

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1350. 011

雄黄可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性关系的研究

顾晶晶¹, 黄珍祯¹, 谷颖敏¹, 汤家铭^{1*}, 夏晶², 王枚博², 季申²

(1. 上海中医药大学实验动物中心, 上海 201203; 2. 上海食品药品检验所, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 观察单次 ig 给药不同批号的雄黄混悬液后小鼠的中毒反应及死亡情况, 用于初步评价受试物毒性, 探讨不同批号的雄黄中可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性间的关系。**方法:** 对 3 个不同批号的雄黄进行总砷含量、可溶性砷和价态砷的测定, 根据预试验结果确定不同批号雄黄的最高剂量。将不同批号的雄黄混悬液分别按 0.85 依次递减的比例单次 ig 给药, 观察给药后各组小鼠中毒反应及死亡情况, 连续观察 14 d, 通过 SPSS 统计软件分析得半数致死量 (LD₅₀) 及其 95% 的可信区间。**结果:** 3 个批号的雄黄总砷含量分别为 95.5%, 96.0%, 94.8%, 可溶性砷分别为 3.32%, 5.23%, 6.73%, 价态砷分别为 1.39%, 3.26%, 4.36%, 测得 LD₅₀ 分别为 2.069 g·kg⁻¹, 1.319 g·kg⁻¹, 1.100 g·kg⁻¹。用 2 倍 LD₅₀ 的雄黄上清液给药, 结果小鼠全部死亡。**结论:** 雄黄的毒性存在于可溶性部分, 可溶性砷和价态砷含量与小鼠急性毒性间呈高度相关关系, LD₅₀ 与可溶性砷和价态砷呈负相关关系, 即可溶性砷和价态砷含量越高毒性越大, 与总砷含量的相关性差。

[关键词] 雄黄; 可溶性砷; 价态砷; 急性毒性; 半数致死量 LD₅₀

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0230-04

Soluble Arsenic, Valence Arsenic and Their Acute Toxicity in Mice

GU Jing-jing¹, HUANG Zhen-zhen¹, GU Ying-min¹, TANG Jia-ming^{1*}

XIA Jing², WANG Mei-bo², JI Shen²

(1. Experimental Animal Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate realgar suspension's toxicity and to find out the relationship between the content of soluble arsenic, valence arsenic of realgar suspension come from different batches and the acute toxicity in mice by observing mice's intoxication reaction and mortality after single-dose intragastric administration with the realgar suspensions. **Method:** The content of total arsenic, soluble arsenic and valence arsenic from 3 different batches of realgar suspension were tested. The maximum dose level was determined according to the results of preliminary test. Toxicity experiment was designed with ig dose proportion of 0.85. Mice's intoxication reaction and mortality were observed after administration for 14 days, LD₅₀ and 95% confidence interval were obtained by SPSS software. **Result:** The total arsenic content of 3 different batches of realgar suspension was 95.5%, 96.0% and 94.8% respectively, soluble arsenic content was 3.32%, 5.23% and 6.73% respectively, valence arsenic content was 1.39%, 3.26% and 4.36% respectively. LD₅₀ obtained from different batches was 2.069 g·kg⁻¹, 1.319 g·kg⁻¹ and 1.100 g·kg⁻¹ respectively. When doubled dosage of LD₅₀ was ig applied, the mice were all dead. **Conclusion:** The experiment shows that the toxicity of realgar exists in the water soluble components. Soluble

[收稿日期] 20101101(008)

[基金项目] 科技部重大新药创制基金(上海中医药大学 2009ZX09502-002; 上海市食品药品检验所 2009ZX09502-024)

[第一作者] 顾晶晶, 硕士生, 从事中药毒理学研究, Tel: 021-51322648, E-mail: gujingtingcm@163.com

[通讯作者] * 汤家铭, 研究员, 从事中药毒理研究, Tel: 021-51322647, E-mail: tangjiaming@hotmail.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:50

arsenic and valence arsenic have strong negative correlation with LD_{50} , which means the higher the content of soluble arsenic and valence arsenic, the higher the toxicity of realgar suspension, while LD_{50} doesn't correlate well with total arsenic content.

