

国家级实验教学示范中心

中药学实验系列教材

National Experimental Teaching Demonstration Center
Series of Textbooks on TCM Experiments

中药化学实验

Traditional Chinese Medicine Chemical Experiments
(双语版)

主编 李医明

Chief Editor Li Yiming



科学出版社

www.sciencep.com

国家级实验教学示范中心
中药学实验系列教材

National Experimental Teaching Demonstration Center
Series of Textbooks on TCM Experiments

中药化学实验

Traditional Chinese Medicine Chemical Experiments

(双语版)

主 编 李医明
Chief Editor Li Yiming

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书是“国家级实验教学示范中心·中药学实验系列教材”,是作者在多年中药化学实验教学的基础上编著而成。主要介绍了常用的中药化学实验提取、分离纯化和检识方法。收录了中药化学研究中有代表性的生物碱、萜类、黄酮、甾类等相关的13个实验。每个实验包括六项内容:目的与要求、实验原理、仪器与试剂、实验步骤、注意事项、思考题。书后选录了部分与中药化学实验相关的参考数据,包括常用有机溶剂性质表、常用显色剂制备表、实验室的安全规则等。本书主要内容均用中英文双语编写,考虑到语言表达习惯等不同,英文部分并非中文内容的逐字翻译。

本书适合中药学、药学、制药工程及相关专业开设中药化学、天然药物化学实验课时,特别是双语实验教学时使用。

图书在版编目(CIP)数据

中药化学实验=Traditional Chinese Medicine Chemical Experiments: 双语版 / 李医明主编. —北京:科学出版社,2009

(国家级实验教学示范中心·中药学实验系列教材)

ISBN 978-7-03-024988-3

I. 中… II. 李… III. 中药化学-化学实验-教材-汉、英 IV. R284-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 116879 号

策划编辑:方 霞 / 责任编辑:万 新 杨 扬 曹丽英 / 责任校对:李奕莹

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

盛 宣 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 7 月第一次印刷 印张:9 1/2

印数:1—2 000 字数:222 000

定价:34.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

《中药化学实验》编委名单

主 编 李医明

副主编 王 瑞

编 者 (以姓氏汉语拼音排序)

贾 琦 李医明 刘祥兰

谭红胜 王 瑞 吴迎春

张 娴

目 录

第一章 绪论	(1)
第二章 中药化学成分的一般研究方法	(2)
第三章 中药化学成分预实验	(5)
第四章 中药化学实验	(12)
实验一 虎杖中蒽醌类成分的提取、分离和鉴定	(12)
实验二 秦皮中香豆素成分的提取、分离和鉴定	(15)
实验三 槐花米中芦丁和槲皮素的提取、分离和鉴定	(17)
实验四 葛根中异黄酮的提取、分离和鉴定	(21)
实验五 甘草中甘草次酸的提取、分离和鉴定	(23)
实验六 柴胡中柴胡皂苷的提取、分离和鉴定	(25)
实验七 穿心莲中穿心莲内酯的提取、分离、鉴定及衍生物制备	(28)
实验八 牡丹皮中丹皮酚的提取、分离和鉴定	(30)
实验九 挥发油的定性和定量分析	(32)
实验十 穿山龙中薯蓣皂苷元的提取、分离和鉴定	(34)
实验十一 黄花夹竹桃总苷和次苷的提取、分离和鉴定	(37)
实验十二 防己中生物碱的提取、分离和鉴定	(41)
实验十三 一叶萩中一叶萩碱的提取、分离和鉴定及衍生物制备	(45)
参考文献	(50)
附录一 常用溶剂化学性质表	(51)
附录二 常用鉴定试剂的配制和应用	(52)
附录三 中药化学学生实验守则	(64)
附录四 安全与急救常识	(65)

Contents

Chapter 1	Introduction	(67)
Chapter 2	The methods for studying chemical composition of natural products chemistry	(68)
Chapter 3	The preparative test on chemical components of TCM	(73)
Chapter 4	Pharmaceutical chemistry experiment	(82)
Exp. 1	Extraction, isolation and identification of hydroxyanthraquinones from Rhizoma et Radix Polygoni Cuspidati	(82)
Exp. 2	Extraction, isolation and identification of coumarins from Cortex Fraxini	(86)
Exp. 3	Extraction, isolation and identification of rutin and quercetin from Flos Sophorae	(89)
Exp. 4	Extraction and isolation of isoflavonoids from Radix Puerariae Lobatae	(94)
Exp. 5	Extraction, isolation and identification of glycyrrhetic acid from Radix et Rhizoma Glycyrrhizae	(96)
Exp. 6	Extraction, isolation and identification of saikosaponin from Radix Bupleuri	(99)
Exp. 7	Extraction, isolation, identification and the derivative preparation of andrographolide from Herba Andrographis	(102)
Exp. 8	Extraction, isolation and identification of paeonol from Cortex Moutan	(105)
Exp. 9	The qualitative and quantitative analysis of volatile oils	(108)
Exp. 10	Extraction, isolation and identification of diosgenin from Rhizoma Dioscoreae Nipponicae	(110)
Exp. 11	Extraction, isolation and identification of thevetins and peruvosides from the fruits of Thevefia Peruviana	(113)
Exp. 12	Extraction, isolation and identification of alkaloids from Fourstamen Stephania Root	(117)
Exp. 13	Extraction, isolation, identification and derivative preparation of securinine from leaves of Securinega suffruticosa(Pall)Rehd	(123)
References		(128)
Appendix I	Properties of common solvents used in extraction and isolation	(129)
Appendix II	Preparation and application of commonly used identification reagents ...	(130)
Appendix III	Safety and laboratory rules of TCM chemistry experiments	(145)
Appendix IV	Learn and observe the safety and laboratory rules	(146)

