

我国不同麦区小麦镰刀菌毒素检测及毒素污染分析

马玉彤¹ 刘太国^{1*} 文才艺² 刘博¹ 高利¹ 陈万权^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 农业部农产品质量安全生物性危害因子(植物源)控制重点实验室, 北京 100193; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 为明确镰刀菌毒素在我国不同小麦产区的污染与分布, 利用超高效液相色谱-串联质谱仪对全国214个小麦品种籽粒中的7种镰刀菌毒素含量进行了测定和比较分析。结果表明: 7种镰刀菌毒素的平均回收率在95.02%~116.52%之间, 相对标准差为6.32%~21.50%。所有测试小麦样品均被镰刀菌毒素污染, 7种毒素中以雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)含量最高, 即使在NIV含量最低的长江中下游冬麦区, 平均含量也高达182.56 μg/kg, 虽然目前并没有关于NIV的相关限量标准, 但也应该予以足够重视; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)含量较高, 在8.07~337.23 μg/kg之间, 低于国家限量标准1 000 μg/kg; T-2含量在4.05~78.05 μg/kg之间, 低于现有国际限量标准100 μg/kg; 玉米赤霉烯酮(zearalmonone, ZEA)含量在5.30~12.50 μg/kg之间, 低于国家限量标准60 μg/kg; 其它3种毒素含量较低, 均低于17.73 μg/kg。不同麦区间毒素比较发现, DON和3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量在长江中下游冬麦区最高, 分别为43.09 μg/kg和6.39 μg/kg, 且显著高于其它麦区; 来自长江中下游冬麦组和黄淮冬麦区南片水地组的小麦品种籽粒中毒素T-2和HT-2的含量显著高于其它麦区; 其余毒素在不同麦区间均无显著差异。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 镰刀菌毒素; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 雪腐镰刀菌烯醇

Determination and contamination of *Fusarium* mycotoxins in different wheat planting regions of China

Ma Yutong¹ Liu Taiguo^{1*} Wen Caiyi² Liu Bo¹ Gao Li¹ Chen Wanquan^{1*}

(1. Key Laboratory of Biological Hazard Factors (Plant Source) Control of Agricultural Products Quality and Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Plant Protection College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: To define the contamination and distribution of mycotoxins caused by wheat *Fusarium* head blight in China, ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometer was used to determine and analyze seven toxins from 214 wheat cultivars. The results showed that the mean recovery rate of seven toxins was between 95.02%–116.52% and the relative standard deviation was 6.32%–21.50%. All wheat cultivars were contaminated. The content of nivalenol (NIV) was the highest, with a minimum content of 182.56 μg/kg in wheat in the middle and lower reaches of the Yangtze River. However, there was no national standards for controlling the content of NIV from wheat cultivars, which should be paid attention to. The volume of deoxynivalenol (DON) was in the range of 8.07–337.23 μg/kg, which was less than 1 000 μg/kg of the national standard. The content of T-2 was from 4.05 μg/kg to 78.05 μg/kg according with international standard under 100 μg/kg. The content of zearalmonone was between 5.30–12.50 μg/kg, lower than the national standard under 60 μg/kg. The contents of 3-acetyl

deoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyl deoxynivalenol and HT-2 were all less than 17.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average contents of DON and 3-ADON were the highest in wheat in the middle and lower reaches of the Yangtze River (43.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 6.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively), significantly higher than those in other wheat planting areas. The average contents of T-2 and HT-2 in the wheat in the middle and lower reaches of the Yangtze River and the irrigated winter wheat in south of Huang-Huai Region were significantly higher than those in other nine wheat regions.

Key words: UPLC-MS/MS; *Fusarium* mycotoxin; deoxynivalenol (DON); nivalenol (NIV)

小麦赤霉病是一种气候性病害,主要发生在多雨、气候潮湿地区(喻璋等,1987),由多种镰刀菌引起,在我国黄淮流域及以北地区以禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 为主,长江中下游地区以亚洲镰孢菌 *F. asiaticum* 为主(史文琦等,2011)。小麦赤霉病在我国麦区均有发生,严重威胁小麦生产,一般流行年份可引起5%~10%的减产,大流行年份甚至颗粒无收(程顺和等,2012),一般在长江中下游冬麦区发生最重、损失最大(霍治国等,1996)。赤霉病不仅造成小麦产量损失,而且在麦粒中会残留毒素,人畜食用后危害健康,有时甚至引起中毒反应。目前污染小麦的镰刀菌毒素主要有脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、T-2、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)和玉米赤霉烯酮(zearalmonone, ZEA)等。

