

免疫亲和净化 HPLC 柱后光化学衍生荧光法测定动物药中黄曲霉毒素

刘丽娜, 李耀磊, 金红宇*, 马双成*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: **目的** 采用免疫亲和净化 HPLC 柱后光化学衍生荧光检测法测定动物药中黄曲霉毒素, 考察该方法在动物药黄曲霉毒素测定中的可行性。并对动物药中黄曲霉毒素污染情况进行筛查, 为动物药的监管提供依据。**方法** 样品经有机溶剂提取、免疫亲和柱净化后, 利用高效液相色谱-光化学衍生-荧光检测器进行分析测定。对部分动物药, 尤其是可能污染黄曲霉毒素的动物药进行加样回收率考察, 测定动物药中黄曲霉毒素残留量, 并对测定结果进行分析。**结果** 动物药中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的回收率均在 70%~120%。16 种 64 批动物药中有 6 种 24 批动物药检出了黄曲霉毒素, 检出率为 37.5%, 其中 4 种 13 批动物药均出现了超过《中国药典》2015 年版限度的现象, 不合格率为 20.3%。**结论** 免疫亲和净化 HPLC 柱后光衍生荧光检测法适用于动物药中黄曲霉毒素的测定。动物药的个别品种黄曲霉毒素污染情况较为严重, 应尽快完善动物药的质量标准, 保障用药安全。

关键词: 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 黄曲霉毒素 B1; 黄曲霉毒素 B2; 黄曲霉毒素 G1; 黄曲霉毒素 G2; 动物药; 风险评估
中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)06-1220-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.028

Determination of aflatoxins in animal medicines by immunoaffinity column and HPLC-FLD with photochemical derivatization fluorescence detection

LIU Li-na, LI Yao-lei, JIN Hong-yu, MA Shuang-cheng

National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To determine the aflatoxins residue of animal medicines by immunoaffinity column HPLC method with post column photochemical derivatization and fluorescence detection, and to evaluate the feasibility of this method. The contamination status of aflatoxins in animal medicines was evaluated according to the determination data of aflatoxin contamination in animal medicines. **Methods** After extraction by organic solvent and purification by immunoaffinity column, aflatoxins samples were analyzed by HPLC with fluorescence detection after photochemistry derivation. The recovery rates of aflatoxins in animal medicines, especially the species easily contaminated by aflatoxin, were then determined by adding aflatoxin standard mixtures. Finally, aflatoxins in animal medicines were determined and the results were analyzed. **Results** Recovery rates of aflatoxin B1, B2, G1, and G2 were from 70% to 120%. Twenty-four batches of six kinds in 64 batches of 16 kinds of animal medicines were contaminated by aflatoxins, and the contamination rate was 37.5%. Thirteen batches of four kinds of animal medicines exceeded the limit of *Chinese Pharmacopoeia of* (2015 Edition), and the rate was 20.3%. **Conclusion** This method can be used to determine aflatoxins in animal medicines. Some species of animal medicines are likely to be contaminated by aflatoxins, so the aflatoxin control in those animal medicines should be put forward to ensure the safety of drug use.

Key words: aflatoxins; immunoaffinity column; aflatoxin B1; aflatoxin B2; aflatoxin G1; aflatoxin G2; animal medicines; risk assessment

动物类中药材在我国有着悠久的历史, 历代本草对动物药都有详细的记载。动物药有“血肉有情之品”“行走通窜之物”之说, 中医认为其作用

常常是植物药、矿物药所不能替代的。从功效看, 动物药的作用多为破血逐瘀、攻坚破积、祛风止痒、搜风通络、壮阳益肾、消癥散结等^[1]。《中国药典》

收稿日期: 2016-05-19

基金项目: 国家十二五“重大新药创制”专项——中药质量安全检测和风险控制技术平台(2014ZX09304307-002)

作者简介: 刘丽娜, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药、天然药质量控制及有害残留物分析。Tel: (010)67095424 E-mail: kllln@163.com

*通信作者 马双成, 男, 博士, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药民族药质量控制与评价研究。

