

HPLC-ICP-MS 联用分析中成药中的可溶性砷形态*

徐陆正² 解 清^{1,2} 陈玉红³ 白国银² 王京宇^{1,2**}

(1. 北京大学医药卫生分析中心, 北京, 100191; 2. 北京大学公共卫生学院, 北京, 100191;

3. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 建立了 HPLC-ICP-MS 联用技术分析三价砷、五价砷、一甲基砷和二甲基砷的方法,并应用于中成药可溶性砷形态的研究中. 分别考察了牛黄解毒片、赛金化毒散、牛黄清火丸、医病丸、乳核散结片等 5 种中成药,并比较了水、盐酸、磷酸、人工胃肠液和甲醇水等多种提取介质以及超声辅助和振荡等提取方式. 结果表明,各种介质的提取效果差别不大,其中以 1% 磷酸为提取介质、超声辅助提取 1h 的提取率稍高,且形态不发生转化. 所考察含矿物中成药的牛黄解毒片、赛金化毒散、牛黄清火丸、医病丸中可溶性砷的比例占总砷的 1% 以下,主要为三价砷和五价砷,而含有海产品的中成药乳核散结片中主要为三价砷、二甲基砷和五价砷. 此方法 4 种砷的加标回收率在 90%—107% 之间,平行 6 次提取结果 4 种砷相对标准偏差均小于 3%.

关键词 HPLC-ICP-MS 联用, 中成药, 可溶性砷, 形态.

中成药是以中草药为原料,经制剂加工制成各种不同剂型的中药制品,包括丸、散、片、膏、丹等多种剂型,是我国历代医药学家经过千百年医疗实践创造、总结的有效方剂的精华. 中成药在临床上的安全性评价中最值得关注的就是其重金属含量的评价,其中就包括对砷这一有害元素含量的测定. 但仅用总量评价其危害性是不科学的,因为砷的毒性随形态的不同有极大的差异,对于某些可溶性的成分如亚砷酸盐、砷酸盐、一甲基砷、二甲基砷,其小鼠口服半数致死剂量 LD_{50} 分别为: $14\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $700\text{—}1800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $700\text{—}2600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 毒性相差可达数百倍; 而某些不溶成分如雄黄主要成分硫化砷因不能被人体吸收而毒性更低,值得关注的是许多矿物性中成药中的绝大部分砷正是这些不溶的硫化砷. 由此可知对中成药中可溶性砷形态的分析是准确评价中成药中砷的危害性的基础. HPLC 和 ICP-MS 联用方法具有高灵敏度、高选择性、强抗干扰能力及高分离效率等优点,是用来分析基体复杂的样品如中成药的理想工具. 因 ICP-MS 不受提取液酸碱度的影响,对无机态砷和有机态砷中的砷有相同的灵敏度且干扰少,分析结果也更为可靠. 用于形态分析的提取方法要求原始形态尽量不发生转化,而且为了精确定量要求有较高的提取率. 应用中药分析的提取方法有很多种,但是由于中成药成分复杂,剂型间差别也较大,而且砷的提取率较低,尽管有不少相关研究,但到目前为止还没有一种被广泛认可的提取方法. 例如,水、磷酸、盐酸、人工胃液、人工肠液和甲醇水等^[1-3] 都曾被应用于砷的形态分析提取方法中,而应用于中药的提取液有水^[4]、甲醇水^[5]和盐酸^[6]等,也有应用人工胃肠液^[7]来分析生物可利用砷的,但是比较这些提取液之间区别的还比较少,而且比较的提取液种类也不够多.

本研究应用 HPLC-ICP-MS 联用技术,着重对中成药中可溶性砷形态分析的提取方法做研究,希望通过对多种剂型中成药的分析,发现不同剂型及不同提取方式导致分析结果的差异,探讨统一的中成药中可溶性砷形态提取方法的可能性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7500cx 型电感耦合等离子体质谱, Agilent 1200 系列高效液相色谱仪, Milli-Q 超纯水系统 (Millipore), 色谱柱: Hamilton PRX-X100 (250mm × 4.1mm, $10\mu\text{m}$). 超声清洗器、振荡仪.

