

低温放电等离子体对葡萄干中赭曲霉毒素A的降解效果及降解机理

张绍君, 张文乐, 孙守峰, 段宇萌, 王 英*
(新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 采用低温放电等离子体对葡萄干中赭曲霉毒素A (ochratoxin A, OTA) 进行降解, 研究不同时间下初始质量浓度、放电电压对葡萄干中OTA降解率的影响。结果表明, 葡萄干中初始质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 的OTA经等离子体在放电电压75 kV时处理10 min被完全降解。利用高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱检测并鉴定经低温放电等离子体处理的OTA降解产物, 结合一级和二级质谱, 推测出相对分子质量分别为 m/z 426.071 5 (B) 和 m/z 158.154 0 (C) 的2种主要降解产物结构及OTA可能的降解路径。等离子体处理前后葡萄干的理化品质没有发生显著变化, 挥发性物质除酸类物质中3-甲基丁酸、乙酸、辛酸含量有明显的下降, 甲酸、戊酸、2-乙基己酸含量有明显上升外, 大部分的酸、醛、醇和酮类物质的相对含量未出现明显变化。研究结果表明低温放电等离子体可以有效地降解OTA, 并对葡萄干品质没有显著影响, 可为OTA污染的食品降解研究提供参考。

关键词: 低温放电等离子体; 赭曲霉毒素A; 降解效果; 产物解析

Degradation Effect and Mechanism of Ochratoxin A in Raisins by Low-Temperature Discharge Plasma

ZHANG Shaojun, ZHANG Wenle, SUN Shoufeng, DUAN Yumeng, WANG Ying*
(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China)

Abstract: In this study, the effect of ochratoxin A (OTA) concentration and discharge voltage on the degradation of OTA in artificially contaminated raisins by low-temperature discharge plasma was explored. The results indicated that OTA in raisins contaminated with 50 $\mu\text{g/mL}$ OTA was completely degraded by plasma treatment for 10 minutes at a discharge voltage of 75 kV. The degraded products of OTA were detected by high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry. Based on the primary and secondary mass spectra, two major degraded products with m/z 426.071 5 (B) and m/z 158.154 0 (C) and the possible degradation pathway of OTA were speculated. There was no significant change in the physicochemical quality of raisins before and after plasma treatment, and the relative contents of most acids, aldehydes, alcohols and ketones did not significantly change, except for a significant decrease in the contents of 3-methylbutyric acid, acetic acid and caprylic acid among acids, and a significant increase in the contents of formic acid, valeric acid, and 2-ethylhexanoic acid. The research results suggest that low temperature discharge plasma can effectively degrade OTA while having no significant effect on raisin quality, which can provide a reference for OTA degradation in contaminated foods.

Keywords: low-temperature discharge plasma; ochratoxin A; degradation efficiency; product analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230822-165

中图分类号: TS255.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 05-0166-08

引文格式:

张绍君, 张文乐, 孙守峰, 等. 低温放电等离子体对葡萄干中赭曲霉毒素A的降解效果及降解机理[J]. 食品科学, 2024, 45(5): 166-173. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230822-165. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Shaojun, ZHANG Wenle, SUN Shoufeng, et al. Degradation effect and mechanism of ochratoxin A in raisins by low-temperature discharge plasma[J]. Food Science, 2024, 45(5): 166-173. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230822-165. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-08-22

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32060574)

第一作者简介: 张绍君 (1998—) (ORCID: 0000-0001-8572-2624), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。

E-mail: junxi_number@163.com

*通信作者简介: 王英 (1984—) (ORCID: 0000-0001-7679-7800), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。

E-mail: wangying0926@xjau.edu.cn

赭曲霉毒素是由曲霉菌属和青霉菌属产生的一类次生代谢产物,由A、B、C、D等7种化合物组成,主要对人和动物肾脏有严重危害,其中赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)是毒性最大、也是对农作物的污染最严重的一种^[1]。OTA因其对肝、肾的毒性和致畸、致癌性,于1993年被国际癌症研究机构划分为2B类致癌物^[2]。在多种真菌毒素中,OTA在农产品、食品和动物饲料中都有广泛的分布,例如谷类、谷类制品、葡萄酒、饮料、干果和咖啡中都有被检测到^[3],它的毒性和对农产品污染的严重性仅次于黄曲霉毒素,因而引起了很多国家和有关组织的关注^[4]。在2019年9月,欧盟食品饲料类快速预警系统发布通报,原产于我国的葡萄干中OTA的检测结果为21.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$,严重超过欧盟规定在葡萄干中OTA的限量规定(10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[5],严重影响了我国的葡萄干进出口贸易。

传统的控制真菌毒素的方法可分为物理法、化学法和生物降解法,主要包括紫外降解^[6]、电子束辐照^[7]、热处理^[8]、物理吸附^[9]、氧化降解^[10]、微生物降解法^[11]等,但这些方法存在效果不稳定、化学物质残留、降解成本高、营养成分损失较大、难以规模化生产等缺点。等离子体是一种含有多种离子、电子、激发态的原子等活性物质的电离气体,其活性物质常常被认为是导致微生物的DNA、蛋白质、脂质以及脂质膜损伤的主要原因,从而能够有效地灭活果汁、牛奶、肉类、水果、蔬菜等食品表面上的产孢和腐败/致病菌,并且能使真菌毒素的分子键断裂,形成低毒或无毒的小分子物质,从而降解真菌毒素^[12-13]。Wang Shiqing等^[14]在300 W条件下进行10 min的低温射频等离子体处理,黄曲霉毒素B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)的降解率达到88.3%。烘焙咖啡中OTA经冷等离子体在输入功率为30 W、输出电压为850 V、氦气流量为1.5 L/min的条件下处理30 min,咖啡中OTA的含量明显降低了50%^[15]。榛子中的AFB₁经以N₂和O₂的混合物为载体气体的介质阻挡放电等离子体在1 000 W处理12 min后,降解率达到了70%^[16]。Iqdiam等^[17]使用大气冷等离子体处理10 min后,小麦籽粒中T-2毒素和HT-2毒素显著下降,分别降低了79.80%和70.40%。常压冷等离子体能够有效降解大麦粒中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),且对大麦粒的蛋白质和 β -葡聚糖无显著影响^[18]。综上所述,等离子体在降解真菌毒素和提高工艺效率方面具有较高应用潜力。

