

HPLC-ICP-MS 法测定雄黄中三价砷和五价砷含量

ICPMS-123

摘要：本文参考 2020 版中国药典《雄黄 - 药材与饮片质量标准草案》公示稿和《2322 汞、砷元素形态及价态测定法》征求意见稿，建立了高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICP-MS）测定雄黄中三价砷和五价砷的方法。样品经过处理后，采用高效液相色谱 LC-20Ai 对不同形态砷进行分离，电感耦合等离子体质谱 ICPMS-2030 进行定量分析。实验结果表明：该方法线性范围在 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内回归系数大于 0.9998，加标回收率在 90%-102% 之间，该方法适用于雄黄样品中三价砷和五价砷含量的测定。

关键词：HPLC-ICP-MS 雄黄 三价砷 五价砷

雄黄俗称二硫化二砷，为橘黄色粒状固体或橙黄色粉末，在临床上应用广泛，可以治疗慢性支气管炎及支气管哮喘、热带性嗜伊红细胞增多症、带状疱疹等等。同时雄黄也具有毒性，雄黄加热时被氧气氧化成剧毒的三氧化二砷，久服易发生砷中毒。

砷是致癌物质，长期低剂量接触会引起皮肤癌、膀胱癌和肺癌，同时引发神经系统和心血管系统疾病。砷的生物毒性不仅与其含量有关，更大程度上还与其存在形态有关。在常见砷的化合物中，三价砷（As III）和五价砷（As V）毒性较大，一甲基砷（MMA）和二甲基砷（DMA）毒性较小，砷甜菜碱（AsB）、砷胆碱（AsC）

和砷糖等基本没有毒性。

由于砷的毒性、致癌性、迁移性质和生物效应均取决于它的化学形态，并且各砷形态随着所处环境的不同处于动态互变之中，所以测定总砷含量无法准确表示出砷的暴露水平。因此，对砷的各种存在形态分别进行分析测定十分必要。

本文参考 2020 版中国药典《雄黄 - 药材与饮片质量标准草案》公示稿和《2322 汞、砷元素形态及价态测定法》征求意见稿，采用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用对雄黄中三价砷和五价砷进行分析。

实验部分

1.1 对照品

五价砷、三价砷、一甲基砷、二甲基砷、砷胆碱和砷甜菜碱购于国家标准物质中心。

1.2 实验检材

市售雄黄

1.3 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用系统。具体配置为 LC-20Ai \times 2 输液泵，DGU-20A3 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，ICPMS-2030 电感耦合等离子体质谱仪，LabSolutions ICPMS TRM 工作站；AP135W 电子天平（岛津）；USK-4R 超声清洗器（600 W, 40 kHz）。

1.4 试剂

磷酸二氢铵、磷酸二氢钾、乙二胺四醋酸二钠均为分析纯，氢氧化钠、氨水均为优级纯。胰酶（来源于猪胰腺）。

■ 方法和结果

2.1 标准溶液配制

精密吸取对照品储备溶液适量，以 0.02 mol/L EDTA 溶液为稀释液配制每 1 mL 含两种价态砷各 5 ng、20 ng、50 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1000 ng（均以砷计）系列浓度的混合标准溶液，摇匀。

2.2 样品前处理

氢氧化钠溶液（0.1 mol/L）：称取 0.4 g 氢氧化钠固体于塑料杯中，加入适量水使其溶解后转移至塑料容量瓶中定容至 100 mL。

乙二醇四醋酸二钠溶液（0.02 mol/L）：移取 4 mL 0.5 mol/L 的乙二醇四醋酸二钠溶液置于 100 mL 塑料容量瓶中，用水定容至 100 mL，摇匀。

人工肠液配制：称取磷酸二氢钾 6.8 g，加入 500 mL 水使其溶解，用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8；另称取胰酶 10 g，加水适量使其溶解，将两种溶液混合后，加水定容至 1000 mL，摇匀。

准确称取雄黄样品 30 mg，置于 250 mL 塑料容量瓶中，加人工肠液约 200 mL，摇匀，置 37°C 水浴中超声处理（功率 600 W，频率 40 kHz）2 小时（每隔 15 分钟充分摇匀一次），放冷，用人工肠液稀释至刻度，摇匀，静置 24 小时，吸取中层溶液约 15 mL（吸取时应避免带入颗粒），用微孔滤膜（0.45 μm）滤过，精密量取续滤液 5 mL，置 50 mL 塑料容量瓶中，加 0.02 mol/L 乙二醇四醋酸二钠溶液稀释至刻度，摇匀，即得。同法制备空白溶液和加标回收溶液。

