

动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的定量风险评估探索^{*}

左甜甜¹, 刘丽娜¹, 孙磊¹, 张磊², 李静¹, 金红宇^{1**}, 马双成^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022)

摘要 目的: 通过对动物药黄曲霉毒素 B₁ 的定量风险评估, 为完善动物药中黄曲霉毒素的限量标准, 保证动物药的用药安全, 提供参考依据。方法: 根据风险评估的 4 个基本步骤, 通过考察动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的日暴露量以及超额风险, 实现动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的定量风险评估。结果: 在土鳖虫、蜂房、九香虫、水蛭中分别检出黄曲霉毒素 B₁。其中土鳖虫、九香虫、蜂房的最大检出值分别为 28.81、336.69 和 602.35 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别超出限量标准数倍、数十倍和百倍。风险评估的结果表明, 动物药的日暴露量为 0.010~4.323 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。蜂房的超额风险为每年 1.297 例癌症病例每 100 万人, 风险应予以关注。其他动物药的超额风险均小于 1, 风险可控。结论: 本文尝试对动物药中黄曲霉毒素 B₁ 进行定量风险评估, 为中药材及制剂中黄曲霉毒素的风险评估打开新的思路。建议进一步完善动物药中黄曲霉毒素等真菌毒素的风险评估技术手段, 为动物药的科学监管以及黄曲霉毒素标准的制修订提供技术支持。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 动物药; 土鳖虫; 蜂房; 九香虫; 水蛭; 风险评估; 致癌作用强度; 暴露量; 超额风险

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)07-1267-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.07.14

Quantitative risk assessment of aflatoxin B₁ in traditional animal medicines^{*}

ZUO Tian-tian¹, LIU Li-na¹, SUN Lei¹, ZHANG Lei², LI Jing¹,
JIN Hong-yu^{1**}, MA Shuang-cheng^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract **Objective:** To improve the standards of aflatoxins and ensure the safe use of traditional animal medicines, quantitative risk assessment of aflatoxin B₁ in traditional animal medicines was performed, so as to provide the reference evidence. **Methods:** According to the 4 basic steps of risk assessment, the quantitative risk assessment of aflatoxin B₁ in traditional animal medicine was realized by calculating the daily exposure and population

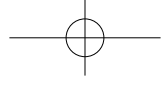
^{*} 国家十二五“重大新药创制”课题“中药质量安全检测和风险控制技术平台”(2014ZX09304307-002)

^{**} 通信作者 金红宇 Tel:(010)67095994; E-mail: jhyu@nifdc.org.cn

马双成 Tel:(010)67095272; E-mail: masc@nifdc.org.cn

第一作者 左甜甜 Tel:(010)67095994; E-mail: zuotiantian2011@163.com

刘丽娜 Tel:(010)67095424; E-mail: klln@163.com



risk of aflatoxin B₁ in traditional animal medicines. **Results:** Aflatoxin B₁ was detected in Eupolyphaga Steleophaga, Vespa Nidus, Aspongopus, and Hirudo with maximum detection values of 28.81, 336.69 and 602.35 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively, which exceeded the limit by several times, dozens of times and one hundred times, respectively. The results of risk assessment showed that the daily exposure of traditional animal medicines ranged from 0.010 to 4.323 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$. The population risk of Vespa Nidus was 1.297 cases of cancer per year per 1 million people, the risk of which worth concerning. The population risk of other traditional animal medicines was less than 1, which was controllable. **Conclusion:** This paper accomplished the quantitative risk assessment of aflatoxin B₁ in traditional animal medicines for the first time, and provided a new idea for the risk assessment of aflatoxin in traditional Chinese medicinal materials and preparations. It is suggested to further improve the risk assessment technique of mycotoxins in traditional animal medicines, to provide technical support for the scientific supervision and the revision of limit for aflatoxins in traditional animal medicines.

