

RP-HPLC-ICP-MS 技术用于西洋参中 多元素溶出特性及形态分析

陈军辉^{1,2}, 谢明勇¹, 王凤美³, 王小如^{3,4}, 黎先春⁴

(1. 南昌大学食品科学教育部重点实验室, 南昌 330047; 2. 中国海洋大学化学化工学院, 青岛 266003;

3. 厦门大学现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005;

4. 国家海洋局第一研究所, 青岛市现代分析科技与中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

摘要 采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和反相高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(RP-HPLC-ICP-MS)对西洋参(*Panax quinquefolium*. L)及西洋参提取物中多种元素的含量及元素的形态进行了研究. 对西洋参中的多种元素用水、乙醇和氯仿等不同极性的溶剂进行提取, 考察了这些元素在不同溶剂中的溶出特性, 采用 ICP-MS 法对其进行定量测定; 并采用 RP-HPLC-ICP-MS 联用技术对西洋参水提取液中多种元素(P, Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Ni, Cu 和 Sr)的形态进行了分析. 结果表明, 元素提取率随提取溶剂极性的增加而增大, 特别表现在 Mg, Ca, P, Mn, Sr, Mo 和 Pb 等元素上; 采用 HPLC-ICP-MS 技术在以 0.1 mol/L 的稀硝酸和超纯水为流动相, 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 20 μ L 的条件下, 各元素的无机态和有机态均得到良好分离.

关键词 西洋参; 元素溶出特性; 元素形态分析; 反相高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)10-1844-05

近年来, 微量元素与人体健康的关系受到普遍关注, 已有不少学者对中草药中的微量元素进行了研究, 但仅研究元素总量显然不能满足临床需要, 需要对元素的形态进行研究. 元素形态分析仅用单一仪器或技术很难完成, 因此联用技术是元素形态分析的重要手段. 自从 1980 年 Hirschfeld^[1]首次提出联用技术以来, 各种联用技术迅速发展, 其中 HPLC 和 ICP-MS 联用是发展较为完善的技术之一. 目前该技术已广泛应用于环境、材料和生命科学样品中元素的形态分析, 可使分离与检测同时完成, 是元素形态分析最有力的工具^[2~4].

我们^[5]对天然产物、中药材中元素形态分析进行了深入研究, 用 HPLC-ICP-AES 进行了茶叶中多元素形态的同步分析; 利用 C_{18} 柱很好地保留了有机态元素及易被稀硝酸洗脱的无机与有机态元素; 以 FI-ICP-AES 法研究了青钱柳叶植物药中 Zn, Mn, Fe 和 Mg 的溶出特性和化学形态^[6]. 本文在此基础上, 对西洋参中多种元素的溶出特性及西洋参水提取液中元素的存在形态进行了研究, 将反相液相色谱(RP-HPLC)-电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用技术应用于西洋参元素形态分析, 为西洋参药理活性的进一步研究提供了科学依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

超纯水(18.2 M Ω); 硝酸和双氧水为优级纯; 含 Mg, Al, P, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Cd 和 Pb 离子的混合标样(各元素的质量浓度均为 5 μ g/mL). 标准参考物灌木枝叶组合样 GBW07603 和茶叶 GB07605 由地矿部化探分析质量监控站提供. 西洋参样品产自东北吉林.

MK-III 型光纤压力自控密闭微波快速消解系统(新科微波溶样技术研究所), Agilent 1100 高效液

收稿日期: 2005-10-12.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(批准号: 20235020)资助.

联系人简介: 谢明勇(1957 年出生), 男, 博士, 教授, 主要从事食品化学与营养学研究. E-mail: myxie@ncu.edu.cn

相色谱仪(美国 Agilent 公司), HP4500 系列电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司); Milli-Q⁵⁰ 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司). 通过优化实验选择 ICP-MS 的工作条件(见表 1), 进行多种元素的同时测定.

