

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)10-0108-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.10.022



液相色谱原子荧光光谱联用法测定安宫牛黄丸中 可溶性无机砷含量*

李 佳, 胡 珀[△], 卜媛媛, 王 萍, 张 舒, 王 玉, 贾云云

(江苏省淮安市食品药品检验所, 江苏 淮安 223300)

摘要:目的 建立测定安宫牛黄丸中可溶性无机砷含量的液相色谱原子荧光光谱联用法。方法 色谱条件, 色谱柱为 PRP-X100 阴离子色谱柱(250 mm × 4.1 mm, 10 μm); 流动相为 1 mmol/L 磷酸氢二铵溶液(pH 9.0) - 30 mmol/L 磷酸氢二铵溶液(pH 8.5), 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 50 μL。荧光光谱条件, 灯电流为 92 mA, 负高压为 292 V, 炉温为 200 °C; 载液为 20% 硝酸, 还原剂为 0.5% 氢氧化钾+3% 硼氢化钾, 流速均为 4 mL/min; 载气、屏蔽气均为氩气, 流量分别为 300, 600 mL/min。结果 三价砷、五价砷质量浓度均在 0~200 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.9994, 0.9999, n = 8$), 检测限分别为 0.01, 0.02 mg/kg, 定量限分别为 0.03, 0.07 mg/kg; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.2%; 平均加样回收率分别为 97.74% 和 98.70%, RSD 分别为 3.12% 和 3.35% ($n = 9$)。7 家生产企业的 21 批样品中均检测出三价砷和五价砷, 均以三价砷为主, 不同企业批次样品中 2 种砷总含量差异较大(最高值约为最低值的 7 倍); 且含量以人工肠液提取液 > 人工胃液提取液 > 稀盐酸提取液。结论 所建方法简便、灵敏, 结果准确, 可用于测定安宫牛黄丸中可溶性无机砷形态。

关键词: 安宫牛黄丸; 三价砷; 五价砷; 液相色谱原子荧光光谱联用法; 溶剂

Determination of Soluble Inorganic Arsenic Content in Angong Niu Huang Pills by Liquid Chromatography - Atomic Fluorescence Spectrometry

LI Jia, HU Po[△], BU Yuanyuan, WANG Ping, ZHANG Shu, WANG Yu, JIA Yunyun
(Huai'an Institute of Food and Drug Control, Huai'an, Jiangsu 223300, China)

Abstract: Objective To establish a liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry (LC - AFS) method for the content determination of soluble inorganic arsenic in Angong Niu Huang Pills. **Methods** Chromatographic conditions were as follows: the chromatographic column was PRP - X100 anion column (250 mm × 4.1 mm, 10 μm), the mobile phase was 1 mmol / L diammonium hydrogen phosphate solution (pH 9.0) - 30 mmol / L diammonium hydrogen phosphate solution (pH 8.5) (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 50 μL. Atomic fluorescence spectrometry conditions were as follows: the lamp current was 92 mA; the negative high voltage was 292 V; the furnace temperature was 200 °C; the carrier liquid was 20% nitric acid, and the reducing agent was 0.5% potassium hydroxide + 3% potassium borohydride, both with a flow rate of 4 mL / min; the carrier gas and shielding gas were both argon, with flow rates of 300 and 600 mL / min, respectively. **Results** The linear ranges of trivalent arsenic and pentavalent arsenic were both 0 - 200 ng / mL ($r = 0.9994$ and $r = 0.9999, n = 8$). The limits of detection were 0.01 and 0.02 mg / kg, respectively, and the limits of quantification were 0.03 and 0.07 mg / kg, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.2%. The average recovery of trivalent arsenic and pentavalent arsenic were 97.74% and 98.70%, with RSDs of 3.12% and 3.35% ($n = 9$), respectively. Trivalent arsenic and pentavalent arsenic were detected in all 21 batches of samples from seven manufacturing enterprises, with trivalent arsenic being the predominant form. There was a significant difference in the total arsenic content of samples from different enterprises and batches (with the highest content being approximately seven times the lowest). Furthermore, the content was found to be in the order of artificial intestinal fluid extraction > artificial gastric juice extraction > dilute hydrochloric acid extraction. **Conclusion** The established method is simple, sensitive, and accurate, which can be used for the determination of the soluble inorganic arsenic forms in Angong Niu Huang Pills.

