

间、提取溶剂及其用量，最终确定超声提取时间为 30 min，提取溶剂为 50% 甲醇，用量为 20 mL。

综上所述，本实验采用 HPLC 法同时测定情之怡片中没食子酸、葛根素、丹酚酸 B、丹参酮Ⅱ_A 含量，该方法专属性强，操作简便，结果可靠，对于控制情之怡片的类似处方制剂的质量有一定借鉴作用。

参考文献：

[1] 李国辉, 张庆文, 王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3156-3159.

[2] 赵 敏, 杜艳秋, 李长喻. 葛根素对急性酒精中毒大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 16(17): 2610-2615.

[3] 李 萍, 谢金鲜, 林启云, 等. 余甘子抗慢性肝损伤性肝纤维化的实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(6): 355-357.

[4] 尹明福, 吴文颀, 姜英子, 等. 丹参脂溶性提取物护肝作用的实验研究[J]. 延边大学医学学报, 2003, 26(4): 261-263.

[5] 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍, 等. 丹参酮Ⅱ_A 对小鼠肝损伤

的保护作用[J]. 中药材, 2001, 24(8): 588-589.

[6] 崔晓红, 奇海涛, 生 宁, 等. HPLC 法同时测定益肝康颗粒中没食子酸、丹参素、芍药苷、丹酚酸 B 和丹参酮Ⅱ_A 含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 432-436.

[7] 陆艳芹, 王 婧, 徐振秋, 等. HPLC 法同时测定清葛片中葛根素、没食子酸及姜黄素的含量[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(1): 230-233.

[8] 姜 晖, 王绍志, 张熙洁, 等. HPLC 法同时测定利脑心胶囊中 6 种成分的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 374-376.

[9] 李 妍, 杨燕云, 张振秋, 等. HPLC 法同时测定白芍、甘草药对提取物中 9 种有效成分[J]. 中成药, 2013, 35(1): 100-104.

[10] 陈晓鹏, 鄂秀辉, 夏忠庭, 等. HPLC 法同时定量测定养血清脑颗粒中 7 个主要成分[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1921-1924.

[11] 饶 毅, 魏惠珍, 崔金国, 等. HPLC 法同时测定心可舒制剂中葛根素和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1431-1433.

[12] 刘 冰, 徐永波, 王蓉华. HPLC 同时测定心可舒胶囊中葛根素、丹参酮Ⅱ_A 含量[J]. 中成药, 2006, 28(5): 669-671.

小儿化毒胶囊中雄黄药效和毒性成分的测定

王 曦, 夏 晶, 曹 帅, 李丽敏, 季 申*
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要：目的 测定小儿化毒胶囊（牛黄、珍珠、雄黄等）中雄黄药效（可溶性砷）和毒性成分（价态砷）的含有量。
方法 分别采用电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）法和 HPLC-ICP-MS 法，测定样品中可溶性砷和价态砷的含有量。
结果 6 种价态砷在样品中只检出了三价砷 As（Ⅲ）和五价砷 As（V），前者含有量更高。可溶性砷、As（Ⅲ）、As（V）的平均加样回收率分别为 106.2%（RSD = 8.3%）、108.0%（RSD = 6.8%）、89.8%（RSD = 5.1%），7 批样品中可溶性砷含有量为 0.31 ~ 0.90 mg/粒，价态砷含有量为 0.12 ~ 0.52 mg/粒。
结论 该方法准确、重复性好，可为控制小儿化毒胶囊中雄黄的疗效和安全性提供依据。
关键词：小儿化毒胶囊；雄黄；可溶性砷；价态砷；ICP-MS；HPLC-ICP-MS
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)05-0971-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.018

Determination of effective and toxic compositions of Realgar in Xiao’er Huadu Capsules

收稿日期：2017-02-16
基金项目：国家自然科学基金（81473347）；上海市科学技术委员会项目（15DZ0502700，14DZ2294000）；中药质量安全检测和风险控制技术平台项目（2014ZX09304307-002）
作者简介：王 曦（1960—），男，副研究员，硕士生导师，研究方向为天然药物质量控制和标准制订。E-mail: wangxi3000@126.com
*** 通信作者：**季 申（1963—），女，博士，主任药师，博士生导师，研究方向为天然药物质量控制和标准制订。Tel: (021) 50798195

WANG Xi, XIA Jing, CAO Shuai, LI Li-min, JI Shen*
(Shanghai Municipal Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS: Xiao'er Huadu Capsules; Realgar; soluble arsenic; valence arsenic; ICP-MS; HPLC-ICP-MS

