

• 药理与临床 •

基于高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法的大鼠口服纳米雄黄后体内砷形态分析

姜 新¹, 李少元², 邓小颖², 张尊建², 黄 寅^{2*}

1. 江苏省疾病预防控制中心理化检验所, 江苏 南京 210009

2. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 对大鼠口服雄黄与纳米雄黄后血清、肝、肾、脾中三价砷[As(III)]、五价砷[As(V)]、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA) 4种砷形态进行定量分析, 比较两组大鼠体内砷形态的差异。**方法** SD大鼠分别ig给予800 mg/kg的雄黄与纳米雄黄, 28 d后采集血清及各组织样本, 经前处理后采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)测定生物样本中砷形态含量并进行比较。**结果** 4种砷形态在大鼠血清和肾脏样本中均被检出, 肝脏中检出了3种, 脾脏中检出了2种; 各砷形态在纳米雄黄组中的含量明显高于雄黄组。**结论** 纳米化提高了雄黄的生物利用度, 更多的砷被吸收入体内并发生代谢转化, 这可能导致纳米雄黄肝、肾等毒性增加。

关键词: 纳米雄黄; 砷形态; 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法; 砷毒性; 三价砷、五价砷、一甲基砷酸、二甲基砷酸
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5328-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.016

Determination of arsenic species in serum, liver, kidney, and spleen of realgar nanoparticles treated rats by HPLC-ICP-MS

JIANG Xin¹, LI Shao-yuan², DENG Xiao-ying², ZHANG Zun-jian², HUANG Yin²

1. Physical and Chemical Analysis Department, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China

2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** Quantitative analysis of four arsenic species As (III), As (V), monomethyl arsenate (MMA), dimethyl arsenate (DMA) in rat serum, liver, kidney, and spleen was performed to compare their differences between realgar and realgar nanoparticles (NPs) groups. **Methods** SD rats were ig treated with blank solvent, realgar, and realgar NPs (800 mg/kg) respectively. After 28 d of continuous administration, serum and tissues were collected and four arsenic species were determined by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). **Results** Four arsenic species were detected in serum and kidney of rats, three were detected in the liver and two in the spleen. The content of arsenic species in the realgar NPs group was significantly higher than that in the realgar group. **Conclusion** Nanotechnology enhanced the bioavailability of realgar, and more arsenic was absorbed into the body and underwent metabolic transformation, which might lead to increased toxicity of realgar NPs.

Key words: realgar nanoparticles; arsenic species; ICP-MS; arsenic toxicity; As (III); As (V); monomethyl arsenate (MMA); dimethyl arsenate (DMA)

雄黄是一味历史悠久、应用广泛的中药, 传统中医认为其具有解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟之功效。现代医学研究发现, 其可用于治疗急性早幼粒细胞白血病、肝癌、食管癌等恶性肿瘤^[1]。但是, 雄黄溶解性差、生物利用度低, 限制了其临床应用。20

世纪初, 雄黄被成功纳米化, 有研究显示, 与传统雄黄相比, 纳米雄黄的抗肿瘤活性显著增强^[2-3]; 本课题组经前期研究发现, 纳米雄黄的肝、肾毒性亦显著增加^[4-5]。雄黄纳米化后药效和毒效的改变很可能源于其体内暴露量的变化, 雄黄主含四硫化四砷

收稿日期: 2018-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(81403181); 江苏省自然科学基金项目(BK20140664)

*通信作者 黄 寅, 博士, 副教授。Tel: (025)83271185 E-mail: huangyin@cpu.edu.cn

(As₄S₄)，有文献以总砷含量为指标，初步证实纳米化提高了雄黄的生物利用度。但是，砷的形态多样、毒性差异很大，如三价无机砷的毒性是五价无机砷的10倍^[6]，仅测定总砷含量难以与药效或毒效关联，因此，有必要对雄黄纳米化后体内各砷形态变化规律开展研究。

