

化种子鸟类对黄檗果实的破坏,影响黄檗的繁殖。

2.2.2 人为因素:1)毁林种地特别是长白山区毁林种参,是对森林资源的巨大破坏,也是黄檗致危的重要人为因素。2)农药的大量使用使某些昆虫数量减少,影响了传粉,致使结实率下降。3)生态环境的破坏使传播种子鸟类的减少,使黄檗不能自然更新。4)盗采盗伐的影响

黄檗材质优良,是人们重点砍伐对象,国家虽然已经禁止天然林砍伐,但盗伐现象在林区仍然极为猖獗。

黄柏是常用中药,也是提取小檗碱的重要原料,禁止天然林砍伐后黄柏的药材来源减少,价格上升,促使不法之徒上山盗采野生黄柏药材,轻者将黄檗大树站立剥皮,重者锯倒剥皮,致使大量黄檗成树惨遭破坏。在调查的老梁山样地中 400 m² 的面积内的 7 株黄檗树有 4 株被站立剥皮,两株被锯倒剥皮,只有一株未遭破坏。在 2003 年以前一直保护较好的前白鸡腰样地,2004 年 8 月样地内的一百多株树龄 50 年以上、胸径 30~80 cm 的黄檗全部被盗伐、剥皮。由于采树皮的季节都在夏季,致使黄檗在果实成熟前死亡,失去了天然更新的机会,从而导致黄檗在该地区灭绝。森林的采伐和乱砍、盗伐是黄檗致危的另一致命的人为因子。

3 解危措施

3.1 原地保护

3.1.1 保护黄檗的生存环境:通过加强立法、严格执法等行政措施,严格禁止毁林种地、种参,保护黄檗的生态环境,保护区域内的生物多样性,保护黄檗的传粉昆虫和传播种子的鸟类,促进黄檗种群的自然更新。严惩乱砍、盗伐和非法采集中药黄柏的不法分子,保护有限的天然黄檗资源。

3.1.2 对黄檗天然种群的更新进行人为干预:由于黄檗种子在自然条件下不易成熟,成熟种子不易脱落,成熟的脱落种子在纯自然条件下不能萌发,在自然条件下黄檗没有无性繁殖的能力,致使黄檗种群自然更新能力极差。针对这些情

况,可在有黄檗分布的区域内采取局部间伐,增强林内光照,对有成熟种子脱落地域的土地进行翻动踩压,使种子与土地紧密结合,促使种子萌发,从而优化黄檗种群年龄结构,在人为干预下促使黄檗种群的更新。

3.1.3 人工扩大区域内的黄檗种群的数量及规模:在有黄檗分布的区域内采集成熟黄檗种子,经人工处理后回播于该区域,或人工育苗后移栽到黄檗自然分布的区域,不经人为管理,令其自然生长,亦可采集黄檗枝条,经药剂处理后扦插于该区域,之后也不经人工管理,从而扩大区域内黄檗种群的数量及规模。

3.2 迁地保护:在黄檗分布的区域采集成熟种子或枝条,经人工处理后播种或扦插于生态环境与气候条件与原产地相近但无黄檗分布的区域,从而扩大黄檗的分布范围及种群数量。

由于黄檗可药用、材用、绿化等,具有很高的经济价值,并且适应能力较强,有成熟的人工栽培技术作支撑^[3,4],异地引种栽培易于成活,也易被人们接受,可在林内、荒山、路边、宅旁大量栽种黄檗,促进农民收入,满足人们对黄檗木材、药材的需求,从而促进黄檗野生资源的保护和合理利用。目前在贵州、湖北乃至新疆天山、哈密等地都有引种黄檗的报道^[5],黄檗的迁地保护切实可行。

References:

