

超滤法分析黄芪水煎液中胶体态铜的分布

李书兰^a, 顾萱^b, 陈海燕^a, 胡育筑^{a*} (中国药科大学 ^a. 分析化学教研室; ^b. 分析测试中心, 南京 210009)

摘要:目的 建立黄芪水煎液中胶体态铜的分析方法。方法 采用 0.45 μm 微孔滤膜、截留相对分子质量为 14 万、5 万、1 万、0.4 万超滤膜组成的超滤系统, 对黄芪水煎液进行分级处理, 用石墨炉原子吸收法测定超滤液中元素铜。结果 截留相对分子质量 1 万的超滤膜对相对分子质量 4 万的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 具有良好的截留效率 (0.99) 和较小的吸附损失 (4.3%); 元素铜在超滤过程中的回收率介于 93.8% ~ 105.1% 之间, RSD < 12.2%; 黄芪水煎液可溶态中, 元素铜主要与相对分子质量大于 5 万和小于 0.4 万的胶体颗粒结合, 这与黄芪多糖分子质量分布相吻合。结论 本法操作简便、快速, 适用于黄芪水煎液中胶体态铜的分析, 结果令人满意。

关键词: 黄芪; 铜; 超滤; 胶体; 形态分析

中图分类号: R917.799.5

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2006)05-0380-04

The colloidal speciation analysis of copper in aqueous extracts of Radix Astragalus by ultra-filtration

LI Shu-lan^a, GU Xuan^b, CHEN Hai-yan^a, HU Yu-zhu^{a*} (China Pharmaceutical University ^a. Department of Analytical Chemistry; ^b. Center for Instrumental Analysis, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for the colloidal speciation analysis of copper in aqueous extracts of Radix Astragalus. **METHODS** A ultra-filtration system, including a filtration membrane (0.45 μm) and a series of ultra-filtration membranes (140kDa, 50kDa, 10kDa and 4kDa), was established to separate colloidal speciation of copper. The concentration of copper in permeate was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). **RESULTS** The 10kDa ultra-filtration membrane possessed retention coefficient of 0.99 and sorptive loss of 4.3% to polyvinylpyrrolidone. Copper recovery of ultra-filtration system were 93.8% ~ 105.1%, RSD < 12.2%. The colloidal fractions (MW > 50kDa and MW < 4kDa) accounted for most of copper in the filtered (< 0.45 μm) fraction, which was consistent with the molecular mass distribution of Astragalus polysaccharides (APS). **CONCLUSION** This method is simple, rapid and has been applied to the colloidal speciation analysis of copper in aqueous extracts of Radix Astragalus with satisfactory results.

KEY WORDS: Radix Astragalus; copper; ultra-filtration; colloid; speciation analysis

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 干燥根, 是传统的补益药, 具有补气升阳、益胃固表、利水消肿、脱毒生肌等功效。研究发现, 黄芪中含有皂苷、黄酮、多糖、氨基酸以及铜、锌等多种人体所需要的微量元素。铜是许多辅酶重要组成元素之一, 有明显提高血红蛋白的药理功效, 因此在维持人体正常生理功能方面起着重要的作用。

由于多数中药制剂采用水煎的工艺, 故实际服用水煎液中的元素形态比原药材中的元素形态要重要得多。国际理论和应用化学联合会 (IUPAC) 对水体中胶体的定义是指粒径介于 1 ~ 1 000 nm 之间的微粒或高分子^[1]。由此可见, 无论是在海水、淡水, 还是在中药水煎液中均存在大量的胶体

物质。对于中药水煎液来说, 微量元素赋存于颗粒态、胶体态和真溶解态等不同物理形态。而微量元素的生物可利用性、毒性和反应活性都强烈地依赖于它们在各种形态中的分布以及各种形态之间的相互作用^[2]。因此, 研究中药水煎液中微量元素的作用, 不但要考虑含量的高低, 更重要的是研究它们的存在形态。但是目前中药微量元素形态分析报道较多的是水煎液中微量元素溶出率, 如赵丽霞等^[3]和吴巧凤^[4]对黄芪水煎液中包括铜在内的不同微量元素溶出率的研究。而针对中药水煎液中微量元素的胶体形态分布了解甚少, 也极少有研究涉及对中药水煎液中微量元素胶体形态分离系统的建立及考察。

