

高效液相色谱测定僵蚕中黄曲霉毒素的含量

孙志胜, 戴洁

阳江市检测检验中心, 广东 阳江 529500

摘要: 为僵蚕药材及其饮片的市场监管提供依据。样品经提取后, 通过免疫亲和柱处理, 采用高效液相色谱法测定。结果显示, 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 检测方法的线性关系、重复性良好; 僵蚕药材及其饮片中的黄曲霉 G2 毒素整体检出率较高, 黄曲霉毒素的暴露水平过高, 将可能会对人体健康产生不良影响, 需要引起关注。

关键词: 黄曲霉毒素; 僵蚕; 高效液相色谱法; 风险评估

Determination of Aflatoxins in Silkworm by High Performance Liquid Chromatography

Sun Zhisheng, Dai Jie

Yangjiang Testing Center, Yangjiang, Guangdong 529500

Abstract: This study provided the basis for the market supervision of silkworm medicinal materials and their decoction pieces. After extraction, the samples were treated by immunoaffinity column and determined by high performance liquid chromatography. The results showed that the linear relationship and repeatability of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 detection methods were good. The overall detection rate of aflatoxin G2-toxin in silkworm and its decoction pieces is high, and the exposure level of aflatoxin is too high, which may have adverse effects on human health and needs to be paid attention to.

Keywords: aflatoxins; silkworm; high performance chromatography; risk assessment

僵蚕, 源于家蚕幼虫受白僵菌侵袭后的干燥形态, 春秋两季多见, 实则为病亡于白僵菌的蚕体经干燥处理而成。此药材效用多样, 能平息风邪、安定惊厥, 消散瘀滞、化解结块, 对惊厥抽搐、咽喉痛、皮肤痒症及颌下淋巴结肿大、面神经障碍均有疗效。^[1]

僵蚕作为一种广泛应用于中医治疗的草药, 若加工不当, 极易滋生黄曲霉菌, 进而产生高致癌性的黄曲霉毒素, 此毒素兼具强烈的急性毒性, 严重威胁人类健康。因此, 全球各国均对食品中的黄曲霉毒素残留设置了严苛标准。^[2] 依据《中华人民共和国药典》2020 版, 僵蚕中每千克黄曲霉毒素 B1 含量须低于 5 微克, 且 B1、B2、G1、G2 四种毒素总和不得超过 10 微克。本研究致力于通过高效液相色谱技术, 结合暴露限量评估法, 对僵蚕中的黄曲霉毒素展开深入的安全风险评估, 来确保用药安全。

一、仪器与试剂

(一) 仪器

电子天平、安捷伦品牌型号为 1260 的高效液相色谱系统、离心分离装置以及 PHRE 15 型号的光化学柱后衍生装置。

(二) 试剂与试药

混合标准溶液含四种黄曲霉毒素 (G2、G1、B2、B1, 浓度均为 2 μg/ml), 源自农业部环保科研测试机构。采用免疫亲和柱进行分离, 甲醇与乙腈购自 Fisher Scientific, 均为色谱级纯度, 纯化水自制, 僵蚕样品购于多家药店, 样品信息如下表 1:

表 1 样品信息

批次	样品信息
210201	僵蚕饮片, 检验样品 (来源俊邦)
2102031	僵蚕饮片, 检验样品 (来源乐仁)
230401	僵蚕饮片, 检验样品 (来源深华)
2208019	僵蚕饮片, 检验样品 (来源众志)
20200903	僵蚕饮片, 检验样品 (来源紫云)

二、方法

(一) 色谱条件

本实验采用 Agilent 品牌 ZORBAX SB-C18 型号的色谱柱,

流动相组成为甲醇、乙腈和水的混合液，体积比为40:18:42。检测手段为荧光法，其中激发光的波长为360纳米（或可选择365纳米），而发射光的波长则设定为450纳米。^[3]

(二) 混合对照品溶液的制备

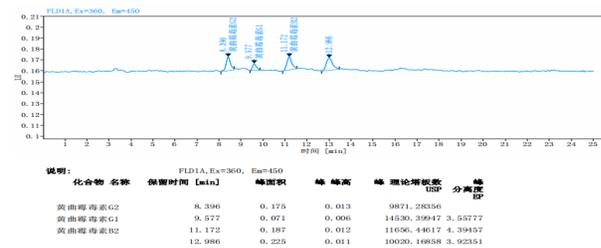
准确吸取1.2条款所述对照品溶液0.5毫升，注入10毫升容量瓶中，加甲醇稀释至满刻度制得储备液。再精准量取储备液1毫升，入25毫升容量瓶，用甲醇稀释至刻度，配制成混合对照溶液。^[3]

