荷叶碱的提取分离及其应用

谢东磊,姜子涛^{*},李荣

(天津商业大学生物技术与食品科学学院,天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134)

摘 要:荷叶作为一种天然、安全有效的保健食品和药物,越来越受到人们的青睐。荷叶,在我国的资 源十分丰富,主要分布在中国的长江、黄河和珠江三大流域。它因含有生物碱、类黄酮、挥发油、有机酸以 及植物固醇等多种功能性成分而具有显著的药食疗功效。荷叶中含有的荷叶碱是一种阿朴啡型生物碱,药理 研究表明其为荷叶中主要的降脂成分。最近研究者们多倾向于对荷叶生物碱类化合物的降脂减肥、抗病毒、 抑菌、抗惊厥等作用进行研究,但是很少有人研究荷叶碱。目前荷叶碱的需求量不断增加,但是缺少方便有 效的分离分析荷叶碱的方法,限制了对荷叶资源进一步的开发和利用。本文综述了荷叶总生物碱的提取、荷 叶碱的分离纯化、含量测定和生理活性的研究现状,以期为荷叶碱的深入研究和合理开发利用提供参考。

关键词:荷叶;荷叶碱;提取分离;色谱法;大孔树脂 中图分类号:TS202.1 文献标识码:A 文章编号:1006-2513(2011)05-0201-05

Extraction, separation and application of nuciferine

XIE Dong-lei, JIANG Zi-tao^{*}, LI Rong

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134)

Abstract: Lotus leaf is more and more popular as a natural , safe and effective functional food and medicine. Lotus leaf , which is abundant in China , mainly distributes around three main rivers basin in China: Yangtze River Basin , Yellow River Basin and Zhujiang River Basin. It has remarkable food and medicine efficacy , because it contains many functional components like alkaloids , flavonoids , volatile oil , organic acid , phytosterol and so on. Nuciferine in lotus leaf is a kind of aporphine alkaloids. The pharmacological studies indicate that it is the main component of lipid – lowering in lotus leaf. Recently , the functions of the lotus leaf alkaloids compounds , such as lipid – lowering lose weight , antiviral , bactriostasis and anticonvulsant becomes more and more hot topics , but few research is on nuciferine. With the increasing demand of nuciferine , the lack of convenient and effective method of separation and analysis limits its further development and application. This paper reviews the research status of the extraction of total alkaloids in lotus leaf , the separation , purification , content determination , and physiological activity of nuciferine. It provides the reference for the further research and development of nuciferine.

Key words: lotus leaf; nuciferine; extraction and separation; chromatography; macro - porous resin

收稿日期: 2011-06-12 * 通讯作者

基金项目:天津市自然科学基金项目(项目编号:043604511)。

作者简介:谢东磊(1987-),女,硕士研究生,主要从事食品添加剂研究。

荷叶为睡莲科植物莲 (Nelumbo nucifera Gaertn.) 的干燥叶,在食用及药用等方面均有较 广泛的应用。自古中国人民就视荷叶为珍贵食 品,人们将荷叶、荷花制茶作为滋补饮品,传统 的荷叶蒸肉、荷叶包饭、荷叶东坡鱼、等,一直 以来都作为人们的餐桌上的佳品。荷叶具有清热 利湿,升发清阳,降脂减肥,止血散瘀等作 用^[1-2]。药理研究表明,荷叶中含有多种生物碱 如荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、O-去甲基荷叶碱 等这些生物碱特别是荷叶碱具有明显的降脂、平 衡胆固醇等生理活性^[3-4]。现已广泛应用于功能 食品、和饮料中,尤其近年来,以荷叶为主要成 分的降脂减肥食疗制品的应用越来越广泛,现已 开发出以荷叶为主要成分的减肥茶和降脂胶囊, 深受久居烦嚣城市,饮食油腻、久坐缺乏运动的 都市人喜爱,而且利用荷叶减肥不必节食,因为 喝一段时间后,对食物的爱好就会自然发生变 化,自然渐渐地远离那些荤腥油腻的食物,达到 了自然健康减肥的目的。

