

实验技术

# 何首乌中磷脂类化合物的微波辅助萃取 / 高效液相色谱法测定

万益群<sup>1,2</sup>, 吴世芳<sup>2</sup>

(1. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047;  
2. 南昌大学 分析测试中心, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 利用微波辅助萃取 (MAE) 技术对何首乌中磷脂类化合物的萃取条件进行研究, 并通过液相色谱法分离测定。通过对 MAE 影响因素的考察, 确定萃取溶剂为氯仿 - 甲醇 (体积比 1 : 2) 的混合溶剂, 固液比为 1 : 20, 萃取时间 15 min, 温度 45 ℃。在 HPLC 中, 采用 Nucleosil 100-5 硅胶色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm), 甲醇为流动相, 流速 0.8 mL/min, 进样量 15 μL, 蒸发光散射检测器。

**关键词:** 微波辅助萃取; 高效液相色谱法; 何首乌; 磷脂

**中图分类号:** O657.72; Q545 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)07 - 0782 - 04

## Determination of Phospholipids in *Polygonum Multiflorum* Thunb by Microwave Assisted Extraction/High Performance Liquid Chromatography

WAN Yi-qun<sup>1,2</sup>, WU Shi-fang<sup>2</sup>

(1. The Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Phospholipids in *Polygonum multiflorum* Thunb were extracted using microwave assisted extraction (MAE) and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) in this study. In MAE, chloroform - methanol (1 : 2, by volume) was selected as the extraction solvent with the solid to liquid ratio of 1 : 20, extraction time of 15 min and the temperature of 45 ℃. Phospholipids were separated on a Nucleosil 100-5 column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) with methanol as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min and detected by a evaporative light-scattering detector. The method was effective and suitable for quality control of *Polygonum multiflorum* Thunb and related preparations.

**Key words:** microwave assisted extraction; high performance liquid chromatography; *Polygonum multiflorum* Thunb; phospholipids

何首乌为蓼科植物 *Polygonum multiflorum* Thunb 的干燥块根, 是一味传统的滋补良药。何首乌中所含的磷脂类化合物是其有效成分之一, 在抗衰老、降血脂、调节神经和智力开发方面有重要作用<sup>[1]</sup>。常见的磷脂类化合物的提取方法有回流法<sup>[2-3]</sup>、超声波提取法<sup>[4]</sup>、超临界提取法<sup>[5-6]</sup>等, 微波萃取法很少见报道。微波辅助萃取技术 (MAE) 具有选择性高、操作时间短、溶剂消耗少、有效成分收率高的特点, 已被成功运用于药材的浸出、中药活性成分的提取方面<sup>[7-8]</sup>。

本文采用高效液相色谱 - 蒸发光散射分离测定了 4 种磷脂类化合物, 结合 MAE, 建立了 MAE/HPLC 法分析磷脂类化合物的新方法, 并成功应用于实际样品的分析, 为有效利用何首乌提供了依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

MDS-2002A T 型微波消解/萃取仪 (上海新仪微波化学科技有限公司); Waters 2695 高效液相色谱仪

收稿日期: 2007 - 10 - 16; 修回日期: 2007 - 11 - 08

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (RT0540); 南昌大学食品科学教育部重点实验室开发基金资助项目 (200408)

第一作者: 万益群 (1964 - ), 男, 江西进贤人, 教授, 博士, Tel: 0791 - 8321370, E-mail: yqwanoy@sina.com

(美国 Waters 公司), Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器 (美国 Alltech 公司); Optima-5300DV 型电感耦合等离子体发射光谱仪 (美国 PE 公司); 消解电热板; Milli-Q 纯水器。

磷脂酰胆碱 (PC)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘油 (PG) 标准品均购自美国 Sigma 公司; 磷标准溶液 (100 mg/L); 氯仿、甲醇、乙酸乙酯, 均为色谱纯; HNO<sub>3</sub> (优级纯); 去离子水。

何首乌, 产地四川, 由安徽亳州永刚饮片厂提供, 经鉴定符合 2000 年版《中华人民共和国药典》质量标准。样品粉碎后, 过 0.187 5 mm 筛, 以四分法制得粉状药品, 50 ℃ 烘干 48 h, 放置干燥器中备用。

