

## 黑茶茶汤中赭曲霉毒素 A 的提取与检测方法

闫航滨, 赵维凡, 汤梦婷, 周 育\*

(安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** 日常饮茶中, 茶叶若因加工或贮藏不当污染了一定量霉菌毒素, 同时对于冲泡过程中的浸出率及实际的摄入量, 仍欠缺深入了解。为建立茶汤中赭曲霉毒素 A (OTA) 的提取方法, 为饮茶所摄入生物毒素的安全评估提供更合理的分析方法, 研究使用乙腈作为提取溶剂提取茶汤中的 OTA, 然后加入盐离子使乙腈和水相分层, 去除杂质后, 以高效液相色谱法 (HPLC) 分析检测, 通过对比 4 种不同方法的准确度、线性、精密性、灵敏度等指标, 选择最适于茶汤的检测方法。结果表明, 方法 M4 通过用含 0.1% 甲酸酸化乙腈提取, 用氯化钠和硫酸镁使乙腈和茶汤分层, 在准确度、精密性、灵敏度等指标上, 均优于其他 3 种方法。方法 M4 在茶汤中 OTA 添加浓度为  $1\sim 45\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时回收率为 82.5%~99.8%, 标准偏差为 1.4%~7.3%; 该方法添加回收的回归方程相关系数为 0.997 1。在日间和日内验证试验中, 高浓度毒素组日内回收率为 90.9%, 相对标准偏差为 2.2%, 日间回收率为 87.5%, 相对标准偏差为 3.2%; 低浓度毒素组的日内回收率为 91.9%, 相对标准偏差为 5.2%, 日间回收率为 92.4%, 相对标准偏差为 6.7%; 该方法的定量限为  $1.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 检出限为  $0.33\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同类型黑茶茶汤验证实验发现, 该方法的回收率均高于 88.65%。对比这 4 种方法, 方法 M4 在分析结果上均好于其他 3 种方法, 适合用于茶汤中 OTA 的检测, 该方法对于 OTA 在茶水冲泡过程中浸出情况及安全风险评估有重要的参考意义。

**关键词:** 茶汤; 赭曲霉毒素; 方法建立; 高效液相色谱; 方法验证

中图分类号: TS272

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)06-0997-08

### Extraction and detection of ochratoxin A in dark tea infusions

YAN Hangbin, ZHAO Weifan, TANG Mengting, ZHOU Yu

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** In daily tea drinking, the tea leaves may be contaminated with a certain amount of mycotoxins due to improper processing or storage, meanwhile, we still lack of understanding of the mycotoxin migration rate and actual intake during the tea brewing process. Therefore, we aim to establish a method for the extraction and detection of ochratoxin A (OTA) in tea infusions, so as to make an appropriate safety assessment of biotoxins ingested through tea infusion. In this study, acetonitrile was used as major solvent to extract OTA in tea infusions, and different salt ions were added to separate acetonitrile and aqueous phase. The supernatant was cleaned and analyzed by HPLC (high performance liquid chromatography), four extraction methods were established and compared, and the most appropriate method was selected by evaluation of the accuracy, linearity, precision, sensitivity and other indicators. As results, method 4, which was extracted with acetonitrile containing 0.1% formic acid and separated the acetonitrile and aqueous phase with sodium chloride and magnesium sulfate, obtained the best results. Method validation of method 4 showed that recovery was between 82.5% and 99.8%, the standard deviation was 1.4% - 7.3%, and the correlation coefficient of the determination method was 0.997 1. In high-concentration fortified group, the intra-day recovery was 90.9%, and the relative standard deviation (RSD) was 2.2%; the inter-day recovery was 87.5% and the RSD was 3.2%. In low-concentration fortified group, the intra-day recovery was 91.9% and the RSD was 5.2%; the inter-day recovery was 92.4% and the RSD was 6.7%. The limit of quantification of the method was  $1.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the detection limit was  $0.33\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Evaluation results of different types of dark tea infusions showed that the recovery rates of the method were all higher than 88.65%. In conclusions, by comparison of the four

收稿日期: 2021-03-16

基金项目: 安徽省重点研发计划项目 (202004h07020007) 资助。

作者简介: 闫航滨, 硕士研究生。E-mail: 1072735383@qq.com

\* 通信作者: 周 育, 教授, 博士生导师。E-mail: microbes@ahau.edu.cn

developed methods, method 4 is better than the other three methods, and it is suitable for the detection of OTA in tea infusions. The method developed in this study is of great significance for OTA migration rate evaluation from dry tea to tea infusions and appropriate risk assessment.