DON 又称呕吐毒素,引起头晕、呕吐、腹泻等症状,长期摄入后会破坏免疫系统, DON 还有很强的细胞毒性,可以抑制蛋白质合成,造成DNA损伤(申红红等,2010)。欧盟规定未加工谷物的DON限量标准为1 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (除硬质小麦、燕麦为1 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (李峻媛等,2011),我国国家标准规定小麦、玉米等粮食作物中的DON含量不能超过1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (樊平声等,2015)。3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl deoxynivalenol, 3-ADON)和15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-ADON)均为DON的前体,在小麦籽粒中多数转化为DON(史建荣等,2014),毒性小于DON。

NIV 分布广泛,毒性比DON更高。苏福荣等(2007)研究结果表明,一些亚洲国家产生NIV的菌系比产生DON的真菌更丰富。但是,相关限量标准至今尚未制定。毒素ZEA 又称F-2,是一种类雌激素,毒性相对较低(Kuipergoodman et al., 1987),食用后常产生恶心、呕吐和腹泻等症状,主要影响动物的生育能力,降低胚胎存活率(Zinedine et al., 2007)。我国国家标准规定粮食中的ZEA含量不能超过60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (刘莹等,2014)。毒素T-2的毒性相对较强,Boonchuvit et al.(1975)在研究中发现T-2具有免疫抑制效应,主要抑制细胞蛋白质和DNA合成(Frankic et al., 2006)。毒素HT-2是T-2的代谢产

物,毒性弱于T-2。1987年,联合国粮农组织和世界卫生组织即规定面粉、大米等禾谷类作物中T-2含量不得超过100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (李峻媛等,2011),但目前我国并没有制定相关的国家标准。

目前,真菌毒素的检测方法较多,薄层色谱法是一种最简单的毒素检测方法,快速、经济、使用设备简单,但其灵敏度较差(Frankic et al., 2006);酶联免疫吸附法具有快速、灵敏、特异、经济、无污染等优点,但抗原与抗体的结合过程容易出现假阴性(薛华丽等,2013),影响测定结果的准确性;高效液相色谱法具有高选择性、准确性和精确性等优点,与四级杆质谱联用,不仅能进行常规的、高通量的生物分析,还可以对多组分生物化合物进行分析,提高定量分析结果的准确度和精确度。本试验拟应用超高效液相色谱-串联四级杆质谱(ultraperformance liquid chromatography - tandem mass spectrometer, UPLC-MS/MS)测定我国11个麦区214个小麦品种籽粒中镰刀菌毒素的含量,明确我国镰刀菌毒素的污染情况,探讨毒素分布与小麦赤霉病流行发生的关系,以期小麦抗病品种的合理布局提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:于2014年9月在我国11个麦区共采集了214个小麦品种的籽粒样品,分别为长江上中游冬麦组24个、长江中下游冬麦组25个、黄淮冬麦区南片冬水组46个、黄淮冬麦区南片春水组16个、黄淮冬麦区北片水地组25个、黄淮冬麦区旱肥组14个、黄淮冬麦区旱薄组11个、北部冬麦区旱地组13个、北部冬麦区水地组10个、北京冬麦区高肥组15个、北京冬麦区节水组15个;健康小麦品种为铭贤169,籽粒由国家冬小麦区域试验品种参试单位提供。

试剂及标准品:乙腈色谱纯、甲醇色谱纯,德国默克公司;其余试剂均为国产分析纯或色谱纯;DON、NIV、T-2、HT-2、ZEA、3-ADON、15-ADON,标准品纯度均不低于国家标准物质中心规定的99%,

青岛普瑞邦生物工程有限公司。

仪器:UPLC-MS/MS,配有电喷雾离子源,沃特世科技(上海)有限公司;Bond Blut Mycotoxin 多功能净化柱,美国安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 流动相种类和比例的选择

质谱的电离在溶液状态下进行,不同的流动相会改变毒素的保留时间和峰形,还会改变各分离组分进入质谱前的离子化效率,进而影响灵敏度(孙娟等,2014)。流动相种类和比例是本试验的处理因素,比较70%甲醇和70%乙腈2种溶液作为流动相对质谱信号和峰型的影响;当确定最佳流动相为甲醇后,再选择乙酸铵作为另一种流动相,考察甲醇-

2 mmol/L 乙酸铵、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵、甲醇-10 mmol/L 乙酸铵对各组分的分离效果和峰型的影响,筛选出最适流动相。不同毒素的化学性质差异大,相较于等度洗脱,梯度洗脱更易使化合物分离,因此采用梯度洗脱的方式分离7种毒素的混合标准溶液,通过调整洗脱程序中的甲醇浓度和洗脱时间,确定最佳洗脱程序。色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH C18柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),进样体积为2 μL,流速为0.1 mL/min,柱温为40℃。质谱分析中采用的离子源为电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI),毒素在正离子模式下采集,喷雾电压为3 000 V;干燥气流速为600 L/h;干燥气温度为350℃,其它参数如表1所示。

