

中药化学实用技术

中药化学基本技能与实验

(主编：吁诚铭)

惠州卫生职业技术学院

2022年3月

目 录

前 言

第一章 中药化学实验的一般知识

- 第一节 中药化学实验规则
- 第二节 中药化学实验试剂的特有性质
- 第三节 中药化学实验试剂取用常识
- 第四节 中药化学实验安全注意的基本事项

第二章 中药化学实验的基本技能与操作

- 第一节 中药化学实验中常用玻璃仪器的操作
- 第二节 中药化学实验中常规仪器设备的操作

第三章 中药化学实验的基本研究方法

- 第一节 中药有效成分的提取方法
- 第二节 中药有效成分的精制与分离方法
- 第三节 中药有效成分的鉴定的一般程序
- 第四节 中药有效成分含量测定方法

第四章 中药化学各类成分的基本实验

- 第一节 色谱分析实验(薄层色谱、柱色谱)
- 第二节 化合物的精制纯化(结晶、重结晶)
- 第三节 中药中有效成分(黄酮类化合物)的提取、分离和鉴定
- 第四节 中药中有效成分(生物碱类化合物)的提取、分离和鉴定
- 第五节 中药中有效成分(蒽醌类化合物)的提取、分离和鉴定
- 第六节 中药中有效成分(香豆素类化合物)的提取、分离和鉴定
- 第七节 中药中有效成分(挥发油)的提取、分离和鉴定
- 第八节 中药中有效成分(三萜皂苷、强心苷)的提取、分离和鉴定
- 第九节 多糖的提取、鉴定及除多糖方法(大枣和黄芪) 设计性试验
- 第十节 中药化学成分系统预试验

附录:常用检识试剂的配制方法

前 言

实验教学是高职医药院校最基本的教学形式之一,对培养学生科学的思维与方法、创新意识与能力,全面推进素质教育有着重要的作用。飞速发展的科学技术,已成为主导社会进步的重要因素,高职医药院校必须不断更新教学内容,以学科发展的前沿知识充实实验课程内容。

《中药化学基本技能与实验》这本教材适用于中药化学实用技术这门课程,是以中药现代化为背景的,对教学的改革创新。中药现代化是传统中药与高科技“嫁接”,遵守严格的规范标准,研究出优质高效、安全稳定、质量可控、服用方便,并具有现代剂型的新一代中药。根据国际市场药用植物提取物的使用状况和国内中药现代化近十几年来的大量研究基础,中药现代化的研究重点应是经过分离和纯化的多组分中药提取物。中成药多为复方,而复方的质量往往不能用 1-2 个指标来评价,在提取过程中,中药提取物在最大程度上保留了活性成分的数目和质量。这在一定程度上反映了中药各组分的协同作用,同时,它反映了中医辨证论治,即根据不同的临床需要,相同的药材,采用不同的提取技术,选择性提取有效部位或改变各自的含量比例,生产不同的提取物。因此,制定符合特定需要的中药提取物科学合理的标准,不仅可以保证中成药质量的稳定和可控,而且可以保证 GMP 生产的真正实施。

为适应我国高职医药教育的改革和发展、满足中药现代化对药学教育的要求,本实验教材是在长期钻研实验课程教学体系,改革教学内容,向各医药院校调研、总结归纳当前药学教育迫切需要补充一些教学内容的基础上进行的编写。考虑到我国药学教育的现状与实际;既体现了各门实验课程自身的独立性、系统性和科学性,又充分考虑到各门实验课程之间的联系与衔接,有助于学生在教学大纲规定的实验教学学时内掌握基本操作技术,提高动手能力,养成严谨、求实、创新的科学态度。同时站在教育、科技和社会发展趋势的高度,对药学专业实验课程的教学内容进行了“精选”,“整合”和“创新”,强调对学生的动手能力、创新思维、科学素养等综合素质的全面培养。教材中适当安排一些反映药学学科发展前沿的实验,有利于学生在掌握实验基本技术的同时,对药学学科的新进展、新技术有所了解,激发他们学习药学知识与相关学科的兴趣。教材中新增的综合性、设计性实验有利于学生全面了解和综合掌握本门实验课程的教学内容。这一举措既满足了学生个性发展的需要,更注重培养学生分析问题、解决问题的能力 and 创新意识。

本教材的编写特点:药学特色鲜明、具有前瞻性、体现现代医药科技水平的一本药学实验教材。由于作者编写药学教学实验用书尚属首次,缺乏经验,在内容选择及编写方法上的不妥之处,在所难免。欢迎从事医药教育的同行们批评赐教。也希望通过该教材的编写促进药学院校间的业务交流。

编者

二〇二〇年四月

第一章 中药化学实验的一般知识

中药化学实验课是中药学专业的一门重要课程,是运用现代科学理论与方法研究中药化学成分的一门学科。本实验课程的重点是根据化合物的化学结构、理化性质,分析设计提取分离流程,进行结构检识等。教学的目的不仅是验证方式来强化理论教学内容,更重要的是培养学生思维与动手能力,使学生掌握系统的实验学知识、科学的实验方法,提高学生独立思考、解决实验课题的能力,在实践中培养学生严谨求实的科学态度和作风。

本教材的编写将中药化学实验体系分为三个层次:基本实验、综合性实验和设计性实验,即基本实验能力训练、综合能力训练和科研创新能力训练。基本实验主要训练学生的基本技能;综合性实验在于体现知识、能力、综合素质全面性;设计性实验主要培养学生独立思考、综合运用知识、创新等适应科研工作的能力。

第一节 中药化学实验规则

一、实验要求

1. 每次实验前,必须认真预习本次实验内容,明确实验目的要求,了解实验的基本原理、方法和操作步骤,不得盲目进行实验。提前分析实验内容及步骤,认真准备好全部的试剂及相应仪器、工具,不懂或者有疑问的步骤和环节问清楚,重点难点做标识,做到心中有数;实验完毕及时分析。

2. 实验时准备好记录本、铅笔和格尺,及时记录每一实验时间应记录的内容,如原料的用量和实验过程中发生的现象、产品的数量和纯度、色谱分析结果、鉴别反应现象等,以做为正式报告的依据。

3. 实验过程中,应严肃认真、正确操作、仔细观察、虚心接受和尊重教师的指导。教师根据学生在实验过程中理论与实践的结合情况、能否正确操作与认真执行实验规则以及实验报告的填写情况来记分考核。

4. 实验所得产品,如不供下一次实验用,应注明品名、数量、组别、姓名等,并交给实验指导教师。

二、实验规则

1. 实验室要保持整齐清洁,实验台不要乱放不需要的仪器、药品。火柴杆、废纸片等要放在固定的容器内,实验完毕后倒掉。废的强酸强碱不应倒在污水槽中,以免腐蚀下水管道,应倒入废液桶中,集中处理。

2. 实验时,不应谈论与实验无关的内容,要保持室内肃静。未经指导教师批准,不得擅自离开实验室。严禁在实验室吸烟、吃饭。

3. 实验药品、仪器均为国家财产,须节约爱护使用。挥发性有机溶剂用毕立即用瓶塞盖好。仪器若有破损,应立即报告指导教师,填写仪器破损单,按学校的赔偿制度处理。

4. 公共仪器及药品不得随意挪动,尤其不得任意拿到自己的桌面上,只能在原处使用,并注意不可盖错试剂瓶塞,以免污染试剂。

5. 装有易燃性液体的瓶子必须远离火源。废的有机溶剂一律按照品种分别放在回收瓶中,不得倒入水槽,以免造成浪费和空气的污染。

6. 加热乙醇、乙醚、石油醚等易挥发可燃的液体时,不得用明火、直火,应使用装有冷凝管的烧瓶,并在水浴上进行加热。加热时应加入 2~3 小粒沸石或一端封死的毛细管,防止爆沸冲出。若在加热前未放沸石,则应冷却后再加。添加溶剂时应离开火源,稍冷后再添加,并应重新加入沸石。

7. 实验过程中如果着火,应立即用沙子或其他防火物品把火盖上,使其隔绝空气而熄灭。同时要迅速断电,扑灭火源并移走周围的物品。

8. 实验室内的电器设备,在熟悉使用方法及安全检查后方可使用,如烘箱、离心机、恒温水浴锅、真空干燥箱、电冰箱、紫外光灯、熔点测定仪等。不可贸然关闭电闸,以免损坏仪器和造成人身事故。

第二节 中药化学实验试剂的特有性质

中药化学实验中用到的有机化学试剂品种很多,它们和无机化学试剂相比最主要的不同点在于:有机化合物都含有碳和氢等原子,所以,这两类化合物在性质上有较大的差别,与无机物相比较,有机物熔点低,不易导电,受热易分解,绝大多数可燃,主要有以下特性。

一、易燃性

绝大多数有机化合物、有机溶剂是可燃的,一部分是易燃的,其中有少数燃烧速度很快,有的还会由于燃烧过快而发生燃爆,或在有限空间里急速燃烧而发生爆炸。对于起火燃烧危险性大小的标度方法,常见的有以下几种。

1. 闪点

指液体或挥发性固体的蒸气在空气中出现瞬间火苗或闪光的最低温度点。若温度高于闪点,药品随时都可能被先闪后燃,而发生火灾。

有机化学试剂闪点在 -4°C 以下者为一级易燃品;在 $-4\sim 21^{\circ}\text{C}$ 者为二级易燃品;在 $21\sim 93^{\circ}\text{C}$ 者为三级易燃品。测定闪点有开杯和闭杯两种方式,大部分在文献中都有注明。查阅相关文献

即可推测某种具体的有机试剂起火燃烧的危险性大小,对于易燃有机液体的保管,更要注意闪点,特别注意贮存温度要尽可能低于易燃物的闪点,以防突发性火灾。实验室中常用的有机溶剂大多数为一级易燃品。

2. 火焰点

在开杯试验中若出现的火苗能持续燃烧,则可持续燃烧 5s 以上的最低温度称为火焰点,也叫着火点(着火点也可定义为:达到可燃物质着火燃烧所需要的最低温度,这个最低温度称为该可燃物质的着火点,也常称燃点)。当有机物的闪点在 100°C以下时,火焰点与闪点相差甚微,当闪点在 100°C以上时,火焰点一般高出闪点 5~20°C。