Keywords: aflatoxin B₁; traditional animal medicines; Eupolyphaga Steleophaga; Vespa Nidus; Aspongopus; Hirudo; risk assessment; average potency; exposure; population risk

黄曲霉毒素是一组化学结构相似的二氢呋喃香豆素类的衍生物,主要由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉代谢产生^[1]。自然界中至少存在 14 种不同类型的黄曲霉毒素,最为常见的包括黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁,其中以黄曲霉毒素 B₁ 分布最广,毒性和致癌性最强^[2]。黄曲霉毒素 B₁ 对人体有明显的致癌性和致畸性,可引起急慢性中毒甚至死亡。1993 年黄曲霉毒素 B₁ 被国际癌症研究会 (IARC) 划定为 1 类的致癌物^[3]。世界卫生组织 (WHO)、联合国粮食及农业组织 (FAO) 等国际组织对食品、农产品中的黄曲霉毒素 B₁ 均执行严格的监管。黄曲霉毒素 B₁ 污染面广,严重威胁人体健康,食品和农产品中黄曲霉毒素污染以及风险评估的研究在全球范围内受到广泛关注,其科学评估数据在风险管理中的应用也受到越来越多的重视^[4-7]。

动物类中药材是指动物的整体或者部分、动物体的生理或病理产物、动物体的加工品等供药用的一类中药,具有来源广,活性强,疗效高等特点,具有很大的药用价值^[8]。动物药在我国有着悠久的历史,从功效来看,动物药的作用多为破血逐瘀、祛风止痒、搜风通络、壮阳益肾等^[9]。动物药是中药体系的重要组成部分,具有不可替代性。中药在采收、储藏、制备、运输等过程中若处理不当易受潮霉变,有被黄曲霉毒素污染的可能。在前期的样品普查中发现动物药中黄曲霉毒素污染水平远高于其他中药平均水平,因此对于动物药中黄曲霉毒素的污染应予以高度关注,开展动物药中黄曲霉毒素的风险评估势在必

行^[10]。本研究以近年来动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的测定数据为基础,按照风险评估的基本步骤,尝试对于动物药中黄曲霉毒素 B₁ 做出定量风险评估,筛选出高风险品种,为中药材及制剂中黄曲霉毒素的风险评估提供新的思路,为动物药的科学监管以及黄曲霉毒素限量检查项的设置提供依据。

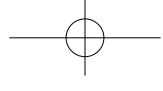
1 材料与方法

1.1 样品采集

样品分别来源于北京同仁堂中药饮片厂、北京同仁堂中药饮片厂、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检样品,由中国食品药品检定研究院康帅助理研究员鉴定。

1.2 样品测定

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,对收集到的 13 种 61 批动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的残留量进行测定^[10]。色谱条件:采用博纳艾杰尔 Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-乙腈-水为流动相,梯度洗脱 [0~17 min, 甲醇-乙腈-水 (10:25:65) → 甲醇-乙腈-水 (10:45:45); 17~20 min, 甲醇-乙腈-水 (10:45:45) → 甲醇-乙腈-水 (10:65:25); 20~22 min, 甲醇-乙腈-水 (10:65:25); 22~23 min, 甲醇-乙腈-水 (10:65:25) → 甲醇-乙腈-水 (10:25:65)], 流速 1.1 mL · min⁻¹, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 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 360 nm, 发射波长 450 nm, 进样量 50 μL 。并以随行质量控制 (包括随



行空白试验以及随行回收试验)来确认方法的适用性,结果均符合残留检测要求。

1.3 动物药中黄曲霉毒素的风险评估

我国在食品、农产品中黄曲霉毒素的风险评估方面尚在起步阶段,关于动物药中黄曲霉毒素的风险评估研究尚在探索阶段。本文尝试采用“点评估”的方法,对于动物药中黄曲霉毒素 B_1 进行定量风险评估。与其他危害因子风险评估程序一致,动物药中黄曲霉毒素 B_1 的风险评估包括危害识别、危害描述、暴露评估和风险描述 4 个步骤。

