

胶体金技术快速测定葡萄酒中赭曲霉毒素 A

庞世琦, 刘青*, 李志勇, 梁瑞婷, 张子皓

(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广州 510623)

摘要: **目的** 利用胶体金免疫层析技术建立葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的快速筛查方法。 **方法** 样品经过层析、孵育, 通过 iCheck-单卡单测快检仪的图像分析进行定量检测, 同时对进口与市售国产葡萄酒进行筛查。 **结果** 赭曲霉毒素 A 在添加水平为 2.0、5.0 $\mu\text{g/L}$ 时, 红葡萄酒的平均回收率分别为 92.5%、72.0%; 相对标准偏差(RSD, $n=6$)分别为 5.84%、2.59%; 桃红葡萄酒的平均回收率分别为 87.0%、76.6%; 相对标准偏差(RSD, $n=6$)分别为 7.70%、5.56%; 白葡萄酒的平均回收率分别为 84.0%、78.4%; 相对标准偏差(RSD, $n=6$)分别为 5.67%、3.54%。该方法定量限为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 。同时与酶联免疫方法和液相色谱方法比较, 通过 t 检验表明胶体金法不存在系统误差。市售葡萄酒赭曲霉毒素 A 的含量低于欧盟的限量标准(2.0 $\mu\text{g/L}$)。 **结论** 胶体金的方法具有快捷、灵敏、特异性等特点, 适合于大批量葡萄酒样品的现场快速筛查。

关键词: 葡萄酒; 赭曲霉毒素 A; 胶体金免疫层析技术; 快速筛查

Rapid detection of ochratoxin A in wines by gold immunochromatography assay

PANG Shi-Qi, LIU Qing*, LI Zhi-Yong, LIANG Rui-Ting, ZHANG Zi-Hao

(Inspection and Quarantine Technology Center of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,
Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food,
Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the detection of ochratoxin A (OTA) in wines by gold immunochromatography assay (GICA). **Methods** After chromatography and incubation, the samples were quantitatively detected by iCheck-single card single measuring detector, meanwhile some of imported and domestic wines were screened. **Results** The recoveries of OTA spiked at 2 levels of 2.0 and 5.0 $\mu\text{g/L}$ in red wine were 92.5% and 72.0% respectively with the relative standard deviations (RSDs) of 5.84% and 2.59% ($n=6$); in pink wine were 87.0% and 76.6% respectively with the RSDs of 7.70% and 5.56% ($n=6$); and in white wine were 84.0% and 78.4% respectively with the RSDs of 5.67% and 3.54% ($n=6$). The quantification limit of GICA was 1.0 $\mu\text{g/L}$. Compared with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high performance liquid chromatography (HPLC), the results of t -test demonstrated that there was no systematic error in GICA. The results of market wines met the requirements of European Union limit standard (2.0 $\mu\text{g/L}$). **Conclusion** The GICA method is rapid, sensitive and specific, which is suitable for preliminarily on-site screening of OTA in the samples of great batch rapidly.

基金项目: 国家质检总局科技项目 (2016IK050)、广东省科技厅国际合作项目(2013B051000068)、广东省科技厅公益项目(2014A04041065)

Fund: Supported by General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China Project (2016IK050), Guangdong Provincial Department of Science and Technology International Cooperation Project (2013B051000068) and Guangdong Provincial Department of Science and Technology Public Welfare Project (2014A04041065)

*通讯作者: 刘青, 硕士, 主要研究方向为葡萄酒质量安全检测, 色谱、色谱质谱等检测技术应用等。E-mail: gdcicq@163.com.

