

天然药物化学实验指导

(供药学专业用)

湖南医学专科学校植化教研室编

一九九一年三月

〔 说 明 〕

本实验指导是参考全国高等医药院校药学专业《天然药物化学》、《中药化学实验技术与实验》。并结合我省、我校的实际情况由罗琼、洪重炜主编。

由于全国尚没有统一的实验教学大纲及实验指导，本实验指导仅供参考、试用。待新的教学大纲制订后再修订、补充。由于水平有限，时间匆促，本实验指导中难免出现谬误，望师生在使用过程中能提出宝贵意见。

植化教研室

一九九一年三月

目 录

规 则	1
实验一、看《中草药化学实验技术》录相、清点、 辨认仪器	2
实验二、层析技术及其应用	2
实验三、粉防己生物碱的提取、精制、分离及检识鉴定	5
实验四、黄芩中黄芩甙的提取、精制、鉴定	12
实验五、挥发油的提取及各类成分的定性	17
实验六、薯蓣皂素的提取、精制、鉴定	20
实验七、中草药化学成分的系統预试	25
实验八、见 习	32

实 验 室 规 则

- 1、遵守实验室的各项制度，听从指导老师安排。
- 2、实验室做到整齐、清洁。
- 3、对公用仪器、试剂要在指定地点使用，并保持整洁，不要任意挪动。
- 4、实验时要精力集中，不能无故迟到、早退，实验室内禁止吸烟。
- 5、实验时要认真做好记录。
- 6、实验完毕，要打扫卫生及检查水、电，关好门窗。
- 7、实验完毕，要经指导老师许可才能离开。

实验一、看《中草药化学实验技术》录像、清点、辨认仪器

目的要求：

1、通过看《中草药化学实验技术》录像，初步掌握中草药化学实验技术。

2、熟悉中草药化学实验常用的仪器。

实验二、层析技术及其应用

一、目的要求：

- 1、掌握 0.8% CMC-Na 水溶液及硅胶板的制备方法。
- 2、掌握薄层分析及纸层析分离检识化学成分的基本操作技术。
- 3、熟悉一般纸层析及薄层层析的常用仪器。
- 4、掌握氧化铝活度测定的方法。

二、实验内容：

- 1、0.8% CMC-Na 水溶液的配制。
- 2、薄层板的制备。
- 3、氨基酸的纸层析。
- 4、薄层层析分离混合染料。

三、实验原理：

- 1、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 为一大分子有机化合物，

可溶于 H_2O ，借助其分子间的作用力起粘结作用，使吸附剂在玻片上成一层坚固的薄层。

2、薄层层析：硅胶薄层层析在一般情况下是以硅胶作为吸附剂，有机溶剂为展开剂的吸附层析，利用吸附剂对化合物吸附能力的不同，而达分离的目的。

3、纸层析是以吸附在纤维滤纸上的水分作为固定相，以与 H_2O 不相混溶的有机溶剂作为流动相的分配层析。利用样品中各成分在展开剂中和在水中分配的不同而达分离目的。

四、实际内容及操作：

1、0.8% CMC-Na的配制：

取CMC-Na 0.4克加到50 ml蒸馏水中，使CMCNa完全溶解。（如果在加热的过程中水分损失，则须补充失去的水分）放冷即得。

2、硅胶CMCNa板的制备

取层析用硅胶（250~300目）10g加入35 ml 0.8% CMC-Na溶液，研磨成均浆，用涂布器铺成4块大板。平放，待阴干后，于烤箱中100℃-105℃活化半小时，即得符合要求的硅胶CMC板。

3、纸层析法检查氨基酸

支持剂：1号新华滤纸

样 品：板兰根注射剂

对照品：精、脯、亮aa标准品

展开剂：正丁醇：冰醋酸：水（4：1：1）

显色剂：0.2%第三酮乙醇溶液

操作：取层析滤纸，在距底边2 cm处用铅笔划一直作为起始线，并做四个等分点，分别用毛细管点上2滴样品溶液及对照品溶液，待溶剂挥干之后，将滤纸在筒内饱和15分钟，之后，上行展开，展开约10厘米后，取出，标记溶剂前沿，挥去展开剂，喷茚三酮显色剂，加热显色，计算出各氨基酸的 R_f 值。