Table 1 ICP-MS operating conditions

RF power/W	1 200	Flow rate of auxiliary gas/(L · min ⁻¹)	1.0
Diameter of sampler/mm	1.0	Resolving power/AMU	0.7
Flow rate of plasma gas/(L · min ⁻¹)	16.0	Integration time/ms	300
Flow rate of carrier gas/(L · min ⁻¹)	0.98	Sample uptake rate/(mL · min ⁻¹)	1.0
S/C temperature/°C	2.0	No. of replicates	3
∣Diameter of skimmer/mm	0.4	Vacuum pressure/Pa	2.23 × 10 ⁻⁵

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 (1) 西洋参原料预处理: 将西洋参样品用玛瑙研钵研磨后过 60 目筛, 于(103 ± 2) °C 烘至恒备用. (2) 水提取物的制备: 称取 1.50 g 西洋参样品, 放入烧瓶中, 加入 80 mL 超纯水(18.2 MΩ), 置于 100 °C 水浴中回流提取 1 h, 冷却至室温, 以 6 000 r/min 速度离心 10 min, 除去沉淀, 将上清液在 55 °C 和 0.095 MPa 真空条件下浓缩至干, 备用. (3) 乙醇提取物的制备: 称取约 1.50 g 样品, 用 80 mL 乙醇于 90 °C 水浴中回流提取 1 h, 后处理同前. (4) 氯仿提取物的制备: 称取 1.50 g 样品, 用 80 mL 氯仿于 70 °C 水浴中回流提取 1 h, 后处理同前. (5) 水提取液的过滤: 处理方法同步骤 (2), 只增加一步上清液过 0.45 μm 微孔滤膜处理过程.

1.2.2 样品的消解 参照文献[7]方法, 取西洋参样品及上述提取物置于 PTFE 消解罐中, 加入 5 mL 浓硝酸, 于室温下预消解过夜, 在微波消解系统中消解; 消解条件及过程: 满功率(800 W), 0.5 MPa, 1 min; 1.0 MPa, 1 min; 1.5 MPa, 3 min; 自然冷却后取出, 加入 2 mL 体积分数为 30% 的双氧水, 于 1 MPa 微波溶样 3 min, 冷却后取出, 移入 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度; 标准参照物和空白样品采用同样方式消解, 每种样品和试剂空白一式 3 份.

1.2.3 标准溶液的制备和元素定量测定 取元素混合标样储备液, 用超纯水分别配制成 1, 4, 16, 32, 50, 100 和 200 ng/mL 的系列标准溶液. 用 ICP-MS 进行多元素同时测定, 先测定系列标准溶液, 并绘制标准工作曲线. 然后依次测定按 1.2.2 节方法消解标准参照物、西洋参样品和西洋参提取物.

1.2.4 HPLC-ICP-MS 接口方法 HPLC 的流出液经聚四氟乙烯管直接导入到 ICP-MS 的同心微流雾化器, 经雾化后送入等离子体, 采用 Time resolved analysis 模式, 单点积分, 对整个过程每隔 0.1 s 采集 1 个强度数据, 达到在线测定的目的.

1.2.5 RP-HPLC-ICP-MS 元素形态分析色谱条件 在前文^[6]工作的基础上, 经优化实验确定以下色谱条件. (1) 磷元素形态分析: Sinochrom C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 0.1 mol/L 硝酸溶液为流动相, 流速 0.4 mL/min, DAD 检测器, 室温, 进样量 20 μL. (2) 其它多元素形态分析的条件基本同 (1), 流动相为硝酸-水溶液; 采用梯度洗脱, 洗脱程序为以超水洗脱 0 ~ 15 min, 以 0.1 mol/L 硝酸溶液洗脱 15 ~ 50 min.

