

温度和水活度对柏子仁黄曲霉毒素含量变化的影响

刘震营, 王玲娜, 姜秋, 蒲高斌, 张永清*
(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: 目的 探讨温度和水活度对柏子仁黄曲霉毒素含量的影响, 为确定适宜储藏条件提供参考。方法 以生化培养箱为载体, 设置不同温度 (20、25、28、32、36、40、42 °C), 基于饱和盐溶液预平衡法设置不同水活度 (0.80、0.85、0.90、0.92、0.94、0.98), 采用免疫亲和净化高效液相色谱技术联合质谱法 (IAC-HPLC-QQQ-MS/MS) 测定不同温度和水活度下 4 种黄曲霉毒素 (黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂) 的含量。结果 温度和水活度均能影响柏子仁黄曲霉毒素含量, 20、42 °C 时无任何黄曲霉毒素产生。除低温、高温及低水活度条件除外, 其余均检出黄曲霉毒素 B₁, 部分条件检出黄曲霉毒素 B₂, 所有条件下均无黄曲霉毒素 G₁ 和黄曲霉毒素 G₂ 产生。柏子仁黄曲霉最适产毒条件为 28 °C 和 0.90 水活度。结论 柏子仁加工后应及时干燥, 并在干燥、通风环境中储藏。控制温度在 20 °C 以下、水活度低于 0.80, 可使柏子仁不产生黄曲霉毒素, 确保临床用药安全。

关键词: 柏子仁; 黄曲霉毒素; 温度; 水活度; IAC-HPLC-QQQ-MS/MS

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0637-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.054

柏子仁为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥成熟种仁, 具有养心安神、润肠通便、止汗等功效^[1]。在中医药备受关注的新形势下, 柏子仁市场需求量逐年增加, 但因黄曲霉毒素含量超标造成质量不合格的报道层出不穷。黄曲霉毒素是由黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 与寄生曲霉菌 (*A. parasiticus*) 相互作用产生一类次级代谢产物。中药材容易受污染的黄曲霉毒素主要有黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁) 和 G₂ (AFG₂) 4 种。其中 AFB₁ 毒性最强, 有严重的肝毒和致癌、致畸、致突变活性, 属 I 类致癌物^[2]。

柏子仁经过机器加工时, 很容易破碎, 造成油脂外溢现象。在脂肪酸过氧化物存在下, 黄曲霉毒素生物合成涉及脂质的氧化降解, 且在脂肪酸存在下脂质过氧化和黄曲霉毒素合成均会加强^[3]。柏子仁脂肪油含量可达 48%, 为黄曲霉菌生长及黄曲霉毒素产生提供有利条件^[4]。在储藏方面, 一般大都常温储藏, 少数采用冷库, 容易达到霉菌滋生和毒素产生的条件, 需要严格控制环境条件。目前, 关于柏子仁黄曲霉毒素的报道大都基于多种药材黄曲霉毒素的检测^[5-7]。前人对水活度、温度影响中药材黄曲霉毒素积累的研究已经比较深入, 不同基质黄曲霉毒素最易产生的条件具有明显差异^[8-12]。本研究探讨不同水活度和温度条件下柏子仁黄曲霉毒素的产毒变化, 寻找柏子仁在储藏等环节能够有限规避黄曲霉毒素产生的安全范围, 有助于

优化生产、加工、仓储条件, 对柏子仁生产加工具有实践性指导意义。

1 材料

SPL-150 生化培养箱 (天津莱玻特瑞仪器设备有限公司); AW1000T 水分活度测定仪 (上海昌珉实业有限公司); ME204/02 万分之一电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); 高效液相色谱-串联三重四级杆质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); 5810R 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); DHM-200 多管漩涡混合仪 (宁波洛尚智能科技有限公司); 黄曲霉毒素免疫亲和柱 (北京华安麦科生物技术有限公司); MLS-3781L-PC 高压蒸汽灭菌锅 (日本 Panasonic 公司); Watson 177-112C 血球计数板 (北京中华大科技有限公司); DM500 生物显微镜 (德国 Leica 公司)。

PDA 培养基 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 320H031); 黄曲霉高产毒菌株 BNCC142803 (北京北纳创联生物技术研究院, 批号 18051821); 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 混合对照品溶液 (北京华安麦科生物技术有限公司, 批号 LRAC0310), 质量浓度分别为 1.0、0.3、1.0、0.3 mg/L。甲醇 (分析纯, 天津富宇精细化工有限公司); 吐温-20 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 505Q013); 吐温-80 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20181205); 甲醇、甲酸 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);

