

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)08-0078-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.08.018



# 高效液相色谱-原子荧光光谱联用法测定活血止痛胶囊中4种形态砷含量\*

朱琼, 方静, 钱晓翠, 冯璐, 葛薇薇<sup>△</sup>

(江苏省泰州市药品检验院, 江苏 泰州 225300)

**摘要:**目的 建立测定活血止痛胶囊中4种形态砷含量的高效液相色谱-原子荧光光谱联用法。方法 色谱条件, 色谱柱为 Hamilton PRP-X100 柱(250 mm × 4.1 mm, 10 μm), 流动相为 12 mmol/L 的磷酸氢二铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>], 用甲酸调 pH 至 6.0, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 100 μL, 载液为 7% 盐酸溶液; 氢化物发生参数, 还原剂为含 1.5% 硼氢化钾(KBH<sub>4</sub>)及 0.5% 氢氧化钾(KOH)的水溶液, 负高压为 285 V, 原子化器高度为 10 mm。原子荧光仪器参数, 灯电流为 40 mA, 载气流量为 300 mL/min, 屏蔽器流量为 800 mL/min。**结果** 三价砷(As<sup>III</sup>)、二甲基砷(DMA)、一甲基砷(MMA)、五价砷(As<sup>V</sup>)质量浓度分别在 5.060~101.2 ng/mL, 5.005~101.1 ng/mL, 5.020~100.4 ng/mL, 5.035~100.7 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r \geq 0.9990$ ), 检测限分别为 0.088, 0.131, 0.119, 0.381 ng/mL, 定量限分别为 0.290, 0.432, 0.357, 1.143 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5%; 平均加标回收率分别为 95.15%, 96.30%, 95.58%, 96.23%, RSD 分别为 2.87%, 1.57%, 2.25%, 3.43% ( $n=9$ )。**结论** 该方法操作简便, 结果准确可靠, 可用于测定活血止痛胶囊中4种形态砷的含量, 同时为完善含砷风险高的中成药的质量标准提供技术参考。

**关键词:** 活血止痛胶囊; 高效液相色谱法; 原子荧光光谱法; 砷形态; 含量测定

## Determination of Four Forms of Arsenic in Huoxue Zhitong Capsules by High Performance Liquid Chromatography - Atomic Fluorescence Spectrometry

ZHU Qiong, FANG Jing, QIAN Xiaocui, FENG Lu, GE Weiwei

(Taizhou Food and Drug Inspection Institute, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

**Abstract: Objective** To establish method for the determination of four forms of arsenic in Huoxue Zhitong Capsules by high performance liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry. **Methods** The chromatographic conditions were as follows: the chromatographic column was Hamilton PRP-X100 column (250 mm × 4.1 mm, 10 μm), the mobile phase was 12 mmol/L diammonium phosphate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>], pH was adjusted to 6.0 with formic acid, the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 100 μL, and the carrier liquid was 7% hydrochloric acid solution. The parameters of hydride generation were as follows: the reducing agent was an aqueous solution containing 1.5% potassium borohydride (KBH<sub>4</sub>) and 0.5% potassium hydroxide

\* 基金项目: 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室开放研究课题[NMPA-KLIPCD-2023-06]。

第一作者: 朱琼, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)383667503@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 葛薇薇, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)1908368215@qq.com。

中成药, 2006, 28(2): 303.

[11] 字磊, 李艳娟, 李艳芹, 等. 中药复方配伍机制研究方法/策略进展[J]. 中国药房, 2023, 34(11): 1393-1398.

[12] 项丽玲, 苗明三. 中药质量生物学评价的思考[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1437-1439.

[13] 徐亚杰, 刘彤. UPLC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中交泰丸主要成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(6): 659-665.

[14] 廖香莲, 吴涛, 梅菊, 等. 不同产地肉桂质量及其储藏对成分的影响[J]. 食品工业, 2023, 44(11): 289-293.

[15] 宋芊芊, 周慧银, 赵宏苏, 等. 牡丹皮药材关键质量标准的优化研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(5): 78-82.

[16] 陈箫箫, 赵宏苏, 章芳珍, 等. 安徽主产区牡丹皮药材质量差异研究[J]. 中南药学, 2020, 18(4): 680-684.

