

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.021

高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定接骨七厘片中总砷含量及砷形态分析

朱琼, 方静, 蔡鹏, 钱保勇

(江苏省泰州市食品药品检验所, 江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立测定接骨七厘片中总砷含量的电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法,以及测定砷形态含量的高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用(HPLC-ICP-MS)法。方法 采用ICP-MS法测定接骨七厘片中总砷的含量;采用HPLC-ICP-MS法测定接骨七厘片中砷甜菜碱(AsB)、砷胆碱(AsC)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)、亚砷酸盐 As(Ⅲ)、砷酸盐 As(V)的含量。结果 总砷质量浓度线性范围是 2.0~20.0 ng/mL($r=0.999\ 2$);检测限为 0.001 6 ng/mL;加样回收率为 98.23%~99.95%, RSD 小于 3.25% ($n=3$);AsB, AsC, MMA, DMA, As(Ⅲ), As(V) 6种砷形态线性关系均良好($r>0.999$),检测限范围为 0.002 9~0.010 3 ng/mL,加样回收率为 89.15%~95.89%, RSD 小于 7.14% ($n=3$)。接骨七厘片中含有 MMA, DMA, As(Ⅲ), As(V),其中 As(V)含量最高,其次是 As(Ⅲ),以及少量的 MMA 和 DMA。结论 该方法经方法学验证,可用于中药材及制剂中砷含量的测定。

关键词: 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用法;接骨七厘片;砷形态;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0078-04

Analysis of Total Arsenic Content and Arsenic Species in Jiegu Qili Tablets by HPLC-ICP-MS

ZHU Qiong, FANG Jing, CAI Peng, QIAN Baoyong

(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish an inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) method for the determination of total arsenic content in Jiegu Qili Tablets, and a high performance liquid chromatograph-inductively coupled plasma mass spectrometry(HPLC-ICP-MS) method for the determination of arsenic species. Methods The ICP-MS method was used to determine the total arsenic content in Jiegu Qili Tablets. The HPLC-ICP-MS method was used to determine the contents of arsenic betaine(AsB), arsenic choline(AsC), and monomethyl arsenic(MMA), Dimethyl arsenic(DMA), arsenite As(Ⅲ), arsenate As(V) in Jiegu Qili Tablets. Results Total arsenic showed good linear relationship in the range of 2.0~20.0 ng/mL($r=0.999\ 2$);the detection limit was 0.001 6 ng/mL, the

第一作者:朱琼,女,硕士研究生,主管药师,主要从事药物分析工作,(电子信箱)happyzhuqiong@126.com。

参考文献:

- [1] 郭冬,王洪波,杜霞,等.祛瘀生新胶囊挥发性部位研究[J].西北药学杂志,2016,31(6):568-571.
- [2] 穆庆丽,乔国,郭冬.祛瘀生新胶囊药效学及急性毒性实验研究[J].中国药业,2019,28(22):4-6.
- [3] 全健,王彦鹏.祛瘀生新胶囊治疗股骨头坏死的临床效果[J].临床医学研究与实践,2018,3(32):122-123.
- [4] 翟宏宇,王海洋,凌颖,等.HPLC法测定丹黄祛瘀胶囊中黄芪甲苷含量[J].中国卫生工程学,2018,17(1):99-101.
- [5] 刘春河,张国跃.安痛舒贴质量标准研究[J].中国药业,2017,26(18):17-21.
- [6] 李渊,高晓霞,王慧,等.基于UPLC-Q/Exactive Orbitrap-MS/MS技术研究柴归颗粒的离体肠吸收[J].山西医科大学学报,2020,51(2):165-170.
- [7] 刘海霞,裴香萍,杜晨晖,等.UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱分析中华苦苣菜与苣荬菜中主要化学成分[J].中草药,2018,49(7):1543-1547.
- [8] XU TY, ZUO LH, SUN Z, et al. Chemical profiling and quantification of ShenKang injection, a systematic quality control strategy using ultra high performance liquid chromatography with Q Exactive hybrid quadrupole orbitrap high-resolution accurate mass spectrometry[J]. PubMed, 2017, 40(24):4872-4879.
- [9] 李瑶,赵金双,赵辉,等.中药三棱研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(9):92-94.
- [10] 白洁,郝武常,郭冬.愈骨佳胶囊含量测定方法[J].陕西中医,2015,34(11):1544-1545.
- [11] 王伟.马钱子的炮制质量研究[J].内蒙古中医药,2017,36(3):98-99.
- [12] 王菲菲,张聿梅,郑笑为,等.骨刺片中士的宁和马钱子碱含量测定方法的研究[J].药物分析杂志,2018,38(10):1824-1829.
- [13] 王辉,杨树东,王乐奇,等.HPLC法测定接骨定痛丸中士的宁的含量[J].中国医药指南,2015,13(32):33-34.
- [14] 屈艳格,陈军,蔡宝昌.士的宁的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):247-251.
- [15] 王佳,冯建安,李希,等.HPLC-ELSD法测定归芪升白颗粒中黄芪甲苷含量[J].亚太传统医药,2017,13(5):41-43.
- [16] 曹玉冰.黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J].现代药物与临床,2017,32(5):954-960.

