

# 第十章 天然药物化学实验

## 第一节 天然药物化学实验引言

### 一、天然药物化学实验一般要求

天然药物化学是运用现代科学理论与技术研究天然药物中化学成分的一门学科,是药学、药剂、中药学等相关专业本科学生必修的专业课,也是国家执业药师(中药学)资格考试必考课程。本课程是在学生完成有机化学、分析化学、有机化合物波谱学、中药学、生药学、药理学等课程学习的基础上,重点讲授天然药物中化学成分的化学结构、理化性质、提取分离、结构鉴定、天然药物新药开发等方面的基本原理与实验技能,培养学生具有从事天然药物方面的研究、开发和生产能力,为我国药学事业的发展输送人才。

天然药物化学实验是天然药物化学课的重要组成部分。学习的主要目的是通过实验操作检验和巩固课堂上所学的理论知识,使学生对理论知识的理解更加深入,掌握得更加牢固;通过实验训练学生的基本操作技能,培养学生分析问题、解决问题的能力,使学生获得从事天然药物化学科研工作的基本训练;同时使学生养成严谨的科学态度和良好的科学作风。为使学生更好地了解专业英语,轻松地阅读专业英文文献,本版实验指导编辑了2个中英文对照实验题目。

实验教学的重点是加强学生基本操作技能的训练,学生在学习天然药物化学实验后,应基本掌握以下技能:

#### (一)提取分离

1. 掌握浸渍法、渗漉法、回流提取法、索氏提取法、重结晶法等提取或纯化技术的原理和操作。
2. 掌握纸色谱、薄层色谱、硅胶柱色谱、离子交换柱色谱的原理和操作。

#### (二)结构鉴定

1. 掌握各类化学成分的一般定性反应在成分鉴定中的应用。
2. 掌握紫外光谱在黄酮类结构测定中的基本应用。

## 二、学生实验成绩评定

学生实验总成绩由实验指导教师根据以下七项要求综合评定：

- (一)学生课前预习情况(5%);
- (二)实验过程中的合理安排(5%);
- (三)实验中的科学素养(10%);
- (四)仪器的操作规范与熟练程度(30%);
- (五)实验记录、结果及实验报告(30%);
- (六)实验理论笔试(10%);
- (七)实验专项技能/技术考核(10%)。

### 第二节 天然药物化学常用实验技能

#### 一、圆形(径向)纸色谱检识技术(Paper chromatography)

##### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：培养皿一对(直径相等)、色谱滤纸、毛细管、相关试剂等。
2. 准备色谱滤纸：取直径 12.5 cm 的圆形色谱滤纸，将滤纸划分出数个区间(根据所点样品的数目划分区间，滤纸不得有折痕或划痕)，在滤纸中心处用铅笔轻轻画直径约为 1.5~2.0 cm 的圆，做为点样起始线。在此圆的中心打一小孔，将一个长方形的滤纸条搓成一个滤纸芯，插在色谱滤纸的小孔中，纸芯与色谱滤纸垂直，纸芯的高度要比培养皿上下合盖后的内部高度稍低。
  3. 点样：用毛细管将样品及对照品溶液点在色谱滤纸上所画的圆形起始线上，做好标记，晾(吹)干。
  4. 选择及配制展开剂。
  5. 展开：将展开剂适量倒入培养皿中，上下盖好，平衡放置，保持 5 分钟左右，使其内部达液~气饱和。然后将色谱滤纸小心“扣盖”在培养皿的下皿中，色谱纸保持水平，纸芯保持直立并插入展开剂中，扣好培养皿上盖。展开剂将沿小纸芯向上浸湿，到达色谱滤纸后以一个圆形的湿斑慢慢向四周扩展。当展开剂浸湿色谱纸一定距离(一般接近培养皿边沿)后即可结束展开。将色谱滤纸取出，做好前沿标记，自然晾干或吹干(图 10-1)。

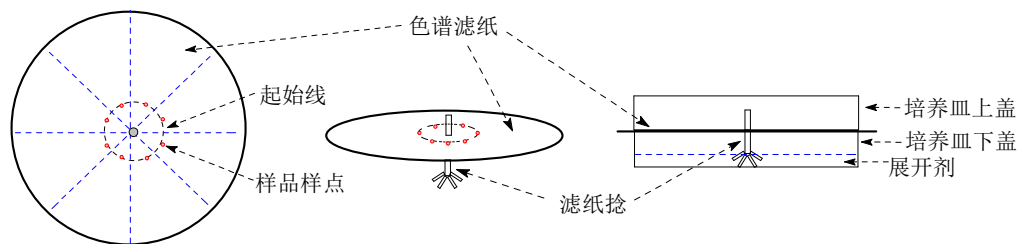


图 10-1 径向纸色谱装置示意图

6. 显色：根据所测样品性质选择合适的显色方法，观察色斑的位置。
7. 观察实验结果：确定出化合物斑点位置后，用尺子测量距离，计算比移值( $R_f$ )或与标准品对照。

## (二)注意事项

1. 色谱纸小心取放，不得折叠、污染。
2. 选择适宜展开剂，否则样品展开效果差。
3. 点样量要合适，浓度小则展开后观察不清楚，浓度太大则有拖尾现象。

## 二、硅胶薄层色谱检识技术(Thin Layer

### Chromatography, TLC)

河南警察大學藥學院天然藥物化學教研室

#### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：色谱缸、TLC 专用玻璃板(5 cm × 20 cm)、研钵、薄层用硅胶、0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液、其他相关试剂等。

#### 2. 制板

(1) 硅胶 G 板：称取 2.5~3 g 硅胶 G 放入研钵中，加入约 7~9 ml 0.5%的 CMC 水溶液(硅胶 : CMC = 1 : 2~3)混合成均匀的粘稠状溶液，再将其倒在 TLC 玻璃板上并涂布均匀，然后轻轻颠荡使硅胶均匀地分布，形成均匀厚度的硅胶层。水平放置，自然晾干。

(2) 荧光薄板：称取硅胶 GF<sub>254</sub> 2.5~3 g，同硅胶 G 法制备。

(3) AgNO<sub>3</sub>-硅胶 G 板：在硅胶 G 中加入 10%硝酸银水溶液调成均匀的糊状溶液，其余同硅胶 G 法制备。

3. 活化：将自然晾干的硅胶板放于烤箱中，在 105~110 °C 烘烤 0.5~1.0 小时，拿出自然降温并保存在干燥器中备用。

4. 点样：在距硅胶玻璃板下端 1.5~2 cm 处用铅笔轻轻划一直线，勿破坏硅胶平面，作为点样起始线。分别用毛细管将样品及对照品溶液点在起始线上，晾(吹)干并做好标记。样品点的直径应在 2~3 mm 以内，样品点之间的间隔应不少于 1 cm。

5. 选择及配制展开剂。

6. 展开：先将展开剂适量置于色谱缸中，再将薄层板放于色谱缸中(不得浸入展开剂中)，盖好上盖，保持 15 分钟左右，使其内部达液-气饱和。然后将硅胶板下端小心慢慢地浸入到展开剂中，勿使展开剂浸没点样起始线，加盖使色谱缸密闭。此时将会观察到展开剂沿硅胶板逐渐向上浸湿(即展开)，展开距离一般为 12 cm 以上。将硅胶板取出，在前沿处作出标记，自然晾干或吹干(图 10-2)。

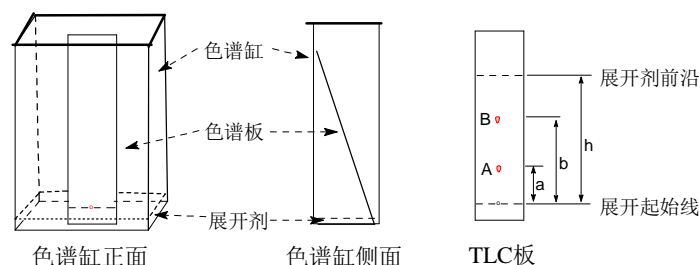


图 10-2 TLC 色谱操作示意图

7. 显色：根据样品性质选择合适的显色方法进行样品的显色观察。
8. 计算比移值  $R_f$  及与标准品对照。

## (二)注意事项

1. 硅胶板小心取放，不要受污染、刮蹭。
2. 样品的点样量要合适，如果浓度小则展开后观察不清楚；如果浓度太大或点样直径过大可能有拖尾现象。如果样品溶液的浓度较低，可用毛细管反复在点样处多点几次。
3. 展开剂一定要选择合适，否则样品展开分离效果差。
4. 荧光硅胶(硅胶-GF<sub>254</sub>)与硅胶-G 的使用方法相同，但不用显色剂，可在紫外灯(254 nm)下观察样品展开情况。

## 三、硅胶柱色谱分离技术(Column Chromatography, CC)

### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：玻璃色谱柱、铁架台、接收瓶、相关试剂等。
2. 装硅胶色谱柱

(1) 干法装柱：打开色谱柱下端活塞，放入适当干燥脱脂棉垫入底部。取 200~300 目的柱色谱用硅胶适量加入到色谱柱中，加完后不断轻轻敲打色谱柱壁，使硅胶紧密均实。

(2) 湿法装柱：在色谱柱底部垫入适当干燥脱脂棉，打开色谱柱下端活塞。取 200~300 目的柱色谱用硅胶适量，置于烧杯中，加入适量的有机溶剂，搅拌使硅胶完全湿润并无气泡，然后将硅胶加入到色谱柱中。注意加硅胶时要打开活塞，让硅

胶自然下沉，液面保持在硅胶之上，硅胶柱中不得有气泡。加样前，液面高度要保持在 10~20 mm 左右。

### 3. 加入待分离样品

(1) 方法 I: 一般将样品溶液溶于少量初始的洗脱剂中，制成样品溶液，轻轻注入已准备好的硅胶柱上面，勿使柱面受到扰动，否则影响色谱效果。

(2) 方法 II: 如样品不溶于初始的洗脱剂，则将样品溶于挥发性的溶剂(如甲醇、丙酮等)中，然后取少量吸附剂与其拌匀，除尽溶剂，再将含有样品的吸附剂均匀地加入到色谱柱的顶端，再覆盖上少量保护硅胶或脱脂棉、小玻璃球将其压住，以防洗脱时冲乱顶部的拌样硅胶。

### 4. 选择及配制洗脱剂。

5. 洗脱与接收: 将洗脱剂置于色谱柱最上面安装好的分液漏斗中。打开色谱柱下端活塞，然后打开分液漏斗活塞滴加洗脱剂开始洗脱并接收，洗脱时要始终保持洗脱剂液面在样品层之上，洗脱剂流速保持在 1~2 滴/秒左右。等份收集洗脱液，一般先选用洗脱能力弱的溶剂，然后逐步增加洗脱能力(图 10-3)。

