固相萃取法萃取葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的方法研究

谢春梅[a],李倩倩[b],王 华[a]

(西北农林科技大学 a. 葡萄酒学院,b. 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】建立葡萄酒中赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A,OTA)的固相萃取方法。【方法】分析了固相萃取小柱的活化方法、淋洗液、洗脱溶剂对萃取葡萄酒中 OTA 的影响,选择出最佳的参数后进行精密度与准确度试验。【结果】葡萄酒中 OTA 的固相萃取方法:C_{18} 固相萃取柱(简称 C_{18}-SPE 柱)经 5 mL 甲醇、5 mL 双蒸水活化后,进样 10 mL,先用 1 mL 双蒸水淋洗,充分干燥后,用 5 mL 乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液并真空旋转蒸发至干,1 mL 流动相溶解残渣待测。【结论】得到了萃取葡萄酒中 OTA 的固相萃取方法,此方法的平均回收率为 88.2%~100.9%,变异系数为 0.93%~2.19%,且具有操作简单,成本低,分析速度快等优点。

[关键词] 赭曲霉毒素 A;葡萄酒;固相萃取;乙酸乙酯

[中图分类号] O652.6;TS262.6 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)12-0187-05

Research on solid-phase extraction of ochratoxin A from wine

XIE Chun-mei[a], LI Qian-qian[b], WANG Hua[a]

(*a. College of Enology; b. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 A basic method of Solid-phase Extraction(SPE) for extracting Ochratoxin A (OTA) from wine was established. 【Method】 Factors, including various ways of activity, washing solution, elution, on extracting Ochratoxin A were valued and simultaneously suitable related parameters were selected and evaluated for precision and accuracy. 【Result】 10 mL wine was firstly brought into the C18 cartridge which was previously activated by 5 mL methanol and 5 mL water, later, flushed with 1mL water, then, after entirely dried, eluted with 5 mL ethyl acetate. The eluent was collected and evaporated till dry, and the residue was dissovled with 1 mL of mobile phase for determination. 【Conclusion】 The recoveries of this method were between 88.2% and 100.9%, and coefficient of variation varied from 0.93% to 2.19%. This method is characterized with an ideal attribute of simplicity, low cost and rapid analysis.

Key words: Ochratoxin A; wine; solid-phase extraction; ethyl acetate

赭曲霉毒素是曲霉属和青霉属的某些菌种产生的一组有毒代谢产物,共有 7 种化合物,其中赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A,简称 OTA)对多种动物具有肾脏毒性、肝脏毒性、免疫毒性、致畸和致癌性,国际癌症研究机构 IARC 将其确定为ⅡB 类致癌物[1]。据报道,OTA 广泛存在于谷类、豆类、花生、香料、干果和咖啡豆中,在饮料中(如啤酒、葡萄酒和葡萄汁)也已检测到 OTA 的存在[2]。据报道,葡萄酒中 OTA 的含量一般为 0.01~3.4 μg/kg,甜酒中为 1~3.9 μg/kg;葡萄汁中 OTA 含量较高,达 1.16~2.32 μg/kg;而葡萄干中 OTA 含量更高,一般超过 40 μg/kg[2-3]。

* [收稿日期] 2007-12-13
[基金项目] 陕西省"13115"科技创新工程重大科技专项计划项目(2007ZDKG-09)
[作者简介] 谢春梅(1981-),女,宁夏盐池人,硕士,主要从事葡萄酒安全研究。
[通讯作者] 王 华(1959-),女,河北阜城人,教授,博士,博士生导师,主要从事葡萄与葡萄酒研究。
E-mail:wanghua@nwsuaf.edu.cn

随着人们生活水平的提高及对葡萄酒消费水平的日益增长，葡萄酒安全问题日趋成为人们关注的焦点，开展对葡萄酒中 OTA 的检测工作势在必行。关于葡萄酒中 OTA 的测定方法在欧洲各国已有报道[4-15]，并且已有相应的检测及限量标准。目前，OTA 的检测技术发展比较快，并呈现出快速、全面、低耗的发展趋势。