(三) 供试品溶液的制备

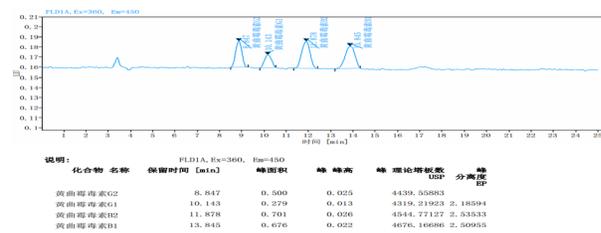
取供试品粉末大约5克（需通过二号筛网过滤），进行精确称量后置于均质容器中。加入3克氯化钠，并精确注入75毫升70%浓度的甲醇溶液。以高于11000转/分钟的速度高速搅拌2分钟，随后以4000转/分钟的速度离心5分钟。精确量取上清液15毫升，置于50毫升容量瓶中，加水稀释至满刻度并摇匀，再次以4000转/分钟的速度离心10分钟。取上清液20毫升通过免疫亲和柱，流速控制为每分钟3毫升。用水20毫升进行洗脱（若需要，可先使用10毫升淋洗缓冲液洗脱，再用10毫升水洗脱），弃去洗脱液。让空气进入柱子，将水挤出后，用适量甲醇洗脱并收集洗脱液，置于2毫升容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，通过0.22微米微孔滤膜过滤，取滤液备用。^[3]

(四) 线性关系考察

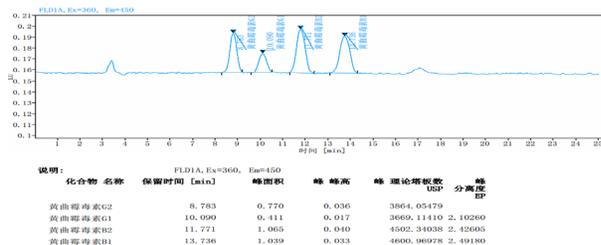
“2.2”项下的对照品溶液的注入体积分别为5至25微升（递增5微升），绘制以注入量（纳克）为X轴、峰面积为Y轴的标准曲线，R²值近1且超0，显示出出色的线性关系。特征图谱如图2-1到2-5，标准曲线如图2-6到2-9，总结如表2^[4]。



