

液相色谱-串联质谱法检测茶叶中真菌毒素的研究进展

曾 艳^{1*}, 张 矛², 陈 亚¹, 张 宇¹, 杨巧慧¹, 李霞雪¹, 王永佳¹

(1. 雅安市农产品质量监测检验中心, 雅安 625000; 2. 雅安市雨城区农业农村局, 雅安 625000)

摘 要: 茶叶由于富含多酚类、儿茶素和多种矿物质等, 具有降血脂、抗氧化、减肥、抗菌等多重保健功效而备受欢迎, 其质量安全一直广受关注。茶叶在其生产加工和保存过程中有可能被真菌毒素污染, 真菌毒素由于对人和动物具有严重的危害(致癌性)备受关注。因此针对茶叶中毒素残留的高效、高通量检测方法, 成为了目前研究的重点。本文参考国内外相关文献, 对液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)在茶叶真菌毒素检测领域的研究进展进行了综述; 对不同前处理提取试剂、净化小柱和检测仪器条件的优劣进行了比较; 对该方法用于检测不同品种茶叶时, 其基质效应对结果的影响进行了分析; 对该方法用于茶叶真菌毒素检测的发展进行了展望, 为检测茶叶中真菌毒素检测标准和限量标准的建立提供理论依据。

关键词: 茶叶; 真菌毒素; 液相色谱-串联质谱法

Research progress on detection of mycotoxins in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZENG Yan^{1*}, ZHANG Mao², CHEN Ya¹, ZHANG Yu¹, YANG Qiao-Hui¹,
LI Xia-Xue¹, WANG Yong-Jia¹

(1. Ya'an Quality Inspection of Agricultural Products Monitoring Center, Ya'an 625000, China;
2. Yucheng District Agricultural and Rural Bureau of Ya'an, Ya'an 625000, China)

ABSTRACT: Tea, rich in polyphenols, catechins and a variety of minerals, is popular for its multiple health care effects such as lowering blood lipids, anti-oxidation, weight loss and antibacterial, and its quality and safety has been widely concerned. Tea may be contaminated with mycotoxins during its production, processing and preservation, and mycotoxins have attracted more attention due to their serious harm to humans and animals (carcinogenicity). Therefore, efficient and high-throughput detection methods for toxin residues in tea have become the focus of current reresearch. This paper reviewed the research progress of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the detection of mycotoxins in tea, compared the advantages and disadvantages of different pre-treatment extraction reagent, purification column and detection instrument conditions; the influence of matrix

基金项目: 四川省 2021 年农产品质量安全风险监测项目(川农发[2021]34 号)、2021 年雅安市雨城区科技特派员项目

Fund: Supported by the 2021 Agricultural Products Quality and Safety Risk Monitoring Project of Sichuan (Agricultural of Sichuan [2021]34), and the 2021 Science and Technology Commissioner Project of Yucheng District, Ya'an

***通信作者:** 曾艳, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品、畜产品及产地环境(土壤、水、大气)、农业投入品(肥料、饲料、农药)质量安全检测。E-mail: 276874503@qq.com

***Corresponding author:** ZENG Yan, Master, Senior Agronomist, Ya'an Quality Inspection of Agricultural Products Monitoring Center, Ya'an 625000, China. E-mail: 276874503@qq.com

effect on the results was analyzed when the method was used to detect different kinds of tea; the development of this method for the detection of mycotoxins in tea was prospected, so as to provide theoretical basis for the establishment of the detection standard and limit standard of mycotoxins in tea.

KEY WORDS: tea; mycotoxins; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

真菌毒素(mycotoxins)是一类由产毒丝状真菌产生的有毒次生代谢产物。迄今已发现的真菌毒素超过 400 多种,主要来源于曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢属(*Alternaria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)和青霉属(*Penicillium*)等产毒丝状真菌^[1-3]。这些真菌毒素不仅具有致癌、致畸和致突变等作用,还具有肝细胞毒性、中毒性肾损害、生殖紊乱以及免疫抑制等作用,对人畜健康造成极大危害^[3-6]。

根据联合国粮食农业组织统计,全球每年约有 25% 的谷物被真菌毒素污染,2% 的农产品因污染严重而失去营养和经济价值,造成数百亿美元的经济损失^[6-7]。国内外学者运用不同的检测技术对食品中的真菌毒素做了大量的研究^[8-12],推动了真菌毒素检测领域的发展。目前,真菌毒素分析前处理方法主要包括固相萃取^[13-14]、加速溶剂萃取^[15]、基质固相分散萃取^[16-17]和液液微萃取^[18-19]等,检测方法无论是研究探索还是国家标准多以液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)为主,如 GB 5009.209—2016《食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定》、GB 5009.111—2016《食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》、GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》等。

