

原子荧光光谱法检测牛黄解毒片及其拆方可溶性砷的含量

董菊¹, 陈辉^{2*}, 吴娟¹, 王明艳¹, 詹臻¹

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210046; 2. 南京市疾病预防控制中心, 南京 210003)

[摘要] 目的: 探讨牛黄解毒片配伍对有毒中药雄黄是否具有减毒作用及其可能减毒药味。方法: 设立牛黄解毒片全方及其不同拆方组, 分别用人工胃液或人工肠液处理, 然后采用原子荧光光谱法测定并比较不同组可溶性砷的含量。结果: 人工胃液或人工肠液处理后, 牛黄解毒片全方组可溶性砷含量明显低于单味雄黄组 ($P < 0.01$); 牛黄解毒片全方去甘草、黄芩、大黄组可溶性砷含量明显高于牛黄解毒片全方组 ($P < 0.01$)。结论: 牛黄解毒片全方配伍对雄黄有减毒作用, 并且甘草、黄芩、大黄是减毒的可能药味。

[关键词] 原子荧光光谱法; 牛黄解毒片; 拆方; 雄黄; 可溶性砷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0067-04

Determination of Soluble Arsenic in Niu Huang Jie Du Tablets and Its Disassembled Prescription by AFS

DONG Ju¹, CHEN Hui^{2*}, WU Juan¹, WANG Ming-yan¹, ZHAN Zhen¹

(1. Department of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Nanjing Center For Disease Control and Prevention, Nanjing 210003, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether the compatibility of Niu Huang Jie Du tablets could reduce the toxicity of realgar, and which may be the possible herbal medicines that could reduce toxicity in the Niu Huang Jie Du tablets prescription. **Method:** Different groups about Niu Huang Jie Du Tablets and its disassembled prescription were arranged, treated with artificial gastric juice or artificial intestine juice, and then atom fluorescence spectrophotometry (AFS) was used to detect the content of soluble arsenic in the different groups samples. **Result:** The content of soluble arsenic in the whole prescription was significant lower than that in the single realgar ($P < 0.01$). The content of soluble arsenic in the whole prescription except for Gancao, Huangqin and Dahuang was significant higher than that in the whole prescription ($P < 0.01$). **Conclusions:** The compatibility for Niu Huang Jie Du tablets could reduce the toxicity of realgar, and Gancao, Huangqin and Dahuang may be the possible herbal medicines that could reduce toxicity.

[收稿日期] 20110430(003)

[基金项目] 江苏省高校研究生科研创新计划项目(2010); 江苏省中医药药效与安全评价重点实验室开放课题(T09019)

[第一作者] 董菊, 博士研究生, 研究方向: 中药毒理学, E-mail: dong_jv2007@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈辉, 女, 主任技师, 研究方向: 元素检测与分析, E-mail: dai-chen@sohu.com

[8] 边宝林, 司南, 王宏洁, 等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 25.

[9] 随志刚, 陈明玉, 刘志强, 等. 附子煎煮与配伍应用中乌头类生物碱含量的变化及意义[J]. 吉林大学学

报, 2009, 35(2): 365.

[10] 孙兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40(1): 59.

[责任编辑 蔡仲德]

[Key words] AFS; Niu Huang Jiedu tablets; realgar; compatibility; soluble Arsenic

牛黄解毒片为一经典名方,主要用于治疗咽喉肿痛、牙龈肿痛、口舌生疮、目赤肿痛等火毒内盛的病证,是一种中医临床上常用的清热解毒药。方中所含雄黄是卫生部颁布的 28 种毒性药材之一,因此,其安全性问题引起了人们的关注^[1]。牛黄解毒片作为多味中药配伍的复方药,《中国药典》^[2] 记载的牛黄解毒片处方中除毒性中药雄黄外还包括牛黄、大黄等 7 味药。那么,该方进入机体后其方药配伍能否降低雄黄的毒性以及主要影响的药味,目前未见有相关研究。雄黄主要成分是二硫化二砷(As₂S₂),另含有少量三氧化二砷(As₂O₃)。现代研究表明^[3-4],As₂S₂ 难溶于水,几乎不被机体吸收,通过炮制等手段可除去天然雄黄中所含的可溶性的 As₂O₃ 部分,并使雄黄的毒性明显降低,因此,雄黄的毒性成分目前被认为是其中的可溶性砷盐部分。鉴此,本研究拟通过牛黄解毒片全方及其拆方组中的可溶性砷含量的检测,来探讨牛黄解毒片方药配伍对雄黄是否具有减毒作用及其可能药味。