目前，国内各地检验检疫机构均采用免疫亲和柱层析净化、荧光光度法或液相色谱法检测 OTA，该方法方便快速准确，符合国际标准[16]。虽然免疫亲和柱具有选择性高、特异性强、样品回收率高的优点，但其价格昂贵，成本较高；而固相萃取柱价格相对便宜，有机试剂用量少，且能获得较高的回收率。因此，本试验用固相萃取柱——C_{18}-SPE 柱进行样品的前处理，采用高效液相色谱荧光检测法检测 OTA，建立一种基于固相萃取柱的，简便、快速、灵敏、准确检测葡萄酒中 OTA 的方法，旨在为葡萄酒品质的提高提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

赤霞珠干红葡萄酒，由西北农林科技大学葡萄酒学院提供。

1.2 试　剂

试验用水均为双蒸水；甲醇、乙腈均为色谱纯，由天津科密欧化学试剂有限公司生产；三氯甲烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、磷酸、冰乙酸均为分析纯，由西安化学试剂厂生产；OTA 固体标准品，纯度为 99%，购于瑞士 ALEXIS　BIOCHEMICALS 公司。

OTA 标准储备液的配制：将 1 mg OTA 标准品用色谱级甲醇完全溶解，定容至 50 mL。置－20 ℃条件下避光保存。

OTA 标准准备液的配制：取 0.5 mL OTA 标准储备液，用流动水-乙腈-冰乙酸混合液（V(水)：V(乙腈)：V(冰乙酸)＝99：99：2）相定容至 100 mL。避光保存于 4 ℃冰箱备用。

1.3 主要仪器

主要仪器包括美国 Supelco ENVI™-18 固相萃取小柱（C_{18}-SPE 柱，填料质量 500 mg，柱容量 3 mL）；美国 Supelco 固相萃取装置；日本岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪（配 RF-10AXL 荧光检测器）；上海 SENCO　恒温水浴锅；Millpore-Q 型自动双重纯水蒸馏器等。

1.4 试验方法

1.4.1　C_{18}-SPE 柱固相萃取的流程　C_{18}-SPE 柱预处理（活化）→添加样品→淋洗固相柱（1 mL 淋洗液）→干燥固相柱→洗脱分析物（流速控制在 1～2 滴/s）→洗脱液干燥（35 ℃真空旋转蒸发至干）→残渣用 1 mL 流动相溶解→滤膜过滤（有机相 0.22 μm）→保存待测。空白试验为未加 OTA 标准品的赤霞珠干红葡萄酒。

1.4.2　高效液相色谱荧光法的检测条件　反相 C_{18} 色谱柱（柱长 150 mm，内径 4.6 mm，填料直径 5 μm）；流动相为水-乙腈-冰乙酸混合液（V(水)：V(乙腈)：V(冰乙酸)＝99：99：2），pH 3.2；流速 1.0 mL/min；荧光检测：激发波长 330 nm，发射波长 460 nm；柱温：室温；进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 OTA 标样的测定及标准曲线的制作

分别取 OTA 标准准备液 0.1，0.25，0.5，2.0 和 10.0 mL，用流动相定容至 10 mL，即配制成质量浓度分别为 1.0，2.5，5.0，20.0，100.0 ng/mL 的 OTA 标准溶液，按液相色谱法条件进样。以 OTA 质量浓度 Y 对峰面积 X 作回归分析（表 1），线性方程为：Y＝0.000 1X－0.261 9，相关系数 r^2＝1.000。结果表明，OTA 在 1.0～100.0 ng/mL 线性关系良好。OTA 标品的保留时间为 8.254 min（图 1）。

表 1　OTA 不同标准溶液的质量浓度与峰面积

Table 1　Different mass concentrations of OTA and the peak areas

质量浓度/(ng·mL^{-1}) Mass concentration	峰面积/(μV·s) Peak area	质量浓度/(ng·mL^{-1}) Mass concentration	峰面积/(μV·s) Peak area
1.0	11 608	20.0	161 798
2.5	21 895	100.0	794 537
5.0	39 030		

2.2 固相萃取方法的建立

2.2.1　活化方法的选择　为了保证良好的萃取重现性，固相柱必须用适当的溶液进行预处理，使其得到活化，展开碳氢键，增加与分析物作用的表面积。同时可以对固相柱进行清洗，除去柱上吸附的对分析有影响的杂质[17-18]。

本试验根据文献[6，12，19-20]选择了 3 种常用的活化方法，即① 5 mL 甲醇、5 mL 双蒸水依次淋洗固相柱；② 3 mL 甲醇、3 mL 双蒸水、3 mL 体积分数 10%乙醇水溶液（pH＝3.0；体积分数 85%磷酸调节）依次淋洗固相柱；③ 5 mL 乙腈、5 mL 双蒸

