

综 述

中药饮片真菌毒素前处理方法进展

董姣姣¹ 范妙璇² 陈炼明¹ 傅欣彤² 肖红斌¹

(1 北京中医药大学,北京,100102; 2 北京市药品检验所,北京,100035)

摘要 中药真菌毒素是真菌在中药中所产生的次生代谢产物,一般不表现出急性毒性,但具有较强的蓄积性。我国常用中药存在真菌毒素污染或潜在污染的情况。为了改善中药基质对真菌毒素检测结果的影响,提高中药真菌毒素检测灵敏度与准确度,保证人类健康,减少真菌毒素带来的经济损失,本文对现代中药真菌毒素提取和净化方法进行了总结和概括,主要包括高速均质提取、搅拌提取、超声提取、振荡提取及免疫亲和柱净化法、固相萃取柱净化法、QuEChERS 净化法等,并对真菌毒素前处理方法进行展望,以供国内外同行参考借鉴。

关键词 中药饮片;真菌毒素;提取;净化;前处理;高速均质提取;搅拌提取;超声提取;振荡提取;免疫亲和柱净化;固相萃取柱净化;QuEChERS 净化

Research Progress on Pretreatment Methods of Aflatoxins in Traditional Chinese Medicine

Dong Jiaojiao¹, Fan Miaoxuan², Chen Lianming¹, Fu Xintong², Xiao Hongbin¹

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Beijing Pharmaceutical Inspection Institute, Beijing 100035, China)

Abstract Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain fungi in traditional Chinese medicine (TCM), which generally don't show acute toxicity but have strong accumulation. Traditional Chinese medicines are contaminated or potentially polluted by mycotoxins. In order to improve the effect of traditional Chinese medicine matrix on mycotoxin detection, to improve the sensitivity and accuracy of mycotoxin detection, and to ensure human health and reduce the economic loss caused by mycotoxins, this paper summarizes the extraction and purification methods of mycotoxin from TCM which mainly include high-speed homogenization extraction, stirring extraction, ultrasonic extraction, oscillation extraction and immunoaffinity column (ICA) purification, solid phase extraction column (SPE) purification and QuEChERS purification. Some expectation of the methods of mycotoxin pretreatment was brought forward in this article for providing reference for peers at home and abroad.

Key Words Traditional Chinese medicine decoction pieces; Mycotoxins; Extraction; Purification; Pretreatment; High speed homogenous extraction; Stirring extraction; Ultrasonic extraction; Vibrating extraction; Immune affinity column purification; Solid phase extraction column purification; QuEChERS purification

中图分类号:R282.7 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.066

真菌毒素残留是中药材微量外源性有毒有害物质的残留,是目前该领域研究的热点。各国政府对真菌毒素的分布及检测予以了极大的关注,特别是欧洲、韩国等国家对此设定了严格的限量规定,但发现各国更侧重对食品中真菌毒素进行限量规定,对药材真菌毒素规定较少,见表1。2015年版《中华人民共和国药典》规定陈皮、僵蚕、胖大海、酸枣仁、桃仁等19味药材需要检测黄曲霉毒素,其中B1不得超过5 μg/kg, B1、B2、G1、G2 总量不得超过10 μg/kg,且规定其净化方式为免疫亲和柱净化法,但并未对其余中药材及真菌毒素进行限量规定。真菌毒素种类繁多,且在不同种类和不同基质中药之间都存在着很大的差异,使检测难度增大。其前处理方法的好坏在很大程度上决定了检测结果的准确性,因此为了提高检测结果的准确性,研究不同的基质的中药和不同的毒素的前处理方法尤为重要。

kg,且规定其净化方式为免疫亲和柱净化法,但并未对其余中药材及真菌毒素进行限量规定。真菌毒素种类繁多,且在不同种类和不同基质中药之间都存在着很大的差异,使检测难度增大。其前处理方法的好坏在很大程度上决定了检测结果的准确性,因此为了提高检测结果的准确性,研究不同的基质的中药和不同的毒素的前处理方法尤为重要。

1 分类综述

1.1 提取方法

基金项目:名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302)

作者简介:董姣姣(1994.01—)女,硕士研究生,研究方向:中药检测与分析,E-mail:djllzx@163.com

通信作者:肖红斌(1969.07—)男,博士,教授,中药分析与转化中心主任,研究方向:中药分析,中药代谢组学,中药分析与转化,E-mail:hbxiao69@163.com

