

HPLC-ICP-MS 研究炮制对中药砷形态的影响

金鹏飞, 吴学军, 邹定, 邝咏梅, 胡欣, 姜文清, 孙春华

卫生部北京医院药学部, 北京 100730

摘要 应用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联机技术(HPLC-ICP-MS)建立了中药中 As^{III} , As^V , MMA 和 DMA 等四种砷形态的同时测定方法, 用该方法对黄芪、大黄、黄芩、何首乌、地黄等五种中药炮制前后砷形态的变化进行了比较研究, 并对一个总砷超标的冬虫夏草样品进行了砷形态的分析。方法学验证表明: 四种砷形态的线性相关系数(r)都大于 0.998 4, 定量限(LOQ)都在 $0.8 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 重复性和稳定性的相对标准偏差(RSD)都小于 10%, 加标回收率都在 82.40%~119.5% 之间。测定结果显示: 中药中的砷形态以无机砷(As^{III} 和 As^V)为主; 植物来源中药中都未检出 MMA 和 DMA, 但冬虫夏草中检出了 MMA; 炮制后, 五种中药无机砷的含量都出现了上升。

关键词 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱; 中药; 炮制; 砷形态

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)03-0816-04

引言

中药中的砷(As)含量向来是各国法规关注的重点^[1]。现代药理表明, 砷元素的毒性与其存在形态密切相关^[2]: 三价砷(As^{III})和五价砷(As^V)属于无机砷, 毒性很强, 其中又以 As^{III} 的毒性最强; 单甲基砷酸(MMA)和二甲基砷酸(DMA)属于有机砷, 有一定毒性, 但毒性远远小于无机砷; 砷胆碱(AsC)、砷甜菜碱(AsB)以及各种类型的砷糖(AsS)和砷脂(AsL)等形态在海洋生物中分布较多, 是几乎无毒的。因此, 要全面评价中药砷毒性, 单纯考察砷总量是不够的, 还应考察各种砷形态的含量, 特别是无机砷的含量。

炮制是中医用药的重要特点, 中药经过炮制后, 药性、药效、毒性等方面都可发生改变。本文应用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联机技术(HPLC-ICP-MS, high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry), 对一个总砷超标的冬虫夏草样品进行了砷形态分析, 还考察了五种常用中药炮制前后砷形态的变化, 为中药的毒理研究提供了参考。

1 仪器与试剂

电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)Agilent 7500a(Agilent Technologies Co. Ltd, USA), 同心雾化器, 镍采样锥和

截取锥。Agilent 1100 型单元泵液相色谱系统、Agilent G3154-65001 阴离子交换树脂柱($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) (美国安捷伦公司), KQ-800KDE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司), CS-6KR centrifuge 低温高速离心机(BECKMAN 公司), 超纯水处理系统(法国 MILLIPORE, Synthesis), METTLER TOLEDO XP 205 电子天平(瑞士梅特勒公司), 101A-2 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂), RT-02A 型粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司), LABOROTA 4000 旋转蒸发仪(德国 HEIDOLPH 公司)。

As^{III} 标准溶液(GBW08666)、 As^V 标准溶液(GBW08667)、MMA 标准溶液(GBW08668)、DMA 标准溶液(GBW08669)均购自国家标准物质研究中心。调谐液为 Li, Y, Ce, Tl, Co 混合液($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), Agilent 公司产品, 编号 5184-3566。超纯水由 MILLIPORE 超纯水系统制得。

2 方法

2.1 HPLC-ICP-MS 工作参数

流动相为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA(氨水调至 pH 6.0), 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

RF 功率 1 500 W; 采样深度 7.2 mm, 载气流速(Carrier Gas) $0.62 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 补充气流速(Makeup Gas) $0.4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 蠕动泵转速 $18 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 雾化室温度 $2 \text{ }^\circ\text{C}$, 采样模式为 Time Resolved Analysis; 峰模式 TRA; 采样元素为 ^{75}As