然而,目前利用等离子体技术降解真菌毒素的机理还不完全,对其降解产物的种类、结构和毒性等问题还缺乏深入的认识。高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry, HPLC-Q-Orbitrap-HRMS)具有分辨率高、

定性定量能力强、检测快速高效等特点,被广泛应用于天然产物或降解产物中已知化合物和未知化合物的鉴定。高分辨质谱可以利用目标化合物母离子的精确质量数对其进行直接定量,可以提供精确分子质量和预测分子式,为鉴定未知化合物和代谢产物提供更多的信息^[19]。

本研究采用低温放电等离子体对葡萄干中OTA进行降解,并对不同初始质量浓度和放电电压下葡萄干中OTA的降解效果进行评价。然后,在此基础上采用HPLC-Q-Orbitrap-HRMS鉴定经等离子体处理的OTA降解产物,参考相关文献^[20-23]推测其降解途径,并对处理前后葡萄干品质进行测定,以期能为低温放电等离子体降解食品中OTA的实际研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

无核白葡萄干(不含OTA),采购于新疆乌鲁木齐市北园春干果市场,果实大小均一、无机械损伤。

OTA标准品(纯度 $\geq 99.8\%$) 美国Sigma-Aldrich公司;乙腈(色谱级) 天津市致远化学试剂有限公司;葡萄糖、氢氧化钠、硫酸铜、碳酸氢钠、亚甲基蓝、酒石酸钾钠、草酸、酚酞、盐酸、乙酸锌、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(以上均为分析纯) 天津市光复科技发展有限公司;2,6-二氯靛酚钠盐、邻苯二甲酸氢钾、抗坏血酸、吐温-20 上海源叶生物科技有限公司;免疫亲和柱 深圳逗点生物技术有限公司。

20 mmol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配制:0.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 5.73$ g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 9$ g NaCl ,蒸馏水溶解并定容至1 000 mL,调pH值至7.4。

1.2 仪器与设备

DBD-50低温等离子体空气常压实验反应器 南京苏曼等离子体科技有限公司;LC-20A高效液相色谱仪 日本岛津(中国)有限公司;7890B-5977系列气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪 美国安捷伦科技有限公司;Q-Exactive plus型四极杆-轨道阱-高分辨质谱系统 德国赛默飞世尔科技公司;3nh SC-10手持色差仪 广东三恩时智能科技有限公司;FK-16A快速水分测定仪 厦门弗布斯检测设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 OTA标准溶液的配制

OTA标准品10 mg溶于色谱乙腈溶液中,定容至100 mL,配制成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的OTA标准原液,置于 -20°C 冰箱中冷藏备用。用乙腈对标准原液进行稀释,得到10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的OTA标准工作液,置于 4°C 冰箱。

1.3.2 染毒葡萄干的制备

称取60 g无核白葡萄干3份(未测出OTA)置于培养皿,分别采用10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的OTA标准工作液对葡萄干进行浸泡染毒,保证OTA在葡萄干中均匀分布,于通风橱风干备用。

1.3.3 低温放电等离子体处理

以低温放电等离子体处理葡萄干中OTA的降解效果为考察指标,固定其他因素,基于图1的等离子体设备分别探讨不同初始质量浓度和放电电压对OTA降解效果的影响。将不同浓度的染毒葡萄干置于等离子体处理室,使用空气作为载气,放电电压为75 kV、放电间距为0.9 cm的螺旋电极(高压电极)与接地电极之间产生丝状放电,从而产生大量臭氧、过氧化氢、羟自由基以及激发态粒子等活性物质降解OTA,每个处理重复进行3次。

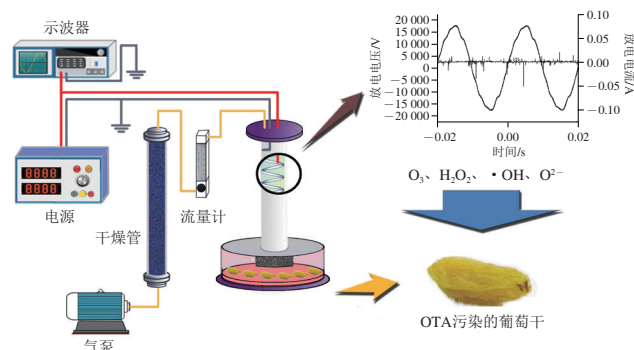


图1 低温放电等离子体装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of low-temperature discharge plasma generation device

1.3.4 不同低温放电等离子体条件下葡萄干中OTA的降解实验

1.3.4.1 不同初始质量浓度对葡萄干中OTA的降解实验

固定放电间距0.9 cm,放电电压25 kV,探究不同初始质量浓度(10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对葡萄干中OTA的降解效果。

1.3.4.2 不同放电电压对葡萄干中OTA的降解实验

固定葡萄干中OTA初始质量浓度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,放电间距0.9 cm,探究放电电压(25、50、75 kV)对葡萄干中OTA的降解效果。

1.3.5 HPLC法测定OTA的降解率

1.3.5.1 试样的制备

准确称取5 g粉碎的葡萄干及1 g氯化钠,加入80%甲醇溶液25 mL,用高速振荡器振荡混匀(10 min),离心5 min(4 000 r/min)。取离心后的上层清液5 mL于烧杯中,再加入20 mmol/L PBS(20 mL)充分混匀,用玻璃纤维滤纸过滤,收集滤液备用。

