

刘海波,刘建利,贾 沙. ICA-HPLC 检测枸杞中赭曲霉毒素 A 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):347-349.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.102

ICA-HPLC 检测枸杞中赭曲霉毒素 A 提取方法的比较

刘海波¹,刘建利^{1,2},贾 沙¹

(1.北方民族大学生物科学与工程学院,宁夏银川 750021; 2.宁夏葡萄与葡萄酒技术创新中心,宁夏银川 750021)

摘要:对免疫亲和柱-高效液相色谱法(ICA-HPLC)测定枸杞中赭曲霉毒素 A(OTA)的提取方法进行研究。对 4 种提取液[0.1 mol/L 正磷酸:甲醇:水(1:10:4),0.1 mol/L 正磷酸:甲醇(1:10),甲醇:水(4:1),2% NaHCO₃:15% NaCl(1:1)]提取下枸杞干果中 OTA 含量的回收率进行对比和差异性分析,对最佳方法做准确度和精密度试验,并用此方法检测宁夏市场枸杞 OTA 污染情况。结果显示,0.1 mol/L 正磷酸:甲醇(1:10)为最佳提取液,回收率为 61.5%~77.19%,变异系数为 2.22%~2.83%;以 0.1 mol/L 正磷酸:甲醇(5:50)为提取液,ICA-HPLC 法测定枸杞干果中 OTA 方法稳定、可靠;宁夏市场枸杞 OTA 检测结果显示不存在污染。

关键词:宁夏枸杞;赭曲霉毒素 A;免疫亲和柱;高效液相色谱法

中图分类号:S567.1⁺90.1;R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)07-0347-03

赭曲霉毒素 A(OTA)是一类真菌毒素,主要由赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)和纯绿青霉(*Penicillium viridicatum*)产生的有毒代谢产物,对人及多种动物具有肾脏毒性、肝脏毒性、免疫毒性、致畸毒性和致癌性,国际癌症研究机构 IARC 将其确定为 2B 类致癌物^[1-4]。OTA 污染范围较广,可污染粮食谷物、蔬果、干果、调味料、啤酒、葡萄酒及中草药材等,严重影响人们的农业生产和食品安全^[5]。

宁夏枸杞已有 600 多年的栽培历史,全区枸杞种植面积 2.97 万 hm²,枸杞产品种类主要有枸杞干果、枸杞鲜果、枸杞鲜汁、枸杞粉、枸杞酒等^[6]。由于枸杞具有多糖、含水率高、表皮有蜡质层等特性,使得枸杞鲜果制干时间较长,致使其易发生霉变。研究表明,一般情况下,采摘后的枸杞鲜果不经任何处理,3 d 后霉变可高达 50%~80%,严重影响枸杞干果的产量和质量^[7-8]。目前,关于 OTA 纯化和测定方法的研究已经较为深入,但现有的提取方法很多,不同样品提取方法不尽相同,目前枸杞干果中 OTA 的研究未见报道,因此建立一种枸杞干果中 OTA 的提取方法具有重要意义。

本研究采用有机溶剂和碳酸氢钠等溶液为提取液提取枸杞干果中的 OTA,从回收率、精密度、准确度等角度进行分析,找出一种简便高效的提取枸杞干果中 OTA 的方法,为宁夏枸杞安全生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

固相萃取装置(美国 Varian);CY-200 电动粉碎机(台

州市新恩精密量仪器有限公司);赭曲霉毒素免疫亲和柱 IC CF-04(北京泰乐祺科技有限公司);高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200Series,美国 Agilent);荧光检测器(Agilent Technologies 1200Series,美国 Agilent);反相 C₁₈柱(pH 值 2~12,美国 Agilent);Empower Software 色谱数据处理系统(美国 Agilent);微量移液枪(德国 Eppendorf)。

1.2 试剂

OTA 标准品(纯度>99%,Fermentek 公司);乙腈和甲醇(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);其他试剂均为化学纯。

OTA 标准储备液的配制:1 mg OTA 标准品用甲醇完全溶解,定容至 50 mL(浓度 20 μg/mL,-20℃避光保存)。

OTA 标准工作液的配制:取 2.5 mL OTA 标准储备液,用甲醇定容至 50 mL(浓度 1 μg/mL,4℃避光保存)。

样品:宁夏枸杞干果购自银川市同心路枸杞批发市场。

1.3 方法

样品准备(粉碎、称量、加标)→提取→免疫亲和柱净化→高效液相色谱仪检测。

1.3.1 提取 用粉碎机将干燥后的枸杞干果粉碎,取粉碎后的枸杞样品 25 g,分别加入 100 mL 0.1 mol/L 正磷酸:甲醇:水(1:10:4)^[9-10]、0.1 mol/L 正磷酸:甲醇(1:10)^[11-12]、甲醇:水(4:1)^[13,15]、2% NaHCO₃:15% NaCl(1:1)^[16-19]等 4 种提取液,高速搅拌 3 min,15 000 r/min 离心 10 min,上清液用 1.2 μm 滤膜过滤,取 15 mL 滤液用 0.01 mol/L PBS 稀释定容至 100 mL,即为 OTA 提取液。

