DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251029001
引用格式: 李冬桂, 吕丽兰, 黄婵婵, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中黄曲霉毒素的前处理方法比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(2): 56–64.
LI DG, LV LL, HUANG CC, *et al*. Study on the comparison of pretreatment methods for determination of aflatoxin in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(2): 56–64. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中黄曲霉毒素的前处理方法比较研究

李冬桂[1,2,3*], 吕丽兰[1,2,3], 黄婵婵[1,2,3], 陈羽烨[1,2,3], 吴　凤[1,2,3], 谢　晋[1,2,3], 姚金洁[1,2,3]

[1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 南宁　530001; 2. 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南宁), 南宁　530001; 3. 农业农村部亚热带果品蔬菜质量安全控制重点实验室, 南宁　530001]

摘　要: 目的　比较研究超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中黄曲霉毒素的前处理方法。**方法**　采用免疫亲和柱法、QuEChERS 法与多功能净化柱法 3 种不同前处理方法对茶叶进行前处理, 结合超高效液相色谱-串联质谱法对茶叶中黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、黄曲霉毒素 B_2 (aflatoxin B_2, AFB_2)、黄曲霉毒素 G_1 (aflatoxin G_1, AFG_1)、黄曲霉毒素 G_2 (aflatoxin G_2, AFG_2)进行检测, 比较 3 种前处理方法对检测结果的影响。通过考察净化效果、基质效应、稳定性、重复性、检出限、回收率, 对 3 种前处理方法进行了对比。**结果**　免疫亲和柱法处理样品, 杂质较少, 基质效应影响最小。3 种不同前处理方法在 1~60 μg/L 范围内 4 种黄曲霉毒素均具有良好线性关系, 相关系数均不小于 0.999。加标回收率在 78.6%~107.1%之间, 相对标准偏差 1.3%~3.1%, 方法检出限为 0.04~0.22 μg/kg。检出限对比结果, 免疫亲和柱法与多功能净化柱法差别不大, 但均优于QuEChERS法。3种前处理方法对茶叶质控样品检测结果的差异性在可接受范围内, AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 检测结果 3 种方法均符合要求。**结论**　3 种前处理方法均适用于茶叶中 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 的测定。免疫亲和柱法基质效应影响小, 灵敏度高, 适合检测低浓度样品。在操作便捷性及对仪器维护成本方面, QuEChERS 法优于多功能净化柱法。QuEChERS 法简单高效, 适用于大批量样品的检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 茶叶; 黄曲霉毒素; 方法比较

Study on the comparison of pretreatment methods for determination of aflatoxin in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Dong-Gui[1,2,3*], LV Li-Lan[1,2,3], HUANG Chan-Chan[1,2,3], CHEN Yu-Ye[1,2,3], WU Feng[1,2,3], XIE Jin[1,2,3], YAO Jin-Jie[1,2,3]

[1. *Guangxi Subtropical Crops Rasearch Institute*, *Nanning* 530001, *China*; 2. *Laboratory of Quality Risk Assessment for Agro-products* (*Nanning*), *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Nanning* 530001, *China*; 3. *Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruit and Vegetable*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Nanning* 530001, *China*]

收稿日期: 2025-10-29
基金项目: 广西壮族自治区农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2024YP121); 广西自然科学基金青年项目(2022GXNSFBA035445)
第一作者/*通信作者: 李冬桂(1985—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为农产品质量安全检测及风险评估。E-mail: ldg2011@163.com

ABSTRACT: Objective　To compare the pretreatment methods for the determination of aflatoxin in tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods**　The 3 kinds of different pretreatment methods, immunoaffinity column method, QuEChERS and multifunctional column were adopted to pretreat the tea, the aflatoxin B_1 (AFB_1), aflatoxin B_2 (AFB_2), aflatoxin G_1 (AFG_1) and aflatoxin G_2 (AFG_2) in tea were detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the effects of 3 kinds of different pretreatment methods on the determination results were compared. The purification effect, matrix effect, stability, repeatability, limits of detection and recovery rates of the 3 kinds of pretreatment methods were compared. **Results**　The immunoaffinity column method had low matrix effects and less impurities. The 3 kinds of different pretreatment methods exhibited a good linear relationship for aflatoxin in the concentration range of 1–60 μg/L, the correlation coefficients were not less than 0.999. The average recoveries ranged from 78.6%–107.1% with relative standard deviations of 1.3%–3.1%. The limits of detection ranged from 0.04–0.22 μg/kg. There was no significant difference in the limits of detection between immunoaffinity column method and multifunctional column method, but the results of limit of detection showed that immunoaffinity column method and multifunctional column method were better than QuEChERS method. The results obtained from the quality control samples of tea matrix after 3 kinds of pretreatment methods were used, the difference was within the acceptable range. The 3 kinds of methods could meet the experimental requirements in the detection of AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2 in tea matrix. **Conclusion**　These 3 kinds of methods are all suitable for the determination of AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2 in tea. The immunoaffinity column method has low matrix effects and high sensitivity, and therefore can be used to determine low concentration samples. QuEChERS method is better in terms of simple operation and instrument maintenance cost saving than multifunctional column. QuEChERS method is simple and efficient, and it is suitable for large-scale samples detection.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; tea; aflatoxin; method comparison