固体可燃物一般火焰点较高,许多物质的火焰点是不固定的,这与物质的分散程度关系很大,分散程度大即颗粒越细,表面积越大,火焰点越低。例如,刨花和木块同是木材,前者的火焰点就要比后者低很多。又如弥漫在空气中的可燃性小液滴与空气中氧气充分接触,形成气溶胶状态,遇到电火花或火星,或点火就会发生燃烧或爆炸,所以,中药化学实验室里不允许用明火加热。

3. 自燃点

分为受热自燃和自热自燃两种情况。前者指样品受热引起燃烧的最低温度;后者指样品在空气中由于发生缓慢氧化作用产生的热量积累,自动升温,没有点火,物质自发地燃烧,这最终导致起火燃烧的最低温度称为自热自燃点。自燃点越低,起火燃烧的危险性越大,易燃性越大。

自热自燃点涉及有机物的稳定性,对于易发生氧化的有机物,应在绝氧/隔空气、低温、隔潮和避光等条件下贮存,或者随用随购,随用随制备,一次性用完、不残留,以避免产生保存的问题。

二、爆炸性

1. 燃爆

燃爆指易燃气体或蒸气在空气中由于燃烧太快,产生的热量来不及散发而导致的爆炸。易燃气体或易燃液体的蒸气与空气混合,在一定的浓度范围内遇到明火即发生爆炸,而低于或高于这个浓度范围则不会爆炸。这个浓度范围称为爆炸极限或燃爆极限,爆炸极限通常以体积分数来表示,其浓度范围越宽广,则发生爆炸的危险性就越大。

2. 自爆

发生自爆的化学物质较多,包括有机物与无机物。有机物如亚硝基有机化合物、多硝基有机化合物、叠氮有机化合物、高卤酸胺盐、多炔烃和雷酸盐等在较高温度或遇到撞击时会自行爆炸;过氧化物在浓缩到一定程度或遇到较强还原剂时会剧烈反应而发生爆炸。无机物如金属钾、钠在遇水时会猛烈反应,放出氢气而发生燃烧/爆炸;重氨盐在干燥时也会自行爆炸;此外,氯酸、高氯酸和氢的卤化物等化合物在一定的条件下也易发生爆炸。对于这些化合物

既要在实验前了解其特性与保存方法,也要注意它们的使用条件。

三、毒性

实验室中所用的有机化学药品除葡萄糖等极少数之外都是有毒的。有机化学试剂的化学毒性有急性毒性、亚急性毒性、慢性毒性和特殊毒性之分,此处只介绍急性毒性和慢性毒性的粗浅常识。

1. 急性毒性

急性毒性指以饲喂、注射或涂皮等方式对实验动物施药一次所造成的伤害情况。最常见的标度方法是 LD_{50} [lethal dose,半(数)致死量],单位是 mg/kg。其物理意义是施药一次造成半数(50%)实验动物死亡时,平均每千克体重的实验动物所用的药品的毫克数,一般都要同时注明动物种类和施毒方式。

例如,三乙胺的 LD_{50} 为 460mg/kg(小鼠,口服)。一些常见的有机化合物的半致死量数据可以从相关手册中查取,据此可知实验中所使用试剂的急性毒性,从而采取资料提供的相关防护措施。

一些毒性较大的有机化合物,一般在化合物的标签上都有其相应的毒物与毒性级别的图标或文字,使用前应注意了解。

2. 慢性毒性

慢性毒性指长期反复接触的有机化学药品对人体所造成的伤害情况用 TLV 来标度,TLV 是 threshold limit value 的缩写,一般译为极限安全值或阈限值,通俗点说就是化工车间空气中最高允许浓度,即在工作环境的空气中含此毒物的蒸气或粉尘所能允许的最大浓度。在此浓度以下,操作者长期反复接触(以每天 8h,每周 5 天计)而不造成危害,其单位是 mg/m³,即每立方米空气中含此毒物的毫克数。TLV 值越小,则慢性毒性越大,一些常见有机化合物的 TLV 值可从有机化学专业手册中查取。

四、酸碱性、刺激性和腐蚀性

有机强酸如硝酸、冰醋酸等具有相当强的酸性和腐蚀性以及刺激性气味;有机强碱如胺类等具有很强的碱性,并往往带有强烈的恶臭等;许多有机化合物可以透过皮肤被吸收,有的直接对黏膜有刺激性,使用时必须有防护措施,同时也应在通风橱内取用这些化合物。

以上这些易燃、易爆、有毒、有腐蚀性、有刺激性的有机化合物在其标签说明上都有相应图识标记,应充分注意和熟悉。在 Aldrich、Sigma 和 Fluka 等常用的化学试剂目录手册中均有各种有机化合物易燃、毒性、腐蚀性和刺激性等的说明,应养成经常翻阅化学参考书、工具书和手册的习惯,这对了解有机化合物的知识与性质,采用相应的防护方法大有帮助。

第三节 中药化学实验试剂取用常识

一、化学试剂规格

有机化学试剂按其纯度分成不同的规格(见表 1-1),国内生产的试剂分为四级。试剂的规格越高,纯度也越高,价格就越贵。凡较低规格试剂可以满足需求者的实验要求,就不要用高规格试剂。在中药化学提取实验中大量使用的是二级品~四级品有机化学试剂,使用产品量较大时可以用工业品代替。在取用试剂时要核对标签,以确认所用试剂名称、规格无误。标签松动、脱落的要及时贴好,分装试剂时要随手贴上标签,标签被腐蚀或损坏,要立即更换新标签。

表 1-1 国内生产的试剂的规格

试剂级别	中文名称	代号及英文名称	标签颜色	主要用途
一级品	保证试剂	G. R.	绿	用作基准物质,用于分析鉴定及精密的科学研究
	“优级纯”	(guarantee reagent)		
二级品	分析试剂	A. R.	红	用于分析鉴定及要求高的药物合成实验和科学研究
	“分析纯”	(analytical reagent)		
三级品	化学纯粹试剂	C.P.	蓝	用于要求较低的分析试验和要求较高的药物及中间体的合成实验
	“化学纯”	(chemically pure)		
四级品	实验试剂	L. R. (laboratory reagent)	棕、黄 或其他	用于一般性的有机化合物的合成实验和科学研究

二、固体试剂的称取

固体试剂用天平称取。目前药物合成实验室中大都采用数字显示的电子天平,有多种规格。最常用的有两种:一种的感量为 0.01g,最大称量为 200g 或 300g,规格大体上与传统的托盘扭力天平相当;另一种的感量为 0.0001g,最大称量为 100g,规格大体上与传统的分析天平相当,可根据需要称量的量及要求的准确程度选用。天平的感量越小则越精密,价格越高,对操作的要求也越严格。各种天平的使用方法不尽相同,应按照使用说明书调试和使用。

称取固体试剂应该注意:不可使天平“超载”。如果需要称量的量多于天平的最大称量,则应分批称取。不可使试剂直接接触天平的任何部位。一般固体试剂可放在表面皿或烧杯中称量;特别稳定且不吸潮的也可放在称量纸上称量;吸潮性或挥发性固体需放在称量瓶或干燥的锥形瓶中塞住瓶口称量;金属钾、钠应放在盛有情性溶剂的容器中称量,最后以差减法求取净重。固体试剂在开瓶后可用牛角匙移取,有时也可用不锈钢刮匙挑取,任何时候都不允许用手直接抓取。取用后应随手将原瓶盖好,不允许将试剂瓶敞口放置。

三、液体试剂的量取

液体试剂一般用量筒或量杯量取,用量少时可用移液管或注射器量取,用量少且计量要求不严格时也可用滴管吸取。取用时要小心勿使其洒出,观察刻度时应使眼睛与液面的弯月面底部平齐。试剂取用后应随手将原瓶盖好。黏度较大的液体应像称取固体那样称取,以免因量器的黏附而造成误差过大。

吸潮性液体要尽快量取,发烟性或可放出有害气体的液体应在通风橱内量取,腐蚀性液体应戴上乳胶手套或塑料薄膜一次性手套量取。挥发性液体或溶有过量气体的液体(如浓氨水、盐酸甲醇溶液等)在取用时应先将瓶子稍作冷却,然后开瓶取用,取量过程必须戴防护眼镜并在通风橱内进行。

第四节 中药化学实验安全注意的基本事项

在中药化学实验过程中,经常要使用上述各类试剂,如果使用不当,就有可能产生着火、爆炸、烧伤或中毒等事故。此外,易碎的玻璃器皿、燃气和电器设备等使用处理不当也会发生事故。但是,上述这些事故都是可以预防的,只要实验者认真进行实验预习和预先熟悉所要使用的化学试剂与药品等的物理化学性质、毒性与有关防护措施等,加强安全意识,实验过程中集中注意力,而不是掉以轻心和犯经验主义等错误,严格执行操作规程,就能有效地避免事故的发生,维护个人、他人与实验室的安全,正常地进行和完成实验。

一、火灾、爆炸、中毒、触电事故的预防

1. 实验室中使用的有机溶剂大多是易燃的。因此,盛有易燃有机溶剂的容器不得靠近火源和加热器,严禁用明火对盛有有机溶剂的反应容器直接加热,必须用水浴、油浴或可调电压的加热套加热。加热乙醚或二硫化碳时,更应特别注意,最好用预先加热的或水蒸气加热的热水浴。实验室中不应储存较多的易燃有机溶剂,强氧化剂和强还原剂严禁放在一起。

2. 回流或蒸馏有机溶剂时应放沸石,以防止液体过热暴沸而冲出。若在加热后发现未放沸石,则应停止加热,待液体稍冷后再放沸石。在过热液体中放入沸石会导致液体迅速沸腾,冲出瓶外而引起烫伤、火灾等事故。不要火焰直接加热烧瓶,而应在其间加石棉网,或应用其他加热方法。同时还应注意冷凝管内水流是否保持畅通,干燥管是否阻塞不通,仪器连接处塞子是否紧密,以免有机溶剂蒸气逸出着火。

