

基于生物可给性和靶器官毒性剂量法的乌梢蛇中铅和砷联合暴露评估

左甜甜[#], 高飞[#], 金红宇, 刘丽娜, 王丹丹, 咎珂^{*}, 马双成^{*}

中国食品药品检定研究院, 北京 102629

摘要: 目的 通过考察乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 中铅 (Pb) 和砷 (As) 的生物可给性, 并探索靶器官毒性剂量 (TTD) 法在评估中药中重金属联合暴露风险中的应用, 为限量标准的制定提供参考。方法 通过胃-肠两步模拟消化 (*in vitro* PBET) 联合电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法对乌梢蛇中 Pb 和 As 的生物可给性进行考察, 根据其生物可给性计算其日暴露量。采用危害指数 (HI) 法对于 Pb 和 As 联合暴露产生的健康风险进行初步筛查; 进一步针对不同毒理学终点, 采用 TTD 法对 Pb 和 As 的累积风险进行更加精确的评估。结果 8 批乌梢蛇中 Pb 和 As 的合格率为 100%。HI 法的初步评估结果表明, 所有批次乌梢蛇中 Pb 和 As 的 HI 值均 < 1。TTD 法评估结果表明, 作用终点心血管系统、神经系统、肾脏、血液和睾丸, 所有批次乌梢蛇的 HI 值均 < 1, 健康风险可接受。结论 基于生物可给性, 探索乌梢蛇中 Pb 和 As 的累积风险评估方法, 为中药外源性有害残留物风险评估的方法开发提供新的思路, 为制定更加科学的限量标准提供技术支撑。

关键词: 靶器官毒性剂量法; 生物可给性; 铅; 砷; 乌梢蛇; 累积风险评估

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 12-2473-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.010

Risk assessment of combined exposure to lead and arsenic in *Zaocys dhumnades* (Cantor) based on bioaccessibility and target-organ toxicity dose modification of hazard index method

ZUO Tiantian, GAO Fei, JIN Hongyu, LIU Lina, WANG Dandan, ZAN Ke, MA Shuangcheng

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Abstract: **Objective** Investigating bioaccessibility of lead (Pb) and arsenic (As) in *Zaocys dhumnades*(Cantor) and exploring the application of target-organ toxicity dose modification of hazard index (TTD) method in assessing the risk of combined exposure to heavy metals in traditional Chinese medicines (TCMs), in order to provide reference for the formulation of limit standards. **Method** The bioaccessibility of Pb and As in *Zaocys dhumnades*(Cantor) was investigated by *in vitro* PBET digestion method combined with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and the exposure doses were calculated based on bioaccessible contents. The health risk caused by combined exposure to Pb and As was preliminary screened by Hazard Index (HI) method. Moreover, a more accurate TTD method was used. **Results** The qualified rates of Pb and As in 8 batches of *Zaocw dhumnades* (Cantor) were 100%. The HI results indicated that the HI values of Pb and As in all batches of *Zaocw dhumnades* (Cantor) were less than one. The results of TTD method showed that for the end points of cardiovascular system, blood, nervous system, kidney and testis, the HI values of all batches of *Zaocw dhumnades* (Cantor) were less than one, and the health risk was acceptable. **Conclusion** The cumulative risk assessment of Pb and As in TCMs is proposed based on their bioaccessibility in this study, which offers novel ideas for the development of risk assessment methods of exogenous harmful residues in TCMs, and provides technical support for formulating scientific limit standards.

Key words: target-organ toxicity dose modification of HI (TTD) method; bioaccessibility; lead; arsenic; *Zaocys dhumnades* (Cantor); cumulative risk assessment

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 国家十三五“重大新药创制”课题(2018ZX09735006); 中国食品药品检定研究院中青年基金资助项目(2020A3)

[#]共同第一作者: 左甜甜, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药质量控制。Tel: (010)67095994 E-mail: zuotiantian2011@163.com

高飞, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为药品和体外诊断试剂质量控制。E-mail: 2287264223@qq.com

^{*}共同通信作者: 马双成, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药质量控制。Tel: (010)67095272 E-mail: masc@nifdc.org.cn

咎珂, 男, 副研究员, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 6206310@qq.com

乌梢蛇为游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 的干燥体,味甘,性平,归肝经。乌梢蛇作为药用最早的动物类中药材记载于《雷公炮炙论》,至今已经有几千年历史,具有祛风、通络、止痉的功效,目前临床上用于风湿顽痹、抽搐痉挛、破伤风、疥癣等疾病的治疗^[1-2]。课题组前期样品筛查中发现,动物药受到重金属污染的情况较为严重,因此对其重金属风险的评估很有必要。

