葡萄酒中赭曲霉毒素A检测方法优化

庞世琦[1]，刘　青[1,*]，李志勇[1]，潘丙珍[1]，罗　敏[2]，刘　茜[1]，陈文锐[1]
(1.广东检验检疫技术中心，广东 广州　510623；2.南海出入境检验检疫局，广东 佛山　528200)

摘　要：对葡萄酒中赭曲霉毒素A(OTA)的前处理和检测方法进行优化，分别采用液液萃取和免疫亲合柱前处理，结合高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FD)和酶联免疫法检测(ELISA)对OTA的回收率、检测成本、检测效率及环保性进行比较，选出适用于大批量样品筛查的首选方法。同时针对目前大量进口的法国、西班牙、意大利、澳大利亚等国家以及国产的葡萄酒进行检测。结果表明：大批量葡萄酒样品的筛查建议采用液液萃取前处理结合ELISA方法进行检测的组合作为首选，检测到阳性样品时再用免疫亲和柱净化后用高效液相色谱检测进行确证，方法具有快捷、灵敏、准确等特点，回收率、精密度都能达到检测要求。

关键词：赭曲霉毒素A；葡萄酒；高效液相色谱法；酶联免疫吸附测定法；方法优化

An Optimized Procedure for Rapid Determination of Ochratoxin A in Wine

PANG Shi-qi[1]，LIU Qing[1,*]，LI Zhi-yong[1]，PAN Bing-zhen[1]，LUO Min[2]，LIU Xi[1]，CHEN Wen-rui[1]
(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou　510623, China；
2. Nanhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Foshan　528200, China)

Abstract：The purpose of this study was to establish the optimal sample pretreatment procedure and analytical method for determining ochratoxin A (OTA) in wine. Sample pretreatment was achieved by alternative methods, either by liquid-liquid extraction or by immunoaffinity column chromatography (IAC) and two different analytical methods, high-performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were compared for their suitability for large-scale determination of OTA in wine from the viewpoints of OTA recovery, cost, efficiency and environmental protection. The selected analytical procedure was validated by applying it for the determination of wines imported from France, Spain, Italy and Australia as well as domestic wines. Based on the results of this study, liquid-liquid extraction in combination with ELISA is a more suitable method for large-scale screening of wines for OTA and can be validated by comparative determination of the positive samples using HPLC analysis following IAC clean-up. The method proposed in this study is rapid, convenient, sensitive and accurate and meets the analytical requirements of recovery and precision.

Key words：ochratoxin A；wine；high performance liquid chromatography (HPLC)；enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)；optimization

中图分类号：TS261.7　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630(2013)24-0193-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201324040

赭曲霉毒素是曲霉菌属和青霉菌属的某些菌种产生的二级有毒代谢产物，包含7种结构类似的化合物，其中赭曲霉毒素A(ochratoxin A，OTA)在自然界中分布最广泛，毒性最强，对人类和动植物影响最大。OTA是一种稳定的无色结晶化合物，具有耐热性，易溶于稀的碳酸氢钠溶液和极性有机溶剂，微溶于水，在紫外照射下呈绿色荧光。研究表明，OTA不仅具有免疫毒性、肾毒性和肝毒性，并且还有致畸、致突变和致癌作用[1]，国际癌症研究机构已将其定义为group 2B类致癌物[2]。在葡萄酒的种植和酿制过程中，由于受种植环境和生产工艺、条件的影响，很容易造成赭曲霉毒素的污染。葡萄酒中OTA的检测越来越受到世界各国的重视。

现有的OTA检测方法主要有液相色谱-荧光检测法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫法、毛细管电泳-二极管阵列检测法等[3-8]。由于葡萄酒中的OTA含量较低(一般在0.1～5.0μg/L)，考虑到其成分复杂，可能会对目标检测