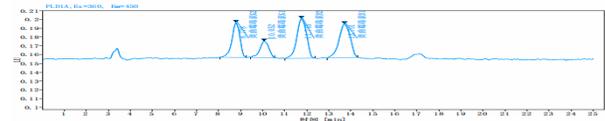
>图2-1 5 μl对照特征图谱



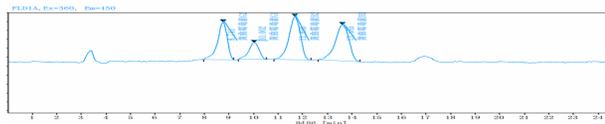
>图2-2 10 μl对照特征图谱



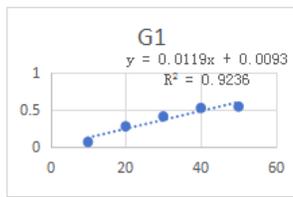
>图2-3 15 μl对照特征图谱



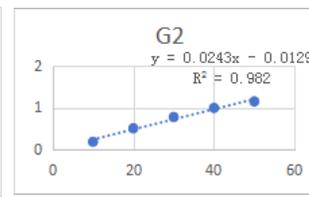
>图2-4 20 μl对照特征图谱



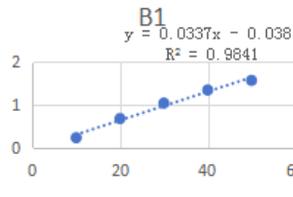
>图2-5 25 μl对照特征图谱



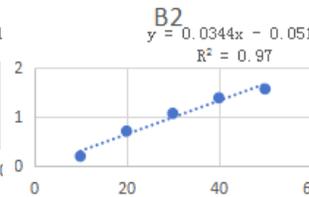
>图2-6



>图2-7



>图2-8



>图2-9

表2 标准曲线

僵蚕对照品标准曲线					
编号	进样量 ng	AFB ₁ 峰面积	AFB ₂ 峰面积	AFG ₁ 峰面积	AFG ₂ 峰面积
1	10	0.225	0.187	0.071	0.175
2	20	0.676	0.701	0.279	0.500
3	30	1.039	1.065	0.411	0.770
4	40	1.347	1.383	0.524	0.989
5	50	1.573	1.565	0.542	1.145
标准曲线		黄曲霉毒素 B ₁ : Y=0.0337x -0.0381	黄曲霉毒素 B ₂ : Y=0.0344x +0.0512	黄曲霉毒素 G ₁ : Y=0.0119x +0.0093	黄曲霉毒素 G ₂ : Y=0.0243x -0.0129
r		0.9841	0.97	0.9236	0.982

(五) 样品实验

分别称取俊邦乐仁紫云轩等厂家的样品 15 g，制备供试品溶液。按照“2.1”项测定，结论是：未发现 B1、B2、G1 型黄曲霉毒素，但检测到 G2 型黄曲霉毒素存在^[5]。

(六) 重复性实验

选取 6 份编号 YJJCZY05 的样品，每份 15 克，测试表明结果

重现性佳；B1、B2、G1型黄曲霉毒素均未检出，G2型RSD值为1.01%^[6]。结果显示B1、B2、G1均未检出，G2含量均低于10微克，具体G2测定数据参见表3所示。

(七) 数据处理

通过标准曲线法分析黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2含量，结

表3 黄曲霉毒素G₂测定结果 μg/kg

黄曲霉毒素G ₂ 测定结果 μg/kg						
广东俊邦						
批次	编号	峰面积	取样量 g	稀释倍数	进样体积 μl	AFG ₂
210201	YJJCZY01	0.110	15.0334	25	20	0.421
210201	YJJCZY02	0.106	15.0232	25	20	0.407
210201	YJJCZY03	0.101	14.8050	25	20	0.396
210201	YJJCZY04	0.116	15.1122	25	20	0.439
广东深华						
批次	编号	峰面积	取样量 g	稀释倍数	进样体积	AFG ₂
2102031	YJJCZY05	0.256	15.0019	25	20	0.922
2102031	YJJCZY06	0.256	15.0004	25	20	0.922
2102031	YJJCZY07	0.268	15.0534	25	20	0.960
2102031	YJJCZY08	0.268	15.0502	25	20	0.960
2102031	YJJCZY09	0.256	15.0019	25	20	0.922
广西紫云轩						
批次	编号	峰面积	取样量 g	稀释倍数	进样体积	AFG ₂
230401	YJJCZY10	0.098	15.0391	25	20	0.379
230401	YJJCZY11	0.103	15.0142	25	20	0.397
230401	YJJCZY12	0.090	15.0043	25	20	0.353
230401	YJJCZY13	0.093	15.0102	25	20	0.363
国药乐仁						
批次	编号	峰面积	取样量 g	稀释倍数	进样体积	AFG ₂
2208019	YJJCZY14	0.368	15.0123	25	20	1.305
2208019	YJJCZY15	0.373	15.0411	25	20	1.320
2208019	YJJCZY16	0.376	15.0315	25	20	1.331
2208019	YJJCZY17	0.377	15.0227	25	20	1.335
江西众志						
批次	编号	峰面积	取样量 g	稀释倍数	进样体积	AFG ₂
20200903	YJJCZY18	0.190	15.0133	25	20	0.695
20200903	YJJCZY19	0.191	15.0227	25	20	0.698
20200903	YJJCZY20	0.191	15.0131	25	20	0.699
20200903	YJJCZY21	0.189	15.0018	25	20	0.692