2 结果与讨论

2.1 ICP-MS 测定元素含量的方法学评价

为考察本方法的准确度, 在选定的工作条件下, 分析了国家一级标准物质灌木枝叶组合样 GBW07603 和茶叶 GB07605. 结果表明, 用两种不同的参考物在与样品相同的条件下进行 6 次测定, 其中元素 Mg, Ca, Zn, P, Sr, Al 和 Pb 的测定值与标准值相差很小, 偏差在 5% 以内; 元素 Cr, Mn, Fe, Co, Ni 和 Cu 的测定偏差也都在 10% 以内, 而微量元素 V, As, Se, Mo 和 Cd 测定值与标准值偏差相对较大(约 20%), 表明利用本文选定的 ICP-MS 工作条件对 18 种元素进行定量测定, 其测定结果准确可信.

2.2 西洋参中多种元素溶出率比较

分别对西洋参水提取物、水提取过滤液、乙醇提取物和氯仿提取物进行消解并测定元素含量, 同

时做试样空白, 计算结果取其平均值($n=3$), 结果见表 2.

Table 2 Transfer characteristics of elements via different solvents

Element	Sample content/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Water extraction $w(\%)$	Water extraction filtrated by 0.45 μm film($\%$)	Ethanol extraction $w(\%)$	Chloroform extraction $w(\%)$
Mg	1 900 \pm 100	51.16	43.81	0.83	0.22
Al	176 \pm 12	3.01	1.61	1.40	1.34
P	2 231 \pm 180	85.51	57.55	2.98	0.71
Ca	1 587 \pm 120	20.07	18.39	4.03	0.58
V	0.19 \pm 0.02	—	—	—	16.88
Cr	0.54 \pm 0.04	71.75	21.07	19.92	15.85
Mn	38 \pm 2	33.05	30.82	0.57	1.16
Fe	239 \pm 11	6.01	3.06	2.31	5.78
Co	—	—	—	—	—
Ni	0.73 \pm 0.05	79.35	53.64	41.48	29.86
Cu	2.5 \pm 0.2	69.45	48.66	26.61	12.45
Zn	17 \pm 0.5	63.82	47.45	36.57	5.63
As	0.12 \pm 0.02	85.99	72.27	32.21	17.94
Se	—	—	—	—	—
Sr	14 \pm 0.3	16.87	13.41	0.06	0.06
Mo	0.13 \pm 0.02	83.89	64.50	—	—
Cd	—	—	—	—	—
Pb	0.52 \pm 0.06	35.63	24.00	9.40	4.63

以水提取物中无机元素含量作为溶解度指标, 未溶出的无机元素含量作悬浮态指标, 考察了各元素的异同. 由表 2 可见, 在被测定的 18 种无机元素中, 西洋参中 Mg, Ca 和 P 总量特别高, 均超过了 1 000 $\mu\text{g}/\text{g}$, 并且 Mg 溶解态与悬浮态百分比基本相当, 这可能与 Mg 主要以可溶解的硝酸盐和硫酸盐存在于植物中有关; Ca 含量很高, 但其溶解态百分比不高, 这可能是因为 Ca 主要以硫酸盐和磷酸盐的形式存在, 而钙的硫酸盐在水中难溶, 磷酸盐不溶于水^[8]; P 在西洋参中的含量最高, 并且溶解态含量高达 85.51%; 西洋参中 Al, Mn, Fe, Cu, Zn 和 Sr 的含量在 2.478 ~ 239.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 范围内, Cu 和 Zn 溶解态百分比均超过 60%, Mn 溶解态百分比为 33.05%, 其余 3 种元素 Al, Fe 和 Sr 的溶解态百分比均小于 20%; 有毒元素 Pb 和 As 的溶解态百分比分别为 35.63% 和 85.99%, 以上两种元素主要是以离子态形式引起人体中毒, 如果游离态离子和其它有机大分子化合物结合, 则其毒性会降低, 甚至于完全没有毒性.

