

地龙药材及其处方制剂散寒化湿颗粒中总砷及砷形态研究

王书娟¹, 胡军华^{2,3}, 姚雪^{2,3}, 汪盛华^{2,3}, 周恩丽^{2,3}, 章晨峰^{2,3}, 于桂芳^{2,3*}, 王振中^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 探究地龙药材至制剂过程中总砷及砷形态、价态的传递规律, 以期建立地龙药材及散寒化湿颗粒 (Sanhan Huashi Granules, SHG) 中砷含量的限度, 保障 SHG 的安全。方法 采用电感耦合等离子体质谱法 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 对经微波消解后的地龙药材到 SHG 进行总砷含量的测定; 采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法 (high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-ICP-MS) 对其进行砷形态、价态的测定分析; 并考察多批次 SHG、不同产地地龙药材中砷总量以及各形态、价态的差异。结果 地龙药材、饮片、提取液及制剂在传递过程中总砷含量呈递减趋势, 阴性样品中检出极少量的砷, 总砷从药材至制剂的平均转移率为 52.00%, 饮片到制剂中的平均转移率为 60.81%; 28 批 SHG 与 24 批地龙中砷形态及价态存在形式及规律基本一致, 即基本以毒性较大的 As(III) 和 As(V) 为主, 其他毒性较小的有机砷含量极低甚至未检出; 结合地龙药材市场供应情况、多批次地龙研究结果以及临床批制剂所用地龙的使用情况, 暂拟定地龙药材中 As 的限度为 15.00 mg/kg。基于量-值传递规律及制剂处方, 暂拟定 SHG 中 As 的限度为 2.50 mg/kg。结论 建立的 SHG 中的总砷与砷形态的含量测定方法高效快速、准确性及稳定性良好。同时基于该方法初步探究了 SHG 中总砷及砷形态、价态的传递规律, 并分别拟定地龙及 SHG 中砷含量的限度, 为 SHG 的安全性及质量可控奠定基础, 也为其他动物药的安全性评价与新药的研发提供参考。

关键词: 散寒化湿颗粒; 地龙; 总砷; 高效液相联用电感耦合等离子体质谱; 砷形态; 量-值传递规律

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)05-1502-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.009

Study on total arsenic and arsenic forms in *Pheretima* herbs and its prescription preparation of Sanhan Huashi Granules

WANG Shujuan¹, HU Junhua^{2,3}, YAO Xue^{2,3}, WANG Shenghua^{2,3}, ZHOU Enli^{2,3}, ZHANG Chenfeng^{2,3}, YU Guifang^{2,3}, WANG Zhenzhong^{1,2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. National Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the transmission pattern of total arsenic, as well as the morphology and valence of arsenic, in Dilong (*Pheretima*) herbs and its prescription preparation, Sanhan Huashi Granules (SHG), in order to establish limits on the arsenic content in *Pheretima* herbs and SHG that ensure the safety of SHG. **Methods** Firstly, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to determine the total arsenic content of the microwave-ablated *Pheretima* herbs to SHG; then HPLC-ICP-MS was employed for determining the morphology and valence of arsenic, as well as investigating the total amount, morphology, and valence differences in SHG and *Pheretima* herbs from different origins. **Results** The total arsenic content in the herbs, tablets, extracts and

收稿日期: 2023-08-07

基金项目: 国家重点研发计划“公共安全风险防控与应急技术装备”重点专项—散寒化湿颗粒治疗新冠肺炎的新药创制示范研究 (2022YFC0868300)

作者简介: 王书娟, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。E-mail: 2968308633@qq.com

*通信作者: 王振中, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新药研发及应用研究。E-mail: kyywzz@163.com

于桂芳, 女, 硕士, 高级工程师, 副主任中药师, 研究方向为中药新药质量标准提升。E-mail: gfyu100@126.com

preparations of *Pheretima* in the transfer process was decreased. A very small amount of arsenic was detected in the negative samples, the average transfer rate of total As from herbs to preparations was 52.00% and the average transfer rate from decoction pieces to preparation was 60.81%. In terms of arsenic morphology and valence, there is basically no difference between 28 batches of SHG and 24 batches of *Pheretima*; Both mainly consist of larger toxic forms such as As(III) and As(V), while other organic forms have very low or undetectable toxicity levels. Considering the market supply of *Pheretima* herbs, multiple batch studies on *Pheretima*, and its use in clinical preparation batches, a tentative limit for As in *Pheretima* herbs is proposed at 15.00 mg/kg. Based on the pattern of volume-value transmission law and prescription requirements for preparation usage, a tentative limit for As in SHG is proposed at 2.50 mg/kg.

Conclusion In this study, the method for the determination of total arsenic and arsenic form in SHG was established with high efficiency, rapidity, good accuracy and stability. Based on the method, the transfer law of total arsenic and arsenic form and valence in SHG was initially investigated to formulate the limits of elemental arsenic content in *Pheretima* and SHG, which will lay a foundation for the safety and quality control of SHG, and also provide a reference for the safety evaluation of other animal medicines and the research and development of new medicines.