荷叶中的生物活性成分主要是荷叶生物碱和 黄酮类化合物。迄今为止,已经从荷叶中鉴定出 了单苄基异喹啉型、阿朴啡型、去氢阿朴啡型和 氧化阿朴啡型四种类型的十五种生物碱^[5-8],其 中以荷叶碱为最主要成分^[9]。荷叶碱是一种阿朴 啡型生物碱,药理研究表明荷叶碱为荷叶中的主 要降脂活性成分^[3,10]。目前荷叶碱的需求量不断 增加,但是缺少方便有效的分离分析荷叶碱的方 法,限制了对荷叶资源进一步的开发和利用。本 文就荷叶碱的提取方法进行了综述,并对其开发 应用前景进行了展望。

1 荷叶总生物碱的提取方法

1.1 大孔树脂吸附法 (Macro – porous resin)

目前在荷叶生物碱纯化中使用的较多的是大 孔树脂,它具有溶剂用量少、产品质量高、稳定 性好、生产周期短、设备简单的特点,摆脱了传 统纯化法制剂大、黑粗、使用不方便且溶剂用量 大的缺点。

王普等^[11]用大孔吸附树脂柱色谱,以甲醇梯 度洗脱分离富集荷叶中阿朴啡类生物碱,实验结 果表明 69.5%的荷叶碱富集于 95% 甲醇水洗脱液

中,洗脱液经蒸干后得固体,荷叶碱在相应的固 体中质量分数为 68.5% 。封聚强等^[12] 用 D101 大 孔吸附树脂进行分离纯化, 20%~70%的乙醇梯 度洗脱,并采用 HPLC 对其中的荷叶碱进行含量 测定。采用 50% ~70% 的醇梯度洗脱后荷叶碱的 总收率达 1.3%。乔蓉等^[13]探讨了聚酰胺树脂对 荷叶碱的吸附和洗脱工艺,通过静态吸附实验在 pH为4、吸附时间为80min时,聚酰胺树脂对荷 叶碱的吸附性能最好,饱和吸附量为1.54mg/ mL,最佳上柱液浓度为0.62mg/mL,动态吸附流 速为 0.35 BV /h 用流速为 1.0 BV /h 的 90% 乙醇溶 液洗脱树脂上吸附的荷叶碱,洗脱率达到 66.8%。林木仙等^[14]采用 FD 阳离子交换树脂分 离与石油醚萃取组合技术可得纯度 85% 的荷叶 碱,得率82%以上;进一步结晶,荷叶碱纯度达 95.4% 以上,可以制备用于分析的高纯度荷叶碱。 但大孔树脂仍然存在缺点,比如有机残留物高, 预处理难度大; 使用过程中大孔树脂破碎严重, 使用寿命短: 成分纯化量较小等。

1.2 膜分离 (Membrance separation)

膜分离技术,是一种简单、快速、选择性 高、具有实用前景的分离方法,在分离过程中无 相变,具有设备简便易操作、周期短、安全性 高、高效节能环保等特点。梁峰等^[15]人建立了用 W/O型乳状液膜分离提取荷叶中3种生物碱:N -去甲基荷叶碱、0-去甲基荷叶碱和荷叶碱的 方法。通过对迁移时间、表面活性剂 Span 80 用 量、载体 D2EHPA 浓度、油内比、乳水比和内水 相盐酸浓度的优化,获得了高效的液膜体系为: 迁移时间 215min,表面活性剂 Span 80 的质量分 数为 3.0%, 载体 D2EHPA 的浓度为 0.01mol/L, 油内比为 10:6,乳水比为 10:60,内水相盐酸 浓度为 0. 2mol/L。在优化的实验条件下,荷叶碱 的萃取率达到了 97.9%,相应的富集因子为 8.04。但膜分离技术也存在着样品前处理较复杂, 实验条件要求严格的缺点。

1.3 色谱法 (Chromatography)

色谱法(Chromatography) 是一种先进的物 理分离技术,对于复杂混合物、相似化合物的异 构体或同系物的分离非常有效,是分离和分析荷 叶生物碱的最有效方法之一。吸附柱色谱一般使 用的吸附剂为硅胶和氧化铝。刘婧婧等^[16]将荷叶