水依次淋洗固相柱。

比较试验结果表明，3 种活化液都能保证良好的萃取重现性，结合低耗、可操作性强和高回收率的原则，本试验选择第一种活化方法。

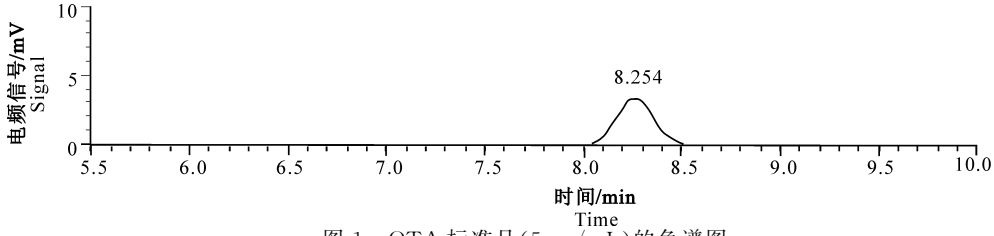

图 1　OTA 标准品(5 ng/mL)的色谱图

Fig. 1　Chromatogram of 5 ng/mL OTA standard sample

2.2.2　淋洗液的选择　淋洗液可以冲洗管壁上的小液滴，使样品全部进入固定相，并洗去干扰组分。选择适当的淋洗液可以洗脱吸附力弱的杂质，保留分析物于柱上[18]。根据参考文献[6,12,19]，本试验选择常用的双蒸水和体积分数 10% 乙醇水作为淋洗液进行分析，结果表明，杂峰对 OTA 色谱峰的干扰都较大，但经过双蒸水淋洗的处理液色谱图中杂峰的干扰相对较小。这是因为淋洗液只能起到去除部分干扰杂质的作用，对于一些吸附能力强的杂质无法起到洗脱作用。考虑到操作的简便性和成本，选择双蒸水作为淋洗液。

2.2.3　洗脱溶剂的选择　结合 OTA 的萃取方法资料[6,12,19-21]，选择常用的甲醇、乙腈、二氯甲烷-甲醇混合液(V(二氯甲烷)∶V(甲醇)=3∶1)作为洗脱溶剂，对加标质量浓度为 0.5 ng/mL 干红葡萄酒进行 OTA 回收率的测定。采用这 3 种洗脱溶剂的最终处理样品均呈紫红色，且色谱图均显示有大量的杂质峰干扰目标峰，初步推测干扰组分为色素。因此，应用了不溶色素和微溶色素的有机溶剂，即二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯作为洗脱溶剂，进行 OTA 回收率试验，结果见表 2。表 2 显示，除二氯甲烷外，其余洗脱溶剂由于回收率均接近 100%，回收率结果良好。

表 2　选择洗脱溶剂的 OTA 回收率试验结果

Table 2　Results of OTA eluted by different solutions

洗脱溶剂 Elution	回收率/% Recovery rate	洗脱溶剂 Elution	回收率/% Recovery rate
甲醇 Methanol	91.5	三氯甲烷 Chloroform	100.0
乙腈 Acetonitrile	88.4	二氯甲烷 Dichloromethane	130.1
二氯甲烷∶甲醇(3∶1) Dichlormethane∶Methanol(3∶1)	98.1	乙酸乙酯 Ethyl acetate	103.02