*Corresponding author: LIU-Qing, Master, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.66, Huacheng Road, Tianhe District, Guangzhou 510623, China. E-mail: gdcicq@163.com

KEY WORDS: wine; ochratoxin A; gold immunochromatography assay; rapid screening

1 引言

赭曲霉毒素(ochratoxin)是曲霉菌属和青霉菌属产生的二级代谢产物,其中赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)在自然界分布最广泛,毒性最强,是一种对肝脏和肾脏的强毒物质,可以导致受试动物的免疫抑制肾萎缩胎儿畸形流产及死亡,并具有高度的致癌、致畸、致突变作用,被国际癌症研究机构定为 2B 类致癌物^[1]。葡萄酒中的 OTA 最早是在 1995 由 Zimmerli 和 Dick 被首次检测出来的^[2],随后澳大利亚、法国、西班牙等许多国家都报道了葡萄酒中 OTA 的存在^[3-5]。2005 年 1 月 1 日欧盟委员会规定葡萄酒以及用于饮料制作的葡萄酒或者葡萄中 OTA 的限量为 2.0 $\mu\text{g/L}$ ^[6]。目前我国只规定了谷类和豆类中 OTA 限量为 5 $\mu\text{g/kg}$,配合饲料为 100 $\mu\text{g/kg}$ ^[7]。对葡萄酒中 OTA 的含量尚未制定相关限量标准,国内也缺乏对葡萄酒中 OTA 的限量及其检测标准方法的相关研究。

赭曲霉毒素 A 常见的分析方法主要有薄层层析法、酶联免疫法、液相色谱法和液相色谱-质谱法等。薄层层析法比较费时,同时需要使用大量的有机试剂而渐渐不被人们所使用;酶联免疫法快速、操作简便,但由于要使用多种仪器而不能满足现场快速检测的要求;液相色谱法和液相色谱-质谱法可以精确地对样品定性和定量分析,但此方法不适用于大批量的样品检测^[8-10]。胶体金免疫层析试纸条检测法是免疫胶体金与固相膜结合发展形成的以膜为固相载体的免疫胶体金快速检测技术,由于操作简单,几分钟内即可通过目视判断检测结果,近年来广泛应用于现场检测^[11-14],但此方法主要应用在谷物、饲料中 OTA 的检测。本研究主要探究胶体金试纸条对葡萄酒样品中赭曲霉毒素的快速定量检测效果,以期将其用于进口和市售国产葡萄酒中赭曲霉毒素的初步筛查。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

iCheck 赭曲霉毒素 A 定量快检卡(葡萄酒)(配备稀释缓冲液 CBS-4), iCheck-单卡单测快检仪(中检维康);恒温箱(BINDER FD53); SW8019 计时器(世运公司); 200 μL 移液枪(吉尔森)。

OTA 标准品: Sigma 公司产品, 10.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 实验方法

取出快检卡、缓冲液和待检样品恢复至室温。将零点校正片插入定量快检仪测定室,点击“零点校正”。将项目电子标定卡插入定量快件卡槽中,点击读取“进行标定”。取 120 μL OTA 稀释缓冲液 CBS-4 于 OTA 微孔板中,加入葡萄酒 30 μL ,用移液枪吸打 5 次混匀,取 100 μL 加入到

快检卡样品孔中。(37 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后,立即将快检卡放入定量快检仪中,点击“分析”读数,即为样品实际浓度。

需要注意的是,此测定方法对反应的温度和时间要求较高,所以在测定过程中必须保证反应温度在(37 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 10 min。

3 结果与分析

3.1 检出限和定量限

根据快检卡的特性,使用该快检卡的测量范围是 0~10 $\mu\text{g/L}$,定量限为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 。如果测定值达到或超过检测范围的上限,将样品用提取稀释液稀释一定的倍数(5 或 10 倍)再测定。最后定量快检仪中读数乘以稀释倍数,即为样品实际浓度。

3.2 方法回收率与精密度

对红葡萄酒、桃红葡萄酒、白葡萄酒 3 种基质进行加标回收实验,设置 2、5 $\mu\text{g/L}$ 两个添加浓度,每个浓度重复 6 次,回收率及相对标准偏差见表 1。结果显示,用胶体金试纸条快速定量测定赭曲霉毒素 A 的方法准确可靠,适合于样品的大批量现场筛查。