0　引　言

茶叶由于富含儿茶素、多酚抗氧化剂等多种对健康有益的成分[1–3], 深受国内外消费者的青睐, 被公认为是世界上最受欢迎的饮品之一。茶叶质量安全对消费者健康及茶产业发展尤为重要[4–6]。茶叶由于经过种植、采摘、生产加工、包装、贮藏及运输等过程, 生产链长, 各个环节中均可能受到产毒真菌的污染, 在适宜的环境下, 产毒真菌繁殖, 产生的真菌毒素在茶叶中不断累积[7–9]。已有不少研究报道茶叶存在被真菌毒素污染的风险[10–12], 茶叶中真菌毒素污染已引起消费者的广泛关注。茶叶中主要污染的真菌毒素有伏马毒素、黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素、雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素等[13–14]。黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉产生的次级代谢产物, 包括黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、黄曲霉毒素 B_2 (aflatoxin B_2, AFB_2)、黄曲霉毒素 G_1 (aflatoxin G_1, AFG_1)、黄曲霉毒素 G_2 (aflatoxin G_2, AFG_2)等。世界卫生组织癌症研究机构将黄曲霉毒素确定为 1A 类致癌物, 具有致癌、致畸和引起肝脏损伤的作用[15–17]。针对茶叶中真菌毒素限量, 目前仅有印度规定红茶中黄曲霉毒素总量限量为 30.0 μg/kg, 关税同盟国(亚美尼亚、吉尔吉斯斯坦、白俄罗斯、哈萨克斯坦和俄罗斯)规定普洱生茶中 AFB_1 限量为 5.0 μg/kg, 阿根廷规定凉茶冲泡原料中 AFB_1 限量为 5.0 μg/kg, 黄曲霉毒素总量限量为 20.0 μg/kg[18–19]。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》对玉米、谷物、花生等食品设定了真菌毒素限量值, 但还没有茶叶中真菌毒素的限量。

黄曲霉毒素的检测方法主要包括酶联免疫法、薄层色谱法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法[20–23]等。超高效液相色谱-串联质谱法由于定量更加准确, 选择性和灵敏度更高, 成为真菌毒素检测的主要方法[24–25]。目前真菌毒素前处理方法主要有全自动免疫磁珠纯化法、固相萃取法、QuEChERS 法、凝胶渗透色谱法[26–28]。自动免疫磁珠纯化法由于需要额外配制全自动磁珠纯化仪, 对基层检测单位该方法难以普及。凝胶渗透色谱法由于茶叶基质复杂, 在茶叶中真菌毒素检测的应用较少, 多用于其他食品中真菌毒素检测[26]。茶叶样品基质复杂, 存在大量的茶色素、茶多酚等复杂基质, 在去除杂质的同时, 要将黄曲霉毒素的损失降到最低。免疫亲和柱法测定的基础是抗原抗体反应, 样品中的黄曲霉毒素在柱内与其相应抗体特异性结合, 再洗涤免疫亲和柱, 去除其余未结合的杂质[29]。由于免疫亲和柱法可选择性吸附、特异性强、基质干扰少、灵敏度高

等特点，被广泛应用于茶叶中黄曲霉毒素的检测。多功能净化柱是在柱内添加与待测真菌毒素不发生吸附作用仅吸附杂质的填料，净化后样品杂质减少，操作方便快捷[30]。在黄曲霉毒素定量检测固相萃取前处理过程中，用到最多的是多功能净化柱法和免疫亲和柱法[21,31]。QuEChERS 法在基质分散固相萃取技术和固相萃取技术的基础上发展起来的，具有经济、高效、快速等优点，是对提取液进行净化，杂质被净化材料吸附以达到净化目的[32−33]。QuEChERS 法可实现多种不同类型真菌毒素同时检测，在茶叶中真菌毒素分析方面也得到普遍推广和应用[34]。

茶叶质量安全一直广受关注，茶叶中黄曲霉毒素安全性风险监测具有重要意义。茶叶基质复杂，样品前处理在茶叶检测中至关重要。免疫亲和柱法、多功能净化柱法与 QuEChERS 法是茶叶中黄曲霉毒素检测常用的 3 种前处理方法。由于我国目前对真菌毒素的检测标准仍不完善，现有标准主要针对粮油、乳制品、调味品等。国家标准 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》适用范围不包含茶叶类，我国还没有针对茶叶类基质的检测标准和限量标准。本研究通过免疫亲和柱法、多功能净化柱法与 QuEChERS 法结合超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中 4 种黄曲霉毒素的方法比较，系统分析 3 种前处理方法的差异性，拟为解决快速、准确检测茶叶中黄曲霉毒素提供方法借鉴，为茶叶中黄曲霉毒素的风险评估与防控提供支持，同时为完善茶叶中真菌毒素检测标准和限量标准的建立提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

六堡茶样品选自广西壮族自治区各茶厂、茶叶店，用粉碎机粉碎后装入洁净容器中，密封标记保存。

AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2(单标质量浓度为 25 mg/L，天津阿尔塔科技有限公司)；乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯，美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；QuEChERS 提取盐包(4 g 硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠、0.5 g 柠檬酸氢二钠)、净化管(150 mg 硫酸镁、50 mg N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、50 mg 石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)(美正检测公司)；吐温-20、磷酸(分析纯，国药集团化学试剂有限公司)；试验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

LC-2050 超高效液相色谱仪、Shim-pack XR-ODSII色谱柱(2.0 mm×75 mm, 2.2 um)(日本岛津公司)；AB SCIEX API3200 三重四级杆串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)；XW-80A 旋涡混匀器(德国 IKA 公司)；TGL-20M 高速冷冻离心机(长沙湘仪仪器有限公司)；HY-2A 数显多用调速振荡器(金坛市医疗仪器厂)；N-EVAP111 氮吹仪(美国 Organomation 公司)；Aflatoxin Total IAC 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱(25 T/3 mL)、MFC226 多功能固相净化柱(25 T/5 mL)(青岛普瑞邦生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液的配制