小儿化毒胶囊由牛黄、珍珠、雄黄、大黄、黄连、甘草、天花粉、川贝母、赤芍、乳香(制)、没药(制)、冰片 12 味药组成,具有清热解毒,活血消肿的功效。处方中雄黄是常用矿物类中药,具有解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟等作用^[1],但含有大量砷元素,可能会对人体造成危害。雄黄主要成分为硫化砷(As_2S_3)和四硫化砷(As_4S_4)^[2],均难溶于水,在胃肠道难以分解,经服用后主要以原型排出体外,其发挥疗效的成分与服用后在体内可溶性砷有关,而其毒性主要与价态砷有关^[3-5]。因此,要正确评价雄黄疗效,就必须对可溶性砷含量进行测定;要控制雄黄安全性,就必须对价态砷进行控制。本实验建立了电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法测定小儿化毒胶囊中所含可溶性砷的含量,以及 HPLC-ICP-MS 法测定价态砷的含量,以期控制小儿化毒胶囊中雄黄的疗效和安全性提供依据。

1 仪器、试药与材料

1.1 仪器与试药 7700X 电感耦合等离子体质谱仪、1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);B9500S-DTH 超声波清洗机[300 W、45 kHz,必能信超声(上海)有限公司];Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。亚砷酸根溶液、砷酸根溶液、一甲基砷溶液、二甲基砷溶液、肿胆碱溶液、肿甜菜碱溶液标准物质均购自中国计量科学研究院;1 000 mg/L 砷标准溶液购自德国默克公司;内标溶液(含锂、锆、铟、铋各 100 mg/L)购自美国安捷伦公司。胃蛋白酶为生化试剂,酶活力 1:27 000,购自上海惠兴生化试剂有限公司;胰酶为生化试剂,酪蛋白转化力 25.0 以上,购自国药集团化学试剂有限公司。所用试剂均为优级纯;水均为去离子水(电阻率 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。针头微孔滤膜(10 μm)由上海恒安生物科技有限公司定制。

1.2 材料 小儿化毒胶囊是西安碑林药业股份有限公司的独家品种,本实验共收集了 7 批样品,编号样 1~样 7。其中,样 1 为市场上正式销售的样品,批号为 201301001;样 2~样 7 为实验室小样,标记为小样 1~6,其中 1~3 为 3 批不同雄黄投料,4~6 则为与雄黄药材批号对应的饮片投料。

2 方法与结果

2.1 可溶性砷含有量的研究

2.1.1 ICP-MS 工作条件 同轴雾化器;石英一体化炬管,中心通道 2.5 mm;石英双通道型雾化室;八级杆碰撞反应池;piltier 半导体控温于 2 $^{\circ}\text{C}$ 左右;镍采样锥和截取锥;以高纯液氩为工作气体和载气;以氦气为反应气;射频功率 1 550 W;采样深度 8 mm;等离子体气流量 15.0 L/min;载气流量 0.9 L/min;积分时间 1.0 s;数据采集重复 3 次。定量分析模式,并开启碰撞池。

2.1.2 对照品溶液制备 精密量取砷单元标准溶液适量,加水制成每 1 mL 含砷 100 μg 的溶液,作为对照品贮备液,取适量置于塑料量瓶中,加 5% 混合酸(硝酸:盐酸=4:1)溶液,制成每 1 mL 含砷 5、10、20、50、100、200 ng 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取样品内容物(过四号筛)0.3 g,置于 250 mL 塑料量瓶中,人工肠液定容,摇匀,密塞,称定质量,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中超声(300 W、45 kHz)2 h(每隔 15 min 充分摇匀 1 次),放冷,人工肠液补足减失的质量,摇匀,取适量至 50 mL 塑料离心管中,静置 20~24 h,洗耳球轻轻吹开上层表面溶液,吸取中层溶液约 15 mL(吸取时应避免带入颗粒),10 μm 微孔滤膜过滤,精密量取续滤液 5 mL,置于 10 mL 塑料量瓶中,0.02 mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL(其余溶液备用)置于顶空进样瓶中,加硝酸 2.0 mL、盐酸 0.5 mL,加盖密封(不可漏气),80~90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴水解 1 h,置于 50 mL 塑料量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。同法制备试剂空白溶液。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 重复性试验 取样 1 和样 5 各 150 mg,每批 6 份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,测得可溶性砷含量 RSD($n=6$)分别为 11.4% 和 6.2%,表明该方法重复性良好。

