

全国高等医学院校配套教材

# 天然药物化学实验及学习指导

主 编 堵年生 王晓梅 王新玲

副主编 王小青 热娜·卡斯木

编 委 (按姓氏笔画排序)

王晓文

丛媛媛

米仁沙·牙库甫

依布拉音·司马义

帕丽达·阿不力孜

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书是全国高等医学院校配套教材之一,共分两部分,第一部分实验指导介绍了6个实验,着重讲述了天然药物活性成分的提取、分离和结构鉴定的原理和具体操作方法。第二部分学习指导以统编《天然药物化学》教材的内容为核心,紧紧围绕教学大纲,每章设立了“学习要求”、“重点难点内容解析”及“强化训练”,对教学内容进行了分析、归纳,学生可对课堂知识进行自我检测。书后附有中草药化学成分检出试剂配制法、常用溶剂的回收及精制方法、常用干燥剂性能说明、常用溶剂性质表,以方便读者查阅。

本教材适合药学专业本、专科学生使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

---

天然药物化学实验及学习指导/堵年生,王晓梅,王新玲主编.—北京:科学出版社,2006.9

(全国高等医学院校配套教材)

ISBN 7-03-017921-8

I. 天… II. ①堵…②王…③王… III. 药物化学—化学实验—医学院校—教学参考资料 IV. R914-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第100874号

---

责任编辑:方 霞 夏 宇 / 责任校对:刘亚琦

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。

出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2006年9月第一版 开本:B5(720×1000)

2006年9月第一次印刷 印张:9 1/2

印数:1—2 000 字数:183 000

定价:27.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

# 前 言

《天然药物化学》是运用现代科学理论与技术研究天然产物中生物活性物质的一门学科,是药学专业学生必修的一门重要的专业课。本课程以有机化学、分析化学、波谱学、药用植物学及生药学等课程为基础,重点研究天然产物中生物活性物质的化学结构、生理活性、理化性质、提取分离、结构鉴定、天然药物的开发等。这门课程内容繁多,涉及的知识面较宽,学生学习起来有一定的难度,为了帮助学生更好地理解 and 掌握这门课程,我们特编写了这本实验及学习指导书。

由于天然药物化学课程是一门理论与实践结合很紧密的学科,我们根据教学大纲和实验大纲要求,将理论教学内容与实验教学内容编排在一起,使学生在掌握天然药物化学基本理论的前提下,再进一步结合实践,理论联系实际,从而可帮助学生熟悉和掌握这门课程的基本内容,同时也可以培养学生的动手能力、自学能力、分析问题与解决问题的能力以及创新能力。

本书在理论教学内容方面,我们针对该学科特点,按照教材的内容和章节顺序编排,每章由“学习要求”、“重点难点解析”和“强化训练”三部分组成。“学习要求”按掌握、熟悉、了解三级教学要求列出,使学习者明确目标,有的放矢;“重点难点解析”针对本章的重点、难点进一步透彻讲解,并在学习方法上给予提示、点拨,可使学生对学习内容融会贯通,抓住重点,攻克难点;“强化训练”采用选择题、名词解释、填空题和问答题等题型,A<sub>1</sub>型题、A<sub>2</sub>型题、B型题突出《天然药物化学》的知识要点,难易度相宜,适用于高等医学院校药学专业、中药学专业本、专科学生使用,也可作为成人教育或自学用参考书,对报考天然药物化学研究生的学生也有裨益。

本书在实验教学内容方面,为了能适应不同的实验条件和药学专业的需要,共选编了6个实验。前5个实验主要涉及几个重要的天然药物成分类型的提取、分离和结构鉴定;第6个实验是一个设计性的实验。每一实验内容以提取、分离为主,鉴定为辅,在提取方面列举了几种方法,希望学生能举一反三,灵活运用。

本书附录中摘编了一些实验中相关内容,如:常用溶剂性质表、常用溶剂回收及精制方法等,有利于学生查阅。

本教材各部分分别由以下人员分工编写而成:实验须知、实验一、第一章、第二章、第九章由王新玲编写;实验二、实验五、第三章、第四章、第七章由王晓梅编写;

实验三、实验四由堵年生、王新玲编写;实验六、第五章、第六章及第八章由王小青、热娜·卡斯木编写;附录由各编委联合完成。

尽管我们作了种种努力,但因编者水平及能力有限,不当及谬误之处在所难免,敬请广大师生和读者予以指正,以便不断改正、补充和完善。

编 者  
2006 年 8 月

# 目 录

前言

## 第一部分 实验指导

实验须知	(3)
实验一 芦丁的提取和鉴定	(5)
实验二 虎杖中羟基蒽醌的提取与分离	(14)
实验三 大孔树脂吸附法分离肉苁蓉中苯乙醇总苷成分	(19)
实验四 皂苷、香豆素、强心苷定性	(22)
实验五 掌叶防己碱的提取与分离及延胡索乙素的制备	(24)
实验六 中草药化学成分预试验	(30)

## 第二部分 学习指导

第一章 总论	(39)
第二章 糖和苷类	(50)
第三章 苯丙素类	(59)
第四章 醌类化合物	(65)
第五章 黄酮类化合物	(74)
第六章 萜类和挥发油	(86)
第七章 三萜及其苷类	(99)
第八章 甾体及其苷类	(105)
第九章 生物碱	(113)
参考答案	(125)
参考文献	(128)
附录一 中草药化学成分检出试剂配制法	(129)
附录二 常用溶剂的回收及精制方法	(135)
附录三 常用干燥剂性能的说明	(139)
附录四 常用溶剂性质表	(142)

# 第一部分 实验指导



# 实验须知

## 一、实验规则

(1) 进实验室前,必须首先预习实验内容,明确实验目的和要求,了解实验的基本原理、内容和方法。

(2) 实验室中应保持安静,不许抽烟,不许大声喧哗,精力要集中,不得擅自离开操作台。

(3) 爱护公物。公用仪器及药品用完后要放回原处,损坏仪器应填写破损单,注明原因交给指导老师。

(4) 保持室内卫生,学生轮流做值日,做到桌面、地面、水槽、仪器四净,实验完毕,清倒垃圾箱和废物缸,离开实验室前一定要检查门、窗、水、电是否关闭。

(5) 在实验室内,必须树立“安全为了实验,实验必须安全”思想。有关安全问题,可参阅下面安全常识介绍。

## 二、实验室安全常识

进行天然药物化学实验,经常要使用易燃、易爆溶剂,如甲醇、乙醇、乙醚、苯等;有些溶剂也有一定的毒性,如苯、 $\text{CHCl}_3$ ;有些无机酸、碱也有一定的腐蚀性,所以在操作过程中,必须树立安全第一的思想,绝不允许马虎大意,一旦草率操作,发生事故,轻则损伤衣服、皮肤,重则着火爆炸,既影响人身安全又损坏公物,严重者还要被追究责任。

为了避免不应发生的事故,除了思想上高度重视外,我们还必须有如何预防和处理事故的一般常识。

### (一) 事故和预防

(1) 实验前必须明确实验原理,细心检查玻璃仪器是否有裂缝、破损等。实验装置必须安全、稳当,严格遵守操作规程。

(2) 严禁在实验室内吸烟、吃食物。

(3) 易燃、易爆的有机溶剂必须注意远离火源、电源。多余的或回收的有机溶剂切勿倒入废物缸中。浓缩溶剂时,切勿直接加热挥发于空气中,这样既易着火,又不利于健康。常用易燃溶剂蒸气爆炸极限量见表1。



表 1 常用易燃溶剂蒸汽爆炸极限表

名 称	BP (°C)	闪燃点 (°C)	爆炸范围 (体积%)
甲醇	64.96	11	6.72 ~ 36.50
乙醇	78.5	12	3.28 ~ 18.95
乙醚	34.51	-45	1.85 ~ 36.5
丙酮	56.2	-17.5	2.55 ~ 12.80
苯	80.1	-11	1.41 ~ 7.10

(4) 实验中如出现有毒或有腐蚀性气体的操作应在通风橱内进行。

## (二) 事故的处理和急救

倘若出现事故应立即采取适当措施并报告指导教师,下面着重介绍火灾的处理。

(1) 一旦发生了火灾,应保持沉着镇静,不要惊惶失措,首先应立即熄灭火源,如切断电炉电源,关闭煤气等,并移开附近的易燃物质。

(2) 小量溶剂(几毫升)着火,可用湿布盖熄。锥形瓶内溶剂着火,可用石棉网或湿布盖熄,切不可乱扔,使火焰蔓延。稍大的火焰可用黄沙或湿拖把盖灭。

(3) 发生大火,应用灭火器扑灭,实验室内均有灭火器备用,平时就要了解各种灭火器的性能和使用方法,以防临阵慌乱,不知所措。

(4) 无论何种灭火器,皆应自火的四周向中心扑灭。

(5) 有机溶剂着火绝对不能用水浇,因为这样反而会使火焰蔓延开来。

(6) 若衣服着火,切勿奔跑,用厚的外衣包裹使熄,较严重者应躺在地上滚动(以防火焰烧向头部),用自来水冲淋熄灭。

(7) 严重受伤者应立即送医院治疗。

常用的灭火器有以下几种:

