

ELISA 试剂盒定量检测中药材和中成药的黄曲霉毒素 B₁

中国协和医科大学中国医学科学院药用植物研究所(北京 100094) 李延生* 陈建民

摘要 为评价中药材和中成药的黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 污染程度,采用了 ELISA 试剂盒定量检测 AFB₁,对一批中药材和中成药进行检测,发现 AFB₁检出率和含量很高。

关键词 中药材 中成药 黄曲霉毒素 B₁ ELISA 试剂盒

Determination of Aflatoxin B₁ in Traditional Chinese Medicine by ELISA

Institute of Medical Plant, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College (Beijing 100094) Li Yansheng and Chen Jianmin

Abstract It was said that the presence of aflatoxin B₁(AFB₁) in traditional Chinese medicinal materials and preparations was of common occurrence. In order to clarify the truth of such saying, the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the occurrence of AFB₁ in a number of Chinese medicinal samples was carried out. Result of the determination showed that the positive rate and contents of AFB₁ were indeed rather high, necessary to alert our deep concern

Key words traditional Chinese medicinal materials Chinese medicinal preparation aflatoxin B₁ ELISA

中药材采集后不及时干燥或贮存不当或在制备和加工过程中处理不善,可能污染各种霉菌并产生真菌毒素,其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁) 毒性最大,致癌力最强,文献报道用间接竞争酶联免疫吸附法(ELISA)检测中药材和中成药的 AFB₁,检出率极高,而且含量也很高^[1,2]。为了更客观地评价中药材的 AFB₁污染程度,保证人民用药安全,我们采用了 ELISA 试剂盒定量检测 AFB₁,对一批中药材和中成药进行检测。

1 仪器、试剂、药材

酶联免疫测定仪(Bio Rad-550), AFB₁ (ELISA)检测试剂盒(北京市营养源研究所百林生物技术公司),其组成:① AFB₁抗原包被 16 孔×6 条形带框酶标板,④单克隆抗体,④酶标二抗,④空白对照液,②底物(1mg×4),③底物液 A,③底物液 B,⑤终止液,⑤ PBS-T 洗液。

中药材样品来源于海淀医药经营公司,中成药为市售品。

2 原理

样品中的 AFB₁经提取、脱脂、浓缩后与定量特异性抗体反应,多余的游离抗体与酶标板内的包被抗原结合,加入酶标记物和底物后显色,与标准曲线

比较测定含量。

3 样品测定

3.1 提取:样品粉碎过 20 目筛,取 20.0 g 加入 250 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 50.0 mL 甲醇-水(80/20)溶液和 15.0 mL 石油醚,盖塞后滴水封严。超声 30 min,用快速定性滤纸过滤于 125 mL 分液漏斗中,待分层后,放出下层甲醇-水溶液于 50 mL 烧杯中,从中取出 10.0 mL(相当于 4.0 g 样品)于 75 mL 蒸发皿中,65℃水浴通风挥干,用 2.0 mL 20% 甲醇-PBS 分 3 次溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物,移至小试管,加盖振荡后静置待测,此液每 1 mL 相当于 2.0 g 样品。

3.2 ELISA 测定

①将下列试剂稀释后备用:PBS-T 洗液:390 mL 蒸馏水稀释(1/40);底物液 A:9 mL 蒸馏水稀释(1/9);抗体:7 mL 蒸馏水稀释(1/140);酶标二抗:10 mL 蒸馏水稀释(1/200);阴性对照液:200 μL 抗体+200 μL 空白对照液在玻璃试管内混合振荡后静置。

④抗体抗原反应:抗体与等量样品提取液混匀后静置 15 min。洗涤酶标板 2 次(每次 3 min),晾干。分别加入此抗体抗原反应液及空白对照液、阴性

* Address: Li Yansheng, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing

李延生 女,1996 年毕业于山东医科大学,1992 年考入北京协和医科大学,师从中国医学科学院药用植物研究所陈建民研究员,1999 年毕业于获理学硕士学位。主要从事中草药成分分析及中药质量标准的研究。

对照液, 130 微升/孔, 37 湿盒中孵育, 2 h 后倒掉反应液并晾干, 洗 $3 \times 3 \text{ min}$, 晾干。

(四)酶标记反应: 加入酶标二抗, 100 微升/孔, 37 孵育 1 h, 洗 $5 \times 3 \text{ min}$, 晾干。

$\frac{1}{4}$ 显色反应: 1 mg 底物+ 2.5 mL 底物液 A+ 42 μL 底物液 B, 待底物充分溶解后加入酶标板, 100 微升/孔, 37 15 min 后加入终止液, 40 微升/孔。