## 1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Nucleosil 100-5 硅胶色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm); 甲醇作流动相, 流速 0.8 mL/min, 等度洗脱; 蒸发光散射检测器参数: 漂移管温度 66 ℃, 气体流速为 1.8 L/min; 进样量为 15 μL。

1.2.2 ICP-AES 测定总磷脂含量 准确称取约 1.0 g 何首乌样品于溶样杯中, 加入一定量萃取溶剂, 把溶样杯放入罐体中, 组装好罐体后放入微波制样系统中, 插入温度探针, 设置萃取压力、萃取时间、温度。萃取完毕后, 将样品过滤, 滤液定容至 25 mL。

准确移取 20.0 mL 提取液于高脚烧杯中, 置于电热板上, 挥去有机溶剂, 加适量浓 HNO<sub>3</sub> 消解。消解完冷却后用 5% (体积分数) HNO<sub>3</sub> 定容至 25 mL, 用 ICP-AES 法测定无机磷的含量 (仪器工作参数: 检测波长为 213.617 nm, 射频功率为 1.2 kW, 雾化气流量为 0.8 L/min, 辅助气流量为 0.2 L/min, 冷却气流量为 15 L/min, 观测方向为 Axial, 溶液提升量为 1.5 L/min), 再根据公式<sup>[9]</sup>  $w(\text{mg/g}) = 25 \times 10^{-3} \times x/m$  (式中  $w$  为总磷脂的含量,  $m$  为样品质量 (g),  $x$  为磷的质量 (μg), 25 为磷脂转换系数 (以卵磷脂计)) 换算成总磷脂的含量。

1.2.3 样品制备 准确称取约 1.0 g 何首乌样品于溶样杯中, 加入 20 mL 萃取溶剂 (氯仿与甲醇体积比为 1:2), 把溶样杯放入罐体中, 组装好罐体后放入微波制样系统中, 插入温度探针。设置萃取压力为安全压力 (1.5 MPa), 萃取时间 15 min, 温度为 45 ℃。微波萃取完毕后, 将样品过滤。滤液用体积为滤液总体积 1/4 的 8 g/L 氯化钠溶液萃取 2 次, 收集有机相。将有机相旋转浓缩至近干, 用甲醇定容至 10 mL。取样品溶液 3 mL 用甲醇稀释至 10 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 待测。

1.2.4 标准溶液的配制 准确称取一定量的 PG、PE、PC、LPC 标准品分别置于 2 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得各磷脂化合物标准储备液的质量浓度为 PG: 3.88 g/L, PE: 2.50 g/L, PC: 5.15 g/L, LPC: 7.15 g/L。分别移取一定量的各磷脂类化合物标准储备液于 2 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 作为混合标准溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MAE 条件的选择

2.1.1 萃取溶剂的种类 实验考察了甲醇、乙酸乙酯、氯仿-甲醇 (体积比 1:1, 1:2, 2:1) 5 种溶剂对微波萃取效率的影响。由实验结果可知, 以氯仿-甲醇 (体积比 1:2) 混合溶剂对总磷脂萃取率最高, 因此选择该混合溶剂为萃取溶剂。

2.1.2 固液比的考察 选择  $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}} = 1:2$  的混合溶剂为萃取溶剂, 分别考察不同的固液比对何首乌中总磷脂萃取率的影响, 结果表明, 当固液比为 1:20 时, 萃取率较高。

2.1.3 萃取时间的选择 萃取率通常随萃取时间的延长有所增加, 但当萃取时间达到一定值后, 再延长萃取时间, 萃取率增长幅度很小。固定其它条件, 分别考察了萃取时间为 5、10、15、20、25、30 min 时总磷脂的萃取率。当萃取时间为 15 min 时, 萃取效率高且节约时间, 故实验选择萃取时间为 15 min。

2.1.4 微波温度的考察 由于磷脂类化合物在高于 60 ℃ 时会发生分解, 且所用萃取溶剂的沸点在 65 ℃ 左右。因此, 本实验在不改变其它萃取条件的情况下, 考察 40~60 ℃ 范围内的萃取率。结果发现最佳萃取温度为 45 ℃。

