

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240822005

改进 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法 测定绿茶中 16 种真菌毒素含量

刘琳, 龚倩, 王会广, 刘云*

(石家庄市食品药品检验中心, 石家庄 050000)

摘要: **目的** 建立一种改进 QuEChERS 法结合超高效液相色谱-串联质谱法用于检测绿茶中 16 种真菌毒素的方法。**方法** 本研究以 1%甲酸乙腈作为提取溶剂, 经涡旋或振荡提取后, 使用 N-丙基乙二胺和十八烷基键合硅胶吸附剂作为净化材料净化后, 经 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)实现分离, 采用电喷雾正负离子电离方式、多反应监测模式进行检测, 基质匹配曲线外标法定量。**结果** 在一定浓度范围内, 16 种真菌毒素均呈良好的线性关系, 相关系数大于 0.998, 该方法的检出限在 0.2~100.0 μg/kg 之间, 定量限在 0.5~300.0 μg/kg 之间。在 1、2、10 倍定量限的加标水平下, 16 种真菌毒素的回收率范围在 74.4%~110.9%之间, 其相对标准偏差值均小于 5%。应用新建立的方法对 10 批次绿茶样品进行分析检测, 结果在 2 批次样品中检测出了 AFB₂, 1 批次样品中检出玉米赤霉烯酮。**结论** 该方法灵敏度好, 准确度高, 可作为绿茶中真菌毒素的日常监测的有效检测方法。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 绿茶; 真菌毒素

Determination of 16 kinds of mycotoxins in green tea by improved QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Lin, GONG Qian, WANG Hui-Guang, LIU Yun*

(Shijiazhuang Institutes for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the determination of 16 kinds of mycotoxins in green tea by improved QuEChERS technique combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples of green tea were extracted acetonitrile containing 1% formic acid and purified by purification materials containing octadecylsilyl silica gel and N-propylethylenediamine. The sample was then analyzed on an ACQUITY BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) to achieve the separation, and detected in multiple reaction monitoring mode and quantified by matrix matching curve external standard method. **Results** Within a certain concentration range, the 16 kinds of mycotoxins revealed satisfactory linearities, with the correlation coefficients between 0.9985 and 0.9999. The limits of detection of the method were in the range of 0.2–100.0 μg/kg, and the limits of quantification of the method were in the range of 0.5–300.0 μg/kg. The recoveries of the 16 kinds of mycotoxins ranged from 74.4% to 110.9% at 1, 2 and 10 times limit of quantitation spiked levels

*通信作者: 刘云, 主任药师, 主要研究方向为食品药品检验. E-mail: cyr123love@163.com

*Corresponding author: LIU Yun, Chief Pharmacist, Shijiazhuang Institutes for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050000, China. E-mail: cyr123love@163.com

with relative standard deviations less than 5%. The 10 batches of green tea samples were analysed and tested by this method and AFB₂ was detected in 2 batches and zearalenone was detected in 1 batches. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, and effective for routine monitoring of mycotoxins in green tea.

KEY WORDS: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; green tea; mycotoxins

0 引言

我国的茶文化历史悠久, 茶叶由于富含氨基酸、维生素、咖啡碱、肌醇和多种微量元素等有益成分被称为健康饮料, 是世界上最流行的饮料之一。因此, 茶叶的饮用安全性与消费者健康及茶产业发展密切相关^[1-2]。

茶叶种植需要温暖潮湿的气候, 而此种温暖潮湿的环境有利于真菌毒素产毒菌的生长及其真菌毒素的产生^[3-5]。虽然在茶叶加工过程中的加热烘干可以杀灭茶叶中大部分的产毒菌, 但由于真菌毒素耐高温, 已经产生的真菌毒素很难被高温破坏^[6-7]。并且茶叶在后续的包装、储存和运输的过程中若处理不当, 依然会受到产毒菌的侵害产生真菌毒素而导致污染再次发生^[8]。真菌毒素具有致癌、致畸、致突变、免疫毒性等多种危害, 对人体的肾脏、肝脏、胃肠道、生殖系统等均能造成一定损害, 严重威胁到人类的健康安全^[9-10]。

目前, 国内外针对真菌毒素常用的检测方法包括: 薄层色谱法(thin-layer chromatography, TIC)^[11-12]、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)^[13-14]、液相色谱法(liquid chromatography, LC)^[15-16]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[17-18]等。与其他方法相比, LC-MS/MS 具有灵敏度高、分离能力强、抗干扰能力强、稳定性好等优点, 已逐渐取代传统的 LC 成为食品中真菌毒素检测的主要方法^[19]。QuEChERS 技术^[20-21]相比于其他前处理技术具有高效、快速、简便和低成本的优势, 已被广泛用于食品中真菌毒素的检测领域。

本研究选择同时测定 16 种风险较高的真菌毒素, 包括黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)、黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)、DON-3-葡萄糖苷(deoxynivalenol-3-glucoside, DON-3G)、15-乙酰基 DON (15-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON)、3-乙酰基 DON (3-acetyldeoxynivalenol, AcDON)、伏马毒素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁)、伏马毒素 B₂ (fumonisin B₂, FB₂)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)、柄曲毒素 (sterigmatocystin, ST)、赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)、T-2 毒素和 HT-2 毒素作为研究对象, 通过优化 QuEChERS