4. 薄层层析分离混合染料

吸附剂：硅胶—CMC板

样品：罗丹明B、甲基橙、罗丹明B—甲基橙混合液

展开剂：95%乙醇

显色：自然光下观察斑点

操作：取硅胶CMC板，在距底边2 cm处划一起始线，并做3个等分点，分别用毛细管点上3滴样品溶液，待溶剂挥干之后，用上行法进行展开约10厘米取出，标好溶剂前沿，计算各样品成分的 R_f 值。

注意事项：

1. 纸层析时层析滤纸饱和，层析板也需饱和
2. 样品点直径为2~3 mm，间距2.5 cm，起始线不能浸泡在展开剂中。
3. 点样量不能太多，也不能太少，太多易导致拖尾，太少斑点模糊不清。
4. 展开剂的用量大约为10~15 ml。
5. 层析完毕后，应及时标好溶剂前沿。
6. 点样用样品溶液不能太稀也不能太浓，一般为1%。

实验三、粉防己生物碱的提取、精制、分离及检识鉴定

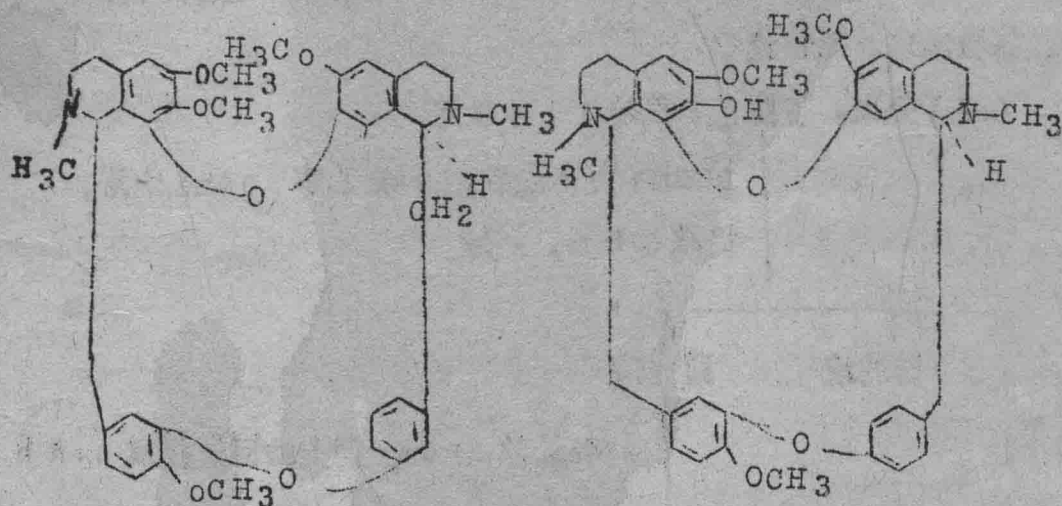
一、实验目的

1. 掌握生物碱的溶剂提取法
2. 掌握生物碱的基本检识法
3. 掌握生物碱的结构和一般性质的关系

二、粉防己中主要成分

粉防己中防己科植物粉防己 (*Stephania tetrandra* S Moore) 的干燥块根。又名汉防己。

粉防己总碱的含量达 1~2%，其中粉防己甲素（粉防己碱）0.5~1%，粉防己乙素（防己诺林碱）0.2~0.5%，尚存在轮环藤酚碱、黄酮甙、酚类、有机酸、挥发油等。

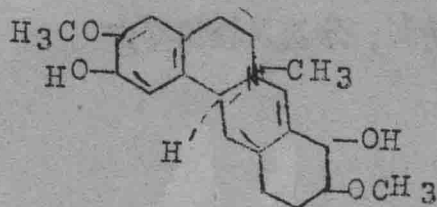


粉防己甲素

粉防己乙素

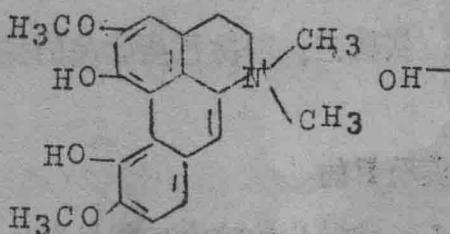
不溶于水，石油醚，易溶于乙醇

溶解度与甲素相似



轮环藤酚碱

为水溶性季铵生物碱，不溶于弱极性溶剂，可溶于水，乙醇，氯仿



木兰花碱

为水溶性季铵碱，不溶于弱极性有机溶剂

三、实验原理

利用生物碱的通性提取总碱；利用季铵碱易溶于水，难溶于有机溶剂的性质分离脂溶性和水溶性碱，利用粉防己甲素与粉防己乙素两者在结构上的差异而产生对氧化铝吸附能力的不同进行分离。