Key words: Sanhan Huashi Granules; *Pheretima*; total arsenic; HPLC-ICP-MS; arsenic form; law of quantity-value transfer

砷(As)元素属于类金属元素,其化合物的种类在自然界中繁多,不同种类的砷化合物具有不同的形态、价态^[1-2]。目前,常见的砷化合物主要有亚砷酸[arsenious acid, As(III)]、砷酸[arsenic acid, As(V)]、一甲基砷(monomethylarsenic, MMA)、二甲基砷(dimethylarsenic, DMA)、砷甜菜碱(arsenobetaine, AsB)、砷胆碱(arsenocholine, AsC) 6种^[3-4]。毒理学研究表明,不同形态、价态的砷化合物的毒性不同。通常无机砷(inorganic arsenic, iAs)有剧毒,其中As(III)的毒性是As(V)的60倍,有机砷(MMA和DMA)的毒性中等,而AsB和AsC则被认为是无毒的^[5-7]。目前,常见的砷形态分析的方法主要有高效液相色谱-原子荧光联用技术(HPLC-AFS)、高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光度法(HPLC-HG-AFS)、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)等^[8-12]。与其他分析方法相比,利用HPLC-ICP-MS技术进行砷化合物的分析,能够避免光谱和基底的干扰,灵敏度高、专属性、精密度较好,分析速度快,操作简便,具有明显的优势^[13-15]。

散寒化湿颗粒(Sanhan Huashi Granules, SHG)是由江苏康缘药业股份有限公司根据《中药注册分类及申报资料要求》中3.2类注册要求和疫情期间临床上实际使用药物的生产工艺所研发上市的颗粒剂^[16]。该方主要由麻黄、厚朴、煨草果、地龙等20味中药组成,具有散寒化湿、祛毒通络、宣肺透邪等功效,其临床疗效显著,安全性良好^[17-18]。该处方药味中地龙为常用的动物药,在中药复方中具有不可替代的作用^[19],但其重金属及有害元素含量超标的问题时有发生,特别是砷元素超标的情况^[20-23],其临床使用的安全性问题一直是备受关注,也在一

定程度上对地龙药材及其复方制剂的应用和推广造成影响。截至目前,关于SHG中总砷和砷形态的含量及其限度的制定等研究尚未见相关报道。本研究通过采用ICP-MS对地龙药材、饮片、地龙饮片提取液、SHG中的总砷含量进行测定分析,再采用HPLC-ICP-MS对其中6种不同形态、价态的砷含量进行测定,探究其传递规律;同时对多批次SHG制剂及不同产地的地龙药材进行分析,以期初步建立地龙药材的内控标准,从源头上控制药材质量,确保SHG的安全性,同时为地龙药材的评价积累数据,也为其他含有地龙药味的中药复方制剂的风险防控提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Flexar型高效液相色谱仪、NexION 300X型电感耦合等离子体质谱仪,美国Perkin Elmer公司;ETHOS UP型微波消解仪,北京安南科技有限公司;Mettler Toledo AL204型电子分析天平,德国梅特勒公司;Milli-Q Academic型超纯水仪,美国密理博公司;HH-6型数显恒温水浴锅,金坛市康华电子仪器制造厂;VB24 UP型赶酸器,北京莱伯泰科有限公司;TDL-5-A型低速大容量离心机,上海安亭科学仪器;KDM型电热套,山东鄄城华鲁电热仪器有限公司;实验所用玻璃仪器均用20%硝酸溶液浸泡24 h以上,并用超纯水冲洗干净,晾干备用。

1.2 材料

1.2.1 试剂 胃蛋白酶(批号220909)、碳酸铵(批号20200326)、无水乙醇(批号20220803)均购自于国药集团化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸二钠(批号11071120645)、磷酸氢二铵(批号11072920722)均购自于南京化学试剂有限公司;硝酸UP级(电

子级硝酸, 金属杂质含量小于 10 ng/L), 苏州晶瑞化学试剂有限公司; 水为超纯水; 硝酸人工胃液 (按照《中国药典》2020 年版四部通则 2322 配制); GraphPad Prism 软件, Version 8.0, 美国 GraphPad Software 公司; SIMCA 软件, Version 14.1, 瑞典 MKS Umetrics 公司。

1.2.2 标准物质 Au 单元素标准溶液 (1.000 mg/mL, 批号 GSB04-1715-2004)、As 单元素标准溶液 (1.000 mg/mL, 批号 GSB04-1714-2004), Ge 单元素标准溶液 (1.000 mg/mL, 批号 GSB04-1728-2004) 均购自国家有色金属及电子材料分析测试中心; 亚砷酸根溶液标准物质 [批号 GBW0866, 质量分数以砷 (As) 计为 (75.7±1.2) μg/g]、砷酸根溶液标准物质 [批号 GBW0866, 质量分数为 (17.5±0.4) μg/g]、一甲基砷溶液标准物质 [批号 GBW08668, 质量分数以砷 (As) 计为 (25.1±0.8) μg/g]、二甲基砷溶液标准物质 [批号 GBW08669, 质量分数以砷 (As) 计为 (52.9±1.8) μg/g]、砷甜菜碱溶液标准物质 [批号 GBW08670, 质量分数以砷 (As) 计为 (38.8±0.1) μg/g]、砷胆碱溶液标准物质 [批号 GBW08671, 质量分数以砷 (As) 计为 (28.0±1.1) μg/g] 均购自于中国计量科学研究院; 调谐液 (含 Be、Ce、Fe、In、Li、Mg、Pb、U, 质量浓度均为 1 μg/L, Lot38-31GSX1) 购自美国 Perkin Elmer 公司。