(收稿日期:2020-02-15)

recovery was 98.23%–99.95%, and the *RSD* was less than 3.25% ($n=3$); the 6 kinds of arsenic species AsB, AsC, MMA, DMA, As(III), As(V) all showed good linear relationship ($r > 0.999$); the detection limit was 0.002 9–0.010 3 ng/mL, the recoveries was 89.15%–95.89%, the *RSD* was less than 7.14% ($n=3$). There were MMA, DMA, As(III), and As(V) in the Jiegu Qili Tablets, and As(V) had the highest content, followed by As(III), and a small amount of MMA and DMA. **Conclusion** This method has been preliminary validated and can be utilized for the test of arsenic species in Chinese herbal medicines and preparations.

Key words: high performance liquid chromatograph–inductively coupled plasma mass spectrometry; Jiegu Qili Tablets; arsenic species; content determinations

接骨七厘片是由醋乳香、醋没药、当归、土鳖虫、龙血竭、酒大黄等药材加工制成的中成药,具有活血化瘀、接骨止痛的功效^[1],能促进骨折愈合,增强抗折作用,对小鼠醋酸致痛有镇痛作用,临床应用广泛。但接骨七厘片中的有害元素时有超标^[1],特别是砷超标需引起重视。为控制接骨七厘片的质量,评价其安全性,砷的测定十分有必要。砷的毒性根据其不同形态有着显著差异,亚砷酸盐 As(III) 和砷酸盐 As(V) 是毒性最大的无机砷,一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA)的毒性较弱,而砷甜菜碱(AsB)和砷胆碱(AsC)无毒。为了科学地评估接骨七厘片中的砷毒性,确定其安全使用的含量范围,有必要对砷形态进行分析。目前,中药中总砷的测定方法主要有氢化物原子荧光法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体发射光谱法,对砷形态的分析方法主要有高效液相色谱–氢化物原子荧光法、高效液相色谱–电感耦合等离子体质谱法(HPLC–ICP–MS)^[2–3]。本研究采用 HPLC–ICP–MS 法对中成药中砷形态进行了含量测定,并制订了相应质量标准,可为研究其他中成药质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);ICP–Q 型电感耦合等离子体质谱仪(美国赛默飞公司);梅特勒电子天平(美国梅特勒公司,精度为 0.1 mg)。

1.2 试剂

砷单元素标准溶液(批号为 175385–28, 1000 μg/mL),亚砷酸盐 As(III)(批号为 144014–7, 1000 μg/mL),砷

酸盐 As(V)(批号为 976236–2, 1000 μg/mL),均购自美国 O2Si Smart Solutions 公司;砷甜菜碱[批号为 1509, 以砷计(38.8 ± 1.1) μg/g],砷胆碱[批号为 1512, 以砷计(28.1 ± 1.1) μg/g],一甲基砷[批号为 16072, 以砷计(25.1 ± 0.8) μg/g],二甲基砷[批号为 1607, 以砷计(52.9 ± 1.8) μg/g],均购自中国计量科学研究院;接骨七厘片(湖南金沙药业有限责任公司,批号分别为 161235, 161237, 170120);硝酸为色谱纯,水由 Milli–Q 系统制得;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 砷形态分析

2.1.1 HPLC–ICP 质谱条件

质谱条件:等离子体功率为 1 550 W,载气为高纯氩气;载气流速为 1.0 L/min;采样深度为 5 mm;冷却气流量为 14 L/min;辅助气流量为 0.8 L/min;载气流速为 0.9 L/min;数据重复采集次数为 3 次。