四、实验内容及操作流程：

(一) 提取：粉防己(捣碎) 150克

100ml 圆底烧瓶，95%乙醇300ml水浴，提取1hr，过滤。

醇滤液 药渣

95%乙醇250ml 同上法回流提取0.5h

药渣 醇滤液

合并两次醇滤液(约450ml)，

冷却如有絮状沉淀物，再滤一次。

澄清醇滤液

减压回收乙醇至无醇味

回收乙醇
(上交)

糖浆状浓缩物 (约 30 ml)

逐渐加入 1% HCl (g/V) 溶液至浓缩后的烧瓶内，充分搅拌使生物碱溶解 (不溶物呈树脂状析出)，加至酸水液不再产生混浊为止。静置，过滤。

酸滤液

残渣

1% HCl 适量洗涤数次，洗涤 2 次 (以少量多次为原则，约共 50 ml)

残渣

洗液

(弃去)

合并滤液和洗液，静置后再抽滤一次

澄清酸滤液

(留 10 ml 作生物碱的沉淀反应)

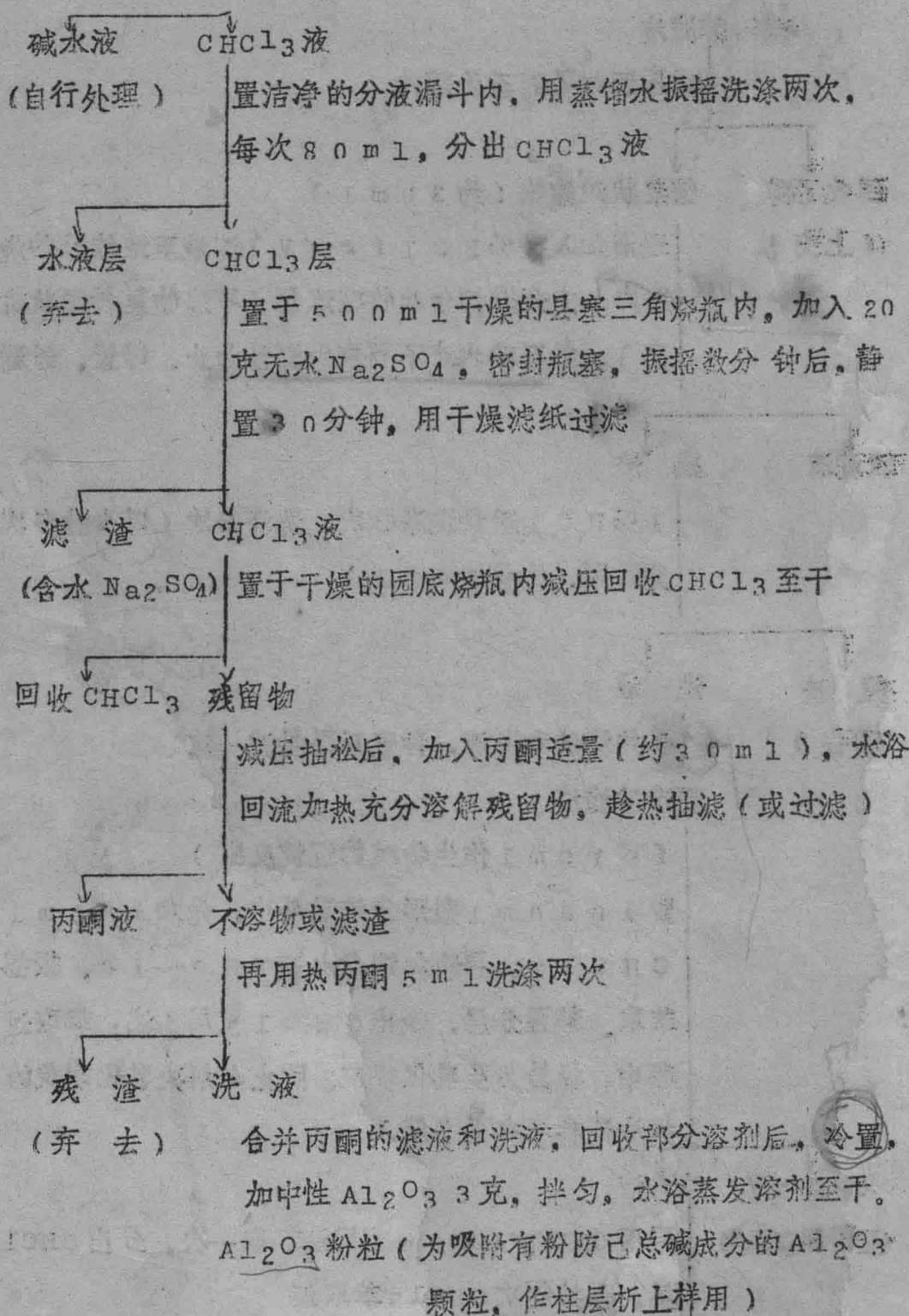
置 1000 ml 梨形分液漏斗中，先加 150 ml CHCl_3 ，再滴加浓氨水调 pH 9~10，振摇萃取，静置分层，分出 CHCl_3 层 (注：萃取过程中，极易发生乳化现象，防止与解决乳化现象的方法请参考有关书籍) ① 振荡 ② 加电 ③ 抽滤