由以上两种元素的溶出率可知, Pb 和 As 溶解态的比例还较高, 但铅和砷总含量并不高. 而有毒元素 Cd 无论是在西洋参样品中还是在提取液中均未检出; 除上述分析的 12 种元素外, 元素 V 在水提取物和乙醇提取物中均未被检出, 而在氯仿提取物中则被检出, 说明 V 可能与极性较小的化合物结合; 元素 Cr, Ni 和 Mo 溶解态百分比均超过 70%; 未检出 Se 和 Co 等元素. 由表 2 对比分析可知, 伴随着提取溶剂极性的增大(从弱极性的氯仿到强极性的水), 元素提取率增大, 无机元素提取率与提取溶剂极性基本呈正比例关系, 特别表现在 Mg, Ca, P, Mn, Sr, Mo 和 Pb 元素上.

2.3 西洋参水提取液中磷元素形态分析

表 2 数据表明, P 元素是西洋参中含量最高的元素, 并且在西洋参水提取液中, 元素 P 的溶出率也最高. 对西洋参水提取液中 P 元素的形态进行了分析, 结果表明, 在以 0.1 mol/L 的稀硝酸为流动相, 流速为 0.4 mL/min 和进样量为 20 μL 的条件下, 西洋参水提取液中 P 元素的形态可得到较好地分离. 图 1 为西洋参水提取液中 P 元素形态分析的 ICP-MS 图谱. 由图 1 可见, P 元素以 6 种不同的形态存在于西洋参水提取液中, 图 1 中的峰 1 为无机态离子, 峰 2 ~ 6 则分别为不同形式的结合态离子. 据文献[9]报道, 在 HPLC-ICP-MS 法分析元素形态的过程中, 流动相最适流速为 0.1 ~ 1.0 mL/min, 本研究通过筛选发现, 流速为 0.4 mL/min 即能满足 HPLC 对 P 元素的形态分离, 也不会导致流动相在 ICP-MS 的雾化室中积累, HPLC-ICP-MS 也能保持准确测定. 实验中用不同浓度的硝酸为洗脱溶剂, 发现 0.1 mol/L HNO_3 可将有机态的 P 从 C_{18} 柱上洗脱下来, 且分离出 5 种有机态, 采用浓度更低的 HNO_3 溶

液作流动相,对有机态 P 的洗脱效果不很理想.考虑到 C_{18} 柱对酸的承受能力有限,不宜采用更高浓度的 HNO_3 作流动相.

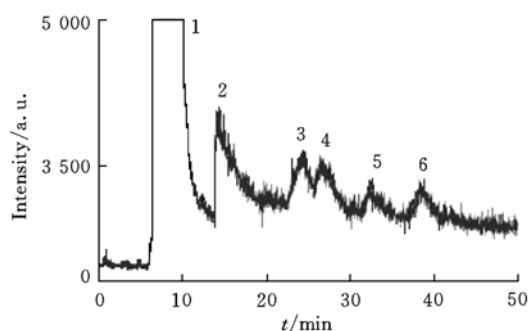


Fig. 1 ICP-MS chromatogram of speciation analysis of P for *Panax quinquefolium*. L

Peak 1: Inorganic ion of speciation; peaks 2—6: ion combined speciation.

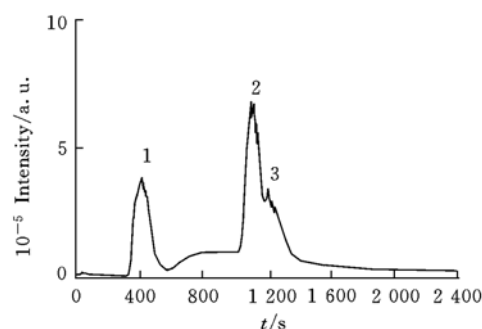


Fig. 2 Total ion chromatogram of speciation analysis for *Panax quinquefolium*. L

Peak 1: Inorganic speciation; peaks 2,3: organic speciation.