1.3.5.2 试样的净化

免疫亲和柱的上端连接10 mL注射器,取10 mL处理好的滤液以1~2滴/s的流速通过柱子,弃掉流出的液

体。然后加入10 mL 0.1%吐温-20 PBS淋洗,再次弃掉流出的液体,用注射器将免疫亲和柱中的水分吹干,加入2 mL甲醇进行洗脱,流速约为2~3滴/s,收集全部洗脱液于棕色样品瓶中,用于HPLC检测。

1.3.5.3 OTA HPLC标准曲线绘制

分别配制质量浓度为0、5、10、50、100、200 ng/mL的OTA标准工作溶液200 μL ,采用HPLC分析,得到标准曲线回归方程: $y=772.519x-248.959$ ($R^2=0.9998$,其中 x 表示OTA溶液的质量浓度, y 表示OTA的峰面积),数据显示线性拟合良好。

1.3.5.4 OTA HPLC条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长250 mm,内径4.6 mm,粒径5 μm ;柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;流动相A: 乙酸-水(1:45, V/V),流动相B: 乙腈;总流速: 1.0 mL/min(45% A + 55% B);等度洗脱15 min;进样量: 20 μL ;激发波长: 333 nm;发射波长: 460 nm。

1.3.5.5 OTA降解率的计算

参照GB/T 5009.96—2016《食品中赭曲霉毒素A的测定》,分别按式(1)、(2)计算样品中OTA含量和降解率:

$$C = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \quad (1)$$

式中: C 为葡萄干中的OTA含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$); ρ 为外标法测得的试样中OTA质量浓度/(ng/mL); V 为甲醇洗脱液的体积/mL; m 为试样质量/g; f 为稀释倍数。

$$X/\% = \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: X 为低温放电等离子体处理OTA的降解率/%; C 为等离子体处理后葡萄干中OTA的含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$); C_0 为等离子体处理前葡萄干中OTA的含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)。

1.3.6 OTA降解产物分析条件

HPLC条件: Agilent XDB- C_{18} 色谱柱(1.8 μm , 4.6 mm \times 50 mm);柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$;流速: 0.3 mL/min;进样量: 5 μL ;激发波长: 365 nm;发射波长: 436 nm;流动相: 0.1%甲酸-水溶液(A)和乙腈(B),梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Mobile phase gradient elution conditions

时间/min	流动相体积分数/%	
	A 0.1%甲酸-水溶液	B 乙腈
0	90	10
5	10	90
10	10	90

MS条件: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),电离电压: -2.8 kV(正离子: 3.2 kV);鞘气压力: 40 arb;辅助气压力: 10 arb;气帘气压力: 35 psi;离子源温度: 350 $^{\circ}\text{C}$;毛细管温度: 300 $^{\circ}\text{C}$;聚焦电压: -350 V,去簇电压: -10 V;整个过

程采用氮气；样品分析采用数据依赖性采集模式：Q-Orbitrap采集范围 m/z 100~1 500，碎片离子扫描范围 m/z 50~1 500；碰撞气：20%、40%、60%；MS分辨率：70 000 FWHM (m/z 200)；MS²分辨率：17 600 FWHM (m/z 200)。

1.3.7 品质指标测定

对等离子体处理前后染毒葡萄干的可滴定酸 (titratable acid, TA)^[24]、还原糖^[25]、总糖^[25]、抗坏血酸^[25]、褐变度^[26]、水分含量^[27]、色差^[28]等品质指标进行测定，每个指标分别重复测定3次。

1.3.8 色差的测定及计算方法

色差仪用白色校准板进行校正，测量等离子体处理前后葡萄干的 L^* 、 a^* 、 b^* 值，读数一式3份。计算公式如下：

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (3)$$

式中： ΔL^* 、 Δa^* 和 Δb^* 分别为通过等离子体处理后葡萄干的亮度差、红绿度差和黄蓝度差； ΔE 表示色差，表征颜色变化的幅度。

1.3.9 挥发性化合物的测定

1.3.9.1 挥发性化合物的富集

挥发性化合物的富集采用顶空固相微萃取的方式进行富集。取无核白葡萄干（(25±1) g）用25 mL水浸泡过夜后匀浆，称取样品10 g，取2 g氯化钠加入20 mL顶空瓶内，平衡30 min后，40℃萃取40 min。利用GC-MS联用仪分析葡萄干挥发性化合物的组成成分，由GC-MS中NIST 14质谱数据库匹配度和保留时间对香气物质进行检索，确定特征挥发性化合物的成分^[29]。

1.3.9.2 GC-MS条件

电子电离源的电子能量为70 eV，进样口温度260℃，离子源温度230℃，四极杆温度150℃。辅助加热250℃，扫描范围35~550 u，不分流进样，载气He，流量1 mL/min，升温程序：40℃保持5 min，3℃/min升至120℃保持5 min，10℃/min升至250℃，保持10 min。

1.4 数据分析

所有实验均重复进行3次。使用Origin作图和SPSS 26对数据进行统计分析，OTA的Q-Exactive plus条件数据采集及分析采用Xcalibur 4.2软件处理。

2 结果与分析

2.1 低温放电等离子体不同处理条件对葡萄干中OTA降解效果的影响

2.1.1 初始质量浓度对葡萄干中OTA降解效果的影响

图2是葡萄干中不同OTA初始质量浓度（10、30、50 μg/mL）的降解效果。等离子体处理5 min，初始质量浓度为10、30、50 μg/mL葡萄干中OTA的降解率分别

