

## 高效制备液相色谱法从荷叶中分离制备黄酮类化合物

田 娜<sup>1,2</sup>, 刘仲华<sup>1,2</sup>, 黄建安<sup>2</sup>, 罗国安<sup>3</sup>, 刘硕谦<sup>2</sup>, 刘新桃<sup>4</sup>

( 1. 湖南农业大学药用资源工程系, 湖南 长沙 410128 ; 2. 湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南 长沙 410128 ;  
3. 清华大学化学系, 北京 100084 ; 4. 湖南省农业厅, 湖南 长沙 410116 )

**摘要** : 采用高效制备液相色谱法从荷叶( *Nelumbo nucifera Gaertn* )中分离制备荷叶黄酮类化合物。用 60% 乙醇回流提取荷叶, 粗提液浓缩后经 D-101 柱及聚酰胺柱色谱分离, 再在 Symmetry Prep<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 柱上分离, 以水-乙腈为流动相进行梯度洗脱( 流速为 5.0 mL/min ) 得到了 3 种黄酮类化合物。经紫外光谱、红外光谱、核磁共振及质谱分析, 确定该 3 种物质分别为金丝桃苷、异槲皮苷和紫云英苷。所制备的 3 种化合物的纯度都在 97% 以上, 其中紫云英苷为首次从荷叶中分离得到。

**关键词** : 制备型反相高效液相色谱法, 黄酮类化合物, 荷叶

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713( 2007 )01-0088-05 栏目类别 : 研究论文

## Isolation and Preparation of Flavonoids from the Leaves of *Nelumbo nucifera Gaertn* by Preparative Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

TIAN Na<sup>1,2</sup>, LIU Zhonghua<sup>1,2</sup>, HUANG Jian'an<sup>2</sup>, LUO Guoan<sup>3</sup>, LIU Shuoqian<sup>2</sup>, LIU Xintao<sup>4</sup>

( 1. Engineering Department of Medical Resource, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China ;  
2. Research Center of Natural Products, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China ;  
3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China ;  
4. Agriculture Department of Hunan Province, Changsha 410116, China )

**Abstract** : It has been confirmed that flavonoids in the leaves of *Nelumbo nucifera Gaertn* ( lotus leaves ) have many pharmacological activities. Currently, total flavones in the leaves of *Nelumbo nucifera Gaertn* have been studied extensively, however, only a few researches were able to investigate the individual components in it. At first, crude extract was obtained from lotus leaves by reflux extraction using 60% ethanol for three times. Then, the concentrated crude extract was separated on a D-101 column ( eluted with 70% ethanol ) and a polyamide column ( step gradient 15% to 90% ethanol ). The Fr-1 fraction was obtained from the eluate of 45% ethanol and was subjected to a preparative reversed-phase high performance liquid chromatograph ( RP-HPLC ) for the isolation of target components. The preparation of the individual flavonoids was carried out on an RP-HPLC with a Symmetry Prep<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column, and the mobile phase was water-acetonitrile at a flow rate of 5.0 mL/min. Three compounds were identified with ultra violet absorbance ( UV ), infrared ( IR ), nuclear magnetic resonance ( NMR ) and mass spectrometry ( MS ). They were hyperin, isoquercetin and astragaloside. To our knowledge that astragaloside was the first time successfully isolated from this plant. The purity of the three compounds was all over 97%.

**Key words** : preparative reversed-phase high performance liquid chromatography ( preparative RP-HPLC ) ; flavonoids ; lotus leaves