前处理过程, 结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测, 建立一种高效、快速的检测绿茶中 16 种真菌毒素的方法, 为绿茶中的真菌毒素污染风险监测和防控提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

DFY-1000C 高速粉碎机(上海比朗仪器制造有限公司); Milli-Q IQ7000 超纯水机(美国 Millipore 公司); ML503T 电子天平(精度 0.0001 g, 美国梅特勒-托利多公司); Triple Quad 5500+超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪[配备电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 美国 AB Sciex 公司]; MultifugeX1R 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔公司); VORTEX 3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司)。

1.2 试剂与材料

甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯)、十八烷基键合硅胶(C₁₈)(上海安谱实验科技股份有限公司); 16 种真菌毒素的标准溶液(1000 μg/mL, 天津阿尔塔科技有限公司); N-丙基乙二胺(N-propyl ethylenediamine, PSA)(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

绿茶样品均于本地市场随机购买。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。柱温箱设定温度为 40 °C; 样品室温度设定为 4 °C; 进样量为 5 μL。起始流动相为 0.1%甲酸水溶液:乙腈=90:10 (V:V), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	流速/(mL/min)	A (0.1%甲酸水溶液)/%	B(乙腈)/%
0.01	0.3	90	10
1.00	0.3	90	10
4.00	0.3	10	90
8.50	0.3	10	90
8.51	0.3	90	10
10.00	0.3	90	10

1.3.2 质谱条件

离子源类型为 ESI, 扫描方式为正离子和负离子同时扫描; 离子源温度为 550 °C; 电喷雾电压正离子为 5500 V, 负离子为 -4500 V; 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式; 每种目标化合物选取两个子离子, 各目标化合物的保留时间、母离子、定性和定量离子对、去簇电压、碰撞能量见表 2。

表 2 16 种真菌毒素的多反应监测扫描模式的质谱参数
Table 2 Multiple reaction detection mass spectrometric parameters of 16 kinds of mycotoxins

序号	化合物名称	保留时间/min	离子对	去簇电压/V	碰撞能/eV
1	AFB ₁	4.14	313.1/241.0*	95	50
			313.1/285.1		32
2	AFB ₂	3.98	315.1/259.1*	113	41
			315.1/287.1		35
3	AFG ₁	3.97	329.1/311.1*	110	30
			329.1/243.1		33
4	AFG ₂	3.82	331.1/245.1*	115	45
			331.1/189.1		54
5	NIV	0.92	313.1/295.1*	50	10
			313.1/175.0		40
6	DON	2.91	296.9/249.1*	60	15
			296.9/231.1		18
7	DON-3G	0.92	459.2/297.1*	80	10
			459.2/249.1		20
8	3-AcDON	3.50	339.1/231.1*	40	30
			339.1/279.1		28
9	15-AcDON	3.46	339.1/137.0*	40	23
			339.1/261.1		20
10	T ₂	4.95	484.2/305.3*	40	18
			484.2/185.1		31
11	HT ₂	4.36	442.1/263.1	66	17
			442.1/215.0		19
12	FB ₁	3.72	722.4/352.4*	100	49
			722.4/334.4		53
13	FB ₂	4.14	706.4/336.1*	140	40
			706.4/318.4		45
14	ST	5.30	325.1/310.0*	86	35
			325.1/281.0		51
15	ZEN	5.14	317.2/175.0*	-112	-31
			317.2/131.2		-34
16	OTA	5.10	402.1/166.9*	-80	-47
			402.1/358.1		-26

注: *代表定量离子。

1.4 样品前处理

1.4.1 样品制备

用高速粉碎机将绿茶样品粉碎, 粉碎后充分混匀, 置于聚乙烯样品袋中, -20 °C 条件下保存, 供检测使用。

1.4.2 提取和净化

准确称取 2 g 绿茶样品(精确到 0.001 g)置于 50 mL 塑料离心管中, 加入 10 mL 1% 甲酸乙腈和 1 个陶瓷均质子, 涡旋提取 30 min 后, 再以 10000 r/min 离心 5 min。定量吸取上清液置于 15 mL 离心管中(管中加入 100 mg PSA 和 C₁₈ 作为净化材料), 涡旋混匀 2 min。以 10000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 待 UPLC-MS/MS 测定。

1.4.3 空白实验

除不称取样品外, 其余均按上述步骤进行。

1.5 数据处理

采用美国 AB SCIEX 公司 SCIEX OS 工作站进行定量分析, Microsoft Excel 2021MSO 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 样品前处理