[17] 李晓艳, 张侠, 张紫薇, 等. HPLC双波长切换法同时测定不同产地牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 药品评价, 2022, 19(15): 904-907.

[18] 明凯利, 王海丁, 张馨之, 等. 补肾健骨胶囊中莫诺苷与马钱苷含量测定[J]. 中国药师, 2022, 25(3): 534-537.

[19] 侯亚迪, 尚子慧, 陈培, 等. 山茱萸环烯醚萜苷的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(6): 69-76.

[20] TAO JH, ZHAO M, JIANG S, et al. Comparative metabolism of two major compounds in Fructus Corni extracts by gut microflora from normal and chronic nephropathy rats *in vitro* by UPLC-Q-TOF/MS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1073: 170-176.

[21] 李怀伟, 张朋, 全桂平, 等. HPLC同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中4种活性成分的含量[J]. 山东化工, 2019, 48(18): 71-73.

[22] 魏引平, 闫花丽. 从高质量发展谈中药制剂原料的监管[J]. 中国药事, 2023, 37(1): 18-22.

[23] 万鑫浩, 舒清霞, 王子千, 等. 基于工艺与装备视角分析中药制剂质量的关键影响因素[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1699-1704.

(收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-09-02)

(KOH), the negative high voltage was 285 V, and the highness of atomizer was 10 mm. The atomic fluorescence instrument parameters were as follows: lamp current was 40 mA, carrier gas flow was 300 mL/min, shielding flow was 800 mL/min. **Results** The mass concentrations of trivalent arsenic (As<sup>III</sup>), dimethylarsenic (DMA), monomethylarsenic (MMA) and pentavalent arsenic (As<sup>V</sup>) exhibited good linear relationship with peak areas within the range of 5.060 – 101.2 ng/mL, 5.005 – 101.1 ng/mL, 5.020 – 100.4 ng/mL and 5.035 – 100.7 ng/mL, respectively ( $r \geq 0.9990$ ). The limits of detection were 0.088, 0.131, 0.119 and 0.381 ng/mL, respectively. The limits of quantitation were 0.290, 0.432, 0.357 and 1.143 ng/mL, respectively. the RSD values for precision, stability and repeatability test were less than 5%. The average spiked recovery rates were 95.15%, 96.30%, 95.58% and 96.23%, with RSD values were 2.87%, 1.57%, 2.25%, 3.43%, respectively ( $n = 9$ ). **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable, which can be used to determine the content of four forms of arsenic in Huoxue Zhitong Capsules, and provide technical reference for improving the quality standard of Chinese patent medicines with high risk of arsenic.

**Key words:** Huoxue Zhitong Capsule; high performance liquid chromatography; atomic fluorescence spectrometry; arsenic speciation; content determination

活血止痛胶囊由当归、三七、醋乳香、冰片、土鳖虫、煅自然铜等中药组方,有活血散瘀、消肿止痛功效,该制剂现行质量标准检查项下“重金属及有害元素”仅对砷元素的总量进行了限制,但尚未对其不同形态进行深入研究<sup>[1-2]</sup>。砷元素有多种形态,包括砷甜菜碱(AsB)、砷胆碱(AsC)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)、三价砷(As<sup>III</sup>,即亚硝酸根)和五价砷(As<sup>V</sup>,即硝酸根)。其中前两者无毒,而MMA与DMA有微毒性,As<sup>III</sup>和As<sup>V</sup>则有强烈毒性<sup>[3-6]</sup>。为了更准确、全面地评估活血止痛胶囊的质量,本研究中建立了同时测定制剂中4种有毒形态砷的高效液相色谱-原子荧光光谱联用(HPLC-AFS)法。现报道如下。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

SAP-20型液相色谱-原子荧光光谱联用仪(北京吉天仪器有限公司); Milli-Q Element超纯水仪(美国Millipore公司); XPE105型电子天平(梅特勒托利多科技<中国>有限公司,精度为0.1 mg); PHS-3C型酸度计(上海雷磁仪电科学仪器股份有限公司)。

### 1.2 试剂

活血止痛胶囊(A企业,批号分别为200509, 201203; B企业,批号分别为200925, 201002, 210202, 210206; 对照品(标准物质)MMA, DMA, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>[中国计量科学研究院,批号分别为2012, 2101, 21071, 2104,质量分数以砷计分别为(25.1±0.8)μg/g, 52.9 μg/g, 75.7 μg/g, (17.5±0.4)μg/g; 试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为Hamilton PRP-X100柱(250 mm×4.1 mm, 10 μm); 流动相为12 mmol/L磷酸氢二钠[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,用甲酸调pH至6.0]; 流速为1.0 mL/min; 进样量为100 μL; 载流液为7%盐酸溶液。