三氯甲烷和乙酸乙酯作为洗脱溶剂所得的 OTA 色谱图见图 2。

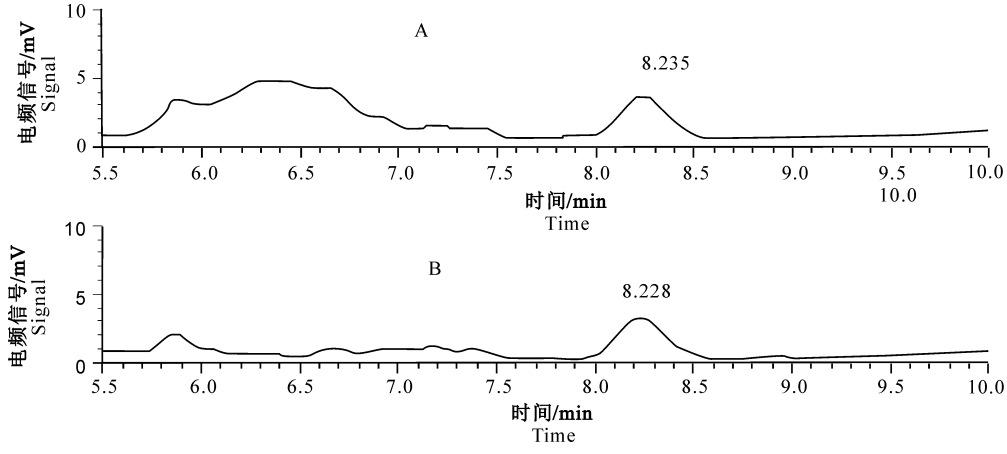

图 2　三氯甲烷(A)和乙酸乙酯(B)作为洗脱溶剂所得的 OTA 色谱图

Fig. 2　Chromatogram of OTA residues eluted by chlorlform (A) and ethyl acetate (B)

综合比较色谱图效果(图 2)，三氯甲烷和乙酸乙酯为洗脱溶剂时，OTA 色谱峰的基线平稳，峰形对称，周围的杂峰较少，保留时间分别为 8.235 和 8.228 min，变化在 5% 以内，是比较理想的洗脱溶剂。考虑到三氯甲烷价格较高、毒性较大，最终选择乙酸乙酯作为洗脱溶剂。

2.3　固相萃取方法及其精密度与准确度的试验

2.3.1　建立的固相萃取方法　综合以上结果，最后

建立的固相萃取方法为：固相萃取小柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 双蒸水活化后，取 10 mL 葡萄酒样品通过固相萃取小柱，流速控制在 1～2 滴/s，用 1 mL 双蒸水淋洗，淋洗完毕后用微弱空气将柱子吹干，再用 5 mL 乙酸乙酯洗脱，收集洗脱液。将收集的洗脱液于 35℃真空旋转蒸发至干（或压缩空气吹干）。残渣用 1 mL 流动相溶解，0.22 μm 微孔滤膜过滤，4℃避光保存待测。

2.3.2 回收率及精密度试验 以未检出 OTA 的样品为本底，制备加标质量浓度为 0.5 ng/mL 的葡萄酒样品，按本研究建立的固相萃取方法处理，并按 1.4.2 的色谱条件测定。重复 6 次，其结果如表 3 所示。表 3 显示，OTA 的平均回收率为 97.1%，变异系数为 1.31%。根据 Horwitz 方程，该质量浓度条件下变异系数的典型值为 1.11%～1.49%，因此本研究建立的固相萃取法精密度高。

表 3 OTA 固相萃取法的回收率及精密度试验结果

Table 3 Results of recovery rate and precision tests of OTA

测定次数 No.	样品量/mL Sample dosage	回收率/% Recovery rate	平均回收率/% Average recovery rate	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
1	10	99.2			
2	10	97.0			
3	10	97.8	97.1	1.27	1.31
4	10	97.0			
5	10	95.0			
6	10	96.5			

2.3.3 回收率及准确度试验 以未检出 OTA 的样品为本底，分别制备加标质量浓度为 0.1，0.25，0.5 ng/mL 的干红葡萄酒，按本研究建立的固相萃取方法处理，并按 1.4.2 的色谱条件测定，重复 3 次，其结果如表 4 所示。表 4 显示，本研究建立的固相萃取法回收率高，变异系数小，精确度高，平均回收率为 88.2%～100.9%，变异系数为 0.93%～2.19%。

表 4 OTA 固相萃取法的回收率及准确度试验结果

Table 4 Results of recovery rate and accuracy tests of OTA

质量浓度/(ng·mL^{-1}) Mass concentration	回收率/% Recovery rate			平均回收率/% Average recovery rate	变异系数/% Coefficient of variation
	1	2	3		
0.1	99.0	104.0	99.8	100.9	2.19
0.25	85.6	90.1	89.0	88.2	2.17
0.5	97.0	97.8	99.2	98.0	0.93

3 结 论

与中国国家标准 GB/T 5009.96－2003《谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定》[21] 中的液液萃取法相比，本研究建立的固相萃取法容易达到定量萃取，快速和自动化，能避免液液萃取法所带来的定量分析回收率低、玻璃器皿易碎和产生大量的有机废液等诸多问题，具有可显著减少溶剂用量、减少样品预处理过程、加快样品处理速度、消除某些干扰杂质等优点。