第一章 绪 论

中药化学是一门结合中医药基本理论和临床用药经验,主要运用化学的理论和方法及其他现代科学理论和技术等研究中药化学成分的科学,一门实践性非常强的学科。中药化学实验课是本门课程的重要组成部分,在教学中占重要地位。实验教学的主要目的是通过对中药有效成分的提取、分离和鉴定等基本操作技能的训练,培养学生分析问题和解决问题的能力,从而训练严格的科学态度。同时,通过实验加强对理论课讲授内容的理解和吸收,可进一步巩固课堂所学的理论知识,使理论与实践密切结合。

《中药化学实验》第二章和第三章主要介绍常用的中药化学实验提取、分离纯化和检识方法。第四章收录了中药化学研究中有代表性生物碱、蒽醌、黄酮等相关的 13 个实验。每个实验包括 6 项内容:实验目的、实验原理、实验仪器和试剂、实验步骤、注意事项和思考题。实验部分所收录的内容超过本科教学大纲要求的实验教学学时数时,可选择部分实验用于教学。附录部分选录了部分与中药化学实验相关的参考数据,包括常用有机溶剂性质表、常用显色剂制备表、参考文献以及中药化学实验室的安全及规则、急救常识等,供实验时参考。

在实验教学中应用《中药化学实验》,可使学生掌握浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流法、连续回流提取法(索氏提取法)、两相溶剂萃取法、沉淀法、结晶法、薄层色谱、纸色谱、柱色谱等中药化学基本操作技能。熟悉它们在中药化学成分提取、分离、检识和鉴定中的应用。鉴于中药中所含化学成分复杂,一些有效成分含量较低等特点,本讲义立足本学科较为经典的实验,着重训练常量、半微量成分的提取、分离及检识方法。使学生具有初步设计提取中药中主要类型成分的能力。

为使学生能够更好地学习本专业的英语知识,今后加强国际交流,本教程的主要内容均用中英文双语编写,考虑到国内外的实验环境要求、语言表达习惯等不同,英文部分并非中文内容的逐字翻译。

本实验教程适合中药学、药学、制药工程及相关专业开设中药化学、天然药物化学实验课时,特别是双语教学实验使用。在使用过程中可根据教学学时数安排,自行调整实验进度。

第二章 中药化学成分的一般研究方法

中药中化学成分的组成一般比较复杂,往往多种成分和大量杂质共存,各成分的含量差别也较大。中药有效成分的提取分离是研究中药化学成分的基础。提取分离方法应根据被提取成分的主要理化性质和各种提取分离技术的原理和特点进行选定,使所需要的成分能充分地得到提取和分离。所以,提取分离出有效成分的单体并进行化学结构鉴定,或制备其特定有效部位并测定其化学组成,是中药化学研究的重要任务之一,也是一项比较困难而又细致的工作。

一、提取方法

提取就是用适当的溶剂将待研究的化学成分从药材组织中抽提出来的过程。在进行提取时,尽量使需要的成分和不需要的成分分开,使杂质不被提取出来,或在处理过程中尽可能除去,去粗取精。

植物体内的成分较为复杂,其中有药用价值的是生物碱、萜类、甾体、苷类、黄酮、蒽醌、香豆素、有机酸、氨基酸、单糖、低聚糖、多糖、蛋白质、酶及鞣质等。而纤维素、叶绿素、蜡、油脂、树脂和树胶等有经济价值的成分,在研究中药化学活性成分时一般作为杂质除去。

提取可在室温下进行,也可以加热。一般冷法提取杂质较少,而热法提取效率较高。在不了解有效成分性质之前,一般采用温和的条件,不用酸碱,以免有效成分被破坏。

常用的经典提取方法包括水提取法、有机溶剂提取法和水蒸气蒸馏等。

1. 水提取法

水为极性较大的溶剂,最常用。水提取可分为水煎煮、水浸泡和水渗漉三种,也可用酸水或碱水提取。碱性、酸性或苷类化合物,如小檗碱、甘草酸、芸香苷等,较易溶于水,可用水作为提取溶剂。但是用水提取时,提取液中糖类、氨基酸、蛋白质、无机盐类等水溶性杂质较多,水提液较难过滤,且不利于进一步分离;如不能及时处理,其中糖类、蛋白质等营养物质易霉变,要注意防腐。因此,有些化合物虽能溶于水,但为了使杂质尽量少带出来,也常用有机溶剂提取。

2. 有机溶剂提取法

有机溶剂提取常采用回流提取法、连续回流提取法(索氏提取法)、浸渍法和渗漉法。可采用几种极性不同的溶剂,按照极性由低到高依次分步提取,根据各成分在不同极性溶剂中溶解度的差异进行提取和分离。若待提取植物成分较为简单,或有效成分含量较高,可根据极性 or 溶解性,采用单一溶剂提取。乙醇、甲醇是最常用的有机溶剂,能与水按任意比例混合,且能和大多数亲脂性有机溶剂混合,渗入药材细胞能力较强,能溶解大多数中药成分。一般来说,甲醇比乙醇的提取效果好,但毒性比乙醇大,故多在实验室研究中应用,而乙醇更适于工业化生产。甲醇和乙醇的浓度根据被提取物质的性质而定。常见化学成分的提取溶剂见表 2-1。