表1 7种真菌毒素标准品的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of seven mycotoxin standards

毒素Mycotoxin	母离子Parent ion	子离子Daughter ion	锥孔电压Cove (V)	碰撞能Collision (eV)	离子模式Ion mode
DON	297.3	249.1, 203.1	20, 20	10, 14	ESI+
ZEA	319.1	283.0, 187.3	18, 18	22, 14	ESI+
3-ADON	339.2	231.2, 213.3	20, 20	14, 22	ESI+
15-ADON	339.3	137.1, 261.2	22, 22	10, 12	ESI+
NIV	313.2	281.2, 249.1	50, 50	30, 28	ESI+
T-2	489.3	387.2, 245.1	42, 42	22, 34	ESI+
HT-2	447.3	345.2, 285.1	34, 34	18, 22	ESI+

1.2.2 7种毒素标准曲线的绘制

用80%乙腈溶液逐级稀释DON、ZEA、T-2、HT-2、NIV、3-ADON、15-ADON标准品,最终配成0.1、0.5、5、10、100、200、500、1 000 ng/mL的标准溶液,在1.2.1种筛选出的最佳流动相种类和比例下进行UPLC-MS/MS检测。以标准溶液浓度 x 为横坐标,以目标组分峰面积 y 为纵坐标,绘制7种毒素的标准曲线,用于后续小麦籽粒样品中毒素含量的计算。

1.2.3 供试小麦籽粒样品中7种毒素含量的测定

将214个小麦品种的籽粒分别研磨至细粉状,分装在5号保鲜袋中4℃保存。每个小麦样品准确称量5.0 g粉碎样品,置于50 mL聚乙烯离心管中,加入80%乙腈提取液25 mL,1 600 r/min匀浆2 min,于4℃下以4 000 r/min离心10 min,取上清液。将多功能净化柱与0.22 μm有机微孔滤器连接,用注射器收集4 mL上清液,缓慢推压注射器使滤液依次通过多功能净化柱和0.22 μm有机微孔滤器,收集滤液。利用醋酸盐去除杂质和气泡,处理后的滤液用UPLC-MS/MS检测毒素含量。每个小麦样品3次重复,计算每个麦区小麦样品籽粒中7种毒素的平均值,揭示我同麦区小麦样品中7种毒素的分布情况。

1.2.4 7种毒素回收率检测试验

为验证本试验毒素含量检测方法的准确性,进

行回收率检测试验。称取粉碎均匀的空白小麦样品5.0 g,将7种毒素按照低、中、高3种水平进行添加,分别为2、10、50 μg/kg,根据1.2.3方法处理样品,采用UPLC-MS/MS定量测定7种毒素的含量,不同毒素每个浓度进行3次水平测定。计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.2.5 不同麦区7种毒素的污染情况分析

统计我国11个麦区小麦样品中7种毒素的阳性率和毒素含量的最大值、最小值以及平均值,比较分析不同麦区小麦样品籽粒中毒素的污染情况。

1.3 数据分析

利用SAS 9.2软件对214个小麦品种籽粒中的毒素含量进行单因素方差分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 流动相种类和比例的确定

结果表明,以甲醇作为流动相洗脱效果更好,质谱信号提高,峰形对称。不同浓度乙酸铵会影响质谱的离子化效率,经验证最终采用甲醇-10 mmol/L乙酸铵作为本试验UPLC-MS/MS检测的流动相。调整甲醇浓度(A),确定最佳洗脱程序为0~3 min, 20%~50% A; 3~6 min, 50%~90% A; 6~7 min, 90%

