

白油佐剂中正烷烃在鸡肉中的残留 消除规律的研究

赵东伟¹, 陈世豪^{1,2}, 施祖灏¹, 陈大伟¹, 张云山^{1,2}, 陆俊贤¹, 高玉时^{1*}, 王杏龙²

(1. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225100; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225100)

摘要: **目的** 研究白油佐剂中正烷烃在鸡肉中的残留消除规律。**方法** 试验选用 15 d 的苏禽黄鸡作为研究对象, 右侧胸肌注射 0.5 mL 白油。注射后的 d 3、d 7、d 14、d 21、d 28、d 35 和 d 42 分别采集 5 只鸡的胸肌, 测定其中正烷烃残留量。**结果** d 3 正烷烃残留浓度最高, 正烷烃残留量随着饲养时间的延长逐渐下降, d 7, 下降至 14.98 mg/kg, 已符合 FAO 及 WHO 关于食品中白油残留量不超过 20 mg/kg 的规定。**结论** d 3~7 内各个烷烃残留量下降速度较快, 尤其短链烷烃在该时间段内下降量和下降速度都达到了最高值; 相对于短链烷烃, 长链烷烃消除或者迁移速度相对较慢, 在鸡肉中需要更长时间才能代谢完全。

关键词: 白油佐剂; 正烷烃; 鸡肉; 消除规律; 代谢

Research on remove rule of white oil adjuvant n-alkanes residual in the chicken

ZHAO Dong-Wei¹, CHEN Shi-Hao^{1,2}, SHI Zu-Hao¹, CHEN Da-Wei¹, ZHANG Yun-Shan^{1,2},
LU Jun-Xian¹, GAO Yu-Shi^{1*}, WANG Xing-Long²

(1. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225100, China;
2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225100, China)

ABSTRACT: Objective To research the remove rule of residual of white oil adjuvant n-alkanes in the chicken. **Methods** The Suqin yellow chickens of 15-d-old were injected 0.5 mL white oil to right chest muscle. After injection, the samples of chest muscle of 5 tested chicken were taken and residue analysis of white oil at d 3, d 7, d 14, d 21, d 28, d 35 and d 42 were studied. **Results** The n-alkanes residual is of the highest at d 3, concentrations of n-alkanes decline gradually as the change of time. At d 7, white oil dropped to 14.98 mg/kg, having conformed to the rule that white oil added in the food additives should not exceed 20 mg/kg, established by FAO and WHO. **Conclusion** Within 3~7 d, n-alkanes residue declined faster, especially short chain alkanes decreasing quantity and speed reached the highest value in this period. Compared with the short chain alkanes, the long chain alkanes eliminated and migrated relatively slower, needing more time to be metabolized completely in the chicken.

KEY WORDS: white oil; n-alkanes; chicken; remove rule; metabolism

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD39B04-3)、国家畜禽产品质量安全风险项目(2014GJFP2014007)、扬州市科技攻关计划(yz2012079)

Fund: Supported by National Key Technology R&D Program (2012BAD39B04-3), National Poultry Product Quality Safety Risk Assessment Project(2014GJFP2014007) and Yangzhou Scientific and Technological Program (yz2012079)

*通讯作者: 高玉时, 研究员, 主要研究方向为家禽品质评价与质量安全控制。E-mail: gaoy100@sina.com

*Corresponding author: GAO Yu-Shi, Researcher, Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225100, China. E-mail: gaoy100@sina.com

1 引言

白油(white oil), 别名液体石蜡, 为石油经过特殊精制后的矿物油, 为液态烃类的混合物。白油无色、无味、化学惰性、光安定性能好, 主要成分为 C₁₆-C₃₁ 的正异构烷烃的混合物, 分子量通常在 250 ~ 450^[1]。因来源广泛、价格适宜, 白油被广泛应用于动物油乳剂疫苗的生产, 是油乳剂疫苗的主要成分, 可增强灭活疫苗的免疫原性, 诱导机体产生有效的免疫应答^[2]。目前, 我国重大禽病防控的疫苗多为油乳剂灭活苗, 所采用的佐剂多数为白油, 而白油在肉鸡体内代谢完全需要较长时间^[3-5]。在家禽饲养过程中, 为了降低禽病爆发的风险, 养殖户往往频繁使用甚至不合理使用油乳剂灭活苗, 必会导致过多的白油残留在畜禽体内, 食用有白油残留的畜产品, 可能会损害消费者身体健康。

