

生物样品及中药中汞、砷的测定^{*}

王宁生 汤毅珊 潘华新 王培训

(广州中医药大学临床药理研究所 广州 510405)

摘要 建立了一种梯度升压微波消解样品, 氢化物发生原子荧光光度法测定生物样品及中药中的汞、砷的方法。在优化实验条件下, 生物样品中 Hg 回收率为 97.3% ~ 99.1%, As 回收率为 99.4% ~ 105.7%; 含朱砂、雄黄中药, Hg、As 平均回收率分别为 (104.1 ± 5.3)%、(94.6 ± 1.8)%。该法具有操作简便、快速、准确、灵敏、重复性好等优点。

关键词 原子荧光分光光度法, 氢化物发生, 微波消解, 汞, 砷, 生物样品, 中药

对含矿物药的中药制剂中重金属和砷化物的安全性评价研究, 正成为毒理学、中药药理学、生物无机化学的研究热点^[1]。生物样品及中药中汞、砷的含量检测成为研究的重要内容之一。

目前, Hg、As 的测定方法包括原子吸收法、原子荧光法、等离子-原子发射光谱法等。其中原子荧光是 80 年代以来我国发展较快的一种新的痕量分析技术^[2, 3]。近年兴起的微波消解, 在样品前处理中以快速、分解完全、元素无挥发损失、酸耗量少等优点, 日益受到实验室工作者的青睐^[4]。

本文报道用梯度升压微波消解样品, 氢化物发生-原子荧光光度法测定生物样品及中药中 Hg、As 的方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

AFS-2201 型双道原子荧光光度计 (北京海光仪器公司); MK-1 型光纤压力自控微波溶样系统 (上海新科微波技术应用研究所)。

Hg 标准溶液 (1 000 mg/L), As 标准溶液 (1 000 mg/L, 国家标准溶液), Hg 标准储备液 (0.5 mg/L, 介质为 $\varphi=5\%$ 硝酸, 含 0.5 g/L $K_2Cr_2O_7$), As 标准储备液 (1 mg/L, 4 mol/L HCl 介质), 混合还原剂 (称取 5 g 硫脲溶于少量水中, 另称取 5 g 抗坏血酸溶于少量水中, 将两试剂混合加水定容至 100 mL, 混匀, 使用前配制), 20 g/L KBH_3 和 1 g/L KBH_3 (介质为 $w=0.5\%$ 的 KOH 水溶液)。HNO₃、HCl 为一级试剂, HClO₄、H₂SO₄、H₂O₂ 为分析纯试剂。

1.2 生物样品

给予 Beagle 犬 (10 kg) 安宫牛黄胶囊人服剂量的等效剂量; 单侧颈动脉插管取血。药后 48 h, 取肝脏。以犬全血和肝脏作为生物样品。

1.3 含汞、砷中药

牛黄解毒片 (广东佛山市制药二厂, 971136N28); 天王补心丸 (广东华天宝药厂, 971005); 安宫牛黄胶囊 (中国牛黄技术开发公司北京市八达岭制药厂, S-9607-0202); 水飞朱砂 (广州市药材公司购得); 水飞雄黄 (广东佛山市制药二厂购得)。中成药先去糖衣或胶囊, 再研成粉末。

1.4 样品消化

1.4.1 消化剂 HNO₃-HClO₄ (4:1); HNO₃-H₂SO₄ (3:1); HNO₃-H₂O₂ (3:2); HNO₃-HClO₄-H₂SO₄ (4:1:0.5); HNO₃; HNO₃-HCl (3:1), 以上括号内均为体积比。

1.4.2 生物样品的消化 吸取 2 mL 血样 (或准确称取肝脏 0.3 g) 于聚四氟乙烯溶样杯中, 加入消化剂 6 mL (肝脏用 3~4 mL), 室温下放置一段时间后进行微波消化, 0.5 mPa、1.0 mPa、1.5 mPa 压力下各加热 2 min。