表 2-1 中药化学成分的极性及其常用的提取溶剂

极性	中药化学成分类型	常用的提取溶剂
强亲脂性	挥发油、脂肪油、蜡、脂溶性色素、甾醇类、部分苷元	石油醚、己烷
亲脂性	苷元、生物碱、树脂、醛、酮、醇、醌、有机酸、部分苷类	乙醚、氯仿
中等极性	小部分苷(强心苷等)	氯仿-乙醇
	中部分苷(黄酮苷等)	乙酸乙酯
	大部分苷(皂苷、蒽醌苷等)	正丁醇
亲水性	部分大极性苷、糖类、氨基酸、部分生物碱盐	丙酮、乙醇、甲醇
强亲水性	蛋白质、黏液质、果胶、糖类、氨基酸、无机盐	水

3. 水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法用于提取能随水蒸气蒸馏,而不被破坏的难溶于水的成分。这类成分有挥发性,在 100℃ 时有一定蒸气压,当水沸腾时,该类成分一并随水蒸气带出,再用水分离器或有机溶剂萃取法,将这类成分自馏出液中分离。挥发油和某些挥发性成分能用水蒸气蒸馏得到。如麻黄碱就可以用水蒸气蒸馏法从麻黄中直接蒸馏出来。

二、分离精制方法

1. 萃取法

通常所指的萃取,即液-液分配萃取,是利用混合物中的各成分在两种互不相溶的溶剂中分配系数的不同而达到分离的目的,往往是互相饱和的水相与有机相。将提取液浓缩成适当浓度的水溶液,或将混合物溶于水,利用各组分配极性差别,选择合适的有机溶剂进行萃取。亲脂性物质,可用石油醚、氯仿或乙醚等有机溶剂萃取;亲水性物质,可用乙酸乙酯、正丁醇等弱亲水性有机溶剂萃取。

2. 沉淀法

有些中药化学成分能与某些试剂生成沉淀,或加入某些试剂后可降低某些成分在溶液中的溶解度而自溶液中析出的一种方法。如果是需要化学成分分离的,则沉淀反应必须是可逆的;如果是不需要的化学成分,将生成的沉淀过滤除去,则沉淀反应可以是不可逆的。常用的沉淀法有专属试剂沉淀法、分级沉淀法和盐析法等。

3. 酸碱处理法

如待分离成分是酸性或碱性化合物,常可向提取溶剂中加适量的酸或碱,使化合物成盐或游离,利于提取。有些化合物遇酸或碱可以发生化学反应,生成的产物溶解性会改变,经过适当处理以后还可恢复成原来的化合物,如具有内酯或内酰胺结构的成分可被皂化溶于水,也有利于分离。使用酸碱处理时要注意酸性或碱性的强度、与被分离成分接触的时间、加热温度和时间等,避免在剧烈条件下某些化合物结构发生变化或结构不能恢复到其原来存在于中药中的状态。

4. 结晶法

化合物由非晶形经过结晶操作形成有晶形的过程称为结晶。初析出的结晶往往不纯,进行再次结晶的过程称为重结晶。结晶法是分离中药化学成分最后阶段常采用的方法,是利用混合物中各成分在溶剂中的溶解度不同达到进一步分离纯化的目的。中药中一些多糖、皂苷等亲水性成分往往没有固定的结晶形态,常为无定形粉末,但也需要通过结晶法进行纯化,以利于结构测定。

结晶法的关键是选择适宜的结晶溶剂。对溶剂的要求一般包括对被溶解成分的溶解度随温度不同应有显著差别;与被结晶的成分不应产生化学反应;沸点适中等。常用于结晶的溶剂有甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸、吡啶等。当用单一溶剂不能达到结晶时,可用两种或两种以上溶剂组成的混合溶剂进行结晶操作。混合溶剂法重结晶,将粗晶在加热状态下溶于少量第一溶剂(使结晶易溶解的溶剂)中,然后加入恰好使溶液变成轻微混浊状所需要的足量溶剂。静置,冷至室温,结晶析出。同上操作收集晶体,必要时同法将产物进行第二次重结晶。

5. 色谱分离法

色谱分离法是中药化学成分分离中最常应用的分离法,具有分离效能高、快速简便等优点。通过选用不同分离原理、不同操作方式、不同色谱材料或将各种色谱组合应用,可达到对各类型中药成分的分离和精制,也可用于化合物的鉴定。

薄层色谱法在中药化学成分的研究中,主要用于化学成分的预试、化学成分的鉴定及摸索柱色谱分离的条件。用薄层色谱法进行中药化学成分检识,可依据各类成分的性质以及文献报道的色谱条件有针对性地进行。样品在薄层板上展开后,可将一些杂质分离。其选择性高,不仅可通过各种显色反应初步鉴定成分类型,而且可以了解主要化学成分的数量及其极性大小,使预试结果更为丰富,更可靠。常用的薄层色谱用硅胶有:硅胶 G(G 为石膏 gypsum 的缩写,表示加有石膏);硅胶 H(表示不加石膏);硅胶 GF₂₅₄(表示加石膏和波长 254 nm 显绿色荧光的硅酸锌镉);硅胶 GF₃₆₅(表示加石膏和波长 365 nm 显黄色荧光的硫化锌镉);硅胶 GH₂₅₄ 和硅胶 GH₃₆₅ 等。