CHCl_3 液

碱水液

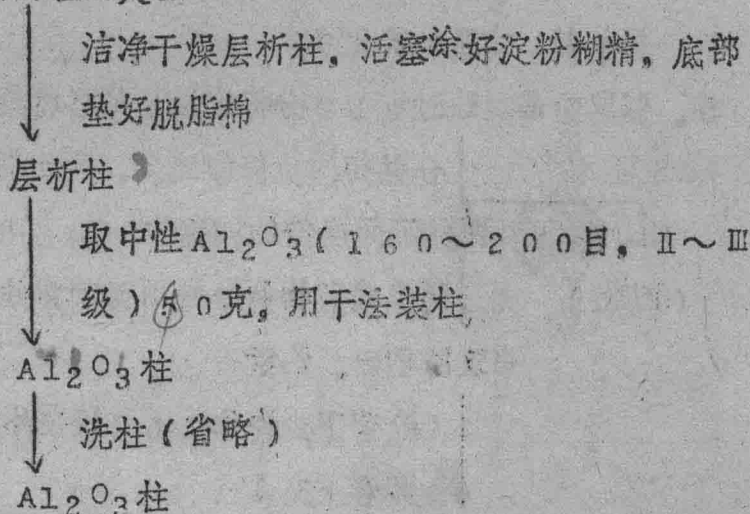
(置密闭容器内)

再用 CHCl_3 100 ml 同法萃取一次，分出 CHCl_3 层，合并两次 CHCl_3 萃取液

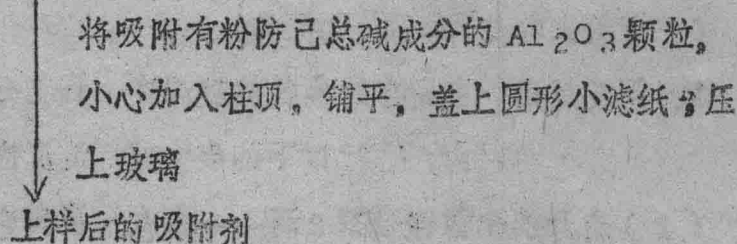


(二) 分离 (Al_2O_3 吸附柱层析法)

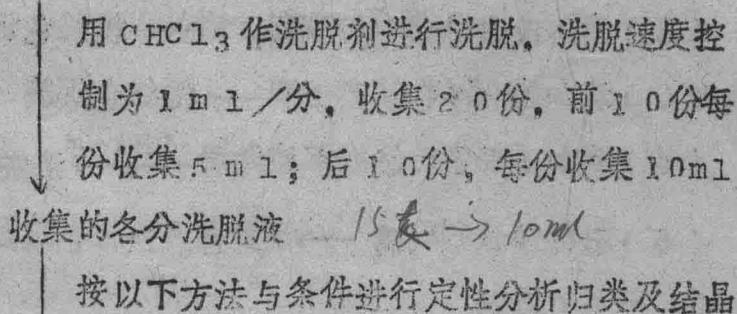
1. 装柱：层析柱的处理



2. 上样



3. 洗脱



4. 分析归类 (TLC法)

