

## 养殖环境对水蛭药材中铜含量的影响

王文祎\*, 杨瑶珺#, 李 梦, 吕晓娜(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R282.3;S865.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4890-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.44

**摘要** 目的:探究铜(Cu)在水蛭药材体内富集的趋势及其养殖环境的影响。方法:设立含Cu低、中、高(30.00、60.00、90.00 μg/g)含量的土壤养殖组和清水养殖对照组,对水蛭科动物蚂蟥进行60 d的模拟养殖。每15天取样1次,采用电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)法测定养殖期内水蛭药材及土壤内的Cu含量并进行比较。结果:在前15 d,4组水蛭药材体内的Cu含量与初期比较均有较大幅度的增加;随后的15 d中除了高含量组含量基本保持不变外,其余3组含量均有下降趋势;而后在第30~45 d内,4组含量继续快速上升,其中低、高含量组含量达到本次实验的峰值;在最后15 d,对照组和高含量组Cu含量继续上升,低、中含量组Cu含量有一定幅度的下降。对照组及低、中、高含量组水蛭药材的Cu含量与初期相比分别增加了292%、186%、293%、464%,后3组土壤中的Cu含量与初期比较分别增加了81.12%、35.98%和21.28%。结论:水蛭药材的Cu含量总体随着养殖时间的延长而增加,并与养殖土壤中的Cu含量呈正相关趋势。建议养殖动物蚂蟥时通过控制其生长环境而控制其体内Cu含量,以符合水蛭药材中重金属元素的质量标准。

**关键词** 水蛭;蚂蟥;铜;重金属;养殖环境

### Study on the Content of Copper in Hirudinidae Medicinal Material Influenced by Culture Environment

WANG Wen-yi, YANG Yao-jun, LI Meng, LYU Xiao-na (College of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore the trend of cooper enrichment in hirudinidae influenced by culture environment. METHODS: The soil containing low-content, medium-content and high-content of cooper groups (30.00, 60.00, 90.00 μg/g) and water culture control group were set up. Hirudinidae leech were culture for 60 d, and sampled every 15 days. ICP-MS techniques was used to determined and compared the contents of cooper in *W. pigra* and soil. RESULTS: In first 15 days, the contents of cooper in leech from 4 groups increased greatly, compared with before; in the following 15 days, the content of cooper kept stable in high-content group while decreased in other 3 groups; in the 30-45 day, the contents of cooper increased rapidly in 4 groups, and those of low-content group and high-content group reached the peak in this experiment; in the last 15 days, the contents of cooper in control group and high-content group increased continuously, while those of low-content and medium-content groups decreased to some extent. Compared with before, the contents of cooper in leech from control group, low-content, medium-content and high-content groups increased by 292%, 186%, 293%, 464% respectively; those of soil from latter 3 groups increased by 81.12%, 35.98% and 21.28% respectively. CONCLUSIONS: The content of cooper in leech increase with time, and is positively correlated with the content of cooper in soil. It is suggested to control the content of cooper in hirudinidae through controlling culture environment when hirudinidae are cultured as medicinal material, in order to meet the quality standard of heavy metal in medicinal material.

**KEYWORDS** Hirudinidae; Leech; Copper; Heavy metal; Culture environment

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Witman、水蛭 *Hirudo nipponica* whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体,是一味传统药材,目前市场上以蚂蟥(宽体金钱蛭)用量最大。近年来水蛭在临床多用于脑血栓、冠心病的治疗<sup>[1-3]</sup>。另据报道,水蛭亦可用于痛风、小儿呼吸系统疾病、慢性肾脏病等的治疗<sup>[4-6]</sup>。蚂蟥在全国均产,但随着水蛭药材功效的不断被开发,以此为原料的中成药及保健品日渐增

