

中药饮片中药曲霉毒素 B₁ 含量的快速测定研究

林方芬 郑志勇 黄 剑 陈 红

(温州市中医院, 浙江温州 325000)

摘 要 目的:建立通过胶体金免疫层析技术快速测定中药饮片中药曲霉毒素 B₁(AFB₁)含量的方法,了解中药黄曲霉毒素 B₁ 的污染情况。方法:采用胶体金免疫层析技术对 30 种中药饮片中药曲霉毒素 B₁ 的含量进行检测,并采用酶联免疫吸附法(ELISA)对检测结果进行验证。结果:通过胶体金免疫层析技术快速测定了中药中药曲霉毒素 B₁ 的含量,其结果与酶联免疫吸附法测定结果一致。所检测的温州市中医院中药饮片中药曲霉毒素 B₁ 含量均符合要求。结论:胶体金免疫层析法能够快速、准确地检测中药饮片中药曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析法 中药饮片

中图分类号 R288 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)12-0065-03

黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株生成的一类有害物质,被世界卫生组织癌症研究机构(IARC)确认为 I 类致癌物质^[1]。到目前为止,中药材中被发现的黄曲霉毒素包括黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,其中 B₁ 被公认为主要的有毒物质。中药材采收、加工、贮存等过程如果处理不当,容易被黄曲霉毒素污染。真菌毒素污染问题已经成为中药材安全性的问题之一,2010 年版《中国药典》共收录了陈皮、桃仁、酸枣仁、僵蚕和胖大海 5 味药材的黄曲霉毒素检测。目前普遍采用的检测方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫亲和柱-荧光分光光度计法(SFB)、免疫亲和柱-高效液相色谱法(IAC-HPLC)以及 HPLC/MS/MS 法等^[2-5]。但是,在医院、药店中药房的实际工作中,针对大批量检测中药饮片的黄曲霉毒素 B₁ 时,上述各方法因灵敏度低、仪器昂贵、操作复杂、费时等条件限制不能普及应用。

胶体金免疫层析技术(immune colloidal gold technique, GICA)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种将胶体金免疫技术和色谱层析技术相结合的固相膜免疫分析方法^[6]。它不仅具有快速、灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、无需任何仪器设备等优点,而且结果判断直观可靠,容易掌握,现已广泛应用于临床诊断及药物检测等领域。本研究拟采用胶体金免疫层析法,建立一种现场快速检测中药饮片中药曲霉毒素 B₁(AFB₁)的方法,以期有效监测饮片质量,保障中药饮片用药安全,更好地服务临床。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 II 型 iCheck 食品安全定量快检仪, CS103 iCheck 黄曲霉毒素定量快检卡, 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析试纸条, 购自北京中检维康

技术有限公司; DNM-9606 酶标仪, 北京普朗新科技有限公司; 黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒, Romer Labs 公司; DFT-100 中药粉碎机, 温岭市大德中药机械有限公司; Sartorius BT 125D 1/10 万分析天平, 北京赛多利斯仪器有限公司; KQ-500DE 型数控超声仪, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 中药饮片 本研究所用 30 批中药饮片待测品均来源于温州市中医院, 经温州市中医院药剂科尤志勉主管中药师鉴定为正品。

1.3 研究方法

1.3.1 样品的提取 取 20g 中药样品粉碎, 过 40 目筛, 称取 5.0g 置于 50mL 离心管中, 加入 70% 甲醇 25mL, 超声提取 30min, 离心 5min (10000r/min), 吸取上清液 5.0mL 于离心管中, 低温烘干, 加入 2.0mL 样品缓冲溶液, 用 0.5mm 微孔滤膜过滤, 收集滤液作为样品提取液, 待测。