氢化物发生参数: 还原剂为含1.5%硼氢化钾(KBH<sub>4</sub>)与含0.5%氢氧化钾(KOH)的水溶液; 负高压为285 V, 原子化器高度为10 mm。

原子荧光仪器参数: 灯电流为40 mA; 载气流量为300 mL/min, 屏蔽器流量为800 mL/min。

### 2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别称取4种对照品适量, 精密称定, 至25 mL容量瓶中, 加水定容, 制成含As<sup>III</sup>, DMA, MMA, As<sup>V</sup>分别为1.012, 1.001, 1.004, 1.007 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液: 取样品内容物0.5 g, 过3号筛, 精密称定, 精密加入硝酸人工胃液(稀硝酸32.8 mL, 加水约800 mL及人工胃蛋白酶10 g, 摇匀, 加水稀释至1000 mL)适量, 置37℃水浴中加热约24 h, 取出, 摇匀, 放置2 h, 取上清液, 用一次性双层滤膜(10 μm+0.45 μm)滤过, 取续滤液, 即得。

加标供试品溶液: 取供试品溶液适量, 加入混合对照品溶液, 即得。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取2.2项下混合对照品溶液和供试品溶液, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果对于As<sup>III</sup>和As<sup>V</sup>, 供试品溶液色谱在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰, 理论板数按As<sup>III</sup>峰计应大于3000, 各色谱峰分离度均大于1.5。详见图1。

线性范围和检测限、定量限考察: 精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量, 加水稀释, 分别制成含As<sup>III</sup> 5.060, 10.12, 20.24, 80.96, 101.2 μg/mL, DMA 5.005, 10.01, 20.02, 80.08, 101.1 μg/mL, MMA 5.020, 10.04, 20.08, 80.32, 100.4 μg/mL, As<sup>V</sup> 5.035, 10.07, 20.14, 80.56, 100.7 μg/mL的系列混合对照品溶液, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(X, ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性

回归。另取混合对照品溶液适量,同法进样,分别以信噪比为3:1和10:1时待测成分质量浓度为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果AsⅢ, DMA, MMA, As V峰面积的RSD分别为1.23%, 1.21%, 1.12%和1.52%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.2项下同一加标供试品溶液,分别于室温放置0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD均小于5%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为200509)内容物0.5 g,过3号筛,6份,精密加入混合对照品溶液0.5 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,精密称定,按2.1项下试验条件进行测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果DMA, MMA, AsⅢ, As V含量的RSD分别为2.52%,

2.11%, 2.23%, 3.10%(n=6),表明方法重复性良好。

加标回收试验:取已知含量样品(批号为200509)内容物适量,分别加入不同质量浓度的对照品溶液,每个浓度平行3次,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果见表2。

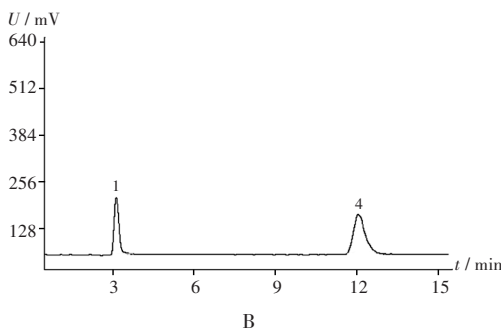
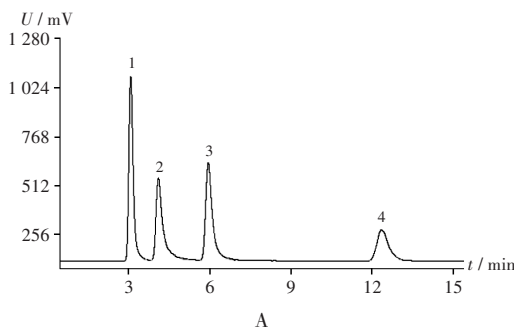
## 2.4 样品测定

取不同企业、不同批次6批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录

表2 加标回收试验结果(n=9)