收稿日期: 2010-03-28 修订日期: 2010-07-02

基金项目: 中央保健科研课题专项(B2009B032)和卫生部北京医院院级课题(bj-2008-117)资助

作者简介: 金鹏飞, 1978 年生, 卫生部北京医院副主任药师 e-mail: j790101@sohu.com

和³⁵Cl, 元素的积分时间 0.5 s。

2.2 中药样品

黄芪(产地: 内蒙)、大黄(产地: 甘肃)、黄芩(产地: 河北)、何首乌(产地: 河南)、地黄(产地: 河南)均购自北京崇光药业有限公司; 冬虫夏草(产地: 青海)为药房送检样品。炙黄芪、熟大黄、酒黄芩、制何首乌、熟地等炮制品都由所购生药按照《中国药典》规定的标准方法^[3]炮制而得。以上样品经粉碎成粉后, 过 70 目筛, 烘箱(70±2)℃烘干, 置于干燥器中备用。冬虫夏草按照前期工作建立的方法^[1]测定总砷含量。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取中药样品或中药炮制品 0.5 g 于离心杯中, 加 50% (φ) 甲醇溶液 10 mL 浸泡 1 h, 超声提取 30 min, 离心机 5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 倾出离心液, 滤渣继续提取 2 次, 合并离心液, 旋转蒸发仪 40℃ 减压浓缩至近干, 用超纯水转移至 10 mL 聚乙烯容量瓶中, 定容, 摇匀, 0.20 μm 微孔滤膜滤过。冬虫夏草供试品溶液按前期工作建立的方法^[1]测定总砷; 冬虫夏草的提取砷含量 = 供试品溶液的砷总量 / 供试品称样量。

2.4 标准溶液的制备

精密吸取四种砷形态的标准溶液适量, 先用超纯水制备浓度为 1 000 μg·L⁻¹ (以 As 计) 的各形态储备液, 再精密吸取四种形态的储备液, 用超纯水稀释制备六个浓度梯度的混合标准溶液, 混合标准溶液中, As^{III} 和 As^V 的浓度分别为: 0, 10, 20, 40, 100 和 200 μg·L⁻¹; MMA 和 DMA 的浓度分别为: 0, 2.5, 5, 10, 25 和 50 μg·L⁻¹。

2.5 测定方法和计算

取六个浓度混合标准溶液, 分别进样 20 μL, 记录总离子流色谱图, 以色谱图中四种砷形态色谱峰的峰面积为纵坐标, 相应的质量浓度为横坐标, 作标准曲线。各供试品溶液也分别进样 20 μL, 通过标准曲线的校正获得四种砷形态的

浓度, 并根据稀释倍数, 计算样品中各种砷形态的含量。

3 结果与讨论

3.1 方法学验证

3.1.1 线性和定量限

四种砷形态的标准曲线方程, 线性相关系数(*r*)见表 1。

Table 1 Linearity and LOQ

Speciations	Calibration curve	<i>r</i>	LOQ (μg·L ⁻¹)
As ^{III}	y=18 665x+4 064	0.998 4	0.8
DMA	y=21 035x-4 452	0.999 5	1.0
MMA	y=19 189x+9 297	0.999 8	1.0
As ^V	y=19 901x+15 223	0.999 8	0.8

取混合标准溶液, 用超纯水逐级稀释, 直至总离子流色谱图中各形态色谱峰的信噪比(S/N)约为 10 的浓度为该形态的定量限(LOQ)。四种砷形态的定量限见表 1。

3.1.2 重复性、稳定性和回收率

精密称取冬虫夏草粉末 0.5 g, 按“2.3”项下的规定操作, 平行测定六份, 计算各形态含量的平均值及 RSD。样品未检出 DMA。As^{III}, MMA 和 As^V 的 RSD 分别为 1.18%, 2.71% 和 4.18%, 重复性良好。选取一份 4℃ 冰箱保存的供试品溶液分别于 1, 3 和 5 d 测定, As^{III}, MMA 和 As^V 的 RSD 分别为 4.46%, 1.89% 和 5.12%, 表明 5 d 内稳定性良好。

