

干燥方式对土鳖虫黄曲霉毒素含量的影响

朱涛^{1,2}, 谌宇³, 杜伟锋², 沈杨炳^{1,2}, 葛卫红^{2*} (1.浙江中医药大学中药饮片有限公司, 杭州 311401; 2.浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 杭州 311401; 3.杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310017)

摘要: 目的 考察比较干燥方式对土鳖虫黄曲霉毒素含量的影响。方法 采购活土鳖虫, 沸水烫死后, 模拟产地晒干的条件设置一组样品 30 ℃ 烘干, 另一组样品设置为较高温度 60 ℃ 快速烘干(每组各制备 2 批); 依据药典, 采用 HPLC(荧光检测器)检测比较 2 组样品的黄曲霉毒素含量。结果 30 ℃ 缓慢烘干者有明显腥臭味, 黄曲霉毒素含量严重超标; 60 ℃ 快速烘干者微有腥气, 黄曲霉毒素含量合格。与传统日晒品比较, 供应商大批量 65 ℃ 烘干 12 h 者黄曲霉毒素含量合格。结论 采用较高温度及时干燥, 可以控制土鳖虫黄曲霉毒素含量。

关键词: 土鳖虫; 干燥方式; 高效液相色谱法; 荧光检测器; 黄曲霉毒素

中图分类号: R284.1; R917.101 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2017)11-1539-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.008

引用本文: 朱涛, 谌宇, 杜伟锋, 等. 干燥方式对土鳖虫黄曲霉毒素含量的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1539-1541.

Effect of Drying Methods on the Content of Aflatoxins in Euplyphaga Steleophaga

ZHU Tao^{1,2}, CHEN Yu³, DU Weifeng², SHEN Yangbing^{1,2}, GE Weihong^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medicinal University Medicinal Pieces Co., Ltd., Hangzhou 311401, China; 2.Research Center of TCM Processing Technology, Zhejiang Chinese Medicinal University, Hangzhou 311401, China; 3.Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study and compare the effect of the drying methods on the content of aflatoxins in Euplyphaga Steleophaga. **METHODS** Living Euplyphaga Steleophagas were boiled to death. Simulating the dry conditions of producing area, set up a part of samples dried at 30 ℃; another samples dried at 60 ℃ quickly(2 batches per group). According to the pharmacopoeia, the contents of aflatoxins in two group of samples were detected by HPLC(fluorescence detection). **RESULTS** The samples drying at 30 ℃ had obvious stench, the content of aflatoxins exceeded standard hardly. The samples drying at 60 ℃ quickly had slightly gamey smell, the content of aflatoxins was qualified. By comparison with traditional naturally dried samples, the samples dried 12 h at 65 ℃ from a supplier, the content of aflatoxins was qualified. **CONCLUSION** The content of aflatoxins in Euplyphaga Steleophaga can be controlled through timely drying at higher temperature.

KEY WORDS: Euplyphaga Steleophaga; drying method; HPLC; FLD; aflatoxins

土鳖虫又名土元、地鳖虫、地乌龟等, 为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga Sinesis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi*(Boleny)的雌虫干燥体。土鳖虫捕捉后, 置沸水中烫死, 晒干或烘干, 药用具有破血逐瘀, 续筋接骨的功效, 可用于跌打损伤, 筋伤骨折, 血瘀经闭, 产后瘀阻腹痛, 癥瘕痞块等^[1]。目前药用土鳖虫已经形成规模养殖, 其雌虫体型扁圆肥厚, 富含氨基酸、蛋白质、核苷、脂肪酸、生物碱、挥发油、维生素与矿物元素等^[2]。

作为动物药, 土鳖虫营养丰富, 如果加工或储存不当, 容易腐败发臭, 发霉生菌, 之前已经有检测出黄曲霉毒素的报道^[3]。而黄曲霉毒素是一类结构类似的二呋喃香豆素类化合物, 在 1993 年

即被世界卫生组织(WHO)划定为一类致癌物, 是一种毒性极强的真菌毒素, 其危害性主要在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时可导致肝癌甚至死亡。在被污染的食品及中药产品中主要能检出黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂(以及 M₁、M₂), 其中黄曲霉毒素 B₁ 常见, 其毒性和致癌性也最强。可以产生黄曲霉毒素的真菌主要是黄曲霉菌和寄生曲霉菌, 影响这类腐生菌繁殖及产毒的因素主要是基质、水分、温度、通风条件等^[4-6]。

在杭州举办的 2016 年全国中药材及饮片质量和检验工作研讨会上, 上海市食品药品检验所以安全性风险控制为重点, 就所承担的土鳖虫项目, 检测发现黄曲霉毒素超标情况比较严重(参照中国

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目(ZYBZH-H-ZY-45)

作者简介: 朱涛, 男, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)87195915
(0571)87195888 E-mail: Geweihong@hotmail.com

