

六神丸和雄黄中砷的组织分布研究

张庆丽^{1,2}, 吴倩¹, 谢媛媛^{1*}, 沈连忠³, 樊敏伟⁴,
梁琼麟¹, 王义明¹, 罗国安^{1,2*}

(1. 清华大学化学系分析中心, 北京 100084; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237;
3. 中国药品生物制品检定所国家药物安全评价中心, 北京 100083; 4. 上海市中药研究所, 上海 201203)

摘要: 本文研究 Beagle 犬服用不同剂量雄黄和六神丸并经过 28 天服药期和 14 天恢复期后, 组织中总砷及各形态砷化合物的分布情况, 为六神丸的安全性评价提供依据。采用 ICP-MS 测定 Beagle 犬灌服不同剂量雄黄及六神丸后各组织中总砷浓度, HPLC-ICP-MS 测定各组织中砷的形态分布。随着雄黄的服用剂量增大, Beagle 犬组织中总砷含量和亚砷酸盐 (As^{III}) + 二甲基砷酸 (DMA) 浓度增大。含相同剂量雄黄的六神丸组与雄黄组相比, 多数组织中总砷含量降低, 所有组织中的 As^{III} + DMA 浓度均降低, 而肝、脾、肾中的砷甜菜碱 (AsB) 浓度升高。总砷含量在组织中呈现出一定的剂量依赖关系, 六神丸复方配伍后对雄黄具有一定的减毒作用。

关键词: 六神丸; 雄黄; 砷; ICP-MS; 组织分布

中图分类号: R283; R284.1; R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0701-06

Tissue distribution of arsenic of Liushen pills and realgar

ZHANG Qing-li^{1,2}, WU Qian¹, XIE Yuan-yuan^{1*}, SHEN Lian-zhong³, FAN Min-wei⁴,
LIANG Qiong-lin¹, WANG Yi-ming¹, LUO Guo-an^{1,2*}

(1. Analysis Center, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing 100083, China; 4. Shanghai Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study is to report the tissue distribution of arsenic after giving different doses of realgar and Liushen pills to Beagle dogs, in order to provide basis for the safety evaluation of Liushen pills. ICP-MS was used to measure arsenic concentration, and HPLC-ICP-MS was used to analyze arsenic speciation. The concentration of total arsenic and As^{III} + DMA (arsenite + dimethylarsenic acid) increased with dosing of realgar. Total arsenic concentration in most tissues and As^{III} + DMA concentration in all tissues of Liushen pills group are lower than that of realgar group, but AsB concentration in liver, spleen and kidney of Liushen pills group increased. The concentration of total arsenic showed a dose-dependent manner with dosage administered. It was indicated that components in Liushen pills can reduce solubility of arsenic in realgar, which may decrease toxicity of realgar.

Key words: Liushen pill; realgar; arsenic; ICP-MS; tissue distribution

六神丸由珍珠粉、牛黄、麝香、冰片、蟾酥、雄黄等六味药材组成, 因其药效神奇而得名, 具有清热

解毒、消肿止痛、强心、增强免疫力等多种疗效, 加之易服、高效、速效等特点, 深受人们青睐。然而方中含有蟾酥、雄黄等毒性药材, 可能会引起一些不良反应, 影响六神丸的用药安全^[1,2]。

雄黄中的主要成分是 As_2S_2 , 也含有少量的 As_2O_3 及微量元素, As_2S_2 在加工或者贮藏过程中很容易氧

收稿日期: 2011-01-08.

基金项目: 国家科技攻关计划资助项目 (2004BA721A13).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-62772263,