1.3.2 免疫层析法快速定量检测 取出 iCheck AFB₁ 定量快检卡和黄曲霉毒素稀释缓冲液, 平衡至室温; 对 iCheck 食品安全定量快检仪进行“零点校正”; 依次输入相应批次的快检卡二维码, 获取校准曲线。取黄曲霉毒素稀释缓冲液 120μL 加入相应微孔中, 加入“1.3.1”项下配制的供试品溶液 30μL, 移液器吹打混匀, 取 100μL 加入到快检卡样品孔中。37℃温育 10min 后, 将快检卡插入定量快检仪中读数, 即为样品实际浓度。该方法的检测范围为 2.5~20μg/kg。当读数为零时, 说明该种中药中无黄曲霉毒素或者含量少于 2.5μg/kg; 当读数值为 20μg/kg 时, 说明测定结果 ≥20μg/kg。2010 年版《中国药典》共收录了陈皮、桃仁、酸枣仁、僵蚕和胖大海 5 味药材的黄曲霉毒素检测, 其规定的限量值均为 5μg/kg,

其他中药黄曲霉毒素未作要求。因此,以限量值 $5\mu\text{g/kg}$ 作为判断黄曲霉毒素是否超标的标准时,该方法有较好的适用性。

1.3.3 酶标仪法检测 将试剂盒在室温中放置 15min 以上,平衡至室温;将 AFB_1 标准品或处理好的样品加入到各自的微孔中,轻轻震板混合,在室温 ($20\sim 25^\circ\text{C}$) 暗处孵育 30min;将反应板放入 37°C 恒温培养箱中孵育 30min;取出反应板,甩掉反应液,拍干;洗板 4 次,反应板放入 37°C 恒温培养箱中显色 15min;加入终止液,摇匀后用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔吸光度 A 值。以吸光度值为纵坐标,黄曲霉毒素 B_1 的浓度为横坐标,绘制标准曲线,并计算样品中黄曲霉毒素 B_1 的含量。

2 结果与分析

2.1 胶体金免疫层析法快速定量检测 使用 GICA 方法对 30 个中药饮片样品 3 批次进行测定,结果见表 1。除陈皮、杏仁、胖大海、僵蚕、熟地、酸枣仁外,其他样品的检测结果均为 0(检测限为 $2.5\mu\text{g/kg}$)。虽然陈皮、杏仁、胖大海、僵蚕、熟地黄、酸枣仁中检测出黄曲霉毒素 B_1 ,但其含量均小于 $5\mu\text{g/kg}$ 。因此,所有中药样品中黄曲霉毒素含量均符合《中国药典》2010 年版一部规定。

表 1 中药饮片样品中黄曲霉毒素 B_1 GICA 检测结果 (Mean $\pm$ std)

品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)	品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)	品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)
陈皮	2.81 ± 0.15	胖大海	4.18 ± 0.23	僵蚕	3.98 ± 0.15
虎杖	0	玄参	0	桑白皮	0
黄精	0	酸枣仁	2.94 ± 0.11	桔梗	0
芡实	0	玉竹	0	五味子	0
甘草	0	金果榄	0	大黄	0
砂仁	0	山药	0	何首乌	0
杏仁	3.52 ± 0.12	百部	0	夏枯草	0
钩藤	0	白术	0	黄芪	0
枳实	0	天花粉	0	熟地	3.15 ± 0.09
土茯苓	0	党参	0	人参	0

2.2 酶标仪法检测

2.2.1 标准曲线 以黄曲霉毒素 B_1 的浓度 (AFB_1 标准溶液 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 ng/mL) 为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制成标准曲线,见表 2、图 1,每个浓度平行重复 3 次。

表 2 黄曲霉毒素 B_1 标准溶液的吸光度值 (Mean $\pm$ std)

序号	浓度 (ng/mL)	吸光度	
		均值	标准差
1	0	0.60	0.02
2	0.10	0.52	0.01
3	0.25	0.43	0.01
4	0.50	0.31	0.02
5	1.00	0.18	0.03
6	2.00	0.12	0.01