Key words: Angong Niu Huang Pills; trivalent arsenic; pentavalent arsenic; liquid chromatography - atomic fluorescence spectrometry; solvent

安宫牛黄丸源于清代吴鞠通《温病条辨》,作为“温病三宝”之一,为中医治疗急症的重要药物^[1]。全方由牛黄、麝香、郁金、水牛角、栀子、珍珠、黄芩、黄连、朱砂、雄黄和冰片等 11 味药材组成,有清热解毒、镇静开

* 基金项目: 江苏省药品监督管理局药品监管科学研究计划项目[202370]。

第一作者: 李佳, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药检验及标准, (电子信箱)Hayjslj1984@sina.com。

[△]通信作者: 胡珀, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品检验及质量控制, (电子信箱)335757547@qq.com。

窍功效^[2]。其现行标准收载于2025年版《中国药典(一部)》,但标准中缺乏对方中主要毒性药物雄黄中总砷及可溶性砷的质量控制。雄黄的主要成分为二硫化二砷(As_2S_2),在雄黄中含量占比超过90%,此外,还含有三氧化二砷(As_2O_3)及五氧化二砷(As_2O_5)。但 As_2S_2 毒性很小,在水中几乎不溶解,在稀酸中略微溶解,因此人体难以吸收其有毒成分^[3]。故通常认为其药效及毒性主要来自少量的可溶性无机砷^[4],包括三价砷和五价砷,其中三价砷为原浆毒,毒性比五价砷大35~60倍。因此,建立制剂中可溶性无机砷的质量控制方法,比单纯测定总砷更能体现药物用量与疗效和安全性之间的关系^[5]。相关文献证明,雄黄在人工胃液和人工肠液中溶出率低^[6],机体主要吸收少量溶出的可溶性砷,故考察砷元素在胃肠液中的溶出特性很有必要。目前,已有较多文献研究各类含雄黄中成药中的可溶性砷,方法主要涉及石墨炉原子吸收分光光度法^[7-8]、原子荧光法^[9-11]、电感耦合等离子体发射光谱法^[12]、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法^[13-14]等。2025年版《中国药典(四部)》新增原子荧光光谱(AFS)法测定中药中的砷,AFS法以其高灵敏度和特异性,在痕量元素检测方面表现出色,有助于提升中药质量安全控制水平。但尚未见基于超声辅助提取的液相色谱原子荧光光谱联用(LC-AFS)法,从胃肠道溶出率、水中溶出率等方面对安宫牛黄丸中可溶性无机砷进行考察的报道。原子荧光光谱能大幅降低背景干扰和样品化学干扰,在与色谱分离技术相结合后,不仅具有可与ICP-MS相当的灵敏度,还具有操作成本低和线性范围宽等优势。基于此,本研究中建立了测定安宫牛黄丸中可溶性砷的LC-AFS法,并通过测定7家企业样品中可溶性砷的含量,探讨安宫牛黄丸中雄黄在人工胃液和人工肠液等中的溶出情况,为临床用药安全性提供试验基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SA-520型形态分析仪、AFS-520型原子荧光光度计(北京普析通用仪器公司);XS205DU型电子天平(精度为0.01 mg)、SevenCompact S220型多参数测试仪(瑞士Mettler Toledo公司);KQ3200型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ST16型低速台式离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);CLXXUVFM2型超纯水仪(法国Veolia Environnement公司)。

1.2 试剂

安宫牛黄丸样品共21批,来自7家生产企业(A-G),详细信息见表1。三价砷、五价砷标准溶液(北方伟业计量集团有限公司,质量浓度均为1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,批号分别为2024013199、2024013161);胰酶(优级纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为G2201549);胃蛋

表1 安宫牛黄丸样品信息

Tab. 1 Sample informations of Angong Niu Huang Pills

企业编号	样品编号	批号	企业编号	样品编号	批号	企业编号	样品编号	批号
A	A1	24012583	D	C2	2023105	F	E3	22055
	A2	24017018		C3	2023103		F1	240801
	A3	24012584		D1	E33015M		F2	220802
B	B1	3822302002	E	D2	E33018	G	F3	240401
	B2	3822308008		D3	D03097M		G1	2303004
	B3	3822306005		E1	210810		G2	2308006
C	C1	2023111	E	E2	22056	G	G3	2403003