柱色谱法是分离和纯化中药化学成分的一种重要的方法,包括常压、低压、中压和高压柱色谱法。装填色谱柱的材料包括硅胶、改性硅胶、氧化铝、纤维素、聚酰胺、葡聚糖凝胶、活性炭、硅藻土等。液相柱色谱的洗脱剂(或流动相)通常为有机溶剂的混合物或水和极性有机溶剂(如甲醇、乙腈)的混合物。硅胶液相柱色谱是经常使用的正相柱色谱法,洗脱剂(或流动相)是有机溶剂的混合物。C₁₈键合硅胶液相柱色谱是经常使用的反相柱色谱法,洗脱剂(或流动相)是甲醇-水或乙腈-水的混合物。

三、理化数据、波谱数据的测定与结构鉴定

从中药中经过提取、分离、精制得到的有效成分,必须鉴定或测定其化学结构,为深入探讨有效成分的生物活性、构效关系、体内代谢、结构改造、化学全合成等研究提供必要的依据。

得到的化合物首先需要进行干燥(玻璃干燥器或真空干燥箱中干燥),然后进行理化常数、波谱数据的测定和结构鉴定,以便对该成分进行进一步的研究工作。

熔点测定是鉴定结晶纯度方法之一。化合物的熔点是一个大致范围,在此范围内化合物由固相变为液相,这一过程有时伴随有化合物的分解。纯的天然物质结晶一般有一定的熔点和较小的熔程,当化合物中含有少量杂质时会使实测熔点值降低。一些天然物质的分解点间隔比较长或不容易看清楚;有些则在加热过程中色泽逐步变深,最后到分解,看不清收缩点。有些立体异构体和非常类似的混合物熔程也很短。还有些天然物质具有双熔点特性,即在某一温度已经全部熔化,当温度继续上升时又固化,然后在某一更高温度时又熔化或分解。

中药化学成分的结构鉴定除理化常数和化学法鉴定外,波谱解析法(包括红外光谱、紫外光谱、核磁共振和质谱等)近年来发展迅速,加上单晶 X 衍射等方法,使鉴定质量和速度大为提高。运用紫外光谱、红外光谱、核磁共振和质谱数据,进行综合解析,能迅速地确定一个化合物的化学式和结构,且用量在毫克乃至微克水平。

判断两个化合物是否相同时,可在相同条件下比较红外光谱、测定混合熔点和在至少 3 种展开系统下进行薄层色谱(应有叠加点样斑点)。若两个化合物的红外光谱一致、混合后熔点不下降、薄层色谱行为一致,则基本可以判定为相同化合物。

第三章 中药化学成分预实验

中药化学成分复杂,种类繁多,每一种中药中含有多种化学成分,在深入研究之前应首先了解其中含有哪些类型的化学成分,才便于根据各类化合物的性质选择合理的研究方法。中药化学成分的预实验可分为两类:一类是单项预实验法,即为寻找某类成分而做的有针对性的检查;另一类是系统预实验法,即在未知情况下对中药中可能含有的各类成分进行比较全面系统的定性检查。

中药化学预实验方法要求简便快速,并力求准确。无论采用哪种方法,都不宜用中药原料直接进行,而且中药各类化学成分之间还可能互相干扰,影响实验结果的显示与判断。通常应作预处理,一般先用不同极性的溶剂按照极性递增的顺序分别提取,获得不同极性的提取部位,再对各部位有所侧重的进行各类化学成分的预实验,缩小预实验范围,提高预实验准确度。

预实验原理是根据各部位可能含有的化学成分类型,选择各类成分特有的化学反应,如颜色反应、沉淀反应、荧光性质等做一般性预试。具体操作时一般采用试管或瓷反应板进行实验,因为提取液的颜色通常较深,如果影响对颜色变化的观察,可采用薄层层析(thin layer chromatography, TLC)或纸层析(paper chromatography, PC)等方法对提取液进行初步分离后喷洒各类显色剂,再进一步检查。

需要说明的是预实验仅是初步分析,由于很多定性实验并不是完全专一性反应,且中药所含成分复杂,可能互相干扰,所以不能仅仅根据预实验结果即肯定或否定某种成分的存在与否,往往需要通过进一步的化学分离和分析技术做出判断。

一、目的与要求

- (1) 学习中药化学成分预实验的方法及原理。
- (2) 掌握中药中未知成分经初步提取分离后进行预实验的程序,熟悉各主要成分的试管(瓷反应板)实验、颜色反应、沉淀反应、荧光性质和纸层析、薄层色谱等方法,并根据实验结果判断所含有的化学成分类型。

二、预实验方法

(一) 样品溶液的制备

根据不同成分在各种溶剂中溶解度的不同,一般采用石油醚、乙醇和水三种溶剂依次进行初步提取分离后进行预实验。

1. 石油醚提取液

取中药粗粉 1 g,加 10 mL 石油醚(沸程 60~90℃),放置 2~3 h,过滤,滤液置表面皿上挥干,残留物进行萜类、甾体、挥发油、油脂等成分的检查,见表 3-1。