目前我国在制定中药材中重金属残留限量标准时一般仅考虑单一重金属的风险,在监测项目中对不合格药材的判定也是以某一重金属是否超标作为评判准则,尚未考虑2种或多种重金属同时暴露的情况。研究表明,人体同时或者先后暴露于多种污染物可能引起更高或者更低的联合效应^[3-4],因此,传统的仅针对单一重金属风险评估的方式可能会造成对风险的低估或高估。2007年,世界卫生组织国际化学品安全规划署(WHO/IPCS)为混合化合物的风险评估制定了通用框架,并推荐了分阶段推进评估法,强调污染物联合暴露所产生的健康风险不容忽视^[5]。此外,在实际情况中,中药材中的重金属不一定能够被人体完全吸收,若将中药材中重金属含量用于风险评估可能会高估其对人体的危害,因此需要考虑重金属的生物可给性(bioaccessibility),即在胃肠环境中可以溶出的重金属的比例^[6-8]。本研究以动物药乌梢蛇为研究对象,采用胃-肠两步模拟消化(*in vitro* PBET)法^[9],并与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法联用测定其生物可给量,在此基础上基于靶器官毒性剂量(TTD)法对于乌梢蛇中铅(Pb)和砷(As)的联合暴露风险进行评价,作为中药重金属风险评估的系列研究,以期科学、客观地评价中药中重金属的健康风险,并为其限量标准的制定进一步提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 7700X ICP-MS(美国Agilent公司); Mars5微波消解仪(美国CEM公司); Millipore Mill-Q超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试剂及主要试剂

Pb和As元素标准溶液购于国家标准物质研究中心;调谐溶液为Li、Y、Ce、Tl、Co的混合标准溶液(美国Agilent公司,质量浓度 $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,批号5185-5959);内标溶液为含Li、Sc、Ge、Rh、In、Tb、Lu、Bi的混合内标溶液(美国Agilent公司,批号5188-

6525);胃蛋白酶、胆酸钠和苹果酸钠(分析纯)、硝酸(微电子级)均购自Sigma公司;胰酶(国药集团);碳酸氢钠、柠檬酸钠、乳酸、冰醋酸、氢氧化钠均为分析纯(国药集团)。

1.3 中药材

本次抽样年份为2018—2020,涉及乌梢蛇样品8批次,分别来自浙江省、山东省、江西省、四川省和上海市,抽样单位涉及中药材及中药饮片生产、经营和流通环节,由中国食品药品检定研究院康帅副研究员鉴定为乌梢蛇 *Z. dhumnades* (Cantor) 的干燥体,具体样品信息见表1。

2 方法

2.1 样品测定

2.1.1 乌梢蛇中Pb和As质量分数测定 根据《中国药典》2020年版四部收录的ICP-MS法进行乌梢蛇中Pb和As残留量的测定,同时采用随行质量控制(空白试验、同位素内标试验、精密度试验和随行回收试验)来确认方法的适用性,结果均符合检测要求。

2.1.2 *in vitro* PBET提取法考察乌梢蛇中Pb和As的生物可给量 样品粉碎,过三号筛,分别精密称取各批次乌梢蛇各2份,每份0.5 g,加入50 mL模拟胃液(由1.25 g胃蛋白酶、0.5 g苹果酸钠、0.5 g柠檬酸钠、420 μL 乳酸、500 μL 乙酸配制而成,溶解后定容至1 L,并用HCl调节pH值至2)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中震荡1 h,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,精密量取上清液25 mL,电热板低温浓缩至约3 mL,冷却后,加入硝酸5 mL,置微波消解仪中进行消解。待消解液冷却后用超纯水定容至50 mL量瓶中,得到提取胃液,待测。同时同法制备试剂空白溶液。

胃液提取结束后,向残渣中加入50 mL模拟肠液(由0.5 g胰酶和1.75 g胆酸钠配制,溶解后定容至1 L,再用氢氧化钠将pH值调至7.0)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中震荡4 h,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,精密量取上清液25 mL,得到提取肠液待测。同时同法制备试剂空白溶液。将提取肠液在电热板低温浓缩至3 mL左右,冷却后,加入硝酸5 mL,置微波消解仪中进行消解。待消解液冷却后用超纯水定容至50 mL量瓶中,待测。同时同法制备试剂空白溶液。