加<sup>[7]</sup>,临床用量不断增大<sup>[8]</sup>,动物蚂蟥的野生资源日益枯竭。目前各产地人工养殖工作已普遍开展,但相关养殖技术尚未完全成熟,在蚂蟥生长的过程中仍会受到重金属的污染,而中药材中重金属元素含量超标也成为影响中药质量安全、制约中药材出口的重要因素。

动物蚂蟥活体生长周期较长、生活环境复杂,易受有毒有害重金属元素铜(Cu)的影响。本实验通过模拟不同环境对水蛭科动物蚂蟥进行养殖,动态监测,定期采样,采用电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)法测定样品中Cu含量,以探究Cu含量与水蛭科动物日常生长的关系。

### 1 材料

\* 硕士研究生。研究方向:中药品种及质量鉴定。E-mail:wangwenyi9068@163.com

# 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药品种及质量鉴定。E-mail:yangyaojunbucmtcm@163.com

## 1.1 仪器与设备

7700x型ICP-MS仪(美国Agilent公司);CP2250D型电子天平(德国Sartorius公司, $d=0.001\text{ mg}$ );Ultra WAVE型微波消解系统(意大利Milestone公司);DFT-100型手提式高速中药粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司);100 W型防爆加热棒、20 W型制氧泵(广东西龙水族产品有限公司)。

## 1.2 药材

笔者于2014年10月20日在山东微山湖水蛭养殖基地采集日龄30 d蚂蟥(经本学院杨瑶珺教授鉴定为真品)青年苗400条,体质量为2~4 g。

## 1.3 标准品与试剂

Cu单元素标准物(国家有色金属及电子材料分析测试中心,编号:GSB04-1725-2004,质量浓度:1 000  $\mu\text{g/ml}$ ); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (美国Sigma公司,批号:1001742990)。

## 2 方法与结果

### 2.1 组别设置

实验在4个水族玻璃箱(水族箱)中进行,每箱投放蚂蟥80条,其中设清水养殖对照组1箱、土壤养殖组(Cu污染)3箱。以无公害水产品产地环境要求(GB18407.4-2001)<sup>[9]</sup>土壤项Cu含量上限(30.00  $\mu\text{g/g}$ )为标准,根据土壤内Cu含量的不同分别为低、中、高含量组(30.00、60.00、90.00  $\mu\text{g/g}$ )。由于现实养殖环境中不存在不含有Cu的土壤,且本实验用土在造模前也含有Cu元素,为保证实验实际意义和准确性,本实验不设置土壤空白组,而以清水养殖组作为对照。

### 2.2 土壤Cu污染造模方法

精密称量 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3份,分别为0.04、0.20、0.40 g,加水溶解,将所得溶液分别与土壤混合,剧烈搅拌均匀,室温下平衡24 h后,在105  $^{\circ}\text{C}$ 下干燥,均匀铺在水族箱底部,厚度为2 cm。

造模后经ICP-MS法检测土壤Cu低、中、高含量(36.38、55.78、88.63  $\mu\text{g/g}$ )组,符合本实验对组别范围的要求。

### 2.3 蚂蟥养殖日常管理

本实验养殖周期60 d;实验用水为自来水,定期更换部分养殖用水;清水养殖组水位高15 cm,其余3箱水位高17 cm。养殖温度控制在21~23  $^{\circ}\text{C}$ ,电子温控器实时监控;定时定量投喂圆田螺,每天定时充氧2 h,定期清理饵料残渣。每日记录并清除死亡蚂蟥。

### 2.4 实验样品采集

实验共采集样品4次。每15天每箱采集蚂蟥8~10条,置于烘箱50  $^{\circ}\text{C}$ 低温烘干,粉碎过3号筛,采用ICP-MS法测定每批样品粉末的Cu含量;同时测定基质土壤中Cu含量。

### 2.5 ICP-MS法测定样品中Cu含量

2.5.1 样品前处理 本实验采用微波消解法对样品进行前处理。

2.5.2 标准溶液制备 吸取Cu单元素标准物,用1%  $\text{HNO}_3$ 溶液稀释定容,制备成0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0  $\text{ng/ml}$ 的标准溶液。