3. 易燃有机溶剂(特别是低沸点易燃溶剂)在室温条件下也具有较大的蒸气压。空气中混杂易燃有机溶剂的蒸气达到某一极限时(见表 1-2),形成气溶胶,偶有明火或电火花极易发生燃烧与爆炸。大多数有机溶剂蒸气都较空气的密度大,会沿着桌面或地面飘移至较远处,或沉积在低洼处,因此,切勿将易燃溶剂倒入废物缸中,更不能用开口容器盛放易燃溶剂。倾倒易燃溶剂时应远离火源,最好在通风橱中进行。蒸馏易燃溶剂(特别是低沸点易燃溶剂)时,整套装

置切勿漏气,接受器支管应接橡皮管,将余气通往室外。

表 1-2 常用易燃溶剂蒸气爆炸极限

溶剂名称	沸点/°C	闪点/°C	空气中的含量(体积分数)/%
甲醇	64.9	11	6.72~36.50
乙醇	78.5	12	3.28~18.95
乙醚	34.5	-45	1.85~36.50
丙酮	56.2	-17.5	2.55~12.80
苯	80.1	-11	1.41~7.10

4. 常压操作时应使全套装置有一定的地方通向大气,切勿造成密闭体系。减压蒸馏时,要用圆底烧瓶或吸滤瓶作接受器,不可用锥形瓶或有伤纹玻璃容器,否则会发生瓶体爆裂,磨口接头要涂真空油脂,除有利于密封外,也有便于开启的作用。加压操作时(如高压釜、封管等)应经常注意釜内压力有无超过安全负荷,选用封管的管壁厚度是否适当、管壁是否均匀,并要有防护措施。

5. 有些有机化合物遇氧化剂时会发生猛烈的分解、氧化反应,而引起爆炸或燃烧,操作前应掌握相关知识,操作时应特别小心。存放药品时,应将氯酸钾、过氧化物、浓硝酸等强氧化剂和有机药品分开存放。

6. 开启储有挥发性液体的瓶塞和安瓶时,必须先充分冷却然后开启(开启安瓶时需用布包裹);开启时瓶口必须指向无人处,以免由于液体喷溅而造成伤害。如遇瓶塞不易开启时,必须注意瓶内储存物的性质,切不可贸然用火加热或乱敲瓶塞等法处理。

7. 有些实验可能生成有危险性的化合物,操作时需特别小心,一定要备有防护措施。如乙醚或四氢呋喃,久置后会生成易爆炸的过氧化物,须按相关资料方法特殊处理后应用。

8. 有些有机物质会渗入皮肤或刺激皮肤,因此,在接触这些有毒的固体或液体物质时,必须戴橡皮手套,操作后应立即洗手。

9. 在反应过程中可能生成有毒或有腐蚀性气体的实验应在通风橱内进行;在使用通风橱时,当实验开始后不要把头伸入橱内。使用后的器皿应及时清洗。

10. 使用电器时,应防止人体与电器导电部分直接接触,不能用湿的手或手握湿物接触电插头。为了防止触电,装置和设备的金属外壳等都应连接地线。修理电器设备,应先切断电源;发生触电,应迅速切断电源,再行抢救。

二、事故的处理与急救

实验中如果遇到事故应立即采取适当措施,并报告教师。

1. 火灾

一旦发生火灾,应保持沉着镇静,不必惊慌失措,应立即采取各种相应措施,控制火势蔓延,以减小事故损失。首先,应立即熄灭附近所有火源(如关闭煤气),切断电源、并移开附近的易燃物质。少量溶剂(几毫升)着火,可任其烧完。锥形瓶内溶剂着火可用石棉网或湿布盖熄。小火可用湿布或黄砂盖熄。火势较大时应首先报火警,同时根据具体情况采用下列灭火器材。

①四氯化碳灭火器。用以扑灭电器内或电器附近之火,但不能在狭小和通风不良的实验室中应用,因为四氯化碳在高温时会生成剧毒的光气;此外,四氯化碳和金属钠接触也会发生爆炸。使用时只需连续抽动唧筒,四氯化碳即会由喷嘴喷出

②二氧化碳灭火器。是实验室中最常用的一种灭火器,它的钢筒内装有压缩的液态二氧化碳,使用时打开开关,二氧化碳气体即会喷射出,用以扑灭有机物及电器设备的着火。使用时应注意,一手提灭火器,一手应握在喷二氧化碳喇叭筒的把手上。因喷出的二氧化碳压力骤然降低,温度也骤降,手若捏在喇叭筒上易被冻伤。

③泡沫灭火器。内部分别装有含发泡剂的碳酸氢钠溶液和硫酸铝溶液,使用时将筒身颠倒,两种溶液即混合反应生成硫酸氢钠、氢氧化铝及大量二氧化碳。灭火器筒内压力突然增大,大量二氧化碳泡沫喷出。

无论用何种灭火器,皆应从火的四周开始向中心扑灭。

2. 以下几种情况不能用水灭火。

①金属钠、钾、镁、铝粉、电石和过氧化钠着火,用水浇会产生氢气,扩大火势,并有爆炸的可能,应用干沙灭火;

②比水轻的易燃液体,如汽油、苯或丙酮等着火,绝对不能用水浇,因为这样反而会使火焰蔓延开来,可用泡沫灭火器;

③有灼烧的金属或熔融物的着火时,应用干沙或干粉灭火器扑灭;

④电器设备或带电系统着火,应迅速切断电源,可用沙、二氧化碳灭火器或四氯化碳灭火器,禁止用水或泡沫灭火器等导电液体灭火。

若衣服着火,切勿奔跑,应用厚的外衣或湿毯包裹使熄灭。较严重时,衣服着火者应躺在地上(以免火焰烧向头部)滚灭,或用防火毯紧紧包住,直至熄灭。实验室如有淋冲设备,应立即用水冲灭,或打开附近的自来水开关用水冲淋熄灭。烧伤严重者应急送医疗单位。

3. 割伤

伤口较小时,取出伤口中的玻璃或固体物,用蒸馏水冲洗后涂上红药水,用绷带扎住止血,或用创可贴包扎止血消毒。大伤口则应先按紧主血管以防止大量出血,急送医疗单位诊治。

4. 烫伤

轻伤涂以玉树油或鞣酸油膏,重伤涂以烫伤油膏后送医疗单位。

5. 试剂灼伤皮肤

①酸。立即用大量水洗,再以 3%~5% 碳酸氢钠溶液洗,然后用水洗,严时要消毒,拭干后涂

烫伤油膏后送医疗单位。

②碱。立即用大量水洗,再以 2%醋酸溶液洗,最后用水洗,严重时间同上处理。

③溴。立即用大量水洗,再用酒精擦至无溴液存在为止,然后涂上甘油或烫伤油膏。

④钠。可见的小钠块用镊子移去,其余与碱灼伤处理相同。

6. 试剂溅入眼内任何情况下都要首先用以下方法洗涤,急救后送医疗单位。

①酸。用大量水洗(条件好的实验室应备有冲洗眼睛的水笼头,可直接,方便地冲洗),再用 1%碳酸氢钠溶液洗。

②碱。用大量水洗,再用 1%硼酸溶液洗。

③溴。用大量水洗,再用 1%碳酸氢钠溶液洗。

④玻璃。用镊子移去碎玻璃,或在盆中用水洗,切勿用手擦动。

7. 中毒

有毒物质溅入口中尚未咽下者应立即吐出,用大量水冲洗口腔。如已吞下,应根据毒物性质给予解毒剂,并立即送医疗单位。

①腐蚀性毒物。对于强酸,先饮大量水,然后服用氢氧化铝膏、鸡蛋白;对于强碱,也应先饮大量水,然后服用醋、酸果汁、鸡蛋白。不论酸或碱中毒皆再以牛奶灌注,不要吃催吐剂。

②刺激剂及神经性毒物。先服用牛奶或鸡蛋白使之立即冲淡或缓和,再用一大匙硫酸镁(约 30g)溶于一杯水中催吐。有时也可用手指伸入喉部促使呕吐,然后立即送医疗单位。

③吸入气体中毒者,将中毒者移至室外,解开衣领或纽扣,使呼吸顺畅,吸入少量氯气或溴者,可用碳酸氢钠溶液漱口。

8. 为处理事故需要,实验室应备有急救箱,内置以下一些物品

①绷带、医用消毒纱布、脱脂药棉、橡皮膏、创可贴、医用镊子和剪刀等。

②医用凡士林、玉树油或鞣酸油膏、烫伤油膏及消毒剂等。

③醋酸溶液(2%)、硼酸溶液(1%)、碳酸氢钠溶液(1%和饱和的两种)、75%乙醇、甘油、红汞和龙胆紫等。

第二章 中药化学实验的基本技能与操作

第一节 中药化学实验中常用玻璃仪器的操作

1. 抽滤瓶主要用于减压条件下溶液及晶体的抽滤,除去溶液中不溶的杂质。使用时,先打开真空泵,再倒入要抽滤的样品;使用完后,应该先拔掉抽滤瓶上的抽气管,不可先关真空泵,这样容易引起倒流现象。

2. 布氏漏斗主要用于固液分离使用。使用时,漏斗的滤纸要大小适宜,一般不能超过漏斗最大的内表面,滤纸最小要全部覆盖漏斗的小孔,以免滤液泄漏。用抽滤液湿润滤纸表面时,不能有气泡。

3. 分液漏斗主要用于两两互不相溶液体的分层,常用在中药中极性不同化合物的萃取分离。使用时,特别要注意乳化现象的发生和解决。

4. 玻璃漏斗主要用于常压下溶液中不溶杂质的去除。使用时,根据要过滤溶液的多少决定滤纸的大小,不能超过漏斗的顶部,倾倒滤液时要用玻棒引流。

5. 渗漉筒主要用于在常温下根据溶剂的浓度差,对于遇热不稳定化合物提取的一种玻璃容器。装筒时,主要注意不能装得太紧,以免药材膨胀胀破渗漉筒;同时溶剂要有充分的浓度差。

6. 圆底烧瓶主要用于中药材受热条件下在一定的溶媒中回流提取。使用时,要注意回流的溶剂不能超过烧瓶最大体积的 $2/3$ 。

7. 玻璃色谱柱主要用于中药材中成分的分离纯化。有不同的规格,柱的直径与高度比为 $1:10\sim 1:40$,柱的大小视分离样品的量而定,一般能装样品的 $30\sim 50$ 倍量的吸附剂即可。