目前，色谱分离技术（如液相色谱、气相色谱等）与元素分析技术（如石墨炉原子吸收、原子荧光光谱法等）联用是元素形态分析的常用手段。其中，高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱（HPLC-ICP-MS）联用技术具有检测限低、线性范围广、多元素同时测定等优点，可以实现对复杂生物样本中多种元素形态的分析^[7-9]。因此，本研究采用HPLC-ICP-MS技术建立了不同生物基质中三价砷[As(III)]、五价砷[As(V)]、一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA)4种砷形态的同时测定方法，定量分析大鼠口服雄黄与纳米雄黄后血清和肝、肾、脾组织中各砷形态的含量，为纳米雄黄的研发及应用提供参考。

1 材料

1.1 药品和试剂

雄黄（批号140408，As₄S₄质量分数>90%）购自郑州瑞龙制药股份有限公司，由秦皇岛太极环纳米制品有限公司加工至纳米级别〔经南京大学现代分析中心通过扫描电子显微镜（SEM）鉴定，平均粒径在200 nm左右〕。砷标准物质As(III)、As(V)购自中国计量科学研究院；MMA和DMA购自德国DR. Ehrenstorfer公司；乙酸钠、硝酸钾、磷酸氢二钠、乙醇、甲醇等试剂均为色谱纯；水由Milli-Q超纯水制备系统制得。

1.2 仪器

LC20-AB（日本岛津公司）与Agilent 7900 ICP-MS（美国Agilent公司）联用，采用HAMILTON PRP-X100阴离子交换柱（250 mm×4.1 mm，10 μm）。

1.3 实验动物

SD雄性大鼠22只，体质量（180±10）g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，合格证编号2008001663731，许可证号SCXK（沪）2013-0016。

2 方法

2.1 动物实验与样本采集

SD雄性大鼠随机分成3组，分别为对照组（6只）、雄黄组（8只）和纳米雄黄组（8只）。用0.5%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）配制雄黄和纳米雄黄

混悬液，给药组每日9:00 ig给药1次，给药剂量根据课题组前期的实验结果确定为800 mg/kg^[4-5]，连续给药28 d；对照组同期ig 0.5% CMC-Na溶液1.0 mL。于第28天眼眶取血，静置1 h后离心10 min（4℃、10 000 r/min），精密量取血清100 μL置于1.5 mL离心管中；处死大鼠取肝、肾、脾组织，用生理盐水洗净；所有生物样本于-80℃冻存。

2.2 样品前处理

分别取100 mg肝、肾、脾组织，精密称定，按1:4（质量体积比）加入约400 μL生理盐水，匀浆制成组织匀浆液。取血清或组织匀浆液100 μL，加入100 μL甲醇和200 μL水，涡旋3 min后水浴超声10 min，于4℃、16 000 r/min离心10 min后取上清液，再离心浓缩30 min除去甲醇，加水定容至500 μL，待测。

2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱采用HAMILTON PRP-X100阴离子交换柱（250 mm×4.1 mm，10 μm），进样量为200 μL，流动相A：2 mmol pH 9.0的磷酸二氢氨溶液，流动相B：10 mmol乙酸钠+3 mmol硝酸钾+10 mmol磷酸氢二钠+0.2 mmol EDTA+1%乙醇，并用氨水调节pH值为10。梯度洗脱程序：0~5 min，100% A；5.01~20 min，100% B；体积流量1.0 mL/min，进样量200 μL。

2.3.2 ICP-MS条件 射频电流功率1 550 W，射频电压1.8 V；载气为Ar气，体积流量15.0 L/min；辅助气体积流量0.7 L/min，雾化器气体积流量0.97 L/min；碰撞气为He气，体积流量5 mL/min；停留时间为100 ms；采集质量数75，采样深度10.0 mm；泵速0.25 r/s。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取各组大鼠空白血清和肝、肾、脾组织样本各6份，按照“2.2”和“2.3”项所述条件处理和分析，以考察该方法的专属性。