混合标准储备液：分别吸取 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 标准溶液各 1 mL，用乙腈定容至 5 mL，制成 5 mg/L 标准储备液，–20 ℃避光保存。

混合标准中间液：准确移取 0.2 mL 混合标准储备溶液至 10 mL 容量瓶中，乙腈定容，制成 100 μg/L 混合标准中间液，–20 ℃避光保存。

混合标准溶液系列：分别用 70%乙腈水溶液或空白基质溶液稀释混合标准中间液，配制成各毒素的质量浓度为 1、5、10、20、40、50 和 60 μg/L 的溶剂混合标准溶液系列及空白基质混合标准溶液系列。

1.3.2 样品的前处理

(1)免疫亲和柱法

称取粉碎后茶叶样品 5 g(精确到 0.01 g)装入 50 mL 离心管中，加入 20 mL 乙腈-水(84:16, *V*:*V*)溶液，置于振荡器中振摇 20 min, 6000 r/min 离心 10 min，取上清液 4 mL，加入 46 mL 1%吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液，混匀。将上述样液按免疫亲和柱说明书操作要求过免疫亲和柱，收集洗脱液用氮气吹至近干，加 1.0 mL 初始流动相，涡旋 30 s 溶解残留物, 0.22 μm 滤膜过滤，待测。

(2) QuEChERS 法

称取粉碎后茶叶样品 5 g(精确到 0.01 g)装入 50 mL 离心管中，加入 10 mL 水和 10 mL 乙腈-乙酸(99:1, *V*:*V*)溶液，置于振荡器中振摇 10 min，加入 QuEChERS 提取盐包，剧烈振摇 1 min, 4200 r/min 离心 5 min，取上清液 1 mL 置于含有混合吸附剂的净化管中，混匀, 10000 r/min 离心 10 min，上清液过 0.22 μm 滤膜，待测。

(3)多功能净化柱法

称取粉碎后茶叶样品 5 g(精确到 0.01 g)装入 50 mL 离心管中，加入 20 mL 乙腈-水(84:16, *V*:*V*)溶液，置于振荡器中振摇 20 min, 6000 r/min 离心 10 min，取 8 mL 上清液置无荧光试管中，快速过固相净化柱，取净化后提取液 4 mL 用氮气吹至近干，加 1.0 mL 初始流动相，涡旋 30 s 溶解残留物, 0.22 μm 滤膜过滤，待测。

1.3.3 色谱条件

色谱柱 Shim-pack XR-ODSII (2.0 mm×75 mm, 2.2 μm)，流动相 A 为 0.1%(体积分数)甲酸溶液，B 为乙腈，流量 0.3 mL/min，柱温 40 ℃，进样量 5.0 μL，梯度洗脱程序见表 1。

表 1　梯度洗脱程序
Tab. 1　Procedure of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.01	98	2
1.00	98	2
5.00	25	75
5.50	25	75
8.00	98	2

1.3.4　质谱条件

电喷雾离子源，正离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描；电喷雾电压 5.5 kV；离子源温度 550 ℃；碰撞气 Medium；气帘气压力 55 Psi；雾化气压力 55 Psi；辅助加热气压力 55 Psi。其他质谱参数见表 2。

1.4　数据处理

通过 AB SCIEX API3200 仪器配置工作站系统进行数据采集，使用 Microsoft Office Excel 2007 软件、SPSS 软件 18.0 版进行数据分析, Origin Pro 2021 进行图形绘图。

表 2　黄曲霉毒素质谱分析参数
Table 2　Mass spectrometry detection parameters for aflatoxins

化合物	保留时间/min	母离子(*m*/z)	子离子(*m*/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
AFB_1	5.83	313.1	285.0*, 241.3	75.0, 74.6	36.0, 38.2
AFB_2	5.70	315.2	259.3*, 287.4	80.3, 80.0	30.5, 31.2
AFG_1	5.55	329.3	243.3*, 311.3	90.4, 91.2	30.2, 34.1
AFG_2	5.42	331.3	245.3*, 313.4	85.2, 84.3	24.0, 33.2

注: *为定量离子。

2　结果与分析

2.1　质谱及色谱条件优化

质谱条件优化: 配制 300 μg/L 的 4 种黄曲霉毒素标准混合液，使用针泵进样，在正离子模式下进行 Q1 全扫描，得到各毒素的母离子，对各母离子进行二级碎片扫描，选择响应高、干扰小的 2 个离子分别作为定量和定性离子。采用 MRM 模式，优化去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能量(collision energy, CE)，优化后质谱参数见表 2。

色谱条件优化: 以乙腈、甲醇为有机相，水及 0.1%甲酸溶液为水相进行流动相考察。结果表明乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相，流速为 0.3 mL/min 时, 4 种黄曲霉毒素分离效果、色谱峰峰形和质谱响应信号最好, 4 种黄曲霉毒素标准溶液色谱图见图 1。