E-mail: luoga@tsinghua.edu.cn; yuanyuan_sy@tsinghua.edu.cn

化生成 As_2O_3 , As_2S_2 不溶于水亦不溶于酸、碱, 而 As_2O_3 可溶于水, 易溶于酸、碱。长期服用可导致砷在体内蓄积, 产生致突变、致癌、致畸、损伤肝脏和肾脏等毒副作用^[3-8]。以往对六神丸和雄黄的研究多集中在总砷含量和可溶性砷总量的控制^[9, 10], 然而砷元素的毒性和药效均与其化学形态有密切关系, 而且砷形态成分的变化可能与其组织蓄积量密切相关^[11], 不同形态的砷, 其理化性质和生物活性各不相同, 毒性大小也有差异, 各砷化物的毒性由高到低为: 亚砷酸盐 (As^{III})、砷酸盐 (As^{V})、一甲基砷酸 (MMA^{V})、二甲基砷酸 (DMA^{V})、砷甜菜碱 (AsB)、砷胆碱 (AsC), AsB 和 AsC 常被认为是无毒的^[12]。在六神丸安全性评价研究中, 本课题组成功地应用高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用技术 (HPLC-ICP-MS) 建立了中药复方中砷元素形态分析的方法, 并成功用于六神丸及雄黄中可溶性砷形态的测定^[13]。本研究在此基础上应用单根阴离子交换柱和等度洗脱条件, 建立了 Beagle 犬组织中 6 种砷形态化合物 As^{III} 、 As^{V} 、 MMA^{V} 、 DMA^{V} 、 AsB 和 AsC 的 HPLC-ICP-MS 分析方法, 并将化学物质组学与毒理药理研究相结合, 从总砷含量和砷元素的形态分析等方面探讨 Beagle 犬服用不同剂量的雄黄和六神丸并经过 28 天服药期和 14 天恢复期后, 组织中总砷及各形态砷化合物的分布情况。

通过探讨砷元素在动物体内的吸收、分布、清除过程, 为研究六神丸中雄黄的作用特点、评价雄黄和六神丸的安全性提供依据, 揭示六神丸的复方配伍减毒作用。

材料与方法

仪器与试剂 美国 Thermo X series 电感耦合等离子体质谱; 贝克曼 System Cold 液相色谱泵; Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱; Labway Science Mikro 22R 台式高速冷冻离心机; LabTech EH20B 型电热板 (北京莱伯泰科公司)。

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、磷酸、 H_2O_2 和甲醇 (北京化学试剂公司, 分析纯); 硝酸 (北京化学试剂公司, MOS 纯); Milli-Q 超纯水 (Millipore, 法国)。1 ng·mL⁻¹ 总砷标准溶液, As^{III} 溶液、 As^{V} 溶液、 MMA^{V} 溶液、 DMA^{V} 溶液、 AsB 溶液和 AsC 溶液均为 100 ng·mL⁻¹ (国家标准物质研究中心)。

雄黄单味药材及六神丸复方由上海雷允上药业有限公司提供, 另由上海雷允上药业有限公司仿照

六神丸工艺制备雄黄供试品, 其中六神丸中总砷含量为 126.1 mg·g⁻¹, 雄黄供试品中总砷含量为 141.6 mg·g⁻¹。 As_4S_4 纯品 (纯度大于 99.9%) 由北京市血液病研究中心提供。Beagle 犬空白组织由国家药物安全评价监测中心提供, -80 °C 保存。

实验动物 实验选用普通级 6 月龄 Beagle 犬, 购自军事医学科学院实验动物中心, 雌雄兼用, 适应环境饲养 2 周后分组开始给药。

色谱条件 采用 Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱 (250 mm × 4.1 mm ID), Hamilton PRP-X100 保护柱 (25 mm × 4.3 mm ID)。15 mmol·L⁻¹ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液 (pH 6.10) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹。

总砷测定质谱条件 等离子体功率 1 350 W, Torch-H (水平) 59 mm, Torch-V (垂直) 485 mm, 雾化气流速 0.70 L·min⁻¹, 辅助气流速 0.72 L·min⁻¹, 冷却气流速 13.0 L·min⁻¹。

砷形态分布测定质谱条件 等离子体功率 1 350 W, Torch-H (水平) 60 mm, Torch-V (垂直) 445 mm, 雾化气流速 0.89 L·min⁻¹, 辅助气流速 0.70 L·min⁻¹, 冷却气流速 13.0 L·min⁻¹。

实验动物分组 取健康的 Beagle 犬 32 只 (除空白组 2 只, 其他每组 6 只, 每组雌雄各半), 随机分为 6 组: 空白对照组 (空白胶囊)、六神丸全方低剂量组 (1 mg·kg⁻¹)、六神丸全方中剂量组 (3 mg·kg⁻¹)、六神丸去蟾酥高剂量组 (30 mg·kg⁻¹)、雄黄中剂量组 (3 mg·kg⁻¹) 和雄黄高剂量组 (30 mg·kg⁻¹), 连续给药, 共 28 天。雄黄中剂量组和高剂量组的雄黄剂量分别等于六神丸全方中剂量组和六神丸去蟾酥方高剂量组中的雄黄剂量。