为96.26%、96.52%、90.79%，均达到了90%以上；各浓度处理组随着时间的延长都得到较为明显的降解效果，5~10 min时OTA的降解率增加缓慢，趋于100%。分析原因可能是随着处理时间的延长，葡萄干中OTA与等离子体产生的活性物质反应有限。Chen Xinlu等^[30]的研究发现，随着处理时间延长，小麦中的成分会与DON竞争活性物质，进而影响DON的降解率。

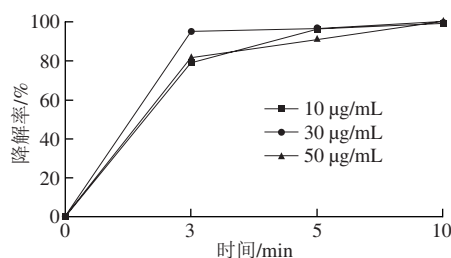


图2 初始质量浓度对OTA降解效果的影响
Fig. 2 Effect of initial OTA concentration on OTA degradation

2.1.2 不同放电电压对葡萄干中OTA降解效果的影响

如图3所示，随着放电电压的增加，葡萄干中OTA的降解率也增加。等离子体处理3 min后，OTA呈现比较明显的降解效果，降解率分别为81.52%（25 kV）、90.77%（50 kV）、93.88%（75 kV）；随着处理时间的延长，放电电压为75 kV时对OTA的降解效果优于50 kV时对OTA的降解效果，25 kV时降解效果最差；处理10 min后，放电电压对OTA的降解没有显著变化，75 kV时处理的OTA被完全降解。分析原因可能是高电压放电是获得等离子体最普遍的途径，放电电压增大，产生较大的折合场强，从而导致活性粒子运动速度加快，能量密度变强，使得OTA降解率增加^[31]。Shi Hu等^[32]在利用低温等离子体降解黄曲霉毒素的研究中，也证实了随着电压的升高，黄曲霉毒素的降解效果也随之增强的规律。

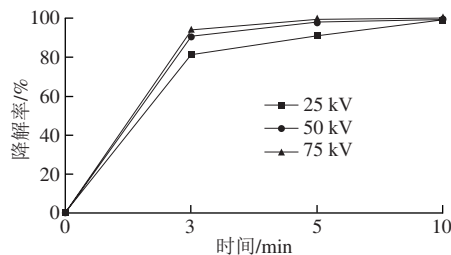


图3 放电电压对OTA降解效果的影响
Fig. 3 Effect of discharge voltage on OTA degradation

2.2 OTA的降解产物分析

2.2.1 OTA降解产物的形成

为避免葡萄干中杂质的影响，采用OTA标准品测定其降解产物。将OTA标准品经等离子体处理后，采用HPLC-Q-Orbitrap-HRMS鉴定经等离子体处理的OTA降解产物。

由图4可知，OTA经过低温放电等离子体处理后，除了A (OTA)物质外，还出现了两个新的峰，分别标示为

物质B、C。在0 min时，图中只有A物质；A物质随着处理时间的延长逐渐减少，处理10 min后A物质完全消失；B物质在处理3 min后开始出现，其峰高呈现先增加后减少的趋势，在处理10 min后也完全消失；而C物质一直呈稳定增加趋势，但在B物质之后才出现，由此推测B物质可能是OTA降解过程中的一个中间产物。

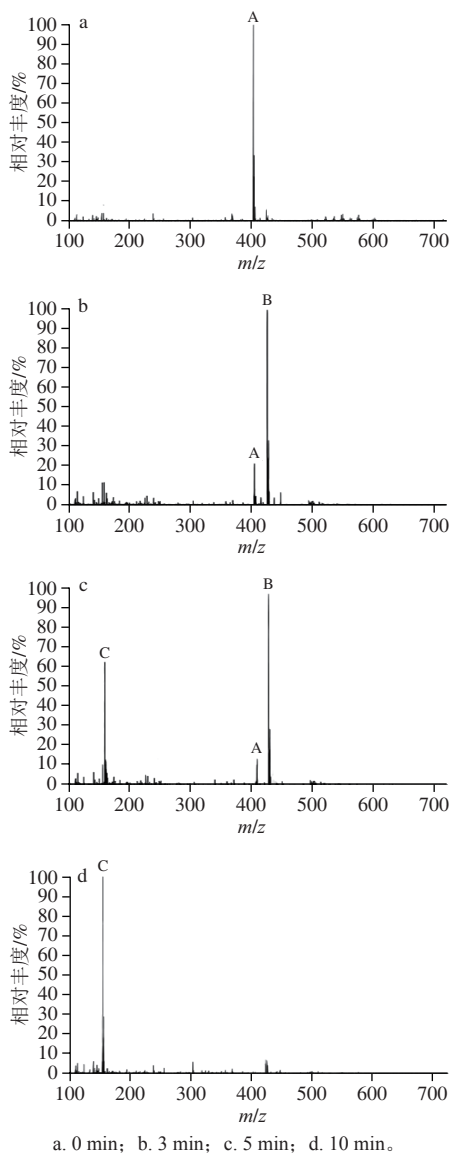


图4 OTA的降解产物一级质谱图

2.2.2 OTA降解产物的鉴定

利用Q-Orbitrap质谱和ESI对等离子体处理后OTA的两种降解产物的结构在负离子模式下进行分析，选取A (m/z 404.0895)、B (m/z 426.0715)、C (m/z 158.1540)作为母核进行二级质谱分析。

图5为OTA的结构式，目前相对于AFB₁的研究，OTA的研究还处于初步状态。目前的研究发现其具有肝毒性、肾毒性、致畸、致癌、免疫毒性、胚胎毒性^[33-36]，但

对OTA结构中的主要毒性活性位点目前未查阅到相关文献有明确表明。但有研究表明，OTA碳原子C-14和氮原子之间裂解时，会生成基本无毒的OT α 和OT α 酰胺^[20]。当毒素分子结构被破坏，缺少苯丙氨酸部分时，其降解产物的细胞毒性较OTA均有大幅降低^[37]。