(1) 四氯化碳灭火器:用以扑灭电器内或电器附近之火。 $\text{CCl}_4$ ,本身有毒;且在高温下生成光气(剧毒),故不能在不能通风的实验室内使用。

(2) 二氧化碳灭火器:是化学实验室常用的一种,也可扑灭电器发生的火灾,注意使用时压缩的 $\text{CO}_2$ 。液体不要喷在手掌上,以免温度聚降造成手冻伤。

(3) 泡沫灭火器:内分别装有 $\text{NaHCO}_3$ 溶液和硫酸铝溶液,使用时将筒身颠倒,二溶液反应生成 $\text{NaHSO}_4$ 、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 及大量 $\text{CO}_2$ ,所以灭火机制仍然是 $\text{CO}_2$ 泡沫。因为后处理麻烦,故一般在大火时使用。

任何事故的发生不仅造成实验失败,而且影响人身安全及公共财物的损坏。只有时时处处小心,消除产生事故的一切隐患,才能防患于未然!



# 实验一 芦丁的提取和鉴定

芦丁(Rutin)亦称芸香苷(Rutoside),广泛存在于植物界中,其中以槐花米和荞麦叶含量较高,可作为提取芦丁的原料。

槐花米系豆科植物 *Sophora japonica* L. 的花蕾,自古作为止血药。槐花米中所含主要成分芸香苷,有减少毛细血管的通透性作用,临床上主要用为防治原发性高血压病的辅助治疗药物。此外,芦丁对于放射线伤害所引起的出血症亦有一定作用。

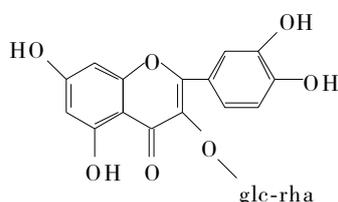
## 一、目的要求

- (1) 根据提取成分的极性度和溶解性能,选择提取溶剂的方法、比较各种方法的优缺点。
- (2) 提取过程中防止或减少苷水解的方法。
- (3) 黄酮苷和黄酮苷元的分离。
- (4) 熟悉黄酮苷的鉴定:包括酸水解后层析鉴定苷元和糖;衍生物的制备;苷和苷元的化学性质试验,以及 UV、IR 光谱鉴定等内容。

## 二、槐花米中已知主要成分的理化性质

槐花米中芦丁的含量可高达 20%,另含少量皂苷,皂苷水解后,可得到桦皮醇(Betulin,  $C_{30}H_{50}O_2$ )及槐二醇(Sophoraadiol,  $C_{30}H_{50}O_2$ )。

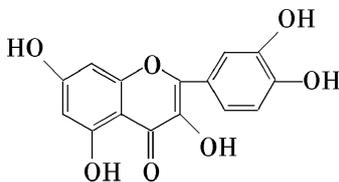
1. 芦丁(芸香苷 Rutin) 本品为淡黄色细小针状结晶,  $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ , 熔点(mp)  $177 \sim 178^\circ\text{C}$ , 无水物熔点  $190^\circ\text{C}$  (不完全),  $214 \sim 215^\circ\text{C}$  发泡溶解。芦丁溶于热水(1:200), 难溶于冷水(1:8000), 溶于热甲醇(1:7), 冷甲醇(1:100); 热乙醇(1:30), 冷乙醇(1:300), 难溶于乙酸乙酯、丙酮; 不溶于苯、氯仿、乙醚及石油醚等易溶于碱液中呈黄色, 酸化后又析出。



2. 槲皮素(Quercetin) 即芸香苷苷元,为黄色结晶,  $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ , mp  $313 \sim$

314℃, 无水物 mp 316℃。

槲皮素溶于热乙醇(1:23), 冷乙醇(1:300)。可溶于冰醋酸、吡啶, 乙酸乙酯、丙酮等溶剂。不溶于石油醚、苯、乙醚、氯仿和水中。



3. 皂苷 易溶于水、吡啶, 能溶于甲醇。经酸水解后得桦皮醇及槐二醇, 均溶于苯、乙醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、乙醇、甲醇中。

### 三、自槐花米中提取芦丁

#### 1. 提取方法

(1) 碱溶酸析法: 取槐花米 40g (未压碎), 置于 100ml 烧杯中, 用冷水快速清洗去泥沙等杂质, 沥干水。加 0.4% 硼砂水溶液 400ml, pH 6~7 左右, 在搅拌下以石灰乳调至 pH 8, 加热微沸 30 分钟。补充失去的水分, 并保持 pH 8, 静置约 5~10 分钟, 倾出上清液, 用尼龙布过滤。重复提取一次, 合并滤液。将滤液用盐酸调至 pH 5 左右, 再加 0.5ml 尼泊金, 放置过夜, 抽滤, 沉淀用水洗 3~4 次, 放置空气中自然干燥得粗芦丁, 计算得率。

(2) 醇提法: 取槐花米 20g, 置于 500ml 圆底烧瓶中, 加乙醇 150ml 加热回流 1 小时, 稍冷后抽滤, 滤渣再加乙醇 100ml 回流 1 小时, 合并乙醇提取液, 放冷, 析出絮状沉淀, 过滤, 滤液浓缩至约 50ml, 放置过夜, 滤取析出结晶, 母液继续浓缩一半, 放置又析出结晶。合并结晶。用乙醚 30~50ml 分次洗去脂溶性成分(油脂、叶绿素等), 再用丙酮 10ml 洗涤一次, 得粗芦丁, 计算得率。

(3) 直接水提法: 取槐花米 20g, 研碎, 置 1000ml 烧杯中加沸水 600ml, 煮沸 30 分钟(烧杯上盖一表面皿以防水分蒸发), 趁热过滤(四层纱布加脱脂棉), 滤渣再重复用沸水提取二次(每次用水 300ml, 煮沸 20 分钟, 再过滤, 三次滤液合并, 静置 24 小时, 析出沉淀, 然后抽滤, 并用少量水洗涤 2~3 次, 得芦丁粗品, 在实验室中自然干燥, 计算得率。

#### 2. 重结晶法

(1) 方法一: 取粗芦丁 2g, 加乙醇 50~60ml 加热溶解, 趁热抽滤, 将溶液浓缩至约 20~30ml 放置, 析出结晶, 母液再浓缩一半, 又析出结晶。合并结晶再用乙醇重结晶一次。

(2) 方法二: 取粗芦丁 2g, 加去离子水或蒸馏水 400ml, 加热煮沸, 趁热抽滤(以滑石粉助滤), 放置过夜析晶(或放冷析晶)。抽滤, 得精制芦丁。



## 四、鉴定方法

### (一) 苷的水解——苷元和糖的鉴定

1. 酸水解和苷元的分离 称取芦丁(芸香苷)1g,加2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  80ml,小火加热煮沸回流30分钟至1小时,开始加热10分钟为澄清溶液,逐渐析出黄色小针状结晶,即槲皮素,抽滤之结晶(保留滤液20ml,以检查其所含单糖)。加50%乙醇(按1g用90ml量)加热回流使槲皮素粗晶溶解,趁热抽滤,放置析晶。抽滤得精制品,在减压下 $110^\circ\text{C}$ 干燥可得槲皮素无水物。测熔点,进行纸层析鉴定。

#### 2. 糖的鉴定

(1) 纸层析鉴定:取上述滤除槲皮素时保留的水解滤液20ml,加 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 的细粉(约2.6g)中和至pH7,滤除生成的 $\text{BaSO}_4$ 沉淀(可用滑石粉助滤),滤液浓缩至约1ml,供纸层析点样用。

展开剂:正丁醇:醋酸:水=4:1:5 上层溶液或4:1:1。

对照品:葡萄糖、鼠李糖水溶液。

显色剂:苯胺邻苯二甲酸盐试剂喷后 $105^\circ\text{C}$ 烘10分钟,显棕色或棕红色斑点。

(2) 糖脎的制备及鉴定:余下水解母液小心用5%  $\text{NaOH}$ 中和,滤去棕红色沉淀物,滤液减压浓缩至30ml左右。加入盐酸苯肼1g。醋酸钠2g,沸水浴中加热半小时,析出黄色的混合糖脎,停止加热,从水浴上取出烧瓶,冷却,取结晶少许置于载玻片上显微镜下观察,鼠李糖脎为菊花形聚针晶,葡萄糖脎为扫帚状聚针晶,吸滤取出糖脎结晶,用水洗涤。干燥后,使溶于丙酮(约用5~7ml丙酮)。滤过,滤液加水适量使成30%丙酮液,葡萄糖脎即析出,抽滤后以少量丙酮重结晶一次,mp  $209^\circ\text{C}$ 。滤去葡萄糖脎后的母液,再加水稀释;鼠李糖脎即析出,以稀乙醇重结晶,mp  $185^\circ\text{C}$ 。