收稿日期：2012-12-02
基金项目：广东省科技计划项目(2011B050400025；2010B020316006)；质检公益性行业科研专项(201210104-2)；
广东检验检疫局科技计划项目(2013GDK31)
作者简介：庞世琦(1976—)，女，工程师，学士，研究方向为食品安全与检测。E-mail：psqciq@163.com
*通信作者：刘青(1971—)，女，高级工程师，硕士，研究方向为食品安全与检测。E-mail：liuq@iqtc.cn

物产生干扰，一般需要采用富集净化技术对样品进行前处理。目前使用的主要净化技术有：溶剂提取法、免疫亲和柱净化(immunoaffinity column，IAC)法和固相萃取(solid-phase extraction，SPE)法[9-10]。采用IAC或SPE处理后，OTA富集程度高、本底纯净，但成本较高，不太适用于大批量葡萄酒样品的检测[11-12]。随着葡萄酒进口量的逐年递增，如何准确快速地检测大批量样品中OTA的含量是现阶段监管工作中亟需解决的重点问题之一。

本实验分别从前处理净化和检测两个方面对葡萄酒中OTA的检测方法进行优化。比较液液萃取和免疫亲和柱法对OTA的富集与纯化的效果；以及高效液相色谱-荧光检测(high performance liquid chromatography-fluorescence detection，HPLC-FD)法和酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA)的检测效果，并通过优化组合，以期选出能够满足实际检测需求、降低检测成本、提高检测效率的方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

10.01μg/mL赭曲霉毒素A标准溶液 Romer国际贸易(北京)有限公司；甲醇(色谱纯)；二氯甲烷、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、盐酸、冰乙酸、碳酸氢钠均为分析纯；赭曲霉毒素ELISA酶联免疫检测试剂盒德国拜发公司。

e2695型高效液相色谱仪(配备荧光检测器) 美国Waters公司；Ultimate C_{18}柱(4.6mm×250mm，5μm)；RMS.3振荡器 德国IKA公司；3-16PK冷冻离心机美国Sigma公司；氮吹浓缩仪 美国Caliper公司；赭曲霉毒素免疫亲和柱 德国拜发公司；Chem Well全自动酶标仪 美国Awareness公司。

1.2 方法

1.2.1 HPLC-FD法检测OTA

1.2.1.1 样品前处理

免疫亲和柱净化：吸取15.0mL样品，用2mol/L的氢氧化钠溶液调pH值至7.5，与pH7.5的0.4mol/L磷酸盐缓冲液(60.0g磷酸氢二钠，8.8g磷酸二氢钠定容至1000mL)等体积充分混合后放入离心机(4000r/min)离心10min。取20.0mL上清液，以2mL/min的速率过免疫亲和柱，用10mL 10mmol/L磷酸盐缓冲液和10mL吐温溶液(试剂盒自带)各淋洗1次，2.0mL甲醇洗脱、过滤后备用。

液液萃取净化：依次吸取5.0mL样品、2.5mL 1mol/L盐酸溶液、4.0mL二氯甲烷于50mL离心管中，充分混合后放入离心机(4500r/min)离心10min，移取2.0mL下层有机相于吹氮管中，60℃缓慢氮吹浓缩。用1.0mL 0.13mol/L碳酸氢钠溶液溶解残余物，过滤备用。

1.2.1.2 色谱条件

色谱柱：Ultimate C_{18}柱(4.6mm×250mm，5μm)；流速：1.0mL/min；荧光检测器：激发波长333nm，发射波长460nm；柱温：室温；进样量：20μL；流动相体积比：A为水-冰乙酸(99:1，*V*/*V*)，B为乙腈-冰乙酸(99:1，*V*/*V*)。

1.2.1.3 标准溶液

标准储备液：准确移取赭曲霉毒素A标准品，用甲醇配制成0.100mg/mL溶液。

标准溶液系列：根据需要移取适量标准储备液，用甲醇稀释，分别配制成2.0、5.0、10.0、20.0、25.0μg/L和50.0μg/L系列标准溶液。标准品图谱见图1。