202

提取物用1%盐酸酸化后经三氯甲烷萃取,萃取 液蒸干后以流动相溶解,高效液相色谱分离制 备,收集洗脱液浓缩到一定体积时析出针状晶体 一荷叶碱,纯度大于98%。

高速逆流色谱(High – speed Countercurrent Chromatography, HSCC),属于分离完全的液液分 配色谱,其溶剂系统是由互不相溶的两相溶剂中 加入第三种中介溶剂混合而成,无需使用固体物 质作固定相载体,与其它的液相色谱相比,消除 了由于使用载体而带来的样品吸附、污染、峰形 拖尾等现象。但设备昂贵,不适合大量提取。Hu 等^[17]利用 HSCC 分离荷叶中的生物碱,所用两阶 段的分离溶剂为石油醚 – 乙酸乙酯 – 甲醇 – 水, 在比例是1:5:1:5 时可以从150mg 的提取液中 分离出 22.1mg 纯度为 92.1% 的荷叶碱。Zheng 等^[18]成功地运用 HSCC 提取了荷叶碱(纯度达 98% 以上)。

1.4 微波辅助提取方法 (Microwave – assisted extraction)

微波辅助提取技术与传统的以及其他现代的 提取技术相比,更快速,更有效,非常适合从固 体中提取有机物,在样品预处理领域也呈现出独 特的优势。离子液体是一种完全由离子组成在室 温下呈液态的熔融盐,具有很多独特的物理和化 学性质,如良好的热稳定性,蒸气压低,热稳定 性高,溶解能力好,几乎没有挥发性等,是一种 可以设计的绿色溶剂。目前,己有多篇文章报道 用离子液体作为萃取溶剂提取中药的有效成分, 对比有机溶剂,离子液体在萃取中药中多酚类和 生物碱类化合物具有一定的优势。Ma等^[19]利用 离子流微波辅助提取法从荷叶中提取了荷叶碱、 N-降荷叶碱、O-降荷叶碱,并与传统的加热回 流提取法作对比,提取效率提高了 0.9% ~ 43.7%,并将提取时间从2h 缩短到2min。

离子液体微波提取方法只使用了很少量的离 子液体却显著提高了提取率,大大降低了提取时 间,充分说明该离子液体水溶液是一种良好的提 取溶剂,充分体现了微波萃取法快速、高效的优 点。目前,尽管离子液体的价格要高于大部分的 有机溶剂和水,但是该方法只使用了很少量的离 子液体,在考虑到时间的节省和离子液体可以循 环利用这一特点,这个方法仍是很经济实用的。 另一方面,与传统方法相比,该方法没有废物排 放到空气中,是一个更安全,环保的提取方法。

2 荷叶碱含量的测定

邬晓鸥等^[20] 建立了薄层扫描法分离测定荷叶 中荷叶碱含量的方法。该方法采用 0.5% 氢氧化 钠溶液制备的硅胶 GF₂₅₄薄层板,以氯仿:醋酸乙 酷:甲醇:水(30:40:20:10) 在 10℃以下放 置 12h 的下层溶液为展开剂,检测波长为 272nm, 进行单波长线性扫描,在此条件下,荷叶碱和其 他成分分离良好,荷叶碱在 0.5 – 5 μ g 范围内呈 现良好的线性关系,平均回收率为 97.4%,RSD = 3.83% (n = 5)。

柴金玲等^[21]采用高效液相色谱法测定荷叶中 荷叶碱的含量,结果显示:荷叶碱在 3.0 ~ 15.0μg/mL范围内具有良好的线性关系(r = 0.9999),平均回收率为 98.3%,RSD = 2.1% (n = 5)。方建国等^[22]采用高效液相色谱 (HPLC)法测定湖北境内3个品种和5个不同产 地和不同采收时间的荷叶中荷叶碱的含量。结果 显示:荷叶碱含量在1.78~28.56mg/L范围内呈 良好的线性关系。由于品种、产地、采收时间不 同,荷叶中荷叶碱的含量相差较大。其中汉川、 潜江、武汉近郊荷叶的指标成分含量较高。九月 为荷叶采收的最佳时期,可以大量采收。