超滤 (ultra-filtration, UF) 是一种以静压差为推动力, 根据相对分子质量的不同进行分离的膜技术, 其特点是: 有效

基金项目: 国际铜协会资助项目 (No. H-AS-03-2)

* 通讯作者: Tel: 025-85391167 E-mail: njhuyuzu@jlonline.com

膜面积大, 滤速快, 不易形成表面浓度极化现象, 无相态变化, 低温操作破坏有效成分的可能性小, 能耗小等^[5]。现已运用于海水金属元素胶体形态分析^[6]。本实验利用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对所建立的超滤系统中超滤膜的截留和吸附性质进行了检验, 考查了该系统在实际样品超滤中铜的回收率, 并通过超滤截留胶体的分子量与黄芪中主要有机成分的相对分子质量及其分布的比较, 初步推测胶体态铜中主要的有机成分, 为进一步探讨其形态打下基础。

1 仪器与试剂

日本岛津 AA-670型原子吸收分光光度计, GFA-4B型石墨炉, 铜的空心阴极灯, 仪器工作条件见表1; UV/9100紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司紫外吸收仪); SCM杯式超滤器(中国科学院上海应用物理研究所膜分离技术研究开发中心); 0.45μm微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂); 截留相对分子质量分别为14万、5万、1万、0.4万的聚醚砜(PES)超滤膜(中国科学院上海应用物理研究所膜分离技术研究开发中心); 黄芪(购于南京市药材公司, 经中药学院杨中林教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao); 聚乙烯吡咯烷酮(K-30); 铜标准储备液(1 mg·mL⁻¹); HNO₃优级纯、HCl和NaOH均为分析纯; 实验用水为去离子水(电导率≤0.8μS·cm⁻¹)。

所有玻璃容器均用1:1 HNO₃浸泡过夜, 再用去离子水冲洗至pH等于7, 烘干备用。

2 实验方法

2.1 样品的制备

用去离子水将黄芪洗净, 置40~60℃烘箱烘干, 粉碎并过40目尼龙筛, 将药材粉末放入加盖烧杯中, 再置40~60℃烘箱干燥至恒重, 移置干燥器中备用。

表1 GFAAS工作条件

Tab 1 Operating conditions for GFAAS

元素	波长 (nm)	分光带宽 (nm)	阶梯干燥 (℃/s)	阶梯灰化 (℃/s)	阶梯原子化 (℃/s)	清洗 (℃/s)	原子化通气方式 (Ar)
Cu	324.7	0.5	100/20	500/25	2300/3	2700/2	停气

3 结果与讨论

3.1 超滤膜的适用性

3.1.1 PVP标准曲线的绘制 取PVP约0.625g精密称定, 置于50mL量瓶中, 加去离子水溶解定容。精密吸取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL, 置25mL量瓶中, 加水定容。在232nm波长处测定吸光度。得回归方程 $A = 0.0173 + 0.3842C$ ($r = 0.9995$)。

3.1.2 超滤膜的截留和吸附性质 超滤膜的截留与吸附性质受超滤物质、超滤介质、超滤系统及超滤膜种类等影响^[7], 超滤膜使用前进行截留系数的检验和吸附损失的考察是非常重要的。由于所用超滤膜制作材料相同, 我们在检验这些超滤膜的适用性时, 只考察了截留相对分子质量1万超滤膜的截留和吸附性质。