由于矿物油不能被机体代谢, 因此会产生一系列副作用, 导致注射部位肉芽肿现象, 出现炎症, 疫苗被包裹起来形成游离的肿块, 这时肉鸡出现精神不振, 采食下降等免疫应激症状, 还易引起其他疾病, 免疫抗体水平也未达到预期效果^[6]。人体内积蓄一定浓度的白油, 可能会引发病症^[7,8]。2009 年, 欧盟食品安全局(ESFA)发表了关于白油添加剂的科学使用意见, 即每天食物中白油总量不超过 12 mg/kg·bw^[9]。FAO 及 WHO 食品添加剂联合委员会也声明, 高粘度的白油在食品中的添加不得超过 20 mg/kg^[10]。因此, 本试验通过测定注射白油后不同时间点肉鸡胸肌中

正烷烃残留量的变化, 探明白油在鸡肉中残留消除规律, 为油乳剂疫苗的合理使用和肉品安全提供科学依据, 从而保障鸡肉品质以及消费安全。

2 材料与方法

2.1 仪器

气相色谱-质谱联用仪: Agilent6890A, 美国 Agilent 公司; 色谱柱: Agilent DB-1ms (60.0 m×0.32 mm×0.25 μm), 美国 J&W 公司; 高速冷冻离心机: 3-30 K, 美国 Sigma 公司; 机械振荡器: HS501, 德国 IKA 公司; 氮吹仪: N-EVA, 美国 Organomation Associates 公司; 水浴锅: HH-S4, 金坛市医疗仪器厂; 电子天平: AB104-L(感量 0.1 mg), 瑞士 METTLER TOLEDO 公司。

2.2 药品及试剂

白油: 扬州优邦生物制药有限公司; 正烷烃混合标准品: 500 ng/μL(C₁₀-C₃₅), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 尿素: 优级纯, 美国 SIGMA 公司; 正己烷: 色谱纯, 德国 CNW 公司; 甲醇: 色谱纯, 德国 Merck 公司; 二氯甲烷: 色谱纯, 德国 CNW 公司; 异辛烷: 农残级, 国药集团化学试剂有限公司。

2.3 试验设计及饲养管理

试验在国家家禽生产性能测定站进行, 厚垫料平养, 人工控温, 自由采食和饮水, 试验过程中未用过任何免疫。选取 50 只 15 d 的苏禽黄鸡, 右侧胸肌均注射 0.5 mL 白油。注射后 d 3、d 7、d 14、d 21、d 28、d 35 和 d 42 分别采集 5 只试验肉鸡的胸肌, 绞碎, 置样品袋, -20 °C 保存。

2.4 样品前处理

2.4.1 正烷烃的提取

准确称取 2.00±0.01 g 经绞碎混匀的鸡胸肌肉样品于 50 mL 离心管内, 加入 5 mL 正己烷机械振荡 30 min, 离心取上清液; 残渣再加 5 mL 正己烷振荡复提一次, 合并提取液于 15 mL 离心管, 氮吹至干, 用 0.5 mL 二氯甲烷溶解待用。

2.4.2 尿素络合

向上述提取液中加入 4 mL 饱和尿素甲醇溶液进行尿素络合反应, 稍振荡后置 4 °C 冰箱过夜(>12 h); 取络合后的样品加入 2~3 mL 异辛烷振荡洗涤, 静置分层后弃去上层异辛烷, 以除去未被络合的有机组分; 加 2 mL 5%稀盐酸、1 mL 正己烷, 100 °C 水浴溶解絮状沉淀, 取出离心管振荡萃取上层有机组分至 10 mL 离心管中, 再用 2 mL 正己烷萃取两次; 萃取液用氮气吹干, 用正己烷定容至 1 mL, 供 GC-MS 分析测定。

2.5 色谱条件

2.5.1 气相色谱条件

色谱柱: Agilent DB-1 ms (60.0 m×0.32 mm×0.25 μm); 载气: 氦气, 纯度≥99.999%, 1 mL/min, 不分流进样, 进样量 1 μL; 进样口温度: 280 °C; 程序升温: 见表 1。

2.5.2 质谱条件

传输线温度: 280 °C;

离子源温度: 230 °C;
 真空室温度: 150 °C;
 溶剂延迟时间: 6.5 min;
 离子化方式: 电轰击电离(EI), 电离能量 70 eV;
 质谱检测方式: 全扫描/选择离子监测同步;
 全扫描模式(SCAN), 扫描范围(m/z)为 40 ~ 500;
 选择离子监测模式(SIM), C_{16} - C_{24} 定量离子(m/z)
 分别为: 226.0、240.0、254.0、268.0、284.0、292.0、
 310.0、324.0、338.0。