8. 薄层色谱板主要用于中药成分的定性研究。根据使用的要求不同可以有不同的规格,用得最多的是 $10\text{cm}\times 20\text{cm}$,板的表面和边缘要光滑、平整。

9. 薄层色谱缸主要用于薄层板在一定的展开剂中展开。根据薄层板的大小有不同的规格;在中药定性研究薄层展开时,最好选用双槽薄层色谱缸,以便于溶剂的饱和。

10. 标本缸主要用于糖的纸色谱鉴定。根据滤纸的长短可以选用不同的规格。

11. 显色瓶主要用于薄层板展开后喷洒显色剂专用试剂瓶。显色时,主要要使显色试剂呈均匀的雾状喷出。

第二节 中药化学实验中常规仪器设备的操作

1. 显微熔点测定仪

(1)用途一种用于测定固体样品物质的熔点以确定其纯度的仪器。主要用于药物等有机化合物纯度检查等。

(2)使用注意事项①对待测样品要进行干燥处理,或放在干燥缸内进行干燥,粉末要进行研细。②设定起始温度切勿超过仪器使用范围($<300^{\circ}\text{C}$),否则仪器将会损坏。③当测量未知熔点的物质时,先可以快速升温,然后在掌握所测物质的大致熔点后,再重复慢慢升温多测几次,取平均值。

2. 电子分析天平

(1)用途满足实验室精确、稳定称量的质量分析要求的工具。

(2)使用注意事项①开机前先插上电源,调整水准器,使仪器预热。②在称物体时,先后在普通天平称取重量,确定不超出电子分析天平称量范围,再将物体放在电子天平的称盘中,轻轻地拿,不使物体冲击称盘,避免传感器受冲击力,影响称量数值。③读数前必须关闭防尘罩的玻璃移门,保证称量准确。④严禁有腐蚀性的物品直接接触称盘及天平台板。

3. 电热恒温鼓风干燥箱

(1)用途广泛用于实验室中的一般性烘焙、干燥、热处理及其他加热。

(2)使用注意事项①干燥箱应安放平稳,周围无强烈震动及腐蚀性气体和易燃、易爆的化合物存在。②箱内不得放入易燃、易爆及腐蚀性物品。③箱内试样不能放得过挤,应留有足够的空气循环空间,排气阀应适当旋开。④取放物品时,切勿碰击感温探头,以免损坏感温探头,不能控制温度。⑤禁止超过额定温度范围使用,以免造成事故。

4. 紫外分析仪

(1)用途本仪器在科学实验工作中为检测有紫外吸收物质的必要仪器。它还可用于药物生产和研究,薄层分析和纸色谱分析斑点和检测。

(2)使用注意事项①灯开后,切勿自下而上直接观看滤色片,以免紫外光伤害眼睛。②仪器放于干燥处,勿受强烈震动。③避免用手直接接触灯管及滤色片,以免沾污造成失透现象。④滤光片应常用纱布沾上酒精或乙融等有机溶剂擦干净。⑤紫外线灯管的寿命在500小时左右,因此用完后要及时关掉。

5. 循环水多用真空泵

(1)用途用于蒸发、蒸馏、结晶、过滤、减压、升华等操作,是实验室的常用设备。

(2)使用注意事项①保持水箱中的水质清洁,最长每周更换一次水,如水质污染严重,使用率高,可缩短更换水的时间。②抽真空作业,将需要抽真空的设备的抽气套管紧密套接于本机抽气嘴上,先开电源,再倒入要抽滤的液体。抽滤结束后,应该先拔下抽气套管,再关电源。

6. 薄层铺板器

(1)用途主要用于不同的薄层色谱铺板使用,一般有 3mm、4mm、5mm、6mm 四个厚度规格。

(2)使用注意事项①在铺板时,薄层板的厚度要均一,这样铺好的板才能均匀。②为避免铺好的板彼此不粘连,最好把铺好的板立即取下,在平整的桌面上轻轻抖动使其均匀。③使用的硅胶 G 应该充分搅拌均匀,赶尽气泡,必要的时候可以适当地加少量乙醇。

7. 离心机

(1)用途主要用于固、液精制分离,分为高速离心和低速离心两种,一般低于 5000 转/分统称为低速离心机。

(2)使用注意事项①离心前,要注意准确称量两对称样品的重量,基本上要相等,以免由于对称的样品重量不等引起噪音大,甚至引起机器的损坏。有时甚至出现安全事故。②开机时,转速的设定最好由慢到快,匀速上升,不能马上就设定到最大。

8. 超声波清洗器

(1)用途主要用于中药材有效成分的提取、加速物质中有机成分溶于溶剂以及常用玻璃仪器的清洗。

(2)使用注意事项①在超声提取中药材的过程中,注意超声频率、超声波作用时间、溶剂的选择及用量对提取率的影响。②超声波清洗器最好要经常换水,保持水质的干净。

第三章 中药化学实验的基本研究方法

第一节 中药有效成分的提取方法

中药化学成分复杂,通常是利用适宜的溶剂或适当的方法,将目标成分充分地提取出来。常用的提取方法有溶剂提取法、水蒸气蒸馏法和超临界流体提取法,此外还有升华法、压榨法和吸收法等。

一、溶剂提取法

溶剂提取法是利用具有合适溶解性能的溶剂把所需的化学成分从药材组织中溶解出来的方法,其原理是药材中的化学成分与提取溶剂间存在“相似相溶”的规律,溶剂提取法是中药中化学成分提取的最常用方法。当溶剂加入经适当粉碎的药材中时,由于扩散、渗透作用,溶剂逐渐通过细胞壁透入细胞内,溶解可溶性成分并造成细胞内外的浓度差,于是一方面细胞内的溶质不断向外扩散,另一方面溶剂又不断进入药材组织细胞中,直至细胞内外溶液浓度达到动态平衡,将溶液滤出,得到提取液。药渣继续加入新溶剂提取,如此反复多次,就可以把所需的成分近于完全溶出或大部分溶出。合并各次提取液,回收溶剂便得到总提取物。

(一)溶剂的选择

溶剂提取法的关键在于溶剂的选择。合适的溶剂应对有效成分溶解度较大,而对无效成分及其他成分溶解度小。根据“相似相溶”的规律,即亲脂性的化学成分易溶于亲脂性的溶剂,难溶于亲水性的溶剂;反之,亲水性的化学成分易溶于亲水性的溶剂,难溶于亲脂性的溶剂。溶剂或化学成分的亲脂性或亲水性可通过其极性的大小来估计。常见的溶剂极性由弱到强的顺序为:石油醚、四氯化碳、苯、二氯甲烷、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、乙醇、甲醇、水。

对化学成分而言,一般基本母核相似,其分子中功能基的极性越大、数目越多,整个分子的极性也越大,亲水性也越强,而亲脂性就越弱;成分的功能基相似,分子的非极性部分越大,则极性越小,亲脂性越强,而亲水性就越弱。

选择提取溶剂时,按照“相似相溶”规律,根据所需成分及其共存杂质的亲脂性和亲水性大小的差别选择适当的溶剂,以使所需成分尽量多地被提取出来而杂质尽量少地被提取出来。

同时,还要注意选择的溶剂不能与所需成分起化学变化,并尽可能经济易得、使用安全方便等。常见的提取溶剂可分为三类。

1. 水

水是一种强极性溶剂,可用于提取亲水性强的中药中化学成分,如苷类、生物碱盐、鞣质、氨基酸、有机酸盐等。为了增加某些成分的溶解度,也常采用酸水或碱水作为提取溶剂。用

酸水提取时,可使生物碱等碱性物质与酸作用生成盐而被提出;用碱水提取时,可使有机酸、黄酮、蒽醌等酸性成分成盐而被提出。以水为溶剂提取有价廉易得、使用安全等优点,使其在工业上得到广泛应用。但水提取液存在易发霉变质、黏度大、滤过困难等缺点,且水的沸点高,水提取液蒸发浓缩时间较长,用水提取苷类时易产生酶解。

2. 亲水性有机溶剂

亲水性有机溶剂是指能与水混溶的、有较强极性的有机溶剂,如甲醇、乙醇、丙酮等,其中以乙醇最为常用。乙醇对中药材细胞穿透能力强,对许多不同类型成分的溶解性能好。中药材中的亲水性成分除蛋白质、黏液质、果胶、淀粉和部分多糖外,大多数能在乙醇中溶解,大部分难溶于水的亲脂性成分在乙醇中溶解度也较大。还可以根据被提取成分的性质,采用不同浓度的乙醇进行提取。

乙醇提取还具有浓缩回收方便、毒性小、价格较便宜、提取液不易发霉变质、提取苷类不易产生水解等优点,是使用最广泛的提取溶剂。甲醇的性质与乙醇相似,且沸点较低(64℃),但毒性较大,使用受到限制。

3. 亲脂性有机溶剂

亲脂性有机溶剂是指不能与水混溶的、极性较小的有机溶剂,如石油醚、苯、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯等。这些溶剂可提出亲脂性成分,不能或不易提出亲水性成分,选择性强,且沸点低,浓缩回收方便。但这类溶剂挥发性大,多易燃,有毒,价格昂贵,不易透入中药材组织,提取时间长,用量大。

(二)影响提取的因素

1. 药材的粉碎度

药材粉碎越细,比表面积越大,溶剂与化学成分接触越充分,越有利于提取。但粉碎过细,药材粉粒表面积过大,吸附作用增强,反而不利于化学成分的溶出。同时,一些杂质如蛋白质、糖类、黏液质等的溶出量也相应增加,不利于后续的分选工作,故药材具体粉碎的程度要根据药材质地、提取方法及提取溶剂来决定。通常质地坚硬的药材应粉碎较细,而质地轻薄的药材可用粗粉或不用粉碎。含大量黏液质的药材如果粉碎过细,则提出的杂质量增加。以水为溶剂进行提取时药材易膨胀,可用粗粉;以乙醇为溶剂可粉碎较细。用渗漉法提取时,药粉不可过细,否则,会导致渗漉困难。

