

咖啡中 3 种赭曲霉毒素 QuEChERS-UPLC-MS/MS 检测方法

Establishment of QuEChERS-UPLC-MS/MS method to determine three kinds of ochratoxins in coffee

高云慨 陈小妹 陈春泉

GAO Yunkai CHEN Xiaomei CHEN Chunqian

周凌聿 邓英林 尹青春

ZHOU Lingyu DENG Yinglin YIN Qingchun

(海南省食品检验检测中心国家市场监督管理总局重点实验室[热带果蔬质量与安全], 海南海口 570100)

(Hainan Institute for Food Control, Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality

Safety for State Market Regulation, Haikou, Hainan 570100, China)

摘要:目的:建立同时测定咖啡中 3 种赭曲霉毒素的 QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱检测方法。方法:样品经乙腈—水—甲酸($V_{乙腈}:V_{水}:V_{甲酸}$ 为 55:40:5)超声提取,利用 QuEChERS 盐包进行脱水盐析,过 ZanChERS-Myco17 净化小柱净化。样品采用 0.2% 甲酸水—乙腈作为流动相经 Waters BEH C_{18} (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) 色谱柱梯度洗脱分离。电喷雾正离子模式,多反应监测扫描,内标法定量。结果:3 种目标物在 0.1~20.0 ng/mL 的质量浓度范围内线性关系良好,相关系数 $\geq 0.999 46$,方法检出限和定量限分别为 0.1~0.2, 0.2~0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。咖啡基质中 3 个添加水平目标物平均回收率为 79.0%~103.3%,相对标准偏差为 1.5%~7.6%。结论:该方法前处理简单,重现性好,分析时间短,能够适用于不同咖啡基质样品中 3 种赭曲霉毒素残留的高通量检测。

关键词:咖啡;赭曲霉毒素;QuEChERS;超高效液相色谱—串联质谱法

Abstract: Objective: A new method was developed for the simultaneous determination of three kinds of ochratoxins in coffee by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with QuEChERS

pretreatment. **Methods:** Samples were extracted by acetonitrile-water-formic acid solution (55:40:5) with ultrasonic, salted out with a QuEChERS salt packet, and then purified with a (ZanChERS-Myco17) column. The chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH C_{18} (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) column by gradient elution using a mobile phase comprising 0.2% formic acid aqueous solution and acetonitrile. In the positive ion mode of electric spray, the samples detected were used by multiple reaction monitoring (MRM) modes with internal standard method. **Results:** Three target substances had a good linear relationship in the range of 0.1~20.0 ng/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.999 46. The detection limit and quantitative limit were 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.2~0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Average recoveries at three spiked levels in the coffee matrix were 79.0%~103.3% with a relative standard deviation of 1.5%~7.6%. **Conclusion:** This method has the advantages of simple sample pretreatment, good reproducibility and high efficiency, and is suitable for the high-throughput detection of multiple ochratoxins in different coffee samples.

Keywords: coffee; ochratoxins; QuEChERS; UPLC-MS/MS

基金项目:国家市场监督管理总局重点实验室(热带果蔬质量与安全)自主研究课题(编号:ZZ-2022001)

作者简介:高云慨,男,海南省食品检验检测中心中级工程师,硕士。

通信作者:尹青春(1986—),女,海南省食品检验检测中心高级工程师,硕士。E-mail: yinqingchun@163.com

收稿日期:2023-02-09 **改回日期:**2023-08-29

据统计^[1],中国饮用咖啡的消费者已达 3.3 亿人,近年来咖啡消费市场规模保持 20% 的年化速度飞速增长。中国咖啡种植主要分布在湿润潮湿的云南、四川及海南地区。研究^[2]表明,咖啡及其产品在采收、加工、贮藏过程中易受到霉菌的侵染,产生各种真菌毒素。Bessaire 等^[3]采集了 9 个国家咖啡样本,多数样本中含有多种霉

