

市售丹参酮 II_A 提取物中 9 种重金属元素的定量分析

郭红丽¹, 刘利亚², Christopher North³, 徐颖键³, 张敏¹, 王鹏骄¹, 高秀丽^{1*}

(1. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004;

2. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004;

3. PhosphonicS Ltd., 44c Western Avenue Milton Park Abingdon Oxon OX144RU, UK)

[摘要] 目的:建立丹参酮 II_A 中重金属元素含量测定的方法。方法:样品经微波消解前处理后,以钪(Sc), 钇(Y), 铟(In), 碱(7b)作为内标,使用 ICP-MS, AAS, AFS 进行含量测定。结果:各元素线性关系均良好(相关系数 $r > 0.9997$), 检出限为 $0.03 \sim 2.16 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 平均回收率 $95\% \sim 113\%$ 。结论:该方法操作简便、精密度高, 准确度好、稳定性和重复性好, 可推荐用于中药提取物丹参酮 II_A 中金属元素的含量测定, 为其他中药提取物中重金属元素的准确测定和质量监控提供参考。

[关键词] 微波消解法; 电感耦合等离子体质谱; 原子吸收光谱法; AFS; 丹参酮 II_A; 金属元素测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0067-05

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2015190067

Quantitative Analysis of 9 Kinds of Heavy Metal Elements in Commercially Available Tanshinone II_A Extract

GUO Hong-li¹, LIU Li-ya², Christopher North³, XU Ying-jian², ZHANG Min¹, WANG Peng-jiao¹, GAO Xiu-li^{1*} (1. School of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Province Center for Disease Control, Guiyang, 550004, China; 3. PhosphonicS Ltd. 44c Western Avenue Milton Park Abingdon Oxon OX144RU, UK)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine the contents of heavy metal elements in Tanshinone II_A. **Method:** ICP-MS, AAS and AFS were used to determine the contents of metal elements with Sc, Y, In and Tb as the internal labels after microwave digestion of samples. **Result:** Each metal elements had a good linear relationship (correlation coefficient > 0.9997), detection limit within $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ to $2.16 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and the average recovery value ranged from 95% to 113% . **Conclusion:** The method was simple in operation, and excellent in precision, accuracy, stability, and repeatability, which can be recommended to determine the content of metal elements in Tanshinone II_A. It also can provide reference for accurate determination and quality control of metal elements in other traditional Chinese medicine extracts.

[Key words] Microwave digestion method; ICP-MS; AAS; AFS; tanshinone II_A; determination of metal elements

重金属对人体的新陈代谢和正常生理功能具有明显的伤害作用, 人体内重金属含量超标会导致各种疾病的发生^[1]。因此, 在一定程度上, 中药材提取物中重金属元素的含量高低已成为衡量药材品质优劣的重要指标, 严重制约着传统中药材原料及制剂的国际化发展水平^[2]。建议今后在重视有效成分的含量研究和中原药材与饮片阶段的重金属研

究, 更应该注重中药提取物中微量元素特别是有害金属的含量测定, 建立一整套科学完备的质量标准和检测方法, 这样将有利于附加值高、市场前景好、出口量大和使用广泛的传统中药及其制剂的市场发展^[3]。丹参酮 II_A 提取物是一种作用广泛、不良反应较少的天然药物, 临床上丹参酮 II_A 其钠盐不仅用于治疗动脉硬化、高血压等心脑血管疾病, 而且在抗

[收稿日期] 20140930(010)

[基金项目] 中英联合项目基金(2014年5月至2015年5月)

[第一作者] 郭红丽, 硕士, 从事药物分析的科研工作, Tel:15761600283, E-mail:guoh0602@163.com

[通讯作者] *高秀丽, 教授, 硕士生导师, E-mail:1550434689qq.com

肿瘤、抗感染性疾病、治疗糖尿病和肝肾疾病等方面也有新的临床应用^[4]。近年来,随着丹参酮 II_A 提取物出口量不断增加及其应用量的急剧上升,准确测定并严格控制各重金属的含量,将显得越来越重要。

对于中草药种植的规范力度上,我国已经投入了巨大的人力、物力和财力等,旨在为获取优质中草药原料提供良好的保障^[5]。本研究分别考察了市售 3 个不同厂家 5 个不同批次丹参酮 II_A 中 9 种金属元素的含量。建立了丹参酮 II_A 提取物中重金属元素的定量测定方法,对了解市售品种受重金属污染情况,提供一部分数据。