### 6. 配合 TLC 或其他方法即时检查洗脱液(即: 接收液)。

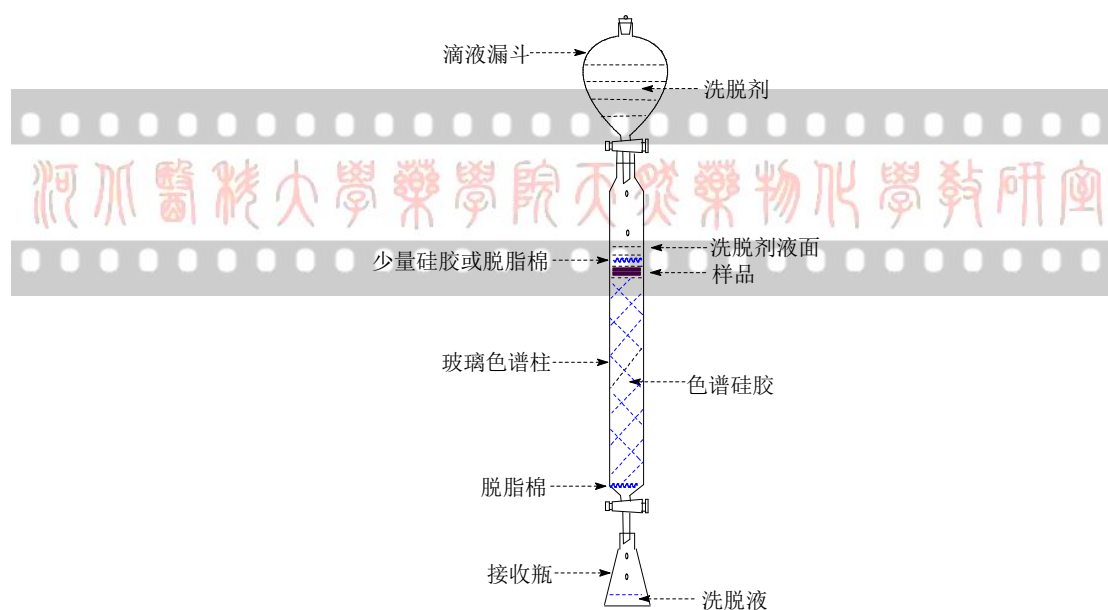


图 10-3 硅胶色谱分离装置示意图

## (二)注意事项

1. 硅胶吸附拌样的比例约为: 样品:硅胶=1:1 或 1:2。
2. 吸附剂硅胶的使用量比例约为: 样品:硅胶=1:30~60 或 1:100(难分离物)。
3. 洗脱剂的极性选择要合适，否则得不到很好的分离。
4. 洗脱的速度要合适，一般保持在 2~5 ml/min。

## 四、离子交换柱色谱分离技术(Ion Exchange

## Chromatography)

### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：色谱柱、铁架台、接收瓶、相关试剂等(仪器装置可参考图 10-3)。

2. 活化树脂(以强酸型阳离子交换树脂为例)：按交换样品的性质选择树脂，根据树脂的交换容量及样品的量，称取适量树脂。新树脂用无水乙醇浸泡 12 h 以上除去杂质，再用蒸馏水浸泡 24 小时溶胀。将色谱柱固定在铁架台上，调节合适高度以便接收。在色谱柱底部垫入适当脱脂棉，将树脂装入色谱柱中，水溶液面始终浸没树脂，避免树脂中产生气泡空洞。先用 5 倍量的 2 mol/L 盐酸水溶液冲洗树脂使之转为  $H^+$  型，再用蒸馏水冲洗为中性；然后用 5 倍量的 5% 氢氧化钠水溶液冲洗树脂使之转为  $Na^+$  型，再用蒸馏水冲洗为中性；最后用 5 倍量的 5% 盐酸水溶液冲洗树脂使之转为  $H^+$  型，用蒸馏水冲洗为中性，备用。

3. 交换：将样品的水溶液从色谱柱上端加入，按流出液约 2~4 滴/秒的速度进行交换。

4. 再交换(洗脱)：用合适的方法再将交换到树脂上的成分交换下来并接收。

5. 再生：将使用完后的树脂采用活化的方法可再生循环利用。

### (二)注意事项

1. 离子交换树脂的交换容量一般在 1~10 mmol/g，选择树脂时要看说明书的技术指标。但实际的交换容量受溶液的 pH 值及离子交换树脂生产批次等的影响，都比理论值要小。

2. 始终保持液面高于树脂，以免发生树脂中溶液干涸，产生气泡空洞，影响交换。

3. 在树脂柱上部加盛有待交换样品溶液的滴液漏斗，方便加液。

4. 随时检查交换情况。

## 五、渗漉提取技术(Percolation)

### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：渗漉筒、铁架台、霍夫曼夹、接收瓶、配制提取溶剂等。

2. 粉碎药材：将药材粉碎成 50 目左右，以利于提取溶剂进入药材内部。

3. 渗漉及接收：将渗漉筒固定在铁架台上，调节合适高度以方便接收，筒内下端放置纱布或滤纸，关闭霍夫曼夹。将药材放在烧杯中，加少量提取溶剂搅拌润湿

后，放入渗漉筒中，将药材适当压紧。从渗漉筒上部加入提取溶剂将药材浸没，保持浸泡一定时间。打开霍夫曼夹，从下端接收提取溶液(渗漉液)，渗漉速度一般为3~6 ml/min(图 10-4)。

4. 即时检查：用合适的方法随时检查是否含有待提取的成分。

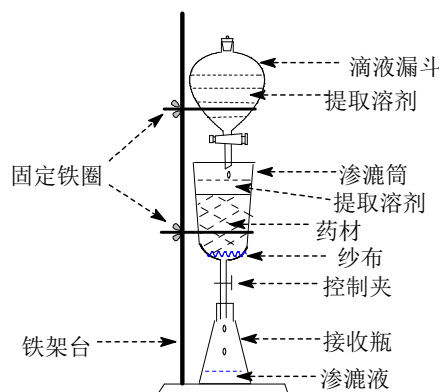


图 10-4 渗漉装置示意图

## (二)注意事项

1. 在渗漉提取中应始终保持提取溶剂完全浸没药材。
2. 当渗漉液中检查不出提取成分或低于要求时，即可认为提取结束。

## 六、索氏提取技术(Soxhlet Continuous Reflux)

### (一)操作技术及程序

1. 准备仪器及试剂：索氏提取器、铁架台、热源(如电热套或水浴)、有关试剂等。
2. 安装仪器：选取合适规格的索氏提取器，按照由下到上的顺序安装固定好索氏提取器。整套仪器应保持垂直(图 10-5)。
3. 处理样品及加样：将待提取的固体样品用滤纸包好，不能有漏缝，然后放入索氏提取器的中心部分。样品滤纸包要用玻璃制重物压住，以免样品在溶剂浸泡时浮起。
4. 加入提取溶剂：取适量提取溶剂放入溶剂瓶中，并加沸石。
5. 加热回流提取：打开冷凝水，调节热源进行加热回流提取。提取结束后要首先关闭热源，待提取液完全冷却后再按由上到下的顺序拆卸仪器，并将提取液转移到合适的容器中。

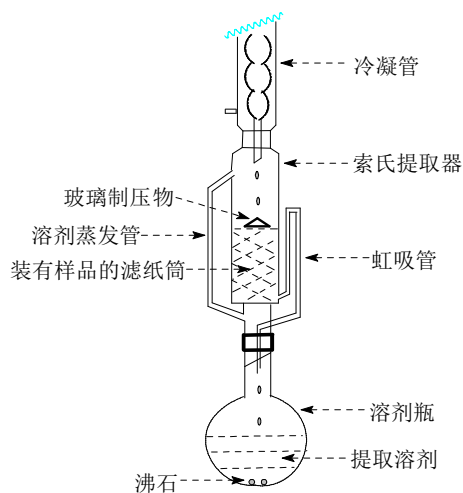


图 10-5 索氏提取装置示意图

## (二)注意事项

1. 如果用非水溶剂提取则整套索氏提取器应无水干燥。
2. 待提取样品放置的高度不应超过虹吸管高度。
3. 加热回流前要在溶剂瓶中放沸石，溶剂使用量不应超过溶剂瓶体积的 2/3。

加热前应检查整套仪器磨口连接部分是否密闭。

河南中医药大学药学院天然药物化学教研室

## 第三节 天然药物化学实验各论

### 实验 1 大黄中蒽醌苷元的提取、分离和蒽醌类化合物的检识

#### 一、实验目的与要求

1. 掌握从大黄中提取、分离蒽醌类化合物的原理及方法。
2. 掌握硅胶柱色谱分离技术原理及仪器的规范操作。学会干法装柱。
3. 掌握硅胶薄层 TLC 板的制备方法。
4. 掌握蒽醌类化合物的化学检识方法。



## 二、实验原理

大黄记载于《神农本草经》等许多文献中，具有泻热通肠、凉血解毒、逐淤通经之功效，用于泄下、健胃、清热、解毒等。自古以来，大黄在植物性泻下药中具有重要作用，是一味很早就被各国药典所收录的植物药。大黄的种类繁多，优质大黄是蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、大黄(*R. officinale* Baill)及唐古特大黄(*R. tangutium* Maxim.et Regl)的根茎及根。大黄中含有多种游离的羟基蒽醌类化合物以及它们与糖所形成的苷，已知其中所含蒽醌苷元主要有下列五种(结构见图 10-6):

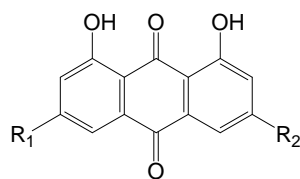


图 10-6 大黄中主要蒽醌苷元结构

表 10-1 大黄所含游离蒽醌苷元的性质

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	名 称	晶 形	熔 点(°C)
-H	-COOH	大黄酸(Rhein)	黄色针晶	318~320
-CH <sub>3</sub>	-OH	大黄素(Emodin)	橙色针晶	256~257
-H	-CH <sub>2</sub> OH	芦荟大黄素(Aloe-emodin)	橙色细针晶	206~208
-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	大黄素甲醚(Physcion)	砖红色针晶	207
-H	-CH <sub>3</sub>	大黄酚(Chrysophanol)	金色片状结晶	196

大黄中蒽醌苷元，其结构不同，因而极性强弱也不同，极性强弱顺序为大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚。

为提高游离的蒽醌苷元的提取收率，实验中先采用酸水解使大黄粉中苷元含量增加、水解物再用乙醚进行提取、提取后再依据苷元不同结构及极性采用柱色谱的技术进行分离。

## 三、仪器与试药

### 1. 实验仪器

玻璃色谱柱(21 mm × 200 mm)及配套分液漏斗，100 ml 三角瓶，蒸发皿，试管，玻璃板(5 × 20 cm)，色谱缸，滤纸，玻璃漏斗，铁架台，脱脂棉，250 ml 园底烧瓶，球形冷凝管，恒温水浴锅，抽滤瓶，布氏漏斗，紫外灯。

### 2. 药品及试剂

大黄粉(外购)，硅胶(柱色谱用 200~300 目)，硅胶 G，乙醚(分析纯)，石油醚(60~90°C)，乙酸乙酯(分析纯)，20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，1% NaOH，0.5% CMC 溶液，1% 茜草素乙醇溶液，0.5% 醋酸镁甲醇溶液。

## 四、实验步骤

### 1. 大黄中蒽醌苷元的提取与分离

取大黄粉 5 g 置于 250 ml 的圆底烧瓶中, 再加入 20%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  水溶液 60 ml, 在水浴上回流 2 小时。冷却后抽滤, 滤饼用水洗至近中性后抽干, 然后自然干燥或 70℃ 左右烘干。滤饼干燥后, 加入乙醚 25 ml 浸泡, 放置室温浸泡 2~3 天。称取 200~300 目硅胶 30 g 采用干法装柱。过滤乙醚浸泡提取液并将滤液慢慢滴加到盛有约 1 g 硅胶的蒸发皿中, 水浴使乙醚挥干, 得到完全干燥的吸附有待分离样品的硅胶, 然后将其加入到柱色谱的顶端, 再加入少量保护硅胶或脱脂棉(以防洗脱时冲乱顶部的拌样硅胶)。用石油醚/乙酸乙酯(7:3)为洗脱剂进行洗脱(配制洗脱剂 200 ml), 待最初的有色段向下移动到距硅胶柱底端约 1 cm 左右时开始收集洗脱液, 约 5~7 ml 为一份, 至主要成分洗脱完全为止。使用硅胶 TLC 检查总提取物(乙醚浸泡液)和各份洗脱收集液, 展开剂为石油醚/乙酸乙酯(7:3)。根据 TLC 检查结果, 将相同成分洗脱液合并并水浴回收溶剂, 即可得单体化合物。(注: 提前制备 TLC 用硅胶 G 板 4 块)

### 2. 蒽酯类化合物的检识反应

(1) 碱液试验(Bornträger's 反应): 取样品洗脱接收液及 1% 茜草素乙醇溶液各 2 ml, 分别加入 1% NaOH 水溶液 2 ml, 振摇放置分层后, 观察颜色变化。

(2) 乙酸镁试验: 在一小张滤纸上滴加样品溶液及 1% 茜草素乙醇溶液各 1 滴, 干燥, 喷 0.5% 乙酸镁甲醇溶液, 于 80℃ 加热 5 min, 观察斑点颜色。

## 五、思考题

1. 大黄中总蒽醌苷元的提取、分离原理各是什么?
2. 写出本实验中蒽醌苷元的提取分离流程图。
3. 以石油醚/乙酸乙酯(7:3)为展开剂对大黄中 5 个蒽醌苷元进行硅胶 TLC 检识, 其  $R_f$  值如何顺序? 为什么?

