

稳定同位素直接稀释/超高效液相色谱-串联质谱法 测定葡萄酒中赭曲霉毒素 A

王兴龙¹, 蔡强¹, 桂文锋², 蔡增轩³, 许娇娇³, 任一平^{1*}

(1. 浙江清华长三角研究院 分析测试中心, 浙江 嘉兴 314000; 2. 上海师范大学 环境与地理科学学院, 上海 200233; 3. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310000)

摘要: 建立了稳定同位素直接稀释/超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定葡萄酒中赭曲霉毒素 A(OTA)的方法。葡萄酒样品经乙腈-水-甲酸(29.8:70:0.2, 体积比)溶液稀释后, 加入稳定同位素消除基质效应的影响。采用 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离, 以 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈为流动相梯度洗脱, 以电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺)扫描, 多反应监测(MRM)模式采集, 内标法定量。结果表明, OTA 在 0.05~1 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)为 0.999 6, 检出限(LOD, $S/N \geq 3$)为 0.1 μg/L, 定量下限(LOQ, $S/N \geq 10$)为 0.3 μg/L。在 1.00、2.00、5.00 μg/L 加标水平下, 回收率为 102%~113%, 日内相对标准偏差(RSD)为 4.1%~9.4%, 日间 RSD 为 4.4%~9.7%。利用该方法对国产品牌的 15 种红葡萄酒和 5 种白葡萄酒进行测定, 均未检出 OTA。此方法简单、高效、节约成本, 可用于大批量葡萄酒中 OTA 的快速、准确检测。

关键词: 稳定同位素; 直接稀释; 超高效液相色谱-串联质谱; 葡萄酒; 赭曲霉毒素 A

中图分类号: O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)11-1379-05

Analysis of Ochratoxin A in Wine by Ultra High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry with Stable Isotope Direct Dilution

WANG Xing-long¹, CAI Qiang¹, GUI Wen-feng², CAI Zeng-xuan³, XU Jiao-jiao³, REN Yi-ping^{1*}

(1. Analysis and Test Center, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Zhejiang, Jiaxing 314000, China;
2. School of Environmental and Geographical Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200233, China;
3. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310000, China)

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was established for the determination of ochratoxin A (OTA) in wine based on stable isotope direct dilution technique. Samples were diluted with acetonitrile – water – formic acid (29.8 : 70 : 0.2, by volume), and the matrix effects were efficiently compensated with the ¹³C₂₀ – labelled internal standard. The analyte was separated on an ACQUITY BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) by gradient elution with 0.1% formic acid solution and 0.1% formic acid acetonitrile as mobile phases, and then analyzed under multiple reaction monitoring (MRM) mode in ESI⁺ mode. Results showed that there was a good linearity for OTA in the range of 0.05 – 1 μg/L with a correlation coefficient (r^2) of 0.999 6. The limit of detection (LOD, $S/N \geq 3$) and the limit of quantitation (LOQ, $S/N \geq 10$) of the method were 0.1 μg/L and 0.3 μg/L, respectively. Recoveries at three spiked levels of 1.00, 2.00, 5.00 μg/L ranged from 102% to 113%, with intra-day RSDs and inter-day RSDs of 4.1% – 9.4% and 4.4% – 9.7%, respectively. The method was applied in the analysis of OTA in fifteen red wines and five white wines made in China, and OTA was undetected in all wines. The method was simple, effective and low-consumption, and was suitable for the determination of OTA in wine.

Key words: stable isotope; direct dilution; ultra high performance liquid chromatography – tandem

