

仁青芒觉中可溶性砷形态的 HPLC – ICP – MS 研究*

王英锋¹ 竺梅² 冯敏¹ 热增才旦³ 张兰¹ 施燕支^{1**}

(1. 首都师范大学分析测试中心, 北京 100048; 2. 首都师范大学校医院, 北京 100048;

3. 青海大学医学院中藏药研究中心, 西宁 810001)

摘要 目的: 采用 HPLC – ICP – MS 对藏药仁青芒觉中可溶性砷的形态进行研究。方法: 采用 Agilent G3154A 阴离子交换柱, 以 0.2 mmol · L⁻¹ EDTA 和 2 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钠的溶液 (pH 6.0) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 测定了仁青芒觉中砷的形态。前处理选择微波萃取, 比较了 1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇不同萃取剂的提取效率。结果: 仁青芒觉在不同提取液中砷的形态主要以 As(III) 和 As(V) 的形式存在, 且 1% 盐酸、1% 硝酸的提取效率较高。As(III) 和 As(V) 检出限 (S/N = 3) 分别为 0.39 ng · g⁻¹ 和 0.72 ng · g⁻¹, 样品加标平均萃取回收率 (n = 3) 分别为 95.6% 和 85.3%, 精密度试验的 RSD (n = 8) 分别为 2.0% 和 3.2%。结论: 藏药仁青芒觉中可溶性砷形态的研究, 为藏药中砷的毒理学研究提供了依据。

关键词: 高效液相色谱 – 电感耦合等离子体 – 质谱; 藏药; 仁青芒觉; 重金属; 砷; 形态分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)10 – 1884 – 03

Speciation analysis of solvable arsenic in Renqing Mangjue by HPLC – ICP – MS*

WANG Ying – feng¹ ZHU Mei² FENG Min¹ Rezengcaidan³ ZHANG Lan¹ SHI Yan – zhi^{1**}

(1. The Analysis Test Center, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2. The Hospital of Capital Normal College, Beijing 100048, China;

3. The Chinese and Tibetan Medicine Research Center of Medical College in Qinghai University, Xining 810001, China)

Abstract Objective: To study the speciation of solvable arsenic in Renqing Mangjue. **Methods:** High performance liquid chromatography with Agilent G3154A anion – exchange column coupled with inductively coupled plasma – mass spectrometry were adopted. The optimized mobile phase composition was 2.0 mmol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate 0.2 mmol · L⁻¹ EDTA at pH 6.0. Micro wave – assisted extraction was chosen as pre – treatment method, the extract efficiencies of different extractants (1% hydrochloric acid, 1% nitric acid, 2% acetic acid, 50% methanol) were compared. **Results:** The result indicated that the main speciation of As(III) and As(V) was presented in extraction solutions of Renqing Mangjue and 1% hydrochloric acid and 1% nitric acid had high extract efficiency. The limits of detection (S/N = 3) of As(III) and As(V) were 0.39 ng · g⁻¹ and 0.72 ng · g⁻¹ respectively; Average spiked recoveries (n = 3) were 95.6% and 85.3% respectively; RSDs of the precision test (n = 8) were 2.0% and 3.2%. **Conclusion:** Speciation analysis of solvable arsenic in Renqing Mangjue by HPLC – ICP – MS has offered a reference for toxicology of arsenic in Tibetan medicine.

Key words: HPLC – ICP – MS; Tibetan medicine; Renqing Mangjue; heavy metal; arsenic; speciation analysis

中国少数民族药物学是中国传统医药学的重要组成部分^[1]。藏药是我国重要的民族传统医药, 它独特的疗效倍受瞩目, 但藏药中重金属砷的存在仍可能会对其发展有限制。研究发现, 砷对人及生态系统的毒性不仅与元素总量有关, 还与元素存在的化学形态密切相关, 例如无机砷的毒性最大, 有机砷的毒性较小, 而砷甜菜碱和砷糖常被认为是无毒的。

目前, 对中藏药材中砷形态分析的报道较少^[2, 3]。因此, 研究藏药中砷的形态具有非常重要的意义, 可为藏药的安全用药提供非常重要的依据。

本文采用微波萃取, 1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇提取剂提取仁青芒觉中的砷, 用高效液相色谱 (HPLC) 与电感耦合等离子体质谱 (ICP – MS) 联用技术^[4]对藏药仁青芒觉中的砷形态进行了分析, 为藏