荷叶是睡莲属植物莲( *Nelumbo nucifera Gaertn* )的叶片。莲, 又名芙蕖、芙蓉等, 是具有膨

大根茎的多年生水生植物<sup>[1]</sup>, 原产于中国和印度, 现全世界皆有分布。中国的荷叶资源丰富, 全国除

青海、西藏外,各地均有,且主要分布在长江、黄河和珠江等三大流域。荷叶呈圆形盾状,叶面为绿色,有蜡质感,背面色淡,园林中常用来美化水面。据报道,我国民间早就有用荷叶治疗肥胖症的记载。在 1991 年 11 月中华人民共和国卫生部的卫监发(1991)第 45 号文件中,“荷叶被列入第 2 批‘既是食品又是药品’的名单之中。现代医学研究发现,荷叶具有调血脂、清除自由基、抑菌等作用,且毒性极小<sup>[2-7]</sup>,其主要的药理活性成分为黄酮类物质。但目前对荷叶中黄酮类化合物单体组分的研究及结构鉴定的报道甚少<sup>[8]</sup>。为了有效利用荷叶资源,阐明荷叶黄酮类物质的药理作用机理,本文采用制备型高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化技术从荷叶中制备分离出 3 种黄酮类化合物。3 种化合物经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)以及质谱(MS)等技术分析鉴定,确定它们为金丝桃苷(hyperin, I)、异槲皮苷(isoquercetin, II)、紫云英苷(astragalgin, III),其中紫云英苷为首次从荷叶中分离获得。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与材料

日本 Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪(分析型);美国 Beckman 高效液相色谱仪(制备型),Beckman Golden System 工作站,配 HITA-CHI L-6000 泵;日本 Shimadzu UV-2550 紫外检测器;美国 Spectrum GX FT-IR 红外光谱仪;日本 ECA300、ECA600 核磁共振仪,四甲基硅(TMS)为内标;美国 Agilent 1100 TOF MS 仪。

乙醇、甲醇、溴化钾、乙腈、二甲基亚砜、氘代甲醇为色谱纯,醋酸、氢氧化钠、浓 HCl、硼酸、草酸、磷酸钼酸为分析纯,均购自南开大学化工厂。柱色谱用聚酰胺粉末(100~120 目)。荷叶取自于湖南省湘潭地区。

### 1.2 制备型高效液相色谱条件

制备色谱柱为美国沃特斯 Symmetry Prep™ C<sub>18</sub> 柱(300 mm × 7.8 mm, 10 μm);流动相为水和乙腈,线性梯度洗脱程序 0~37 min, 86% 水→76% 水, 37~42 min, 76% 水; 42~47 min, 76% 水→86% 水, 47~60 min, 86% 水;流速为 5.0 mL/min。流动相在使用前需经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,超声脱气;进样量为 600 μL;柱温为 30 °C;检测波长为 360 nm。

### 1.3 荷叶黄酮类化合物的提取纯化

准确称取干净、干燥的荷叶 1 kg,用乙醇水溶液回流提取 3 次(分别用 3 L, 3 L, 2 L 60% 乙醇水溶

液),合并提取液,真空浓缩。用已处理好的 D-101 树脂进行初步分离。先用蒸馏水冲洗至洗脱液无色澄清(去除蛋白质和糖类化合物),然后以 70% 的乙醇水溶液洗脱(预备实验证实总黄酮类化合物主要在该洗脱液中)。收集洗脱液,真空浓缩,冷冻干燥,得荷叶黄酮粗提物 8.4 g。取荷叶黄酮粗提物 5 g,以 50 mL 水溶解,将其缓慢倒入装有已处理好的聚酰胺填料的柱色谱(120 cm × 8 cm, 聚酰胺粉 500 g)中,充分吸附 30 min 后,依次用 15%、30%、45%、60%、75%、90% 的乙醇水溶液洗脱,分别收集洗脱液并用分析型高效液相色谱仪检测。合并相同组分。从 45% 乙醇水溶液的洗脱液中得到 Fr-1(680 mg)。

### 1.4 荷叶黄酮类化合物的制备色谱分离

将 Fr-1 组分真空浓缩后上样于制备液相色谱柱。制备液相色谱的分离条件如“1.2”节所述,分别收集 A、B、C 组分(见图 1)。各组分溶液用制备液相色谱进一步分离(分离条件同上),分别收集洗脱液,真空浓缩,冷冻干燥后,从 A 馏分中得到化合物 I(240 mg),从 B 馏分中得到化合物 II(200 mg),从 C 馏分中得到化合物 III(80 mg)。

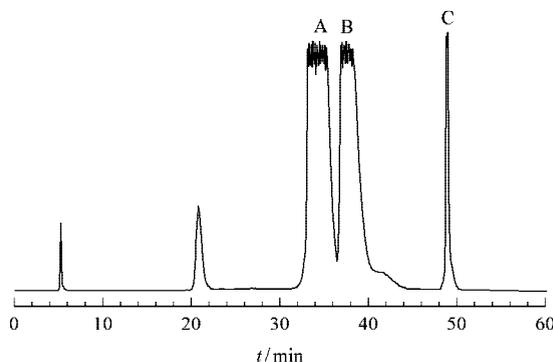


图 1 Fr-1 组分的制备液相色谱图

Fig. 1 Chromatogram of Fr-1 by preparative RP-HPLC  
A. hyperin; B. isoquercetin; C. astragalgin.

