

① 37-40

膜纯化-分光光度法测定侧柏叶总黄酮含量[†]薛伟明 张效林[✓] 亢茂德

(西北大学化学工程学系,西安,710069)

R289.1

0657.3

摘要 将膜分离技术与植物有效成分分析方法结合,提出以二醋酸纤维素膜(CAMFM)膜纯化-分光光度法取代蒸干转溶法测定侧柏叶提取液中侧柏叶总黄酮含量。与蒸干转溶法相比,CAMFM膜纯化-分光光度法具有除杂效率高、分析过程无相变、有效成分理化性质稳定、分析操作简便、分析结果重复性好、准确度较高的特点。

关键词 膜;纯化;分光光度法;侧柏叶总黄酮

分类号 TQ028.468;R931.71

文献标识码 A

测定,膜分离

论文编号 1000-274X(1999)01-0037-40

采用乙醇-水溶剂系统提取侧柏叶总黄酮时,提取液中除有效成分侧柏叶总黄酮外,还含有大量脂溶性叶绿素和悬浮物微粒等杂质。为了避免杂质对侧柏叶总黄酮测定的干扰,通常采用蒸干转溶法测定提取液中侧柏叶总黄酮含量^[1],将提取液样品置于高温下蒸发溶剂,使样品中的侧柏叶总黄酮、脂溶性叶绿素、悬浮物微粒等物质均以固相析出;再加入一定量的水,此时只有侧柏叶总黄酮从固相转溶到水相;离心除去未转溶的叶绿素及悬浮物微粒,取上清液测定侧柏叶总黄酮含量。因此,蒸干转溶法的目的在于对供试样品除杂纯化。

由于蒸干转溶法存在蒸发、转溶两个必要步骤,因而分析操作繁琐、分析周期长。而且,在高温下蒸发,会影响侧柏叶总黄酮的理化稳定性,使分析结果不能准确反映提取液中侧柏叶总黄酮含量。在转溶操作中,由于固体杂质对侧柏叶总黄酮的吸附及包络作用,使侧柏叶总黄酮转溶不完全,造成含量测定损失。本文应用膜分离纯化技术,采用自制二醋酸纤维素微滤膜(CAMFM)纯化提取液样品,可替代蒸发转溶环节,一步有效除去脂溶性叶绿素和悬浮物微粒,简化了分析操作,提高了分析效率。膜法纯化分析过程在常温进行,且分析过程无相变,确保了侧柏叶总黄酮理化性质的稳定性,与蒸干转溶法相比,分析结果重复性好,准确度较高。

1 实验

1.1 试验仪器与材料

722型光栅分光光度计;GQ70E型红外快速干燥器;WMZK-01型温度指示控制仪;76-1型恒温玻璃水浴;微孔膜滤器($\Phi=25$ mm,上海医药工业研究所);15 mL玻璃注射器;侧柏叶(自采);芦丁(生化试剂,上海试剂二厂);鞣酸(A.R,江苏无锡县化学试剂厂);二醋酸纤维素(结合酸53.5%~55.5%,国产分装)。所用其他试剂均为分析纯。

1.2 CAMFM的制备及性能测定

称取干燥至恒重的二醋酸纤维素(CA)适量,按一定配比与溶剂丙酮、添加剂甲酰胺配制铸膜液。在一定环境温度、湿度条件下,采用流涎法在光滑平面上刮膜,蒸发一定时间后,转入水槽凝胶,即制得具有一定孔径分布的CAMFM。采用自制膜性能评价装置,在 $\Delta P=0.02$ MPa下测定CAMFM的纯水透过通量 J ,并测定CAMFM对鞣酸的截留率 R_0 ,采用流速法孔径测定模型测定CAMFM孔径^[2]。

1.3 侧柏叶总黄酮提取实验

称取20~40目干燥侧柏叶粉末8.00 g,加入200 mL,45(vol)%乙醇溶液,在搅拌状态下于50℃恒温提取。在提取过程中定时取样,测定样品中侧柏叶总黄酮含量。

[†] 收稿日期:1998-07-16

西北大学科学基金资助项目(KG-97215)