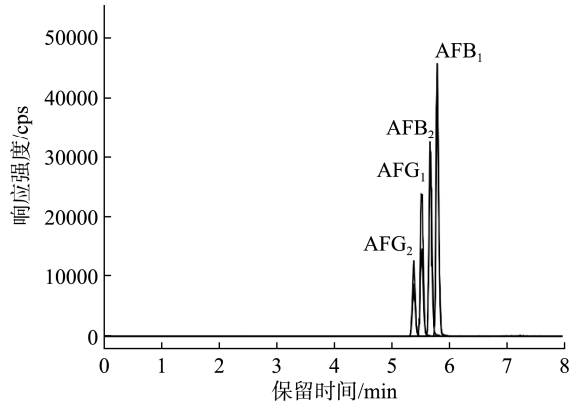


图 1　混合标准溶液 MRM 色谱图
Fig.1　MRM chromatogram of the mixed standard solution

2.2　不同前处理方法净化效果比较

按 1.3.2 中前处理方法对空白茶样品进行处理，比较 3 种不同前处理方法对空白茶样品净化效果。3 种不同前处理方法样品提取液颜色见图 2。免疫亲和柱法提取净化后，样品干净透明，多功能净化柱法提取净化后，样品颜色最深。免疫亲和柱测定的基础是抗原抗体反应，样品中黄曲霉毒素与柱内抗体特异性结合，再经洗涤去除未结合的其他物质，后用甲醇洗脱黄曲霉毒素。因此，免疫亲和柱法处理的样品，杂质干扰少。QuEChERS 法处理后的样品颜色比多功能净化柱法处理样品颜色浅，表明 QuEChERS 法的提取液中色素含量少于多功能净化柱法处理的样品。QuEChERS 法中净化材料 PSA 是弱阴离子交换吸附剂，可以去除茶叶样品中的有机酸、酚类、糖类和色素等。

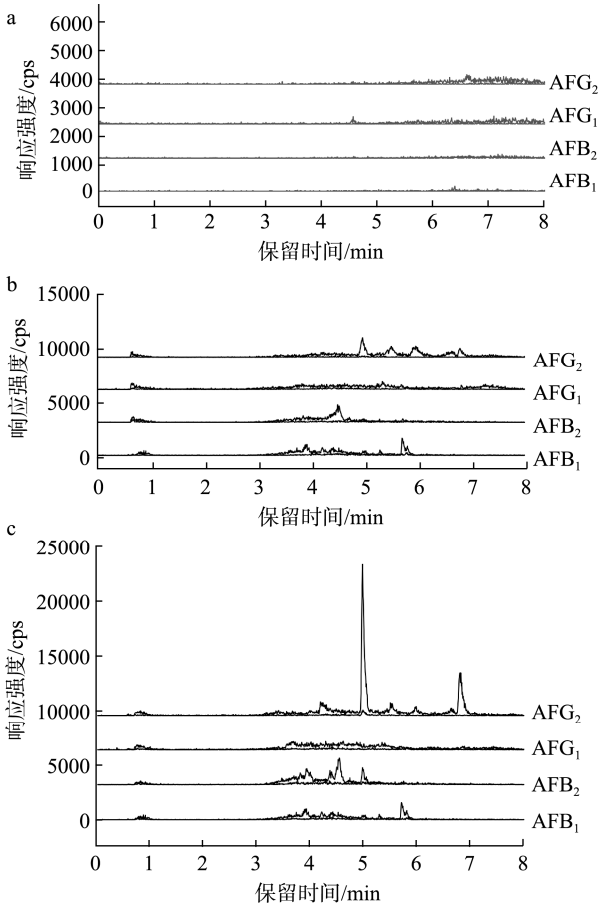


免疫亲和柱法　　QuEChERS法　　多功能净化柱法

图 2　不同前处理方法下茶样品提取液效果比较
Fig.2　Comparison of tea extracts using different sample treatment methods

硫酸镁可以吸附茶叶基质中水分及水溶性较强的强极性杂质。GCB 是非极性或弱极性吸附剂, 可以有效去除茶叶基质中色素。

考察 3 种不同前处理方法得到的空白茶样品提取液中 4 种黄曲霉毒素的提取离子色谱图, 分析不同前处理方法基质的干扰, 空白茶样品提取液离子色谱图见图 3。比较 3 种前处理方法离子流图的基线噪音, 免疫亲和柱法处理的样品基线噪音最低, 多功能净化柱法最高, QuEChERS 法次之。表明免疫亲和柱法前处理的样品干扰物含量最少, 多功能净化柱法前处理的样品干扰物含量最多。从图 3a 可以看出, 免疫亲和柱法前处理几乎没有干扰峰。图 3b 和 3c 中, AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 提取离子色谱图显示 QuEChERS 法和多功能净化柱法在茶基质干扰物的去除方面差异不大, 但对 AFG_2 多功能净化柱法干扰物较多, 在 5~7 min 有两个较强干扰峰。



注: a. 免疫亲和柱法前处理; b. QuEChERS 法前处理; c. 多功能净化柱法前处理。

图 3 不同前处理方法时空白茶样品中 4 种黄曲霉毒素的提取离子色谱图

Fig.3 Extracted ion chromatogram of 4 kinds of aflatoxins in blank tea sample after different sample treatment methods

从基线噪音、基质对 4 种黄曲霉毒素的影响以及提取液颜色比较分析, 免疫亲和柱法处理的样品基质干扰最小, 对仪器污染最少。免疫亲和柱法和 QuEChERS 法均适用于茶叶中 4 种黄曲霉毒素的测定, 多功能净化柱法净化效果虽然比不上 QuEChERS 法, 但对茶叶样品的净化效果也能满足黄曲霉毒素的检测要求。