- [1] Wang J P. *Record of Changbai Mountain* (长白山志) [M]. Changchun: Jilin Literature and History Press, 1989.
- [2] Lu C H, Chang J Z, Xu Q, et al. Regeneration of *Phellodendron amurense* and its dead dispersal by frugivorous birds [J]. *J Ecol* (生态学杂志), 2004, 23(1): 24-29.
- [3] Wu M J, Yue Y P, Sun J F, et al. Cultivation of Amur Cork seeding sampling [J]. *J Forest Sci Technol* (林业科技), 1996, 21(6): 13-14.
- [4] Lin D G, Gu S F, Li C H, et al. Study reproduced technology [J]. *J Forest Sci Technol* (林业科技), 1998, 23(2): 7-9.
- [5] Xing X Z. Adventitious effect and analysis of ecological adaptability of Amur Cork [J]. *Xinjiang Agric Sci* (新疆农业科学), 2001, 38(5): 193-194.

中药中黄曲霉毒素检测概况

陈建民,张雪辉,杨美华,金 钺

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所,教育部“中草药物质基础与资源利用”

重点实验室,北京 100094)

摘 要:介绍了近 10 年来中药污染黄曲霉毒素检测概况,早期研究主要采用 TLC 和 ELISA 法均发现部分中药污染了黄曲霉毒素,但实验报告结果差异很大,而且尚未形成公认的标准方法。评述了 TLC、ELISA 和 IAC-衍生化 HPLC 荧光检测法。认为 ELISA 法可能发展成为样品的快速检测方法,而 IAC-HPLC 检测法是最有前途的方法,目前国内外在食品检测中采用的多种衍生物方法均可引入用于中药检测。

关键词:中药;黄曲霉毒素;检测

中图分类号:R286.013

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)03-0463-04

收稿日期:2005-07-08

基金项目:国家“十五”重大科技专项“创新药物和中药现代化”——中药质量保证技术平台(2001BA701A57)。

作者简介:陈建民(1942—)男,广东人,研究员,博士生导师,长期从事中药质量标准研究。Tel:(010)62899730 Fax:(010)62899730
E-mail:chenjianmin@hotmail.com

A survey of determination of aflatoxin in Chinese materia medica

CHEN Jian-min, ZHANG Xue-hui, YANG Mei-hua, JIN Yue

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)**Key words:** Chinese materia medica; aflatoxin; determination

黄曲霉毒素(aflatoxins, AF)是黄曲霉 *Aspergillus flavus* Link 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* Speare 产生的一类代谢产物,特曲霉也能产生黄曲霉毒素,但产量少。1961 年首次发现污染了 AF 的花生并能使大鼠诱发肝癌,1962 年鉴定 AF 这组化合物均为二呋喃香豆素的衍生物,已证实有 17 种衍生物,最重要的为黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 和 AFM₁)等 6 种化合物。前 4 种主要存在于植物性样品中,特别是含油脂或淀粉的花生、核桃、大豆、玉米等食品中,后 1 种是 AFB 在动物体内的代谢产物,主要存在于牛奶及奶制品中。近年研究也发现一些中药材也存在 AF 的污染,AF 污染已引起了 WHO 和全世界人们普遍关注。随着农产品和食品中 AF 限量日益严格,其检测方法随之不断改进,在农产品和食品方面,已有较成熟的方法^[1-3]。世界上还没有公认的植物药中 AF 限量标准,我国原外经贸部 WM-2001《药用植物及制品进出口绿色通道行业标准》^[4]中 AF 限量标准为小于 5 ng/g,由于中药中 AF 检测开展较晚和较少,直接引用农产品方法进行检测存在问题。本文对近年来中药中 AF 检测情况进行了概述。