收稿日期: 2021-12-22

基金项目: 国家中医药管理局全国中药资源普查项目 (GZY-KJS-2018-004); 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心项目 (CYLXTCX2020); 山东省重点研发计划课题 (2016CYJS08A01); 山东省现代农业产业技术体系中草药产业创新团队项目 (SDAIT-20-01)

作者简介: 刘震营 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18963461309, E-mail: 17862987069@163.com

* **通信作者:** 张永清 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: zyq622003@126.com

溴化钾(批号20200526)、氯化钾(批号20191005)、氯化钡(批号20200509)、硫酸亚铁(批号20190504)、硝酸钾(批号20140414)、硫酸钾(批号20180504)(国药集团化学试剂有限公司)。

柏子仁收集于山东省济宁市汶上县柏子仁加工基地,均为当年产且未受黄曲霉毒素污染,经山东中医药大学张永清教授鉴定为柏科植物侧柏 *Platyclus orientalis* (L.) Franco 的干燥成熟种仁。

2 方法

2.1 黄曲霉孢子悬浮液制备 将高产毒黄曲霉菌株 BNCC142803 转接到 PDA 培养基上, 28 °C 生化培养箱中培养 7 d, 待菌落长满后用于后续黄曲霉孢子悬浮液制备。于超净工作台用接种棒蘸取适量黄曲霉菌与 1% 吐温-80 混合, 振荡摇匀, 用无菌滴管吸取少量滴于血球计数板中, 在显微镜下反复计数, 制得密度为 1×10^6 /mL 的黄曲霉孢子悬浮液, 备用。

2.2 水活度调节 水活度和温度是在综合黄曲霉菌繁殖生长及毒素产生条件, 采用饱和盐溶液预平衡法获得目标水活度 (0.80、0.85、0.90、0.92、0.94、0.98)^[12-14]。选择相应的饱和盐溶液(溴化钾、氯化钾、氯化钡、硫酸亚铁、硝酸钾、硫酸钾)^[15], 将不同种类盐分别放入干燥无菌培养皿中, 向其中慢慢滴加水, 直到完全溶解达到饱和状态, 将培养皿分别置入干燥器下层(图1)。称取一定量柏子仁置于干燥无菌培养皿中, 在超净台中紫外杀菌 2 h 后置于干燥器上层, 放上盖子, 使其内部形成密闭空间, 以达到不同目标的水活度。将所有干燥器放置在 25 °C 恒温实验室内 48 h 后, 用水分活度测定仪测定。

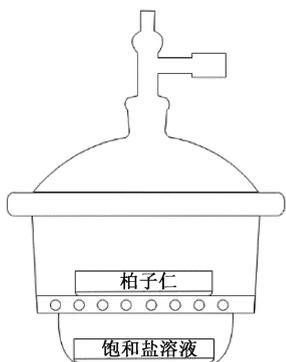


图1 目标水活度调节示意图

2.3 接种培养 将达到目标水活度的柏子仁置超净工作台紫外杀菌 2 h, 称取 80 g 放入已灭菌具塞锥形瓶中, 加入 3 mL 黄曲霉孢子悬浮液, 振荡, 混匀, 倒入培养皿, 均匀铺开。然后置于事先设定好温度 (20、25、28、32、36、40、42 °C) 并紫外灭菌 2 h 的生化培养箱中培养 7 d。每组实验均设置 3 个平行样品。

2.4 黄曲霉毒素含量测定 称取 8 g 培养 7 d 后的柏子仁, 于液氮中研磨。精密称取 5 g, 置 50 mL 离心管中, 加入 1 g 氯化钠和 25 mL 70% 甲醇混匀, 振荡, 涡旋 5 min, 2 500 r/min 离心 3 min, 取 10 mL 上清液, 加入 40 mL 1%

吐温稀释, 用快速定量滤纸过滤, 收集滤液为上样液, 待净化洗脱。取 25 mL 上样液注入免疫亲和柱中, 待液体排干后, 用 10 mL 水洗涤 2 次, 弃去全部洗脱液。待液体排干后, 加入 1 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液并定容至 1 mL。洗脱液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 用于 HPLC-MS/MS 分析。

分析条件为 HALO 90A C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~4 min, 80%~62% A; 4~10 min, 62%~30% A; 10~10.20 min, 30%~0A; 10.20~15 min, 0~80% A); 柱温 40 °C; 体积流量 0.25 mL/min; 进样量 3 μL。电喷雾离子源 (ESI); 正离子扫描; 多反应监测模式; 干燥气温度 300 °C; 干燥气体积流量 10 L/min; 毛细管电压 4 000 V。4 种黄曲霉毒素的相关质谱参数见表 1。

