

## 调查研究

## 2013—2015年广州市市售普洱茶真菌毒素污染调查

余超,罗晓燕,李迎月,梁伯衡,张维蔚,刘于飞,何洁仪

(广州市疾病预防控制中心,广东 广州 510440)

**摘要:**目的 了解广州市市售普洱茶真菌毒素污染状况及评估健康风险。方法 2013—2015年,在广州市批发市场、零售店、超市、餐饮单位、网店和茶博会6类场所采集不同生产工艺、包装形态、生产年份、原料产地、价格的普洱茶样品432份,使用多功能净化柱净化-柱后衍生高效液相色谱法测定黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ ),高效液相色谱-质谱法测定雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮。结果 432份普洱茶样品黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ )、雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮7个项目检测结果均低于所用检测方法的检出限。结论 本次对广州市市售普洱茶的调查,未检出真菌毒素。

**关键词:**广州;普洱茶;真菌毒素;高效液相色谱法;高效液相色谱-质谱法;黄曲霉毒素;食品污染物;调查

**中图分类号:**R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2017)06-0719-04

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2017.06.017

### Analysis on content of mycotoxin in puerh tea in Guangzhou in 2013-2015

YU Chao, LUO Xiao-yan, LI Ying-yue, LIANG Bo-heng, ZHANG Wei-wei, LIU Yu-fei, HE Jie-yi

(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

**Abstract: Objective** To understand the situation of mycotoxin residues in puerh tea from Guangzhou City, and provide reference basis for risk assessment and government supervision. **Methods** A total of 432 puerh tea samples were collected from wholesale markets, retail stores, super markets, catering units, online sellers and tea fair in Guangzhou City from 2013-2015. The concentrations of aflatoxin  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  in the samples were determined by purification column high performance liquid chromatography (HPLC) with post column derivatization method. Nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone were determined by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). **Results** No aflatoxin  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ , nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in puerh tea samples could be detected by HPLC and HPLC-MS method. **Conclusion** There was no mycotoxin detected by HPLC and HPLC-MS national standard method. Puerh tea in the markets of Guangzhou City was not contaminated with mycotoxins.

**Key words:** Guangzhou; puerh tea; mycotoxin; high performance liquid chromatography; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; aflatoxin; food contaminant; survey

真菌毒素(mycotoxin)是指真菌在其污染的食品中产生的有毒代谢产物,主要包括黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)、赭曲霉毒素、展青霉素、单端孢霉烯族化合物、玉米赤霉烯酮(ZEN)、伏马菌素等。产毒真菌在一定的基质、水分、湿度、温度和通风条件下产生真菌毒素,主要产毒真菌包括曲霉菌属、青霉菌属、镰刀菌属等<sup>[1-2]</sup>。AF是目前公认的最强化学致癌物质,国际癌症研究机构(IARC)2012年将AFB<sub>1</sub>列为人类致癌物<sup>[2]</sup>。普洱茶是以地理标志保

护范围内的云南大叶种茶叶为原料,经杀青、揉捻、晒干成晒青毛茶,经发酵而成的具有独特陈香品质的一类茶叶<sup>[3]</sup>。

广州市是普洱茶主要消费地区,也是普洱茶最大的集散中心和贸易场所,普洱茶是否存在真菌毒素污染是当前社会关注的热点问题。为了解广州市市售普洱茶真菌毒素污染状况,评估普洱茶饮用安全风险,广州市疾病预防控制中心于2013—2015年对市售普洱茶真菌毒素污染情况开展了专项监测。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

2013—2015年广州市疾病预防控制中心食品专业采样人员,按照分层便利抽样原则,以普

收稿日期:2017-11-08

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20161A010055)

