

# 液相色谱与电感耦合等离子体质谱联用测定中药中砷形态

王小龙<sup>1</sup>, 李曼<sup>2</sup>, 李小佳<sup>1,2</sup>

(1. 钢铁研究总院, 北京 100081; 2. 钢研纳克检测技术股份有限公司, 北京 100081)

**摘要:** 实验建立了一种能够快速准确分离、测定中药中不同形态砷的方法。使用高效液相色谱(HPLC)与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用的方法, 使用磷酸二氢铵和磷酸氢二钠作为色谱流动相, 分离了砷酸盐(As(V))、亚砷酸盐(As(III))、砷胆碱(AsC)、一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA)5种不同的砷形态, 测定了陈皮、艾草、白果、半夏、五加皮和细辛等6种中药中不同化学形态砷的含量。使用优化过的色谱条件, 能够在7 min内完全分离砷的5种形态, 不同形态砷的检出限分别为0.74 ng/mL As(III), 2.20 ng/mL As(V), 6.56 ng/mL AsC, 2.60 ng/mL (DMA)和0.34 ng/mL(MMA); 半夏中不同形态砷的加标回收率为94.3%~113.5%。该方法能够快速分离5种不同形态砷, 对中药中不同化学形态砷含量实现准确测定。

**关键词:** 中药; 砷形态; 高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱

**中图分类号:** O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7571(2018)增-0173-05

传统药材在我国使用已经有数千年历史, 现在中药的应用范围也越发广泛。然而, 有研究表明, 砷在人体内有蓄积倾向, 是致癌、致畸和致突变的因子<sup>[1]</sup>, 《中国药典》规定中药中砷总量不得超过5 mg/kg。然而, 使用砷的总量来表示中药中砷的毒性大小是不准确的。根据毒理学研究表明, 砷的毒性跟其化学形态具有密切关系。总的来说, 含有有机基团的砷形态毒性较小, 无机砷酸盐毒性较大, 例如亚砷酸(As III)和砷酸(AsV)的毒性远远大于一甲基砷(MMA)和二甲基砷(DMA), 而砷甜菜碱(AsB)、砷胆碱(AsC)、砷糖(AsS)和砷脂(AsL)则几乎没有毒性<sup>[2-3]</sup>。因此为了更为准确的表示中药中砷的毒性, 准确测定不同化学形态的砷是必要的。目前测定砷形态的方法在多种领域有应用, 例如食品<sup>[4-5]</sup>、大气<sup>[6]</sup>、海产品<sup>[7]</sup>和花粉<sup>[8]</sup>等。

本文测定中药中砷总量的时, 采用了微波消解方法进行前处理, 使用ICP-MS对中药中砷的总量进行测定。分析砷的不同化学形态时, 使用了HPLC与ICP-MS联用技术, 对HPLC的分离条件进行了优化, 加快了分离速度, 降低流动相盐度, 实现了对砷酸(As V)、亚砷

酸(As III)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)和砷胆碱(AsC)快速分离测定。本方法比2015版《中国药典》中砷形态分析分离时间缩短了8 min, 比食品安全国家标准<sup>[9]</sup>中砷形态分离测定时间缩短了4 min。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

PlasmaMS 300 电感耦合等离子质谱(钢研纳克检测技术股份有限公司); LC 3000 高效液相色谱仪(北京创新通恒); Excel 微波化学工作平台(上海屹尧仪器科技发展有限公司); LD-3 离心机(江苏荣华仪器制造有限公司)。

陈皮、艾草、白果、半夏、细辛和五加皮(北京市购)。

砷形态标准储备液(GBW08666, GBW08667, GBW08668, GBW08669, GBW08671, 中国计量科学研究院)。总砷标准溶液(1000 μg/mL, 钢研纳克检测技术有限公司)。

磷酸二氢铵(GR, 国药集团化学试剂有限公司), 磷酸氢二钠(GR, 天津市光复科技发展有限公司)。

实验用水为超纯水。

### 1.2 样品处理

#### 1.2.1 测砷总量

称取0.500 0 g 样品于聚四氟乙烯微波消解罐中, 加入7 mLHNO<sub>3</sub>和1.5 mLH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温静置1.5 h, 将消解罐置于微波消解仪中, 按表1中程序设定进行消解。消解完成后, 将样品转移至50 mL 聚四氟乙烯烧杯中, 置于电热板上于100 °C下将溶液浓缩至近干, 取下, 冷却至室温, 加入1 mLHNO<sub>3</sub>和适量