超滤膜截留大分子物质的能力以表观截留系数 R_c 表示。中国现代应用药学杂志 2006年10月第23卷第5期

精称药材粉末适量, 加10倍量水浸泡30min(第2次加水量8倍; 第3次加水量5倍), 分别加热煮沸并回流1.5、1.1h离心, 合并上清液, 浓缩至每100mL含1.5g原药材。

2.2 超滤膜适用性实验

将聚乙烯吡咯烷酮(PVP)配成适当浓度的溶液, 分成两份, 一份测定超滤前的紫外吸收; 另一份进行超滤, 具体方法按“2.3”项下, 超滤完成后将超滤杯里截留的溶液充分转移并定容。分别取未超滤液、超滤液和截留液, 以去离子水同法超滤得到的相应溶液为空白, 于232nm处测定吸光度。

2.3 样品的超滤

样品超滤前超滤系统依次用0.02 mol·L⁻¹ NaOH溶液和0.02 mol·L⁻¹ HCl溶液清洗, 在各种清洗溶液之间及之后均用大体积去离子水洗涤, 使超滤液及截留液的pH等于7。此外, 每份样品超滤前均用约10mL样品预平衡超滤系统。

取经0.45μm微孔滤膜处理的黄芪水煎液, 用超滤系统进行超滤, 详细流程见图1。

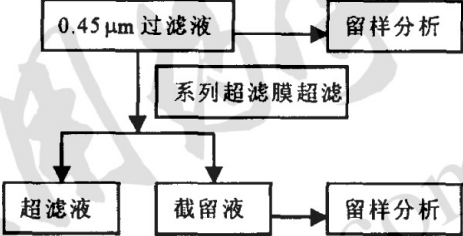


图1 黄芪水煎液超滤流程

Fig 1 UF procedure for aqueous extracts of Radix Astragalus

2.4 超滤液中元素铜的测定

取系列超滤液适量, 加HNO₃使其浓度为2%。定量吸取适量进样, 按表1所列条件进行测定。

示^[8], 本实验获得的表观截留系数为0.99, 证明研究所用的超滤膜是完好的。见表2。

中药水煎液的胶体主要是由有机物质形成, 因此在应用超滤技术进行水煎液胶体研究时, 必须考察超滤膜对有机物质的吸附性质。本实验所用超滤膜对超滤物质吸附损失为4.3%, 表明其对有机物质吸附较少, 适合于黄芪水煎液中胶体态铜的研究。见表2。

3.2 黄芪水煎液胶体态铜分析

3.2.1 标准曲线的绘制 采用铜标准储备液(1.0mg·mL⁻¹)配制浓度为4、8、12、16、20ng·mL⁻¹标准溶液, 用GFAAS法测定元素铜的吸光度, 得回归方程 $A = -0.0458C + 0.0336$ ($r = 0.9996$)。

3.2.2 GFAAS精密度及回收率 取过截留分子质量5万超滤膜的超滤液, 平行测定5次, RSD为3.0%。用标准加入法

表 2 超滤膜适用性 (n = 5)

Tab 2 Applicability of UF membranes (n = 5)

	体积 (mL)	PVP浓度 (mg·mL ⁻¹)	表观截留系数 RC ¹	吸附损失 ² (%)
未超滤液	25.00	2.698 ± 0.010		
超滤液	10.00	0.076 ± 0.005	0.989 ± 0.001	4.3 ± 0.1
截留液	50.00	1.275 ± 0.005		

注: ¹ 表观截留系数 (Rc) = $1 - \frac{[U] \times V_U}{[D] \times V_0}$
² 吸附损失 (%) = $\frac{[D] \times V_0 - [U] \times V_U - [R] \times V_R}{[D] \times V_0} \times 100$
公式中 [D]、[U]、[R] 分别代表未超滤溶液、超滤液和超滤膜截留液中 PVP 的浓度; V₀、V_U、V_R 分别代表相应溶液的体积。

表 3 超滤系统回收率 (n = 5 $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Recoveries of UF system (n = 5 $\bar{x} \pm s$)