作者简介:余超 男 主管医师 研究方向为食品安全风险监测

E-mail:375839262@qq.com

通信作者:何洁仪 女 主任医师 研究方向为食品安全风险监测与评估 E-mail:1368434818@qq.com

通消费者身份采集具有代表性、典型性的样品,样品数量应能满足检验项目的需求,在广州市不同辖区批发市场、零售店、超市、餐饮单位、网店、茶博会6类场所购买普洱茶样品进行检测分析,包括不同生产工艺(生茶、熟茶)、不同包装形态(饼茶、散茶、砖茶、沱茶、圆柱茶、袋泡茶)、不同生产年份、不同原料产地、不同价格的普洱茶样品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>

茶叶样品(干样)经高速粉碎机粉碎,混匀过筛备用,准确称取样品5.0 g于50 ml离心管中,加入20 ml乙腈-水,用均质器均质后离心得上清液,取上清液用多功能柱净化,净化液用氮气缓慢吹干,加入三氟乙酸后涡旋,恒温箱中衍生,乙腈-水定容,0.22 μm滤膜过滤后收集滤液,在特定的高效液相色谱条件下测定标准溶液,获取标准曲线,用进样器吸取前述滤液注入高效液相色谱仪,测定 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的浓度,检出限为 0.25 μg/kg<sup>[4]</sup>。

### 1.2.2 雪腐镰刀菌烯醇(NIV)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、ZEN

茶叶样品(干样)经高速粉碎机粉碎,混匀过筛备用,准确称取样品粉末2 g,置于50 ml离心管中,加入内标及乙腈-水溶液,浸泡后离心,收集上清液,上清液经固相萃取柱净化,浓缩定容后在指定的液相色谱-质谱参考条件下进样分析,同位素稀释法定量,检出限为2.5 μg/kg<sup>[4]</sup>。

### 1.2.3 质量控制

检验步骤严格按照相应的国家标准要求进行,样品测定时附带测定国家一级标准物质,测定结果控制在允许值范围内,要求实验室人员达到检测成分的加标回收率在80%~120%之间后再开始检验。每一个检测样品均需进行平行测定,平行测定结果应满足分析方法的误差要求,报告检测结果平均值。

## 1.3 统计学分析

用 Microsoft Excel 2003 录入数据,进行样品信息特征和检测结果数据的分析描述。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品信息特征

在广州市8个辖区及网店采集不同生产工艺、包装形态、销售场所、生产年份、原料产地、价格的普洱茶样品432份,样品的分布充分考虑了广州市普洱茶消费市场的实际情况。

### 2.1.1 生产工艺特征

普洱茶按生产工艺不同分为生茶和熟茶,生茶是以云南大叶种晒青毛茶为原料,经高温蒸压定型,置于干燥之地自然阴干而成,而熟茶则以云南大叶种晒青毛茶为原料,放置在温度和湿度适当的环境下,经过45 d渥堆发酵,然后经干燥、精制整理,再经高温蒸压定型而成。本次采集的432份普洱茶样品中熟茶占73.61%(318/432),生茶占26.39%(114/432)。

### 2.1.2 包装形态特征

普洱茶按包装形态不同分为饼茶、散茶、砖茶、沱茶、圆柱茶、袋泡茶等,其中以饼茶和散茶最常见,本次采集的432份普洱茶样品中饼茶占48.38%(209/432),散茶占38.66%(167/432),见表1。

表1 不同包装形态普洱茶样品分布

Table 1 Distribution of puerh tea samples in different packaging form

包装形态	生茶/份(%)	熟茶/份(%)	合计(%)
饼茶	89(20.60)	120(27.78)	209(48.38)
散茶	15(3.47)	152(35.19)	167(38.66)
砖茶	4(0.93)	28(6.48)	32(7.41)
沱茶	5(1.16)	13(3.01)	18(4.17)
圆柱茶	1(0.23)	0(0.00)	1(0.23)
袋泡茶	0(0.00)	5(1.16)	5(1.16)
合计	114(26.39)	318(73.61)	432(100.00)