表 1 各国对真菌毒素的限量标准

毒素名称	中文名称	来源	限量标准
AFB1	黄曲霉毒素 B1	韩国 ^[2]	10 μg/kg(甘草、决明子等)
		欧盟 ^[1]	2 μg/kg
		《中华人民共和国药典》2015 版 ^[4]	5 μg/kg(陈皮、桃仁等)
		《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》 ^[3]	5 μg/kg
AFM1	黄曲霉毒素 M1	《食品安全国家标准》	0.5 μg/kg(婴幼儿配方食品等)
AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2		《中华人民共和国药典》2015 版	10 μg/kg
ZEN	玉米赤霉烯酮	《食品安全国家标准》	60 μg/kg(玉米、小麦等)
α-ZON	α-玉米赤霉醇	美国	0.15 mg/kg(肉)
			0.3 mg/kg(肝脏)
DON	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	《食品安全国家标准》	1 000 μg/kg(玉米)
OTA	赭曲霉毒素	《食品安全国家标准》	5 μg/kg(谷物、豆类等)
FB1	伏马毒素 B1	欧盟	1 000 μg/kg(玉米、小麦等)
			200 μg/kg(婴幼儿食品)
PAT	展青霉素	《食品安全国家标准》	50 μg/kg(水果制品、果蔬汁类)

一种好的提取方法不仅要求提取充分,而且要求提取的物质中含有尽量少的非目标组分,这将有利于之后毒素的分离和纯化。真菌毒素寄生在中药基质的各个角落,需要外界力量使其溶解。目前常用的毒素提取溶剂包括甲醇、乙酸乙酯、乙腈和水中的一种或多种不同配比的混合物,提取方法主要有高速均质提取法、振荡提取法、超声提取法、高速搅拌提取法等^[5]。

1.1.1 高速均质提取法 高速均质提取法,是在提取剂环境中利用均质机器将样品进行高速旋转,使提取剂与样品组织进行充分接触,进而将中药材中的真菌毒素提取出来。不足之处在于此种方法由于高速搅拌可能破坏分子结构。韩铮等^[6]选取不同基质的 30 份中药材,包括根茎类(白芍、丹参等)、种子果实类(酸枣仁、苦杏仁等)、花类(菊花、槐花等)、全草类(大青叶、青黛等),通过比较甲醇、乙腈、水、甲醇/水(84/16, v/v)、甲醇/水(50/50, v/V)、乙腈/水(84/16, v/v)、乙腈/0.1 M 的碳酸钠水溶液(70/30, v/v)、乙酸乙酯等溶液对中药材真菌毒素的提取率,分别选择 86% 乙腈提取 AF 类真菌毒素、乙酸乙酯提取 OT 类真菌毒素、50% 乙腈提取 FB 类真菌毒素,乙腈加氯化钠提取 ZEN,并经 UP-LC/MS/MS 分别测定。Katerere D R 等^[7]在薯蓣属、灵芝属类等植物中加入氯化钠,用 80% 甲醇对其进行高速均质提取,得到 AFB1、FB1、FB2、FB3 结果。Zheng H 等^[8]则用 84% 乙腈水对根茎、花类、种子类和全草类的不同中药进行高速均质提取,测定了 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、AFM1、AFM2 六种 AF 类真菌毒素结果。Han Z 等^[9]比较了不同浓度的甲醇水和乙腈水对柑橘、柴胡等中药材中 DON、3-

ADON、15-ADON、NIV 和 Fus X 的提取率,选择用 84% 乙腈水作为提取溶剂,对其进行高速均质提取。Liu X 等^[10]比较了 50% 甲醇水、50% 乙腈水、75% 甲醇水、75% 乙腈水、1% 甲酸乙腈水和 1% 甲酸甲醇水对桃仁、酸枣仁、当归等中药中 FB1、FB2、FB3 的提取效果,发现用 50% 乙腈水提取同时,使用 NaOH 调节 PH 为 6~9,将达到符合要求的回收率。Zhang L 等^[11]将氯化钠加入北五味子、山楂等中药材粉末后加入 70% 甲醇高速均质提取过滤,后加入磷酸缓冲盐调节 PH 为 7.8 并用 2% 吐温-20 助溶,得到待净化溶液。Arroyo-Manzanares N 等^[12]将水飞蓟研磨,加入磷酸缓冲盐、5% 甲酸乙腈涡旋高速均质提取 AF、NIV 等真菌毒素。朱禹澎^[39]等对比了药典甲醇提取法和不同的离心速度对黄曲霉提取的影响,选择提取溶剂为 70% 甲醇对陈皮粉末加入氯化钠高速均质提取,并将离心速度由 2500 r/min 改为 4 000 r/min,发现此方法对进液相的峰有所改进。

1.1.2 振荡提取法 振荡提取是一种较常见的提取方法,优点在于将样本混合均匀会大幅度增加液体的流动性,从而提高提取效率,且不会损坏样本,但对不同基质的中药真菌毒素的提取率差别较大。孔祥虹等^[14]加氯化钠于样品中,用乙腈直接振荡提取生姜、槐花等植物中的黄曲霉毒素,并用玻璃纤维过滤。Zheng R 等^[15]用 84% 乙腈水对太子参、苦杏仁等 244 批样品振摇提取,通过 LC-MS/MS 检测到 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、OTA 和 ST 六种真菌毒素,回收率在 91.2%~112.1% 之间。林方芬等^[16]用 84% 乙腈水对川贝母、杜仲等 15 种药材涡旋振荡提取后吸取上清液 60℃ 蒸干复溶得供试液。