表 3-1 石油醚提取液中成分检查

主要成分类型	常用实验方法
甾体或三萜类	乙酸酐-浓硫酸实验, 25% 钼磷酸试剂
挥发油和油脂	滴于滤纸上, 观察有无油斑并在加热后能否挥发

2. 乙醇提取液

取中药粗粉 10 g, 加 5~12 倍的 95% 乙醇, 在水浴上加热回流 1 h, 过滤, 滤液(1)(见表 3-2)可直接进行酚类、鞣质、有机酸等成分的检查。然后将滤液减压浓缩成浸膏, 加少量 2%~5% 盐酸搅拌过滤, 分取酸液(2)(见表 3-2)进行生物碱的预实验。残留浸膏分为两部分: 一部分以少量乙醇溶解, 溶液(3)(见表 3-2)可作黄酮、蒽醌及其苷类等成分的检查; 另一部分以少量的乙酸乙酯溶解, 溶液置分液漏斗中加适量 5% 氢氧化钠振摇, 使酚类物质及有机酸等转入下层氢氧化钠水溶液中, 分取乙酸乙酯层, 用蒸馏水洗至中性, 水浴上蒸干, 则主要含有中等极性非酸性成分, 以适量乙醇溶解(4)(见表 3-2), 可进行香豆素、萜类及萜类内酯、甾体化合物等成分的检查, 见表 3-2。

表 3-2 乙醇提取液中成分检查

提取液	主要成分类型	常用实验方法
(1)	酚类	1% 三氯化铁试剂
	鞣质	明胶沉淀反应
	有机酸	溴甲酚蓝试剂
(2)	生物碱	碘化铋钾试剂; 碘化汞钾试剂
		硅钨酸试剂; 磷-碘化钾试剂; 苦味酸试剂
(3)	黄酮	盐酸-镁粉反应; 三氯化铝反应
	蒽醌	10% 氢氧化钾; 0.5% 醋酸镁; 氨蒸气熏
(4)	香豆素与萜类内酯	开环与闭环反应; Emerson 试剂
		Gibb's 试剂; 异羟肟酸铁反应
	强心甘	Kedde 试剂; Legal 试剂; 苦味酸试剂

3. 水浸液

取中药粗粉 10 g, 加水 100 mL, 室温浸泡过夜, 或在 50~60℃ 的水浴上加热 1 h, 过滤, 滤液供糖类、苷类、有机酸、皂苷、酚类、鞣质、氨基酸、多肽、蛋白质、生物碱等成分的检查, 见表 3-3。

表 3-3 水提取液中成分检查

主要成分类型	常用实验方法
糖	酚醛缩合反应; 菲林试剂
苷类或多糖	酚醛缩合反应; 菲林实验
	加盐酸酸化, 加热煮沸数分钟, 冷后观察有无絮状沉淀
有机酸	pH 试纸反应; 溴甲酚蓝试剂
皂苷	泡沫实验
酚类	1% 三氯化铁试剂
鞣质	1% 三氯化铁试剂; 明胶试剂
氨基酸	茚三酮试剂
蛋白质	双缩脲反应
生物碱	碘化铋钾试剂; 硅钨酸试剂

如所研究中药的化学成分未知,可顺次作上述三种提取,即石油醚提取后,药材挥干石油醚再用95%乙醇提取,药渣再用水提取,分别检查各提取部位的主要成分。

各类化学成分常用的薄层色谱或纸色谱预试条件,见表3-4。可以根据被分离成分极性的适当调整系统展开的比例。

表 3-4 各类化学成分的展开剂和显色剂

色谱种类	化合物类别	展开剂	显色剂
薄层色谱	酚类化合物	氯仿-丙酮(8:1)	1%三氯化铁乙醇液
	有机酸	氯仿-丙酮-甲醇-乙醇(7:2:1.5:0.5)	溴甲酚蓝
	生物碱	氯仿-甲醇(9:1)	碘化铋钾;氨蒸气熏
	甾体三萜	氯仿-丙酮(8:2)	5%硫酸乙醇
	萜醌	环己烷-乙酸乙酯(7:3)	氨蒸气熏
	挥发油	石油醚-乙酸乙酯(85:15)	香草醛-浓硫酸
	香豆素	正丁醇-乙酸-水(4:1:1)	喷5%氢氧化钾甲醇液,喷显色剂前、后在紫外灯下观察荧光
纸色谱	氨基酸	正丁醇-乙酸-水(4:1:5,上层)	茚三酮
	强心苷	氯仿-丙酮-甲醇-甲酰胺(8:2:0.5:0.5)	咕吨氢醇
	黄酮苷及苷元	乙酸-水(15:85)	三氯化铝
	糖	正丁醇-乙酸-水(4:1:1)	苯胺邻苯二甲酸试剂
		乙酸乙酯-吡啶-水(2:1:2)	

对各类成分的检识可选择一种或多种方法,尽量排除假阳性和假阴性反应,得出合理、准确的结论。

(二) 各类成分的预实验方法

1. 试管及滤纸片预试法

(1) 检查生物碱:生物碱在酸性水或稀醇中与某些试剂生成难溶于水的复盐或络合物。取酸性醇提取液,先用稀碱调至中性,水浴蒸干,再加5%硫酸溶解残渣,过滤,取滤液供预实验使用。

