

# 高效液相色谱-串联质谱法检测茶叶中的赭曲霉毒素 A

莫瑾\*, 龚强, 周慧平, 白雪, 谭建锡, 彭梓, 黄迎波

(湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 长沙 410004)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱联用技术检测茶叶中赭曲霉毒素 A(OTA)的方法。 **方法** 用甲醇-2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液(60:40, V:V)提取样品中的赭曲霉毒素 A, 采用免疫亲和柱对茶叶中的赭曲霉毒素 A 净化, 使用甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%乙酸)为流动相, 检测赭曲霉毒素 A, 采用正离子模式。 **结果** 本方法中赭曲霉毒素 A 在 0.5~10 ng/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系( $r=0.996$ ), 回收率在 83.6%~92.5%之间, 相对标准偏差在 6.5%~9.1%之间, 检出限为 0.1 μg/kg。 **结论** 该方法准确性好、灵敏度高, 适用于茶叶样品的检测。 **关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 赭曲霉毒素 A; 免疫亲和柱; 茶叶

## Determination of ochratoxin A in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MO Jin\*, GONG Qiang, ZHOU Hui-Ping, BAI Xue, TAN Jian-Xi, PENG Zi, HUANG Ying-Bo  
(Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of ochratoxin A (OTA) in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by methanol-2% sodium bicarbonate solution (60:40, V:V), followed by clean-up on OchraTest affinity cartridge using methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution in the presence of 0.1% formic acid as the mobile phase. OTA was detected in positive ion mode. **Results** A good linearity ( $r=0.996$ ) was achieved for the target compounds in the range of 0.5~10 ng/mL. The recoveries of ochratoxin A in 4 tea samples were varied from 83.6% to 92.5% ( $n=5$ ) with the relative standard deviations from 6.5% to 9.1%. The limit of detection was 0.1 μg/kg. **Conclusion** The method is accurate and sensitive, and suitable for the determination of ochratoxin A in tea samples.

**KEY WORDS:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ochratoxin A; immuno-affinity column; tea

基金项目: 国家质检总局项目(2010IK133)

**Fund:** Supported by the Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Foundation of China (2010IK133)

\*通讯作者: 莫瑾, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物. E-mail: moj@hnciq.gov.cn

\*Corresponding author: MO Jin, Senior Engineer, Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: moj@hnciq.gov.cn

## 1 引言

赭曲霉毒素是由曲霉属和青霉属的一些真菌产生的次级代谢毒素, 包括 A、B、C、D 等 7 种结构类似的化合物, 其中以赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA) 的毒性最大<sup>[1]</sup>。主要分布在谷物和其他植物性食品及相关产品和动物性食品中, 对人和动物的肾脏、肝脏具有毒性, 且还有致畸、致突变和致癌作用, 并有免疫抑制作用<sup>[2,3]</sup>。1993 年国际癌症机构(The International Agency for Research on Cancer, IARC)将其确定为 2B 类致癌物。现已查明, 除霉变的谷物<sup>[2]</sup>及啤酒<sup>[3]</sup>外, OTA 广泛存在于咖啡豆<sup>[4]</sup>、可可豆<sup>[5]</sup>、葡萄酒和葡萄干<sup>[6]</sup>中, Doris 等<sup>[7]</sup>报道了在普洱茶中检出赭曲霉毒素 A。

目前国内外检测 OTA 的方法主要有酶联免疫吸附法<sup>[5]</sup>(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、高效液相色谱法<sup>[4]</sup>(high performance liquid chromatography, HPLC)、薄层层析法(thin layer chromatography, TLC)等。国际上常采用 HPLC 法检测食品中赭曲霉毒素 A<sup>[6]</sup>, 但是, 对于茶叶等比较复杂的基质, 液相色谱法的基质干扰大、分析过程耗时较长。随着国内外对茶叶中的产毒真菌以及毒素检测提出的要求不断提高, 如何提高茶叶 OTA 的检测灵敏度, 降低茶叶样本对检测结果的干扰, 对于保障茶叶食用安全和顺利出口具有越来越重要的意义。本研究旨在建立一种灵敏度高、专属性强、分析速度快的高效液相色谱-质谱/质谱法(HPLC-MS/MS)以代替高效液相色谱法<sup>[8,9]</sup>, 结合高速匀质提取、免疫亲和柱净化等前处理方法<sup>[10]</sup>, 可降低检出限。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