亚砷酸根 (As III)、二甲基砷 (DMA)、一甲基砷 (MMA)、砷酸根 (As V) 标准溶液,配制成 $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标准储备液,用超纯水稀释配制浓度为 10、50、100、200、500、1000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的混合标准溶液.

* “重大新药创制”科技重大专项课题“中药中农药残留、重金属检测与分析关键技术研究”(2009ZX09502-027).

** 通讯联系人, Tel: 010-82801107; E-mail: wjy@bjmu.edu.cn

人工胃液、人工肠液按照药典(2005 版)方法配制,所用磷酸、盐酸及其它试剂均为优级纯。

1.2 样品前处理

中药样品均购买于同仁堂等大型药品超市。中成药有很多剂型,如散剂、片剂、水丸和蜜丸等,散剂混匀后直接称取,片剂和水丸压碎成粉末后称取,蜜丸切成小块后称取。

1.2.1 总砷测定的前处理方法:准确称取 0.1g 样品,加入 2ml 浓 HNO_3 和 1ml 浓 HCl ,密封静置过夜后置于微波消解仪中消解,然后加 5ml 高纯水转移至试管中,定容至 8ml,待测。

1.2.2 可溶性砷形态的提取方法:称取样品 0.2g(精确至 0.0001g)于 15ml 离心管中,加入 10ml 提取液,提取之后 $3600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15min,取上清液过 $0.45\mu\text{m}$ 水系滤膜,样品保存于 4°C 条件下,24h 内完成测定。

1.3 分析方法

砷总量测定:ICP-MS 条件:功率 1500W,玻璃同心雾化器,石英雾化室,半导体控温于 $(2\pm0.1)^\circ\text{C}$,石英一体化炬管,2.5mm 中心通道,屏蔽炬,Pt 锥,载气流量 $0.75\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,补偿气 $0.35\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,采样深度 7.6mm,He 流量 $5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

形态分析:流动相: $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaH}_2\text{PO}_4/0.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$ 、 $\text{pH}=6.0$;流速: $1.0\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量 $5\mu\text{l}$ 。ICP-MS 条件:功率 1500W,玻璃同心雾化器,石英雾化室,半导体控温于 $(2\pm0.1)^\circ\text{C}$,石英一体化炬管,2.5mm 中心通道,屏蔽炬,Pt 锥,载气流量 $0.6\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,补偿气 $0.35\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,采样深度 7.6mm,采集质量数砷 75、氯 35,分析时间 11min,峰面积定量。

2 结果及讨论

2.1 砷形态分析色谱条件的优化

用于砷形态分离的液相色谱体系也有很多种,根据相关文献报道及预实验,中成药中含有较高浓度的无机砷,因此选择阴离子交换色谱柱、洗脱能力较强的磷酸盐缓冲体系。分别比较了缓冲盐为 2、5、10、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对保留时间的影响,其中三价砷、二甲基砷和一甲基砷的保留时间变化不大,五价砷的保留时间随着缓冲盐浓度增高而逐渐提前,分别为 9.96、9.61、8.82、7.97min。缓冲盐的浓度较高时易导致 ICP-MS 的基体效应并可能造成信号漂移。兼顾 4 种砷形态的分离效果及 ICP-MS 的长期稳定性,最终选择 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓冲盐作为流动相,4 种砷形态保留时间分别是三价砷 2.30min、二甲基砷 3.29min、一甲基砷 5.00min、五价砷 9.59min(见图 1)。