* 北京市自然科学基金资助课题 (No: 2102011)

** 通讯作者 Tel: (010) 68902695, 15120089751; E – mail: bjshifa@sohu.com

药中砷元素的质量控制和毒理学研究提供了参考。

1 仪器及试剂

Agilent 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies Co. Ltd. USA); 雾化器: 同心雾化器; 雾化室: 石英双通道, Piltier 半导体控温于 $(2 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$; 炬管: 石英一体化, 2.5 mm 中心通道; 样品锥: Pt 材质; Agilent 1200 型高效液相色谱仪; 离心机: BECKMAN COULTER Allegra™ 64RCentrifuge; CEM MARS5 微波消解仪 (CEM, USA), Milli-Q 超纯水系统 (Millipore, Bedford MA)。

标准储备液: $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ECS 环境混合标准溶液 (environmental calibration standard, Agilent); $75.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 亚砷酸盐 [As(III)] 溶液、 $17.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 砷酸盐 [As(V)] 溶液 (国家标准物质研究中心); 内标溶液: $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 铯和铊标准储备液 (国家钢铁研究总院); 硝酸: 优级纯 (Merck); 双氧水: MOS 级; 磷酸二氢钠和 EDTA: 优级纯; 调谐溶液: $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 锂、钴、钇、铈、铊混合标准溶液 (2% 硝酸介质, Agilent, Part#5184-3566); 超纯水 ($18.2 \text{ M}\Omega$) 由 Milli-Q 超纯水系统制得, 用于配制所有标准溶液与样品溶液; 仁青芒觉 (青海某藏医院提供)。

2 HPLC 及 ICP-MS 实验条件

2.1 HPLC 色谱柱: Agilent G3154A 阴离子交换柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$) 及配套的保护柱 (G3154-65002); 流动相: $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 6.0; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $50 \mu\text{L}$ 。

2.2 ICP-MS 功率: 1.35 kW; 冷却气流速: $15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流速: $1.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 载气流速: $1.10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 采样深度: 8.0 mm; 分析模式: 全定量; 氧化物: $\text{CeO}^+ / \text{Ce}^+ < 0.5\%$; 双电荷: $\text{Ce}^{2+} / \text{Ce}^+ < 2\%$; 内标加入方式: 在线内标。

3 样品前处理

用玛瑙研钵将仁青芒觉药丸研磨, 过 400 目筛, 混合均匀, 准确称取 0.1000 g, 置于酸煮洗净的 PTFE (聚四氟乙烯) 消解罐中, 分别加入萃取剂 (1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇各 20 mL) 然后放入微波炉中, 在 $80 ^\circ\text{C}$ 时微波萃取 1 h。结束后, 冷却至常温, 打开密闭消解罐, 样品消解液转移至干净的 15 mL 塑料离心管中, 在 $4 ^\circ\text{C}$ 下离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 的水系滤膜后将溶液稀释 10 倍于聚四氟乙烯瓶中, 进行 HPLC-ICP-MS 分析; 同时进行 ICP-MS 分析元素总量, 前处理方法与形态分析一致。

4 结果与讨论

4.1 干扰及消除 在分析测试前, 先用调谐液优化

仪器条件, 使 ^{75}As 有较高的灵敏度和较低的检测限。由于 ^{35}Cl 和仪器所用的高纯载气 (氩气) 易形成 $^{75}\text{ClAr}^+$, 干扰 ^{75}As , 因此在形态分析中, 采用时间分辨分析模式, 仪器同时监测 ^{75}As 、 ^{35}Cl 的信号, 用以排除 $^{75}\text{ClAr}^+$ 干扰峰^[5]。

4.2 pH 对 As(III)、As(V) 保留时间的影响 As(III)、As(V) 在不同的 pH 下有不同的形态, 这 2 种形态可用阴离子交换法进行分离。本文研究了 pH 在 5.25 ~ 10.26 范围内对这 2 种砷形态的保留时间的影响。从图 1 可看出, pH 对 As(V) 保留时间的影响比较明显, 而对 As(III) 基本上无影响。考虑到缩短分析时间, 本文选择 pH 6.0 为最佳的分离条件。