精密称取冬虫夏草粉末 0.5 g 于离心杯中, 并在每杯中精密加入各形态储备液适量, 按“2.3”项下的规定操作, 平行测定三份, 以加标前后测定的含量平均值计算各形态的回收率。本方法中高、中、低三个浓度的加标回收率都在 82.40%~119.5% 之间(见表 2)。

Table 2 Results of spiked recovery test

Speciations	Original/(μg·L ⁻¹)	Added/(μg·L ⁻¹)	Found/(μg·L ⁻¹)	Recovery/%	RSD(n=3)/%
As ^{III}	17.23	10	26.93	97.00	2.85
		20	33.71	82.40	1.85
		30	46.87	98.80	3.38
DMA	0	7.5	6.59	87.87	4.33
		10	9.41	94.10	3.72
		12.5	12.34	98.72	4.31
MMA	4.63	3	8.04	113.7	1.73
		5.5	9.86	95.09	2.92
		8	13.54	111.4	5.32
As ^V	40.08	20	63.98	119.5	4.30
		40	82.01	104.8	1.52
		60	109.3	115.4	1.22

3.2 样品测定及结果分析

应用建立的方法对冬虫夏草进行了砷形态的分析, 并对黄芪、大黄、黄芩、何首乌、地黄五种中药材炮制前后的砷形态变化进行了研究。每个样品测定 3 次, 取平均值。砷形

态的典型总离子流色谱图见图 1, 样品测定结果见表 3。

从砷形态的分析结果来看: (1) 无机砷(As^{III} 和 As^V) 在中药砷形态中占绝对多数; (2) 所有植物来源中药都未检出 MMA 和 DMA, 这和王小如课题组的研究结果^[4]一致, 提示

植物类中药很可能对砷元素不具备甲基化代谢功能；但在冬虫夏草中检出了 MMA，表明冬虫夏草对砷元素具有一定的甲基化代谢功能，这可能和冬虫夏草是真菌和昆虫的复合体有关；(3) 冬虫夏草中 As^{III} 、 As^V 和 MMA 的含量总和为 $1.23 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，仅占其总砷含量 ($2.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 58%，提

取砷含量 ($1.65 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 的 74%，提示冬虫夏草中还存在着一定比例的 (26%~42%) 未知结构砷形态，有待深入研究；(4) 黄芪等五种中药材炮制后的无机砷含量无一例外地出现了上升，具体机理有待进一步深入研究。

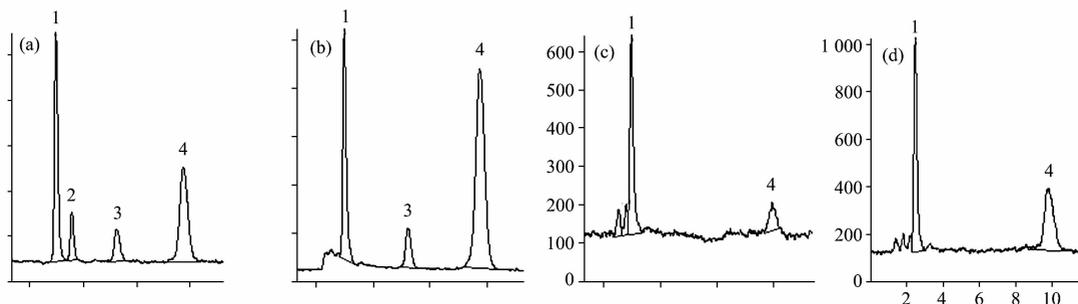


Fig. 1 TICs of arsenic speciation

(a): Combined standards ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for As^{III} and As^V , $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for DMA and MMA); (b): *Cordyceps*; (c): *Radix Scutellariae*; (d): Processed *Radix Scutellariae*
1: As^{III} ; 2: DMA; 3: MMA; 4: As^V