2. 温度

一般温度越高,溶解度越大,扩散速度加快,提取效率也就越高。但提取温度升高,杂质的溶出度也相应增大,同时也易导致对热不稳定成分及挥发性成分的损失。

3. 浓度差

粉碎后的药材颗粒界面内外提取溶剂中的有效成分的浓度差越高,提取效率越高。增大浓度差的方法有搅拌、更换溶剂、渗漉等。

4. 提取时间

提取时间并非越长越好。一旦药材组织内外达到提取平衡,再长的时间也是无用的。必须通过改变药材内外浓度差来提高提取效率,而不能一味延长提取时间。通常水为溶剂时,提取时间约需半小时,以乙醇为溶剂则需一小时左右。

(三)操作方法

用溶剂法提取时,常采用浸渍、渗漉、煎煮、回流提取及连续回流提取等操作方法。

1. 浸渍法

将药材的粗粉或碎块装入容器中,加入适当的溶剂(一般用稀乙醇或水),以浸没药材稍过量为度,时常振摇或搅拌,放置一段时间(一日以上)后滤出提取液,药渣另加新溶剂再进行同样操作,如此反复数次,后续浸渍时间可缩短。合并提取液并浓缩,即得提取物。用水作为溶剂浸渍时应注意防止发生霉变。本法简单易行,但提取效率较差,提取时间较长,因此有时在浸渍时采用加热(40-80℃)温浸等方法以缩短提取时间,提高提取效率。

2. 渗漉法

将药材粉末润湿膨胀后装入渗漉器中,不断在药材粉末上添加新溶剂,使其自上而下渗透过药材粉末,提取液从渗漉器的下部流出,应控制流速宜成滴不宜成线。本法提取时由于药材和溶液之间保持了较大的浓度差,故提取效率较高,但溶剂用量较大,操作时间较长。

3. 煎煮法

煎煮法是我国最早使用的传统提取方法。是将药材切成小段、薄片或粉碎成粗粉装入容器中,加水浸没药材并充分浸泡,加热至沸,保持微沸一定时间,滤出药液,药渣再依法煎煮数次,合并各次药液,过滤,浓缩后便得提取物。此法简便易行,但杂质溶出较多,且不宜用于遇热易被破坏或具挥发性的化学成分的提取。

4. 回流提取法

此法是用有机溶剂提取时最常用的一种方法,采用回流加热装置,以免溶剂挥发损失。小量药材提取时,可在圆底烧瓶上连接回流冷凝器。操作时将药材粗粉装入烧瓶中(药材的量为烧瓶容量的 1/3~1/2),再加溶剂浸没至药材表面,在水浴上加热回流提取一定时间后滤出提取液,药渣加入新溶剂再次加热回流。如此提取数次,直至有效成分基本提尽为止。合并各次提取液,回收溶剂即得提取物。大量提取时,一般使用有隔层的提取罐,用蒸气加热提取。此法提取效率较高,但溶剂用量较大,且有效成分受热易被破坏的中药材不宜用此法。

5. 连续回流提取法

实验室常用的连续回流提取装置为索氏提取器。将药材粗粉放入滤纸筒后再置于索氏提取器内,下端所接烧瓶内盛溶剂。在水浴上加热,溶剂蒸发,通过上端的冷凝管使溶剂冷凝流入药粉内。当流入的溶剂达到一定高度,通过虹吸管流入下端的烧瓶内,如此反复,使原料中的有效成分不断被提出。该法所需溶剂量较少,提取也较完全,但由于成分受热时间较长,有效成分

遇热不稳定的中药材不宜采用此法。

二、水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法是将水蒸气通入含有挥发性成分的药材中,使药材中挥发性成分随水蒸气蒸馏出来的方法。本法适用于能随水蒸气蒸馏且不被破坏的挥发性成分的提取,主要用于中药材中的挥发油、某些小分子的生物碱(麻黄碱、槟榔碱)和小分子酸性物质(丹皮酚、香豆素、蓝雪酮等)的提取。这些化学成分沸点在 100℃以上,与水不相混溶或微溶于水,且在 100℃时有一定的蒸气压,当与水一起加热至其蒸气压与水的蒸气压总和为一个大气压时,水蒸气将挥发性成分一并带出,馏出液往往分出油水两层。将油层分出即得挥发性成分;馏出液不分层而呈乳浊状水液时,可将馏出液经盐析并用低沸点溶剂(常用乙醚、环己烷)将挥发性成分萃取出来,回收溶剂即得挥发性成分。

三、超临界流体提取法

超临界流体提取法是利用超临界流体来提取中药材中化学成分的一种新技术。超临界流体是处于临界压力和临界温度以上,介于液体和气体之间的流体。超临界流体同时具有液体和气体的双重特性,它的扩散系数和黏度接近气体,而分子密度却几乎与液体接近,密度的增加使分子间相互作用力增大,对化合物的溶解能力增强,因此超临界流体的溶解性能类似液体,可以用来提取天然药物化学成分。

进行超临界流体提取最常用的流体物质是二氧化碳,因为它具有临界条件好、无毒、安全、无污染等优点。二氧化碳的最佳提取温度为 40℃,在这个温度条件下改变压力即可有效地改变其密度和溶解特性。操作时,二氧化碳在高于临界温度和临界压力的条件下成为超临界流体,溶出中药材中的化学成分,将溶有化学成分的超临界流体与原料残渣分开,当压力和温度恢复至常温和常压时超临界流体又成为气体,对物质的溶解能力大大下降,溶解在超临界流体二氧化碳中的化学成分立刻与气态二氧化碳分开而析出,达到提取化学成分的目的。

除二氧化碳外,氧化二氮、乙烯、三氯甲烷、六氟化硫、氮气、氙气等都均可用作超临界流体提取的流体物质,每种流体物质都有其最佳工作条件。此外,在超临界流体中少量加入如甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂可以改善超临界流体的溶解性能。这些溶剂通常称为夹带剂,对提高溶解度、改善选择性和增加收率都起着重要作用。

超临界流体用于中药材中化学成分提取时,一般对亲脂性强的成分提取效果较好,可用于生物碱、香豆素、芳香有机酸、酚、内酯类化合物和挥发油的提取。

四、其他提取方法

1. 升华法

固体化学成分受热直接变成气态,遇冷后又直接凝固为固态的性质称为升华。有些天然药物化学成分具有升华的性质,利用升华的方法可将这些成分直接从药材粉末中提取出来,如茶叶中的咖啡因在 178℃以上就可升华而不分解。此法简单易行,但具有升华性的天然药物

化学成分较少,仅见于少数单萜类、生物碱、游离蒽醌、香豆素和小分子有机酸类。由于在加热升华过程中往往伴有热分解现象,另外还有升华不完全、产率低及升华物不纯时往往难于处理等缺点,使得本法应用范围非常有限。

2. 压榨法

压榨法用于一些挥发油含量较高的中药材的提取,如鲜橘皮、柠檬皮等。可用机械压榨把挥发油从药材组织中压榨出来。此法在常温下进行,其成分不会受热分解,但所得产品不纯,往往含有水分、黏液质及细胞组织等杂质,因而常呈混浊状,同时又不易将药材中挥发油压榨干净,因此常将压榨后的药渣再进行水蒸气蒸馏,以便使挥发油提取更完全。

3. 吸收法

本法用于贵重的挥发油的提取,如玫瑰油、茉莉花油的提取常采用吸收法进行,用亲脂性树脂作为吸收剂来提取挥发油,特别是低沸点的挥发油,如鲜花的头香等成分。通常将鲜花放入底部有进气管、顶部有抽气管的干燥器内,然后与装有树脂的干燥器串接,使干燥器抽气管中出来的含有挥发油的气体连续通过树脂,挥发油被树脂吸附后用石油醚洗脱,挥干石油醚即得挥发油。

4. 超声波提取法

超声波提取法是利用超声波辅助溶剂进行提取的方法。其原理是利用超声波在振动时能产生大量的能量,使介质产生空化现象,当大量的超声波作用于提取介质时,介质被撕裂成许多小空化泡,空化泡在瞬间迅速胀大并破裂,破裂时把吸收的声能在极短的时间和极小的空间内释放出来,形成高温和高压,并形成较强的冲击波和微声流,使中药材的细胞壁组织在瞬间破裂,细胞内的有效成分得以从细胞内释放出来,进入提取溶剂中,从而提高提取效率。另外,超声波的许多次级效应如热效应、乳化效应、扩散效应等也能加速中药材有效成分在溶剂中的溶解和扩散,有利于提取。同时具有不破坏有效成分、提取时间短等优点,为中药有效成分的提取提供了一种快速、简便、高效的提取新方法。

超声波提取的溶剂通常选用甲醇、乙醇、乙酸乙酯、水、酸水、碱水等溶剂。超声波与常规提取相比,具有时间短、产率高和不需要加热等优点。但超声波提取目前处于小规模应用阶段,要用于大规模生产还有待进一步解决有关工程设备的放大问题。

5. 微波提取法

微波是波长介于 1mm~1m(频率介于 $3\times 10^6\sim 3\times 10^9$ Hz)的电磁波。微波在提取的过程中,中药材细胞内的极性物质尤其是水分子吸收微波能,产生大量热,使细胞内温度迅速上升,水汽化产生的压力将细胞膜和细胞壁冲破,形成微小的孔洞。进一步的微波加热导致细胞内部和细胞壁水分减少,细胞收缩,表面出现裂纹。小孔洞和裂纹的存在使细胞外溶剂容易进入细胞内,溶解出细胞内化合物并扩散到细胞外。此外,当样品与溶剂混合并被微波辐射时,由于不同物质的结构不同,吸收微波的能力各异,因此某些中药材细胞内的组分被微波选择性地加热,

进入吸收微波能力较差的溶剂中。

常用于微波提取的溶剂有甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、甲苯、己烷等有机溶剂,以及己烷-丙酮、二氯甲烷-甲醇、水-甲苯等混合溶剂。