菌毒素,其中赭曲霉毒素 A 含量最高。饮用咖啡是机体摄入该毒素的主要途径,因在生产及食用环节难以完全避免其毒性,已成为危害健康的主要关键风险因素^[4-5]。

赭曲霉毒素(ochratoxin, OT)是由真菌产生的具有结构类似的次生代谢产物,常见的有赭曲霉毒素 A(OTA)、赭曲霉毒素 B(OTB)和赭曲霉毒素 C(OTC)等^[6-7]。其主要通过侵害动物肝脏与肾脏,具有致癌、致畸等毒副作用,已被国际癌症研究机构(IARC)列入 2B 类致癌目录,危害性仅次于黄曲霉毒素^[8]。研究^[9]表明,OTA 和 OTC 在特定条件下可以相互转化,具有协同毒副效应。同时,代谢的多种真菌毒素的协同作用对人体健康的影响更具危害性^[10-11]。叶林链等^[12]从肉豆蔻中分离了一株赭曲霉毒素产毒菌,同时检出了 OTA、OTB 两种真菌毒素,说明在植物源样本中存在不同结构的赭曲霉毒素。GB 2761—2017 对咖啡中赭曲霉毒素 A 限值有明确要求,但其他赭曲霉毒素类型尚未见相关规定^[13]。

近年来,高效液相色谱—串联质谱技术因其强大的分离能力和较好的灵敏度、准确性,逐步被应用于部分真菌毒素的定性和定量分析^[14-18]。免疫亲和柱法对真菌毒素具有高特异性,是目前国家标准检测咖啡赭曲霉毒素 A 采用的前处理方法,但由于采用抗原抗体结合的净化方式,其前处理过程复杂、使用成本高,检测的真菌毒素种类有限。相比免疫亲和柱,QuEChERS 前处理技术采用提取与净化结合方式,具有操作简单、快速、价格便宜且选择性好等优点,可应用于多种真菌毒素的高通量检测^[19-23]。

目前国内有关咖啡及制品中真菌毒素检测的研究较少^[24],尚未见针对咖啡中同时检测 OTA、OTB、OTC 3 种类型赭曲霉毒素方法研究及评价的报道。研究拟将高效液相色谱—串联质谱技术与 QuEChERS 技术结合,采用内标法定量,旨在建立能快速筛查和准确定量咖啡中 3 种赭曲霉毒素检测方法,以期为全面监测、评估咖啡中赭曲霉毒素的污染风险提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

OTA、OTC:天津阿尔塔科技有限公司;

OTB:德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

¹³C₂₀-OTA:北京曼哈格生物科技有限公司;

QuEChERS 提取盐包:4 g 硫酸镁、1.0 g 氯化钠,美国 Agilent 公司;

净化柱:SHIMADZU WondaPak QuEChERS 净化管,日本 SHIMADZU 公司;

Waters Oasis® PRime HLB: 200 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司;

ZanChERS-Mycol7 净化小柱:北京科德诺思技术有限公司;

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 美国 Waters 公司;

乙腈、甲酸、甲醇:德国 MERCK 公司;

咖啡生豆、烘焙咖啡豆、速溶咖啡粉:市售。

1.1.2 仪器与设备

质谱仪:AB Sciex Triple Quad™ 4500 型,美国 SCTEX 公司;

电子天平:XS204S 型,瑞士梅特勒—托利多公司;

冷冻离心机:5804R 型,德国 Eppendorf 公司;

超声波器:SK 7200 型,上海科导超声仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 仪器条件

(1) 质谱条件:离子源(ESI);正离子模式;多反应监测(MRM)扫描;喷雾电压 4 500 V;离子源温度 550 °C;雾化气为氮气;加热气为氮气;碰撞室入口电压 10 V。

(2) 色谱条件:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);柱温 40 °C;进样体积 5.0 μL;流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为乙腈;流速 0.3 mL/min;洗脱程序:0~2.0 min, 10% B; 2.0~3.0 min, 10%~90% B; 3.0~3.2 min, 90%~10% B; 3.2~5.0 min, 10% B。

1.2.2 标准溶液配制

(1) 混合标准溶液 (1.0 μg/mL):准确吸取 100 μg/mL 的 3 种赭曲霉毒素混标 100 μL,用乙腈定容至 10 mL,并于 -18 °C 贮藏备用。

(2) ¹³C₂₀-OTA 内标使用溶液 (10.0 μg/mL):准确吸取 100 μg/mL ¹³C₂₀-OTA 溶液 1.0 mL,用乙腈定容至 10 mL,并于 -18 °C 贮藏备用。

