

马兰重金属元素 ICP-MS 及主成分聚类分析

王国凯, 郑娟, 郁阳, 刘劲松, 王诤, 蔡百祥, 王刚*

安徽中医药大学药学院现代中药安徽省重点实验室, 合肥 230012

摘要: 采用微波消解-ICP-MS 法测定不同产地马兰重金属元素的含量, 并运用主成分分析法和聚类分析法对含量进行分析和评价。主成分分析提取 2 个因子, 对 15 批次马兰进行综合评价, 其综合评价函数为 $F = 0.586F_1 + 0.414F_2$, 结果亳州药材市场、亳州 2 以及宣城市马兰样品综合得分排名前三。聚类分析说明含量存在产地相似性。结果说明 ICP-MS 法快速、灵敏、准确, 可作为马兰中重金属元素含量分析方法, 并为马兰的质量控制与安全评价提供参考依据。

关键词: 马兰; 重金属元素; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.017

Determination and Evaluation of Heavy Metal Elements in *Kalimeris indica* by ICP-MS Coupled with Principal Component Analysis and Cluster Analysis

WANG Guo-kai, ZHENG Juan, YU Yang, LIU Jin-song, WANG Zheng, CAI Bai-xiang, WANG Gang*

School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Key Laboratory for modern Chinese Materia Medica, Hefei 230012, China

Abstract: A microwave digestion coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method was established for the determination of heavy metal elements in *Kalimeris indica* from different habitats. The results were analyzed by principal component analysis and cluster analysis. Two principal factors were extracted and used to comprehensively evaluate heavy metal elements from 15 batches of *K. indica*. The comprehensive function was $F = 0.586F_1 + 0.414F_2$, which resulted in the top three samples coming from Bozhou Chinese medicine market, Bozhou 2 and Xuancheng, respectively. The cluster analysis results showed that the contents of heavy metals were similar by habitats. The study indicated that ICP-MS was a quick, accurate, sensitive method to determine the contents of heavy metal elements in *K. indica*.

Key words: *Kalimeris indica*; heavy metal elements; principal component analysis; cluster analysis

马兰为菊科马兰属植物马兰 [*Kalimeris indica* (L.) Sch-Bip] 的全草, 全国分布广泛^[1]。具有清热利湿, 解毒消肿, 凉血止血之功效。电感耦合等离子体光谱法具有精密度好、灵敏度高、检出限低、抗干扰能力强、线性范围广等优点, 已广泛应用于医药等多个分析领域^[2]。本课题组前期对马兰进行了一系列相关研究^[3-5], 本研究采用微波消解-ICP-MS 法测定不同产地马兰重金属元素的含量, 并运用主成分分析法^[6]和聚类分析法^[7]对含量进行分析和评价。结果说明 ICP-MS 法快速、灵敏、准确, 可作为马兰中重金属元素含量分析方法, 并为马兰的质量控制

与安全评价提供参考依据。

1 材料与仪器

马兰具体产地见表 1, 经笔者鉴定为菊科植物马兰 *Kalimeris indica* (L.) Sch-Bip 的干燥全草。凭证标本保存于安徽中医药大学天然药化研究室。

iCAP-Q 电感耦合等离子体质谱仪 (Thermo Fisher 公司); CP300 数控聚四氟乙烯电热板 (北京欣凯隆生物科技有限公司); MDS-8G 微波消解仪 (上海新仪微波化学科技有限公司); CP225D 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q gradient 超纯水一体机 (美国 Millipore 公司)。

铜 (Cu)、砷 (As)、铅 (Pb)、镉 (Cd) 单元素标准溶液 (国家标准物质研究中心, 质量浓度均为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 mL); iCAP Q 调谐液 (Thermo fisher 公司); 优级纯硝酸 (上海国药集团化学试剂有限公