### 1.5 荷叶黄酮类化合物的鉴定

#### 1.5.1 荷叶黄酮类化合物的色谱鉴定

将化合物 I、II 和 III 分别进行分析型高效液相色谱和高效薄层色谱检测。

分析型高效液相色谱条件:分析色谱柱为大连依利特公司生产的 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为水-乙腈(体积比为 84:16;使用前经 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,超声脱气);流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL;柱温为 30 °C;检测波长为 360 nm。

高效薄层色谱条件:聚酰胺薄膜,展开剂为乙醇-水(体积比为 3:5),显色剂为 1% AlCl<sub>3</sub>,于紫外灯下观察。

### 1.5.2 荷叶黄酮类化合物的结构鉴定

分别对化合物 I、II 和 III 进行 UV、IR、MS、NMR 检测,确定其化学结构。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱鉴定

图 2 为化合物 I、II 和 III 的色谱分离图。经峰

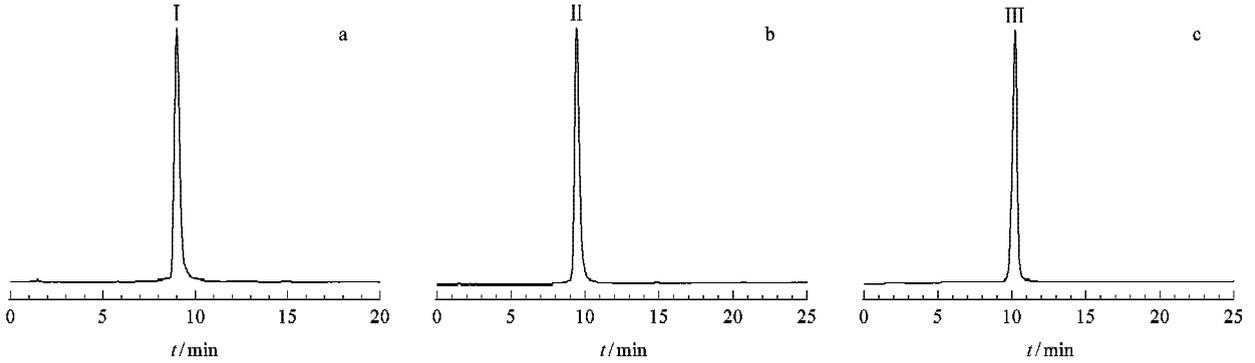


图 2 (a)化合物 I、(b)化合物 II 和(c)化合物 III 的高效液相色谱分离图

Fig. 2 Chromatograms of (a) compound I, (b) compound II and (c) compound III

面积归一法计算,3 个化合物的纯度依次为 99.3%, 98.3%和 97.6%;保留时间分别为 8.925,9.358 和 10.14 min。高效薄层色谱分离结果见图 3,各化合物均为单一斑点, $R_f$  值分别为 0.51,0.49 和 0.46。3 个化合物的熔点依次为 197~199 ℃、198~200 ℃ 和 170~173 ℃。上述结果表明各化合物均为单一成分。