Zheng R S^[17]等用乙酸乙酯直接涡旋提取金银花、厚朴等中药得到 AFB1、B2、G1、G2、OTA、ST 6 种真菌毒素,并分别用形态学、分子式识别、液质连用等方法鉴别。Ali N 等^[18]选择 70% 甲醇水振荡提取槟榔得上清液,用吐温-20:PBS(1:9)助溶,再通过玻璃纤维纸过滤,得到澄清的提取液。付成平等^[19]直接用 80% 甲醇振荡提取穿山龙中的 AFB1,且未经过其他提取操作。

1.1.3 超声提取法 超声提取法利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速胞内有效物质的释放、扩散和溶解,显著提高提取效率,但其破碎力较强,杂质溶出较多。陈重均^[20]考察了 70% 甲醇、100% 甲醇、84% 乙腈及 100% 乙腈对黄芪中真菌的提取效率,最终使用 100% 乙腈对黄芪中 10 种真菌毒素超声提取。李峻媛^[21]比较了乙腈-水(84:16, v/v)和甲醇-水(80:20, v/v)对薏苡仁中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等真菌毒素的提取率,选择了乙腈-水(84:16, v/v)超声提取作为其提取方式,并经过滤纸过滤。万丽等^[22]使用 70% 甲醇超声提取川芎、柏子仁等 14 批中药中的黄曲霉毒素,玻璃纤维过滤。赵连华等^[23]以 80% 甲醇水超声提取后滤过玻璃纤维纸,取 2 mL N₂ 吹干,50% 甲醇复溶得 AF 类 4 种黄曲霉毒素。李梦华等^[24]对比了甲醇-水(80:20, v/v)与甲醇-水-0.1 甲酸(79:20:1, v/v/v)对 8 种毒素的提取率,发现甲醇-水(80:20, v/v)体系对伏马毒素的回收率在 60% 左右,而甲醇-水-0.1 甲酸体系使伏马毒素的回收率达到 80% 以上,故选择甲醇-水-0.1 甲酸对山药中的 AFB1、B2、G1、G2、OTA、FB1、FB2、ZEA 8 种真菌毒素超声提取。胡一晨等^[25]使用 80% 甲醇超声提取川芎、白芷、半夏等 5 种中药中的黄曲霉毒素。朱迪^[26]通过加入氯化钠并用 70% 甲醇对 87 批中药饮片超声提取,检测 4 种 AF 类真菌毒素。Kong W J 等^[27]比较了不同浓度的甲醇水和乙腈水对薏苡仁中 AFG2、AFG1、AFB2、AFB1、 β -ZOL、 α -ZOL、ZON 的提取率,并对比了加入氯化钠和不加氯化钠的区别,选择了 80% 甲醇加入氯化钠超声提取。Yang L 等^[28]使用 80% 甲醇超声提取甘草、黄芪、黄芩等中药中的 OTA 后加入 3% 吐温-20 溶液助溶。郝爱鱼等^[29]通过 70% 甲醇超声提取 120 批中药饮片后加入 10% 吐温-20 溶液助溶得 4 种 AF 类真菌毒素。Wei R 等^[30]比较了不同浓度的乙腈和甲醇对 AFB1、B2、G1、G2、OTA 的提取率,发现 80% 甲醇的提取可以达到符合要求的回收率。故选择 80% 甲醇对甘草中此 5 种

真菌毒素进行提取并加入 2% 吐温-20 溶液助溶得。曹纪亮^[31]比较了 80% 甲醇超声提取 20 min 和振摇提取 60 min 的提取率,发现无明显差异,选择较为简便的 80% 甲醇对中药鸡胆子、生姜中的黄曲霉及赭曲霉进行提取。并且,曹纪亮等还考察了不同浓度的吐温-20/PBS 溶液对沉淀的助溶效果,发现 2.0% 的吐温-20/PBS 溶液能有效抑制沉淀的产生。通过测定后发现赭曲霉污染较为严重,故建立了赭曲霉的提取方法为 60% 乙腈水超声提取滤过后,加水稀释盐酸调节 PH 为 1.0。Yang Ying 等^[32]将氯化钠与生姜混合后加入 80% 甲醇水超声提取,在过滤前先加入 2% 吐温-20/PBS 混匀滤过玻璃纤维纸得供试液。韦日伟等^[33]将甘草粉碎加入氯化钠用 80% 甲醇超声提取后定量滤纸粗滤之后加入 2% 吐温-20 稀释。Wen J 等^[34]用同样的方法提取测定 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、OTA 5 种真菌毒素。李春等^[35]先将何首乌粉末中加入水、1% 乙酸乙腈溶液涡旋,后超声提取,离心,吸取上清液备用。