收稿日期: 2015-07-22 接受日期: 2015-10-25

基金项目: 国家自然科学基金 (81303220); 安徽省自然科学基金 (11040606M220); 安徽省科技专项 (13Z04013); 康缘中医药科技创新基 (KYCX 201003)

* 通讯作者 Tel: 86-551-68129167; E-mail: kunhong_8@163.com

司,生产批号:20130713)、优级纯过氧化氢(上海国药集团化学试剂有限公司,生产批号:201301120);

高纯氩气、氦气(纯度 > 99.999%);实验用水均由超纯水机制备(电阻率大于 18.2 MΩ)。

表 1 马兰不同来源材料

Table 1 Sample information of *K. indica* from different resources

编号 No.	采集地点 Collection site	编号 No.	采集地点 Collection site
S1	亳州市场 1 (201311) Bozhou1	S9	庐江 1 (201408) Lujiang1
S2	亳州 2 (201310) Bozhou2	S10	合肥 3 (201409) Hefei3
S3	亳州 3 (201311) Bozhou3	S11	池州 (201407) Chizhou
S4	亳州 4 (201311) Bozhou4	S12	庐江 2 (201408) Lujiang2
S5	合肥 1 (201309) Hefei1	S13	芜湖 (201406) Wuhu
S6	合肥 2 (201309) Hefei2	S14	宣城 (201311) Xuancheng
S7	安庆 1 (201408) Anqing1	S15	蚌埠 2 (201311) Bengbu2
S8	蚌埠 1 (201311) Bengbu1		

2 实验方法

2.1 样品处理

取样品适量于 60 °C 下干燥 12 h,按四分法取样后,粉碎,过 70 目筛,保存于干燥器内,备用。精密称取样品,置于聚四氟乙烯消化管中,加入 10 mL 硝酸和 2 mL 过氧化氢,通过优化最佳微波消解条件进行消解。消解完全后为澄清液体,消解液在电热板上赶酸后冷却至室温,1% 硝酸稀释定容至 50 mL 容量瓶,同时按上述方法做空白试剂。

2.2 ICP-MS 工作参数

ICP-MS 工作参数条件:射频功率 RF1550 W,等离子体气流量 14.0 L/min,辅助氩气流量 0.8 L/min,雾化器流量 1.07 L/min,透镜电压 16.8 V,扫描方式跳峰,分析模式全定量,重复采集数据次数 3 次,驻留时间 20 ms,每个质量频通道数 3。

2.3 数据分析

参考文献^[7],采用 SPSS19.0 软件进行各重金

属元素间相关性分析,运用 Spearman 等级相关系数法统计。

3 实验结果

3.1 标准曲线

吸取适量 Cu、As、Cd、Pb 混合标准储备液,用 1% HNO₃ 溶液逐级稀释为 0、0.5、1、5、10、50 μg/L 系列浓度,吸取适量 Hg 标准溶液单独配制,用 1% HNO₃ 溶液逐级稀释为 0、0.2、0.5、1、2、5 μg/L 系列浓度,配制成合适范围的标准曲线。在优化的实验条件下,采集空白和标准溶液系列,绘制各元素标准曲线。根据测定检出限的方法,在优化的仪器条件下,空白溶液重复测定 10 次,3 倍标准偏差 (3σ) 对应的元素浓度即为检出限,结果说明 Cu、As、Cd、Pb 分别在 0 ~ 50 μg/L、Hg 在 0 ~ 5 μg/L 范围内呈良好线性关系。

表 2 标准曲线、相关系数及检出限

Table 2 Standard curve, correlation coefficient and detection limits

元素 Tested element	内标元素 Internal standard	标准曲线 Standard curve	相关系数(r) Correlation coefficient	检出限 Detection limit (μg/L)
⁶³ Cu	72Ge	y = 27758.149x + 14968.041	0.9984	0.060
⁷⁵ As	72Ge	y = 3684.519x + 255.003	1.0000	0.032
¹¹⁴ Cd	115In	y = 15556.369x + 432.009	1.0000	0.012
²⁰² Hg	209Bi	y = 41155.599x + 6200.559	0.9946	0.017
²⁰⁸ Pb	209Bi	y = 194715.134x + 153791.521	1.0000	0.044