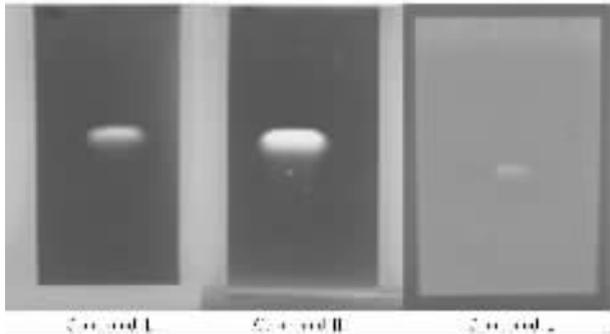


图 3 化合物 I、II 和 III 的高效薄层色谱图

Fig. 3 HPTLC spectra of compounds I, II and III

### 2.2 结构鉴定

经 UV、IR、MS、NMR 等光谱鉴定,确定化合物 I、II 和 III 分别为金丝桃苷、异槲皮苷和紫云英苷,其中紫云英苷为首次从荷叶中分离得到。

#### 2.2.1 化合物 I

外观为淡黄色粉末;熔点为 197~199 ℃;溶于乙醇、甲醇、稀碱溶液;HCl-Mg 反应呈紫红色;醋酸铅反应黄色加深,久放形成黄色沉淀;碱性试剂处理后黄色加深,久放呈棕色;UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (nm):257,360 sh;IR (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>):3390 (OH),1658 (C=O),1607,1563,1511,1455,1365,1305,1202,1169,1130,1086,1069,1020;<sup>1</sup>H NMR(二甲基亚砜(DMSO)) $\delta$ :7.66(1H,d),7.52(1H,s),6.80(1H,d),6.40(1H,s),6.20(1H,s),5.37(1H,d);<sup>13</sup>C NMR(DMSO) $\delta$ :177.5(C-4),164.2(C-7),161.2(C-5),156.3(C-9),156.2(C-2),148.5(C-

2'),144.8(C-3'),133.5(C-3),122.0(C-6'),121.1(C-1'),116.0(C-5'),115.2(C-4'),103.9(C-10),101.8(Gal:C-1),98.7(C-6),93.5(C-8),75.8(Gal:C-5),73.2(Gal:C-3),71.2(Gal:C-2),67.9(Gal:C-4),60.1(Gal:C-6);加钠 TOF MS ( $m/z$ ):487.0834,显示相对分子质量为 464。其<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和熔点数据与文献报道<sup>[9-16]</sup>基本一致,鉴定该化合物为 3-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基-槲皮素苷,即金丝桃苷。

#### 2.2.2 化合物 II

外观:黄色粉末;熔点为 198~200 ℃;溶于乙醇、甲醇、稀碱溶液;HCl-Mg 反应呈紫红色;醋酸铅反应黄色加深,久放形成黄色沉淀;碱性试剂处理后黄色加深,久放呈棕色;UV  $\lambda_{max}^{MeOH}$  (nm)257,359 sh (MeOH);IR (KBr)  $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>)3391(OH),1658 (C=O),1607,1505,1442,1362,1305,1274,1199,1169,1113,1062,1012;<sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ :7.70(1H,d),7.56(1H,s),6.85(1H,d),6.38(1H,s),6.19(1H,s),5.23(1H,d);<sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ :179.5(C-4),166.1(C-7),163.1(C-5),159.0(C-9),158.5(C-2),149.9(C-2'),145.9(C-3'),135.6(C-3),123.2(C-6'),123.1(C-1'),117.5(C-5'),116.0(C-4'),105.7(C-10),104.3(Glc:C-1),99.9(C-6),94.7(C-8),78.4(C-5),78.1(C-3),75.7(C-3),71.2(C-4),62.6(C-6);加钠 TOF MS ( $m/z$ )487.0834,显示相对分子质量为 464。其<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和熔点数据与文献

报道<sup>[9-15]</sup>基本一致,鉴定该化合物为 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-槲皮素苷,即异槲皮苷。

### 2.2.3 化合物 III

外观:淡黄色粉末;熔点为 170~173℃;溶于乙醇、甲醇、稀碱溶液;HCl-Mg 反应呈紫红色;醋酸铅反应黄色加深,久放形成黄色沉淀;碱性试剂处理后黄色加深,久放呈棕色;UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm) 268, 354 sh (MeOH);IR (KBr)  $\nu_{\max}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3 343(OH), 1 656(C=O), 1 607, 1 501, 1 443, 1 360, 1 283, 1 209, 1 178, 1 069, 1 069, 1 012;  $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.03(2H, d), 6.87(2H, d), 6.40(1H, d), 6.20(1H, d), 5.45(1H, d);  $^{13}\text{C NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 178.2(C-4), 164.7(C-7), 161.8(C-5), 160.2(C-4'), 157.7(C-2), 157.2(C-9), 134.1(C-3), 130.9(C-2'), 130.9(C-6'), 121.5(C-1'), 114.7(C-3'), 114.7(C-5'), 104.4(C-10), 102.7(Glc:C-1), 98.5(C-6), 93.4(C-8), 77.1(Glc:C-5), 76.7(Glc:C-3), 74.4(Glc:C-2), 70.0(Glc:C-4), 61.3(Glc:C-6);加钠 TOF MS( $m/z$ ): 471.088 1,显示相对分子质量为 448。其  $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$  和熔点数据与文献报道<sup>[9-17]</sup>基本一致,鉴定该晶体为 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-山奈酚苷,即紫云英苷。此化合物为首次从荷叶中分离得到。