1) 碘化汞钾试剂(Mayer试剂):取滤液1 mL,加入试剂1~2滴,如有浅黄色和白色沉淀,可能有生物碱。

2) 碘化铋钾试剂(Dragendörff's试剂):取滤液1 mL,加入试剂1~2滴,如有橘红色沉淀产生,可能有生物碱。

3) 硅钨酸试剂:取滤液1 mL,加入试剂1~2滴,如有浅黄色或灰白色沉淀,可能含有生物碱。

注意:生物碱沉淀反应要在酸水或酸性稀醇中进行,因为生物碱和生物碱沉淀试剂均可溶于其中,使反应易于进行且反应结果易于判断。但苦味酸试剂可在中性条件下进行。利用沉淀反应鉴别生物碱时,应注意假阴性和假阳性反应。仲胺一般不易与生物碱沉淀试剂反应,如麻黄碱。水溶液中如有蛋白质、多肽、鞣质亦可与此类试剂产生阳性反应,故应在被检液中除掉这些成分。其方法是将酸水提取液碱化,以氯仿萃取,分取氯仿层,再用酸水萃取氯仿层,此酸水层除去了上述水溶性干扰物质,可作为沉淀反应应用溶液。此外,对生物碱定性鉴别时,应用三种

以上试剂分别进行反应,均阳性或均阴性方有可信性。

(2) 检查氨基酸、多肽和蛋白质:

1) 双缩脲实验(Biuret 试剂):取 1%硫酸铜溶液与 1%氢氧化钠溶液各 1 mL 混合。取 1 mL 冷水浸液,加入上述试剂,摇动后如显紫红色,表示含多肽或蛋白质。

2) 茚三酮试剂(Ninhydrin 试剂):取冷水浸液 1 mL,加入 0.2%茚三酮乙醇溶液 2~3 滴,摇匀,在沸水浴中加热 5 min,冷却后,如显蓝色或蓝紫色,表明含有氨基酸、多肽或蛋白质。

(3) 检查有机酸:

1) 用 pH 试纸检查:将热水提取液和乙醇提取液分别用 pH 试纸检查,如呈酸性,则可能含有游离酸或酚性化合物。

2) 溴酚蓝试剂:取少量乙醇提取液点于滤纸片上,喷洒 0.1%溴酚蓝试剂,如在蓝色背景上显黄色斑点,表明可能含有有机酸(如不明显,可再喷洒氨水;然后暴露于盐酸气体中,背景逐渐由蓝色变为黄色,而有机酸斑点为蓝色)。

(4) 检查酚类化合物和鞣质:

1) 1%三氯化铁试剂:取乙醇提取液 1 mL,提取液如为酸性,即可直接进行检查,如为碱性,可加乙酸酸化后,再加三氯化铁试剂 1~2 滴,如呈蓝墨绿色或蓝紫色,证明可能含有酚类或鞣质。

2) 香草醛-盐酸试剂:将乙醇提取液点在滤纸片上,干燥后,喷洒香草醛-盐酸试剂,如呈不同程度的红色,表明具有间苯二酚结构的化合物。

3) 三氯化铁-铁氰化钾试剂:将乙醇提取液点在滤纸片上,喷洒三氯化铁-铁氰化钾试剂,如呈蓝色斑点,证明可能含鞣质、酚类或还原性化合物。为了进一步确证是一般酚类化合物还是鞣质,可利用鞣质与生物碱或明胶产生沉淀而除去鞣质后进行实验(生物碱可选择 0.1%咖啡碱水溶液)。

(5) 检查还原糖、多糖和苷:

1) 菲林试剂(Fehling 试剂):取热水浸液 1 mL,加入新配制的菲林试剂 4~5 滴,在沸水浴上加热数分钟,如产生红棕色沉淀,证明含有还原糖或其他还原性物质。

为了检查多糖和苷,另取 4 mL 水浸液,加 1 mL 菲林试剂,在沸水浴上加热 10 min,滤去沉淀,滤液用 10%盐酸酸化后,再加入过量的盐酸 1 mL,于沸水浴上加热半小时,如有混悬物析出表明可能是苷元,滤去沉淀,加 10%氢氧化钠呈碱性,再加入菲林试剂,加热 10 min,如有红棕色沉淀,表示可能有多糖或苷。

2) α -萘酚实验(Molish 反应):取水提液或乙醇提取液,加入 5% α -萘酚乙醇液 2~3 滴,摇匀,沿试管壁缓缓加入少量浓硫酸,如在浓硫酸的接触面产生紫红色环,证明含有糖类、多糖或苷类。

3) 邻苯二甲酸苯胺试剂:将冷水浸液点在滤纸片上,喷洒邻苯二甲酸苯胺试剂,在 105℃加热数分钟,显棕色或棕红色即证明含有还原糖。

(6) 检查皂苷:

1) 泡沫实验:取热水提取液 1~2 mL 于试管内,激烈振摇,如产生较大量蜂窝状泡沫,放置 10 min 以上,甚至加入乙醇,泡沫也不明显地减少,表示含有皂苷。