2.1.1 提取溶剂的确定

提取作为样品前处理的关键步骤, 提取效果决定了分析方法的准确性和实用性^[22]。常用的提取试剂有甲醇、正己烷和乙腈, 均有良好的提取效果。正己烷的挥发性强, 易于浓缩, 但其提取的杂质较多, 而且后续进行色谱分析时需要溶剂置换, 增加了操作的复杂性。甲醇对极性敏感的组分(例如 DON)的提取效率不如乙腈^[22]。乙腈不仅提取效率较高, 而且与 LC-MS/MS 分析的兼容性较强, 从而应用广泛^[23-24]。有文献表明, 把一定比例的水加入极性溶剂后进行提取, 可提高提取溶剂对样品的渗透性, 进而提高目标化合物的提取效率^[25-26]。本研究拟采用乙腈为提取剂, 首先考察提取溶剂中水分含量对 16 种真菌毒素回收率的影响。在空白绿茶样品中加入等量 16 种真菌毒素的标准溶液, 选取 50% 乙腈水、80% 乙腈水和乙腈 3 种提取溶剂, 对比不同提取条件下各目标化合物的回收率, 结果见图 1。结果显示, 乙腈作为提取溶剂时, 16 种目标化合物的回收率较高。

有文献表明, 由于有一些真菌毒素含有羧基基团, 所以对提取溶剂的酸度较为敏感, 将甲酸添加到提取溶剂中时, 可以增强含有羧基基团毒素的稳定性及回收率^[27-28], 本研究选取乙腈、0.4% 甲酸乙腈、1% 甲酸乙腈、2% 甲酸乙腈作为提取溶剂, 对比不同酸度对 16 种真菌毒素回收率的影响, 结果见图 2, 提取溶剂为 1% 甲酸乙腈时, 16 种真菌毒素的回收率较高。因此, 本研究的提取溶剂最终选择为 1% 甲酸乙腈。

2.1.2 净化材料的确定

石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)对色素有较好的吸附作用, C₁₈ 可以有效去除油脂类杂质, PSA 能够很好的去除有机酸、脂肪酸、酚类和碳水化合物^[22]。本研究分别考察了 PSA、PSA+C₁₈ 和 PSA+C₁₈+GCB 分别作为净化材料时 16 种真菌毒素的回收率, 图 3 结果表明, PSA+C₁₈ 作为净化材料时净化效果最佳, 故采用 PSA+C₁₈ 为净化材料。

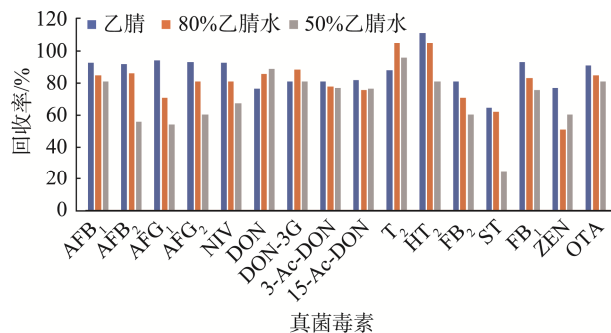


图 1 不同提取溶剂对回收率的影响
Fig.1 Effects of different extractants on recovery efficiency

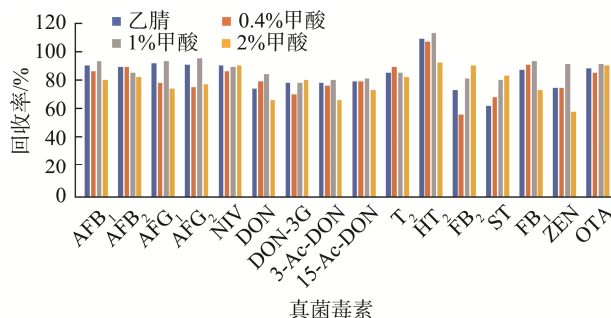


图 2 不同酸度对回收率的影响
Fig.2 Effects of different acidity on recovery efficiency

2.2 色谱条件的优化

用 UPLC-MS/MS 检测样品时, 流动相的比例和组分会影响到目标化合物的色谱峰峰形以及响应值的大小。本研究比较了乙腈-水、甲醇-水、0.1%甲酸水溶液-甲醇、0.1%甲酸水溶液-乙腈作为流动相对 16 种真菌毒素分离的效果。结果表明, 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈时, 16 种毒素的分离效果最好, 色谱图峰形和响应强度均理想, 保留

时间稳定。当流动相加入甲酸后, 目标化合物的离子响应强度均有所提高, 所以本研究最终选用 0.1%甲酸水溶液-乙腈作为流动相。16 种真菌毒素的总离子流色谱图见图 4, MRM 色谱图见图 5。

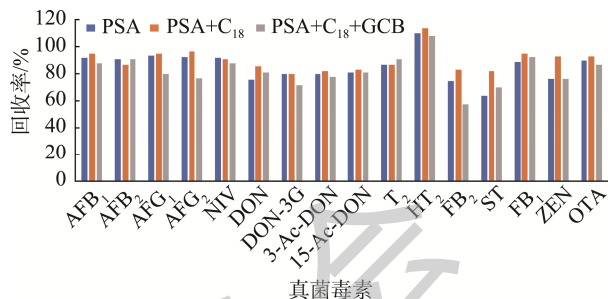
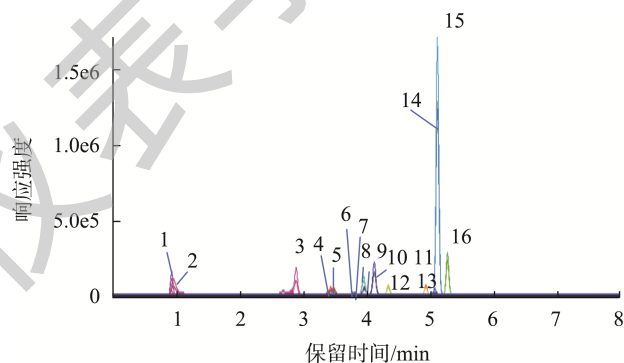