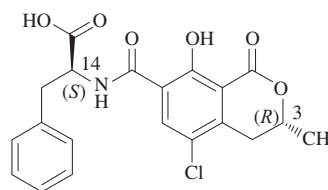


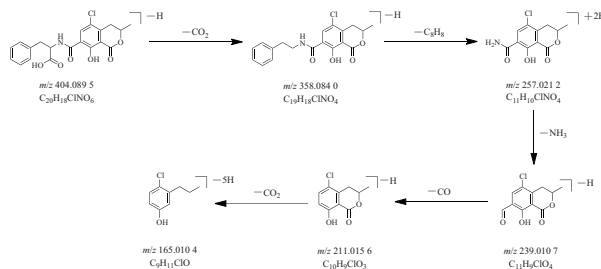
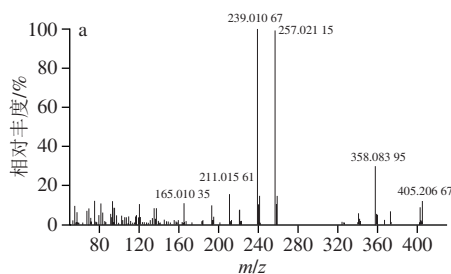
图5 OTA结构式^[20]

Fig. 5 Structural formula of OTA^[20]

OTA与降解产物的二级质谱碎片信息见表2。根据A (m/z 404.0895)、B (m/z 426.0715)与C (m/z 158.1540)的二级质谱信息，可推断出物质A、B、C可能的裂解途径。图6a~c分别为OTA (A)及其两种降解产物的二级质谱图(上方)及每种物质对应结构的碎片信息。

表2 OTA与降解产物的二级质谱碎片信息
Table 2 Information about MS/MS fragments of OTA and its degradation products

化合物	分子式	母离子	二级碎片
A	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	404.0895	358.0840 (C ₁₉ H ₁₈ ClNO ₄)
			257.0212 (C ₁₁ H ₁₀ ClNO ₄)
			239.0107 (C ₁₁ H ₉ ClO ₄)
			211.0156 (C ₁₀ H ₉ ClO ₃)
B	C ₂₀ H ₂₄ ClNO ₇	426.0715	260.9925 (C ₁₁ H ₁₅ ClO ₅)
			133.9748 (C ₉ H ₁₀ O)
C	C ₉ H ₁₁ NO ₂	158.1540	102.0918 (C ₈ H ₁₀)
			92.9487 (C ₇ H ₈)



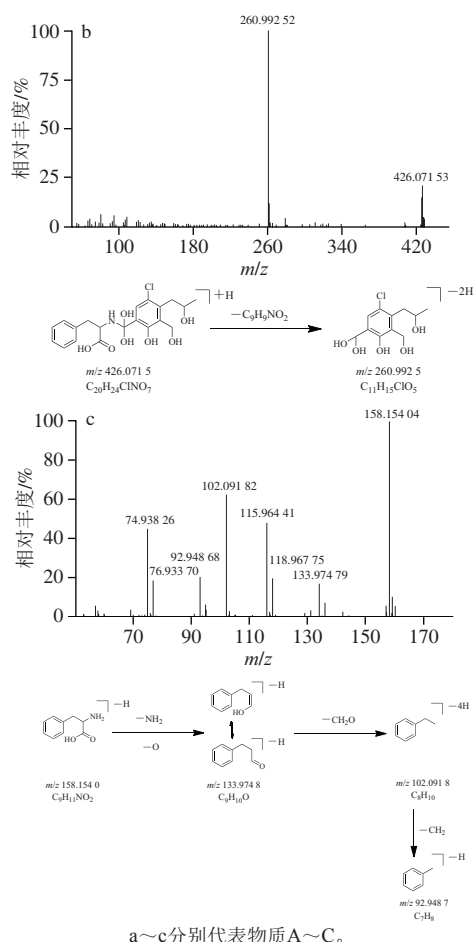


图6 OTA及其降解产物的二级质谱及对应的结构碎片
Fig. 6 MS/MS spectra and possible fragments of OTA and its degradation products

2.2.3 OTA降解途径

在低温放电等离子体处理过程中，会产生大量的臭氧、过氧化氢、羟自由基和激发态粒子等活性物质，这些物质具有极高的活性，能够有效地降解溶液中的化合物。其中羟自由基具有很强的氧化性，能与多种自由基、不饱和键、苯环等发生加成反应；氢离子可以与未成对的H、未成对的电子、芳香族化合物以及不饱和化合物发生加成反应^[38]。

正如之前的研究所报道，OTA可通过对OTA酰胺基的水解作用，释放出OTα和L-苯丙氨酸，这种反应极有可能由羧肽酶或者类似的酶介导的^[39]。OTα是OTA的多种降解产物中毒性最小的一种^[20,40]。

根据降解产物分子质量和二级质谱鉴定结果，推断出低温放电等离子体降解OTA的可能降解途径，见图7。图中红色虚线部分为断裂结构，A物质的a处因水解开环形成羟基和羧基，而羧基被进一步还原成羟基（B物质中蓝色圈出部分）；b处的羰基因质子化被水解形成了2个羟基。OTA经过水解、羟基化、内酯打开等途径可以产生更多的羟基代谢物，其中4-羟基-赭曲霉毒素A和10-羟

基-赭曲霉毒素A被证明是毒性较小的羟基代谢物^[41]。B物质的NH—CO（图7B物质，c处）发生断裂进而得到C物质，而C的结构与彭春红^[38]的电子束辐照降解产物相同，是毒性远低于OTA的L-苯丙氨酸，等离子体将OTA降解成OTα的过程还需要进一步的探索。