## 2.2 HPLC条件的优化

分别考察了甲醇、乙腈、甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等不同组合及比例的流动相下 4 种磷脂类化合物的分离情况, 最终选定甲醇为流动相。

分别改变流动相的流速为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min, 考察流速的变化对各组分的分离度、信号强度及出峰时间的影响, 最后确定甲醇的流速为 0.8 mL/min。

在上述优化的色谱条件下, 磷脂类化合物标准品色谱分离情况见图 1。

## 2.3 标准曲线的绘制

将“1.2.4”中制备的各磷脂的标准储备液用甲醇稀释, 配制一系列的标准工作液, 在选定的色谱条件下进行测定。以峰面积的自然对数 ( $Y$ ) 对标准溶液浓度的自然对数 ( $X$ ) 进行线性回归, 得到各磷脂类化合物的线性方程及相关系数, 见表 1。

表 1 不同磷脂组分的线性方程和检出限

Table 1 The linear regression equations of different phospholipids

Phospholipids	Linear range / ( $g \cdot L^{-1}$ )	Regression equation	Correlation coefficient $r$	Detection limit / ( $mg \cdot L^{-1}$ )
PG	0.038 8 ~ 0.388	$Y = 1.38X + 7.22$	0.999 5	1.7
PE	0.050 0 ~ 0.250	$Y = 1.44X + 6.77$	0.999 6	2.5
PC	0.010 3 ~ 0.165	$Y = 1.53X + 6.01$	0.999 7	5.4
LPC	0.010 3 ~ 0.343	$Y = 1.53X + 5.71$	0.999 8	5.1

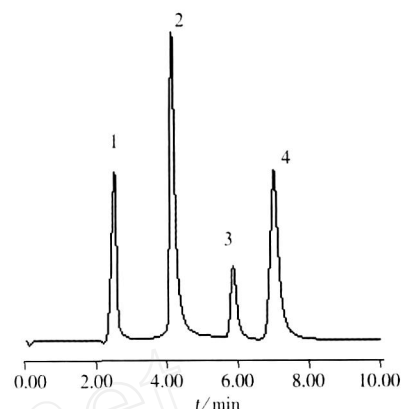


图 1 标准品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a mixed phospholipid standards

1. PG, 2. PE, 3. PC, 4. LPC

## 2.4 精密度

将“1.2.4”中配制的混合标准溶液按选定的色谱条件进行测定, 重复测定 6 次, 各磷脂类化合物峰面积的 RSD 值分别为 PG: 0.07%, PE: 0.39%, PC: 0.81%, LPC: 0.05%, 表明该仪器分析的精密度良好。

## 2.5 样品测定

准确称量一定量的何首乌样品按“1.2.3”的方法处理, 在“1.2.1”的色谱条件下进行测定, 平行测定 6 次, 结果 PE 的含量为 1.38 mg/g, 样品的色谱图如图 2 所示。

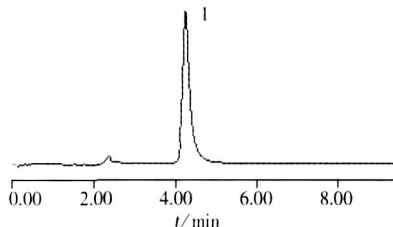


图 2 何首乌样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of a *Polygonum multiflorum* Thumb sample

1. PE

## 2.6 加标回收率

在何首乌样品中分别加入不同浓度的各磷脂标准溶液, 按“1.2.3”的实验方法制备并进行检测, 结果见表 2。

表 2 加标回收结果 ( $n=6$ )

Table 2 Spiked recoveries of different phospholipids ( $n=6$ )

Phospholipids	Original $m_O / \mu g$	Added $m_A / \mu g$	Found $m_F / \mu g$	Recovery $R / \%$	RSD $s_r / \%$
PG	-	19.40, 38.80	20.26, 36.54	104, 94	1.23, 0.89
PE	41.46	40.00, 80.00	79.76, 120.1	96, 98	1.62, 2.07
PC	-	16.48, 32.96	15.71, 33.65	95, 102	1.12, 0.94
LPC	-	17.16, 34.32	16.62, 35.35	97, 103	0.97, 1.21