1 AF 的理化性质

AF 易溶于氯仿、甲醇,不溶于水、正己烷、石油醚和乙醚。耐热(一般烹调加工的温度下破坏很少),280 °C 发生裂解,可被强碱、强氧化剂破坏。在氢氧化钠溶液中内酯环开环成香豆素钠盐溶于水。霉菌菌株在 25~32 °C、80%~90% 湿度、氧气 1% 以上的条件下可产生 AF。在紫外照射下,产生荧光,激发光 λ_{ex} 365 nm 时, B 族产生黄色荧光(λ_{em} 425 nm), G 族产生绿色荧光(λ_{em} 450 nm)。全部为右旋(+)光学活性体。在 362 nm(或 350 nm)处 AF 紫外吸收的摩尔吸收系数: AFB₂>AFB₁>AFG₂(≥AFM₁)>AFG₁(表 1)。

表 1 黄曲霉毒素的紫外吸收(甲醇)

Table 1 UV Absorption of aflatoxins (methanol)

AF 的种类	相对分子质量	波长/nm	摩尔吸收系数
B ₁	312	223	22 100
		265	12 400
		360	21 800
B ₂	314	222	18 600
		265	12 100
		362	24 000
G ₁	328	216	27 400
		242	9 600
		265	9 600
		362	17 700
G ₂	330	214	25 300
		244	10 500
		265	900
		362	19 300
M ₁	328	265	14 150
		357	21 250

2 AF 的检测

根据欧盟 1525/98 号指令要求食品及实物组分中 AFB₁≤2 μg/kg, AF 总量(AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂)≤4 μg/kg, 我国食品标准为 5~20 μg/kg, 即样品浓度范围常在 0.1 μg/kg~0.1 mg/kg, 因此对检测方法灵敏度和准确性有较高的要求, 而因为日常需检测的商品(样品)数量巨大, 所以要求检测方法尽量简便、快速。已报道的检测方法有薄层色谱法、酶联免疫吸附法、免疫和柱荧光法、免疫亲和柱-HPLC 法等。

2.1 薄层色谱法: 其原理是将样品经过提取、净化后, 适量点于硅胶薄层板上, 展开后, 在紫外灯下与随行 AF 对照品色谱点距对照, 目测或荧光扫描检测, 是一种半定量的分析技术。

薄层色谱法有单项展开和双向展开, 在紫外灯下, AFB 对应的色谱点显浅黄荧光, AFG 为弱的绿色荧光。R_f 减少的顺序为 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂, 具体分析操作可参照 GB/T5009.2-1996 和 GB/T 5009.23-1996 第一法, 检出限为 1~5 μg/kg。目测的 RSD 为 20%~30%, 荧光扫描可降至约 5%。卢志雁等采用此法检测了神曲、越鞠保和丸等 7 种中药材或中成药, 其中神曲中含 AF 200~229 ng/g, 越鞠保和丸为 1 056 ng/g^[5]。李春蓉等检测了桃仁、胶大海等 50 种中药材, 仅桃仁、胖大海检出 AF(<5 ng/g)^[6]。

2.2 酶联免疫吸附法(ELISA): 其基本原理是想将已知的抗体或抗原结合在某种固相载体上, 并保持其免疫活性。测定时, 将待检标本和酶标抗原或抗体按不同步骤与固相载体表面吸附的抗体或抗原发生反应, 用洗涤的方法分离抗原、抗体复合物和游离成分, 然后加入酶, 底物催化显色, 进行定性或定量测定。该法是近年我国中药研究人员开展最多的检测方法。李汶等采用此法检测 30 种常用中药材和 7 个品种 20 批次中成药, 23 种药材和 18 个批号中成药的 AF>20 μg/g^[7]。刘鹏等采用 ELISA 法检测 18 批中成药, 全部检出 AFB₁, 但均低于 1 μg/g^[8]。李延生等采用此法检测 22 种中药, 50% AF 大于 20 μg/g, 25 批中成药 AF 为 250~878 ng/kg。汤杨采用此法检测了 44 个品种的中成药(含片剂、冲剂、丸剂、胶囊剂)AF 检出率达 89%, 24 个品种 51 批中药材中有 41 批 AF>20 μg/g^[9]。匡佩琳等^[11-13]也报道了运用 ELISA 法中药中 AF 的检测情况。