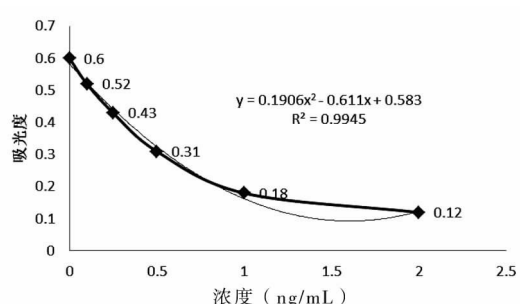


图 1 标准溶液的吸光度值标准曲线

2.2.2 酶标仪法定量检测结果 使用酶标仪法对 30 个中药饮片样品的 3 批次药材进行测定,结果见表 3。该方法测定结果与 GICA 方法测定结果相似,所有中药样品检测结果均小于 $5\mu\text{g/kg}$ 。

表 3 中药饮片样品中黄曲霉毒素 B_1 ELISA 检测结果 (Mean $\pm$ std)

品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)	品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)	品名	AFB_1 含量 ($\mu\text{g/kg}$)
陈皮	2.63 ± 0.15	胖大海	4.22 ± 0.23	僵蚕	4.05 ± 0.21
虎杖	0.11 ± 0.02	玄参	0.89 ± 0.02	桑白皮	0 ± 0.00
黄精	0.23 ± 0.02	酸枣仁	2.87 ± 0.09	桔梗	1.66 ± 0.08
芡实	0.16 ± 0.01	玉竹	1.31 ± 0.07	五味子	0.45 ± 0.03
甘草	0.18 ± 0.01	金果榄	0.15 ± 0.01	大黄	0.76 ± 0.05
砂仁	1.80 ± 0.08	山药	0.08 ± 0.00	何首乌	0.13 ± 0.01
杏仁	3.59 ± 0.16	百部	0 ± 0.00	夏枯草	1.22 ± 0.02
钩藤	0.10 ± 0.01	白术	0.12 ± 0.01	黄芪	0.08 ± 0.00
枳实	0.14 ± 0.01	天花粉	2.11 ± 0.03	熟地	3.30 ± 0.13
土茯苓	0.19 ± 0.01	党参	0.81 ± 0.03	人参	0.51 ± 0.02

3 讨论

黄曲霉毒素因为其毒性极强,目前已经被国际癌症研究机构确定为 I 类致癌物^[1],其毒性是氰化钾毒性的 10 倍以上,是剧毒物砒霜的 68 倍,诱发肝癌的风险比二甲基亚硝胺大 75 倍^[7-8]。本次实验结果表明,除僵蚕外,温州市中医院中药饮片 AFB_1 含量均符合要求。陈皮、杏仁、僵蚕、胖大海、熟地中 AFB_1 含量相对较高,这些中药在采购、储藏过程中要经常检测 AFB_1 含量,并注意尽量避免 AFB_1 的污染,以确保中药临床使用的安全、有效。

本研究建立了胶体金免疫层析法快速测定中药样品中黄曲霉毒素 B_1 含量的方法,并与酶联免疫法进行了比较。研究结果显示,胶体金免疫层析法与酶联免疫法结果一致,都能准确反映中药中黄曲霉毒素 B_1 的污染情况。与酶联免疫法相比,免疫胶体金检测卡检测法灵敏度高、检测速度快、选择性好、操作简便、检测成本较低,在医院、药店中药房的实际工作中,针对大批量中药饮片检测黄曲霉毒素 B_1 时,可以提高工作效率。

参考文献

- [1] IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and

(下转第 69 页)

表4 综合评分方差分析

方差因素	离差平方和	自由度	F	F 临界值	显著性
A	248.31	2	55.377	19	*
B	10.718	2	2.39	19	
C	3.627	2	0.809	19	
D(误差)	4.484	2	1	19	

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

2.6 验证试验 按处方比例称取各药材共3份,按最佳提取工艺参数提取,测定阿魏酸含量和干膏得率,计算综合评分值。结果发现优选的提取工艺条件稳定可行,可作为补心益气煎膏剂的提取工艺。具体结果见表5。

表5 验证试验结果

批次	阿魏酸含量($\mu\text{g/g}$)	干膏得率(%)
1	9.8427	26.21
2	9.8492	25.77
3	9.8532	26.12
Average	9.8484	26.03
RSD(%)	0.054	0.89