应用“2.1.1”项方法检测Pb和As生物可给量,并计算生物可给性。

生物可给性=重金属生物可给量/乌梢蛇中重金属的质量分数

2.2 风险评估

2.2.1 日暴露量的计算 按公式计算每人每千克体质量中药材中Pb、Cd、As日暴露量。

$$\text{Exp} = \text{EF} \times \text{Ed} \times \text{IR} \times \text{C} \times \text{BA} / (\text{W} \times \text{AT})$$

Exp为每人每千克体质量单一重金属的日暴露量,单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;EF为中药材的服用频率;Ed为服用中药的年限(根据国家食品安全风险评估中心在我国11个省份20 917名调查者的有效消费调查数据^[10],EF的P95值为每年90 d、Ed为20年);IR为处方中药材的日暴露量(根据《中国药典》2020年版规定的最大日用量为15 g);BA为乌梢蛇中Pb和As的生物可给性;C为乌梢蛇中重金属的残留量,单位为 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;W为人体体质量,以70 kg计;AT为平均寿命天数($365 \times 70 = 25\,550$)

2.2.2 风险特征描述 单一重金属风险的高低由危害商(HQ)来描述,其计算公式如下:

$$\text{HQ} = \text{Exp} \times \text{SF} \times 0.001 / \text{HBGV}$$

安全因子(SF)为 $10^{[11]}$;本研究所采用的健康指导值(HBGV)是美国环保署(US EPA)所建议的Pb和As的口服参考剂量,分别为每日0.003 5、0.000 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[12]

若 $\text{HQ} \leq 1$,那么单一重金属暴露所产生的健康风险较低,风险可以被接受;若 $\text{HQ} > 1$,风险较高,不容忽视。

2.2.3 累积风险评估 采用分级别的原则对于乌梢蛇中Pb和As累积暴露所产生的风险进行评估。先从低级别的累积风险评估方法即危害指数(HI)法,对风险进行初步筛查;再采用更加精确的TTD法,对于Pb和As的累积风险进行评估。

HI是各化学物HQ之和,若 $\text{HI} < 1$,则认为Pb和As联合暴露所产生的风险可以被接受;若 $\text{HI} > 1$,则认为风险不可接受。

$$\text{HI} = \text{HQ}_{\text{Pb}} + \text{HQ}_{\text{As}}$$

TTD法对HI法进行改进,是针对特定毒理作用终点风险特征描述的方法。TTD法需考虑每一污染物基于每一作用终点的毒理效应,计算基于每一特定作用终点效应的HQ和HI值^[13]。TTD法中HI的计算公式同HI法,所不同的是计算HQ需代入每一毒理效应终点的HBGV。根据US EPA发布的指南^[14],针对心血管、血液、神经系统、肾脏、睾丸这5种不同毒理终点的Pb的每日允许暴露量(ADI)分别为0.001 3、0.004 2、0.004 2、0.000 6、0.0167 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;针对心血管、血液、神经系统、肾脏这4种不同毒理终点As的ADI分别为0.000 3、0.000 6、0.000 3、0.09 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。若 $\text{HI} < 1$,则认为风险可以被接受;若 $\text{HI} > 1$,则认为风险不可接受。

3 结果

3.1 Pb和As的残留总量和生物可给量结果

参照《中国药典》2020年版(一部)对动物类中药材水蛭中Pb和As的限量标准($\text{Pb} \leq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{As} \leq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),8批乌梢蛇中Pb和As的合格率为100%。采用PBET法模拟胃肠消化提取后,Pb和As的平均生物可给性结果分别为10.9%和75.6%。

表1 乌梢蛇样品信息及Pb和As的测定结果

Table 1 Sample information and contents of Pb and As in *Zaocys dhumnades* (Cantor)

编号	产地	批号	质量分数/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		生物可给 量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	
			Pb	As	Pb	As
1	浙江省金华市	123622	0.110	0.228	0.012	0.173
2	山东省济宁市	245311	0.737	0.333	0.081	0.253
3	山东省济宁市	245312	1.776	0.226	0.195	0.172
4	江西省九江市	153678	0.600	0.120	0.066	0.091
5	四川省成都市	A180501	2.344	0.312	0.258	0.237
6	上海市	2018020607	2.279	0.053	0.251	0.040
7	上海市	1809064	2.449	0.035	0.269	0.027
8	上海市	2018011905	1.421	0.040	0.156	0.030