2.4.2 线性关系、检测限及定量限测定 精密吸取含As(III)、As(V)、DMA和MMA的混合标准溶液10 μL，加入空白血清或肝、肾、脾组织匀浆液100 μL，配制成系列质量浓度的样本，每个质量浓度各5份，按“2.2”项中方法处理后进样，记录峰面积，以待测组分质量浓度为横坐标，待测组分峰面积为纵坐标绘制标准曲线；血清和组织样本中各砷形态的检测限以信噪比（S/N）>3确定，定量限以S/N>10确定。

2.4.3 准确度和精密度考察 按照标准曲线测定方法,配制含 4 种砷形态的高、中、低 3 个不同质量浓度的血清和肝、肾、脾组织质控(QC)样本各 6 份,在同一批内平行测定 6 次,计算批内精密度。在不同日期同样制备并分析 3 批,计算批间精密度。准确度以 6 次测定结果的平均值与精确加入的标准物质质量浓度的比值表示,精密度以相对标准偏差(RSD)表示。

2.4.4 回收率考察 制备大鼠血清、肝、肾和脾的高、中、低质量浓度 QC 样本各 5 份,按“2.2”项下处理后进样分析,记录峰面积为 A_s ;取血清和肝、肾、脾样本按“2.2”项下处理至除去甲醇后,加入 QC 样本质量浓度匹配的混合标准溶液各 5 份,定容、进样分析,记录峰面积为 A_r ;回收率由 A_s 与 A_r 的比值计算所得。

2.4.5 稳定性考察 制备大鼠血清、肝、肾和脾的高、中、低质量浓度 QC 样本各 9 份,等分为 3 组,第 1 组立即处理分析,第 2 组于室温放置 6 h 后处理分析,第 3 组于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 30 d 后处

理分析;将第 2、3 组所得各砷形态质量浓度分别与第 1 组比较,考察室温放置稳定性和长期冷冻稳定性。

2.5 数据处理

样本测定结果经 SPSS 软件(Statistics 19, IBM, 美国)进行独立样本 t 检验,比较分析雄黄组和纳米雄黄组间各砷形态差异的显著性。

3 结果

3.1 样品前处理条件优化

本研究分析的形态包括无机砷和有机砷,提取试剂需选用一定比例的甲醇和水,并借助涡旋、超声等来提高提取效率,故本研究采用均匀设计法^[10],考察了甲醇和水的体积以及涡旋和超声时间 4 个因素对提取效率的影响。选用 $U_8(4^4)$ 均匀设计表(表 1),将 100 μL 空白血清(或组织匀浆液)与 20 μL 混标混合,按表 1 的设计平行处理,采用 ICP-MS 测定各实验方案组各砷形态的峰面积,经比较后发现方案 6 提取效率最高(表 1),故选择方案 6 为样品预处理方法。

表 1 $U_8(4^4)$ 均匀设计实验安排与结果
Table 1 $U_8(4^4)$ uniform design and experiment arrangement

方案	实验安排				峰面积			
	甲醇体积/ μL	水体积/ μL	涡旋时间/min	超声时间/min	As(III)	As(V)	DMA	MMA
1	300 (3)	0 (1)	3 (3)	30 (3)	73 030	340 406	198 986	109 579
2	400 (4)	100 (3)	2 (2)	30 (3)	134 125	457 954	235 579	85 621
3	400 (4)	50 (2)	5 (4)	40 (4)	138 302	489 737	214 320	97 074
4	200 (2)	100 (3)	5 (4)	20 (2)	78 659	307 312	282 133	105 230
5	100 (1)	0 (1)	1 (1)	20 (2)	122 386	402 757	160 035	99 122
6	100 (1)	200 (4)	3 (3)	10 (1)	160 798	551 980	293 865	157 674
7	200 (2)	50 (2)	2 (2)	10 (1)	107 459	349 998	172 269	94 544
8	300 (3)	200 (4)	1 (1)	40 (4)	146 865	495 150	215 494	120 197