3.3 方法关键点控制

此测定方法对反应的温度和时间要求较高,因此在测定过程中必须保证反应温度在(37 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 10 min。由于使用的是单卡单测的快检仪,6 个红葡萄酒加标样品分 6 次逐一测定,为了测试反应时间对结果的影响,再把 6 个加标样品分 2 组,每次同条件下测定 3 个样品,比较发现加标水平为 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 时逐个检测的回收率比同时测定 3 个样品的回收率高(见表 1 与表 2)。结果表明,孵化时间对测试结果影响较大,所以在测定过程中时间的控制很重要,如果条件允许,则配备一个恒温器于快检仪旁,便于样品反应 10 min 后的快检卡能立即放入快检仪进行测定读数,这样能够提高其准确性和稳定性,同时也可选择 2~4 卡同测的快检仪。

3.4 胶体金方法与酶联免疫方法和液相色谱方法比较

为了验证方法的可靠性,即是否存在系统误差,将所得样本的平均值与标准值进行比较,进行 t -检验,同时为了判断 3 个检测方法有无显著性差异,通过不同方法检测的平均值进行 t -检验。利用加标水平为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 的红葡萄酒分别用液相色谱法、酶联免疫法和胶体金法测定的结果进行 t 检验,结果见表 3。其中 t_1 、 t_2 是高效液相法、酶联免疫法分别与胶体金法比较的 t 值,符合 $t < t_{0.05, 10} = 2.228$,表明胶体金法与另两种方法比较均无显著性差异。 t_3 是胶体金法与标准值(加标浓度)比较的 t 值,同时符合 $t < t_{0.05, 5} = 2.571$,表明胶体金法不存在系统误差。

表 1 回收率和精密度测定结果($n=6$)
Table 1 Results of recoveries and precisions ($n=6$)

样品名称	试样本底($\mu\text{g/L}$)	添加水平($\mu\text{g/L}$)	平均测定值($\mu\text{g/L}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
红葡萄酒	ND	2.0	1.85	92.5	5.84
		5.0	3.60	72.0	2.59
桃红葡萄酒	ND	2.0	1.74	87.0	7.70
		5.0	3.83	76.6	5.56
白葡萄酒	ND	2.0	1.68	84.0	5.67
		5.0	3.92	78.4	3.54

ND 表示 not detected.

表 2 回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Recoveries and precisions ($n=6$)

添加水平($\mu\text{g/L}$)	测定值($\mu\text{g/kg}$)	平均测定值($\mu\text{g/L}$)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD 值(%)
5.0	第一组	3.71	74.2	63.8	14.3
		3.46	69.2		
		2.66	53.2		
	第二组	3.57	71.4		
		3.04	60.8		
		2.69	53.8		

表 3 不同方法检测的回收率和精密度结果($n=6$)
Table 3 Recoveries and precisions by different methods ($n=6$)

测定方法	试样本底($\mu\text{g/L}$)	添加水平($\mu\text{g/L}$)	平均值($\mu\text{g/L}$)	平均回收率(%)	RSD(%)	标准偏差 s	S^2	t
液相色谱法	ND	2.0	1.90	95	4.72	0.090	0.0080	0.81(t_1)
酶联免疫法	ND	2.0	1.81	90	6.48	0.117	0.0138	0.38(t_2)
胶体金法	ND	2.0	1.84	92	8.52	0.157	0.0248	2.50(t_3)

ND 表示 not detected.

3.5 葡萄酒样品测定

使用胶体金免疫层析快检卡对不同地区的进口和国产葡萄酒样品进行 OTA 含量测定, 其中法国酒 36 支、西班牙酒 23 支、意大利酒 27 支、南非酒 5 支、智利 7 支、葡萄牙酒 4 支、美国酒 6 支、澳大利亚酒 46 支、新西兰酒 1 支、希腊酒 3 支和国产酒 39 支。结果显示, 西班牙酒有 2 支检出 OTA 含量分别为 1.6 $\mu\text{g/L}$ 和 1.7 $\mu\text{g/L}$, 意大利酒有 1 支检出为 1.2 $\mu\text{g/L}$, 其他国家和中国葡萄酒均小于定量限, 符合欧盟和国际葡萄与葡萄酒组织(International Office of Vine and Wine, 简称 OIV)关于 OTA 限量小于 2.0 $\mu\text{g/L}$ 的相关规定。

4 结 论

胶体金免疫层析法检测 OTA 的方法具有快捷、灵敏、准确等特点, 对实验条件要求不高、成本较低, 检测时间短, 适合于大批量葡萄酒样品的初步筛查。综合考虑, 在检测 OTA 方面, 可使用胶体金作为大批量葡萄酒样品的现场快速筛查, 这既满足保障消费者健康的需求, 又能对进口酒类形成有效屏障。

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]. 国外医学卫生分册, 2005, 32(1): 51-55.