3.2 HI法初步评估结果

分别采用Pb和As的生物可给性计算乌梢蛇中Pb和As的日暴露量,结果见表2。HQ结果(表2)说明,考虑Pb和As的生物可给性后,所有批次乌梢蛇中Pb和As的HQ值均小于1,得到相应的HI值也小于1。

3.3 TTD法修正的HI结果

Pb非致癌作用终点主要包括心血管系统、神经系统、肾脏、血液和睾丸,As非致癌作用终点主要包括心血管系统、神经系统、肾脏、血液,分别采用Pb和As的生物可给性,针对每一种靶器官的毒性剂量,分别计算出Pb和As相应的HQ值,进一步计算出TTD法修正的HI值(表3)。结果表明,对于作用终点心血管系统、血液、神经系统、肾脏、睾丸,所有批次乌梢蛇的HI值 < 1 ,健康风险可接受。

4 讨论

目前,对于重金属的暴露评估大多是基于单一重金属的外暴露量,而不是与污染物毒性密切相关的内暴露总量^[15-17]。然而,在风险评估过程中,人体摄入重金属所引起的健康风险取决于重金属可以被人体吸收的含量,而非中药材中重金属的浓度。由于消化过程中并非所有的污染物能够全部从基质中释放,因此生物可给量小于外暴露量,生物可

表2 基于生物可给性的乌梢蛇中Pb和As的日暴露量及HI值

Table 2 Daily exposure and HI values of Pb and As in *Zaocys dhumnades* (Cantor) based on bioaccessibility

样品编号	Pb		As		HI
	日暴露量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HQ	日暴露量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HQ	
1	1.46×10^{-4}	4.16×10^{-4}	2.05×10^{-3}	0.068	0.069
2	9.73×10^{-4}	2.78×10^{-3}	2.99×10^{-3}	0.100	0.103
3	2.34×10^{-3}	6.70×10^{-3}	2.04×10^{-3}	0.068	0.075
4	7.92×10^{-4}	2.26×10^{-3}	1.08×10^{-3}	0.036	0.038
5	3.09×10^{-3}	8.84×10^{-3}	2.81×10^{-3}	0.094	0.102
6	3.01×10^{-3}	8.60×10^{-3}	4.77×10^{-4}	0.016	0.024
7	3.23×10^{-3}	9.24×10^{-3}	3.15×10^{-4}	0.010	0.020
8	1.88×10^{-3}	5.36×10^{-3}	3.57×10^{-4}	0.012	0.017

表3 基于生物可给性和TTD法的乌梢蛇中Pb和As的累积暴露评估结果

Table 3 Cumulative exposure assessment results of Pb and As in *Zaocys dhumnades* (Cantor) based on bioavailability and TTD method

样品	Pb的HQ值					As的HQ值				HI 心血管	HI 神经	HI 肾脏	HI 血液
编号	心血管系统	神经系统	肾脏	血液	睾丸	心血管系统	神经系统	肾脏	血液				
1	0.001	3.47×10^{-4}	0.002	0.001	8.72×10^{-5}	0.068	0.068	2.28×10^{-4}	0.034	0.069	0.069	0.003	0.034
2	0.007	2.32×10^{-3}	0.016	0.007	5.83×10^{-4}	0.100	0.100	3.33×10^{-4}	0.050	0.107	0.102	0.017	0.052
3	0.018	5.58×10^{-3}	0.039	0.018	1.40×10^{-3}	0.068	0.068	2.26×10^{-4}	0.034	0.086	0.073	0.039	0.040
4	0.006	1.89×10^{-3}	0.013	0.006	4.74×10^{-4}	0.036	0.036	1.20×10^{-4}	0.018	0.042	0.038	0.013	0.020
5	0.024	7.37×10^{-3}	0.052	0.024	1.85×10^{-3}	0.094	0.094	3.12×10^{-4}	0.047	0.117	0.101	0.052	0.054
6	0.023	7.16×10^{-3}	0.050	0.023	1.80×10^{-3}	0.016	0.016	5.30×10^{-5}	0.008	0.039	0.023	0.050	0.015
7	0.025	7.70×10^{-3}	0.054	0.025	1.94×10^{-3}	0.010	0.010	3.50×10^{-5}	0.005	0.035	0.018	0.054	0.013
8	0.014	4.47×10^{-3}	0.031	0.014	1.12×10^{-3}	0.012	0.012	3.97×10^{-5}	0.006	0.026	0.016	0.031	0.010