1.2.3 基质标准曲线配制 称取不含 3 种赭曲霉毒素的咖啡空白基质样品,按 1.2.2 的方法处理得到基质溶液,使用该溶液配制成质量浓度为 0.1~20.0 ng/mL 的标准工作曲线溶液。

1.2.4 样品前处理 称取 1.0 g (精确至 0.01 g) 咖啡粉碎样品至 50 mL 干净离心管中,加入 100 ng/mL 的 ¹³C₂₀-OTA 内标标准溶液 200 μL 及 10 mL 乙腈提取液 (V_{乙腈}:V_{甲酸}:V_水 为 65:5:30),分别漩涡超声 5 min,加入 3.2 g QuEChERS 盐包,剧烈振荡分散,10 000 r/min 离心 5 min。吸取 2 mL 上清液上 ZanChERS-Mycol7 净化小柱,收集滤液过 0.22 μm PTFE 滤膜,上质谱测定。

1.2.5 线性关系 以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,将 3 种赭曲霉毒素系列混合标准曲线溶液分析结果绘制校准曲线,计算相应线性方程及相关系数。

1.2.6 检出限及定量限 通过测定系列混合标准曲线溶液,检出限以 3 倍信噪比 (S/N=3) 时对应的目标物浓度换算,定量限以 10 倍信噪比 (S/N=10) 时对应的目标物浓度换算。

1.2.7 回收率和精密度测定 分别选取不含3种赭曲霉毒素的咖啡生豆、烘焙咖啡粉、速溶咖啡粉作为基质,分别配制含混标溶液 2,5,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个水平的供试品溶液进行测定,每个水平6个平行,计算各水平目标物回收率和相对标准偏差。

1.2.8 实际样品测定 采用市售的咖啡生豆(预包装)、咖啡生豆(散装)、研磨咖啡粉(预包装)、研磨咖啡粉(散装)、速溶咖啡(预包装)、速溶咖啡(散装)共30个样品,主要产地为海南省,按试验建立的方法及 GB 5009.28—2016 进行测定,每种类型5个样品,每个样2个平行。

1.2.9 数据处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,采

用 Origin 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

分别取质量浓度为 20 ng/mL 的 OTA、OTB、OTC 和 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 标准溶液上机调谐,依次选择正、负离子模式扫描一级质谱,比较正、负离子模式的响应情况。结果发现,4种目标物采用正离子模式响应最好。继续采用正离子模式扫描二级质谱,同时选择多反应监测模式优化各目标物的其他参数,筛选最优的定性和定量离子。优化后的质谱参数见表1。

表1 OTA、OTB、OTC 和 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的质谱参数

Table 1 MS parameters of OTA, OTB, OTC and $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA

化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	定量(m/z)	定性(m/z)	碰撞能量/V	去簇电压/V	内标物
OTA	3.50	404.0	358.0	239.0	20/33	50	$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA
OTB	3.51	370.0	205.0	187.0	28/48	50	$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA
OTC	3.31	432.0	358.0	239.0	25/36	50	$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA
$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA	3.97	424.0	377.0	/	23	50	/

2.2 色谱柱及流动相的筛选

试验对比了 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (1.7 μm , 2.1 $\text{mm} \times 100 \text{ mm}$)、CORTECS T_3 (2.7 μm , 2.1 $\text{mm} \times 100 \text{ mm}$)、CORTECS T_3 (1.8 μm , 2.1 $\text{mm} \times 100 \text{ mm}$) 3款类型不同填充粒径的色谱柱和 0.2% 甲酸水/甲醇、水/甲醇、0.2% 甲酸水/乙腈、水/乙腈 4种不同配比流动相的分离效果。结果显示,采用 Waters BEH C_{18} 及 CORTECS T_3 色谱柱均能分离4种化合物,其中 Waters BEH C_{18} 色谱柱响应值最高,分离效果最好。李硕等^[24]采用 UPLC-MS/MS 测定咖啡粉中黄曲霉毒素和杂色曲霉素,发现 C_{18} 色谱柱填料为实心核壳颗粒分离效果要优于全多孔颗粒。对比4种不同配比流动相,当流动相中添加甲酸后,峰型对称、信号响应更高,并随着甲酸浓度的增加,其响应不断增强。其中 0.2% 甲酸水/乙腈作为流动相的色谱峰型及信号响应最好。叶林链等^[12]研究发现,选择乙腈为流动相,不加酸,OTA、OTB 的保留时间会发生漂移,加酸后能改善目标化合物的峰型。赭曲霉毒素化合物由于含较多羧酸,添加适量的酸可以使其保持分子形式有利于色谱柱的保留,促进分离^[25]。因此,选择 Waters BEH C_{18} 色谱柱,0.2% 甲酸水/乙腈为流动相。4种化合物质谱总离子流图如图1所示。