**Key words:** tea infusion; ochratoxin A; method establishment; HPLC; method validation

茶叶因富含茶多酚、茶氨酸等多种生物活性成分并具有较好的保健功效深受人们的喜爱。饮茶在我国,甚至世界上很多国家已经成了一种健康的生活习惯<sup>[1-3]</sup>。后发酵黑茶加工过程离不开微生物参与,尤其在渥堆发酵过程中来源于鲜叶及环境中的菌群对黑茶品质及风味的形成有重要作用。然而,这些土著微生物菌群对茶叶风味形成具有重要贡献的同时是否存在有害微生物及霉菌毒素的污染,也是一个值得关注的问题。我国的茶叶加工企业具有数量多、规模小、生产质量良莠不齐等鲜明特征。在一些中小企业,生产过程中因环境卫生条件不适宜、渥堆发酵条件控制不当或者生产、销售过程中因贮藏条件不当等因素造成的有害微生物污染难以避免<sup>[4-5]</sup>。发酵茶叶为一类次生代谢产物含量丰富的基质,霉菌毒素污染问题并不像花生、大米和玉米(富含脂肪、淀粉和蛋白质)等农产品那样突出,但作为一种由自然发酵食品(饮品),其微生物的安全问题仍需要高度重视<sup>[6]</sup>。

赭曲霉毒素 A (OTA) 是食物中最常见的霉菌毒素之一,它是由几种曲霉菌 (*Aspergillus spp.*) 和青霉 (*Penicillium spp.*) 产生<sup>[7]</sup>。有害霉菌的生长及毒素产生,取决于许多因素,包括菌株生长的温度、湿度、食品基质、含水量以及后续食品加工和储存环境等<sup>[8-9]</sup>。赭曲霉毒素 A 已被国际癌症研究机构列为 2B 类致癌物(即可能对人类有致癌),同时也具有神经毒性、肾毒性和免疫抑制作用<sup>[10]</sup>。研究显示,发酵茶在不适当的加工和贮藏环境有可能会有产毒曲霉和 OTA 的污染<sup>[11-15]</sup>。从现有的检测结果来看,各类霉菌毒素在茶叶中的检出率及阳性样品污染浓度呈“双低”特点。关于茶叶中霉菌毒素检测方法研究,主要集中于从干茶中直接提取霉菌毒素,并未考虑各类霉菌毒素水溶性和泡茶浸出率问题。然而,茶叶有别于其他食品基质,不直接食用。因此,研究茶汤中霉菌毒素的提取及检测方法,对研究不同类型霉菌毒素在茶叶冲泡过程中的提取率及膳食摄入水平具有重要意义。QuEChERS (quick、easy、cheap、effective、rugged 和 safe) 是近年来发展的一种用于农药快速提取方法,其原理为样品经乙腈或酸化乙腈提取后,采用盐离子盐析分层,以 PSA (乙二胺-N 丙基硅烷) 和 PVPP (聚乙烯吡咯烷酮) 等试

剂除去基质中有机酸、色素、酚类等干扰物,以达到净化目的<sup>[16-18]</sup>。本研究依据 QuEChERS 原理,对茶汤中 OTA 的不同提取方案进行对比分析,建立茶汤中 OTA 最佳分析方法,以期对茶叶中 OTA 的膳食风险监测、评估做技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

黑茶茶样:普洱熟茶(散茶)、六堡茶、安化黑茶、青砖茶、康砖茶和茯砖茶的茶样均采购自国内的茶叶专门店或网上专卖店,每种茶样收集均超过 1.0 kg,常温保存于干燥环境中。

### 1.2 试剂与仪器

本试验主要试剂包括:色谱纯乙腈(纯度>99.9%,美国 TEDIA 公司);色谱纯甲酸、乙酸(纯度>98.0%,上海阿拉丁公司);蒸馏水(香港屈臣氏公司);氯化钠(纯度>99.0%)、硫酸镁(纯度>98.0%)、柠檬酸钠(纯度>98.0%)均购买于上海生工生物公司;乙二胺-N 丙基硅烷(PSA,纯度>98.0%)、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP,纯度>98.0%)均为德国 CNW Technologies 公司产品。赭曲霉毒素 A 标准品(20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  于甲醇,纯度>99.0%)为美国维康公司产品。

主要仪器包括:涡旋震荡仪(德国依卡有限公司),微量移液器(德国 Eppendorf 公司),低温高速离心机(美国 sigma 公司),离心浓缩仪(上海般诺),高效液相色谱仪(美国 waters 公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 茶汤的准备** 取 5 g 普洱(熟茶)茶样于 500 mL 锥形瓶中,加入 250 mL 沸水浸泡 5 min,冷却至室温,随后用玻璃纤维滤纸过滤除去茶渣,取茶汤(每份 20 mL)加入 OTA 涡旋混匀以备提取分析使用。

**1.3.2 茶汤中赭曲霉毒素 A 的提取** 依据 QuEChERS 方法原理,并参考 Juan 等<sup>[19]</sup>果汁中 AFs (黄曲霉毒素)、OTA、AOH (交链孢酚)、AME (交链孢酚单甲醚)等霉菌毒素提取分析方法,设计并对比以下 4 种茶汤中 OTA 提取与检测方法。

方法 1 (M1): 取 20 mL 茶汤,加入 20 mL 乙腈和 3.0 g 柠檬酸钠,涡旋 1 min,以 5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清,重复提取 2 次,合并上清,

再加入 0.8 g 柠檬酸钠, 0.8 g 硫酸镁, 以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清 10 mL, 旋转蒸发浓缩至 1.0 mL, 用 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 然后经 HPLC 检测。