## Experiment 1 Extraction, Isolation and Detection of Anthraquinones from *Rheum palmatum* L.

### 1. Objective

1. To master extraction, isolation principles and methods of anthraquinones from *Rheum palmatum* L.
2. To master the separation principle and method of silica gel column chromatography, and to learn dry column-packing method.

3. To learn the method of preparation of silica gel thin layer plate.
4. To learn the chemical methods of detecting anthraquinones.

## 2. Experimental principles

*Rhubarb* was recorded in *Shen Nong's Herbal Classic*. It has the effects of reducing internal heat, defaecation, cooling blood, detoxification, eliminating stasis, and dredging collateral channels. It is traditionally used for defaecation, promoting digestion, clearing heat, and detoxication as a folk medicine. *Rhubarb* is a famous plant purgating drug, and has been recorded early in pharmacopoeia of many countrys. All the roots and rhizomes of *Rheum palmatum* L., *Rheum officinale* Baill, and *Rheum tanguticum* Maxim. et Regll could be used as *Rhubarb*. Its chemical constituents contain various hydroxy-anthraquinones and their glycosides. The main anthraquinone aglycons are listed in the following table:

Table 10-1 Characteristics of main anthraquinone aglycons

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Compounds	Crystal form	Melt point(°C)
-H	-COOH	Rhein	Yellow needle crystal	318~320
-CH <sub>3</sub>	-OH	Emodin	Orange needle crystal	256~257
-H	-CH <sub>2</sub> OH	Aloe-emodin	Orange needle crystal	206~208
-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	Physcion	Brick-red needle crystal	207
-H	-CH <sub>3</sub>	Chrysophanol	Golden flaky crystal	196

Polarity of anthraquinone aglycons in *Rhubarb* is different because of their different structures, especially substitution groups. Their polarity, from strong to weak, is in the sequence of Rhein, Emodin, Aloe-emodin, Physcion and Chrysophanol.

The method of acid hydrolysis of *Rhubarb* Powder is used for higher aglycons' yield. The hydrolysis product, aglycon, is extracted with ethyl ether, and the ethyl ether extraction is separated by silica gel column chromatography according to their polarity.

## 3. Instruments and reagents

### 1. Experimental instruments

Glass chromatographic column (21 mm×200 mm, 24#), globe-shaped funnel (250 ml, 24#), flask (100 ml), evaporating dish, test tube, glass thin layer plate(5×20 cm), filter paper, glassfunnel, iron support stand, absorbent cotton, round bottom flask, economical allihn condenser, thermostat water bath, Büchner flask, Buser funnel, ultraviolet lamp.

### 2. Reagents and drugs

*Rhubarb* Powder, silica gel (200-300 mesh), silica gel G, ethyl ether (AR), petrolum ether (60-90°C, AR), ethyl acetate (AR), 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5% CMC, 1% alizarin

alcohol solution, 0.5% magnesium acetate methanol solution.

#### 4. Experimental procedures

##### 1. Extraction and Isolation of Anthraquinone from *Rheum palmatum* L.

The dried and finely ground plant material (5 g) of *Rheum palmatum* L. is hydrolyzed with 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60 ml) at water bath for 2 hours (operating in 250 ml round bottom flask), hydrolyzed material is obtained after vacuum filtration (washed to neutral with water) and air drying.

Dried hydrolyzed material is extracted with ethyl ether (25 ml) at room temperature about 2-3 days. The ethyl ether extraction is subjected to separation over a silica gel column and eluted with a petroleum ether-EtOAc gradient solvent system (7:3, ~200 ml). Eluents are collected with test tubes, 5~7 ml per fraction. The fractions are defined by the results of TLC (silica gel, developing solvent: petroleum ether-EtOAc 7:3). Each fraction then is evaporated and obtains pure compounds. Column chromatography operation is as follows:

The ethyl ether extraction is adsorbed onto 0.5~1.0 g silica gel (200~300 mesh) in evaporating dish and the solvent is evaporated at water bath, thus obtained sample silica gel. Dry column-packing method: silica gel (30 g, 200~300 mesh) is added to the chromatography column, then sample silica gel is packed on the top, some silica gel and absorbent cotton are placed on the top of the sample to prevent washing the sample in a mess when adding solvent on the top.

##### 2. Chemistry detection reactions

###### (1) Bornträger's reaction

Sample eluent and 1% alizarin alcohol solution each 2 ml are added 2 ml 1% NaOH at test tube, respectively, shake and then standing, observe color changes.

###### (2) Magnesium acetate test

Taking a drop of sample eluent and 1% alizarin alcohol solution are added on the same filter paper strip (3×10 cm), and then 0.5% magnesium acetate methanol solution is sprayed on this strip, observe color changes after heated at 80°C about 5 min.

#### 5. Questions

1. What are the principles of extraction and isolation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L.?
2. Try to write extraction and isolation flow chart of anthraquinone aglycons.
3. What about the R<sub>f</sub> values of five anthraquinone aglycons when they are separated by silica gel thin-layer chromatography and developed with petroleum ether: ethyl acetate (7:3), and why?

## 实验2 芦丁的提取、精制和槲皮素的制备；黄酮、糖类化合物的检识反应(综合性实验)

### 一、实验目的与要求

1. 掌握从槐花米中提取与精制芦丁的原理和方法。
2. 掌握从黄酮苷通过酸水解制取黄酮苷元的方法。
3. 掌握纸色谱鉴别操作技术。
4. 掌握黄酮类化合物和糖类的一般定性检识方法。

### 二、实验原理

芦丁(rutin)亦称芸香苷(rutoside), 为广泛存在于植物界中的黄酮苷类化合物。现已发现含芦丁的植物至少在 70 种以上, 如: 烟叶、槐花、荞麦和蒲公英等植物中, 尤以槐花米(植物 *Sophora japonica* 未开放的花蕾)和荞麦中含量最高, 可作为大量提取芦丁的原料。芦丁具有维生素 P 样作用, 有助于保持及恢复毛细血管的正常弹性, 主要用作防治高血压病的辅助治疗药。芦丁为浅黄色粉末或极细的针状结晶, 一般常含有 3 分子结晶水, 芦丁 mp174~178℃, 无水芦丁 mp188~190℃; 溶解度: 冷水中为 1:10000, 热水中 1:180, 冷乙醇 1:650, 热乙醇 1:60, 冷吡啶 1:12; 微溶于丙酮、乙酸乙酯, 不溶于苯、乙醚、氯仿、石油醚, 溶于碱而呈黄色。芦丁是由槲皮素(quercetin)分子结构中 3-位上的羟基与芸香糖(rutinose)脱水而成的苷(芦丁与槲皮素的关系见图 10-7)。

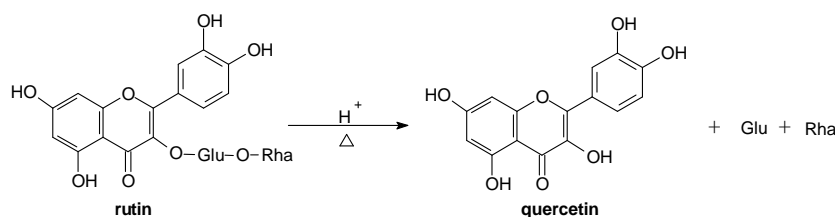


图 10-7 芦丁与槲皮素的关系

本实验利用芦丁具有一定的弱酸性即在碱水中可成盐而增大溶解能力的性质, 采用弱碱性水溶液(石灰水)为溶剂煮沸提取, 碱水提取液再加酸酸化后即可析出芦丁的结晶, 再利用芦丁对冷水和热水溶解度相差悬殊的特性进行精制。芦丁用酸回流水解即可得槲皮素。

### 三、仪器与试药

#### 1. 实验仪器

烧杯(1000、500、50 ml), 园底烧瓶(250 ml), 环形冷凝管, 玻璃漏斗, 抽滤瓶,

布氏漏斗, 三角瓶(100 ml), 蒸发皿, 玻璃板(5 × 20 cm), 色谱缸, 滤纸, 脱脂棉, 紫外灯, 点样毛细管等。

## 2. 药品及试剂

槐花米, 氧化钙, 95%乙醇, 氢氧化钡, 正丁醇, 冰醋酸, 乙酸乙酯, 甲酸, 浓硫酸, 镁粉, 浓盐酸, 浓氨水, 硅胶 GF<sub>254</sub>, 葡萄糖、鼠李糖的水溶液, 邻苯二甲酸-苯胺试剂, 标准芦丁乙醇溶液, 标准槲皮素乙醇溶液, 1%三氯化铝乙醇溶液, 1%葡萄糖溶液, 1%蔗糖溶液, 1%可溶性淀粉溶液,  $\alpha$ -萘酚试液, 1%芦丁乙醇溶液, 1%槲皮素的乙醇溶液, 1%橙皮苷的甲醇溶液, 黄芩苷的乙醇饱和溶液, 1%三氯化铁溶液, 2%二氯氧钼甲醇溶液, 2%柠檬酸甲醇溶液, 0.5%醋酸镁甲醇溶液, 甲醇钠溶液, 无水醋酸钠, 硼酸, 无水三氯化铝, 聚酰胺薄膜等。

## 四、实验步骤

### 1. 芦丁的提取与精制

取干燥槐花米 30 g 在研钵中研碎后置于 1000 ml 烧杯中, 加入 300 ml 热水, 再加入饱和石灰水溶液调 pH  $\approx$  8, 加热煮沸 10 min, 趁热用纱布过滤, 得提取液; 再将固体药渣中加入 250 ml 热水(先用饱和石灰水溶液调 pH  $\approx$  8), 加热煮沸 10 min, 趁热用纱布过滤, 又得提取液。将两次提取液合并, 小心滴加 10% 盐酸调 pH  $\approx$  4, 冷却静置, 待沉淀完全析出后, 抽滤, 沉淀用水洗涤至中性后将沉淀转移至培养皿中自然干燥, 得粗品芦丁。将提取的粗品芦丁用蒸馏水进行重结晶后得精制芦丁, 自然干燥并称重记录, (同时制备硅胶 GF<sub>254</sub> 板 1 块)。

注: 取少量固体氧化钙加水搅拌, 放置 10 min 左右(须有不溶氧化钙固体存在), 取上清液即为饱和石灰水溶液。

### 2. 槲皮素的制备

称取精制芦丁 1 g 置于 250 ml 圆底瓶中, 加入 100 ml(V/V)的 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 隔石棉网直火煮沸回流约 30 min(注意观察现象: 未加热时瓶内为混悬液; 加热后混悬液逐渐变为澄清液; 继续加热后澄清液体又逐渐变为混悬液)。冷却水解液, 抽滤, 滤液保存于三角瓶中待作糖的检识, 所得沉淀用少许水洗涤后自然干燥即得粗品槲皮素, 自然干燥并称重、计算苷元与糖的重量比。粗品槲皮素用 95%乙醇进行重结晶后即得纯品槲皮素。