表1 黄曲霉毒素质谱参数表

化合物	保留时间/min	母离子	子离子
AFB ₁ (ESI ⁺)	11.78~12.00	313.2(150)	241.2(42)
			285.2(20)
AFB ₂ (ESI ⁺)	11.24~11.45	315.2(135)	259.2(40)
			287.2(30)
AFG ₁ (ESI ⁺)	10.78~10.86	329.2(135)	115.2(90)
			243.2(40)
AFG ₂ (ESI ⁺)	10.19~10.38	331.2(135)	245.2(40)
			189.2(70)

3 结果

3.1 温度对柏子仁黄曲霉毒素含量的影响 图 2 显示温度对柏子仁 AFB₁ 含量变化的影响, 在水活度 0.80 时, 20、25 °C 均不产生 AFB₁。28 °C 开始有 AFB₁ 产生, 但含量相对较少, 随着温度升高 AFB₁ 含量增加, 至 32 °C 时达到最大, 然后逐渐降低, 40 °C 时 AFB₁ 含量低于 28 °C。在水活度 0.85 时, AFB₁ 的产生趋势与水活度 0.80 时相似, 但初始产生温度从 28 °C 降为 25 °C。在水活度 0.90~0.92 时, 均为 25 °C 开始产生 AFB₁, 且产毒量相对较高, 至 28 °C 便达到最高。在水活度 0.94~0.98 时, AFB₁ 最大产生量均发生在 32 °C, 但 25 °C 时水活度 0.94 下 AFB₁ 产生量明显高于水活度 0.98。

对于 AFB₂, 不同温度下含量不同(图3)。25 °C 时, 水活度 0.85、0.94、0.98 产毒最多。28 °C 时, 水活度 0.90 产毒最多; 28~32 °C 区间不同水活度下均下降; 36~42 °C 区间, 水活度 0.80、0.85、0.90、0.94 呈先上升后下降的趋势; 42 °C 时, 不同水活度均无 AFB₂ 产生。AFG₁ 和 AFG₂ 在任何温度下均未检测到。

随着温度升高, 黄曲霉毒素总量呈现先上升后下降(图4)。20 °C 时, 4 种黄曲霉毒素均未产生。随着温度升高, 不同水活度条件下产毒量逐渐升高, 28 °C 为水活度 0.85、0.90、0.92 条件下最适产毒温度, 其中在水活度 0.90、0.92 时产毒量已超过 2020 年版《中国药典》规定标准。32 °C 为水活度 0.80、0.94、0.98 时最适产毒温度, 随着温度升高, 黄曲霉毒素总量开始下降。在 42 °C, 未产