表 1 升温程序
 Table 1 Oven program

	升温速率 (°C/min)	温度 (°C)	保持时间 (min)	保留时间 (min)
初温		100	1	1
阶段 1	20	200	1	11
阶段 2	8	320	5	27

3 结果

注射白油后, d 3、d 7、d 14、d 21、d 28、d 35 和 d 42 胸肌中 9 种正烷烃(C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 、 C_{23} 和 C_{24})残留浓度及正烷烃总量(n-alkanes)见表 2, d 21 胸肌中正烷烃残留的选择离子色谱图见图 1。

由表 2 可见, 在 7 个检测点中, d 3 白油残留浓度

最高, 随着饲养时间延长, 胸肌内烷烃浓度逐渐下降, 其中正十六烷、正十七烷和正十九烷在 d 42 后浓度已降至检测限以下。白油中, 正十七烷、正十八烷、正十九烷和正二十烷较其他烷烃含量高, 且在鸡肉中消除速率较快, 正二十四烷的浓度较低, 消除速率最慢。注射白油 3 d 后, 胸肌中正烷烃总量达 30.58 mg/kg, d 7, 下降至 14.98 mg/kg, 随饲养时间延长残留浓度逐步下降, d 42 残留量为 2.17 mg/kg。

各个烷烃在 d 3 ~ d 7 消除曲线的斜率最大, 即消除速率最快; 在 d 7 ~ d 14, 正二十一烷、正二十三烷下降较快; d 14 以后, 除正二十烷下降较快外, 其他烷烃的消除曲线均趋于平缓, 但总体呈下降趋势。

4 讨论

从表 2 可以看出, 注射白油后, d 3 白油残留量在 7 个检测时间点中最高, d 3 ~ d 7 白油残留下降低率最快, 残留量下降最多, 而 d 7 ~ d 14, 白油残留下降低率趋于平缓, 且下降量变化不大, 说明肉鸡在注射白油后 d 3 内没有完全吸收, 注射点聚集的油滴导致检测值异常高, d 7 后白油则逐步吸收至肌肉中。而河海荣等^[10]研究指出白油制成的油乳剂疫苗给鸡肉注射 d 20 后, 仍肉眼可见未吸收的黄稠液体, 可能是因为白油经乳化后物理性质发生变化致机体吸收困

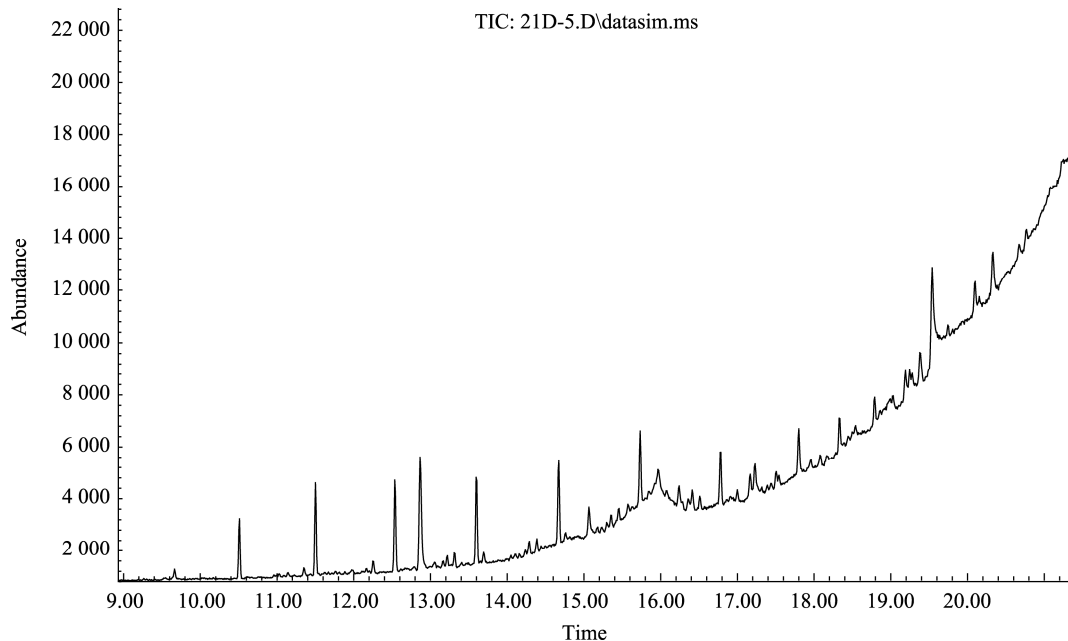


图 1 第 21 天胸肌中正烷烃残留的选择离子色谱图

Fig. 1 Select ion chromatogram of n-alkanes residues of d 21 chicken sample

表 2 肉鸡胸肌中正烷烃残留量($n=5$)
Table 2 Residues of n-alkanes in broiler breast muscle ($n=5$)