作者简介:薛伟明(1966-),女,博士生

1.4 分析方法

1.4.1 鞣酸含量分析 采用文献[3]方法测定。

1.4.2 叶绿素含量分析 采用文献[4]方法分析。

1.4.3 芦丁标准曲线 采用文献[1]方法测定。将芦丁标准溶液吸光度值 A , 芦丁浓度 $C(\text{mg/mL})$ 的实验数据进行最小二乘拟合, 回归方程为

$$A_{415} = 2.9682 \times 10^{-5} C + 0.0102 \quad r = 0.9996.$$

1.4.4 方法 1(蒸干转溶法) 提取液 1.0 mL—蒸干—加 10.0 mL 蒸馏水转溶—离心—取上清液 2.0 mL—3.0 mL H_2O +0.1 mol·L⁻¹3.0 mL AlCl_3 +1.0 mol·L⁻¹5.0 mL CH_3COOK —显色 40 min—415 nm 处测定吸收度 A —据芦丁标准曲线确定侧柏叶总黄酮含量。

方法 2 提取液经 CAMFM 膜滤, 取膜滤液 1.0 mL, 分析方法同方法 1。

方法 3 提取液经 CAMFM 膜滤, 取提取液 1.0 mL—蒸馏水定容至 10.0 mL—取稀释液 2.0 mL—3.0 mL H_2O +0.1 mol·L⁻¹3.0 mL AlCl_3 +1.0 mol·L⁻¹5.0 mL CH_3COOK —显色 40 min—415 nm 处测定吸收度 A —据芦丁标准曲线确定侧柏叶总黄酮含量。

2 结果与讨论

2.1 CAMFM 膜参数的测定及 CAMFM 的筛选

考察了 3 种配方铸膜液在不同条件下制备的膜的性能。由于侧柏叶乙醇-水提取液中鞣质含量较高, 为 0.4~1.0 mg/mL, 它对侧柏叶总黄酮含量测定具有一定干扰, 因此, 本文以鞣质作为提取液中高分子杂质的代表物, 将膜对鞣质的截留率作为筛选对提取液分析纯化用膜的重要依据。表 1 中膜性能测定结果表明, 在相同制膜条件下, 配方 2 膜对鞣酸的截留率高于其他两个配方, 表明其分离性能良好, 但该配方膜纯水通量很低, 不适于快速纯化样品。配方 1 膜纯水通量虽然大, 但对鞣酸的截留率很低, 其分离纯化性能不能满足膜法分析的要求。配方 3 膜对鞣酸的截留率与纯水通量介于配方 1, 配方 2 之间, 既具备良好的分离性能, 又具有适宜的通量, 适于快速纯化提取液样品。本文筛选既具有适宜通量, 对鞣酸又具有较高截留率的 7[#] 膜作为提取液纯化分离用膜。对侧柏叶提取液膜法纯化前、后结果比较如表 2 所示。

表 1 CAMFM 性能参数与结构参数

Tab. 1 Characteristic and Structural Parameters of CAMFM

铸膜液配方 Wt/% CA: 丙酮: 甲酰胺	配方 1 1: 8: 3			配方 2 1: 8: 5			配方 3 1: 10: 5		
蒸发温度/°C	30			30			30		
凝胶温度/°C	20			20			20		
蒸发时间/s	30	60	120	30	60	120	30	60	120
纯水通量/mL·cm ⁻² ·min ⁻¹	0.676	0.594	0.414	0.330	0.140	0.072	0.435	0.482	0.239
鞣酸截留率, R/%	21.58	40.05	53.62	71.17	86.33	74.82	76.98	61.32	66.83
平均膜孔径/μm	0.022	0.026	0.034	0.030	0.019	0.012	0.020	0.031	0.022
膜号	1	2	3	4	5	6	7	8	9

表 2 侧柏叶提取液 CAMFM 膜法纯化前、后比较

Tab. 2 Comparison of Extracted-liquid of Cacumen Biotae with and without Membrane-based Purification

项目	纯化前	纯化后
提取液外观	黄绿色混浊液体	黄色澄清透明液体
提取液中微粒个数/mL	>1 000	无
叶绿素截留率/%		76.90
鞣酸截留率/%		81.71

