

荷叶提取物的分离和纯化

李彩侠;张贇彬;黄国纲

上海理工大学 (上海 200093)

摘要 用三种方法对荷叶提取物进行分离纯化,结合薄层层析(TLC)和颜色反应,对各分离组分跟随鉴定。结果表明:高速逆流色谱(HSCCC)分离效果最好,Sephadex LH-20柱层析分离效果次之,硅胶柱层析分离效果最差;荷叶提取物经高速逆流色谱分离纯化,可以得到两种黄酮醇类单体。

关键词 荷叶;提取物;分离;纯化;黄酮醇

Purifying and Separating of Extract from Lotus Leaves

Li Cai-xia; Zhang Yun-bing; Huang Guo-gang

University of Shanghai for Science and Technology (Shanghai 200093)

Abstract Three methods were used to separate and purify extract from lotus leaves, every component was analyzed by thin layer chromatography and color reaction. The results showed that, separate effect of HSCCC was remarkable, that of Sephadex LH-20 was middle, that of silicagel column chromatography was bad; two flavonol monomers were separated from extract of lotus leaves by HSCCC.

Keywords lotus leaves; extract; separating; purifying; flavonol

荷叶(Lotus Leaf)是睡莲科植物中国莲(Nelumbo Nucifera)的叶片,生长在水上,在我国南北均有分布。荷叶甘、平、无毒,具有消暑、清肺、安心神等作用^[1]。现代研究表明,荷叶营养丰富,除含有普通植物所共有的碳水化合物、脂类、蛋白质、单宁等常规化学成分外,还富含具有明显生物活性和生理功能的黄酮类化合物和生物碱这两大类别物质^[2]。杜力军^[3]、纪丽莲^[4]、许腊英^[5]等人研究显示,荷叶粗提液具有降脂减肥、抗自由基、抑制高胆固醇血症和动脉硬化等功效。本文对荷叶提取物进行了分离和纯化,以期对荷叶的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料与试剂

原料:新鲜荷叶(十月上旬采于上海青浦区);

试剂:甲醇,乙醇,石油醚,茴香醛,浓硫酸,氯仿,甲酸等(均为分析纯)。

1.1.2 主要仪器

电热恒温鼓风干燥箱;UV-1700紫外分光光度器(日本岛津);真空冷冻干燥机(美国LABCONCO);电子分析天平(Sartorius BP211D);旋转蒸发器(日本岛津);TBE-300半制备高速逆流色谱仪(上海同田生化有限公司);8823A紫外检测仪(北京市新技术应用研究所);恒流泵(北京圣益通技术开发有限责任公司);硅胶(160~200目),葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20);聚酰胺薄膜;层析缸,层析柱等。

1.2 实验方法

1.2.1 荷叶黄酮的提取

将新鲜荷叶洗净沥干,置于干燥箱低温(50℃)烘干,取出粉碎得荷叶粉;取荷叶粉10g放入500mL带塞三角瓶中,加入70%的乙醇300mL,在80℃水浴中浸提2h,浸提两次,合并滤液,得荷叶乙醇粗提液。

去除叶绿素、叶蜡:用石油醚(浓度和体积与乙醇同)对粗提液进行萃取。将石油醚萃取部分蒸干,回收石油醚;将乙醇部分蒸干,回收乙醇,得荷叶浸膏。

去除蛋白质、糖类:将荷叶浸膏用95%乙醇溶解,再将滤液进行真空冷冻干燥,得荷叶提取物。

1.2.2 硅胶柱层析分离

以100~200目的硅胶进行湿法装柱(柱长100cm,内径3.5cm);取少许荷叶提取物,用无水甲醇溶解(约15mL),上硅胶柱,用甲醇洗脱,采用定时收集方式收集,结合薄层层析(TLC)分析鉴定。

1.2.3 葡聚糖凝胶柱层析分离

葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)进行湿法装柱(柱长60cm,内径2.4cm);取少许荷叶提取物,用无水甲醇溶解(约15mL),上凝胶柱,用无水甲醇洗脱,定时方式收集,跟随TLC分析鉴定。

1.2.4 高速逆流色谱(HSCCC)分离

采用氯仿:乙醇:水=4:3:2溶剂体系,置分液漏斗中,混匀,静置分层,分成固定相(上层)和流动相(下层)。上高速逆流色谱仪,柱温25℃,首先泵入固定相,接着泵入流动相,达到平衡时,固定相保留量为265mL。取少许荷叶提取物,用固定相溶解,进样,流速2mL/min,转速900r/min,定时方式收集,跟随TLC分析鉴定。