茶叶由于富含多酚抗氧化剂、儿茶素和矿物质^[19-20],被公认为是世界上最受欢迎的饮料之一,长时间以来,几乎是部分人的日常饮料^[20-22]。但是茶叶在热带气候和恶劣的贮藏条件下或干旱、昆虫和栽培时的用药和机械损伤等各阶段,都可能会造成真菌污染,其有毒次级代谢产物通过食物链进入人体并累积,从而对人体健康带来严重危害。也有研究表明,这些真菌毒素会从茶叶原料(生茶)转移到衍生的茶叶饮品中,因此在国外,对于茶饮品中真菌毒素污染的研究较多^[20,23-25]。在我国陈年茶叶—普洱茶、黑茶、红茶等老陈茶中真菌毒素污染已引起消费者的广泛关注^[25-30]。研究表明,茶叶中主要污染的真菌毒素为赭曲霉毒素^[31-32]、玉米赤霉烯酮^[33-34]、伏马毒素^[35]、黄曲霉毒素^[36-38]、T-2 毒素^[39-40]等,因此,我国在 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中也对各类真菌毒素进行了限量,但种类仅限于谷物、豆类、坚果、乳与乳制品等,并没有茶叶中真菌毒素的限量值;欧盟 98/53/EC 指令中也只规定了人类生活消费品中生物毒素

的限量值和检测方法。尽管对茶叶中真菌毒素检测的研究报道越来越多,但是目前国内外鲜少有针对茶叶中检测真菌毒素的国家或行业检测标准;有关茶叶中真菌毒素的检测技术的综述也鲜有报道。因此本文根据目前检测茶叶中真菌毒素最主要的技术—LC-MS/MS 的特点,结合样品基质特征和真菌毒素的理化性质,总结了利用该技术检测茶叶中真菌毒素的应用进展,以期为茶叶中真菌毒素检测方法的选择、新检测标准和限量标准的建立提供理论基础。

1 前处理方法

1.1 提取

LC-MS/MS 由于检测的灵敏度高、检出限低,已经广泛应用于谷物、坚果、奶粉等样品中真菌毒素的测定。与之相比,茶叶样品基质复杂,干扰物质多,直接检测会对仪器造成污染,同时也会对结果造成干扰。因此,前处理是茶叶真菌毒素检测中较为关键的部分,提取和净化过程直接决定了检测的准确度和精密度,目前主要的前处理方法如表 1 所示。

真菌毒素是真菌微生物的代谢产物,绝大部分附着在茶叶表面,并没有进入到茶叶内部。因此,使用超声和振荡的方式,在 20~30 min 内即可进行提取。同时相关文献也表明这两种提取方式对茶叶中真菌毒素检测结果没有明显差异^[15,38,43],称样量 1~2 g,提取剂加入量为称样量的 4~5 倍,即可得到较好的结果^[43]。目前,植物性样品中使用的提取溶剂主要有丙酮、乙酸乙酯、乙腈、甲醇和正己烷^[35,38,43-46]等。丙酮和正己烷对茶叶组织渗透力不足,难以将从植物组织中完全萃取,提取效率低,乙酸乙酯由于酯溶性强,会提取出大量的叶绿素。因此,检测茶叶真菌毒素时主要使用乙腈、甲醇作为提取剂。甲醇作为质子化溶剂,比乙腈具有更好的溶解性,同时也会提取较多的杂质,研究表明^[43-44],这些茶基质共提物(叶绿素、叶黄素等)在后期检测中强烈抑制了目标化合物的电离信号,而乙腈提取的脂肪和色素类杂质较少^[25,43-44],因此,用乙腈作提取剂更优于甲醇。由于部分真菌毒素对 pH、极性范围敏感,众多研究^[39-40,44]向有机提取剂中加入了不同浓度的甲酸、乙酸或低浓度盐酸(1%)等调节提取剂的 pH,使得这部分毒素在适宜的酸度下得以有效提取,实现了多种真菌毒素同时提取。ZHOU 等^[44]研究发现,多种真菌毒素同时提取时,随着乙腈浓度的增加,多种真菌毒素的回收率会有所

表 1 LC-MS-MS 法检测茶叶中真菌毒素的主要前处理法
Table 1 Main pretreatment methods for the detection of mycotoxins in tea by LC-MS-MS

