

原子吸收法测定椒目中不同化学形态的锌含量

涂剑波¹, 王四旺^{1*}, 谢艳华¹, 李丁川², 高双斌¹, 王剑波¹

1. 第四军医大学药理学系药物研究所, 陕西 西安 710032

2. 解放军 305 医院, 北京 100017

摘要 结合椒目的市场前景与药效, 采用原子吸收分光光度法, 分析了不同产地椒目中的锌含量及其形态。使用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜、 CHCl_3 将椒目水煎液中的锌分为悬浮态和可溶态、有机态和无机态, 建立了锌的四种形态分离分析方法; 探讨了正辛醇-水分配体系模拟水煎液中锌在人体胃肠中的分配情况; 并采用原子吸收分光光度法测定了椒目中的锌在不同溶剂中的化学形态和溶出特性。结果表明, 椒目中的锌以水可煎出态为主, 不同产地椒目锌含量不同, 但水可煎出态总锌百分率、有机态总锌百分率基本接近。该方法回收率在 $97.5\% \sim 104.0\%$ 范围内, 相对标准偏差均小于 2.36% 。应用于实际, 结果表明其灵敏度高, 重现性好。

关键词 原子吸收光谱; 形态分析; 锌; 椒目

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)11-2357-04

引言

椒目为芸香科(*Rutaceae*)花椒属植物花椒(*Zanthoxylum bungeanum Maxim.*)的干燥成熟种子, 我国大部分地区均有分布。该药味苦、辛, 性寒, 有小毒, 具有利水、平喘之功, 主治水肿胀满、痰饮喘逆等症^[1]。因花椒仅在陕西的种植面积已高达 $60\ 000\ \text{m}^2$, 椒目年产约 $120\ 000\ \text{t}$ ^[2], 为进一步提高种植花椒的效益, 人们迫切为椒目寻找利用价值高的途径。已知椒目中含有多种微量元素, 锌含量尤为丰富。锌是人体中许多酶的组成成分, 参与了机体内核酸与蛋白质的合成。锌的吸收利用率、药理作用与锌存在的形态密切相关^[3]。本文对锌的形态进行了层次分析, 并采用正辛醇/水分配体系^[4], 模拟椒目水煎液中的锌在人体胃肠中的分配情况, 检测研究了椒目水煎液中锌的含量、分布、化学形态以及它们在不同溶剂中的溶出特性。

1 实验材料与仪器

1.1 主要仪器及试剂

180-80 ZEEMAN 原子吸收分光光度计(日本日立公司), 锌空心阴极灯(北京有色金属研究总院)。仪器工作条件为: 波长 $213.8\ \text{nm}$; 灯电流 $10.0\ \text{mA}$; 光谱带宽 $1.3\ \text{nm}$; 空气流量 $1.60\ \text{kg} \cdot \text{cm}^2$; 乙炔流量 $0.22\ \text{kg} \cdot \text{cm}^2$ 。

锌标准溶液: 用高纯金属按常规方法配成 $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 贮备液, 临用前用此液逐级稀释成锌的标准系列溶液。

浓硝酸、高氯酸均为市购, 分析纯。

器皿处理: 所有玻璃和塑料器械, 使用前均须经 $1:1\ \text{HNO}_3$ 和 $1:1\ \text{HCl}$ 交替浸泡 $72\ \text{h}$, 用去离子水冲洗干净后, 烘干置塑料袋中密封待用。所有操作步骤均不得与不锈钢器械直接接触!

1.2 实验材料

椒目药材自陕西省医药公司采购, 经陕西省药品检验所鉴定为正品: 符合《山东省中药材标准》1995年版第181页椒目项下有关规定。原药剔除杂物, 以超纯水清洗2次, 放入烘箱内于 $60\ ^\circ\text{C}$ 下烘干。取椒目置于玻璃碾钵内, 用陶瓷碾槌碾碎过 20 目筛备用。

2 实验方法

2.1 原生药中总锌的测定(T_{Zn})

精确称取椒目粉末 $0.200\ 0\ \text{g}$ 于 $25\ \text{mL}$ 烧杯中, 加入 $10\ \text{mL}$ 硝酸-高氯酸混合液($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4=4:1$), 盖上表面皿, 置电热板上消化至溶液呈无色透明为止。小火加热蒸至近干, 停止加热, 取下冷却, 转移入 $50\ \text{mL}$ 容量瓶, 用超纯水定容、摇匀, 按仪器工作条件测定锌含量。并在相同的实验条件下制作空白试验进行校准。