A; 7~8 min, 90%~20% A; 8~10 min, 20% A。在上述条件下得到7种真菌毒素的多反应监测色谱图(图

1), 色谱图反应良好(NIV 色谱图虽有拖带, 但不影响试验结果), 此条件利于毒素的检测。

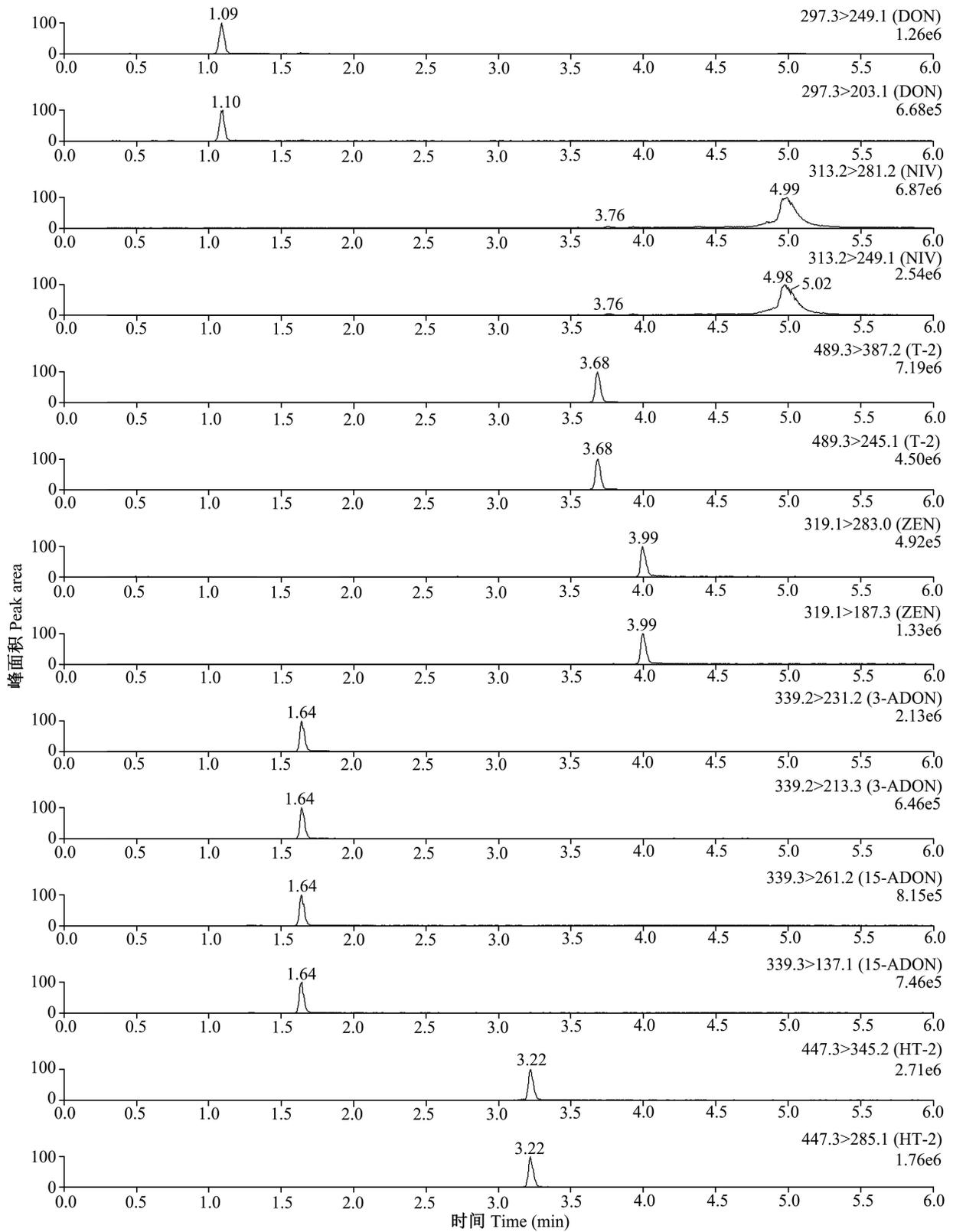


图1 7种真菌毒素混合标准溶液在ESI+模式下的多反应监测色谱图

Fig. 1 Multiple-reaction monitoring chromatograms of mixed solution of seven mycotoxin standards in ESI+

图中数据表述形式为母离子>子离子(毒素), 峰面积。Data in figure are parent ion>daughter ion (mycotoxin), peak area.

2.2 7种毒素标准曲线的建立

根据UPLC-MS/MS检测结果,挑选6组线性良好的数据,以各标准品所测毒素峰面积平均值 y 为

纵坐标、其质量浓度 x 为横坐标绘制标准曲线,所得标准曲线的相关系数均大于0.9969,表明7种毒素在一定质量浓度范围内具有良好的线性关系(表2)。

表2 7种真菌毒素标准品的线性方程和相关系数

Table 2 Calibration curves and correlation coefficients of seven mycotoxin standards

真菌毒素 Mycotoxin	线性范围 Linear range (ng/mL)	线性方程 Calibration curve	R^2
DON	0.10-100.00	$y=205.24x-1644.50$	0.9999
ZEN	5.00-200.00	$y=264.42x-1387.60$	0.9997
NIV	0.10-500.00	$y=-1239.60x+533419.00$	0.9973
15-ADON	5.00-500.00	$y=125.01x-447.89$	0.9999
3-ADON	0.50-500.00	$y=304.63x-1149.40$	0.9969
HT-2	0.10-200.00	$y=444.45x-2763.00$	0.9970
T-2	0.05-200.00	$y=1463.90x+7759.00$	0.9995

2.3 7种真菌毒素的回收率

检测结果表明,7种毒素DON、NIV、T-2、ZEA、T-2、HT-2、3-ADON、15-ADON的平均回收率分别为106.56%、97.03%、91.71%、95.02%、102.65%、