### 3. 糖的径向纸色谱检识

取 20 ml 水解芦丁后的滤液加适量 Ba(OH)<sub>2</sub> 固体细粉调溶液 pH 到中性, 用玻璃漏斗过滤至蒸发皿中, 再在水浴上浓缩至 2 ml 左右, 供径向纸色谱点样用, 同时用葡萄糖标准品水溶液(2 mg/ml)和鼠李糖标准品水溶液(2 mg/ml)进行对照。展开剂为正丁醇/冰醋酸/水(4:1:2)配制或正丁醇/冰醋酸/水(4:1:5, 取上层用)。显色剂为邻苯二甲酸-苯胺进行喷雾, 再用电吹风加热至出现棕褐色斑点。将样品色斑与标准品色斑对照并计算 R<sub>f</sub> 值, 作出结论。

### 4. 芦丁和槲皮素的硅胶 TLC 及聚酰胺薄膜检识

(1) 将自制的精品芦丁、槲皮素、芦丁标准品乙醇溶液(1 mg/10 ml)、槲皮素标准品乙醇溶液(1 mg/10 ml)进行硅胶 TLC 对照检识。展开剂为乙酸乙酯/甲酸/水(8:1:1), 喷雾 1%  $\text{AlCl}_3$  乙醇溶液显色或在紫外灯(365 nm)下观察荧光。将样品色斑与标准品色斑对照并计算  $R_f$  值, 给出结论。

(2) 取聚酰胺薄膜一块(2 cm×5 cm), 将上述芦丁标准品乙醇溶液(1 mg/10 ml)和槲皮素标准品乙醇溶液(1 mg/10ml)在聚酰胺薄膜上点样, 进行聚酰胺色谱对照检识。展开剂为 70% 乙醇, 喷雾 1%  $\text{AlCl}_3$  乙醇溶液显色或在紫外灯(365 nm)下观察荧光, 并计算  $R_f$  值, 给出结论。

#### 5. 糖和黄酮类化合物的颜色反应

(1) 糖的 Molish 检识反应: 取 4 支试管, 分别加入 1% 的葡萄糖溶液、1% 的蔗糖溶液、1% 的可溶性淀粉溶液和蒸馏水各 1 ml, 再向各试管加入  $\alpha$ -萘酚试液 2~3 滴, 混合后, 分别沿试管壁慢慢加入 1 ml 浓硫酸(不要振摇), 观察两相溶液界面处的颜色并比较 4 支试管反应的异同。

(2) 糖的显色反应: 取一滤纸条(约 12×3 cm), 用铅笔划三个圆圈, 于各圆圈内分别点 1% 的葡萄糖溶液、1% 的蔗糖溶液、1% 的可溶性淀粉溶液一滴, 待干燥后, 喷雾邻苯二甲酸-苯胺试剂, 置 100℃ 加热数分钟或用电吹风加热, 观察并比较三个圆圈斑点的颜色。

(3) 黄酮类化合物结构中酚羟基与  $\text{FeCl}_3$  的显色反应: 取 3 支试管, 分别加入 1% 芦丁乙醇溶液、1% 槲皮素乙醇溶液和 1% 橙皮苷甲醇溶液~1 ml, 再均加入 1%  $\text{FeCl}_3$  溶液 1 滴, 观察现象。

(4) 黄酮类化合物与盐酸/镁粉的显色反应: 取 3 支试管, 分别加入 1% 芦丁乙醇溶液、1% 槲皮素乙醇溶液和 1% 橙皮苷甲醇溶液~1 ml, 再均加少许镁粉, 振摇混匀, 分别缓缓滴加 3 滴浓盐酸, 观察现象。

(5) 黄酮苷的 Molish 检识反应: 取 3 支试管, 分别加入 1% 芦丁乙醇溶液、1% 槲皮素乙醇溶液和 1% 橙皮苷甲醇溶液~1 ml, 各试管加入  $\alpha$ -萘酚试液 2~3 滴, 混合后, 分别沿试管壁慢慢加入 1 ml 浓硫酸(不要振摇), 观察两相溶液界面处的颜色并比较 3 个试管反应的异同。

(6) 黄酮类化合物与  $\text{ZrOCl}_2$  的显色反应: 取 2 支试管, 分别加入 1% 槲皮素乙醇溶液、黄芩苷乙醇饱和溶液~1 ml, 然后均加入数滴 2%  $\text{ZrOCl}_2$  甲醇溶液, 注意观察颜色变化情况。再向试管中加入 2% 柠檬酸甲醇溶液, 观察颜色变化情况。

(7) 黄酮类化合物的荧光: 取一滤纸条(10×3 cm), 用铅笔划三个圆圈, 于各圆圈内分别点 1% 芦丁乙醇溶液、1% 槲皮素乙醇溶液、1% 橙皮苷甲醇溶液一滴, 干燥后观察在日光和紫外灯下三个样品的颜色; 接着将纸条放在水蒸气中熏 1 分钟、再用氨气熏片刻, 观察在日光和紫外灯下颜色变化; 再将纸条放在通风处放置 10 min 后, 观察在日光和紫外灯下颜色变化; 最后再喷雾 1%  $\text{AlCl}_3$  乙醇溶液, 干燥后在日光和紫外灯下观察颜色变化。

(8) 黄酮类化合物与金属离子的络合反应: 取一滤纸条(10×3 cm), 用铅笔划三个圆圈, 于各圆圈内分别点 1% 芦丁乙醇溶液、1% 槲皮素乙醇溶液、1% 橙皮苷甲

醇溶液一滴，干燥后喷雾 0.5% 醋酸镁/甲醇溶液，于 90℃ 加热 5 min，在日光和紫外灯下观察颜色变化。

## 五、思考题

1. 写出本实验提取及精制芦丁的流程图。
2. 芦丁和槲皮素在进行硅胶 TLC 时，分别在两种展开剂条件下(70% 乙酸；乙酸乙酯:甲酸:水=8:1:1)展开，它们的  $R_f$  值有什么不同？为什么？
3. 提取苷类化合物时应注意什么？
4. 提取芦丁工艺中影响产量和质量的主要因素是什么？
5. 比较芦丁和槲皮素在聚酰胺色谱上的分离结果与硅胶 TLC 结果的差异，试分析其原因？

## 实验 3 芦丁和槲皮素的紫外光谱测定

### 一、实验目的与要求

1. 掌握紫外光谱与黄酮类化合物结构的关系。
2. 通过测定芦丁、槲皮素的紫外光谱，掌握通过紫外光谱推测黄酮类化合物结构的方法与步骤。
3. 掌握 T6-紫外光谱仪的操作方法。

### 二、实验原理

多数黄酮类化合物因分子结构中存在着桂皮酰基和苯甲酰基组成的交叉共轭体系(见图 10-1)，其甲醇溶液在 200~400 nm 区间会出现两个主要吸收峰，称为峰带 I 和峰带 II，又因 B 环和 A 环上取代基的性质、位置或数量不同，将影响两带的位置和形状。根据带 I、带 II 的峰位、形状(或强度)和加入某些试剂(诊断试剂)后峰位的变化，可推测其结构(\*常用诊断试剂：甲醇钠、醋酸钠、醋酸钠/硼酸、三氯化铝、三氯化铝/盐酸)。

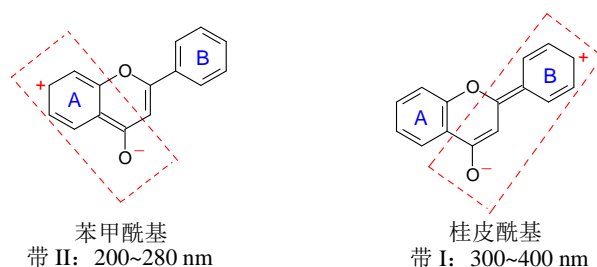


图 10-1 黄酮类化合物结构中的苯甲酰基和桂皮酰基结构



黄酮类化合物 UV 光谱测定程序:

- ① 测定样品在甲醇溶液中的 UV 光谱;
- ② 测定样品在甲醇溶液中加入各种诊断试剂后的紫外光谱;
- ③ 比较各种谱图吸收峰位的变化, 根据经验规律推断样品的结构。

### 三、仪器与试剂

1. 实验仪器: T6 紫外分光光度计。

2. 药品及试剂

芦丁样品: 精密称取芦丁 10 mg 于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀。从中吸取 5 ml 于 50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀备用(10  $\mu\text{g/ml}$ )。

槲皮素样品: 精密称取槲皮素 10 mg 于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀。从中吸取 5 ml 于 50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀备用(10  $\mu\text{g/ml}$ )。

甲醇钠溶液: 取新切割的金属钠 2.5 g, 小心分次加入到 100 ml 干燥的光谱纯甲醇中, 所得溶液密塞贮存于玻璃容器中备用。

无水醋酸钠: 取醋酸钠置蒸发皿中于 120 $^{\circ}\text{C}$  干燥 2 小时, 研碎备用。

无水硼酸: 研碎备用。

无水三氯化铝溶液: 取 1 g 无水  $\text{AlCl}_3$  小心加入到 20 ml 光谱纯甲醇中, 放 24 小时后即溶解备用。

盐酸溶液: 取浓盐酸 50 ml 加蒸馏水 100 ml 混匀后备用。

注: 取 30 ml 滴瓶, 每个滴瓶分别盛上述备用液, 放于紫外分光光度计旁, 供测定时用。

### 四、实验步骤

1. 芦丁的紫外光谱测定(220~550 nm 内进行扫描)

(1) “芦丁的基础 UV 光谱”: 取芦丁的甲醇溶液, 测定。

(2) “芦丁+ $\text{NaOCH}_3$ ”UV 光谱: 向 4.1.1 项中溶液里再加 3 滴甲醇钠溶液, 立即测定。

(3) “芦丁+ $\text{AlCl}_3$ ”UV 光谱: 取芦丁/甲醇样品溶液置石英杯中, 加入 6 滴三氯化铝溶液, 立即测定。

(4) “芦丁+ $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ”UV 光谱: 在测定完“芦丁+ $\text{AlCl}_3$ ”光谱后, 再向样品石英杯中加 3 滴盐酸溶液, 立即测定。

(5) “芦丁+ $\text{NaOAc}$ ”UV 光谱: 取芦丁/甲醇样品溶液置石英杯中, 加入无水醋酸钠振摇, 至比色杯底留有约 2 mm 厚的醋酸钠固体时测定。

(6) “芦丁+ $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$ ”UV 光谱: 在测定完“芦丁+ $\text{NaOAc}$ ”光谱后, 加入足量的无水硼酸使成饱和溶液, 立即测定。

2. 槲皮素的紫外光谱测定(220~550 nm 内进行扫描)(注: 测定步骤及方法同芦丁的测定)

## 五、结果分析

1. 解释芦丁的紫外光谱数据变化与其结构的关系。
2. 解释槲皮素的紫外光谱数据变化与其结构的关系。

表 10-2: 加入诊断试剂后黄酮类化合物 UV 图谱及结构归属

诊断试剂	带 II	带 I	归属
样品+MeOH	220~280 nm	300~400 nm	(基础图谱)
NaOMe		红移 40~60 nm, 强度不降	示有 4'-OH
		红移 50~60 nm, 强度下降	示有 3-OH, 无 4'-OH
		吸收谱随时间延长而衰退	示有对碱敏感的取代结构(如: 3,4'-; 3,3',4'-; 5,6,7-; 5,7,8-; 3',4',5'-羟基等)
NaOAc(未熔融)	红移 5~20 nm		示有 7-OH
		在长波一侧有明显肩峰	示有 4'-OH, 无 3-及/或 7-OH
NaOAc(熔融)		红移 40~65 nm, 强度下降	示有 4'-OH
		吸收谱随时间延长而衰退	示有对碱敏感的取代结构
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		红移 12~30 nm	示 B 环有邻二酚羟基结构
	红移 5~10 nm		示 A 环有邻二酚羟基结构(但不包括 5,6-位)
AlCl <sub>3</sub> 和 AlCl <sub>3</sub> /HCl		AlCl <sub>3</sub> 谱图 = AlCl <sub>3</sub> /HCl 谱图	示无邻二酚羟基结构
		AlCl <sub>3</sub> 谱图 ≠ AlCl <sub>3</sub> /HCl 谱图	示可能有邻二酚羟基结构
		峰带 I(或 Ia):	
		紫移 30~40 nm	示 B 环有邻二酚羟基结构
		紫移 50~60 nm	示 A、B 环均可能有邻二酚羟基
		AlCl <sub>3</sub> /HCl 谱图 = MeOH 谱图	示无 3-及 5-OH
		AlCl <sub>3</sub> /HCl 谱图 ≠ MeOH 谱图	示可能有 3-及/或 5-OH
		峰带 I:	
	红移 35~55 nm	示只有 5-OH	
	红移 60 nm	示只有 3-OH	
	红移 50~60 nm	示可能同时有 3-及 5-OH	
	红移 17~20 nm	除 5-OH 外, 还有 6-含氧取代基	

## Experiment 3 Determination of Rutin and Quercetin by UV Spectroscopic Method

### 1. Objective

- (1) To master the relationship between UV spectra and the structures of flavonoids.
- (2) To determine the structures of flavonoids by the UV spectra.
- (3) To master the operation method of T6-ultraviolet spectrometer.