收稿日期: 2006-08-08, 修订日期: 2006-11-16

基金项目: 陕西省中医药管理局项目(2005079)资助

作者简介: 涂剑波, 1978年生, 第四军医大学药理学系硕士研究生

* 通讯联系人 e-mail: wangsiw@fmmu.edu.cn

2.2 水可煎出态总锌(D_{zn})和水不可煎出态总锌(UD_{zn})的测定

制备时沿袭传统中药煎法,与中医临床用药接近^[5]。精确称取椒目粉末 50.000 0 g 于烧杯中,煎煮 3 次,每次加水 500 mL,加热至沸腾后保持微沸 1 h,合并 3 次水煮液,过滤,得水煎液 A,将 A 液浓缩至 200 mL。移取 A 液 1.0 mL 于烧杯中,按照 2.1 节的方法消化、测定其中的锌含量,即可得出水可煎出态总锌含量 D_{zn} 。用原生药中锌的总含量 T_{zn} 减去水可浸出态总锌含量即可得出水不可煎出态总锌含量 ($UD_{zn} = T_{zn} - D_{zn}$)。其水可煎出态总锌的百分率为 $P_d = D_{zn} / T_{zn} \times 100\%$,水不可煎出态总锌百分率 $P_{ud} = UD_{zn} / T_{zn} \times 100\%$ 。

2.3 可溶态总锌(SO_{zn})和不可溶态总锌(SU_{zn})的测定

将 A 液混匀,通过 0.45 μm 微孔滤膜(用 1 mol \cdot L⁻¹ HNO₃ 浸泡)抽滤,得滤液 B。用原子吸收法直接测定其中的锌含量,即可得可溶态总锌的含量 SO_{zn} ,差减法求不可溶态总锌含量 SU_{zn} ($SU_{zn} = D_{zn} - SO_{zn}$)。可溶态的百分率计算公式为 $P_{so} = SO_{zn} / T_{zn} \times 100\%$,不可溶态的百分率计算公式为 $P_{su} = SU_{zn} / T_{zn} \times 100\%$ 。

2.4 有机态总锌(O_{zn})和无机态总锌(I_{zn})的测定

用移液管吸取滤液 B 10.0 mL,于 60 mL 分液漏斗中,加 20 mL CHCl₃ 振荡 5 min,静置分层后弃去有机相,再于水相中加入 20 mL CHCl₃,步骤同前。重复 3 次。收集水相后,用 AAS 法直接测定其中的锌含量即可得出无机态总锌含量 I_{zn} ^[5]。用差减法求有机态总锌含量 ($O_{zn} = SO_{zn} - I_{zn}$)。有机态的百分率计算公式为 $P_o = O_{zn} / T_{zn} \times 100\%$,无机态的百分率计算公式为 $P_i = I_{zn} / T_{zn} \times 100\%$ 。

2.5 正辛醇-水分配体系模拟实验

取水煎液两组,每组 5 mL,用盐酸和氢氧化钠调溶液 pH 值,一组调为胃液的酸度(pH 1.3),另一组调为小肠液的酸度(pH 7.6),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,移入分液漏斗中,每份均加入正辛醇 5 mL 振荡萃取 2 h,萃取 2 次,合并 2 次萃取

的水相和有机相。水相按 2.1 所述方法消解,定容至 10 mL, AAS 法测得水煎液中水溶态锌($W_{g_{zn}}$, $W_{i_{zn}}$)的含量,用差减法求得醇溶态锌($A_{g_{zn}}$, $A_{i_{zn}}$)的浓度。

3 结果与分析

3.1 样品预处理和消化体系的确立

将样品用陶瓷碾钵碾碎,以避免粉碎过程中的污染。我们研究了 HNO₃-HClO₄, HNO₃-H₂O₂ 和 HNO₃-HClO₄-H₂O₂ 三种消化体系,通过实验设计、比较,得出 HNO₃-HClO₄ 为最优方案,故本方法采用 HNO₃-HClO₄ 作为消化液。

3.2 工作曲线和线性范围

量取浓度 1 mg \cdot mL⁻¹ 锌标准储备液,用 1% HCl 稀释配制 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 锌操作液。移取锌操作液 1.00, 2.00, 3.00, 5.00 mL,分别稀释到 100 mL,制得浓度为 0, 0.20, 0.40, 0.60, 1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的锌标准溶液,按仪器的工作条件进行 AAS 测定,绘制标准曲线。锌在 0~1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系,结果见表 1。

Table 1 Standard curve parameter

Concentration	0.0	0.2	0.4	0.6	1.0
Absorbance	0.0	0.031 2	0.059 8	0.088 3	0.146 3
	$y=0.145\ 6x+1.070\ 3\ r=0.999\ 8$				