1.2.3 样品

(1) 传递规律研究用样品。对应关系 1: 地龙药材 (批号 Y2101023)、地龙饮片 (批号 YP2104025)、缺地龙 SHG 阴性样品 (SHG-阴性)、SHG (批号 210401、210402、210403)。对应关系 2: 地龙饮片 (批号 YP2211066)、缺地龙 SHG 阴性样品 (SHG-阴性)、SHG (批号 221203)。地龙样品分别来自于广东、广西, 均为钜蚓科环毛蚓属动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)。

(2) 多批次 SHG。共 28 批, 批号分别为 210401、210402、210403、221202、221203、221204、221205、221206、221207、221208、221209、221210、221211、221212、221213、221215、221216、221217、221233、221234、221235、221236、221237、221238、221240、221241、221242、221243, 编号分别为 SHG1~SHG28, 均购自江苏康缘药业股份有限公司。

(3) 多批次地龙药材。共 24 批, 均购自于中药材市场, 均经南京中医药大学中药资源学教研室 (中药资源与栽培技术中心) 主任谷巍教授鉴定, 结果

分别为钜蚓科环毛蚓属动物参环毛蚓 *P. aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 的干燥体, 习称“广地龙”或“沪地龙”, 具体信息见表 1。

表 1 地龙样品信息

Table 1 Information of <i>Pheretima</i> samples					
编号	产地	基原	编号	产地	基原
S1	广东 1	参环毛蚓 (广地龙)	S13	海南 1	参环毛蚓 (广地龙)
S2	广东 2	参环毛蚓 (广地龙)	S14	海南 2	参环毛蚓 (广地龙)
S3	广东 3	参环毛蚓 (广地龙)	S15	海南 3	参环毛蚓 (广地龙)
S4	广西 1	参环毛蚓 (广地龙)	S16	湖北 1	通俗环毛蚓 (沪地龙)
S5	河南 1	威廉环毛蚓 (沪地龙)	S17	湖北 2	通俗环毛蚓 (沪地龙)
S6	河南 2	威廉环毛蚓 (沪地龙)	S18	湖北 3	威廉环毛蚓 (沪地龙)
S7	河南 3	威廉环毛蚓 (沪地龙)	S19	河南 1	威廉环毛蚓 (沪地龙)
S8	安徽 1	通俗环毛蚓 (沪地龙)	S20	河南 2	威廉环毛蚓 (沪地龙)
S9	安徽 2	通俗环毛蚓 (沪地龙)	S21	海南 4	参环毛蚓 (广地龙)
S10	重庆 1	参环毛蚓 (广地龙)	S22	海南 5	参环毛蚓 (广地龙)
S11	重庆 2	参环毛蚓 (广地龙)	S23	广西 2	参环毛蚓 (广地龙)
S12	重庆 3	参环毛蚓 (广地龙)	S24	广西 3	参环毛蚓 (广地龙)

2 方法与结果

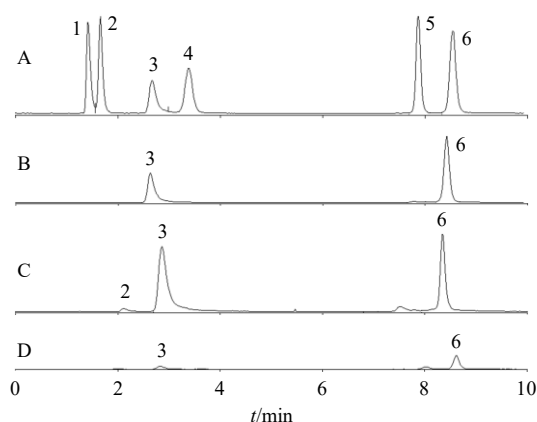
2.1 色谱条件

2.1.1 ICP-MS 条件 总砷测定时采用碰撞反应池模式, 等离子气体流量 16.0 L/min, 雾化器流量 0.94 L/min, 辅助气流量 1.2 L/min, 射频功率 1 600 W, 脉冲阶段电压 1 300 V, 模拟阶段电压-2 200 V, 蠕动泵的转速为 20 r/min, 载气为高纯液氮, 跳峰采集模式, 测定时选取 ⁷⁴Ge 为内标; 砷形态测定时, ICP-MS 与 HPLC 通过数据线连接传递信号, ICP-MS 采集模式为时间分辨模式 (time resolved mode, TRA), 检测质量数 *m/z* 为 75 (As), 其他采集条件同总砷测定模式。

2.1.2 HPLC 条件 Hamilton PRP-X100 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液 (A) -100 mmol/L 碳酸铵溶液 (B); 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样体积为 20 μL; 梯度洗脱: 0~2 min, 10%~12% B; 2~4 min, 12%~100% B; 4~9 min, 100% B~10% B; 9~10 min, 10% B。在选定的条件下, 6 种砷形态、价态的色谱图、SHG、地龙药材及 SHG 地龙阴性典型样品图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 总砷测定标准溶液 精密吸取 As 单元素标准溶液适量, 用 5%硝酸稀释, 制成含砷为 10 μg/mL



A-6 种砷形态标准溶液; B-SHG 典型样品; C-地龙药材典型样品; D-SHG 地龙阴性样品; 1-AsC; 2-AsB; 3-As(III); 4-DMA; 5-MMA; 6-As(V)。

