

QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定发酵黑茶中的 10 种真菌毒素

刘妍¹, 陈坚², 谭贵良^{2,3}, 刘子雄³, 李向丽¹

(1. 中山火炬职业技术学院, 广东中山 528436) (2. 广东省中山市质量计量监督检测所, 广东中山 528403)

(3. 中山市食品药品检验所, 广东中山 528437)

摘要: 建立了云南普洱茶、湖南黑茶、广西六堡茶和湖北老青茶等发酵黑茶黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (AFG₂)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-AcDON)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、T-2 毒素 (T-2)、HT-2 毒素 (HT-2)、赭曲霉毒素 A (OTA) 等 10 种真菌毒素的简单、快速、高灵敏度超高效液相色谱-串联质谱检测方法。样品采用乙腈/水溶液 (84+16) 提取试样、QuEChERS 净化, 试样以 C₁₈ 柱分离, 多反应监测 (MRM) 模式进行定量与定性分析, 采用外标法定量。结果表明, 在优化的条件下, 10 种真菌毒素在各自的线性响应范围内线性关系良好, 相关系数 (r) 均不小于 0.9995, 定量限 (LOQ) 为 0.1~10 µg/kg, 在三个不同加标水平下平均回收率为 61.9%~120.3%, 相对标准偏差 (RSD) 为 3.2%~16.1%。采用建立的方法对市面上销售的黑茶中的 10 种真菌毒素进行了筛查, 数批产品检出真菌毒素。该方法简单、准确、可靠, 可适用于发酵黑茶中多种真菌毒素的快速分析。

关键词: 真菌毒素; 超高效液相色谱-串联质谱; 发酵黑茶; 多残留检测

文章篇号: 1673-9078(2017)7-280-288

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.039

Determination of Ten Mycotoxins in Fermented Dark Tea by QuEChERS-Ultra-high-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIU Yan¹, CHEN Jian², TAN Gui-liang^{2,3}, LIU Zi-xiong³, LI Xiang-li¹

(1. Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan 528436, China) (2. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China) (3. Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528437, China)

Abstract: A method was established for the determination of ten mycotoxins (aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁), aflatoxin G₂ (AFG₂), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), zearalenone (ZEN), T-2 mycotoxin (T-2), HT-2 toxin (HT-2), and ochratoxin A (OTA)) in fermented dark tea (Pu'er tea, Hunan dark tea, Guangxi Liupu tea, and Hubei old green tea) using (QuEChERS) ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile-water (84:16, V/V), and the extracted solutions were purified using the QuEChERS approach. The mycotoxins were then separated on an Agilent Zorbax Rrhd SB-C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm) using (0.1% formic acid-5 mM ammonium acetate-water)/methanol as the mobile phase and detected by MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The mass spectrometry measurement was conducted using positive (ESI⁺) and negative (ESI⁻) electrospray ionization with an external standard. The results showed that ten mycotoxins had a good linear relationship within their own linear response ranges, with correlation coefficients (r) all >0.9995. The limits of quantitation (LOQ) (S/N≥10) were 0.1~1.0 µg/kg, and the average recoveries at three spike levels of ten mycotoxins ranged from 61.9% to 120.3%, with a relative standard deviation (RSD, n=3) of 3.2%~16.1%. This newly developed method was successfully applied for the assessment of 61

收稿日期: 2017-03-16

基金项目: 广东省高等学校优秀青年教师培养计划资助项目 (Yq2013196); 国家质检总局科技计划项目 (2014QK051); 广东省食药局科技计划项目 (2015ZX07); 中山市科技计划项目 (2014A2FC247、2015B2297)

作者简介: 刘妍 (1983-), 女, 讲师, 研究方向: 食品质量检测与食品安全

通讯作者: 谭贵良 (1977-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 食品检测分析技术

commercial black tea samples, and mycotoxins were detected in several batches of samples. Based on these results, the developed method is reliable, simple, and accurate, and is suitable for the rapid analysis of multiple mycotoxin contaminants in fermented dark tea.

Key words: mycotoxins; ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fermented dark tea; multi-residue determination

中国既是茶叶的生产大国,又是茶叶的消费大国。随着社会经济的发展和生活水平的提高,近几年来人们开始重视普洱茶的各种功效成分和保健作用研究。同时围绕普洱茶的农药残留、重金属、稀土含量、真菌毒素污染以及微生物超标等带来的品质危害问题的研究也备受关注,尤其是对普洱茶等渥堆发酵茶中主要潜在危害物真菌毒素污染的研究越来越受到重视。我国在国家标准《食品中真菌毒素限量》^[1]中对黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、展青霉素 (PAT)、赭曲霉毒素 A (OTA) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN) 六种真菌毒素进行了限量。在真菌毒素检测方法方面,国内外报道的方法主要有:液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[2-5]、液相色谱法 (HPLC)^[6-8]、酶联免疫吸附分析 (ELISA)^[9-11]、薄层色谱法 (TIC)^[12,13]、气相色谱法 (GC)^[14,15]和纳米探针技术^[16,17]等。

在发酵茶中真菌毒素检测方面,目前国内外对发酵茶中 AFB₁、OTA、DON 和 PAT 等真菌毒素污染情况的检测分析已有部分报道^[7,10,11,18-22]。近期刘妍等^[21]也建立了部分发酵茶 (普洱茶、湖南黑茶和红茶) 中五种真菌毒素 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 OTA) 的高效液相色谱-串联质谱检测方法。但是缺乏普洱茶等多种发酵黑茶中多种真菌毒素同时检测以及风险调查的系统报道。现有检测的毒素种类仍比较单一,且茶叶样品不够全面。本研究针对前人研究的不足,采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 建立了检测多种发酵黑茶 (云南普洱茶、湖南黑茶、广西六堡茶和湖北老青茶) 中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (AFG₁)、黄曲