2.5.3 方法检测限及精密度试验 在ICP-MS仪器选定的工作参数下对Cu标准溶液进行测试,绘制相应的标准工作曲线。对样品空白测定11次,并以其测试结果的3倍标准偏差所对应的质量浓度为检测限。本次实验Cu(63)的检测限为

0.035  $\text{ng/ml}$ 。

仪器的精密密度采用标准物质对照法进行测定。在本实验条件下选取猪肝成分分析标准物质GBW10051为标准对照品对仪器精密密度进行考察,参考标准值为(52  $\pm$  3)  $\mu\text{g/g}$ ,仪器测定值为53  $\mu\text{g/g}$ 。结果表明在标准值范围内,方法的测量数据准确、可靠<sup>[10]</sup>。

2.5.4 Cu含量测定方法 药材用粉碎机粉碎,过3号药典筛。准确称取样品约0.5 g,加入 $\text{HNO}_3$  3.0 ml,微波消解(时间:5 min $\rightarrow$ 5 min $\rightarrow$ 20 min);温度:室温 $\sim$ 150  $^{\circ}\text{C}$  $\rightarrow$ 150 $\sim$ 190  $^{\circ}\text{C}$  $\rightarrow$ 190 $\sim$ 190  $^{\circ}\text{C}$ ;功率:1 200 W,预加压:40 bar;石英消解管消解,消解试剂为 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (1:2),以纯水定容至15 ml。消化液稀释5倍,上机测定。雾化气流量:1.0 L/min,辅助气流量:0.80 L/min,等离子体气流量:15.0 L/min;积分时间:300 s;扫描方式:单点跳峰。同步制备空白溶液。

### 2.6 水蛭药材中Cu含量检测结果

各组养殖60 d内水蛭药材中Cu含量及养殖前后土壤中Cu含量检测结果详见表1[注:Cu残留标准以农产品安全质量-无公害水产品安全要求(GB18406.4-2001)<sup>[11]</sup>作为参考依据]。

表1 各样本Cu含量检测结果( $\mu\text{g/g}$ )

Tab 1 The content of cooper in samples( $\mu\text{g/g}$ )

项目	组别			
	低含量	中含量	高含量	对照
初始含量	30.25	30.25	30.25	30.25
15 d	77.15	80.67	82.53	87.65
30 d	68.53	69.34	83.12	59.63
45 d	101.89	154.76	125.81	114.01
60 d	86.56	118.94	170.73	118.61
养殖前土壤Cu含量	36.38	53.78	88.63	
养殖后土壤Cu含量	65.89	75.85	107.69	
GB18406.4-2001标准值,mg/kg	50			

从表1可知,在养殖初期的前15 d,4组水蛭药材中的Cu含量均有较大幅度的升高;随后的15 d中,除了高含量组含量基本保持不变外,其余3组含量均有下降趋势;而后在30~45 d采样周期内,含量继续快速上升,其中低、高含量组含量达到本次实验的峰值;在最后一个采样周期,对照组和高含量组Cu含量继续上升,低、中含量组Cu含量有一定幅度的下降。从实验数据综合分析表明,随着蚂蟥生长时间的延长,Cu含量总体呈上升趋势。同一批用于养殖实验的蚂蟥青年苗,初始Cu含量均为30.25  $\mu\text{g/g}$ ;通过60 d的养殖,对照组(清水养殖)水蛭药材中在实验末期比初期Cu含量增加了292%;低、中、高含量组分别增加了186%、293%、464%,至于每组上升过程中的不同变化,可能与蚂蟥不同的生长环境有关。

采用SPSS 20.0软件对检测结果进行分析。单因素方差分析结果见表2。

表2 单因素方差分析结果

Tab 2 Analysis of variance of single factor

项目	平方和	自由度	均方	F	P
组间	1 834.525	3	611.508	0.341	0.796
组内	28 683.372	16	1 792.711		
总计	30 517.897	19			