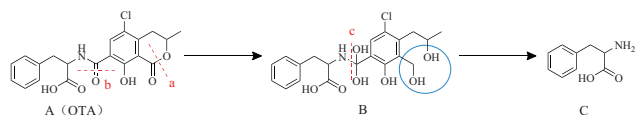


图7 OTA的可能降解途径
Fig. 7 Possible degradation pathway of OTA

2.3 低温放电等离子体处理对葡萄干品质指标的影响

由表3可知，葡萄干经过低温放电等离子体处理3、5 min后，葡萄干的TA、还原糖、总糖、抗坏血酸（VC）、褐变度、水分质量分数无显著差异（ $P > 0.05$ ）。在Feizollahi等^[18]的研究中，常压冷等离子体有效降低了大麦中的DON，但大麦粒的发芽质量、蛋白质含量、水分含量和β-葡聚糖均无明显变化。Paixão等^[42]也观察到了类似的结果，他们的研究结果称等离子体处理过的Siriguela果汁中VC和色素没有明显变化，但总酚类化合物、抗氧化活性和B族维生素有所增加。综上，等离子体对食品中的真菌毒素有良好的降解效果，但考虑到食品基质的复杂性，等离子体处理对食品本身的影响会有略微不同。

表3 不同时间低温放电等离子体处理对葡萄干品质指标的影响
Table 3 Effects of low-temperature discharge plasma treatment time on quality indexes of raisins

时间/min	TA质量分数/%	还原糖质量分数/%	总糖质量分数/%	VC含量/(mg/100 g)	褐变度	水分质量分数/%
0	4.625±0.082 ^a	27.172±0.02 ^a	73.824±0.441 ^a	7.486±0.216 ^a	0.144±0.001 ^a	4.03±0.16 ^a
3	4.656±0.136 ^a	27.172±0.03 ^a	73.604±0.315 ^a	7.562±0.111 ^a	0.144±0.003 ^a	4.08±0.22 ^a
5	4.688±0.054 ^a	27.182±0.01 ^a	73.609±0.564 ^a	7.343±0.120 ^a	0.145±0.001 ^a	4.00±0.32 ^a

注：同列相同小写字母表示差异不显著， $P > 0.05$ 。表4同。

2.4 低温放电等离子体处理对葡萄干色泽的影响

L^* 值、 a^* 值、 b^* 值和 ΔE 值几个指标是决定葡萄干外观的直接指标。从表4可以看出，经低温放电等离子体处理后，葡萄干的 L^* 值、 a^* 值、 b^* 值没有显著差异（ $P > 0.05$ ），总色差 ΔE 显著下降（ $P < 0.05$ ），可能是因为葡萄干的基质成分与等离子体的活性物质发生反应。

表4 不同时间低温放电等离子体处理对葡萄干色泽的影响
Table 4 Effects of low-temperature discharge plasma treatment time on the color of raisins

处理时间/min	L^*	a^*	b^*	ΔE
0	43.222±0.914 ^a	3.751±0.358 ^a	21.093±0.558 ^a	
3	44.526±0.623 ^a	3.877±0.342 ^a	21.584±0.547 ^a	1.399±0.348 ^a
5	43.969±0.384 ^a	3.914±0.257 ^a	21.269±0.530 ^a	0.785±0.719 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

2.5 低温放电等离子体处理对葡萄干挥发性化合物的影响

低温放电等离子体在不同时间处理葡萄干中的挥发性化合物共检测出31种, 主要由酸类、醛类、醇类、酮类和其他物质组成。其中甲酸、乙酸、己酸、3-甲基丁酸、己醛、3-甲基丁醛、(Z)-2-庚醛、3-甲基-2-丁醇、1-己醇、1-辛烯-3-醇等物质为葡萄干的主要风味物质。

由表5可知, 低温放电等离子体处理3、5 min后, 葡萄干除酸类物质中3-甲基丁酸、乙酸、辛酸含量有明显的下降, 甲酸、戊酸、2-乙基己酸含量有明显上升外, 大部分的酸、醛、醇和酮类物质的相对含量未出现明显变化, 可能是因为葡萄干经过不同时间低温放电等离子体处理过程中酸类物质发生相互转换。综上所述, 采用低温放电等离子体处理葡萄干后, 其挥发性物质的变化并不明显。

表5 低温放电等离子体处理对葡萄干挥发性化合物的影响

Table 5 Effect of low-temperature discharge plasma treatment time on volatile compounds in raisins

种类	挥发性化合物	保留时间/min	相对含量/%		
			0 min	3 min	5 min
酸类	甲酸	1.692	8.31	12.43	12.07
	乙酸	2.401	40.6	45.54	42.57
	3-甲基丁酸	8.301	3.22	2.73	1.98
	戊酸	10.081	0	1.79	1.76
	己酸	15.600	10.47	7.16	6.54
	庚酸	19.361	0.71	0.86	0.63
	2-乙基己酸	21.293	0	0.41	0.63
	辛酸	23.919	0.41	0.40	0
醛类	3-甲基丁醛	3.329	2.06	2.14	2.03
	己醛	5.907	6.56	6.65	5.90
	(Z)-2-庚醛	12.711	4.3	4.11	2.57
	苯乙醛	17.011	0	0	0.44
	1-乙基-1H-吡咯-2-羧醛	17.305	0.47	0.54	0.44
	(E)-2-辛烯醛	17.810	0.47	0.43	0.31
	壬醛	20.112	0.91	1.62	1.13
	癸醛	25.063	0	0.40	0
	3-甲基-2-丁醇	3.468	3.45	2.16	4.03
	3-甲基-1-丁醇	4.152	0	0.69	0
醇类	1-戊醇	5.052	0	0.80	0.50
	1-己醇	8.750	3.7	2.97	2.64
	1-辛烯-3-醇	13.916	4.27	3.05	2.18
	2-乙基-1-己醇	16.456	0.55	0.65	0.63
	(E)-2-辛烯-1-醇	18.389	1.59	1.13	0.78
	2-辛烯-1-醇	18.444	0.67	1.13	0.78
	6-甲基-5-庚烯-2-酮	14.305	1.47	1.00	0.98
酮类	3,4-二甲基-2,5-呋喃二酮	16.877	1.14	0.94	0.70
	2,6-二叔丁基-4-羟基-4-甲基环己-2,5-二烯-1-酮	38.033	0.34	1.29	1.29
	5-羟基-2,2,6,6-四甲基-4-丙酰环己烯-4-烯-1,3-二酮	39.609	0.45	0.43	0.45
	甲氧基苯基丙酮	10.720	1.84	1.77	2.00
其他	3,5,5-三甲基-2-己烯	13.618	1.87	1.97	1.59
	丁二酸二异丙酯	28.137	0.58	0.42	0.47