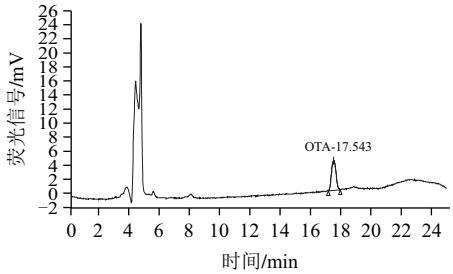

图1 2.0μg/L赭曲霉毒素A标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of 2.0 μg/L ochratoxin A standard solution

1.2.2 ELISA法检测OTA

1.2.2.1 免疫亲和柱净化

样品经免疫亲和柱净化后，取滤液100μL与200μL去离子水混合，再取混合液100μL与900μL的0.13mol/L碳酸氢钠溶液混合均匀，每孔取50μL按测试盒的要求进行检测。

1.2.2.2 液液萃取净化

样品经液液萃取净化后，取滤液50μL与450μL的0.13mol/L碳酸氢钠溶液混合均匀，每孔取50μL，按测试盒的要求进行检测。

2 结果与分析

2.1 前处理方法优化

根据有关文献资料[13-26]，从样品的前处理净化和检测方面考虑，设定不同的实验条件进行讨论。

2.1.1 净化方式的选择

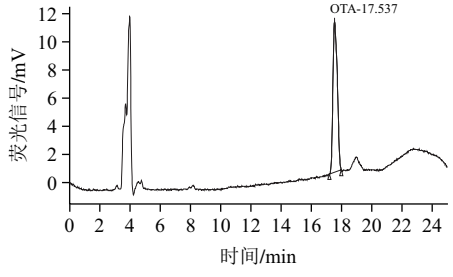

图2 5.0μg/L加标葡萄酒免疫亲和柱净化后的色谱图

Fig.2 Chromatogram of 5.0 μg/L spiked wine sample purified with IAC

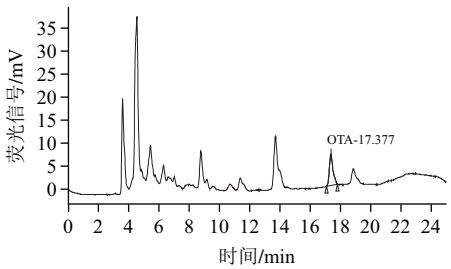

图 3 5.0μg/L加标葡萄酒液液萃取净化后的色谱图

Fig.3 Chromatogram of 5.0 μg/L spiked wine sample purified with liquid-liquid extraction

液液萃取和免疫亲和柱净化是实验室常用的毒素检测净化手段。本实验使用免疫亲和柱净化时，OTA的回收率在91%～107%之间，图谱见图2；使用液液萃取法时回收率在94%～119%之间，图谱见图3。由图2、3可知，两种前处理方法的检测效果差异不大，如果从时间、经济的角度考虑，可首选液液萃取。

2.1.2 萃取溶剂的选择

结合OTA的化学特性，分别采用二氯甲烷、三氯甲烷和四氯化碳对质量浓度分别为1.0、2.0、5.0μg/L 3个水平的加标葡萄酒进行萃取实验。结果表明，用二氯甲烷萃取的平均回收率为91.9%、三氯甲烷萃取为78.2%、四氯化碳为65%左右。考虑到二氯甲烷的毒性略小，因此建议选用二氯甲烷作为萃取剂。

2.1.3 淋洗溶剂的选择

目标检测物在免疫亲和柱富集后，可采用水、磷酸缓冲液、吐温溶液等来淋洗，经实验表明，依次用磷酸缓冲液、吐温溶液淋洗，可得到更好的净化效果。

2.1.4 洗脱溶液的选择

免疫亲和柱净化后需要用甲醇与酸的混合液洗脱富集在柱上的目标物，但ELISA检测要求试液的pH值在7.5左右，因此分别用甲醇-冰乙酸(98:2，*V*/*V*)和纯甲醇溶液进行洗脱，结果表明两者无明显的差异，从简化实验步骤考虑，选用纯甲醇洗脱。

