

HPLC-ICP-MS 法测定蟑螂中形态砷含量

ICPMS-116

摘要：本文参考 2020 版中国药典四部《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）测定动物类中药中形态砷的方法。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 0.2~20 $\mu\text{g/L}$ 范围内回归系数大于 0.999，加标回收率在 97%-105% 之间，该方法可适用于蟑螂等动物类中药中不同形态砷含量的测定。

关键词：HPLC-ICP-MS 形态砷 动物药 蟑螂

砷是自然界中常见的有毒致癌性元素之一，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。不同形态的砷化合物性质往往不同，毒性差异很大。

常见的砷化合物有：亚砷酸（As（III））、砷酸（As（V））、一甲基砷（MMA）、二甲基砷（DMA）、砷胆碱（AsC）和砷甜菜碱（AsB）等。其中，无机砷的毒性大于有机砷，砷与有机基团结合越多，毒性越小。它们的毒性排序为：As（III）> As（V）> MMA > DMA，而砷甜菜碱和砷胆碱普遍认为是无毒的。

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 版中国药典四部《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 联用对动物药蟑螂进行砷形态分析。

■ 实验部分

1.1 对照品

砷酸、亚砷酸、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 实验材料

市售蟑螂（干品）

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）。

1.4 试剂

硝酸、碳酸铵均为优级纯，甲醇为质谱纯。

胃蛋白酶（来源于猪胃粘膜） ≥ 250 units/mg solid

■ 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 各含 0.2ng、1.0 ng、2.0ng、5.0 ng、10.0ng、20.0 ng（均以砷计）系列浓度的混合溶液，摇匀。

2.2 样品前处理

稀硝酸配制：移取 1 mL 浓硝酸，加入 9 毫升水后摇匀。

人工胃液配制：移取 3.28 mL 稀硝酸，加入 80 毫升水与胃蛋白酶 1g 后振荡摇匀，定容至 100 毫升。

移取足量蟑螂（干品），经破壁机充分粉碎，作为待测样品。

准确称取蟑螂粉末 0.5 g，加入硝酸人工胃液 10 毫升，置 40°C 水浴 24 小时。10000 转离心 15 min 后，取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤，滤液用 0.02mol/L EDTA 溶液稀释 10 倍，待测。同法制备空白溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：Hamilton PRP-X100 Anion Exchange 250*4.1 mm	柱温：40°C
流动相：A-2% 甲醇水 B-50 mmol/L 碳酸铵水溶液 (PH=8.0)	进样量：20 μL
流速：1.3 mL/min	洗针液：水
	洗脱程序：梯度洗脱

表 1. 梯度洗脱条件

Time	Flow	A.Conc	B.Conc
0.00	1.30	100	0.0
1.50	1.30	100	0.0
2.50	1.30	0.0	100.0
7.00	1.30	0.0	100.0
7.10	1.30	100	0.0
15.00	1.30	100	0.0

2.4 质谱参数

高频功率：1.2 kW	等离子体气流速：8.0 L/min
辅助气流速：1.1 L/min	载气流速：0.7 L/min
炬管类型：Mini	雾化器类型：同心
雾化室：旋流	雾室温度：5 °C
采样深度：5.0 mm	高频频率：27.12 MHz