注:括号中的数值是占总样品数的比例,下同

### 2.1.3 销售场所特征

样品采集的销售场所包括批发市场、零售店、超市、餐饮单位、网店和茶博会,由于广州市是普洱茶最大的集散中心和贸易场所,本次样品采集以批发市场为主,占36.11%(156/432),其次为零售店,占20.37%(88/432),兼顾超市和餐饮单位,详见表2。

表2 不同销售场所普洱茶样品分布

Table 2 Distribution of puerh tea samples in different merchandising location

销售场所	生茶/份(%)	熟茶/份(%)	合计(%)
批发市场	57(13.19)	99(22.92)	156(36.11)
零售店	24(5.56)	64(14.81)	88(20.37)
超市	8(1.85)	53(12.27)	61(14.12)
餐饮单位	1(0.23)	60(13.89)	61(14.12)
网店	22(5.09)	35(8.10)	57(13.19)
茶博会	2(0.46)	7(1.62)	9(2.08)
合计	114(26.39)	318(73.61)	432(100.00)

### 2.1.4 样品年份特征

将不同年份分为4个区间,生产年份≤1、>1~5、>5~10、>10年,本次采集的432份普洱茶样品中生产年份明确的有287份,其中以>1~5年的样品数最多,占27.31%(118/432),其次为>5~

10 和  $\leq 1$  年样品,详见表 3。

表 3 不同年份普洱茶样品分布

Table 3 Distribution of puerh tea samples in different productive life

样品年份	生茶/份(%)	熟茶/份(%)	合计(%)
$\leq 1$ 年	29(6.71)	47(10.88)	76(17.59)
>1~5 年	49(11.34)	69(15.97)	118(27.31)
>5~10 年	21(4.86)	61(14.12)	82(18.98)
>10 年	0(0.00)	11(2.55)	11(2.55)
不详	15(3.47)	130(30.09)	145(33.56)
合计	114(26.39)	318(73.61)	432(100.00)

### 2.1.5 原料产地特征

普洱茶是地理标志产品,保护区域为云南省普洱市、西双版纳州、临沧市、昆明市、大理州、保山市、德宏州、楚雄州、红河州、玉溪市、文山州等 11 个州(市)。本次采集的样品原料产地以西双版纳州为主,占 37.04%,其次为临沧市、普洱市、昆明市,详见表 4。

表 4 不同原料产地普洱茶样品分布

Table 4 Distribution of puerh tea samples in different places of origin

样品原料产地	生茶/份(%)	熟茶/份(%)	合计(%)
云南省西双版纳州	45(10.42)	115(26.62)	160(37.04)
云南省临沧市	14(3.24)	19(4.40)	33(7.64)
云南省普洱市	8(1.85)	17(3.94)	25(5.79)
云南省昆明市	6(1.39)	18(4.17)	24(5.56)
其他及产地不详	41(9.49)	149(34.49)	190(43.98)
合计	114(26.39)	318(73.61)	432(100.00)

### 2.1.6 样品价格特征

将不同价格划分为  $\leq 50$ 、 $> 50 \sim 100$ 、 $> 100 \sim 150$ 、 $> 150 \sim 200$ 、 $> 200 \sim 300$ 、 $> 300 \sim 400$ 、 $> 400 \sim 500$ 、 $> 500 \sim 600$ 、 $> 600 \sim 700$ 、 $> 700 \sim 2000$  元/kg 10 个区间,本次采集的 432 份普洱茶样品以中低价位为主,300 元/kg 以下占比 79.86% (345/432),详见表 5。

表 5 不同价格普洱茶样品分布

Table 5 Distribution of puerh tea samples in different price levels

价格/(元/kg)	生茶/份(%)	熟茶/份(%)	合计(%)
$\leq 50$	4(0.93)	58(13.43)	62(14.35)
>50~100	9(2.08)	53(12.27)	62(14.35)
>100~150	15(3.47)	50(11.57)	65(15.05)
>150~200	30(6.94)	48(11.11)	78(18.06)
>200~300	28(6.48)	50(11.57)	78(18.06)
>300~400	18(4.17)	31(7.18)	49(11.34)
>400~500	5(1.16)	11(2.55)	16(3.70)
>500~600	2(0.46)	3(0.69)	5(1.16)
>600~700	1(0.23)	3(0.69)	4(0.93)
>700~2000	2(0.46)	11(2.55)	13(3.01)
合计	114(26.39)	318(73.61)	432(100.00)

