

# 毛细管电泳-激光诱导荧光法测定人参中铜和镉离子含量

卢恒, 徐宁, 孟繁蕴\*

(北京师范大学地理科学学部,  
教育部资源药物工程研究中心, 北京 100875)

**[摘要]** **目的:**建立高效毛细管电泳-激光诱导荧光法(high performance capillary electrophoresis-laser induced fluorescence, HPCE-LIF)测定  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  含量的方法,并将其应用于中药材人参重金属的检测。**方法:** $\text{Cu}^{2+}$  与  $\text{Cd}^{2+}$  通过与荧光络合剂异硫氰酸荧光素酯-偶氮乙二胺四乙酸(fluorescein isothiocyanate isomer I-Aminobenzyl ethylene diamine tetraacetic acid, FITC-ABEDTA)柱前络合后,以熔融石英毛细管柱(75  $\mu\text{m} \times 60.2 \text{ cm}$ ,有效长度 50 cm)为分离通道,经 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调 pH 至 9.3 的 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸溶液-0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS 溶液(38.5:61.5)作为缓冲溶液,分离电压 25 kV,检测波长 520 nm,毛细管温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,自动压力进样 5 s。**结果:**人参样品中  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  分离效果良好,并且对两者进行了标准曲线、精密度、重复性和加样回收率试验,在 1~150, 2~200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好( $r > 0.9992$ ),两者精密度 RSD 均  $< 2.0\%$ ,表明精密度良好;两者重复性 RSD 均  $< 3.7\%$ ,表明重复性良好;两者加样回收率分别为 103.30%, 100.33%, RSD 2.5%, 2.8%。**结论:**采用毛细管电泳-激光诱导荧光法测定中药材人参中特定重金属,方法可行,很好地解决了中药材重金属离子含量低且不易分离的问题,为中药材重金属离子的检测提供一种新的方便快捷准确的方法,并且相信经过不断探索和改进研究,HPCE-LIF 法可用于中药材中更多重金属离子的同时检测。

**[关键词]** 毛细管电泳-激光诱导荧光检测; 硫氰酸荧光素酯-偶氮乙二胺四乙酸; 重金属; 人参; 铜; 镉

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0052-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140052

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.0923.002.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-20 9:23

## Content Determination of $\text{Cd}^{2+}$ and $\text{Cu}^{2+}$ in Ginseng Radix et Rhizoma by Capillary Electrophoresis Coupled with Laser-induced Fluorescence

LU Heng, XU Ning, MENG Fan-yun\*

(Beijing Key Laboratory of Protection and Utilization of Chinese Medicine,  
Institute of Natural Medicine and Chinese Medicine Resources,  
Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a high performance capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (HPCE-LIF) detection method for simultaneous determination of cadmium and copper contents, and apply this proposed HPCE-LIF method for the detection of heavy metal in Ginseng Radix et Rhizoma. **Method:** After the complexation of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  with fluorescein isothiocyanate isomer I-Aminobenzyl ethylene diamine tetraacetic acid (FITC-ABEDTA), with a fused silica capillary (75  $\mu\text{m} \times 60.2 \text{ cm}$ , effective length of 50 cm) as the separation channel, the carrier buffer was composed of 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  boric acid-0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS (38.5:61.5) with pH adjusted to 9.3. The applied voltage was 25 kV and the capillary temperature was 25  $^{\circ}\text{C}$ . The detection wavelength was at 520 nm, and the samples were injected into the capillary at a pressure for 5 s. **Result:**  $\text{Cd}^{2+}$  and

**[收稿日期]** 20170402(002)

**[基金项目]** 国家基础性工作专项(2013FY114500,2015FY111500);国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-HEN-18)

**[第一作者]** 卢恒,在读博士,从事中药资源研究,Tel:010-62208739,E-mail:baggio9@mail.bnu.edu.cn

**[通讯作者]** \*孟繁蕴,博士,教授,从事中药资源研究,Tel:010-62208739,E-mail:mfy@bnu.edu.cn

$\text{Cu}^{2+}$  ions were well separated, and good linearity was found in the range of 1-150, 2-200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  ions. The RSD of precision was both less than 2.0%; RSD of repeatability was both less than 3.7%, and the average recovery was 100.33% for  $\text{Cd}^{2+}$  with RSD of 2.8% and 103.30% for  $\text{Cu}^{2+}$  with RSD of 2.5%.