2.3 HPLC 检测法: 由于 AF 具有较强的紫外吸收和产生荧光的特性, 因此可以进行 HPLC-紫外或荧光检测; 而 AFB₁ 和 AFG₁ 其荧光强度相对弱一些, 在含水流动相中容易产生荧光淬灭, 所以为提高检测灵敏度, 常采用柱前三氟醋酸(TFA)衍生法^[14], 柱后溴化^[15]、碘化^[3], Kobra cell 电化学衍生法^[16]和柱后光化学衍生法等, AFB₁、AFB₂ 荧光增

强。为除去样品中干扰成分,食品检测中常采用各种固相萃取小柱进行净化和富集,主要有以硅胶, C_{18} 键和硅胶, Florisil 硅土, 极性、非极性离子交换树脂等为填充剂的多功能性和交联有 AF 特异抗体的免疫亲和柱(IAC)^[3,17]。免疫亲和柱对 AF 有特异吸附,而这种吸附又可以被极性溶剂洗脱,将提取、净化、浓缩一次完成,大大简化了前处理过程,提高了工作效率和方法的准确度、精密度。目前使用最多的是美国 Vicam 公司的 Afla Test[®] 柱和德国 r-Biopharm 公司的 Easiextract Aflatoxina 柱。

笔者曾考察我国进出口商品检验行业标准(SN0339-95)中 HPLC-TFA 法和 ELISA 法检测 22 种中药材及中成药,结果见表 2。Storka 等采用 IAC-HPLC 溴化衍生法检测了大麻苈、番泻叶、辣椒粉等几种生药和提取物中 AF。Tasaneeyakul 等用 IAC-电化学衍生 HPLC 法测定了 28 种泰国草药产品,有 5 种产品受到 AF 污染,但低于泰国允许限量 20 $\mu\text{g/g}$ ^[18]。笔者还对 39 种药材和中成药进行了 IAC-HPLC 柱后溴衍生荧光检测和 IAC-荧光分光光度法(SFB)的检测,结果秦艽、生建曲、生麦芽、前胡、杏仁出现阳性结果,而大多数 SFB 法阳性结果的药材用 HPLC 法确证并没有受到 AF 污染^[19]。

表 2 ELISA 和 HPLC-TFA 法测定中药中 AFB₁

Table 2 Determination of AFB₁ in Chinese materia medica by ELISA and HPLC-TFA

中药名称	AFB ₁ /(mg · kg ⁻¹)	
	ELISA	HPLC-TFA
神曲	49.3	2.57
青皮	25.7	0
白芍	42	0.37
番泻叶	100	0
黄芪	200	8.27
陈皮	106	3.20
柴胡	10	0
丹皮	2.5	0
地丁	14.6	0
金钱草	12	0
板蓝根	100	0
山楂	28	2.24
白术	15	0
黄芩	16.9	0
麦冬	0	0
胖大海	19	0.73
枳实	23.5	0
续断	44.7	0
姜黄	17	0
茯苓	0	0
银翘解毒丸	29.5	未测
清眩止痛丸	23.7	未测

3 结果与讨论

3.1 从文献检测结果可看出,植物药材在生产、贮藏过程中确实存在被 AF 污染的可能性,应特别关注经发酵工艺的曲类药、种子类中药,注意南方高温、高湿地区及库房中长霉药材的检测。

3.2 由于许多中药材含有香豆素及产生荧光的生物碱和萜类等化合物,对采用薄层色谱法检测 AF 产生严重干扰,双向展开、加压薄层色谱可以减轻干扰。采用氨熏,观察荧光点