2.2 检测方法优化

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

时间/min		洗脱程序1					洗脱程序2						
		5.0	5.1	7.0	7.1	10.0	5.0	14.0	16.0	18.0	20.0	22.0	25.0
流动相体积分数/%	A						57	45	45	35	35	57	57
	B						43	55	55	65	65	43	43
	C	100	0	0	100	100							
	D	0	100	100	0	0							

注：A.水-冰乙酸 (99:1，*V*/*V*)；B. 乙腈-冰乙酸 (99:1，*V*/*V*)；C. 乙腈-水-冰乙酸 (450:525:25，*V*/*V*)；D. 乙腈。

HPLC-FD对OTA进行检测时，流动相可分别采用等度或梯度洗脱。等度洗脱过程中，流动相为乙腈-水-冰乙酸(58:41:1，*V*/*V*)。当采用免疫亲和柱净化时，标准品出峰时间短、色谱峰形好；但由于葡萄酒的基质非常复杂，当采用液液萃取净化时，目标物的附近有很多的干扰峰，只有采用梯度洗脱，才能达到良好的分离效果。为比较不同流动相的梯度洗脱程序对分离效果的影响，比较了两种不同的洗脱程序(表1)。从峰形、干扰峰和目标峰的分离等结果表明洗脱程序2较佳。

2.3 方法的线性范围与检出限

根据本方法所确定的实验条件，用质量浓度分别为2.0、5.0、10.0、20.0、25.0μg/L和50.0μg/L系列标准溶液进样，以峰面积对质量浓度作图。结果表明，目标物在2.0～50.0μg/L范围内，线性方程为$y=8.75\times10^3x+2.38\times10^3$，线性相关系数为0.9996，线性良好。当样品中的目标物超出此线性范围时，可适当调整样品的稀释倍数。

如果净化后采用ELISA方法检测，则方法的线性范围和检出限要根据各测试盒的规定确定。

2.4 方法的准确度与精密度

在红葡萄酒、桃红葡萄酒、白葡萄酒中进行加标回收实验，设置3个添加质量浓度，分别用经免疫亲和柱和液液萃取前处理得到的待测液，待测液再分别用HPLC-FD法和ELISA法检测，每种方法每个质量浓度重复6次，获得回收率及相对标准偏差分别见表2～5。

表 2 样品经免疫亲和柱净化后用采液相色谱法测得的回收率和精密度(*n*=6)

Table 2 Recoveries and RSDs for spiked samples by IAC-HPLC (*n* = 6)

样品名称	试样本底质量浓度/(μg/L)	添加水平/(μg/L)	平均测定值/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
白葡萄酒	ND	1.0	0.96	96	3.86
		2.0	1.88	94	4.91
		5.0	4.92	98	5.20
桃红葡萄酒	ND	1.0	0.94	94	4.70
		2.0	1.83	92	5.56
		5.0	5.09	102	5.94
红葡萄酒	ND	1.0	0.98	98	4.67
		2.0	1.92	96	2.54
		5.0	4.89	98	1.80

注：ND. 未检出。表3～5同。

表 3 样品经液液萃取净化后采用液相色谱法测得的回收率和精密度(*n*=6)

Table 3 Recoveries and RSDs for spiked samples by liquid-liquid extraction-HPLC (*n* = 6)

样品名称	试样本底质量浓度/(μg/L)	添加水平/(μg/L)	平均测定值/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
白葡萄酒	ND	1.0	1.05	105	4.61
		2.0	2.05	102	5.63
		5.0	5.16	103	1.96
桃红葡萄酒	ND	1.0	1.04	104	2.50
		2.0	1.98	99	1.71
		5.0	4.94	99	1.01
红葡萄酒	ND	1.0	1.06	106	4.35
		2.0	1.87	94	3.63
		5.0	5.09	102	3.67