## 2.3 讨论

### 2.3.1 提取条件的选择与优化

黄酮类化合物是植物体内非常重要的一类次生代谢产物,具有多种药理作用,是一类具有广阔开发前景的天然药物。本文比较了以热水、碱液、乙醇和丙酮为提取剂的提取效果,其中以丙酮的提取效果最佳,其次为乙醇。考虑到丙酮对人体有害,不符合健康食品要求,最后确定以乙醇作为提取溶剂。实验采用 30%、40%、50%、60%、70%、80% 6 个浓度的乙醇水溶液对荷叶中的黄酮类化合物进行提取。结果表明,当乙醇浓度较低时,提取率也较低;随着乙醇浓度加大,提取率逐渐上升;但当乙醇浓度太高时,提取率又逐渐下降。这可能是由于在提取时荷叶总是浮在液面上,而提取溶剂中乙醇浓度高而水的含量少时,荷叶不能吸收足够的水分而膨胀,荷叶中的黄酮类物质不能充分地溶出的缘故,所以实验最后确定以提取率最高的 60% 的乙醇水溶液作为提取溶剂。

### 2.3.2 高效制备液相色谱条件的选择与优化

在对 Fr-1 馏分进行制备分离时曾采用甲醇-水作为流动相进行等度洗脱,虽然经过充分的优化,但由于 A、B 两物质的结构非常相似(从鉴定结果可以看出),A 和 B 两个峰几乎完全重叠,未能达到理想

的分离效果。采用乙腈-水系统作为流动相,3 个目标成分基本达到基线分离,并且保留时间也适宜。在采用高效制备液相色谱法进行物质的分离纯化时,不但要求所分离的物质有较好的分离度,而且要求进样量大、收率高、实验运行时间短,以降低运行成本。利用高效液相色谱进行分析时常采用等度洗脱法,但在进行制备分离时等度洗脱法存在分离时间过长的缺陷,导致制备效率降低和溶剂消耗增加。本文从提高效率、节约溶剂的角度考虑,选用梯度洗脱方法来制备分离荷叶中的黄酮类物质。在液相色谱分离中通常都是等所有组分都流出后再平衡色谱柱,等色谱柱完全平衡后再进行下一次分离实验,因此柱平衡时间的长短直接影响实验效率,这也是作者建立本实验方法的重要考虑因素。本实验的柱平衡时间较长(约为 15 min 左右),为提高实验效率,作者通过多次的摸索发现在 42 min 也就是在 B 物质的峰差不多出来后就开始降低乙腈的浓度,这样不仅可以使各物质得到较好的分离,还可以缩短进样前的柱平衡时间,从而达到提高效率、节约成本的目的。

荷叶粗提物在聚酰胺柱色谱分离后还得到了另一组分 Fr-2。该组分经反复重结晶后得化合物 IV,经紫外光谱、红外光谱、核磁共振以及质谱等技术的分析鉴定,确定为槲皮素,纯度为 98.3%。

## 3 结论

高效制备液相色谱法分离制备化合物不仅能够得到高纯度的化合物单体,而且产率高,操作方便,便于收集,制备出的产品可作为对照品。该色谱分离方法为在天然产物中分离高纯度的化合物单体提供了参考。

本实验的荷叶原料来源于湖南省湘潭地区,因为荷叶的品种很多,不同地区、不同采摘时间的荷叶中的活性成分以及各成分的含量都会有差异,对这些差异性的比较还有待进一步的研究。

致谢:清华大学化学系王义明教授、王玉莉博士、任康宁博士、严诗楷博士、梁琼粼博士在化合物的 IR、MS 和 NMR 测定时给予了很大的帮助,在此表示真诚的感谢。

### 参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部. 北京:化学工业出版社), 2000: 231
- [2] Yu Z L, Guan Z S, Li J, Wang J J, Wu J. Study Journal of Traditional Chinese Medicine (喻泽兰, 关章顺, 李洁, 王俊