**作者简介:** 王小龙(1987—), 男, 博士生, 从事ICP-MS应用研究及无机元素检测工作; **E-mail:** pimoxiu@163.com

**通讯联系人:** 李小佳(1965—), 教授, 博士生导师, 从事分析化学及冶金材料领域的工作; **E-mail:** lixiaojia@nscchina.com

超纯水,重新放置于电热板上,加热至微沸,取下冷却至室温后转移至 50 mL 塑料容量瓶内,用超纯水定容至刻度。同时,做样品空白。

表 1 砷总量测定微波消解程序  
Table 1 Microwave digestion program for the determination of total As

温度 Temperature/°C	压力 Pressure/atm	持续时间 Time/min
80	20	3
120	30	3
150	40	3
180	40	20

### 1.2.2 测形态砷

为了得到更好的提取效果,使用了3种方法:

(1) 酸热提取法:称取 1.0000 g 样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管内,加入 15 mL 0.2 mol/L HNO<sub>3</sub>,密闭后于 100 °C 下提取 2.5 h,每 0.5 h 振摇 1 min。提取完毕后,将溶液冷却至室温,置于离心机上以 6 000 r/min 离心 15 min,取上层清液 3 mL 通过 0.45 μm 有机系

微孔滤膜,待测。同时做样品空白。

(2) 超声提取法:称取 1.0000 g 样品置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 1 mL 甲醇和 9 mL 超纯水,超声萃取 30 min,冷却至室温后,于 6 000 r/min 离心机离心 15 min。取 5 mL 上清液于烧杯中,置于 100 °C 电热板上,微热后取下,转移至 10 mL 容量瓶内,冷却至室温后用超纯水定容至刻度,取 3 mL 定容后溶液通过 0.45 μm 微孔滤膜后,待测。同时做样品空白。

(3) 水热提取法:称取 1.0000 g 样品,置于 50 mL 聚丙烯离心管内,加入 15 mL 超纯水,密闭后于 100 °C 下水浴提取 2.5 h,每 0.5 h 振摇 1 min。提取完毕后,将溶液冷却至室温,置于离心机上以 6 000 r/min 离心 15 min,取上层清液 3 mL 通过 0.45 μm 有机系微孔滤膜,待测。同时做样品空白。

### 1.3 仪器工作参数

使用 PlasmaMS 300 测定 As 选用 m/z=75 处数据,使用 He 作为碰撞池气体,排除 Ar-Cl 干扰;色谱柱选用 Hamilton PRP-X100 阴离子交换柱,具体仪器工作参数如表 2 所示。

表 2 ICP-MS 和 HPLC 工作条件  
Table 2 ICP-MS and HPLC conditions

ICP-MS		HPLC	
冷却气流速 Cool gas flow/(L/min)	13.0	色谱柱 Column	Hamilton PRP X-100
辅助气流速 Auxiliary gas flow/(L/min)	0.8	流动相 Mobile phase	44 mmol/LNH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 与 13 mmol/LNa <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
载气流速 Nebuliser gas flow/(L/min)	1.05	流速 Flow rate	等速 1.0 mL/min
等离子体功率 ICP power/W	1 300	进样量 Injection volume	100 μL
数据采集模式 Data acquisition mode	时间分辨 模式		
碰撞气 Collision gas	He		
碰撞气流速 Collision gas flow/(mL/min)	1.2		

## 2 结果与讨论

### 2.1 砷总量的测定

中药的主要成分为有机物,选择 HNO<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混合为消解酸,在放入酸的初始阶段,会产生大量气体,需静置待消解罐内样品不再产生气体时方可

进行微波消解程序。

### 2.2 提取方法

食品中砷形态分析的国家标准方法提取砷使用酸热提取法<sup>3</sup>,水热和超声辅助萃取法是环境、食品等样品砷形态分析常用的方法<sup>4</sup>。在本次实验中,经过对比发现,水热法和超声辅助萃取法未能

达到提取砷形态的目的,不能准确反应砷各种形态在中药中的准确含量。因此本实验选择酸热法进行砷的提取。

### 2.3 分离性能

目前对于 As 形态分离,主要采用磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)与磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)混合溶液作为流动相分离四种 As 的形态。本实验中对比了上述方法与磷酸二氢铵(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)和磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)混合溶液作为流动相的分离时间与分离效果。使用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>体系作为流动相,分离五种形态 As 所用时间为 420 s;使用 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>体系作为流动相,分离五种形态 As 所用的时间为 400 s;两种体系分离时间大致相同,然而使用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>体系时,基线的强度(CPS)大于 30 000,结果导致空白测定值过高,检出限高,盐浓度(质量/体积)为 0.8%左右;使用 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>体系时,基线 CPS 为 6000 左右,盐浓度为 0.67%左右;综合考虑,降低基线强度,提高检出限,降低盐浓度,防止锥堵塞,选择 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>体系作为流动相。最终流动相为 44 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>与 13 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,能够在 400 s 内完全分离 As 的 5 种形态,分离效果如图 1 所示。