## 2.2 真菌毒素监测结果

AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 检测结果均低于检出限 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; NIV、DON 和 ZEN 检测结果均低于检出限 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 3 讨论

普洱茶是以云南大叶种芽叶为原料,经杀青、揉捻、解块、晒干成晒青毛茶,经精制、蒸压成型、干燥等工序而成普洱生茶,经后发酵、干燥、精制而成普洱熟茶,普洱熟茶加工时有一个微生物作用的后发酵过程<sup>[3,5]</sup>。陈建玲等<sup>[6]</sup>对广州市某茶叶市场 70 份湿仓储存普洱茶中真菌毒素污染情况进行调查,发现 AFB<sub>1</sub> 检测值  $> 5 \mu\text{g}/\text{kg}$  有 8 份,占 11.43%,DON 检测值  $> 1 \text{mg}/\text{kg}$  的 63 份,占 90%。柳其芳等<sup>[7]</sup>随机抽取深圳市场 60 份湿仓发酵茶真菌毒素污染情况,也发现此类样品存在不同程度的 AF 和 DON 污染,ZEN 在样品中也可检出。吴静<sup>[8]</sup>对南昌市某市场湿仓储藏普洱茶样品真菌毒素污染情况进行调查,DON 超过 1  $\text{mg}/\text{kg}$  占 68.33%。上述三地监测的样品表明湿仓储存普洱茶存在真菌毒素残留,有些甚至是专门采集发霉或者有霉味的样品,与市面上销售给居民饮用的普洱茶存在一定的差异。陈若恒等<sup>[9]</sup>对荔湾区茶叶批发市场 140 份普洱茶 AFB<sub>1</sub> 污染状况进行检测,阳性率为 5.71%,检出值范围 2.03~4.29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,该监测所用的检测方法是免疫亲和柱净化-酶联免疫吸附(ELISA)法,检出的阳性样品未用高效液相色谱法进行确认,酶联免疫吸附法被业界普遍认为假阳性结果偏多,所以报道的检出率会比真实情况高<sup>[10]</sup>。

广州市市售 432 份普洱茶样品真菌毒素监测结果显示,AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>、NIV、DON、ZEN 7 个项目检测值均低于检出限,未发现广州市市售普洱茶存在真菌毒素污染,人群经普洱茶摄入真菌毒素的风险较低。本次监测过程设计科学合理,样品的采集以普通消费者可以买到的零售渠道方式(不含仓储环节的样品),贴近生活实际,样品的分布充分考虑了不同发酵工艺、包装形态、销售场所、生产年份、原料产地、价格等影响因素,能较好地代表广州市居民消费的普洱茶总体,使用的检验方法为国家标准规定的高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱法,检测过程进行了严格的质量控制,所得检测结果准确可靠。本次监测结果也与国内外部分文献报道的结果一致。李亚莉等<sup>[11]</sup>对 16 份(12 份熟茶、4 份生茶)云南省售普洱茶样品检测 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>,均未检出污染残留。HAAS 等<sup>[12]</sup>检测了 36 份普洱茶样品,未检测到

AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 污染残留。陈秋娥<sup>[13]</sup>检测了44份中国台湾市售普洱茶,均未检出真菌毒素残留。