A-standard solution of 6 arsenic forms; B-typical sample of SHG; C-typical sample of *Pheretima* herbs; D-negative sample solution of SHG; 1-AsC; 2-AsB; 3-As(III); 4-DMA; 5-MMA; 6-As(V)。

图 1 砷元素形态测定图谱和典型样品图

Fig. 1 Determination of arsenic form and typical sample

的标准储备液。精密量取该储备液适量,用 5%硝酸稀释制成含砷元素分别为 5、20、50、100、200、250 ng/mL 的系列标准溶液。

2.2.2 形态砷测定标准溶液 分别精密称取 As(III)、As(V)、MMA、DMA、AsC、AsB 对照品适量,加 0.02 mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液制成各含 2.0 μg/mL (以 As 计)的混合对照品储备液。分别精密吸取对照品储备液适量,加入 0.02 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液制成各含 1、5、20、50、100、200 ng/mL 的系列标准曲线混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 提取浸膏的制备 精密称取混合均匀的地龙饮片(过三号筛,批号 YP2104025、YP2211066)约 4 g,精密加入水 50 mL,加热回流提取 2 h,浓缩成浸膏(密度 1.10 g/cm³),待用。

2.3.2 总砷测定供试品溶液 精密称取混合均匀的样品(过三号筛)约 0.5 g 于聚四氟乙烯消解罐中,加入硝酸 10 mL,混匀,待气泡散尽,置预先设置好参数的微波消解仪中(消解功率为 1 500 W,在 20 min 内升温至 190 °C,消解 40 min),消解完全后放置室温,取出,待蒸气散尽后,将消解液转移至 50 mL 聚丙烯量瓶中,用水洗涤消解罐 2~3 次,洗液与消解液合并,加水定容至刻度线,摇匀即可。如果测定提取浸膏中的总砷,则精密称取提取浸膏适量于聚四氟乙烯消解罐中,自“加入硝酸 10 mL”起,保持相同操作。同法制备试剂空白溶液。

2.3.3 形态砷测定供试品溶液 精密称取混合均匀的样品(过 3 号筛)约 0.2 g 于 50 mL 离心管中,精密加入硝酸人工胃液 10 mL,40 °C 水浴震荡 8 h,待冷却至室温后,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。如果测定提取浸膏中的砷形态,则精密称取提取浸膏适量于 50 mL 离心管中,自“加入硝酸人工胃液 10 mL”起,保持相同操作。同法制备空白溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围考察 采用 HPLC-ICP-MS,分别精密吸取配制好的 6 种砷形态化合物质量浓度为 1、5、20、50、100、200 ng/mL 的溶液各 20 μL 进样,以质量浓度为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数,结果分别为 AsC $Y=3\ 137.229\ 9\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL; AsB $Y=3\ 823.738\ 9\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL; As(III) $Y=2\ 841.969\ 3\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL; DMA $Y=4\ 077.541\ 7\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL; MMA $Y=4\ 054.937\ 0\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL; As(V) $Y=4\ 217.265\ 7\ X$, $r=0.999\ 9$,线性范围 1~200 ng/mL。结果显示,各成分在 1~200 ng/mL 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密称取地龙样品 1 份(S15),按“2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液,连续进样 6 次,计算 AsB、As(III)、MMA、As(V)峰面积的 RSD 分别为 2.11%、0.87%、2.37%、1.62%,符合微量元素分析的要求,表明仪器进样精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称取地龙样品 1 份(S15),按“2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进样测定,计算得到 AsB、As(III)、MMA、As(V)峰面积的 RSD 分别为 3.81%、5.68%、6.82%、3.26%,符合微量元素分析的要求,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取地龙样品的供试品溶液(S15)6 份,按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样 20 μL,计算得到 AsB、As(III)、MMA、As(V)质量分数的均值分别为 0.22、1.60、1.24 μg/g, RSD 分别为 6.06%、5.79%、13.96%、7.06%,符合微量元素分析的要求,表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取适量重复性试验样品(S15)6 份置 50 mL 离心管中,分别加入混合对照品溶液(1 μg/mL)1 mL,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL,测定并计算加

样回收率。结果表明, AsC、AsB、As(III)、DMA、MMA、As(V)的平均加样回收率分别为 111.61%、103.78%、96.08%、94.15%、94.77%、79.20%, 其 RSD 分别为 5.4%、6.9%、7.2%、8.0%、6.9%、7.8%, 符合微量元素分析的要求, 说明该方法准确性良好。

2.5 样品测定结果

2.5.1 传递规律研究 通过对研究传递规律批的地龙药材、地龙饮片、饮片提取液、SHG 中的样品进行处理。采用 ICP-MS 对上述样品进行总砷含量的测定, 并采用 HPLC-ICP-MS 对其进行相应的砷形态及价态分析, 测定结果见表 2。由结果可以看出, 地龙药材、饮片、提取液及 SHG 在传递过程中总砷含量呈递减趋势, 其中, 总砷在对应关系 1 中各物料的转移率(即药材→饮片→提取液→SHG)分别为 85.58%、78.95%、76.97%; 基于制剂处方, 药材到制剂中的平均转移率为 52.00%, 饮片到制剂中的平均转移率为 60.81%; 总砷在对应关系 2 中各物料的转移率(即饮片→提取液→SHG)分别为 76.11%、80.60%, 饮片到制剂中的转移率为 64.79%。SHG 阴性样品中检出极少量的砷, 且采用同一批地龙制备的 3 批制剂中 6 种砷形态含量以及总砷含量相近, 可推测 SHG 中的砷几乎均来自地龙药材, 地龙对 SHG 的砷含量起决定性作用。