1.3.2 净化 免疫亲和柱净化方法参照孙林超等的方法^[14-15],并适当修改:(1)ICA 柱活化。冰箱中取出免疫亲和柱使之恢复到室温,流尽保护液,使 2~3 mL 空气通过柱体。(2)上样。取 20 mL OTA 提取液过柱,流速控制在 20~30 滴/min。(3)淋洗。先用 5 mL PBS(pH 值 7.2~7.4)淋洗,再用 5 mL 超纯水淋洗,弃去洗脱液,使 2~3 mL 空气通过柱体。(4)洗脱。用 6 mL 甲醇分 3 次洗脱(每次加入 2 mL 甲醇后孵育 5 min 再进行洗脱)。合并洗脱液用氮气吹干,用 1 mL 色谱流动相溶解,0.22 μm 有机系滤膜过滤至样液瓶

收稿日期:2015-06-08

基金项目:北方民族大学自主科研项目(编号:2014XBZ14);国家自然科学基金(编号:31460212)。

作者简介:刘海波(1990—),男,内蒙古赤峰人,硕士研究生,主要从事植物生理生态研究。E-mail:liuhaibo90416@163.com。

通信作者:刘建利,副教授,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail:lj17523@126.com。

中,供 HPLC 检测。

1.3.3 HPLC - FD 检测方法 色谱条件:参考 AOAC2001 方法^[19-20]。反相 C₁₈ 柱 (Eclipse XDB - C₁₈ 分析柱, 5 μm, 4.6 mm × 150 mm); 流动相为乙腈: 双重水: 冰乙酸 = 99: 99: 2, pH 值 = 3.2; 流速 1.0 mL/min; 荧光检测条件为激发波长 330 nm, 发射波长 460 nm; 进样量 20 μL。

1.3.4 加标回收率计算方法

回收率 = (加标样品测定值 - 空白样品测定值) / 理论加标浓度 × 100%。

1.3.5 OTA 含量计算公式

$$X = \frac{A \times C \times V}{A_m \times m}$$

式中: X 为宁夏枸杞子中 OTA 含量, ng/g; A 为样液 OTA 峰面积; A_m 为标准液 OTA 峰面积; C 为标准液 OTA 的浓度, ng/mL; V 为处理后的最终样液体积, mL; m 为最终样液相当的试样质量, g。

2 结果与分析

2.1 线性范围和检测限

取 OTA 标准工作液, 以流动相为溶剂, 分别配制浓度为 2、3、5、10、20、60、100 ng/mL 的 OTA 标准液, 按高效液相色谱法条件进行检测, 每个标准浓度分别检测 5 次, 取平均值。以峰面积对 OTA 质量浓度 C (ng/mL) 进行回归分析, 线性方程为 $y = 1.3114x + 0.2863$, 相关系数 $r^2 = 0.9990$, 结果表明 OTA 在 2.0 ~ 100.0 ng/mL 范围内线性关系良好 (图 1)。OTA 标品的保留时间为 7.023 min (图 2)。以 3 倍信噪比确定最低检出限为 0.27 ng/mL。

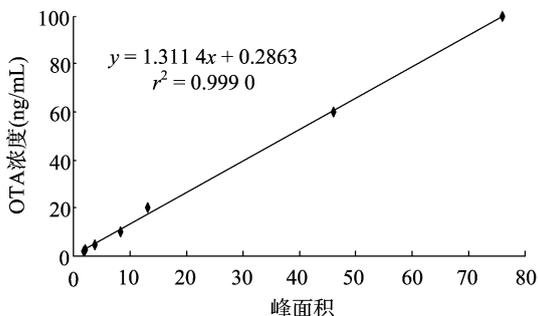


图1 HPLC 检测 OTA 标准曲线

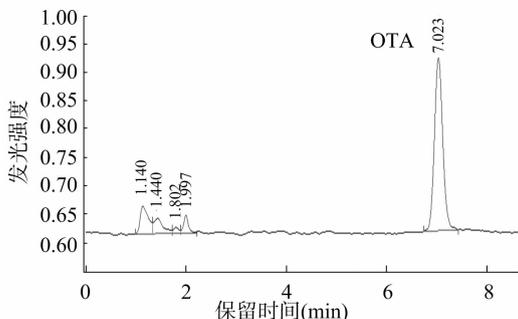


图2 OTA 标准品 (5 ng/mL) 的色谱图

2.2 不同提取液结果比较

称取 25 g 枸杞样品, 加入 OTA 标准工作液 (1 μg/mL) 50 μL, 分别采用 4 种提取液提取, 采用 ICA - HPLC 检测, 重复 3 次, 结果见表 1, 以正磷酸: 甲醇 (1: 10) 为提取液回收