3 结论

本研究采用低温放电等离子体对葡萄干中OTA进行降解, 研究不同初始质量浓度、放电电压对葡萄干中OTA降解率的影响。结果表明, 低温放电等离子体降解葡萄干中OTA效果显著, 葡萄干中OTA初始质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$, 经等离子体在放电电压75 kV时处理10 min基本能被完全降解。低温放电等离子体处理对葡萄干的品质指标未产生显著影响 ($P>0.05$); 色泽指标 L^* 值、 a^* 值、 b^* 值未出现显著差异 ($P>0.05$); 挥发性化合物仅有少部分出现微量变化。Mohammadi等^[43]的研究表明等离子体因穿透深度低、对食物和植物基质的损害较小, 从而可在有效降解植物或者食物表面真菌毒素的同时保留食品内部的营养成分。

利用HPLC-Q-Orbitrap-HRMS检测并鉴定经低温放电等离子体处理的OTA降解产物, 结合质谱图的碎片信息, 对B (m/z 426.071 5)和C (m/z 158.154 0) 2种主要降解产物的结构进行分析, 并对等离子体降解OTA的可能途径进行推测。本实验最终产物与彭春红^[38]、邹东^[44]实验的最终产物相似, 但未出现较多的中间产物, 可能是由于中间产物不稳定的性质以及低温放电等离子体高效率的性质, 从而使得本实验中未出现过多中间产物。上述研究结果表明, 低温放电等离子体是一种高效降解OTA的非热加工技术, 可为OTA污染的食品降解研究提供理论依据, 但降解产物的安全性还需要动物实验和细胞实验进一步验证。

参考文献:

- [1] 张洁荣. 葡萄酒加工中赭曲霉毒素A含量变化规律解析及产物安全性评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022: 1-2. DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2022.002006.
- [2] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene[M]. Geneva: World Health Organization, 2002.
- [3] PETZINGER, ZIEGLER. Ochratoxin A from a toxicological perspective[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2000, 23(2): 91-98. DOI:10.1046/j.1365-2885.2000.00244.x.
- [4] 单艳群, 王晓英. 赭曲霉毒素A的电化学适体传感检测[J]. 化学进展, 2018, 30(6): 797-808.
- [5] RASFF database. Ochratoxin A (21.91 $\mu\text{g/kg}$ -ppb) in dried raisins from China[DB/OL]. (2019-09-27)[2023-08-22]. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>.
- [6] MAO J, HE B, ZHANG L X, et al. A structure identification and toxicity assessment of the degradation products of aflatoxin B₁ in peanut oil under UV irradiation[J]. Toxins, 2016, 8(11): 332. DOI:10.3390/toxins8110332.
- [7] 李克. 电子束辐照降解玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 3-6.
- [8] PUKKASORN P, RATPHITAGSANTI W, HARUTHAITANASAN V. Effect of ultra-superheated steam on aflatoxin reduction and roasted