2.5.2 地龙药材与 SHG 的多批次测定 采用“2.3”项下方法, 对市售地龙药材及多批次的 SHG 进行测

定, 测定结果见表 3、4。结果显示, 24 批次地龙药材中总砷含量在 3.96~24.55 mg/kg, 平均值为 12.31 mg/kg, 反映出不同产地的地龙药材中总砷含量差异较大, 且均高于《中国药典》2020 年版植物类“重金属及有害元素一致性限量”指导值(砷不得过 2 mg/kg)^[4], 游离的无机砷(inorganic arsenic, iAs)含量较高, 占总砷含量的 90%以上, 且其形态与总砷含量之间并非呈现简单的正相关, 因此有必要对多批次地龙作进一步的分析, 探究不同产地对地龙中砷含量的影响, 以便更加方便直观对其进行评价, 从源头上保障制剂的安全性。28 批 SHG 中的总砷含量在 0.84~2.21 mg/kg, 平均值为 1.60 mg/kg, 游离的 iAs 占检出总量的 89.2%~97.2%, 其中 As(III)最高检出量为 1.61 mg/kg, As(V)最高为 0.68 mg/kg,

表 3 地龙中总砷和砷形态测定结果

Table 3 Determination results of total As and arsenic speciation in *Pheretima*

样品	质量分数/(mg·kg ⁻¹)						
	总砷	AsC	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
S1	24.55	—	0.06	8.22	—	0.07	10.06
S2	13.85	—	0.10	5.47	—	0.04	3.69
S3	7.95	—	0.09	2.55	—	0.02	2.74
S4	19.61	—	0.07	7.65	—	0.04	5.47
S5	12.67	—	0.07	4.27	—	0.04	1.47
S6	11.98	—	0.13	4.88	—	0.04	1.89
S7	12.42	—	0.08	4.71	—	0.01	1.67
S8	13.91	—	0.08	5.35	—	0.05	1.74
S9	15.92	—	0.09	6.68	—	0.04	1.47
S10	7.57	—	0.18	3.06	—	0.03	0.97
S11	9.86	—	0.19	3.78	—	0.03	1.13
S12	8.97	—	0.17	3.69	—	0.03	1.22
S13	11.65	—	0.09	4.18	—	0.03	2.17
S14	11.03	—	0.12	4.49	—	0.03	2.52
S15	4.03	—	0.20	1.37	—	0.03	1.12
S16	16.02	—	0.92	6.89	—	0.03	5.87
S17	17.45	—	0.93	7.92	—	0.03	6.51
S18	17.30	—	0.99	8.17	—	0.03	6.23
S19	14.74	—	0.06	8.60	—	0.03	3.13
S20	13.40	—	0.08	7.74	—	0.02	2.76
S21	12.46	—	0.15	6.90	—	0.03	3.04
S22	9.41	—	0.15	5.26	—	0.02	2.29
S23	3.96	—	0.23	2.65	—	0.01	0.30
S24	4.63	—	0.24	3.46	—	0.02	0.33

表 2 地龙药材至制剂的总砷及砷形态测定结果

Table 2 Determination results of total arsenic and arsenic speciation from *Pheretima* herbs to preparations

对应关系	样品	质量分数/(mg·kg ⁻¹)						
		总砷	AsC	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
1	地龙药材	11.78	—	0.05	5.29	—	0.03	2.49
	地龙饮片	10.08	—	0.03	3.59	—	0.02	3.09
	饮片提取液	7.96	—	0.00	2.52	—	0.02	3.30
	SHG-阴性	0.30	—	0.00	0.06	0.06	0.03	0.11
	SHG1	1.76	—	0.02	0.91	0.01	0.06	0.37
	SHG2	1.81	—	0.01	0.95	0.01	0.06	0.40
	SHG3	1.93	—	0.02	0.97	0.01	0.06	0.40
2	地龙饮片	9.38	—	0.04	3.17	—	0.01	2.68
	SHG-阴性	0.30	—	0.00	0.06	0.06	0.03	0.11
	饮片提取液	7.54	—	0.02	2.66	—	0.02	2.90
	SHG5	1.82	—	0.03	0.86	—	0.02	0.48

“—”-未检出, 表 3、4 同。

“—”-not detected, same as table 3 and table 4.