2.3 样品前处理条件优化

乙腈作为提取溶剂具有沉淀蛋白的作用,对脂肪及蛋白含量较高的食品具有较好的选择^[26]。通过加标回收试验考察了6种不同配比提取溶剂1[乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 90:10)]、提取溶剂2[乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 75:25)]、提取溶剂3[乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 65:

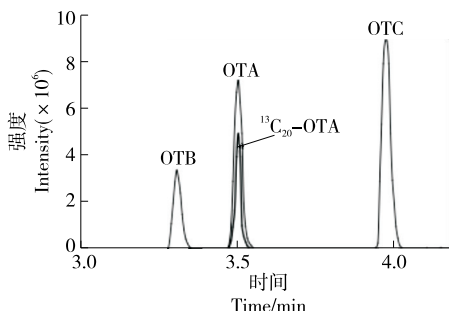


图1 OTA、OTB、OTC 和 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 质谱总离子流图
Figure 1 Total ion chromatography of OTA, OTB, OTC and $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA

35)]、提取溶剂4[乙腈—水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 55:45)]、提取溶剂5[乙腈—水—甲酸($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}$ 为 55:40:5)]、提取溶剂6[乙腈—水—甲酸($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}$ 为 55:35:10)]的提取效果。由图2可知,溶剂中加入适量水可以增强乙腈的渗透性,添加无机盐可以促进乙腈与水相分层,当 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 65:35 时,开始分层,其中 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$ 为 55:45 的分层效果最好,提取效率最高。当提取液中含有 5% 甲酸时,OTA、OTB 的回收率较高,但甲酸含量过高,3种目标化合物的回收率均降低。有研究^[27]表明,体系中加入适当的酸可增强对酸敏感的真菌毒素的提取效果并降低基质效应。试验中加入适当的酸及无机盐可以使目标物保留分子形式利于提取及减少乙腈中水溶性杂质的基质效应,从而获得较高提取效果。综合考虑,选择乙腈—水—甲酸($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}$ 为 55:40:5)作为提取溶剂。

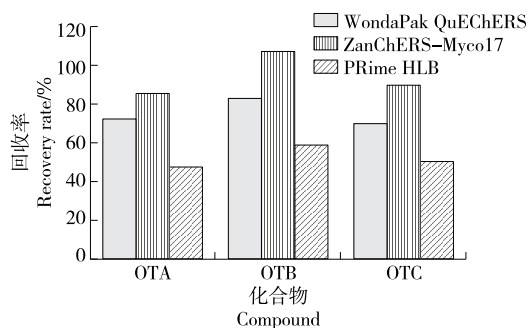


图 2 提取溶剂对 3 种化合物回收率的影响

Figure 2 The effect of extract on the recoveries of OTA, OTB and OTC

2.4 净化方式优化

研究^[28]表明,可采用不同类型净化方式去除干扰物质,提高净化效果。试验分别选用 WondaPak QuEChERS 净化管、ZanChERS-Myco17 净化小柱、PRime HLB 净化柱 3 种净化方式,以回收率为指标,考察 3 种目标化合物的净化情况。由图 3 可知,WondaPak QuEChERS 净化管、ZanChERS-Myco17 净化小柱对 3 种目标化合物净化效果较好,其中 ZanChERS-Myco17 净化小柱净化效果最佳,整体回收率为 85.5%~107.5%。QuEChERS 净化管采用的净化剂含有 PSA、GCB、C₁₈,这些成分可有效去除脂类、糖类及色素等成分,但对酸性及含有苯环的官能团毒素具有吸附作用,可能是导致回收率偏低的原因。PRime HLB 净化柱能够有效去除蛋白、盐、磷脂等干扰物,但对咖啡色素的净化效果不明显,基质干扰大,导致回收率偏低。ZanChERS-Myco17 净化小柱采用磁性金属有机骨架(MOFs)材料键合 NH₂ 基团,相比净化管具有较高的理论塔板数及选择性。因此,选取 ZanChERS-Myco17 净化方式。