1.3.1 危害识别 黄曲霉毒素 B_1 主要通过形成环氧化物抑制细胞中的核酸、蛋白质等发挥作用,具有极强的毒性,其肝毒性约为氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍,三聚氰胺的 416 倍^[10]。流行病学研究表明,食物中的黄曲霉毒素 B_1 含量与肝细胞癌症发生呈正相关。国际癌症研究机构将黄曲霉毒素 B_1 定为 I 类致癌物,指出其对人体有明确的致癌性、致畸性、致突变性,可引起急性中毒,甚至死亡。

1.3.2 危害特征描述 由于黄曲霉毒素具有遗传毒性和致癌性,目前国际组织对黄曲霉毒素还没有建立每日耐受摄入量(TDI)、临时每日耐受摄入量(PTDI)、临时每周耐受摄入量(PTWI)等健康指导值。随着黄曲霉毒素毒理学和暴露评估研究的不断发展完善,黄曲霉毒素危害特征描述的方法从早期的简单定性逐步向半定量、定量评价的方向发展。1987 年,联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(JECFA)首次对黄曲霉毒素进行了风险评估,当时由于黄曲霉毒素毒理学研究数据不充分,仅采用定性的危害特征描述的方法,建议将黄曲霉毒素的暴露尽可能降低到实际可实现的水平,即采用 ALARA(as low as reasonable achievable)原则^[11]。自 JECFA 第 31 次会议后,黄曲霉毒素的膳食暴露与肝癌的流行病学的研究备受大量学者的关注^[12-14]。

1997 年,在 JECFA 第 49 次会议中,委员基于黄曲霉毒素动物毒理学试验和人类流行病学数据,应用不同数学模型外推,首次提出了黄曲霉毒素 B_1 的“致癌作用强度”这一概念,用于黄曲霉毒素的危害特征描述,其意义是每 $1 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的黄曲霉毒素 B_1 摄入量导致每年每 10 万人发生癌症的病例数^[15]。

根据 JECFA 的研究报告,当黄曲霉毒素日暴露量为 $1 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,对于乙肝表面抗原阴性者的危害

强度为每 10 万人中有 0.01 例癌症病例,对乙肝表面抗原阳性者为每 10 万人中有 0.3 例癌症病例^[15]。黄曲霉毒素 B_1 的致癌作用强度的计算公式为^[15]:

$$AP=0.3 \times P+0.01 \times (1-P) \quad (1)$$

公式(1)中,AP 为黄曲霉毒素 B_1 的致癌作用强度; P 为乙肝病毒感染率,在第十四届国际病毒性肝炎和肝病大会新闻发布会上,根据北京大学医学部教授庄辉的介绍,目前中国约有 7% 的乙肝病毒携带者。经计算,中国黄曲霉毒素 B_1 的致癌作用强度为 0.03。

1.3.3 暴露评估 暴露评估的目的是确定特定暴露情形下风险因子的暴露量,从而为风险评估提供可靠的暴露数据。黄曲霉毒素 B_1 日暴露量的计算公式为:

$$EXP=LP \times HR \times f/bw \quad (2)$$

公式(2)中,EXP 为黄曲霉毒素 B_1 日暴露量($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$);LP 为药材日消费量($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$),可参照《中华人民共和国药典》规定的最大摄入量($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$);HR 为检出动物药中黄曲霉毒素 B_1 测定均值($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$); f 为消费频率校正;根据国家食品安全风险评估中心提供的我国居民中药材消费量调查数据,中药材服用天数的 P_{95} 值为 90 d,即年服用频率为 0.247;bw 为人体体质量,一般为 60 kg。