表 4 SHG 中总砷和砷形态测定结果

Table 4 Determination results of total As and arsenic speciation in SHG

样品	质量分数/(mg·kg ⁻¹)						
	总砷	AsC	AsB	As(III)	DMA	MMA	As(V)
SHG1	1.76	—	0.02	0.91	0.01	0.06	0.37
SHG2	1.81	—	0.01	0.95	0.01	0.06	0.40
SHG3	1.93	—	0.02	0.97	0.01	0.06	0.40
SHG4	1.54	—	0.02	0.78	—	0.02	0.43
SHG5	1.82	—	0.03	0.86	—	0.02	0.48
SHG6	1.55	—	0.03	0.73	—	0.02	0.46
SHG7	1.95	—	0.04	1.12	—	0.04	0.68
SHG8	1.42	—	0.02	0.88	—	0.05	0.29
SHG9	1.90	—	0.03	1.16	—	0.04	0.45
SHG10	1.51	—	0.02	0.99	—	0.05	0.34
SHG11	2.13	—	0.04	1.46	—	0.05	0.49
SHG12	2.18	—	0.03	1.61	—	0.04	0.48
SHG13	1.65	—	0.03	1.06	—	0.03	0.39
SHG14	1.45	—	0.03	0.89	—	0.04	0.30
SHG15	2.13	—	0.04	1.39	—	0.02	0.46
SHG16	1.27	—	0.03	0.72	—	0.03	0.29
SHG17	2.21	—	0.02	1.48	—	0.03	0.46
SHG18	1.79	—	0.04	1.39	—	0.05	0.41
SHG19	1.08	—	0.02	0.46	—	0.05	0.27
SHG20	1.03	—	0.02	0.44	—	0.05	0.29
SHG21	0.95	—	0.02	0.51	—	0.05	0.24
SHG22	1.31	—	0.02	0.90	—	0.04	0.30
SHG23	0.84	—	0.02	0.37	—	0.04	0.26
SHG24	2.08	—	0.02	1.38	—	0.04	0.46
SHG25	1.05	—	0.02	0.41	—	0.05	0.29
SHG26	1.34	—	0.02	0.92	—	0.04	0.31
SHG27	1.97	—	0.02	1.39	—	0.04	0.46
SHG28	1.09	—	0.02	0.44	—	0.05	0.30

iAs 总量平均值为 0.55 mg/kg, 检出少量的 AsC、AsB、MMA, 而 DMA 大多未检出。

聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)是用于中药化学成分与物料性质等归类的一种常用方法^[24-26]。为进一步阐明地龙药材中无机砷的分布特征,采用 SIMCA 软件对 24 批地龙药材中总砷与 5 种主要砷形态、价态含量进行聚类分析(DMA 均未检出)。结果(图 2)显示, S7 与 S8 聚为一类; S22~S24 聚为一类; S5~S6、S14~S16 与 S19 聚为一类; S1~S4、S9~S13、S17~S18 与 S20~S21

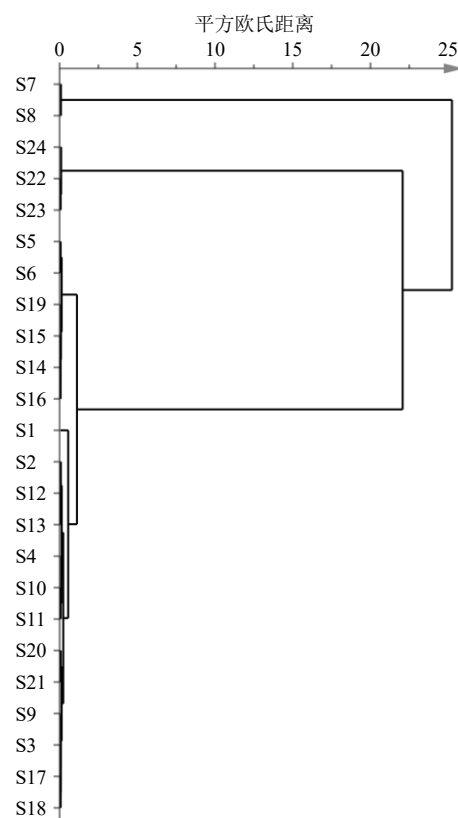


图 2 多批次地龙药材总砷与砷形态聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of total arsenic and arsenic form in many batches of *Pheretima* herbs

聚为一类。结果显示,除来自湖北的 3 批药材聚为一类外,其他产地地龙药材中总砷形态化合物存在一定的交互现象,说明地龙药材中普遍存在这 5 种砷化合物,其在质量传递过程中的变化影响可做进一步分析。

主成分分析法(principal component analysis, PCA)是基于数学降维思路对原来变量重新组合成几个能反映多数变量信息、对复杂因子下的变量进行简单化的统计方法^[27-28],也是药材质量评价的主要手段之一。研究中采用 SIMCA 软件,对 24 批地龙药材中 5 种主要砷化合物含量,进行主成分信息提取分析。由提取到的信息(表 5)可知,主成分 1(PC1)与主成分 2(PC2)方差贡献率分别为 45.98%、25.89%,累积贡献率达 71.87%,可以解释大部分变量对模型的影响。为进一步分析各形态元素间的相互关系,对构成 PC1 与 PC2 的 5 种化合物形态做相关性分析。

由 GraphPad Prism 软件绘制得到的二维矩阵热点图(图 3)结果可知,As(III)与 MMA、As(V)呈显著相关($P<0.05$);MMA 与 As(V)呈显著相关($P<$

表 5 PCA 数学模型的提取信息

Table 5 Extraction information of PCA mathematical model

主成分	R^2_X	R^2_{cum}	特征值
1	0.459 8	0.459 8	2.299
2	0.258 9	0.718 7	1.294

R^2_X 为主变量解释变量, R^2_{cum} 为累积解释变量。

R^2_X is the main explanatory variable, R^2_{cum} is the cumulative explanatory variable.