### (二) 芦丁和槲皮素的层析鉴定

1. 纸层析鉴定 点样:取新华滤纸(1号)15cm长,宽度视需要而定,在离一端8cm处画一线,每隔1.5cm点一样品。

#### (1) 样品

- 1) 芦丁(自制)
- 2) 芦丁(标准品)
- 3) 槲皮素(自制)
- 4) 槲皮素(标准品)

(2) 展开剂:用下列溶剂系统之一。

- 1) 正丁醇-醋酸-水(4:1:5 上层或4:1:1)
- 2) 25% 醋酸水溶液



### (3) 显色

- 1) 可见光下观察黄色斑点。紫外光下观察荧光斑点。
- 2) 经氨气熏后再观察。
- 3) 喷三氯化铝试剂后再观察。

## 2. 芦丁和槲皮素的聚酰胺薄层

### (1) 样品

- 1) 芦丁(自制)
- 2) 芦丁(标准品)
- 3) 槲皮素(自制)
- 4) 槲皮素(标准品)

### (2) 展开剂:乙醇-水(7:3)

### (3) 显色

- 1) 可见光下观察黄色斑点。紫外光下观察荧光斑点。
- 2) 经氨气熏后再观察。
- 3) 喷三氯化铝试剂后再观察。

## (三) 衍生物的制备

1. 槲皮素五酰化物的制备 取槲皮素 200mg,置于 50ml 圆底烧瓶内,加入 4ml 无水吡啶,上接空气冷凝管,于水浴上加温,振摇使其完全溶解,再加入 5ml 醋酐,摇匀,于水浴上加热反应 30 分钟,放冷,将反应液在搅拌下倾入 150ml 冰水中,一直搅拌至油滴消失,固体沉淀析出,抽滤析出的白色沉淀,用水洗至中性,干燥,用 95% 乙醇重结晶,得细针状结晶,测定其熔点,并与文献记载的五乙酰基槲皮素的熔点(193 ~ 195℃)对比。恒温干燥器内干燥后,送做红外吸收光谱与标准图谱对照。图 1 为槲皮素红外光谱图,图 2 为五乙酰基槲皮素红外光谱图。

2. 槲皮素五甲醚的制备 取槲皮素结晶 400mg,置于 150ml 的三颈瓶中,加 50ml 无水丙酮,装上电动搅拌器、冷凝管及温度计。加热回流搅拌,每间隔一适当时间加入无水碳酸钾 0.2g 和硫酸二甲酯 0.2ml,大约在 1.5 小时左右加完 4 克无水碳酸钾和 4ml 硫酸二甲酯,继续加热回流搅拌直至溶液黄色完全消退为止,约需 4 ~ 5 小时。停止加热,取下烧瓶,反应液经过滤,沉淀用热丙酮洗涤数次,合并洗、滤液,蒸馏回收部分丙酮,留存 10 ~ 15ml,放置,渐渐析出无色结晶,母液浓缩,复得一批结晶,如母液浓缩后呈糖浆状不能析出结晶,表示过量的硫酸二甲酯存在。应加 5% 的 NaOH 数滴,振摇使硫酸二甲酯水解,此时又可析出一小部分结晶(检查所析出结晶对 1% FeCl<sub>3</sub> 的反应,甲基化完全者应呈负反应),合并,以乙醇重结晶,得槲皮素五甲醚(mp 152 ~ 153℃)。甲基化不完全时对三氯化铁呈正反应,主要产物为槲皮素 3,7,3',4'四甲醚, mp 161 ~ 161.5℃。

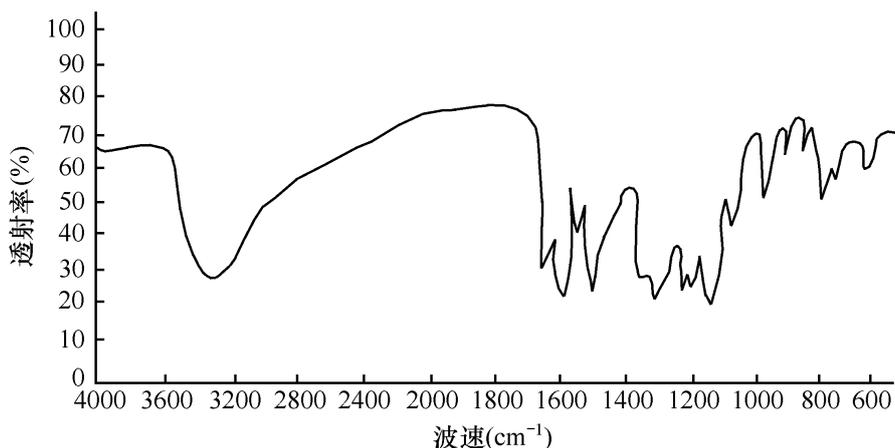


图1 槲皮素红外光谱图

(固相,溶剂:KBr 浓度 1%,厚度 0.5mm,扫描时间 6')

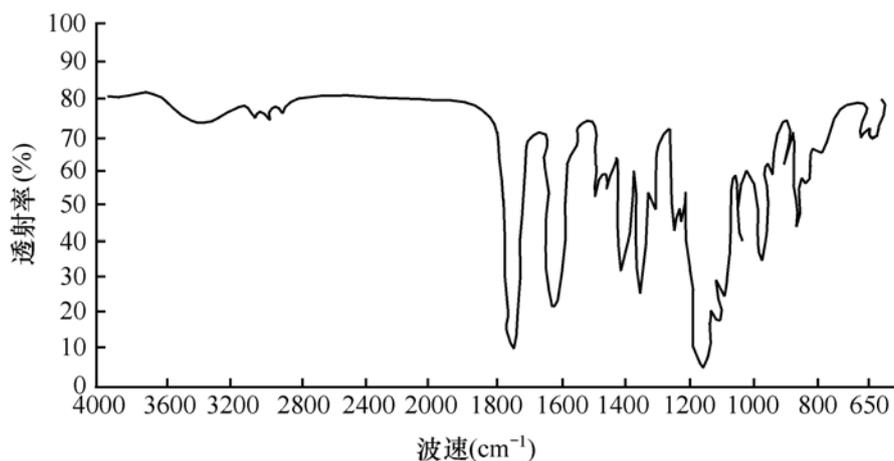
$$\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}: 3600 \sim 2800 (\text{broad. } -\text{OH}), 1640 (\text{C}=\text{O}), 1500, 1600 (\text{芳环})$$


图2 五乙酰基槲皮素红外光谱图

(固相,溶剂,KBr 浓度 1%,厚度 0.5mm,扫描时间 6')

$$\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}: 1760 (-\text{C}-\text{CH}_3), 1600 (\text{芳环}), 1420 (\text{W}), 1360 (\text{S}) (\text{酰基特征峰})$$

#### (四) 苷和苷元的性质试验

1. Molish 反应 取试料数毫克置小试管中,加乙醇 0.5ml,加  $\alpha$ -萘酚数毫克,振摇使溶解。斜置试管沿管壁注入浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  约 0.5ml,静置,观察两层溶液的界面变化。出现紫红色环者为阳性反应,是试样为糖或分子中含糖基的结构。比较芦丁与槲皮素的不同。

2. 盐酸-镁粉试验 取样品(芦丁、槲皮素)1mg 置于试管内,加 50% 乙醇 2ml,在水浴上加热溶解,加镁粉约 50mg,再滴加浓盐酸 2 滴,溶液由黄色变为红色。



3. 硼氢化钾(钠)反应 专门还原二氢黄酮而呈现红至紫色。

取橙皮苷溶于 50% 乙醇液 5 滴,置于试管内,加硼氢化钾一粒(米粒大),再滴加浓盐酸,观察呈现颜色变化。

4. 锆-枸橼酸反应 取槲皮素,黄芩素各 0.1mg,分别置于试管内,加甲醇加热溶解,再分别加 2% 二氯氧锆 3~4 滴,具有 C<sub>3</sub>-OH 或 C<sub>5</sub>-OH 的黄酮即呈鲜黄色,然后分别加 2% 枸橼酸甲醇溶液 3~4 滴,具有 C<sub>3</sub>-OH 的黄酮黄色不褪,具有 C<sub>5</sub>-OH 的黄酮黄色减退。

5. 三氯化铝反应 取一样品数毫克,溶于甲醇,加 1% 三氯化铝甲醇溶液,黄酮类应呈鲜黄色并有荧光。

6. 醋酸镁反应 取样品(芦丁、橙皮苷)数毫克,溶于 50% 乙醇中,在试管中或点样于滤纸片上,加 1% 醋酸镁甲醇液,黄酮类(芦丁)呈黄色荧光,二氢黄酮类(橙皮苷)呈天蓝色荧光。