图 3 不同净化材料对回收效率的影响
Fig.3 Effects of different purification materials on recovery efficiency



注: 1. NIV; 2. DON-3-G; 3. DON; 4. 15-Ac-DON; 5. Ac-DON; 6. FB1; 7. AFG2; 8. AFG1; 9. AFB2; 10. FB2; 11. AFB1; 12. HT-2 毒素; 13. T-2 毒素; 14. OTA; 15. ZEN; 16. ST。

图 4 16 种真菌毒素提取离子流色谱图
Fig.4 Extracted ion chromatogram of 16 kinds of mycotoxins

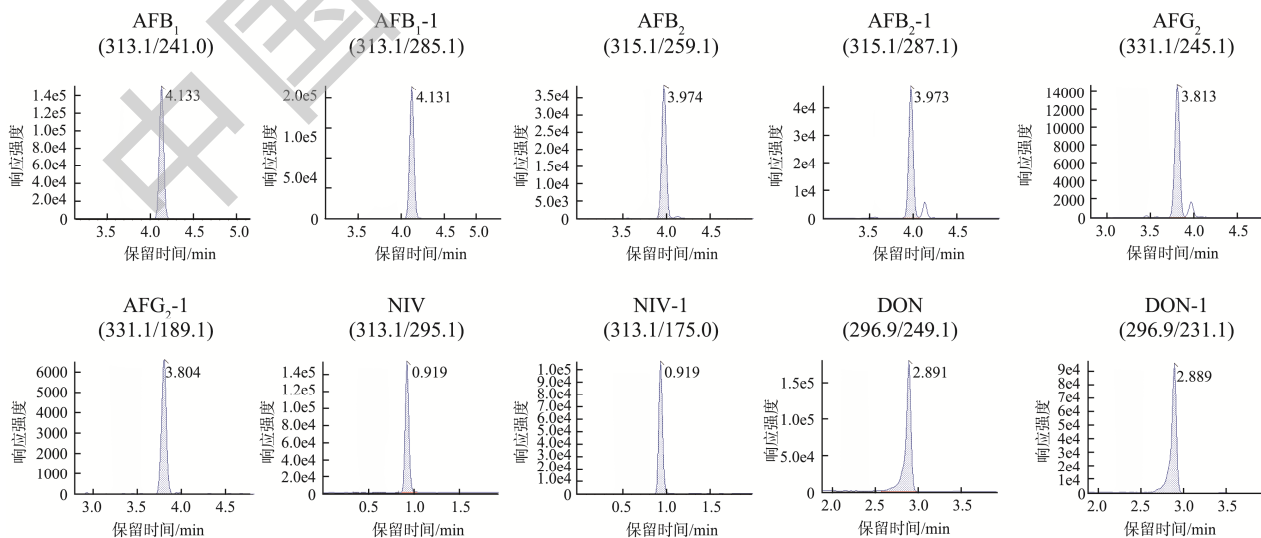


图 5 16 种真菌毒素的 MRM 色谱图
Fig.5 MRM chromatograms of 16 kinds of mycotoxins

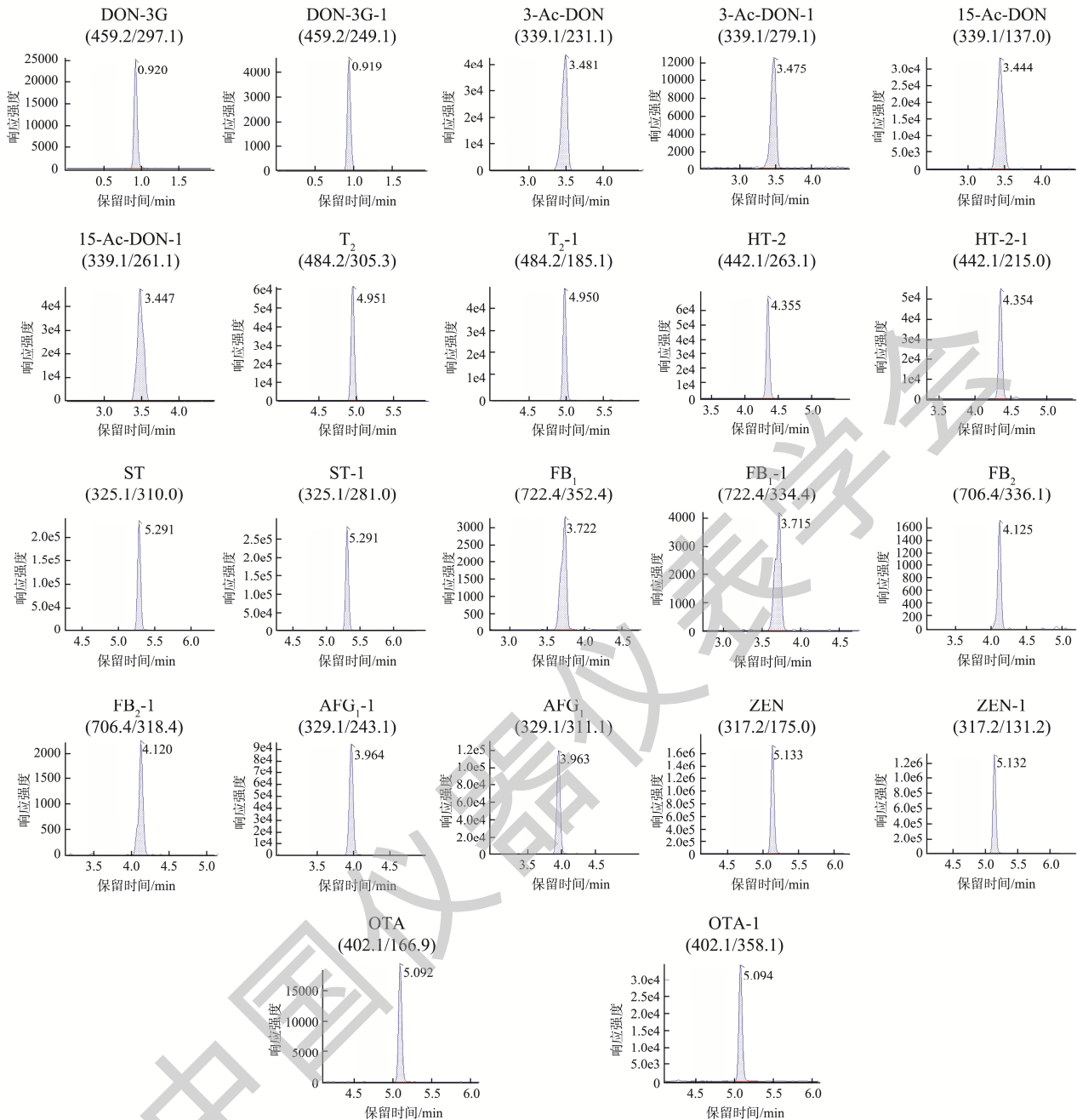


图 5(续) 16 种真菌毒素的 MRM 色谱图

Fig.5 MRM chromatograms of 16 kinds of mycotoxins

2.3 质谱条件的优化

以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速, 将 16 种真菌毒素的标准混合溶液注入质谱仪中, 进行母离子全扫描, 其中 14 种真菌毒素在正离子模式下响应值最大, 2 种真菌毒素在负离子模式下响应值最大。随后通过母离子扫描模式进行质谱条件的优化, 确定去簇电压, 再通过子离子模式, 进一步优化碰撞能量, 得到最强响应的定量离子和定性离子对, 具体质谱参数见表 2。

2.4 评价基质效应