* 国家攀登计划资助项目

收稿日期: 1998-12-09; 王宁生, 男, 52 岁, 研究员

取出放冷, 开启消解罐。对含 Hg 样品, 于沸水浴中加热消解液赶走 NO₂, 加 1 滴 50 g/L KMnO₄, 红色应 0.5 min 内不褪去, 以确保消化完全和 NO₂ 已排尽。用 5% (φ) HNO₃ (含 0.5 g/L K₂C₂O₇, 保护 Hg²⁺ 不还原成单质汞而被玻皿吸附) 定容至 10 mL, 待测定。对含 As 样品, 将消解液于电热板上加热赶走 HNO₃, 用 4 mol/L HCl 定容至 10 mL, 待测定。

1.4.3 含 Hg、As 中药的消化 精密称取含 Hg 药粉约 0.1 g 于溶样杯中, 加入消化剂 2 mL 浓 HNO₃, 1 mL 浓 HCl。90 ℃ 水浴中加热约 10 min, 放冷后进行微波消解。0.5 mPa、1.0 mPa 压力下各加热 2 min。取出放冷, 开启消解罐, 于沸水浴中加热排尽 NO₂。加 1 滴 50 g/L KMnO₄, 红色应 0.5 min 内不褪去。用 5% (φ) HNO₃ (含 0.5 g/L K₂C₂O₇) 定容至 25 mL, 再稀释一定倍数, 待测定。对含 As 中药, 消化剂用 2 mL 浓 HNO₃, 0.5 mL HClO₄。消解液于电热板上加热至高氯酸大量冒白烟, 以赶走 HNO₃。用 4 mol/L HCl 定容至 25 mL, 再稀释一定倍数, 待测定。

1.5 测定条件

测 Hg: 灯电流 15 mA, 负高压 300 V, 原子化器高度 8 mm, 原子化温度(冷原子法) ≈ 200 ℃, Ar 气流量, 载气 0.5 L/min, 屏蔽气 1 L/min。测 As: 灯电流 60 mA, 负高压 360 V, 原子化温度 900~1 000 ℃, 其余条件同 Hg。

1.6 标准曲线绘制

1.6.1 Hg 标准曲线绘制 吸取 Hg 标准储备液(0.5 mg/L) 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mL, 用 5% (φ) HNO₃ (含 0.5 g/L K₂C₂O₇) 定容至 50 mL, 进行测定。工作系列应用现用现配。标准曲线方程和相关系数为: $I_f = -1.179 + 1.278 \times C$, $r = 0.9999$ (I_f 为原子荧光强度, C 的单位为 μg/L)。

1.6.2 As 标准曲线绘制 吸取 As 标准储备液(1 mg/L) 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 分别加入 4 mol/L HCl 35.0, 34.75, 34.5, 34.0, 33.0, 30.0 mL, 加入混合还原剂 5 mL, 用水定容至 50 mL。室温下放置 30 min 后进行测定。标准曲线方程和相关系数为: $I_f = 0.0657 + 19.533 \times C$, $r = 0.9999$ (I_f 为原子荧光强度, C 的单位为 μg/L)。

1.7 样品测定

吸取 Hg、As 生物样品待测液 8.0 mL, 加液、定容; 吸取 Hg、As 中药样品待测液 1.0 mL, 加液、定容。按 Hg、As 测定条件进行测定。

1.8 回收试验

在生物样品、受试中药中加入适量的 Hg、As 标准液, 按前述方法进行消化和含量测定, 计算加样回收率。

2 结果与讨论

2.1 消化剂的选择

比较几种消化剂对生物样品中 Hg、As 含量测定的影响, 结果详见表 1、表 2。实验结果表明, 仅用 HNO₃ 消化全血和肝脏, Hg 回收率为 (74.9 ± 3.4)%, (89.7 ± 4.5)%。回收率偏低, 说明 HNO₃ 不易使有机样品消解完全, 宜与其它酸组成混合消化剂, 以增强其氧化性。H₂SO₄ 有强氧化性和脱水性, HNO₃-H₂SO₄ (体积比 3:1) 尤其适用于消解生物样品, Hg 回收率为 (99.1 ± 0.3)% (全血), (97.3 ± 6.0)% (肝脏)。由于 HClO₄ 直接与有机物接触易发生爆炸, H₂O₂ 极易分解, 故 HNO₃-HClO₄、HNO₃-H₂O₂ 的使用不如 HNO₃-H₂SO₄ 方便, 需用 HNO₃ 将样品预分解, 再加入 HClO₄、H₂O₂。