白酶(优级纯,上海源叶生物科技有限公司,批号为O23IS229560);其余试剂同为优级纯;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PRP-X100阴离子色谱柱(250 mm \times 4.1 mm, 10 μm);流动相以1 mmol/L磷酸氢二铵溶液(pH 9.0)为流动相A,30 mmol/L磷酸氢二铵溶液(pH 8.5)为流动相B,梯度洗脱(0~5 min时100%A,5~11 min时0A,11~12 min时100%A);流速为1.0 mL/min;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为50 μL 。

原子荧光光谱条件:灯电流为92 mA;负高压为292 V;炉温200 $^{\circ}\text{C}$;载液为20%硝酸,流速为4 mL/min;还原剂为0.5%KOH(氢氧化钾)+3%KHB₄(硼氢化钾),流速为4 mL/min;载气、屏蔽气均为氩气,流量分别为300,600 mL/min。

2.2 溶液制备

混合标准溶液:分别取三价砷、五价砷标准溶液适量,加水制成质量浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液母液;精密量取适量,加水制成每1 mL均分别含三价砷和五价砷0,2,5,10,50,100,150,200 ng的系列混合标准溶液。

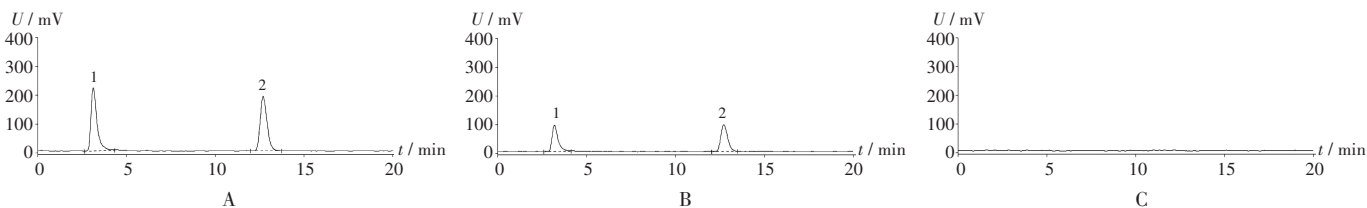
人工胃液^{[15]191}:按2025年版《中国药典(四部)》配制。取稀盐酸16.4 mL,加水800 mL和胃蛋白酶10 g,摇匀,加水稀释至1 000 mL,即得。

人工肠液^{[15]571}:按2025年版《中国药典(四部)》配制。取磷酸二氢钾6.8 g,加水500 mL使溶解,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调pH至6.8;另取胰酶10 g,加水使溶解,将两液混合,加水稀释至1 000 mL,即得。

稀盐酸^{[15]565}:按2025年版《中国药典(四部)》配制。取盐酸234 mL,加水稀释至1 000 mL,即得。

供试品溶液:取样品1丸,剪碎,称取1.0 g,精密加入人工胃液或人工肠液25 mL,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中超声处理(功率500 W,频率40 kHz)2 h,摇匀,5 000 r/min离心5 min,精密吸取上清液1 mL,用0.02 mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液稀释至50 mL,摇匀,经0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:不加样品,同供试品溶液制备方



1. 三价砷 2. 五价砷

A. 混合标准溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Trivalent arsenic 2. Pentavalent arsenic

A. Mixed standard solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下混合标准溶液、供试品溶液,阴性对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果,供试品溶液在与混合标准溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离效果良好,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取2.2项下标准溶液母液,分别用水制成各系列标准溶液,按2.1项下试验条件进样测定。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,得三价砷回归方程为 $Y_1 = 33\ 112.150X_1 + 25\ 653.499$ ($r = 0.999\ 4, n = 8$),五价砷为 $Y_2 = 33\ 071.516X_2 + 52\ 024.747$ ($r = 0.999\ 9, n = 8$)。结果表明,三价砷、五价砷质量浓度均在0~200 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察:取2.2项下10 ng/mL的混合标准溶液与阴性对照品溶液,按2.1项下试验条件进样,记录峰面积,以信噪比分别为3:1和10:1时相应质量浓度为检测限和定量限。结果三价砷的检测限为0.01 mg/kg,五价砷为0.02 mg/kg;三价砷的定量限为0.03 mg/kg,五价砷为0.07 mg/kg。