方法 2 (M2): 同 M1 处理, 将柠檬酸钠替换为氯化钠。

方法 3 (M3): 取 20 mL 茶汤, 加入 20 mL 乙腈和 3.0 g 氯化钠, 涡旋 1 min, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清, 重复提取 2 次, 合并上清, 再加入 0.8 g 氯化钠, 0.8 g 硫酸镁, 3 g PVPP, 1.2 g PSA, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清 10 mL, 旋转蒸发浓缩至 1.0 mL, 用 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 然后经 HPLC 检测。

方法 4 (M4): 取 20 mL 茶汤, 然后加入 20 mL 乙腈、20 μL 甲酸和 3.0 g 氯化钠, 涡旋 1 min 后 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清, 重复提取 2 次, 合并上清, 再加入 0.8 g 氯化钠, 0.8 g 硫酸镁, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清 10 mL, 旋转蒸发浓缩至 1.0 mL, 用 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 然后经 HPLC 检测。

**1.3.3 HPLC 检测条件** 色谱柱型号为 ACE C<sub>18</sub> 柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 乙腈:2% 乙酸水 (50:50, V/V); 进样量: 5 μL; 柱温: 38 °C; 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 荧光检测器 (FLD): 激发波长: 333 nm; 发射波长: 460 nm。

**1.3.4 检测标准曲线制作** 以 HPLC 流动相配置 1~100 μg·L<sup>-1</sup> 标准品, 进行 HPLC 检测, 以 OTA 检测浓度为 x, 以色谱峰面积为 y, 进行线性拟合获取 OTA 检测的标准曲线, 以及相关系数的平方 (R<sup>2</sup>), 以此标准曲线计算各检测样本 OTA 检测浓度。

## 1.4 方法学验证

方法验证所考虑的参数为: 方法线性、灵敏度 (检测限和定量限)、准确度 (回收率) 和精密度 (重复性和重现性)。

(1) 方法线性。取 20 mL 空白茶汤 6 份, 分别加入 OTA, 使茶汤中毒素的终浓度为 45、20、10、5、1 和 0 μg·L<sup>-1</sup>。每个浓度做 6 个重复, 经由 4 种方法提取检测后, 以 OTA 检测浓度为 x, 以色谱峰面积为 y, 进行线性拟合获取检测方法的线性方程, 以及相关系数 (R<sup>2</sup>), 以相关系数来判断检测方法的线性关系, R<sup>2</sup> 的值越接近 1 则方法的线性越好<sup>[18]</sup>。

(2) 基质效应。取 20 mL 空白茶汤, 分别用 4 种方法提取后, 获得每种方法提取后的茶汤基质, 分别用该方法提取的茶汤基质配制 OTA 基质标准, 对照组用乙腈配制相同浓度的 OTA 溶剂标准。基质标

准和溶剂标准配制毒素浓度分别为 100、50、20、10、5 和 1 μg·L<sup>-1</sup>。基质标准组和溶剂标准组均做 3 个重复。经 HPLC 检测后, 以浓度为 x, 以色谱峰平均面积为 y, 建立回归方程。基质效应以茶汤基质标准方程的斜率与乙腈配制的溶剂标准方程的斜率比值, 即公式 (1)。基质效应结果在 85%~115%, 则可以认为该基质对目标物的检测无显著性影响<sup>[19-21]</sup>。

基质效应 (ME%) = (基质标准方程的斜率 / 乙腈配制的溶剂标准方程的斜率) × 100 (1)

(3) 灵敏度。在 20 mL 空白茶汤中加入 OTA 至终浓度为 5 μg·L<sup>-1</sup>, 分别采用 4 种方法提取, 以流动相梯度稀释, 经 HPLC 检测后, 以 OTA 信号响应值和噪音值的比值来计算定量限 (LOQ) 和检出限 (LOD)。LOQ 以 OTA 响应值: 噪音值 = 10:1, LOD 以 OTA 响应值: 噪音值 = 3:1 计算, LOQ 和 LOD 越低, 则该方法的灵敏度越高<sup>[20-21]</sup>。

(4) 准确度。取 20 mL 空白茶汤 5 份, 分别加入 OTA, 使茶汤中 OTA 的终浓度为 45、20、10、5 和 1 μg·L<sup>-1</sup>, 每个浓度做 6 个重复。回收率用公式 (2) 计算。

$$R = (C_1 \times f) / C_2 \quad (2)$$

式 (2) 中: R—回收率; C<sub>1</sub>—经液相检测的浓度 (μg·L<sup>-1</sup>); C<sub>2</sub>—添加到茶汤中的浓度 (μg·L<sup>-1</sup>); f—稀释倍数。