2.3 色谱条件

色谱条件参见表 1、表 2。

表 1. HPLC 分析条件

参 数	参数设定
色谱柱	Hamilton PRP-X100 Anion Exchange 250*4.1mm
流动相	A-25 mmol/L NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH=8); B- 水
流 速	1.0 mL/min
柱 温	40°C
进样量	20 μL
洗针液	水
洗脱程序	梯度洗脱

表 2. 梯度洗脱条件

Time (min)	Flow (mL/min)	A.Conc (%)	B .Conc (%)
0.00	1.0	0.0	100.0
3.00	1.0	0.0	100.0
5.00	1.0	100.0	0.0
10.00	1.0	100.0	0.0
13.10	1.0	0.0	100.0
20.00	1.0	0.0	100.0

2.4 质谱参数

ICP-MS 仪器分析条件见表 3。

表 3. ICP-MS 分析条件

参 数	参数设定	参 数	参数设定
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	8.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

■ 结果与讨论

3.1 专属性考察

对空白和六种形态砷溶液进样考察，排除系统干扰，并且考察六种形态砷的分离度，以确保实际样品分析过程中不会造成假阳性检出，见图 1。

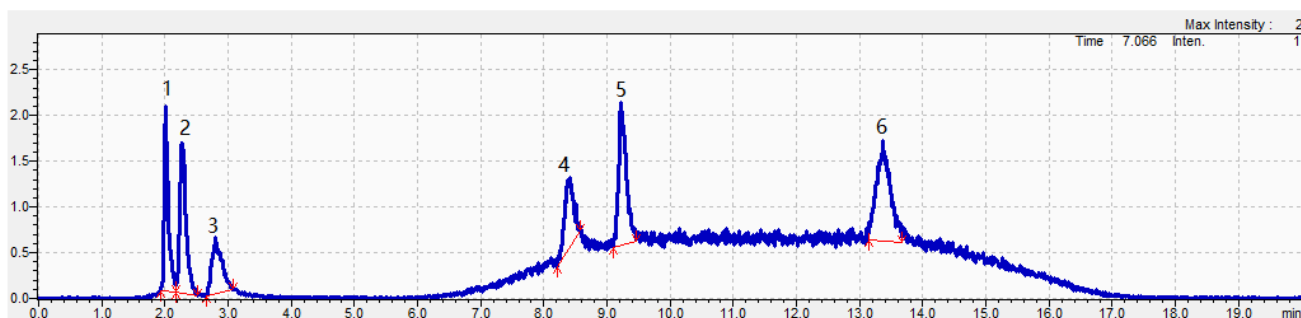


图 1. 砷元素形态及价态测定图谱

1. 砷胆碱 (AsC); 2. 砷甜菜碱 (AsB); 3. 三价砷 (As III) ;
4. 二甲砷 (DMA); 5. 一甲基砷 (MMA); 6. 五价砷 (As V)