E-mail: hbzt007@163.com

***通信作者:** 葛卫红, 男, 博士, 教授 Tel:

药典 2015 年版中僵蚕等动物药的限量标准), 并作为重大问题上报监管部门。从上半年杭州市食品药品检验研究院在市场抽检的土鳖虫饮片看, 同样不少样品的黄曲霉毒素含量超标; 本公司检测最近批次的土鳖虫样品, 黄曲霉毒素含量也有超标现象。水分是霉菌滋生的首要环境因素, 因此, 本实验从产地加工的干燥方式进行探讨, 以控制土鳖虫中的黄曲霉毒素含量。

1 材料和试剂

1.1 仪器

Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪、RF-20A 荧光检测器、LC solution 工作站(日本岛津公司); Pribolab 2000S 高速均质器(青岛普瑞邦生物工程有限公司); AP-SE-12B 型固相萃取装置(美瑞泰克科技有限公司); AL-204 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9240A 型恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试剂耗材

黄曲霉毒素混合标准品(中国食品药品检定研究院, 批号: 61001-201602, 标示浓度黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 分别为 1.02, 0.43, 1.06, 0.38 μg·mL⁻¹); Pribolab 免疫亲和柱; 甲醇、乙腈为色谱纯, 氯化钠为分析纯, 水为 Milli-Q 纯水。

1.3 药材

活土鳖虫购自安徽怀远, 经浙江中医药大学中药饮片有限公司钱敏主管中药师鉴定为地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取约 1 kg 活土鳖虫置盛放沸水的水盆内烫死, 捞起冲洗干净, 沥干, 立即分别置 2 台恒温干燥箱内烘干。一部分湿虫 30 °C 烘干约 96 h 作为样品组一(S₃₀ °C), 虫体干透, 腥臭味明显; 一部分湿虫 60 °C 烘干约 14 h 作为样品组二(S₆₀ °C), 虫体干透, 微有腥气。各组分别制备 2 批样品。

2.2 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇-乙腈-水(30:10:60); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 用柱后衍生法检测, 光化学衍生器(254 nm), 以荧光检测器检测, 激发波长 360 nm(或 365 nm), 发射波长

450 nm。

2.3 溶液准备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密量取黄曲霉毒素混合标准品 1.0 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为储备液。精密量取储备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 分别取上述样品粉碎过二号筛, 精密称定 15 g 粉末, 加入氯化钠 3 g, 置于匀浆均质器中, 精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL, 高速搅拌 2 min(搅拌速度 12 000 r·min⁻¹), 离心 5 min(离心速度 2 500 r·min⁻¹), 精密量取上清液 15 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 量取续滤液 20.0 mL, 采用固相萃取装置, 通过免疫亲和柱, 流速每分钟 3 mL, 用水 20 mL 洗脱, 洗脱液弃去, 使空气进入柱子, 将水挤出柱子, 再用适量甲醇洗脱, 收集洗脱液, 置 2 mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得^[7]。

2.4 系统适用性试验

按“2.2”项下色谱条件, 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 结果见图 1。由图 1 分析可知, 出峰顺序依次为黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁, 各目标峰对称性良好, 分离度均>1.5。

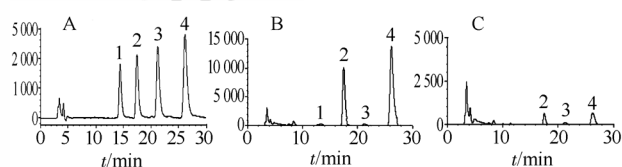


图 1 高效液相色谱图

A—混合对照品; B—样品 S₃₀ °C; C—样品 S₆₀ °C; 1—黄曲霉毒素 G₂; 2—黄曲霉毒素 G₁; 3—黄曲霉毒素 B₂; 4—黄曲霉毒素 B₁。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A—mixed reference substances; B—test sample S₃₀ °C; C—test sample S₆₀ °C; 1—afatoxin G₂; 2—afatoxin G₁; 3—afatoxin B₂; 4—afatoxin B₁。

2.5 样品测定

分别精密吸取混合对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线。分别得到黄曲霉毒素 B₁ 线性回归方程为 $Y=2.5 \times 10^9 X - 1\,308$ ($r=0.999\,8$)、黄曲霉毒素 B₂ 线性回归方程为 $Y=5.9 \times 10^9 X - 1\,205$ ($r=0.999\,5$)、黄曲霉毒素 G₁ 线性回归方程为 $Y=1.4 \times 10^9 X - 627$ ($r=0.999\,7$)、黄曲霉毒素 G₂ 线性回归方程为 $Y=3.3 \times 10^9 X - 469$ ($r=0.999\,8$)。可见, 黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素

G₁的进样量在约 10~50 pg, 黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₂的进样量在约 4~20 pg 范围内与各自的峰面积呈良好的线性关系。