mass spectrometry; wine; ochratoxin A

赭曲霉毒素(Ochratoxin)是一类主要由曲霉菌属(*Aspergillus*)和青霉菌属(*Penicillium*)的真菌产生的次级代谢产物,根据化学结构,可分为赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)、赭曲霉毒素 B(Ochratoxin B, OTB)和赭曲霉毒素 C(Ochratoxin C, OTC)。其中 OTA 的毒性最强,化学性质稳定,半衰期较长,可产生致畸^[1]、致癌、肾毒性^[2]、免疫毒性、肝细胞毒性^[3]、神经毒性^[4]等毒性。由于受葡萄酒生长条件和酿制工艺的影响,葡萄酒易造成赭曲霉毒素的污染。近年来, Yusefi 等^[5]对伊朗的 70 个葡萄汁样本进行评估研究,发现 55.7% 的样本中 OTA 浓度高于 0.125 $\mu\text{g/L}$, 平均污染水平为 0.5 $\mu\text{g/L}$, 最高达 2.6 $\mu\text{g/L}$ 。刘青等^[6]对 9 个国家 11 种不同种类的葡萄酒中赭曲霉毒素进行筛查, OTA 的检出率高达 45.4%, 检出浓度为 1.1~11.5 $\mu\text{g/L}$, 有 4 个样本超过 2 $\mu\text{g/L}$ 。为有效控制葡萄酒中 OTA 对人类健康产生危害,国内外相继制定了限量标准,如我国 GB 2761-2017 标准^[7]及欧盟法规^[8]均规定 OTA 在葡萄酒中的最大残留量为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。随着葡萄酒中 OTA 风险评估研究的深入,对其检验方法不仅要求结果更加精准,而且要求前处理技术更加简单、高效。

目前,酒类产品中真菌毒素的定量检测方法主要有酶联免疫吸附法^[9]、高效液相色谱法^[10-11]、液相色谱-串联质谱法^[12-13]等。其中,酶联免疫吸附法的前处理相对简单,主要用于快速筛查,但易出现假阳性。高效液相色谱法的准确度高、稳定性好,但对前处理要求较高,抗干扰能力较差。而液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、选择性好、分析效率高等优势,逐渐成为赭曲霉毒素检测的首选方法。目前,液相色谱-串联质谱法检测葡萄及其制品中真菌毒素的前处理技术主要有固相萃取柱净化^[14-15]、免疫亲和柱净化^[5,16]、分散液-液微萃取^[17-18]以及 QuEChERS^[19-20]等方法。然而,上述前处理技术成本较高,过程相对复杂,易造成目标物损失,且无法满足大批量样本的同时检测需求。

本研究将样品直接稀释、过滤膜处理,利用稳定同位素稀释技术消除基质效应,建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测葡萄酒中 OTA 的方法。本方法简单、高效、成本低,适用于大批量葡萄酒样品中 OTA 的快速、准确定量检测,可为葡萄酒中 OTA 的安全风险评估提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity H 超高效液相色谱仪、Waters TQD 三重四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

OTA($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, CAS 号: 303-47-9)及其稳定同位素 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 标准品:质量浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$, 购自 Romer 国际贸易(北京)有限公司。色谱纯乙腈、甲酸,以及 0.22 μm 亲水 PTFE 针式滤膜购于上海安谱实验科技股份有限公司;实验用水为超纯水,由 Milli-Q 超纯水仪制备。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 OTA 标准储备液 移取适量的 OTA 标准品溶液,用乙腈稀释至 10 mL,配制成 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.2 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 工作溶液 移取适量的 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 标准品溶液,用乙腈稀释至 5 mL,配制成 5 $\mu\text{g/L}$ 的稳定同位素工作溶液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.2.3 OTA 标准工作溶液 准确移取适量的 OTA 标准储备液,用乙腈-水-甲酸(29.8:70:0.2, 体积比)溶液逐级稀释,分别配成 0.05、0.1、0.2、0.5、1 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准工作溶液。移取 20 μL $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 工作溶液与 180 μL OTA 标准工作溶液于 300 μL 进样小瓶中,充分混匀,待测。

1.3 样品前处理

准确移取 100 μL 试样于 1.5 mL 离心管中,加入 900 μL 乙腈-水-甲酸(29.8:70:0.2)溶液,涡旋混匀后,过 0.22 μm PTFE 针式滤膜。移取 20 μL $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 工作溶液于 300 μL 进样小瓶中,加入 180 μL 样品滤液,充分混匀后,待测。

1.4 仪器条件

1.4.1 液相色谱条件 ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm);柱温为 $40\text{ }^\circ\text{C}$;进样