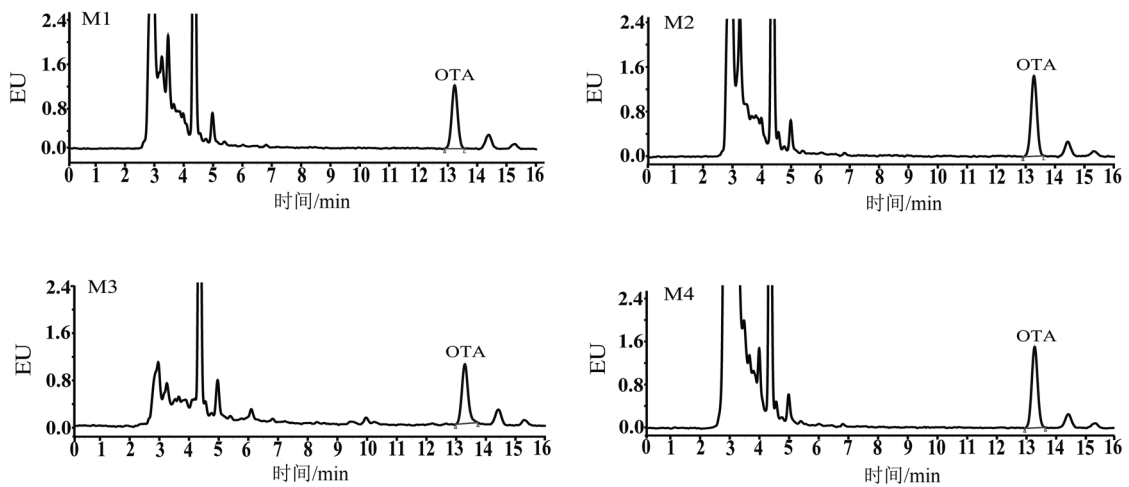
(5) 精密度。精密度验证试验中, 设置高浓度 (45 μg·L<sup>-1</sup>) 和低浓度 (5 μg·L<sup>-1</sup>) 2 个组的添加回收实验。每个浓度组每天做 6 个重复, 且不连续重复 5 d。根据实验日内回收率和日间回收率以及相对标准偏差 (RSD) 的比值进行比较分析, 以此验证各方法的重复性和再现性。RSD 的值越小, 方法越可靠性越高 (RSD < 15% 为可接受范围)<sup>[20-22]</sup>。

(6) 方法适用性检测。取不同类型黑茶茶样, 包括 (六堡茶、安化黑茶、青砖茶、康砖茶和茯砖茶), 用方法 1.3.1 获得茶汤。取制备好的茶汤样品 20 mL, 添加 OTA 使其茶汤中毒素浓度分别达到 45 μg·L<sup>-1</sup> (高浓度组) 和 5 μg·L<sup>-1</sup> (低浓度组) 并分别设置 6 个重复。以最佳提取检测方法, 验证该方法对各类型黑茶茶汤的适用性。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种方法的线性分析

以普洱 (熟茶) 为研究材料的添加回收实验, 4 种不同方法 (M1—M4) 从普洱茶汤中提取的 OTA 经 HPLC 分离, 发现茶叶基质中的同步提取物主要在 2~6 min 洗脱下来, 而本研究中的 OTA 洗脱时



OTA 浓度为  $45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图 1 普洱茶茶汤中 4 种 OTA 提取方法的高效液相色谱图

Figure 1 OTA chromatograms by four different extraction methods from Pu'er tea infusion

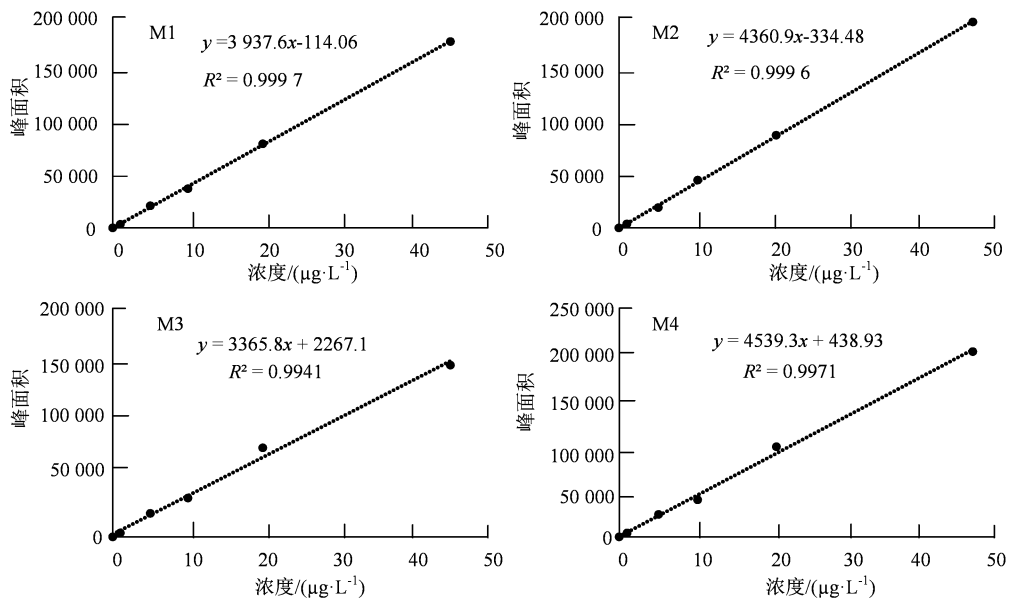


图 2 4 种提取方法的线性回归方程

Figure 2 The regression equations of four different OTA determination methods

表 1 4 种方法的线性

Table 1 Linear of the four methods

方法	线性范围 / ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回归方程	$R^2$
M1	0 ~ 45	$y = 3\,937.6x - 114.06$	0.999 7
M2	0 ~ 45	$y = 4\,360.9x - 334.48$	0.999 6
M3	0 ~ 45	$y = 3\,365.8x + 2267.1$	0.994 1
M4	0 ~ 45	$y = 4\,539.3x + 438.93$	0.997 1