颜色变化,再加热除氨,重现原来颜色;或在斑点上加滴三氟醋酸观察荧光是否加强等手段可帮助确证。受方法本身限制,建议将 TLC 仅作为一个快速的限量检测方法。

3.3 ELISA 方法是一种灵敏的高特异性的快速检测方法,适用于大批量样品的普查,但由于供用酶、抗体,对保存条件、保存时间、温度均有一定要求,其次在研制抗体时交叉反应主要考虑的是其他霉菌毒素及脂肪、蛋白、糖等的干扰,没有考虑中药化学成分干扰,此外样品的酸、碱 pH 性质甚至样品溶液中含醇量都可能造成假阳性结果。而国内目前的 ELISA 试剂盒,大多质量不稳定,不同厂家、不同批次检测结果差异较大。因而目前不同实验室中药检测结果难以比较参照。根据相似的酶联免疫原理研制质量可靠、稳定的试剂盒或检测条(卡),进一步查明哪些类型化学成分可能产生干扰,是今后研究的一个重要方面。

3.4 各种固相萃取柱在农产品和食品的 AF 检测中是很好的样品前处理方法,但在中药的检测中,未能找到合适的洗脱液适用于各种中药和不同剂型样品,仍然是 IAC 柱效果最好,仅需注意样品液的 pH 影响。一些中药成分虽能被 IAC 柱吸附,但不干扰 HPLC 检测;必要时操作中可加入氯化钠溶液、三氯化铝溶液等试剂减少干扰物。只是 IAC 柱价格较贵,又是一次性使用,检测成本高;多次使用受操作者、操作条件及不同样品的影响较大,实验室内和实验室间测定误差较大。目前 ELISA 法和 IAC-荧光光度法,由于所使用的抗体目前尚不能很好区分 AFB₁、AFB₂ 和 AFG₂、AFG₂, 因此实际检测的是 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的总量;IAC 荧光光度法操作过程不使用 AF 对照液,故最安全。

3.5 IAC-HPLC 检测中药中 AF 量是最有前途的方法,无论采用柱前衍生或柱后衍生,方法的灵敏度、精密度都能满足 AF 检测要求。柱前 TFA 衍生灵敏度最高,但重现性受操作者技术影响较大;在线柱后衍生法自动化程度高、重现性好,但需增加衍生化器和衍生剂输液泵等设备,衍生化反应受温度、时间、衍生剂浓度的影响,而反应时间需要考虑反应管体积、HPLC 流动相流速和衍生剂流动相的影响。

References:

- [1] Stroka J, Anklam E, Jorissen U, et al. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study [J]. *JAOAC Int*, 2000, 83(2): 320.
- [2] Trucksess M W, Stack M E, Nesheim S, et al. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1991, 74(1): 81.
- [3] GB18979-2003 [S].
- [4] WM 2-2001 [S].
- [5] Lu Z Y, Ye J W, Yuan W P, et al. Detection of the aflatoxin in the seven of Chinese materia medica [J]. *Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2001, 19(5): 527-528.
- [6] Li C R, Xu L M, Lin B C, et al. The contamination investigation of the aflatoxin in Chinese medicinal materials [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 1994, 6(3): 80-81.
- [7] Li W, Zhuang X C. Determination of aflatoxin B₁ in regular Chinese medicine by method [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(2): 100-102.

- [8] Liu P, Du P H, Su D M. Determination of aflatoxin of the 18 batches of Chinese traditional patent medicine [J]. *China J China Meter Med* (中国中药杂志), 1999, 24(5): 287-288.
- [9] Li Y S, Chen J M. Determination of aflatoxin B₁ in traditional Chinese medicine by ELISA [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(8): 586.
- [10] Ren F Z, Ma H W. The Determination of aflatoxin B₁ in traditional Chinese medicine and traditional patent medicine by ELISA reagent box [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1997, 17(4): 280-281.
- [11] Kuang P L. Inspection of AFB₁ quantity in Chinese traditional medicines [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(7): 478-479.
- [12] Liang Y Q, Huang R F. Detection of the aflatoxin B₁ in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2000, 17(3): 224-225.
- [13] Du P H, Yang X F. The study on the analysis of indirect competitive EFISA for the determination of the aflatoxin B₁ in Chinese medicinal materials [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(2): 34-36.
- [14] *Professional Standard of the People's Republic of China for Import and Export Commodity Inspection* (中华人民共和国进出口商品检验行业标准) SN0339-1995 [S].
- [15] *Professional standard of the People's Republic of China for Import and Export Commodity Inspection* (中华人民共和国进出口商品检验行业标准) SN0637-1997 [S].
- [16] AOAC Official Method 991.31 [S].
- [17] Bruce R M, Graig W H, Tom R R, et al. Determination of aflatoxins in grains and raw peanuts by a rapid procedure with fluorometric analysis [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(1): 95.
- [18] Tassaneeyakul W, Razzazi-Fazeli E, Porasaphatana S, et al. Contamination of aflatoxin in herbal medicinal products in Thailand [J]. *Mycopathologia*, 2004, 158(2): 239-244.
- [19] Zhang X H, Chen J M. Comparison between the post-column derivatization with bromine by HPLC and the fluorometric analysis for determination of aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(12): 997-1000.