吸附剂：硅胶——C M C 板 4 块 (自制)

展开剂： CHCl_3 ：无水 EtOH (10：1) (氨水蒸气饱和) 混匀 5 分钟

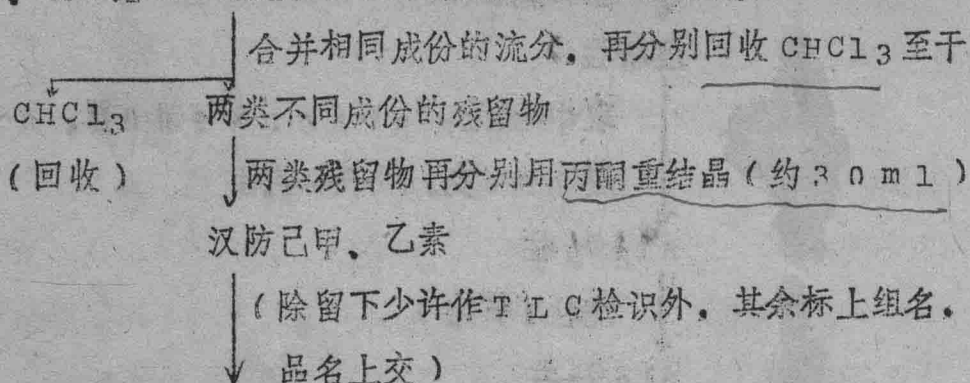
样品液：收集的各流份

对照品：标准粉防己甲素醇液

标准粉防己乙素醇液

显色剂：喷改良碘化钾

5. 制取结晶 通过TLC分析定性后的各收集流份



(三) 检识鉴定

1. 沉淀反应：取留存的生物碱酸滤液10ml分装于5支试管内，进行以下的生物碱沉淀反应。

(1) 滴加碘化钾试剂2滴→白色~淡黄色沉淀

(2) 滴加改良碘化钾试剂2滴→橙红色沉淀

(3) 滴加碘化钾试剂2滴→桔红色沉淀

(4) 滴加1%雷氏铵盐溶液数滴 $\xrightarrow{\text{pH}4\sim5}$ 淡灰色沉淀

(5) 硅钨酸试剂数滴→淡黄色或灰白色沉淀

2. TLC析识

吸附剂：硅胶——CMC板 1块(自制)

样品：自制的汉防己甲素醇液

自制的汉防己乙素醇液

对照品：标准粉防己甲素醇液

标准粉防己乙素醇液

展开剂： CHCl_3 ：无水 EtOH （10：1）自制20ml（氨气饱和）

显色剂：改良碘化铋钾

结果：计算 R_f 值，并与标准品对照比较

3、多级缓冲纸层析：

A、取层析滤纸一张（ $30 \times 8 \text{ cm}$ ），距下端8cm处，用铅笔划一起始线，然后向上每隔2cm划一平行线，配制五种PH值的缓冲液，PH值分别为6.0；5.4；5.0；4.6；

4.0。将滤纸悬空平放（勿贴桌面，以免污染），用棉签沾取不同PH的缓冲液，顺次涂在每隔2cm处的行间，涂布特小心，勿使缓冲溶液渗出线外，涂完后，将纸悬空挂在空中自然干燥。

汉防己叔胺碱多级缓冲

纸层析图：

1、汉防己碱

2、防己诺林碱

3、总碱

B、点样：在起始线上每隔2cm

用毛细管点样

C、展开：于层析缸内用

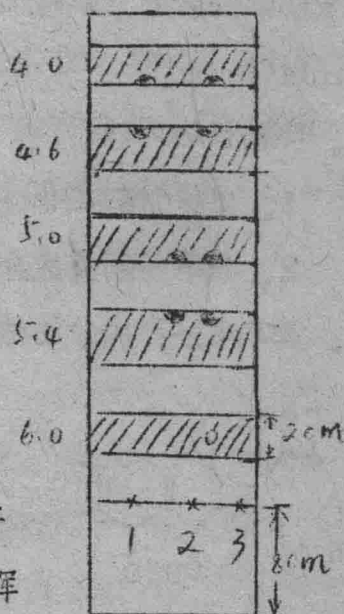
CHCl_3 ： Et_2O ：无水

EtOH （3：3：4）上行展开

D、显色：展开完毕后，取出滤纸，挥

干展开剂，喷改良碘化铋钾

显色。



四、实验要求：

- 1、获取汉防己甲素、汉防己乙素结晶。干燥后，分别称量，计算百分产率，产品分别写上组名，品名上交，并将产品情况登记入表。
- 2、TLC 检识结果交指导老师检查后，方可洗去。
- 3、写出实验报告。