注: y: 峰面积; x: 浓度。

间约为 13 min。因此, 4 种方法的茶叶同步提取物与 OTA 可以较好分开, 不对 OTA 的定性及定量分析产生影响 (图 1)。

在样本添加浓度为  $0\sim 45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围以内, 以 4 种提取检验方法的检测值, 计算获得的回归曲线及

线性关系, 结果如表 1 和图 2 所示。方法 M1—M4 的相关系数的平方值 ( $R^2$ ) 分别为 0.999 7、0.999 6、0.994 1 和 0.997 1。添加回收实验的分析结果显示, 4 种不同方法添加回收率的线性关系值均大于 0.99, 即在  $0\sim 45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内, 4 种提取分析方法均

具有良好的线性相关性, 其中以方法 M1 和 M2 最佳<sup>[18]</sup>。

## 2.2 4 种方法的基质效应与灵敏度

基质效应是指基质对目标分析物产生的干扰, 从而影响检测结果的准确性。茶叶中含有大量的次级代谢产物如茶多酚、酚酸、色素等, 这些物质可

以随着 OTA 同步被提取出来, 从而干扰 OTA 分析的准确性。本试验中, 茶汤提取物对 4 种方法的 OTA 检测基质效应分别为 94.3%、91.1%、95.4%和 95.9% (表 2), 均在标准检测方法可接受范围<sup>[20-22]</sup>。同时, 基质效应测试结果表明, 方法 M3 和 M4 的茶汤机制效应较小。

表 2 4 种方法提取基质和乙腈配制的 OTA 标准曲线方程

Table 2 OTA standard equations prepared by acetonitrile and tea matrices extracted by four different methods

方法	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	标准曲线	$R^2$	基质效应 ME/%
M1	1~100	$y = 9\,041.8x - 753\,2.5$	0.999 6	94.3
M2	1~100	$y = 8\,735.7x - 490\,6.6$	0.999 6	91.1
M3	1~100	$y = 9\,150.1x - 532\,8.1$	0.999 3	95.4
M4	1~100	$y = 9\,195.0x + 918\,3.3$	0.999 8	95.9
STD	1~100	$y = 9\,593.0x + 244\,2.6$	0.999 8	—

注: y: 峰面积; x: 浓度; STD, 表示以乙腈配置的 OTA 标准品, ME, 基质效应。

表 3 4 种方法添加不同浓度 OTA 的回收率 ( $n=6$ )

Table 3 Recoveries of four methods adding different concentrations of toxin ( $n=6$ )

方法	添加浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$					%
	45	20	10	5	1	
M1	75.6±2.4	77.9±4.7	76.6±4.2	70.5±4.2	73.6±5.8	
M2	81.5±3.1	85.3±4.0	91.6±3.8	79.7±1.4	76.3±7.5	
M3	63.1±3.8	76.1±3.2	70.3±2.1	70.7±4.5	74.5±8.3	
M4	84.5±2.6	95.1±4.1	82.5±7.2	99.8±1.4	90.2±5.4	

表 4 4 种方法的日间精密度 ( $n=30$ ) 和日内精密度 ( $n=6$ )

Table 4 Inter-day ( $n=30$ ) and intra-day ( $n=6$ ) precision of the four methods

方法/组别		精密度/%		相对标准偏差 RSD/%	
		日内	日间	日内	日间
M1	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	69.1	68.9	4.5	6.5
	45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	65.5	64.2	3.3	3.1
M2	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	81.2	78.6	4.7	9.7
	45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	80.3	78.4	3.4	3.8
M3	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	48.5	52.4	4.5	8.7
	45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	63.2	62.0	6.4	4.5
M4	5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	91.9	92.4	5.2	6.7
	45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	90.9	87.5	2.2	3.2

方法学测试结果显示: 方法 M1—M4 的 LOD 分别为 0.44、0.39、0.38 和 0.33  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M1—M4 的 LOQ 分别为 1.48、1.31、1.27 和 1.10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。从 4 种方法检出限来看, 方法 M4 的检出限与定量限最低, 具有最高的方法灵敏度。Haas 等<sup>[13]</sup>以 HPLC 方法检测普洱茶叶中 OTA 含量, 该方法中的 LOD 为 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 稍高于本研究中的 M4; Monbaliu 等<sup>[23]</sup>以 UPLC-MS/MS 方法检测茶叶中 OTA 含量, 该方法中的 LOD 为 2.6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。然而, 以 HPLC 方法检测大米及其副产品中 OTA 含量, LOD 仅为 0.06

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[18]</sup>。以上分析显示, 液相色谱法检测茶叶中 OTA 的灵敏度高于液质方法, 但与大米等食品基质相比, 茶叶中 OTA 检测灵敏度显然偏高, 该结果与茶叶或茶汤基质效应关系密切。