3.2 方法学考察结果

专属性考察结果表明,大鼠血清和肝、肾、脾样本中的内源性物质与 4 种砷形态完全分离,不干扰其测定,血清、肝、肾、脾中各砷形态的典型离子流图见图 1,各砷形态保留时间为 4.0~17.5 min。血清及肝样本中各砷形态的线性方程、定量限和检测限分别见表 2 和 3。在肾和脾组织样本中,As(III)、As(V)、DMA 和 MMA 的线性范围分别与其在肝脏样本中相同,定量限为 4~10 ng/g,可满足真实样本分析的需求。

血清和组织样本高、中、低 3 个质量浓度的批

内精密度与批间精密度均小于 15%,准确度均在 85%~115%,表明该方法准确、可靠,重复性好。提取回收率均大于 80%且稳定,符合生物样本检测要求。室温放置 6 h 和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 30 d 后 RSD 均小于 15%,证明各样本在此条件下稳定。血清样本中各砷形态精密度、准确度和提取回收率结果见表 4。

3.3 血清及各组织中砷形态的含量比较

大鼠口服雄黄或纳米雄黄后各砷形态在血清和组织样本中的含量见图 2。在血清中,4 种砷形态均被检出,其中 As(V)、DMA 和 MMA 在纳米雄黄组中的含量比雄黄组显著升高($P<0.01$ 、 0.001);As(III)