3.2 精密度试验

重金属元素含量,精密度结果见表3。

取上述对照品溶液,平行取6份,经测定计算各

表3 精密度实验结果
Table 3 The results of precision

元素 Tested element	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
⁶³ Cu	11.798	10.959	11.456	11.465	11.332	10.557	3.89
⁷⁵ As	10.255	9.473	9.960	9.885	9.713	9.220	3.77
¹¹⁴ Cd	11.010	10.143	10.878	10.835	10.403	10.093	3.78
²⁰² Hg	0.011	0.010	0.012	0.010	0.011	0.010	4.29
²⁰⁸ Pb	13.843	12.784	13.675	13.458	13.058	12.676	3.63

3.3 重复性试验

法消解处理得供试品溶液,经测定计算各元素含量,

随机抽取某一样品粉末,平行称取6份,上述方 重复性结果见表4。

表4 重复性实验结果
Table 4 The results of repeatability

元素 Tested element	1	2	3	4	5	RSD (%)
⁶³ Cu	23.314	20.588	22.335	22.366	21.676	4.56
⁷⁵ As	0.932	0.904	0.925	0.917	0.906	1.31
¹¹⁴ Cd	1.109	1.018	1.057	1.065	1.013	3.72
²⁰² Hg	0.011	0.0105	0.010	0.011	0.010	4.76
²⁰⁸ Pb	6.113	5.596	6.165	5.641	6.115	4.75

3.4 加样回收率试验

10 μg/L)加入空白消解液中,按上述方法消解处理、稀释,对样品中的各元素进行加标回收,计算回收率。结果表明,所建立的分析方法回收率较好。

采用标准加入法进行回收率试验,分别取标准品溶液(Cu、As、Cd、Hg、Pb终浓度分别10、10、10、1、

表5 加样回收率实验结果
Table 5 The recovery of standard addition

元素 Tested element	均值 Mean (μg/L)	加入量 Added amount (μg/L)	测定值 Detected amount (μg/L)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
⁶³ Cu	15.346	10.0	25.663	103.17	0.02
⁷⁵ As	0.816	10.0	10.223	94.17	1.14
¹¹⁴ Cd	0.220	10.0	9.811	95.91	1.53
²⁰² Hg	0.050	0.4	0.396	86.50	3.96
²⁰⁸ Pb	7.952	10.0	17.759	98.07	4.87

3.5 元素含量测定结果

分别称取不同批次的样品,按样品处理方法分别处理,测定15批药材的重金属元素含量,结果见表6。

3.6 元素主成分分析与综合评价

表7相关数据表明马兰中As和Cu、Cd以及Pd

表现出一定的负相关趋势,其中和Cd呈明显负相关($P < 0.05$),反映出As和Cd具有一定程度的相互拮抗抑制的作用。其余元素间大多呈现正相关趋势,但均未达到显著性水平。运用SPSS19.0软件进行主成分分析得到两个主要成分,统计结果见表8。

表 6 重金属元素含量测定结果

Table 6 Contents of tested elements in *K. indica*

编号 No.	重金属元素含量 Contents of tested elements (mg/kg)				
	⁶³ Cu	⁷⁵ As	¹¹⁴ Cd	²⁰² Hg	²⁰⁸ Pb
S1	40.61	1.08	0.42	0.12	4.45
S2	25.93	1.05	1.64	0.093	6.26
S3	14.26	2.3	0.13	0.076	6.68
S4	18.54	0.86	1.25	0.063	7.66
S5	30.71	1.42	0.27	0.061	8.26
S6	28.45	1.21	0.52	0.061	7.5
S7	21.12	1.29	1.62	0.062	5.28
S8	21.26	0.68	1.08	0.075	6.49
S9	17.28	2.53	0.16	0.051	4.25
S10	13.62	1.32	0.26	0.068	5.37
S11	21.88	1.56	0.26	0.043	3.19
S12	14.10	2.76	0.19	0.038	4.58
S13	20.28	0.78	0.14	0.027	4.65
S14	30.45	0.55	2.25	0.023	2.94
S15	22.72	0.92	1.02	0.011	6.76