超临界流体萃取法从 20 世纪 50 年代起已开始进入实验阶段,如从石油中脱沥青等。之后不断有大量专利涌现出来,如从咖啡豆中脱咖啡因,烟草中脱尼古丁等。20 世纪 70 年代末,SFE 技术在食品工业中的应用日益广泛,其中从啤酒花中提取酒花精已形成了生产规模。20 世纪 80 年代以来,SFE 技术更广泛地用于香精和香辛料成分的提取。如有人从菊花、梅花、栀子花、米兰花、玫瑰花中提取天然花香剂;从胡椒、肉桂、茺藜、月桂、薄荷中提取香辛料等。从中药材中提取有效成分,是近些年才开始的。原西德学者利用 SFE 技术从植物原料中提取大麻醇、香豆素和咖啡因。日本学者宫地洋等从药用植物蛇床子、茵陈蒿、桑白皮、甘草根和紫草中萃取有效成分。

6. 酶解提取法

酶解提取法是在溶剂提取前对中药材增加酶解处理步骤,使目标成分的收率明显提高的方法。其原理是通过选用适当的酶进行温和的酶反应,将中药材的细胞壁破坏,细胞内的有效成分比较容易从细胞内释放出来,使得中药材有效成分的收率较大幅度提高。由于大部分中药材的细胞壁主要由纤维素组成,因此一般选用纤维素酶来酶解药材,也可用复合酶来进行酶解。酶解提取法提取条件温和,提取效果好,收率高,节约能耗,有较广阔的应用前景。

7. 半仿生提取法

半仿生提取法(semi-bionic extraction method, SBE)是模仿口服药物在胃肠道的转运吸收过程,采用选定 pH 的酸性水和碱性水依次连续提取,其目的是提取含指标成分高的“活性混合物”。半仿生提取法的主要优点是:①提取过程符合中医配伍的特点、临床用药的特点及口服药物在胃肠道转运吸收的特点。②在具体工艺选择上,既考虑活性混合成分又以单体成分作指标,这样不仅能充分发挥混合物的综合作用,又能利用单体成分控制中药制剂的质量。③有效成分损失少,成本低,生产周期短。

第二节 中药有效成分的精制与分离方法

中药的提取液或浓缩后得到的提取物通常仍是混合物,需要进一步分离才能得到化学成分的单体。中药材中化学成分分离是根据提取物中各成分之间物理或化学性质的差异,运用一定的方法使各成分彼此分开从而获得单一化合物的过程。当获得的化学成分有一定纯度但仍有一些杂质时,进一步将杂质除去的分离过程习惯上称为纯化或精制。分离过程可粗略地分为部分分离和单体分离两个阶段,但这两个阶段并没有明显的界限,根据不同中药材化学

成分的具体情况可以灵活取舍。

中药中化学成分的分离方法很多,分离原理主要有如下几种:①根据各成分溶解度的差异进行分离;②根据各成分在两相溶剂中分配系数的差异进行分离;③根据各成分吸附性的差异进行分离;④根据各成分分子大小的差异进行分离;⑤根据液体各成分沸点的差异进行分离等。中药化学成分的主要分离方法介绍如下。

一、两相溶剂萃取法

1. 萃取法

将总提取物浸膏加少量水分散后,在分液漏斗中用与水不相混溶的有机溶剂进行萃取。一般需要反复萃取数次,才能使化学成分得到较好的分离。混合物中各成分在两相溶剂中分配系数相差越大,则分离效率越高。

若有效成分是亲脂性的,一般多用石油醚、甲苯、三氯甲烷或乙醚等亲脂性有机溶剂进行萃取,亲脂性成分被有机溶剂萃取出来;若有效成分是偏亲水性的,则需用乙酸乙酯、正丁醇或戊醇等有机溶剂进行萃取。可根据预试验结果选择对有效成分溶解度好的溶剂,如游离生物碱常选用三氯甲烷萃取,黄酮类可用乙酸乙酯萃取,皂苷类成分一般选用正丁醇进行萃取。

当提取物中含有难溶于水的碱性或酸性成分时,可调节其 pH 进行分离。对于难溶于水的生物碱成分,可以加入无机酸与之成盐而溶于水,通过萃取与难溶于水的其他成分分离;对于具有羧基、酚羟基难溶于水的酸性成分,可以加入碱与之成盐而溶于水、通过萃取与难溶于水的其他成分分离;对于具有内酯或内酰胺结构的成分,可加入碱并加热皂化,使之成盐溶于水,与难溶于水的其他成分分离。

如果通过以上分离得到的酸性部分或碱性部分中、分别含有强度不同的酸性成分或碱性成分,可用 pH 梯度萃取法进行进一步分离。pH 梯度萃取法是利用不同成分的酸碱性强弱的差异,在某一强度的 pH 条件下某些成分可成盐溶于水,而与其他成分分离的,依次改变 pH 条件,则不同酸、碱性的化学成分依次被萃取出来,从而达到分离的目的。

中药中含有的一些成分如蛋白质、皂苷、树脂等都有一定的表面活性,是天然的乳化剂,因此萃取中常遇到乳化的难题。萃取操作时要尽量防止乳化。

2. 逆流分配法

逆流分配法(counter current distribution, CCD)是将混合物在一定量的两相溶剂中经多次移位萃取分配而达到分离的方法。本法采用的逆流分配装置进行分离,该仪器是由数十乃至数百只管子组成。操作时,往盛有混合物溶液的管内加入另一种不相混溶的溶剂,振摇后放置,分成上、下两层,将上层转移到盛有下层新溶剂的下一管中,同时加入新的上层溶剂到原管内,振摇放置分层。如此反复操作数次或数十次甚至数百次,混合物几乎完全被分离开。逆流分配法具有很强的分离混合物各组分的能力,适用于分离性质非常近似的化合物。但是逆流分配操作比较麻烦,很少采用,现在多采用分离原理相同的高速逆流色谱等方法。

二、系统溶剂分离法

系统溶剂分离法是采用数种不同极性溶剂,对总提取物的化学成分依极性不同而分离的方法。这是常用的一种初步分离的方法,若配合药理可确定有效部位,就能为有效成分的进一步分离提供方便。选用的溶剂种类和数量可以根据各成分的溶解情况灵活取舍。该法有三种操作方式。

1. 用 3~4 种不同极性的溶剂对总提取物进行溶解处理。溶剂的极性由低到高,使总提取物中的各种成分依其在不同极性溶剂中溶解度的差异而分别溶解在不同溶剂中,这样便将总提取物中的化学成分按照极性由小到大粗分成了若干个部分。常用的溶剂有石油醚、乙醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、水等。由于总提取物常为胶状物,难于均匀分散在低极性的溶剂中,使分离难以完全,这时可拌入适量的惰性填充剂,如硅藻土或纤维素粉等,低温干燥成粉末状,再用溶剂依次溶解分离。

2. 采用萃取法,将总提取物混悬在水中,然后用若干种极性不同且能与水不相混溶的溶剂,按溶剂的极性由低到高依次进行萃取。常用的溶剂有石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等,这样就把总提取物中的化学成分按照极性由小到大粗分成石油醚部分、三氯甲烷部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水等五个部分。

3. 采用柱色谱的方法,将总提取物与吸附剂拌样装柱,然后用若干种极性不同的溶剂按极性由低到高依次分别洗脱,可将总提取物的化学成分分成若干部分,此法还可采用两种溶剂的混合溶剂进行洗脱分离。

三、结晶法

结晶法是分离和精制固体化学成分最常用的方法之一,是利用混合物中各成分在某种溶剂或某种混合溶剂中的溶解度不同来达到分离的方法。天然药物化学成分在常温下多数是固体物质,具有结晶化的通性,可用结晶法来达到分离,一旦获得结晶就能有效地精制成单体。

纯化合物的结晶有一定的熔点和结晶学特征,有利于化合物的鉴定。因此,获得结晶并纯化至单体是鉴定天然药物化学成分、研究其分子结构的重要途径,但值得注意的是,通常天然药物化学成分应先经过提取分离,得到较纯的组分时才进行结晶的操作,能结晶的成分大部分是较纯的化合物,但并不一定是单体,结晶有时也是混合物。另外也有一些物质即使达到了很高的纯度,也不能结晶或不易结晶,只呈无定形粉末状。

(一)结晶法的操作步骤

结晶法的操作通常包括四个步骤,

1. 溶解

将需要结晶处理的固体物质或粗晶溶解于沸腾或近于沸腾的适宜溶剂中。溶剂加热至沸腾或近于沸腾的目的是使溶剂产生最大的溶解度,以利于冷却后过饱和溶液的形成和结晶的析出。为了减少样品留在母液中而造成损失,加入溶剂的量应尽可能少。

某些样品由于含少量有色杂质使结晶溶液呈色,可加入适量的活性炭脱色。活性炭的用量视活性炭的活性、所用溶剂极性和所含杂质的量而定,常用量为固体样品量的 1%~2%。

2. 热滤

将溶解了样品的溶液趁热过滤,以除去不溶性杂质,用活性炭脱色时也要将活性炭一并滤除。通过溶解而制得的结晶溶液是一个热的饱和溶液,遇冷往往易析出结晶,因此必须趁热过滤。

3. 析晶

将滤液慢慢冷却放置,结晶析出。在这一过程中一般是溶液浓度高,降温快,析出结晶的速度也越快,但此时结晶的颗粒较小,杂质也可能较多。有时自溶液中析出的速度太快,超过了化合物晶核的形成和分子定向排列速度,往往只能得到无定形粉末。有时溶液浓度过高,相应杂质的浓度或溶液的黏度也较大,反而阻碍结晶的析出。因此,在操作中使溶液浓度适当并慢慢降低温度,常常能析出较大和纯度较高的结晶。有时结晶的形成需要较长的时间,往往需冷藏,放置数天或更长时间。

4. 滤过

滤出结晶。滤出的结晶要用少量冷的溶剂洗涤晶体,以便除去附在晶体表面的母液。取出结晶干燥即得。

(二)结晶溶剂的选择

在使用结晶法的过程中要特别注意结晶条件的选择,其中又以结晶溶剂的选择最为重要,这也是制备出结晶的关键所在。对结晶溶剂的要求如下。

1. 该溶剂对欲纯化成分的溶解度在 1/1000~1/10,一般在 1/100 左右为宜。此外,该溶剂对欲纯化的成分热时溶解度大,冷时溶解度小,而对杂质则冷热都不溶或冷热都易溶。这样欲结晶的物质在热时和冷时溶解度相差较大,热时溶解的有效成分在溶液冷时易析出结晶,而杂质冷热都不溶时可经滤过除去;杂质冷热都易溶时,冷却后不随欲结晶成分一同析出而留在母液中,也能经滤过除去。