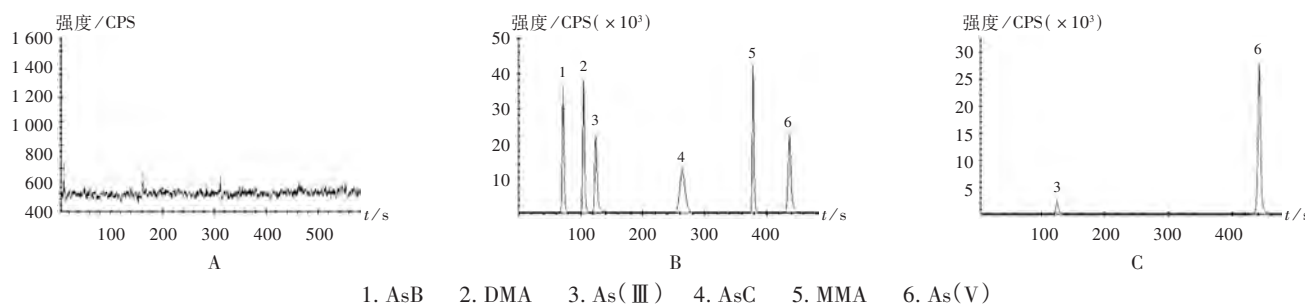
色谱条件:赛默飞 AS7 阴离子交换柱(250 mm × 4.6 mm);流动相为 10 mmol/L 碳酸铵(A), 100 mmol/L 碳酸铵(B),梯度洗脱,洗脱程序见表 1;流速为 0.8 mL/min;进样量为 20 μL。记录离子流图(见图 1)。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	100	0	8	100	0
3	50	50	10	100	0
5	50	50			

2.1.2 标准溶液配制及线性关系考察

精密量取砷单元素标准溶液适量,逐级稀释配制成含砷为 0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 20.0 ng/mL 的系列质量浓度混合标准溶液,照 2.1.1 项下条件测定。取



1. AsB 2. DMA 3. As(III) 4. AsC 5. MMA 6. As(V)

A. 空白溶液 B. 6 种形态砷标准溶液 C. 供试品溶液

图 1 离子流图

10个空白溶液测定空白强度值,按空白值的3倍标准差和10倍标准差分别计算检测限(LOD)和定量限(LOQ)。

取6种形态砷,精密称定,分别用去离子水配制成As(Ⅲ)的质量浓度分别为0,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,20.0 μg/L;As(V)的质量浓度分别为0,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,20.0 μg/L;MMA的质量浓度分别为0,1.00,2.00,4.00,8.01,16.02,20.02 μg/L;DMA的质量浓度分别为0,1.00,2.01,4.02,8.03,16.06,20.08 μg/L;AsB的质量浓度分别为0,1.02,2.04,4.08,8.15,16.30,20.38 μg/L;AsC的质量浓度分别为0,1.00,2.01,4.02,8.04,16.08,20.10 μg/L。按2.1.1项下条件测定,标准曲线及相关系数见表2。取10个空白溶液测定空白强度值,并计算LOD和LOQ,结果见表2。

表2 标准曲线方程与灵敏度考察结果

砷形态	标准曲线方程	线性范围 (μg/mL)	相关系数 (r)	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
AsB	$Y=516.3904X+56.5455$	1.02~20.38	0.9995	0.0082	0.025
AsC	$Y=266.0366X+48.6100$	1.00~20.10	0.9996	0.0073	0.022
MMA	$Y=527.8495X-0.7680$	1.00~20.02	0.9992	0.0045	0.014
DMA	$Y=567.2036X-3.9021$	1.00~20.08	0.9990	0.0029	0.009
As(Ⅲ)	$Y=7232.6533X-41.8050$	1.00~20.00	0.9994	0.0077	0.023
As(V)	$Y=7008.9310X+12776.3523$	1.00~20.00	0.9992	0.0103	0.031
总砷	$Y=10673.4258X+2921.9473$	1.00~20.00	0.9992	0.0016	0.005

2.2 总砷含量测定

2.2.1 质谱条件

同2.1.1项下质谱条件。

2.2.2 溶液制备

取样品(去包衣),粉碎,混匀,取粉末0.50 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,加入人工肠液20 mL,超声15 min,放置过夜。次日放入37.5℃烘箱中提取3 h,每隔0.5 h振摇锥形瓶1 min。提取完毕,吸取中层滤液10 mL,用微孔滤膜过滤,取续滤液5 mL,再用0.02 mol/L乙二胺四醋酸二钠(EDTA)溶液稀释至50 mL容量瓶中即得砷形态溶液。

取样品(去包衣)0.25 g,精密称定,置微波消解罐中,加入硝酸7 mL,加盖密闭,在100℃下预消解15 min,冷却,然后放入微波消解仪中消解。消解采用程序升温,20℃升至110℃,保持8 min;110℃升至160℃,保持

