

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.15.024

仿生提取电感耦合等离子体-质谱法同时测定小儿惊风七厘散中可溶性有害元素含量

张晶, 祖金花, 李智敬, 隋鲁英[△]

(山东省德州市中医院, 山东 德州 253013)

摘要:目的 建立模拟人工胃液仿生提取小儿惊风七厘散中可溶性有害元素铅(Pb)、镉(Cd)、铜(Cu)、汞(Hg)、砷(As)含量的电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)法。方法 样品经人工胃液提取, ²⁰⁸Pb和²⁰²Hg以²⁰⁹铋(²⁰⁹Bi)作内标物, ¹¹⁴Cd以¹¹⁵铟(¹¹⁵In)作内标物, ⁶³Cu以⁴⁷钪(⁴⁷Sc)作内标物, ⁷⁵As以⁷³锗(⁷³Ge)作内标物, 进行校正。结果 在人工胃液中, 小儿惊风七厘散的Pb, Cd, Cu, Hg, As可溶性有害元素在各自的质量浓度范围内与仪器信号值线性关系良好, r 分别为0.999 3, 0.999 0, 0.999 9, 0.999 9, 0.999 1 ($n=3$); 加样回收率在90.75%~98.29%之间, RSD 均小于3.0% ($n=6$); 含量均未超出2015年版《中国药典(四部)》中有害元素的限量标准。结论 该方法灵敏度高, 分析速度快, 稳定性好, 可用于小儿惊风七厘散中5种可溶性有害元素的含量测定。

关键词: 小儿惊风七厘散; 仿生提取; 电感耦合等离子体-质谱法; 人工胃液; 可溶性有害元素; 含量; 安全性评价

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)15-0085-04

Simultaneous Determination of Soluble Harmful Elements in Xiaoer Jingfeng Qili Powder by ICP-MS with Bionic Extraction Method

ZHANG Jing, ZU Quanhua, LI Zhijing, SUI Luying

(Dezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dezhou, Shandong, China 253013)

Abstract: **Objective** To establish an inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method for the biomimetic extraction of soluble harmful elements of lead (Pb), copper (Cu), mercury (Hg) and arsenic (As) from Xiaoer Jingfeng Qili Powder by simulated artificial gastric juice. **Methods** The sample was extracted by bionic extraction method with artificial gastric juice, ²⁰⁸Pb and ²⁰²Hg were corrected with ²⁰⁹Bi as the internal standard substance, ¹¹⁴Cd was corrected with ¹¹⁵In as the internal standard substance, ⁶³Cu was corrected with ⁴⁷Sc as the internal standard substance, and ⁷⁵As was corrected with ⁷³Ge as the internal standard substance. **Results** The soluble harmful elements (Pb, Cd, Cu, Hg, As) of Xiaoer Jingfeng Qili Powder in artificial gastric juice showed good linear relationship between their respective concentrations and the instrument signal values ($r=0.999\ 3, 0.999\ 0, 0.999\ 9, 0.999\ 9, 0.999\ 1, n=3$), their average recoveries were in the range of 90.75%~98.29% with $RSD < 3.0\%$ ($n=6$). The content of soluble harmful elements in the samples did not exceed the limit standard of harmful elements in the Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition, Volume IV). **Conclusion** The method is sensitive, rapid and stable, which can be used for the content determination of five soluble harmful elements in Xiaoer Jingfeng Qili Powder.

Key words: Xiaoer Jingfeng Qili Powder; bionic extraction; ICP-MS; artificial gastric juice; soluble harmful elements; content; safety evaluation

小儿惊风七厘散由牛黄、麝香、雄黄、天竺黄、琥珀、朱砂等33味药材组方,有清热解毒、祛风化痰、解热镇惊功效,主要用于治疗小儿外感风邪所致上呼吸道感染、肺炎、痢疾肠炎、积滞等症^[1-2],目前执行的标准为

《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十一册)》^[3]。方中,朱砂镇惊安神、清心明目^[4-5],主要成分为硫化汞(HgS),还有少量的游离汞和可溶性汞盐,如氯化汞和氧化汞等^[6];雄黄解毒杀虫、抗惊痫^[7-8]。二者合用药效

第一作者:张晶,女,大学本科,主治医师,研究方向为药品临床研究与安全性评价,(电子信箱)yxx2019@sohu.com。

[△]通信作者:隋鲁英,女,大学本科,主任药师,研究方向为药品临床风险评估及安全性评价,(电子信箱)lyw2019@yeah.net。

色谱,2020,38(11):1288-1293.