HCl 虽不属于氧化剂, 但在高压和较高温下, 可使许多难溶化合物生成可溶性盐。实验表明使用 HNO₃-HCl (体积比 2:1) 能在较短时间内使含朱砂(HgS)的中药溶解完全。选用 HNO₃-HClO₄ (体积比 4:1) 消化含雄黄中药, HClO₄ 的作用一是加强氧化作用, 二是利用 HClO₄ 沸点(130 ℃)略高于 HNO₃(120 ℃), 在消化后可赶走 HNO₃, 以排除 HNO₃ 对测定 As 的干扰。

表 1 消化剂对生物样品中 Hg 含量测定的影响
Table 1 Influence of digestive agents on the determination of Hg in biological samples

Sample	Digestive agent	Original content ^a $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Added ^b $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Detected ^c $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery R / %	$\bar{x} \pm s$ %	RSD s _r / %
Blood (全血)	HNO ₃	0.018 8	0.05	0.055 4	73.2	74.9 ± 3.4	4.47
		0.014 1	0.05	0.050 4	72.6		
		0.014 5	0.05	0.053 9	78.8		
	HNO ₃ -H ₂ SO ₄ (3: 1)	0.017 7	0.05	0.067 4	99.4		
		0.012 5	0.05	0.062 0	99.0		
		0.013 4	0.05	0.062 8	98.8		
Liver (肝脏)	HNO ₃	0.219	0.5	0.661	88.4	89.7 ± 4.5	5.07
		0.146	0.5	0.576	86.0		
		0.299	0.5	0.773	94.8		
	HNO ₃ -H ₂ SO ₄ (3: 1)	0.115	0.5	0.630	103.0		
		0.108	0.5	0.563	91.0		
		0.095	0.5	0.584	97.8		
	HNO ₃ -HCl (3: 1)	0.331	0.5	0.902	114.2		
		0.250	0.5	0.889	127.8		
		0.246	0.5	0.722	95.2		

* 肝脏样品单位为 10⁻⁶ (Unit is 10⁻⁶ for liver sample)

表 2 消化剂对生物样品中 As 含量测定的影响
Table 2 Influence of digestive agents on the determination of As in biological samples

Sample	Digestive agent	Original content ^a $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Added ^b $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Detected ^c $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery R / %	$\bar{x} \pm s$ %	RSD s _r / %
Blood (全血)	HNO ₃ -HClO ₄ (4: 1)	0.046 9	0.1	0.151	104.1	105.7 ± 7.14	6.75
		0.040 5	0.1	0.140	99.5		
		0.087 5	0.1	0.201	113.3		
	HNO ₃ -HClO ₄ -H ₂ SO ₄ (4: 1: 0.5)	0.063 5	0.1	0.169	105.5		
		0.058 5	0.1	0.143	84.5		
		0.059 2	0.1	0.162	102.8		
Liver (肝脏)	HNO ₃ -H ₂ SO ₄ (3: 1)	0.062 9	0.5	0.517	90.8	89.6 ± 1.8	2.04
		0.039 5	0.5	0.492	90.5		
		0.086 6	0.5	0.524	87.5		
	HNO ₃ -H ₂ O ₂ (3: 2)	0.055 9	0.5	0.572	103.2		
		0.097 7	0.5	0.609	102.3		
		0.0	0.5	0.464	92.8		

* 肝脏样品单位为 10⁻⁶ (Unit is 10⁻⁶ for liver sample)

2.2 微波消解条件的确定

以往消化样品多采用常压湿法消化。我们曾用此法消化中药,测得 Hg 回收率为 (92.5 ± 26.9)%,回收率偏低且不稳定,是由于 Hg、As 易挥发损失所致^[5]。微波消解能在较短时间内使样品消解完全,且密闭的高压消解罐能有效防止元素的挥发损失和减少酸耗量。

以样品完全溶解,消解液无色澄清(或略带黄色)为消解完全,考察消解压力、时间对消解效果的影响,发现在低压下,有机物难以消解完全,消解液为稍浊黄色液体;而高压下长时间加热,难免引起酸气泄漏。故采用梯度升压方式,目的是先在低压下消解易氧化的有机物,高压下再消解难分解的有机物。实验证明生物样品在 0.5 mPa、1.0 mPa、1.5 mPa 压力下各加热 2 min;中药样品在 0.5 mPa、1.0 mPa 各加热 2 min,可获得满意的消化效果。