霉毒素 G₂ (AFG₂)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-AcDON)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、T-2 毒素 (T-2)、HT-2 毒素 (HT-2) 和赭曲霉毒素 A (OTA) 等多种真菌毒素的高通量检测方法。本方法简便、快速、灵敏度高,可以实现发酵茶中多种真菌毒素的同时测定,可为相关部门对此类产品的监管提供技术支持,无疑对于了解市场上发酵茶产品的真菌毒素污染现状及潜在风险具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

1290/6460 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 (UPLC-MS/MS) (美国 Ailent 公司); 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); MILLI-Q 纯水机 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂与样品

10 种真菌毒素标准品: 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁, 1162-65-8)、黄曲霉毒素 B₂ (AFB₂, 7220-81-7)、黄曲霉毒素 G₁ (AFG₁, 1165-39-5)、黄曲霉毒素 G₂ (AFG₂, 7241-98-7)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON, 51481-10-8)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-AcDON, 50722-38-8)、玉米赤霉烯酮 (ZEN, 17924-92-4)、T-2 毒素 (T-2, 21259-20-1)、HT-2 毒素 (HT-2, 26934-87-2) 和赭曲霉毒素 A (OTA, 303-47-9) (美国 ROMER 公司), 标准品的分子结构如图 1 所示。

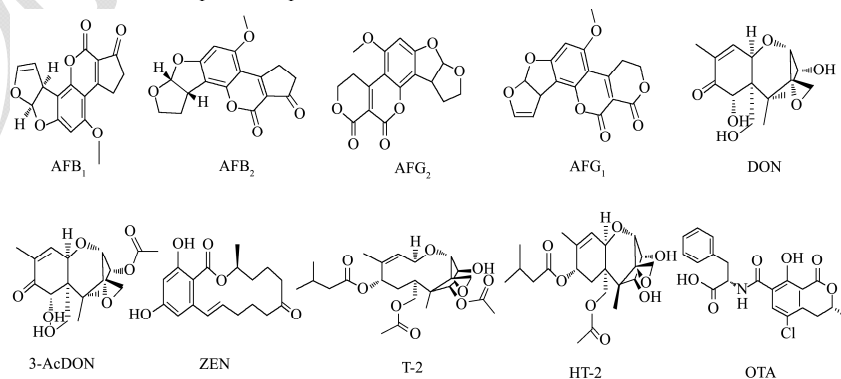


图 1 标准品的分子结构

Fig.1 Chemical structures of the investigated compounds

Mycospin 400 净化柱 (美国 ROMER 公司)、盐析剂 (含 4 g 硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸三钠和二水结晶盐、以及 0.5 g 的柠檬酸氢二钠合一个半水结晶盐)、Bond Elut 净化管 A (含 400.1 mg PSA、400.1 mg C18、45.0 mg Bulk Carbograph、1199.8 mg 硫酸镁)、净化管 B (含 149.9 mg PSA、900.1 mg 硫酸镁)、净化管 C (含 147.7 mg PSA、15.1 mg Bulk Carbograph、887.2 mg 硫酸镁) (美国 Agilent 公司)。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯 (德国 Merck 公司)。实验室用水符合 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》中二级水的规定。云南普洱茶、湖南黑茶、广西六堡茶和湖北老青茶购自当地超市、茶叶店。

1.3 色谱-质谱条件

Agilent Zorbax Rrhd SB-C18 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 °C; 进样体积: 2 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A 为 0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水, B 为甲醇, 梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 90% A 和 10% B; 1.5~5.0 min, 45% A 和 55% B; 5.0~7.5 min, 10% A 和 90% B, 7.5~8.0 min, 45% A 和 55% B, 8.0~8.5 min, 90% A 和 10% B。

质谱条件: 鞘电喷雾离子源(JetESI); 正、负离子扫描; 多反应监测(MRM); 鞘气温度: 310 °C; 鞘气流量: 11 L/min; 喷嘴电压: 500 V(ESI⁺)/-1000V(ESI⁻); 雾化气压力: 45 psi; 毛细管电压: 4000 V(ESI⁺)/3500 V(ESI⁻); 离子驻留时间(Dwell time): 20 ms, 其他条件见表 1。

表 1 10 种真菌毒素的保留时间及质谱参数

Table 1 Retention time and UPLC-MS/MS conditions for ten mycotoxins

真菌毒素	ESI 模式	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV	毛细管出口电压/V	保留时间/min
AFB ₁	ESI ⁺	313.1 [M+H] ⁺	284.9*/240.9	24, 44	171	4.33
AFB ₂	ESI ⁺	315.1 [M+H] ⁺	286.9*/258.9	28, 32	176	4.05
AFG ₁	ESI ⁺	329.1 [M+H] ⁺	242.9*/199.6	28, 50	156	3.63
AFG ₂	ESI ⁺	331.1 [M+H] ⁺	257.0/245.0*	30, 32	158	3.44
DON	ESI ⁺	297.1 [M+H] ⁺	249*/203	4, 12	100	2.67
3-AcDON	ESI ⁺	339.1 [M+H] ⁺	231*/203.1	8, 12	95	3.22
ZEN	ESI ⁻	317.1 [M-H] ⁻	175.3/131.3*	32, 24	70	6.25
T-2	ESI ⁺	489.2 [M+Na] ⁺	386.8/245*	24, 20	125	6.09
HT-2	ESI ⁺	442.2 [M+NH ₄] ⁺	263*/215	4, 4	100	5.85
OTA	ESI ⁻	401.8 [M-H] ⁻	358.1*/211.0	16, 26	120	6.21

