

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.018

仿生提取电感耦合等离子体-质谱法同时测定小儿牛黄清心散中可溶性汞和砷含量

裴海燕, 高慧珠, 孙密朴, 叶盛英, 李 丽[△]

(中国人民解放军联勤保障部队第九八三医院药剂科, 天津 300142)

摘要:目的 建立同时测定小儿牛黄清心散中可溶性汞(Hg)和砷(As)含量的仿生提取电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)法。方法 样品经人工胃液提取后, As以锑(Ge)作内标物质, Hg以铋(Bi)作内标物质进行校正测定。结果 小儿牛黄清心散在人工胃液中可溶性Hg和As的质量浓度分别在0~16.0 ng/mL和0~40.0 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率分别为91.40%和94.98%, RSD为1.20%和0.60% (n=6)。结论 该方法分析速度快、准确度高、稳定性好, 可为评价小儿牛黄清心散的安全性提供参考。

关键词: 小儿牛黄清心散; 仿生提取; 电感耦合等离子体-质谱法; 可溶性汞; 可溶性砷; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)01-0059-04

Determination of Soluble Mercury and Arsenic in Xiaoer Niu Huang Qingxin Powder by Bionic Extraction-ICPMS Method

PEI Haiyan, GAO Huizhu, SUN Mipu, YE Shengying, LI Li

(Department of Pharmacy, No. 983 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Tianjin, China 300142)

Abstract: Objective To establish a bionic extraction ICP-MS method for the simultaneous determination of soluble mercury and arsenic in Xiaoer Niu Huang Qingxin Powder. **Methods** The sample was processed by bionic extraction method and determined by ICP-MS. As with Ge as the internal standard substance and Hg with Bi as the internal standard substance, respectively. **Results** The soluble mercury and arsenic had good linearity among the ranges of 0-16.0 ng/mL and 0-40.0 ng/mL in Xiaoer Niu Huang Qingxin Powder. The average recoveries were 91.40% (RSD=1.20%) and 94.98% (RSD=0.60%), respectively (n=6). **Conclusion** This method has a good advantage of rapid analysis, high accuracy and good stability, which can be used as references for the safety evaluation of Xiaoer Niu Huang Qingxin Powder.

Key words: Xiaoer Niu Huang Qingxin Powder; bionic extraction; ICP-MS; soluble mercury; soluble arsenic; content

小儿牛黄清心散是由天麻、胆南星、黄连、赤芍、大黄、朱砂、雄黄等14味药材组方的中成药, 具有清热化痰、镇静止痉的作用, 主要用于小儿内热引起的痰喘急惊、四肢抽搐、神志昏迷等症状^[1-3]。方中, 朱砂可清心

镇惊、安神解毒^[4-5], 雄黄可解毒杀虫、燥湿祛毒^[6-7], 二者联用与该药的药效作用一致。但朱砂的主要化学成分为硫化汞(HgS), 此外还有少量的游离汞和可溶性汞盐, 如氯化汞、氧化汞等^[8-9]。硫化汞化学性质稳定, 难

第一作者: 裴海燕, 女, 主管药师, 研究方向为药物调剂及药物分析, (电子信箱)yimen74400400@163.com。

[△]通信作者: 李丽, 女, 大学本科, 主管技师, 研究方向为临床营养, (电子信箱)541893186@qq.com。

示, 五味子醇甲在250 nm波长处均有最大吸收, 苯甲酸钠在229 nm和274 nm波长处有最大吸收, 苯甲酸钠在274 nm波长处的吸收值与250 nm相近, 故选择250 nm作为2种成分的共同检测波长。

参考药典方法处理样品, 采用甲醇作为提取溶剂, 同时五味子醇甲和苯甲酸钠均溶于甲醇, 结果能提取完全; 另外, 对比超声时间10, 20, 30 min对提取效率的影响, 发现超声20 min后有效成分即能溶出。