2.3 基质效应

基质效应(matrix effects, ME)是指基质中除待测物之外的其他成分对待测物分析的影响, 包括基质增强效应和基质减弱效应, 影响检测结果的准确性和重现性[35]。按 1.3.2 中前处理方法, 分别用空白基质溶液与 70%乙腈水溶液配制成 1、5、10、20、40、50 和 60 μg/L 的基质匹配标准工作溶液和溶剂标准工作溶液。在相同条件下采用超高效液相色谱-串联质谱进行测定, 分别建立基质标准工作曲线和溶剂标准工作曲线。

采用标准曲线斜率比较法计算 ME, ME/%=(空白基质匹配标准工作曲线的斜率/溶剂标准工作曲线的斜率–1)×100%, 0≤|ME|≤20%, 基质对信号干扰较低, 可忽略不计; 20%<|ME|<50%, 表现为中等强度的基质干扰; |ME|≥50%, 为强烈的基质干扰[13], ME 见表 3。结果表明, 4 种黄曲霉毒素都有不同程度 ME 的影响。免疫亲和柱法|ME|值为 1.7%~9.2%, ME 较弱。多功能净化柱法和 QuEChERS 法处理的样品, |ME|值为 20.3%~30.6%, 为中等 ME, 4 种黄曲霉毒素为基质抑制效应。免疫亲和柱法处理样品效果更佳, 杂质较少, 这和黄曲霉毒素能与抗体特异性结合有关。为减少 ME 影响样品检测结果的准确性, 多功能净化柱法和 QuEChERS 法需要通过配制基质标准工作曲线进行定量, 降低 ME 的影响。

表 3 4 种黄曲霉毒素的 MEs

Table 3 MEs of 4 kinds of aflatoxins

方法	MEs/%			
	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2
多功能净化柱法	–29.7	–26.6	–30.6	–22.3
免疫亲和柱法	–1.7	–3.7	–9.2	–6.0
QuEChERS 法	–30.0	–27.2	–20.3	21.8

2.4 线性范围、检出限与定量限

配制质量浓度为 1、5、10、20、40、50 和 60 μg/L 的空白基质混合标准溶液系列, 按照仪器工作条件测定, 以黄曲霉毒素的质量浓度为横坐标(X, μg/L), 质谱峰面积为纵坐标(Y)绘制工作曲线, 线性回归方程、检出限和定量限见表 4。结果表明, AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 在 1~60 μg/L 范围内呈良好线性关系, 相关系数不小于 0.999。分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算检出限和定量限。多功能净化柱法检出限为 0.05~0.06 μg/kg, 免疫亲和柱法检出限为 0.04~0.05 μg/kg, QuEChERS 法检出限为 0.20~0.22 μg/kg, 均满足茶叶中 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2

的日常检测需求。免疫亲和柱法检出限最低, 可能因为免疫亲和柱净化能力较好, 可去除大部分杂质干扰。但多功能净化柱法和免疫亲和柱法检出限和定量限两者差异不大, 均比 QuEChERS 法检出限和定量限低, 二者在测试低浓度样品时比 QuEChERS 法具有优势。

2.5　精密度和回收试验

称取基质空白样品, 添加低、中、高 3 个不同水平的黄曲霉毒素, 按照 1.3.2 方法处理, 进行加标回收率实验, 每个加标浓度水平重复测定 6 次, 计算回收率和测定值的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 5。免疫亲和柱法的回收率为 80.7%~95.5%, RSDs 为 1.5%~2.6%, 多功能净化柱法的回收率为 78.6%~101.8%, RSDs 为 1.6%~3.1%, QuEChERS 法的回收率为 79.8%~107.1%, RSDs 为 1.3%~3.0%, 说明 3 种前处理方法回收率和精密度良好, 可满足茶叶中 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 检测的需求。但免疫亲和柱法前处理, 耗时最长, 多功能净化柱法次之, QuEChERS 法操作最便捷, 在大批量样品处理时, 综合考虑回收率、操作的便捷性、成本的经济性, QuEChERS 法更优。

表 4　线性方程、检出限和定量限

Table 4　Linear equations, limits of detection and limits of quantitation

化合物	方法	线性方程	相关系数	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
AFB_1	多功能净化柱法	Y=165.19X+587.3	0.9992	0.05	0.16
	免疫亲和柱法	Y=231.11X+738.93	0.9993	0.04	0.13
	QuEChERS 法	Y=164.5X+570.37	0.9992	0.20	0.50
AFB_2	多功能净化柱法	Y=110.39X+56.096	0.9991	0.05	0.16
	免疫亲和柱法	Y=144.92X+512.33	0.9993	0.04	0.13
	QuEChERS 法	Y=109.43X+237.32	0.9990	0.20	0.50
AFG_1	多功能净化柱法	Y=59.197X+178.39	0.9990	0.06	0.20
	免疫亲和柱法	Y=77.442X+183.9	0.9991	0.05	0.16
	QuEChERS 法	Y=67.951X+322.55	0.9990	0.22	0.60
AFG_2	多功能净化柱法	Y=20.432X+74.861	0.9990	0.06	0.20
	免疫亲和柱法	Y=24.707X+105.67	0.9993	0.05	0.16
	QuEChERS 法	Y=20.555X+81.691	0.9995	0.22	0.60

表 5　回收试验和精密度结果(n=6)

Table 5　Results of test for recovery and precision (n=6)