**Conclusion:** Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence could be used to detect certain heavy metals in Chinese traditional medicine Ginseng Radix et Rhizoma, and this method could make up for the shortcomings of low content of heavy metal ions and the difficulty in separation of traditional Chinese medicinal materials, and provide a new, convenient, fast and accurate method for detecting heavy metal ions of Chinese medicinal materials. It is believed that after continuous exploration and improvement research, HPCE-LIF can be used to detect more heavy metal ions in traditional Chinese medicine simultaneously.

[Key words] CE-LIF; FITC-ABEDTA; heavy metals; Ginseng Radix et Rhizoma;  $\text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{Cd}^{2+}$

随着我国经济的发展,由于环境污染,施肥以及病虫害防治用药而导致的中药材重金属超标问题日益突出<sup>[1-8]</sup>。这不但直接影响到人民的身体健康,同时也极大地制约了中药材在国际市场上的竞争力<sup>[9]</sup>。人参是我国驰名中外,老幼皆知的名贵药材。其具有大补元气,复脉固脱,补脾益肺,生津养血,安神益智的功能<sup>[10]</sup>。现已有报道<sup>[11-12]</sup>对人参重金属进行测定,发现存在不同程度上的重金属超标问题。

中药重金属精确检测通常采用 ICP-MS 法<sup>[13-16]</sup>,然而 ICP-MS 检测成本昂贵,尤其是中药材检测样本量普遍较多,更增加了其检测成本。因此本研究提出毛细管电泳-激光诱导荧光法用于中药材重金属的检测。毛细管电泳具有高效快速,分离度高,自动化高,经济环保等优点<sup>[17]</sup>,同时激光诱导荧光检测器又可以提供足够与 ICP-MS 相媲美的检测灵敏度<sup>[18]</sup>,足以解决中药材重金属含量低不便于检出的问题,因此两者联用可以同时确保化学检测所需要的高分离度和高灵敏度。本研究采用毛细管电泳-激光诱导荧光法检测人参中  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$ ,并对此方法用于中药材中重金属离子的检测进行了初步的研究。

## 1 材料

P/ACE™ MDQ 型高效毛细管电泳仪(激光诱导荧光检测器激,发光波长 483 nm,发射光波长 520 nm,德国 Beckman 公司);熔融石英毛细管柱(河北永年色谱元件有限公司);32Karat Software 工作站,5418 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);KQ-250DV 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);AX205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);S54 型电热平板消解仪(北京莱伯泰科仪器有限公司)。

$\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  单元素标准储备液 (1 000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

批号分别为 GBW08615, GBW08612, 中国计量科学研究院);荧光素 (FITC-I, 纯度 > 98%, 美国 Fluka 公司);偶氮乙二胺四乙酸 (ABEDTA, 纯度 > 98%, 日本 Dojindo 公司);乙腈为色谱纯(美国 J. T. Baker 公司);硼酸为分析纯(北京化工厂);氢氧化钠,十二烷基硫酸钠 (SDS), 浓硝酸 (65%), 双氧水 (30%) 均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。所有实验用水为 Milli-Q 超纯水装置所制超纯水,18.2 MΩ(美国 Millipore 公司),并且所有的溶液配制和保存均在四氟乙烯瓶中进行以避免外界金属离子的干扰。3 批人参样品分别采自吉林省集安市大路镇正义村、台上镇老岭村、太王镇高台村,采集日期分别为 2013-09-19, 2013-09-20, 2013-09-20。秋季采挖,阴干,存放于北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室,经北京师范大学资源学院孟繁蕴教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根。

## 2 方法和结果

### 2.1 溶液制备

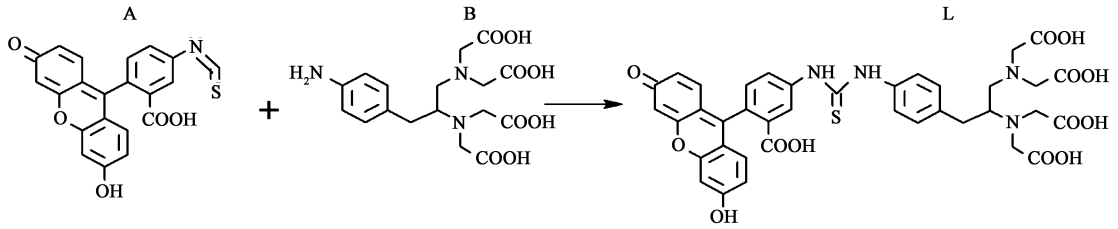
**2.1.1 重金属离子对照储备溶液** 取  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  标准储备液适量,用超纯水稀释至质量浓度为 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,得到对照储备液,保存于冰箱,工作液逐级稀释得到。