2.4 西洋参水提取液中多种元素形态同步分析

实验对西洋参水提取液中的多种元素 Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Ni, Cu 和 Sr 的形态进行了在线同步分析,在选定的色谱条件下,以 ICP-MS 同步检测多种元素 Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Ni, Cu 和 Sr. 图 2 为西洋参水提取液中多元素形态分析的 ICP-MS 总离子图谱,经标准无机元素离子混合液确认,图 2 中峰 1 为无机态元素峰,而峰 2 和峰 3 则为有机态元素峰. 实验采用梯度洗脱,以水为流动相可以将无机态的元素洗出,以 0.1 mol/L 的稀硝酸为流动相可以将有机态的元素洗脱,各元素形态分析的 ICP-MS 图谱见图 3.

由图 3 的 Ca 元素形态分析 ICP-MS 图谱可知, Ca 主要是以无机态和有机态(图 2 中峰 2)的形式存在,且有机态远远高于无机态; Mg 主要是以无机态和有机态(图 2 中峰 2)的形式存在,且有机态高于无机态; Al 主要是以有机态(图 2 中峰 3)的形式存在,无机态和有机态的含量极低; Mn 主要是以有机态的形式存在,无机态含量明显较有机态低;而 Cu 主要是以有机态(图 2 中峰 3)的形式存在,有机态(图 2 中峰 2)的含量极低,未检出无机态 Cu; Ni 元素形态分析的 ICP-MS 图谱与 Zn 元素在峰形上相似,而 Fe 元素形态与 Al 元素在峰形上极为相似,保留时间也一致,故可初步推断 Ni 和 Zn, Al 和 Fe 与西洋参水提取液中化学性质相同的化合物结合; Sr 主要是以有机态(图 2 中峰 2)和无机态的形式存在,且无机态 Sr 明显低于有机态 Sr 的含量.

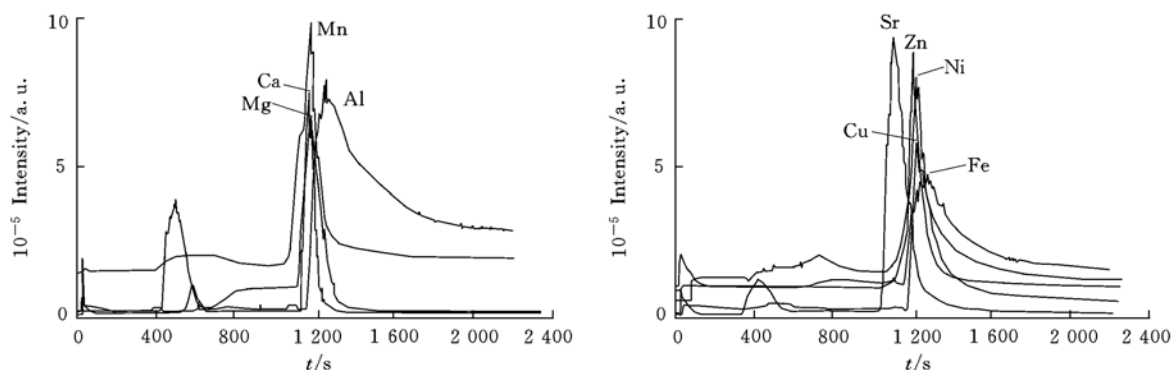


Fig. 3 ICP-MS chromatogram of speciation analysis for Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Ni, Cu and Sr

本文所得各元素的形态分析结果与文献[10]分析茶叶提取液所得结果相似,说明本文方法适于植物水提取液中的元素形态分析. 实验还考察了进样量对分析结果的影响,发现进样量为 20 μ L 时分析结果较好,如果进样量过大,会造成离子强度过大,ICP-MS 会中断扫描检测;如果进样量太小,某些离子强度低于 ICP-MS 检测限,无法检出. 还考察了方法的重现性,结果表明,5 次测定的各峰保留时间和峰高结果相对标准偏差均在 4% 以内,表明方法的重现性较好.