称样量	提取剂	提取剂 加入量 /mL	提取方式	净化小柱	流动相	检测方式	参考文献
5 g	甲醇-2% NaHCO ₃ (60:40, V:V)	20	匀浆 2 min	OchraTest 亲合柱	5 mmol/L 乙酸铵 含 0.1%乙酸-甲醇	外标定量, OTA 正离子模式	[41]
2 g	乙酸乙酯-甲酸 (99:1, V:V)	10	振荡提取 30 min	NH ₂ +C ₁₈ 小柱	0.3%甲酸-甲醇	外标定量, 正离子模式	[34]
5 g	乙腈水(84:16, V:V)	25	振荡提取 30 min	特异性免疫亲和柱	水-甲醇	外标定量, 正离子模式	[15]
5 g	乙腈	20	超声 20 min, 离心	Prime HLB+免疫 亲和柱	0.1%甲酸(含 0.01 mol/L 乙酸铵) 水-甲醇	外标定量, 正离子模式	[37]
5 g	25 mL, 70%甲醇 水+12 mL 吐温	25	超声 30 min, 离心	特异性免疫亲和柱	0.1%甲酸水-0.1% 甲酸乙腈	外标定量, 正离子模式	[38]
2 g	1%乙酸乙腈水 (84:16, V:V)	10	超声 10 min 后加入 了盐析剂, 离心	Bond Elut 净化管 A+ 净化管(QuEChERS)	0.1%甲酸 -5 mmol/L 乙酸铵- 水-甲醇	QuEChERS 提取和净化, OTA/ZEN 为负离子模式, 其 他为正离子模式	[40]
2 g	甲醇-水-甲酸 (70:29:1, V:V:V)	20	超声提取 20 min, 振荡提取 30 min	Multi-Toxin IAC 免疫 亲和净化柱	0.2%甲酸水-乙腈	同位素内标定量, DON 为负 离子模式, 其他为正离子 模式	[39]
5 g	甲酸-乙腈(10:90, V:V)	20	振荡提取 10 min, 加入盐析盐包, 离心	Oasis PRIME HLB+净 化管(QuEChERS)	0.1%甲酸水-甲醇	QuEChERS 提取和净化, 外 标定量, DON 为负离子模式, 其他为正离子模式	[25]
2 g	乙酸乙酯-甲酸 (99:1, V:V)	10	振荡提取 30 min	NH ₂ +C ₁₈ 小柱	0.3%甲酸-甲醇	外标定量, 正离子模式	[42]
1 g	乙腈	10	超声提取 30 min	MWCNTS-COOH\HL B\SG 净化管 (QuEChERS)	5 mm 乙酸铵水-乙 腈	外标定量, 正离子模式	[43]
1 g	乙腈+1%甲酸水	10	超声提取 30 min	MWCNTS-COOH\HL B\SG 净化管 (QuEChERS)	5 mm 乙酸铵水-乙 腈	外标定量, 正离子模式	[44]
2 g	乙腈水(84:16, V:V)	8	振荡提取 30 min	Mycospin 400 多功能 净化柱	0.01%甲酸-0.05% 铵水-甲醇	外标定量, OTA 为负离子模 式, 其他为正离子模式	[45]

注: 赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA); 玉米赤霉烯酮(zearalmon, ZEN); 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivaleno, DON)。

增加: 在 5% 甲酸水-乙腈中 OTA、单端孢霉烯毒素(trichothecenes, T-2)和新链丝菌素(neomycin, NEO)的回收率达到 100%; 在 2% 甲酸水-乙腈中 DON 的回收率最好, ZEN 在酸度大于 5% 后, 回收率会低于 60%, 当甲酸浓度低于 1% 时, 桔青毒素(citrinin, CIT)回收率达到 100%, 最终使用 1% 的甲酸水-乙腈实现了多种类毒素的同时提取。

1.2 净 化

茶叶中存在大量的茶多酚和茶色素等复杂基质, 需要较好的净化, 去除大部分干扰物质, 但在去除杂质的同时, 也要将目标化合物的损失降到最小, 因此, 净化小柱的选择极为关键。由于茶叶中基质较为复杂, 普通的样品净化方式杂质引入较多, 使用单一的 C₁₈ 小柱对大部分有机物质吸附能力不足, 一般不予使用; 免疫亲和柱用于检测黄曲霉毒素等, 特异性显著, 净化效果好^[15,37-39], 因此 GB 5009.111—2016、GB 5009.22—2016 等均推荐使用; 但

在多种真菌毒素同时检测时, 部分毒素如杂色曲霉毒素、桔青霉毒素等效果不理想; 多功能净化柱操作方便快捷, 但净化后的样品仍有明显的基质干扰, 净化效果不理想, 导致检测结果偏高; 刘文静等^[25]、尚乐等^[37]使用了 HLB 小柱, 其吸附剂是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 *n*-乙烯基吡咯烷酮两种单体按一定比例聚合而成的大孔共聚物, 单一 HLB 小柱只能去除茶叶基质中的大分子脂类杂质, 对于糖、酸性物质和色素等效果较差, 一般和免疫亲和柱串联使用, 效果更理想^[25,37]。胥伟等^[34]和 MONBALIU 等^[42]均使用 NH₂+C₁₈ 小柱联合使用净化, 效果良好: MONBALIU 等^[42]用该方法同时检测了茶叶中 28 种真菌毒素, 回收率在 91%~107% 之间。由此表明, 在高通量检测真菌毒素时将 HLB 和免疫亲和柱串联或 NH₂+C₁₈ 小柱联合使用, 会得到更好的净化效果。值得注意的是, 近年来二氧化硅/石墨烯氧化物和多壁碳纳米管(MWCNTS)已经成功地应用于谷类作物

和食品中黄曲霉毒素的检测^[41,43]。也有报道氨基化多层碳纳米管(MWCNTS-NH₂)在检测茶叶中黄曲霉毒素时的去除茶多酚和叶绿素能力^[43-44]。ZHOU 等^[43]比较了 MWCNTS、MMWCNTS-NH₂、MWCNTS-COOH、GCB 和 HLB 等的单一净化柱的净化效果和几种结合使用的净化效果,发现 MWCNTS-COOH 去除茶多酚和叶绿素、叶黄素的能力最强,而且黄曲霉毒素的回收率最好。