体积为 10 μL ; 流速为 0.3 mL/min; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为 0.1% 甲酸乙腈。洗脱条件: 0~1.0 min, 70% A; 1.0~4.5 min, 70%~5% A; 4.5~6.5 min, 5% A; 6.5~9.5 min, 5%~70% A。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描; 毛细管电压为 3.0 kV; 离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度为 500 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流速为 800 L/h, 锥孔反吹气流速为 30 L/h; 多反应监测模式(MRM)采集。

2 结果与讨论

2.1 质谱参数的优化

在 ESI^+ 模式下, 采用 MS Scan 模式, 对 500 ng/mL 的 OTA 及 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 分别进行一级质谱全扫描分析, 得到每种目标物的母离子。比较不同锥孔电压下母离子的响应强度, 以最大响应值时为最佳锥孔电压。采用 Daughter 模式, 在不同碰撞能量下, 对目标物母离子分别进行二级质谱全扫描, 得到每种母离子的碎片离子, 比较不同碰撞能量下碎片离子的响应强度, 选择响应强度较高的两个子离子作为定量离子和定性离子, 优化的质谱参数见表 1。在上述优化条件下, OTA 及 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的总离子流图见图 1。

表 1 OTA 及其同位素的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of OTA and its isotope

Analyte	t_{R} (min)	Mode	Parent(m/z)	Cone voltage(V)	Daughter(m/z)	Collision energy(V)
OTA	4.5	M + H	404.14	35	239.04*	24
					358.22	15
$^{13}\text{C}_{20}$ -OTA	4.5	M + H	424.14	35	250.04	24

* quantitative ion

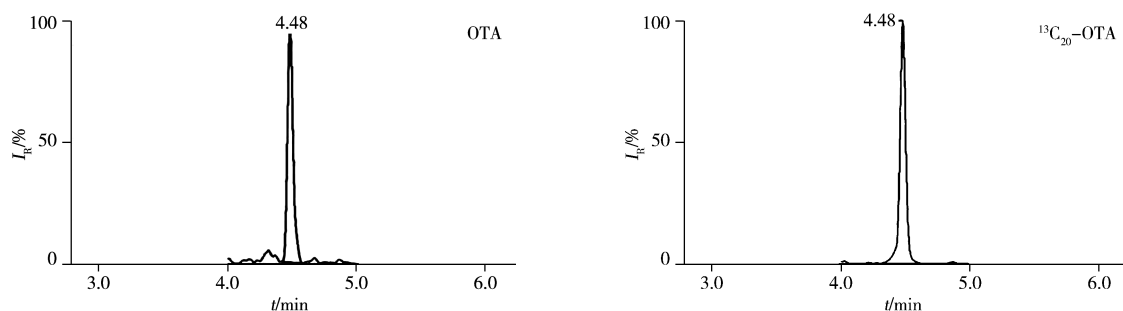


图 1 OTA 及 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatograms of OTA and $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA

OTA: 0.1 $\mu\text{g/L}$; $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA: 0.5 $\mu\text{g/L}$

2.2 前处理条件的优化

葡萄酒基质相对复杂, 含多种抗氧化剂、色素、葡萄糖与果糖等成分。在 ESI^+ 模式下, OTA 及 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的离子化效率易受到基质干扰, 从而影响定量检测。本实验按照下式评估基质效应: $\text{ME} = |C - A| / B \times 100\%$ [21], 式中, C 为样品加标 1 $\mu\text{g/L}$ 测定的峰面积, A 为样品本底的峰面积, B 为 OTA 浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的溶剂标准品的峰面积。若 $\text{ME} = 100\%$, 说明无基质效应; $\text{ME} > 100\%$, 说明存在基质增强效应; $\text{ME} < 100\%$, 说明存在基质抑制效应。将葡萄酒样品经乙腈-水-甲酸(29.8:70:0.2)溶液分别稀释 5、10、20 倍后按照本方法进行分析, 结果显示, 3 种稀释倍数下的基质效应均接近 100%, 说明直接稀释可基本消除基质效应。综合考虑方法灵敏度与仪器污染, 本实验将稀释倍数设为 10 倍, 同时加入稳定同位素作为内标 [22-23], 以降低质谱仪器波动的影响, 保证实验结果更加可靠。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系、检出限与定量下限 在优化条件下, 采用内标法对质量浓度为 0.05~1 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准工作溶液进行测定, 以 OTA 与 $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的峰面积比值为纵坐标(Y), OTA 的质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/L}$)进行线性拟合。结果表明, $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA 的质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 时, OTA 在 0.05~1 $\mu\text{g/L}$