7. 醋酸铅沉淀反应 取葛根的水浸液、芦丁水溶液各 1~2ml,分别置于试管内,各滴加醋酸铅试剂数滴观察其有无沉淀,一般应将水溶液加醋酸铅试剂产生沉淀,滴加至不再产生沉淀时,过滤或离心除去沉淀,取其上清液,再加碱式醋酸铅数滴,观察有无沉淀发生。

或:取少量样品溶于热水或稀甲醇,加入 5% 中性醋酸铅溶液数滴,观察有无沉淀,再加碱式醋酸铅溶液数滴,观察有无沉淀产生。

8. 三氯化铁反应 取样品数毫克溶于水或乙醇中,加 1% FeCl<sub>3</sub> 溶液 1 滴。注意呈色变化,一般对黄酮类化合物 3-羟基呈绿色,3,5-双羟基呈深绿色,8-羟基也呈绿色,而对 4,6,7-羟基不呈色,试比较芦丁与槲反素的呈色反应。

9. 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和浓 HCl 的反应 取芦丁数毫克置于白色有孔磁板上,滴加浓硫酸成盐,呈橙色,待加酸溶解后,加较多量水稀释后转为浅黄色,并析出芦丁黄色沉淀。

10. 对不同强度碱度的溶解度试验 取小试管四只一组,每管中加入试料数毫克。分别加稀氨溶液、5% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液和 1% NaOH 水溶液各 1ml。振摇后观察溶解情况,溶解的溶液应呈黄色,再加 HCl 数滴酸化,黄色褪去或变浅并有沉淀或混浊析出。

### (五) 槲皮素的紫外光谱鉴定

1. 原理 利用紫外吸收光谱,测定黄酮化合物在加入各种电解质或络合剂后吸收峰的位移,根据位移的情况,以判断该化合物羟基的位置。

2. 试剂配制

(1) 无水甲醇:用分析纯的甲醇,加入 10% CaO,放置 24 小时后并加热回流 1 小时。回流时,冷凝管顶端应安装 CaCl<sub>2</sub> 干燥管,然后蒸馏得无水甲醇。

(2) 甲醇钠溶液:取 0.25g 金属钠,剪碎,小心的加入无水甲醇 10ml 中,此溶



液储存在玻璃瓶中,用橡皮塞密封。

(3) 氢氧化钠溶液:用 2.5g 氢氧化钠,加 10ml 水溶解。

(4) 三氯化铝溶液:2.5g 无水三氯化铝(显黄绿色)小心地加入无水甲醇 50ml 中,放置 24 小时后全溶。

(5) 醋酸钠:用无水粉状醋酸钠。

(6) 硼酸饱和液:将无水硼酸加入适量无水甲醇,配成饱和溶液。

依照上述方法制备的储备液可放置 6 个月。

### 3. 测定方法

(1) 黄酮羟基位置的测定:精密称取黄酮样品(槲皮素)约 1.2mg,用无水甲醇溶解,再稀释至 100ml。

1) 黄酮光谱:取样品溶液约 3mg 置于石英杯中(1cm),在 200 ~ 500nm 波段内进行扫描。重测一次,观察光谱的再现性。

2) 氢氧化钠光谱:取样品溶液 3ml 置于石英杯中,加 NaOH 2 ~ 3 滴立即测定。放置 5 分钟后,再进行测定。

3) 甲醇钠光谱:取样品溶液约 3ml 置于石英杯中,加入甲醇钠溶液 5 ~ 7 滴后,立即进行测定。放置 5 分钟后,再测定一次。

4) 三氯化铝光谱:在盛有约 3ml 样品溶液的石英杯中,加入  $\text{AlCl}_3$  溶液 6 滴,放置一分钟后进行测定。测定后,加入 3 滴盐酸溶液(浓盐酸:水 = 1:1),再测定一次。

5) 醋酸钠光谱:取样品溶液约 3ml 置于石英杯中,加入适量的无水醋酸钠固体,摇匀;杯底剩有约 2ml 的醋酸钠时,两分钟内进行测定。

槲皮素加上上述位移试剂后测定的 UV 光谱图分别见图 3 ~ 图 5。

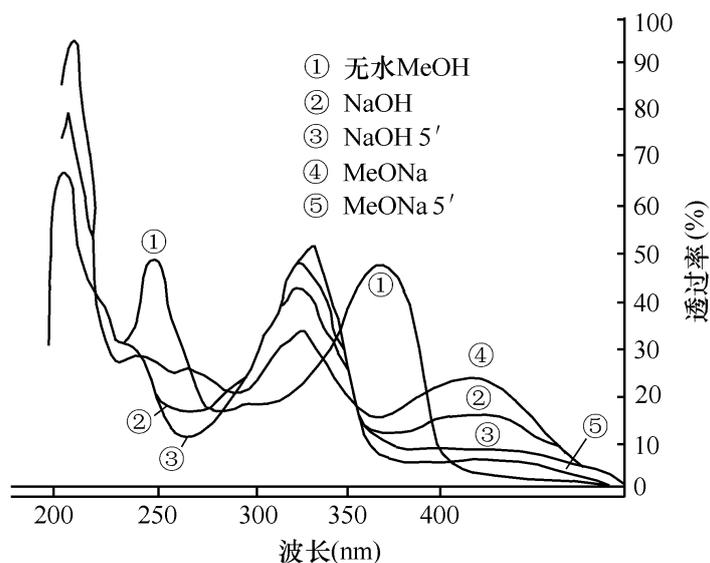


图3 槲皮素加位移试剂

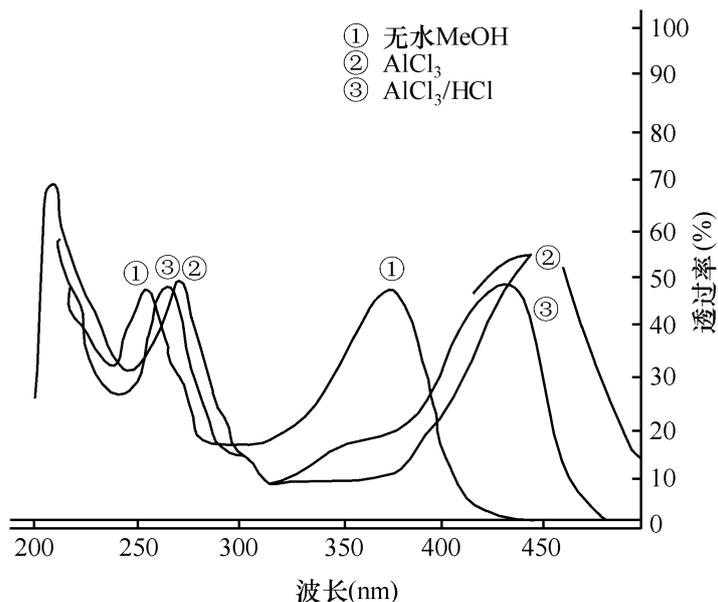


图4 槲皮素加位移试剂

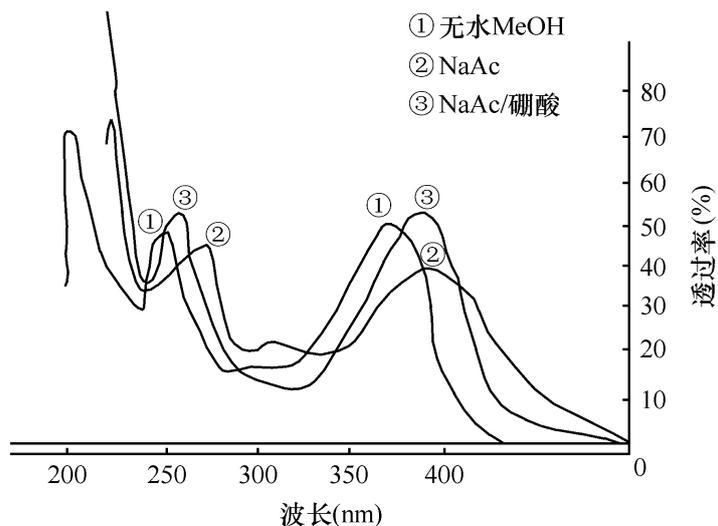


图5 槲皮素加位移试剂

(2) 克分子吸收系数的测定:根据已测定的黄酮光谱,测量吸收峰的波长和吸收峰前后 20nm 的波长范围。然后取样品溶液约 3mg,置于 1cm 长的石英杯中;用紫外光谱仪,仔细测量在上述波长范围内各波长的吸收值。反复测定三次。

记录:

1) 位移测定的结果。

2) 测定克分子吸收系数在吸收峰前后 20nm 波长范围内,依次测定波长和吸收值,用方格纸作图,精确地测出吸收峰的波长和吸收值,记录测定结果(见表 2)。

表 2 槲皮素 (MeOH) 加位移试剂结果表 ( $\lambda_{\max}^{\text{nm}}$ )

加入试剂	编 号	Ⅱ 峰	I 峰	位移值	羟基位置
无水甲醇	1	256	371		
氢氧化钙	2		430	I 峰 $\Delta$ 59	4'-OH
NaOH 5'	2'	分解	分解		3,4'-OH
MeONa 5'	3		416	I 峰 $\Delta$ 45	3-OH
MeONa 5'	3'	分解	分解		3,4'-OH
AlCl <sub>3</sub>	4	270	450	I 峰 $\Delta$ 79	3,5 及 -3',4'-OH
AlCl <sub>3</sub> /HCl	4'	265	425	I 峰 $\Delta$ 54	3',4'-OH
NaOAc	5	277	387	Ⅱ $\Delta$ 21	7-OH
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6	259	385	I 峰 $\Delta$ 14	3',4'-OH



## 实验二 虎杖中羟基蒽醌的

### 提取与分离

虎杖为蓼科植物虎杖 *polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc 的根茎及根,习称斑根、阴阳莲。中医用为清热利湿,活血通经药。民间用以治风湿关节痛、筋骨痛、跌打损伤。近年来用于治疗慢性支气管炎(多用复方),高血脂病及烧伤有效。

#### 一、目的要求

- (1) 掌握用乙醇回流提取中草药的方法和注意点。
- (2) 掌握用乙醚分出脂溶性成分的方法。
- (3) 掌握 pH 梯度萃取的操作方法。
- (4) 熟悉蒽醌类成分的性质鉴定方法。

#### 二、虎杖中已知成分的物理性质

虎杖中含有羟基蒽醌类化合物约 0.1% ~ 0.5%,其中以大黄素为最多,大黄素-6-甲醚、大黄酚-8-β-D-葡萄糖苷及大黄素-6-甲醚-8-β-D-葡萄糖苷含量均较少,另含芪三酚及其苷约 1%。

1. 大黄素(Emodin) 本品为橙黄色长针晶(丙酮),  $C_{15}H_{10}O_5$ , 其 mp 256 ~ 257°C, 几乎不溶于水,对于下列溶剂溶解度为:四氯化碳 0.01%, 苯 0.041%, 氯仿 0.071%, 乙醚 0.14%;溶于乙醇及 NaOH,  $Na_2CO_3$ ,  $NH_3 \cdot H_2O$  溶液中。

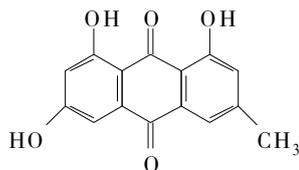
2. 大黄素-6-甲醚(Physion) 本品为黄色针状结晶, mp 207°C, 能升华不溶于水,溶于苯、氯仿、乙醚、乙醇、冰醋酸,很难溶于石油醚,易溶于 NaOH 水溶液。

3. 大黄酚(Chrysophanol) 本品为六角形片状结晶,或针状结晶, mp 196°C, 能升华,不溶于水,溶于苯、氯仿、醚、乙醇、冰醋酸,很难溶于石油醚,可溶于 NaOH 水溶液及热的  $Na_2CO_3$  水溶液。

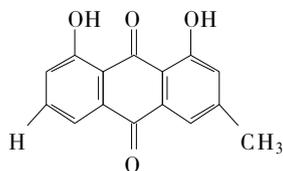
4. 大黄素-8-β-D-葡萄糖苷(E-modin-8-β-D-glucoside) 本品为淡黄色针晶, mp 190 ~ 191°C (乙醇-水)。



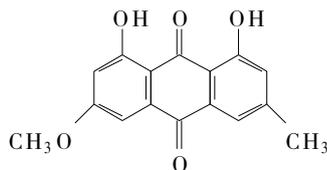
大黄素



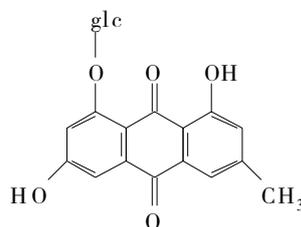
大黄酚



大黄素-6-甲醚



大黄素-8-β-D-Glc 苷



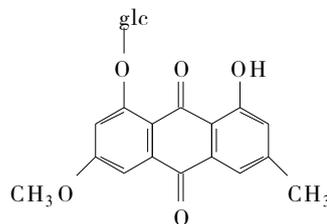
5. 大黄素-6-甲醚-8-β-D 葡萄糖苷 (Physcione-8-β-D-glucoside) 本品为黄色针晶, mp 230 ~ 232°C (甲醇-水)。

6. 芪三酚 (Resveratrol) 本品又称白藜芦醇, 为无色片状结晶或针晶, mp 256 ~ 257°C, 261°C 升华 (225°C 开始升华), 易溶于乙醚、氯仿、丙酮、乙醇、甲醇等。

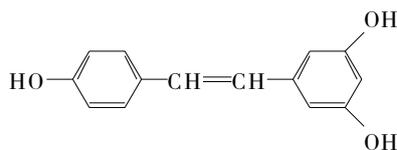
7. 芪三酚苷 (Polydatin Pееid) 又称白藜芦醇苷, 为无色针状簇晶, 含一分子结晶水者在 138 ~ 140°C 融熔, 继续加热又固化, 至 225 ~ 226°C 全融。

芪三酚苷难溶于乙醚, 可溶于乙醚乙酯, 易溶于丙酮、乙醇、甲醇、热水 (稍溶于冷水), 亦溶于 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaOH 的水溶液中。

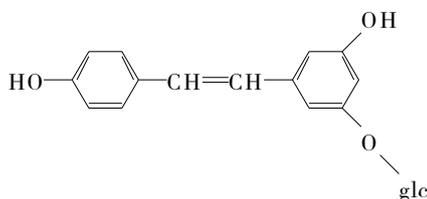
大黄素-6-甲醚-8-β-D-葡萄糖苷



芪三酚



芪三酚苷





8. 鞣质 为缩合鞣质,可溶于醇及水,不溶于苯、乙醚、氯仿等。

### 三、提取方法

1. 乙醇总提取物的制备 称取虎杖根茎粗粉 50g,置于容积 500ml 的圆底烧瓶中,加 95% 乙醇以约高于生药面为度,安上球形冷凝管。置水浴上加热回流,保持乙醇微微沸腾 2~3 小时,取下圆底烧瓶,趁热滤出乙醇提取液。滤渣再以 95% 乙醇热提二次,最后一次残渣倒在布氏漏斗上抽干后弃去。合并三次乙醇提取液,放冷,观察有无物质析出,如有再滤一次。

乙醇提取液分次移入 500ml 的蒸馏烧瓶中,每次置入量勿超过瓶内容积的二分之一。在常压下进行蒸馏,回收乙醇,至全部乙醇提取液浓缩成浆状勿太稠厚,将浓缩液趁热转移入 150ml 容积的三角烧瓶中,蒸馏烧瓶以少量(数毫升)热乙醇洗涤后并入,得乙醇总提取物。

2. 总游离蒽醌的提取,亲脂性成分与亲水性成分分离 在盛有乙醇总提取物的三角烧瓶中,加乙醚 30ml 冷浸,时时振摇,注意勿使内容物外溅,将上层乙醚溶液倾泻入另一三角瓶中(容积 500ml 中),瓶内糖浆状物再以乙醚每次 20ml(内加丙酮 0.8ml)同法冷浸振摇抽提数次,直至乙醚呈色较浅时为止,约需 5~6 次,合并乙醚抽提液。如显混浊,经析滤一次,乙醚溶液含有总游离蒽醌。乙醚提过的糖浆状物留存按本实验 3(5)项下继续分离。

#### 3. 蒽醌单体的分离

(1) 强酸性成分——游离蒽醌的分离:将含有游离蒽醌的乙醚溶液移置 250ml 的分液漏斗中。加 5%  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 20ml,振摇提取。(  $\text{NaHCO}_3$  水溶液先用 pH 试纸测定其 pH) 放置待分层,放出下层  $\text{NaHCO}_3$  溶液,置于另一三角烧瓶中,上层乙醚溶液留存在分液漏斗中,再加 5%  $\text{NaHCO}_3$  溶液 15ml 萃取一次,每次振摇提取后,放置分层时间应稍久,以免乙醚溶液混在下层水液中,影响分离效果。提取过程中,如乙醚挥发,可酌量补加。合并  $\text{NaHCO}_3$  提取液,注意其颜色,在搅拌下小心滴加 HCl 到呈酸性反应,观察酸化过程中的颜色变化,酸化时有大量的  $\text{CO}_2$  气体产生,小心防止气体产生时使内容物溢出,抽滤用水洗涤沉淀至洗液不呈酸性,沉淀移置表面皿上,得沉淀 I。进行薄层析鉴定,观察其中主要成分的斑点位置与 I、II 部分有何区别。