1.3 QuEChERS 前处理

传统的真菌毒素净化方法,通常需要使用多种有机试剂,经过多次洗脱,存在较高的毒素和有机试剂暴露风险。近年来,QuEChERS 前处理技术由于其高效、简便和绿色的技术理念正逐渐在生物毒素检测中得以应用^[25,43-46]。不少研究者将 QuEChERS 这种较为环保的前处理技术引入到真菌毒素检测中来^[47-48],利用 QuEChERS 方法,提取剂中加入了氯化钠和硫酸镁等盐析剂,样品提取后,提取液中仍然存在大量的共萃物,通过盐析,可以去除大部分水溶性杂质,更利于目标化合物向乙腈相中转移^[25,37],增强了联合提取的效果,得到更好的回收率。在净化步骤,QuEChERS 法使用了分散萃取的方式进行净化。将提取上清液(有机相层)移入装有多组分净化剂的净化管内,混匀离心,即净化干净。净化管内主要的净化剂一般为:PSA (primary secondary amine)结构上有两个氨基,可与分子结构上含有羟基的极性物质发生氢键作用,吸附提取液中的糖类、色素和有机酸;C₁₈ 通过非极性作用吸附非极性物质,如提取液中的淀粉、脂类和固醇类物质;GCB 具有阴离子交换作用,通过疏水和氢键作用吸附杂质,可吸附类胡萝卜素和叶绿素等色素成分。这些组分可将样品的分散、萃取及净化一次完成,操作方便,ZHOU 等^[43-44]通过比较 6 种常用吸附剂的单一净化分数和几种净化方式结合净化的效果,最终开发了 MWCNTS-COOH、HLB 和硅胶(1:7.5:7.5, *m:m:m*)结合的 QuEChERS 净化管,取得了良好的净化效果,在多种霉菌毒素同时检测时,具有更高效和广泛的选择能力,得到较好的回收率,而且大大减少了有机试剂的使用和有毒物质的暴露风险,对操作人员更为安全,具有取代商业多功能净化柱的潜力。

2 LC-MS/MS 分析技术

LC-MS/MS 检测真菌毒素时,多使用 C₁₈ 的色谱柱,由于真菌毒素是一类极性范围较宽的芳香族小分子,而 C₁₈ 柱是由十八烷基硅烷键合硅胶填料,该长链烷基键合相,有较高的碳含量和更好的疏水性,对各种类型的大分子有更强的保留效果,适合于多种类真菌毒素同时检测。有研究表明^[43],YMC-Triant PFPC₁₈ 色谱柱由于含有氢键、偶极和 π - π 作用,可以较好地保留芳香族化合物,具有更高的灵敏度,更适用于检测真菌毒素。

流动相最常用的组成是“甲醇-水”和“乙腈-水”,但由

于乙腈毒性大于甲醇,因此,通常优先考虑“甲醇-水”流动相,同时加入少量的甲酸或乙酸等有利于目标化合物的电离。大量的研究中流动相是在水相中加入 0.1% 的甲酸或乙酸,使得有些同分异构体不能完全分离,但 MONBALIU 等^[42]以 0.3% 的甲酸-甲醇为流动相梯度洗脱发现,可以将异构体 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇,及伏马毒素 B₁、B₂、B₃ 等较好分离,分离度达到 2.33,值得推广。

LC-MS/MS 在电离模式上有正电离和负电离两种模式,模式的选择主要取决于毒素物质的分子结构。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 等毒素(毒素中英文名称见表 2 注)中含有 C=O 或甲氧基(CH₃O-),易得到氢离子,在正电离模式下可以得到较好的响应;而 OTA、ZEN 和 DON 等几种毒素物质的分子结构中,即含有 C=O,又有羟基和酚羟基,因此文献中既有采用正电离模式也有采用负电离模式进行检测。比较文献中几种物质在正负电离下的响应和检出限(或定量限)发现,OTA、ZEN 和 DON 3 种毒素在负离子模式下的响应更好,检出限(或定量限)更低^[49]。依据出峰情况,在多反应监测模式条件下,对不同电离方式的毒素分时间段检测,即可实现一次进样,正负离子同时检测,这种方式在文献[25,37,39]中均有体现,效果良好。

在定量方式上,绝大部分使用外标法定量,具体如表 2 所示,比较了刘文静等^[25]和胡琳等^[39]研究发现,2 位研究者检测毒素种类相差无几,但回收率和检出限却有很大差别,使用内标法后,回收率总体提高了 21.8%,检出限总体下降了 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其原因是通过同位素内标物的校正,大大降低了前处理带来的基质影响,提高了回收率,降低了检出限,定量效果更好,但同位素内标物价格昂贵,如果能在前处理时,得到良好净化效果,外标法仍然是茶叶真菌毒素检测中更为理想的定量方式。