**2.1.2 人参供试品溶液** 称取粉碎后的人参样品 0.5 g,放入到消解管中,加入浓硝酸 10 mL,放于电热板上过夜预消解,预消解后打开电热板调节温度至 70 °C,加入过氧化氢 1 mL 后不断调高温度,适当补酸,补过氧化氢,待其冒白色烟雾时,可作为消解完成的终点表示消解完全,温度控制在 120 °C 以内赶酸。赶酸完成后,用超纯水将样品洗出并用超纯水定容至 5 mL。得到人参供试品溶液。

**2.2 荧光络合剂的合成<sup>[18]</sup>** 取 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FITC-I 和 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABEDTA 各 5 mL,加超纯水

40 mL,用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 苹果酸-氢氧化钠缓冲液调 pH 到 6.2,在 40 ℃ 下避光反应 6 h。反应产物通过 HPLC 进行纯化分馏。得到的溶液在 pH 2.5 的盐

酸溶液中酸化反应 30 min,滤过干燥得到荧光络合剂。取适量荧光络合剂加纯化水溶液配制荧光络合剂储备液(1.0 mmol·L<sup>-1</sup>)。反应公式见图 1。



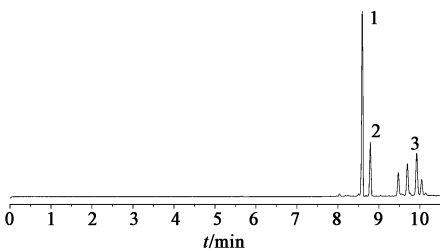
A. FITC-I(荧光剂);B. ABEDTA(重金属离子络合剂);L. FITC-ABEDTA(荧光络合剂)

图 1 荧光络合剂制备反应

Fig. 1 Preparation of fluorescent complexing agent

**2.3 柱前络合** 取 2.1 项下配制的对照储备液,人参样品溶液分别放入到 1.5 mL 离心管中,加入适量 2.2 项下合成的荧光络合剂(1.0 mmol·L<sup>-1</sup>),加超纯水定量至 1 mL,进行络合反应,充分混合反应以后,避光室温 3 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 5 min。得到重金属离子络合物,进行毛细管电泳测定。

**2.4 毛细管测定条件** 经 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液调 pH 至 9.3 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 硼酸溶液-0.1 mol·L<sup>-1</sup> SDS 溶液(38.5:61.5),分离电压 25 kV,检测波长 520 nm,毛细管温度 25 ℃,自动压力进样 5 s。见图 2。



1. FITC-ABEDTA; 2. Cu<sup>2+</sup>; 3. Cd<sup>2+</sup>

图 2 人参药材毛细管电泳

Fig. 2 Electropherograms of Ginseng Radix et Rhizoma

**2.5 标准工作曲线** 依照《中国药典》2015 年版规定办法,取 10 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 对照储备液,用超纯水稀释, Cu<sup>2+</sup> 质量浓度分别为 1, 5, 30, 150 μg·L<sup>-1</sup>; Cd<sup>2+</sup> 质量浓度分别为 2, 10, 40, 200 μg·L<sup>-1</sup>。经过柱前络合反应后,按 2.4 项下毛细管电泳测定条件进样测定,以荧光强度作为纵坐标,以金属离子对照溶液的质量浓度作为横坐标,绘制标准曲线。结果各元素线性关系良好(r>0.999 0)。见表 1。

**2.6 精密度试验** 取含 50 μg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 的对照溶液,按上述的电泳条件连续进样 6 次测定,相对荧光单位(RFU)的 RSD 均 < 2.0%,表明精密度

表 1 Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 的回归方程

Table 1 Calibration curve of Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>

元素	回归方程	r	线性范围/μg·L <sup>-1</sup>
Cd <sup>2+</sup>	Y = 2 578.12X - 125.68	0.999 2	2 ~ 200
Cu <sup>2+</sup>	Y = 1 067.28X - 721.36	0.999 5	1 ~ 150