黄曲霉是自然界较常见的霉菌之一,主要污染花生、玉米、菜籽、大豆等食品。食品中真菌毒素限量标准中规定了谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及其籽类、油脂及其制品、调味品、特殊膳食用食品中 AFB<sub>1</sub> 的限量标准,但并没有包含茶叶<sup>[14]</sup>。普洱茶中可能携带黄曲霉,但并不容易产生毒素,黄曲霉产生毒素需要同时满足温度、湿度、营养成分等条件,还需要携带能产生毒素的基因<sup>[15]</sup>。黄曲霉产毒的适宜温度为 25~33℃,而普洱茶的渥堆发酵温度较高(中心温度达到 40~60℃)<sup>[2,15]</sup>。当食品中水分降至 13% 以下时,即使污染黄曲霉也不会产生毒素,而普洱茶中水分含量低于 13%<sup>[2-3]</sup>。普洱茶本身的组成成分对黄曲霉产毒具有一定的抑制作用,对茶叶中抑制 AF 产生的组分及相关特性的研究结果<sup>[16-17]</sup>显示,普洱茶的茶样水提物对黄曲霉产毒有不同程度的抑制作用,其中熟普洱茶对黄曲霉产毒的抑制作用较强,茶叶水提物浓度在 100 μg/ml 时能完全抑制产毒。对茶叶发酵过程中多酚变化及其对黄曲霉产毒的抑制效应的研究<sup>[18]</sup>表明,在高浓度下,茶叶水提物能够抑制 AFB<sub>1</sub> 的产生并下调 AF 产毒基因的表达,此外,茶多酚单体、槲皮素和没食子酸均具有较高的抑制黄曲霉产毒活性。研究人员将黄曲霉接种于云南普洱晒青毛茶,模拟“渥堆”发酵过程,最后在正常试验组中也未检出真菌毒素残留<sup>[14]</sup>。上述研究结果提示普洱茶在良好的生产和储存环境下产生 AF 的可能性较低。

## 参考文献

- [1] 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):627-631.
- [2] 孙长颖. 营养与食品卫生学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2012.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 地理标志产品 普洱茶:GB/T 22111—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [4] 王竹天,杨大进. 食品中化学污染物及有害因素监测技术手册[M]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [5] 中华人民共和国农业部. 普洱茶:NY/T 779—2004[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [6] 陈建玲,李文学,杨光宇,等. 广州某茶叶市场普洱茶中多种生物毒素污染现状调查[J]. 癌变 畸变 突变,2011,23(1):68-71.
- [7] 柳其芳. ELISA 法测定发酵茶和植物香料真菌毒素的污染[J]. 中国热带医学,2011,11(11):1381-1382,1409.
- [8] 吴静. 渥堆中普洱茶品质形成及陈化中真菌毒素状况的研究[D]. 南昌:南昌大学,2013.
- [9] 陈若恒,谭志焘,张秋丽. 荔湾区茶叶批发市场普洱茶中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 污染调查[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(14):2088-2089,2093.
- [10] 吴国华,赵榕,里南,等. 茶叶中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(3):808-812.
- [11] 李亚莉,康冠宏,杨丽源,等. LC-MS/MS 法检测普洱茶中黄曲霉毒素及安全性评价研究[C]//第十六届中国科协年会-分12 茶学青年科学论坛论文集,昆明,2014. 昆明:中国科学技术协会,云南省人民政府,2014:328-333.
- [12] 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.
- [13] 陈秋娥. 普洱茶中霉菌毒素之污染研究[D]. 台湾:国立台湾大学食品科技研究所,1991.
- [14] 中华人民共和国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 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [15] 钟凯. 普洱茶中携带黄曲霉会不会产生毒素?[N]. 中国医药报,2017-06-01(8).
- [16] 李浩,谭英智,陈柱涛,等. 云南大叶种晒青毛茶提取物对产毒黄曲霉生长及产毒的影响[J]. 现代食品科技,2015,31(11):101-106.
- [17] 吴清华. 茶叶中抑制黄曲霉毒素产生的组分及相关特征性研究[D]. 陕西:西北农林科技大学,2013.
- [18] 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]. 陕西:西北农林科技大学,2014.