数据经单因素方差分析, $F$ 为0.341 $<$ 8.71, $P$ 为0.796,数据差异不具有统计意义。表1、表2结果表明,水蛭药材中Cu

含量均与时间有关,3组不同Cu含量土壤养殖组和对清水养殖组结果趋于一致,表明4组模拟养殖水蛭药材中Cu累积趋势与时间的关系大致相同。

### 3 讨论

#### 3.1 水蛭药材中Cu的主要来源

影响动物蚂蟥生长中Cu在体内富集的因素有很多,通过本次实验结果可得出Cu的来源主要为蚂蟥的食物和生活环境中的土壤。

蚂蟥是杂食性动物,以吸食动物的体液为主要生活方式,常以水中浮游生物、淡水螺贝类、蜗牛等软体动物作为饵料,而目前又以圆田螺为饵料最普遍,因此本实验中水蛭药材中Cu的主要来源之一或许为被Cu污染的田螺。通过实验期间对水蛭进食过程的观察,笔者发现蚂蟥在进食过程中,只钻进活田螺身体内部吸取里面的汁液,无法对田螺经常活动暴露在外肉质较厚的部分进行摄食活动,所以对于蚂蟥吸食田螺的部分很难进行样品采集和Cu含量的精确测定。本实验设置的清水养殖组可排除土壤中Cu对蚂蟥体内残留的干扰,而通过清水养殖组的数据可看出养殖采样期间水蛭药材的Cu含量总体呈上升趋势,这可以说明蚂蟥的食物污染是影响水蛭药材Cu含量累积的主要因素之一。因此在今后的蚂蟥养殖过程中,应该加强对饵料质量的监督管理,尽量减少或避免因为饵料的污染导致蚂蟥体内Cu的大量富集。

本实验通过设置土壤中Cu含量不同的组别来评价土壤污染对水蛭药材中Cu含量的影响。从最终的实验结果发现,水蛭药材中的Cu含量的高低与土壤的污染程度相对应,低含量组Cu含量最低,高含量组Cu含量最高。这表明在蚂蟥生长环境中,土壤的质量也会直接影响水蛭药材中的Cu含量,是影响水蛭药材中Cu含量累积的又一重要因素。因此在对蚂蟥进行养殖之前,应充分了解调查养殖场地土壤质量,以减少生长环境对养殖动物的污染。

#### 3.2 养殖模式对水蛭药材中Cu含量的影响

目前动物蚂蟥养殖主要分为以土为基质养殖和直接清水养殖,故本实验通过设置清水养殖组和土壤养殖组对这两种主流养殖模式进行对比,而且土壤养殖组分别测定了养殖前和养殖后土壤内Cu的含量。

通过实验的最终结果可看出,低含量组的Cu含量最低,清水养殖组的Cu含量与中含量组相当,高含量组Cu含量最高。通过对不同阶段的土壤中Cu含量测定可看出,低、中、高含量组实验末期比实验初期土壤中的Cu含量分别提高了81.12%、35.98%和21.28%。而且通过对蚂蟥日常生活的观察,笔者发现在土壤养殖组里的蚂蟥平日活动多在泥土里进行,而在泥土表面和水中活动相对较少,可能在这种更接近蚂蟥适合生活的环境中,蚂蟥可以在平日的活动中通过土壤代谢出一些体内的Cu,而土壤中Cu含量的前后变化也能佐证这一点。因此在蚂蟥的养殖模式选择方面,以泥土为基质饲养或许对蚂蟥生长期间Cu含量的控制更有利。