生物样品的处理 Beagle 犬组织样品按“四分法”取样。称取上述处理过的组织 0.05~0.1 g, 向其中加入纯硝酸 0.5 mL 和 H_2O_2 0.1 mL, 摇匀, 浸泡过夜。将样品置于电热板上加热消解, 加热温度 150 °C。加热约 1 h 后, 溶液呈无色或淡黄色, 最后蒸发至约 0.2 mL。取下冷却, 用去离子水稀释至约 2 mL, 测定其中总砷含量; 另称取上述处理过的组织约 0.3 g, 向其中加入甲醇 1 mL, 冰浴匀浆 (总工作时间 300 s, 超声 6 s, 停 9 s, 功率 500 W, 频率 8 kHz), 然后冰浴超声 10 min, 离心 (6 000 r·min⁻¹, 10 min), 将上清液移出, 氮气吹干。剩余物用纯水 1 mL 超声提取 20 min, 离心 (6 000 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液复溶上述氮气吹干物。将上述步骤所得溶液过滤 (孔径 0.45 μm), 滤液用于样品分析测定。

组织分布测定 按设计剂量对 Beagle 犬灌胃给

药, 连续给药 28 天后, 每组处死 4 只 Beagle 犬, 其余 2 只再经 14 天恢复期后处死。取其大脑、小脑、心、肝、胆汁、脾、肺、肾、卵巢或睾丸、脊髓、胰腺、肌肉, 观察有无形态、病理改变, 测定 14 种组织中的总砷含量, 并对主要砷分布器官进行砷形态分析。

结果

1 总砷测定方法学研究

1.1 准确度考察 向空白 Beagle 犬肝组织中加入一定量的砷标准溶液, 使其加入值分别为 10、50 和 200 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。按照上文所述方法进行样品处理, 每个浓度做 3 份平行样。用 ICP-MS 测定结果, 回收率在 80.4%~103.9% 之间, 说明该方法准确度较好。

1.2 精密度考察 同一日同一批次处理的 3 个平行样, 加入量为 200 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 1.07%; 加入量为 50 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 2.37%; 加入量为 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, RSD 为 6.05%。说明该方法日内精密度良好。取一份 Beagle 犬肝组织样品, 按照上述生物样品处理方法, 连续 3 天, 每天做一份样品, 用 ICP-MS 测定其中的总砷含量, 测定值分别为 57.6、52.4 和 59.1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 6.23%。说明该方法日间精密度良好。

1.3 线性范围和检出限考察 取 Beagle 犬空白组织样品, 分别加入一定量的 6 种形态砷混标溶液, 使其分别为 2、5、10、30、100、200 和 300 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 用 ICP-MS 进行测定。结果表明, 砷在 2~300 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 内线性关系良好, 线性方程为 $Y=0.3957+1.3872X$, $r=0.9993$ 。对消解空白和标准溶液交替测定 11 次, 其测量结果标准偏差的 3 倍所对应的浓度即为本方法的检出限 0.01 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 按样品稀释 20 倍计算, 组织中砷的最低检出浓度为 0.2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2 砷形态分布测定方法学研究

2.1 准确度考察 向空白 Beagle 犬组织 (约 0.3 g) 中加入一定量的 6 种砷形态混标溶液, 使其加入值分别为 5、40 和 180 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。按照上文所述方法进行样品处理, 每个浓度做 3 份平行样。回收率结果如表 1。

由于 DMA 与 As^{III} 分离度不好, 所以将两种合并计算。除 AsC 和 MMA 在低浓度的回收率比较差之外, 其他各种形态砷化合物的加样回收率在 70% 以上, 说明该方法准确度较高。6 种形态砷在组织中的谱图见图 1。

2.2 精密度考察 在同一日同一批次处理 3 个平行样, 测定其中砷形态化合物的含量, 6 种砷形态化合物的 RSD 值在 1.03%~6.63%, 说明该方法日内精密度良好。同法操作, 连续 3 天, 每天做 1 份样品, 测