## 2.3 4 种方法准确度分析

添加不同浓度的 OTA 测试 4 种方法的回收率及标准偏差, 结果 (表 3) 显示方法 M1 在 5 个不同添加浓度下, 回收率在 70.5% ~ 77.9% 之间, 该结果未达到单个化合物添加回收率在 80% ~ 115% 之间的基本要求<sup>[21-22]</sup>。方法 M2 在添加毒素浓度为 45、20 和

10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  条件下, 回收率分别为 81.5%、85.3%和 91.6%, 符合回收率基本要求; 但是, 在添加低浓度为 5 和 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时回收率均低于 80%, 也未达到标准。方法 M3 在各个浓度下的添加回收率仅在 63.1%~76.1%之间, 不符合标准化检测方法要求。相比而言, 方法 M4 在 5 个不同的添加浓度下, 回收率在 82.5%~99.8%之间, 在各浓度条件下均符合标准化检测方法要求, 显著优于其他 3 种方法。同时 4

种提取检测方法的标准偏差最高值为 7.2% (方法 M4), 最低值为 1.4% (方法 M1) 均在可接受范围内。相比于其他 3 种方法, 方法 M4 之所以有更高准确度和稳定的回收率, 可能与 OTA 在酸性环境下更易溶于有机提取剂密切相关。本实验结果与 Malir 等研究, 在酸性条件下 ( $\text{pH} < 7$ ) OTA 易转移于有机提取相, 更少残留于茶汤或果汁水相结果一致<sup>[24]</sup>。

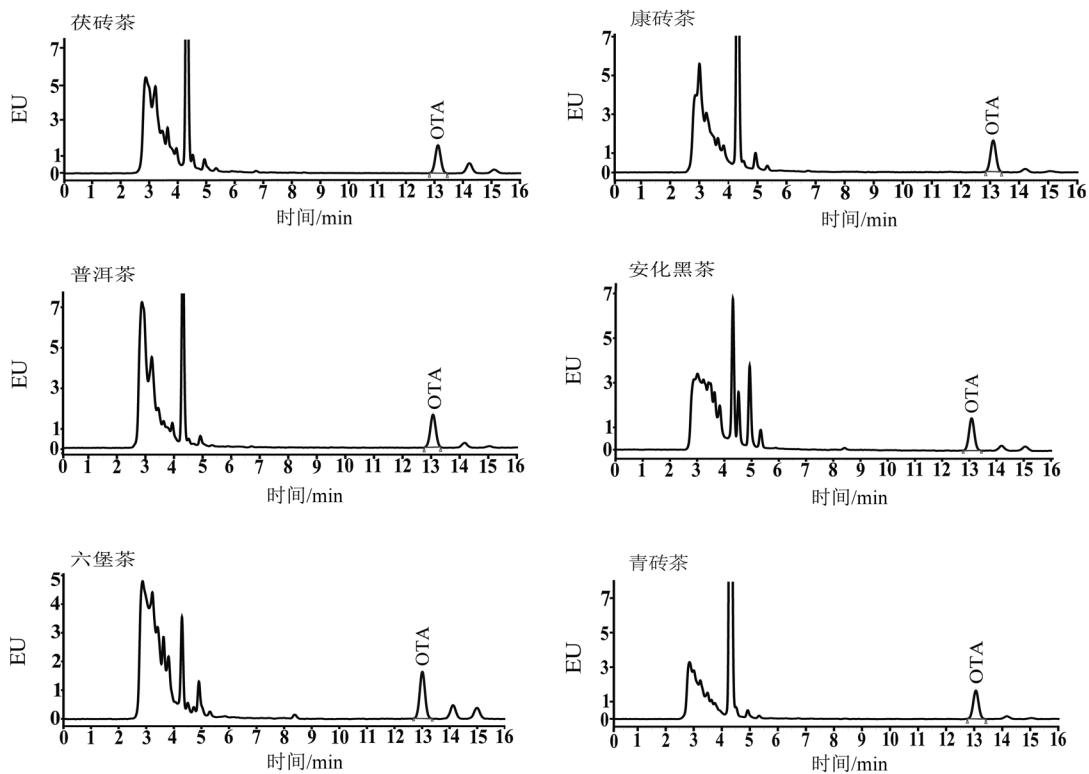


图 3 使用方法 4(OTA 浓度为  $45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 提取不同黑茶茶汤的色谱图

Figure 3 OTA Chromatograms from different tea infusions extracted by method M4 (OTA concentration:  $45 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

表 5 不同黑茶茶汤毒素提取结果 ( $n=6$ )

Table 5 Extraction results of toxins in different black tea infusions ( $n=6$ )

黑茶茶汤	添加浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%	标准偏差/%
普洱茶	5	99.77	1.40
	45	89.36	4.41
青砖茶	5	89.49	4.85
	45	90.04	2.18
六堡茶	5	91.92	5.18
	45	93.26	2.57
安化黑茶	5	102.15	4.39
	45	92.74	1.69
茯砖茶	5	91.96	6.15
	45	88.65	1.44
康砖茶	5	94.37	5.41
	45	89.47	3.30