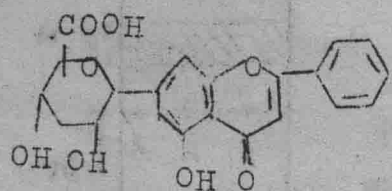
实验四、黄芩中黄芩甙的提取、精制、鉴定

黄芩为唇形科植物黄芩及同属其它黄芩的根。功能清热燥湿，泻火解毒安胎等。现临床所用中成药，银黄注射液，三黄片，茵桅黄注射液。

一、实验目的：

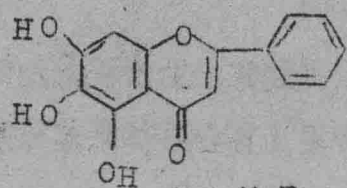
- 1、掌握黄酮类化合物的提取原理和方法
- 2、熟悉黄酮类成分和黄芩甙的主要理化性质和一般检识方法

二、黄芩中主要成分的结构及性质



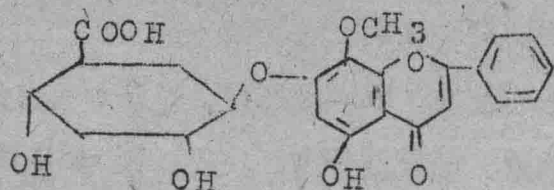
浅黄色针晶

黄芩甙：可溶于 NaHCO_3 、 NaOH 等碱液中。但在碱液中不安定渐变暗棕色，难溶于甲醇，也不溶于 H_2O 、乙醚、氯仿等。

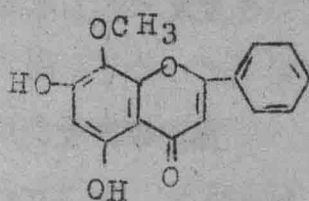


黄芩素：易溶于甲醇、乙醇，在碱液中溶解，但不稳定，易氧化，呈绿色。

黄色针晶



汉黄芩甙



汉黄芩素

三、实验原理：黄芩甙及其它黄酮类化合物在热水中溶解度大，在强酸性条件下易析出沉淀，利用此性质，从黄芩中提取黄芩甙。利用黄芩甙和黄芩素在95%乙醇中溶解度的差别把三者分离。

四、实验方法及流程

(一) 总黄酮类化合物提取

黄芩 1000 克

投入 600 ml 沸水中继续煮沸 20 分钟，用 4 层纱布过滤

滤液①

药渣

再用 600 ml 常水同法煮沸 20 分钟过滤

滤液②

药渣(弃)

合并两次滤液，如果不清再用棉花过滤一次

澄清滤液

澄清 滤液

用浓HCl调PH呈2(约5滴管)酸化液置水浴上加热,
80℃保温30分钟置离心机上离心分层(离心具体操作另附)
↓ 倾去上清液,留取沉淀。

沉 淀

直接在离心管用热水洗二次(第一次不搅,直接加热水洗
倾去水液,第二次加入热水,把沉淀拌匀,离心,倾去上清
↓ 液。

沉淀(置滤纸或培养皿上,60°~70℃干燥2小时)

干燥沉淀(粗总黄酮类)称重计算产率

黄芩甙与黄芩素的分离

粗总黄酮类沉淀

置具塞三角烧瓶内,加95%乙醇100ml捏溶,搅拌
浸泡20分钟,抽滤

醇液① 沉淀

再用100ml 95%乙醇同法浸泡20分钟,抽滤留取沉淀

醇液② 沉淀

再用100ml乙醇直接在滤器上分次洗涤数次至乙
醇液颜色较浅

醇液③ 沉淀抽干溶剂后80℃,干燥30分钟

合并醇液