(2) 中等酸度成分——大黄素的提取:留存在分液漏斗中的乙醚溶液,用 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液每次 15~20ml 如上法相同提取数次,直至提取液呈色较浅时为止,约需 6~7 次(  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水液先用 pH 试纸测定其 pH,与  $\text{NaHCO}_3$  水溶液的 pH 比较有何不同)。合并  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  提取液,小心滴加盐酸酸化,放置待沉淀,抽滤收集析出物经水洗涤中性,抽干移置表面皿上,干燥后称重,得沉淀 II。



沉淀Ⅱ主要含大黄素,经丙酮或甲醇重结晶数次,可得橙黄色长针晶,测 mp, 并进行薄层层析鉴定。纯化后只显示一个斑点(丙酮母液中含白藜芦醇)。

沉淀Ⅱ利用硅胶柱层析分离大黄素,硅胶(100~200目用量为样品的100倍,湿法上柱),沉淀Ⅱ以丙酮热溶后加少量硅胶拌匀,挥去丙酮,加于柱顶,样品上再加少量硅胶。洗脱剂:环己烷-醋酸乙酯(7:3)洗脱至淡黄色后改用环己烷-醋酸乙酯(6:4)洗脱,最后当柱顶只有红色色带时改用95%乙醇→60%乙醇→40%乙醇梯度洗脱。记录柱层析结果,并绘出薄层层析图谱。测定大黄素单体的熔点,计算得率。

薄层层析条件:硅胶 CMC-Na 板。

展示剂:环己烷-醋酸乙酯(7:3)

显色:先在紫外分析灯观察后用氨熏显色。

(3) 弱酸性成分——大黄酚和大黄素 6-甲醚的提制:留存在分液漏斗中的乙醚溶液,以 2% NaOH 水溶液每次 15ml 提取 3~4 次。NaOH 水溶液先以 pH 试纸测定其 pH,与 NaHCO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液的 pH 又有何不同? 乙醚溶液再以蒸馏水提取 2~3 次,以洗涤去碱液,合并 NaOH 和水的提取液。滴加 HCl 酸化,放置,抽滤收集沉淀,经水洗、抽干,移置表面皿上,干燥后称重,得沉淀Ⅲ。

沉淀Ⅲ主要含大黄酚和大黄素 6-甲醚,以甲醇-氯仿或苯-氯仿(1:1)重结晶后,测熔点进行薄层层析鉴定。

[附注] 大黄酚和大黄素 6-甲醚两者分离较为困难。上述的薄层层析条件下在几乎同一位置出现斑点,进一步分离可用磷酸氢钙柱层析,以石油醚展开,下层黄色带洗脱后以甲醇重结晶可得大黄酚,上层黄色带洗脱后以甲醇重结晶可得大黄素 6-甲醚。

(4) 中性成分——甾醇类化合物:经过碱液萃取并经水洗涤的乙醚溶液,置于分液漏斗中静置,分去下层残留水液,然后倾入三角烧瓶中,加无水硫酸钠或无水硫酸镁数克,放置半天(时时振摇以脱去水分)。过滤除去脱水剂,滤液移置干燥的圆底烧瓶中,在水浴上蒸馏回收乙醚(勿用明火),得残留物 V、IV。加少量甲醇加热使残留物溶解,滤入小三角烧瓶中放置,如有结晶析出,过滤收集,用少量石油醚洗涤。结晶或 V、IV 部分进行浓硫酸-醋酐的甾醇反应(所得结晶应是 β-谷甾醇 mp 137℃)。

(5) 苷的提取——芪三酚苷:取乙醚提取过的糖浆状物,加蒸馏水 200ml,加热煮沸并搅拌约 15 分钟,吸滤分取滤液。残渣移入三角烧瓶中加水 10ml 同法加热抽提二次。将水液合并,静置,在室温中冷却。经吸滤一次,将此澄清液加活性炭 1~2g 后,煮沸 15 分钟以脱色,趁热吸滤除去炭末,滤液置蒸发皿中,在水浴上用小火缓缓蒸发浓缩至约 30ml 左右时移置三角烧瓶中,冷却后加乙醚 10ml,加瓶塞后放置冰箱中。当结晶析出完全后,取出三角烧瓶。先将上层乙醚液用吸管移置

另一三角烧瓶中回收乙醚。下层水液经吸滤取出结晶。用少量水洗涤,得粗芪三酚苷。称重,再以 30% 甲醇重结晶 1~2 次。测熔点,进行纸层析鉴定。

## 四、鉴定方法

### 1. TLC 法

(1) 吸附剂:硅胶板

(2) 点样:①大黄酚及大黄素-6-甲醚;②大黄素;③乙醚总提取物;④白藜芦醇。

(3) 展开剂:苯-甲酸乙酯-甲酸(75:24:1)或环己烷-醋酸乙酯(7:3)。

(4) 显色:①先在可见光下观察,记录有色斑点出现的位置。②用浓氨溶液熏或喷以 2% 稀氨溶液后观察斑点的色泽变化,再在紫外光下观察荧光斑点的出现。

[附注]游离蒽醌类在可见光下呈黄色,紫外光下橙色。蒽醌苷在可见光下呈黄色,紫外光下呈红色。喷稀氨溶液后均呈红色。白藜芦醇及其苷在紫外光下出现紫色荧光,喷稀氨溶液后呈亮蓝色荧光。

### 2. 蒽醌类鉴定反应

(1) 碱液试验:分别取各蒽醌化合物结晶 1~2mg,置于有穴板孔穴中加 2% NaOH 水溶液数滴,观察呈色变化(凡具有邻位或对位羟基的蒽醌加碱液后呈紫蓝色;其他羟基蒽醌呈红色)。

(2) 醋酸镁试验:分别取蒽醌化合物结晶 1~2mg,置于白瓷孔穴板孔穴中,各加乙醇数滴使溶解,滴加 0.5% 醋酸镁乙醇溶液数滴,观察颜色变化(几乎有邻位或对位羟基的蒽醌呈红紫→蓝色,有两个  $\alpha$ -羟基的或与之互成间位羟基的蒽醌呈橙红→红色,只有一个  $\alpha$ -羟基或一个  $\beta$ -羟基,或两个羟基互为间位的蒽醌呈黄橙→橙色)。

(3) 三氯化铁反应:取试料数毫克,使溶于乙醇 0.5ml。滴加 1%  $\text{FeCl}_3$  溶液 1 滴。有酚羟基者常呈黄、绿、紫、红等色。



## 实验三 大孔树脂吸附法分离

# 肉苁蓉中苯乙醇总苷成分

### 一、实验目的

- (1) 了解大孔树脂吸附法分离肉苁蓉中苯乙醇总苷的原理和基本操作程序。
- (2) 了解大孔树脂的预处理方法,掌握大孔树脂吸附、解吸附的方法。
- (3) 了解紫外分光光度法测定苯乙醇总苷的原理和方法。
- (4) 了解大孔树脂吸附法在中药现代化中的意义。

### 二、基本原理

大孔树脂是一类不带交换基团的多孔性交联聚合物,理化性质稳定,不溶于酸、碱及有机溶剂。它能从中药或天然药物的水溶液中吸附或筛选有机物,其吸附原理是基于范德华引力或氢键,筛选原理是基于树脂本身的多孔性结构。如果有一群结构类似的水溶性成分,那么被大孔树脂吸附的物理性能也将类似。通过适当的解吸附手段,能有效提取分离或富集这类水溶性成分。

大孔树脂根据其组成的骨架材料不同,可分为非极性、中等极性与极性吸附树脂三类。一般地说,非极性化合物在水中可以被非极性树脂吸附,极性化合物在水中可以被极性树脂吸附。

使用大孔树脂分离天然药物中水溶性成分有以下特点:

- (1) 大孔树脂稳定,不受 pH 影响,可以反复使用。
- (2) 脱盐、脱色、脱臭。
- (3) 大孔树脂吸附量大,一般高于活性炭。
- (4) 大孔树脂吸附的有机化合物可以被解吸附,操作方便。

### 三、实验内容

1. 肉苁蓉水溶性成分提取液的制备 称取小块状肉苁蓉或肉苁蓉饮片(和田地区的管花肉苁蓉)药材 30g,加 80% 乙醇适量进行回流提取 3 次(每次 1 小时),