表 7 元素相关性分析结果

Table 7 The results of correlation analysis

元素 Tested element	Cu	As	Cd	Hg	Pd
Cu	1.000				
As	-0.414	1.000			
Cd	0.500	-0.636 *	1.000		
Hg	0.014	0.055	0.104	1.000	
Pd	0.050	-0.096	0.121	0.250	1.000

*:在置信度(双测)为 0.05 时,相关性是显著的。

*:when confidence was 0.05, the correlation analysis is significant difference.

表 8 旋转前后的特征值及方差贡献率

Table 8 Total variance explained

主成份 Component	初始特征值 Initial characteristic value			旋转平方和载入后 After rotating sum of squares loading		
	特征值 Total	方差贡献率 Contribution to variance (%)	累积贡献率 Cumulative (%)	特征值 Total	方差贡献率 Contribution to variance (%)	累积贡献率 Cumulative (%)
1	1.938	38.762	38.762	1.905	38.092	38.092
2	1.310	26.202	64.964	1.344	26.873	64.964
3	0.932	18.643	83.607			
4	0.528	10.560	94.167			
5	0.292	5.833	100.000			

结果可知,在所提取的主成分 1 和 2 中,特征值都大于 1,方差累积贡献率达到 64.96%。为了确定马兰样品中重金属元素各自所占的比例,由旋转前后因子载荷矩阵可知,在第一成分中占比例较大的

两个元素是 Cu 和 Cd,在第二成分中占很大比例的是 Hg 和 Pd 两种元素,统计结果见表 9。又通过旋转前后方差累积贡献率可知,第一成分占较大比例,故 Cu 和 Cd 为马兰中特征重金属元素。

表 9 因子载荷矩阵

Table 9 Factor loading matrix

元素 Tested element	初始主成分因子 Initial principal factor scores		旋转后主成分因子 Rotating principal factor scores	
	1	2	1	2
Cu	0.749	0.235	0.674	0.402
As	-0.871	0.170	-0.887	-0.036
Cd	0.738	-0.409	0.813	-0.227
Hg	0.243	0.822	0.047	0.855
Pd	0.120	0.620	-0.027	0.063

将上述旋转后主成分因子得分和方差贡献率乘积之和相加,得出各产地马兰样品中重金属总因子得分 F,其综合评价函数为 $F = 0.586F_1 + 0.414F_2$,通过此函数公式算出不同产地马兰的综合得分 F

以及排名,见表 10。由数据可知,亳州市药材市场、亳州 2 以及宣城这三批次马兰样品综合得分排名前三,故综合来看这三批次马兰样品重金属含量相比其它要高。

表 10 成分因子以及综合评价

Table 10 Principal factor scores and comprehensive ranking

编号 No.	主成分因子 Principal factor score			综合排名 Comprehensive ranking
	F1	F2	F	
S1	1.064	2.050	1.472	1
S2	1.224	0.948	1.110	2
S3	-2.049	0.750	-0.890	13
S4	0.566	0.462	0.523	7
S5	-0.113	1.491	0.551	5
S6	0.203	1.041	0.550	6
S7	0.749	-0.395	0.276	8
S8	0.792	0.553	0.693	4
S9	-1.927	-0.624	-1.388	14
S10	-0.967	-0.022	-0.576	11
S11	-0.566	-1.084	-0.781	12
S12	-2.312	-0.996	-1.767	15
S13	-0.074	-1.068	-0.485	10
S14	2.741	-2.121	0.728	3
S15	0.668	-0.985	-0.016	9