范围内线性关系良好, 回归方程为 $Y = 18.2645X + 0.105421$, 相关系数(r^2)为 0.9996。在空白样品中加入一系列不同浓度的标准品, 按本方法进行前处理后进样分析, 得到 OTA 的检出限(LOD, $S/N \geq 3$)和定量下限(LOQ, $S/N \geq 10$)分别为 0.1、0.3 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 准确度与精密度 针对红葡萄酒和白葡萄酒 2 种空白样品进行 1.00、2.00、5.00 $\mu\text{g/L}$ 3 个水平的加标回收实验, 每个加标水平测定 6 次, 通过内标法计算加标回收率, 并计算同一浓度水平的相对标准偏差(RSD), 作为日内精密度。按照以上操作连续测定 3 d, 以每天对应浓度的平均值计算 RSD, 作为日间精密度。结果如表 2 所示, OTA 的回收率为 102%~113%, 日内、日间的 RSD 均小于 10%, 说明该方法的准确度和精密度良好。

表 2 OTA 的加标回收率及相对标准偏差
Table 2 Recoveries and relative standard deviations of OTA

Sample	Spiked ($\mu\text{g/L}$)	Found ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
Red wine	1.00	1.09 \pm 0.07	109	6.6	9.7
	2.00	2.17 \pm 0.22	108	9.4	8.0
	5.00	5.08 \pm 0.21	102	4.1	4.4
White wine	1.00	1.04 \pm 0.08	104	5.2	6.7
	2.00	2.25 \pm 0.13	113	6.0	5.4
	5.00	5.18 \pm 0.24	104	4.6	8.6

2.4 方法比较

为验证本方法的可行性, 以空白葡萄酒为基质, OTA 的加标浓度设为 2 $\mu\text{g/L}$, 参考 GB 5009.96-2016^[24] 第三法, 采用免疫亲和柱净化法与本实验建立的直接稀释法, 在相同的分析条件下进行测定, 比较加标回收结果是否存在显著性差异, 结果如表 3 所示。经计算, t 值为 0.71, 小于 $t(0.05, 10) = 2.23$, 说明两种前处理方法的结果一致。

表 3 直接稀释法与免疫亲和柱净化法的比较
Table 3 Comparison between direct dilution and immune affinity column purification method

Replicate analysis	Immune affinity column ($\mu\text{g/L}$)	Direct dilution ($\mu\text{g/L}$)
1	2.25	2.17
2	2.08	2.11
3	2.39	2.13
4	2.10	2.56
5	2.31	1.98
6	2.28	2.05
Average	2.23	2.17
t		0.71

2.5 实际样品检测

通过市场采购, 选取橡木桶、白杨河、长城、威龙、香格里拉、天然、赤霞珠、梅洛等国产品牌的 15 种红葡萄酒和 5 种白葡萄酒, 采用本方法进行检测。结果显示, 所有样本中均未检出 OTA, 表明上述样品满足欧盟和我国食品安全标准对于葡萄酒中 OTA 的限量要求。

3 结论

本文建立了葡萄酒中 OTA 的超高效液相色谱-串联质谱检测方法, 通过直接稀释的前处理方法, 并结合稳定同位素内标定量技术, 避免了目标物损失, 保证了测定结果准确、可靠。本方法前处理简单、高效、灵敏度高、成本低, 适合大批量葡萄酒中 OTA 的快速、准确定量检测, 同时还可用于葡萄酒中多种真菌毒素的检测。

参考文献:

- [1] Erceg S, Mateo E M, Zipancic I, Jimenez F J R, Arago M A P, Jimenez M, Soria J M, Garcia-Esparza M A. *Toxins*, **2019**, 11(4): 217-227.
- [2] Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. *Toxins*, **2016**, 8(7): 191-239.