国家标准相关规定明确了防腐剂在糖浆剂中的使用限量^[6], 但并未规定含量测定方法。由于防腐剂苯甲酸钠有一定毒性^[3], 目前有些品种口服液已将其作为检查项加入质量标准中, 因此同时检测五味子糖浆中的活性成分及防腐剂的含量, 不仅简化了检验过程, 而且还可提高糖浆剂的质量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 616.
- [2] 佟志军, 魏晓雨, 王美慧, 等. 五味子糖浆原药材、中间体及成品的HPLC指纹图谱相关性研究[J]. 中草药, 2016, 9(17): 3032-3038.
- [3] 兰金革, 宁丽峰, 张益文, 等. 高效液相色谱法测定口服液类药物中苯甲酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 4-6.
- [4] 杨武军, 刘雪峰. 布洛芬混悬液中苯甲酸测定方法的建立[J]. 中国药师, 2016, 19(2): 382-384.
- [5] 宋 博, 孙玉坤, 田 洁, 等. HPLC同时测定五味子糖浆中五味子酯甲和五味子甲素的含量[J]. 武警医学, 2018, 29(3): 267-269.
- [6] 商思阳, 陈 娟, 徐 冲, 等. 高效液相色谱法测定槐枝合剂的防腐剂含量[J]. 中国药业, 2017, 26(19): 34-36.

(收稿日期: 2019-05-22; 修回日期: 2019-06-25)

溶于盐酸和硝酸,在人体胃中难以吸收,基本均随粪便排除,因此口服硫化汞对人体基本无毒。但朱砂中还有少量氯化汞和可溶性汞盐,具有较大毒性,长期服用会损坏人体肝脏和肾脏,同时对人体中枢神经系统和生殖系统有慢性毒性^[10-11]。雄黄的主要成分是硫化砷(As_2S_3),在人体胃肠道难以吸收,几乎无毒,但药材中含有少量的可溶性砷盐和三氧化二砷(As_2O_3),是剧毒物质^[12-13]。目前,朱砂和雄黄的传统炮制方法均为水飞法,主要是为了减少可溶性的汞(Hg)和砷(As),降低毒性。小儿牛黄清心散现行标准中无对朱砂和雄黄药材的质量控制^[11],只有散剂通则的检查项。本试验中对该制剂中可溶性 Hg 和 As 的含量测定进行探讨,目前对于 Hg 和 As 的测定主要有原子吸收光谱法^[14-15]、原子荧光法^[16]、电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)^[17-18]法及柱前衍生高效液相色谱法等^[19],参考中国药典和上述文献,建立 ICP-MS 法同时测定小儿牛黄清心散中可溶性 Hg 和 As 的含量,可为控制该药的安全性和有效性,以及对改进其质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与材料

仪器:PerkinElmer Nexlon300x 型电感耦合等离子体质谱仪(美国铂金埃尔默公司);ETHOS UP A 型微波消解仪(美国 Milestone 公司);SHA-B 型恒温水浴振荡器(常州金坛友联仪器研究所);Sartorius BP210S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

试剂:小儿牛黄清心散样品(山东广育堂国药有限公司,规格为每袋 0.3,批号分别为 20181203,20190109,20190201);汞单元素标准物质[批号为 GBW(E)081593,质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$],砷单元素标准物质(批号为 GBW08611-15105,质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),金溶液标准物质(批号为 GSB 04-1715-2006,质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$);内标溶液锗(Ge),铋(Bi)(质量浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),所有单元素标准溶液和内标溶液均购自国家计量科学研究院。KED 调谐液为仪器自带,购自美国铂金埃尔默公司;65%硝酸为优级纯(美国 Merck 两合公司);盐酸、胃蛋白酶(上海国药化学试剂有限公司);水为超纯水(电阻率 $\geq 18.3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$,美国 Millipore 超纯水机制备);液氮为高纯液氮。

人工胃液:取稀盐酸 16.4 mL,加水 800 mL、胃蛋白酶 10 g,摇匀,再加水稀释成 1 000 mL,即得。

2 方法与结果

2.1 质谱条件

ICP-MS 工作参数:RF 射频功率为 1 300 W,等离子体气体流量为 18 L/min;雾化气流速为 0.82 L/min,辅助气体流量为 1.5 L/min,采样深度为 7.2 mm,样品提升速率为 1.0 L/min;液氮压力为 0.7 MPa;脉冲电压