## 2. Experiment principles

There are two main absorption peaks, called bands I and II, respectively, for the majority of flavonoids in methanol scanning from 200 to 400 nm in ultraviolet band, caused by two cross-shaped conjugation systems i. e. cinnamyl and benzoyl groups (Figure 10-1). The positions and shapes of the bands I and II are influenced by substituents on rings A and B. So according to the position, shape or intensity of bands I and II as well as the transformation of positions of the band with some diagnostic reagents, we can investigate the structures of flavonoids.

Common diagnostic reagents include sodium methoxide, sodium acetate, sodium acetate-boric acid, aluminium trichloride and aluminium trichloride-hydrochloric acid.

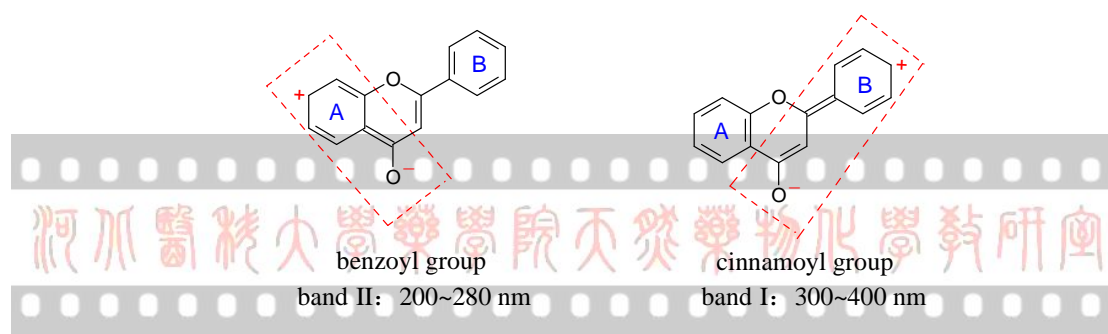


Figure 10-1 The structures of benzoyl and cinnamyl groups in flavonoids

Procedures of UV spectral determination in this experiment:

- a. Determination of the sample's UV spectrum in methanol.
- b. Determination of the sample's UV spectra after adding every diagnostic reagent in methanol solution, respectively.
- c. Deduce the structure of the sample according to the above spectra.

## 3. Instruments and reagents

- (1) Experiment instruments: T6-Ultraviolet spectrometer.
- (2) Reagents and drugs

Rutin sample, weigh precisely 10 mg of rutin into a measuring flask and dissolve with methanol to 100 ml. Pipet above solution 5 ml into a 50 ml measuring flask and dilute with methanol to 100 ml exactly, e.i. 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Quercetin sample, weigh precisely 10 mg quercetin to a measuring flask and dissolve with methanol to 100 ml. Pipet above solution 5 ml into a 50 ml measuring flask and dilute with methanol to the volume accurately, 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Sodium methoxide, weigh sodium metal 2.5 g and cut it into small pieces, then

gradually add the pieces into 100 ml methanol. The prepared solution must be stored in the airtight glass container and standby application.

Anhydrous sodium acetate, add sodium acetate in evaporating dish and dry at 120 degrees for 2 hours, then grind and standby application.

Anhydrous boric acid, grind and standby application.

Anhydrous aluminium trichloride, weigh about 1 g anhydrous aluminium trichloride and dissolve with 20 ml chromatogram class methanol, stored for 24 hours.

Hydrochloric acid, take 50 ml concentrated hydrochloric acid and diluted with 100 ml distilled water, blending and standby application.

#### 4. Determination procedures

(1) Determination of rutin UV spectra (scanning from 220 to 550 nm)

1) Determination of rutin UV spectra in MeOH.

2) Determination of rutin UV spectra in MeOH + NaOCH<sub>3</sub>: Load test sample to silici-cuvette, add 3 drops sodium methanol solution to the silici-cuvette and then scan immediately.

3) Determination of rutin UV spectra in MeOH + AlCl<sub>3</sub>: Load test sample to silici-cuvette and add 6 drops AlCl<sub>3</sub> solution to the silici-cuvette and then scan.

4) Determination of rutin UV spectra in MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl: Adding 3 drops of hydrochloric acid solution to the above sample solution, and then scan immediately.

5) Determination of rutin UV spectra in MeOH + NaOAc: Load test sample to silici-cuvette and add anhydrous sodium acetate, shake till the sediment on the bottom reached ca. 2 mm, and then scan.

6) Determination of rutin UV spectra in MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: Adding enough hydrochloric acid solution to the above sample solution, and then scan immediately.

(2) Determination of quercetin UV spectra (scanning from 220 to 550 nm):

All the determination methods refer to rutin as described above.

#### 5. Data analysis

(1) To explain the relationship between UV spectral data and the structure of rutin.

(2) To explain the relationship between UV spectral data and the structure of quercetin.

附：T6 分光光度仪光谱扫描程序使用指南

### 1. 光谱扫描参数设置

激活光谱扫描窗口，选择【测量】菜单下的【参数设置】子菜单，即可打开设置窗口。“测量、仪器、附件”三个选项卡中【测量】选项卡中的内容是设置扫描参数的主要内容。如图所示。



1.1. 光谱扫描光度模式：选择“Abs”吸光度模式。

1.2. 显示范围：设置光谱扫描图形中纵坐标的范围(一般为0.00~1.00)。

1.3. 扫描参数：设置扫描的波长范围、间隔、速度等参数。

【起点】和【终点】构成了横坐标扫描范围，设置为200~500nm，根据实验情况具体调整。

【速度】：扫描速度越快，数据的质量相对越不好；扫描速度慢，数据的质量相对越好。

【间隔】表示扫描的波长间隔。可选的扫描间隔有：0.1、0.2、0.5、1.0、2.0和5.0nm(根据仪器型号不同，扫描间隔也将会有所不同)。

【自动间隔】的作用是根据您设置的扫描范围来为您自动选择一个扫描间隔。

1.4. 扫描方式：【单次扫描】表示只进行一次扫描，不重复。

【重复扫描】表示可进行多次重复扫描。

【自动扫描】是根据选择的附件样品池的数量进行扫描。

如果选择了重复扫描，则需要设置扫描的【时间间隔】和【重复次数】。如果选择了自动扫描，则不需要设置重复次数，只要设置时间间隔就可以了。

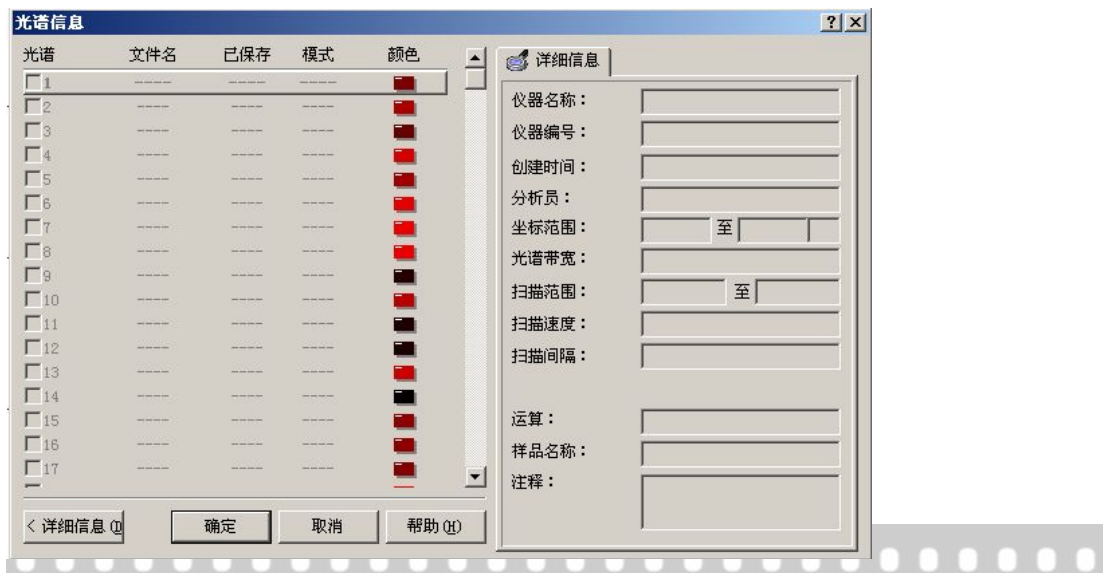
### 2. 光谱扫描

选择【测量】菜单下的【开始】子菜单，即可开始光谱扫描。如果要终止扫描，

可点击“停止”按钮或按ESC键。

### 3. 查看光谱信息

选择【图形】菜单下的【光谱信息】子菜单，即可打开光谱信息窗口。如图所示。在此窗口中，所有扫描的光谱将以列表的形式进行显示。任意点击一条光谱，在其右侧的详细信息窗口中将会显示其详细信息。还可以点击“颜色”按钮来改变对应光谱的颜色。



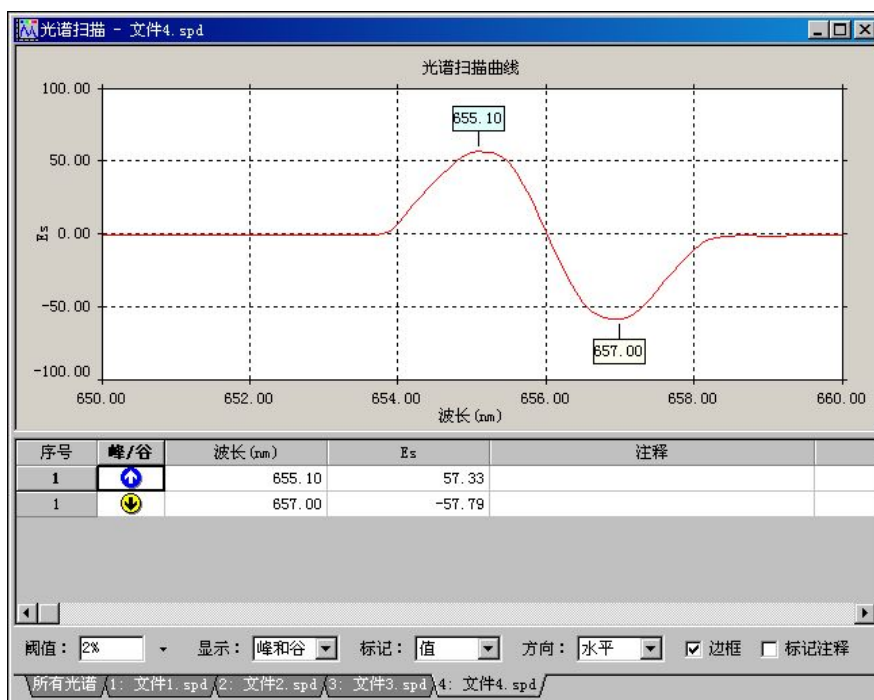
### 4. 保存和打开光谱文件

选择【文件】菜单下的【保存】子菜单，在弹出的保存窗口中输入要保存的文件名，然后点击【确定】按钮即可。当要浏览保存过的光谱文件时，可选择【文件】菜单下的【打开】子菜单，此时系统将弹出打开光谱文件窗口。如图所示，点击【属性】按钮可以查看光谱文件的详细信息。