Tel/Fax: (010)67095272 67023650 E-mail: masc@nifdc.org.cn

金红宇, 男, 硕士生导师, 主任药师, 研究方向为中药天然药物质量控制。E-mail: jhyu@nifdc.org.cn

2010 年版一部^[2]收载 51 味动物药药材、1 种提取物及 369 种含动物药制剂, 占全部 2 165 个品种的 19.3%。由此可见, 动物药历来受到医药学家和政府部门的重视, 是中药体系的重要组成部分。

黄曲霉毒素可以由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉 4 种曲霉菌产生, 是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生物。黄曲霉毒素是目前为止发现毒性最大的真菌毒素之一, 其毒性相当于氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍^[3]。目前已经分离鉴定出 12 种包括 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂、P₁、Q、H₁ 等分子形式。在植物来源的食物中通常只污染黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 其中产生黄曲霉毒素 B₁ 的量比其他黄曲霉毒素构型要多, 而且毒性最强, 因此黄曲霉毒素 B₁ 被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物质^[4]。当人体摄入量较大时, 可发生急性中毒, 出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生等症状^[5]。

中药在采集、贮藏、制备、运输过程中如保存不当极易受潮霉变, 部分品种有污染黄曲霉毒素的可能, 尤其是种子、果实类中药材、发酵类中药及含有上述药材的中成药^[6-8]。《中国药典》2010 年版一部收录了黄曲霉毒素测定法并在陈皮、酸枣仁、桃仁、胖大海、僵蚕 5 种药材检查项下规定了黄曲霉毒素检查项, 黄曲霉毒素限量为: 每 1 000 克药材含黄曲霉毒素 B₁ 不得过 5 μg , 含黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 B₂ 和黄曲霉毒素 B₁ 的总量不得过 10 μg ^[2]。《中国药典》2015 年版^[9]在柏子仁、莲子、使君子、槟榔、麦芽、肉豆蔻、决明子、远志、薏苡仁、大枣、地龙、蜈蚣、水蛭、全蝎 14 味药材及其饮片项下, 增加黄曲霉毒素的检查。其中, 地龙、蜈蚣、水蛭、全蝎为动物药。对动物药中黄曲霉毒素残留量的研究报道目前尚较为少见, 本研究收集 16 种 64 批次常见动物药材, 对其黄曲霉毒素残留量进行筛查, 对检测方法适用性进行确认, 同时开展了初步风险评估, 为保证中药用药安全提供参考。

1 仪器和材料

Waters2695 型高效液相色谱单元, 配 Waters2475 荧光检测器(美国 Waters 公司); Waters UPLC I-Class Xevo TQ-S 液质联用仪(美国 Waters 公司); 光化学衍生器(北京华安麦科生物技术有限公司, 紫外光灯 254 nm); AE 240 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler 公司); 旋转振荡器(江苏太仓市实验设备厂); Z2064 离心机(德国 Hermle

公司); Milli-Q 超纯水处理系统。

甲醇、乙腈均为色谱纯; 水为高纯水; 黄曲霉毒素混合对照品(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂)由中国食品药品检定研究院提供(批号 610001-201301); 黄曲霉总量(B₁、B₂、G₁、G₂)免疫亲和色谱柱(北京华安麦科生物技术有限公司); 药材购自北京同仁堂中药饮片厂、北京卫仁中药饮片厂、北京德威治药房、北京时代千方大药房、安徽亳州药市、广西玉林药市及部分国家抽验样品, 经中国食品药品检定研究院康帅助理研究员鉴定为僵蚕 *Bombyx Batryticatus*、土鳖虫 *Eupolyphaga Steleophaga*、蝉蜕 *Cicadae Periostracum*、地龙 *Pheretima*、蜂房 *Vespaes Nidus*、蛤蚧 *Gekko*、海马 *Hippocampus*、金钱白花蛇 *Bungarus Parvus*、九香虫 *Aspongopus*、乌梢蛇 *Zaocws*、蕲蛇 *Agkistrodon*、全蝎 *Scorpio*、水蛭 *Hirudo*、鳖甲 *Trionycis Carapax*、羚羊角 *Saigae tataricae Cornu*。