2.1.4.2 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样 1(可溶性砷 0.987 8 mg/g)0.2 g,精密加入砷对照品溶液(以砷计 2.151 g/L)40、80、

160 μL, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 测得平均加样回收率($n=9$)为106.2%, RSD为8.3%。再精密称取含有量已知的样5(可溶性砷2 973 mg/kg) 75 mg, 共9份, 加入砷标准溶液(以砷计1.000 g/L) 100、200、400 μL(各3份), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 测得平均加样回收率($n=9$)为95.6%, RSD为4.0%。

2.2 价态砷含有量测定 砷具有不同价态, 现国际公认有毒性的砷化合物一般为6种, 其中AsH₃有剧毒, 亚砷酸(AsⅢ)和砷酸(AsⅤ)的毒性大于一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA), 而肿甜菜碱(AsB)和肿胆碱(AsC)基本无毒^[6], 但两者均为无毒砷到有毒砷的中间体, 故也列入考察范围。由于可溶性砷具有药效与毒性两方面作用, 其价态砷的存在形式对本品毒性判定有着重要意义, 故需要对其进行价态研究。

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 ICP-MS的工作条件、参数设置等同“2.1.1”项。HPLC分析采用Hamilton PRP-X100色谱柱(250 mm×4.1 mm; 10 μm); 以0.025 mol/L磷酸二氢铵溶液(氨水调节pH值至8.0, A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱(0~15 min, 0~100% A; 15~20 min, 100% A~0; 20~30 min, 0~100% A); 体积流量1.0 mL/min。色谱图见图1, 可知6种价态砷的分离度均良好。

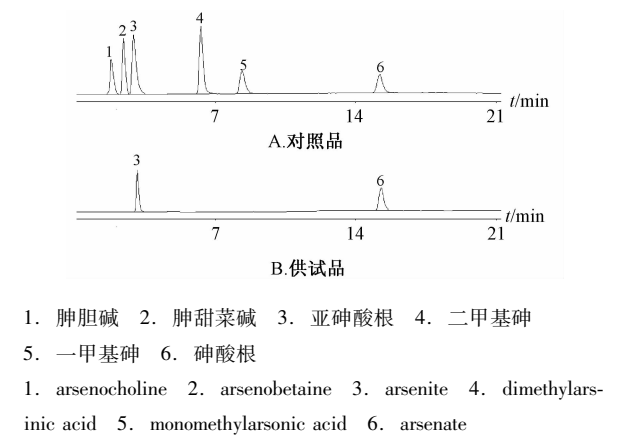


图1 6种价态砷HPLC-ICP-MS色谱图
Fig.1 HPLC-ICP-MS chromatograms of six valence arsenic

2.2.2 对照品溶液制备 精密吸取亚砷酸根、砷酸根、一甲基砷、二甲基砷、肿胆碱、肿甜菜碱标准物质溶液适量, 0.125 mol/L盐酸溶液制成每1 L各含5 mg(均以砷计)对照品的溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 同“2.1.3”项。

2.2.4 标准曲线溶液制备 精密吸取各对照品溶液适量, 用0.02 mol/L乙二胺四醋酸二钠溶液制成每1 L含砷10、20、50、100、500 μg的系列标准溶液。

2.2.5 方法学考察
2.2.5.1 线性关系考察 精密吸取已配制好的系列标准曲线溶液注入色谱仪, 色谱柱流出液体直接进入电感耦合等离子体质谱仪的雾化器, 选取同位素为⁷⁵As, 选择碰撞池反应模式, 并根据不同仪器的要求选用适宜校正方程, 对所测元素进行校正。以各标准曲线溶液测得不同形态的砷峰面积为纵坐标(Y), 相应质量浓度为横坐标(X)进行回归, 结果见表1, 表明各形态砷在各自范围内均呈良好的线性关系。

表1 6种价态砷线性关系			
Tab.1 Linear relationships of six valence arsenic			
名称	回归方程	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	相关 系数
肿胆碱	$Y=337.905\ 9X+0.307\ 8$	0.005 41~5.408 90	0.999 8
肿甜菜碱	$Y=530.469\ 1X+0.075\ 4$	0.005 23~5.226 00	1.000 0
亚砷酸根	$Y=616.988\ 5X+0.213\ 9$	0.006 39~6.391 28	1.000 0
二甲基砷	$Y=666.780\ 6X+0.395\ 9$	0.005 24~5.237 90	0.999 9
一甲基砷	$Y=677.357\ 1X+0.203\ 7$	0.002 68~2.680 70	1.000 0
砷酸根	$Y=788.238\ 3X+0.857\ 6$	0.001 78~1.781 80	0.999 9