采用纯溶剂标准曲线斜率与基质标准曲线斜率的比值, 当评价基质效应在 0.8~1.2, 可以忽略基质的影响^[29], 当比值小于 0.8 为基质抑制效应, 比值大于 1.2 为基质增强效应, 测定结果见图 6。其中 NIV、DON、DON-3G、3-Ac-DON、15-Ac-DON 基质效应小于 0.8, 基质抑制效应的毒素种类为 5 种, 约占 31.2%; FB₁、FB₂、OTA 基质效应大于 1.2, 基质增强效应的毒素种类为 3 种, 约占 18.8%,

由此可见必须去除基质干扰。因此本研究采用基质匹配标准溶液进行定量, 以满足 16 种真菌毒素的检测要求。

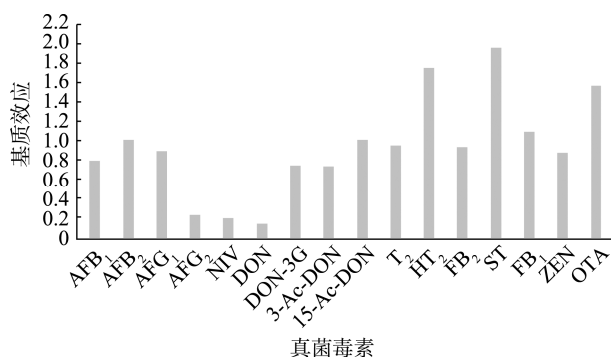


图 6 绿茶基质中 16 种真菌毒素的基质效应

Fig.6 Matrix effects of 16 kinds of mycotoxins in green tea matrix

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系、检出限、定量限

以绿茶空白样品的提取溶液作为空白基质溶液, 用空白基质溶液将标准混合溶液逐级稀释, 配置系列标准混合溶液。以相对应的基质匹配标准混合溶液的质量浓度 ($\mu\text{g/L}$) 为横坐标, 以目标化合物的定量离子的峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线。以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 时相应的加标量作为方法的检出限 (limit of detection, LOD), 以 10 倍信噪比 ($S/N=10$) 时相应的加标量作为方法的定量限 (limit of quantitation, LOQ)^[24], 结果见表 3。在一定浓度范围内,

16 种真菌毒素的线性关系良好, 相关系数在 0.9985~0.9999 之间, LODs 在 0.2~100.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间, LOQs 在 0.5~300.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间。