2.5 线性范围、检出限及定量限

García-Moraleja 等^[29]以生咖啡豆为基质,建立了 UPLC-MS/MS 测定 OTA 的方法,检出限及定量限分别为 1.13, 1.45 μg/kg。由表 2 可知,试验方法在 0.1~20.0 ng/mL 的质量浓度范围内 3 种目标物线性关系良好,相关系数均>0.999 46,检出限为 0.1~0.2 μg/kg,定量限为 0.2~0.7 μg/kg,其中 OTA 的检出限及定量限分别为 0.2, 0.7 μg/kg,均小于同类方法及 GB 5009.96—

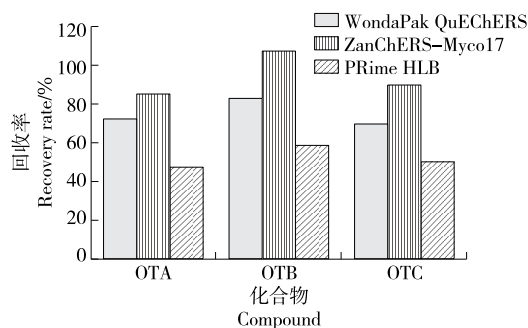


图 3 净化方式对 3 种目标化合物回收率的影响

Figure 3 The effect of different purification methods on the recoveries of OTA, OTB and OTC

2016 中的检出限和定量限,说明试验方法的灵敏度较高。

2.6 回收率与精密度试验

基质效应是影响检测结果准确性的重要因素,减少基质效应的影响一般可选择同位素内标法和基质匹配校正法^[30-31]。鉴于咖啡基质较为复杂,试验选择内标法定量。分别选取不含目标物的咖啡豆、研磨咖啡粉、速溶咖啡粉作为阴性样品,各添加 2, 5, 10 μg/kg 3 个水平浓度 OTA、OTB 和 OTC 混标溶液及内标溶液,按 1.2.7 的方法分别计算 3 种化合物的平均回收率及相对标准偏差(RSD),每个浓度 6 个平行,结果见表 3。由表 3 可知,3 种毒素的平均回收率为 79.0%~103.0%,RSD 为 1.5%~7.6%,方法准确性和重现性较好,满足检测要求。

2.7 实际样品测定

由表 4 可知,30 份咖啡样品中共检出 4 批含有 OTA,含量为 0.82~2.15 μg/kg,均低于标准规定限值(5.0 μg/kg)。经比对,除样品 YMS4 因检测结果低于标准方法定量限而无法准确定量外,试验方法测定结果与标准方法的相对标准偏差均<15%,说明该方法测定样品结果准确可靠。一般来说,咖啡样品中赭曲霉毒素的污染主要来自生产、运输、贮藏过程中残留毒素的直接接触及真菌侵染后产生代谢物两个方面,此次检出的 4 批样品中,3 批来自散装贮藏,可能是由于散装咖啡密封不严、贮藏条件控制不当而被真菌污染产生毒素所致。生咖啡豆中 OTA 残留量通常会比烘焙咖啡的高,主要原因是烘焙过程中高温可一定程度上降低 OTA 水平^[32-33]。试验也发现,生咖啡豆 OTA 检出含量要高于研磨咖啡。

表 2 3 种化合物的线性关系、检出限、定量限

Table 2 Linear equation, LODs and LOQs of OTA, OTB and OTC

化合物	线性范围/ (μg · L ⁻¹)	回归方程	相关系数	检出限/ (μg · kg ⁻¹)	定量限/ (μg · kg ⁻¹)
OTA	0.1~20	y=2.420 13x-0.003 64	0.999 76	0.2	0.7
OTB	0.1~20	y=2.367 05x-0.006 69	0.999 63	0.2	0.7
OTC	0.1~20	y=11.125 13x-0.015 38	0.999 46	0.1	0.2

表3 3种化合物的回收率和RSD

Table 3 The recoveries and RSD of OTA, OTB and OTC ($n=6$)