- 杰, 吴俊. 中医药学刊), 2003, 21(5):669
- [ 3 ] Du L J, Sun H, Li M, Jin W, Xu L Z. Chinese Traditional and Herbal Drugs( 杜力军, 孙虹, 李敏, 金文, 徐丽珍. 中草药), 2000, 31(7):526
- [ 4 ] Yu Y G, Chen H G, Zeng Q X. Chinese Traditional and Herbal Drugs( 余以刚, 陈海光, 曾庆孝. 中草药), 2001, 32(8):693
- [ 5 ] Li M Y, Chen J F, Qian F G, He W H. Chinese Journal of Stomatology( 李鸣宇, 陈健芬, 钱伏刚, 何卫华. 中华口腔医学杂志), 2003, 38(4):274
- [ 6 ] Tang Y F, Zhang M L, Ye J F, Zeng H Y. Guangzhou Food Science and Technology( 唐裕芳, 张妙玲, 叶进富, 曾虹燕. 广州食品工业科技), 2004, 20(2):57
- [ 7 ] Li J H. Food Science( 李敬华. 食品科学), 2004, 25(5):210
- [ 8 ] Elegami A A, Bates C, Gray A I, Mackay S P, Skellem G G, Waigh R D. Phytochemistry, 2003, 63(6):727
- [ 9 ] Zhao Y X, Sun X Y. The Spectral Identification of Organic Molecular Structure. Beijing: Science Press( 赵瑶兴, 孙祥玉. 有机分子结构光谱鉴定. 北京: 科学出版社), 2004:247
- [ 10 ] Zhao T Z.  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press( 赵天增. 核磁共振碳谱. 郑州: 河南科学技术出版社), 1993:226
- [ 11 ] Harborne J B. The Flavonoids. Dai L K, transl. Beijing: Science Press( 黄酮类化合物. 戴伦凯, 译. 北京: 科学出版社), 1983:51
- [ 12 ] Filippo I. Chemistry and Industry, 1979, 4:525
- [ 13 ] Gong Y H. The Chemical Shift for  $^{13}\text{C}$ -NMR of Natural Organic Compounds. Kunming: Yunnan Science and Technology Press( 龚运淮. 天然有机化合物的 $^{13}\text{C}$ 核磁共振化学位移. 昆明: 云南科学技术出版社), 1986:182
- [ 14 ] Yu D Q, Yang J S. The Handbook of Analytic Chemistry: Vol 7. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press( 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册: 第7分册. 第2版. 北京: 化学工业出版社), 1999:820
- [ 15 ] Chen D C. The Handbook of Chemical Reference Substances. Beijing: Medical and Scientific Publishing House of China( 陈德昌. 中国化学对照品工作手册. 北京: 中国医药科技出版社), 2002:278
- [ 16 ] Markham K R, Temai B, Stanley R, Geiger H, Mabry T J. Tetrahedron, 1978, 34(9):1389
- [ 17 ] Iwashina T, Ootani S. Phytochemistry, 1990, 29(11):3639

## 会 讯

# 第二届华东地区色谱、质谱学术交流会暨仪器展览会 在南京成功举行

由江苏省分析测试协会色谱专业委员会、有机波谱专业委员会和长三角洲质谱学术交流会联合举办、江苏省理化测试中心承办的第二届华东地区色谱、质谱学术交流会暨仪器展览会于2006年11月2日~4日在南京隆重召开。来自上海、浙江、安徽、江苏等华东地区及山东等省市从事色谱、质谱的科技工作者代表300余人参加了会议。大会邀请了中国特色谱学会理事长张玉奎院士, 南京大学陈洪渊院士, 中国特色谱学会副理事长兼秘书长许国旺教授, 中国质谱学会副理事长钱小红教授, 中国特色谱学会常务理事关亚风教授以及华东地区的知名色谱、质谱学者共12位专家作了精彩的大会专题学术报告。更多的与会代表则以书面形式进行了广泛的学术交流, 会议出版了与会学者撰写的70多篇学术交流论文集。大会期间有10多家国内外仪器厂商的代表与会并作了新产品应用方面的新方法、新技术报告。会议始终洋溢着浓郁的学术气氛, 生动活泼、富有新意。从事色谱、质谱学科的科技工作者首次聚集一堂, 共同研讨华东地区色谱、质谱技术的结合与发展, 推动色谱、质谱技术的普及与提高。

( 赵厚民、汤伟 供稿 )