1.3.4 风险描述 因黄曲霉毒素 B_1 具有致癌性,对其进行的风险描述不能采用重金属及有害元素、农药残留等有害物质风险描述中常用的健康指导值与实际暴露量比较得到风险商的方法。对于黄曲霉毒素 B_1 的风险描述,采用 JECFA 提出的“超额风险”的方法^[15]。超额风险为黄曲霉毒素暴露可能增加的肝癌病例数,美国环保署(USEPA)选用的可接受的水平是百万分之一(10^{-6}),即认为在每 100 万人中增加 1 例癌症病例,风险可接受^[16]。

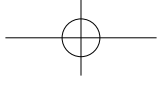
黄曲霉毒素 B_1 超额风险的计算公式^[15]:

$$PR=EXP \times AP \quad (3)$$

公式(3)中,PR 为黄曲霉毒素 B_1 的超额风险;EXP 为公式(2)计算得到的黄曲霉毒素 B_1 的日暴露量;AP 为公式(1)计算得到的黄曲霉毒素 B_1 的致癌作用强度。

2 结果与分析

对收集的动物药中的黄曲霉毒素 B_1 进行了测定(表 1)。其中,蕲蛇和僵蚕由于较难收集,分别收集到 2 批和 3 批样品,其他品种均收集到 4 批以上,可以从一定程度上反映该品种被黄曲霉毒素 B_1 污染



的状况。对未检出值按检测下限进行统计,本试验黄曲霉毒素 B₁ 的检测下限为 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。《中华人民共和国药典》2015 年版在柏子仁等 14 味药材及其饮片项下,设置了黄曲霉毒素的限量标准(其中地龙、蜈蚣、水蛭、全蝎为动物药),规定每 1 000 g 药材含黄曲霉毒素 B₁ 不得过 5 μg ^[17]。从测定结果可见,土鳖

虫、蜂房、九香虫、水蛭分别检出黄曲霉毒素 B₁ 4 批、6 批、1 批、1 批,其中土鳖虫的最大检出值为 28.81 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,超出限量(5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)数倍,九香虫的最大检出值为 336.69 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,超出限量(5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)数十倍,而蜂房的最大检出值高达 602.35 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,超出限量(5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)百倍。

表 1 动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的暴露量以及风险情况

Tab. 1 Exposure and risk of aflatoxin B₁ in traditional animal medicines

品种 (type)	批数 (batch number)	检测均值 (average determination result)/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	日最大 服用剂量 (maximum daily intake)/g	日暴露量 (daily exposure)/ ($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均超额风险 (average excessive risk)
僵蚕 (Bombyx Batryticatus)	3	0.5	10	0.021	0.006
土鳖虫 (Eupolyphaga Steleophaga)	11	4.21	9	0.156	0.047
蝉蜕 (Cicadae Periostracum)	4	0.5	6	0.012	0.004
地龙 (Pheretima)	4	0.5	10	0.021	0.006
蜂房 (Vespae Nidus)	10	105.02	10	4.323	1.297
蛤蚧 (Gecko)	4	0.5	6	0.012	0.004
海马 (Hippocampus)	4	0.5	9	0.019	0.006
九香虫 (Aspongopus)	4	84.67	9	3.137	0.941
乌梢蛇 (Zaocys)	4	0.5	12	0.025	0.007
蕲蛇 (Agkistrodon)	2	0.5	9	0.019	0.006
全蝎 (Scorpio)	4	0.5	6	0.012	0.004
水蛭 (Hirudo)	4	1.16	3	0.014	0.004
蜈蚣 (Scolopendra)	4	0.5	5	0.010	0.003

按照“1.3”中风险评估的 4 个基本步骤,对动物药样品中的黄曲霉毒素 B₁ 进行风险评估,分别计算了黄曲霉毒素 B₁ 的平均日暴露量和平均超额风险(表 1)。动物药的日暴露量为 0.010~4.323 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。蜂房的平均超额风险为每年 1.297 例癌症病例每 100 万人,即每年每百万人中可增加多于 1 人的癌症病例,风险应予以关注。而其他动物药的年平均超额风险小于 1,说明大多数动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的风险可控。