咖啡基质	化合物	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
咖啡生豆	OTA	93.0	1.5	91.5	2.3	92.0	1.5
	OTB	92.5	5.4	103.0	2.7	94.5	3.7
	OTC	90.0	1.6	93.0	1.5	99.5	2.1
研磨咖啡粉	OTA	83.5	2.5	89.5	4.0	90.0	3.1
	OTB	88.0	1.6	93.5	2.3	90.5	2.3
	OTC	82.0	5.2	89.0	4.8	83.0	5.1
速溶咖啡粉	OTA	79.0	5.4	85.0	3.3	83.5	7.6
	OTB	82.5	4.3	83.5	7.6	83.5	4.2
	OTC	80.0	7.1	86.0	4.9	82.5	2.6

表4 实际样品检测结果[†]

Table 4 Detection results of actual samples

样品	试验方法/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	标准方法/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	偏差/ %	样品	试验方法/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	标准方法/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	偏差/ %
SDY1	ND	ND	/	YMS2	1.81(OTA)	1.92(OTA)	5.9
SDY2	ND	ND	/		1.12(OTB)	/	
SDY3	2.15(OTA)	2.38(OTA)	10.2	YMS3	ND	ND	/
SDY4	ND	ND	/	YMS4	0.82(OTA)	LD	/
SDY5	ND	ND	/	YMS5	ND	ND	/
SDS1	1.21(OTA)	1.39(OTA)	13.9	SR Y1	ND	ND	/
SDS2	ND	ND	/	SR Y2	ND	ND	/
SDS3	ND	ND	/	SR Y3	ND	ND	/
SDS4	ND	ND	/	SR Y4	ND	ND	/
SDS5	ND	ND	/	SR Y5	ND	ND	/
YMY1	ND	ND	/	SRS1	ND	ND	/
YMY2	ND	ND	/	SRS2	LD	LD	/
YMY3	ND	ND	/	SRS3	ND	ND	/
YMY4	ND	ND	/	SRS4	ND	ND	/
YMY5	ND	ND	/	SRS5	ND	ND	/
YMS1	ND	ND	/				

[†] SDY为咖啡生豆(预包装);SDS为咖啡生豆(散装);YMY为研磨咖啡粉(预包装);YMS为研磨咖啡粉(散装);SR Y为速溶咖啡(预包装);SRS为速溶咖啡(散装);ND为未检出;/为无计算值;LD为低于定量限。

相关研究^[34]数据显示,咖啡及制品在一些国家或地区具有较高的赭曲霉毒素检出率及残留量。对实际样品检测发现,赭曲霉毒素检出率及含量均较低,另外,散装贮藏方式咖啡检出率高于预包装,说明可能存在真菌污染导致毒素积累的风险。建议在咖啡生产及销售过程中应对贮藏条件及方式加以严格控制,防止产毒真菌污染。

3 结论

采用 QuEChERS 前处理方法结合内标法定量,通过优化色谱质谱条件、提取条件和净化条件,建立了可同时

测定咖啡基质中3种赭曲霉毒素的 UPLC-MS/MS 方法。该方法相较标准方法的免疫亲和柱法更加简便、准确、灵敏,其分析时间短,适用于咖啡基质中3种赭曲霉毒素的快速筛查及定量检测。后续可结合微生物学手段明确污染源,以期为全面监测、评估咖啡中赭曲霉毒素的污染风险提供依据。

参考文献

- [1] 沈晓静, 字成庭, 辉绍良, 等. 咖啡化学成分及其生物活性研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(1): 112-122.