3 讨论

本实验同时也考察了不同提取、浓缩设备及加水量、提取次数、时间对膏方质量的影响,结果表明采用夹层反应锅提取40min,浓缩30min,加水量范围为6~10倍量,提取次数范围为1~3次,提取时间范围为40~80min时膏方的质量最佳。

鉴于中药复方成分的复杂性,任何单一成分均难以代表制剂的效应,而补心益气汤作为补益药,多糖类大分子也是药效成分,因此本研究以其出膏率、阿魏酸为考察指标。但各指标的影响程度不同,为保证指标的全面性,数据处理引入了综合指标概念,给予关键因素相应的权重系数。这种多指标综合加权评分法较好地避免了单一评价的片面性,使分析采样指标更全面

的同时,对于关键影响因素又给予了相应的侧重。本研究在根据王晖等^[8]对多指标综合评价方法研究及权重系数如何选择和确立的基础上,结合自身试验的特点和考察指标间的关系,合理、科学地设置各指标的权重系数。我们设置这个比例考虑到中药有效成分及出固率的关系,一般指标性成分的提取比出固率来得更为重要,因此设置指标性成分权重系数为60分,而出固率设置为40分,使分析结果更为科学和客观,也使补心益气煎膏工艺优化合理、可信,为补心益气煎膏的规模化生产提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 张延君.丹麦补心膏的制备工艺探讨[J].光明中医,2015,30(10):2237.
- [2] 肖卫红,杨全伟,何伟,等.正交设计优选九味益胃合剂提取工艺研究[J].中国药房,2015,26(19):2711.
- [3] 刘旺培,黄义纯,陈华龙.HPLC法测定天王补心丸中阿魏酸的含量[J].中国药房,2015,26(21):3003.
- [4] 王虎,任路路,任莹,等.HPLC法测定十四味当归活血合剂中阿魏酸的含量[J].安徽医药,2015,19(5):873.
- [5] 叶淑颖,唐业建,曾怡,等.正交试验法优选泰痹颗粒的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):37.
- [6] 杨晶,刘嘉琪,王宝昌,等.正交试验优选桑白皮总黄酮的最佳提取工艺[J].辽宁中医杂志,2014,41(2):319.
- [7] 张金莲,姚冬琴,龚千锋,等.多指标综合加权评分法优选马兜铃蜜制工艺[J].中成药,2012,34(2):321.
- [8] 王晖,陈丽,陈垦,等.多指标综合评价方法及权重系数的选择[J].广东药学院学报,2007,23(5):583.

第一作者:赵林钢(1976—),男,硕士,副主任中药师,研究方向为中药学及药事管理。

通讯作者:姚毅,本科学历,主任中药师。
yaoyi@medlink.com.cn

收稿日期:2016-06-28

编辑:吴宁

(上接第66页)

- mycotoxins[M]. Lyon:World Health Organization International Agency for Research on Cancer,1993:245.
- [2] 龚燕,蔡建荣,赵晓联,等.ELISA法检测红曲中的黄曲霉毒素B₁[J].无锡轻工大学学报,2004,23(4):10.
 - [3] 刘鹏,杜平华,苏德模.18批中成药黄曲霉毒素的检测[J].中国中药杂志,1999,24(5):287.
 - [4] 郑荣,毛丹,王柯,等.HPLC法测定中药中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂含量[J].药物分析杂志,2005,25(6):610.
 - [5] 张雪辉,陈建民.高效液相色谱法与荧光光度法检测中药材中黄曲霉毒素的比较[J].药学报,2004,39(12):997.
 - [6] SHYU R H,SHYU H F,LIU H W,et al.Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin[J].Toxicon,2002,40(3):255.

- [7] ONO E Y,ONO M A,FUNO F Y,et al.Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA[J].Food Addit Contam,2001,18(8):719.
- [8] EGNER P A,WANG J B,ZHU Y R,et al.Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer[J].Proceedings of the National Academy of Sciences,2001,98(25):14601.

第一作者:林方芬(1976—),女,本科学历,主管中药师,从事中药质检研究。276006127@qq.com

收稿日期:2016-07-11

编辑:吴宁