精密度试验:取2.2项下100 ng/mL的混合标准溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果三价砷和五价砷峰面积的RSD分别为1.00%和1.61% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液,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。结果三价砷和五价砷峰面积的RSD分别为2.30%和2.70% ($n = 6$),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(D₁)1.0 g,精密称定,共5份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果三价砷和五价砷平均含量分别为118.65 mg/kg和52.46 mg/kg, RSD分别为2.60%和3.12% ($n = 5$),表明方法重复性良好。

表2 加样回收试验结果($n = 9$)

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

样品含量(mg/kg)		加入量(mg/kg)		测得量(mg/kg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
三价砷	五价砷	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷
114.09	51.33	90	40	202.12	89.10	97.81	94.43				
114.09	51.33	90	40	200.06	91.53	95.52	100.50				
114.09	51.33	90	40	202.49	89.40	98.22	95.18				
114.09	51.33	110	50	223.45	103.54	99.42	104.42				
114.09	51.33	110	50	227.12	101.54	102.75	100.42	97.74	98.70	3.12	3.35
114.09	51.33	110	50	218.12	100.04	94.57	97.42				
114.09	51.33	130	60	236.55	112.34	94.20	101.68				
114.09	51.33	130	60	238.41	110.25	95.63	98.20				
114.09	51.33	130	60	246.10	108.96	101.55	96.05				

加样回收试验:取已知含量样品(D₁,含三价砷114.09 mg/kg,五价砷51.74 mg/kg)9份,每份约0.5 g,分别加入低、中、高质量浓度混合标准溶液,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,并计算加样回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取21批样品各适量,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,计算样品含量。结果见表3。并采用不同提取溶剂(稀盐酸、人工胃液、人工肠液),同法测定样品含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 样品含量差异与限度

不同企业样品中可溶性无机砷(三价砷和五价砷)总含量差异较大(最高值约为最低值的7倍),其可能原因,一是雄黄的产地、来源不同,二是炮制工艺影响,企业的水飞工艺的差异,直接导致实际入药的雄黄量和纯度的不同;三是雄黄的贮存方法不当,导致少量As₂S₂氧化为As₂O₃,然后进一步氧化为As₂O₅。此外,各企业样品中可溶性无机砷均以As₂O₃为主,尚未进一步氧化为As₂O₅。

安宫牛黄丸主要用于急救时的高热、惊厥、昏迷等病症,每次一般服用1丸。一般来说,急性病症缓解后,应尽快停用,以避免可能的副作用。本研究中测得可溶

表3 样品中2种砷形态含量测定结果(mg/kg, n=2)

样品编号	三价砷	五价砷	合计	样品编号	三价砷	五价砷	合计
A1	272.40	36.09	308.50	D3	114.96	49.22	164.18
A2	260.27	34.14	294.41	E1	42.63	64.38	107.01
A3	246.80	33.07	279.86	E2	42.57	65.38	107.95
B1	260.39	69.02	329.41	E3	41.02	58.29	99.31
B2	259.93	68.93	328.85	F1	48.70	0.00	48.70
B3	270.40	71.04	341.43	F2	49.92	0.00	49.92
C1	62.96	84.72	147.68	F3	56.43	0.00	56.43
C2	73.83	76.56	150.40	G1	111.91	69.21	181.12
C3	67.68	78.04	145.73	G2	104.46	59.06	163.52
D1	114.09	51.74	166.02	G3	101.90	68.09	169.99
D2	119.19	47.39	166.58				

表4 不同提取溶剂样品中2种砷形态含量测定结果(mg/kg, n=2)