番红花化学成分及生物活性研究进展

何美莲, 陈家宽, 周铜水*

(复旦大学生命科学学院 天然药物研究中心, 上海 200433)

摘要:着重对番红花柱头所含的化学成分及其代谢途径进行了综述。根据化合物的结构特点、理化性质及代谢途径, 番红花中的化学成分可归纳为水溶性色素、脂溶性色素、挥发油及挥发油前体苷类几种类型, 研究表明这些结构多样的成分均是由脂溶性的玉米黄质降解产生。此外, 还对国内外有关番红花花被以及侧芽等不同部位化学成分的研究进展, 以及番红花提取物及番红花苷成分在心脑血管、肝脏、肾脏、免疫系统、肿瘤以及抗氧化方面的广泛药理活性进行了全面综述, 为全面开发利用番红花资源提供参考。

关键词:番红花; 代谢途径; 生物活性

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)03-0466-05

Advances in reserach of chemical constituents in *Crocus sativus* and their biological activities

HE Mei-lian, CHEN Jia-kuan, ZHOU Tong-shui

(Research Center of Natural Medicines, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Key words: *Crocus sativus* L.; metabolic pathway; biological activities

番红花 *Crocus sativus* L. 为鸢尾科番红花属植物^[1]。中医将其干燥柱头入药, 称为西红花 (*Stigma Croci*), 具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神之功效, 用于经闭腹痛、产后瘀阻、温毒发斑、忧郁痞闷、惊悸发狂等症^[2]。番红花原产欧洲南部至伊朗, 经印度传入西藏, 故亦称藏红花, 习用至今, 现在我国浙江、江西、江苏、北京、上海有少量栽培。它既是一种名贵药材, 也是一种名贵香料, 现代药理研究表明番红花具有很强的循环系统作用以及抗肿瘤、抗氧化等生物活性。由于其广泛的生物活性, 近来, 人们越来越关注它的开发利用。本文就其不同部位化学

成分和生物活性作一综述, 为全面开发利用番红花提供参考。

1 化学成分

由于番红花的药用部位是其柱头, 因此对番红花化学成分的研究也主要集中在柱头, 近年来也对番红花花被和侧芽中的化学成分进行了研究。迄今为止, 从番红花中已发现化学成分 100 多种, 现分述如下。

1.1 柱头中的化学成分: 番红花柱头中存在一条独特的代谢途径, 能将脂溶性的玉米黄质降解产生藏红花酸、部分挥发油和藏红花苦素; 藏红花酸进一步糖苷化形成特殊的水溶性色

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家“十五”重大科技专项 (2001 BA701A61); 上海科委中药现代化专项 (03D219547, 03D219532)

作者简介: 何美莲 (1979—), 女, 安徽太湖人, 硕博连读研究生, 从事天然产物研究与开发。 E-mail: hml1129@sohu.com

* 通讯作者 周铜水 Tel: (021) 65642206 E-mail: tszhou@fudan.edu.cn