Table 1 Recoveries for the assay of the six species ($n=3$). AsC: Arsenocholine bromide; AsB: Arsenobetaine; As^{III} : Arsenite; DMA^V: Dimethylarsonic acid; MMA^V: Monomethylarsonic acid; As^{V} : Arsenate

Spiked / $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	Mean $\pm$ SD/%				
	AsC	AsB	As^{III} +DMA ^V	MMA ^V	As^{V}
5.0	63.7 $\pm$ 8.7	93.6 $\pm$ 8.6	70.0 $\pm$ 8.3	31.8 $\pm$ 3.2	79.2 $\pm$ 4.3
40.0	96.0 $\pm$ 3.5	85.0 $\pm$ 4.9	96.4 $\pm$ 4.9	96.9 $\pm$ 7.2	94.3 $\pm$ 2.3
180.0	91.7 $\pm$ 3.5	62.2 $\pm$ 8.9	105.1 $\pm$ 1.9	106.1 $\pm$ 9.1	98.9 $\pm$ 6.2

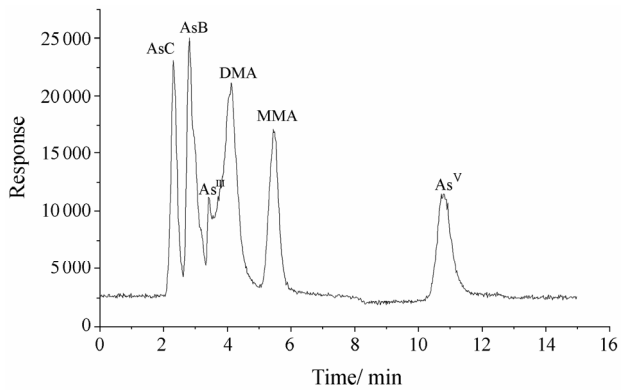


Figure 1 Spectrogram of the six species in tissue (concentration: 40 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

定其中砷形态化合物的含量, 6 种砷形态化合物的 RSD 值在 4.89%~7.56%, 说明该方法日间精密度良好。

2.3 线性范围考察 向 Beagle 犬空白组织样品中分别加入一定量的 6 种形态砷混标溶液, 使其浓度分别为 4、8、16、32、64、100、150 和 200 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。按前文所述方法处理, 测定其中各形态砷的含量, 各形态砷的线性方程, 以峰面积积分值 (Y) 对浓度 (X , $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 进行线性回归, 得到各成分的回归方程, 相关系数和检出限如表 2 所示。可以看出, 6 种形态砷化合物在 4~200 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 内线性关系良好。

Table 2 Linear regression data and LOD ($S/N \geq 3$) of the six species

Arsenic speciation	Regression equation	r^2	LOD / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
AsC	$Y=-0.5300+1.2240 \times 10^7 X$	0.998 2	1.0
AsB	$Y=0.2747+2.0046 \times 10^7 X$	0.996 5	1.0
As^{III} + DMA	$Y=1.3778+1.0831 \times 10^7 X$	0.995 3	2.0
MMA	$Y=-0.5747+1.7307 \times 10^7 X$	0.994 9	1.0
As^{V}	$Y=-0.4539+1.2635 \times 10^7 X$	0.993 9	2.0

3 组织分布

3.1 组织中总砷含量测定 取其大脑、小脑、心、肝、胆汁、脾、肺、肾、卵巢或睾丸、脊髓、胰腺、肌肉, 观察其有无形态、病理改变, 测定其中总砷含量, 各

剂量 Beagle 犬给药结束后 (28 天) 组织中总砷分布如图 2 所示, 恢复期 (14 天) 中总砷分布如图 3 所示。根据组织中的总砷含量, 并结合病理切片观察, 确定 5 个主要分布器官, 分别为心脏、肝脏、脾脏、肾脏和肺。

由图 2 可见, 雄黄高剂量组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药 28 天后, 在脊髓中有较高的砷含量 ($91.9 \pm 15.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), 而在含等量雄黄的六神丸去蟾酥高剂量组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 中, 脊髓中总砷含量却是正常值 ($28.3 \pm 7.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)。经过 14 天的恢复期, 多数组织中的砷含量都能恢复到空白对照组中砷的水平, 但雄黄高剂量组的肝, 以及雄黄高低剂量组、六神丸高中剂量组的生殖器官未能恢复到空白对照组中砷的水平。