Table 3 Results of arsenic speciations analysis ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Speciations	<i>Cordyceps</i>	<i>Radix Astragali</i>		<i>Radix et Rhizoma Rhei</i>		<i>Radix Scutellariae</i>		<i>Radix Polygoni Multiflori</i>		<i>Radix Rehmanniae</i>	
		Crude	Processed	Crude	Processed	Crude	Processed	Crude	Processed	Crude	Processed
As^{III}	0.34	BL	0.02	BL	0.24	0.07	0.13	BL	0.06	0.20	0.22
DMA	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
MMA	0.09	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
As^V	0.80	0.04	0.04	0.02	0.31	BL	0.09	0.03	0.08	0.14	0.18

UD: Undetectable; BL: Below the LOQ

4 讨论

4.1 分析方法的选择

目前，砷形态分析的热点在海洋动植物，中药砷形态分析的报道很少^[4,5]。海洋动植物中砷含量高，形态丰富，分析相对容易；中药，特别是中草药，砷含量很低，要分析其中微量的砷形态，对方法灵敏度的要求很高。HPLC-ICP-MS 是 20 世纪 90 年代后期新发展起来的联机技术，兼有 HPLC 的分离功能和 ICP-MS 的元素分析功能，专属性和灵敏度都

很高，是中药砷形态分析的发展方向。

4.2 流动相的选择与优化

传统方法多采用 NaH_2PO_4 或 KH_2PO_4 作为砷形态分析流动相的缓冲盐，其中的 Na 和 K 元素在 ICP-MS 中很容易解离，长期运行含有较高浓度 Na 和 K 元素的流动相对仪器产生损害。本方法采用 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 作为缓冲盐，其分离效果和 NaH_2PO_4 相当，但 NH_4^+ 在仪器中不会解离，因而也不会对仪器造成损害。对流动相 pH 值的优化时发现，pH 在 4.0~6.0 之间，四种砷形态都能得到基线分离，但 pH 为 6.0 时峰形最佳。

References

- [1] JIN Peng-fei, SONG Li-jie, ZOU Ding, et al(金鹏飞, 宋丽洁, 邹定, 等). Chinese Pharmaceutical Journal(中国药理学杂志), 2007, 42(21): 1660.
- [2] ZHANG Pu-dun, XU Guo-wang, WEI Fu-sheng(张普敦, 许国旺, 魏复盛). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2001, 29(8): 971.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission(中国药典委员会). Chinese Pharmacopoeia Vol. I(中国药典, 一部). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. appendix 20.
- [4] HAO Chun-li, WANG Geng, YU Jing-jing, et al(郝春莉, 王庚, 余晶晶, 等). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 2009, 28(8): 9181.
- [5] FANG Jun, SHU Yong-hong, TENG Jiu-wei, et al(方军, 舒永红, 滕久委, 等). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室), 2007, 26(9): 34.

Study on Arsenic Speciation Changes in Crude and Processed Traditional Chinese Medicines by HPLC-ICP-MS

JIN Peng-fei, WU Xue-jun, ZOU Ding, KUANG Yong-mei, HU Xin, JIANG Wen-qing, SUN Chun-hua

Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract A HPLC-ICP-MS method for simultaneous determination of As^{III}, As^V, MMA and DMA in traditional Chinese medicines (TCMs) was established, and the contents of As^{III}, As^V, MMA and DMA in a TCM with high total arsenic content (*Cordyceps*) and 5 crude and processed TCMs (*Radix Astragali*, *Radix et Rhizoma Rhei*, *Radix Scutellariae*, *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Rehmanniae*) were determined and analyzed. The method validation indicated that the correlative coefficients (r) for all speciations were bigger than 0.998 4; the limits of quantitation (LOQ) were from 0.8 to 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; the reproducibility and stability were satisfactory with all RSDs less than 10%; the spiked recoveries ranged from 82.40% to 119.5%. The results of samples analysis showed that the inorganic arsenic (As^{III} and As^V) was the dominating speciation in the tested TCMs; MMA and DMA were not found in all plant resourced TCMs, but MMA was found in *Cordyceps*; all the tested TCMs indicated a content increasing of inorganic arsenic after processing.

Keywords HPLC-ICP-MS; Traditional Chinese medicine; Processing; Arsenic speciation

(Received Mar. 28, 2010; accepted Jul. 2, 2010)

* Corresponding author