生黄曲霉毒素。

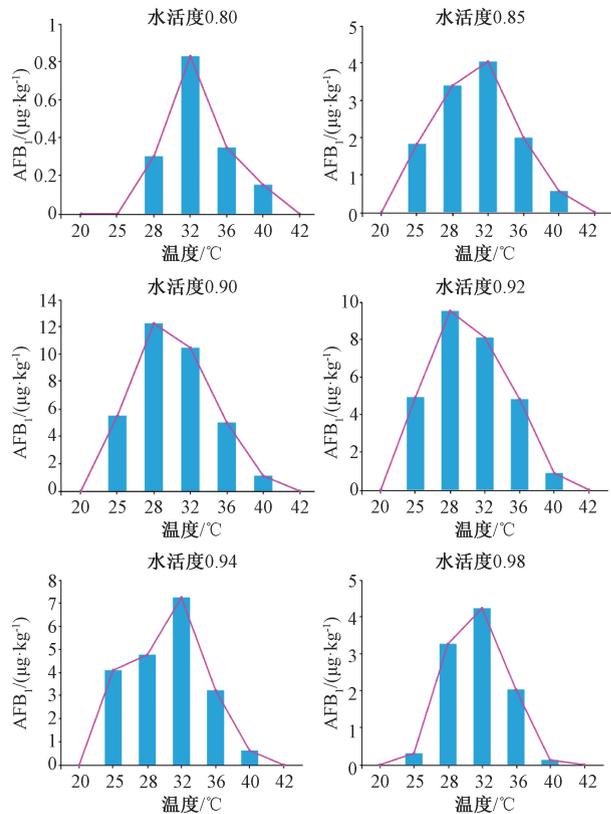


图2 温度对 AFB₁ 含量的影响

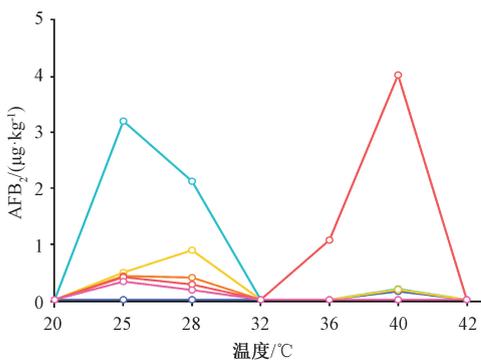


图3 温度对 AFB₂ 含量的影响

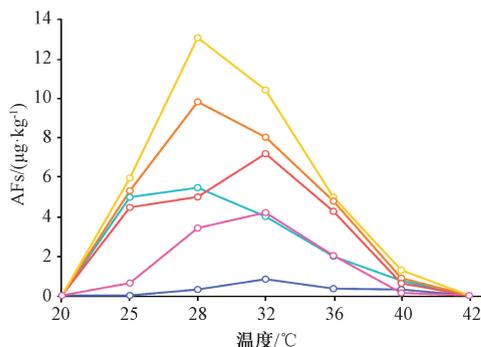


图4 温度对 AFs 含量的影响

示不同水活度下 AFB₁ 含量的变化。在 20、42 °C 时，均不会产生 AFB₁。25 °C 时，水活度 0.80 无 AFB₁ 产生，水活度 0.90 时 AFB₁ 产生量最多。28 °C 时，水活度 0.80 产生 AFB₁ 但含量较低。AFB₁ 均在水活度 0.90 时含量最高，且 25、28、32、36 °C 下产毒量已超过限量标准。

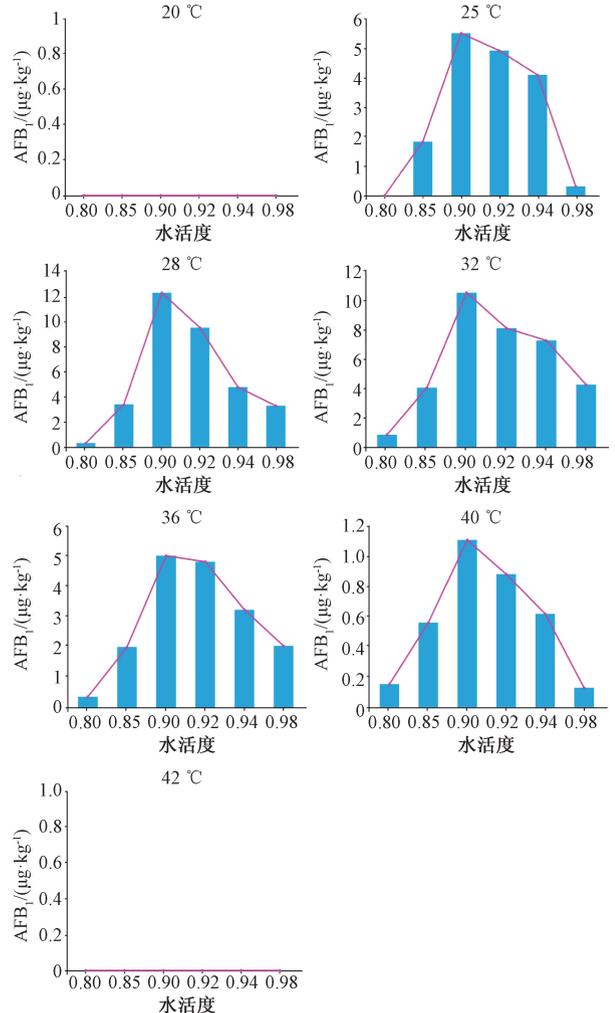


图5 水活度对 AFB₁ 含量的影响

AFB₂ 在不同水活度下含量不同 (图 6)。水活度 0.85 时，25、28 °C 条件下产毒最多。随着水活度不断升高，大部分温度条件下产毒量下降，其中在水活度 0.92~0.98 区间，36、40 °C 条件下产毒量呈先升高后下降。AFG₁ 和 AFG₂ 在任何水活度下均未检测到。

水活度对柏子仁 Afs 的影响参见图 7。随着水活度升高，黄曲霉毒素总量上升，水活度 0.90 时，黄曲霉毒素总量最高，随温度升高下降。

4 讨论

本研究检测 4 种黄曲霉毒素，除低温和高温、部分低水活度条件外，均检出 AFB₁、AFB₂。水活度作为黄曲霉菌产生黄曲霉毒素的一个测定指标，表示药材中的水与其他物质结合的紧密程度，是影响微生物生长的关键因素之一^[16]。相比于水分含量，它能够反映产品储藏的稳定性，