此外陈波等^[23]采用高效液相色谱 – 紫外 – 电 喷雾质谱(HPLC – UV – ESI/MS) 联用法测定保 健食品中荷叶碱的含量,结果显示:荷叶碱在 0.2 – 20μg/mL 范围内峰面积和浓度呈良好的线 性关系,样品平均回收率为97.3%。

3 荷叶碱作用及应用

"荷叶减肥,令人瘦劣",中国自古以来就把 荷叶奉为瘦身的良药。近年来,荷叶降脂减肥保 健品的种类越来越多,已有多种以荷叶为主要成 分的减肥茶上市。陈海光等^[24]以荷叶为主要原料 制备降脂保健茶,并经动物试验表明,其能明显 降低血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG),高 密度脂蛋白(HDL-C),且无任何毒副作用。王 锋^[25]将荷叶碎片脱水制成携带方便的荷叶减肥降 脂饼干,使荷叶的减肥降脂功能得到充分的发 挥,同时荷叶又在饼干中保持了青绿的状态。 Nergard 等^[26]以高脂血症大鼠为整体模型,观察 荷叶水煎剂对血清总胆固醇(TC)和甘油三酯 (TG) 的影响,结果表明荷叶水煎剂能使的 TC 下降 25.6%~39.3%, TG 下降 18.9%~39.2%, 对 HDL - C 未见明显影响,但随 TC、TG 的降低, LDL-C显著下降;同时荷叶水煎剂能降低全血 比粘度、红细胞压积,从而改善血液浓黏状态, 说明荷叶水煎剂具有明显降脂作用。陈爱华等^[27] 通过试验观察前荷叶碱对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ) 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 凋亡的影响, 证明低浓度前荷叶碱通过增强总一氧化氮合酶 (tNOS)的活性尤其是内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 活性来增加 HUVECs 分泌 NO,抑制 Ang Ⅱ刺激活性氧(ROS)的产生,从而减少AngⅡ 诱导 HUVECs 凋亡,发挥其保护内皮细胞的功 能,从而预防动脉粥样硬化等多种心血管疾病发 生。

涂长春等^[3]通过对生物总碱灌胃肥胖高脂血 症大鼠的实验,研究表明荷叶生物总碱能明显抑 制肥胖大鼠的体重增长,可使反映机体肥胖程度 的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及动脉粥样 硬化指数(AI)下降,而且在发挥减肥作用的同 时,动物活动正常,无明显腹泻和抑制食欲的现 象发生。荷叶碱对老鼠 Renshaw 细胞中的乙酸胆 碱有抑制作用^[28],并且荷叶碱具有明显的降甘油 三酯、降胆固醇及减肥效果^[14]。经实验研究表明 荷叶碱可以明显抑制细胞内胆固醇合成,升高低 密度脂蛋白受体的数量,降低细胞内的胆固醇酯 酶,对细胞内胆固醇合成和代谢均有显著减弱效 果^[29]。陈希平等^[30]对荷叶乙醇提取物进行分离 和纯化,并对荷叶碱单体的抑制脂肪酶活性进行 了实验。结果显示,在所有的荷叶生物碱中,以 荷叶碱的脂肪酶抑制活性最强,抑制活性为 25.8%

荷叶生物碱具有强烈的抗有丝分裂的作用, 从而具有较强的抑菌作用。蒋益虹^[31] 提取荷叶中 的生物碱进行抑菌试验,结果表明,荷叶生物碱 提取液对细菌、酵母菌有较强的抑菌作用,且对 细菌的抑菌能力比对酵母菌强,但对霉菌的抑菌 作用较差。对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低 抑菌浓度为 0.25g/mL,对枯草芽抱杆菌和葡萄酒 酵母的最低抑菌浓度为 0.5g/mL。溶液 pH 对荷 叶生物碱提取液抑菌活性的影响比较大,中性偏 碱性环境的抑菌活性比中性及中性偏酸性环境有 较明显增强;热处理对荷叶生物碱提取液的抑菌 活性相对较小,尤其是经较高温度较短时间处理 (95℃,15min)和高温短时处理(121℃,5min) 后,仍具有较强的抑菌活性。从而荷叶碱作为天 然食品抑菌剂的资源开发具有广阔的前景。