为 780 V;样品冲洗 30 s,延迟 10 s;调谐模式为碰撞模式 KED;数据采集重复测定 3 次,测定时 As 以 Ge 作内标物质,Hg 以 Bi 作内标物质进行校正。

2.2 溶液制备

分别精密吸取 As 和 Hg 2 种单元素的对照品溶液适量,用超纯水稀释成每 1 mL 中分别含 As 1,5,10,20,40 ng 和含 Hg 1,2,4,8,16 ng 的系列标准溶液。分别精密量取内标元素 Bi 和 Ge 标准溶液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,用超纯水稀释成每 1 mL 含 Bi 和 Ge 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品混合溶液。称取样品(批号为 20181203)0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 50 mL 人工胃液,于恒温振荡器中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 4 h,振荡频率 150 r/min,取出,置离心机上,以 4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取 2.2 项下的 As 和 Hg 2 种元素的混合标准系列溶液,按 2.1 项下条件进样分析,内标进样管插入 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标溶液中,同时按从低到高的质量浓度依次将进样管插入上述 2 种元素的混合标准系列溶液中,以 3 次读数的平均值为纵坐标(Y)、相对应的进样质量浓度(ng/mL)为横坐标(X)进行线性回归。得线性回归方程分别为 $Y_{203\text{As}} = 0.0071X + 0.0040$, $r = 0.9992$ ($n = 3$); $Y_{75\text{As}} = 0.0122X + 0.0081$, $r = 0.9991$ ($n = 3$)。结果表明,As 和 Hg 进样质量浓度分别在 0~16 ng/mL 和 0~40 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下的 As 和 Hg 2 种元素混合标准系列溶液,分别取其低、中、高 3 种不同质量浓度的混合标准系列溶液,按 2.1 项下条件测定,每种质量浓度重复测定 6 次,记录测量值。结果 Hg 元素的 RSD 分别为 4.02%,2.43%,1.13%,As 元素的 RSD 分别为 3.40%,2.42%,1.21% ($n = 6$),RSD 均在 5% 内,表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 20181203)0.2 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下条件测定,每份样品重复测定 3 次,分别计算 Hg 和 As 的含量。结果 Hg 和 As 的平均含量分别为 0.068 6 mg/kg 和 0.989 9 mg/kg ,RSD 分别为 3.43% 和 3.22% ($n = 3$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20181203)0.2 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下条件分别于 0,1,2,4,8,16,24 h 时进样测定,记录测定值。结果 Hg 和 As 2 个元素的 RSD 分别为 4.04% 和 2.31% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 20181203)0.1 g,精

密称定,共称取6份,置具塞三角锥形瓶中,精密吸取上述Hg和As标准品溶液适量,用水稀释成每1 mL含Hg 10 ng、As 100 ng的混合溶液,分别加入上述6份样品中,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下条件进行测定,计算回收率和RSD。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (ng)	加入量 (ng)	测得量 (ng)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
Hg	0.102 5	7.031 5	10	16.167 8	91.36	91.40	1.20
	0.102 2	7.010 9	10	16.022 7	90.12		
	0.103 6	7.107 0	10	16.399 3	92.92		
	0.105 1	7.209 9	10	16.357 8	91.48		
	0.102 9	7.058 9	10	16.286 5	92.28		
	0.103 3	7.086 4	10	16.112 1	90.26		
As	0.102 5	101.464 8	100	196.6325	95.17	94.98	0.60
	0.102 2	101.167 8	100	195.9282	94.76		
	0.103 6	102.553 6	100	196.9528	94.40		
	0.105 1	104.038 5	100	198.9281	94.89		
	0.102 9	101.860 7	100	197.8715	96.01		
	0.103 3	102.256 7	100	196.8832	94.63		

2.4 样品含量测定

取各批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下条件测定,采用标准曲线法分别计算3批样品中可溶性Hg和As的含量。结果见表2。

表2 各批样品中可溶性Hg和As的含量测定结果

批号	可溶性成分($\mu\text{g/g}$)		每日最大使用量(g)		每日摄入人体总量(μg)	
	Hg	As	Hg	As	Hg	As
20181203	0.068 6	0.989 9	1.2	1.2	0.082 3	1.187 9
20190109	0.061 2	1.012 7	1.2	1.2	0.073 4	1.215 2
20190201	0.063 3	1.007 3	1.2	1.2	0.076 0	1.208 8