表 2 表明, CAMFM 可有效除去提取液中的杂质微粒, 对提取液中干扰侧柏叶总黄酮测定的叶绿素、鞣质也具有适宜的截留率。

2.2 CAMFM 膜法纯化对侧柏叶总黄酮测定的影响

在侧柏叶总黄酮的提取过程中, 定时取样, 分别

采用 1.4.4 中的方法 1~3 测定提取液样品中的侧柏叶总黄酮含量, 结果如图 1 所示。图 1 表明, 方法 2 之测定结果高于方法 1, 而方法 3 之测定结果又高于方法 2。

在提取液样品中, 存在悬浮物微粒、脂溶性叶绿素、鞣酸等干扰侧柏叶总黄酮含量测定的杂质。

当采用方法 1 分析时, 在高温蒸发条件下, 提取液中的侧柏叶总黄酮与杂质一起随溶剂蒸发而呈固态析出。受杂质的吸附和包络作用影响, 在蒸发阶段呈固体析出的侧柏叶总黄酮在转溶操作中不能完全转溶, 使测定值偏低。

此外, 在蒸发阶段, 侧柏叶总黄酮的理化性质稳定性会受到过高蒸发温度的影响, 亦导致测定值偏低。

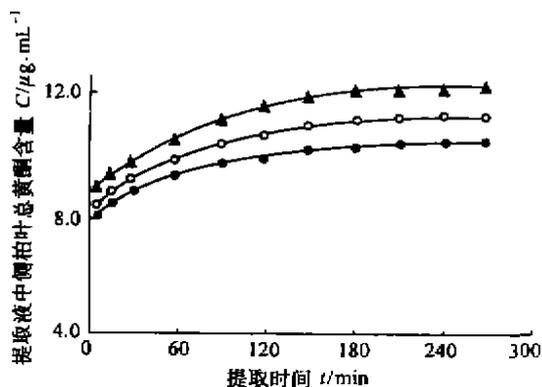


图 1 不同分析方法对侧柏叶总黄酮测定结果的影响
Fig. 1 Influences on Measurement of Cacumen Bioae with Different Analytical Methods

● 蒸干转溶测定 ○ 蒸干转溶测定(经 CAMFM 处理) ▲ CAMFM 膜法测定

由于方法 2 采用 CAMFM 截留了提取液中的悬浮微粒、叶绿素、鞣酸等杂质,消除了杂质对侧柏叶总黄酮转溶能力的影响,因此,与方法 1 相比,方法 2 测定的侧柏叶总黄酮含量较高。但因其未能消除高温蒸发对侧柏叶总黄酮理化性稳定性的影响,故其测定结果低于方法 3。

由于 CAMFM 膜法分析技术具有除杂效率高、分析过程无相变、分析步骤简化的特点,克服了上述两方法的不足,因而方法 3 测定的侧柏叶总黄酮含量最高。显示了膜法分析技术的优越性。

2.3 CAMFM 膜法分析技术与蒸干转溶法测定结果的比较

采用 CAMFM 膜纯化-分光光度法测定侧柏叶总黄酮含量时,可能的测定误差主要来源于 CAMFM 膜面对侧柏叶总黄酮截留,导致测定结果与样品中侧柏叶总黄酮含量之间产生误差;采用蒸干转溶法测定时,可能的测定误差主要在于侧柏叶总黄酮在“蒸发-转溶”过程中发生相变而使其理化性质稳定性及转溶能力受到影响,导致测定结果与样品中侧柏叶总黄酮含量之间产生误差。

本文以侧柏叶总黄酮的对照品芦丁为测定对象,配制一定浓度的芦丁溶液,平行取样。分别采用蒸干转溶法(1.4.4 中方法 1)、CAMFM 膜纯化-分光光度法(1.4.4 中方法 3)测定芦丁样品溶液中的芦丁含量,对两种测定方法进行考察。测定结果如表 3 所示。

表 3 蒸干转溶法与 CAMFM 膜法测定结果的比较
Tab. 3 Comparison of Measurement of Evaporating-redissolving Method and CAMFM Membrane-based Method

样品	芦丁含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$		回收率/%	
	蒸干转溶法	CAMFM 法	蒸干转溶法	CAMFM 法
1	0.455	0.470	95.0	98.0
2	0.471	0.475	98.0	99.0
3	0.478	0.478	99.6	99.6
4	0.467	0.473	97.3	98.6
5	0.463	0.478	99.6	99.6
6	0.478	0.478	96.5	99.6
7	0.467	0.474	97.3	98.9
X	0.468	0.475	97.5	99.1
$\sigma (n=7)$	0.008 6	0.003 1		
平均回收率			97.6	99.0
/%				