率最高, 达 77.19%, 变异系数最低, 达 2.25%, 比以正磷酸: 甲醇: 水 (1: 10: 4)、甲醇: 水 (4: 1)、2% NaHCO₃: 15% NaCl (1: 1) 为提取液回收率分别高 0.43、27.93、36.07 百分点; 结果表明正磷酸: 甲醇 (1: 10) 为最佳提取液; 不同测定方法之间存在显著差异 ($P > 0.05$), 说明提取方法影响回收率的测定。因此, 后续试验中提取液均采用正磷酸: 甲醇 (1: 10)。

表 1 4 种提取方法的回收率结果分析

提取液	加标量 (ng/g)	测定浓度 (ng/g)	回收率 (%)	变异系数 (%)
0.1 mol/L 正磷酸: 甲醇: 水 (1: 10: 4)	2	1.535 09	76.76 ± 8.9a	11.61
0.1 mol/L 正磷酸: 甲醇 (1: 10)	2	1.543 84	77.19 ± 1.7a	2.25
甲醇: 水 (4: 1)	2	1.231 45	49.26 ± 1.4b	2.84
2% NaHCO ₃ : 15% NaCl (1: 1)	2	0.822 31	41.12 ± 7.0b	16.99

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

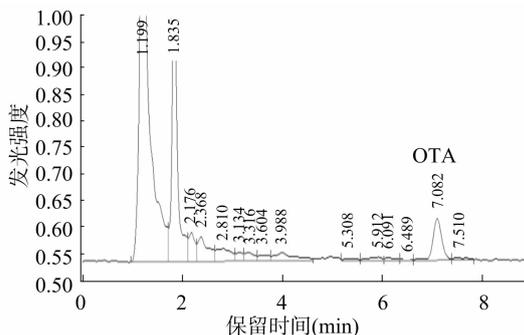


图3 正磷酸: 甲醇 (1: 10) 为提取液 (样品加标 2 ng/g) 的色谱图

2.3 精密度试验

制备加标浓度为 2 ng/g 的加标样品, 用正磷酸: 甲醇 (1: 10) 提取, 采用 ICA - HPLC 法检测, 重复 3 次, 平均回收率为 77.19%, 标准差为 1.74 ng/g, 变异系数为 2.25% (表 2), 说明该方法精密度高, 稳定性和重复性满足要求。

表 2 ICA - HPLC 方法回收率与精密度试验

测量次数	测定浓度 (ng/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	标准差 (ng/g)	变异系数 (%)
1	1.504	75.2			
2	1.570	78.5	77.19	1.74	2.25
3	1.557	77.8			

2.4 准确度试验

制备加标浓度为 1、2、5 ng/g 的加标样品, 用正磷酸: 甲醇 (1: 10) 提取, 采用 ICA - HPLC 检测, 重复 3 次, 回收率为 61.5% ~ 77.19%, 变异系数为 2.22% ~ 2.83% (表 3), 说明该方法回收率高, 准确度能满足试验要求。

表 3 ICA - HPLC 方法回收率与准确度试验

加标浓度 (ng/g)	加标后测定浓度 (ng/g)	平均回收率 (%)	变异系数 (%)
1	0.614 99	61.50 ± 1.4	2.22
2	1.543 84	77.19 ± 1.7	2.25
5	3.193 57	63.79 ± 1.5	2.38