	未超滤液 (ng)	超滤液 (ng)	截留液 (ng)	¹ 回收率 (%)
截留分子质量 14 万超滤膜	379.9 ± 38.7	147.9 ± 11.6	211.4 ± 21.1	95.1 ± 7.9
截留分子质量 5 万超滤膜	249.2 ± 19.9	83.1 ± 9.4	150.2 ± 11.1	93.8 ± 4.1
截留分子质量 1 万超滤膜	221.7 ± 25.1	94.0 ± 11.5	138.4 ± 14.0	105.1 ± 4.4
截留分子质量 0.4 万超滤膜	203.0 ± 14.9	78.4 ± 6.4	112.4 ± 13.8	94.0 ± 7.41

注: ¹ 回收率 (%) = $\frac{\text{截留液中铜含量} + \text{超滤液中铜含量}}{\text{未超滤液中铜含量}} \times 100$

已分离出的主要有机成分有多糖、皂苷、氨基酸、黄酮等, 这些成分含有多种官能团, 具有较高的配位潜力, 因而都有可能与微量元素作用。但这些有机成分中, 除黄芪多糖的相对分子质量较大外, 其他组分的相对分子质量大都在 0.1 万以下。

通过计算不同截留部分胶体态铜占可溶态铜含量百分比, 得出以下结果: 黄芪水煎液可溶态中, 元素铜大部分存在于真溶液中, 占可溶态铜的 39.4%, 这部分铜可能是以离子态或者与相对分子质量小的有机成分结合存在; 与相对分子质量大于 14 万的胶体颗粒结合的占 22.7%; 与 14 万 ~ 5 万的胶体颗粒结合的占 18.8%; 与 5 万 ~ 1 万和 1 万 ~ 0.4 万的胶体颗粒结合的分别占 7.1% 和 12.0%, 见图 2。这与闫巧娟等^[9]用超滤方法研究黄芪多糖的相对分子质量分布所得结果大致相近, 即: 黄芪多糖的分布很不均匀, 相对分子质量大于 15 万和小于 0.3 万的黄芪多糖含量较多, 而相对分子质量介于 0.3 万至 15 万这一段的多糖只占总多糖的 13.2%。推测黄芪水煎液胶体态中影响元素铜分布的主要有机成分可能是黄芪多糖。李磊等^[10]和曾志将等^[11]也曾得出相似的结果, 即铜在可溶性多糖中的比例较高。文献^[12]指出多糖负氧基团能静电吸引阳离子或通过多羟基团与之生成螯合物, 如植物细胞壁胶质多糖由二价阳离子与糖醛酸中的羧基络合而成。同时图 2 的结果还显示约有 60% 的元素铜以胶体态存在, 不同相对分子质量大小的胶体吸附铜的量不同。这进一步证实水煎液中胶体态也是元素铜的一种存在形态。至于不同煎煮时间对黄芪水煎液中胶体态铜的分布和含量有何影响, 及黄芪多糖与元素铜的作用机制, 将是我们下一步研究重点。

进行回收实验, 回收率为 101.8%, 可见准确度较好。
3.2.3 超滤系统回收率^[8] 尽管回收率并不是超滤实验成功与否的绝对指标, 但它仍是评价超滤实验结果的一个简便而有效的参数。若 R > 100%, 则意味着超滤过程中超滤系统可能会释放研究组分; 若 R < 100%, 则说明超滤过程超滤系统会吸附研究组分。
本研究建立的超滤系统对实际样品中铜的回收率介于 93.8% ~ 105.1% 之间, RSD < 12.2%, 表明超滤系统经过适当的酸洗、碱洗及样品预平衡, 元素铜受到的玷污或损失不大, 应用该系统进行黄芪水煎液胶体态铜的研究, 准确度较好。见表 3。

