

李文廷, 李洁, 申颖, 等. 普洱茶中 HT-2 毒素假阳性结果的分析[J]. 环境化学, 2019, 38(7): 1691-1693.

LI Wenting, LI Jie, SHEN Ying, et al. Analysis of false positive results of HT-2 toxin in Pu-erhTea[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(7): 1691-1693.

ThermoFisher 赛默飞世尔科技
SCIENTIFIC

普洱茶中 HT-2 毒素假阳性结果的分析*

李文廷¹ 李洁¹ 申颖¹ 范忠吉² 梅金丹² 欧利华^{1**}

(1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明, 650228; 2. 大理大学公共卫生学院, 大理, 671000)

摘要 普洱茶样品采取有机溶剂(甲醇/水/甲酸 70:29:1 溶液)提取, 提取液通过 PriboFastRMulti-Toxin IAC 免疫亲和净化柱及 M226 多功能净化柱对比净化, 利用超高效液相色谱串联质谱的多反应监测模式进行测定分析, 采用内标法定量, 通过基质加标回收实验、质控已知样实验进行验证. HT-2 毒素的回归方程有良好的线性关系, 相关系数为 0.9995, 3 个不同加标水平回收率为 85.3%—92.6%, 相对标准偏差为 4.24%—5.61%. 174 件云南普洱茶中, 通过免疫亲和柱净化处理的检测结果为未检出, 通过多功能净化柱净化处理的检测结果有 52 件确认为假阳性样品, 含量范围为 0.52—14.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 假阳性率为 29.8%.

关键词 HT-2 毒素, 假阳性, 普洱茶, 超高效液相色谱-串联质谱.

Analysis of false positive results of HT-2 toxin in Pu-erhTea

LI Wenting¹ LI Jie¹ SHEN Ying¹ FAN Zhongji² MEI Jindan² OU Lihua^{1**}

(1. Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming, 650228, China;

2. School of Public Health, Dali University, Dali, 671000, China)

Abstract: Samples were extracted by organic solvent (methanol-water-formic acid 70:29:1 solution), purified by PriboFast RMulti-Toxin IAC immunoaffinity purification column, determined and analyzed by multi-reaction monitoring of ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and quantified by internal standard method, through standard addition recovery experiment, quality control of known samples to verify the comparison. The regression equation of HT-2 toxin has a good linear relationship with a correlation coefficient of 0.9995. The recovery rates at three different levels are 85.3% — 92.6%, and the relative standard deviations are 4.24% — 5.61%. Among the 174 Yunnan Pu-erh teas, the detection results by the immunoaffinity column purification treatment were not detected, and 52 samples were confirmed as false positive samples by the multi-function purification and purification treatment, with a false positive rate of 29.8%, with the content ranged of 0.52—14.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Keywords: HT-2 toxin, false positive, Pu-erh Tea, ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

近年来,消费者对普洱茶饮用的安全性备受关注,由于普洱的发酵工艺特殊性,在生产制作和存储过程中,存在真菌毒素污染的可能.HT-2 毒素为 T-2 毒素的水解脱乙酰基团产物,这两种毒素对动物均具有较强的毒性.HT-2 毒素的检测方法主要有酶联免疫吸附法、免疫亲和净化-高效液相法、免疫亲和柱色谱-酶联免疫吸附法、液相色谱-串联质谱法.由于茶叶中复杂基质如茶多酚和茶色素的存在,样品前处理过程中存在净化效果不理想的问题,目标分析物具有多种形态的性质以及仪器分析软件存在缺陷问题因素的存在,无论使用何种检测方法,真菌毒素的测定结果均可能产生“假阳性”

* 昆明市卫生科技人才培养项目暨“十百千”工程培养计划[2018- sw(后备)-20]和昆明市卫生计生科研项目(2017-12-06-003)资助.

Supported by the Kunming Health Science and Technology Talents Training Project (2018- sw(reserve)-20) and the Kunming Health and Family Planning Research Project (2017-12-06-003).

** 通讯联系人, E-mail: 441084779@qq.com

Corresponding author, E-mail: 441084779@qq.com

结果.

本文利用 2018 年国家食品安全风险监测工作数据,通过超高效液相色谱串联质谱对 174 件在售云南普洱茶进行 HT-2 毒素的检测分析,经过样品基质干扰的考察,样品的净化效果研究以及仪器分析软件进行定性定量验证,对普洱茶 HT-2 毒素出现假阳性结果进行分析并确认,提供更为科学准确的实验数据.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

检测普洱茶样品由云南各州市疾病预防控制中心进行采集提供,昆明市、普洱市及西双版纳州分别为 26 件,德宏州为 28 件,大理市为 24 件,其余各位 4 件,共计 174 件.

1.2 仪器与试剂

超高效液相-串联质谱联用仪(美国 Agilent Technologies 1290 Infinity II-美国 AB SCIEX QTRAP 4500),十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo, XS205DU); 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, KQ-500DE); 纯水处理终端机(德国 Sartorius, Arium pro D1); Pribofast RMulti-Toxin IAC 免疫亲和柱及 Pribofast RM226 多功能净化柱均为(美国 Pribolab); 智能台式高速冷冻离心机(湖南赫仪器装备有限公司, 3H16RI).

标准物质 HT-2 毒素($C_{22}H_{32}O_8$)、同位素内标 $^{13}C_{22}$ -HT-2($^{13}C_{22}H_{32}O_8$)及质控样(Level # MT-C-9999I)均购自美国 Pribolab; 色谱纯甲醇、乙腈购自美国 Sigma-Aldrich; 实验中所用水均为一级纯水.