真菌毒素	免疫亲和柱法		多功能净化柱法		QuEChERS 法	
	添加量/(μg/kg)	回收率/%	添加量/(μg/kg)	回收率/%	添加量/(μg/kg)	回收率/%
AFB_1	0.5	82.7±1.96	0.5	97.4±2.67	0.5	91.3±2.33
	1.0	91.7±2.16	1.0	98.7±1.62	1.0	80.1±1.58
	5.0	95.1±1.53	5.0	84.1±2.21	5.0	84.4±1.98
AFB_2	0.5	80.8±1.18	0.5	79.7±2.26	0.5	79.8±1.22
	1.0	91.3±1.82	1.0	101.8±1.69	1.0	80.9±1.02
	5.0	95.5±2.48	5.0	88.5±2.4	5.0	83.1±1.36
AFG_1	0.5	90.3±1.54	0.5	90.3±2.67	0.5	87.6±1.90
	1.0	84.0±2.12	1.0	78.6±1.71	1.0	92.2±2.27
	5.0	92.7±1.66	5.0	87.8±2.73	5.0	107.1±2.47
AFG_2	0.5	80.7±1.48	0.5	93.9±2.71	0.5	105.3±2.48
	1.0	93.2±2.22	1.0	87.3±1.60	1.0	91.6±2.71
	5.0	92.0±2.36	5.0	90.8±2.15	5.0	103.9±1.84

2.6　实际样品检测

选取 1 份茶叶质控样品, 采用免疫亲和柱法、QuEChERS 法和多功能净化柱法对其所含 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 进行 3 次平行测定, 结果取平均值, 见表 6。结果表明, 3 种前处理方法对茶叶中 4 种黄曲霉毒素的测定结果都在标准值允许偏差范围内。说明 3 种前处理方法用于茶叶中 4 种黄曲霉毒素的检测准确度都较高, 可以满足检测要求。

表 6 3 种方法质控样品检测结果(μg/kg)

Table 6 Determination results of quality control samples by 3 kinds of methods (μg/kg)

化合物	标准值	特性值区间	测定值		
			免疫亲和柱法	多功能净化柱法	QuEChERS 法
AFB_1	4.74	5.74~3.74	4.42±0.01[a]	4.34±0.02[b]	4.35±0.01[b]
AFB_2	4.68	5.63~3.73	4.25±0.02[a]	4.09±0.02[b]	4.13±0.03[b]
AFG_1	8.45	10.14~6.76	7.90±0.14[a]	7.66±0.06[b]	7.71±0.02[b]
AFG_2	8.55	10.27~6.83	7.81±0.02[a]	7.63±0.05[b]	7.68±0.03[b]

注: 同行不同小写字母表示处理方法之间具有显著性差异(P<0.05)。

对 3 种方法检测结果差异性用单因素方差分析, 3 种方法对 4 种黄曲霉毒素检测结果存在显著性差异(P<0.05)。进一步用最小显著差数法(least significant difference, LSD)及 Duncan 法进行多重比较, 由表 6 可知, 质控样品中 AFB_1、AFB_2、AFG_1 和 AFG_2 测定值免疫亲和柱法与多功能净化柱法和 QuEChERS 法比较, 有显著性差异。多功能净化柱法和 QuEChERS 法比较, 4 种毒素测定值无显著性差异。免疫亲和柱法对 4 中毒素的测定值均高于多功能净化柱法和 QuEChERS 法, 可能是由于免疫亲和柱法对茶叶样品的净化能力较好, 杂质干扰少。虽然免疫亲和柱法处理样品测定结果与多功能净化柱法和 QuEChERS 法前处理样品测定结果存在显著性差异, 但 3 种方法的测定值均在质控样品的特性值区间内。3 种前处理方法的差异在可接受范围内, 在检测茶叶中 4 种黄曲霉毒素时, 3 种前处理方法均可满足检测要求。

钟舒洁等[36]、刘文静等[37]均有报道在茶叶中检出 AFB_1、赭曲霉毒素 A 等毒素, 茶叶由于生产链长, 各个环节中均可能受到产毒真菌的污染从而产生毒素[13]。从广西各茶厂、茶叶店采集六堡茶样品 30 份, 按 1.3.2 中前处理方法对茶样品进行处理, 按 1.3.3 色谱条件, 1.3.4 质谱条件对前处理好的样品进行检测分析, 30 份茶叶样品均未检测出黄曲霉毒素。可能由于本次抽检的茶叶样品包含各个年份的茶叶, 且抽样量较少, 因此未检出真菌毒素。但是, 陈年老茶贮藏年份较长, 茶叶的储存环境可能受真菌污染从而产生毒素, 发酵黑茶在生产渥堆过程控制不严或存储环境不当也会受到真菌毒素的污染, 未发酵茶和发酵茶均有检出真菌毒素[21]。因此, 应加强茶叶真菌毒素污染检测和防控措施。