2 方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Venusil MP C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 以甲醇-乙腈-水为流动相, 按表 1 中的梯度比例进行梯度洗脱, 体积流量 1.1 mL/min; 采用柱后光化学衍生法: 光化学衍生器(254 nm); 以荧光检测器检测, 激发波长(λ_{ex}) = 360 nm, 发射波长(λ_{em}) = 450 nm, 进样量 50 μL 。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序

Table 1 HPLC gradient elution

保留时间/min	乙腈/%	甲醇/%	水/%
0	10	25	65
17	10	45	45
20	10	65	25
22	10	65	25
23	10	25	65

2.2 检测方法确认

由于所采用的方法为《中国药典》2010 年版^[2]附录通用方法, 故仅以随行质量控制(包括随行空白试验及随行回收试验)来确认方法的适用性。

2.2.1 检测限 取混合对照品溶液(黄曲霉毒素 B₁ 5 ng/mL), 进样量 1 μL , 计算黄曲霉毒素 B₁ 峰信噪比为 12, 则本实验检测限为黄曲霉毒素 B₁ 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 黄曲霉毒素总量 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2.2 空白溶液 取 70%甲醇溶液 50 mL, 按《中国药典》2010 年版^[2]附录 IX V 黄曲霉毒素测定法

“供试品溶液的制备”项下方法自“离心 5 min”起操作，即得。

2.2.3 随行回收率试验 取供试品粉末 5 g，加入混合对照品储备液（黄曲霉毒素 B1 质量浓度为 100 ng/mL）1 mL，加 70% 甲醇溶液至 50 mL，按《中国药典》2010 年版^[2]附录 IX V 黄曲霉毒素测定法“供试品溶液的制备”项下方法操作，即得。黄曲霉毒素 B1 回收率在 73.46%~99.64%；黄曲霉毒素 B2 回收率在 70.50%~109.25%；黄曲霉毒素 G1 回收率在 72.83%~119.61%；黄曲霉毒素 G2 回收率在 78.15%~116.23%。

3 样品测定

对收集的动物类中药材样品进行测定，测定结果见表 2，并对测定结果进行统计（表 3）。其中，金钱白花蛇、鳖甲及羚羊角丝因为样品较难收集，仅收集到 1 批样品，其他品种不同来源均收集到 4 批以上，可以从一定程度上反映该品种被黄曲霉毒素污染的情况。从测定结果可以看出，动物药中蝉蜕、地龙、海马、金钱白花蛇、乌梢蛇、蕲蛇、全蝎、蜈蚣、鳖甲和羚羊角丝，各批次均未检出黄曲霉毒素，而僵蚕、土鳖虫、蜂房、蛤蚧、九香虫、水蛭都出现了检出黄曲霉毒素的批次，其中，僵蚕、

表 2 动物类中药材样品测定数据
Table 2 Data of aflatoxins in animal medicines

名称	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)				总量
	黄曲霉毒素 B1	黄曲霉毒素 B2	黄曲霉毒素 G1	黄曲霉毒素 G2	
麸炒僵蚕-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
麸炒僵蚕-2	0.28	0.16	2.47	10.88	13.80
麸炒僵蚕-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
土鳖虫-1	未检出	2.10	未检出	1.00	3.20
土鳖虫-2	未检出	2.80	未检出	1.50	4.30
土鳖虫-3	5.10	98.90	0.50	11.40	115.90
土鳖虫-4	未检出	未检出	未检出	1.10	1.10
土鳖虫-5	未检出	2.70	未检出	1.10	3.70
土鳖虫-6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
土鳖虫-7	7.30	94.20	1.70	20.10	123.30
土鳖虫-8	0.46	0.05	1.35	0.12	1.98
土鳖虫-9	28.81	2.35	98.38	7.20	136.73
土鳖虫-10	1.84	0.17	23.63	0.81	26.45
土鳖虫-11	0.33	0.00	1.93	0.00	2.26
蝉蜕-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蝉蜕-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蝉蜕-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蝉蜕-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
地龙-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
地龙-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
地龙-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
地龙-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜂房-1	315.47	21.63	298.27	15.90	651.27
蜂房-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜂房-3	34.09	0.85	5.71	1.43	42.09
蜂房-4	75.83	6.24	0.22	0.06	82.34
蜂房-5	0.42	0.07	1.77	0.27	2.52
蜂房-6	0.79	0.00	0.17	0.21	1.17
蜂房-7	19.15	0.38	0.42	0.00	19.95
蜂房-8	0.15	0.00	0.43	0.00	0.58
蜂房-9	1.41	0.00	0.38	0.10	1.89
蜂房-10	602.35	41.83	0.23	0.22	644.64
蛤蚧-1	0.42	0.02	0.20	0.00	0.64
蛤蚧-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蛤蚧-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蛤蚧-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
海马-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
海马-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
海马-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