3.3 检出限及特征浓度

对空白溶液连续测定 10 次,以 3 倍标准差计算锌的检出限为 0.3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 锌标准浓度为 1.00 mg \cdot L⁻¹ 时,锌的特征浓度为 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (1% 吸收)。

3.4 精密度

对不同浓度锌含量的样品进行消化,分别测定 7 次,计算精密度。结果见表 2。

Table 2 Results of precision ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Samples	Results				\bar{x}	RSD/%
1	0.332	0.316	0.325	0.311	0.318	2.36
2	0.735	0.722	0.701	0.740	0.715	2.29
3	0.935	0.937	0.911	0.902	0.926	1.36

3.5 共存离子的干扰试验

稀释试验是检验样品共存离子有无干扰的最简单方法之一,如果稀释前后测定结果相同,表明共存离子对被测元素无干扰;如果稀释前后测定结果不一,表明共存离子对被测元素呈正负干扰。我们对同一混合样品进行了不同稀释度试验,结果表明,当样品稀释 20 倍时,结果基本一致,表明样品中共存离子对本法测定锌无干扰。

3.6 样品回收率实验

于原生药样品中加入不同量的标准锌,按 1.1 节方法消化后进行 AAS 测定,计算回收率,结果见表 3,样品加标回

收率为 97.5%~104.0%,准确度高。

Table 3 Results of recovery test (\bar{x} , $n=3$)

Original concentration of samples / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Added / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Found / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery / %
0.326	0.200	0.521	97.5
0.326	0.400	0.713	96.8
0.326	0.600	0.948	104.0

3.7 实际样品测定

(1)应用本法测定了不同产地椒目中不同化学形态的锌

含量, 并由此计算不同产地不同形态锌的分布, 结果见表 4 和表 5。

从表 4 和表 5 可以看出, 椒目各产地不同, 其总锌含量差别较大。但是各产地椒目水可煎出总锌百分率基本接近,

其溶出率在 63%~66% 之间, 其中以不可溶态为主, 约占总锌含量的 38%~41%。其总量呈 $T_{zn} > D_{zn} > UD_{zn} > SU_{zn} > SO_{zn} > O_{zn} > I_{zn}$ 的趋势。

Table 4 Analytical results of the chemical speciation of zinc in the bunge pricklyash seed with different habitat

Habitats	Results/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)						
	T_{zn}	D_{zn}	UD_{zn}	SO_{zn}	SU_{zn}	I_{zn}	O_{zn}
Shannxi	273.63	172.39	101.22	64.81	107.62	20.13	44.71
Shandong	69.21	45.54	23.66	17.44	28.10	5.81	11.64
Sichuan	195.84	123.22	72.62	49.63	73.59	17.17	32.46

Table 5 Distribution of zinc with chemical speciation and different habitat

Habitats	Results/%						
	P_d	P_{ud}	P_{so}	P_{su}	P_i	P_o	
Shannxi	63.01	36.99	23.68	39.33	7.35	16.34	
Shandong	65.80	34.19	25.20	40.60	8.38	16.82	
Sichuan	62.92	37.08	25.34	37.58	8.76	16.57	

水可煎出态总锌包括锌的各种离子态、可溶于水而不溶于有机溶剂的含锌氨基酸盐、糖类化合物、蛋白质及各种亲水性胶体, 并不单指无机化合物; 可溶态总锌包括锌与纤维素、鞣酸、胶体、蛋白质等物质形成的化学结合疏松的其他类物质的盐类、锌与有机大分子形成的可溶性化合物和锌的水溶性离子; 有机态总锌为水可煎出态总锌中可溶于有机溶剂而不溶于水的锌的有机化合物的总量。各总锌的具体化学形态需要更高层次的形态分析技术在分子水平上进一步确定。

(2) 水煎液中醇溶态、水溶态含量及其分布。

Table 6 Contents of zinc in octanol-water system at different acidities(\bar{x} , $n=6$, $RSD \leq 2.36$)

Gastric acidity(pH 1.3)			Intestinal acidity(pH 7.6)		
Wg_{zn}	Ag_{zn}	K_{ow1}	Wi_{zn}	Ai_{zn}	K_{ow2}
68.9	103.5	1.50	33.9	138.5	4.09

正辛醇醇溶性微量元素具有较强的亲脂性和生物活性, 如微量元素作为主要有效成分, 正辛醇醇溶性微量元素含量与药性、药效存在密切关系。由表 6 可以看出: (1) 锌的醇溶态含量随 pH 值上升而增大, 表明在小肠环境中锌的生物活性有所提高。(2) 从 K_{ow} 值的变化来看, pH 值对锌的 K_{ow} 值的影响较明显, 说明 Zn 的生物活性与 pH 值相关; 随着溶液