116.52%和103.88%,平均相对标准偏差分别为9.59%、6.32%、11.04%、21.50%、9.95%、11.26%和8.99%(表3)。7种毒素的回收率均较高,证明了本试验方法是可靠的。

表3 7种真菌毒素标准品的回收率

Table 3 Recoveries of seven mycotoxin standards

真菌毒素 Mycotoxin	添加水平 Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 (%) Relative standard deviation
DON	2.00	110.17	9.42
	10.00	138.13	4.04
	50.00	71.38	15.30
NIV	2.00	73.02	6.04
	10.00	115.04	9.69
	50.00	103.02	3.23
T-2	2.00	100.09	11.64
	10.00	61.02	14.18
	50.00	114.03	7.29
ZEA	2.00	94.13	29.13
	10.00	133.01	32.21
	50.00	57.91	3.16
HT-2	2.00	66.78	15.90
	10.00	127.01	6.60
	50.00	114.17	7.34
3-ADON	2.00	102.90	7.38
	10.00	117.03	13.20
	50.00	129.63	13.02
15-ADON	2.00	135.00	16.00
	10.00	95.04	5.64
	50.00	81.62	5.33

2.4 供试小麦品种籽粒中7种毒素的污染情况

所有检测的小麦样品均被7种毒素所污染,污染情况比较普遍,其中214个小麦品种中NIV含量最高,最大值为393.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均值为273.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但目前国内外未制定有关NIV的限量标准;DON的含量略低于NIV的含量,在8.07~337.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,低于国家规定的限量标准1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$;T-2的含量为4.05~78.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$,低于现有国际限量标准100 $\mu\text{g}/\text{kg}$;

ZEA含量的最大值为12.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,最小值为5.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,低于国家限量标准60 $\mu\text{g}/\text{kg}$;HT-2、3-ADON和15-ADON的含量均低于17.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$,当前国内外均未制定相关限量标准(表4)。

2.5 不同麦区间7种毒素含量的分析

NIV在11个小麦产区的污染情况最严重,11个麦区的NIV含量均较高,最高可达316.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即使在含量最低的长江中下游冬麦区,NIV含量也高

达 182.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$; DON 在长江中下游冬麦区的含量最高, 为 43.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 显著高于其它麦区, 毒素 3-ADON 与 DON 在各地区的分布特点相似, 但 3-ADON 在各麦区的平均含量均较低, 最大值为 6.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2 在长江中下游冬麦区和黄淮冬麦区南片冬水组的含量

最高, 分别为 71.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 68.49 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 与其它小麦产区差异显著, 毒素 HT-2 与 T-2 在各个麦区分布相似, 但含量均较低; 毒素 15-ADON 和 ZEA 在各个麦区的平均含量均低于 9.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 且各个麦区间差异不显著(表 5)。

表 4 7 种真菌毒素在 11 个小麦主产区的污染情况

Table 4 Contamination of seven mycotoxins in 11 wheat-planting regions

毒素 Toxin	污染率 (%) Contamination rate	平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Average	最大值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Maximum	最小值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Minimum	国家/国际限量标准 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) National/International standard
DON	100.00	15.49	337.23	8.07	1 000.00
T-2	100.00	22.89	78.05	4.05	100.00
ZEA	100.00	7.18	12.50	5.30	60.00
3-ADON	100.00	4.87	17.73	2.00	-
15-ADON	100.00	6.88	15.40	3.73	-
HT-2	100.00	7.03	10.00	5.05	-
NIV	100.00	273.44	393.70	73.35	-

表 5 我国 11 个麦区小麦籽粒中 7 种真菌毒素的含量及差异性

Table 5 Distribution of seven mycotoxins and differences among 11 wheat-planting regions in China