1.1.4 搅拌提取 搅拌提取法是在样本浸渍提取的基础上加快物质的溶出,操作简单易行,使用搅拌机等简易仪器即可完成,但提取耗时较长。王少敏等^[36]通过 12 500 r/min 高速搅拌提取桃仁粉末中 4 种 AF 类真菌毒素,并通过玻璃纤维滤纸滤过。魏俊德等^[37]也用同样的方法对白苏子进行搅拌提取,测得 4 种黄曲霉毒素。王珂等^[38]使用 84% 乙腈对薏苡仁中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素和 T-2 毒素等 7 种真菌毒素高速搅拌提取。2005 年,郑荣等^[39]已使用 70% 甲醇加入氯化钠高速搅拌提取丹参、大枣、苦杏仁等中药中 4 种 AF 类真菌毒素。2010 年,^[40]他们对酸枣仁中的 4 种 AF 类真菌用同样的方法进行测定。杨文武等^[41]也使用和郑荣相同的提取方法对白芍、陈皮、酸枣仁等中药中的 4 种 AF 类真菌毒素进行提取。刘书宇等^[42]粉碎莲子后加入氯化钠,用 80% 甲醇高速搅拌提取并加入 PBS 稀释得 AF 类 4 种真菌毒素。赵淑锐等^[43]使用 80% 甲醇水和正己烷加入人参粉末中高速搅拌后通过分层中性滤纸过滤,得续滤液加入磷酸缓冲盐和吐温-20 得到黄曲霉毒素提取液。Yue Y T 等^[44]加入 5 g 聚乙二醇于薏苡仁、西洋参等中药材中再加入 100 mL 蒸馏水搅拌提取 DON。

1.2 净化方法

样品净化是真菌毒素分析中的重要步骤,净化是指在不损失或尽可能少损失待测毒素的前提下,

除去干扰杂质的过程。由于中药样品基质种类复杂及真菌毒素微量存在,样品的净化处理是测定真菌毒素的难点所在。目前常用的净化方法主要为免疫亲和柱净化法、固相萃取柱净化法及 QuEChERS 法。

1.2.1 特异性净化方法 免疫亲和层析 (Immune Affinity Column, IAC) 法基于抗原抗体反应,抗体连接在免疫亲和柱内,样品中的黄曲霉毒素经提取过滤、稀释,滤液缓慢经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和柱层析净化,黄曲霉毒素交联在层析递质中的抗体上。这种净化方法特异性强,回收率高,操作简便,选择性强,但价格昂贵。2015 版药典规定对黄曲霉毒素的净化采用此方法^[4]。朱迪等^[22,26,31,41,43]通过玻璃纤维滤纸滤过的提取液均通过免疫亲和柱净化,首先用水洗涤杂质后甲醇洗脱真菌毒素,测定回收率均在 75%~90% 之间。郑荣等^[35,37]对丹参、大枣、苦杏仁、白苏子等中药的提取液通过免疫亲和柱净化,回收率在 60%~110% 之间。郝爱鱼等^[29]将 120 批中药澄清的溶液直接使用免疫亲和柱净化,回收率为 95%~110%。Katerere D R 等^[7]使用不同的免疫亲和柱净化 AFB1 和 FB1、FB2。他将滤过 0.45 μm 的滤液通过 Aflat-est column 免疫亲和柱净化 AB1、Strong Anionic Exchange Columns 净化 FB1、FB2、FB3。Ali N 等^[18]将助溶过滤后得到的澄清液通过免疫亲和柱净化后得到真菌提取液,通过 HPLC 柱后衍生测定 AFB1、AFB2、AFG2 3 种真菌毒素。YangYing 等^[34]得到供试液后直接通过免疫亲和柱净化,测定了 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、OTA 5 种真菌毒素。孔祥虹等^[14]将提取液加入净化装置中的玻璃针筒中,使滤液以一定速率流入免疫亲和柱,分别用 10 mL 0.1% 吐温-20 缓冲液、10 mL 水淋洗后用 1.0 mL 甲醇洗脱、收集洗脱液,洗脱液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后得待测试液。赵淑锐等^[43]将得到的提取液上 AflaCLEANTM 柱,直接用甲醇洗脱进行净化。韦日伟等^[33]将过玻璃纤维的滤液通过 AflaOchra 免疫亲和柱净化,流速为 2~3 mL/min,直至液体完全通过免疫亲和柱。再分别用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液和 10 mL 水淋洗免疫亲和柱,最后用 2 mL 甲醇洗脱得黄曲霉毒素与赭曲霉毒素 A。Zhang L 等^[11,46]等将 0.45 μm 过滤的滤液直接通过免疫亲和柱净化,测得 AFB1、B2、G1、G2 4 种黄曲霉毒素,回收率均在 80%~95% 之间。曹纪亮等^[31]对下文提到的不同种类的固相萃取柱进行了考察,包括 Waters Oasis