3.7 不同产地马兰重金属元素聚类分析

为了更形象直观的反应不同产地马兰重金属含

量的相关性和差异性,采用 SPSS19.0 将上述主成分分析的结果进行变量聚类分析,结果见图 1。可将 5

个元素分为 4 类: Cu / Hg、Pd、Cd 以及 As, 将这 4 类元素作为特征的变量, 再进行聚类分析, 见图 1。

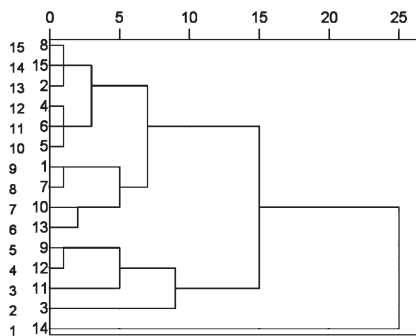


图 1 15 批药材的聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram of 15 batches of *K. indica* samples

由树状图知, 在阈值 5 处, 可将上述产地分为 6 类: S8/S15/S4, S2/S7/S14, S5/S6, S1/S13, S9/S12/S3/S10, S11。

4 结论

通过微波消解-ICP-MS 法测定不同产地马兰中重金属元素的含量, 并运用主成分分析法和聚类分析法对重金属元素含量进行分析和评价。结果亳州药材市场、亳州 2 以及宣城市这三批次马兰样品综合得分排名前三。聚类分析说明马兰重金属含量存在产地相似性。本研究为马兰的质量控制与安全评价提供参考依据。

参考文献

- 1 Chinese Herbal Editorial Board, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. Chinese Herbal (国家中医药管理局中华本草编委会). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006, 7: 886-889.
- 2 Yu NJ (俞年军), Yu Jiao (于娇), Zhang W (张伟), et al. Determination of trace elements in different parts of Boju and root soil by ICP-MS. *Chin Med Mat* (中药材), 2014, 37: 2136-2139.
- 3 Ji P (季鹏), Wang GK (王国凯), Liu JS (刘劲松), et al. Five phenols from *Kalimeris indica*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 212-214.
- 4 Wang GK (王国凯), Liu JS (刘劲松), Zhang CE (张聪侗), et al. Studies on chemical constituents of *Kalimeris indica*. *Chin Med Mat* (中药材), 2015, 38: 82-85.
- 5 Zhong WW (钟文武), Liu JS (刘劲松), Zhang CE (张聪侗), et al. Studies on chemical constituents of *Kalimeris indica* II. *Guihaia* (广西植物), 2012, 32: 261-263.
- 6 Song HX (宋华湘), Chen B (陈波), Cai QY (蔡青云), et al. The principal composition cluster analysis for catechins and alkaloids in tea. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15: 415-418.
- 7 Wang Y (王砚), Wang SL (王书林). HPLC fingerprinting and cluster analysis of *Bupleurum* plants. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 704-708.

(上接第 2030 页)

- 8 Hao WH (郝文慧), Zhao WW (赵文文), Chen XP (陈修平). Research progress on the anti-cancer effect and mechanisms of the natural tanshinones. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2014, 30: 1041-1044.
- 9 Zhang Y, Jiang P, Ye M, et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 13621-13666.
- 10 Li GB, Shan CY, Liu L, et al. Tanshinone IIA inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/

p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117440.

- 11 Zhang Y, Wei RX, Zhu XB, et al. Tanshinone IIA induces apoptosis and inhibits the proliferation, migration, and invasion of the osteosarcoma MG-63 cell line *in vitro*. *Anticancer Drugs*, 2012, 23: 212-219.
- 12 Qin JK (覃江克). Studies on the separations of tanshinones and their chemical transformations. Guangzhou: Sun Yat-sen University (中山大学), PhD. 2005.