#### 2.4 4 种方法的精密度分析

检测方法另一个重要的指标即方法的精密度,

代表了该方法的重复性和再现性。4 种方法的精密度测试结果显示,  $\text{M4} > \text{M2} > \text{M1} > \text{M3}$  (表 4)。方法 M4 在高浓度毒素组和低浓度毒素组, 测试的日内和日间回收率结果分别为 90.9%、87.5%、91.9%和 92.4%, 该结果均优于其他 3 种方法, 且完全符合单个污染化合物分析测试要求。

同时, 方法 M4 在高浓度毒素组和低浓度毒素组分析过程中, 日内和日间相对标准偏差结果分别为 2.2%、3.2%、5.1%和 6.7%, 均在正常范围内 ( $\text{RSD} < 15\%$ )。从以上分析结果来看, 方法 M4 在精密度测试方法中显著优于其他 3 种方法, 尤其是方法 M1 和 M3。因此, 根据精密度测试结果, M4 最适合于提取茶汤中 OTA。

#### 2.5 方法的适用性分析

以普洱(熟茶)茶汤为基质, 建立 4 个提取分

析方法, 根据以上方法学评估对比分析结果, 方法 M4 是最适宜于普洱茶茶汤中 OTA 的提取与检测。在此基础上, 本研究又同时选取六堡茶、青砖茶、安化黑茶、茯砖茶和康砖茶为测试材料, 以普洱茶为对照, 评估 M4 在其他后发酵黑茶中的适用性。结果显示, 以 M4 从 6 种发酵黑茶茶汤中提取的 OTA 经 HPLC 分离, 均可以与各自茶汤中同步提取物很好的分离, 不会对 OTA 定性及定量分析产生影响(图 3)。HPLC 色谱图显示, 虽然不同黑茶茶汤基质不影响 OTA 检测分析, 但各茶汤基质有明显差异, 茶汤基质出峰时间集中在 2 ~ 6 min; 青砖茶杂质峰面积最大, 茯砖茶和康砖茶较为相似, 六堡茶杂质峰面积较小。根据 6 种发酵黑茶杂质峰分析, 不同黑茶茶汤基质有明显差别。6 种不同黑茶茶汤添加回收结果(表 5)显示, 高浓度组回收率为 88.65%~93.26%, 低浓度组回收率为 89.49%~102.15%; 所有添加回收试验标准偏差均小于 6.15%。本试验中 6 种茶汤基质, 对以 M4 为提取方法的 OTA 检测未产生显著性干扰, 添加回收试验表明 M4 普遍适用于黑茶茶汤中 OTA 检测。但是, 不同类型发酵茶因其茶叶原料、发酵工艺及参与微生物菌群皆有显著的区别, 在使用本方法前仍需要做具体的分析和方法学验证。

### 3 讨论与结论

我国黑茶的消费量仅次于绿茶, 且我们周边国家(例如, 蒙古国、俄罗斯、印度及东南亚)后发酵黑茶的消费也十分的广泛<sup>[16]</sup>。近几年, 由黑茶渥堆和贮藏过程中是否会发生有害微生物及霉菌毒素污染问题引起了广泛关注。这些问题在引起老百姓饮茶忧虑同时, 给发酵茶产业的健康发展也造成了一定影响<sup>[7-9]</sup>。我国并未发布茶叶、茶汤或茶饮料中 OTA 检测方法, 国标 GB 5009.96—2016 中关于液体样品检测<sup>[25]</sup>, 只包括植物油脂、酱油、醋、酒类的方法。2017 年 Pallarés 等通过分散液相微萃取方法, 以液相色谱串联质谱(LC/MS-MS)检测茶饮料中黄曲霉毒素和 OTA 等 7 种霉菌毒素<sup>[21]</sup>。Monbaliu 等采用 C<sub>18</sub>-SPE 固相萃取柱净化, 建立草药茶茶汤中霉菌毒素 UPLC-MS/MS 检测方法<sup>[23]</sup>。其他研究主要为干茶叶中霉菌毒素的提取分析, 关于后发酵黑茶茶汤中 OTA 的检测还未有所涉及<sup>[14-15, 20, 26]</sup>。

近年来, 关于发酵黑茶中 OTA 污染研究也陆续开展。陈秋娥等检测分析了 44 种普洱茶样品, 均未检出 OTA 的污染<sup>[11]</sup>; 王鹭等检测了市售 20 种各类茶叶样品, 也未检出 OTA 污染<sup>[12]</sup>。Haas 等检测了 36 种普洱茶样品, 发现 4 份茶叶样品检出 OTA, 含

量分别为 0.65、0.65、14.8 和 94.7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 参考我国食品中 OTA 限量范围, 其中两份样品含量超过可接受范围<sup>[13]</sup>; Ye 等检测了 108 个发酵茶样品, 发现 2 份样品检测出 OTA, 含量分别为 5.9 和 36.4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 1 个样品超出食品中 OTA 污染可接受水平<sup>[14]</sup>; Cui 等检测了 158 种后发酵茶样品, 两个样品检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 浓度为 2.07 和 1.24  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[15]</sup>。Ye<sup>[14]</sup>和 Cui<sup>[15]</sup>等根据所测定的样品污染水平及膳食摄入数据, 分别作了 6 大类霉菌毒素和 4 种黄曲霉毒素风险评估, 结果显示发酵黑茶的霉菌毒素膳食风险暂不构成可以预见的食品安全风险。