2.5 宁夏枸杞中 OTA 含量测定

随机抽取 10 份不同品种的市售宁夏枸杞进行检测, 结果

均未测得 OTA 存在,图4 为市售样品“宁夏枸杞”的检测色谱图示。

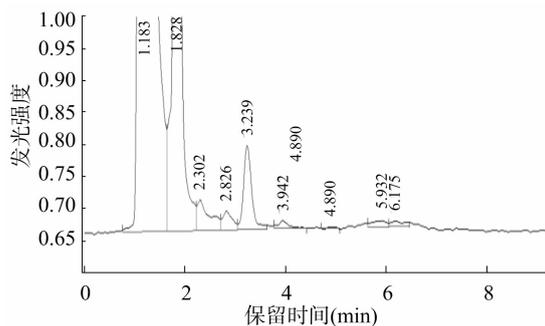


图4 “宁夏枸杞”样品中 OTA 含量的色谱图

3 结论与讨论

提取是 OTA 测定的重要步骤之一,不仅要依据 OTA 的理化性质选择不同的提取试剂,同时还要考虑样品性质。OTA 溶于极性溶剂和稀碳酸氢钠溶液,微溶于水^[3],因此本试验选择甲醇、稀碳酸氢钠溶液等作为提取溶剂。本试验4种提取方法中得到的 OTA 回收率略低,原因可能与枸杞性质和免疫亲和柱净化有关。首先枸杞的基质非常复杂,OTA 可以与基质中的大分子如糖类、纤维素、蛋白质等结合,从而导致提取过程中 OTA 损失较大;其次净化是 OTA 进行 HPLC 检测的重要前提,对于少量 OTA 的基质净化,免疫亲和萃取净化法是目前较好的方法^[14]。免疫亲和柱具有高度特异性的优点,使用时不需要活化,但是上样液中有有机溶剂含量要严格控制,甲醇体积分数不得超过 20%,否则将影响 OTA 抗原抗体的结合反应^[16]。另外,在甲醇提取过程中,一些与赭曲霉毒素结构相似的有机小分子诸如黄酮、色素、芳香物质等也被提取出来,这些物质可能会与抗原 OTA 竞争抗体上的结合位点,从而影响免疫亲和柱净化的回收效率,因此在保证较高净化纯度的同时回收率可能就不太理想,从加标样的色谱图中就可以反映出这一点。

本研究中宁夏市场枸杞样品进行检测,均未检出 OTA,可能是因为果农在鲜枸杞制干过程中采用含 NaOH、乙醇、Na₂CO₃、对羟基苯甲酸乙酯及其钠盐、对羟基苯甲酸丙酯钠、过氧化氢和二氧化氯等成分的促干剂、脱蜡剂、防腐剂等,抑制了包括产 OTA 真菌在内的果霉霉菌的生长^[7-8];或商品加工包装过程中枸杞经过严格分拣,去除霉变的枸杞。

正磷酸:甲醇(1:10)溶液作为提取液采用 ICA-HPLC 检测枸杞干果中 OTA 的效果最好,并且研究方法稳定、可靠。对宁夏市场枸杞进行 OTA 检测,均未检测到 OTA 污染。

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.
 [2]丁建英,韩剑众. 赭曲霉毒素 A 的研究进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):112-115.
 [3]刘建利,林勤,王甜甜,等. 一种测定酿酒葡萄中赭曲霉毒素 A 的新方法[J]. 食品与发酵工业,2013,39(9):175-179.
 [4]Abarca M L, Accensi F, Bragulat M R, et al. *Aspergillus carbonarius*

as the main source of ochratoxin a contamination in dried vine fruits from the Spanish market[J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(3):504-506.

[5]杨蕾. 中药中赭曲霉毒素 A 的检测方法研究[D]. 北京:北京协和医学院,中国医学科学院,清华大学医学部,2010:6-9.
 [6]陈玮琳. 枸杞果汁饮料加工及质量控制[D]. 银川:宁夏大学,2013:3-4.
 [7]杜静. 枸杞表皮蜡质及制干技术研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2010:5-8.
 [8]吴古飞. 枸杞干燥过程中防腐剂的开发与应用研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2011:6-8.
 [9]Möller T E, Nyberg M. Ochratoxin a in raisins and currants; basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples[J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(11):1072-1076.
 [10]Macdonald S, 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.
 [11]吕相征,谢妮,李业鹏,等. 用高效液相色谱法测定粮食样品中的赭曲霉毒素 A[J]. 中国医科大学学报,2002,31(4):285-286.
 [12]Serra R, Mendonca 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(1):41-47.
 [13]褚庆华,郭德华,王敏,等. 谷物和酒类中赭曲霉毒素 A 的测定[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2006,29(2):109-117.
 [14]Medina A, Mateo R, López-Ocaña L, et al. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8):4696-4702.
 [15]Galvis-Sánchez A C, Barros A S, Delgado I. Method for analysis dried vine fruits contaminated with ochratoxin A[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 617(1/2):59-63.
 [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, 2009(3):113-115.
 [17]樊祥,褚庆华,周瑶,等. 液-液萃取结合免疫亲和柱层析净化-高效液相色谱测定烘焙咖啡中赭曲霉毒素 A[J]. 理化检验:化学分册, 2008, 44(8):736-739.
 [18]Timperio A M, Magro P, Chilosi G, et al. Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2006, 832(1):127-133.
 [19]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(1/2):196-201.
 [20]Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection; collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 2001, 84(6):1818-1827.