2. 溶剂的沸点不宜太高或太低,一般在 30~150°C 之间。溶剂沸点过低易挥发逸失,过高则不易将结晶表面附着的溶剂除去。

3. 溶剂与欲结晶的成分不发生化学反应。

4. 尽可能安全、价廉、易得。

寻找合适的溶剂一般要通过查阅文献资料,参考同类化合物的一般溶解性质和结晶条件,并且经少量摸索试验而确定。常用的结晶溶剂有水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷、苯、石油醚等。常用的溶剂不能结晶时可考虑一些不常用溶剂,如二氧六环、吡啶等。

若选择不到合适的单一的结晶溶剂,可考虑选择混合溶剂。混合溶剂一般由两种互溶的溶剂组成,其中一种是对欲结晶的成分溶解度大的溶剂,而另一种则是溶解度小的溶剂。先将

欲结晶的样品溶于最少量的溶解度大的热溶剂中,然后向热溶液中滴加溶解度小的第二种溶剂直至混浊,这时再滴加第一种易溶的溶剂使混浊全部变清为止,溶液在该点达到饱和状态,冷却时易析出结晶。在选择混合溶剂时,低沸点溶剂要对欲结晶的成分较易溶解,而高沸点溶剂则较难溶解,这样两者才能混合使用,在放置析晶过程中先塞紧瓶塞看是否能结晶。如不结晶,可打开瓶塞任溶剂逐步在室温下自然挥发,低沸点的溶剂易挥发而比例逐渐减少,样品的溶解度慢慢降低,促进结晶的析出。常用的混合溶剂有乙醇-水、丙酮-水、乙醚-甲醇、苯-石油醚、乙醚-石油醚、三氯甲烷-醇或醚等。

四、沉淀法

沉淀法是在提取液中加入某种试剂产生沉淀,以获得有效成分或除去杂质的方法。

1. 溶剂沉淀法

溶剂沉淀法是在含有混合成分的溶液中加入某种溶剂或混合溶剂,使混合物中的某些成分沉淀出来的分离方法。例如在水提取液中加入一定量的乙醇,使含醇量达到 80% 以上,则难溶于乙醇的成分如淀粉、树胶、黏液质、蛋白质等杂质从溶液中沉淀出来,经过滤除去沉淀,即可达到将有效成分与这些杂质相分离的目的。这便是中药制剂中常用的“水提醇沉法”和“醇提水沉法”的基本原理。又如将粗制总皂苷溶于少量甲醇中,然后滴加乙醚、丙酮或乙醚丙酮的混合溶剂,边加边摇匀,皂苷即可析出,如此反复处理数次可得到较纯的总皂苷。如果逐渐降低溶剂的极性,皂苷还可能分批析出,得到不同极性的皂苷混合物。

2. 酸碱沉淀法

酸碱沉淀法是利用酸性成分在碱中成盐而溶解、在酸中游离而沉淀,而碱性成分在酸中成盐而溶解、在碱中游离而沉淀的性质来进行分离的一种方法。如游离生物碱一般难于水,遇酸生成生物盐而溶于水,过滤除去水不溶性杂质,滤液再加碱碱化,则重新生成游离的生物碱从水溶液中析出而与水溶性杂质相分离。不溶于水的内酯类化合物遇碱时开环(有时需加热),生成羧酸盐类而溶于水,过滤除去水不溶性杂质,滤液再加酸酸化,则内酯环重新环合生成不溶于水的内酯类化合物,从溶液中沉淀析出,这样便与其他成分相分离。

3. 专属试剂沉淀法

某些试剂能选择性地与某类化学成分反应生成可逆的沉淀,借以与其他化合物分离,如水溶性生物碱可加入雷氏铵盐沉淀而分离,甾体皂苷可被胆甾醇沉淀,鞣质可用明胶沉淀等。但在使用该法时要注意,若用试剂来沉淀分离有效成分,则生成的沉淀应是可逆的,即得到的沉淀可用一定溶剂或试剂将其还原为原化合物,若被沉淀的化合物是杂质则不需考虑这一点。

五、膜分离法

膜分离法是利用具有一定孔径的多孔滤膜对分子大小不同的化学成分进行筛分而达到相互分离的方法。膜分离技术是对传统分离技术的一次革命,被国际上公认为 20 世纪末至 21 世纪中期最有发展前途的一项重大生产技术,成为各国研究的热点。现已研制和开发的高分

子分离膜有:离子交换膜、微滤、超滤、反渗透和纳滤膜,渗析膜。膜分离过程(MSP)的实质是物质被透过或被截留于膜的过程;近似于筛分过程,依据滤膜孔径的大小达到确实分离的目的,根据分离膜的不同,膜分离法可分为以下几种主要类型。

1. 微滤

采用多孔半透膜,截流 0.02~10 μm 的微粒,使溶液通过,除去溶液中悬浮的微粒,一般用作天然药物有效成分溶液的预处理。

2. 超滤

采用非对称膜或复合膜,截流 0.001~0.02 μm 的大分子溶质,一般用作除去溶液中的生物大分子杂质,得到较纯的、相对分子质量较小的中药的有效成分溶液。常用于除去黄酮、生物碱、皂苷等中药的有效成分提取液中的鞣质、多糖、树胶等大分子杂质。

3. 纳滤

纳滤技术是介于超滤与反渗透之间的一种膜分离技术,其截留分子量在 80-1000 的范围内,孔径为几纳米,因此称纳滤。采用复合膜除去溶液中的小分子和低价离子杂质,得到较纯的、相对分子质量较大的中药中有效成分溶液。一般用于除去皂苷、蛋白质、多肽、多糖等大分子有效成分溶液中的无机盐、单糖、二糖等小分子杂质。

4. 透析

透析法是利用小分子物质在溶液中可通过半透膜,而大分子物质不能通过半透膜的性质达到分离的方法。例如分离和纯化皂苷、蛋白质、多肽、多糖等物质时,可用透析法以除去无机盐、单糖、二糖等杂质。反之也可将大分子的杂质留在半透膜内,而将小分子的物质通过半透膜进入膜外溶液中而加以分离精制。透析是否成功与透析膜的规格关系极大,透析膜的膜孔有大有小,要根据欲分离成分的具体情况选择。由于膜分离法是常温操作,分离物质过程中不涉及相变,无二次污染,且具有生物膜浓缩富集的功能,同时操作方便、能耗低、分离效率高、维修费用低,易于自动化,因而是现代分离技术中一种效率较高的分离手段,可以部分取代传统的滤过、吸附、冷凝、重结晶、蒸馏和萃取等分离方法,在药物研究的许多领域获得广泛应用。

六、色谱法

色谱法是中药中化学成分分离的最常用方法,利用混合物中各种成分对固定相和流动相亲和作用的差异使之相互分离的,该法具有分离效能高、快速简便等特点。通过不同分离原理、不同操作方式、不同色谱材料,组合应用各种色谱法,天然药物中的化学成分一般均可以获得满意的分离结果。随着近年来色谱技术的发展,色谱法也逐步向仪器化、自动化、高速化及与其他仪器联用的方向发展,成为中药中化学成分最有效、应用范围最广、使用最多的分离手段。另外,色谱法也是中药中化学成分定性鉴定和定量分析的重要方法。

(一)常规柱色谱法

常规柱色谱法是中药中化学成分分离的最常用方法。该法是将固定相填装在柱中,再把要分离的样品均匀加到柱顶端,然后将流动相(洗脱剂)从柱顶端不断加入通过色谱柱,使不同的化学成分得到分离,最后收集不同的流分,得到分离后的各个化合物,根据常规柱色谱法固定相的性质和分离原理,通常可分为如下几种类型、

1. 吸附色谱法

吸附色谱法是应用各种固体吸附剂为固定相,利用混合物中各成分对吸附剂的吸附能力差异来进行分离的一种方法。吸附色谱法是使用最广泛的一种色谱方法,吸附剂的吸附作用主要通过氢键、配合作用、静电引力、范德华力等而产生的。色谱分离时,吸附作用的强弱与吸附剂的吸附能力、被吸附成分的性质和流动相的性质有关。操作过程中,当流动相流经固定相时,化合物连续不断地发生吸附和解吸附,从而使混合物中各成分相互分离。

(1)吸附剂。常用硅胶、氧化铝、聚酰胺等。另外,氧化镁、硅酸镁、碳酸钙和硅藻土等也可作为吸附剂应用于某些中药中化学成分的分离。

(2)洗脱剂。在柱色谱中,流动相习惯上称为洗脱剂。洗脱剂对分离效果影响极大,选择时必须根据被分离成分和所选用的吸附剂性质结合起来加以考虑。对极性吸附剂而言,通常被分离的成分极性越大,吸附作用越强,而对于洗脱剂则是极性越大洗脱能力越强。吸附剂的吸附能力减弱,则洗脱剂的极性也要相应降低。

在柱色谱分离过程中,由于中药中化学成分结构往往较为近似,只采用单一溶剂洗脱不易得到满意的分离效果。采用梯度洗脱的方法,通过逐步改变洗脱剂的极性以逐步提高其洗脱能力。由一种洗脱剂更换为另一种洗脱能力更强的洗脱剂时,应该辅以二者不同比例的混合溶剂作为过渡,逐渐增大洗脱能力强的溶剂的比例。这样在整个洗脱过程中,洗脱剂的洗脱能力是缓慢地、渐进地提高,更有利于混合物的完全分离。

2. 分配色谱法

分配色谱法是指以液体作为固定相和流动相的液相色谱法。

其原理是利用混合物中各成分在固定相和流动相两种不相混溶的液体之间连续分配,由于各成分在两相间的分配系数不同从而达到相互分离的目的。若固定相的极性大于流动相的极性,称为正相分配色谱;若固定相的极性小于流动相的极性,则称为反相分配色谱。