3 应用现状

在国家标准中用 LC-MS/MS 检测真菌毒素也是单一的只检测一类毒素,如 GB 5009.22—2016 只检测黄曲霉毒素,GB 5009.209—2016 只检测玉米赤霉烯酮等。文献研究发现 LC-MS/MS 检测茶叶中真菌毒素的种类在逐年增加,目前研究者多将 QuEChERS 法用于茶叶中多种真菌毒素的同时检测^[25,37,43-44],操作简单、省时省力(如表 2 所示);当只检测一类毒素(如黄曲霉毒素)时,回收率和检出限都较好,检出限多在 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及以下,回收率在 80% 以上居多。多种类毒素同时检测时,回收率范围较宽,在 60%~120% 之间,黄曲霉毒素、杂色曲霉毒素、桔青毒素的检出限和定量限都较低,镰刀菌烯醇类的检出限和定量限较高,其他毒素居中。因此多种类毒素同时检测时,影响回收率和检出限的多为镰刀菌烯醇类。

表 2 LC-MS/MS 法在检测茶叶中真菌毒素的应用
Table 2 Determination of mycotoxins in tea by LC-MS/MS

样品	毒素种类	回收率/%	检出限或定量限/(μg/kg)	参考文献
红茶、绿茶、普洱茶、花茶	OTA 1 种	83.6~92.5	检出限: 0.1	[41]
黑毛茶	OTA、DON、AFB ₁ 3 种	/	/	[34]
黑茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 4 种	77.5~93	检出限: 0.024~0.210	[15]
普洱茶、绿茶、红茶、乌龙茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 4 种	81.5~89.6	检出限: 0.02	[37]
普洱茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 4 种	80.3~116.7	检出限: 0.25	[38]
普洱茶、黑茶、红茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 、OTA 5 种	63.5~125.0	定量限: 0.1~0.5	[45]
普洱茶、黑茶、六堡茶、老青茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 、DON、3-AcDON、ZEN、T-2、HT-2、OTA 10 种	61.9~120.3	定量限: 0.1~10.0	[40]
普洱茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 、DON、3-AcDON、15-AcDON、ZEN、T-2、HT-2、OTA、FB ₁ 、FB ₂ 、FB ₃ 、NIV、ST 16 种	84.2~102.7	检出限: 0.05~3.00	[39]
乌龙茶、红茶、白茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 、DON、ZEN、T-2、HT-2、OTA、CIT、FB ₁ 、FB ₂ 、FB ₃ 、NIV、ST 15 种	63.4~109.7	检出限: 0.03~7.00	[25]
普洱	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 4 种	78.9~105.2	检出限: 0.01~0.25	[43]
绿茶、红茶、乌龙茶、黑茶、生产中的原茶	AFB ₁ 、AFB ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂ 、DON、ZEN、 α -ZEL、 β -ZEL、 α -ZAL、 β -ZAL、3-AcDON、15-AcDON、T-2、OTA、NEO、CIT 16 种	61.3~118.5	检出限 0.015~15.000	[44]

注: 黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁); 黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂); 黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁); 黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂); 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3-AcDON); 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON); HT-2 毒素(HT-2 toxin, HT-2); 伏马毒素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁); 伏马毒素 B₂ (fumonisin B₂, FB₂); 伏马毒素 B₃ (fumonisin B₃, FB₃); 杂色曲霉毒素(sterigmatocystin, ST); 雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV); α -玉米赤霉烯醇(α -zearealenol, α -ZEL); β -玉米赤霉烯醇(β -zearealenol, β -ZEL); α -玉米赤霉醇(α -zearealanol, α -ZAL); β -玉米赤霉醇(β -zearealanol, β -ZAL); /表示未说明。

国内外研究者大量应用 LC-MS/MS 进行了实际样品的检测: 有研究^[15,37-38]检测广东省 86 份生、熟普洱茶和云南 20 份普洱、红茶、绿茶、乌龙茶, 100 份黑茶的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂, 几种毒素检测结果均为未检出; 李恒等^[50]检测了 97 份红茶 AFB₁, 检出率为 7.2%, 含量在 3.2~10.6 μg/kg 之间, 属于低污染水平; 刘妍等^[40]也应用该方法检测了市售 61 份黑茶, 结果有 9 份检出 AFB₁, 含量在 0.1~16.1 μg/kg, 5 份检出 OTA, 含量在 0.9~6.7 μg/kg 之间, 3 份检出 DON, 含量在 70.1~299.5 μg/kg 之间, 参照 GB 2761—2017, 部分真菌毒素超过国家限量要求。莫瑾等^[41]检测了红茶、绿茶、普洱和花茶等 100 个样品的 OTA, 有 4 份样品检出, 含量在 0.22~0.44 μg/kg 之间。胡琳等^[39]检测了 174 份云南普洱茶中的真菌毒素, 其中 DON 和 FB₁、FB₂、FB₃ 被检出, 其检出率分别为 30.63%、55.17%、6.9%和 6.9%。刘文静等^[25]检测了 121 份乌龙茶、白茶和红茶, 其中有 1 份检出 AFB₁, 含量为 34.0 μg/kg, 1 份红茶检出 OTA, 含量为 1.6 μg/kg。