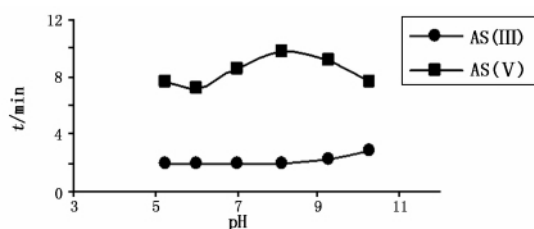


图 1 pH 对保留时间的影响

Fig 1 The effect of pH on the retention time

4.3 流动相浓度对 As(III)、As(V) 保留时间的影响 从图 2 可以看出, 流动相中磷酸二氢钠的浓度对 As(V) 保留时间的影响较大, 对 As(III) 的影响较小。为了达到较好的分离效果, 选择流动相中磷酸二氢钠的浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时又能减小流动相中的钠盐对等离子体的影响。

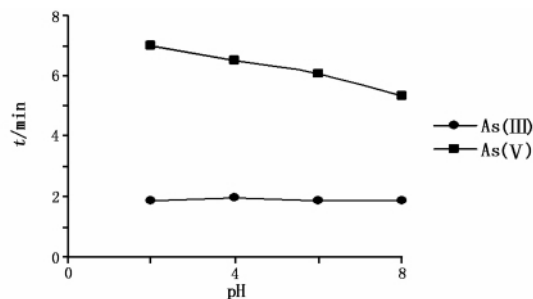


图 2 磷酸二氢钠浓度对保留时间的影响

Fig 2 The effect of NaH_2PO_4 concentration on the retention time

4.4 EDTA 浓度对 As(III)、As(V) 保留时间的影响 在流动相中加入 EDTA 是为了消除砷在色谱分离过程中的损失。从图 3 可以看出, EDTA 浓度的增加会缩短 As(III) 和 As(V) 的保留时间。为了快速分离的目的, 选择流动相中含 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA。

4.5 微波萃取可溶性砷形态的测定 采用的微波萃取, 分别以 1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇 4 种溶剂作为萃取剂, 测定了提取液中不同砷形态的含量, 结果见表 1。标准溶液与不同萃取剂提取的仁青

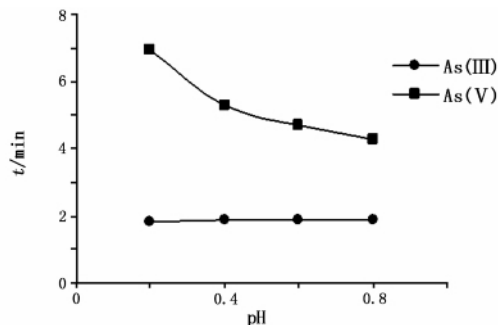


图3 EDTA 浓度对保留时间的影响

Fig 3 The effect of EDTA concentration on the retention time

芒觉中砷形态的色谱图分别见图4-A、B。实验结果显示,仁青芒觉中的砷主要以无机态 As(III) 和 As(V) 形式存在。在 1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇 4 种萃取剂的提取液中 As(III) 和 As(V) 占提取液中砷总量的质量分数分别为 92.9%、87.6%、82.4%、14.9%。可见在 1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸的提取液中绝大部分是 As(III) 和 As(V)。

表 1 不同萃取剂提取的 As 形态的测定结果 (μg · g⁻¹)

Tab 1 The concentration of arsenic species were extracted by different extractants

萃取剂 (extractant)	As(III)	As(V)	As 总量 (total amount) *
1% 盐酸(hydrochloric acid)	20.35	34.32	60.81
2% 硝酸(nitric acid)	31.84	34.94	75.80
50% 醋酸(acetic acid)	19.31	29.37	59.13
甲醇(methanol)	23.61	20.41	294.9

* 为使用 ICP-MS 直接测定的提取液中的砷总量(For the use of ICP-MS direct determination of total arsenic in extracts)