样品编号	稀盐酸		人工胃液		人工肠液	
	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷	三价砷	五价砷
A1	190.40	28.49	231.31	30.18	272.40	38.49
A2	160.13	16.63	120.71	18.69	160.13	26.63
A3	246.80	23.07	211.65	29.08	246.80	33.07
B1	160.39	74.13	185.89	92.00	260.39	94.13
B2	103.87	48.93	113.49	62.21	173.87	68.93
B3	196.29	63.88	289.85	116.95	396.09	133.88
C1	42.96	34.77	62.11	72.72	62.96	84.72
C2	50.83	33.94	49.81	46.76	73.83	63.96
C3	48.03	38.41	62.88	32.34	180.03	28.11
D1	61.28	11.74	90.38	19.84	114.28	51.74
D2	56.97	17.39	123.69	37.37	156.87	47.39
D3	60.36	16.83	92.40	29.60	114.96	36.83
E1	22.13	6.70	15.85	20.15	42.63	26.70
E2	22.47	6.38	33.86	52.00	42.57	65.38
E3	21.54	6.29	24.80	46.57	31.04	58.29
F1	38.75	0.00	54.15	5.38	98.71	0.00
F2	37.20	0.00	29.78	0.00	37.40	0.00
F3	36.44	0.00	45.47	0.00	56.43	0.00
G1	51.93	39.27	66.70	50.80	111.91	69.21
G2	55.52	39.15	67.86	46.81	85.61	59.06
G3	51.70	42.47	79.97	33.65	101.90	42.87

性无机砷最高质量分数为341.43 mg/kg, 即1次摄入量为1 020 μg。联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(JECFA)暂定, 无机砷的可耐受摄入量为每天2.14 μg/kg, 即成年人(体质量以60 kg计)每天允许摄入128.4 μg。由此可知, 安宫牛黄丸中可溶性无机砷含量均大于可接受暴露量范围。建

议后续结合安宫牛黄丸的临床用量用药周期及可溶性无机砷的测得数据, 制订合理的限量值, 以确保药品质量和用药安全。

3.2 流动相优化

砷形态是以阴离子形态存在中药中, 因此选择阴离子交换柱进行分离^[16]。基于国家标准^[17], 选择磷酸盐溶液作为流动相, 磷酸盐浓度和pH会影响形态砷化合物的分离, 配制不同浓度(1, 20, 30 mmol/L)和不同pH(8.0, 8.5, 9.0)的磷酸盐溶液, 进行等度或梯度洗脱, 考察峰形和分离度。结果显示, 采用等度洗脱时, 分离度较好, 但是五价砷峰形太宽, 故选择梯度洗脱。

3.3 提取方法优化

保证中药样品中各砷形态含量的关键, 是在提取过程中待测样品中各砷形态能被完全提取以及待测砷形态及分布不发生变化。本研究中分别采用了酸热浸提法、超声辅助提取法和超声酶水解提取法^[17], 考察了3种不同方法得出的可溶性无机砷含量。结果表明, 酸热浸提法得出三价砷含量很大, 而五价砷含量很小; 而采用后两种提取方法, 得出可溶性无机砷含量接近, 但考虑超声酶水解法中pH调节较烦琐, 且判别易出现偏差, 故考虑采用人工胃液或人工肠液超声辅助提取。

3.4 提取溶剂优化

为真实地模拟药品口服后进入人体的环境, 本研究中分别取盐酸、胃蛋白酶和胰酶, 按药典规定方法配制稀盐酸、人工胃液和人工肠液, 考察了3种溶剂的提取效率。结果表明, 安宫牛黄丸经人工胃液和人工肠液提取, 测得含量接近均高于稀盐酸提取, 故排除稀盐酸作为提取溶剂。此外再考察了人工胃液和人工肠液, 发现人工肠液的提取率略高于人工胃液, 故决定采用人工肠液作为提取溶剂。

3.5 方法评价

本研究所建方法简便、灵敏, 结果准确, 可用于测定安宫牛黄丸中可溶性无机砷形态。

参考文献

- [1] 孙赛阳, 李海波. 含砷汞中成药安宫牛黄丸安全性应用研究[J/OL]. 实用中医内科杂志, 1-7[2025-03-21]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1187.R.20240425.1052.002>.
- [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, 2025:954-956.
- [3] 高双荣, 梁爱华, 易艳, 等. 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):243-247.
- [4] 李珺, 袁倬斌, 韩树波, 等. 安宫牛黄丸中汞、砷的存在及其吸收波与排泄[J]. 首都医科大学学报, 2006, 27(5):647-651.
- [5] 张永文, 马秀璟, 阳长明. 含朱砂、雄黄的中药制剂的质量控制及安全性评价问题分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11):1501-1504.
- [6] LU YT, YANG DY, SONG XN, et al. Bioaccessibility and