2.5.2 准确度与精密度

在 LOQ、2 倍 LOQ 和 10 倍 LOQ 进行 3 个水平的加标回收实验, 每个浓度水平进行 6 次平行实验, 计算 6 次测定结果的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD), 用以考察本方法的准确度与精密度, 结果见表 4。16 种真菌毒素的平均回收率在 74.4%~110.9% 之间, RSDs 为 0.9%~4.3%, 可见该方法的加标回收率高, 重复性好, 对绿茶中 16 种真菌毒素的检测均具有较好的准确度和精密度, 符合《实验室质量控制规范食品理化检测》对方法精密度和准确度的要求。

2.6 实际样品测定

为验证新建方法的实用性, 在市场上随机购入 10 份绿茶样品, 按照本研究优化建立的方法对 16 种真菌毒素进行检测。10 批样品共有 2 批样品检出真菌毒素, 其中 2 批样品中检测出 AFB₂, 其浓度分别为 3.82 $\mu\text{g/kg}$ 、4.16 $\mu\text{g/kg}$; 1 批样品中检出 ZEN, 其浓度为 2.54 $\mu\text{g/kg}$ 。鉴于所检出的真菌毒素在 GB 2761—2017《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》未设定明确的限量标准, 且有可能存在潜在的健康风险。因此有必要对绿茶中的真菌毒素污染物进行有效的风险监测, 从而确保绿茶的质量安全。研究结果表明, 本方法适用于绿茶中真菌毒素的定性和定量分析。

表 3 绿茶中 16 种真菌毒素的 LODs、LOQs、线性范围、相关系数

Table 3 LODs, LOQs, linear range and correlation coefficient for 16 kinds of mycotoxins in green tea

序号	化合物名称	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	相关系数(r)	LODs/ $(\mu\text{g/kg})$	LOQs/ $(\mu\text{g/kg})$
1	AFB ₁	0.1~10.0	0.9998	0.5	1.5
2	AFB ₂	0.03~3.00	0.9998	0.2	0.5
3	AFG ₁	0.1~10.0	0.9997	0.5	1.5
4	AFG ₂	0.03~3.00	0.9991	0.2	0.5
5	NIV	20~2000	0.9999	100.0	300.0
6	DON	15~1500	0.9985	75.0	250.0
7	DON-3G	2.5~250.0	0.9985	12.5	40.0
8	3-AcDON	4~400	0.9988	15.0	50.0
9	15-AcDON	2~200	0.9995	7.5	25.0
10	T ₂	0.2~20.0	0.9991	1.0	3.0
11	HT ₂	1~100	0.9988	5.0	15.0
12	FB ₁	2~200	0.9982	10.0	30.0
13	FB ₂	1~100	0.9987	5.0	15.0
14	ST	0.1~10.0	0.9995	0.5	1.5
15	ZEN	2~200	0.9998	10.0	30.0
16	OTA	0.2~20.0	0.9998	1.0	3.0

表 4 绿茶中 16 种真菌毒素的回收率和 RSDs($n=6$)
Table 4 Recovery rates and RSDs of 16 kinds of mycotoxins in green tea ($n=6$)

序号	名称	加标质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 /%	RSDs/%
1	AFB ₁	1.5	94.3	3.6
		3.0	96.6	3.7
		15.0	95.5	2.0
		0.5	80.6	4.1
2	AFB ₂	1.0	84.2	3.9
		5.0	81.2	3.2
		1.5	92.6	2.2
3	AFG ₁	3.0	94.3	2.6
		15.0	95.0	2.1
		0.5	91.6	3.3
		1.0	90.5	2.5
4	AFG ₂	5.0	92.8	1.2
		300	75.3	3.6
		600	74.4	2.6
5	NIV	6000	77.1	3.3
		250	78.3	2.8
		500	80.4	2.2
		2500	79.4	1.4
6	DON	40	76.8	4.3
		80	76.1	3.5
		400	77.5	2.5
7	DON-3-3G	50	77.9	3.5
		100	80.0	2.0
		500	81.0	1.3
8	AcDON	25	81.6	3.0
		50	82.5	1.1
		250	82.9	1.7
9	15-AcDON	3	106.4	3.3
		6	107.8	2.7
		30	110.9	1.7
10	T ₂ 毒素	15	74.5	3.3
		30	75.3	2.3
		150	75.5	1.6
11	HT-2	15	79.3	3.4
		30	79.0	1.3
		150	80.2	2.1
12	FB ₂	30	79.0	1.3
		150	80.2	2.1
		150	80.2	2.1

表 4(续)

序号	名称	加标质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 /%	RSDs/%
13	ST	1.5	74.8	2.4
		3.0	75.3	2.7
		15	75.2	1.3
14	FB ₁	30	76.4	2.9
		60	74.8	0.9
		300	76.5	2.0
15	ZEN	30	77.7	3.0
		60	78.6	0.9
		300	80.0	1.7
16	OTA	3	76.4	3.9
		6	75.8	2.8
		30	78.4	3.3