### 5. 图形处理

打开一幅扫描谱图，选择【图形】菜单下的【峰值检出】子菜单，系统会自动对谱图中的峰、谷值进行检查，并把检查结果显示在检出表中。



#### 6. 组合显示

选择【图形】菜单下的【组合显示】菜单，并在其子菜单中选择【创建组合显示】，即可打开组合显示设置窗口。在窗口中，可选择需要组合的光谱，然后点击【确定】按钮即可。如果想清除组合显示，可选择【创建组合显示】菜单下的【清除组合】来清除当前的组合，或选择【清除全部组合】来清除全部曲线的组合显示设置。



#### 7. 导出到文件

选择【文件】菜单下的【导出数据】子菜单，系统将打开数据导出窗口。在窗口中，可以通过【导出类型】来对导出的文件类型进行选择，可以将数据导出到 Word 文件中，然后再对 Word 文件进行相应的编辑即可。在【导出文件】编辑框中输入要导出的文件名，或点击其右侧的“...”按钮对文件进行选择。设置完成后，点击【导出】按钮，系统会按照设置的内容将所有的数据导出到指定的文件中。

## 实验 4 苦参生物碱的提取、分离及生物碱的检识反应 (综合性实验)

### 一、实验目的与要求

1. 掌握离子交换法提取生物碱的原理及方法。
2. 掌握渗漉技术的原理及规范操作。
3. 掌握强酸性阳离子交换树脂的活化方法及规范操作。
4. 掌握索氏提取技术的原理及仪器的规范操作。
5. 掌握生物碱的定性检识方法。

### 二、实验原理

苦参为豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait)的根, 味苦性寒, 有清热利湿、祛风杀虫及解毒等功效, 主要用于湿热黄疸、赤白带下、痈肿疮毒、皮肤疥癣以及腮腺炎、痢疾等, 苦参制剂常用于急性菌痢、滴虫病、白细胞减少症、皮肤瘙痒等多种疾病。苦参中生物碱还具有减慢心率作用, 可用于心室早博等心律失常之症。苦参中主要含有苦参碱(matrine)、氧化苦参碱(oxymatrine)、槐果碱(sophocarpine)、氧化槐果碱(N-oxysophocarpine)、槐定碱(sophoridine)等(结构见图 10-2)。目前药理实验表明苦参碱、氧化苦参碱等还具有抗肿瘤作用。

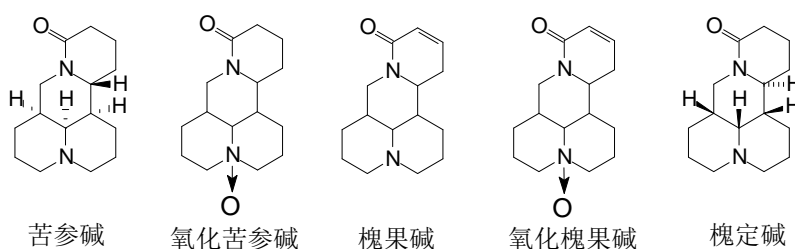


图 10-2 苦参中主要生物碱结构

利用苦参生物碱能与酸成盐而溶于水的特性, 通过渗漉法将苦参药材中的苦参总碱用稀酸提取, 再将酸水提取液通过阳离子交换树脂进行交换, 树脂再用浓氨水碱化进行再次交换, 然后以二氯甲烷为溶剂通过索氏提取方法从树脂中提取苦参总生物碱, 最后浓缩二氯甲烷提取液即得苦参生物总碱。

### 三、仪器与试药

#### 1. 实验仪器

玻璃色谱柱(21mm×200mm)及配套分液漏斗, 烧杯(50, 500, 1000 ml), 渗漉筒,



纱布, 100 ml 三角瓶, 索氏提取器, 蒸发皿, 玻璃板(5 × 20 cm), 色谱缸, 滤纸, 玻璃漏斗, 铁架台, 250 ml 园底烧瓶, 恒温水浴锅, 抽滤瓶, 布氏漏斗等。

## 2. 药品及试剂

苦参粗粉, 732 型强酸性阳离子交换树脂(交换容量: 45 毫克当量, 交联度: 1 × 7), 硅胶 G, 乙醇, 浓氨水, 二氯甲烷, 氯仿, 无水硫酸钠, 丙酮, 甲醇, 乙醚, 12 M 盐酸, 氢氧化钠, 改良的碘化铋钾试液, 碘化汞钾试剂, 硅钨酸试剂, 10% 硫酸铜试剂, 0.1% 硫酸奎宁水溶液, 0.1% 硫酸小檗碱水溶液, 0.1% 硫酸阿托品水溶液, 苦参生物碱水溶液(自制), 1% 盐酸麻黄碱水溶液, 等。

## 四、实验步骤

### 1. 阳离子交换树脂的预处理(活化)

称取 50 g 干树脂置于 100 ml 三角瓶中, 加少量酒精浸泡过夜, 次日倒出酒精, 用蒸馏水洗至溶液澄清, 然后倒入交换柱中。先用约 300 ml(约 8 倍量) 2 M 盐酸以 5~6 ml/min 的速度进行交换, 使其转为 H<sup>+</sup>型, 然后用蒸馏水洗至流出液呈中性。接着再用约 300 ml(8 倍量) 5% 氢氧化钠水溶液以同样速度使其转为 Na<sup>+</sup>型, 用蒸馏水洗至流出液呈中性。然后再用约 300 ml(8 倍量) 的 2 M 盐酸进行交换, 使之恢复 H<sup>+</sup>型。最后用蒸馏水冲洗至中性, 在蒸馏水中浸泡待用。

### 2. 苦参总碱的渗漉提取及离子交换

称取苦参粗粉 150 g, 用少量 0.1% 盐酸搅拌湿润后装入渗漉筒中(渗漉筒底部铺二层纱布), 加 0.1% 盐酸浸泡过夜。次日以 0.1% 盐酸为提取溶剂以 4~5 ml/min 的速度进行渗漉提取。边渗漉边检查生物碱反应(或测定 pH 的变化), 至渗漉液生物碱反应不明显为止(收集渗漉提取液约 1000 ml)。

(注: ① 提取溶剂如酸度太大或用量过大, 离子交换时可将交换吸附到树脂上的生物碱再交换洗脱下来, 因此渗漉溶剂酸度和用量要合适。② 将溶液滴在滤纸上再喷雾碘化铋钾试剂, 若有橙红色斑点说明溶液中含生物碱。)

将渗漉提取液(若固体杂质较多需用滤纸过滤处理)通过活化后的强酸性阳离子树脂, 交换速度为 4~5 ml/min 或以检查流出液是否有生物碱来控制交换速度。交换完毕后, 将树脂倒入 250 ml 烧杯中, 用蒸馏水洗至洗液无色, 再用乙醇洗两次, 将树脂倒至培养皿中自然晾干(或于 40~50℃ 烤箱中烘干)。

### 3. 索氏提取

将交换后干燥的树脂加 10 ml 左右的浓氨水拌湿, 密闭放置 20 min, 然后用滤纸包好, 放入索氏提取器中, 加入 200 ml 的二氯甲烷为溶剂进行索氏提取约 2 h(恒温水浴)。冷却二氯甲烷提取液后转入干燥具塞三角瓶中, 加无水硫酸钠干燥脱水, 干燥至少半小时以上。然后过滤, 滤液进行浓缩至溶剂挥尽, 残留物加入少量丙酮后再水浴热溶, 放置过夜自然冷却, 待结晶析出。再加少量丙酮处理结晶, 抽滤, 干燥, 即得粗品苦参总碱(浅黄白色结晶)。将苦参总碱粗品用约 20 倍的丙酮进行重结晶精制(保留母液供 TLC 鉴定用), 即得以氧化苦参碱为主的精制苦参总碱, 称重。

## 4. 苦参总碱的硅胶 TLC 鉴定

将自制苦参总碱、母液、苦参碱和氧化苦参碱的标准品点于硅胶板上，展开剂为氯仿/甲醇/浓氨水(8:2:0.25)，显色剂为碘化铋钾溶液，进行展开对照鉴别，对照观察生物碱斑点数量并计算相应各斑点的  $R_f$  值。(注：提前制备 TLC 用硅胶 G 板 2 块)

## 5. 生物碱的沉淀和显色反应

(1) 碘化铋钾反应：取 4 支试管，分别加入 0.1% 硫酸奎宁水溶液、0.1% 硫酸小檗碱水溶液、0.1% 硫酸阿托品水溶液及苦参生物碱水溶液各 1 ml，然后在各试管中均加入碘化铋钾试剂，振摇，观察生成沉淀情况。

(2) 碘化汞钾反应：取 4 支试管，分别加入 0.1% 硫酸奎宁水溶液、0.1% 硫酸小檗碱水溶液、0.1% 硫酸阿托品水溶液及苦参生物碱水溶液各 1 ml，然后在各试管中均加入碘化汞钾试剂，振摇，观察生成沉淀情况。

(3) 硅钨酸反应：取 4 支试管，分别加入 0.1% 硫酸奎宁水溶液、0.1% 硫酸小檗碱水溶液、0.1% 硫酸阿托品水溶液及苦参生物碱水溶液各 1 ml，然后在各试管中均加入硅钨酸试剂，振摇，观察生成沉淀情况。

(4) 麻黄碱的颜色反应：在试管中加入 1% 盐酸麻黄碱水溶液 1 ml，再加入 10% 硫酸铜试剂 2~3 滴，用氢氧化钠碱化应显兰紫色；继续往试管中加入乙醚，振摇分层后，醚层应呈紫红色(二水合物)、水层应呈兰色(四水合物)。反应原理见图 10-3。

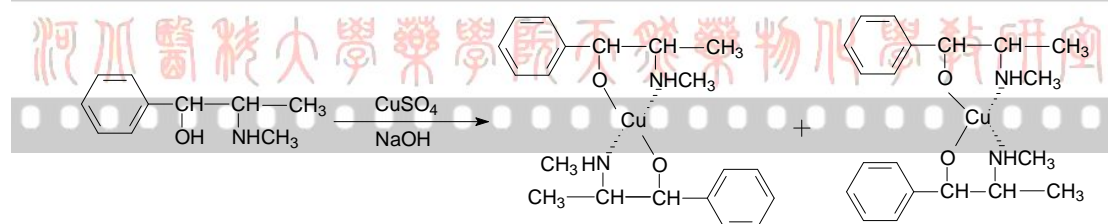


图 10-3 麻黄碱与硫酸铜的反应原理

(5) 显色反应：取一张滤纸条，分别点滴 0.1% 硫酸奎宁水溶液、0.1% 硫酸小檗碱水溶液、0.1% 硫酸阿托品水溶液及苦参生物碱水溶液各 1 滴，干燥后喷雾碘化铋钾试剂，观察各种样品显色情况。

## 五、思考题

1. 写出本实验中苦参生物碱的提取分离(离子交换法)流程图。
2. 离子交换树脂提取生物碱的原理和特点？
3. 使用索氏提取器有什么优点？应注意哪些问题？
4. 根据苦参生物碱的性质，请设计用溶剂法提取苦参生物总碱的流程。

## 实验 5 利用纸色谱先导设计法从洋金花中提取分离生物碱

(综合性实验)