良好。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批人参药材样品细粉 6 份,按照上述方法制备供试品溶液,并按上述的电泳条件操作,记录 RFU,测得 Cu<sup>2+</sup> 平均质量分数为 0.213 μg·g<sup>-1</sup>, RSD 2.7%; Cd<sup>2+</sup> 平均质量分数为 8.971 μg·g<sup>-1</sup>, RSD 3.6%。表明方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 取已知 Cu<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 含量的人参药材细粉 6 份各 0.5 g,精密称定,分别加入 Cd<sup>2+</sup> 对照溶液(0.1 mg·L<sup>-1</sup>), Cu<sup>2+</sup> 对照溶液(5 mg·L<sup>-1</sup>) 1.0 mL。按照上述方法制备供试品溶液,并按上述的电泳条件操作,记录 RFU,计算含量,结果见表 2,3。

表 2 人参药材中 Cd<sup>2+</sup> 加样回收率试验

Table 2 Recovery test of Cd<sup>2+</sup> in Ginseng Radix et Rhizoma

称样量/g	样品中量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.501 3	0.106 8	0.209 2	102.40	100.33	2.8
0.501 6	0.106 8	0.207 3	100.50		
0.502 1	0.106 9	0.206 1	99.20		
0.498 5	0.106 2	0.201 4	95.20		
0.500 4	0.106 6	0.208 7	102.10		
0.500 8	0.106 7	0.209 3	102.60		

注:加入量均为 0.100 0 μg。

**2.9 样品测定** 取 2.1 项下配制的人参样品溶液

表 3 人参药材中 Cu<sup>2+</sup> 加样回收率试验

Table 3 Recovery test of Cu<sup>2+</sup> in Ginseng Radix et Rhizoma

称样量 /g	样品中量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.5013	4.497	9.712	104.30	103.30	2.5
0.5016	4.500	9.705	104.10		
0.5021	4.504	9.765	105.22		
0.4985	4.472	9.513	100.82		
0.5004	4.489	9.465	99.52		
0.5008	4.493	9.786	105.86		

注:加入量均为 5.000 μg。

0.5 mL 放入到 1.5 mL 离心管中,加入 2.2 项下合成的荧光络合剂 50 μL (1.0 mmol·L<sup>-1</sup>),加超纯水定量至 1 mL,避光室温 3 000 r·min<sup>-1</sup>下离心 5 min,充分络合反应后,即为样品供试品溶液。按上述毛细管电泳条件进行测定。3 批人参药材测定结果分别为 Cd<sup>2+</sup> 质量分数 0.41, 0.23, 0.25 μg·g<sup>-1</sup> (限量值 ≤ 0.3 μg·g<sup>-1</sup>); Cu<sup>2+</sup> 质量分数 9.07, 8.53, 7.78 μg·g<sup>-1</sup> (限量值 ≤ 20.0 μg·g<sup>-1</sup>)。

### 3 讨论

**3.1 金属离子的荧光吸收** Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 离子本身并没有荧光吸收,因此选择合适的荧光络合剂是本研究的首要条件。荧光络合剂包括荧光基团与金属离子络合基团 2 部分,本研究选择常用的 FITC-I 作为荧光剂,ABEDTA 具有极强的金属离子络合能力的同时与 FITC-I 可以发生结合反应,因此被选为此次研究的金属离子络合剂。

**3.2 毛细管电泳测定条件的选择** 试验中发现硼酸体系的缓冲溶液在 Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 分离时效果较好,在缓冲液中加入适量的 SDS 可以显著改善整体分离度。此外缓冲液 pH 也显著影响分离效率和迁移时间。对不同 SDS 浓度以及 pH 的筛选。试验最终确定经 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液调 pH 至 9.3 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 硼酸溶液-0.1 mol·L<sup>-1</sup> SDS 溶液 (38.5:61.5) 作为缓冲溶液分离效果最好。

**3.3 人参药材中其他重金属离子的干扰** 人参药材本身含有多种重金属离子,在与荧光络合剂反应后进行 CE 测定时,除了 Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 外,不可避免会有其他的干扰离子,通过图 2 所示的人参毛细管电泳图谱也可以清楚地看出。一方面在本研究中其他干扰离子未影响 Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 的分离,另外在对 Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 进行了充分的定性定量研究的基础上,对其他干扰峰也做了初步研究,但现有研究未能对