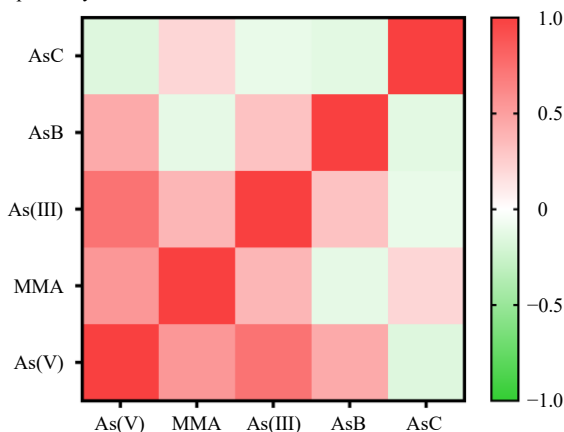


图 3 多批次地龙药材中 5 种砷元素间二维矩阵热点图

Fig. 3 Two-dimensional matrix hot spot map of five arsenic elements in multiple batches of *Pheretima* herbs

0.05)。可以发现, As(III)、MMA 与 As(V) 3 种形态化合物间相互关联性较强, 同时 As(V) 受其他 2 种化合物影响, 反映出 As(V) 是地龙药材重金属中起主要影响作用的砷化合物, 也是质量控制过程中需重点关注的检测指标。

3 讨论

3.1 供试品制备方法优化

砷形态化合物的提取应该在不使原有形态发生改变和互相转化的前提下进行。目前砷形态化合物的提取方法种类繁多, 如水提取、稀硝酸提取、酶解析提取、乙酸提取等^[29]。本实验选用硝酸人工胃液提取, 通过仿生手段模拟胃肠环境, 以期得到的成分更接近人体真实情况; 同时参考《中国药典》2020 年版四部通则 2322 中汞、砷元素形态及价态中供试品溶液的制备方法^[4], 在此基础上对供试品处理条件进行优化, 考察了水浴加热与水浴震荡 2 种提取方式, 并对提取时间、静置时间进行筛选, 通过比较 6 种不同砷形态、价态的化合物的含量及总量。结果表明, 选择水浴加热时, 20 h 提取的效果更充分; 提取方式为水浴震荡时, 8 h 提取的较为充分; 同时比较水浴加热 20 h 与水浴震荡 8 h 的提取效果, 发现两者效果相当; 是否需静置 2 h 的结

果显示影响较小。综上, 在达到相同的提取效果的前提下, 选择硝酸人工胃液为溶剂, 水浴震荡 8 h 后直接离心能够有效缩短提取时间, 故采用该优化后的方法。

3.2 色谱条件的选择

基于美国 Perkin Elmer 公司液相仪器的碳酸盐体系特性, 选用 Hamilton, PRP-X100 阴离子交换色谱柱; 与 0.025 mmol/L 的磷酸二氢铵 (氨水调节 pH 值至 8.0)-水对比, 1.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液-100 mmol/L 碳酸铵溶液作为流动相, 不需调节 pH 值, 操作较为方便, 色谱图基线噪音较小, 基线较为平稳; 且碳酸铵系统进入 ICP-MS 后, 被分解成易挥发的气体, 能够有效减少盐的残留, 减轻对采样锥的污染, 进而选择 1.5 mmol/L 磷酸氢二铵溶液和 100 mmol/L 碳酸铵溶液作为流动相。

3.3 建立地龙药材与 SHG 的内控标准

《中国药典》2020 年版一部中地龙重金属检查项下, 规定用通则 0821 第二法检查, 含重金属不得超过 30 mg/kg。该法是通过供试品溶液与硫代乙酰胺作用显色, 再与一定量的标准铅溶液同样处理后的颜色进行比较^[30]。此法是一种半定量分析方法, 仅凭肉眼判断重金属的含量是否超标, 准确度有限, 更无法分析其中含有的化合物形态。因此, 有必要采用更精确的检测方法对地龙以及复方制剂中的砷总量及价态进行研究, 以确保用药安全与药品的质量可控。根据本课题组积累的多批次地龙药材重金属含量测定结果与相关文献报道^[20-23], 对结果进行统计分析发现市售地龙总砷含量普遍偏高。考虑地龙市场供应的实际情况以及动物药疗效的不可替代性等因素, 同时参考临床批制剂所用地龙药材中总砷的含量情况 (11.78 mg/kg), 暂拟定地龙药材中 As 的限度为 15.00 mg/kg。结合量-值传递规律及制剂处方, 得出 SHG 中总砷的限度为 2.25 mg/kg, 换算公式如下: SHG 中的总砷含量=地龙药材中砷转移的量+SHG 阴性样品砷含量=15.00 mg/kg×250 g×52.00%/1.000 kg+0.30 mg/kg=2.25 mg/kg (250 g 为 SHG 中地龙药材在制剂中的处方量, 1.000 kg 为 SHG 工艺生产时最后的制得量)。