在本实验条件下,以 10、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 混标测定线性范围,工作曲线依次为: $y=9394x+18338$, $y=9701x+16440$, $y=9622x+20150$, $y=9898x+20620$,相关系数均大于 0.9999。平行进 6 次 $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标准溶液,4 种砷峰面积的 RSD 依次为 1.03%,1.23%,1.95%,0.55%。样品的测定过程中同时采集 ^{35}Cl 的信号值,监控 ArCl 对测定的干扰。由实际样品图谱(图 2,以牛黄解毒片为例)可知,Cl 的保留时间为 13.33min,远大于五价砷的保留时间,因此,样品中的 Cl 不会对砷的测定结果产生影响。

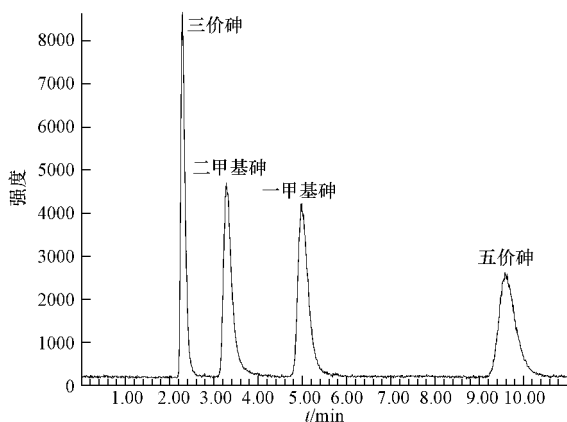


图1 $5\mu\text{l}$ 进样, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 混合标准溶液的色谱图

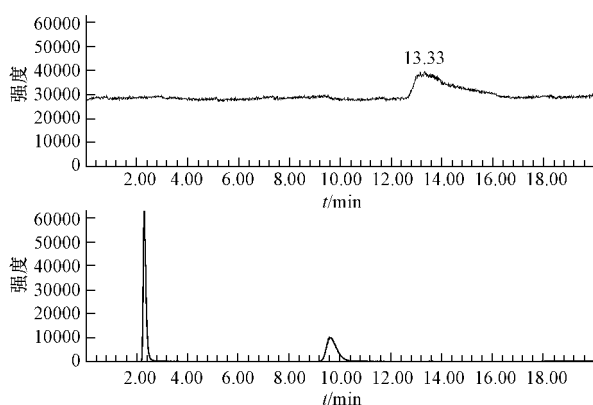


图2 牛黄解毒片盐酸提取液的色谱图

2.2 提取方法和时间

利用王水微波消解中成药样品测定总砷,然后以形态分析方法分析提取液中所考察 4 种砷的含量。结果表明中成药样品中主要为三价砷和五价砷,在含有海产品的中成药乳核散片中还检出了部分二甲基砷。比较了超声辅助和振荡的提取方法对提取率的影响,以救急散为例,超声 0.75、1、2、3h 的提取率分别是 0.34%、0.47%、0.40%、0.41%,而振荡 12h、24h 的提取率为 0.35%、0.35%。可以看到超声辅助提取的效率要高于振荡提取,超声 1h 的提取率已经超过振荡 12h 和 24h 的结果。比较不同超声时间的结果发现,超声 1h 有最高的提取率,为确保此条件下形态不发生转化,综合提取率的结果形态转化实验的结果,选择超声辅助 1h 作为提取方法。

2.3 提取介质

选取 5 种不同剂型的中成药作为实验对象,应用水、磷酸、盐酸、人工胃液、人工肠液和甲醇水这 6 种提取液提取以比较不同提取液之间的区别,结果见表 1.