- peanut properties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(8): 2935-2941. DOI:10.1002/jsfa.8788.
- [9] YUE T, GUO C, YUAN Y, et al. Adsorptive removal of patulin from apple juice using Ca-alginate-activated carbon beads[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(10): 1629-1635. DOI:10.1111/1750-3841.12254.
- [10] 王莉, 罗颖鹏, 罗小虎, 等. 臭氧降解污染小麦中呕吐毒素的效果及降解产物推测[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 164-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201618027.
- [11] ABRUNHOSA L, SANTOS L, VENANCIO A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*[J]. Food Biotechnology, 2006, 20(3): 231-242. DOI:10.1080/08905430600904369.
- [12] PHAN K T K, PHAN H T, BOONYAWAN D, et al. Non-thermal plasma for elimination of pesticide residues in mango[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 48: 164-171. DOI:10.1016/j.ifset.2018.06.009.
- [13] EKEZIE F G C, SUN D W, CHENG J H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: current applications and future trends[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 69: 46-58. DOI:10.1016/j.tifs.2017.08.007.
- [14] WANG S Q, HUANG G Q, LI Y P, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by low-temperature radio frequency plasma and degradation product elucidation[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(1): 103-113. DOI:10.1007/s00217-015-2439-5.
- [15] CASAS-JUNCO P P, SOLÍS-PACHECO J R, RAGAZZO-SÁNCHEZ J A, et al. Cold plasma treatment as an alternative for ochratoxin A detoxification and inhibition of mycotoxigenic fungi in roasted coffee[J]. Toxins, 2019, 11(6): 337. DOI:10.3390/toxins11060337.
- [16] SICILIANO I, SPADARO D, PRELLE A, et al. Use of cold atmospheric plasma to detoxify hazelnuts from aflatoxins[J]. Toxins, 2016, 8(5): 125. DOI:10.3390/toxins8050125.
- [17] IQDIAM B M, FEIZOLLAHI E, ARIF M F, et al. Reduction of T-2 and HT-2 mycotoxins by atmospheric cold plasma and its impact on quality changes and germination of wheat grains[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(4): 1354-1371. DOI:10.1111/1750-3841.15658.
- [18] FEIZOLLAHI E, IQDIAM B, VASANTHAN T, et al. Effects of atmospheric-pressure cold plasma treatment on deoxynivalenol degradation, quality parameters, and germination of barley grains[J]. Applied Sciences, 2020, 10(10): 3530. DOI:10.3390/app10103530.
- [19] 张朋杰, 张宪臣, 李云松, 等. QuEChERS结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速测定禽畜肉中157种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5391-5400. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2022.16.038.
- [20] 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, 31(2): 83-90. DOI:10.1007/s12550-014-0218-y.
- [21] 罗小虎, 李克, 王韧, 等. 臭氧、电子束辐照降解玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 98-102; 173. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2017.12.020.
- [22] 唐洪涛, 夏蕊, 迟蕾, 等. 玉米中赭曲霉毒素A的辐照降解及辐照产物的毒性评价[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(4): 28-32. DOI:10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20210714.002.
- [23] WU Q H, DOHNAL V, HUANG L L, et al. Metabolic pathways of ochratoxin A[J]. Current Drug Metabolism, 2011, 12(1): 1-10. DOI:10.2174/138920011794520026.
- [24] 姚娜娜, 车凤斌, 张婷, 等. 不同预处理对提高大果沙棘热风干燥效果的对比分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 28; 217-225. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0121.
- [25] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 136-137.
- [26] 李晓丽, 陈计峦, 范盈盈, 等. 无核白葡萄干制过程中酚类物质的变化及其与褐变的关系[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 27-32. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180315-198.
- [27] 黎永艳, 张海霞, 邱棋伟. 水分测定仪测定食品中水分的含量[J]. 医学动物防制, 2011, 27(9): 880-881.
- [28] 袁杰, 李锐, 周利, 等. 基于超高效液相色谱法和色差仪法的黄芩药材质量评价[J]. 世界中医药, 2019, 14(11): 2849-2854.
- [29] 张文娟, 黄瑞彬, 徐秀娟, 等. 新疆葡萄干挥发性成分差异化信息分析研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(3): 4-9. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.03.002.
- [30] CHEN X L, QIU Y, ZHANG J Y, et al. Degradation efficiency and products of deoxynivalenol treated by cold plasma and its application in wheat[J]. Food Control, 2022, 136: 108874. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.108874.
- [31] 赵青, 刘述章, 董洪辉. 等离子体技术及应用[M]. 北京: 国防工业出版社, 2009: 286-287.
- [32] SHI H, ILELEJI K, STROSHINE R L, et al. Reduction of aflatoxin in corn by high voltage atmospheric cold plasma[J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(6): 1042-1052. DOI:10.1007/s11947-017-1873-8.
- [33] 何随彬, 李好磊, 李步社, 等. 赭曲霉毒素A的毒性作用及致毒机理研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(4): 9-12. DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2020.04.004.
- [34] GAGLIANO N, DONNE D I, TORRI C, et al. Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological, biochemical and molecular study[J]. Toxicology, 2006, 225(2/3): 214-224. DOI:10.1016/j.tox.2006.06.004.
- [35] ZURICH M G, LENGACHER S, BRAISSANT O, et al. Unusual astrocyte reactivity caused by the food mycotoxin ochratoxin A in aggregating rat brain cell cultures[J]. Neuroscience, 2005, 134(3): 771-782. DOI:10.1016/j.neuroscience.2005.04.030.
- [36] DOMIJAN A M, GAJSKI G, JOVANOVIĆ I N, et al. *In vitro* genotoxicity of mycotoxins ochratoxin A and fumonisin B₁ could be prevented by sodium copper chlorophyllin: implication to their genotoxic mechanism[J]. Food Chemistry, 2015, 170: 455-462. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.08.036.
- [37] 王玉萍, 黄昆仑, 梁志宏. 微生物对赭曲霉毒素A的生物脱毒机理研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(2): 316-323. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2017.02.017.
- [38] 彭春红. 电子束辐照对赭曲霉毒素A的降解效果及机理研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015: 42-48.
- [39] ABRUNHOSA L, PATERSON R R, VENANCIO A. Biodegradation of ochratoxin a for food and feed decontamination[J]. Toxins, 2010, 2(5): 1078-1099. DOI:10.3390/toxins2051078.
- [40] HAQ M, GONZALEZ N, MINTZ K, et al. Teratogenicity of ochratoxin A and the degradation product, ochratoxin α , in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model of vertebrate development[J]. Toxins, 2016, 8(2): 40. DOI:10.3390/toxins8020040.
- [41] ROTTKORD U, RÖHL C, FERSE I, et al. Structure-activity relationship of ochratoxin A and synthesized derivatives: importance of amino acid and halogen moiety for cytotoxicity[J]. Archives of Toxicology, 2017, 91(3): 1461-1471. DOI:10.1007/s00204-016-1799-3.
- [42] PAIXÃO L M N, FONTELES T V, OLIVEIRA V S, et al. Cold plasma effects on functional compounds of siriguela juice[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12: 110-121. DOI:10.1007/s11947-018-2197-z.
- [43] MOHAMMADI X, MATINFAR G, KHANEGHAH A M, et al. Emergence of cold plasma and electron beam irradiation as novel technologies to counter mycotoxins in food products[J]. World Mycotoxin Journal, 2021, 14(1): 75-83. DOI:10.3920/WMJ2020.2586.
- [44] 邹东. 诱变黑曲霉对赭曲霉毒素A的脱除作用及其在麦麸中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2022: 27-31. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2022.000491.