注: *为定量离子。

1.4 样品处理方法

方法一: 准确称取 2 g 粉碎的茶叶试样 (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈+水溶液 (84+16), 涡旋 3 min, 超声提取 10 min, 于 4 °C 下 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 过滤。取 1 mL 滤液过 MycoSpin 400 多功能净化柱, 滤液经过 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 上 UPLC-MS/MS 分析。

方法二: 准确称取 2 g 粉碎的茶叶试样 (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL、1%的乙酸-乙腈-水溶液 (84+16), 涡旋 3 min, 超声提取 10 min, 离心管中加入提取剂, 涡旋 3 min 后, 于 10000 r/min 离心 5 min。取 5 mL 上清液至 15 mL 净化管, 混匀, 涡旋 3 min, 于 10000 r/min 离心 5 min。取 1 mL 滤液经过 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 上 UPLC-MS/MS 分析。

1.5 标准储备液及工作液的配置

用乙腈分别将各真菌毒素标准品配置成单标储备液 (500 μg/L), 置于 -20 °C 冰箱中保存。取适量的各单标储备液, 用 20%甲醇-水溶液配成混合工作液 (AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的浓度为均 25 μg/L, DON、3AcDON、HT-2、T-2、OTA 和 ZEN 的浓度均为 100 μg/L)。配制标准工作曲线时, 根据要求将储备液或混合工作液用流动相稀释成不同浓度, 现配现用。

1.6 基质效应分析

将不含目标真菌毒素的茶叶样品按上述前处理方法处理后得到基质空白溶液, 向基质空白中加入一定浓度的真菌毒素混合标准溶液, 进行 UPLC-MS/MS 分析。同时比较其与相同浓度水平标准溶液 (以 20% 甲醇-水溶液作为溶剂) 的质谱响应情况。通过计算各

毒素在基质溶液与标准溶液中峰面积的差异,用来评价各类发酵茶的基质效应。若两者的峰面积之比在80~120%之间,表明基质效应不明显;低于80%或高于120%则表明基质效应显著^[23]。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

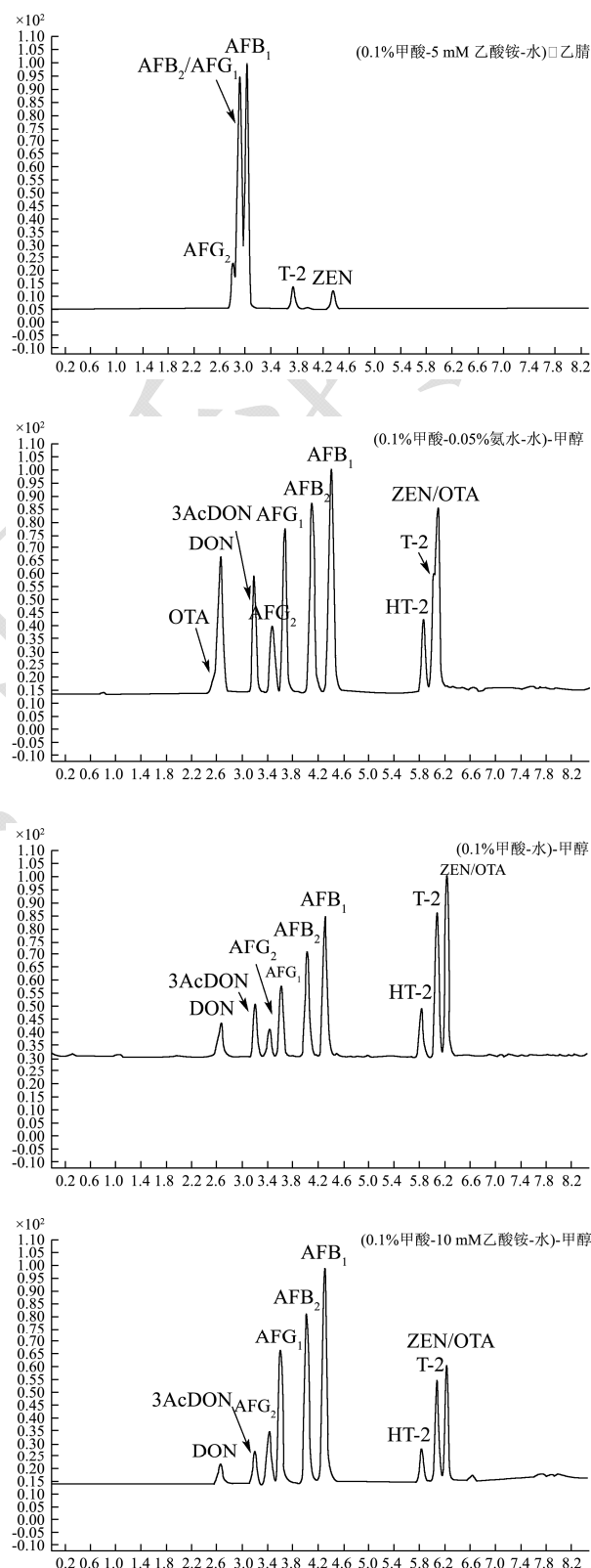
AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、3-AcDON、HT-2 和 T-2 含有 C=O 或甲氧基 (CH₃O-), 易得到氢离子, 正电离模式下可呈现较好的响应; OTA 和 ZEN 分子中则含有羟基 (-OH)、酚羟基等, 易失去氢离子, 在负电离模式下可以得到较好的响应。因此, 依据洗脱顺序设定正离子和负离子模式之间的转换, 即可实现这 10 种真菌毒素的同时检测。依据 10 种真菌毒素的出峰分离情况, 可以分为两个时间段进行检测, 第一时间段在正离子模式下检测 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、3-AcDON、HT-2 和 T-2, 第二时间段在负离子模式下检测 OTA 和 ZEN。经过优化后 10 种真菌毒素化合物中, AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON 和 3-AcDON 6 种毒素均以 [M+H]⁺ 形成母离子、T-2 以 [M+Na]⁺ 形成母离子、HT-2 以 [M+NH₄]⁺ 形成母离子, 而 ZEN 和 OTA 两种毒素则以 [M-H]⁻ 方式形成母离子 (见表 1)。