Tab.2 Results of the recovery test (n=9)

待测成分	取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)			
AsⅢ	0.5081	0.1469	0.1000	0.2391	92.20	95.15	2.87			
	0.5017	0.1450	0.1000	0.2381	93.10					
	0.5163	0.1493	0.1000	0.2422	92.90					
	0.5082	0.1469	0.1500	0.2845	91.73					
	0.5109	0.1477	0.1500	0.2946	97.93					
	0.5072	0.1466	0.1500	0.2941	98.33					
	0.5089	0.1471	0.3000	0.4425	98.47					
	0.5013	0.1449	0.3000	0.4324	95.83					
	0.5032	0.1455	0.3000	0.4330	95.83					
	MMA	0.5081	0	0.1000	0.0945			94.50	96.30	1.57
		0.5017	0	0.1000	0.0975			97.50		
		0.5163	0	0.1000	0.0965			96.50		
0.5082		0	0.1500	0.1429	95.27					
0.5109		0	0.1500	0.1479	98.60					
0.5072		0	0.1500	0.1475	98.33					
0.5089		0	0.3000	0.2861	95.37					
0.5013		0	0.3000	0.2871	95.70					
0.5032		0	0.3000	0.2847	94.90					
DMA		0.5081	0	0.1000	0.09810	98.10	95.58	2.25		
		0.5017	0	0.1000	0.09792	97.92				
		0.5163	0	0.1000	0.09532	95.32				
	0.5082	0	0.1500	0.1469	97.93					
	0.5109	0	0.1500	0.1379	91.93					
	0.5072	0	0.1500	0.1398	93.20					
	0.5089	0	0.3000	0.2847	94.90					
	0.5013	0	0.3000	0.2861	95.37					
	0.5032	0	0.3000	0.2866	95.53					
	AsV	0.5081	0.5294	0.4000	0.8963	91.72			96.23	3.43
		0.5017	0.5228	0.4000	0.8954	93.15				
		0.5163	0.5380	0.4000	0.9017	90.92				
0.5082		0.5295	0.6000	1.1221	98.77					
0.5109		0.5324	0.6000	1.1203	97.98					
0.5072		0.5285	0.6000	1.1200	98.58					



1. AsⅢ 2. DMA 3. MMA 4. As V

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. AsⅢ 2. DMA 3. MMA 4. As V

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig.1 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察结果

Tab.1 Results of the linear relation test

待测成分	回归方程	r	线性范围(ng/mL)	检测限(ng/mL)	定量限(ng/L)
AsⅢ	$Y_1 = 2.227.8X_1 - 2.797$	0.9998	5.060~101.2	0.088	0.290
DMA	$Y_2 = 1.545.5X_2 - 312.6$	0.9993	5.005~101.1	0.131	0.432
MMA	$Y_3 = 1.792.4X_3 - 334.9$	0.9993	5.020~100.4	0.119	0.357
As V	$Y_4 = 747.6X_4 - 2.374.3$	0.9990	5.035~100.7	0.381	1.143

表3 样品中4种砷形态测定结果(mg/kg, n=3)

Tab. 3 Determination results of four arsenic species in samples (mg/kg, n=3)

批号	AsⅢ	DMA	MMA	AsⅤ	批号	AsⅢ	DMA	MMA	AsⅤ
200509	0.2891	-	-	1.0420	201002	-	-	-	0.4845
201203	0.3711	-	-	1.3019	201202	0.3683	-	-	1.4876
200925	-	-	-	0.4334	210206	0.4532	-	-	1.6220

峰面积,计算样品含量。结果见表3(-为未检出)。

可见,不同企业样品的测定结果存在差异。6批样品均未检出DMA和MMA。A企业样品中均检出AsⅢ和AsⅤ,含量相对稳定,B企业样品中2批次检出AsⅢ和AsⅤ,2批次仅检出AsⅤ,且不同批次间含量差异较大。分析原因,可能与该中成药的制作工艺和药材本身生长环境的差异有关。

### 3 讨论

#### 3.1 样品提取方式选择

调研可知,砷形态样品测定的提取方法主要有水提取、酸提取、超声提取、微波提取等,预试验中均做了考察,结果几种方法均能将样品中的不同形态砷提取完全,单一的水提取、超声提取时间太长,样品中的AsⅢ和AsⅤ会发生转变,影响测定结果;微波提取也会破坏砷形态的存在方式,考虑到提取效率及样品的稳定性,因此最终确定“人工胃液+超声”的方式。