实验样品均为市购: 红茶样品 30 个, 绿茶样品 33 个, 普洱茶样品 19 个, 花茶样品 18 个。

OTA 标准样品: 以色列 Fermentek 公司。采用称量法制备母液, 准确称取赭曲霉毒素 A 对照品 1 mg 至 10 mL 容量瓶中, 用 HPLC 级甲醇配成标准贮备液, 质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ , 2~8  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。

甲醇、乙酸铵、甲酸(美国 Dikma Dikmapure 公司); 氯化钠、碳酸氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾、乙酸为分析纯(北京国药); 实验室用水按照

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。PBS 配制: 磷酸氢钠: 1.2 g, 氯化钠: 8.0 g, 氯化钾: 0.2 g, 用 990 mL 纯水溶解, 调 pH 7.0。OchraTest Column 亲和柱、真菌清洗缓冲液(美国 Vicam 公司)。

### 2.2 仪器与设备

岛津 20 A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); API 4000 Q TRAP 质谱仪(美国应用生物系统公司), 带电喷雾(ESI)电离源和三重四级杆质量分析器; 3-18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); N-EVAp 氮吹仪(美国 Organomation 公司); 超声液振荡器(KQ-250E, 昆山市超声仪器有限公司)。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 样品提取

取 25 g 样品, 加入 100 mL 甲醇-2%  $\text{NaHCO}_3$  溶液(60:40, V:V)溶液, 匀浆 2 min 后 3000 r/min 离心 5 min, 滤纸过滤备用。

#### 2.3.2 提取物的稀释

移取 10 mL 2.3.1 的上清液至加有 40 mL PBS 缓冲液干净的烧杯中, 混匀。将稀释液通过玻璃微纤维过滤器, 收集滤液。

#### 2.3.3 免疫亲和层析柱操作

取 2.3.2 中得到的滤液 10 mL, 全部通过 OchraTest 亲和柱, 流速 1~2 滴/s。取 10 mL 真菌清洗缓冲液通过亲和柱, 流速 1~2 滴/s。取 10 mL 纯水通过亲和柱, 流速 1~2 滴/s, 直到空气进入到亲和柱。取 1.5 mL HPLC 级甲醇淋洗亲和柱, 流速 1~2 滴/s, 收集样品淋洗液(1.5 mL)于玻璃测试管中, 进行 HPLC-MS/MS 检测。

### 2.4 色谱条件

Agilent Eclipse AAA (150 m $\times$ 4.6 mm; 3.5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 以 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%乙酸)溶液为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 流速 0.5 mL/min, A:B=1:4 等度洗脱。

### 2.5 标准工作曲线的制备

质量浓度分别为 0.5、1、5、10 ng/mL 标准样品的配制: 分别吸取 5、10、50、100  $\mu\text{L}$  100 ng/mL 的标准样品配制液定容到 1 mL。

加标回收: 采用样品预处理的方法进行提取和净化后, HPLC-MS/MS 进行测定, 以质量浓度

$X$ /(ng/mL)为横坐标、峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

### 3 结果与分析

#### 3.1 质谱条件与色谱条件的选择

##### 3.1.1 质谱条件的优化

根据赭曲霉毒素 A 的分子质量和分子结构<sup>[11-13]</sup>, 利用流动注射直接进标准品, 对赭曲霉毒素 A 的质谱条件进行优化, 结果显示:  $m/z$  404.1 的离子丰度最大。以  $m/z$  404.1 为碰撞解离的母离子, 进一步筛选特征碎片离子。赭曲霉毒素 A 的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压见表 1。

表 1 多反应监测扫描模式检测赭曲霉毒素 A 的部分质谱参数

化合物	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	去簇电压/eV	碰撞能量 /eV
OTA	404.1	239.0*	106	34
		341.1	102	36
		358.1	99	32

\* 为定量离子

##### 3.1.2 色谱条件的选择

根据赭曲霉毒素 A 的性质, 并参照部分文献对色谱柱和流动相进行条件优化。比较分析了 Agilent Eclipse AAA 柱、 $C_{18}$  柱以及  $C_8$  柱, 结果表明采用 Agilent Eclipse AAA 柱的分离效果最理想。分别采用甲醇、乙腈作为有机相, 水相为 0.1%乙酸、5 mmol/L 乙酸铵、0.1%甲酸, 进行组合条件的优化, 结果表明甲醇+5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%乙酸)组合时, 峰形、响应强度、分析时间以及分离效果最佳。因此, 采用甲醇和 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%乙酸)作为流动相。在优化好的色谱和质谱条件下, 赭曲霉毒素 A 的多反应监测(MRM)色谱图见图 1。

