

高效液相色谱-光化学衍生法测定湖南产莲子中黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂

吴梅青¹, 罗栩强², 曾春姣¹

1. 湘潭医卫职业技术学院, 湖南 湘潭 411102

2. 中山市仙逸堂中药饮片有限公司, 广东 中山 528436

摘要: 目的 对不同来源的湖南产莲子中黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₂、B₁ 进行高效液相色谱-光化学衍生法测定。方法 采用高效液相色谱-光化学衍生法, 采用岛津 GL Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水(35:13:52), 柱温 35 ℃; 光化学衍生器(254 nm) 激发波长 λ_{ex}=360 nm, 发射波长 λ_{em}=450 nm。结果 黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₂、B₁ 分别在 6.7~33.3、11.4~56.8、10.3~51.5、4.1~20.3 pg 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.07%、97.72%、96.11%、99.52%, RSD 值分别为 1.69%、1.40%、2.72%、1.34% (n=6)。9 批莲子样品中, 有 6 批未检出黄曲霉毒素, 来自于农贸市场农户自存的 2 批次检出黄曲霉毒素 B₁, 实验室塑料袋包装储存 1 年的 1 批检出黄曲霉毒素 B₁、B₂, 但质量分数均低于法定标准限量。结论 不同来源湖南产莲子中黄曲霉毒素质量分数均低于《中国药典》2020 年版规定限量。该法测定结果准确、重复性良好, 可为完善莲子安全性控制和质量标准提升提供实验依据。

关键词: 莲子; 黄曲霉毒素 G₁; 黄曲霉毒素 G₂; 黄曲霉毒素 B₁; 黄曲霉毒素 B₂; 高效液相色谱-光化学衍生法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)04-0671-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.006

Determination of aflatoxin G₁, G₂, B₁, and B₂ in *Nelumbinis Semen* from Hunan Province by HPLC-photochemical derivatization

WU Mei-qing¹, LUO Xu-qiang², ZENG Chun-jiao¹

1. Xiangtan Medicine Health Vocational College, Xiangtan 411102, China

2. Zhongshan Xianyitang Chinese Herbal Medicine Co. Ltd., Zhongshan 528436, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-photochemical derivatization method for determination of aflatoxin G₁, G₂, B₂, and B₁ in *Nelumbinis Semen* from different sources in Hunan Province. **Methods** The content of aflatoxins were determined by HPLC-photochemical derivatization method. Shimadzu GL Inertsil ODS-3 chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with column temperature of 35 ℃, and methanol- acetonitrile- water (35 : 13 : 52) was used. Fluorescence detector: excitation wavelength λ_{ex}=360 nm and emission wavelength λ_{em}=450 nm. **Results** Aflatoxin G₂, G₁, B₂, and B₁ showed good linear relationships in the ranges of 6.7 — 33.3, 11.4 — 56.8, 10.3 — 51.5, and 4.1 — 20.3 pg, and their average recoveries were 98.07%, 97.72%, 96.11%, and 99.52% with the RSD values were 1.69%, 1.40%, 2.72%, and 1.34%, respectively. Among 9 batches of *Nelumbinis Semen* samples, aflatoxin was not detected in 6 batches, and aflatoxin B₁ was detected in 2 batches from farmers' market, and aflatoxin B₁ and B₂ were detected in 1 batch of sample from laboratory plastic bags storage for one year. But the aflatoxin content was much lower than the *Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition* legal standard limit. **Conclusion** Aflatoxin in *Nelumbinis Semen* samples of different sources in Hunan Province was lower than the limit stipulated in the *Chinese Pharmacopoeia 2020 Edition*. The method is accurate and reproducible, which can provide experimental basis for improving the safety control and quality standard of *Nelumbinis Semen*.

Key words: *Nelumbinis Semen*; aflatoxin G₁; aflatoxin G₂; aflatoxin B₁; aflatoxin B₂; HPLC-fluorescence detection

莲子为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 养心安神的功效^[1], 多产于湖南、湖北、福建、江苏、浙江、江西等地。现代药理研究表明, 莲子具

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(2020JJ7066); 湘潭市 2020 年指导性科技计划项目(CG-ZDJH2020014)