[Key words] realgar; soluble arsenic; valence arsenic; acute toxicity; LD_{50}

雄黄(realgar)是一种常用的矿物类中药,具有解毒杀虫,燥湿祛痰,截疟等功效^[1]。雄黄的主要成分为二硫化二砷(As_2S_2),药典要求本品砷含量以 As_2S_2 计,不得少于90%^[2]。现代研究表明,雄黄可促使白血病细胞^[3-5]、血细胞^[6]、肿瘤细胞^[7]等凋亡,同时还具有增强免疫功能^[7]等作用。长期以来中医认为雄黄有毒,内服宜慎,不可久用,孕妇禁用,因此雄黄作为有毒中药一直受到药政部门的严格控制。有人认为雄黄中杂质 As_2O_3 含量的多少直接决定了其毒性的大小^[8]。叶祖光等^[9]报道,雄黄中的可溶性砷部分为其活性成分,而 As_2S_2 是不被机体所吸收的无活性成分(约占给药量的99%)。因此,阐明雄黄中主要毒性成分对今后控制临床用量、把握疗效和降低毒性作用具有重要意义。本实验试图通过测定不同批号雄黄的总砷含量、可溶性砷、价态砷和小鼠急性毒性 LD_{50} ,探讨雄黄中可溶性砷和价态砷与小鼠急性毒性 LD_{50} 间的关系。

1 材料

1.1 受试药物 雄黄饮片(批号 H2007052401, H2009102405, H2009102407, 产自湖南石门雄黄矿业不同矿区),由上海食品药品监督管理局委托上海封浜中药饮片厂按照《中国药典》2010年版用球磨机水飞法研磨,120目过筛进行炮制。羧甲基纤维素钠(批号 H20090508, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 动物 清洁级 ICR 小鼠,雌雄各半,4周龄,体重 20~22 g,由上海斯莱克试验动物有限公司提供,实验动物使用许可证号 SCXK(沪)2007-0005。动物购入后,饲养在清洁级动物实验室内,实验动物使用许可证号 SYXK(沪)2009-0069,温度控制在 20~25℃,湿度控制在 40%~70%。经适应性饲养 2~3 d 后用于实验。

2 方法

2.1 雄黄饮片总砷含量、可溶性砷、价态砷的测定

各批号雄黄总砷含量、可溶性砷、价态砷的测定由上海市食品药品监督管理局中药天然药物室检测。总砷含量使用电感耦合等离子体原子发射光谱法测定。可溶性砷使用 ICP-MS 法测定,价态砷使用 HPLC 与

ICP-MS 联用法测定。

2.2 小鼠 LD_{50} 测定 根据预试验的结果,确定不同批号雄黄的急性毒性 LD_{50} 的最高剂量,将各剂量组间距比设为 1:0.85 依次递减。不同批号雄黄均以 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液(CMC-Na)助悬,配制成不同浓度的混悬液备用。

小鼠给药前 12 h 禁食不禁水,不同批号的雄黄试验组分别按体重分层随机分成阴性对照组和给药组,每组 10 只,雌雄各半。阴性对照组(A组)给予等容量 CMC-Na 溶液,给药组(B-G组)给予不同浓度的雄黄混悬液,按 40 mL·kg⁻¹ ig 给药 1 次。

根据《中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则》(2005.3)^[10]介绍的观察指标,给药后,尤其是给药后 4 h 内严密观察,连续观察 14 d,包括动物体重变化、饮食、行为、分泌物、排泄物等,并记录中毒死亡时间,中毒反应起始时间、持续时间、恢复期是否可逆,动物最短死亡时间,最长死亡时间,平均死亡时间等。对死亡动物和观察期结束后动物进行大体解剖观察,并作记录。根据各组小鼠的死亡情况计算各批次小鼠 LD_{50} 。

2.3 雄黄混悬液上清的小鼠毒性试验 将不同批次雄黄按 2 倍剂量 LD_{50} 悬于蒸馏水中,水浴 2 h 后,1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液后给小鼠 ig 给药,观察小鼠死亡情况。