#### 3.2 前处理方法的选择

为保证样品前处理中的回收率, 应选择萃取效率高的溶剂。根据赭曲霉毒素 A 溶解性能, 对不同比例的甲醇-水作为萃取溶剂进行筛选。实验证明, 使用甲醇-2%  $\text{NaHCO}_3$  溶液(60:40, V:V)对茶叶样品进行萃取, 其效率可达 98%, 且杂质干扰小。茶叶中的 OTA 提取可采用高速匀质提取、免疫亲和柱净化和 LC-MS/MS 联用方法, 该方法实用可靠。本实验比较了多功能净化柱与免疫亲和柱, 实验结果表明: 免疫

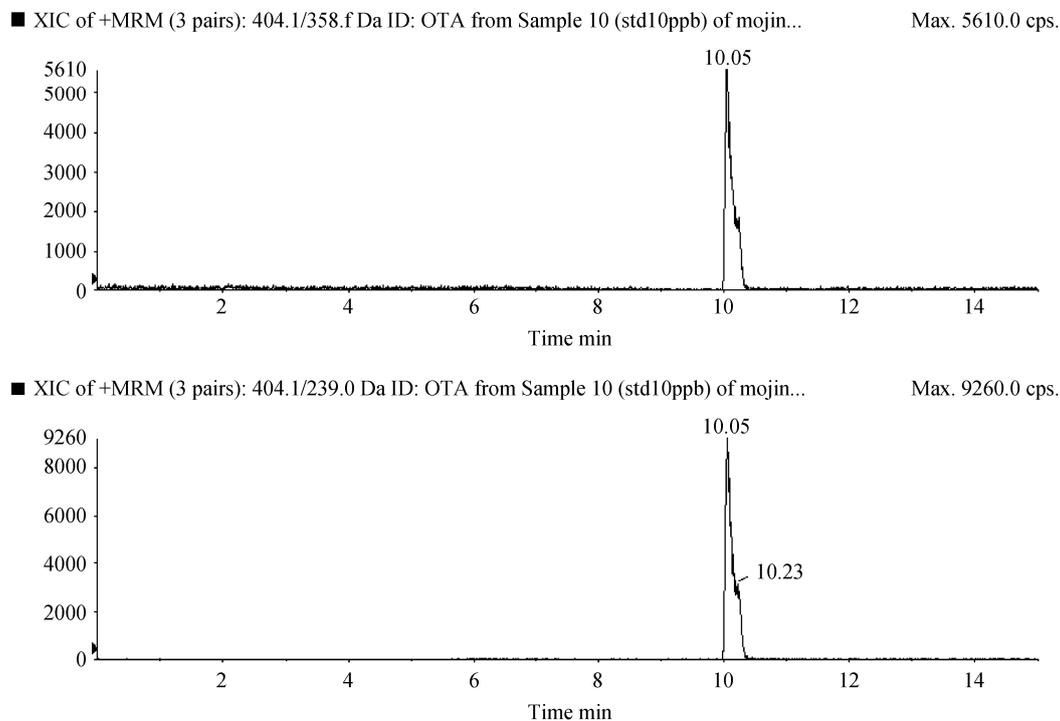


图 1 OTA 的多反应监测(MRM)色谱图(1.0 ng/mL)

Fig. 1 MRM chromatogram of OTA (1.0 ng/mL)

亲和柱过柱后, 杂质干扰小, 操作简单, 且过柱时间短(不需要活化直接进样), 回收率高。

### 3.3 标准曲线和检出限

准确吸取不同质量浓度的 OTA 标准工作溶液 10  $\mu\text{L}$  进行 HPLC-MS/MS 分析, 实验结果表明: 在 0.5 ~ 10 ng/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系,  $r = 0.996$ (图 2)。添加接近定量限(LOQ)的一系列低质量浓度样品, 以信噪比大于等于  $3(S/N \geq 3)$  的最低质量浓度为最低检测限(LOD), 得出检出限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

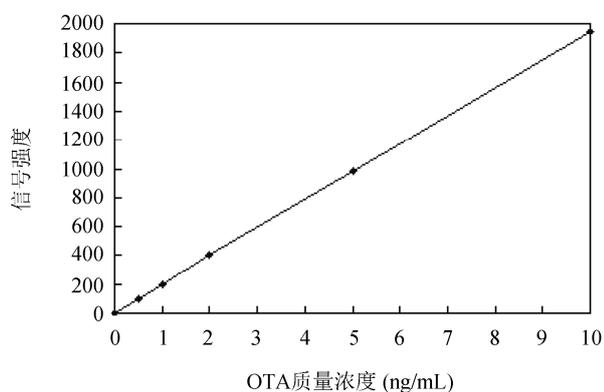


图 2 标准曲线图

Fig. 2 Standard curve of OTA

### 3.4 回收率及精密度实验

本实验对多种样品进行测定, 并做了添加回收实验, 并进行了 5 组平行实验, 结果见表 2。样品的回收率在 83.6%~92.5%之间, 且相对标准偏差在 6.5%~9.1%之间。