HLB 柱、Agilent SampliQ C18 柱、TC-M160 PuriToxSR 多功能净化柱以及 VicamAflaTest 黄曲霉毒素免疫亲和柱,结果发现,前 3 种方法对鸭胆子的净化效果均不理想,检测时色谱图中杂质峰较多,对黄曲霉毒素的检测干扰严重,而免疫亲和柱对黄曲霉毒素有很好的选择性,能较好的去除基质中的干扰成分,适用于鸭胆子中黄曲霉毒素检测的样品净化要求,并测定 4 种黄曲霉毒素和一种赭曲霉毒素。付成平等^[19]将直接离心得的上清液通过免疫亲和柱,以 20 mL 0.1% 吐温-20/PBS 溶液分 2 次洗柱(流速为 1~2 mL/min),再以 20 mL 重蒸水分 2 次洗柱,弃去全部流出液,并使 2~3 mL 空气通过柱体,最后以 1.0 mL 色谱级甲醇洗脱,流速为 1~2 mL/min。胡一晨等^[25]比较了硅胶、中性氧化铝、硅藻土自制固相萃取柱和免疫亲和柱对黄曲霉毒素的净化效果,通过 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 测定并选择免疫亲和柱净作为净化方式。Wei R 等^[33]考察 Aflaochra HPLC 柱和免疫亲和柱的净化效果,并对比了直接使用 20 mL 水冲洗,10 mL 水淋洗后磷酸缓冲液冲洗和 10 mL 水淋洗后吐温 20 冲洗对 AFB1、B2、G1、G2、OTA 回收率的影响,发现只有用免疫亲和柱中第 3 种冲洗方式较好。Yue Y T 等^[44]比较了硅酸镁载体、Mycosep225、Bond ElutMycotoxin、DON 免疫亲和柱对 DON 的净化效果,发现除了免疫亲和柱其他的萃取柱净化后检测对 DON 影响较大。Kong W J 等^[27]考察了 Agilent SampliQ C18-SPE 柱、Romer Mycosep226 柱、Sepax universal 柱、WatersHLB 柱、Bond ElutMycotoxin-SPE 柱、MF160 柱、AflaZearalTestTM 免疫亲和柱和自制硅胶柱对薏苡仁中 AFG2、AFG1、AFB2、AFB1、 β -ZOL、 α -ZOL、ZON 的净化效果,发现只有免疫亲和柱可以达到要求回收率。

1.2.2 非特异性净化方法

1.2.2.1 固相萃取柱净化法 固相萃取柱 (Solid Phase Extraction, SPE) 净化法利用了选择性吸附与选择性洗脱的液相色谱法分离原理。较常用的方法是使液体样品溶液通过吸附剂,保留其中被测物质,再选用适当强度溶剂冲去杂质,然后用少量溶剂迅速洗脱被测物质,从而达到快速分离净化与浓缩的目的。也可选择性吸附干扰杂质,而让被测物质流出;或同时吸附杂质和被测物质,再使用合适的溶剂选择性洗脱被测物质。SPE 分为正相、反相、混合型色谱柱。下文提到 C-18 柱、Mycosep226 柱等为反相色谱柱,硅胶、氧化铝柱为正相色谱柱,还有混合填料色谱柱等。这种方法缺乏专一性,净化痕量黄曲