在 ZHOU 等^[44]的研究中, 除了检测后发酵茶以外, 还将绿茶和发酵中各阶段茶叶进行了检测, 结果显示, 绿茶中未检测出真菌毒素, 这与尚乐等^[37]的报道一致, 乌龙茶中检出的 DON 高于了直接食用谷物的限量值(750 μg/kg),

红茶中检出了 AFs(黄曲霉毒素总和), 乌龙茶和红茶中的 α -ZEL、 β -ZEL 含量均高于其他茶叶, 但总量没有超过限量值(75 μg/kg); 但在后发酵茶的发酵和储存各阶段 16 种真菌毒素均有少量检出。结果同时还显示, 在第 1 次渥堆发酵中检出毒素含量最高, 原料、加湿和第 5 次渥堆发酵中检出 OTA 含量最高, 在第 3 步重堆中 CIT 含量检出最高。

该方法的应用样本集中在红茶、黑茶、普洱茶和乌龙茶等后发酵茶类, 随着存贮时间的延长, 后发酵茶具有越陈越香的特点, 但茶叶在长时间保存过程中吸湿受潮后就容易受到真菌侵害并产生真菌毒素, 这在 ZHOU 等^[44]的研究中得以验证。绿茶由于加工无需发酵, 研究相对较少, 但从现有同时检测后发酵茶和绿茶的文献中可见, 二者的基质效应、检出限和回收率等没有明显差异, 因此, LC-MS/MS 可同时用于众多品种茶叶真菌毒素的检测中。

4 结束语

目前报道 LC-MS/MS 检测真菌毒素方法较多, 但主要集中在发酵产品、粮食等食品中, 茶叶中真菌毒素的应用较少, 且多种真菌毒素的高通量检测研究更少, 多为单一毒素检测, 这主要由于茶叶的基质较为复杂, 前处理净

化操作导致部分真菌毒素随茶多酚和茶色素杂质一起被净化掉;检测中一部分真菌毒素为负离子模式,一部分为正离子模式,同时检测会造成灵敏度和检出限下降,在高通量检测时,前处理和检测模式均对定量限有很大影响,这是目前 LC-MS/MS 检测茶叶真菌毒素的难题,因此建立高通量、高准确度的 LC-MS/MS 检测不同种类茶叶中真菌毒素是未来研究的重点。

另一方面,有研究表明不同茶叶基质中毒素种类分布有所不同^[51-52],但该方法检测茶叶中真菌毒素在普洱茶中占比很大,应用于乌龙、红茶、黑茶等同为发酵茶叶的研究较少,研究目前还没有对所有品种茶叶进行毒素检测,其风险评估无完整数据可言;同时,该类检测在国内应用于茶叶原料的较多,但生活中均以茶叶泡水或制作成茶饮品,国内却鲜有研究者对利用该方法对茶浸液或茶饮品的真菌毒素迁移含量进行检测;缺少人们食用平均量的暴露评估基础数据。因此,只有将该方法用于茶汤和成品茶饮料的检测,将二者的真菌毒素水平信息与消费量结合起来,才能真正对茶叶真菌毒素污染进行风险评估,确保茶叶的质量安全。

以上研究同时表明在后发酵茶中 AFB₁、OTA 和 DON 及其代谢毒素检出率偏高,其他毒素极少检出,总体含量偏低,较少毒素超出现有限量值(参考谷物等最低限量值),极少暴露于较高水平,但也提示应当对后期加工或储存过程的霉菌毒素进行监测,以便尽可能地消除高危茶叶样品。