针对每个母离子选取两个子离子用以对化合物进行定性和定量分析。本试验最终确定的各种真菌毒素在 MRM 模式下信号采集的特征离子对、碰撞能等参数条件见表 1。

2.2 色谱条件的优化

在液相色谱-质谱方法中通常采用乙腈-水或甲醇-水作为流动相来分析真菌毒素, 有时也在流动相中添加低浓度的甲酸或乙酸铵, 以获得良好的分离和出峰效果。本研究分别考察了 (0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水)-乙腈、(0.01%甲酸-0.05%氨水-水)-甲醇、(0.1%甲酸-水)-甲醇、(0.1%甲酸-10 mM 乙酸铵-水)-甲醇和 (0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水)-甲醇作为流动相的分离效果。试验结果表明, (0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水)-乙腈作为流动相时, 峰型较差, T-2、ZEN 响应值较低, 且 AFB₂、AFG₁ 未能分开, 3Ac-DON、HT-2、OTA 未出峰; (0.01%甲酸-0.05%氨水-水)-甲醇作为流动相时响应略低, T-2、OTA 未分开; (0.1%甲酸-水)-甲醇和 (0.1%甲酸-10 mM 乙酸铵-水)-甲醇作为流动相时, 峰形较好, 但部分的毒素响应值较低。

只有当流动相为 (0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水)-甲醇时, 以上 10 种毒素的质谱信号和灵敏度明显比其他高, 且峰形对称, 有利于定量分析。因此最终采用 (0.1%甲酸-5 mM 乙酸铵-水)-甲醇作为流动相, 流动相的分离效果如图 2 所示。



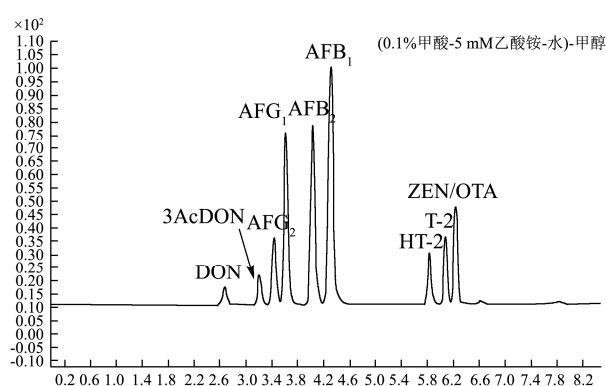


图2 流动相分离效果

Fig.2 Separation of ten mycotoxins by mobile phase

由于10种真菌毒素的化学性质差异较大,为了使这些真菌毒素在短时间内达到基线分离,研究过程中采用逐步提高流动相中甲醇浓度的梯度洗脱方式进行分离。结果表明,初始甲醇比例越大,出峰越快,待分析物可在6.5 min内出峰完毕。10种真菌毒素在优化的色谱和质谱条件下的总离子色谱图如图3所示。

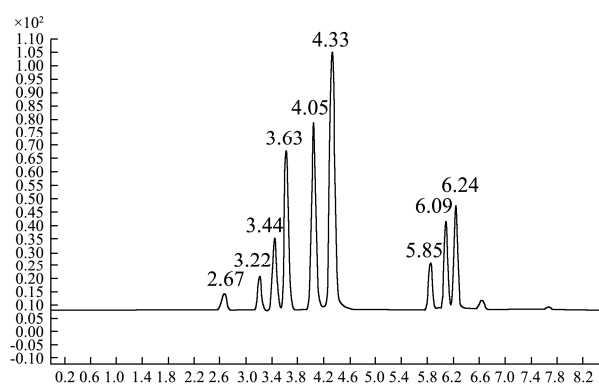


图3 优化条件下10种真菌毒素的总离子流图

Fig.3 TIC chromatogram of ten mycotoxins

其中, AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的浓度为均25 μg/L, DON、3AcDON、HT-2、T-2、OTA和ZEN的浓度均为100 μg/L。各真菌毒素的出峰保留时间依次为: DON 2.67 min、3-AcDON 3.22 min、AFG₂ 3.44 min、AFG₁ 3.63 min、AFB₂ 4.05 min、AFB₁ 4.33 min、HT-2 5.85 min、T-2 6.09 min、OTA 6.21 min、ZEN 6.25 min。10种真菌毒素混合标准溶液在ESI⁺和ESI⁻条件下的MRM定量离子色谱图见图4。