1.3 分析方法

色谱条件 Waters HSS T3 C18 色谱柱(柱长 50 mm, 柱内径 2.1 mm, 填料粒径 1.8 μm), 柱温设定 40 $^{\circ}C$, 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.2% 甲酸水溶液, 洗脱程序为梯度洗脱, 流速为 0.3 $mL \cdot min^{-1}$, 样品进样体积 15 μL , 检测分析时间为 8.0 min.

质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 多重反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 离子源温度 550 $^{\circ}C$, 离子喷雾电压(ionspray voltage)为 5500.0 V, 气帘气为 30 psi, 雾化气为 55 psi, 辅助气为 55 psi.

1.4 标准溶液的配制

移取一定体积 HT-2 毒素标准液于 10 mL 容量瓶中, 用 20% 乙腈水溶液定容至刻度, 得标准储备液, 浓度为 2.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 移取一定体积同位素标准溶液于 5 mL 容量瓶中, 20% 乙腈水溶液稀释定容至刻度, 充分混合后得同位素内标工作液, 浓度为 0.2 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 分别避光储存于 -20 $^{\circ}C$ 条件下.

1.5 样品前处理

精确称取 2 g (精确到 0.01 g) 试样于 50 mL 样品管中, 加入 20 mL 甲醇/水/甲酸(70:29:1)水溶液, 涡旋 1 min, 加入 20 μL 同位素内标工作液, 置于超声波振荡器中超声提取 20 min, 再置于多功能涡旋振荡器上提取 30 min, 10000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min, 收集上清液, 如溶液出现浑浊, 用玻璃纤维滤纸过滤, 收集滤液.

取 10 mL 上清液通过 PribofastRMulti-Toxin IAC 免疫亲和净化柱, 分别用 20 mL 0.5% 吐温-水溶液、10 mL 水依次淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 加入 2 mL 甲醇-乙酸(98:2)洗脱亲和柱, 排干后再重复操作 1 次, 收集全部洗脱液至 10 mL 样品管中, 在 50 $^{\circ}C$ 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干, 加入 0.5 mL 20% 的乙腈水溶液溶解残留物, 过 0.22 μm 滤膜待测分析.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 质谱条件的优化

T-2 和 HT-2 毒素及其内标在正离子模式扫描下响应值最高而且稳定, 所以选择正离子模式检测. 用 MRM 模式再分别优化其对应的锥孔电压(DP)、碰撞能量(CE)等质谱条件, 得到样品检测的质谱参数, 如表 1 所示.

表 1 HT-2 及同位素内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters for HT-2 and isotope internal standard

真菌毒素	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms	锥孔电压/V	碰撞能/eV
HT-2	425.3	263.0*	50	75	35
		245.0		75	33
13C22-HT-2	447.2	278.1	50	73	14

备注: * 为定量离子.

2.2 流动相的选择

以乙腈-甲酸作为流动相洗脱, 目标分析物的离子化效率较强, 质谱信号响应强度较高, 梯度洗脱模式为: 0—

1.0 min, 80% B; 1.0—2.5 min, 80% B—40% B; 2.5—4.5 min, 40% B—0% B; 4.5—5.5 min, 0% B; 5.5—7.0 min, 0% B—80% B; 7.0—8.0 min, 80% B.

2.3 线性关系及检出限

在 5.32—199.50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内配制 6 个不同浓度的标准溶液,同时加入定量的同位素内标混合溶液,选取优化的质谱参数,通过乙腈-甲酸水系统的洗脱进行实验,以 HT-2 毒素峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线,相关系数为 0.9995,线性方程为 $y=72.088x+67.502$.以 3 倍信噪比计算检出限(LOD)为 0.20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,10 倍信噪比计算定量限(LOQ)为 0.60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,检测限满足痕量分析实验要求.

2.4 加标回收率、精密度及准确度

在同一份茶叶样品中添加 3 个水平为 10、30 g、50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 标准溶液进行 HT-2 毒素的加标回收实验,每个水平平行测定 6 次计算方法的回收率和精密度,HT-2 毒素平均回收率在 85.3%—92.6% 之间,相对标准偏差(RSD)在 4.24%—5.61% 之间,结果显示本方法具有良好的准确度和精密度.

准确称取 5.0 g 含 HT-2 毒素质控样 3 份,按照样品前处理方法进行处理并检测分析,检测均值为 186 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,参考值为 215 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,满足检测最低要求 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,实验表明普洱茶样品按照此方法处理具有较高的提取净化效率,准确度较好.

2.5 实际样品检测

174 件普洱茶样品经实验分析,利用 PriboFast RMulti-Toxin IAC 免疫亲和柱净化的样品未有 HT-2 毒素检出,但采用 PriboFast RM226 多功能净化柱净化的样品出现 HT-2 毒素假阳性结果,含量范围为 0.52—14.27 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,假阳性率为 29.8%,因此需要进一步分析以排除样品中假阳性结果.

2.6 假阳性确证

经过免疫亲和柱净化的样品并没有 HT-2 毒素的检出,而经多功能净化柱及滤头净化的样品,通过假阳性样品谱图与标准谱图信息的对比,基质加标回收及质控样的验证,质控样的相关谱图信息与标准品谱图一致,而假阳性样品的谱图信息与标准品谱图有较大差异,假阳性样品的定性定量离子与标准品不一致,离子丰度比大于 78%,保留时间偏差为 3.72%,确证为 HT-2 毒素假阳性结果.

3 结论(Conclusion)

茶叶中复杂基质对 HT-2 毒素的干扰应经过免疫亲和柱净化消除,通过两对或多对离子对同时定性确认,并利用保留时间及相对丰度的偏差结合分析,提高普洱茶中 HT-2 毒素检测结果的准确性.