目前 LC-MS/MS 用于茶叶中真菌毒素的检测研究也仅是个人或检测机构自行研发,各种方法的推广可行性还有待验证;国际上除印度对红茶黄曲霉毒素做了限量规定^[53],关税联盟国家规定了原茶中 AFB₁ 的限制为 5 μg/kg^[54],阿根廷对草药茶材料中 AFB₁ 和 AFB₂ 的限制分别为 5 和 20 μg/kg^[55],其他大部分国家和地区包括中国均没有茶叶中真菌毒素的检测标准及明确的限量标准。因此,为了我国茶叶质量安全和出口不受限制,应尽早制定茶叶中真菌毒素的检测和限量标准,加强茶叶真菌毒素的高通量检测及加工过程的质量控制,降低茶叶毒素污染,为茶叶的质量安全提供有力的技术保障。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] SCHRENK D, BIGNAMI M, BODIN L, *et al.* Risk assessment of aflatoxins in food [J]. EFSA J, 2020, 18(3): 6040.
- [4] 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.
- [5] BOGDANOVA E, PUGAJEVA I, REINHOLDS 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.
- [6] 吉星多. 粮食或饲料中玉米赤霉烯酮污染检测的新技术研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
JI XD. Study on new techniques for determination of zearalenone contamination in grain or feed [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2021.
- [7] 袁航. 粮食中主要真菌毒素危害及联合毒性研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 223-227.
YUAN H. Research progress on hazards and toxicity of major mycotoxins in grain [J]. Food Mach, 2019, 35(11): 223-227.
- [8] ALSHANNAQ AF, YU JH. A liquid chromatographic method for rapid and sensitive analysis of aflatoxins in lab-oratory fungal cultures [J]. Toxins, 2020, 12(2): 93.
- [9] HONG P, YU WCH, ROBERT CB, *et al.* Interference of mycotoxin binders with ELISA, HPLC and LC-MS/MS analysis of aflatoxins in maize and maize gluten [J]. Food Addit Contam, 2019, 37(3): 1-11.
- [10] 黄晴雯. 真菌毒素的分析方法及风险评估研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
HUANG QW. Study on determination method and risk assessment of mycotoxins [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [11] YE ZL, WANG X, FU RY *et al.* Determination of six groups of mycotoxins in Chinese dark tea and the associated risk assessment [J]. Environ Pollut, 2020, 261: 114-180.
- [12] ZHANG K, BANERJEE K. A review: Sample preparation and chromatographic technologies for detection of aflatoxins in foods [J]. Toxins, 2020, 12(9): 539.
- [13] PAKSHIR K, MIRSHEKAR I, ZNOURAEI H, *et al.* Mycotoxin detection and fungal contamination in black and green tea by HPLC-based method [J]. J Toxicol, 2020. DOI: 10.1155/2020/2456210
- [14] ZHAN J, ZHANG RR, SHI XZ, *et al.* A novel sample-preparation method for the generic and rapid determination of pesticides and mycotoxins in tea by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2021, 1636: 461794.
- [15] YE ZL, PU C, WANG Y, *et al.* Simultaneous determination of four aflatoxins in dark tea by multifunctional purification column and immunoaffinity column coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Agric Food Chem, 2019, 67: 11481-11488.
- [16] RUBER J, SOLER C, MANES J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS [J]. Talanta, 2011, 85(1): 206-215.
- [17] ASGHAR MA, ZAHIR E, SHAHID S, *et al.* Iron, copper and silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B₁ adsorption activity [J]. Food Sci Technol, 2018, 90: 98-107.
- [18] AKBARIALIABAD H, DAHROUD MD, KHAZAEI MM, *et al.* Green tea, a medicinal food with promising neurological benefits [J]. Current Neuropharm, 2021, 19(3): 349-359.

- [19] SENTKOWSKA A, PYRZYNSKA K. Investigation of antioxidant activity of selenium compounds and their mixtures with tea polyphenols [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(3): 3019–3024.
- [20] NOELIA P, GUILLERMINA F, JORDI M, *et al.* Multimycotoxin LC-MS/MS analysis in tea beverages after dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(47): 10282–10289.
- [21] 李燕, 王文富, 王金涛, 等. 不同冲泡次数普洱生茶浸出物含量及滋味品质变化分析[J/OL]. *食品科学*: 1-18. [2022-04-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210816.1142.018.html>
LI Y, WANG WF, WANG JT *et al.* Analysis of variations in content of extracts and taste quality of Pu-erh raw tea with different brewing times [J/OL]. *Food Sci*, 1-18. [2022-04-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210816.1142.018.html>
- [22] HAZARIKA LK, BHUYAN M, HAZARIKA BN. Insect pests of tea and their management [J]. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54: 267–284.
- [23] MALIR F, OSTRY V, PFOHL LA, *et al.* Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages [J]. *Toxins*, 2014, 6(12): 3438–3453.
- [24] MATHIEU C, GREGOIRE D, EVEN LR, *et al.* Multi-class analysis for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, process-induced toxicants and packaging contaminants in tea [J]. *Food Chem*, 2018, 242(1): 113–121.
- [25] 刘文静, 黄彪, 傅建伟. 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. 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.
- [26] 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.
- [27] SEDOVA R, KISELEVA M, TUTELYAN V. Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation [J]. *Toxins*, 2018, 10(11): 444.
- [28] 祖新, 燕妮, 郭娇娇, 等. 免疫亲和净化-高效液相色谱法检测茯砖茶中黄曲霉毒素 B₁[J]. *茶叶通讯*, 2022, 49(1): 108–112.
ZU X, YAN N, GUO JJ, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in fuzhuan tea by immunoaffinity purification and HPLC-MS [J]. *Tea Commun*, 2022, 49(1): 108–112.
- [29] 钟舒洁, 陈晓嘉, 周芳梅, 等. UPLC-MS/MS、HPLC 和 ELISA 法测定普洱茶中黄曲霉毒素研究[J]. *安徽农学通报*, 2021, 27(16): 15–19.
ZHONG SJ, CHEN XJ, ZHOU FM, *et al.* Determination of aflatoxin in Pu-erh tea by UPLC-MS/MS, HPLC and ELISA [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2021, 27(16): 15–19.
- [30] 赵浩军, 王坤, 杨卫花, 等. 高效液相色谱柱后光化学反应荧光检测茶叶中黄曲霉毒素 B₁[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(3): 237–241.
ZHAO HJ, WANG K, YANG WH, *et al.* Determination of aflatoxins B₁ in tea by high performance liquid chromatography-fluorescence detector with post-column photochemical reaction [J]. *Tea Sci*, 2013, 33(3): 237–241.
- [31] ZHANG L, XIAO WD, CHENG ZH, *et al.* A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines [J]. *Toxins*, 2018, 10(2): 65.
- [32] 邓秀娟, 涂青, 伍贤学, 等. 茶叶中赭曲霉毒素 A 安全性风险研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(12): 405–412.
DENG XJ, TU Q, WU XX, *et al.* Research progress on the safety risk of ochratoxin A in tea [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(12): 405–412.
- [33] ZHANG DH, LI PW, YANG Y, *et al.* A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B₁ [J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 736–742.
- [34] 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.
- [35] STROKA J, ANKLAM E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 904(2): 263–268.
- [36] 张浩. 茶叶发酵过程中的多酚变化及其对黄曲霉产毒的抑制效应[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
ZHANG H. Polyphenols changes in tea fermentation and the inhibitory effect on aflatoxin production [D]. Yanglin: Northwest Agriculture & Forestry University, 2014.
- [37] 尚乐, 殷建忠, 钟读波. 液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 4 种黄曲霉毒素[J]. *理化检验-化学分册*, 2018, 54(6): 674–679.
SHANG L, YIN JZ, ZHONG DB. Determination of 4 kinds of aflatoxin in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phys Tests Chem Anal B*, 2018, 54(6): 674–679.
- [38] 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.
- [39] 胡琳, 师真, 赵丽, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定普洱茶中 16 种真菌毒素[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(10): 1700–1708.
HU L, SHI Z, ZHAO L, *et al.* Simultaneous detection and analysis of 16 kinds of mycotoxins in Pu-erh tea [J]. *Zhejiang Acta Agric*, 2019, 31(10): 1700–1708.
- [40] 刘妍, 陈坚, 谭贵良, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定发酵黑茶中 10 种真菌毒素[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(7): 1–11.
LIU Y, CHEN J, TAN GL, *et al.* Determination of ten mycotoxins in fermented fark tea by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(7): 1–11.
- [41] 莫瑾, 龚强, 周慧平, 等. 高效液相色谱—串联质谱法检测茶叶中的赭曲霉毒素 A[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(1): 182–187.
MO J, GONG Q, ZHOU HP, *et al.* Determination of ochratoxin A in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(1): 182–187.
- [42] MONBALIU S, WU A, ZHANG D, *et al.* Multimycotoxin UPLC-MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(24): 12664–12671.
- [43] ZHOU HY, LIU N, YAN ZH, *et al.* Development and validation of the