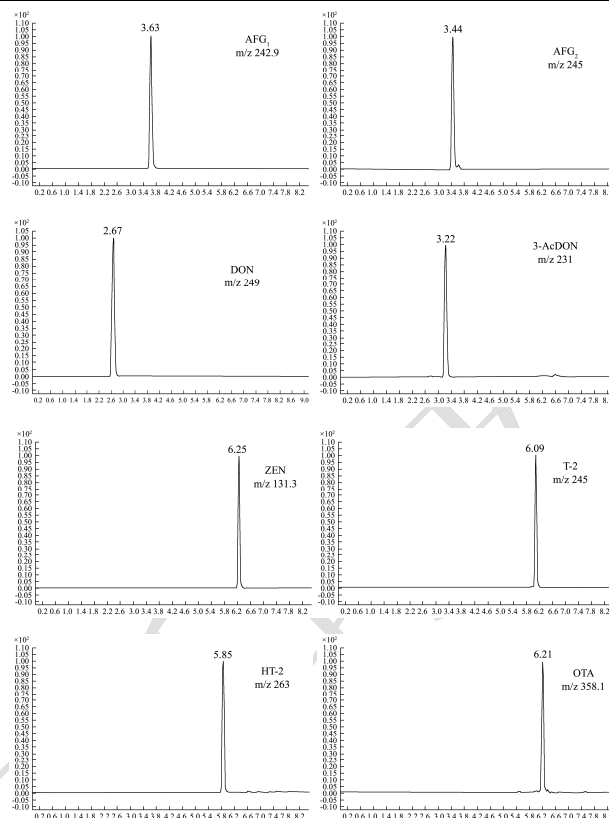
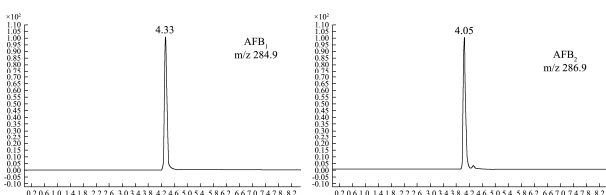


图4 10种真菌毒素的MRM定量离子色谱图

Fig.4 MRM (ESI⁺ and ESI⁻) chromatograms of ten mycotoxins

2.3 样品提取条件的优化

2.3.1 提取剂的选择

要快速对普洱茶等后发酵黑茶中的多种真菌毒素进行同时筛查,需要在提取效率提高的同时,还要把不同样品中目标化合物损失降到最小。因此,食品中毒化合物前处理方法的关键是选择提取效率好的提取溶剂和净化方法,减少目标化合物在不同样品前处理过程中的损失。大量研究表明,乙腈-水体系是被广泛使用的一种提取溶剂。虽然单一乙腈作为提取液对多真菌毒素的联合提取效果较好,但对pH值、极性范围敏感的真菌毒素,提取时需在提取液中添加辅助试剂(甲酸、乙酸和甲醇等)以增强联合提取的效果。本研究在提取剂中加入1%的乙酸的情况下,比较了不同比例的乙腈-水溶液及甲醇-水溶液的提取效果。在乙腈-水溶液提取溶剂中,还比较了乙腈的浓度(体积比)分别为50%、79%、84%和100%时的提取效果。研究表明,随着乙腈浓度的提高,待测物的提取回收率也逐步提高,当乙腈浓度为84%时,各种毒素的提取回收率最高,回收率在79.9%~100.3%之间,结果见表2。因此,本研究采用含1%乙酸的乙

腈/水=84:16 作为提取剂。同时在提取过程中向样品的乙腈溶液中加入一定量的 NaCl 和 MgSO₄ 等盐析剂，以利于目标化合物向乙腈相中转移。

表 2 不同提取剂对 10 种真菌毒素回收率的影响 (%)

Table 2 Recoveries of ten mycotoxins using different extraction solvents					
真菌毒素	乙腈:水=50:50	乙腈:水=79:21	乙腈:水=84:16	乙腈:水=100:0	甲醇:水=84:16
AFB ₁	69.1	83.0	88.5	76.6	80.3
AFB ₂	75.3	77.4	94.7	80.2	79.6
AFG ₁	71.5	81.7	80.8	76.6	72.5
AFG ₂	63.2	79.9	85.5	78.0	70.1
DON	70.2	70.8	89.6	82.1	85.5
3-AcDON	64.6	80.5	100.3	77.2	76.0
ZEN	73.1	86.0	92.1	80.5	84.7
T-2	75.2	85.3	79.9	79.0	69.7
HT-2	80.0	81.9	87.0	78.4	83.3
OTA	75.9	70.6	81.5	83.9	81.4

2.3.2 净化方式的选择

表 3 不同净化处理下 10 种真菌毒素的回收率比较 (%)

Table 3 Recoveries of ten mycotoxins using different purification modes				
真菌毒素	Spin400	净化管 A	净化管 B	净化管 C
AFB ₁	85.1	87.4	79.3	82.6
AFB ₂	75.0	83.6	72.1	73.5
AFG ₁	95.6	98.1	80.0	79.7
AFG ₂	86.6	85.0	73.6	75.3
DON	62.3	90.2	70.3	84.7
3-AcDON	96.5	95.3	88.1	69.9
ZEN	89.0	101.6	71.7	62.8
T-2	60.4	73.1	68.5	73.1
HT-2	88.3	82.9	77.2	80.6
OTA	82.6	86.8	74.5	88.7

试验过程中发现直接用提取剂提取时，基质效应比较强，导致色谱峰不好，而且同时对色谱柱和仪器的损坏较大。基质固相分散（QuEChERS）是一种新的提取净化技术，可以将样品的分散、萃取及净化一次完成，省时省力，操作方便，对色谱柱和仪器起到了很好的保护作用。