3 结语

本文尝试对动物药中黄曲霉毒素 B₁ 做出定量风险评估,为中药材及制剂中强致癌性物质黄曲霉毒素的定量风险评估打开新思路。研究表明,部分品种动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的残留量较高,甚至严重超标。

风险评估的结果表明,除了蜂房的致肝癌风险应予以关注外,大多数动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的风险可控。建议加强动物药中黄曲霉毒素的污染基础数据库建设,摸清中国动物药中黄曲霉毒素的污染类型和污染程度。对于高风险品种蜂房,继续积累其黄曲霉毒素的数据,进一步完善动物药中黄曲霉毒素等真菌毒素的风险评估技术手段,探索建立既符合国际通行规则又兼顾本国国情且适用于中药使用特点的风险评估模型,为动物药的科学监管、黄曲霉毒素标准的制修订和编制风险评估技术指导原则提供技术支撑。同时尽快组织开展中药材贮藏规范化研究,防止黄曲霉毒素的污染;并加强黄曲霉毒素脱除技术的研究,从根本上解决其污染问题。

参考文献

- [1] 张牧臣, 郑楠, 王加启. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 污染研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 312
ZHANG MC, ZHENG N, WANG JQ. Aflatoxin B₁ contamination in foods: a review[J]. Food Sci, 2018, 39(7): 312
- [2] PROBST C, NJAPAU H, COTTY PJ. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(8): 2762
- [3] VERHEECKE C, LIBOZ T, MATHIEU F. Microbial degradation of aflatoxin B₁: current status and future advances[J]. Int J Food Microbiol, 2016, 237: 1
- [4] LEWIS L, ONSONGO M, NJAPAU H, *et al.* Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(12): 1763
- [5] DING XX, WU LX, LI PW, *et al.* Risk assessment on dietary exposure to aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts in the Yangtze River ecological region[J]. Toxins (Basel), 2015, 7(10): 4157
- [6] DING XX, LI PP, BAI YZ, *et al.* Aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts and dietary risk in China[J]. Food Control, 2012, 23: 143
- [7] SHEPHARD GS. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008, 25(10): 1246
- [8] 吴桐, 赵月, 刘苗苗, 等. 动物药抗肿瘤药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(18): 81
WU T, ZHAO Y, LIU MM, *et al.* Research in antitumor pharmacological activity of animal medicines[J]. Asia Pac Tradit Med, 2017, 13(18): 81
- [9] 黄招明. 浅谈动物药的应用[J]. 光明中医, 2003, 21(1): 27
HUANG ZM. Discussion on the application of animal medicines[J]. Guangming J Chin Med, 2003, 21(1): 27
- [10] 刘丽娜, 李耀磊, 金红宇, 等. 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[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1220
LIU LN, LI YL, JIN HY, *et al.* Determination of aflatoxins in animal medicines by immunoaffinity column and HPLC-FLD with photochemical derivatization fluorescence detection[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(6): 1220
- [11] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants[J]. WHO Tech Rep Ser, 1987(759): 359
- [12] European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products[J]. EFSA J, 2007, 446: 1
- [13] KONISHI YS, SATO T, SAITO S, *et al.* Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B₁[J]. Food Addit Contam, 2010, 27(3): 365
- [14] BRERA C, CAPUTI R, MIRAGLIA M, *et al.* Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera[J]. Microchem J, 2002, 73: 167
- [15] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants[J]. WHO Tech Rep Ser, 1999(884): 45
- [16] 赵丹宇, 张志强, 李晓辉, 等. 危险性分析原则及其在食品标准中的应用[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001: 1
ZHAO DY, ZHANG ZQ, LI XH, *et al.* General Principle and Application of Risk Analysis on Food Safety[M]. Beijing: Chinese Standards Press, 2001: 1
- [17] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 123
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 123

(本文于 2018 年 7 月 10 日收到)