表4 样品经免疫亲和柱净化后采用ELISA法测得的回收率和精密度(*n*=6)

Table 4 Recoveries and RSDs for spiked samples by IAC-ELISA (*n* = 6)

样品名称	试样本底质量浓度/(μg/L)	添加水平/(μg/L)	平均测定值/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
白葡萄酒	ND	1.0	1.05	105	3.74
		2.0	2.07	104	4.88
		5.0	5.33	107	5.33
桃红葡萄酒	ND	1.0	1.05	105	4.11
		2.0	1.79	90	3.16
		5.0	4.54	91	3.09
红葡萄酒	ND	1.0	0.93	93	4.27
		2.0	1.85	93	3.89
		5.0	5.33	107	2.22

表5 样品经液液萃取净化后采用ELISA法测得的回收率和精密度(*n*=6)

Table 5 Recoveries and RSDs for spiked samples by liquid-liquid extraction-ELISA (*n* = 6)

样品名称	试样本底质量浓度/(μg/L)	添加水平/(μg/L)	平均测定值/(μg/L)	平均回收率/%	RSD/%
白葡萄酒	ND	1.0	1.15	115	6.38
		2.0	2.34	117	8.37
		5.0	5.96	119	5.96
桃红葡萄酒	ND	1.0	1.08	108	7.32
		2.0	2.19	110	8.10
		5.0	5.64	113	6.33
红葡萄酒	ND	1.0	1.13	113	7.94
		2.0	2.22	111	8.88
		5.0	5.74	115	6.72

由表2～5可知，两种净化手段和两种检测方法的回收率、相对标准偏差(RSD)都能达到要求。其中前处理方法采用液液萃取较免疫亲和柱法的回收率相对偏高，分析可能是由于液液萃取在净化过程中对干扰物质净化不够彻底。但液液萃取对实验条件要求不高、成本低，可适用于大批量葡萄酒样品中OTA的筛查。ELISA法与HPLC-FD法比较，在回收率、精密度方面没有很明显的差别，但ELISA检测由于其操作简单、快速、准确，可大大提高检测效率，当检测到阳性样品时可考虑用液相色谱等其他方法进行确证。

2.5 葡萄酒样品测定

使用液液萃取进行前处理，ELISA检测的组合对法国、西班牙、意大利、智利、澳大利亚、中国等14个国家的18批次、506支葡萄酒样品进行OTA含量检测，结果表明，OTA的含量一般都在0.17～1.60μg/L之间，符合欧盟和国际葡萄与葡萄酒组织关于OTA限量小于2.0μg/L[27]的相关规定。其中西班牙酒有2支检出OTA含量分别为4.632、3.765μg/L，意大利有2支干红葡萄酒检出含量高于1.60μg/L、有2支甜型葡萄酒含量为4.79μg/L和2.44μg/L。对来自中国6个葡萄酒产区的50多支葡萄酒进行检测，均未检出含有OTA。

3 结 论

从时间、成本、操作条件等因素考虑，本实验选用液液萃取的样品前处理方法可以很好地净化样品，在萃取剂的选择上，二氯甲烷比三氯甲烷、四氯化碳更为理想。在净化过程中无论选液液萃取还是过免疫亲和柱，检测方法采用HPLC-FD或ELISA方法，回收率、精密度都能达到检测要求。ELISA方法检测操作简单、检测效率高，更适合大批量样品的初筛。综上所述，大批量葡萄酒样品的筛查建议采用液液萃取前处理结合ELISA方法进行检测的组合作为首选，检测到阳性样品时再用免疫亲和柱净化后用HPLC-FD进行确证，这样的组合方法具有快捷、灵敏、准确等特点，可满足实际检测工作的需要。

参考文献：

[1] ASTA C D, GALAVEMA G, DOSSENA A, et al. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1024: 275-279.