- [3] Rasic D, Mladinic M, Zeljezic D, Pizent A, Stefanovic S, Milicevic D, Konjevoda P, Peraica M. *Toxicol.*, **2018**, 146: 99–105.
- [4] Qi X Z, Wagenaar E, Xu W T, Huang K L, Schinkel A H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2017**, 329: 18–25.
- [5] Yusefi J, Valaee M, Nazari F, Maleki J, Mottaghianpour E, Khosrokhavar R, Hosseini M J. *Iranian J. Pharm. Res.*, **2018**, 17(1): 140–146.
- [6] Liu Q, Pang S Q, Xiong X, He S M, Chen W R, Zhang G W. *Chin. J. Food Hyg.* (刘青, 庞世琦, 熊欣, 何素媚, 陈文锐, 张广文. 中国食品卫生杂志), **2018**, 30(5): 481–486.
- [7] GB 2761–2017. National Food Safety Standard—Maximum Levels of Mycotoxins in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量. 中华人民共和国国家标准).
- [8] Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006. Maximum levels for Certain Contaminants in Foodstuffs.
- [9] Oplawaska – Stachowiak M, Kleintjens T, Sajic N, Haasnoot W, Campbell K, Elliott C T, Salden M. *Toxins*, **2017**, 9(12): 388–405.
- [10] Appell M, Evans K O, Jackson M A, Compton D L. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **2018**, 41(15/16): 949–954.
- [11] De Jesus C L, Bartley A, Welch A Z, Berry J P. *Toxins*, **2018**, 10(1): 1–12.
- [12] Zwickel T, Klaffke H, Richards K, Rychlik M. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1455: 74–85.
- [13] Rodriguez – Cabo T, Rodriguez I, Ramil M, Cela R. *Food Chem.*, **2016**, 199: 401–408.
- [14] Hou J B, Xie W, Li J, Lü C H, Shen W F, He J M. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (侯建波, 谢文, 李杰, 吕春华, 沈炜锋, 何建敏. 理化检验 – 化学分册), **2015**, 51(9): 1290–1293.
- [15] Bolton S L, Mitchell T, Brannen P M, Glenn A E. *Am. J. Enol. Viticult.*, **2017**, 68(3): 336–343.
- [16] Martinez N D, Rodriguez A M, Gomez D A. *Lat. Am. Appl. Res.*, **2017**, 47(3/4): 119–124.
- [17] Zhao Z Y, Yang X L, Zhao X Y, Bai B, Yao C X, Liu N, Wang J H, Zhou C Y. *Food Control*, **2017**, 73: 862–868.
- [18] Puangkham S, Poapolathep A, Jermnak U, Imsilp K, Tanhan P, Chokejaroenrat C, Poapolathep S. *World Mycotoxin J.*, **2017**, 10(4): 401–409.
- [19] Guo W B, Fan K, Nie D X, Meng J J, Huang Q W, Yang J H, Shen Y Y, Tangni E K, Zhao Z H, Wu Y J, Han Z. *Toxins*, **2019**, 11(2): 87–99.
- [20] Xiong X, Liu Q, Zhang G W, Pang S Q, Zeng G F, Chen W R. *J. Instrum. Anal.* (熊欣, 刘青, 张广文, 庞世琦, 曾广丰, 陈文锐. 分析测试学报), **2018**, 37(9): 1008–1013.
- [21] Rey V, Botana A M, Antelo A, Alvarez M, Botana L M. *Food Chem.*, **2018**, 269: 166–172.
- [22] Al – Taher F, Banaszewski K, Jackson L, Zweigenbaum J, Ryu D, Cappozzo J. *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, 61(10): 2378–2384.
- [23] Ye J, Wu Y, Xin Y Y, Zhou M H, Xie G, Wang S X. *J. Instrum. Anal.* (叶金, 吴宇, 辛媛媛, 周明慧, 谢刚, 王松雪. 分析测试学报), **2017**, 36(4): 449–456.
- [24] GB 5009.96–2016. Determination of Ochratoxin A in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品中赭曲霉毒素 A 的测定. 中华人民共和国国家标准).

(责任编辑: 丁 岩)