注: σ 为有限次平均标准方差

实验表明,通过选择具有适当膜参数的 CAMFM,在侧柏叶总黄酮含量的测定过程中,膜纯化-分光光度法的准确度和精密度均优于蒸干转溶法。

3 结 论

在侧柏叶有效成分提取过程中,本文以 CAMFM 膜纯化-分光光度法取代蒸干转溶法,测定侧柏叶提取液中侧柏叶总黄酮含量。与蒸干转溶法相比,CAMFM 膜纯化-分光光度法具有除杂效率高、分析过程无相变、有效成分理化性质稳定、操作简便、精密度和准确度较高的特点,显示了膜技术在分析过程中应用的优越性。

参 考 文 献

- 程立方,田 樱. 侧柏叶总黄酮含量测定方法研究. 时珍国药研究,1995,6(4):15~17
- 高以炬,叶凌碧. 膜分离技术基础. 北京:科学出版社,1989. 26~32
- 张振宇. 茶叶、啤酒中鞣质含量测定方法研究. 食品科学,1991(11):47~50
- 华东师范大学生物系植物生理教研组编. 植物生理学实验指导. 北京:人民教育出版社,1981. 88~90

(编 辑 时亚丽)

An Applied Study on Measurement of General Flavone of Cacumen Biotae by Spectrophotometric Determination Combined with Membrane-based

XUE Weiming ZHANG Xiaolin KANG Maode

(Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, 710069)

Abstract Combined with technology of membrane separation and analytical method of plant effective components, a new analytical method of spectrophotometric determination combined with membrane-based purification is put forward to determine the content of general flavone in extracted-liquid of Cacumen Biotae instead of traditional evaporating-redissolving method. Compared with evaporating-re-dissolving method, the advantages of membrane-based spectrophotometric determination consist in high efficiency of purification, no phase inverse during analysis, simplified analytical operation, satisfied repetition of analytical results and high precision.

Keywords membrane; purification; spectrophotometric determination; general flavone of Cacumen Biotae

· 学术动态 ·

本刊进入 1997 年度中国高校科技论文 被引频次最高的前 50 名期刊之列

根据科学技术部计划发展司委托项目——中国科技信息研究所《1997 年科技论文统计与分析》年度报告,以及根据对 1997 年 1 214 种中国科技期刊(含本刊)的统计,本刊进入我国高校科技论文被引频次最高的前 50 名期刊之列,位居全国高校第 42 位。具体见下表:

表 1 1997 年度中国高校科技论文被引频次最高的前 50 名高校

名次	高校名称	被引频次	名次	高校名称	被引频次
1	清华大学	1 543	26	同济大学	495
2	北京大学	1 111	27	复旦大学	490
3	北京医科大学	1 106	28	第三军医大学	488
4	南京大学	1 058	29	西北工业大学	465
5	华中理工大学	981	30	同济医科大学	461
6	上海医科大学	801	31	北京师范大学	459
7	武汉大学	752	32	华西医科大学	457
8	西安交通大学	726	33	南京农业大学	451
9	浙江大学	720	34	吉林大学	445
10	中国科技大学	709	35	中国地质大学	443
11	第二军医大学	692	36	兰州大学	435
12	四川联合大学	674	37	浙江农业大学	430
13	哈尔滨工业大学	666	38	华东理工大学	429
14	南开大学	662	39	第一军医大学	410
15	中国农业大学	619	40	北京科技大学	399
16	大连理工大学	611	41	华中农业大学	398
17	天津大学	602	42	西北大学	395
18	上海交通大学	600	43	东北大学	394
19	厦门大学	594	44	白求恩医科大学	379
20	第四军医大学	574	45	山东大学	369
21	上海第二医科大学	569	46	北京航空航天大学	350
22	华南理工大学	560	47	湖南大学	341
23	中山大学	543	48	西北农业大学	337
24	中山医科大学	517	49	杭州大学	336
25	东南大学	495	50	东北师范大学	318

(姚 远)