■ 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。

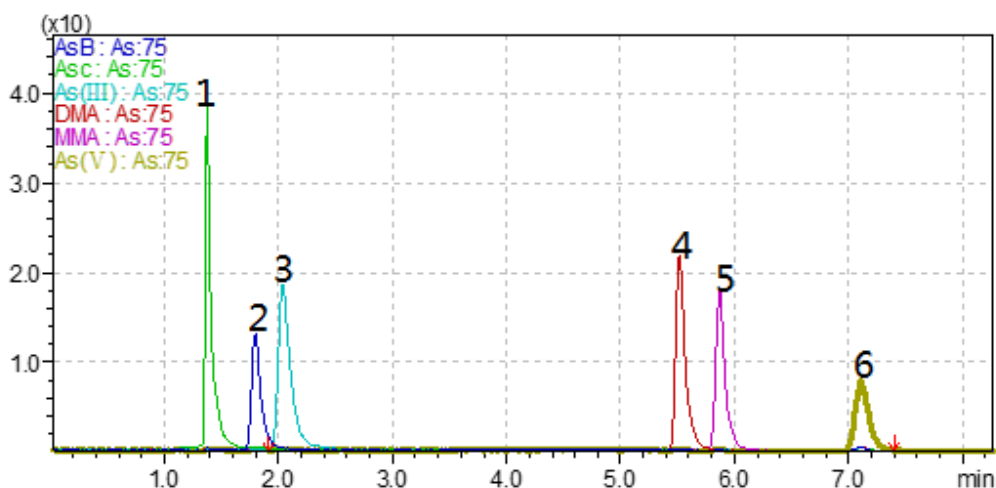


图 1. 砷元素形态及价态测定图谱

1. 砷胆碱; 2. 砷甜菜碱; 3. 亚砷酸根 (三价砷);
4. 二甲基砷; 5. 一甲基砷; 6. 砷酸根 (五价砷)

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。

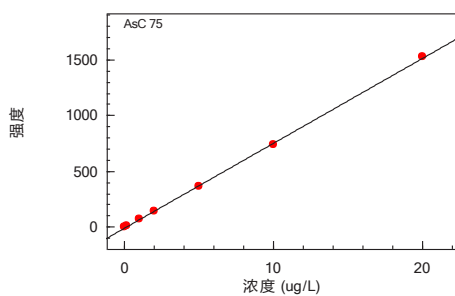


图 2. 砷胆碱标准曲线 $r=0.99979$

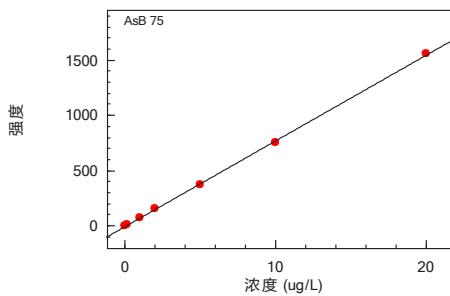


图 3. 砷甜菜碱标准曲线 $r=0.99924$

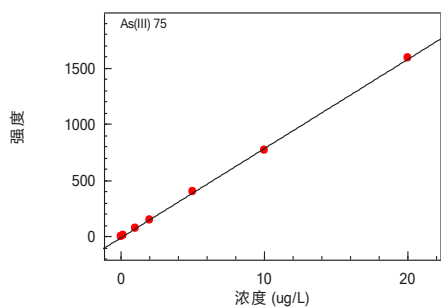


图 4. 亚砷酸根标准曲线 $r=0.99937$

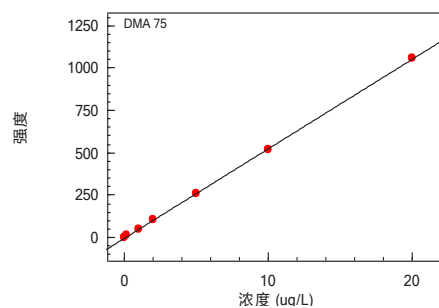


图 5. 二甲基砷标准曲线 $r=0.99993$

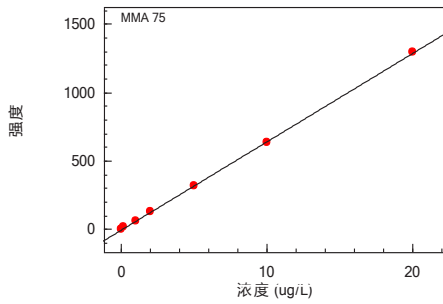


图 6. 一甲基砷标准曲线 $r=0.99993$

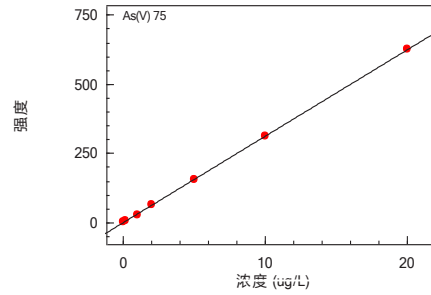


图 7. 砷酸根标准曲线 $r=0.99998$

3.3 检出限考察

在进样体积为 20 μL 时, 对浓度为 0.2 ng/mL 样品溶液考察六种形态砷的信噪比, 以三倍信噪比 (3S/N) 峰高对应浓度作为检出限, 六种形态砷色谱图、基线及检出限结果分别见图 8、图 9 和表 2。