目前, HPLC-ICP-MS 已广泛应用于各种元素的形态研究, 但多数报道都是有关对单一元素的形态分析, 关于多元素形态同步分析的报道相对较少^[11, 12]. 本文旨在探讨药用植物中多种元素形态同步分析的 RP-HPLC-ICP-MS 方法, 从而提高元素形态分析的效率. 本实验以西洋参水提取液为研究对象, 对其含量较高的 9 种元素形态(Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Zn, Ni, Cu 和 Sr)进行了同步分析, 成功地实现了元素有机态和无机态的分离, 为多元素形态同步分析和鉴定奠定了基础.

参 考 文 献

- [1] Hirschfeld T. . Anal. Chem. [J], 1980, **52**: 297—305
- [2] Nski R. L. , Szpunar J. . Anal. Chim. Acta[J], 1999, **400**: 321—332
- [3] Szpunar J. . Analyst[J], 2000, **125**: 963—988
- [4] Yang C. L. , Zhuang Z. X. , Wang X. R. *et al.* . Spectrochim. Acta B[J], 1998, **53**: 1427—1435
- [5] Wang X. R. , Zhuang Z. X. , Yang P. Y. . Microchem. J. [J], 1995, **5**(1/2): 88—98
- [6] LI Lei(李 磊), XIE Ming-Yong(谢明勇), SUN Zhen-Hua(孙振华) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2000, **21**(5): 707—709
- [7] CHEN Jun-Hui(陈军辉), XIE Ming-Yong(谢明勇), WANG Feng-Mei(王凤美) *et al.* . J. Instrumental Analysis(分析测试学报) [J], 2006, **25**(2): 20—24
- [8] XIE Ming-Yong(谢明勇), WEN Hui-Liang(温辉梁), Von Bohlen A. *et al.* . J. Tea Sci. (茶叶科学)[J], 2000, **20**(1): 51—54
- [9] Sutton K. L. , Caruso J. A. . J. Chromatogr. A[J], 1999, **856**: 243—258
- [10] Cairns W. R. L. , Hill S. J. , Les Ebdon. Microchem. J. [J], 1996, **54**: 88—110
- [11] Mart3n3nez-Bravo Y. , Roig-Navarro A. F. , Lopez F. J. *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 2001, **926**: 265—274
- [12] Guerin T. , Astruc M. , Batel A. *et al.* . Talanta[J], 1997, **44**: 2201—2208

Element Transference Characteristics and Element Speciation Analysis in *Panax quinquefolium*. L by RP-HPLC-ICP-MS

CHEN Jun-Hui^{1,2}, XIE Ming-Yong^{1*}, WANG Feng-Mei³, WANG Xiao-Ru^{3,4}, Frank S. C. LEE⁴

(1. Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Key Laboratory of Modern Analytical Science of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

4. Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines,
First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China)

Abstract Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and high performance liquid chromatography coupled with ICP-MS (HPLC-ICP-MS) were applied to the study of the chemical speciation of inorganic elements in *Panax quinquefolium*. L. Chloroform, water and ethyl alcohol were employed to extract *Panax quinquefolium*. L, and the extracts were then determined by ICP-MS in order to analyze the transference characteristics of the elements. The RP-HPLC-ICP-MS technique was applied for the analysis of element speciation. The results showed that the polarity of the extraction solvent affects significantly the elemental transference ratio. The transference characteristics of kinds of elements including Mg, Ca, P, Mn, Sr, Mo and Pb were in linearity proportion with the polarity of extraction solvent. The inorganic and organic species of the elements were well separated by HPLC-ICP-MS under the following conditions: C₁₈ bonded silica gel column, 0.10 mol/L nitric acid and super pure water as the mobile phase, flow rate of 0.4 mL/min and injection volume of 20 μ L.

Keywords *Panax quinquefolium*. L; Transference characteristics of element; Element speciation analysis; RP-HPLC-ICP-MS

(Ed. : K, G)