[9] 葛雨琦,叶晓霞,乐健,等. N -亚硝胺类基因毒性杂质毒性与检测方法研究进展[J]. 药物分析杂志,2020,40(1):83-89.

[10] 厉晨皓. 食品中 N -亚硝胺类化合物的检测研究进展[J]. 行业综述,2021(3):40-43.

[11] 杨竹,杭太俊,郭晓迪,等. N -亚硝胺类基因毒性杂质的研究进展[J]. 药学与临床研究,2020,28(4):270-274.

[12] 梁旭峰,黄杰,李宗芮,等. 色质联用技术在 N -亚硝胺

类物质分析中的应用[J]. 检验检疫学刊,2015,25(3):62-65.

[13] 章为,王晓菲,易必新,等. UPLC-APCI-MS/MS法测定二甲双胍列吡嗪片中 N -亚硝基二甲胺[J]. 中南药学,2020,18(9):1568-1571.

[14] 姜俊,邹韵,孙丽鹏,等. 顶空气相色谱质谱联用测定厄贝沙坦中遗传毒性杂质 N -亚硝基二甲胺和 N -亚硝基二乙胺[J]. 分析试验室,2020,39(2):245-248.

(收稿日期:2021-01-20)

作用一致,但朱砂和雄黄均含有对人体有害的汞盐和砷盐,长期服用会损坏小动脉和血管壁,同时对人体各个器官及中枢神经系统和生殖系统造成慢性中毒^[9-12]。该药又主要用于儿科,小儿的器官未发育完全,用药风险增大。目前,可溶性汞盐和砷盐主要由于朱砂和雄黄的不恰当炮制所致,同时含有其他重金属。小儿惊风七厘散现行标准中的朱砂和雄黄药材主要通过显微鉴别控制,未对其进行定量控制。重金属的定量测定主要有原子吸收光谱法、原子荧光法,电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS)法等。本研究中参考文献[13-16]和《中国药典》^[17]建立了同时测定小儿惊风七厘散中5种可溶性有害元素含量的仿生提取 ICP-MS 法,可为其临床安全用药提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo ICAP-Q series 型电感耦合等离子体质谱仪(美国赛默飞公司),配有半导体制冷雾化器,镍采样锥,截取锥,TOPEX 全能型化学工作站;SHA-B 型恒温水浴振荡器(常州金坛友联仪器研究所);XE204T 型电子分析天平(梅特勒仪器有限公司,精度为十万分之一)。

1.2 试剂

汞(Hg)单元素标准物质[批号为 GBW(E)081593,质量浓度为 1 000 μg/mL],砷(As)单元素标准物质(批号为 GBW08611-15105,质量浓度为 1 000 μg/mL),铅(Pb)单元素标准物质[批号为 GBW(E)081577,质量浓度为 1 000 μg/mL],镉(Cd)单元素标准物质[批号为 GBW(E)081581,质量浓度为 1 000 μg/mL],铜(Cu)单元素标准物质[批号为 GBW(E)081579,质量浓度为 1 000 μg/mL],金(Au)单元素标准溶液(批号为 GNM-SA-U-002-2013,质量浓度为 100 μg/mL),内标溶液铋(Bi,批号为 GSB 04-1719-2004)、锗(Ge,批号为 GSB 04-1728-2004)、钪(Sc,批号为 GSB 04-1760-2004)、铟(In,批号为 GSB 04-1731-2004),质量浓度均为 1 000 μg/mL,均购自国家计量科学研究院;STD 调谐液为仪器自带;盐酸为优级纯;胃蛋白酶(上海国药化学试剂有限公司);水为超纯水,由 Milli-Q 型超纯水机(电阻率≥18.2 MΩ·cm,美国 Millipore 公司)制得;液氮为高纯液氮;小儿惊风七厘散(云南腾药制药股份有限公司,批号分别为 20171106,20181101,20181202,规格为每粒 0.2 g)。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 条件

采用 STD 模式下用调谐液调整仪器各项参数,使元素丰度、氧化物产率、双电核离子产率等指标达到测

定要求(仪器主要工作参数见表1)。测定时选取的同位素为 ⁷⁵As 和 ²⁰²Hg,并以 ⁷²Ge 和 ²⁰⁹Bi 作为内标物质进行校正,依次分别将空白试剂、系列标准溶液、样品溶液上机测定,重复测定 3 次。分别引入仪器,采集数据,绘制标准曲线,计算回归方程。