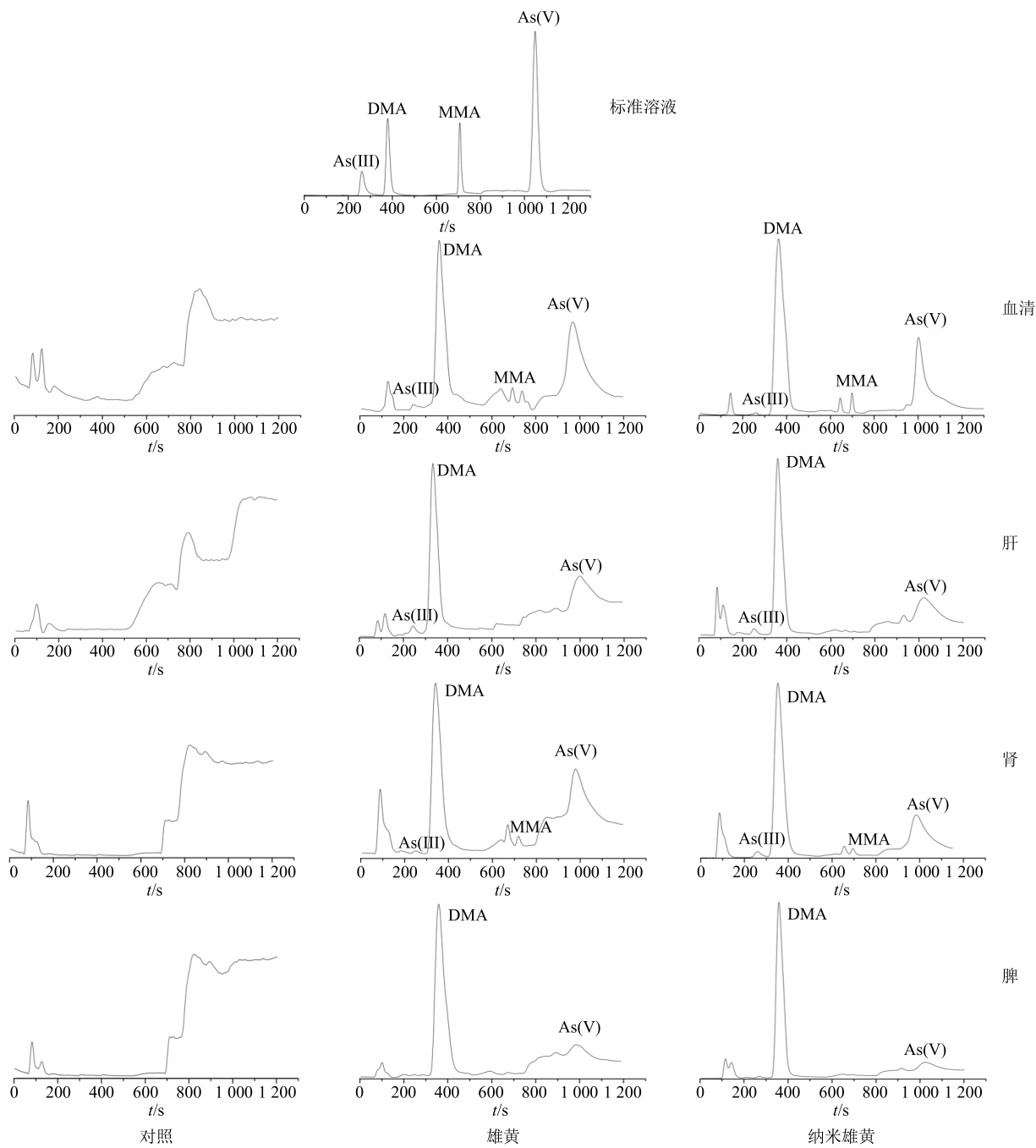


图 1 标准溶液及各组大鼠血清、肝、肾、脾中各砷形态离子流图

Fig. 1 Typical ion chromatogram of four arsenic species in standard solution and serum, liver, kidney, and spleen in rats

表 2 血清中各砷形态标准曲线方程、定量限和检测限

Table 2 Linearity, lower limit of detection, and lower limit of quantitation of arsenic species in serum

砷形态	线性方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r ²	定量限/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)
As(III)	$Y=0.000\ 376\ 68\ X-0.042\ 15$	1~50	0.998	1.0	0.4
DMA	$Y=0.000\ 251\ 61\ X-0.363\ 6$	1~1 000	0.999	1.0	0.4
MMA	$Y=0.000\ 757\ 01\ X-0.049\ 963$	2.5~200	0.995	2.5	0.9
As(V)	$Y=0.000\ 127\ 4\ X+1.703\ 1$	2.5~200	0.999	2.5	0.9

表 3 肝脏中各砷形态标准曲线方程、定量限和检测限

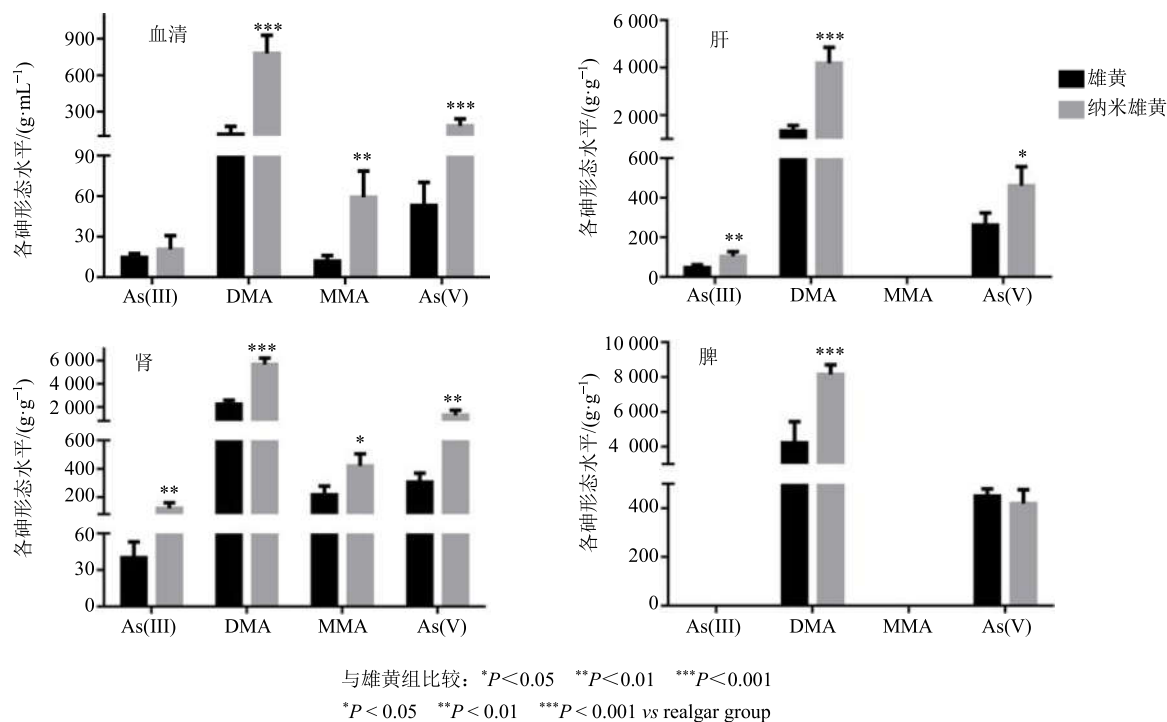
Table 3 Linearity, lower limit of detection, and lower limit of quantitation of arsenic species in liver