合并乙醇提取液,于旋转薄膜蒸发器中回收乙醇至稠膏状,加水适量混悬,用乙酸乙酯萃取3次,脱去脂溶性成分,水层部分过滤或高速离心除去沉淀物,水层澄清后备用。

2. 大孔树脂对肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的吸附与解吸附 将上述水溶液加到预先处理好的60ml大孔树脂AB-8柱的顶端,先用100~200ml蒸馏水洗脱,再用50%~60%乙醇洗脱,观察富集的苯乙醇总苷成分徐徐下移。当色带下移到色谱柱下端时开始单独收集,直至色带全部被洗脱,回收乙醇洗脱液中的乙醇直至稠膏状,置蒸发皿中减压真空干燥,干燥后称重,计算收率。

大孔吸附树脂再生:当用50%~60%乙醇洗脱苯乙醇总苷后,再用95%乙醇洗涤大孔树脂,然后再用水洗去乙醇后又可继续上样分离总苷。如果95%乙醇洗涤大孔树脂后,树脂颜色过深,此时可用稀碱,稀酸和水反复再生处理,以恢复树脂的吸附力。

### 3. 苯乙醇总苷成分的分析鉴定

(1) 定性分析:①Molish反应;②FeCl<sub>3</sub>反应;③TLC鉴定。

称取总苷成分约2mg,加甲醇5ml溶解作为薄层层析供试液。另取1%CMC-Na配制成的硅胶G荧光薄层板一块,照药典薄层色谱法在薄层板上点10μl供试液,用CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(6:4:0.5)液展开。展开剂临近前沿时取出薄层板,晾干,于254nm紫外灯下观察荧光斑点。

(2) 定量分析:称取松果菊苷约4mg,精密置10ml量瓶中,用80%甲醇溶解并定溶至刻度,摇匀。分别吸取0.2,0.4,0.6,0.8,1.0ml,置25ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,在333nm波长处,以80%甲醇作空白,按紫外分光光度法测定吸收度,以浓度对吸收度做回归方程,得标准曲线。

精密称取肉苁蓉苯乙醇总苷约5mg,置25ml量瓶中,加80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再吸取其中适量,稀释10倍后测紫外吸收值后带入标准曲线方程,计算含量。

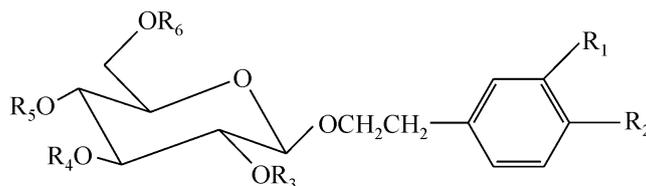
## 四、注意事项

(1) 大孔树脂有多种型号,每一种中药或天然药物的成分提取分离所用树脂必须经过筛选,其理想的树脂必然是吸附量大,且易解吸附,并且脱盐、脱糖、脱色素及脱其他杂质效果好。

(2) 市售大孔树脂必须经过预处理后方可应用,方法可参考有关资料。

(3) 大孔树脂可用高浓度的乙醇、甲醇或丙酮处理后再生。使用过的大孔树脂一般保存在70%乙醇浓度以上的溶液中,以防霉变。

(4) 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的结构通式可写为:



其中： $R_1$ 、 $R_2$  常为 OH 或  $OCH_3$ ； $R_3$  常为 H 或乙酰基； $R_4$  常为 H 或鼠李糖基； $R_5$  为 H 或咖啡酰基、阿魏酰基； $R_6$  常为 H 或葡萄糖基。

当  $R_1 = R_2 = OH$ ， $R_3 = H$ ， $R_4 = Rha$ ， $R_5 =$  咖啡酰基， $R_6 = glc$  时，此结构称松果菊苷 (echinacoside)，它是肉苁蓉中含量最高的一个成分，另一个主要成分为毛蕊花糖苷 (acteoside)，亦称麦角甾苷，它的结构与松果菊苷类似，差别就是通式中  $R_6 = H$  时称毛蕊花糖苷。

(5) 对照品松果菊苷的提取分离及结构鉴定：对照品松果菊苷的提取分离较为复杂，将实验所得的苯乙醇总苷，可用硅胶反复柱层析分离，用  $CHCl_3: MeOH: H_2O = 7: 3: 0.5$  液洗脱，先得类叶升麻苷等二糖苷，然后得松果菊苷。由于松果菊苷是三糖苷，无定型粉末，不易通过重结晶等手段纯化，只能采用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 纯化或制备 HPLC 等手段，具体方法可参阅有关文献。



# 实验四 皂苷、香豆素、强心

## 苷定性

### 一、实验目的

熟悉皂苷、香豆素、强心苷的鉴别方法。

### 二、香豆素

1. 荧光 羟基香豆素类的极稀水溶液发生蓝色荧光,若加入氨水后,呈显著的黄色荧光(用秦皮的浸出液)。

2. 三氯化铁溶液 秦皮的水浸液,加入1%三氯化铁溶液数滴呈蓝绿色。若再加入氨水转为污红色。

3. 异羟肟酸反应 取1mol/L的盐酸羟胺甲醇液0.5ml,置于小试管中,加香豆素数毫克振摇使其溶解,加2mol/L KOH 甲醇溶液,使溶液呈碱性,在水浴上加热煮沸2分钟有气泡产生,冷却后,加1%三氯化铁溶液1~2滴,然后滴加5%盐酸使溶液呈酸性,若有紫红色呈现表明含有香豆素或其他内酯化合物和酯类化合物。

4. Gibb 反应 Gibb 反应必须有酚羟基,但酚羟基的对位无取代基时才能呈阳性反应。本试剂在弱碱性条件下与酚羟基对位活性氢缩合成蓝色物。

试剂:① 0.5%的2,6-二氯苯醌-4-氯亚胺的乙醇液;② 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液,pH 9.4。

pH 9.4 缓冲液是用0.1mol/L NaOH 32ml 和 1/5mol/L 硼酸-氯化钾 25ml 加新鲜煮沸的蒸馏水至100ml 配成(其中 1/5mol/L 硼酸-氯化钾溶液为 6.202g 硼酸和 7.456g 氯化钾溶于水中稀释成 500ml)。用毛细管将试液滴在滤纸上,喷洒试剂甲,待干,再喷洒试剂乙,即呈深蓝色至蓝色。

### 三、强心苷

显色反应可由苷元及2,6-二去氧糖两部分产生。



1. 苷元反应 强心苷苷元具有甾体母核反应,也具有不饱和五元内酯的反应。甲型强心苷在碱性醇溶液中能与活性亚甲基试剂作用而呈色。

(1) Legal 反应:取试样数小粒于孔穴白磁板中,加乙醇 0.2ml 溶解后,加 0.3% 亚硝酰铁氰化钠溶液 2 滴,10% 氢氧化钠乙醇溶液 2 滴,呈紫色。

(2) Kedde 反应:将乙酸乙酯提取液点于滤纸片上,喷洒碱性二硝基苯甲酸(3,5-二硝基苯甲酸的氢氧化钾甲醇液)试剂,如呈现红色或紫红色斑点,示可能有五元不饱和内酯环的强心苷存在(有些萜类也有此反应,如穿心莲等,不可凭此断然决定)。

(3) Baljet 反应:取样品的纯溶液于试管中,加入碱性苦味酸试剂(1% 苦味酸乙醇溶液和 5% 氢氧化钠水溶液等量混合)数滴,呈现橙或橙红色。该反应有时发生较慢,需放置 15 分钟后才显色。

2. 2,6-去氧糖的颜色反应 Keller-Kiliani 反应:取样品 1mg 溶于 5ml 冰醋酸中,加 1 滴 20% 三氯化铁水溶液置试管中,注入 5ml 浓硫酸,观察界面和醋酸层的颜色变化,如有 2,6-去氧糖存在,醋酸层渐呈绿色、蓝绿色至蓝色。

## 四、皂 苷

1. 泡沫试验 取穿山龙的水浸出液 2ml 置小试管中,用力振摇 1 分钟,如产生多量泡沫,放置 10 分钟,泡沫没有消失,即表明有皂苷。

2. 醋酐-浓  $H_2SO_4$  反应(Liebermann-Burchard 反应) 薯蓣皂苷元结晶少许,置试管或白磁板上,加浓  $H_2SO_4$ -醋酐试液 2~3 滴,观察颜色由红→紫→蓝,放置后变污绿色。

3. 溶血试验 取清洁试管二支,其中一支加入蒸馏水 0.5ml,另一试管加入穿山龙的水浸出液 0.5ml,然后分别加入 0.5ml 1.8% NaCl 水溶液,再加入 1ml 2% 的红细胞悬浮液,充分摇匀,观察溶血现象。

根据下列标准判断试验结果:

(1) 全溶:试管中溶液透明为鲜红色,管底无红色沉淀物。

(2) 不溶:试管中溶液透明为无色,管底沉淀着大量红细胞,振摇立即发生混浊。



## 实验五 掌叶防己碱的提取

### 与分离及延胡索乙素的制备

掌叶防己碱又称巴马汀 (Palmatine), 硫酸延胡索乙素又称消旋四氢巴马汀硫酸盐 (*dl*-tetrahydro—Paimatine sulphate)。