## 参考文献:

- [1] 沈同, 王镜岩. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 473 - 481.
- [2] 梁惠花, 刘晓河, 张利民, 等. 坝上油菜花粉中磷脂的含量测定 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 504 - 505.
- [3] 白研, 毋福海, 陈志澄, 等. 广东德庆何首乌中卵磷脂含量测定 [J]. 广东药学, 2004, 14(5): 3 - 5.
- [4] 王立新, 吴启南, 吴德康, 等. 钼蓝比色法测定不同产地合子草中总磷脂的含量 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(3): 50 - 51.

(下转第 787 页)

## 参考文献:

- [1] 汪洪涛, 徐学明, 金征宇. 角黄素的性质与开发应用 [J]. 粮食与饲料工业, 2003, (6): 31 - 32
- [2] 饲料添加剂品种目录 [B]. 中华人民共和国农业部第 318号公告.
- [3] TOLASA S, CAKL I S, OSTERMEYER U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid [J]. Eur Food Res Technol, 2005, 221: 787 - 791.
- [4] 刘良忠, 彭光华, 王海滨, 等. 天然红心鸭蛋中红色素的化学及光谱性质研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(11): 265 - 268
- [5] 刘良忠, 张声华, 石嘉悻, 等. 采用反相  $C_{18}$ -HPLC分离天然红心鸭蛋中红色类胡萝卜素的异构体 [J]. 食品科学, 2006, 27(11): 473 - 478
- [6] 刘良忠, 张民, 彭光华, 等. 高效液相色谱-质谱法分离鉴定天然红心鸭蛋黄中的红色素 [J]. 色谱, 2004, 22(3): 197 - 201.

(上接第 784页)

- [5] 耿岩玲, 王晓, 程传格, 等. 超临界  $CO_2$  萃取何首乌磷脂的工艺研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(1): 140 - 142
- [6] 袁海龙, 李仙逸, 张纯, 等. 超临界流体萃取-高效液相色谱法测定何首乌中磷脂成分 [J]. 药学报, 1999, 34(9): 702 - 705.
- [7] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 73
- [8] 李杰红. 微波辅助萃取技术提取中药有效成分研究 [J]. 中国医药导报, 2006, (36): 155 - 156
- [9] 上海市医学化验所. 临床生化检验: 上册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1979: 185 - 187.

## 欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

## 《分析测试学报》

国内刊号: CN 44 - 1318 /TH  
国际刊名代码 CODEN: FCEXES  
国外代号: BM 6013

国际标准刊号: ISSN 1004 - 4957  
邮发代号: 46 - 104  
广告经营许可证: 粤 010029

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物, 中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果, 介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展, 本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2006年, 影响因子在全国分析学科刊物排名中列第 1 名, 被引频次每年递增约 30%, 稿源丰富, 基金论文比超过 70%。近几年, 本刊发表的论文被 CA (美国化学文摘) 收录率达 94%, 2006年引文频次在 CA 千种表中国部分中列第 38 名, 并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘 (AA)、《质谱公报》等收录。中文核心期刊 (入选《中文核心期刊要目总览》); 进入由全国 8000 种期刊遴选出的 500 种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”; 中国学术期刊综合评价数据库 (CAJCED) 统计刊源; 中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊); 《中国科学引文数据库》来源期刊; 中国期刊全文数据库 (CJFD) 收录期刊; 《中国核心期刊 (遴选) 数据库》收录; 《中国学术期刊 (光盘版)》全文收录期刊; 《中国期刊网》全文收录期刊; 《中国学术期刊文摘 (英文版)》收录为源期刊等。

本刊自 2008 年起变更为月刊, 国内外公开发售。大 16 开, 铜版纸印刷, 单价: 12.00 元 / 册, 全年 144 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部, 邮编: 510070, 写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数 (全年或某期), 电话: (020) 87684776 或 37656606, <http://www.fxcsxb.com> (可在线投稿), E-mail: [fxcsxb@china.com](mailto:fxcsxb@china.com)。