此外荷叶碱还具有抗病毒作用,Boustie J 等^[32]研究了18 种阿朴啡类生物碱抗人脊髓灰质 炎病毒的构效关系,结果表明,荷叶碱在体外具 有显著抗脊髓灰质炎病毒的活力。

4 展望

1991年11月中华人民共和国卫生部卫监发 (1991) 第45号文件中,荷叶被列为第二批"既 是食品又是药品"的名单中,其在食用及药用两 方面均有较广泛的应用。我国荷叶资源丰富,南 北均有广泛种植,价格低廉,但对荷叶开发利用 并不高,大多数荷花的叶子都自动凋零而被弃 掉。近代研究表明,荷叶内的生物碱和黄酮都具 有调血脂活性,但荷叶多以复方用于肥胖症的治 疗,对其中所含多种生物碱成分的分离提纯及各 单体的药理研究及其中活性成分的药代动力学研 究均未见报道。并且现在对荷叶的主要活性物质 的提取分离还没有形成比较规范的标准化操作程 序,其质量难以得到有效控制;另外很少对荷叶 的有效成分进行深入研究,其毒副反应的研究也 比较欠缺,限制了荷叶的进一步的开发和利用。 荷叶生物碱种类多,药理作用多样,应加大对荷 叶生物碱活性成分的分离提纯及单体的药理作用 的研究,以便更好的开发荷叶相关产品,提高荷 叶利用率, 变废为宝。

荷叶碱作为荷叶生物碱中主要成分,其作用 不容忽视,尤其在降脂减肥作用上更是不可替 代。应进一步明确其减肥降脂机理,揭开其化学 本质,多途径、多学科的对荷叶碱进行系统研 究,并进一步研究开发相关产品,从而开发出高 效低毒的降脂减肥保健制品。

参考文献:

[1] David D B , Jeffrey J W , Mathew P J , et al. Wind and water

204

rosion and transport in semi – arid scrublands , grassland and forest ecosystems: quantifying dominance of horizontal wind driven transport [J]. Earth Surf. Processes Landforms , 2003 , 28: 1189 – 1209.

- [2] Cheng KT, Chang HC, Huang H, et. al. RAPD analysis of Lycium bararum medicine in Taiwan market [J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41 (1): 11 – 14.
- [3] 涂长春,李晓宇,杨军平,等.荷叶生物总碱对肥胖高脂血症大鼠减肥作用的实验研究[J].江西中医学院学报, 2001,13(3):120-121.
- [4] 杜力军,孙虹,李敏,等.荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究田 [J]. 中草药,2000,31 (7): 526-528.
- [5] 罗金波,肖文军,刘仲华.荷叶生物碱类成分的研究进展[J].今日药学,2008,18(3):9-21.
- [6] 凌和平,王建荣,李良俊,等.荷叶生物碱的研究进展 [J]. 长江蔬菜,2009,(16):10-13.
- [7]朱秀萍,徐翔.荷叶生物碱研究进展 [J].中国药房, 2008,19(6):459-461.
- [8] 雷红松,肖文军,魏勇.荷叶生物碱的研究进展 [J].吉首 大学学报(自然科学版),2007,28(5):92-94.
- [9] 刘密新,吴筑平,杨成对,等.荷叶精油与生物碱的分析研究[J].清华大学学报(自然科学版),1997,37(6):35-37.
- [10] 许腊英,毛维伦,江向东,等.荷叶降血脂的开发研究 [J].湖北中医杂志,1996,18(1):42-43.
- [11] 王普,罗旭彪,陈波,等.大孔吸附树脂分离纯化荷叶中 阿朴啡类生物碱 [J]. 中草药,2006,37 (3):355-358.
- [12] 封聚强,时书杰,赵骏.大孔吸附树脂分离纯化荷叶中的 荷叶碱 [J],2008,26(4):877-879.
- [13] 乔蓉,钟世安,邓潇君,等.聚酰胺树脂纯化荷叶碱的工艺研究[J].化学与生物工程,2008,25(5):35-38.
- [14] 林木仙,林国荣,陈剑锋,等. 高纯度荷叶碱的制备及其
 药效研究 [J]. 福州大学学报,2008.36 (2):303 307.
- [15] 梁锋,张成功,马铭,等.乳状液膜分离提取荷叶中3种生物碱[J].精细化工,2007,24(6):555-570.
- [16] 刘婧靖,罗旭彪,陈波,等.制备高液相色谱分离纯化荷 叶碱 [J].中草药,2006,37 (1):55-57.
- [17] Hu JN, Shan B, Deng ZY, et. al. Application of high speed counter – current chromatography for the isolation of 5 alkaloids from Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) leaves [J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19 (6): 1661 – 1665.