延胡索乙素 (Corydalis B) 为镇静催眠药, 用于缓解肠胃系统的疾病听引起的疼痛、临产阵痛、头痛、失眠等。

中药延胡索 (元胡, *Coryo yanhusuo* W·T·Wang 的块根) 中含延胡索乙素的量很少, 而其脱氢化合物巴马汀在某些植物中含量却很高。在防己科植物黄藤 (*Fibraurea recisa* Paerre) 的根茎中含巴马汀, 再经氢化反应, 制备延胡索乙素。

黄藤曾列入《本草纲目》, 李时珍谓“黄藤生岑南, 状若防己, 俚人常服此藤; 纵饮食有毒, 亦自然不发”。现代民间作为清热消炎药, 常用于外伤感染、扁桃体炎、咽喉炎、结膜炎、热痢及黄疸等。

#### 一、目的要求

- (1) 掌握季铵生物碱的一种提取方法。
- (2) 掌握季铵生物碱还原成叔胺碱的方法。
- (3) 掌握季铵碱、叔胺碱在溶解度等方面的理化性质差异。
- (4) 熟悉生物碱或其盐类重结晶的方法。
- (5) 了解生物碱沉淀反应的条件和意义。

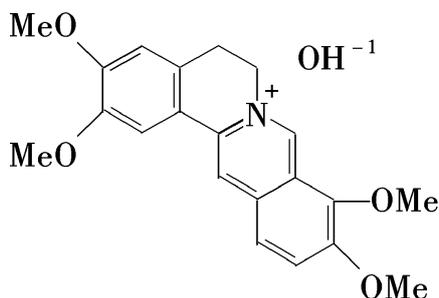
#### 二、黄藤中已知成分的理化性质

黄藤根茎及根中所含成分主要为巴马汀, 尚含少量药根碱、黄藤素甲、黄藤素乙、内酯及甾醇。又谓在根茎、根及树皮中含小檗碱。

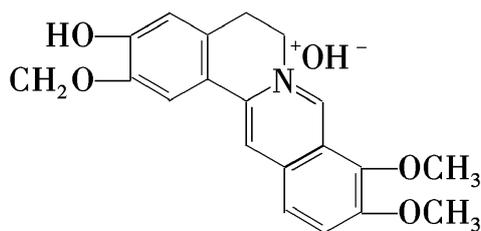
1. 掌叶防己碱 (巴马汀, Palmatine) 本品系季铵生物碱, 溶于水、乙醇, 几乎不溶于氯仿、乙醚、苯等溶剂。掌叶防己碱盐酸盐即氯化巴马汀 (palmatine chloride) 分子式  $C_{21}H_{22}O_4N \cdot Cl \cdot 3H_2O$ , 为黄色针状结晶, mp 205°C (分解), 其理化性质与盐酸



小檗碱类似。巴马汀氢碘酸盐(palmatine iodide)分子式  $C_{21}H_{22}O_4N \cdot I \cdot 2H_2O$  为橙黄色针状结晶, mp 241℃(分解)。



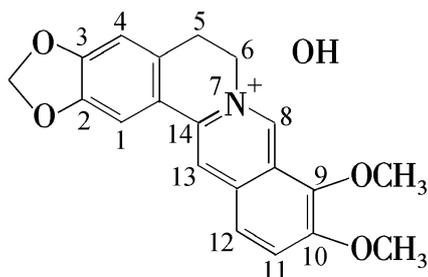
2. 药根碱(雅托碱, Jatrorrhizine) 本品系具酚羟基季铵盐, 其理化性质与巴马汀类似, 但较易溶于苛性碱液中。其盐酸盐在水中的溶解度亦比盐酸巴马汀为大, 可藉此性质予以分离, 药根碱盐酸盐(jatrorrhizine chi-oride)  $C_{20}H_{20}O_4N \cdot Cl \cdot H_2O$  为铜色针状结晶, mp 204 ~ 206℃, 其苦味酸盐(jatrorrhizine picrate)  $C_{20}H_{20}O_4N \cdot C_6H_2O_7N_3$  为橙黄色柱状结晶, mp 217 ~ 220℃(分解)。



3. 小檗碱(黄连素 Berberine) 本品系季铵生物碱, 其游离碱为黄色长针状结晶,  $C_{20}H_{18}O_4N \cdot OH \cdot 5.5H_2O$ , mp 145℃, 在 100℃ 干燥, 失去结晶水转为棕黄色。小檗碱能缓缓溶于水(1:20), 乙醇(1:100) 较易溶于热水、热乙醇、微溶于丙酮、氯仿、苯, 几乎不溶于石油醚中, 小檗碱与氯仿、丙酮、苯均能形成加成物。

小檗碱盐酸盐(Berberine Chloride)  $C_{20}H_{18}O_4N \cdot Cl_2 \cdot 2H_2O$ , mp 205℃(分解), 微溶于冷水, 较易溶于沸水, 其硝酸盐及氢碘酸盐, 极难溶于水(冷水约 1:2000)。小檗碱的中性硫酸盐, 磷酸盐, 醋酸盐在水中溶解度较大。小檗碱的盐类在水中的溶解度:

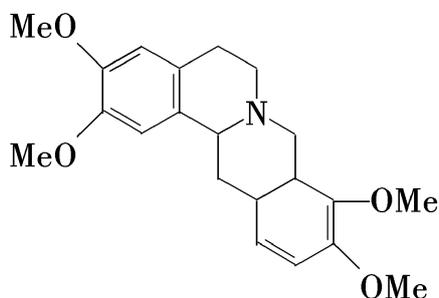
盐酸小檗碱	1:500
硫酸小檗碱	1:30(酸性盐 1:100)
枸橼酸小檗碱	1:125
磷酸小檗碱	1:15



4. 四氢巴马汀(Tetrahydr palmatine) 延胡索乙素为消旋四氢巴马汀, 系叔胺碱, 其游离碱  $C_{21}H_{25}O_4N$ , mp 146 ~ 148℃, 不溶于水, 能溶于热乙醇(在冷乙醇中溶解度较小), 易溶于氯仿、苯、乙醚中。延胡索乙素的酸性硫酸盐为无色针状结晶,

mp 245 ~ 246°C, 在冷水中溶解度较小, 在热水中较大, 其中性硫酸盐为长柱状结晶, mp 为 220°C, 在水中溶解度较酸性硫酸盐为大, 其盐酸盐难溶于水。

左旋四氢巴马汀即颅痛定 (Rotundine), mp 141 ~ 142°C,  $[\alpha]_D^{16} - 287.5^\circ$  (C = 1.1%, 氯仿)。本品在华千金藤及圆叶千金藤的块根(山乌龟)中含量较多。



5. 黄藤素甲 本品为制备氯化巴马汀的乙醇母液中的少量成分, 为季铵碱的盐酸盐  $C_{26}H_{29}O_7N \cdot HCl \cdot H_2O$ , mp 196 ~ 198°C,  $[\alpha]_D^{15} + 273.3^\circ$  (C = 1%, 乙醇), 其还原产物为白色针状结晶, mp 184 ~ 186°C,  $[\alpha]_D^{15} + 146.6^\circ$  (C = 1%, 盐酸)。

6. 黄藤素乙 本品系粗制巴马汀氢化、碱化分去四氢巴马汀后, 母液中的微量物质, 溶于氯仿。以氯仿-乙醇重结晶得黄色结晶, mp 192 ~ 193°C,  $[\alpha]_D^{16} + 283.3^\circ$  (C = 1%, 氯仿)。

7. 黄藤内酯 本品得自粗氯化巴马汀重结晶时的不溶于水物质中, 反复以酒精、丙酮重结晶, 得光亮棱状结晶,  $C_{27}H_{23}O_9$ , mp 278°C。  $[\alpha]_D^{15} + 36.6^\circ$  (C = 1%, 乙醇)。

8. 黄藤甾醇 本品得自制备氯化巴马汀的乙醇母液中, 分出的少量油层经 10% KOH 皂化而得到的白色针晶, mp 136 ~ 137°C,  $[\alpha]_D^{15} + 24.51^\circ$  (C = 1%, 氯仿)。

### 三、巴马汀的提取及延胡索乙素制备的方法

巴马汀为季铵生物碱, 极性较大, 可用水作为提取溶媒, 常用 1% 醋酸水溶液提取(因为巴马汀属于小檗碱型结构类型, 它的盐酸盐溶解度较小, 故不用盐酸的水溶液来提取), 也可用高极性的有机溶媒如甲醇、乙醇来提取。

巴马汀还原得延胡索乙素。常用的还原剂为  $Zn + H_2SO_4$ , 或  $NaBH_4$ , 现将提取的两种方法, 还原的两种方法介绍如下:

#### [方法一]

##### 1. 流程