2.4 统计学处理 小鼠 LD_{50} 与总砷含量、可溶性砷和价态砷含量的相关性分析均采用 SPSS 13.0 软件进行分析。

3 结果

3.1 总砷含量、可溶性砷和价态砷含量测定 由表 1 可见,3 个批号的雄黄总砷含量 94.8%~96.0%,上下相差 1.2%,而可溶性砷含量最高和最低相差 2 倍多,价态砷相差 3 倍多。可溶性砷与价态砷含量之间密切相关,二者的相关系数 $r=0.997$;而总砷含量与可溶性砷及价态砷之间相关性低,总砷含量与可溶性砷的 $r=-0.523$,总砷含量与价态砷的 $r=-0.454$ 。

3.2 一般状态和死亡情况观察 不同批号雄黄给

表 1 不同批号总砷含量、可溶性砷和价态砷含量测定

产地	批号	总砷含量	可溶性砷	价态砷
		/%	/%	/%
湖南石门	H2007052401	95.5	3.32	1.39
雄黄矿业	H2009102405	96.0	5.23	3.26
	H2009102407	94.8	6.73	4.36

药后小鼠均呈现安静少动态,进食减少,排出的大便为橙红色。部分出现中毒症状的小鼠均出现伏地、四肢瘫软、呆滞,继而出现反复翻转、角弓反张,抽搐等症状,最终在 1~2 d 内死亡。剂量越大,小鼠中毒反应症状越明显,从出现中毒症状到死亡的持续时间越少。

给药后 24 h 内小鼠死亡数分别占全部死亡数的 92%,98%,96%,个别动物 24~48 h 内死亡,表明不同批号雄黄致小鼠中毒和死亡时间基本一致。小鼠死亡率与性别无关。未死亡小鼠在给药后 1~2 d 就开始恢复,逐渐恢复正常。

不同批号雄黄给药后死亡小鼠经尸体解剖,肉眼观察除可见胃、空肠、回肠部可见橙黄色药液沉积外,其余部位肉眼均未见明显异常。

对不同批号雄黄给药组存活小鼠在给药后的第 1,2,7,14 天进行了体重测定,结果显示,与阴性对照组相比,各组存活小鼠体重在第 2 天和(或)第 7 天有一过性轻微下降趋势,均在第 7 天和(或)14 天恢复正常。说明给药对存活小鼠的体重影响是一过性的,经统计学分析无显著意义。

对存活小鼠耗食量的观察,发现给药组存活小鼠的摄食量无明显变化,与对照组小鼠的耗食量基本相同,说明药物对小鼠耗食量没有影响。

观察 14 d 后解剖存活小鼠,肉眼观察均未发现脏器有病理性改变。

3.3 14 d 小鼠 LD₅₀ 的计算 不同批号雄黄给药 14d 后的小鼠死亡情况见表 2。采用 SPSS 13.0 软件分析,得不同批号雄黄(批号 H2007052401, H2009102405, H2009102407)的 LD₅₀ 分别为 2.069, 1.319, 1.100 g·kg⁻¹, 95% 可信区间分别为 1.817~2.296 g·kg⁻¹, 1.224~1.420 g·kg⁻¹, 0.992~1.208 g·kg⁻¹。

3.4 小鼠 LD₅₀ 与总砷含量、价态砷、可溶性砷之间的关系 LD₅₀ 与总砷量、可溶性砷及价态砷之间的回归方程和 *r* 依次为 $Y = 25.968X - 23.286$, $r =$

表 2 不同批号雄黄给药 14 d 内小鼠的死亡情况(*n* = 10)

组别	H2007052401		H2009102405		H2009102407	
	给药剂量	死亡率	给药剂量	死亡率	给药剂量	死亡率
	/g·kg ⁻¹	/%	/g·kg ⁻¹	/%	/g·kg ⁻¹	/%
A 组	-	0	-	0	-	0
B 组	1.55	0	0.95	0	0.81	0
C 组	1.83	60	1.12	10	0.95	40
D 组	2.15	50	1.32	50	1.12	60
E 组	2.53	70	1.55	90	1.32	60
F 组	2.98	90	1.83	100	1.55	100
G 组	3.50	100	2.15	100	1.83	100

0.308 ; $Y = -30.424X + 3.0662$, $r = -0.972$; $Y = -33.423X + 2.4998$, $r = -0.988$ 。

经相关性统计计算,LD₅₀ 与价态砷和可溶性砷的相关性较好,呈负相关,表明随着价态砷和可溶性砷浓度的升高,对小鼠的急性毒性增加;LD₅₀ 与总砷量的相关性较差,表明雄黄的毒性与总砷含量关系不大。