2.2.5.2 重复性试验 取“2.1.4.1”项下溶液测定, 结果检测到2种价态砷, 即亚砷酸根As(Ⅲ)和砷酸根As(Ⅴ), 样1中两者含有量RSD($n=6$)分别为4.8%和3.4%, 样5中分别为9.4%和11.7%, 表明该方法重复性良好。

2.2.5.3 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样1[As(Ⅲ)0.510 mg/g、As(Ⅴ)0.244 mg/g]和样5[As(Ⅲ)1.022 mg/g、As(Ⅴ)0.714 mg/g]适量, 精密加入相应标准溶液, 按“2.2.5”项下方法制备供试品溶液, 测得样1中两者加样回收率($n=9$)分别为108.0%(RSD=6.8%)和89.8%(RSD=5.1%), 样5中分别为96.6%(RSD=5.0%)和105.3%(RSD=5.9%)。

2.3 样品含有量测定 结果见表2。

3 讨论

3.1 影响可溶性砷及其价态砷测定的因素
可溶性砷对于评价雄黄疗效有重要意义, 其准确测定是雄黄品质研究的重要部分, 而其中价态砷是正确评价雄黄安全性的指标。前期文献调研时发现, 雄黄及其制剂中的可溶性砷尚未有公认的准确测定方法, 主要存在以下问题: (1)文献报道的

表2 砷含有量测定结果

Tab. 2 Results of content determination of arsenic

编号	批号或 标记	含有量/(mg·粒 ⁻¹)			价态砷占可溶	
		可溶性砷	As(Ⅲ)	As(V)	价态砷	性砷比例/%
样1	201301001	0.31	0.134	0.076	0.21	67.7
样2	小样1	0.69	0.141	0.059	0.20	29.0
样3	小样2	0.64	0.072	0.048	0.12	18.8
样4	小样3	0.60	0.132	0.088	0.22	36.7
样5	小样4	0.90	0.307	0.214	0.52	57.8
样6	小样5	0.56	0.190	0.130	0.32	57.1
样7	小样6	0.65	0.189	0.141	0.33	50.8

方法基本相似，均采用人工胃液或人工肠液作为提取溶剂，但所得结果差异较大；（2）雄黄单味药与复方制剂中的可溶性砷含有量不匹配；（3）各文献报道的同品种可溶性砷含有量不完全一致^[7-12]。

经分析，雄黄经人工胃液或人工肠液提取后，其溶出的砷可与胃蛋白酶或胰酶、配味药物成分等形成大分子砷化合物，其存在形式的微小变化即会影响测定结果的准确性，其中提取溶媒、提取方法及净化方式为主要影响因素，也是研究中重点考察的部分。

3.2 提取溶剂选择 不同溶剂对可溶性砷的溶出有较大影响，根据人体实际体液情况模拟人体试验，对0.125、0.25 mol/L 硝酸溶液、人工胃液、人工肠液、1.5、0.25、0.062 5 mol/L 盐酸溶液进行考察，发现盐酸溶液提取效率高于硝酸溶液，但是不同浓度的差异较大，无明显规律，并均小于人工胃液和人工肠液。从模拟人体环境的角度而言，在与人体酸度相当的溶液中，人工肠液含有量最高，而且重复性较好，稳定性较强，最符合人体实际情况，故最终选择人工肠液作为提取溶剂。

3.3 溶液净化方式的选择

预实验发现，本品同一提取溶液采用不同净化方式（如滤过、离心、静置等）得到的结果不同，推测溶液中的砷可能以大分子形式存在，粒径较大，净化方式不恰当会造成大分子砷被除去。

雄黄本身的颗粒较细，水飞后则更细，故其经提取后溶液中大粒子沉降需要较长时间。本实验曾采用滤膜进行净化，但发现采用不同孔径（0.22~10 μm）含有量差异较大，而且不符合重复性要求。然后偶然间发现，当溶液静置过夜后，实验数据的平行性基本一致，提示溶液中的大分子砷化合物可能在一定时间内较为稳定。

分析上述试验结果可知，溶液中大分子砷化合物

物的粒径分布较广，对于滤膜来说，不同粒径的化合物易堵塞滤孔，造成试验结果不理想，静置后能有效减少这种干扰，故最终选择自然静置沉降法，可有效避免溶液中悬浮颗粒，并最大程度保留溶液中的大分子砷化合物。