表1 ICP-MS 主要工作参数
Tab.1 Working parameter of ICP-MS

条件	参数	条件	参数
分析时压力	<6.0E-07 mbar	等离子体功率	1 550 W
雾化室温度	2.70 °C	蠕动泵转速	40 r/min
冷却气流速	14.00 L/min	辅助气流速	0.8 L/min
采样深度	5.00 mm	雾化器流速	0.992 8 L/min
火焰水平位置	-1.43	火焰垂直位置	-1.06

2.2 溶液制备

分别精密吸取上述 5 种元素的单元标准溶液各适量,加超纯水,分别稀释成每 1 mL 中分别含 Pb 5,10,20,30,40 ng, Cd 0.2,0.5,1,2,8 ng, Cu 50,100,200,400,600 ng, As 1,2,4,8,16 ng, Hg 0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 ng 的系列混合标准溶液。

分别精密量取上述内标元素多元标准溶液(质量浓度为 1 000 μg/mL),用超纯水稀释成每 1 mL 含 Bi, Ge, Sc, In 各 0.1 μg/mL 的对照品混合溶液。

分别精密量取 Au 元素标准溶液,用超纯水稀释成每 1 mL 含 Au 元素 1 μg 的溶液,作为稳定剂。

取稀盐酸 16.4 mL,加水 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀,加水稀释成 1 000 mL,即得人工胃液^[17]。

取样品(批号为 20171106)0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入人工胃液 50 mL,于 37 °C 恒温振荡器中振荡 4 h,频率为 150 r/min,取出,离心(4 000 r/min)10 min,吸取上清液,即得供试品溶液。同时,取相同体积的人工胃液作为空白溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取 2.2 项下 5 种元素的系列混合标准溶液,按 2.1 项下仪器工作条件进样分析测定,内标进样管插入质量浓度为 0.1 μg/mL 的内标溶液中,同时按从低到高的浓度依次将进样管插入上述 5 种元素的系列混合标准溶液中,以仪器 3 次信号值的平均值为纵坐标(Y)、相应进样质量浓度为横坐标(X, ng/mL),进行线性回归。结果见表 2。

精密度试验:取 2.2 项下 5 种元素系列混合标准溶液,分别取 5 种元素的低、中、高浓度的系列混合标准溶液,按 2.1 项下仪器工作条件进样测定,每个浓度重复测定 6 次,记录测量信号值。结果 Pb 的 RSD 分别为 2.02%, 1.53%, 0.98% (n=6); Cd 的 RSD 分别为 3.17%, 2.28%, 1.02% (n=6); Cu 的 RSD 分别为

表2 5种元素的线性方程、相关系数和线性范围($n=3$)

Tab. 2 The linear equation, correlation coefficient and linear ranges of five soluble harmful elements($n=3$)

元素	线性方程	相关系数(r)	线性范围(ng/mL)
Pb	$Y=0.0088X+0.0037$	0.9993	0~40.0
Cd	$Y=0.1221X+0.0225$	0.9990	0~8.0
Cu	$Y=0.1125X+0.0006$	0.9999	0~600.0
Hg	$Y=0.0062X+0.0003$	0.9999	0~8.0
As	$Y=0.0087X+0.0009$	0.9991	0~16.0

1.01%, 0.79%, 0.62% ($n=6$); Hg的RSD分别为4.16%, 2.08%, 1.22% ($n=6$); As的RSD分别为2.97%, 2.01%, 1.58% ($n=6$)。RSD均在5%以内,表明该仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20171106)样品0.2g,精密称定,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下仪器条件进样测定,每份样品重复测定3次,求平均值,分别计算5种元素的含量。结果Pb, Cd, Cu, Hg, As的平均含量分别为1.2032, 0.0819, 5.0638, 0.1021, 0.8518 mg/kg, RSD分别为1.67%, 2.08%, 1.05%, 2.17%, 1.26% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20171106)样品0.2g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下仪器条件分别于0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h时进样测定,记录测定值。结果Pb, Cd, Cu, Hg, As的RSD分别为1.85%, 1.67%, 2.09%, 2.52%, 2.68% ($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:精密吸取上述5种元素标准溶液各适量,用水稀释成每1 mL分别含Pb 100 ng、Cd 10 ng、Cu 500 ng、Hg 10 ng、As 100 ng的混合溶液,作为待加标准溶液;然后取同一批(批号为20171106)样品0.1 g,精密称定,平行6份,置具塞三角锥形瓶中,分别精密吸取上述待加标准溶液各1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下仪器条件进样测定。结果见表3。