- SHEN X, ZI C T, HUI S L, et al. Advances on chemical components and biological activities of coffee [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2021, 29(1): 112-122.
- [2] VIEGAS C, PACÍFICO C, FARIA T, et al. Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2017, 80: 719-728.
- [3] BESSAIRE T, PERRIN I, TARRES A, et al. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment[J]. *Food Control*, 2019, 96: 59-67.
- [4] MARIN S, RAMOS A J, CANO-SANCHO G, et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 60: 218-237.
- [5] SUECK F, HEMP V, SPECHT J, et al. Occurrence of the ochratoxin a degradation product 20'R-ochratoxin a in coffee and other food: An update[J]. *Toxins*, 2019, 11(6): 329.
- [6] SCOTT P M. Effects of processing and detoxification treatments on ochra toxin A: Introduction[J]. *Food Additives and Contaminants*, 1996, 13: 19-21.
- [7] MA W, YIN H, XU L, et al. Femtogram ultrasensitive aptasensor for the detection of ochratoxin A[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 42(1): 545-549.
- [8] 吕蕾, 赵阳, 刘仁杰, 等. 基于纳米金与适配体的赭曲霉毒素 A 检测方法研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(7): 56-60.
- LU L, ZHAO Y Y, LIU R J, et al. Study on detection method for ochratoxin A based on gold nanoparticle and aptamer[J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(7): 56-60.
- [9] ZIMMERLI B, DICK R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment [J]. *Food Additives & Contaminants*, 1996, 13(6): 655-668.
- [10] REMIRO R, IBÁÑEZ-VEA M, GONZÁLEZ-PEÑAS E, et al. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1 217(52): 8 249-8 256.
- [11] BITTNER A, CRAMER B, HARRER H, et al. Structure elucidation and in vitro cytotoxicity of ochratoxin α amide, a new degradation product of ochratoxin A[J]. *Mycotoxin Research*, 2015, 16: 33-38.
- [12] 叶林链, 毛丹, 王少敏, 等. 肉豆蔻中赭曲霉毒素的测定及赭曲霉毒素产毒菌的分离鉴定[J]. *分析试验室*, 2021, 40(1): 7-11.
- YE L L, MAO D, WANG S M, et al. Determination of ochratoxins in nutmeg as well as isolation and identification of ochratoxin producing fungus [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(1): 7-11.
- [13] 侯晨, 王云政, 张驰, 等. 食品中赭曲霉毒素样品前处理及其检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(8): 163-170.
- HOU C, WANG Y Z, ZHANG C, et al. Advances in sample pretreatment and detection methods of ochratoxin in foods [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(8): 163-170.
- [14] ZHANG Z W, HU X F, ZHANG Q, et al. Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC-MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column [J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1 021: 145-152.
- [15] JEYAKUMAR J M J, ZHANG M Q, THIRUVENGADAM M. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 123: 98-110.
- [16] 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(1): 182-187.
- MO J, GONG Q, ZHOU H P, et al. Determination of ochratoxin A in tea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016(1): 182-187.
- [17] 张思思, 陆继伟, 王少敏, 等. 国内外真菌毒素检测方法研究现状及进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(7): 2 575-2 586.
- ZHANG S S, LU J W, WANG S M, et al. Current status and advances of domestic and international determination methods of mycotoxins[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(7): 2 575-2 586.
- [18] 韩艺焯, 邓年, 谢建军, 等. 酸辅助分散液液微萃取—高效液相色谱—串联质谱法测定果汁中多种真菌毒素[J]. *分析化学*, 2019, 47(3): 455-462.
- HAN Y Y, DENG N, XIE J J, et al. Acid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of mycotoxins in fruit juice[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(3): 455-462.
- [19] 潘晨, 于建, 吴思霖, 等. 新型脱脂前处理技术联合净化—同位素稀释—超高效液相色谱—串联质谱法测定花生中 15 种真菌毒素[J]. *上海预防医学*, 2020, 32(5): 368-374.
- PAN C, YU J, WU S L, et al. Simultaneous determination of 15 mycotoxins in peanuts by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with QuEChERS EMR-Lipid approach and stable isotope dilution[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2020, 32(5): 368-374.
- [20] 赵天宇, 杨帛, 刘锐萍, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的方法的优化研究[J]. *酿酒科技*, 2020(7): 90-94.
- ZHAO T Y, YANG B, LIU R P, et al. Ruiping optimization of determination method of ochratoxin A in wine by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020(7): 90-94.
- [21] 赵英莲, 张梓琪, 赵鑫, 等. QuEChERS 技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 1-5.
- ZHAO Y L, ZHANG Z Q, ZHAO X, et al. Research progress on QuEChERS technology in the detection of mycotoxins in food[J]. *China Brewing*, 2020, 39(1): 1-5.