霉不够充分。陈重均^[20]比较了 Waters 226 柱和 HLB 柱对不同真菌毒素的回收率,发现 Waters 226 对 OTA、MPA 回收率极差,故选择 Waters 226 为黄芩真菌毒素的净化方式。李俊媛^[47]对安捷伦,Varian 公司的 Bond ElutMycotoxin-SPE 柱、MF 160 和 CleanertPestiCarb-SPE 小柱 5 种已商品化的固相萃取小柱,按相关文献中的制备方法处理样品,经 HPLC-FLD 检测,考察净化效果,发现前 3 种小柱处理后的供试品杂质峰多,影响目标物的检出,无法达到理想的净化效果,对于薏苡仁样品不适用;后 2 种小柱的净化效果较好。MF160 小柱是 Mycosep226 柱的改进型,净化效果较好,没有杂质影响 ZON、 α -ZOL、 β -ZOL 的检测,但其价格较贵,与免疫亲和柱同价,故其选择 CleanertPestiCarb-SPE 对真菌毒素进行优化,虽对 β -ZOL 净化有影响,但对 ZON、 α -ZOL 无影响,且价格便宜。林方芬等^[16]比较了 SPE 柱、HLB、免疫亲和柱和石墨吸附柱对 4 种黄曲霉的净化能力后,选择了石墨吸附柱作为净化方式,通过检测得 4 种 AF 类真菌毒素的回收率在 74.0% ~ 102.7% 之间。曹纪亮等^[33]通过检测发现赭曲霉毒素对中药污染较为严重,所以对赭曲霉建立了新的净化方法,取 AFFINIMIP SPE Ochratoxin A 柱,依次用 5 mL 乙腈和 5 mL 纯水活化,将供试液上柱后用 5 mL 乙腈-0.1M HCl (40/60, v/v) 淋洗柱子,最后用 2 mL 乙酸-甲醇 (2/98, v/v) 洗脱得赭曲霉毒素。Han Z 等^[9]考察了硅胶、硅酸镁载体、硅藻土 3 种吸附剂各自及混合对 DON、3-ADON、15-ADON、NIV 和 Fus X 的净化效果,发现 3 种混合对这 5 种真菌毒素的净化效果较好,选择用 3 种混合自制固相萃取柱作为其净化方式。Liu X 等^[10]比较了 MultiSep 211 Fum 柱和 Oasis HLB SPE 柱对 FB1、FB2、FB3 净化后的回收率,选择 MultiSep 211 Fum 柱为其净化方式。韩铮等^[6]用硅胶、氧化铝、硅藻土、佛罗里硅土等常用的正相净化填料研制了一种新型复合萃取柱,将其应用到不同种类的中药材基质(如种子果实类、花类、根茎类和叶全草类)中。王珂等^[38]比较了 QuEChERS 方法、C18 小柱净化法和多功能净化柱(Mycosep 226)对 7 种真菌毒素的净化,选择 Mycosep 226 作为最终净化方式,得到的回收率在 70% ~ 120% 之间。

1.2.2.2 QuEChERS 法 QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)法原理与高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)和固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)相似,都是

利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用,吸附杂质从而达到除杂净化的目的。主要用于真菌毒素、农残检测等痕量检测中。QuEChERS 方法回收率较高,精确度和准确度高,可分析的真菌范围广,分析速度快溶剂使用量少,污染小,价格低廉且不使用含氯化物溶剂,操作简便,且装置简单,但其去除杂质的效果较差,需要进一步优化。步骤可以简单归纳为:1)样品粉碎;2)单一溶剂乙腈提取分离;3)加入 $MgSO_4$ 等盐类除水;4)上清液进行 GC-MS、LC-MS 检测。Arroyo-Manzanares N 等^[12]将水飞蓟研磨,加入磷酸缓冲盐、5% 甲酸乙腈涡旋后分别加入 4 g 硫酸镁,1 g 氯化钠,1 g 柠檬酸三钠,0.5 g 柠檬酸二钠提取 AF 类、NIV、DON、FB1、FB2、OTA、T-2、HT-2、STE、CIT 和 ZEN 等真菌毒素。李春等^[35]先将何首乌粉末中加入水、1% 乙酸乙腈溶液涡旋后再加入 4 种固体试剂,超声,选用液质联用 MRM 检测到 AF 类 4 种,OT 类 2 种、FB 类 2 种、DON、HT-2、T-2 等 12 种真菌毒素。可见这种方法为提取与净化同时进行,节省时间。

2 小结

通过上述对提取方法的综述,发现大多数研究者提取真菌毒素选择 60% ~ 90% 的甲醇水或乙腈水,但由于 FB 极性较大,OTA 极性较小,有研究选择 50% 甲醇水或乙腈水提取 FB,乙酸乙酯提取 OTA。由于中药基质和真菌毒素本身结构的复杂性,为了提高真菌毒素的提取率,还可选择加入氯化钠等固体试剂、调节溶液酸碱性、加入吐温试剂助溶等不同的处理方法。当然,除了考虑如何选择提取溶剂外,提取方法对不同中药基质真菌毒素的提取也有影响,如 Zhao S 等^[45]将中药按其富含基质分类为脂肪油、挥发油、蛋白质和生物碱,并比较了超声、振荡、均质 3 种提取方法对不同基质中药的提取率,发现富含脂肪油的中药适合均质提取,富含挥发油和蛋白质的重要适合超声提取,富含生物碱的重要适合振荡提取。

中药真菌毒素的净化方法主要为免疫亲和柱法、固相萃取柱法及 QuEChERS 法,其中免疫亲和柱法特异性强,净化效果好,应用最为广泛,但其价格昂贵。故固相萃取柱和 QuEChERS 净化方法是目前研究者选择较多的方法,并且对这 2 种方法不断优化以使其对真菌的净化效果达到要求。除了以上 3 种净化方法外,基质固相分散、分子印迹固相萃取等净化方法已经应用到食品真菌毒素净化中^[5]但还未应用到中药材的净化中。因此,中药真菌毒