1 材料

1.1 主要仪器 AFS-230a 双道原子荧光光度计,北京万拓仪器有限公司;砷特种空心阴极灯,北京有色金属研究院;AE200 电子天平,瑞士梅特勒公司;Milli-Q 纯水器,法国密理博公司;SHB-III 循环水式真空泵,河南省予华仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;TGL-16M 高速台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;SHZ-88 水浴恒温振荡器,江苏太仓市实验设备厂。

1.2 主要药物 牛黄解毒片中牛黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草 7 味单味药均购自江苏省中医院药剂科中药房;雄黄由南京中医药大学门诊部提供,经鉴定为硫化物类雄黄。

1.3 主要试剂 胃蛋白酶, Sigma 公司产品;胰蛋白酶, Gibco 公司产品;砷标准储备液:100 mg·L⁻¹ 国家环保总局标样研究所提供, GSB07-1275-2000;0.10 mg·L⁻¹ 标准使用液[介质为盐酸(5+95)];还原剂:硫脲(A. R.) + 抗坏血酸(A. R.) 溶液(50 g·L⁻¹ + 50 g·L⁻¹);硼氢化钾溶液[15 g·L⁻¹, 介质为氢氧化钠(A. R.) 溶液 5 g·L⁻¹];盐酸(G. R.);氢氧化钠(A. R.);氧化镁(A. R.);硝酸镁(A. R.) 溶液(15 g·L⁻¹);超纯水(18.2 MΩ·cm)。

2 方法

2.1 人工胃液及人工肠液的制备^[5] 取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀后,调 pH 至 1.5,加水稀释至 1 000 mL,即得人工胃液。取 KH₂PO₄ 6.8 g 加水 500 mL 溶解,用 NaOH 溶液调 pH 至 6.8。每 100 mL 液体中加入 1 g 胰蛋白酶,混匀即得人工肠液。

2.2 牛黄解毒片全方及其拆方供试品制备 设立单味雄黄组、牛黄解毒片全方组、牛黄解毒片去雄黄组及牛黄解毒片去甘草、黄芩和大黄组,各组药材组成及用量见表 1。牛黄解毒片全方及其拆方供试品的制备参照《中国药典》2010 年版一部中规定的牛黄解毒片处方比例(人工牛黄 5 g,雄黄 50 g,石膏 200 g,大黄 200 g,黄芩 150 g,桔梗 100 g,冰片 25 g,甘草 50 g)与制备方法进行。

表 1 雄黄、牛黄解毒片及其拆方供试品的药材组成 mg

组别	雄黄	甘草	大黄	黄芩	石膏	牛黄	冰片	桔梗
雄黄	200	0	0	0	0	0	0	0
全方	200	200	800	600	800	20	100	400
全方去雄黄	0	200	800	600	800	20	100	400
全方去甘草、黄芩、大黄	200	0	0	0	800	20	100	400

2.3 人工胃液处理各组供试液的准备 雄黄及不同牛黄解毒片组方人工胃液处理组:取上述准备的雄黄、牛黄解毒片全方及其拆方供试品加入人工胃液 30 mL,37 ℃ 水浴 5 h,定容至 50 mL,摇匀,取 1 mL,用冷冻离心机 10 000 r·min⁻¹,离心 30 min,取上清,稀释 10 倍待测。同时设立相同质量雄黄水溶液组,准备步骤同人工胃液处理组。

2.4 人工肠液处理各组供试液的准备 雄黄及不同牛黄解毒片组方人工肠液处理组:取上述准备的雄黄、牛黄解毒片全方及其拆方供试品加入人工肠液 30 mL,37 ℃ 水浴 5 h,定容至 50 mL,摇匀,取 1 mL,用冷冻离心机 10 000 r·min⁻¹,离心 30 min,取上清,稀释 10 倍待测。同样设立相同质量雄黄水溶液组,准备步骤同人工肠液处理各组。

2.5 原子荧光光谱法测定各组供试液可溶性砷含量 按 GB/T5009.11-2003^[6] 原子荧光法测砷操作进行测定。仪器分析条件:砷空心阴极灯电流 60 mA,负高压 300 V,原子化器高度 8 mm,载气流量