$\frac{1}{2}$ 测定: 酶标仪 490 nm 测定吸收值。

3.3 计算

¹ 求出各孔的吸收校正值: 吸收校正值= 吸收实测值- 空白对照孔吸收值(均值)。

④求出待测样的吸收值: 吸收(%) = [吸收校正值 \div 阴性对照孔吸收校正值(均值)] $\times 100\%$ 。

(四) 求出待测样 AFB₁ 含量(ng/g): 将待测样的吸收(%) 值带入标准竞争抑制曲线, 算出 AFB₁ 含量。结果见表 1。

4 讨论

ELISA 法检测限达 0.01 ng, 操作比较简单, 样品不用经过纯化是其优越性。本文所用试剂盒为单

表 1 中药材和中成药的 AFB₁ 含量

药材名称	AFB ₁ 含量 (ng/g)	药材名称	AFB ₁ 含量 (ng/g)
神曲	49.3	山楂	28
青皮	25.7	白术	15
白芍	2.3	黄芩	16.9
泻叶	100	麦冬	0
黄芪	200	胖大海	19
陈皮	106	枳实	23.5
柴胡	10	续断	44.7
丹皮	2.5	姜黄	17
地丁	14.6	茯苓	0
金钱草	12	银翘解毒丸	29.5
板蓝根	100	清眩治瘫丸	23.7

克隆抗体, 与文献所用多克隆抗体方法的检测结果相比, 所测中药材和中成药的 AFB₁ 含量低得多, 但据了解该试剂盒的单克隆抗体未检验过中药成分, 尚需证实含香豆素或黄酮类化合物的中药对检测 AFB₁ 有无干扰。

参 考 文 献

1 杜平华, 杨晓峰. 药物分析杂志, 1995, 15: (2): 34
2 任凤兰, 马宏伟. 药物分析杂志, 1997, 17: (4): 280
(1999-07-08 收稿)

刺五加提取物中紫丁香苷、紫丁香树脂苷的 HPLC 测定法

西安天诚医药生物工程有限公司(710075) 刘莹 惠玉虎*

摘 要 以 C₁₈柱, 甲醇-水(28 72) 为流动相, 在 270 nm 检测波长下, 建立了刺五加提取物中紫丁香苷(简称苷 B)、紫丁香树脂苷(简称苷 E) 的反相高效液相色谱同时测定方法。该方法快速、准确、灵敏。方法回收率苷 B 为 97.3%, RSD 1.95%; 苷 E 为 96.8%, RSD 1.50%。
关键词 刺五加 紫丁香苷 紫丁香树脂苷 HPLC

刺五加提取物是从五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根及根茎中提取有效成分后喷雾干燥而成。其中主要含有各种苷类如紫丁香苷(苷 B)、紫丁香树脂苷(苷 E) 及多种木脂素类、异秦皮定和黄酮类等成分^[1]。关于苷 B 的测定已有报道, 为 HPLC 法, 流动相为甲醇-水-冰醋酸^[2, 3], 氯仿-异辛烷-冰醋酸^[1]; 也有分光光度法^[1]。为了更好地控制产品质量, 根据客户要求, 我们对其中的苷 B、苷 E 的测定方法进行了研究, 建立了苷 B、苷 E 的反相高效液相色谱同时测定方法。

1 仪器与试剂
日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器, 大连化学物理研究所色谱工作站(WDL-95), KQ-250 型超声波清洗器。
对照品: 苷 B、苷 E 均由美国 Alpha 实验室提供, 刺五加提取物为西安天诚医药生物工程有限公司生产(批号为 991107, 991108, 991109, 991110, 991111)。甲醇为分析纯, 水为二次重蒸馏水。
2 色谱条件
色谱柱: Supelcosel LC-18-DB 4.6 mm \times 150 mm 5 μm ; 流动相: 甲醇-水(28 72); 流速: 1.0

* Address: Hui Yuhu, Xi'an Tiancheng Drugs & Bioengineering Co., Ltd., Xi'an
惠玉虎 男, 理学硕士学位, 高级工程师。1989 年毕业于吉林农业大学农业环保专业, 研究方向为农药残留分析。工作期间主要从事农药质量检测及科技推广工作, 共发表研究论文 8 篇, 译文 7 篇。现在西安天诚医药生物工程有限公司主要从事中草药提取物的检测和农药残留分析检测等工作。