本实验对不同成分组成的净化管的净化效果进行了比较，比较结果见表 3。结果发现，经过净化管 A 净化后，多数真菌毒素的回收率较高。与净化管 A 净化相比，Mycospin 400 净化柱净化后，除 DON、T-2 外，大部分目标分析物的回收率也较高。综合考虑后，选用含 Bond Elut 净化管 A（含 400.1 mg PSA、400.1 mg C₁₈、45.0 mg Bulk Carboxagragh 和 1199.8 mg 硫酸镁）提取目标分析物，回收率在 73.1%~101.6%之间。

2.4 基质效应

基质效应是 LC-MS/MS 多残留检测分析过程中准确、可靠定量面临的一个难题，减少样品基质效应对于获得准确的回收率尤为重要。本试验选取了预先测定不含毒素的普洱茶、湖南黑茶、广西六堡茶和湖北老青茶作为基质空白，利用相同的前处理方法向其加入配制好的混合标准溶液（AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的浓度为 10 μg/L，DON、3-AcDON、HT-2、T-2、OTA 和 ZEN 的浓度均为 50 μg/L），测定各真菌毒素的峰面积（A）。接着以 20%甲醇水为溶剂配制相应浓度的混合标准溶液，测定其峰面积（B）。按照 Huang 等（2013）报道的方法计算基质效应，基质效应 ME(%)=B/A×100。

经定量测定表明，AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、3AcDON、HT-2、T-2 和 ZEN 的基质效应为 82.6%~117.3%，表示 8 种毒素受基质效应影响不大，抑制不明显。但 DON 和 OTA 的基质效应明显，峰面积之比均不在 80~120%区间。其中，DON 在普洱茶中为 129.3%，在湖南黑茶中为 133.0%，在广西六堡茶中为 72.6%，在湖北老青茶为 124.7；OTA 在普洱茶中为 135.8%，在湖南黑茶中为 128.1%，在广西六堡茶中为 112.5%，在湖北老青茶为 146.8%。因此在 LC-MS/MS 多残留检测分析中，采用基质匹配的标准溶液进行校准定量，能较好地补充基质效应，提供定量分析的准确度。

2.5 标准曲线与定量限

根据 10 种化合物的响应强弱，配置不同质量浓度

的混合标准溶液,以质量浓度(x)为横坐标,定量离子对峰面积(y)为纵坐标,绘制标准工作曲线,考察标准溶液曲线的线性范围和相关系数。结果显示,10种真菌毒素在正、负ESI模式下均呈良好的线性关系,相关系数(r)≥0.9995(见表4)。

同,将其配制成不同浓度的混标溶液,在空白样品中添加目标化合物,按照“1.4 样品处理方法”中给定的方法进行前处理,上机测定,以 S/N=10 计算方法定量限(LOQ),计算得出10种真菌毒素的LOQ分别为0.1~10 µg/kg。

根据10种真菌毒素在质谱MRM模式下响应的不

表4 10种真菌毒素的线性方程和定量限

Table 4 Linear equations, correlations, and limits of quantitation (LOQ) of ten mycotoxins

真菌毒素	线性方程	相关系数(r)	线性范围/(µg/L)	定量限/(µg/kg)
AFB ₁	y=1196x-2.3428	0.9999	0.05~25	0.1
AFB ₂	y=845x+28.831	0.9997	0.05~25	0.1
AFG ₁	y=467.17x+9.2968	0.9999	0.1~25	0.2
AFG ₂	y=302.91x-45.41	0.9999	0.1~25	0.2
DON	y=12.744x+47.691	0.9998	5~100	10
3-AcDON	y=18.386x-54.525	0.9999	5~100	10
ZEN	y=12.744x+47.691	0.9989	1~100	2
T-2	y=46.667x+797.54	0.9998	2.5~100	5
HT-2	y=16.581x-30.235	0.9995	1~100	2
OTA	y=12.744x+47.691	0.9997	0.5~100	1

2.6 方法的回收率和精密度

表5 发酵茶中10种真菌毒素的回收率及相对标准偏差(%, n=3)

Table 5 Recoveries and RSD of the analytes in fermented tea(%, n=3)

毒素名称	普洱茶						湖南黑茶					
	加标1		加标2		加标3		加标1		加标2		加标3	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
AFB ₁	78.9	7.2	85.2	7.4	82.1	4.7	82.6	3.6	87.2	10.5	90.4	5.1
AFB ₂	85.1	3.2	112.0	9.5	81.5	12.8	77.1	5.5	82.8	9.2	87.7	9.5
AFG ₁	93.3	4.5	78.5	9.0	79.2	10.3	69.0	10.8	92.8	8.6	78.3	7.6
AFG ₂	80.8	8.4	106.6	6.6	82.0	5.1	85.2	4.4	72.0	4.1	95.6	7.2
DON	77.2	12.9	85.1	15.5	97.5	8.4	89.9	3.8	93.8	6.5	93.3	13.7
3-AcDON	92.5	10.5	90.3	4.3	80.6	7.1	105.5	7.9	91.7	6.0	98.4	8.2
ZEN	89.0	4.8	102.4	7.1	91.4	16.2	86.6	7.5	95.6	4.4	89.6	6.3
T-2	82.9	12.3	76.5	5.9	78.5	9.3	75.2	10.6	85.6	5.3	80.2	4.9
HT-2	73.6	6.5	82.7	6.2	81.9	12.5	85.0	16.1	78.4	3.8	113.5	10.2
OTA	69.2	10.2	77.8	3.3	80.5	16.5	75.9	9.1	73.1	7.6	82.9	5.7