正烷烃	残留量(mg/kg)						
	3d	7d	14d	21d	28d	35d	42d
n-C ₁₆	3.18±0.08	1.21±0.08	1.08±0.10	0.75±0.06	0.56±0.07	0.19±0.04	ND*
n-C ₁₇	4.40±0.12	1.54±0.09	1.54±0.13	0.63±0.09	0.42±0.08	0.18±0.11	ND*
n-C ₁₈	4.33±0.13	1.88±0.08	1.39±0.09	0.99±0.07	0.72±0.15	0.40±0.06	0.21±0.09
n-C ₁₉	4.02±0.13	1.76±0.11	1.25±0.05	0.97±0.11	0.59±0.10	0.31±0.09	ND*
n-C ₂₀	4.77±0.09	1.75±0.12	1.78±0.07	0.98±0.10	0.83±0.09	0.67±0.08	0.32±0.02
n-C ₂₁	3.29±0.15	2.94±0.09	1.29±0.12	1.09±0.13	1.02±0.08	0.75±0.10	0.44±0.05
n-C ₂₂	3.37±0.07	1.53±0.13	1.22±0.13	1.03±0.09	1.08±0.12	0.81±0.12	0.47±0.05
n-C ₂₃	2.09±0.10	1.33±0.11	0.79±0.11	0.75±0.06	0.63±0.09	0.40±0.09	0.20±0.08
n-C ₂₄	1.35±0.11	0.94±0.09	0.94±0.08	0.91±0.09	0.63±0.13	0.48±0.05	0.35±0.09
n-alkanes	30.58±0.14	14.98±0.11	11.30±0.15	8.43±0.11	6.70±0.13	4.56±0.17	2.17±0.11

注: ND-无检测值

难,同时也反映了白油经乳化制成的油乳剂疫苗能在相当长的时间内发挥免疫刺激作用。胡瑞鸿等^[12]研究指出,在机器条件允许的情况下,充分乳化白油佐剂,可降低白油佐剂的黏度,易于注射和吸收;反之,如果乳化不充分,黏度较大,不利于注射和吸收,极有可能导致注射部位病变,抗体产生的效果也不理想。

研究表明,正十二烷、正二十一烷及正二十三烷在 d 14 时下降速率较其他烷烃仍然较快,说明这 3 种烷烃被肌肉吸收的速率最慢;正十六烷、正十七烷、正十八烷和正十九烷在胸肌中的残留下降速度明显高于正二十四烷,而其他烷烃则介于之间,说明白油中短链烷烃在鸡肉中的代谢速率比长链烷烃快,这与刘亮等的研究结果^[13]一致。Wilner 等^[14]使用了 9 种正构烷烃和 11 种异构烷烃制成的 w/o 乳液作为佐剂,在豚鼠等动物身上进行了矿物油毒性和脊髓灰质炎、流感疫苗效价的测定。结果显示,烷烃的分子量越大,毒性越小,但是佐剂活性也越低。在 C₂₄ 以上,毒性反应已经较小。C₁₆~C₂₀ 之间的烷烃不但表现出较好的活性,且代谢速度快,毒副作用小。因生产工艺、生产出的白油型号的不同,它们所含的烃类及其比例也有差异,这对白油佐剂的活性和副作用有重要的影响。

白油中主要成分为 C₁₆~C₃₁ 的正异构烷烃的混合物,但因异构烷烃成分复杂,在非极性毛细管柱上无法分离,在色谱图上呈现基线上隆的“鼓包峰”或者

“未分峰”^[15],无法定量白油的含量,所以本研究以检测白油中正烷烃成分,作为评估鸡肉中白油的残留。注射白油 3 d 后,肉鸡胸肌正烷烃为 30.58 mg/kg, d 7,正烷烃总量下降至 14.98 mg/kg,这说明注射白油 d 7 后,胸肌内白油正烷烃残留总量已达到 FAO 及 WHO 食品添加剂联合委员会关于白油在食品中添加最多不超过 20 mg/kg 的规定。

5 小 结

短链烷烃在胸肌注射白油后至 42 d 内,其残留量已降至检测限以下,在 3 ~ 7 d 内各个烷烃残留量下降速度较快,尤其短链烷烃在该时间段内下降量和下降速度都达到了最高值;相对于短链烷烃,长链烷烃整个消除曲线都呈平缓下降,且长链烷烃在 42 d 内仍有检测值,其消除或者迁移速度相对较慢,在鸡肉中需要更长时间代谢完全。

参考文献

- [1] 李立权. 白油及白油生产技术[J]. 润滑油, 2003, 18(4): 1-6.
Li LQ. White oil and technology [J]. Lubrication oil, 2003, 18(4): 1-6.
- [2] 潘杭君, 孙红祥. 免疫佐剂研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(1): 32-37.
Pan HJ, Sun HX. Research progress of immunologic adjuvant [J]. Chin J Vet Drug, 2004, 38(1): 32-37.
- [3] 刘亮, 李阳友, 李丽芳. GC-MS 法检测白油在鸡体肌胃、腺胃和小肠的残留[J]. 川北医学院学报, 2011, 26(4): 299-301.