因此, 暂拟定 SHG 中总砷的限度为 2.50 mg/kg, 又因药材及制剂中均以毒性较大的无机砷为主, 所以暂不拟定砷形态及价态限度。

4 结语

本实验基于 HPLC-ICP-MS 法首次对地龙药材

及 SHG 中的总砷及砷形态进行分析研究,反映了地龙药材到 SHG 制剂中的量-值传递规律,并对其中的地龙药材及 SHG 制定初步的总砷含量限度,以期科学评价地龙药材及 SHG 的安全性。鉴于目前课题进展与后续实验安排,该总砷含量值只是目前暂定的参考值,后期还将对其进行蓄积性研究,分析其吸收排泄规律,以期建立更加准确的地龙药材总砷的安全值,为 SHG 的安全性提供保障;同时建议尽快建立地龙等动物药及相关制剂中高毒形态与高含量(如 iAs)的重金属形态限量标准,以期保障动物药及相关制剂的安全性,进而促进中药的可持续发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hughes M F, Beck B D, Chen Y, *et al.* Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123(2): 305-332.
- [2] Li Y, Liu Y, Han X, *et al.* Arsenic species in *Cordyceps sinensis* and its potential health risks [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1471.
- [3] 吕翔,王佳佳,邵霞,等. 砷元素形态分析和在中药研究中的应用进展 [J]. *中成药*, 2017, 39(8): 1679-1683.
- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 237.
- [5] 刘好. 矿物药及动物药中汞、砷元素形态分析与安全性研究探讨 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [6] 张伟,黄良民. 海洋生物体内砷含量及其形态研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(1): 41-53.
- [7] 潘月华,白利珊. 从砷的分布结构特性探讨其作用与危害 [J]. *微量元素与健康研究*, 2013, 30(5): 71-73.
- [8] 王剑. 基于 HPLC-AFS 联用法测定地龙蛋白粉中形态砷的前处理方法优化 [J]. *皮革与化工*, 2020, 37(6): 21-25.
- [9] Jesus J P, Suárez C A, Ferreira J R, *et al.* Sequential injection analysis implementing multiple standard additions for As speciation by liquid chromatography and atomic fluorescence spectrometry (SIA-HPLC-AFS) [J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1364-1368.
- [10] 黄田富,张著森,丘则海. HPLC-HG-AFS 联用测定茶叶中四种砷的形态化合物 [J]. *井冈山大学学报: 自然科学版*, 2021, 42(1): 30-34.
- [11] 陈吴越,崔欣语,周昊言,等. 高效液相-氢化物发生-原子荧光光谱法分析六神丸在大鼠肝脏中代谢的砷形态 [J]. *中医药信息*, 2021, 38(3): 26-29.
- [12] 何易,刘兰侠,薛黎明,等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定人尿中 6 种砷形态化合物 [J]. *上海预防医学*, 2023, 35(2): 182-186.
- [13] 刘湘生,何小青,陈翁翔. 高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用技术 HPLC-ICP-MS 进展 [J]. *现代科学仪器*, 2003(4): 38-42.
- [14] 李耀磊,李海亮,左甜甜,等. 基于 HPLC-ICP-MS 的冬虫夏草(繁育品)干品及鲜品中砷形态、价态研究及风险评估 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13): 3548-3553.
- [15] 海来约布,群培,卢君蓉,等. 基于 HPLC-ICP-MS 的藏药佐塔汞、砷元素形态、价态分析及安全性评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(10): 2985-2990.
- [16] 于桂芳,胡军华,周茆,等. 散寒化湿颗粒 HPLC 特征图谱研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4168-4176.
- [17] 郑榕,陈琴,黄铭涵. 从“寒湿疫毒”辨治新型冠状病毒感染肺炎 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(8): 18-20.
- [18] Tian J X, Yan S Y, Wang H, *et al.* Hanshiyi Formula, a medicine for Sars-CoV2 infection in China, reduced the proportion of mild and moderate COVID-19 patients turning to severe status: A cohort study [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105127.
- [19] 商焯,齐丽娜,金华,等. 地龙化学成分及药理活性研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(5): 989-996.
- [20] 马戔,李正刚,曲涵婷,等. 电感耦合等离子体质谱法测定地龙药材中铅、砷、汞、镉、铜元素的残留量 [J]. *分析测试技术与仪器*, 2022, 28(4): 427-432.
- [21] 陈伟韬,毕晓黎,李养学,等. 广地龙药材、汤剂及配方颗粒的元素分析 [J]. *中国药师*, 2019, 22(11): 2102-2105.
- [22] 李勇,丁冠华. 基于 ICP-MS 法对地龙、水蛭中重金属及有害元素的测定及分析 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(10): 2152-2155.
- [23] 左甜甜,金红宇,王赵,等. 地龙中重金属及有害元素的含量分析与安全性评价 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(5): 450-453.
- [24] 彭警,樊箫雨,王迪磊,等. 基于成分定量和指纹图谱的化学模式识别法评价胆木不同部位的差异性 [J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3281-3291.
- [25] 王夏茵,岳宝森,张炜华,等. 不同产地天麻 HPLC 指纹图谱、含量测定及化学模式识别研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21(5): 1358-1362.
- [26] 汪盛华,秦春娟,安双凤,等. 水提干法制粒的中药配方颗粒溶化性与粉体物理属性相关性研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1439-1448.
- [27] Ringnér M. What is principal component analysis? [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(3): 303-304.
- [28] Ben Salem K, Ben Abdelaziz A. Principal component analysis (PCA) [J]. *Tunis Med*, 2021, 99(4): 383-389.
- [29] 陆奕娜,卢金素,朱婷,等. 砷形态提取及分析方法研究进展 [J]. *福建分析测试*, 2017, 26(4): 26-33.
- [30] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 112.

[责任编辑 郑礼胜]