2.4 样品含量测定

分别取不同批号(批号分别为20171106,

表3 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 3 Results of the recovery tests($n=6$)

元素	取样量(g)	样品含量(ng)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
Pb	0.1021	122.8467	100	216.01	93.16	92.87	1.96
	0.1032	124.1702	100	215.56	91.39		
	0.1009	121.4029	100	216.37	94.97		
	0.1023	123.0874	100	215.75	92.66		
	0.1036	124.6515	100	214.98	90.33		
	0.1018	122.4858	100	217.21	94.72		
Cd	0.1021	8.3620	10	17.82	94.58	90.75	2.34
	0.1032	8.4521	10	17.33	88.78		
	0.1009	8.2637	10	17.26	89.96		
	0.1023	8.3784	10	17.52	91.42		
	0.1036	8.4848	10	17.39	89.05		
	0.1018	8.3374	10	17.41	90.73		
Cu	0.1021	517.0140	500	999.24	96.45	98.29	1.71
	0.1032	522.5842	500	1008.32	97.15		
	0.1009	510.9374	500	1015.66	100.94		
	0.1023	518.0267	500	1007.98	97.99		
	0.1036	524.6097	500	1012.35	97.55		
	0.1018	515.4948	500	1013.67	99.64		
Hg	0.1021	10.4244	10	19.69	92.66	91.98	1.08
	0.1032	10.5367	10	19.72	91.83		
	0.1009	10.3019	10	19.55	92.48		
	0.1023	10.4448	10	19.76	93.15		
	0.1036	10.5776	10	19.62	90.42		
	0.1018	10.3938	10	19.53	91.36		
As	0.1021	86.9688	100	184.21	97.24	95.96	1.17
	0.1032	87.9058	100	183.22	95.31		
	0.1009	85.9466	100	182.69	96.74		
	0.1023	87.1391	100	183.16	96.02		
	0.1036	88.2465	100	182.33	94.08		
	0.1018	86.7132	100	183.06	96.35		

20181101, 20181202)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下仪器条件进样测定,采用标准曲线法分别计算样品中可溶性Hg和As的含量,并根据药品的每日最大使用量,计算每日摄入人体Hg和As的总量。结果见表4。

表4 3批样品中可溶性有害元素含量测定结果

Tab. 4 Content determination of five soluble harmful elements in the three batches of samples

元素	可溶性成分的含量($\mu\text{g/g}$)			每日最大使用量(g)			每日摄入人体的总量(μg)		
	20171106	20181101	20181202	20171106	20181101	20181202	20171106	20181101	20181202
Pb	1.2032	2.0154	1.9805	0.2	0.2	0.2	0.2406	0.4031	0.3961
Cd	0.0819	1.2238	1.0853	0.2	0.2	0.2	0.0164	0.2448	0.2171
Cu	5.0638	7.6925	7.2864	0.2	0.2	0.2	1.0128	1.5385	1.4573
Hg	0.1021	0.1329	0.0957	0.2	0.2	0.2	0.0204	0.0266	0.0191
As	0.8518	1.0212	0.9886	0.2	0.2	0.2	0.1704	0.2042	0.1977

3 讨论

3.1 供试品制备方法

小儿惊风七厘散中的朱砂和雄黄均经水飞后入药,朱砂和雄黄药材多采用机械化(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汞盐和砷盐及其他类重金属,这是导致朱砂和雄黄中毒的主要原因。本研究中为了更好地模拟可溶性汞盐和砷盐在人体的溶解性,采用仿生提取,即人工胃液进行萃取,采用 ICP-MS 法进行测定。同时考察了供试品的提取时间,分别于 2, 4, 8, 12, 16 h 时进样测定。结果随着时间的增长,样品中可溶性有害元素的含量依次增大;提取时间超过 4 h 后,可溶性 Hg 和 As 的含量变化不大。综合考虑人体实际服药时间,选择供试品的提取时间为 4 h。

3.2 可溶性有害元素测定

小儿惊风七厘散中含有朱砂和雄黄,若直接采用微波消解,再测定 Hg 和 As 的含量,二者均会超过药典规定的限度($Hg \leq 0.2 \text{ mg/kg}$, $As \leq 2 \text{ mg/kg}$)。并非所有的 Hg 和 As 都具有毒性,其毒性与其所处的价态有较大关系,且微波消解也不符合人体对其吸收的条件。本研究中采用模拟人工胃液进行提取,测定 5 种可溶性有害元素的含量,控制其安全性。同时发现, Hg 极易附着在仪器的采样锥和矩管上,影响 As 的测定,因此在测定样品时需加入一定量的 Au 元素标准溶液作为稳定剂,以消除 Hg 元素的记忆效应,减少对 As 元素测定的干扰,保证测定结果的准确性,测定完成后要充分冲洗,尽量减少 Hg 在仪器中的残留污染。