的 pH 值的降低, 椒目水煎液中的锌的水溶态含量增加而醇溶态含量减少, 为今后进一步开发生物利用度高的补锌药物提供了一定的理论依据。

4 讨论

椒目中锌的含量非常丰富。锌是人体中许多酶的组成成分, 参与机体内核酸与蛋白质的合成。锌的吸收利用率、药理作用与锌存在的形态密切相关, 在不同生理环境下, 它具有不同的亲脂性和生理活性, 从而表现出不同的药效^[6-8]。因此, 测定椒目中锌的含量及相对比值、研究其溶出特性及相关形态对于阐明椒目的生理作用机制具有理论意义。正辛醇是一种结构上与人体内碳水化合物和脂肪类相似的长链烷醇, 药物研究中人们常以正辛醇/水萃取体系来测定 K_{ow} 参数($K_{ow} = C_o/C_w$, C_o , C_w 分别为该化合物在正辛醇相和水相中的平衡浓度^[4, 9-12]), 该参数是表征化合物生物活性的一个重要参数, 直接反应药物的疏水性。本文结合对锌形态分析的层次模式, 并采用正辛醇/水分配体系, 模拟椒目水煎液中的锌在人体胃肠中的分配情况, 检测研究椒目水煎液中锌的含量、分布及其在不同溶剂中的溶出特性和化学形态, 对于指导中药中的微量元素形态分析以及椒目的临床应用具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] LI Shi-zhen(李时珍). Compendium of Materia Medica(本草纲目). Beijing: People's Medical Publishing House(北京: 人民卫生出版社), 1992. 1855.
- [2] DENG Zhen-yi, FAN Hong-zhang(邓振义, 樊鸿章). Shaanxi Journal of Agricultural Sciences(陕西农业科学), 2006, (2): 22.
- [3] SUN Rui-xia, SU Yong-xiang, SUN Jian-hui(孙瑞霞, 苏永祥, 孙剑辉). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 720.

- [4] DENG Nan-sheng, WU Feng(邓南圣, 吴 峰). Course of Environmental Chemistry(环境化学教程). Wuhan: Wuhan University Press (武汉: 武汉大学出版社), 2005. 6.
- [5] SUN Zhen-hua, WU Xi-hong, SUN Da-hai(孙振华, 吴熙红, 孙大海). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 2001, 20(2): 1.
- [6] ZHU Zhi-guo, HUA Rui-nian, LUO Wei-guo(朱志国, 华瑞年, 罗卫国). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(3): 384.
- [7] Yüksel Ozdemir, Seref Gücer. Food Chemistry, 1998, 61(3): 313.
- [8] XIE Su-jing, XIE Shu-lian, XIE Bao-mei(谢苏婧, 谢树莲, 谢宝妹). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 615.
- [9] SHAWKET Abliz, WANG Ji-de, HU Xi-dan(肖开提·阿布力孜, 王吉德, 胡西旦). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2082.
- [10] WU Yi-wei, ZHANG Han, HU Bin(吴一微, 张 菡, 胡 斌). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2003, 19(3): 201.
- [11] LI Lei, XIE Ming-yong, WU Xi-hong(李 磊, 谢明勇, 吴熙鸿). Food Science(食品科学), 2000, 21(2): 53.
- [12] GUO Chun-mei, WU Rong-lan, FENG Shun(郭春梅, 武荣兰, 封 顺). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 2005, 24(6): 42.

Speciation Analysis of Zinc in Bunge Pricklyash Seed by AAS

TU Jian-bo¹, WANG Si-wang^{1*}, XIE Yan-hua¹, LI Ding-chuan², GAO Shuang-bin¹, WANG Jian-bo¹

1. Institute of Materia Medica of Pharmacy Department in Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

2. The 305th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100017, China

Abstract A method was developed for the investigation of the contents and the speciation of zinc in bunge pricklyash seed (BPS) in different habitats by atomic absorption spectrum (AAS). By using 0.45 μm filter membrane and chloroform, four different species of the decoction of BPS, named the suspended, the soluble, the inorganic and organic species, were obtained, and the segregation analysis methods for those species were developed. The octanol-water system was proposed to simulate the distribution of decocted zinc in the stomach and the intestine of the human body. The results showed that the decocted zinc was the main content of the total zinc, and the contents of zinc were different in different habitats, but the percentages of decocted zinc and the organism zinc were similar. The recovery for the method was 97.5%-104.0% and the relative standard deviation was less than 2.36%. The results showed that the sensitivity and reproducibility of this method were excellent.

Keywords Atomic absorption spectrum; Speciation analysis; Zinc; Bunge pricklyash seed

(Received Aug. 8, 2006; accepted Nov. 16, 2006)

* Corresponding author