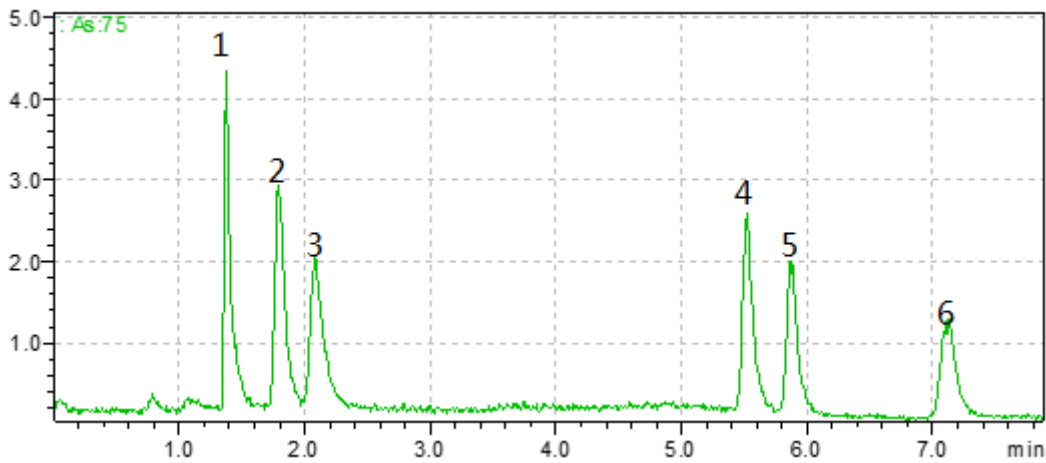


图 8. 0.2 ng/mL 六种形态砷标准溶液的色谱图

1. 砷胆碱; 2. 砷甜菜碱; 3. 亚砷酸根 (三价砷);
4. 二甲基砷; 5. 一甲基砷; 6. 砷酸根 (五价砷)



图 9. 色谱分离基线

表 2. 检出限考察结果

名称	仪器检出限 (ng/mL)	方法检出限 (ng/g)
砷胆碱	0.02	4
砷甜菜碱	0.02	4
亚砷酸根	0.03	6
二甲基砷	0.03	6
一甲基砷	0.04	8
砷酸根	0.08	16

根据出峰情况调整积分条件后, 得到砷胆碱、砷甜菜碱、亚砷酸根的保留时间和峰宽信息, 见表 3。

表 3. 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)
砷胆碱	1.373	1.330	1.540
砷甜菜碱	1.786	1.692	1.970
亚砷酸根	2.081	1.970	2.264

按照分离度计算公式 $R=2*\Delta T/(W_1+W_2)$ 计算分离度, 其中 W_1 、 W_2 为相邻两个峰的峰宽, ΔT 则为相邻两个峰的保留时间差。计算得到砷胆碱和砷甜菜碱分离度为 1.7, 砷甜菜碱和亚砷酸根分离度为 1.0, 符合药典规定的砷胆碱、砷甜菜碱、亚砷酸根分离度应不小于 1 的规定。

3.4 样品测试结果及回收率考察

将市售蟑螂(干品)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 4。

表 4. 蟑螂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 (%)
砷胆碱	0.19	38	1	1.17	98
砷甜菜碱	0.18	36	1	1.19	101
亚砷酸根	0.21	42	1	1.26	105
二甲基砷	0.12	24	1	1.13	101
一甲基砷	0.06	12	1	1.03	97
砷酸根	0.14	28	1	1.12	98

结论

参考 2020 版中国药典四部《2322 汞、砷元素形态及价态测定法》征求意见稿, 建立了蟑螂中六种形态砷的高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用法(HPLC-ICP-MS)。该方法灵敏度高, 方法检出限为 4~16 ng/g, 可满足 2020 版《中国药典》的分析要求, 适用于蟑螂等动物药中不同形态砷的分析。