- [22] 倪杨, 杨军军, 石磊, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法同时测定坚果中20种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4 107-4 116.
NI Y, YANG J J, SHI L, et al. Simultaneous determination of 20 kinds of mycotoxins in nuts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(13): 4 107-4 116.
- [23] 齐春艳, 许秀丽, 国伟, 等. QuEChERS 结合 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 法测定小麦粉中9种真菌毒素[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 315-320.
QI C Y, XU X L, GUO W, et al. Determination of nine mycotoxins in wheat flour by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Food Science, 2022, 43(4): 315-320.
- [24] 李硕, 李莉. 超高效液相色谱—串联质谱法检测咖啡中黄曲霉毒素和杂色曲霉毒素[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(6): 136-141.
LI S, LI L. Analysis of aflatoxins and sterigmatocystin in coffee by ultra-high performance liquid chromatograph [J]. Food Research and Development, 2022, 43(6): 136-141.
- [25] ZHANG S S, LU J W, WANG S M, et al. Multimycotoxins analysis in Pheretima using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based on a modified QuEChERS method [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2016, 1 035: 31-41.
- [26] 才凤, 赵飞, 贾宏新. 超高效液相—串联质谱法测定速冻调理肉制品中18种喹诺酮类药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(24): 8 456-8 461.
CAI F, ZHAO F, JIA H X. Determination of the residues of 18 quinolones in quick-frozen prepared meat products by ultra-high performance liquid phase tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(24): 8 456-8 461.
- [27] ZHANG L, DOU X W, ZHANG C, et al. A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines[J]. Toxins, 2018, 10(2): 1-39.
- [28] 王杰, 裴斐, 李彭, 等. 不同前处理方法对猪组织中喹诺酮类兽药残留检测效果对比[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 309-314.
WANG J, PEI F, LI P, et al. Comparison of different sample pretreatments for the analysis of quinolone residues in porcine tissue[J]. Food Science, 2018, 39(18): 309-314.
- [29] GARCÍA-MORALEJA A, FONT G, MANES J, et al. Simultaneous determination of mycotoxin in commercial coffee[J]. Food Control, 2015, 57: 282-292.
- [30] 王小乔, 邱国玉, 杨志敏, 等. 液质联用高通量检测技术基质效应评价与消除[J]. 现代食品, 2020(12): 44-46.
WANG X Q, QIU G Y, YANG Z M, et al. Evaluation and elimination of matrix effect in high throughput of LC-MS [J]. Modern Food, 2020(12): 44-46.
- [31] 贾玮, 樊子便, 杜安, 等. 基于质谱特征碎裂片段的乳制品中真菌毒素非定向筛查方法研究[J]. 分析测试学报, 2020, 39(6): 705-714.
JIA W, FAN Z B, DU A, et al. Non-directional screening of mycotoxins in dairy products based on mass spectrometry characteristic fragments[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(6): 705-714.
- [32] TSUBOUCHI H, YAMAMOTO K, HISADA K, et al. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus* [J]. Mycopathologia, 1987, 97(2): 111-115.
- [33] FERRAZ M B, FARAH A, IAMANAKA B T, et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting[J]. Food Control, 2010, 21(6): 872-877.
- [34] KHANEGHAH A M, FAKHRI Y, ABDIC L, et al. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression[J]. Fungal Biology, 2019, 123: 611-617.
-
- (上接第90页)
- [9] 中国(深圳)综合开发研究院课题组. 粤港澳大湾区协同创新的目标模式和路径选择[M]. 北京: 社会科学文献出版社, 2020: 97.
Research Group of China (Shenzhen) Institute of Comprehensive Development. Target model and path selection for collaborative innovation in the Guangdong Hong Kong Macao greater bay area [M]. Beijing: Social Science Literature Press, 2020: 97.
- [10] 汪丽华. “互联网+”背景下网络食品安全监管策略[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 95-98.
WANG L H. Research on network food safety supervision strategy under the background of "Internet Plus"[J]. Food & Machinery, 2022, 38(4): 95-98.
- [11] 罗文丽. 攻克“大通关”[J]. 中国物流与采购, 2015(6): 42-44.
LUO W L. Conquering the "great customs clearance"[J]. China Logistics and Procurement, 2015(6): 42-44.
- [12] 陈和华. 市场监管总局多措并举助力粤港澳大湾区高质量发展[N]. 中国市场监管报, 2023-07-15(1).
CHEN H H. The general administration of market regulation takes multiple measures to help the high-quality development of the Guangdong-Hong Kong-Macao greater bay area[N]. China Market Regulation News, 2023-07-15(1).
- [13] 姜顶, 陈和芳. 食用农产品网络直销中食品安全信息共享的法律规制[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 223-225, 230.
JIANG D, CHEN H F. Legal regulations on food safety information sharing in online direct marketing of edible agricultural products[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 223-225, 230.