1.2.5 薄层层析分析鉴定

*受上海市自然科学基金项目(03ZR14069)和教育部留学回国人员科研启动基金项目资助

展开体系：甲醇：水和氯仿：甲醇：甲酸；显色剂：茴香醛：浓硫酸：乙醇体系，将各部分洗脱液在聚酰胺薄膜上展开；观察比较显色后的斑点颜色及 Rf 值。

1.2.6 颜色反应

分别取荷叶提取物少许，甲醇溶解，加入不同的定性试剂，观察其颜色反应。

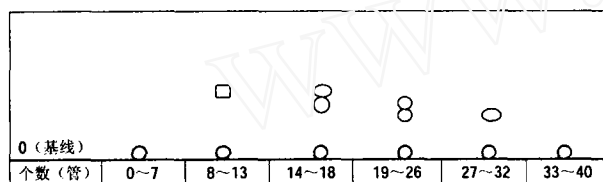
2 结果与讨论

2.1 硅胶柱层析分离结果

荷叶提取物经硅胶柱层析分离，洗脱部分出现多种混合颜色，分别点样于聚酰胺薄膜上，对其进行 TLC 分析。TLC 显示：最先洗脱的绿色部分无斑点，可能是没萃取完全的叶绿素，后面洗脱的红色和黄色部分大多都有两个或三个斑点，拖尾现象较严重。可见利用硅胶柱层析可以进一步将叶绿素等杂质分离，但对荷叶中其它组分的分离效果不好。

2.2 葡聚糖凝胶柱层析纯化结果

荷叶提取物经 Sephadex LH-20 柱层析分离，洗脱部分出现多种颜色，界线分明；每 5mL 收集 1 管，结合 TLC 分析(展开剂：甲醇-水)检测，结果见图 1。



(TLC)展开结果

图 1 薄层层析

从图 1 可以看出，8~13 管、27~32 管各有一清晰斑点，且展开距离不同，说明 Sephadex LH-20 柱层析分离荷叶提取物效果较好；但 14~26 管未能分离开，且每管展开时基线上均有斑点，说明 Sephadex LH-20 柱层析很难完全分离得到单一化合物。

2.3 高速逆流色谱(HSCCC)分离结果

荷叶提取物经高速逆流色谱分离后有个主要的峰，见图 2 所示。

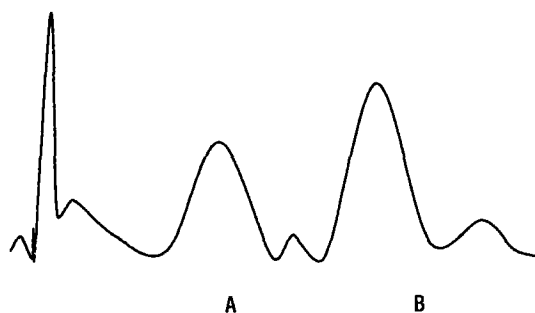


图 2 HSCCC 紫外检测分离谱图

用分部收集器对每个峰都进行收集，并用 TLC 进行检测，去掉组分重叠的部分，结果得到组分 A 和 B。

对 A 和 B 分别用不同的展开剂(甲醇-水和氯仿-甲醇-甲酸)展开，喷洒显色剂，结果如图 3 所示。

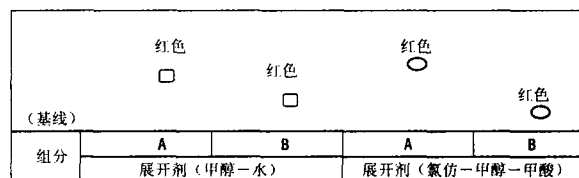


图 3 不同展开剂的展开结果

从图 3 可以看出，组分 A 和 B 经不同展开剂展开后，均得到单一、明显的斑点，展开距离各不相同，且基线处无斑点。实验结果说明，荷叶提取物经高速逆流色谱分离后能得到两种纯度很高的物质。

2.4 颜色反映结果

用不同的试剂分别对组分 A 和 B 显色，结果如表 1 所示。

表 1 颜色反应结果

	本身颜色	盐酸+镁粉	三氯化铝	氢氧化钠	三氯化铁
A	黄色	紫红色	黄绿色	深黄色	棕色
B	黄色	红色	黄绿色	深黄色	棕色

盐酸-镁粉反应和三氯化铁反应为鉴定黄酮类化合物最常用的颜色反应，加入不同试剂后，组分 A 和 B 均可明显显示，可见组分 A 和 B 均为黄酮类化合物，由表 1 的显色颜色并结合文献^[6]，可以判断 A 和 B 均为黄酮醇类化合物。

3 结论

3.1 三种方法分离纯化荷叶提取物，高速逆流色谱(HSCCC)分离效果最好，Sephadex LH-20 柱层析分离效果次之，硅胶柱层析分离效果最差。结合 TLC 分析、颜色反应鉴定可知，荷叶提取物经 HSCCC 分离纯化，可以得到两种纯度很高的黄酮醇类化合物。

3.2 荷叶属于农产品废弃物，本文对荷叶提取物进行分离、纯化研究，这对荷叶的开发有一定的现实意义。

参考文献

- [1]姜兴俊. 荷叶(含荷蒂、荷梗)古今应用概说. 中国中药杂志, 1997, 22(6): 374~378.
- [2]李志诚. 荷叶化学成分的研究. 中草药, 1996, 27: 50~52.
- [3]杜力军, 孙虹等. 荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究. 中草药, 2000, 31(7): 526~528.
- [4]纪丽莲. 荷叶中抑菌成分的提取及其抑菌活性的研究. 食品科学, 1998, (8): 64~66.
- [5]许腊英, 毛维伦等. 荷叶降血脂的研究开发. 湖北中医杂志, 1996, 14(4): 42~43.
- [6]徐任生. 天然产物化学. 北京: 科学出版社, 1993: 591.