2) 乙酸酐-浓硫酸反应(Liebermann-Burchard 反应):取乙醇提取液 1~2 mL,挥去乙醇,残渣溶解或悬浮于乙酸酐中,滴加 1 滴浓硫酸,如呈紫红色,并且在溶液上层逐渐变绿,证明含有甾体、三萜类或皂苷。

(7) 检查甾体及三萜类化合物:乙酸酐-浓硫酸实验:取乙醇提取液 3 mL,将溶剂蒸去,于残渣中加 1 mL 乙酸使其溶解,再加 1 mL 乙酸酐,最后滴入 1 滴浓硫酸,试管颜色逐渐由黄→红→

紫→蓝墨绿,表明含有甾体皂苷元、甾醇或三萜类化合物,其中甾体化合物颜色变化较快,而三萜类化合物颜色变化较慢。

(8) 检查黄酮类化合物:

1) 盐酸-镁粉反应:取乙醇提取液 1 mL 于试管中,加镁粉少许,再滴入浓盐酸数滴(必要时在沸水中加热 3 min)如显红-紫颜色,说明可能有黄酮类化合物存在。

2) 碱液实验:取乙醇提取液点于滤纸片上,与氨蒸气接触,如显黄色,当滤纸离开蒸气数分钟后,黄色又消退,说明可能有黄酮类化合物存在。

3) 1%的三氯化铝乙醇溶液:将样品点在滤纸片上,喷洒此试剂,干燥后,如呈黄色斑点,而于紫外灯光下如呈极明显之黄色或黄绿色荧光,说明可能有黄酮类化合物存在。

(9) 检查内酯、香豆素及其苷:

1) 取乙醇提取液及水提取液点于滤纸片上,放在紫外灯光下观察,如有蓝色荧光,加碱后,变成黄色荧光,表明可能含有香豆素及其苷类。

2) 重氮化实验:取乙醇提取液 1 mL,加等量 3%碳酸钠溶液于水浴上煮沸 3 min,冷却后,加新配制的重氮化试剂 1~2 滴,如显红色,表明可能含有香豆素及其苷类。

3) 异羟肟酸铁实验(内酯的反应):取乙醇提取液 1 mL,加 5 滴盐酸羟胺的饱和乙醇液和 10 滴氢氧化钠的饱和乙醇液,加温至反应开始(有气泡产生),冷却,加 5%盐酸使成弱酸性,再加 5 滴 1%三氯化铁溶液,如有橙红色或紫色反应,表明含有酯、内酯、香豆素及其苷类。

(10) 检查强心苷:

1) 碱性 3,5-二硝基苯甲酸试剂(Kedde 试剂):取乙醇提取液 0.5 mL,加碱性 3,5-二硝基苯甲酸试剂 3~4 滴,如呈红色或紫色,表明可能含强心苷。

2) 碱性苦味酸试剂(Baljet 试剂):取乙醇提取液 1 mL,加入碱性苦味酸试剂 1 滴,如呈橙色或红色反应,表明可能含强心苷。

3) 亚硝酰铁氰化钠试剂:取乙醇提取液 1 mL,在水浴上蒸干,用 1 mL 吡啶溶解残渣,加入 0.3%亚硝酰铁氰化钠溶液 4~5 滴,混匀,再加入 10%氢氧化钠溶液 1~2 滴,摇匀,如呈红色反应,且颜色又逐渐消失,表明可能含有强心苷。

(11) 检查蒽醌类:

1) 1%硼酸水溶液:将乙醇提取液点于滤纸片上,喷洒 1%硼酸水溶液,如呈黄橙、红色或荧光表明含蒽醌及其苷类。

2) 5%氢氧化钾溶液:将乙醇提取液点于滤纸片上,喷洒 5%氢氧化钾水溶液,如呈黄橙、红色或荧光表明含蒽醌及其苷类。

3) 碱性实验:取乙醇提取液 1 mL,加入 1%氢氧化钠 1 mL,如产生红色,加入少量 30%过氧化氢液,加热后,红色不褪,用酸液酸化,如红色消退,表明含有蒽醌及其苷类。

(12) 检查挥发油:水浸液如有香味,表示可能含挥发油。将乙醇提取液滴于滤纸片上,如纸片上的油斑能在大气中自然挥发,就可能含有挥发油。

2. 圆形滤纸层析预试法

取一圆形滤纸,在距圆心 1.0~1.5 cm 周围用毛细管点附加样品。一张滤纸上可同时点 8~10 个样品,待溶剂挥发后,在滤纸中心穿入一纸芯,然后放在培养皿中,使纸芯与展开剂接触,滤纸上面再覆盖另一培养皿,进行层析。当溶剂前沿接近培养皿边缘时,取出滤纸,待溶剂挥发后,将滤纸各层析谱带剪开,各纸片喷上不同的显色剂,根据滤纸上出现的颜色斑点确定样品成分。

(1) 展开剂:先以甲醇或 95%乙醇为展开剂,展开后,喷以显色剂,如发现有生物碱、黄酮

类、皂苷等化合物存在时,可用长滤纸重新点样。分别用以下几种专用展开剂进行展开并显色,以确认这些化合物的存在。

常用的专用展开剂:

- 1) 生物碱:氯仿-甲醇(96:4)。
- 2) 黄酮类化合物:15%乙酸。
- 3) 皂苷、强心苷和糖类:正丁醇-乙酸-水(4:1:1)。
- 4) 其他化合物:苯-无水乙醇(8:2)。