[18] Zheng ZJ, Wang ML, Wang DJ, et al. Preparative separation of alkaloids from Nelumbo nucifera leaves by conventional and pH – zone – refining counter – current chromatography [J]. J Chromatogr B, 2010, 878 (19): 1647 – 1651.

专论综述 中国食品添加剂 China Food Additives

- [19] Ma WY, Lu YB, Hu RL, et al. Application of ionic liquids based microwave – assisted extraction of three alkaloids N – nornuciferine, O – nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf [J]. Talanta, 2010, 80 (3): 1292 – 1297.
- [20] 邬晓鸥,熊英. 薄层扫描法测定荷叶中荷叶碱的含量 [J]. 中国药师, 2004, 7 (4): 262-264.
- [21] 柴金玲,李伟,谷学新. 高效液相色谱法测定荷叶中荷叶 碱的含量 [J]. 药物分析杂志,2005,25(8):932-934.
- [22] 方建国,万进,王文清,等.鄂产药材荷叶中荷叶碱及槲 皮素的含量分析 [J].中国医院药学杂志,2007,27 (4):439-441.
- [23] 陈波,罗旭彪,姚守拙,等. 高效液相色谱-质谱联用法 测定保健食品中荷叶碱的含量 [J]. 中国食品卫生杂志, 2005,17 (5): 420-421.
- [24] 陈海光,余以刚,曾庆孝.荷叶保健茶的研制及其功效研 究[J]. 食品工业科技,2002,23(1):53-54.
- [25] 王锋. 荷叶减肥降脂饼干及制备方法 [P]. 发明专利, CN200410060619. 8. 2005-03-02.
- [26] Nergard CS, Diallo D, Michaelsen TE, et al. Isolation partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from Vernonia kotschyana Sch Bip. Ex Walp [J]. J Ethnopharm. 2004, 91 (1): 141–152.
- [27] 陈爱华,肖华,李志梁,等.前荷叶碱对血管紧张素Ⅱ诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J].中草药,2006,37 (7):1045-1048.
- [28] Duggan AW, Lodge D, Bixcoe TJ, et. al. Effect of nuciferine on thechemical excitation of Renshaw cells in the rat [J]. AJch Int Parmacodyn Ther, 1973, 204 (1): 147 – 149.
- [29] 韩晓,吴成爱,王伟,等.荷叶碱对 bel 7402 细胞胆固醇 代谢的影响 [J].现代生物医学进展,2008,8(9): 1628-1630.
- [30] 陈希平,杨鹏,张阳德.荷叶中生物碱的分离纯化及脂肪 酶活性抑制作用研究 [J].农业现代化研究,2009,30 (6):748-760.
- [31] 蒋益虹. 荷叶抑菌活性成分的研究 [D]. 杭州: 浙江大 学, 2007.
- [32] Boustie J, Stigliani JL, Montanha J, et al. Antipoliovirus structure – activity relationships of some aporphine alkaloids [J]. J Nat Prod., 1998, 61 (4): 480 – 484.