3 结 论

本研究通过超高效液相色谱-串联质谱法分析比较了免疫亲和柱法、QuEChERS 法和多功能净化柱法 3 种不同前处理方法对茶叶中 4 种黄曲霉毒素检测效果。通过考察 3 种前处理方法净化效果、ME、方法的稳定性、检出限、回收率, 及对茶叶质控样品的检测效果, 对 3 种前处理方法进行评价, 结果表明免疫亲和柱法净化效果最好, 由于免疫亲和柱测定的基础是抗原抗体反应, 净化后样品澄清, ME 影响最小, 有较高的灵敏度, 适合检测低浓度样品。多功能净化柱法净化后样品颜色比 QuEChERS 法深, 杂质去除能力比 QuEChERS 法稍弱。但提取液中各毒素提取离子色谱图显示, 二者在茶基质干扰物的去除方面差异不大, 仅对 AFG_2 干扰峰较多, 多功能净化柱法对茶叶样品的净化效果也能满足要求, 但基质干扰物对仪器产生污染, 会增加仪器维护成本。多功能净化柱法和免疫亲和柱法检出限和定量限两者差异不大, 均比 QuEChERS 法低, 但免疫亲和柱法处理样品时比 QuEChERS 法和多功能净化柱法耗时长。茶叶质控样品检测结果显示免疫亲和柱法测定值与多功能净化柱法和 QuEChERS 法测定值相比, 有显著性差异, 4 种毒素测定值均高于另外两种方法。可能是由于 QuEChERS 法和多功能净化柱法处理的样品是中等 ME, 基质对待测物产生了基质抑制作用, 但 3 种方法测定值均在标准值允许偏差范围内, 测定结果差异性在可接受范围。在检测分析时, 3 种前处理方法均适合检测茶叶中 4 种黄曲霉毒素。

QuEChERS 前处理技术简便、高效和绿色, 被广泛应用于茶叶中真菌毒素的检测。红茶、绿茶、黑茶等茶叶中真菌毒素检测均有采用 QuEChERS 前处理方法[12,30,34]。QuEChERS 前处理技术适用于黄曲霉毒素、伏马毒素、赭曲霉毒素 A 等多种毒素的同时测定[12]。免疫亲和柱法测定的基础是抗原抗体反应, 适用于茶叶、谷物、花生等不同基质食品中真菌毒素的检测[32]。针对不同的真菌毒素, 免疫亲和柱法匹配不同的免疫亲和柱, 与 QuEChERS 法相比, 免疫亲和柱法无法达到多种不同类型真菌毒素同时测定, 在大批量样品真菌毒素筛查检测时, 综合考虑回收率、操作的便捷性、成本的经济性, QuEChERS 法更优。多功能净化柱法去除杂质能力较弱, 适合基质干扰较少的样品检测。QuEChERS 法、免疫亲和柱法和多功能净化柱法相比, 免疫亲和柱法净化效果最好, 样品中黄曲霉毒素与柱内抗体特异性结合, 再经洗涤去除未结合的其他物质, 净化后样品澄清, ME 影响最小, 表现出较高的灵敏度, 检测低浓度样品时免疫亲和柱法有优势。

参考文献

[1] SHANG A, LI JH, ZHOU DD, *et al*. Molecular mechanisms underlying health benefits of tea compounds [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 172: 181–200.

[2] LIN FJ, WEI XL, LIU HY, *et al*. State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 126–138.

[3] YUE ZJ, XUE Z, XU DL, *et al*. Study on differences between etiolated-green tea and other 10 kinds of common tea based on drinking quality and *in vitro* hypoglycemic lipase activity [J]. Journal of Future Foods, 2025, https://doi.org10.1016/j.jfutfo.2025.09.006

[4] BAO MT, XUE Z, SHUO P, *et al*. Extraction, characterization, and impact of polysaccharides from Zhonghuang No.1 etiolated-green tea on human fecal microbiota [J]. Food Bioengineering, 2025, 4: 166–181.

[5] ZHOU H, YAN Z, WU A, *et al*. Mycotoxins in tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze): Contamination and dietary exposure profiling in the Chinese population [J]. Toxins, 2022, 14(7): 452–452.

[6] 王秋霜, 李东霖, 吴华玲. 茶叶质量与安全研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 67–76.
WANG QS, LI DL, WU HL. Research progress on tea quality and safety [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 67–76.

[7] 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]. Journal of Guizhou Tea, 2023(2): 4–13.

[8] 周海燕, 武爱波, 刘娜. 茶叶中真菌与真菌毒素污染风险状况与防控研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 390–397.
ZHOU HY, WU AIB, LIU N. Research progress on risk profile and control of fungal and mycotoxin contamination in tea [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 390–397.

[9] WEI FZ, XUE M, HANG BY, *et al*. Aspergillus flavus and aflatoxins control in long-term storage of food ingredients of Puerh tea, peanut and polished rice [J]. Food Chemistry, 2024, 461: 140805.

[10] 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]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 405−412.

[11] 余佃贞, 武爱波. 茶叶中产毒真菌污染现状及其生物防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2290–2298.
YU DZ, WU AIB. Research progress on the contamination status and bio-control of fungi and mycotoxin in tea [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(7): 2290–2298.

[12] 梁剑锋, 李亚, 宾月景, 等. QuECHERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中伏马毒素 B_1、B_2、B_3的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(11): 1316–1320.
LIANG JF, LI Y, BIN YJ, *et al*. Determination of fumonisina B_1, B_2 and B_3 in tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with QuECHERS [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2023, 59(11): 1316–1320.

[13] 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 Science, 2021, 42(2): 299–305.

[14] 李静榕, 毛世红, 覃观凤, 等. 茶叶中真菌毒素风险评估及防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(19): 6354–6360.
LI JR, MAO SH, QIN GF, *et al*. Research progress in risk assessment and prevention control of mycotoxins in tea [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(19): 6354–6360.

[15] 朱金国, 莫瑾, 谭建锡, 等. 出口茶叶生产加工中有害微生物危害分析[J]. 现代农业科技, 2014, 2: 304–306.
ZHU JG, MO J, TAN JX, *et al*. Analyses of harmful microorganisms hazard in production and processing of export tea [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014, 2: 304–306.