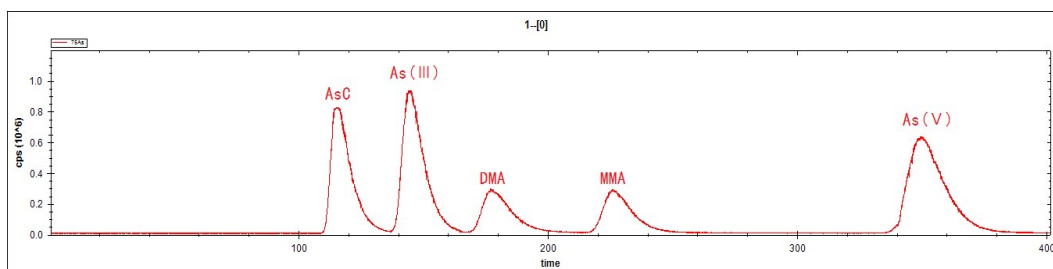


图1 形态砷的HPLC-ICP-MS谱图(质量浓度:100 ng/mL)

Fig.1 Spectra of five species of arsenic obtained by HPLC-ICP-MS

### 2.4 校准曲线和检出限

分别配制浓度为 1、5、8、10、20 ng/mL 和 50 ng/mL 含有 5 种形态砷的混合标准溶液。得到 5 种形态砷的校准曲线线性相关系数  $R^2 > 0.999$ 。不同形态砷的检出限是以 2 倍信噪比( $S/N=2$ )计算,得到结果分别为:0.74 ng/mL(As III), 2.20 ng/mL(As V), 6.56 ng/mL(AsC),

2.60 ng/mL(DMA)和 0.34 ng/mL(MMA)。

### 2.4 加标回收结果

选取半夏样品,进行加标回收率实验,分别做砷总量加标回收实验和 5 种形态砷加标回收实验。在样品进行处理前分别加入不同的标准溶液,进行测定。其结果如表 3 所示。

表3 形态砷及砷总量加标回收率实验结果

Table 3 Results of the recovery experiment for As species and total As

砷形态 Species	本底值 Content/(ng/g)	加标量 Addition/ng	回收量 Recovery/ng	加标回收率 Recovery rate/%
As(III)	4.1	75	75.3	94.3
As(V)	127.0	75	207.24	106.9
AsC	ND	75	85.1	113.5
DMA	ND	75	70.8	94.4
MMA	ND	75	84.3	112.3
砷总量	280.9	250	7278.3	102.3

### 2.5 样品分析

对陈皮、艾草、白果位、半夏、细辛和老鹤草等 6 种市售中药材中 5 种砷形态及砷总量进行了分析,其结果如表 4 所示。结果表明:所做几种中药中砷主要以 As(III)形式存在,有机砷含

量较低。

## 3 结语

通过对比酸热提取,超声辅助萃取和水热提取法,最终选择酸热提取法作为砷形态分析的样品前

处理方法,此方法提取效率相对于其余两种方法较高。通过优化流动相的选择,降低了流动相的盐度,加快了分离不同形态砷的速度,使之更适合于HPLC与ICP-MS的联合使用。对陈皮、艾草、白果

位、半夏、细辛和五加皮等6种常见中药材总砷含量及5种不同形态砷进行了分析。结果说明:HPLC与ICP-MS联用能够对中药中砷的5种不同形态进行快速分离和准确测定。

表4 中药样品中形态砷及砷总量结果

Table 4 Results of the determination of As species and total As in traditional Chinese medicine

样品 Sample	测定值 Found/(ng/g)							
	As(III)	As(V)	AsC	DMA	MMA	形态砷总量	砷总量	所占比例/%
陈皮	22.4	47.8	7.35	ND	ND	77.55	118.3	65.55
艾草	69.8	892.7	33.6	18.1	63.3	1077.5	947.6	113.71
半夏	4.1	127.0	ND	ND	ND	131.1	280.9	46.67
五加皮	5.3	ND	ND	1.2	ND	6.5	32.8	19.82
白果	ND	9.6	ND	ND	ND	9.6	34.3	27.99
细辛	34.7	106.1	ND	5.3	ND	146.1	196.7	74.27

参考文献:

[1] 柳晓娟,刘文菊,林爱军,等.中草药砷含量特征及其健康风险初步评价[J].环境科学,2010,31(12):3036-3042.  
LIU Xiao-Juan, LIU Wen-ju, Lin Ai-jun, et al. Survey of arsenic concentration in Chinese Herbal Medicines (CHMs) and preliminary risk assessment of As in CHMs on human health[J]. Environmental Science. 2010, 31(12): 3036-3042.