1 材料

1.1 仪器 Xseries2 型电感耦合等离子体质谱仪(美国热电公司),GFA-7000 型原子吸收分光光度计(日本岛津),AF-610B 型原子荧光光度计(上海精密仪器仪表有限公司),ETHOS A 型高压微波消解仪(Milestone 公司);DEENA II 型全自动消解仪,配套 Hg 空心阴极灯、Fe 空心阴极灯、聚四氟乙烯瓶(美国 DEENA);AFZ-2002-U 型超纯水处理系统(艾科浦),电子分析天平(赛多利斯)。

1.2 试剂 硝酸(优级纯),过氧化氢(优级纯),盐酸(优级纯),去离子水;多元素混合标准溶液(10 μg·L⁻¹,编码 S130615011,加拿大摠耐睿公司),包含有 Mn, Cu, As, Pb, Cd, Cr, Zn 7 种元素;内标标准溶液 Sc, Y, In, Tb(国家标准物质研究中心,100 mg·L⁻¹);Hg 单元素标准溶液(1 000 mg·L⁻¹,GSB 04-1729-2004),Fe 单元素标准溶液(1 000 mg·L⁻¹,GSB 04-1729-2006);Sc, Y, In, Tb(10 mg·L⁻¹,购于国家标准物质研究中心,批号 110213)。

1.3 材料 10% 丹参酮 II_A 提取物(市售)。

2 方法与结果

2.1 内标液和标准液的制备

2.1.1 多元素标准溶液制备 精密量取适量多元素标准溶液,用 5% 的 HNO₃ 稀释成质量浓度为 1 mg·L⁻¹ 的标准溶液,再分别用 3% 的 HNO₃ 稀释成质量浓度分别为 0, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 μg·L⁻¹ 系列浓度的混合标准溶液。

2.1.2 内标溶液制备 精密量取适量的 Sc, Y, In, Tb 标准溶液,用 5% 的 HNO₃ 稀释成质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的内标储备液,用 3% HNO₃ 稀释成质量浓度为 10 μg·L⁻¹ 内标溶液。

2.1.3 Hg 标准溶液制备 精密量取 Hg 标准溶液,

用 10% 的 HNO₃ 稀释成质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的标准储备液,用 5% 的 HNO₃ 逐级稀释成质量浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μg·L⁻¹ 系列 Hg 标准溶液。

2.1.4 Fe 标准溶液制备 精密量取 Fe 标准溶液,用 10% 的 HNO₃ 稀释成质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 的标准储备液,用 5% 的 HNO₃ 逐级稀释成质量浓度分别为 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·L⁻¹ 的系列 Fe 标准溶液。

2.2 供试品溶液的制备 根据已经优化的方法,准确称取 10% 丹参酮 II_A 提取物 0.2 g,置于洗净的耐酸耐高温的 PTFE 消解罐中,加入的 HNO₃ 6 mL,浸泡过夜(预消解)次日准确加入 H₂O₂ 2 mL,混匀,加盖密封,消解。待消解完成后,将消解后的溶液转移至 25 mL 聚四氟乙烯材料的量瓶中,用少量去离子水洗涤消解罐和盖 3 次,合并至量瓶中,定容,摇匀,作为供试品溶液,空白对照同法处理。

2.3 仪器工作参数

2.3.1 微波消解条件 步骤 1,温度 100 °C,功率 500 W,维持 5 min;步骤 2,温度 120 °C,功率 500 W 维持 15 min;步骤 3,温度 150 °C,功率 800 W,维持 20 min。

2.3.2 ICP-MS 参数 采用标准检测模式,用调谐液对仪器进行调谐,使氧化物干扰 < 1%,双电荷干扰 < 3%。等离子气流量 15 L·min⁻¹,辅助气流量 0.9 L·min⁻¹,冷却气流量 12 L·min⁻¹,采样深度 8.5 mm,等离子体 RF 功率 1 200 W,进样稳定时间 10 s,雾化器流速 0.85 L·min⁻¹,扫描次数 25。

2.3.3 FAAS 参数 Fe 元素,波长 248.3 nm,狭缝 0.2 nm,灯电流 12 mA,空气流量 15 L·min⁻¹,乙炔流量 1.9 L·min⁻¹。

2.3.4 AFS 参数 Hg 元素, HCl 主阴极电流 30 mA,载气流量 600 mL·min⁻¹,采样泵素 100 r·min⁻¹,采样时间 8 s。

2.4 标准曲线的制备 将 2.1.1 和 2.1.2 项下的系列混合标准溶液与内标溶液同时注入仪器。依次测定,以每一浓度测得的 3 次读数的平均测量值为纵坐标,相应元素标准溶液对应的浓度为横坐标,绘制标准曲线,得线性方程,结果见表 1。