作者简介: 吴梅青(1971—), 女, 教授, 研究方向为天然药物的研究与应用。E-mail: wmq0519@sina.com

有强心、镇静、延缓衰老作用，还可以根据不同的搭配制作出多种类型的莲子保健食品^[2]。黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉等在合适的温度和湿度下产生的真菌毒素，2017 年被世界卫生组织癌症研究机构划定为 I 类致癌物^[3]，能破坏人、动物肝脏组织，严重时可导致肝癌甚至死亡。由于中药材生产、加工、贮藏、运输的过程工序多，耗时长，加之部分药材含油脂多、含蛋白质高、含糖量大等特性，使得中药材很容易发生霉变而污染黄曲霉毒素，贮藏时间越长、贮存条件越差，黄曲霉毒素产生的越多^[4]。《中国药典》2020 年版规定 1 000 g 莲子含黄曲霉毒素 B₁ 不得超过 5 μg，黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 总量不得超过 10 μg。由于莲子多产自温湿带地区，其生长的气候条件、不适当的采收、加工、储藏等过程极易导致莲子污染黄曲霉毒素。黄曲霉毒素超标也是近年来我国莲子产品被出口地通报的主要原因之一^[5]。莲子作为药食同源产品，其黄曲霉毒素的检测受到了研究者关注^[6-9]。目前黄曲霉毒素的检测方法有高效液相色谱法^[10]、液相色谱-串联质谱法^[11-12]、酶联免疫法^[13-14]。本研究参考《中国药典》2020 年版四部及相关文献报道^[10, 15-16]，采集不同来源的湖南产莲子样品 9 批，提取分离样

品中的黄曲霉毒素，采用高效液相色谱-光化学衍生法测定样品中的黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂，以期为湖南产莲子的质量标准提升提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC16 高校液相色谱仪、ATY224 电子天平；KQ3200DB 数控超声波清洗仪（昆山超声仪器有限公司）；TG1650-WS 台式高速离心机（湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司）；XL-600B 多功能粉碎机（永康市小宝电器有限公司）；DHG-9140A 电热鼓风干燥箱（上海雷韵试验仪器制造有限公司）。

1.2 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯，氯化钠为分析纯，实验用水为超纯水，黄曲霉毒素混合对照品溶液购于中国食品药品检定研究院，批号为 610001-201703（约 1.3 mL），黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量浓度分别为 0.99、0.64、1.09、0.39 μg/mL。

1.3 样品

9 批莲子来自于湖南各大农贸市场、社会药房和本实验室储存，产地均为湖南，经中山市仙逸堂中药饮片有限公司罗栩强工程师鉴定为莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥成熟种子，见表 1。

表 1 不同来源湖南产莲子样品

Table 1 *Nelumbinis Semen* samples from different sources in Hunan Province

样品名称	储存条件	采样地点	产地
1#样品	密封包装	湘潭步步高某分店	湖南华容
2#样品	密封包装	老百姓大药房连锁股份有限公司湘潭某分店	湖南耒阳
3#样品	密封包装	益丰大药房连锁股份有限公司湘潭某分店	湖南衡阳
4#样品	农户 1 自存	汉寿某农贸市场	湖南汉寿
5#样品	农户 1 自存	耒阳农贸市场	湖南耒阳
6#样品	农户 1 自存	常德市某农贸市场	湖南常德
7#样品	塑料袋真空包装、室温，含水量 13.8%	实验室样品储存 1 年	湖南湘潭
8#样品	塑料袋真空包装、室温，含水量 13.1%	实验室样品储存 1 年	湖南湘潭
9#样品	塑料袋包装、室温，含水量 14.0%	实验室样品储存 1 年	湖南湘潭

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品的制备 精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 标示质量浓度分别为 0.99、0.64、1.09、0.39 μg/mL）1.3 mL，置 25 mL 量瓶中，用甲醇稀释并加至刻度，作为贮备溶液。精密量取贮备溶液 1 mL，置 25 mL

量瓶中，用甲醇稀释并加至刻度，作为混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取莲子供试品粉末约 15 g（过二号筛），精密称定，置于均质瓶中，加入氯化钠 3 g，精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL，高速搅拌 2 min（搅拌速度大于 11 000 r/min），离心 5 min（离心速度 2 500 r/min），精密量取上清液 15 mL，

置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过。取续滤液 20 mL, 通过免疫亲和柱 (Pribolab 公司), 体积流量 3 mL/min, 用水 20 mL 洗脱, 洗脱液弃去, 使空气进入柱子, 将水挤出柱子。再用适量甲醇洗脱, 收集洗脱液, 置 2 mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 取 1 批不含黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 的莲子样品按“供试品溶液的制备”项下方法操作, 即得。

2.2 色谱条件及系统适应性检查

采用岛津 GL Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水 (35:13:52), 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 光化学衍生器 (254 nm) 激发波长 λ_{ex} =360 nm, 发射波长 λ_{ex} =450 nm。