- one-step purification method coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of four aflatoxins in fermented tea [J]. *Food Chem*, 2021, 354: 129497.
- [44] 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.
- [45] 刘妍, 谭贵良, 刘子雄, 等. 发酵茶中多种真菌毒素超高效液相色谱-串联质谱法的测定[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 322–327.
- LIU Y, TAN GL, LIU ZX, *et al.* Determination of various mycotoxins in fermented tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2016, 32(8): 322–327.
- [46] 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.
- [47] YU L, MA F, DING X, *et al.* Silica/graphene oxide nanocomposites: Potential adsorbents for solid phase extraction of trace aflatoxins in cereal crops coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 1018–1024.
- [48] ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, ŠTAJNBAHER D, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412–431.
- [49] CINA M, PONCE MD, MARTINEZ LD, *et al.* Development of a novel UHPLC-MS/MS method for the determination of ochratoxin A in tea [J]. *Heliyon*, 2021, 7: e0663.
- [50] 李恒, 陈涛, 江虹, 等. 闽北地产红茶中黄曲霉毒素 B1 污染水平研究 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2017, 23(1): 9–12.
- LI H, CHEN T, JIANG H, *et al.* Study on contamination level of aflatoxin B₁ in black tea in northern Fujian area [J]. *Strait J Prev Med*, 2017, 23(1): 9–12.
- [51] TOMAN J, MALIR F, OSTRY V, *et al.* Transfer of ochratoxin A from raw black tea to tea infusions prepared according to the Turkish tradition [J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 98(1): 261–265.
- [52] STORARI M, DENNERT FG, BIGLER L, *et al.* Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market [J]. *Food Control*, 2012, 26(1): 157–161.
- [53] 刘青, 邹志飞, 余炀炀, 等. 食品中真菌毒素法规限量标准概述[J]. *中国酿造*, 2017, 36(1): 12–18.
- LIU Q, ZOU ZF, YU YY, *et al.* Review of regulations of mycotoxins limit standard in foods [J]. *China Brew*, 2017, 36(1): 12–18.
- [54] Technical regulations of the customs union. on food safety (Document No. TRCU/021/2011) [Z].
- [55] ZHANG L, DOU XW, ZHANG C, *et al.* Review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines [J]. *Toxins*, 2018, 10: 65.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



曾 艳, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品、畜产品及产地环境(土壤、水、大气)、农业投入品(肥料、饲料、农药)质量安全检测。

E-mail: 276874503@qq.com