毒素名称	广西六堡茶						湖北老青茶					
	加标1		加标2		加标3		加标1		标2		加标3	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
AFB ₁	86.5	3.7	88.9	10.5	92.6	7.0	80.3	6.7	82.6	3.9	85.7	10.6
AFB ₂	76.4	4.9	75.3	5.6	89.7	5.6	81.4	7.3	76.6	8.1	90.1	6.0
AFG ₁	81.1	8.6	89.3	9.7	112.3	8.1	69.8	5.5	85.4	5.4	79.6	5.5
AFG ₂	61.9	6.7	77.0	9.3	82.5	4.5	77.7	6.0	80.1	6.7	84.9	4.8
DON	79.2	5.5	83.3	8.1	95.2	5.5	63.8	8.9	71.5	6.2	78.2	9.3

转下页

接上页

3-AcDON	84.4	10.2	89.0	4.9	99.2	9.3	82.6	8.1	96.7	9.3	120.3	7.2
ZEN	70.3	9.3	66.2	5.4	79.1	7.6	76.5	4.4	79.3	11.5	85.5	7.8
T-2	67.5	4.1	74.9	8.3	80.4	8.5	79.6	3.2	80.0	7.1	82.1	4.2
HT-2	83.0	12.5	87.1	6.1	105.3	4.0	74.9	7.6	88.6	8.8	89.0	3.9
OTA	75.8	7.3	83.4	3.9	87.6	9.9	85.1	5.3	79.2	6.3	83.6	8.7

以不含毒素的茶叶作为空白样品,分别添加低(加标 1)、中(加标 2)和高(加标 3)三个水平的毒素,计算方法的加标回收率和精密度,每个添加浓度做 3 个平行。其中,加标 1、加标 2 和加标 3 分别为各毒素定量限的 1 倍、10 倍和 100 倍。由表 5 可以看出,10 种真菌毒素的回收率为 61.9%~120.3%,相对标准偏差(RSD)为 3.2%~16.1%。

2.7 实际样品的检测

采用本方法对在本地销售的 61 份发酵黑茶样品(云南普洱茶 30 份、湖南黑茶 15、广西六堡茶 10 份和湖北老青茶 6 份)进行了检测分析。检测结果发现,有 9 份样品检出 AFB₁,其中普洱茶 7 份(0.1~16.1 µg/kg)、湖南黑茶 1 份(0.5 µg/kg)、湖北老青茶 1 份(2.0 µg/kg);3 份样品检出 DON,其中普洱茶 1 份(8.6 µg/kg)、湖南黑茶 2 份(70.1 µg/kg, 299.5 µg/kg);5 份样品检出 OTA,其中普洱茶 2 份(6.7 µg/kg 和 2.5 µg/kg)、湖南黑茶 1 份(4.0 µg/kg)、广西六堡茶 2 份(0.9 µg/kg 和 1.3 µg/kg)。参照 GB 2761-2011《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》要求中对 AFB₁、DON 和 OTA 的限量要求分别为:20 µg/kg(玉米及制品)、1000 µg/kg(谷物及制品)、5 µg/kg,所测样品部分超过国家限量要求。

3 结论

3.1 真菌毒素是由各种真菌产生的有毒次生代谢产物,目前已发现真菌毒素数量为 300~400 种,如黄曲霉毒素(AFs)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、赭曲霉毒素 A(OTA)、伏马菌素(fumonisin)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和展青霉素(PAT)等。真菌毒素具有很强的生物毒性,其中 AFB₁ 的毒性最强,被国际癌症研究机构规定为 I 类致癌物,其毒性是氰化钾的 10 倍。真菌毒素污染问题已成为食品和农产品的重大安全问题,被世界卫生组织(WHO)列为食源性疾病的重要根源。目前,玉米、花生和小麦等谷物其制品、水果及其制品以及乳及制品中真菌毒素含量也已成为各国质检部门检疫检验的重点项目。发酵黑茶若在渥堆生产环节控制不严或存储不当,尤其是当茶叶吸湿受潮后容易受到真菌和真菌毒素的污染。遗憾的是对

发酵茶等茶叶中真菌毒素的监测尚未引起足够重视,未列入日常监管项目。GB 2761-2011 未规定茶叶中真菌毒素的限量。

3.2 本实验采用 QuEChERS 方法对样品前处理方法进行优化,建立了一套简便、快速、灵敏度高的可同时检测发酵黑茶中多种真菌毒素的高效液相色谱-串联质谱法。高效液相色谱-串联质谱法具有更高的选择性和灵敏度,是目前同时检测多种真菌毒素的主要手段。QuEChERS 技术是由 Anastassiades 等^[24]在基质固相分散萃取技术的基础上建立的一种集快速(quick)、简单(easy)、便宜(cheap)、有效(effective)、可靠(rugged)和安全(safe)为一体的样品提取、净化技术。与传统的提取净化技术相比,该技术具有试剂使用量少、操作步骤少及处理时间短等诸多优点。本研究样品经过 QuEChERS 方法处理后,空白样品加标回收试验得到了较高且稳定的回收率。经过方法优化后,10 种真菌毒素的检测定量下限(LOQ)达到 0.1~10 µg/kg,达到较高灵敏度,能满足国家有关检验标准和相关产品质量监管的要求。从本文及其他研究人员的研究结果表明,发酵茶中可被检测出真菌毒素,说明这类经过发酵处理的茶叶中存在真菌毒素的安全隐患,将来需要加大对发酵茶中各类毒素的含量调查和安全性评价。建议根据真菌毒素的污染现状,制定发酵茶及其他茶叶中真菌毒素的限量指标。

参考文献

- [1] GB 2761-2011,食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]
GB 2761-2011, National food safety standard limited mycotoxins in food [S]
- [2] Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semiquantitative screening of moldy food samples [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2007, 389(5): 1505-1523
- [3] 葛宝坤,赵孔祥,王伟,等.免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法测定中药材中的 14 种真菌毒素[J].色谱,2011, 29(6):495-500
GE Bao-kun, ZHAO Kong-xiang, WANG Wei, et al.