#### 3.2 色谱条件选择

样品中4种形态砷的分离主要采用阴离子色谱柱,流动相采用磷酸氢二铵系统,预试验中通过采用甲酸、乙酸、三氟乙酸调节pH,最终确定甲酸调pH至6.0能将4种砷形态完全分离,且仅需等度条件就能在15 min内出峰完全,整个测定过程中,系统稳定,磷酸氢二铵的浓度仅为12 mmol/L,降低了盐的使用量,避免液相系统由于盐积累太多堵塞管路。

#### 3.3 展望

本研究中以中成药活血止痛胶囊为载体,建立了同时测定4种有毒形态砷的HPLC-AFS法,经过初步方法学验证,符合测定要求。2020年版《中国药典》收录的砷形态测定方法为高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用(HPLC-ICP-MS)法<sup>[7]</sup>,HPLC-AFS法可作为药品中砷形态测定方法的补充,后法同样具有灵敏度高、检测限低的特点,且该测定法操作简便,所用仪器价格便宜,可降低制药企业的检测成本<sup>[8-11]</sup>。国家药典委员会网站通知显示,AFS法将收录在2025年版《中国药典》中,本研究也为HPLC-AFS纳入2030年版《中国药典》做了铺垫。然而,本研究中仅对砷形态采用该方法进行了研究,后期将对汞、铬、硒等的形态进行进一步探讨<sup>[12-16]</sup>。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 236.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1394.
- [3] 刘洋, 陈绍占, 刘丽萍, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析尿中6种砷形态[J]. 分析测试学报, 2023, 42(2): 227-232.
- [4] 杨欢, 许萍, 李洪艳, 等. 液相色谱-原子荧光光谱联用分析不同种类稻米中4种砷形态含量[J]. 粮油食品科技, 2023(6): 28-34.
- [5] 刘正华, 李忠海. HPLC-AFS法测定水产品中4种砷形态[J]. 食品与机械, 2023, 39(8): 66-70.
- [6] 张妮娜, 陈绍占, 刘丽萍, 等. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法测定干制食用菌中5种砷形态[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3252-3258.
- [7] 方静, 朱琼, 蔡鹏, 等. 活血止痛胶囊砷形态的分析[J]. 中成药, 2020, 42(11): 3007-3010.
- [8] 林燕奎, 李勇, 王丙涛, 等. 液相色谱-原子荧光光谱联用检测海产品中不同形态砷的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9): 1955-1958.
- [9] 祖文川, 汪雨, 刘聪, 等. 高效液相色谱-原子荧光光谱联用技术分析6种植物源性中药中砷的形态[J]. 分析试验室, 2016, 35(1): 82-85.
- [10] 赖长鸿, 刘亚玲, 贺鸿志, 等. 无机三价砷对生菜的生态毒性及其生物积累[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(5): 831-836.
- [11] 陈绍占, 杜振霞, 刘丽萍, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子质谱法分析雄黄在大鼠脏器中代谢的砷形态[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 349-354.
- [12] PENG CN, ZHOU JT, LI C, et al. Research progress on speciation analysis of arsenic in traditional Chinese medicine[J]. Open Chemistry, 2022, 20(1): 23-39.
- [13] ZOPA S, MICHALSKI R. Simultaneous Determination of Inorganic Forms of Arsenic, Antimony, and Thallium by HPLC-ICP-MS[J]. Spectroscopy, 2015, 30(2): 54.
- [14] HUANG QQ, BAO QQ, WU CY, et al. Carbon dots derived from Poria cocos polysaccharide as an effective "on-off" fluorescence sensor for chromium(VI) detection[J]. J Pharm Anal, 2022, 12(1): 104-112.
- [15] MARQUES CV, KELLY SBJ, OLIVEIRA MW, et al. Infrared radiation-assisted thermochemical vapor generation for mercury speciation by atomic absorption spectrometry[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2023(9): 38.
- [16] FILIPPINI T, FAIRWEATHER-TAIT S, VINCETI M. Selenium and immune function: a systematic review and meta-analysis of experimental human studies[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2023(1): 117.

(收稿日期: 2024-02-26; 修回日期: 2024-11-29)