#### 3.3 土壤Cu含量对水蛭药材Cu含量的影响

本实验设置了不同的养殖环境,其中低含量组土壤Cu含量略高于国家标准,中、高含量组Cu含量接近于标准的2、3倍。

通过实验的最终结果可看出,土壤含Cu量高的组别,水蛭

药材的Cu含量就越高,这可能与在蚂蟥日常活动中吸收土壤里的Cu元素,随着时间而富集有关。此外通过表1数据可知,中、低含量组Cu含量呈现升降交替、总体上升的趋势;而高含量组则呈现单向上行的趋势,这说明了在Cu污染较为严重的环境下,可能会干扰蚂蟥对体内Cu元素的代谢。而从上文提到的各组实验末期与实验初期土壤中的Cu含量变化也可看出,低含量组土壤Cu含量上升最多,实验末期较初期提升了81.12%;中含量组次之;高含量组变化幅度最小。此结果可能也说明了土壤中Cu的含量会影响动物蚂蟥在生长中对Cu的代谢速度。

因此通过以上分析,可以得到土壤中Cu含量的高低会从蚂蟥生活中的吸收和代谢两方面影响水蛭药材Cu含量的结论,在今后蚂蟥养殖的过程中,控制其生长环境很有必要。

#### 3.4 新版药典关于重金属元素含量的规定

据笔者了解,2015年版《中国药典》首次对水蛭药材中重金属元素含量进行了限量规定。这对于患者用药安全和中药规范使用有着积极的意义,但在这次修改的范围中并不包括对Cu元素的含量限定,而通过本次实验结果,并与相关国家标准数据对比可发现,在养殖15d的时候所有组别的Cu含量均已超标,而且蚂蟥的生长周期要长于本次实验天数,因此可能会出现Cu富集更多的问题,从而可能会威胁到患者的用药安全,故需要一个标准来控制这一指标。另外,通过模拟养殖实验结果可看出,造成蚂蟥中Cu累积的主要来源是日常投喂的饵料污染和土壤环境,这些因素在蚂蟥的养殖过程中是可以尽量避免的,因此建议药典对水蛭药材中Cu残留量的规定应该更加严格,以利于规范水蛭药材的养殖,提高患者用药安全性。

本实验通过在不同环境下对动物蚂蟥的模拟养殖,初步探究了Cu在水蛭药材体内富集的原因,而对于其他重金属元素在水蛭药材体内的富集因素同样值得进一步探究。本次实验的养殖周期为60d,15d为采样周期,虽然初步得到养殖时间与Cu含量的关系,但是在今后的实验中有必要延长养殖时间,深入探究养殖时间与Cu含量的关系,同时缩短采样周期,可以确定能控制Cu含量的养殖时间。随着研究的不断深入,ICP-MS分析技术也在不断改善,与其相关的联用技术也将得到广泛的重视和发展<sup>[12]</sup>,为以后进一步研究水蛭药材重金属污染的相关研究提供了新的方法。通过实验室内水族箱养殖可直观清楚地观察到蚂蟥的进食、活动、休息等日常活动,通过研究动物蚂蟥的生长习性来选择适合蚂蟥生长的条件,应该会给水蛭药材的安全评价、质量评价带来积极的影响。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:76-77.
- [2] 刘晓帆,杨瑶珺,吴丽洁,等.中药水蛭生药学与化学成分的研究进展与展望[J].环球中医药,2012,5(8):637.
- [3] 于海青.复方水蛭胶囊治疗冠心病心绞痛112例[J].光明中医,2012,27(11):2228.
- [4] 徐惟永,邓彰恂,苏承武,等.水蛭生物治疗痛风的效果观察[J].蛇志,2014,26(1):28.
- [5] 任耀全,周维维,石宗珂,等.水蛭在儿科的临床应用进展

# 危害分析和关键点控制在网上药店药品流通管理中的应用<sup>△</sup>

刘诗洋\*,王倩,郑秋莹,孔军辉<sup>#</sup>(北京中医药大学管理学院,北京 100029)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4893-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.45