6 min;160℃升至180℃,保持25 min。待消解完全后,当冷却温度至低于45℃时,取出消解罐,继续放冷至室温,将消解后的溶液定量至50 mL容量瓶中,用少量超纯水润洗消解罐4次,合并至容量瓶中,用超纯水定容,摇匀,放置,取上清液作为总砷测定的供试品溶液。依法制备空白溶液。

2.2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(批号为161235)粉末,分别加入高、中、低质量浓度(16,8,2 ng/mL)的AsB、AsC、MMA、DMA、As(Ⅲ)、As(V)、总砷标准溶液,每个质量浓度制备3个平行样,按拟订方法测定,计算RSD。结果见表3,RSD在1.78%~7.20%之间,精密度符合微量元素分析的要求。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,分别于0,1,2,4,8 h时按拟订条件测定。结果AsB、AsC、MMA、DMA、As(Ⅲ)、As(V)和总砷离子强度的RSD均小于5.00%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定。

重复性试验:取样品粉末(批号为161235),平行配制6份砷形态样品和6份总砷样品,按拟订条件测定,根据砷形态测定结果计算的RSD为3.12%~6.64%(n=6),根据总砷的测定结果计算的RSD为2.32%(n=6),符合微量元素分析要求。

加样回收试验:在已知含量的样品(批号为161235)粉末中分别加入高、中、低质量浓度(16,8,2 ng/mL)的AsB、AsC、MMA、DMA、As(Ⅲ)、As(V)和总砷标准溶液,每个质量浓度制备3个平行样,按拟订条件测定,计算加样回收率。结果见表4,其范围在89.15%~99.95%之间,RSD符合微量元素分析要求。

2.2.4 样品含量测定

按拟订条件测定3批样品中总砷和砷形态的含量,结果见表5。

3 讨论

3.1 提取温度选择

比较人工胃液、人工肠液、水提液3种提取方式在37.5℃的提取率,结果水提取和人工胃液提取的含量都很低,但人工肠液提取率略好。设置人工肠液提取的温度分别为37.5,60,90,120℃,结果90℃提取效率最高,

表3 AsB、AsC、MMA、DMA、As(Ⅲ)、As(V)、总砷精密度试验结果

加样质量浓度(ng/mL)	AsB		AsC		MMA		DMA		As(Ⅲ)		As(V)		总砷	
	标准差	RSD	标准差	RSD	标准差	RSD	标准差	RSD	标准差	RSD	标准差	RSD	标准差	RSD
	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)	($\bar{X} \pm s$, ng/mL)	(%)
16	16.32±0.79	4.84	16.29±0.96	5.89	16.09±0.69	4.29	16.81±1.21	7.20	16.19±0.46	2.84	18.11±0.84	4.64	18.01±0.69	3.83
8	8.68±0.51	5.88	8.24±0.41	4.98	7.89±0.51	6.46	8.30±0.55	6.63	8.13±0.53	6.38	10.31±0.32	3.10	10.09±0.18	1.78
2	2.18±0.10	4.59	2.07±0.10	4.83	2.09±0.11	5.26	2.12±0.08	3.77	2.12±0.06	2.83	4.22±0.21	4.98	4.21±0.15	3.56

表4 加样回收试验结果($\bar{X} \pm s, \%, n=3$)

加样质量浓度(ng/mL)	AsB	AsC	MMA	DMA	As(Ⅲ)	As(V)	总砷
16	91.22±6.51	90.91±3.23	92.95±6.10	95.89±5.52	92.92±7.00	94.63±5.93	98.23±3.25
8	93.46±5.44	94.02±4.62	94.27±5.63	96.26±7.14	89.15±6.57	92.58±5.25	99.95±2.56
2	92.57±5.91	92.20±6.24	94.52±7.10	95.23±6.29	93.73±5.17	94.89±5.71	98.37±3.02

表5 3批样品中砷形态测定结果(mg/kg, $n=3$)

批号	AsB	AsC	MMA	DMA	As(Ⅲ)	As(V)	总砷
161215	ND	ND	0.014	0.003 7	0.126	2.141	2.235
161237	ND	ND	0.014	0.003 5	0.156	1.816	1.925
170120	ND	ND	0.013	0.003 8	0.136	2.272	2.409

注:ND为未检出。

当提取温度继续增加至120℃时,As(Ⅲ)含量变低,As(V)含量变高,提示砷形态会发生转变。为了保证提取效率和砷形态不发生变化,故选择人工肠液在90℃提取^[4-6]。