续表 2

名称	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)				总量
	黄曲霉毒素 B1	黄曲霉毒素 B2	黄曲霉毒素 G1	黄曲霉毒素 G2	
海马-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
金钱白花蛇-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
九香虫-1	1.00	0.08	0.20	0.00	1.29
九香虫-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
九香虫-3	336.69	13.82	4.28	0.18	354.98
九香虫-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
乌梢蛇-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
乌梢蛇-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
乌梢蛇-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
酒乌梢蛇-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蕲蛇-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蕲蛇-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
全蝎-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
全蝎-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
全蝎-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
全蝎-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
烫水蛭-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
水蛭-2	3.14	0.21	未检出	未检出	3.35
水蛭-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
制水蛭-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜈蚣-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜈蚣-2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜈蚣-3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
蜈蚣-4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
炙鳖甲-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
羚羊角丝-1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

表 3 动物类中药材黄曲霉毒素测定数据汇总

Table 3 Summarization of data for aflatoxins in animal medicines

品种	批次数	检出批次	不合格批次	最大检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	检出黄曲霉毒素种类
僵蚕	3	1	1	10.9 (黄曲霉毒素 G2)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1
土鳖虫	11	10	4	98.4 (黄曲霉毒素 G1)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1
蝉蜕	4	0	0	未检出	—
地龙	4	0	0	未检出	—
蜂房	10	9	7	602.3 (黄曲霉毒素 B1)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1
蛤蚧	4	1	0	0.42 (黄曲霉毒素 B1)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G2
海马	4	0	0	未检出	—
金钱白花蛇	1	0	0	未检出	—
九香虫	4	2	1	67.3 (黄曲霉毒素 B1)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1
乌梢蛇	4	0	0	未检出	—
蕲蛇	2	0	0	未检出	—
全蝎	4	0	0	未检出	—
水蛭	4	1	0	3.14 (黄曲霉毒素 B1)	黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 B1
蜈蚣	4	0	0	未检出	—
鳖甲	1	0	0	未检出	—
羚羊角丝	1	0	0	未检出	—

土鳖虫、蜂房和九香虫按《中国药典》2015 年版标准陈皮等项下黄曲霉毒素限度都出现了超出限度的情况,九香虫的不合格率达 25%,僵蚕的不合格率达 33%,土鳖虫的不合格率达 36.4%,蜂房的不合格率则达到了 70%,九香虫和土鳖虫的最大检出值超标数 10 倍,而蜂房则超标数百倍,而且最大检出值达 6.022 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。部分样品色谱图见图 1。取阳性检出结果的供试品溶液,按建立的方法^[10]进行 LC/MS/MS 测定,证实确为黄曲霉毒素。

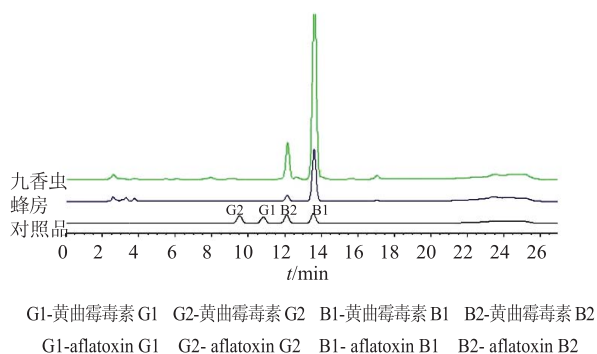


图 1 黄曲霉毒素对照品溶液和部分阳性样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of partial positive samples