表 1 提取介质对提取结果的影响

中成药	提取介质	三价砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	二甲基砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	一甲基砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	五价砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	4 种砷 形态之和/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	总砷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	提取率/%
牛黄解毒片	水	96.6	N. D.	N. D.	106.6	203.2	71619.2	0.28
	1% 磷酸	120.8	N. D.	N. D.	101.1	221.9		0.31
	0.384% 盐酸	115.3	N. D.	N. D.	100.3	215.6		0.30
	人工胃液	123.2	N. D.	N. D.	82.9	206.1		0.29
	人工肠液	90.0	N. D.	N. D.	101.7	191.7		0.27
	50% 甲醇水	136.9	N. D.	N. D.	80.0	216.9		0.30
赛金化毒散	水	12.4	N. D.	N. D.	71.4	83.8	36184.7	0.23
	1% 磷酸	58.3	N. D.	N. D.	101.0	159.3		0.44
	0.384% 盐酸	66.7	N. D.	N. D.	87.5	154.2		0.43
	人工胃液	74.2	N. D.	N. D.	85.0	159.2		0.44
	人工肠液	40.0	N. D.	N. D.	56.1	96.1		0.26
	50% 甲醇水	52.6	N. D.	N. D.	68.6	121.2		0.33
牛黄清火丸	水	35.2	N. D.	N. D.	10.8	46.0	27964.7	0.16
	1% 磷酸	28.0	N. D.	N. D.	15.6	43.6		0.16
	0.384% 盐酸	33.6	N. D.	N. D.	14.3	47.9		0.17
	人工胃液	34.5	N. D.	N. D.	13.3	47.8		0.17
	人工肠液	20.6	N. D.	N. D.	24.4	45.0		0.16
	50% 甲醇水	36.9	N. D.	N. D.	10.6	47.5		0.17
医痫丸	水	53.1	N. D.	N. D.	11.8	64.9	8892.7	0.73
	1% 磷酸	46.7	N. D.	N. D.	25.5	72.2		0.81
	0.384% 盐酸	46.0	N. D.	N. D.	26.7	72.7		0.82
	人工胃液	49.6	N. D.	N. D.	22.5	72.1		0.81
	人工肠液	57.8	N. D.	N. D.	18.7	76.5		0.86
	50% 甲醇水	63.9	N. D.	N. D.	3.9	67.8		0.76
乳核散结片	水	8.7	3.5	N. D.	7.7	19.9	42.8	46.5
	1% 磷酸	9.2	3.5	N. D.	9.7	22.4		52.3
	0.384% 盐酸	8.9	3.2	N. D.	8.9	21.0		49.1
	人工胃液	8.9	3.5	N. D.	8.8	21.2		49.5
	人工肠液	8.1	3.8	N. D.	8.8	20.7		48.4
	50% 甲醇水	10.0	3.4	N. D.	5.0	18.4		43.0

由表 1 可见,从提取率上看,含有海产品的乳核散结片明显高于其它 4 种含有雄黄的中成药,而其它 4 种的提取率按剂型从高到低依次是水丸、散剂、片剂和蜜丸,就每一种中成药 6 种提取液的提取率来看,6 种提取介质的结果差别不大,但 1% 磷酸有稍高的提取率. 从提取出来的形态种类上看,含有海产品的乳核散结片除了含有三价砷、五价砷外还含有二甲基砷,一甲基砷未检出,对于其他 4 种含雄黄的中成药来说,它们三价砷和五价砷的比例也不尽相同,在赛金化毒散中五价砷含量明显高于三价砷,而在医痫丸中三价砷含量明显高于五价砷,在牛黄解毒片中两种无机砷含量相当,雄黄在不同的样品基质条件下被提取出来的形态存在着明显的差异,不同中成药的基质不仅影响砷的溶出,同时影响溶出砷的形态分布.

2.4 提取次数

选择了含有雄黄和海产品的两种中成药连续提取 4 次,每次提出量占总提出量的百分比分别是 73.4%、17.1%、5.3%、4.2% 和 92.9%、5.4%、1.7%、0%. 可以看到两次提取分别能够到达 4 次提取总量的 98.3% 和 90.5%,值得注意的是两种中成药砷溶出规律的不同,含雄黄中成药在第三次和第四次提取值差别较小,趋于稳定,这种现象在其它研究中也有报道^[9],可能的原因是雄黄中其它可溶的成分都已溶解,而剩下的就是其主要成分硫化砷在提取液中的溶出,有观点认为雄黄的药效正是由其中硫化砷持续低浓度的释放砷来达到的,本实验的现象符合这一假设的推断,但究其原因

还需要进一步的研究.