3.2 流动相选择

2015年版《中国药典(四部)》中砷形态测定采用的是0.025 mol/L磷酸二氢铵(氨水调节pH至8.0)为流动相,本研究中采用的是碳酸铵为流动相,是因为磷酸二氢铵更易污染质谱的采样锥,易导致质谱熄火,而碳酸铵系统进入ICP-MS后,被分解成易挥发的气体,不会产生残留,可减少质谱熄火等情况的发生。同时,高盐样品经过电感耦合等离子体时间太长,会产生信号漂移,应以质控样品或对照溶液进行回测,或采用内标法进行校正。

3.3 溶剂选择

对供试品进行前处理时,最后需将样品用EDTA溶液进行稀释定容,可有效降低溶剂效应,分离效果更好,其质谱离子流图也更满意,特别是AsB和MMA的峰形会更尖锐,否则会出现双峰及拖尾^[7-12]。

3.4 分离方法选择

目前,分离形态砷的方法主要有高效液相色谱-氢化物原子荧光法和HPLC-ICP-MS法。前者分离时间较长,出峰时间短,峰形较差。HPLC-ICP-MS法分离时间较短,且配制试剂较少,测定结果更稳定,该方法可用于药物体内代谢途径及部位的研究^[13-14]。

3.5 方法评价

本研究中建立了测定接骨七厘片中砷形态的HPLC-ICP-MS法,同时采用ICP-MS法对接骨七厘片中的总砷进行了测定,结果准确、可靠。不同批次接骨七厘片中砷形态含量存在差异,其中As(V)含量最高,其次是As(Ⅲ),还含有少量的MMA,DMA,AsB和AsC

均未检测到。由可溶性砷含量的测定结果可见,接骨七厘片中的砷主要是可溶性砷,以可溶性砷中的As(V)含量最高。

参考文献:

- [1] 尹丽,徐鸿,邓继华,等. 接骨七厘片(散、丸)中有害元素和功效成分的测定[J]. 中成药,2017,39(8):1744-1746.
- [2] STICE S, LIU G, MATULIS S, et al. Determination of multiple human arsenic metabolites employing high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1009-1010:55-65.
- [3] THEINER S, GRABARICS M, GALVEZ L, et al. The impact of whole human blood on the kinetic inertness of platinum(Ⅳ) prodrugs - an HPLC-ICP-MS study[J]. Dalton Transactions, 2018, 47(15):1-18.
- [4] 曹璨,刘成雁,王志嘉,等. 微波酸提取-液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定动物源性中药中6种砷形态[J]. 分析测试学报, 2017, 36(6):756-761.
- [5] 陈绍占,刘丽萍,杜宏举,等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析经牛黄解毒片暴露后大鼠血清中砷形态[J]. 质谱学报, 2017, 38(2):177-186.
- [6] 章剑扬,王国庆,马桂岑,等. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定茶叶中4种砷形态[J]. 中国食品学报, 2017, 17(7):255-262.
- [7] 陈荣,张华锋. 基于HPLC联合ICP-MS法测定活血止痛胶囊中总砷、可溶性砷、价态砷[J]. 中国合理用药探索, 2019, 16(5):183-186.
- [8] 艾丹,陈秋生. HPLC-ICP-MS测定牛黄解毒片中砷形态分析的不确定度[J]. 湖北农业科学, 57(23):134-137.
- [9] 杨芬,谢邵文,韦朝阳,等. HPLC-ICP-MS联用技术研究甲醇对砷形态分析结果的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(6):230-234.
- [10] JAMARI NLA, DOHMANN JF, RAAB A, et al. Novel non-target analysis of fluorine compounds using ICPMS/MS and HPLC-ICPMS/MS[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2017, 32(5):942-950.
- [11] 姜新,李少元,邓小颖,等. 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[J]. 中草药, 2018, 49(22):103-108.
- [12] ZUO TT, LI YL, JIN HY, et al. HPLC-ICP-MS speciation analysis and risk assessment of arsenic in Cordyceps sinensis[J]. Chinese Medicine, 2018, 13(1):19.
- [13] 林琳,张素静,徐渭聪,等. 血液和尿液中砷形态化合物的HPLC-ICP-MS分析[J]. 法医学杂志, 2018, 34(1):37.
- [14] 李蕙. 接骨七厘片高效液相色谱法测定阿魏酸的含量[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(1):19.

(收稿日期:2019-11-16;修回日期:2020-02-11)