- Liu L, Li YY, Li LF. Detection of white oil in muscular stomach, glandular stomach and small intestine of chicken by GC-MS [J]. North Sichuan Med Univ J, 2011, 26(4): 299–301.
- [4] 王振辉, 慈洪波, 武桂梅, 等. 不同来源注射用白油佐剂免疫效果分析[J]. 中国家禽, 2013, 35(19): 48–50.
Wang ZH, Ci HB, Wu GM, *et al.* Immune effect analysis of different sources white oil adjuvants [J]. China Poultry, 2013, 35, (19): 48–50.
- [5] 顾祥国, 江裕吉, 吴永兵, 等. 肉禽肌肉注射禽流感疫苗后的吸收情况观察[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 5: 39.
Gu XG, Jiang YJ, Wu YB, *et al.* The absorption of observation of the poultry muscle injection on bird flu vaccine [J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2005, 5: 39.
- [6] 王传强, 董伟峰, 吴春滨, 等. 产蛋鸡疫苗免疫应激反应的原因及对策[J]. 家禽科学, 2005, 10: 29–30.
Wang CQ, Dong WF, Wu CB, *et al.* The causes and countermeasures of immune stress reaction of layer chicken vaccine [J]. Poultry Sci, 2005, 10: 29–30.
- [7] Nash JF, Getting SD, Diembeck W, *et al.* A toxicological review of topical exposure to white mineral oils [J]. Food Chem Toxicol, 1996, 34: 213–225.
- [8] Ciancio SJ, Coburn M. Penile salvage for squamous cell carcinoma associated with mineral oil injection [J]. J Urology, 2000, 164: 1650.
- [9] Aguilar F, Charrondiere UR, Dusemund B, *et al.* Scientific opinion on the use of high viscosity white mineral oil as a food additive [J]. ESFA J, 2009, 7(11): 1387–1426.
- [10] Mondello L, Zoccali M, Purcaro G, *et al.* Determination of saturated hydrocarbon contamination in baby foods by using on-line liquid-gas chromatography and off-line liquid chromatography-comprehensive gas chromatography combined with mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2012, 1259: 221–226.
- [11] 何海蓉, 姜平, 梅忠. 不同来源白油佐剂质量分析及其制备的禽流感疫苗安全性与免疫效力研究[J]. 中国家禽, 2009, 31(22): 15–18.
- He HR, Jiang P, Mei Z. Quality analysis and preparation of the avian influenza vaccine safety and immune efficacy research of different sources of white oil adjuvant [J]. China Poultry, 2009, 31(22): 15–18.
- [12] 胡瑞鸿, 丛秋实, 赵辉, 等. 白油佐剂的选择与乳化剂频率的确定[J]. 兽医导刊, 2013, 12: 72.
Hu RH, Cong QS, Zhao H, *et al.* The choice of white oil adjuvant and the determination of emulsifier frequency [J]. J Vet, 2013, 12: 72.
- [13] 刘亮, 唐善虎, 陈诺, 等. GC-MS法研究矿物油在肉鸡体内残留动态变化[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 87–91.
Liu L, Tang SH, Chen N, *et al.* Research on residues and dynamic changes in chicken by GC-MS [J]. Food Sci, 2010, 31(19): 87–91.
- [14] Wilner BI, Evers MA, Troutman HD, *et al.* Vaccine potentiation by emul-sification with pure hydrocarbon compounds [J]. J Immunol, 1963, 91(2): 210–22.
- [15] Fiorini D, Paciaroni A, Gigli F, *et al.* A versatile splitless injection GC-FID method for the determination of mineral oil paraffins in vegetable oils and dried fruit [J]. Food Control, 2010, 21: 1155–1160.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



赵东伟, 副研究员, 主要研究方向为家禽健康养殖与品质评价。
E-mail: 408394403@qq.com



高玉时, 研究员, 主要研究方向为家禽品质评价与质量安全控制。
E-mail: gaoy100@sina.com