表 2 实际样品的测定及添加实验结果( $n=5$ )

Table 2 Content and average spike recoveries of OTA in tea samples ( $n=5$ )

样品名称	OTA 实测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	添加水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均回收率/(%)	相对标准偏差/(%)
红茶	未检出	5.00	83.6	8.8
绿茶	未检出	2.00	92.5	6.5
普洱茶	未检出	2.00	88.9	9.1
花茶	0.22	5.00	87.3	6.8

### 3.5 实际样品的检测

采用该方法对实验室 100 个茶叶样品进行检测, 有 4 个样品检出 OTA, 含量在 0.22~0.44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间, 参照国家标准 GB 2761-2011 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量的要求中对食品中赭曲霉含量的要求为 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 所测样品均未超过国家限量要求。采用空白样品进行添加试验, 空白添加及实际样品的色谱图见图 3。

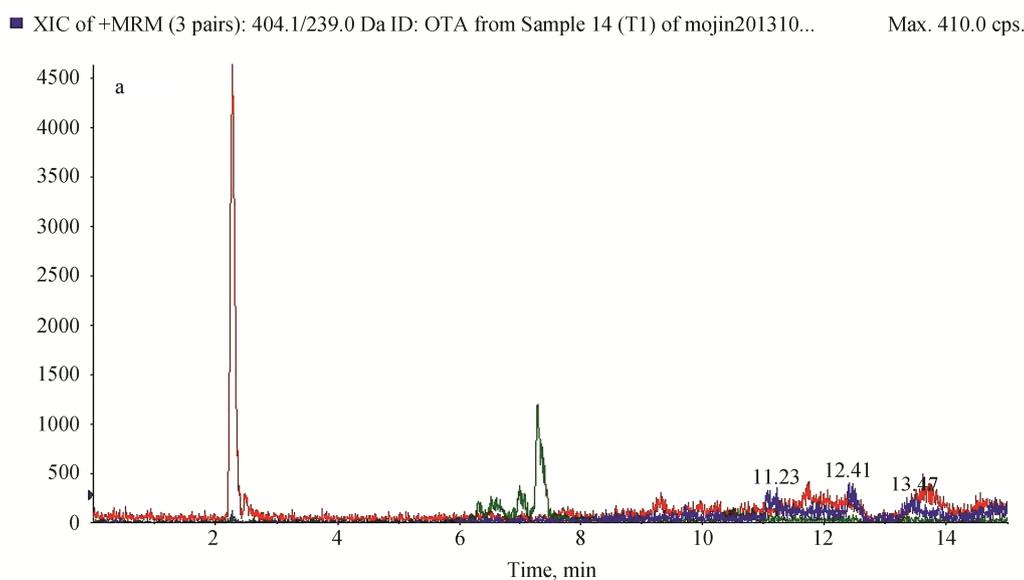


图 3 实际样品及空白添加的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of real sample and blank added