[2] 谭洪涛,周鸿,李娟.液相色谱-原子荧光光谱法测定大米中4种砷形态的含量[J].理化检验:化学分册,2016,52(09):1104-1107.  
TAN Hong-tao, ZHOU Hong, LI Juan. LC-AFS Determination of 4 kinds of arsenic species in rice[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2016, 52(9): 1104~1107

[3] 姚晶晶,袁友明,王明锐,等.高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光法测定大米中的四种砷形态[J].光谱仪器与分析,2011(Z1):64-67.  
YAO Jing-jing, YUAN You-ming, WANG Ming-rui, et al. Speciation analysis of arsenic in rice by HPLC-HG-AFS[J]. Spectronic instrument & Analysis, 2011(Z1): 64-67.

[4] Maja Welna, Anna Szymczycha-Madeja, Pawel Pohl. Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice[J].Trends in Analytical Chemistry, 2015(65):122-136

[5] 侯艳霞,刘丽萍,潘浩,等.高效液相色谱-电感耦合等离子

体质谱分析大米中砷形态化合物[J].分析试验室,2013(10):103-107.  
HOU Yan-xia, LIU Li-ping, PAN Hao, et al.Determination of arsenic species in rice by HPLC- ICP- MS[J].Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013(10): 103-107.

[6] 龚仓,徐殿斗,马玲玲,等.HPLC-HG-AFS测定大气颗粒物中砷的形态[J].分析试验室,2014(6):664-667.  
GONG-Cang, XU Dian-dou, MA Ling-ling, et al.Determination of arsenic species in atmospheric particles by HPLC-HG-AFS[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2014(6): 664-667.

[7] 王亚,张春华,葛滢.高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法检测紫菜中的砷形态[J].分析试验室,2013(5):34-38.  
WANG Ya, ZHANG Chun-hua, GE Ying.Determination of arsenic speciation in porphyra using HPLC-(UV)-HG-AFS [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2013(5): 34-38

[8] 王素芬,陈芳,王鹏,等.HPLC-HG-AFS联用技术检测蜂花粉中砷形态[J].食品科学,2013(12):189-193.  
WANG Su-fen, CHEN Fang, WANG Peng, et al.Determination of four arsenic species in bee pollen by high performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry[J].Food Science. 2013(12): 189-193.

[9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.GB 5009-2014 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.

## Determination of arsenic species traditional Chinese medicines by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry

WANG Xiao-long<sup>1</sup>, LI Man<sup>2</sup>, LI Xiao-Jia<sup>\*1,2</sup>

(1. Iron and Steel Research Institute Group, Beijing 100081, China; 2. NCS Testing Technology Co., Ltd., Beijing 100081, China)

**Abstract:** In this paper we establish a method which can identify and quantify different arsenic species in Chinese traditional medicine quickly and accurately. In this work, we use high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the analysis of arsenic species. Five arsenic species are identified and quantified in the samples of Chinese traditional medicine. Samples are pericarpium citri reticulatae, wormwood, cortex acanthopanacis, pinellia ternate, ginkgo and asarum. The species are arsenate (As(V)), arsenite (As(III)), Arsenocholine (AsC), monomethylated arsenic (MMA) and dimethylated arsenic(DMA). With the optimized chromatograph condition, five arsenic species can be separated, identified and quantified in 7 minutes. The detection limits of arsenic species were 0.74 ng/mL (As III), 2.20 ng/mL (As V), 6.56 ng/mL (AsC), 2.60 ng/mL mL (MMA). The recoveries of different arsenic species in pinellia ternate were 94.3%-113.5%. The result shows that HPLC-ICP-MS, due to its high separation efficiency and sensitivity, is suitable to identify and quantify different selenium species. HPLC-ICP-MS can analyze five selenium species in Chinese traditional medicine quickly and accurately.

**Key words:** Chinese traditional medicine; arsenic species; high-performance liquid chromatography (HPLC); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)