给性低于100%。因此,基于中药材中重金属的生物可给性结果进行风险评估更加接近实际情况。不同累积风险评估方法所需要的毒理学参数及适用范围有所不同,HI法简便快速,但各重金属的HBGV值的确定并非基于共同的观察终点,因此,HI法适用于风险的初步筛查。本研究首先基于乌梢蛇中Pb和As的生物可给性采用HI法对于乌梢蛇中重金属的联合暴露风险进行初筛,进一步基于Pb和As的生物可给性结果探索性地采用更高级别的TTD法对Pb和As可能产生的健康风险做出更加精确的评估。TTD法评估结果表明,对于作用终点心血管系统、血液、神经系统、肾脏、睾丸,所有批次巴戟天的HI值 <1 ,健康风险可接受。污染物的累积风险评估在国际上环境、食品等领域仍然是一个全新的课题,中药中重金属的累积风险评估更是刚刚起步。本研究尝试基于Pb和As的生物可给量,并采用TTD法对于中药材中重金属的累积暴露风险进行评估,为中药中外源性有害残留物风险评估的方法开发提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林 喆,胡丽娜,李 娜.动物药整理研究:乌梢蛇[J].吉林中医药,2009,29(11):982-984.
Lin Z, Hu L N, Li N. Study on the animal medicine--*Zaocys dhumnades* (Cantor) [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2009, 29(11): 982-984.
- [2] 梁新合,王 会,金 平,等.乌梢蛇鉴别技术研究[J].吉林中医药,2018,38(5):566-569.
Liang X H, Wang H, Jin P, et al. Research progress of the identification of technique *Zaocys* [J]. Jilin J Chin Med, 2018, 38(5): 566-569.
- [3] Reffstrup T K, Larsen J C, Meyer O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2010, 56(2): 174-192.
- [4] U.S-EPA. Framework for cumulative risk assessment [EB/OL].(2018-05-08)[2022-04-12].https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/frmwrk_cum_risk_assmnt.pdf.

- [5] IPCS. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment [R]. Geneva: World Health Organization, 2009.
- [6] Gu Y G, Ning J J, Ke C L, et al. Bioaccessibility and human health implications of heavy metals in different trophic level marine organisms: A case study of the South China Sea [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 163: 551-557.
- [7] Liu S Y, Tian S H, Li K X, et al. Heavy metal bioaccessibility and health risks in the contaminated soil of an abandoned, small-scale lead and zinc mine [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(15): 15044-15056.
- [8] Pelfrène A, Waterlot C, Douay F. Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils [J]. *Environ Pollut*, 2013, 178: 80-88.
- [9] Ruby M V, Schoof R, Brattin W, et al. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33(21): 3697-3705.
- [10] 左甜甜, 王莹, 张磊, 等. 中药中外源性有害残留物安全风险评估技术指导原则 [J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(10): 1902-1907.
- Zuo T T, Wang Y, Zhang L, et al. Guideline of risk assessment of exogenous harmful residues in traditional Chinese medicines [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(10): 1902-1907.
- [11] Zuo T T, Jin H Y, Zhang L, et al. Innovative health risk assessment of heavy metals in Chinese herbal medicines based on extensive data [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105268.
- [12] Khan S, Cao Q, Zheng Y M, et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China [J]. *Environ Pollut*, 2008, 152(3): 686-692.
- [13] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures [S]. 2001.
- [14] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Interaction profile for arsenic, cadmium, chromium and lead [S]. 2004b.
- [15] Cao H B, Qiao L, Zhang H, et al. Exposure and risk assessment for aluminium and heavy metals in Puerh tea [J]. *Sci Total Environ*, 2010, 408(14): 2777-2784.
- [16] Fallahzadeh R A, Ghaneian M T, Miri M, et al. Spatial analysis and health risk assessment of heavy metals concentration in drinking water resources [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(32): 24790-24802.
- [17] Mahmood A, Malik R N. Human health risk assessment of heavy metals via consumption of contaminated vegetables collected from different irrigation sources in Lahore, Pakistan [J]. *Arab J Chem*, 2014, 7(1): 91-99.

[责任编辑 兰新新]