3.2 组织中砷的形态分析及分布 对砷的主要分布器官进行砷形态分析, 所得结果主要是 As^{III} 、 DMA^{V} 和 AsB , 未检测到 As^{V} 、 MMA^{V} 和 AsC 。实验结果见图 4。

讨论

剂量、给药途径和给药周期的选择是毒理研究的重要环节, 直接关系到安全性评价的可靠性。本研究

根据六神丸临床剂量进行换算, 并结合预试验研究结果, 确定了六神丸低、中、高 3 个剂量 (1 、 3 和 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和雄黄中、高两个剂量组 (3 和 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。雄黄供试品按照六神丸工艺制备, 雄黄药材用量与六神丸相同, 中剂量 ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 为微量中毒剂量, 高剂量 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 未出现明显中毒反应的剂量。在动物预实验时发现, 药粉中所含蟾酥量较大时可使动物产生呕吐反应, 为避免动物呕吐并考虑到本研究主旨是研究雄黄毒性的蓄积及动物自身对于蓄积后的清除能力, 因此高剂量组则采用六神丸去蟾酥方进行实验。临床上六神丸通常为口服给药, 且每疗程不超过一周, 因此, 本研究选择经口给药途径, 给药周期为临床用药周期的 4 倍, 即 28 天。

脊髓是感觉和运动神经冲动传导的重要通路, 研究表明砷是一种神经毒物^[14], 雄黄高剂量组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药 28 天后, 在脊髓中总砷含量较高, 而灌服含等量雄黄的六神丸去蟾酥方的高剂量组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 脊髓中总砷含量与空白组织相近。由此可见雄黄的神经毒性可能与砷元素在脊髓的蓄积有关, 而经六神丸配伍后, 可减少总砷在脊髓的蓄积, 减轻其神经毒性。Beagle 犬口服六神丸和雄黄的毒理生理