3.2 水活度对柏子仁黄曲霉毒素含量的影响 图5 结果显

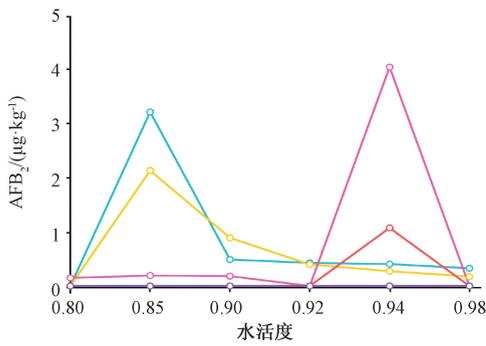


图6 水活度对 AFB₂ 含量的影响

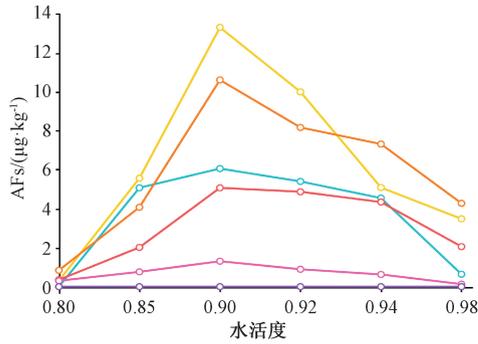


图7 水活度对 AFs 含量的影响

广泛用于药材质量与安全控制。

未来在柏子仁储存过程中,应重点防控 AFB₁ 和 AFs 的污染状况。在 28 ℃、水活度 0.90 时,柏子仁的黄曲霉产毒能力最强,毒素含量最高。在 20、42 ℃时,水活度变化均不会产生黄曲霉毒素,推测这 2 个温度点均限制与黄曲霉毒素产生相关基因的表达。一般选择低温储藏,高温储藏会促进其他真菌的繁殖生长。在水活度 0.80 时,各温度条件下黄曲霉毒素产生量最低。由此可将 20 ℃、水活度 0.80 作为柏子仁黄曲霉毒素安全控制点。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] Yun Y, Lu Z, Yang J, et al. Electrochemical analysis of specific catalase activity during development of *Aspergillus flavus* and its correlation with aflatoxin B₁ production[J]. *Food Chem*, 2021, 337: 127978.

[3] Gizachew D, Chang C H, Szonyi B, et al. Aflatoxin B₁ (AFB₁) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus*

parasiticus on ground Nyjer seeds; The effect of water activity and temperature[J]. *Int J Food Micro*, 2019, 296: 8-13.

[4] 李瑞海, 冯琳, 马欣悦, 等. 脂肪油和总二萜含量与柏子仁质量的相关性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12): 9-11.

[5] 刘蕊, 赵新悦, 毛雯雯, 等. ELISA 法快速检测中药材黄曲霉毒素总量[J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2376-2381.

[6] 赵祥升, 应光耀, 魏建和, 等. 中药中黄曲霉毒素 B₁ 污染概况[J]. *中国药物警戒*, 2018, 15(10): 608-616.

[7] Chien M Y, Yang C M, Huang C M, et al. Investigation of aflatoxins contamination in herbal materia medica in a Taiwan pharmaceutical factory[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(3): 1154-1159.

[8] Krulj J, Markov S, Bočarov-Stančić A, et al. The effect of storage temperature and water activity on aflatoxin B₁ accumulation in hull-less and hulled spelt grains[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(7): 3703-3710.

[9] 刘肖, 邢福国, 王利敏, 等. 种植至储藏期花生黄曲霉毒素 B₁ 污染研究[J]. *核农学报*, 2017, 31(5): 899-905.

[10] 吕聪, 王平, 常鹏, 等. 培养温度、水分活度对稻谷和大米黄曲霉生长及产毒的影响[J]. *核农学报*, 2019, 33(10): 2033-2039.

[11] Yunes N B S, Oliveira R C, Reis T A, et al. Effect of temperature on growth, gene expression, and aflatoxin production by *Aspergillus nomius* isolated from Brazil nuts[J]. *Mycotoxin Res*, 2019, 36(2): 173-180.

[12] Norlia M, Jinap S, Nor-Khaizura M A R, et al. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in peanut meal extract agar[J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 335: 108-836.

[13] Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, et al. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*[J]. *J R Soc Interface*, 2012, 9(69): 757-767.

[14] Lv C, Jin J, Wang P, et al. Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy and polished rice[J]. *Food Chem*, 2019, 293: 472-478.

[15] Oiml R. The scale of relative humidity of air certified against saturated salt solutions[S].

[16] 易巧, 熊骏, 刘绪平. 枯草芽孢杆菌生长所需最低水分活度的考察与验证[J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(6): 497-501.