分别吸取混合对照品、莲子样品溶液 25 μL 进样测定。结果黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 在相同保留时间处无杂质干扰, 相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 分离度良好, 理论板数在 4 000~7 000, RSD 值分别为 1.55%、1.38%、1.06%、1.47%, 说明系统适用性试验符合要求。见图 1。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 5、10、15、20、25 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 计算得回归方程, 结果见表 2。

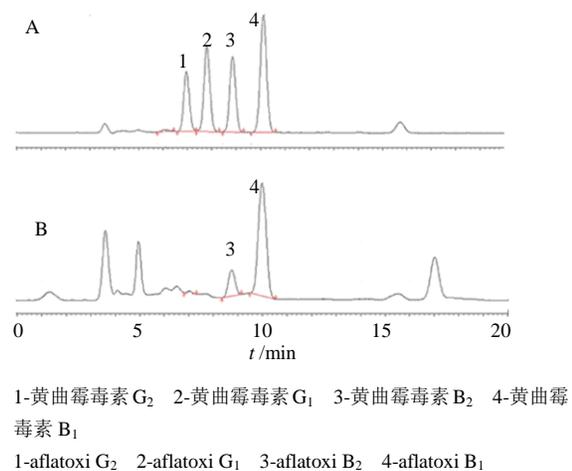


图 1 混合对照品 (A) 和莲子样品 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Nelumbinis Semen* sample (B)

表 2 黄曲霉毒素的回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 Regression equation, correlation coefficient, and linear range of aflatoxins

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
黄曲霉毒素 G ₁	$Y=1 \times 10^7 X-1 727.7$	0.999 6	6.7~33.3
黄曲霉毒素 G ₂	$Y=6 \times 10^6 X+32.2$	0.999 9	11.4~56.8
黄曲霉毒素 B ₁	$Y=1 \times 10^7 X-3 016.6$	0.999 6	4.1~20.3
黄曲霉毒素 B ₂	$Y=4 \times 10^6 X-1 147.6$	0.999 8	10.3~51.5

2.4 精密度试验

精密吸取黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量浓度分别为 2.06、1.33、2.27、0.81 ng/mL 的对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 峰面积的 RSD 值分别为 1.44%、1.33%、1.47%、1.46%。

2.5 重复性试验

称取 1#莲子样品 6 份, 每份约 15 g (过二号筛), 精密称定, 置于均质瓶中, 精密加入黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量浓度分别为 2.06、1.33、2.27、0.81 ng/mL 的对照品溶液 0.5 mL, 制备供试品溶液, 进样, 测定黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 的质量分数, 结果显示, 黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量分数的 RSD 值分别为 1.27%、1.40%、1.46%、1.72%。

2.6 稳定性试验

称取 1#莲子样品适量, 精密称定, 置于均质瓶中, 精密加入黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量浓度分别为 2.06、1.33、2.27、0.81 ng/mL 的对照品溶液 0.5 mL, 进行处理, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定峰面积, 计算 RSD 值。结果显示, 黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 峰面积的 RSD 值分别为 2.14%、1.86%、1.83%、1.58%, 表明样品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 回收率试验

称取 1#莲子样品 6 份, 每份约 15 g (过二号筛), 精密称定, 分别精密加入黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 质量浓度分别为 2.06、1.33、2.27、0.81 ng/mL 的混合对照品溶液 0.5 mL, 进行处理, 测定峰面积,

计算回收率。结果黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 的平均回收率分别为 98.07%、97.72%、99.52%、96.11%，RSD 值分别为 1.69%、1.40%、1.34%、2.72% (n=6)。

2.8 样品测定

取 9 批莲子样品，每份样品制备 3 份平行样品，制备供试品溶液，进样测定黄曲霉毒素 G₁、G₂、

B₁、B₂ 峰面积，按外标法计算莲子样品中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 的质量分数，结果见表 3。可以看出，本研究中测定的 9 批莲子样品中，有 6 批样品未检出黄曲霉毒素，有 2 批样品检出了黄曲霉毒素 B₁，有 1 批样品检出黄曲霉毒素 B₂、B₁，但质量分数均低于《中国药典》2020 年版中对黄曲霉毒素的规定限量。

表 3 莲子样品中黄曲霉毒素的测定结果 (n=3)
Table 3 Determination of aflatoxins in *Nelumbinis Semen* samples (n=3)

样品名称	质量分数/(μg·kg ⁻¹)			
	黄曲霉毒素 G ₁	黄曲霉毒素 G ₂	黄曲霉毒素 B ₁	黄曲霉毒素 B ₂
1#样品	—	—	—	—
2#样品	—	—	—	—
3#样品	—	—	—	—
4#样品	—	—	0.001	—
5#样品	—	—	0.065	—
6#样品	—	—	—	—
7#样品	—	—	—	—
8#样品	—	—	—	—
9#样品	—	—	1.04	0.03