砷形态	线性方程	线性范围/(ng·g ⁻¹)	r ²	定量限/(ng·g ⁻¹)	检测限/(ng·g ⁻¹)
As(III)	$Y=0.001\ 43\ X+1.10$	4~200	0.996	4	1.5
DMA	$Y=0.001\ 01\ X+0.403$	4~4\ 000	0.998	4	1.5
MMA	$Y=0.003\ 00\ X+5.18$	10~800	0.993	10	4.0
As(V)	$Y=0.000\ 498\ X+6.18$	10~800	0.995	10	4.0

表 4 血清中各砷形态精密性、准确度和提取回收率

Table 4 Precision, accuracy, and extraction recovery of arsenic species in serum

砷形态	加标 ρ /(ng·mL ⁻¹)	实测 ρ /(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	提取回收率/%
As(III)	3	2.81	93.67	8.27	10.37	96.55
	20	19.01	95.05	7.99	12.49	86.99
	50	52.29	104.58	8.45	7.68	93.34
DMA	3	3.11	103.67	14.63	12.50	103.87
	500	511.03	102.21	5.81	6.99	92.27
	1\ 000	1\ 133.77	113.37	7.09	8.97	103.24
MMA	7.5	7.25	96.67	8.94	9.66	93.24
	100	94.68	94.68	6.97	7.04	95.48
	200	196.64	98.32	11.55	11.28	99.43
As(V)	7.5	7.12	94.93	12.06	13.97	92.51
	100	108.06	108.06	12.15	10.62	88.47
	200	189.11	94.56	8.69	7.90	107.40

图 2 雄黄组和纳米雄黄组大鼠血清、肝、肾、脾中各砷形态含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 2 Content of four arsenic species in rat serum, liver, kidney, and spleen from realgar group and realgar NPs group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

的含量有升高趋势但无统计学差异。在肝脏中,只检测到 As(III)、As(V) 和 DMA, 其中 As(III)、As(V) 在纳米雄黄组中显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), DMA

显著升高 ($P < 0.001$)。肾脏中 4 种砷形态也均被检出, 且其含量在纳米雄黄组中均显著升高。脾脏中只检测到 As(V) 和 DMA, 其中纳米雄黄组 DMA

含量显著性升高 ($P<0.001$), 而 As(V) 含量无明显变化。此外, 对照组大鼠各生物样本中均未检测到 4 种砷形态。

4 讨论

纳米中药自 20 世纪末提出后一直是中药现代化研究的热点之一。与传统中药相比, 纳米中药具有独特的表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应等理化性质^[1]。这些特性影响了纳米中药在体内的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 过程, 使其生物利用度提高、靶向性增强, 但在提高药效的同时也可能增加毒性^[12]。