3 讨论

3.1 供试品制备方法

试验前期,对供试品的取样量采用正交试验 $L_9(3^3)$ 进行了考察。当取样量过大时,测定时需要多步骤地稀释,容易导致误差偏大;样品量过少,当采用人工胃液提取时,可溶性的Hg含量太低,测量误差大,不易获得准确值。综合考虑,取样量为0.2 g合适。对供试品的提取时间进行了考察,分别在2,4,8,12,24 h时进行了测定,结果发现,随着时间的延长,样品中可溶性Hg和As的含量增大,但当提取时间超过4 h时,可溶性Hg和As的含量变化不大。综合考虑人体实际服用药物时间,选择供试品的提取时间为4 h。Hg具有较强的吸附性,极易附着在仪器的采样锥和矩管上,影响As的测定,因此在样品中需要加入一定的金元素标准溶液,由于Hg可与金形成金汞齐,使其溶解,可减少仪器污染,保证测定结果的准确性。

3.2 可溶性Hg和As测定

方中朱砂和雄黄2种药材均含有游离Hg、游离As和可溶性的汞盐和砷盐,毒性较大,不同炮制方法对朱砂和雄黄中可溶性Hg和As的含量差异很大,当采用传统的水飞法进行炮制时,可溶性Hg和As含量最低;同时,也可除去药材中其他部分重金属及其盐类,大大降低了药材的毒性。目前,朱砂和雄黄的炮制主要采用机械法(球磨机)干法研磨,不仅会使Hg和As游离出来,同时也不能除去可溶性Hg和As,以及其他类重金属,从而导致朱砂和雄黄中毒。孔广英等^[12]通过砷盐古蔡氏法测得小儿牛黄清心散中可溶性As含量为0.1%~0.2%,与本研究结果基本一致。

3.3 ICP-MS法的优点

ICP-MS法同时测定多种元素时具有较高的灵敏度和准确性,且具有一次进样同时测定多个元素的优势,缩短试验时间,仪器的灵敏度最高,减少相互之间的干扰,补偿基体效应。依据质量数相近、电离电位相近的原则选 ^{209}Bi 作为 ^{202}Hg 、 ^{72}Ge 作为 ^{75}As 的内标溶液,从而减少元素的直接干扰。同时,为了保证结果的准确性、试验所用容量瓶和大肚吸管均为聚乙烯塑料材质,并采用20%硝酸浸泡过夜洗净后使用,所有量瓶和大肚吸管均经计量院校准合格后使用。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂(第2册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:18.
- [2] 陈芳芳,耿少怡,林燕,等. 小儿牛黄清心散治疗小儿上呼吸道感染临床疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(2):171-172.
- [3] 曲德勇,贾祥芝,李慧. 小儿牛黄清心散治疗疱疹性口腔炎的疗效观察[J]. 中国药师, 2013, 16(7):1053-1054.
- [4] 张桂菊,李凯峰. 朱砂临床应用的安全性评价[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(10):787-788.
- [5] 于丽,轩姣,李晋宝. 临床药师在朱砂外用致汞中毒诊治中的作用[J]. 上海医药, 2016, 37(17):68-70.
- [6] 陈朋,李红玉. 雄黄的临床应用与炮制方法研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7):1663-1666.
- [7] 何溶溶,吕翔,周婧,等. 雄黄的安全性评价和配伍减毒研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6):111-114.
- [8] 张映娜,曾丽玲,李晔华,等. 原子荧光光度法测定不同产地朱砂中的可溶性汞盐[J]. 中国药师, 2010, 13(9):1273-1275.
- [9] 杨国红,田南卉. 炮制对朱砂中游离汞的影响[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(3):156-157.
- [10] 梁爱华,商敏凤. 朱砂的毒性研究概况[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4):249-252.
- [11] 朱新科,张启明,程美丽. 朱砂的毒性及炮制研究进展[J]. 中国药业, 2005, 14(6):94-95.