结果显示 9 种金属元素线性关系良好,相关系数均 > 0.999 7, Mn, Cu, As, Pb, Cd, Cr, Zn 在 0.5 ~ 100 μg·L⁻¹ 线性关系良好, Hg 元素在 0.1 ~ 1.0 μg·L⁻¹ 线性关系良好, Fe 元素在 0.25 ~ 4.0 μg·L⁻¹ 线性关系良好。

表 1 各元素回归方程与检出限

Table 1 Regression equations, *r*, and detection limit

元素	标准曲线	<i>r</i>	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Pb	$Y = 4\ 876X + 6\ 852.7$	0.999 7	1.55
Cd	$Y = 509.44X + 38.143$	0.999 9	0.03
Cr	$Y = 1\ 812.1X + 3\ 460.1$	0.999 9	0.05
As	$Y = 318.38X - 177.3$	0.999 9	0.26
Cu	$Y = 259.09X + 221.86$	0.999 7	0.21
Mn	$Y = 3\ 104X + 2\ 600.8$	0.999 9	0.39
Zn	$Y = 176.92X + 645.02$	0.999 8	2.16
Fe	$Y = 0.028\ 008X - 0.008\ 6$	0.999 9	0.23
Hg	$Y = 1\ 961.8X + 3.566\ 8$	0.999 8	0.05

2.5 检出限 以空白标准溶液进行测定,以空白标

表 2 各重金属元素平均回收率测定

Table 2 Average recovery rate of elements

元素	样品中量/ μg	加入量/ ng	测定量/ μg	回收量/ ng	平均回收率/%	RSD/%
Pb	2.392	50	2.441	49.115	98.23	3.5
Cd	0.021	5	0.026	4.778	95.56	5.6
Cr	1.075	20	1.095	19.844	99.22	7.2
As	0.113	2	0.115	2.260	113.01	5.1
Cu	18.421	9	18.43	9.121	101.34	3.8
Mn	27.707	30	27.740	33.294	110.98	3.3
Zn	9.223	20	9.245	21.660	108.30	6.5
Fe	278.2	50	278.25	50.545	101.09	3.6
Hg	0.011	2	0.013 2	2.161	108.03	2.9

2.8 重复性试验 取已知 Pb, Cd, As, Cr, Cu, Mn, Zn, Fe, 和 Hg 含量的丹参酮 II_A 样品 6 份, 依据 2.3 项下的仪器参数测定各金属元素的含量, RSD 分别为 Pb(1.2%), Cd(1.8%), As(1.9%), Cr(1.5%), Cu(2.0%), Mn(2.2%), Zn(2.6%), Fe(3.6%), Hg(2.9%)。

2.9 样品的测定 依据上述测定方法, 分别测定了市售的 A, B, C 3 个厂家, 5 个不同批次的丹参酮 II_A 中 9 种重金属元素的含量, 结果见表 3。

A, C 2 个厂家均存在部分重金属超标和重金属总量超标的现象, 且同一厂家不同批次的丹参酮 II_A 提取物中重金属含量也存在较大差异, 厂家 A 中第 4 批和第 5 批重金属总量超标 $> 20.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 推测厂家 A 中丹参酮 II_A 提取物的原药材来源可能不同, 第 1 批、第 2 批和第 3 批各金属含量接近, 第 4 第 5 批金属含量接近; 厂家 B 中第 5 批丹参酮 II_A 中金属含量基本一致, 其中 As 元素超标 $> 2.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 厂家 C

准溶液测定值的 3 倍标准偏差除以相应元素标准曲线的斜率计算该方法的检出限, 结果见表 1, 由此可知各元素的检出限均可以很好地满足分析要求。

2.6 精密度试验 取含 Pb, Cd, As, Cr, Cu, Mn, Zn 为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液重复进样 6 次, RSD 分别为 0.3% (Pb), 0.5% (Cd), 0.4% (As), 0.5% (Cr), 0.5% (Cu), 0.8% (Mn), 0.8% (Zn), 1.1% (Fe), 2.2% (Hg)。表明仪器进样精密度良好。