素的净化处理还需进一步分析研究,并且将食品真菌毒素中已有的前处理充分的引入到中药中来,并建设中药特有的处理方法。

3 讨论

我国传统中药在一定程度上受到了不同真菌毒素的污染,这些污染直接影响到人类健康。为了控制和监测真菌毒素的污染,真菌毒素前处理技术需要不断提高。中药基质的复杂性对真菌毒素的前处理影响很大,故针对不同基质中药真菌毒素提出不同的前处理方法极为重要。现已有研究表明^[6,20],不同的中药材基质对真菌毒素的干扰强度不同,其中花类中药的基质效应小,而根茎类的基质效应较大。但如今大部分文献中,大批的中药材使用同样的方法同时提取多种真菌毒素检测,而只有极少文献对中药按基质不同进行分类,并且按基质效应的不同选择合适的提取方法。已有研究中已经证明不同浓度的甲醇对花类、种子类、全草类等不同基质中药的提取效果不同^[45],发现不同基质的中药所需要的最佳提取溶剂浓度是不同的,且不同的提取方法也对不同基质的中药材的真菌毒素有一定影响。因此在以后的研究中,需对中药按不同基质分类进行不同方法的提取方法进行设计。同样,不同的净化方法对不同基质的中药真菌毒素净化效果也是不同的,如韩铮等^[6]运用自制净化柱对不同基质的中药真菌毒素净化,发现虽然净化柱对花类、种子果实类等都有净化效果,但都不及对根茎类的净化效果好。因此,在研究中还需对不同基质的中药选择不同的净化柱,以保证净化效果。

参考文献

- [1] Commission Regulation (EU) No 105/2010; Amending Regulation (EC) No 1881/2006 Setting maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs as Regards Ochratoxin A[S]. Commission.
- [2] 辽宁出入境检验检疫局网站. 关于韩国制订中药材中二氧化硫和黄曲霉毒素相关标准事宜的通知[EB/OL]. http://www.lnciq.gov.cn/ywpd/zwjy/ywbl/czjy/200804/t20080416_4539.htm, 2008-04-16/2010-04-01.
- [3] WM/T2-2004, 药用植物及制剂进出口绿色行业标准[S]. 中华人民共和国商务部, 2004, 2.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典附录 I[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 I: 402-404.
- [5] 傅勇, 曹纪亮, 杨小丽, 等. 真菌毒素检测的前处理技术及其应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1462-1466.
- [6] 韩铮. 中药材中常见真菌毒素分析方法学及代谢动力学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [7] Katerere D R, Stockenström S, Thembo K M, et al. A Preliminary Survey of Mycological and Fumonisin and Aflatoxin Contamination of African Traditional Herbal Medicines Sold in South Africa[J]. Human & Experimental Toxicology, 2008, 27(11): 793.
- [8] Zheng H, Zheng Y, Luan L, et al. An Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 And M2 in Traditional Chinese Medicines[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 664(664): 165-171.
- [9] Han Z, Liu X, Ren Y, et al. A Rapid Method with Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Five Type B Trichothecenes in Traditional Chinese Medicines[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(13): 1923-32.
- [10] Han Z, Ren Y, Liu X, et al. A Reliable Isotope Dilution Method for Simultaneous Determination of Fumonisin B1, B2 And B3 in Traditional Chinese Medicines by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(17-18): 2723-2733.
- [11] Zhang L, Dou X, Kong W, et al. Assessment of Critical Points and Development of A Practical Strategy to Extend the Applicable Scope of Immunoaffinity Column Cleanup for Aflatoxin Detection in Medicinal Herbs[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 12(1483): 56.
- [12] Arroyo-Manzanares N, García-Campaña A M, Gámiz-Gracia L. Multiclass Mycotoxin Analysis in Silybummarianum by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using A Procedure Based on Quenchers and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1282(5): 11.
- [13] 李鹏, 贺澎, 欧国静. 中药黄曲霉毒素检测方法的改良研究[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(6): 71-71.
- [14] 孔祥虹, 高军刚, 何强, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定植物提取物中的 4 种黄曲霉毒素[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 325-329.
- [15] Zheng R, Xu H, Wang W, et al. Simultaneous Determination of Aflatoxin B(1), B(2), G(1), G(2), Ochratoxin A, and Sterigmatocystin in Traditional Chinese Medicines by LC-MS-MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(13): 3031.
- [16] 林方芬, 郑志勇, 黄剑, 等. 中药饮片黄曲霉毒素 B1 含量的快速测定研究[J]. 江苏中医药, 2016, 48(12): 65-66, 69.
- [17] Zheng R S, Wang W L, Tan J, et al. An Investigation of Fungal Contamination on The Surface of Medicinal Herbs in China[J]. Chinese Medicine, 2017, 12(1): 2.
- [18] Ali N, Hashim N H, Saad B, et al. Evaluation of A Method to Determine the Natural Occurrence of Aflatoxins in Commercial Traditional Herbal Medicines from Malaysia and Indonesia[J]. Food & Chemical Toxicology, 2005, 43(12): 1763-1772.
- [19] 付成平, 欧阳华学, 刘瑜. 柱前衍生化高效液相色谱法测定中草药提取物中的黄曲霉毒素 B1[J]. 西南农业学报, 2009, 22(2): 522-524.
- [20] 陈重均. 超高效液相色谱串联质谱定量分析中药材及其制剂中真菌毒素方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [21] 李峻媛. 薏苡仁中常见真菌毒素的检测方法及不同储藏条件下真菌毒素含量变化的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