3.5 不同批号雄黄上清液给药后小鼠死亡情况 用 2 倍剂量 LD₅₀ 的雄黄上清液 ig 给药,结果 3 个批号雄黄上清液,每批 10 只小鼠给药 24 h 内全部死亡,中毒反应起始时间和症状同雄黄混悬液。

4 讨论

关于雄黄毒性的大小文献报道^[11-12]各不相同,可能与产地、炮制方法等不同有关。本次实验我们采用产自湖南石门雄黄矿业不同矿区并经过正规工艺加工的雄黄饮片,结果发现不同批号雄黄的 LD₅₀ 1.1~2.1 g·kg⁻¹,上下相差 1.0 g·kg⁻¹左右,毒性明显高于文献报道的实验结果,说明来源和毒性大小有关。在炮制方法上我们曾用雄黄药材自己加工研磨,用 80 目筛子过筛进行 ig 给药小鼠急性毒性试验,结果剂量高达 20 g·kg⁻¹ 无动物死亡,对此的解释可能是雄黄在水飞法炮制时研磨得越细,在液体(胃液、肠液)中可溶性砷溶解得越多,因而毒性越大。

我们的实验结果显示,小鼠急性毒性 LD₅₀ 值与雄黄的价态砷和可溶性砷浓度呈高度相关,价态砷和可溶性砷的含量越高,雄黄的毒性越大,因此,雄黄的毒性成分是溶解在液体中的。我们用 2 倍 LD₅₀ 的雄黄混悬液上清给药结果小鼠全部死亡,就证明了这一点。雄黄的总砷含量与小鼠急性毒性关系不

大。由于可溶性砷既是雄黄的药效活性部分,又是毒性成分,因此我们在利用其药理作用的同时,要清楚地认识到它的毒性作用,从而把握治疗剂量与中毒剂量之间的关系。

本次实验中不同批号的雄黄之间 LD_{50} 虽有明显差异,但中毒反应症状、程度、持续时间及死亡时间基本一致,死亡率与性别无关。给药后对小鼠的体重进行统计处理后发现,给药组与对照组小鼠相比无统计学意义,说明药物对存活小鼠的体重影响是一过性的。根据我国 1978 年工业企业设计卫生标准科协会建议中毒性分级标准^[13],实验所选用的 3 个批次的雄黄毒性均相当于低毒性矿物药。

[参考文献]

- [1] 张明发,李淑君. 雄黄和含雄黄中成药再认识[J]. 中国执业药师,2008,50(2):26.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:316.
- [3] 钟璐,陈芳源,韩洁英,等. ATRA 和雄黄对白血病细胞 PML 基因及蛋白表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2001,21(2):106.
- [4] 陈思宇,刘陕西,张梅. 雄黄对急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞基因表达谱的影响[J]. 第四军医大学学

- 报,2002,23(6):封2.
- [5] 刘延芳,陆道培,江滨. 四硫化四砷对 NB4 细胞增殖的抑制作用[J]. 中原医刊,2006,33(12):3.
- [6] 李国明,王鑫国,李青. 雄黄诱导小鼠血细胞凋亡的形态学研究[J]. 上海医学检验杂志,2000,15(2):91.
- [7] 刘京生,吕占军,董兰凤,等. 雄黄诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 河北中医,2000,22(11):874.
- [8] 张娟,刘启德,汤毅珊. 雄黄中砷的毒副作用研究进展[J]. 中国药房,2007,18(15):1178.
- [9] 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]. 医学研究通报,2005,34(9):35.
- [10] 《中药、天然药物急性毒性试验技术指导原则》课题研究组. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[S]. 2005:3.
- [11] 李信民,陈思宇,王怀宇,等. 瑞尔康主成分雄黄的动物急性毒性试验[J]. 现代中医,2001(1):43.
- [12] 全燕,张英军,李先荣. 湖南石门雄黄的研究[J]. 中国中医药科技,1997,4(5):286.
- [13] 岳旺,刘文虎,王兰芬,等. 中国矿物药的急性毒性 (LD_{50}) 测定[J]. 中国中药杂志,1989,14(2):42.

[责任编辑 聂淑琴]