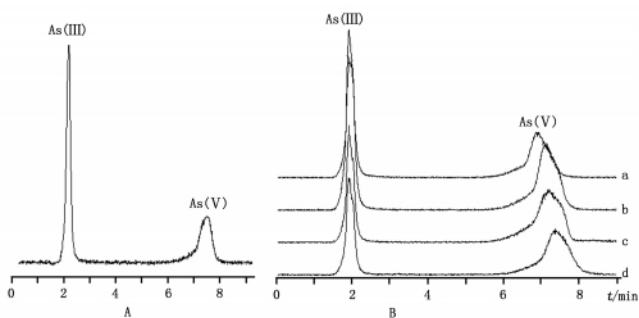


图4 5 ng · g⁻¹ As(III)、As(V) 标准溶液(A)与4种不同的萃取剂提取仁青芒觉中砷化合物(B)的HPLC-CP-MS 色谱图

Fig 4 Chromatograms of 5 ng · g⁻¹ As(III), As(V) standard solution (A) and arsenic-containing compounds extracted by different extractants (B)

a. 1% 盐酸(hydrochloric acid) b. 1% 硝酸(nitric acid) c. 2% 醋酸(acetic acid) d. 50% 甲醇(methanol)

4.6 标准曲线与检出限 用超纯水将标准储备溶液逐级稀释,配制成浓度为 0, 2, 10, 20, 50 ng · mL⁻¹ 的 As(III)、As(V) 的混合标准溶液系列,在优

化的实验条件下,采集空白及标准溶液系列,以 As(III)、As(V) 的峰面积对浓度进行线性回归。结果表明,在 0 ~ 50 ng · mL⁻¹ 浓度范围内,As(III)、As(V) 的线性回归方程分别为:

$$Y = 0.66 \times 10^5 X - 0.95 \times 10^5$$

$$Y = 0.72 \times 10^5 X - 0.45 \times 10^5$$

相关系数均在 0.999 以上,检出限(3 倍空白溶液的标准偏差对应的浓度)分别是 0.39 ng · g⁻¹ 和 0.72 ng · g⁻¹。

4.7 回收率及精密度

精密称取藏药仁青芒觉样品 0.1 g 共 9 份,加入 1% 盐酸作为萃取剂,分别精密加入混合标准溶液 [5 mg · mL⁻¹ As(III) 和 As(V) 的标准溶液] 0.5 mL,涡旋 1 min 混合均匀,按“3”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下的色谱条件进样测定,计算 As(III) 和 As(V) 的回收率。结果平均回收率(n=9)分别为 92.8% (RSD = 1.8%), 85.3% (RSD = 2.8%)。

精密吸取“4.6”项下制备的 10 ng · mL⁻¹ As(III)、As(V) 的混合标准溶液,连续进样 8 次,按前述色谱条件测定 As(III) 和 As(V) 色谱峰峰面积,计算各被测成分峰面积的 RSD(n=8) 分别为 2.0% 和 3.2%,表明精密度良好。

5 结论

HPLC-ICP-MS 测定,微波萃取(1% 盐酸、1% 硝酸、2% 醋酸、50% 甲醇)作为提取方法,通过优化测定条件,对仁青芒觉中砷的具体形态进行了测定。结果显示,仁青芒觉中的砷大部分都以无机 As(III) 和 As(V) 的形式存在。仁青芒觉中砷元素形态的分析,为藏药中砷元素的形态和毒理学研究提供了依据。

参考文献

- CHEN Ren-shou(陈仁寿). The research status and prospects of Chinese ethnic medicine(中国少数民族药物的研究现状和前景). *J Nanjing Univ Tradit Chin Med(Soc Sci Ed)* (南京中医药大学学报 社会科学版) 2006 7(2): 92
- ZHOU Tian-ze(周天泽). The problems of speciation analysis of trace elements in Chinese herbal medicine(中草药微量元素形态分析的几个问题). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 1990 21(10): 37
- FANG Jun(方军), SHU Yong-hong(舒永红), TENG Jiu-wei(滕久委), et al. Determination of arsenic speciation in traditional Chinese medicine using HPLC-ICP-MS(HPLC-ICP-MS 测定中药中砷的形态). *Chin J Anal Lab* (分析实验室) 2006 25(12): 95
- LIU Gui-hua(刘桂华), WANG Li(汪丽). The application of speciation analysis of arsenic in the seaweed by HPLC-ICP-MS(HPLC-ICP-MS 在紫菜中砷形态分析的应用). *J Instrument Anal* (分析测试学报) 2002 21(4): 88
- Onkart SN, Laurent V, Carbonnelle P, et al. Speciation of five arsenic species(arsenite, arsenate, MMAAV, DMAAV and AsB, et) in different kind of water by HPLC-ICP-MS. *Chemosphere* 2007 66(4): 738

(本文于 2011 年 7 月 27 日修改回)