- Determination of 14 mycotoxins in Chinese herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with immunoaffinity purification [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(6): 495-500
- [4] 李向丽,谭贵良,梁波,等.多功能柱净化-超高效液相色谱串联质谱法同时测定水产品中11种真菌毒素[J].现代食品科技,2015,31(7):342-346
- LI Xiang-li, TAN Gui-liang, LIANG Bo, et al. Simultaneous detection of 11 mycotoxins in aquatic products using multifunctional column clean-up and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 342-346
- [5] 苏碧玲,谢维平,欧阳燕玲,等.QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中12种真菌毒素[J].中国食品卫生杂志,2016,28(4):467-471
- SU Bi-ling, XIE Wei-ping, OUYANG Yan-ling, et al. Determination of twelve mycotoxins in cereal-based complementary foods for infants and young children by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry using Qu ECh ERS approach [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(4): 467-471
- [6] Campone L, Piccinelli A L, Celano R, et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereal products [J]. J. Chromatogr. A, 2011, 1218(42): 7648-7654
- [7] 付朝晖,黄雪祥,闵顺耕.超高效液相色谱法快速测定发酵茶叶中的黄曲霉毒素[J].分析试验室,2009,28(6):112-115
- FU Zhao-hui, HUANG Xue-xiang, MIN Shun-geng. Rapid determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in fermented tea by ultra performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(6): 112-115
- [8] 黎睿,谢刚,王松雪.高效液相色谱法同时检测粮食中常见8种真菌毒素的含量[J].食品科学,2015,36(6):206-210
- LI Rui, XIE Gang, WANG Song-xue. Simultaneous analysis of 8 mycotoxins in grains by high performance liquid chromatography [J]. Food Science, 2015, 36(6): 206-210
- [9] Rosi P, Borsari A, Lasi G, et al. Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay [J]. Int. Dairy J., 2007, 17(5): 429-435
- [10] 刘辉,张燕.QuEChERS-酶联免疫快速检测法测定茶叶中黄曲霉毒素 B₁[J].食品安全质量检测学报,2015,6(4):1307-1313
- LIU Hui, ZHANG Yan. Simultaneous determination for aflatoxin B₁ in tea leaf by QuEChERS -enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(4): 1307-1313
- [11] 谭志熹,江俊生,陈若恒,等.免疫亲和柱净化-酶联免疫吸附法检测普洱茶中黄曲霉毒素 B₁[J].预防医学论坛,2014,20(3):413-415
- TAN Zhi-xi, JIANG Jun-sheng, CHEN Ruo-heng, et al. Detection of aflatoxin B₁ in the Puer tea using affinity column purification-enzyme linked immunosorbent assay [J]. Prev. Med. Trib., 2014, 20(3): 413-415
- [12] Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, et al. Assessment of toxigenic fungion Argentinean medicinal herbs [J]. Microbiol. Res., 2004, 159(2): 113
- [13] Carvalho K L, Gonçalves G A A, Lopes A L, et al. Modeling uncertainty estimation determination of aflatoxin M₁ in milk by visual and densitometric thin-layer chromatography with immunoaffinity column clean-up [J]. Food Addit. Contam., 2012, 29(4): 679-693
- [14] Ibáñez-Vea M, Lizarraga E, González-Peñas E. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS [J]. Food Control, 2011, 22(8): 1428-1434
- [15] 毛艳玲,蔡艳,罗昊轩,等.苹果中展青霉素的气相色谱-质谱检测研究[J].核农学报,2015,29(9):1757-1765
- MAO Yan-ling, CAI Yan, LUO Hao-xuan. Detetmination of patulin in apple fruit by gas chromatography-mass spectrometry analysis [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(9): 1757-1765
- [16] Wu S J, Duan N, Li X L, et al. Homogenous detection of fumonisin B₁ with a molecular beacon based on fluorescence resonance energy transfer between NaYF₄: Yb, Ho upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. Talanta, 2013, 116(22): 611-618
- [17] 李响,李向丽,谭贵良,等.磁分离结合 CdTe 发光量子点标记黄曲霉毒素 B₁ 免疫检测新方法[J].食品与生物技术学报,2013,32(3):258-264
- LI Xiang, LI Xiang-li, TAN Gui-liang, et al. A new immunoassay method for aflatoxin B₁ using CdTe luminescent qauantum dots as labels [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(3): 258-264
- [18] 陈建玲,李文学,杨光宇,等.广州某茶叶市场普洱茶中多种生物毒素污染现状调查[J].癌变·畸变·突变,2011,23(1): 68-71
- CHEH Jian-ling, LI Wen-xue, YANG Guang-yu, et al. Biological contamination of Puer tea in Guangzhou tea market [J]. Arcinogenesis, Teratogenesis, Mutagenesis, 2011, 23(1): 68-71

现代食品科技