对于加酸后反应剧烈的样品要敞开放置一段时间或进行必要的预反应,再进行微波消化。

2.3 中药中 Hg、As 含量及回收率测定

测定结果见表 3。

表 3 含朱砂、雄黄中药中的 Hg、As 含量及回收率

Table 3 Results of analysis and recovery test of Hg or As in some Chinese patent medicines containing cinnabar or realgar

	Sample	Element detected		RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$
		Name	Content		
			$w/10^{-3}$		
Sample containing cinnabar (含朱砂中药)	Tianwang Buxin Wan(天王补心丸)	Hg	8.915±0.394	4.42	104.1±5.3
	Angong Niu Huang capsule(安宫牛黄胶囊)	Hg	75.54±2.33	3.08	
	Cinnabar(水飞朱砂)	Hg	789.8±15.08	1.91	
Sample containing realgar (含雄黄中药)	Niu Huang Jie Du tablet(牛黄解毒片)	As	66.71±1.74	2.61	94.6±1.8
	Angong Niu Huang capsule(安宫牛黄胶囊)	As	66.13±2.26	3.41	
	Realgar(水飞雄黄)	As	600.1±21.14	3.52	

2.4 原子荧光测定条件的选择

测定 As 时, HCl 介质酸度在 2~ 5 mol/L 范围内对测定影响不大; 测定 Hg 对酸度的要求较宽松, 本实验中采用 5% (v/v) HNO₃。

还原剂的含量, 直接影响测定结果的准确性。一般文献中所建议的测定 Hg 的还原剂含量偏高。由于 Hg²⁺ 的氧化还原电极电位较一般干扰元素高, 故在浓度较低的还原剂作用下也能被还原成单质汞。实验表明, 测定 Hg 时采用较低含量 (0.1~ 1 g/L) 的 KHB₄ 作还原剂, 可以获得更高的灵敏度和稳定性, 而且有效消除了各种干扰。根据我们的反复实验, 采用 1 g/L KHB₄ 能获得令人满意的结果。测定 As 要求较高的 KHB₄ 含量以还原生成氢化物 (AsH₃), 一般文献为 7~ 20 g/L。降低 KHB₄ 浓度对消除干扰影响作用不大, 但对灵敏度却有较大影响。本实验中采用的 KHB₄ 含量为 20 g/L, 可获得令人满意的结果。

参 考 文 献

- 1 刘清, 王子健, 汤鸿霄. 重金属形态与生物毒性及生物有效性关系的研究进展. 环境科学, 1996, 17(1): 89
- 2 牛建军, 汪炳武. 痕量汞分析的现状和展望. 分析化学, 1991, 19(12): 1448
- 3 刘演兵, 韩恒斌. 砷形态分析方法研究进展. 环境科学进展, 1994, 2(4): 1
- 4 陈莉月, 徐文强. 密闭微波溶样方法的进展. 分析仪器, 1997(4): 12
- 5 Van Delft W, Vos G. Comparison of digestion procedures for the determination of mercury in soils by cold vapour atomic absorption spectrometry. Anal Chim Acta, 1988, 209(1-2): 147

Determination of Hg, As in Biological Samples and Chinese Patent Medicine by Hydride Generation- Atomic Spectrophotofluorimetry with Microwave Digestion

Wang Ningsheng, Tang Yishan, Pan Huaxin, Wang Peixin

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

Abstract A method for the determination of mercury and arsenic in biological samples and Chinese patent medicines by hydride generation- atomic spectrophotofluorimetry with pressure gradient microwave digestion has been established. Recoveries of Hg and As have been proved to be 97.3% ~ 99.1% and 99.4% ~ 105.7% in biological samples, and (104.1±5.3)% and (94.6±1.8)% in Chinese patent medicines respectively by the recovery tests of standard addition to the samples under optimum conditions. The method has the advantages of simple operation, high precision, good repeatability and low interference and is suitable for the determination of Hg, As in biological samples and Chinese patent medicines.

Keywords Atomic spectrophotofluorimetry, Hydride, Microwave digestion, Mercury, Arsenic, Biological sample, Chinese patent medicine