3 结论

由于真菌毒素结构的多样性,本研究必须不断革新和优化检测方法^[25]。本研究建立了一种改进 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 测定绿茶中 16 种真菌毒素的检测方法。样品经 1% 甲酸乙腈溶液提取后,加入优化的 QuEChERS 盐包进行净化并振荡离心,经 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)进行分离,采用 MRM 模式检测,基质匹配标准曲线外标法定量。在相应浓度范围内,16 种真菌毒素均呈现出良好的线性关系,相关系数在 0.9985~0.9999 之间。本方法采用 QuEChERS 方法进行净化,无需活化和平衡,与常用的免疫亲和柱法相比,操作更为便捷,而且成本较低,可除去大部分基质干扰物,净化效果能够满足实验需求。采用超高效液相色谱-串联质谱分析方法可以同时测定 16 种真菌毒素,检出限能够达到 0.2~100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,灵敏度高,分析时间短。10 min 内即可完成所有目标化合物的检测,可以极大地提高检测效率,能很好地满足对产品质量监督的要求。

本研究在 10 批绿茶样品中检出 2 种真菌毒素,说明真菌毒素污染的安全隐患在绿茶中是存在的。在后续的研究中可增大样品的数量,进一步考察市售绿茶真菌毒素的污染状况。目前,我国的 GB 2761—2017 规定了 AFB₁ 在谷物、坚果、豆类、调味品及特殊膳食等食品中的限量标准,并未规定茶叶及其制品中真菌毒素的限量标准。目前,国际上也只有小部分国家对茶叶中黄曲霉毒素设置了限量标准,如俄罗斯、哈萨克斯坦、白俄罗斯等限制生茶中的 AFB₁ 不能超过 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。阿根廷规定凉茶中的 AFB₁ 不能超过 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,黄曲霉毒素总量不能超过 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[30]。因此,本研究对建立茶叶中的真菌毒素限量标准及检测标准提供了一定的数据支撑和技术参考。

参考文献

- [1] 刘腾飞, 董明辉, 杨代凤, 等. 茶叶质量安全主要化学影响因素分析方法研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 310–325.
LIU TF, DONG MH, YANG DF, *et al.* Progress in analytical methods for major chemical contaminants affecting tea quality and safety [J]. Food Sci, 2018, 39(9): 310–325.
- [2] 刘文静, 黄彪, 傅建炜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定陈年老茶中 16 种真菌毒素残留[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 299–305.
LIU WJ, HUANG B, FU JW, *et al.* Simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Sci, 2021, 42(2): 299–305.
- [3] 张修宝, 龚雪, 王翔, 等. 茶叶微生物污染研究进展[J]. 贵茶, 2023, 2: 4–13.
ZHANG XB, GONG X, WANG X, *et al.* Research progress on microbial pollution in tea [J]. J Guizhou Tea, 2023, 2: 4–13.
- [4] 姜依何, 胥伟, 朱旗. 黑茶真菌污染研究进展及探讨[J]. 茶叶科学, 2018, 38(3): 227–236.
JIANG YH, XU W, ZHU Q. Research progress and discussion on fungal contamination of dark tea [J]. J Tea Sci, 2018, 38(3): 227–236.
- [5] 马燕, 张冬莲, 苏小琴, 等. 茶叶中真菌毒素污染的国内外研究概况[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(6): 626–627.
MA Y, ZHANG DL, SU XQ, *et al.* Review of the studies on the contamination of mycotoxins in tea [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(6): 626–627.
- [6] VIEGAS C, SA F, MATEUS M, *et al.* Commercial green tea from Portugal: Comprehensive microbiologic analyses [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 333: 108795.
- [7] MA Y, LING TJ, SU XQ, *et al.* Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus Niger*, *Aspergillus tamarii* and *Aspergillus fumigatus* [J]. Food Chem, 2021, 334: 127560.
- [8] SEDOVA I, KISELEVA M, TUTELYAN V. Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(11): 444.
- [9] CHINAZA GA, ERICK NO, SARAH N, *et al.* Mycotoxins' toxicological mechanisms involving humans, livestock and their associated health concerns: A review [J]. Toxins, 2022, 14: 167.
- [10] BOGDANOVA E, PUGAJEVA I, REINHOLED S I, *et al.* Two-dimensional liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for simultaneous monitoring of 70 regulated and emerging mycotoxins in Pu-erh tea [J]. J Chromatogr A, 2020, 1622: 461145.
- [11] RAHMANI A, JINAP S, SOLEIMANY F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins [J]. Comp Rev Food Sci Food Saf, 2009, 8(3): 202–251.
- [12] 赵亮. 粮油食品中的黄曲霉毒素检测技术分析[J]. 现代食品, 2021(14): 47–49.
ZHAO L. Analysis of aflatoxin detection technology in cereals, oils and foods [J]. Mod Food, 2021(14): 47–49.
- [13] 周颖琴, 熊瑛, 吴倩青. 酶联免疫吸附法测定药食同源中药饮片中的黄曲霉毒素的研究[J]. 现代食品, 2022, 28(18): 163–168.
ZHOU YQ, XIONG Y, WU SQ. Study on the determination of aflatoxin in traditional chinese medicine slices with the homology of medicine and food by enzyme linked immunosorbent assay[J]. Mod Food, 2022, 28(18): 163–168.
- [14] 李靖靖. 酶联免疫吸附法在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2023, 30: 154–156.
LI JJ. Application of enzyme-linked immunosorbent assay in food safety detection [J]. China Food Saf Mag, 2023, 30: 154–156.
- [15] 赵磊, 吴明宸, 于亚楠, 等. 酶联免疫和薄层层析法检测茶叶中 AFB1 的评价[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(6): 1190–1194.
ZHAO L, WU MC, YU YN, *et al.* Evaluation of aflatoxin B1 in tea was detected by ELISA and TLC [J]. Heilongjiang Med J, 2018, 31(6): 1190–1194.
- [16] 陈予君, 任春明, 张小勇, 等. 高效液相色谱法测定粮食中真菌毒素的效果评价[J]. 粮食与食品工业, 2022, 29(2): 62–67, 72
CHEN YJ, REN CM, ZHANG XY, *et al.* Evaluation of the effect of high performance liquid chromatography on the determination of mycotoxins in grain [J]. Cere Food Ind, 2022, 29(2): 62–67, 72.
- [17] 梁辉. 液相色谱法在测定粮食作物中真菌类毒素的应用分析[J]. 现代食品, 2023, 29(18): 178–180.
LIANG H. Analysis of the application of liquid chromatography in the determination of fungal toxins in food crops [J]. Mod Food, 2023, 29(18): 178–180.
- [18] STEINER D, MALACHOVÁ A, SULYOK M, *et al.* Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants [J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413(1): 25–34.
- [19] 胥伟, 姜依何, 田双红, 等. 基于色谱-质谱技术分析高湿条件下霉变黑毛茶品质成分变化及真菌毒素残留[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 293–297.
XU W, JIANG YH, TIAN SH, *et al.* Analysis of quality components and mycotoxins residues in mildewed raw dark tea with high humidity by liquid chromatography and mass spectrometry [J]. Food Sci, 2019, 40(20): 293–297.
- [20] ZHOU HY, YU S, YAN ZH, *et al.* Development of a novel UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins in different tea categories [J]. Toxins, 2022, 14: 169–183.
- [21] YU CC, HAO DY, CHU Q, *et al.* A one adsorbent QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of 10 organophosphorus pesticide residues in tea [J]. Food Chem, 2020, 321: 126657.
- [22] 赵淑娥, 肖庚鹏, 袁璐, 等. QuEChERS 提取快速液相色谱-串联质谱法同时测定食品中多种真菌毒素[J]. 江西化工, 2023, 6: 37–40, 44.
ZHAO SE, XIAO GP, YUAN L, *et al.* Simultaneous determination of several mycotoxins in food by QuEChERS extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Jiangxi Chem Ind, 2023, 6: 37–40, 44.
- [23] 陈晓嘉, 周芳梅, 钟舒洁. UPLC-MS/MS 测定普洱茶中黄曲霉毒素 B1, B2, G1 和 G2[J]. 食品工业, 2019, 40(12): 290–293.
CHEN XJ, ZHOU FM, ZHONG SJ. Determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Pu'er tea by UPLC-MS/MS [J]. Food Ind, 2019, 40(12): 290–293.
- [24] 瞿广胜, 李显娉, 徐林, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定豆类及制品中 6 种真菌毒素[J]. 贵州农业科学, 2021, 49(6): 99–107.