2.7 加样回收率和重复性试验 取已知 Pb, Cd, As, Cr, Cu, Mn, Zn, Fe, Hg 含量的丹参酮 II_A 样品 6 份, 分别加入约相当于丹参酮 II_A 样品中所含各金属含量一半的标准品, 按照 2.2 项下的方法制备供试品, 依据 2.3 项下的仪器参数测定各金属元素的含量, 计算回收率和 RSD, 结果见表 2。

中第 4 和第 5 批中 Cd 和 Hg 元素超标, $\text{Cd} > 0.3\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Hg} > 0.2\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 厂家 A 中 Fe 和 Mn 均较厂家 B 和厂家 C 高。

导致以上丹参酮提取物中重金属超标可能的原因主要有空气污染、废水、土壤等, 重金属污染程度不同导致原药材中金属含量基值不同, 嵌入有效结构内部——提取物的金属差异较大; 一些商家为了防止中药遭虫蛀, 人为地采用硫磺熏蒸, 导致 As 和 Hg 元素的含量增高^[6]; 另外, 在提取过程中采用的提取工艺法、所接触的容器、提取中使用的各种溶媒等均可造成重金属的污染^[7]。

3 讨论

迄今为止, 大部分中药材中重金属含量尚未制定标准^[8]。现行《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》限量指标规定, 重金属总量应 $\leq 20.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Pb} \leq 5.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Cd} \leq 0.3\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Hg} \leq 0.2\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{As} \leq 2.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{Cu} \leq 20$

表 3 丹参酮 II_A 中重金属元素含量的测定 (n = 3)

Table 3 Results of heavy metals in Tanshinone II_A (n = 3)

厂家	批次	Pb	Cd	Hg	As	Cu	Fe	Mn	Zn	Cr
A	1	1.392	0.021	0.011	0.113	18.421	278.23	27.707	9.223	1.075
	2	2.013	0.023	0.018	0.309	15.028	279.05	26.039	8.017	1.009
	3	1.902	0.022	0.020	0.293	16.039	269.03	29.038	8.027	0.910
	4	3.393	0.122	0.069	0.501	17.011	299.09	35.083	13.024	1.000
	5	3.687	0.130	0.051	0.502	18.025	300.03	32.902	12.609	0.980
B	1	1.004	0.032	0.096	2.132	11.887	92.11	16.353	7.990	0.623
	2	1.002	0.050	0.103	2.082	10.025	89.03	15.032	8.031	0.590
	3	0.990	0.080	0.104	2.012	10.000	89.06	14.940	8.037	0.602
	4	0.890	0.073	0.093	2.282	12.035	76.63	10.023	7.032	0.509
	5	0.808	0.032	0.102	2.089	11.024	79.11	11.092	8.025	0.561
C	1	0.102	0.109	0.069	1.009	6.004	62.02	5.012	3.043	0.894
	2	0.110	0.103	0.089	0.905	5.025	53.03	4.905	3.035	0.683
	3	0.090	0.380	0.270	1.052	5.067	59.04	5.605	6.047	0.673
	4	0.109	0.302	0.209	0.991	3.034	55.25	5.043	7.045	0.893
	5	0.109	0.120	0.157	0.950	3.052	56.02	6.241	3.065	0.735

mg·kg⁻¹。本研究测定的 3 个不同厂家不同批次的丹参酮 II_A 提取物数据显示,不仅中药材原料及饮片存在重金属超标现象,提取物也存在着个别重金属超标和重金属总量超标的现象,因此,在防治中药材重金属污染的过程中,需要对炮制、提取和提纯工艺进行优化以免在炮制过程中引入重金属导致其严重超标,最终影响产品的国际化发展。

上述分析结果可以发现,3 个厂家不同批次的丹参酮 II_A 提取物存在个别重金属超标和总量超标现象,均无法满足世界主要国家和组织对进口药材或食品中重金属残留量的规定,严重阻碍了我国中草药的发展,提示我们需要在控制中药材原料重金属的同时对中药提取物也加强防治力度和采取有效的措施。厂家 A 丹参酮中 Mn, Fe 元素含量非常高,尽管目前国家还没有对这些元素的含量做出明确的限量标准,但是含量过高必定会对人体造成损害^[9]。建议相关监管部门,对已有国家限量标准的元素加强质量控制,对于目前没有明确限量标准要求但含量较高存在严重用药安全隐患的 Fe, Mn 等元素的含量建立相应的产品质量标准,从而进一步推进我国传统中草药的工业化、现代化和国际化发展。