三、黄曲霉毒素风险评估

黄曲霉毒素是一种对人体极具危害的物质，能够严重损害人类及动物的肝脏组织^[7]。其毒性极其强烈，在极端情况下，甚至可引发肝癌并导致死亡。世界卫生组织已明确将黄曲霉毒素列为1类致癌物质。有研究显示，若能有效控制并减少黄曲霉毒素的摄入，肝癌及其相关死亡病例或可避免。本次研究聚焦于中药中有害残留物的风险评估，特别是暴露评估环节^[8]。我们采用暴露限值法（MOE）对中药中黄曲霉毒素G₂的潜在致癌风险进行了评估，通过剂量-反应曲线推算出了人群致癌风险。我们利用人群膳食暴露量与摄入量的比值来描述风险程度。若MOE值大于

10000，则表明黄曲霉毒素G₂的摄入量处于安全范围内，不会对人体健康构成威胁；反之，若MOE值小于或等于10000，则可能对人体健康产生不良影响。^[9]

(一) 暴露边界值计算

根据公式(1) $ADD = (C \times IR) / BW$ ；公式(2) $MOE = POD / ADD$

在评估模型中，ADD代表民众日常消费僵蚕所摄入的AFG₂平均日剂量（单位：微克/千克·天），C为僵蚕样本中AFG₂的平均浓度（单位：微克/千克），IR代表日均僵蚕摄入量（单位：千克/天，参考《中国药典》2020版建议的0.01千克/天），BW代表成人平均体重（假定为60千克）。POD基于人群流行病学数

据,采用EFSA的剂量-反应模型,设定BMDL10(即肝癌风险增加10%的95%置信区间下限)为0.87微克/千克·天^[10]。未检出值依据LOD原则处理,参考WHO及USEPA指南。

本次实验测得僵蚕中黄曲霉毒素G2平均含量为0.75微克/千克。经公式(1)计算,民众日常通过僵蚕摄入的G2日均暴露量(ADD)为0.000125微克/千克·天。再经公式(2)推导,得出平均人群MOE值为6960。鉴于MOE值未超10000,提示僵蚕药材中的G2暴露水平可能对人体健康构成潜在风险。

四、讨论与结论

本次对俊邦乐仁、紫云轩等品牌五批次僵蚕实施了检测,发

现其中黄曲霉毒素G2虽有检出,但均未触及2020版《中国药典》所规定的10微克/千克上限^[1]。至于黄曲霉毒素B1、B2及G1则未检出,结果合规。在风险评估环节,我们运用了暴露限制法来评估僵蚕中G2的风险,结果显示MOE值未超过10000,意味着G2暴露水平偏高,可能对消费者健康构成潜在威胁。本次药品风险监测揭示了药品安全漏洞,呼吁政府强化药品监管,提升检测技术水平,确保违禁成分的高效检出,以促进药品行业的健康发展,并加强质量控制,守护公众用药安全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典:2020年版·一部[M].中国医药科技出版社,2020.
- [2] 尹淑涛,薛文通, and 张惠.“黄曲霉毒素检测方法研究进展.”2007中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会学术年会暨中国中部地区农产品加工产学研研讨会论文集2007.
- [3] 中华人民共和国药典:2020年版·四部[M].中国医药科技出版社,2020.
- [4] 纪坤发,杨爱君,何瑛,等.高效液相色谱法测定牛奶中黄曲霉毒素M1含量的方法验证研究[J].中国乳业,2024,(11):120-132.
- [5] 陈梦,邹小龙,范蕾,等.高效液相色谱法测定牛奶中黄曲霉毒素M1含量的不确定度评定[J].分析测试技术与仪器,2020,26(01):71-75.
- [6] 郭新颖,戴志英,潘少聪,等.高效液相色谱荧光-光化学衍生法测定固体牛乳制品中黄曲霉毒素含量[J].医学动物防制,2023,39(12):1221-1224.
- [7] 李亚,梁剑锋,宾月景,等.QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定六堡茶中黄曲霉毒素B1的含量[J].理化检验-化学分册,2023,59(10):1134-1138.
- [8] 张玮,李会荣,朱娜,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮含量的研究[J].饲料研究,2023,46(03):126-129.
- [9] 王莹,金红宇,李耀强,等.何首乌外源性有害残留物的风险评估与其致肝毒相关性初评[J].中国药事,2022,36(10):1134-1146.
- [10] 许莉,黄晓婧,罗霄,等.使君子中22种真菌毒素UHPLC-MS/MS同步检测与风险评估[J].时珍国医国药,2021,32(4):984-987.