从目前的研究报道来看, 茶叶(主要为发酵黑茶)中 OTA 及其他霉菌毒素检测结果, 整体呈检出率低及污染水平低的“双低特点”, 但是可靠的检测方法才是检测结果的基本保证。同时关于以上这些研究, 一个值得注意的问题是茶叶与其他食品基质不同, 茶叶摄入方式为茶汤饮用, 茶叶本身直接摄入或与其他食品加工后直接食用比例很小。本实验及相关研究所涉及的赭曲霉毒素和黄曲霉毒素等水溶性较低, 在茶叶冲泡过程中有多少毒素可以通过茶水冲泡浸出尚不清楚。因此, 进一步研究茶汤中各类霉菌毒素提取方法及在茶水冲泡过程中的浸出率, 对充分了解发酵茶叶中霉菌毒素膳食风险有重要意义。

本研究依据 QuEChERS 基本原理, 对普洱茶茶汤中 4 种 OTA 提取检测方法完成对比分析。通过 4 种方法的线性、灵敏度、准确度和精密度同步比较, 确定以含 0.1%甲酸酸化乙腈提取、氯化钠和硫酸镁分层的方法 M4 为最佳提取检测方法。不同茶汤基质测试结果显示, 该方法在六堡茶、青砖茶、安化黑茶、茯砖茶和康砖茶等 5 种后发酵茶汤中也具有适用性。本方法可以对茶汤提取物进行离心浓缩, 检测痕量的 OTA 污染, 对后发酵黑茶茶汤 OTA 检测, 霉菌毒素在茶汤中浸出率研究及更准确的膳食风险评估有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 陈富桥, 胡林英, 姜爱芹. 我国茶产业发展 40 年[J]. 中国茶叶, 2019, 41(10): 1-5.
- [2] 吕海鹏, 张盛, 林智. 茶的抗菌抗病毒功效[J]. 中国茶叶, 2019, 41(1): 1-6.
- [3] 钟玉心, 邓素娥. 浅谈茶叶质量安全现状和监管方向[J]. 农产品加工, 2018(19): 75-77.
- [4] 刘新, 张颖彬, 潘蓉, 等. 我国茶叶加工过程的质量安全问题及对策[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(2): 16-19.

- [5] 刘新, 陈红平, 王国庆. 中国茶叶质量安全40年[J]. 中国茶叶, 2019, 41(12): 1-9.
- [6] 孙威江. 茶叶质量与安全学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2020.
- [7] NGUYEN K T N, RYU D. Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States[J]. *Food Control*, 2014, 40: 140-144.
- [8] IQBAL S Z, ASI M R, HANIF U, et al. The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake[J]. *Food Chem*, 2016, 210: 135-140.
- [9] HAJOK I, KOWALSKA A, PIEKUT A, et al. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population[J]. *Food Chem*, 2019, 284: 264-269.
- [10] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins[M]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 1993, 56: 489.
- [11] 陈秋娥. 普洱茶中霉菌毒素之研究论文[D]. 台北: 台湾大学, 2003.
- [12] 王鹭, 杨骅, 谢国祥, 等. 普洱茶、红茶、绿茶中真菌毒素的检测[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(24): 4801-4806.
- [13] HAAS D, PFEIFER B, REITERICH C, et al. Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(2): 316-322.
- [14] YE Z, WANG X, FU R, et al. Determination of six groups of mycotoxins in Chinese dark tea and the associated risk assessment[J]. *Environ Pollut*, 2020, 261: 114180.
- [15] CUI P, YAN H B, GRANATO D, et al. Quantitative analysis and dietary risk assessment of aflatoxins in Chinese post-fermented dark tea[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111830.
- [16] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER 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.
- [17] SCHENCK F J, CALLERY P, GANNETT P M, et al. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods[J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(5): 1177-1180.
- [18] KWON H, LEHOTAY S J, GEIS-ASTEGGIANTE L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops[J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1270: 235-245.
- [19] JUAN C, MAÑES J, FONT G, et al. Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method[J]. *LWT*, 2017, 86: 344-351.
- [20] YE Z, CUI P, 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]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(41): 11481-11488.
- [21] PALLARÉS N, FONT G, MAÑES J, 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.
- [22] European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed[R]. European Commission Document No. SANTE/11945/2015, 2015.
- [23] MONBALIU S, WU A B, ZHANG D B, 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.
- [24] MALIR F, OSTRY V, PFOHL-LESZKOWICZ A, et al. Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages[J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(12): 3438-3453.
- [25] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素A的测定: GB 5009.96—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [26] XU P, YING L, WU J, et al. Safety evaluation and anti-hyperlipidemia effect of aqueous extracts from fermented puerh tea[J]. *Food Funct*, 2016, 7(6): 2667-2674.