各样品按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定。每个样品取样 2 份制备, 每份供试品溶液进样 2 次。精密吸取各供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 依据各标准曲线计算出供试品中相当于黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的平均含量。另外, 针对安徽怀远某供应商提供的各 2 批土鳖虫常规晒干样品(S_晒)和大批量 65 °C 干燥 12 h 的样品(S_{65 °C})依据同样条件进行了检测。各样品最终计算结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果(n=4)

Tab. 1 Results of sample determination(n=4) μg·kg ⁻¹				
样品编号	黄曲霉毒素 G ₂	黄曲霉毒素 G ₁	黄曲霉毒素 B ₂	黄曲霉毒素 B ₁
S _{30 °C} -1	0.15	48.65	0.28	36.47
S _{30 °C} -2	0.19	37.57	0.32	39.33
S _{60 °C} -1	未检出	2.33	0.04	2.21
S _{60 °C} -2	未检出	2.42	0.05	2.37
S _晒 -1	6.23	106.87	8.11	78.67
S _晒 -2	3.64	98.71	1.07	33.46
S _{65 °C} -1	未检出	2.55	0.02	2.14
S _{65 °C} -2	未检出	1.93	未检出	1.67

3 讨论

中国药典 2015 年版规定 19 种药材需要检测黄曲霉毒素, 其中包含水蛭、地龙、全蝎、蜈蚣、僵蚕 5 种动物类药材。因此本实验也直接参考药典四部统一的“黄曲霉毒素测定法(通则 2351 第一法)”进行检测, 没有做方法学考察。经比较实验, 流动相调整为甲醇-乙腈-水(30:10:60); 结果表明, 在本色谱条件下, 分离度高, 峰形更好。

查阅在执行的 2005 版《安徽省中药炮制规范》, 其中土鳖虫“采收与加工”项下描述是“捕获后, 置沸水中烫死, 干燥”, 并没有指定具体干燥方式。经咨询安徽怀远土鳖虫养殖基地, 土鳖虫的产地加工一般是沸水烫死后反复晒干, 因此模拟晒干的条件设置了一组样品 30 °C 烘干, 另一组样品设置为较高 60 °C 快速烘干(在实验设计时有设置 90 °C 干燥组, 结果不到 10 h 即出现焦糊味, 而虫体内部还没干透, 表明干燥温度不宜过高)。结果, 干燥时间分别需要约 96 h 和 14 h。参照药典中 19 种药材黄曲霉毒素的同一限量规定(每 1 000 g 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), 前者严重超标, 后者则是合格的。说明长时间晒干或低温干燥的土鳖虫容易滋生黄曲霉毒素, 较高温度及时干燥则可以控制。

为综合比较 2 种干燥方式对土鳖虫质量的影响, 笔者同时按药典标准做了其他检测项目。测得 30 °C 和 60 °C 烘干的样品水分分别为 12.51% 和 8.83%(药典规定不得过 10.0%); 浸出物分别为 27.43% 和 28.21%(药典规定不得少于 22.0%); 二者的显微鉴别和薄层鉴别均合格。

实验结果表明, 2 种干燥方式对土鳖虫的黄曲霉毒素含量的有重大影响。与常规晒干品比较, 65 °C 干燥 12 h 的土鳖虫样品, 质松脆, 微有腥气, 黄曲霉毒素检测合格(数据见表 1), 其他检测项目均合格。

从检测结果看, 有明显臭味的样品, 黄曲霉毒素含量一般都超标。是否可以作为经验鉴别依据, 需要更大样品量的检测数据支持。

土鳖虫采用较高温度及时干燥, 置通风干燥处储藏, 可以控制其黄曲霉毒素限量。建议国家药典增加土鳖虫的黄曲霉毒素检查项目, 以更好地控制其质量, 保证用药安全性。

致谢

衷心感谢浙江中医药大学中药饮片有限公司同事章怡、王云飞的支持。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 19.
- [2] 王鹏程, 吕文纲. 土鳖虫质量控制及药理作用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(9): 846-848.
- [3] ZHANG W, ZOU Y H, ZHUGE L. Content determination of aflatoxins in Eupolyphaga by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(30): 4269-4271.
- [4] LAO W Y, LIN S Z. The contamination and Hazards of aflatoxin on food [J]. J Beijing Union Univ(北京联合大学学报), 2011, 25(1): 64-69.
- [5] HAO A Y, ZHAO L Y, LIU Y H, et al. HPLC determination of aflatoxin residues in traditional Chinese medicine Yinpian with post column photochemical [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(12): 2203-2207.
- [6] ZHENG R, MAO D, WANG S M, et al. HPLC determination of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁ in 6 traditional Chinese drugs [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(3): 418-421.
- [7] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 224.

收稿日期: 2017-07-15

(本文责编: 曹粤锋)