- ZHAI GS, LI XY, XU L, *et al.* QuEChERS-UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six mycotoxins in beans and their products [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2021, 49(6): 99–107.
- [25] 许嘉, 王硕, 曹瀚文. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定挂面、方便面中 15 种真菌毒素[J]. *农产品质量与安全*, 2024, 1: 48–52, 92.
- XU J, WANG S, CAO HW. Determination of 15 kinds of mycotoxins in dried noodles and instant noodles by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Qual Saf Agro-Pro*, 2024, 1: 48–52, 92.
- [26] 曾艳, 张矛, 陈亚, 等. 液相色谱-串联质谱法检测茶叶中真菌毒素的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3834–3841.
- ZENG Y, ZHANG M, CHEN Y, *et al.* Research progress on detection of mycotoxins in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(12): 3834–3841.
- [27] JO HW, PARK MK, HEO HM, *et al.* Simultaneous determination of 13 mycotoxins in feedstuffs using QuEChERS extraction [J]. *Appl Biol Chem*, 2021, 64(1): 34.
- [28] 秦富, 汪文龙, 钟佳静, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱测定坚果中 40 种真菌毒素[J]. *中国口岸科学技术*, 2023, 5(1): 40–52.
- QIN F, WANG WL, ZHONG JJ, *et al.* Determination of 40 mycotoxins in nuts by QuEChERS-liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *China Port Sci Technol*, 2023, 5(1): 40–52.
- [29] ZHOU W, YANG S, WANG PG. Matrix effects and application of matrix effect factor [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 9(23): 1839–1844
- [30] 郭明珠, 武爱波, 余佃贞. 茶叶中黄曲霉毒素的安全性风险研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(22): 7143–7149.
- GUO MZ, WU AB, YU DZ. Advances on the security risk of aflatoxin in tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(22): 7143–7149.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介

刘琳, 工程师, 主要研究方向为食品药品检验。
E-mail: huiyill@163.com

刘云, 主任药师, 主要研究方向为食品药品检验。
E-mail: cyr123love@163.com