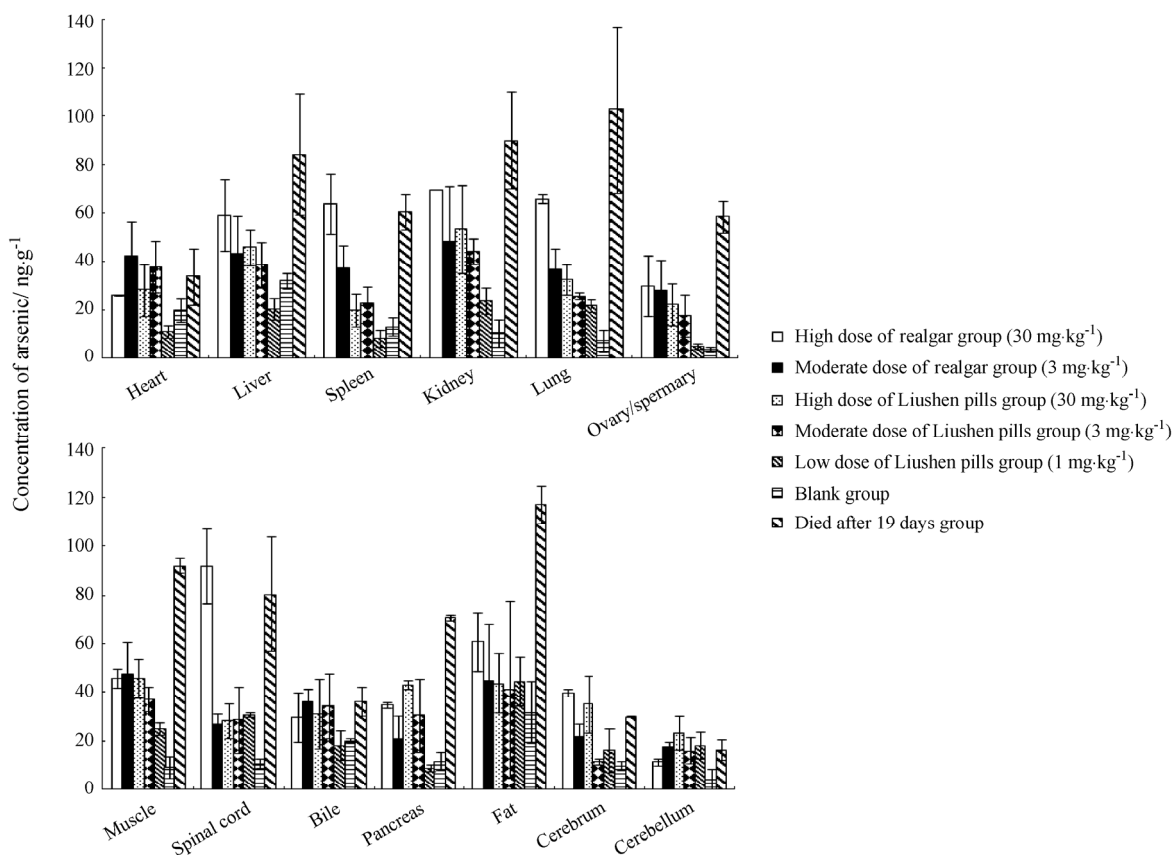


Figure 2 Concentrations of arsenic in tissues of different groups after administration

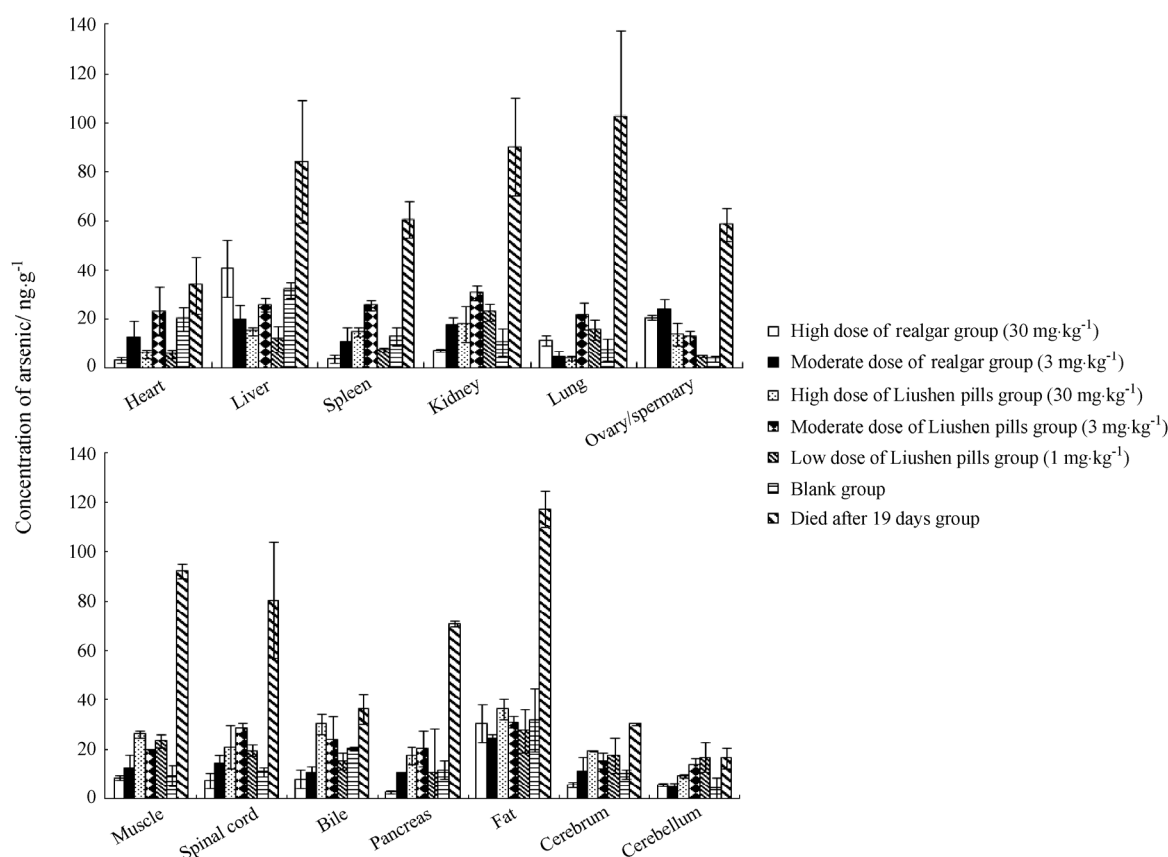


Figure 3 Concentrations of arsenic in tissues of different groups at recovery stage