- Gao X, Li M, Zhang LS. Research review of toxicity of ochratoxin A [J]. Foreign Med Health Booklet, 2005, 32(1): 51-55.
- [2] Zimmerli B, Dick R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by HPLC with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity cleanup: Methodology mad Swiss data [J]. J Chromatogr B, 1995, 666: 85-99.
- [3] Asta CD, Galavema G, Dossena A, *et al.* Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine [J]. J Chromatogr A, 2004, 1024: 275-279.
- [4] 江涛, 李凤琴, 王环宇, 等. 赭曲霉毒素 A 免疫学检测方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(5): 556-558.
Jiang T, Li FQ, Wang HY, *et al.* Study on immunoassay for ochratoxin A [J]. Chin J Public Health, 2004, 20(5): 556-558.
- [5] 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, 229(4): 32-35.
Zong N, Li JM, Zhang BL. The optimized procedure of solid-phase extraction with HPLC for the determination of ochratoxin A in wine [J]. China Brew, 2011, 229(4): 32-35.
- [6] Regulation (EC) No 1881/2006 The Commission of the European Communities, EC No 1126/2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products [S].
- [7] GB 2715-2005 食品安全国家标准 粮食卫生标准[S].
GB 2715-2005 National Food Safety Standard Hygienic standard for grains [S].
- [8] 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.
Xie CM, Wang H. Research Advance in the determination methods for ochratoxin A in grape and in grape wine [J]. Liquor-making Sci Technol, 2007, 153(3): 92-96.
- [9] 熊勇华, 陈雪岚, 许杨. 检测赭曲霉毒素 A 的酶联免疫吸附法 (ELISA)体系的建立[J]. 食品科学, 2006, 27(5): 30-35.
Xiong YH, Chen XL, Xu Y. Development of ELISA system to determine ochratoxin A(OTA) [J]. Food Sci, 2006, 27(5): 30-35.
- [10] Leitner A, Zollner P, Paolillo A, *et al.* Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine [J]. Anal Chim Acta, 2002, 453: 33-41.
- [11] 赖卫华, 熊勇华, 陈高明, 等. 应用胶体金试纸条快速检测赭曲霉毒素 A 的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 204-207.
Lai WH, Xiong YH, Chen GM, *et al.* Preparation of colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A [J]. Food Sci, 2005, 26(5): 204-207.
- [12] 舒文祥, 徐炜, 李艳, 等. 胶体金免疫层析法快速检测赭曲霉毒素 A 的研究[J]. 农产品加工, 2011, (10): 53-56.
Shu WX, Xu W, Li Y, *et al.* Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of ochratoxin A [J]. Agrotechny, 2011, (10): 53-56.
- [13] 刘美辰, 李培真, 郭健, 等. 胶体金测试条法对粮食中赭曲霉毒素快速定量测定的研究[J]. 粮食与食品工业, 2013, 20(3): 62-64.
Liu MC, Li PZ, Guo J, *et al.* Study on rapid quantitative detection for ochratoxin in grain with colloidal gold strips method [J]. Cereal Food Ind, 2013, 20(3): 62-64.
- [14] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 232-236.
Deng SL, Lai WH, Xu Y. Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of aflatoxin B₁ [J]. Food Sci, 2007, 28(2): 232-236.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介

庞世琦, 学士, 工程师, 主要研究方向为食品、葡萄酒质量安全检测, 色谱、色谱质谱等检测技术应用等。
E-mail: psqciq@163.com

刘青, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品、葡萄酒质量安全检测, 色谱、色谱质谱等检测技术应用等。
E-mail: gdcicq@163.com