小麦种植区域 Wheat-planting area	毒素含量 Toxin content ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							样品数 No. of samples
	NIV	DON	T-2	HT-2	3-ADON	15-ADON	ZEA	
长江上游冬麦组 The winter wheat of the upper reaches of Yangtze River	264.93 \pm 73.59 bc	16.48 \pm 11.11 b	7.89 \pm 0.52 c	6.79 \pm 0.45 b	5.09 \pm 0.62 b	7.02 \pm 1.89 abc	7.12 \pm 1.51 a	24
长江中下游冬麦组 The winter wheat of the middle and lower reaches of Yangtze River	182.56 \pm 72.89 d	43.09 \pm 69.71 a	71.01 \pm 8.26 a	7.54 \pm 0.62 a	6.39 \pm 3.15 a	7.69 \pm 3.08 ab	7.40 \pm 1.35 a	25
黄淮冬麦区南片冬水组 The irrigated winter wheat in south of Huang-Huai Region	234.92 \pm 58.31 c	14.28 \pm 13.42 b	68.49 \pm 3.23 a	7.45 \pm 0.39 a	4.93 \pm 0.55 b	7.01 \pm 2.64 abc	7.35 \pm 0.88 a	46
黄淮冬麦区南片春水组 The irrigated spring wheat in south of Huang-Huai Region	243.11 \pm 60.67 c	21.99 \pm 19.97 b	36.29 \pm 26.76 b	6.95 \pm 0.36 b	5.13 \pm 0.64 b	7.36 \pm 1.85 ab	9.14 \pm 1.02 a	16
黄淮冬麦区北片水地组 The irrigated winter wheat in north of Huang-Huai Region	245.82 \pm 50.82 c	13.08 \pm 9.32 b	8.27 \pm 0.67 c	6.95 \pm 0.42 b	4.74 \pm 0.50 b	6.25 \pm 1.93 bc	7.36 \pm 1.01 a	25
黄淮冬麦区旱肥组 The arid and fertile winter wheat in Huang-Huai Region	294.89 \pm 41.91 ab	14.02 \pm 10.05 b	7.68 \pm 0.47 c	7.02 \pm 0.32 b	4.58 \pm 0.53 b	6.95 \pm 1.97 abc	7.74 \pm 1.61 a	14
黄淮冬麦区旱薄组 The arid and infertile winter wheat in Huang-Huai Region	311.81 \pm 17.98 a	10.22 \pm 3.77 b	7.52 \pm 0.75 c	6.96 \pm 0.48 b	4.57 \pm 0.34 b	5.21 \pm 1.08 c	8.02 \pm 1.14 a	11
北部冬麦区旱地组 The dryland winter wheat in north of China	303.62 \pm 34.12 ab	9.00 \pm 1.02 b	7.65 \pm 0.73 c	7.04 \pm 0.93 b	4.49 \pm 0.36 b	6.13 \pm 1.66 bc	7.52 \pm 1.13 a	13
北部冬麦区水地组 The irrigated winter wheat in north of China	295.96 \pm 21.93 ab	9.66 \pm 2.94 b	7.71 \pm 0.74 c	6.83 \pm 0.70 b	4.51 \pm 0.25 b	6.59 \pm 2.08 abc	9.21 \pm 1.71 a	10
北京冬麦区高肥组 The high fertile winter wheat in Beijing	313.98 \pm 30.19 a	10.07 \pm 4.18 b	7.19 \pm 1.43 c	7.02 \pm 0.36 b	4.55 \pm 0.33 b	8.152 \pm 2.50 a	8.58 \pm 1.20 a	15
北京冬麦区节水组 The water-saving winter wheat in Beijing	316.39 \pm 37.36 a	9.88 \pm 2.94 b	7.06 \pm 0.97 c	6.74 \pm 0.31 b	4.44 \pm 0.77 b	7.31 \pm 1.65 ab	8.11 \pm 1.12 a	15

表中数据为平均数 \pm 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean \pm SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本试验中检测的214个小麦品种为我国2014年主要育种单位育成的冬、春小麦品种,部分品种审定后可在各大麦区推广种植,毒素检测结果对小麦的食品安全具有现实意义。2014年全国小麦赤霉病发生水平较低,而且所检测小麦籽粒样品表面并无明显的发病症状,但是毒素检测结果表明,这214个小麦品种均被7种毒素污染。因此,针对镰刀菌毒素的检测,不应仅仅局限于病害大发生年或者表面存在发病症状的小麦麦粒,应提高小麦品种的检测范围与水平,以保障食品安全。目前,国内/国际上对部分镰刀菌毒素如DON、ZEA、T-2有相关的限量规定,但尚未统一。因此,建立高效的检测体系,同时制定完善的毒素限量标准,对于小麦的安全生产具有重要意义。

目前,国家测定毒素的标准方法为免疫亲和净化-液相色谱法,该方法虽然稳定性好,准确性高,但是前处理复杂,成本较高(孙娟等,2014)。近年来,UPLC-MS/MS在检测真菌毒素方面应用甚广(Royer et al., 2004; Berthiller et al., 2005),其灵敏度更高,稳定性和复现性较好。孙娟等(2014)采用UPLC-MS/MS法检测了2011、2012和2013年全国1350份小麦样品和华北地区157份玉米样品中真菌毒素含量,发现与国家标准测量方法所得结果相吻合,证实了UPLC-MS/MS方法的准确性和可靠性。本试验采用UPLC-MS/MS法进行毒素回收率检测,发现7种毒素的平均回收率在95.02%~116.52%之间,平均相对标准偏差在6.32%~21.50%之间,毒素回收水平较高,表明所用方法可靠。