本文采用以优化的微波消解-冷原子荧光光谱法准确测定了 Hg 元素含量,因为丹参酮 II_A 提取物难以采用普通的湿法消解法消化彻底,为了能够同

时准确测定 9 种金属元素的含量,本研究考察了两种消解方法,即全自动湿法消解法和微波消解法,比对后发现采用全自动湿法消解无法准确定量 Hg 含量,因为 Hg 在敞开的环境下 100 °C 以上易挥发,损失大,回收率仅有 50%,且丹参酮难消解,故采用微波消解达到了同时测定所有金属元素的目的,回收率可以满足要求,故不仅为丹参酮 II_A 提取物中重金属含量的测定提供了科学的分析测定方法,也为其他中药提取物中重金属元素的准确测定和质量监控提供参考。

基体效应会对待测元素产生抑制作用^[5],而内标法对基体效应具有补偿作用^[10],本实验选用 Se, Y, In 和 Tb 作为内标,根据实测内标响应值与预期内标响应值较非内标元素的响应值可以提高待测元素的准确度和灵敏度。通过优化仪器参数、干扰方程的校正,碰撞反应池技术、稀释校正和标准加入法等方法消除 ICP-MS 法中常见的干扰^[11]。

采用 ICP-MS 法准确定量 Fe 元素时,仪器必须是需要装有 CCT 模式且样品没有很复杂的基体^[12],但是本文采用 AAS 测定 Fe 含量,一方面由于丹参酮 II_A 中富含 Fe 高达 300 mg·kg⁻¹,另一方面中药提取物具有复杂的基体,另外,氧化氙的分子质量接近 Fe, MS 检测器易受干扰,消解系统中的 Fe 元素的背景比较高,难以准确定量 Fe 元素,因此本研究最终决定采用 AAS 法测定 Fe 元素的含量。

[参考文献]

- [1] 周爱枝. 丹参酮 II_A 联合顺铂对 HeLa 细胞生长的影响及作用机制的研究. [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2008.
- [2] 蒋受军, 王瑾, 朱斌, 等. ICP-MS 法测定注射用丹参(冻干)中 15 种微量元素[J]. 药物分析杂志, 2008, 8(8): 1298-1300.
- [3] 李金英, 郭冬发, 姚继军, 等. 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)新进展[J]. 质谱学报, 2002, 23(3): 164.
- [4] 孙微, 封薇. 浅述中草药中微量元素 Cd 的测定及测定方法[J]. 黑龙江科技信息, 2009, 35(3): 38-40.
- [5] 荆森, 陈利琴, 陈成祥, 等. 电感耦合等离子体质谱测定高纯仲钨酸铵中磷及其他微量素[J]. 分析化学, 2009, 37(3): 403-406.
- [6] 喻喜华, 毕开顺, 陈晓辉, 等. 微波消解 ICP-MS 法测定山茱萸中 5 种重金属的含量[J]. 微量元素与健康研究, 2010, 27(3): 47-48.
- [7] 梦萌, 陈涛, 李进, 等. 丹参药材中铅、铬、砷、汞、铜的含量测定[J]. 天津中医药, 2009, 6(26): 249.
- [8] 王斌, 徐银峰, 李国强, 等. 微波消解/ICP-MS 法测定二色补血草中 27 种元素[J]. 光谱学与光谱学分析, 2009, 29(11): 3138-3140.
- [9] Ni S Q, Li R P, Wang A J. Heavy metal content in scalp hair of the inhabitants near Dexing Copper Mine, Jiangxi Province[J]. Sci China Earth Sci China, 2011, 16(5): 780-788.
- [10] Wen Z, Dang Z, Yu S D, et al. Research progress of supercritical carbon dioxide fluid extract ion of heavy metals [J]. Prog Chem, 2001, 13(4): 309-314.
- [11] Liang P, Hu B, Chen H, et al. Study on determination of trace elements in Traditional Chinese Medicine by ICP-MS with microwave digestion [J]. Chin J Spec Lab, 2001, 18(4): 509-511.
- [12] 邹耀华, 吴加伦. “浙八味”材及其土壤中有毒重金属污染调查分析[J]. 中成药, 2011, (10): 1826-1828.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名, 冒用本刊名义, 骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明: ① <http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名, 其他域名均非本刊。

② 本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③ 投稿成功后, 为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为, 本刊将通过法律程序进行维权。