马莉等[20] 采用 C_{18}-SPE 柱、以乙腈作为洗脱溶剂的方法萃取葡萄酒中 OTA，与该方法相比，本研究建立的方法采用了毒性较小的乙酸乙酯，成本低，并且精确度较高。

采用本研究所得到的固相萃取方法萃取葡萄酒中的 OTA 后，萃取液进行高效液相色谱荧光检测法测定，平均回收率可达 88.2%～100.9%，结果精密度高，重现性好，可作为实验室测定葡萄酒中 OTA 含量理想的准确定量方法。

[参考文献]

[1] 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：卫生学分册，2005，32(1)：51-55.
Gao X，Li M，Zhang L S. Research advances of the toxicity and contamination of ochratoxin A [J]. Foreign Medical Sciences：Section of Hygiene，2005，32(1)：51-55. (in Chinese)

[2] Battilani P，Pietri A. Ochratoxin A in grape and wine [J]. European Journal of Plant Pathology，2002，108：639-643.

[3] Varga J，Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products [J]. Trends in Food Science & Technology，2006，17：72-81.

[4] Zimmerli B，Dick R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood，serum，milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup：methodology and Swiss data [J]. Journal of Chromatography B，1995，666：85-

99.

[5] Serra R, Mendona C, Abrunhosa L, et al. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 513: 41-47.

[6] Jornet D, Busto O, Guasch J. Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 882: 29-35.

[7] González-Peñas E, Leache C, López de Cerain A, et al. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine [J]. Food Chemistry, 2006, 97: 349-354.

[8] Aresta A, Vatinno R, Palmisano F, et al. Determination of ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1115: 196-201.

[9] Siantar D P, Halverson C A, Kirmiz C, et al. Ochratoxin A in wine: survey by antibody and polymeric-based SPE columns using HPLC/fluorescent detection [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54, 170-177.

[10] Dall'Asta C, Galaverna 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.

[11] Visonti A, Pascale M, Centonze G. Dertermination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleannup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study [J]. Journal of AOAC International, 2001, 84(6): 1818-1827.

[12] Berente B, Móricz Á, Klára H, et al. Determination of ochratoxin A in Hungarian wines [J]. Microchemical Journal, 2005, 79: 103-107.

[13] Blesa J, Soriano J M, Moltó J C, et al. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of valencian community (Spain) [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1054: 397-401.

[14] Brera C, Grossi S, De Santis B, et al. Automated HPLC method for the determination of ochratoxin A in wine samples [J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2003, 26(1): 119-133.

[15] Ratola N, Martins L, Alves A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 513: 319-324.

[16] 上海市技术标准专项项目管理办公室. 上海市技术标准专项工作简报 [EB/OL]. 2006-02. http://www.cnsis.info/technicoffice/default01.jsp.
Management Office for Shanghai Technical Standard Project. A brief of Shanghai technical standard work [EB/OL]. 2006-02. http://www.cnsis.info/technicoffice/default01.jsp. (in Chinese)

[17] 楼蔓藤, 商振华. 固相萃取技术的发展与应用 [J]. 分析仪器, 1998(1): 1-6.
Lou M T, Shang Z H. Development and applications of solid phase extraction techniques [J]. Aanalytical Instrumentation, 1998(1): 1-6. (in Chinese)

[18] 赖宇红, 陈浩桉. 固相萃取法在中药分析中的应用前景及其建立优化新方法的策略与步骤 [J]. 广东药学, 2002, 12(2): 116.
Lai Y H, Chen H A. The prospects of applying solid phase extraction to the analysis of traditional Chinese medicine and discussing the strategy and procedure of developing a new SPE method [J]. Guangdong Pharmaceutical, 2002, 12(2): 116. (in Chinese)

[19] Leitner L, Zöllner P, Paolillo A, et al. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 453: 33-41.

[20] 马 莉, 康维钧, 陈 庆, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测葡萄酒中的赭曲霉毒素 A [J]. 分析试验室, 2007, 26(4): 81-84.
Ma L, Kang W J, Chen Q, et al. Determination of ochratoxin A in wine by high performance liquid chromatography with solid phase extraction [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2007, 26(4): 81-84. (in Chinese)

[21] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.96—2003 谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 5009.96—2003 Determination of ochratoxin A in cereals and soybeans [S]. Beijing: Standards Press of China, 2005. (in Chinese)