3.3 安全性评价

朱砂的毒性主要源自可溶性汞盐,其与蛋白质的巯基结合能力较强,可与血液中的血红蛋白结合而进入人体各器官,损害组织器官;雄黄的主要剧毒成分为 As_2O_3 , 与其炮制方法和生产工艺有关。因此,要对可溶性的有害元素,尤其是汞盐和砷盐进行控制。根据中药有害残留物限量指导原则及该药的每日允许最大使用量,参照《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》规定的限度, $Pb \leq 5 \text{ mg/kg}$, $Cd \leq 0.3 \text{ mg/kg}$, $Cu \leq 20 \text{ mg/kg}$, $Hg \leq 0.2 \text{ mg/kg}$, $As \leq 20 \text{ mg/kg}$ 。结果小儿惊风七厘散中 5 种可溶性有害元素的含量均未超标,表明服用该药是安全的,但因小儿的器官未发育完全,为了减少不必要的伤害,应尽量少服用或不服用含朱砂和雄黄的中成药。

3.4 ICP-MS 的优点

ICP-MS 是目前公认的测定痕量元素的分析仪器,可同时测定多种元素,灵敏度和准确性均较高,能避免逐个分析原子吸收,分析速度快,极大地缩短了试验时

间,提高试验效率。但分析质量数较小的元素时极易受质谱干扰,为提高灵敏度,需减少元素相互间的干扰,补偿基质效应。依据“质量数相近,电离电位相近”的原则,选择 ^{208}Pb 和 ^{202}Hg 以 ^{209}Bi 作内标物, ^{114}Cd 以 ^{115}In 作内标物, ^{63}Cu 以 ^{47}Sc 作内标物, ^{75}As 以 ^{73}Ge 作内标物,减少了元素间的直接干扰。同时,长时间测定后要清洗雾化器和采样锥,防止污染,试验所用容量瓶和大肚吸管均为聚乙烯塑料材质,均应采用 20% 硝酸浸泡过夜洗净后使用,以保证结果的准确性。

参考文献

- [1] 郭兰芳,陈月,吴晖. 小儿惊风七厘散预防小儿热性惊厥疗效观察[J]. 江西医药, 2011, 46(12): 1104-1105.
- [2] 寸时灿. 高效液相色谱法测定小儿惊风七厘散中黄芩苷的含量[J]. 儿科药学杂志, 2009, 15(1): 41-43.
- [3] WS₃-B-0188-90, 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第十一册)[S].
- [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] 薛建国,夏春丽,宋艺君. 朱砂的功效及毒性研究进展[J]. 现代中医药, 2014, 34(2): 66-69.
- [6] 张映娜,曾丽玲,李昭华,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.
- [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): 645-648.
- [8] 裴可,冯慧超,郑文利,等. 纳米雄黄抗肿瘤的药理毒理研究及临床应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 214-219.
- [9] 陆远富,时京珍,石京山,等. 科学评价含雄黄、朱砂中成药的安全性[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3402-3405.
- [10] 张永文,马秀璟,阳长明. 含朱砂、雄黄的中药制剂的质量控制及安全性评价问题分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1501-1504.
- [11] 李朝峰. 雄黄及含雄黄中成药的质量控制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [12] 牛东霞,李西林,柳国斌,等. 朱砂毒性、质量控制与合理使用[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(2): 130-132.
- [13] 贾庆欣,李文君,张进,等. 原子吸收分光光度法测定安宫牛黄丸中雄黄和朱砂的含量[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(21): 89-91.
- [14] 张国跃,冯斌,王梦琪,等. 原子荧光光度法测定跳骨片中可溶性砷、汞含量[J]. 中国药业, 2019, 28(24): 35-38.
- [15] 姜范成,张静娇,郑尚季,等. ICP-MS 法测定两类中药注射用冻干粉针中铅、镉、砷、汞、铜的含量[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(8): 116-117.
- [16] 蒋秋桃,曾丽,马杰,等. 仿生提取-电感耦合等离子体-质谱法测定柏子养心片中可溶性有害元素[J]. 分析化学, 2016, 44(6): 979-983.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 119.

(收稿日期: 2020-07-31; 修回日期: 2020-12-08)