本实验结果发现雄黄纳米化后, 各砷形态含量在不同组织中均有不同程度的上升, 这表明纳米雄黄的生物利用度显著提高, 更多的砷被吸收进入体内并发生代谢转化。本实验测定的 4 种砷形态毒性差异较大, As(III) 毒性最强, As(V) 次之, MMA 与 DMA 是无机砷在体内甲基化代谢的产物, 毒性远小于无机砷, 如 DMA 毒性仅为 As(III) 的 1/171。现有研究表明, As(III) 与 As(V) 通过不同机制干扰细胞能量代谢通路中 ATP 的生成, 引起凋亡诱导因子的释放, 造成细胞受损、死亡^[13]。As(III) 通过键合糖代谢通路中关键酶——丙酮酸脱氢酶的巯基而影响 ATP 的生成; As(V) 竞争替代无机磷酸盐中的磷酸根, 造成糖酵解及呼吸链中氧化磷酸化解偶联, ATP 生成减少。此外, As(III) 还可抑制谷胱甘肽的生成而引起氧化应激反应, 对机体造成损伤, As(V) 可在机体内转化成 As(III) 进一步发挥毒性^[14]。

对于 As(III) 与 As(V) 这 2 种无机砷, 其在纳米雄黄组大鼠肝、肾中的含量均极显著增加 (1.8~3.9 倍)。结合本课题组前期研究成果^[4-5], 可以推知, 纳米雄黄更严重的肝、肾毒性可能是由这 2 种强毒性的无机砷的体内暴露量升高所导致。此外, 各组大鼠脾脏中均未检出 As(III), 且纳米雄黄组脾脏 As(V) 的含量也未显著升高, 这与课题组前期实验未发现纳米雄黄对脾脏造成明显损伤相吻合。

本研究利用均匀设计法优化和建立了大鼠血清和肝、肾、脾组织中 As(III)、As(V)、MMA、DMA 砷形态的 HPLC-ICP-MS 测定方法, 并应用该方法比较分析了大鼠口服雄黄与纳米雄黄后体内各种砷形态的含量, 发现纳米雄黄组大鼠肝、肾组织中 As(III) 和 As(V) 的水平显著升高, 这为进一步阐明纳米雄黄的毒效作用机制提供了科学依据。

参考文献

- [1] Wang L, Zhou G B, Liu P, *et al.* Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [2] Zhao Q H, Zhang Y, Liu Y, *et al.* Anticancer effect of realgar nanoparticles on mouse melanoma skin cancer *in vivo* via transdermal drug delivery [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(2): 203-212.
- [3] 伏旭, 李培武, 尹稳. 雄黄抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(11): 914-920.
- [4] Zhang M H, Chen J Q, Guo H M, *et al.* Combination of LC/MS and GC/MS based metabolomics to study the hepatotoxic effect of realgar nanoparticles in rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(9): 684-694.
- [5] 余霞霞, 李少元, 华云飞, 等. 纳米雄黄肾毒性的代谢组学研究 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(3): 328-333.
- [6] Beesley L, Inneh O S, Norton G J, *et al.* Assessing the influence of compost and biochar amendments on the mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil [J]. *Environ Poll*, 2014, 186: 195-202.
- [7] 杨凡, 孟庆雄, 彭珍华, 等. 电感耦合等离子体质谱联用技术应用进展 [J]. 现代仪器, 2012, 18(5): 1-6.
- [8] 赵一懿, 郭洪祝, 傅欣彤, 等. 基于 ICP-MS 法分析银杏叶系列品种中 25 种无机元素 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1991-1997.
- [9] 丁华永, 彭华毅, 林绥. 基于 ICP-MS 法的麝香保心丸中 26 种无机元素分析 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 847-852.
- [10] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [11] Huang Y, Zhao Y, Liu F, *et al.* Nano traditional Chinese medicine: Current progresses and future challenges [J]. *Current Drug Targets*, 2015, 16(13): 1548-1562.
- [12] Ling C, Wang L, Wang Y, *et al.* The roles of traditional Chinese medicine in gene therapy [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(2): 67-75.
- [13] Dixit G, Singh A P, Kumar A, *et al.* Sulfur mediated reduction of arsenic toxicity involves efficient thiol metabolism and the antioxidant defense system in rice [J]. *J Hazard Mater*, 2015, 298: 241-251.
- [14] Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, *et al.* Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease [J]. *J Appl Toxicol*, 2011, 31(2): 95-107.