## 一、实验目的与要求

1. 熟悉纸色谱先导设计法的原理与操作。
2. 掌握逆流分溶法(CCD法)的原理与操作。
3. 掌握洋金花中东莨菪碱和莨菪碱的理化性质与提取分离方法。

## 二、实验原理

洋金花是茄科(Solanaceae)植物白花曼陀罗(*Datura metel* Linn.)或毛曼陀罗(*Datura innoxia* Mill.)的干燥花,前者又称南洋金花、后者又称北洋金花。曼陀罗的叶、花、根和种子均含有莨菪碱(hyoscyamine)、东莨菪碱(hyoscine, scopolamine)、阿托品(atropine)等生物碱成分,含量高达0.2~0.5%。花中主要含莨菪碱和东莨菪碱(结构见图10-4),以东莨菪碱为多。洋金花味辛性温、有毒,有定喘、麻醉止痛之功效,主治哮喘、惊痫、风湿痹痛等,还可作手术麻醉剂。民间将洋金花与烟丝或烟叶混合,做成烟卷,用以治疗老年性慢性气管炎哮喘,缓解支气管平滑肌痉挛。东莨菪碱为粘稠状液体,  $K_b=3.5 \times 10^{-7}$ , 其一分子水合物为结晶体(mp: 59°C,  $[\alpha]_D: -18^\circ$ )。具有极强的亲水性,可溶于水(1:9.5),易溶于热水、乙醇、乙醚、氯仿、丙酮,难溶于四氯化碳、苯或石油醚,不与HgCl<sub>2</sub>生成黄色HgO沉淀。莨菪碱为固体(mp: 108.5°C,  $[\alpha]_D: -22^\circ/\text{EtOH}$ ),  $K_b=4.5 \times 10^{-5}$ , 易溶于无水乙醇中,能与HgCl<sub>2</sub>生成黄色HgO沉淀(加热后转为红色),加0.16%的氢氧化钠或120°C加热30 min即可转化为外消旋的阿托品。东莨菪碱和莨菪碱均能与多种无机酸或有机酸成盐而溶于水。

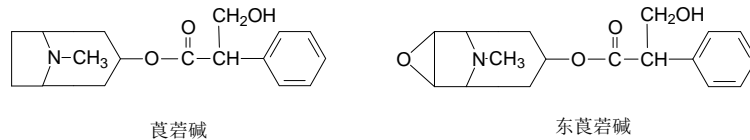


图 10-4 莨菪碱和东莨菪碱的结构

逆流分溶法(Counter current distribution, CCD)是一种多次的(即:具有数个萃取装置)或连续的液-液萃取分离方法。对于性质相似的化合物,简单一次萃取不能达到基本分离的目的,多采用 CCD 法分离。此法条件温和、样品容易回收、效率较高,样品较少时也适用,为常用的萃取分离技术。CCD 法操作见图 10-5。

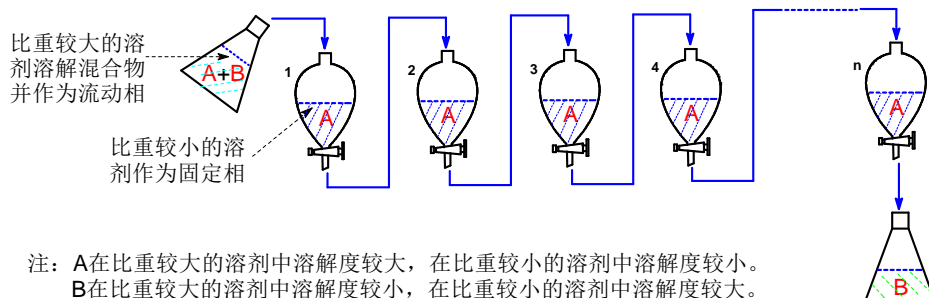


图 10-5 CCD 法操作示意图

纸色谱先导设计法是预先以纸色谱的结果及计算数据作指导来选择液-液两相萃取法分离混合物时所采用的两相萃取溶剂的方案。如可利用东莨菪碱和莨菪碱的弱碱性的差异, 选择合适 pH 值的萃取溶剂, 即在此 pH 条件下, 碱性较小的东莨菪碱( $K_b = 3.5 \times 10^{-7}$ )以分子状态溶解在有机溶剂中, 而碱性较大的莨菪碱( $K_b = 4.5 \times 10^{-5}$ )以离子状态溶解在水中, 从而达到分离的目的。

本实验利用东莨菪碱和莨菪碱与酸成盐而溶于水、碱化后游离而溶于氯仿的性质及其碱性差异, 先用酸水将洋金花中生物总碱提取出来、碱化后用氯仿萃取得到总碱, 再用纸色谱法找出 CCD 法萃取分离此二种生物碱的萃取条件, 最后用 CCD 法分离东莨菪碱和莨菪碱。

### 三、仪器与试剂

#### 1. 实验仪器

分液漏斗(125 ml 1 个、50 ml 4 个), 蒸馏装置一套, 三角瓶若干, 毛细管, 试管若干, 色谱滤纸, 脱脂棉。

#### 2. 药品及试剂

洋金花(外购), 氯仿, 浓盐酸, 浓氨水, 改良的碘化铊钾试液, 柠檬酸-碳酸氢钠缓冲水溶液(pH=5、6.5、7.5、8.5)四种, 氢溴酸东莨菪碱对照品溶液, 硫酸阿托品对照品溶液。

### 四、实验步骤

#### 1. 洋金花中总生物碱的提取

称取洋金花 15 g, 搓碎, 置于 100 ml 三角瓶中, 加蒸馏水 80 ml, 滴加浓盐酸调溶液 pH = 2, 浸泡过夜。抽滤, 将滤液倒入 125 ml 分液漏斗中, 加 20 ml 氯仿, 用浓氨水碱化至 pH = 8~9, 振摇萃取。再分别用 20 ml、10 ml 氯仿萃取两次。合并三次氯仿萃取液(水层弃掉), 回收氯仿, 剩约 5~6 ml 即可(留 1 ml 作纸色谱用)。

#### 2. 纸色谱先导设计萃取分离条件

取一条 15 cm × 5 cm 的色谱滤纸, 用铅笔距底端 2 cm 划起始线, 再垂直于起始线画三条等距纵线, 即将滤纸分为四等分窄条。用棉球沾取不同 pH 的缓冲水溶液(pH 依次为 5、6.5、7.5、8.5 的柠檬酸-碳酸氢二钠缓冲液)按顺序涂布于滤纸的各条带上, 涂布操作要求均匀、快速, 且尽量避免缓冲液向邻近区间扩散。涂毕后将湿滤纸条夹在两张干滤纸之间吸去多余的水分。然后用毛细管吸取总生物碱溶液分别点于色谱滤纸各条缓冲带的起始线处。以水饱和的氯仿为展开剂, 展开。展开高度约 10 cm 后取出, 以改良的碘化铊钾试剂喷雾显色。记录不同 pH 缓冲带下样品的比移值, 根据此值选择样品中生物碱分离的适宜 pH 缓冲条件。

### 3. CCD 法分离东莨菪碱和莨菪碱

取 4 个小分液漏斗, 编号为 1~4, 每只内盛有  $\text{pH} = 6.5$  的缓冲水溶液 5 ml 做为固定相(缓冲溶液要用氯仿提前饱和)。将含有总碱的氯仿浓缩溶液 5 ml 转入第 1 号分液漏斗中, 振摇后静置分层; 再将第 1 号分液漏斗中的氯仿层溶液转至第 2 号分液漏斗中, 振摇后静置分层; 再将第 2 号分液漏斗中的氯仿层溶液转至第 3 号分液漏斗中, 振摇后静置分层; 再将第 3 号分液漏斗中的氯仿层溶液转至第 4 号分液漏斗中, 静置后分层; 最后将第 4 号分液漏斗中的氯仿层溶液收集至试管中(编号为第 1 号氯仿萃取液)。再取 5 ml 新配的氯仿液(提前用  $\text{pH} = 6.5$  的缓冲溶液饱和)倒入第 1 号分液漏斗中, 振摇后静置分层; 再将第 1 号分液漏斗中的氯仿层溶液转入第 2 号分液漏斗中……。最后将第 4 号分液漏斗中的氯仿层溶液收集至试管中(编号为第 2 号氯仿萃取液)。重复上述步骤, 依顺序得到编号为第 3 号、第 4 号的氯仿萃取液。共得到编号为 1~4 号的四份氯仿萃取液。

向第 1~4 号分液漏斗内的水相中各加入 5 ml 氯仿, 再分别加入氨水碱化至  $\text{pH} = 9$ , 振摇后静置, 分出氯仿层溶液, 共得到编号为 5~8 的四份为水相碱化后的氯仿萃取液。

将以上各氯仿萃取液(共 8 份, 编号 1~8)分别浓缩至小量后待纸色谱鉴定用。

### 4. 纸色谱鉴定

取一张圆形纸色谱滤纸, 在圆心处画一直径约为 3 cm 的圆圈做为起始线。用棉球沾取  $\text{pH} = 6.5$  的缓冲溶液均匀涂于一张圆形纸色谱滤纸上, 用于滤纸吸去多余的水份, 再按圆形纸色谱法操作。点样样品为洋金花总生物碱氯仿浓缩液、氢溴酸东莨菪碱对照品溶液、硫酸阿托品对照品溶液、氯仿萃取浓缩液(共 8 份, 编号 1~8)。展开剂使用  $\text{pH} = 6.5$  缓冲溶液饱和的氯仿液。显色剂为改良的碘化铋钾试液, 喷雾显色。注意观察各样品斑点情况, 并分析各萃取液中的成分。

## 五、思考题

1. 写出此实验中提取分离东莨菪碱和莨菪碱的流程示意图。
2. 在提取中为什么要先加氯仿再碱化? 碱化后  $\text{pH}$  值为什么要控制在 8~9?
3. 萃取用的氯仿为什么要用  $\text{pH} = 6.5$  的缓冲溶液饱和?

## 实验 6 青蒿素的提取分离和检定(综合性实验)

### 一、实验目的与要求

1. 掌握从青蒿中提取、分离并鉴定青蒿素的方法。
2. 掌握柱色谱的操作方法。

## 二、实验原理

青蒿素(qinghaosu, arteannuin, artemisinin)是植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中得到的含过氧基团的倍半萜内酯化合物(结构见图 10-6), 具有很好的抗疟活性, 尤其对脑型疟疾和抗氯喹疟疾具有速效和低毒的特点。青蒿素的极性较低, 可以用低沸点的有机溶剂如二氯甲烷、氯仿、乙醚、丙酮或石油醚(30~60℃)提取, 然后再应用硅胶柱色谱和重结晶的方法进行分离、纯化。

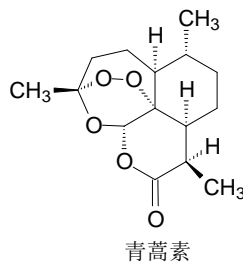


图 10-6 青蒿素的结构

## 三、仪器与试剂

### 1. 实验仪器

色谱柱, 旋转薄膜蒸发器, 硅胶薄层板, 展开缸, 显色试剂, 电吹风, 锥形瓶(50 ml)等。

### 2. 药品及试剂

青蒿的干燥叶, 硅胶(100~200 目), 石油醚(30~60℃), 氯仿, 乙酸乙酯, 二氯甲烷, 正己烷, 乙腈, 5%香草醛-浓硫酸(溶解在硫酸:无水乙醇 = 4:1 中)显色剂。