其他干扰峰做出准确的定性分析,猜测有可能是多种金属离子的重合峰,这也是接下来需要继续研究的方向。

**3.4 人参药材中 Cd<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 超标情况** 对 3 批人参进行测定,发现其中有一处的 Cd<sup>2+</sup> 有轻微的超标现象,其他均正常。有可能是种植过程中使用农药累积造成的。

**3.5 毛细管电泳-激光诱导荧光用于中药材中重金属离子的检测** 本次研究是将毛细管电泳-激光诱导荧光联合用于中药材重金属离子的检测,将毛细管电泳高分离度优点发挥的同时,又结合激光诱导荧光检测高灵敏度的优点,很好的解决了中药材重金属离子含量低且不易分离的问题,为中药材重金属离子的检测提供一种新的方便快捷准确的方法。虽然只在初步阶段,却有巨大的研究和可利用空间。

#### [参考文献]

[1] 郑琪,南铁贵,袁媛,等. 9 种市售药材中重金属含量调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 14-17.

[2] 赵连华,杨慧慧,胡一晨,等. 我国中药材中重金属污染现状分析及对策研究[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1199-1206.

[3] 陈建存. 输美中成药受重金属/化学品污染及违反 FDA 规定情况[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(8): 90-91.

[4] 李敏,刘渝,周睿,等. 国内外有关中药中重金属和砷盐的限量标准及分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2859-2860.

[5] 韩小丽,张小波,郭兰萍,等. 中药材重金属污染现状的统计分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2041-2047.

[6] 王阶,乔夕瑶,林飞,等. 中药饮片发展现状及质量管理中存在的问题与分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4475-4478.

[7] 叶国华,吕方军. 21 种中药材中重金属含量测定[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(2): 265-266.

[8] 先慧,王爱平. 中药材中重金属污染现状以及防治措施[J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(4): 24-25.

[9] 吴加伦. 中药材 GAP 的环境污染物检测对象与限量标准探讨[J]. 中国现代中药, 2008, 10(12): 3-8.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 8-9.

[11] 徐晶,窦德强. 人参的质量标准研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(3): 22-24.

[12] 张春盛,吴舜芳,林炳国,等. 西洋参等 8 种中药的重金属检测[J]. 中国药业, 2009, 18(17): 20-21.

[13] 冯欣,杜小伟,周钢,等. 西藏林芝地区产红花中的 8

- 种重金属及 2 种有效成分的质量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 41(20): 4108-4111.
- [14] 焦阳, 尹海波, 张乐, 等. 基于 ICP-MS 对不同产地葛头无机元素的主成分分析和聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 68-71.
- [15] 靳敏, 梁青青, 张丽萍, 等. 蒙古黄芪种植土壤及药材中重金属和农药残留分析[J]. 中药材, 2015, 38(3): 454-456.
- [16] 周骁腾, 卢恒, 李耿, 等. 川产道地药材川芎重金属富集能力及健康风险评价[J]. 环境化学, 2014, 33(4): 562-567.
- [17] MENG F Y, WEI Y Q, LU H, et al. Chelatometric dispersive liquid-liquid microextraction followed by capillary electrophoresis for the analysis of total and water soluble copper in Rhizoma Coptidis [J]. Chin Chem Lett, 2013, 24(3): 506-508.
- [18] Saito S, Nakano Y, Hikichi A, et al. Ultrasensitive CE for heavy metal ions using the variations in the chemical structures formed from new octadentate fluorescent probes and cationic polymers [J]. Analyst, 2011, 136(13): 2697-2705.

[责任编辑 顾雪竹]

## 《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士, 由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊, 创刊于 1995 年 10 月, 目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴, 在中医药事业蓬勃发展的进程中, 《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

① 中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016 年版): 影响力指数(CI) 学科排序 3/122(中医药类 122 本期刊中排第 3 名); 复合影响因子 1.319, 学科排序 9/122;

② 万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为 16, 总被引频次 15 664, 复合影响因子 1.620, 在中医药类 122 本期刊中排序分别为第 2, 2, 11 名;

③ 入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④ 入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014 年版);

⑤ 入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊 2016 年版);

⑥ 被评为“RCCSE 中国权威学术期刊(A+)”(《中国学术期刊评价研究报告(武大版)(2017—2018)》)。