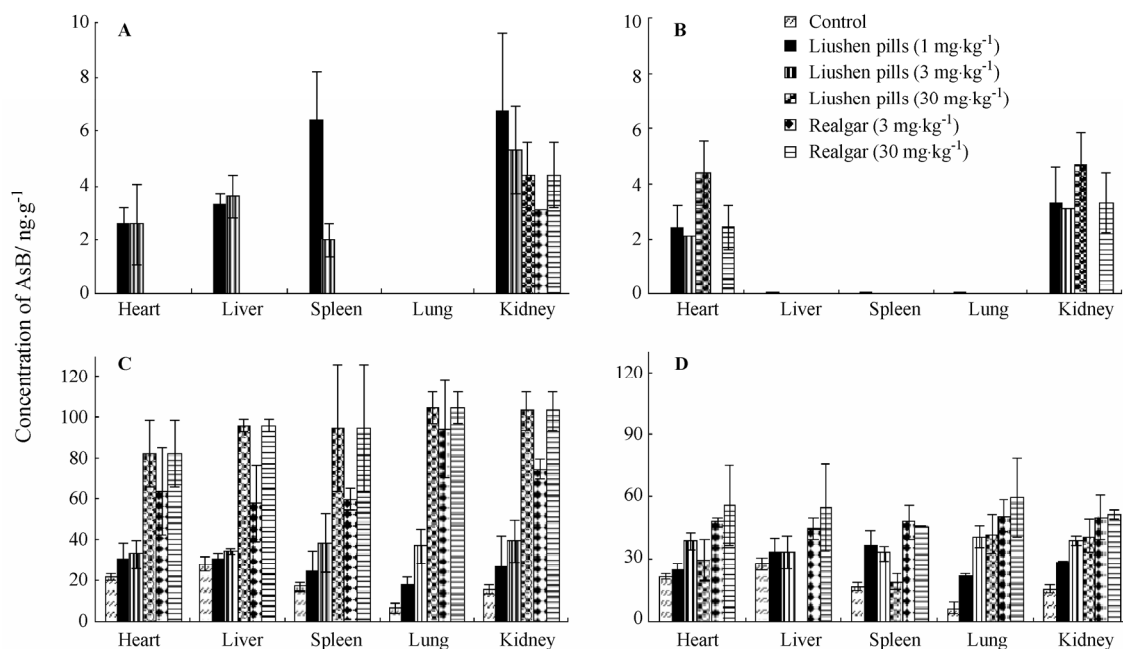


Figure 4 Tissue distributions of arsenic from different groups. A: Concentration of AsB at administration stage; B: Concentration of AsB at recovery stage; C: Concentration of (As^{III} + DMA) at administration stage; D: Concentration of (As^{III} + DMA) at recovery stage. $n = 6$

实验结果表明雄黄高剂量组 (30 mg·kg⁻¹) 出现严重呕吐现象, 从首次给药一直持续到末次给药。从给药开始约 2 周左右, 动物出现软便、流涎、活动减少、

眼结膜无光泽等严重临床症状, 19 天后 2 只该剂量组的 Beagle 犬死亡, 其组织中砷含量远远高于其他个体, 尤其是肝 (84.3±25.0 ng·g⁻¹)、肾 (90.1±20.0 ng·g⁻¹)、

肺 ($102.8 \pm 34.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)、肌肉 ($92.1 \pm 3.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)、胰 ($70.6 \pm 1.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 和脂肪 ($117.0 \pm 19.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 中明显增高, 说明未经配伍的高剂量的雄黄毒性很大, 甚至导致动物死亡。

Beagle 犬经 14 天恢复期, 多数组织中砷含量都能恢复到空白对照组中砷的水平, 说明砷在组织中的分布是可逆的, 14 天内可以被清除。但雄黄高剂量组的肝, 以及雄黄高低剂量组、六神丸高中剂量组的生殖器官组织中总砷含量未能恢复到空白对照组中砷的水平。由于肝脏是生物体的解毒器官, 其中含有大量的巯基, 雄黄中的砷易与其结合, 故雄黄高剂量组动物在经过 14 天恢复期后, 肝中的大量砷仍难以被清除。生殖器官中的砷难以清除, 推测雄黄中的砷存在生殖系统毒性, 这与报道^[15]一致。