400 mL·min⁻¹,屏蔽气流量1 000 mL·min⁻¹,读数方式:峰面积,延迟时间1 s,读数时间10 s,进样体积0.5 mL。

3 结果

3.1 检出限与线性关系考察 根据仪器设定的测定检出限程序,对试剂空白进行11次测定,由测试结果得 $S=3.20, 3S=9.60, DL=0.16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,以取样量1 mL定容至25 mL计,样品的最低检出量为 $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。吸取浓度为0.00, 4.00, 8.00, 12.00, 16.00, 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 砷标准液,原子荧光法测砷,然后以砷标准溶液的浓度为横坐标、荧光强度为纵坐标进行直线回归,得回归方程 $Y=61.66X+10.85$ ($r=0.9997$),结果表明砷浓度在0~20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

3.2 加标回收率与精密度 取同一供试液样品24份,将其分为4组(每组为6份样品)。一组为本底,在另外3组中分别加入砷标准溶液,浓度分别为2.00, 8.00, 16.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,经消化、定容后再测定砷含量,计算其回收率和精密度(见表2)。结果显示添加低、中、高3个砷浓度样品的平均回收率在99.62%~103.32%间, RSD为0.41%~5.95%。

表2 加标回收率与精密度的测定($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	测定值	回收率	精密度
	/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	/%	/%
供试液本底	3.53 ± 0.21	-	5.95
供试液+8.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准液	5.59 ± 0.22	103.32 ± 9.13	3.94
供试液+16.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准液	11.60 ± 0.14	100.97 ± 1.99	1.21
供试液+2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准液	19.47 ± 0.08	99.62 ± 1.12	0.41

3.3 人工胃液处理后各组可溶性砷含量的测定 由表3可知,牛黄解毒片全方人工胃液处理组可溶性砷含量明显低于单味雄黄人工胃液处理组($P<0.01$),而全方去甘草、黄芩、大黄人工胃液组可溶性砷含量明显高于牛黄解毒片全方人工胃液处理组($P<0.01$),表明牛黄解毒片全方配伍对雄黄的毒性可能有减低作用,并且甘草、黄芩、大黄3味中药是发挥减毒作用的可能药味;此外,结果还显示,雄黄经人工胃液处理后,可溶性砷含量明显低于相同质量的雄黄水溶液组($P<0.01$),表明雄黄经胃液处理后毒性可能是降低的。

3.4 人工肠液处理后各组可溶性砷含量的测定 由表4可知,牛黄解毒片全方人工肠液处理组可溶性砷含量明显低于单味雄黄人工肠液处理组($P<$

表3 人工胃液及牛黄解毒片配伍对雄黄可溶性砷含量的影响 ($\bar{x}\pm s$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	<i>n</i>	可溶性砷含量
雄黄水溶液组	5	0.84 ± 0.01
雄黄人工胃液组	5	$0.66\pm 0.01^{1)}$
全方人工胃液组	5	$0.40\pm 0.10^{2)}$
全方去雄黄人工胃液组	5	0.00 ± 0.00
全方去甘草、黄芩、大黄人工胃液组	5	$0.47\pm 0.10^{3)}$

注:经方差分析和两两比较,¹⁾表示与雄黄水溶液组比较, $P<0.01$; ²⁾表示与雄黄人工胃液组比较, $P<0.01$; ³⁾表示与全方人工胃液组比较, $P<0.01$ 。

表4 人工肠液及牛黄解毒片方药配伍对雄黄可溶性砷含量的影响 ($\bar{x}\pm s$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	<i>n</i>	可溶性砷含量
雄黄水溶液组	5	1.25 ± 0.23
雄黄人工肠液组	5	$0.66\pm 0.18^{1)}$
全方人工肠液组	5	$0.22\pm 0.02^{2)}$
全方去雄黄人工肠液组	5	0.00 ± 0.00
全方去甘草、黄芩、大黄人工肠液组	5	$0.43\pm 0.03^{3)}$

注:经方差分析和两两比较,¹⁾表示与雄黄水溶液组比较, $P<0.01$; ²⁾表示与雄黄人工肠液组比较, $P<0.01$; ³⁾表示与全方人工肠液组比较, $P<0.05$ 。

0.01),而全方去甘草、黄芩、大黄人工肠液组可溶性砷含量明显高于牛黄解毒片全方人工肠液处理组($P<0.01$),亦表明牛黄解毒片全方配伍对雄黄的毒性可能有减低作用,并且甘草、黄芩、大黄3味中药是发挥减毒作用的可能药味;同时,由表4可知,雄黄经人工肠液处理后,可溶性砷含量明显低于相同质量的雄黄水溶液组($P<0.05$),表明雄黄经人工肠液处理后毒性亦可能是降低的。