本试验检测结果表明,除NIV外,其余6种毒素含量均较低,且符合现有国内/国际毒素限量标准。NIV的平均含量为273.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即使在毒素含量最低的长江中下游冬麦区,含量也高达182.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。一方面,近年来产生NIV的病原菌群体呈上升趋势。如在亚洲地区, Lee et al. (2009)从韩国分离的亚洲镰孢菌菌株中,发现70%的菌株产生NIV; Shen et al. (2012)研究发现,在中国存在产3-ADON的镰孢菌群体向产NIV群体转化的基因流。另一方面,不同的储存条件也会影响小麦中部分毒素含量的变化,如姚振宇等(2016)发现,当小麦储存于地下库和常温库时,在含水量分别为11.5%、12.8%、15.7%的条件下存储60 d后,籽粒中NIV含量未发生显著变化,而DON含量显著降低。Pettersson et al. (1995)发现用含有500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ NIV的饲料喂食鸡,

无中毒反应,以NIV含量为600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的饲料喂食的影响都较小。目前,尽管关于NIV在临床试验方面的影响数据尚未见发表,国际上也尚未制定NIV的限量标准,但是基于食品安全的考量,国家有关部门应予以重视,尽快制定NIV的限量标准。

长江中下游是小麦赤霉病的高发区,但是NIV在长江中下游麦区的含量反而低于其它麦区。史文琦等(2011)曾对长江流域的镰刀菌毒素进行研究,发现我国的镰刀菌毒素存在着明显的地理分布差异,NIV主要分布在长江上游麦区,而DON主要集中在长江中下游麦区。但是,目前关于NIV在我国其它麦区的分布情况未见报道。其它6种毒素主要分布在长江中下游麦区和黄淮冬麦区南片冬水组,这些麦区温、湿度适宜,是小麦赤霉病高发区,危害严重(Chen et al., 2008)。本研究结果表明,部分镰刀菌毒素含量的高低和小麦赤霉病的流行发生区域具有相关性,这一推测也与吴杰等(2009)利用酶联免疫吸附法检测的结果一致。所以,建立更加快速、准确的检测手段,对我国小麦品种镰刀菌毒素含量进行检测,不仅可以保障食品安全,同时可以更好地了解小麦赤霉病的发生与流行。

致谢:中国农业科学院植物保护研究所农业部农产品质量安全生物性危害因子(植物源)控制重点实验室王涛老师和河南农业大学植物保护学院李小会参加了本试验部分工作,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R. 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1062: 209-216
- Boonchuvit B, Hamilton PB, Burmeister HR. 1975. Interaction of T-2 toxin with *Salmonella* infections of chickens. *Poultry Science*, 54(5): 1693-1696
- Chen Y, Li HK, Chen CJ, Zhou MG. 2008. Sensitivity of *Fusarium graminearum*, to fungicide JS399-19: *in vitro*, determination of baseline sensitivity and the risk of developing fungicide resistance. *Phytoparasitica*, 36(4): 326-337
- Cheng SH, Zhang Y, Bie TD, Gao DR, Zhang BQ. 2012. Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 28(5): 938-942 (in Chinese) [程顺和, 张勇, 别同德, 高德荣, 张伯桥. 2012. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良. *江苏农业学报*, 28(5): 938-942]
- Fan PS, Zhou MG, Chen CJ, Wang JX. 2015. Study on the control in-