3.2 线性关系考察

按“2.1 标准溶液配制”项下规定进行标准曲线系列浓度的配制，记录各成分的峰面积，以浓度（浓度均以 As 计）与峰面积做线性回归绘制标准曲线，结果如下所示。

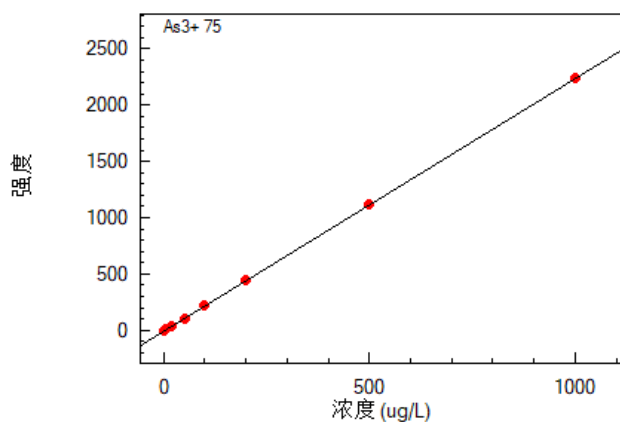


图 2. 三价砷标准曲线 $r=0.99999$

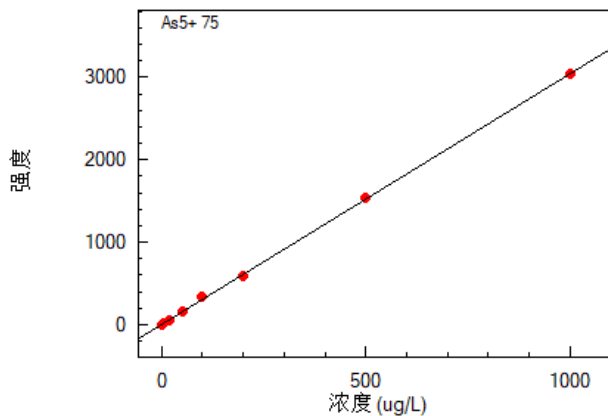


图 3. 五价砷标准曲线 $r=0.99988$

3.3 检出限及分离度考察

在进样体积为 20 μL 时,对浓度为 5.0 ng/mL 样品溶液考察三价砷和五价砷的信噪比,以三倍信噪比 (3S/N) 峰高对应浓度作为检出限,三价砷和五价砷色谱图及检出限结果分别见图 4、表 4。

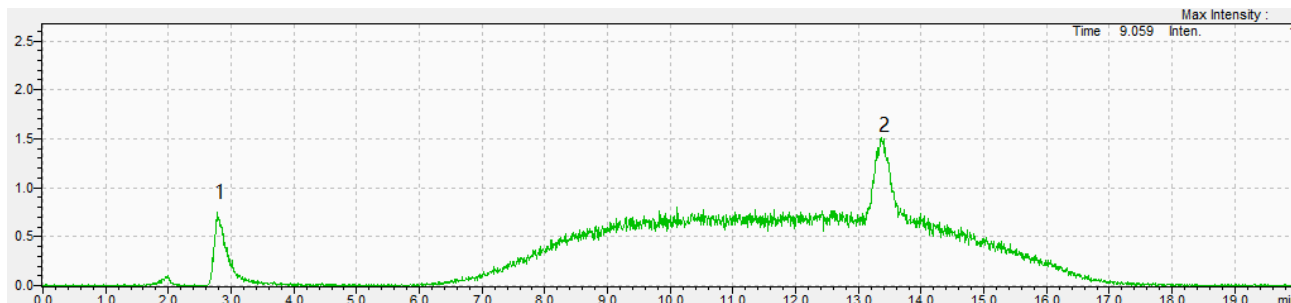


图 4. 5.0 ng/mL 三价砷和五价砷标准溶液的色谱图

1. 三价砷 (As III) ; 2. 五价砷 (As V)

表 4. 检出限考察结果

名称	仪器检出限 (ng/mL)	方法检出限 ($\mu\text{g/g}$)
三价砷	0.4	33
五价砷	3.0	250

根据出峰情况调整积分条件后,得到砷甜菜碱和三价砷的保留时间和峰宽信息,见表 5。

表 5. 保留时间及峰宽信息

名称	保留时间 (min)	峰开始时间 (min)	峰结束时间 (min)
砷甜菜碱	2.277	2.180	2.525
三价砷	2.803	2.660	3.081

按照分离度计算公式 $R=2*\Delta T/(W1+W2)$ 计算分离度,其中 $W1$ 、 $W2$ 为相邻两个峰的峰宽, ΔT 则为相邻两个峰的保留时间差。计算得到砷甜菜碱和三价砷分离度为 1.4,符合药典规定的相邻两个峰即砷甜菜碱和三价砷分离度应不小于 1 的规定,砷甜菜碱的存在不会影响三价砷的分析。

3.4 样品测试结果及回收率考察

将市售雄黄按“2.2 样品前处理”进行处理后进 HPLC-ICP-MS 分析,并对其进行加标回收试验,测定结果见表 6。

表 6. 雄黄测试结果及加标回收率 (%)

名称	测定结果 (ng/mL)	样品含量 ($\mu\text{g/g}$)	加标浓度 (ng/mL)	加标测定结果 (ng/mL)	加标回收率 (%)
三价砷	26.6	2217	50	71.6	90
五价砷	ND	ND	5	5.1	102

注: ND 为未检出。

测定结果显示,三价砷和五价砷总量(以 As 计)为 0.22%,远低于限值要求的 7%,该雄黄样品符合中国药典的安全要求,该方法适用于雄黄样品中三价砷和五价砷含量的测定。

■ 结论

参考 2020 版中国药典《雄黄 - 药材与饮片质量标准草案》公示稿和《2322 汞、砷元素形态及价态测定法》征求意见稿，建立了高效液相色谱电感耦合等离子体质谱法（HPLC-ICP-MS）测定雄黄中三价砷和五价砷的方法。样品中三价砷和五价砷的总量为 0.22%，满足 2020 版中国药典《雄黄 - 药材与饮片质量标准草案》公示稿中三价砷和五价砷的总量（以 As 计）不超过 7.0% 的要求，该方法适用于雄黄样品中三价砷和五价砷含量的测定。

岛津应用云