4 讨论

中药配伍减毒作用研究是近年来研究的热点,但有毒中药雄黄的配伍减毒尚未见有研究。本研究以牛黄解毒片为研究切入点,探讨其方药配伍对雄黄是否具有减毒作用。结果显示,不管是人工胃液还是人工肠液处理,牛黄解毒片全方配伍后,均可明显降低雄黄中可溶性砷含量,并且,牛黄解毒片全方去甘草、黄芩、大黄后,其可溶性砷又明显升高,这表明牛黄解毒片全方配伍对雄黄有减毒作用,而甘草、黄芩、大黄3味中药是发挥减毒作用的可能药物。该研究结果有助于正确认识经典名方牛黄解毒片的

组方配伍规律,并且能为雄黄的配伍减毒提供有益的提示,因此具有重要意义。但对于发挥减毒作用的具体药味、成分及机制等问题,还需要做进一步地深入研究。

《中国药典》收载的牛黄解毒片处方中除毒性中药雄黄外包括牛黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草 7 味药,其中甘草具有调和药性,解百药之毒之功效,并且《本草纲目》中百病主治药“诸毒”中可用甘草解的就包括“金、石毒”,指的是含汞成分的水银、升汞及含砷成分的砒石、雄黄等^[7];黄芩、大黄具有重要的抗氧化、抗突变性作用^[8-9]。现代研究表明,基因突变、氧化损伤正是砷剂毒性发生的重要机制^[10-11]。这些资料提示,牛黄解毒片方药中甘草、大黄、黄芩 3 味中药对雄黄可能具有减毒作用,但这缺乏充足的实验证据。因此,本研究在对全方研究的基础上,进行拆方,设立全方去甘草、大黄、黄芩组开展研究,以对发挥减毒作用的可能药味进行初步探索。

已有研究表明^[12-13],雄黄进入机体后,胃肠道内环境会改变可溶性砷的含量,从而影响雄黄中砷在机体内的毒性。为对此作进一步的考证,本研究平行设立雄黄水溶液组,并分别和雄黄人工胃液组以及雄黄人工肠液组比较,结果显示相同质量雄黄在人工胃液、肠液中可溶性砷含量均小于其在水溶液中的可溶性含量,该研究结果和已有研究报道不尽相同。姜泓等报道^[12-13],相同质量雄黄在人工胃液中砷的溶出量小于在水中砷的溶出量,但在人工肠液中砷的溶出量大于在水中砷的溶出量。分析出现不同结果的原因,认为可能与待测供试液准备过程中操作步骤不尽相同有关。本研究采用高速冷冻离心方式来获取待测供试液,而姜泓等采用滤膜过滤方式来获取待测供试液,结果的不同可能由这种操作步骤的差异引起,但确切原因有待进一步的研究与

分析。

[参考文献]

- [1] 张力,高思华,周超凡,等.从牛黄解毒丸(片)看含砷中成药的安全性问题[J].中国中药杂志,2006,31(23):2010.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:386.
- [3] 张伟,余伯阳,寇俊萍,等.雄黄活性物质的毒效相关性初步研究[J].中国天然药物,2004,2(2):123.
- [4] 叶祖光,王智民,王跃生,等.安宫牛黄丸中朱砂和雄黄的药理作用特点与安全性评价研究[J].医学研究通讯,2005,34(9):35
- [5] 中国药典.二部[S].2005:附录 76.
- [6] GB/T5009.11-2003.中华人民共和国国家标准食品卫生检验方法[S].理化部分(一).北京:中国标准出版社,2004,73.
- [7] 潘英伟,陈卫平,奚丽君.甘草减毒作用的应用与机理分析[J].南京中医药大学学报,2008,24(6):428.
- [8] 宋成岩,刘宇,朴锦花,等.黄芩抗氧化化学成分的研究[J].时珍国医国药,2007,18(4):856
- [9] 陶玉珍,刘毅,郭启明,等.大黄抗突变作用的研究[J].癌变·畸变·突变,1998,10(4):241.
- [10] Li Z, An Y. Advance on oxidative stress mechanism of arsenic[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2009,38(5):634.
- [11] Kligerma A D, Tennant A H. Insights into the carcinogenic mode of action of arsenic[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2007,222(3):281.
- [12] 姜泓,费思平,陈再兴,等.氢化物发生冷阱捕集原子荧光光度法测定人工胃液、水中牛黄解毒片中可溶性砷的含量[J].中药材,2008,31(3):450.
- [13] 姜泓,孟舒,陈再兴,等.氢化物发生冷阱捕集原子荧光光度法测定人工肠液、水中牛黄解毒片中可溶性砷的含量[J].中药材,2009,32(4):629.

[责任编辑 蔡仲德]