(2) 显色剂:

1) 检查生物碱:用碘化铋钾试剂显色,呈棕色、棕红色斑点。如样品的乙醇提取液与本试剂呈负反应,可改用盐酸乙醇提取液实验。

2) 检查酚性成分:用2%三氯化铁乙醇溶液与2%铁氰化钾水溶液的等量混合液显色,呈蓝、紫色斑点。

3) 检查有机酸:用1%溴酚蓝试剂显色,呈黄色斑点。

4) 检查植物甾醇、甾体皂苷、三萜类、三萜皂苷:

用新鲜配制的5%磷钼酸乙醇溶液喷洒,并于120℃烘至显色,显蓝-蓝紫色斑点。

用1%硫酸铈试剂喷洒,于110℃烘2~5 min至呈色。由于结构不同,颜色不同,呈淡红、棕、绿或蓝。

如为正反应,尚需用试管法做泡沫反应及乙酸酐-浓硫酸反应进一步鉴别。

5) 检查内酯、酯类、香豆精及其苷:用异羟肟酸铁试剂喷洒,显蓝-紫色斑点。

6) 检查黄酮类化合物:

先在紫外灯下观察荧光,然后喷以1%三氯化铝试剂,再观察荧光是否加强,如在紫外光下呈现黄色、黄绿色、蓝色荧光斑点,经喷洒三氯化铝试剂后,荧光显著增强。

氨熏后,出现黄色、棕色荧光斑点。

喷以3%三氯化铁乙醇溶液,出现暗蓝色荧光斑点,再经氨熏后转变为棕色荧光斑点。

喷以1%乙酸镁甲醇溶液,烘干2 min,黄酮类成分显黄色荧光斑点,双氢黄酮类成分显蓝色荧光斑点。

为了进一步肯定黄酮或其苷类的存在,也可用试管预试法做盐酸-镁(锌)粉反应来证实。

7) 检查蒽醌及其苷类:

用氨气熏,呈橙黄、橙红或紫红色斑点。

喷以5%氢氧化钾溶液,呈红色。

用1%乙酸镁甲醇溶液显色,90℃烘干5 min,呈橙黄、橙红、紫色。

8) 检查强心苷:先喷以2%3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液,再喷4%氢氧化钠乙醇溶液,显紫红色斑点。

9) 检查氨基酸:用2%茚三酮乙醇溶液喷匀后,在80℃烘干10 min,呈红色、蓝色、蓝紫色斑点。

10) 检查挥发油:首先观察滤纸上有无油迹斑点,如有油斑点则可将滤纸加温烘烤,油斑消失,即证明有挥发油存在。

三、预实验实例

1. 样品溶液的制备

取中药粉防己、虎杖、槐米、秦皮、知母粉末各0.5 g于试管中,分别加5 mL 95%乙醇,于水

浴中加热 5~15 min, 过滤, 滤液供生物碱、黄酮、蒽醌、香豆素、甾体等成分的检测。

2. 预实验方法

(1) 检查生物碱——碘化铋钾试剂沉淀反应: 取防己提取液 0.5 mL 于瓷反应板上, 加入碘化铋钾试剂 1~2 滴, 如有砖红色沉淀产生, 证明有生物碱存在。

(2) 检查蒽醌类化合物——Bornträger 反应(与碱液的反应): 取虎杖提取液 0.5 mL 于瓷反应板上, 加入 2% 氢氧化钠溶液 1~2 滴, 如呈红色表明含蒽醌及其苷类。

(3) 检查黄酮类化合物——盐酸-镁粉反应: 取槐米提取液 0.5 mL 于瓷反应板上, 加镁粉少许(约 5 mg), 再滴入浓盐酸 5 滴, 如显红-紫颜色, 说明可能有黄酮类化合物存在。

(4) 检查内酯、香豆素及其苷类化合物——荧光反应: 取秦皮提取液点于滤纸片上, 放在紫外灯光(365 nm)下观察, 如有蓝色荧光, 加碱后, 变成黄色荧光, 并且荧光强度增加, 表明含有香豆素及其苷类。

(5) 检查甾体及三萜类化合物——乙酸酐-浓硫酸实验: 取知母提取液 2 mL 于试管中, 水浴上蒸去乙醇, 于残渣中加 1 mL 乙酸酐, 沿壁滴入浓硫酸 5 滴, 不要摇晃试管, 观察 30 min, 乙酸酐与浓硫酸交界面先出现红色, 渐渐变为紫→蓝→绿(或黄→红→紫→蓝墨绿)者为阳性反应。表明含有甾体皂苷元、甾醇或三萜类化合物, 其中甾体化合物颜色变化较快, 最后出现绿色; 而三萜类化合物颜色变化较慢, 最后出现红色。

氯仿-浓硫酸实验: 取知母提取液 2 mL 于石英试管中, 水浴上蒸去乙醇, 于残渣中加 0.5 mL 氯仿, 溶解, 沿壁滴入浓硫酸 0.5 mL, 摇匀, 于紫外灯下观察, 在氯仿层中呈蓝色荧光, 硫酸层呈红色为阳性反应。

3. 思考题

- (1) 写出防己、虎杖、槐米、秦皮、知母预实验步骤(用流程图表示)。
- (2) 根据实验结果, 写出各样品中所含的化学成分类型。