3.2.4 黄芪水煎液中胶体态铜分布 黄芪的化学成分众多,

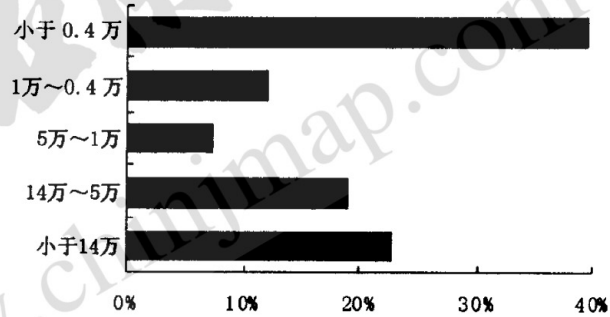


图 2 黄芪水煎液中胶体态铜分布; n = 3 RSD < 11.3%
Fig 2 Composition ratio of copper in UF fractions n = 3 RSD < 11.3%

4 结论

4.1 截留相对分子质量 1 万的超滤膜对相对分子质量 4 万的 PVP 具有良好的截留效率和较小的吸附损失, 证明所用超滤膜完好, 对 PVP 的吸附较少。
4.2 元素铜在超滤过程中的回收率介于 93.8% ~ 105.1% 之间, RSD < 12.2%, 表明超滤系统经过酸洗、碱洗及样品预平衡, 研究组分受到的污染或损失均很小。
4.3 黄芪水煎液不同大小胶体态中元素铜含量占可溶态铜含量结果表明: 元素铜主要分布在分子质量大于 5 万和小于 0.3 万胶体颗粒中。同时结果还证明黄芪水煎液中胶体态也是元素铜的一种存在形态。

致谢: 南京中医药大学植物药研究与开发中心郭立玮教授对本研究给予的帮助。

参考文献

[1] 魏俊峰, 戴民汉, 洪华生, 等. 海洋胶体与痕量金属的相互
中国现代应用药学杂志 2006 年 10 月第 23 卷第 5 期

- 作用 [J]. 地球科学进展, 2004, 19(1): 26-31.
- [2] 刘清, 王子健, 汤鸿霄. 铜的形态分布于 *Daphnia magna* 急性毒性关系 [J]. 环境化学, 1998, 17(1): 14-18.
- [3] 赵丽霞, 张勇. 中草药黄芪中 6 种微量元素的溶出率研究 [J]. 光谱实验室, 2003, 20(3): 373-375.
- [4] 吴巧凤. 黄芪及其水煎液中 Cu、Mn、Zn、Fe、Se 的测定和浸出率研究 [J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(3): 51-53.
- [5] 彭国平, 郭立玮, 徐丽华, 等. 超滤技术应用对中药成分的影响 [J]. 南京中医药大学学报 (自然科学版), 2002, 18(6): 339-341.
- [6] Wen LS, Stordal MC, Tand D, *et al.* An ultraclean cross-flow ultrafiltration technique for the study of trace metal phase speciation in sea water [J]. Mar Chem, 1996, (55): 129-152.
- [7] Dai M, Buesseler KO, Ripple P, *et al.* Evaluation of two cross-flow ultrafiltration membranes for isolation marine organic colloids [J]. Mar Chem, 1998, (62): 117-136.
- [8] 陈敏, 郭劳动, 黄奕普, 等. 错流超滤技术在海水胶体态铀、钍、镭同位素和有机碳研究中的应用 [J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 51-59.
- [9] 闫巧娟, 韩鲁佳, 江正强, 等. 黄芪多糖的分子量分布 [J]. 食品科学, 2004, 25(8): 27-30.
- [10] 李磊, 谢明勇, 王小如, 等. 青钱柳多糖组分生物活性及其元素化学形态分析 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2003, 42(1): 73-77.
- [11] 曾志将, 王开发. 花粉中 Fe、Zn、Cu、Mn 元素可溶性糖类结合态及脂肪结合态的研究 [J]. 蜜蜂杂志, 2002, (11): 3-4.
- [12] Szpunar J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques [J]. Analyst, 2000, (125): 963-988.

收稿日期: 2005-04-06