[16] MAGGIRA M, IOANNIDOU M, SAKARIDIS I, *et al*. Determination of aflatoxin M_1, in raw milk using an HPLC-FL method in comparison with commercial ELISA kits-application in raw milk samples from various regions of Greece [J]. Veterinary Sciences, 2021, 8(3): 46.

[17] 黄奥迪, 严佳惠, 张昭寰, 等. 黄曲霉毒素 B_1 诱导大鼠肝细胞凋亡率剂量效应模型的构建[J]. 食品科学, 2024, 45(3): 61–67.
HUANG AD, YAN JH, ZHANG ZH, *et al*. Dose-response modeling of aflatoxin B_1-induced apoptosis rate in rat hepatocytes [J]. Food Science, 2024, 45(3): 61–67.

[18] ZHANG XJ, ZHANG L, ZHOU T, *et al*. Fungal flora and mycotoxin contamination in tea: Current status, detection methods and dietary risk assessment-a comprehensive review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 207–220.

[19] SEDOVA I, KISELEVA M, TUTELYAN V. Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation [J]. Toxins, 2018, 10(11): 444.

[20] 李亚, 梁剑锋, 宾月景, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定六堡茶中黄曲霉毒素 B_1 的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(10): 1134–1138.
LI Y, LIANG JF, BIN YJ, *et al*. Determination of aflatoxin B_1 in liupao tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with QuEChERS [J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part B: Chemical Analysis), 2023, 59(10): 1134–1138.

[21] 吕志强, 张滢. 茶叶中真菌毒素检测研究进展[J]. 中国茶叶, 2023, 45(5): 12–20.
LV ZQ, ZHANG Y. Research progress in detection of mycotoxins in tea [J]. China Tea, 2023, 45(5): 12–20.

[22] CUI P, YAN HB, GRANATO D, *et al*. Quantitative analysis and dietary risk assessment of aflatoxins in Chinese post-fermented dark tea [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 146: 111830.

[23] AREO OM, ABAFE OA, GBASHI S, *et al*. Detection of multi-mycotoxins in rooibos and other consumed teas in South Africa by a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J/OL]. Food Control, 2023, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109255

[24] 陈瑞鹏, 孙云凤, 霍冰洋, 等. 真菌毒素多重检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 267–274.
CHEN RP, SUN YF, HUO BY, *et al*. Progress in multiple detection technologies for mycotoxins [J]. Food Science, 2021, 42(17): 267–274.

[25] 赵东岳, 许秀丽, 王秀娟, 等. 共价有机框架材料磁性固相萃取结合高效液相色谱-串联质谱法检测茶叶中黄曲霉毒素[J]. 食品科学, 2024, 45(20): 263–269.
ZHAO DY, XU XL, WANG XJ, *et al*. Determination of aflatoxins in tea by magnetic solid phase extraction based on covalent organic framework coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2024, 45(20): 263–269.

[26] 吴定芳, 戴佩珍, 何茫茫. 茶叶中真菌毒素检测研究现状[J]. 现代食品, 2022, 28(9): 18–20.
WU DF, DAI PZ, HE MM. Research status of mycotoxin detection in tea [J]. Modern Food, 2022, 28(9): 18–20.

[27] GHOLIZADEH S, MIRZAEI H, KHANDAGHI J, *et al*. Ultrasound-assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 114. https://doi.org10.1016/J.JFCA.2022.104831

[28] 朱青, 曹美萍, 任兴发, 等. 全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对食品中黄曲霉毒素B_1检测结果的影响比对[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 93–99.
ZHU Q, CAO MP, REN XF, *et al*. Effection and comparison of detection results of aflatoxin B_1 in foods by fully automated immunomagnetic bead purification method and immunoaffinity column method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 93–99.

[29] 祖新, 燕妮, 郭娇娇, 等. 免疫亲和净化-高效液相质谱法检测茯砖茶中黄曲霉毒素 B_1 [J]. 茶叶通讯, 2022, 49(1): 108–112.
ZU X, YAN N, GUO JJ, *et al*. Determination of aflatoxin B_1 in Fuzhuan tea by immunoaffinity purification and HPLC-MS [J]. Journal of Tea Communication, 2022, 49(1): 108–112.

[30] 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]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(12): 3834–3841.

[31] 张久成. 液相色谱-串联质谱法测定老白茶中黄曲霉毒素 B_1 残留量[J]. 现代食品, 2025, 14: 183–185.
ZHANG JC. Measurement of aflatoxin B_1 residue in old white tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food, 2025, 14: 183–185.

[32] 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(170): 37–44.
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 Chemical Industry, 2023, 6(170): 37–44.

[33] 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的 10 种真菌毒素[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 280–289.
LIU Y, CHEN J, TAN GL, *et al*. Determination of ten mycotoxins in fermented dark tea by QuEChERS-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 280–289.

[34] 叶梦薇, 冯丽凤, 黄芊, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 快速测定茶叶中 23 种真菌毒素[J]. 化学研究与应用, 2024, 36(2): 380–310.
YE MW, FENG LF, HUANG Q, *et al*. Rapid determination of 23 kinds of mycotoxins in tea by QuECHERS-UPPLC-MS/MS [J]. Chemical Research and Application, 2024, 36(2): 380–310.

[35] EECKHAUT AV, LANCKMANS K, SARRE S, *et al*. Validation of bioanalytical LC-MSMS assays: Evaluation of matrix effects [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 887: 2198–2207.

[36] 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 Agricultural Science Bulletin, 2021, 27(16): 15–19.

[37] 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 AIB, YU DZ. Advances on the security risk of aflatoxin in tea [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022,13(22): 7143–7149.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)