含相同剂量雄黄的六神丸组较之雄黄组, 多数组织中砷的含量均有降低。雄黄高剂量组 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和含等量雄黄的六神丸去蟾酥组中, 总砷含量差异在肝 (雄黄: $59.1 \pm 14.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 六神丸: $45.9 \pm 7.35 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)、脾 (雄黄: $64.0 \pm 12.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 六神丸: $20.0 \pm 6.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)、肾 (雄黄: $69.6 \pm 0.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 六神丸: $53.5 \pm 18.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)、肺 (雄黄: $65.9 \pm 0.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 六神丸: $32.6 \pm 6.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 和脊髓 (雄黄: $91.9 \pm 15.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 六神丸: $28.3 \pm 7.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 等组织中表现尤为明显, 说明雄黄经六神丸配伍后, 砷在组织中的分布降低。然而六神丸低剂量组 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相当于临床剂量, 在这一组中, 给药 28 天、恢复期 14 天和空白对照组中的组织总砷含量差异不明显。结果提示按照临床剂量服用六神丸, 即使连续服用 28 天, 也不会对动物体造成明显影响。

对组织中砷形态的分析发现, 六神丸组所有组织中的 $\text{As}^{\text{III}} + \text{DMA}$ 浓度均比等雄黄剂量的雄黄组低, 而六神丸组的肝中的 AsB 浓度却比等雄黄剂量的雄黄组高。 As^{III} 和 DMA 的毒性均比 AsB 大, $\text{As}^{\text{III}} + \text{DMA}$ 毒性比 AsB 大, 说明六神丸复方配伍后, 促进体内的砷化合物向毒性较小的形态转化, 进一步表明六神丸复方配伍后对雄黄具有一定的减毒作用。

References

- [1] Xu SH, Liu YX. Common toxic reaction and treatment measures of Liushen pills [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2001, 5: 197.
- [2] Huang JM, Zhang WH. The extended application and attention of using for Liushen pills [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2005, 27: Appendix 9–11.
- [3] Sun EL, Bu XZ. Study on mutagenicity of Xionghuang [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med (中国中医基础医学杂志), 1998, 4: 52.
- [4] Liu XH. Clinical applications and adverse reaction of Xionghuang [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2003, 20: 20–21.
- [5] Leechen SF, Yu CT, Jan KY. Effect of arsenate on the DNA repair of UV-irradiated Chinese-hamster ovary cells [J]. Mutagenesis, 1992, 7: 51–55.
- [6] Duo L, Huang YZ, Shen DW, et al. Clinical and pathologic features of basal cell carcinoma caused by arsenic [J]. Chin J Derm Venereol (中国皮肤性病学杂志), 1999, 13: 85.
- [7] Li Y, Zhu HG, Fan YQ, et al. Teratogenic effects of arsenic on rats [J]. Chin J Prev Med (中华预防医学杂志), 1998, 32: 37.
- [8] Yuan PJ. Alert toxicity of arsenic in Xionghuang preparations [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 1996, : 21.
- [9] Sun H, Wu XC, Zhou Y, et al. Analysis and quality assessment standard of heavy metals and arsenic in Rhizoma et Radix Notopterygii from different localities [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 978–980.
- [10] Wang JH, Ye ZG, Liang AH, et al. Absorption and distribution of mercury and arsenic from realgar and cinnabar of Angong Niu Huang pill in normal rats and rats with cerebral isthmian [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28: 639–642.
- [11] Zhang JH, Fan Q, Li HY. Pharmacokinetics of bacteria bioleaching solution of realgar in rat [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1279–1284.
- [12] Aposhian HV, Zheng BS, Aposhian MM, et al. DMPS-arsenic challenge test II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid ($\text{MMA}(\text{III})$), excreted in human urine [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 165: 74–83.
- [13] Wu Q, Liang QL, Luo GA, et al. Speciation analysis of solvable arsenic in Liushen pills by HPLC-ICP-MS [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2007, 38: 332–335.
- [14] Golub MA. Marenal toxicity and the identification of organic arsenic as a developmental toxicant [J]. Rep Toxicol, 1994, 8: 283.
- [15] Zhang C, Wang GQ, Xiao BY. A review on arsenic-induced toxicity in genitals [J]. Chin J Prev Med (中华预防医学杂志), 2000, 34: 56–58.