“—”表示未检出

“—”undetected

3 讨论

本研究中测定 9 批莲子样品，6 批莲子样品的生产或包装日期为半年到 2 年，真空包装，但均未检测出黄曲霉毒素；来自于农贸市场农户自存的 2 批检出黄曲霉毒素 B₁，质量分数分别为 0.001、0.065 μg/kg，实验室塑料袋包装储存 1 年的 1 批检出黄曲霉毒素 B₁、B₂，质量分数分别为 0.03、1.04 μg/kg，原因可能与莲子样品的含水量、储存时间、储存的温度和湿度等因素有关。因此莲子在采收、加工和储存过程要做好科学养护，减少莲子在储藏过程中的霉变现象。

《中国药典》2020 年版四部通则 2351 中规定的高效液相色谱法测定黄曲霉毒素的检测色谱条件中以甲醇 - 乙腈 - 水 (40 : 18 : 42) 为流动相。本研究中采用以上流动相发现对照品和莲子样品出峰较快且色谱峰形不对称，分离度均低于 1.5。经过优化后，最终采用流动相的比例为甲醇 - 乙腈 - 水 (35 : 13 : 52)，结果显示色谱峰形对称，4 种黄曲霉毒素的分离度均在 1.5 以上，无干扰。

通过对莲子样品的外观性状、生产和包装日期

进行分析，发现检出黄曲霉毒素的莲子样品其外观性状有不同程度的改变，农户自存 5#样品和实验室自存 9#样品伴有虫蛀现象，9#样品虫蛀比 5#样品要严重一些，9#样品中不仅黄曲霉毒素 B₁ 质量分数比要高于 5#样品，还检出了黄曲霉毒素 B₂。至于莲子中黄曲霉毒素质量分数与莲子虫蛀之间是否有关联性，尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 285.
- [2] 张超文, 谢梦洲, 王亚敏, 等. 药食同源莲子的应用研究进展 [J]. 农产品加工, 2019(2): 80-82.
- [3] 世界卫生组织国际癌症研究机构. 致癌物清单 [EB/OL]. [2019-09-23]. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. The International Agency for Research on Cancer. Agents classified IARC monographs [EB/OL]. [2019-9-23]. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>.
- [4] 张成, 豆小文, 张磊, 等. 中药饮片黄曲霉毒素的污染分布与预防措施 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 665-671.

- [5] 陈泽宇. 出口莲子产品中黄曲霉毒素污染及防控建议 [J]. 天津农业科学, 2020, 26(4): 84-86.
- [6] 罗定强, 黄艳, 樊宝娟, 等. LC-MS/MS 检测莲子中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的方法探讨 [J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 41-44.
- [7] 赵颖, 王楠, 高华龙, 等. 核酸适配体亲和柱净化富集莲子中黄曲霉毒素 B₁ 及其测定 [J]. 分析化学, 2020, 48(5): 662-669.
- [8] 付宁费, 丽娜. 胶体金免疫层析法测定中药材中黄曲霉毒素 B₁ 的含量 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(11): 113-115.
- [9] 杨英, 谢艳君, 孔维军, 等. 基于侧流免疫层析技术制备胶体金试纸条检测莲子中黄曲霉毒素 B₁ 的研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(3): 28-32.
- [10] 王云霞, 王娟, 谢志民. HPLC-柱后光化学衍生法测定清火片(胶囊)中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的含量及其安全性评价 [J]. 中国药房, 2019, 30(7): 906-909.
- [11] 素琼, 白伟娟, 柳训才, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用技术测定燕窝中黄曲霉毒素 [J]. 食品科技, 2020, 45(11): 319-323.
- [12] 朱筱玲. 快速液相色谱-串联质谱法测定 26 味中药中黄曲霉毒素 [J]. 分析科学学报, 2018, 34(5): 103-106.
- [13] 杨东顺, 王莉丽, 马芙蓉, 等. 酶联免疫吸附法测定云南铁皮石斛中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 324-328.
- [14] 单利楠, 豆小文, 刘好, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 免疫快速检测技术研究进展及其在中药中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 202-217.
- [15] 尹宁宁, 周黎明, 刘军田, 等. HPLC 法同时测定 21 种中药饮片中 4 种黄曲霉毒素的含量 [J]. 山东中医杂志, 2019, 38(11): 1067-1070.
- [16] 张金星, 龚旭东, 周谧, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定沉香中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(1): 35-37.

[责任编辑 解学星]