[2] 高翔, 李梅, 张立实. 赭曲霉毒素A的毒性研究进展[J]. 国外医学: 卫生分册, 2005, 32(1): 51-55.

[3] 谢春梅, 王华. 葡萄与葡萄酒中赭曲霉毒素A检测方法研究进展[J]. 酿酒科技, 2007, 153(3): 92-96.

[4] LEITNER A, ZOLLNERA P, PAOLILLO A, et al. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 453: 33-41.

[5] 孙亚宁, 滕蔓, 胡骁飞, 等. 抗赭曲霉毒素A单克隆抗体的制备及免疫学鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 236-240.

[6] 陈兴龙, 徐玲, 刘仁荣, 等. 基于菌体展示技术的赭曲霉毒素A的高密度模拟表位的表达研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 188-192.

[7] 迟蕾, 哈益明, 王峰. γ射线对赭曲霉毒素A的辐照降解与产物分析[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 320-324.

[8] 杜政, 朱之光, 王松雪. 粮食真菌毒素监测预警与处理技术发展现状与趋势[J]. 食品科学, 2012, 33(增刊1): 66-74.

[9] 疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 赭曲霉毒素的产生及鉴别[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 2183-2185.

[10] MONACI L, PALMISANO F, MATRELLA R, et al. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1090: 184-187.

[11] DONALD S M, WILSON P, BARNES K, et al. Ochratoxin A in dried vine fruit:method development and survey[J]. Food Additives and Contaminants, 1999, 16(6): 253-260.

[12] JORGENSEN K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A[J]. Food Additives and Contaminants, 1998, 15(5): 550-554.

[13] 邱元青, 王伟, 李凤琴. 化学发光酶免疫分析法检测食品中赭曲霉毒素[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 432-435.

[14] 杨超, 林洪, 张辉珍, 等. 免疫亲和柱净化高效液相色谱检测啤酒中赭曲霉毒素A[J]. 分析与检测, 2007, 33(12): 127-129.

[15] 傅武胜, 邱文倩, 郑奎城, 等. 药食两用类食品中赭曲霉毒素A的高效液相色谱-荧光检测方法[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 298-302.

[16] 孙林超. 免疫亲和柱-高效液相色谱在白酒赭曲霉毒素A检测中的应用[J]. 酿酒科技, 2007(3): 92-95.

[17] 杨琳, 张宇昊, 马良. 高效液相色谱法同时检测粮谷中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 250-254.

[18] 史娜, 路勇, 吴颖, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测食品中赭曲霉毒素A[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 260-263.

[19] 马莉, 李珊, 牛凌梅, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测啤酒中赭曲霉毒素A[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1345-1346.

[20] REBECA R, MARIA I V, ELENA G P, 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, 1217: 8249-8256.

[21] ZHENG Zhongming, HANNEKEN J, HOUCHINS D, et al. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC[J]. Mycopathologia, 2005, 159: 265-272.

[22] 宗楠, 李景明, 张柏林. 检测葡萄酒中赭曲霉毒素A的SPE-HPLC方法优化[J]. 中国酿造, 2011(4): 32-35.

[23] TESSINI C, MARDONES C, VONBAER D, et al. Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of ochratoxin A in wine using fluorescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 660: 119-126.

[24] FLAJS D, DOMIJAN A M, IVIC D, et al. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia[J]. Food Control, 2009, 20: 590-592.

[25] 陈杰, 莫艳霞, 徐银君, 等. 进口葡萄酒中赭曲霉毒素A的含量分析[J]. 酿酒科技, 2012(1): 107-109.

[26] SAEZ J M, MEDINA A,GIMENO-ADELANTADO J V, et al. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1029: 125-133.

[27] 欧盟委员会. CE 1881—2006 食品中特定污染物的最大限量[S].