2.5 形态转化及加标回收考察

形态分析的提取过程需要保持原始形态不发生转化,为了考察本提取条件下的形态转化,首先应用了已知浓度的标准溶液加入相应的提取剂经过超声提取,然后分析测定其中各种砷的值来初步判断提取过程是否发生形态转化.本研究利用已知浓度的4种形态混合标准溶液在1%磷酸提取介质中经过超声0.75、1、2h提取后,发现三价砷的回收率依次为102%、98%、74%,五价砷的回收率依次为103%、104%、128%,一甲基砷和二甲基砷在100%—105%之间,可见超声2h条件下已经发生了明显三价砷和五价砷之间的形态转化,而在超声1h条件下还未观察到转化发生,究其原因一方面可能是长时间的超声提取导致温度升高,加快了反应速度,另一方面也有可能是超声条件下产生了某些种类的自由基,而自由基作为较强的氧化剂使得部分三价砷转化为五价砷^[8].

为了观察本提取条件下实际样品中是否发生形态转化,对样品进行加标回收实验,由于没有样品中含有一甲基砷,所以通过在样品中加入一定量的混合标准溶液得到模拟样品,测定模拟样品中4种砷的加标回收率分别为:三价砷98.56%—102.96%,二甲基砷90.67%—106.41%,一甲基砷96.62%—106.53%,五价砷92.20%—107.23%,结果表明在实际样品中4种砷也没有发生形态转化;对同一模拟样品分成6份,平行做6次提取,4种砷含量的相对标准偏差为三价砷1.59%,二甲基砷2.93%,一甲基砷2.77%,五价砷为1.29%.

3 结论

HPLC-ICP-MS方法由于其高选择性、强抗干扰能力等方面优点适合用于中成药中可溶性砷形态方面的研究,本研究表明,含矿物中成药牛黄解毒片、赛金化毒散、牛黄清火丸、医病丸中的可溶性砷占总砷的1%以下,其中主要以三价砷和五价砷的无机态存在,而含海产品的中成药乳核散结片中的可溶性砷除了无机砷外还含有二甲基砷,超声辅助提取较振荡提取更为简便、快速,且有更高的提取效率.结果表明,各种介质的提取效果差别不大,其中1%磷酸提取液可以提取率稍高且不发生形态转化,提取方法的稳定性也满足要求,该方法需要进一步在更多的中成药样品中应用,以建立中成药中可溶性砷形态分析的标准方法.

参 考 文 献

- [1] 陈光,林立,陈玉红.液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用(HPLC-ICP-MS)测定乳制品的无机砷及其它砷形态[J].环境化学,2009,28(04):608-611
- [2] 林立,陈光,陈玉红.液相色谱-电感耦合等离子体质谱法联用测定动物性海产品中的无机砷[J].环境化学,2009,28(01):149-152
- [3] 吕超,刘丽萍,董慧茹,等.高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术测定水产类膳食中5种砷形态的方法研究[J].分析测试学报,2010,29(05):465-468
- [4] 吴倩,梁琼麟,罗国安,等.六神丸可溶性砷形态的HPLC-ICP-MS研究[J].中国药科大学学报,2007,(04):332-335
- [5] 郝春莉,王庚,余晶晶,等.15种中药材中砷的形态分析[J].分析测试学报,2009,28(08):918-921
- [6] 许珺辉,王洪玮,崔蓉,等.雄黄及含雄黄中成药中砷的形态分析[J].药物分析杂志,2007,27(03):395-399
- [7] Koch I, Sylvester S, Lai V W, et al. Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills[J]. Toxicology and Applied Pharmacol, 2007, 222(3): 357-364
- [8] Neppolian B, Doronila A, Ashokkumar M. Sonochemical oxidation of arsenic(III) to arsenic(V) using potassium peroxydisulfate as an oxidizing agent[J]. Water Research, 2010, 44: 3687-3695