- dex of wheat dead blight caused by *Gibberella zeae*. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 34(5): 81-85 (in Chinese) [樊平声, 周明国, 陈长军, 王建新. 2015. DON毒素作为小麦赤霉病损失率评估及防治指标的研究. 山地农业生物学报, 34(5): 81-85]
- Frankic T, Pajk T, Rezar V, Levart A, Salobir J. 2006. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. Food & Chemical Toxicology, 44(11): 1838-1844
- Huo ZG, Yao CW, Jiang RZ, Zhao SJ. 1996. A study on prediction models of maximum entropy method of winter wheat scab in China. Acta Phytopathologica Sinica, 26(2): 117-122 (in Chinese) [霍治国, 姚彩文, 姜瑞中, 赵圣菊. 1996. 我国小麦赤霉病最大熵谱预报模式研究. 植物病理学报, 26(2): 117-122]
- Kuipergoodman T, Scott PM, Watanabe H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. Regul Toxicol Pharmacol, 7(3): 253-306
- Lee JK, Chang IY, Kim H, Yun SH, Leslie JF, Lee YW. 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. Applied & Environmental Microbiology, 75(10): 3289-3295
- Li JY, Wan L, Yang MH. 2011. Limit standard of mycotoxins and advances in studies on its application in Chinese materia medica. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 42(3): 602-609 (in Chinese) [李峻媛, 万丽, 杨美华. 2011. 真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展. 中草药, 42(3): 602-609]
- Liu Y, Wang PY, Liu XP, Wang JH, Liang NN, Han S. 2014. Review of current Chinese regulations of maximum residue levels and testing standard of mycotoxin in foods and feeds. China Brewing, 33(7): 10-19 (in Chinese) [刘莹, 王珮玥, 刘雪平, 王金凤, 梁娜娜, 韩深. 2014. 我国现行食品与饲料中真菌毒素限量及检测标准概述. 中国酿造, 33(7): 10-19]
- Pettersson H, Hedman R, Engström B, Elwinger K, Fossum O. 1995. Nivalenol in Swedish cereals: occurrence, production and toxicity towards chickens. Food Additives and Contaminants, 12(3): 373-376
- Royer D, Humpf HU, Guy PA. 2004. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants, 21(7): 678-692
- Shen CM, Hu YC, Sun HY, Li W, Guo JH, Chen HG. 2012. Geographic distribution of trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat production areas of China. Plant Disease, 96(968): 1172-1178
- Shen HH, Yang MH, Ouyang Z. 2010. Advances in studies on DON and NIV of *Fusarium* toxin. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 38(16): 8425-8428 (in Chinese) [申红红, 杨美华, 欧阳臻. 2010. 镰刀菌毒素 DON 和 NIV 研究进展. 安徽农业科学, 38(16): 8425-8428]
- Shi JR, Liu X, Qiu JB, Ji F, Xu JH, Dong F, Yin XC, Ran JJ. 2014. Deoxynivalenol contamination in wheat and its management. Scientia Agricultura Sinica, 47(18): 3641-3654 (in Chinese) [史建荣, 刘馨, 仇剑波, 祭芳, 徐剑宏, 董飞, 殷宪超, 冉军舰. 2014. 小麦中镰刀菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染现状与防控研究进展. 中国农业科学, 47(18): 3641-3654]
- Shi WQ, Yang LJ, Feng J, Zhang X, Zeng FS, Xiang LB, Wang H, Yu DZ. 2011. Analysis on the population structure of *Fusarium* pathogenic spp. and its mycotoxin chemotypes in *Fusarium* head blight epidemic region. Acta Phytopathologica Sinica, 41(5): 486-494 (in Chinese) [史文琦, 杨立军, 冯洁, 张旭, 曾凡松, 向礼波, 汪华, 喻大昭. 2011. 小麦赤霉病流行区镰刀菌致病种及毒素化学型分析. 植物病理学报, 41(5): 486-494]
- Su FR, Song X, Sun H, Liu H. 2007. The state of mycotoxin maximum limit of grain. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 15(6): 57-59 (in Chinese) [苏福荣, 松雪, 孙辉, 刘焯. 2007. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析. 粮油食品科技, 15(6): 57-59]
- Sun J, Li WX, Zhang Y, Sun LJ, Dong XL, Hu XX, Wang BJ. 2014. Simultaneous determination of twelve mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Acta Agronomica Sinica, 40(4): 691-701 (in Chinese) [孙娟, 李为喜, 张妍, 孙丽娟, 董晓丽, 胡学旭, 王步军. 2014. 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物 12 种真菌毒素. 作物学报, 40(4): 691-701]
- Wu J, Liu TG, Gao L, Zhu BC, Chen WQ. 2009. Determination of 4 *Fusarium* mycotoxins using enzyme-linked immunosorbent assay and its contamination analysis in wheat. Journal of Plant Protection, 36(2): 106-112 (in Chinese) [吴杰, 刘天国, 高利, 朱宝成, 陈万权. 2009. 小麦四种镰刀菌毒素的 ELISA 检测及毒素污染分析. 植物保护学报, 36(2): 106-112]
- Xue HL, Bi Y, Wang Y, Ge YH, Li YC. 2013. Advance on toxicity, detection and detoxification of trichothecenes. Food Science, 34(17): 350-355 (in Chinese) [薛华丽, 毕阳, 王毅, 葛永红, 李永才. 2013. 单端孢霉烯族毒素毒性、检测和脱毒研究进展. 食品科学, 34(17): 350-355]
- Yao ZY, Yin XC, Yu MZ, Dong F, Ji F, Xu JH, Shi JR. 2016. Effect of water content and storage conditions on DON and NIV in wheat during storage. Jiangsu Agricultural Sciences, 44(12): 300-303 (in Chinese) [姚振宇, 殷宪超, 俞明正, 董飞, 祭芳, 徐剑宏, 史建荣. 2016. 含水量、储存条件对储存期小麦中 DON、NIV 毒素含量变化的影响. 江苏农业科学, 44(12): 300-303]
- Yu Z, Guo TC, Chen ZS, Li DW, Liu QY. 1987. Wheat *Fusarium* head blight and its management. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, pp. 31-39 (in Chinese) [喻璋, 郭天财, 陈志申, 李大伟, 刘庆元. 1987. 小麦赤霉病及其防治. 郑州: 河南科学技术出版社, pp. 31-39]
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food & Chemical Toxicology, 45(1): 1-18