## 四、实验步骤

### 1. 青蒿素的提取分离

青蒿干燥叶粉碎后用石油醚室温浸泡提取 48 小时。过滤, 得石油醚提取液。减压浓缩提取液, 得到棕黑色浆状物, 用 20 ml 氯仿溶解后再加入 180 ml 乙腈, 过滤除去不溶部分, 滤液再减压浓缩得到胶质状残渣。将残渣用 200 g 硅胶进行柱色谱分离, 洗脱剂为乙酸乙酯-氯仿(1:9)溶液。待最初约 200 ml 洗脱液下来之后开始收集洗脱流分, 每份体积约为 40 ml, 即时用 TLC 进行检测。共收集洗脱流分体积约 300 ml, 浓缩各洗脱流分, 应得白色结晶的青蒿素。用二氯甲烷-正己烷(1:4)进行重结晶后可得到青蒿素纯品。(注意: 高温易导致青蒿素产生大量降解产物, 因此本实验必须低温提取回收, 温度不得超过 60℃。)

### 2. 青蒿素的 TLC 鉴定

将少量自制青蒿素样品用氯仿或二氯甲烷溶解后点样。展开剂为乙酸乙酯:氯仿

(1:9)。显色剂为 5% 香草醛-浓硫酸。可以观察到青蒿素开始为黄色斑点, 加热到 90℃ 后变成紫红色斑点( $R_f \approx 0.7$ )。

## 五、思考题

1. 写出提取分离青蒿素的流程图。
2. 请查阅有关文献设计其他青蒿素提取分离的方法。

## 实验 7 穿心莲内酯的提取、分离、鉴定及其亚硫酸氢钠加成物的制备(综合性实验)

### 一、实验目的与要求

1. 掌握穿心莲内酯的提取分离方法。
2. 学习氧化铝柱色谱的原理和操作方法。
3. 通过穿心莲内酯与亚硫酸氢钠的加成反应, 掌握一种使脂溶性化合物转化为水溶性化合物的方法。

### 二、实验原理

穿心莲为爵床科植物穿心莲(*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees)的全草或叶, 具有清热解毒、凉血消肿的作用, 用于治疗急性菌痢、胃肠炎、咽喉炎、尿路感染等。穿心莲中含有多种二萜类化合物, 主要如: 穿心莲内酯(andrographolide)、脱氧穿心莲内酯(14-deoxy-andrographolide)、新穿心莲内酯(neo-andrographolide)等, 其中穿心莲内酯、新穿心莲内酯是穿心莲抗菌消炎的主要有效成分。穿心莲内酯又称穿心莲乙素, 为无色方型或长方型结晶, mp 230~232℃,  $[\alpha]_D^{20} = -126^\circ$ , 味极苦, 可溶于甲醇、乙醇、丙酮、吡啶, 微溶于氯仿、乙醚, 难溶于水及石油醚。脱氧穿心莲内酯又称穿心莲甲素, 为无色片状或长方型结晶, mp 175~176.5℃,  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  (1%, 氯仿), 味稍苦, 可溶于甲醇、乙醇、丙酮、吡啶、氯仿、乙醚、苯, 微溶于水。新穿心莲内酯又称穿心莲丙素或穿心莲新苷, 为无色柱状结晶, mp 167~168℃, 无苦味, 可溶于甲醇、乙醇、丙酮、吡啶, 微溶于氯仿和水, 不溶于石油醚。穿心莲内酯、脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯的结构见图 10-7。

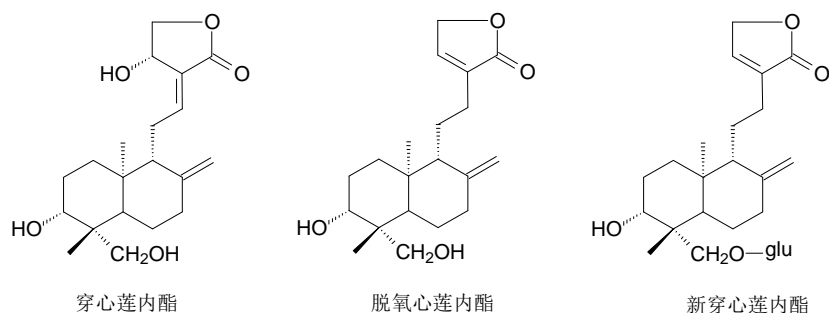


图 10-7 穿心莲内酯、脱氧穿心莲内酯、新穿心莲内酯的结构

穿心莲中的内酯类化合物极性较低，易溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂中，故可选用乙醇提取。穿心莲中还含有大量叶绿素，可用活性炭脱色法除去。利用穿心莲内酯与脱氧穿心莲内酯在氯仿中溶解度不同，可初步将二者分离。再利用穿心莲内酯与脱氧穿心莲内酯结构差异，用氧化铝柱分离纯化。

因穿心莲内酯难溶于水，可将穿心莲内酯与亚硫酸氢钠反应、或通过磺化反应、或与琥珀酸酐反应等生成水溶性衍生物。图 10-8 为穿心莲内酯与亚硫酸氢钠化学反应式。



图 10-8 穿心莲内酯与亚硫酸氢钠的化学反应式

### 三、仪器与试剂

#### 1. 实验仪器和试剂

玻璃色谱柱(2 × 30 cm)及配套分液漏斗，滤纸，50 ml 三角瓶数个，恒温水浴锅，蒸发皿，玻璃板(5 × 20 cm)，色谱缸，玻璃漏斗，铁架台，500 ml 园底烧瓶，抽滤瓶，布氏漏斗，冷凝器，旋转蒸发仪，硅胶薄层板，显色试剂喷瓶，电吹风，锥形瓶(50 ml)等。

#### 2. 药品及试剂

穿心莲粗粉，中性氧化铝(100~200 目)，95%乙醇，活性炭(粉末)，硅胶 G，丙酮，氯仿，甲醇，正丁醇，亚硫酸氢钠，碘，2%的 3, 5-二硝基苯甲酸/甲醇溶液，0.5 M 氢氧化钾/甲醇溶液。

### 四、实验步骤



### 1. 内酯类成分的提取

称取穿心莲粗粉 100 g 置于圆底烧瓶中, 加 95% 乙醇以浸没药粉 2 cm 为宜, 加热回流 1 小时。过滤, 收集滤液。药渣再加适量乙醇回流 2 次, 每次 1 小时。过滤, 合并三次滤液即得提取液。将提取液浓缩至约总体积 1/5, 加入原料量的 15~30% 活性炭进行回流脱色 30 分钟, 过滤, 滤液浓缩至 15~20 ml 左右, 放置析晶, 过滤并用少量水洗即得穿心莲内酯粗品, 母液中主要含脱氧穿心莲内酯(待分离)。

穿心莲内酯粗品加 40 倍量丙酮, 回流 10 分钟, 过滤, 收集丙酮溶液; 不溶物再加 20 倍量丙酮回流 10 分钟, 过滤, 合并二次丙酮溶液。将丙酮溶液浓缩至三分之一体积, 放置析晶, 过滤, 应得白色颗粒状结晶即为穿心莲内酯纯品。

将含有脱氧穿心莲内酯的母液在水浴上加热至稠膏状, 加氯仿 70 ml, 用力搅拌后滤出氯仿液, 残渣再加氯仿 10 ml 同法处理。合并二次氯仿液, 水浴浓缩至 5 ml 左右, 将浓缩液进行中性氧化铝柱色谱分离(氧化铝约 30~35 g, 氯仿湿法装柱, 用氯仿洗脱, 控制洗脱流速为 2~3 ml/min, 接收每份 10 ml, 约接收 12~15 份)。将洗脱流份分别浓缩后进行 TLC-硅胶鉴定, 合并相同成分的流份, 蒸干氯仿, 结晶用少量丙酮洗涤, 应得脱氧穿心莲内酯白色结晶。

### 2. 穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物的制备

取自制穿心莲内酯纯品 0.5 g 置于 50 ml 圆底烧瓶中, 加 95% 乙醇 5 ml, 再加 4% 的亚硫酸氢钠水溶液(含与穿心莲内酯相同摩尔数量的亚硫酸氢钠), 回流 30 分钟。反应完后蒸出乙醇, 再加 5 ml 蒸馏水溶解, 冷却后过滤, 滤液用少量氯仿洗涤三次, 水液浓缩至干, 残留物加乙醇~20 ml 溶解, 滤除不溶物, 将乙醇溶液浓缩放置挥发掉溶剂或减压抽干溶剂, 得白色粉末即为加成物粗品。将加成物粗品用乙醇-氯仿重结晶后即得穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物纯品。

### 3. 有关自制内酯物的鉴定

(1) 穿心莲内酯的熔点测定: 应为 230~232℃。

(2) 穿心莲内酯的硅胶 TLC 检识: 应显一个斑点(展开剂为氯仿-无水乙醇 = 20:1, 显色剂为碘蒸气)

(3) 脱氧穿心莲内酯的熔点测定: 应为 175~177℃。

(4) 脱氧穿心莲内酯的硅胶 TLC 检识: 应显一个斑点(展开剂为氯仿-无水乙醇 = 20:1, 显色剂为碘蒸气)。

(5) 穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物的熔点测定: 应为 mp 226~227℃。

(6) 穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物的硅胶 TLC 检识: 将自制的穿心莲内酯、穿心莲内酯亚硫酸氢钠加成物同时展开检识, 展开剂分别用氯仿-甲醇 = 9:1、氯仿-正丁醇-甲醇 = 2:1:2、氯仿-丙酮-乙醇-水 = 5:5:5:1, 显色剂为 2% 的 3,5-二硝基苯甲酸/甲醇溶液与 0.5 M 氢氧化钾/甲醇溶液等体积混合后喷雾, 在 105℃ 加热约 5 分钟, 样品斑点应显紫红色。

## 五、思考题

1. 写出此实验中的提取分离流程图。
2. 根据穿心莲中内酯类成分的不同结构,判断其极性大小并分析各成分在薄层板上的相对  $R_f$  值。

## 实验 8 黄芩苷的提取与分离(自主设计实验)

黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georg.)的干燥根,其主要有效成分为黄芩苷(baicalin),具有清热燥湿、泻火解毒、抗菌消炎之功效。市售中成药银黄口服液、银黄片中的主要成分之一就是黄芩苷。

### 一、实验目的

1. 提高理论联系实际、独立思考和解决问题的能力。
2. 锻炼查阅天然药物化学相关文献资料的能力。
3. 通过分析文献资料结合所学知识,自主设计提取分离黄芩苷的流程并实际动手完成。
4. 掌握如何鉴定未知物结构的方法,以提高独立思考和解决问题的能力。

### 二、实验有关要求

1. 学会系统查阅国内外专业文献,有详细的查阅记录及资料,并根据文献写出有关综述(具体内容要求如下)。

- (1) 黄芩的植物来源、品种、科属及分布。
- (2) 黄芩苷的临床应用和药理活性研究概况。
- (3) 黄芩中主要有效成分的名称、结构、理化性质。
- (4) 提取、分离、纯化黄芩苷的主要方法。
- (5) 黄芩苷的波谱数据(UV、NMR、MS、IR)。

#### 2. 自主设计实验主要内容

- (1) 根据查阅的有关文献以及实际实验条件设计提取分离及纯化黄芩苷方法。
- (2) 列出自主实验所需仪器、药品及试剂等。
- (3) 列出自主实验具体实施计划,以及实际实验记录。

#### 3. 总结与讨论

- (1) 根据自主实验结果讨论成功与失败的原因。
- (2) 找出自主实验需要改进的实验步骤或内容。
- (3) 自主设计实验的体会。

#### 4. 上交实验报告

## 实验 9 实验考核

### 一、目标要求

1. 公正、合理地评价学生的实验水平。
2. 对发现的问题进行重点指导及教学改进。
3. 实验考核成绩占学生天然药物化学实验总成绩的一部分。

### 二、考核方式及内容

1. 分为实验理论考核(笔试)和实验技能考核(实际操作), 要求学生分别独立完成。
2. 实验理论考核(笔试)考核内容: 有关天然药物化学实验基本理论等。
3. 实验技能考核(实际操作)考核内容: 天然药物化学实验所涉及实验仪器的规范操作等。
4. 实验指导教师负责出题、监查、记录、打分等。

河南中医药大学药学院天然药物化学教研室