- [22] 胡一晨, 万丽, 范成杰, 等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生化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.
- [23] 赵连华. 陈皮中黄曲霉毒素的累积对其质量影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [24] 李梦华. 中药及其相关产品中多种真菌毒素同步检测研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [25] 胡一晨. 中药及其提取物中农药多残留同步分析方法及黄曲霉毒素净化方法的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [26] 朱迪, 谭丹, 向文英, 等. 免疫亲和柱-HPLC 柱后光化学衍生法测定中药饮片黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8): 843-847.
- [27] Kong W J, Li J Y, Qiu F, et al. Development of A Sensitive and Reliable High Performance Liquid Chromatography Method with Fluorescence Detection for High-Throughput Analysis of Multi-Class Mycotoxins in Coixseed[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 799(17): 68-76.
- [28] Yang L, Wang L N, Pan J Y, et al. Determination of Ochratoxin A in Traditional Chinese Medicinal Plants by HPLC-FLD[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2010, 27(7): 989-997.
- [29] 郝爱鱼, 赵丽元, 刘英慧, 等. HPLC 柱后光衍生荧光法测定中药饮片黄曲霉毒素残留量[J]. 药物分析杂志, 2012(12): 2203-2207.
- [30] Wei R, Qiu F, Kong W, et al. Co-Occurrence of Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, and Ochratoxin A In Glycyrrhizauralensis, Analyzed By HPLC-MS/MS[J]. *Food Control*, 2013, 32(1): 216-221.
- [31] 曹纪亮. 中药鸦胆子 and 生姜中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 的检测研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [32] Yang Ying, Wen Jing, Kong Weijun, et al. Simultaneous Determination of Four Aflatoxins and Ochratoxin A in Ginger after Inoculation with Fungi by Ultra-Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(12): 4160-4167.
- [33] 韦日伟, 杨小丽, 仇峰, 等. 免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-HPLC-FLD 同时测定甘草中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和赭曲霉毒素 A 的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2342-2346.
- [34] Wen J, Kong W, Wang J, et al. Simultaneous Determination of Four Aflatoxins and Ochratoxin A In Ginger and Related Products by HPLC with Fluorescence Detection after Immunoaffinity Column Clean-Up and Postcolumn Photochemical Derivatization[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(23): 3709-16.
- [35] 李春, 苏晓, 冯伟红, 等. 基于 UPLC-ESI-MS/MS 的何首乌中 12 种真菌毒素污染检测[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4368-4374.
- [36] 王少敏, 许勇, 毛丹, 等. HPLC-MS/MS 法测定中药桃仁中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 907-911.
- [37] 魏俊德, 邱海蕴, 慎洁. 高效液相色谱-串联质谱法测定白苏子中黄曲霉毒素[C]//国际数字医学会数字中医药分会成立大会暨首届数字中医药学术交流会议论文集. 2016, 131.
- [38] 郑荣, 王少敏, 简龙海, 等. 薏苡仁中 7 种真菌毒素的液相色谱-串联质谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 318-320.
- [39] 郑荣, 毛丹, 王柯, 等. HPLC 法测定中药中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 610-613.
- [40] 郑荣, 毛丹, 王柯, 等. 柱后衍生-高效液相色谱法测定酸枣仁中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(1): 36-37.
- [41] 杨文武, 熊凌云, 王瑞芳, 等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法测定 34 批中药材中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(1): 43-47.
- [42] 刘书宇, 仇峰, 杨美华. 免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生 HPLC-FLD 检测莲子中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 及其液质确证[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 305-309.
- [43] 赵淑锐, 徐艳霞, 徐菲, 等. 检测中草药提取物中黄曲霉毒素的高灵敏方法[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(3): 379-383.
- [44] Yue Y T, Zhang X F, Pan J Y, et al. Determination of Deoxynivalenol in Medicinal Herbs and Related Products by GC-ECD and Confirmation by GC-MS[J]. *Chromatographia*, 2010, 71(5): 533-538.
- [45] Zhao S P, Zhang D, Tan L H, et al. Analysis of Aflatoxins in Traditional Chinese Medicines: Classification of Analytical Method on The Basis of Matrix Variations[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30822.
- [46] 李鹏, 贺澎, 欧国静. 中药黄曲霉毒素检测方法学的改良研究[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(6): 71-71.
- [47] 李峻媛. 薏苡仁中常见真菌毒素的检测方法及不同储藏条件下真菌毒素含量变化的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

(2017-08-17 收稿 责任编辑: 杨阳)