3.4 静置时间考察 在选择溶液净化方式时发现，小儿化毒胶囊中雄黄可溶性砷主要以大分子形态存在，结合目测、显微鉴定、数据测量等手段，发现超声2 h后，提取溶液中的混悬颗粒较多，而且处于高度运动状态，若此时取样，溶液中充满雄黄的细小颗粒，所测结果会偏高，不能代表实际溶液中的可溶性砷。因此，对样品超声提取后的溶液分别静置2、4、6、8、12、18、24、30、36 h，发现静置18 h后，结果均趋于稳定，而且可持续达30 h左右，推测溶液静置18 h后，溶液中细小颗粒的沉降较完全，对可溶性砷测定结果的影响较小。考虑到操作时间，最终确定静置时间为20~24 h。

3.5 样品中可溶性砷、价态砷含有量比例的相关性分析

由表2可知，7批样品中可溶性砷的含有量为0.31~0.90 mg/粒，价态砷为0.12~0.52 mg/粒，即后者占前者的18.8%~67.7%，不同批次样品间两者含有量存在一定差异，价态砷中以As（Ⅲ）为主，其含有量约为As（V）的1.5倍。

然后，考察以同批号雄黄药材和饮片分别生产的样品，发现同批次药材经炮制为饮片后，可溶性砷含有量略有升高，但价态砷明显增加，提示水飞可增加As（Ⅲ）和As（V）的溶出，可能与雄黄疗效密切相关，与文献[13]报道的炮制可降低雄黄中可溶性价态砷含有量的观点不一致，但该结论却符合自然规律，理由是雄黄主成分均较难溶于水^[7]，其在胃肠道的溶出有限，而雄黄水飞炮制后粒度变小，比表面积增加，其砷溶出量理论上也应相应增加。

4 结论

本实验通过模拟体内吸收过程，建立了适宜方法测定小儿化毒胶囊中雄黄可在人体溶出的极限值，避免因试验参数（仪器、试剂、人员）无法完全复制而造成重复性差的问题。同时，因人体能吸收的可溶性砷量远小于极限值，故可避免病理、生理、人种、年龄、性别等因素带来的不确定性，以达到安全性控制最大化。

同时，还建立了ICP-MS法测定本品雄黄中可溶性砷的含有量，可用于雄黄发挥药效的监测手

段；HPLC-ICP-MS 法测定本品雄黄中价态砷的含有量，可用于本品的安全性评估，该方法可为其他含雄黄类中成药的检测提供借鉴和参考。

参考文献：

[1] 肖 飞，赵厚睿，向希雄，等. 小儿化毒散临床应用探讨[J]. 世界中医药, 2015, 10(11): 1806-1807.

[2] 曹 帅，夏 晶，杨新华，等. 雄黄炮制前后 χ 射线衍射分析研究[J]. 中成药, 2012, 34(6): 151-154.

[3] 汤家铭，谷颖敏，李咏梅，等. 雄黄灌胃给药后砷在孕大鼠脏器内的分布及排泄途径研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(8): 34-37.

[4] 顾晶晶，黄珍祯，谷颖敏，等. 雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 230-233.

[5] 高双荣，梁爱华，戴宝强，等. 雄黄肾脏毒性的病理形态学特征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 297-301.

[6] 陈保卫，那仁满都拉，吕美玲，等. 砷的代谢机制、毒性和生物监测[J]. 化学进展, 2009, 21(23): 474-482.

[7] 李丽敏，夏 晶，王欣美，等. HPLC-ICP-MS 法研究 5 种含雄黄中成药的可溶性砷及其形态[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2118-2123.

[8] 许珺辉，王洪玮，崔 蓉，等. 雄黄及含雄黄中成药中砷的形态分析[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 395-399.

[9] 邓德红，郑建国，周昭红. 石墨炉原子吸收分光光度法测定雄黄和牛黄解毒片中可溶性砷含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 44-45.

[10] 张 炜，刘学良，骆桂法，等. 佐太等珍宝矿物类藏药材中总砷、总汞及可溶性砷汞含量的对比研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 721 - 726.

[11] 王启铮，王丽敏，敬应春，等. 雄黄和六神丸中可溶性砷的溶出度研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 24(1): 17-22.

[12] 王辰洋，金鹏飞，邝咏梅，等. ICP-MS 研究含雄黄中成药中的砷元素在胃肠液中的溶出特性[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(11): 853-858.

[13] 裴月梅，杨士友，顾家华. 牛黄解毒颗粒剂制备工艺中雄黄的炮制方法及其可溶性砷盐的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(10): 599-600.