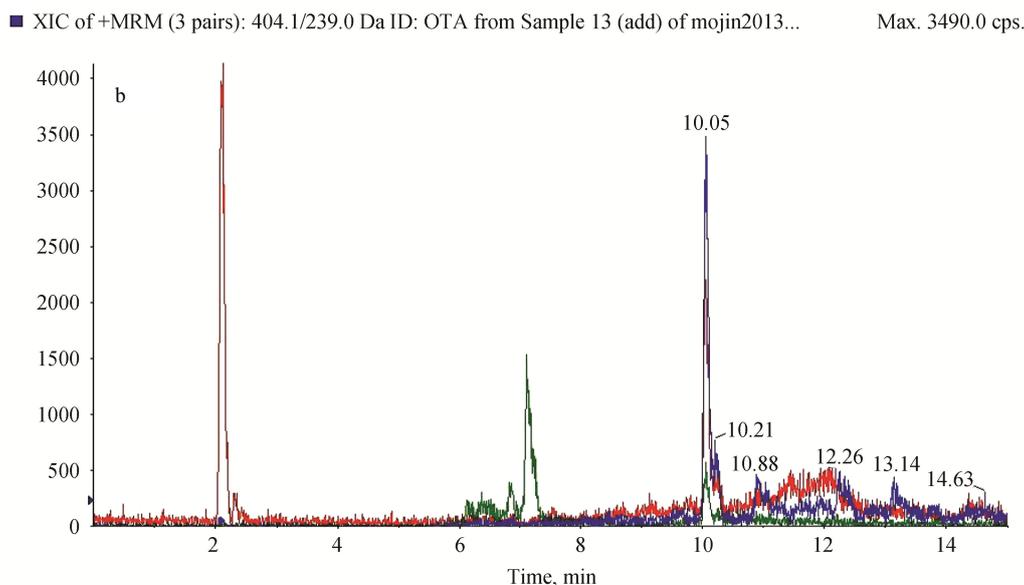


图 3 实际样品及空白添加的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of real sample and blank added  
 a: 实际茶叶样品; b: 1.0 ng/g 空白加标茶叶样品  
 a: tea samples; b: 1.0 ng/g blank added tea samples

## 4 结 论

本实验建立了用 HPLC-MS/MS 检测茶叶中 OTA 的方法。目前采用高速匀质提取、免疫亲和柱净化和 HPLC-MS/MS 联用的方法对茶叶中 OTA 进行检测的方法报道较少。采用免疫亲和柱对茶叶中的 OTA 进行净化, 具有前处理简单、净化效果好、保留能力高等特点。本方法的精密度和回收率能满足食品检测的相关法规标准要求。

### 参考文献

- [1] 许焯, 马荣山, 李军. 高效液相色谱法测定酒中赭曲霉毒素 A[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 40-42.  
XU Y, MA RS, LI J. Determination of ochratoxin in wine by liquid chromatography [J]. Liquor Making, 2006, 33(2): 40-42.
- [2] Visconti A, Paoal M, Centonze G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2000, 888(11): 321-326.
- [3] 马莉, 李珊, 牛凌梅, 等. 固相萃取- 高效液相色谱检测啤酒中赭曲霉毒素 A[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1345-1346.  
Ma L, Li S, Niu LM, *et al.* Application of solid - phase extraction to determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(8): 1345-1346.
- [4] 杨家玲, 岳田利, 高振鹏, 等. 赭曲霉毒素 A 检测方法的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2008, 139(6): 4-7.  
Yang JL, Yue TL, Gao ZP, *et al.* Research advance on the determination methods of ochratoxin A [J]. Acad Period Farm Prod Proc, 2008, 139(6): 4-7.
- [5] Boudra H, Bars PL, Bars JL. Thermo stability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1156-1158.
- [6] 谈敦芳, 康维均, 甄国新, 等. 高效液相色谱法检测谷物中赭曲霉毒素 A 的方法评价与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 12-13.  
Tan DF, Kang WJ, Zhen G, *et al.* Evaluation and application of determination of ochratoxin A in samples of corn by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(1): 12-13.
- [7] Doris H, Bettina P, Christoph R. Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Puerh tea [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 166(2) 316-322.
- [8] 谢春梅, 王华. 葡萄与葡萄酒中赭曲霉毒素 A 检测方法研究进展[J]. 酿酒科技, 2007, (3): 92-95.  
Xie CM, Wang H. Research advance in the determination

- methods for ochratoxin A in grape and in grape wine [J]. *Liquor Making Sci Technol*, 2007, (3): 92–95.
- [9] Wood GM, Patel S, Entwisle AC, *et al.* Ochratoxin A in wheat: a second inter-comparison of procedures [J]. *Food Addit Contam*, 1996, 50(13): 519–539.
- [10] 陈大义, 余蓉. HPLC 法快速检测咖啡及粮食中赭曲霉毒素 A[J]. *卫生研究*, 1999, 27(增刊 1): 143–145.  
Chen DY, Yu R. Fast Determination of ochratoxin A and B in roast coffee and cereals by HPLC [J]. *J Hyg Res*, 1999, 27(Suppl1): 143–145.
- [11] Abrunhosa L, Serra R, Venancio A. Biodegradation of ochratoxinA by Fungi isolated from grapes [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(25): 7493–7496.
- [12] 章英, 许杨. 谷物类食品中赭曲霉毒素 A 分析方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 767–771.
- Zhang Y, Xu Y. Advance on analysis methods of ochratoxin A in cereals [J]. *Food Sci*, 2006, 27(12): 767–771.
- [13] Losito I, Monaci L, Palmisano F, *et al.* Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2004, 18(17): 1965–1971.

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



莫瑾, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: mojin@hnciq.gov.cn