**摘要** 目的:探讨促进网上药店药品流通管理的方法。方法:运用危害分析和关键点控制(HACCP)方法,识别网上药店药品流通管理中的关键控制点,探讨适合网上药店药品流通管理的有效方法。结果与结论:根据HACCP原则,可将货源质量、药品验收、存储养护和物流配送确定为网上药店药品流通管理中的4个关键环节。建议网上药店在药品流通质量管理中需要针对上述环节采取纠偏措施。首先,确定供货商合法资质,定期核查保证药品质量;其次,改进药品验收方法,提高药品抽检率;再次,落实“三三四”科学养护(即药品按30%、30%、40%的比例分为3个部分,逐月检查1个部分),完善存储养护方案;最后,建立独立配送体系,保障药品外观全过程检查。

**关键词** 危害分析和关键点控制;网上药店;药品流通管理

## Application of HACCP Methodology in Drug Circulation Management of Online Pharmacies

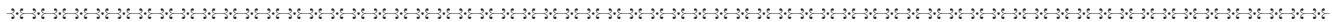
LIU Shi-yang, WANG Qian, ZHENG Qiu-ying, KONG Jun-hui (College of Management, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore the method for promoting drug circulation management of online pharmacies. METHODS: Hazard analysis and critical control point (HACCP) was applied to identify the critical control points (CCPs) and explore the effective method for drug circulation management of online pharmacies. RESULTS & CONCLUSIONS: According to the HACCP principle, four CCPs of drug circulation management of online pharmacies are supplier qualification, acceptance method, maintenance and storage scheme and distribution system. It is suggested to adopt correct measures of drug circulation quality management of online pharmacy. Firstly, the supplier's legal qualification should be determined and the quality of the drug should be regularly checked; secondly, drug retailers should improve the acceptance method of drugs and improve the sampling rate of drug; then, the "three three four" scientific conservation which required the medicine to be divided into three parts according to the proportion of 30%, 30%, 40% and checked monthly should be implemented to improve the storage and maintenance program; finally, the independent distribution system should be established to ensure the full process of the appearance inspection.

**KEYWORDS** HACCP; Online pharmacies; Drug circulation management

与传统的实体药店相比,网上药店在药品种类、价格、信息、配送等方面优势突出。正是因为看到这些线上服务的市场价值,越来越多的药品零售连锁企业开始进入电子商务领

域。截至2014年9月,我国获得网上药店交易资格证书的企业共有313家<sup>[1]</sup>。虽然近几年来网上药店的数量激增,但其网上平台的交易额在企业交易总额中所占份额却并未得到相应



[J].中医儿科杂志,2013,9(5):63.

[6] 刘盛娟,舒惠荃,张骁.水蛭治疗慢性肾脏病的应用[J].吉林中医药,2012,32(9):924.

[7] 郭巧生,刘飞,史红专.水蛭及其养殖基地农药与重金属残留分析[J].中国中药杂志,2006,31(21):1 763.

[8] 张涛,于翔,龚元,等.宽体金钱蛭室内繁殖的初步研究

[J].水产学杂志,2014,27(2):52.

[9] 国家质量监督检验检疫总局. GB18407.4-2001 农产品安全质量无公害水产品产地环境要求[S]. 2001-10-01.

[10] 徐慧,奚玮.电感耦合等离子体-质谱法测定玫瑰花中有害元素残留[J].中国药业,2013,22(14):70.

[11] 国家质量监督检验检疫总局. GB18406.4-2001 农产品安全质量无公害水产品安全要求[S]. 2001-08-06.

[12] 黄训瑞. ICP-MS法测定生脉注射液中5种重金属元素的含量[J].中国药房,2014,25(17):1 619.

△基金项目:北京高等学校青年英才计划项目(No.YETP0801)  
\*本科生。研究方向:公共卫生管理。E-mail:1214370711@qq.com

#通信作者:教授,博士生导师。研究方向:健康心理、组织行为与管理。E-mail:kjh007@sina.com

(收稿日期:2015-03-05 修回日期:2015-06-24)

(编辑:刘萍)