4 讨论

4.1 动物药中黄曲霉毒素污染情况远高于中药平均水平

笔者曾统计过中药材中黄曲霉毒素检出率及不合格率,涉及的样品包括常见的中药材和部分中成药制剂^[11],将此次动物药黄曲霉毒素测定结果与中药中黄曲霉毒素筛查结果比较。从统计结果可以看出,动物药黄曲霉毒素污染情况的检出率(37.5%)及不合格率(20.3%)均显著高于中药中黄曲霉毒素检出率(7.7%)和不合格率(3.2%)。说明对动物药中黄曲霉毒素污染应予以高度关注。动物基质以蛋白质、脂肪、核酸等大分子为主,基质营养丰富,容易霉变。黄曲霉毒素在中药中并不存在普遍污染,其风险集中于 30~40 种中药材,其中种子果实类药材、动物类药材占有较高比例。

4.2 动物药中黄曲霉毒素检出种类与植物药有差异

植物药中一般检出的黄曲霉毒素种类以黄曲霉毒素 B1、B2 为主,而动物药检出的黄曲霉毒素 G1、G2 的比例高于植物药。这一差异可能与黄曲霉毒素在动、植物不同基质中代谢途径的差异有关。

4.3 黄曲霉毒素可能污染途径

植物药在种植、采集、贮藏、制备过程中如保存不当极易受潮霉变而污染黄曲霉毒素。而动物药中黄曲霉毒素污染的主要途径,应该是贮存过程。目前多数动物药并未明确规定冷藏、防潮等贮藏条件,存在霉变的样品在市场上多见。此外,由于在动物生产过程中以植物或动物为食,如果使用了污染黄曲霉毒素的植物或动物的话,那么则会在动物体内发生代谢,将黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 代谢为黄曲霉毒素 M1、M2,这也是动物污染黄曲霉毒素的可能原因。后续,应继续开展动物药中黄曲霉毒素 M 的测定研究,为动物药的质量评价提供进一步参考。

本研究表明,《中国药典》2015 年版附录“黄曲霉毒素残留量测定法”适于动物药中黄曲霉毒素残留检测。动物药的部分品种黄曲霉毒素污染情况较为严重,《中国药典》2015 年版在部分动物药品种下增加黄曲霉毒素限量检查总体上讲可以有效控制安全风险,是有必要的。在具体品种上,全蝎、地龙、蜈蚣、水蛭等品种应进一步积累数据,同时更应增加九香虫、土鳖虫、蜂房等高风险品种黄曲霉毒素限量检查。应尽快组织开展中药材贮藏规范化研究,防止药材霉变,浪费资源并增加用药安全隐患,从根本上解决黄曲霉毒素污染问题。

参考文献

- [1] 黄招明. 浅谈动物药的应用 [J]. 光明中医, 2003, 1(21): 27-28.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 李枝文. 黄曲霉毒素的发现、毒害及预防 [J]. 生物学通报, 1992(12): 1.
- [4] IARC. *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins* [M]. Lyon: World Health Organization, 1993.
- [5] 张艺兵, 鲍蕾, 褚庆华. 农产品中真菌毒素的检测分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [6] 刘丽娜, 王莹, 金红宇, 等. HPLC 法测定虫草发酵粉中黄曲霉毒素残留量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1256-1259.
- [7] 胡一晨, 万丽, 范成杰, 等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法检测中药及染菌中药制剂中间体的黄曲霉毒素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 116-119.
- [8] 刘宁, 王萌萌, 金红宇, 等. 高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定参苓白术散中黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 [J]. 中国药事, 2012, 26(5): 442-445.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] Liu L N, Jin H Y, Sun L, et al. Determination of aflatoxins in medicinal herbs by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 469-476.
- [11] 刘丽娜, 金红宇, 孙磊, 等. 中药材及部分制剂中黄曲霉毒素残留普查报告及初步风险评估 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 64-69.