在分配色谱中,由于固定相和流动相均为液体,选用的溶剂应该是互不相溶的,但实际上相互间总会有少许的溶解。即使是极少量的互溶,在大量洗脱剂的洗脱下,会使固定相液膜流失而影响分离,故在操作前要使两相预先相互饱和。为了避免操作上的麻烦和提高固定相的稳定性,现在一般使用键合固定相材料,如常用的反相硅胶分配色谱填料系将普通硅胶经下列方式化学修饰,键合上长度不同的烃基(R),在载体硅胶上形成一层亲脂性表面。键合的烃基通常为乙基(-C₂H₅)、辛基(-C₈H₁₇)和十八烷基(-C₁₈H₃₇),分别命名为 RP-2,RP-8 和 RP-18,它们的亲脂性由强到弱为:RP-18,RP-8,RP-2。

3. 离子交换色谱法

离子交换色谱法是利用各种离子性化学成分与离子交换树脂等进行离子交换反应时,因交换平衡的差异或亲和力差异而达到分离的一种分离方法。

该法以离子交换树脂为固定相,用水或与水混合的溶剂为流动相,在流动相中存在的离子性成分与树脂进行离子交换反应而被吸附。离子交换色谱法主要适合离子性化合物的分离,如生物碱、有机酸、氨基酸、肽类和黄酮类成分。化合物与离子交换树脂进行离子交换反应的能力强弱主要取决于化合物解离度的大小和带电荷的多少等因素,化合物解离度大(酸性或碱性强),则易交换在树脂上而相对来说较难洗脱。因此,当具不同解离度成分的混合物被交换在树脂上,解离度小的化合物先于解离度大的化合物被洗脱。

(1)离子交换树脂的类型。离子交换树脂是由苯乙烯通过二乙烯苯交联聚合而成的高分子物质,具有特殊的网状结构,网状结构的骨架上带有能解离的基团作为交换离子。根据交换离子的不同可将其分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。

(2)离子交换树脂的选择。被分离的物质为生物碱阳离子时选用阳离子交换树脂,为有机酸阴离子时选用阴离子交换树脂。被分离的离子吸附性强(交换能力强),选用弱酸或弱碱型离子交换树脂,如用强酸或强碱型树脂则由于吸附力过强而很难洗脱;被分离的离子吸附性弱,应选用强酸或强碱型离子交换树脂,如用弱酸或弱碱型离子交换树脂则不能很好地交换或交换不完全。被分离物质的相对分子质量大,选用低交联度的树脂;相对分子质量小,选用高交联度的树脂。如分离生物碱、大分子有机酸、多肽类采用 2%-4%交联度的树脂为宜;分离氨基酸或小分子肽(二肽或三肽),则以 8%交联度的树脂为宜;制备无离子水或分离无机成分,需用 16%交联度的树脂,只要不影响分离的完成,一般尽量采用高交联度的树脂。

(3)洗脱剂的选择。由于水是优良的溶剂并具有解离性,因此大多数离子交换树脂色谱都选用水作洗脱剂,有时也采用水甲醇混合溶剂。为了获得最佳的洗脱效果,经常要用竞争的溶剂离子,并同时保持恒定的溶剂 pH 值,因此经常采用各种不同离子浓度的含水缓冲溶液。如在阳离子交换树脂中,经常用乙酸、枸橼酸、磷酸缓冲溶液;在阴离子交换树脂中,则应用氨水、吡啶等缓冲溶液。

除了离子交换树脂外,还可用离子交换纤维和离子交换凝胶来进行分离。离子交换纤维和离子交换凝胶是在纤维素或葡聚糖等大分子的烃基上,通过化学反应引人能释放或吸收离子的基团制得的,如二乙氨基纤维素(DEAE-Cellulose)、羧甲基纤维素(CM-Cellulose)、二乙氨基葡聚糖凝胶(DEAE-SepHdex)、羧甲基葡聚糖凝胶(CM-SepHdex)等。这些类型的离子交换剂既有离子交换性质又有分子筛的作用,对水溶性成分的分离十分有效,主要用于分离纯化蛋白质、多糖等水溶性成分。

4. 大孔树脂色谱法

大孔树脂是一种没有可解离基团、具有大孔结构的固体高分子物质,一般为白色球形颗

粒状,粒度多为 20~60 目。大孔树脂色谱是利用化合物与大孔树脂吸附力及化合物相对分子质量大小的不同,在大孔树脂上经溶剂洗脱而达到分离的方法。大孔树脂色谱是吸附和分子筛原理相结合的色谱方法,其吸附力以分子间范德华力为主,其分子筛作用是由其多孔性结构所决定的。大孔树脂在水中吸附性强,故适用于从水溶液中分离和提纯化合物,因此,在天然药物化学成分的分离中尤其是水溶性成分的提取分离中应用较为广泛。

大孔树脂根据孔径、比表面积和树脂结构可分为许多型号,如 AB-8, NKA-9, NKA-12, D101 等。以聚苯乙烯为核心的大孔树脂属于非极性大孔树脂,能吸附非极性化合物;以极性物质为核心的大孔树脂属于极性大孔树脂,能吸附极性化合物,在应用中,可根据实际要求和化合物性质选择合适的树脂型号和分离条件。

大孔树脂用于天然药物化学成分的分离时,通常用混合物的水溶液通过大孔树脂后依次用水、含水醇(甲醇或乙醇)、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等洗脱剂洗脱。

大孔树脂的再生处理比较方便,再生时用 1 mol/L 盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠溶液顺次浸泡洗涤,最后用蒸馏水洗至中性,浸泡于甲醇或乙醇中储存,临用前用蒸馏水洗尽醇即可使用。

5. 凝胶色谱法

凝胶色谱法是一种以凝胶为固定相的液相色谱方法。凝胶色谱法所用的固定相凝胶是具有许多孔隙的立体网状结构的高分子多聚体,其孔隙大小有一定的范围。它们呈理化惰性,大多具有极性基团,能吸收大量水分或其他极性溶剂。将凝胶颗粒浸泡在适宜的溶剂中,使其充分溶胀,然后装入色谱柱中,加入样品溶液,再用洗脱剂洗脱。由于凝胶颗粒膨胀后形成的骨架中有许多一定大小的孔隙,当混合物溶液通过凝胶柱时,比凝胶孔隙大的分子不能进入凝胶内部(即被排阻在凝胶颗粒外部),只能在凝胶颗粒的间隙移动,并随洗脱剂从柱底先行流出,比凝胶孔隙小的分子可以自由进入凝胶内部,移动被滞留,随流动相走在后面。这样经过一段时间的洗脱后,混合物中的各成分就能按分子由大到小的顺序先后流出并得到分离。

在天然药物化学成分的研究中,凝胶色谱主要用于蛋白质、酶、多肽、氨基酸、多糖、苷类、甾体以及某些黄酮、生物碱的分离。商品凝胶的种类很多,不同种类凝胶的性质和应用范围有所不同,常用的有葡聚糖凝胶(SepHadex G)和羟丙基葡聚糖凝胶(SepHadex LH-20)。

(1)葡聚糖凝胶。葡聚糖凝胶是由葡聚糖和甘油基通过醚键(-O-CH₂-CHOH-CH₂-O-)交联而成的多孔性网状结构物质。由于其分子内含大量羟基而具有亲水性,在水中溶胀。凝胶颗粒网孔大小取决于制备时所用交联剂的数量及反应条件。加入交联剂越多,交联度越高,网状结构越紧密,孔径越小,吸水膨胀也小;交联度越低,则网状结构越稀疏,孔径就大,吸水膨胀也大。商品型号即按交联度大小分类,并以吸水量(每克干凝胶吸水量×10)来表示,如 SepHadex G-25 表示该凝胶吸水量为 2.5 mL/g, SepHadex G-75 的吸水量为 7.5 mL/g。SepHadex G 系列的凝胶只适于在水中应用,不同规格的凝胶适合分离不同相对分子质量的物质。

(2)羟丙基葡聚糖凝胶。羟丙基葡聚糖凝胶是在 SepHadex G-25 分子中的羟基上引入羟

丙基而成醚键(-OH→-OCH₂CH₂CH₂OH)由此结合成的多孔性网状结构物质。虽然分子中羟基数未改变,但非极性烃基部分所占比例相对增加了,因此这种凝胶既有亲水性又有亲脂性,不仅可在水中应用也可在多种有机溶剂中膨胀后应用。它所用的洗脱剂范围较广,如含水的醇类、甲醇、乙醇等,既可使用单一有机溶剂,也可使用混合溶剂,如三氯甲烷与甲醇的混合液。可以在洗脱过程中改变溶剂组成,类似梯度洗脱,以达到较好的分离效果,同时也扩大了使用范围,适用于某些亲脂性、难溶于水的成分分离。

在葡聚糖凝胶分子上引入各种离子交换基团,使凝胶具有离子交换剂的性能,同时仍保持凝胶的一些特点。如羧甲基交联葡聚糖凝胶(CM-SepHdex)、二乙氨基乙基交联葡聚糖凝胶(DEAE-SepHdex)、磺丙基交联葡聚糖凝胶(SP-SepHdex)、苯胺乙基交联葡聚糖凝胶(QAE-SepHdex)等。此外,商品凝胶还有丙烯酰胺凝胶(SepHacryl,商品名 Bio-Gel P)、琼脂糖凝胶(SepHarose,商品名 Bio-Gel A)等,都适用于分离水溶性大分子化合物。

(二)加压柱色谱

1. 高效液相色谱

高效液相色谱是在经典的常规柱色谱的基础上发展起来的一种新型快速分离分析技术,其分离原理与常规柱色谱相同,包括吸附色谱、分配色谱、凝胶色谱、离子交换色谱等多种方法。高效液相色谱采用了微粒型填充剂(颗粒直径 5~20 μm)和高压匀浆装柱技术,洗脱剂由高压输液泵压入柱内,并配有高灵敏度的检测器和自动描记及收集装置,从而使其在分离速度和分离效能等方面远远超过常规柱色谱,具有高效化、高速化和自动化的特点。高效液相色谱还保持了液相色谱对样品的适用范围广、流动相改变灵活性大的优点,对于难汽化、相对分子质量较高的成分或对热不稳定的成分都可应用。制备型的高效液相色谱还能用于较大量分离制备纯度较高的样品,因此在中药中化学成分分离、定性检测和定量分析等方面已占有越来越重要的地位。高效液相色谱常使用键合固定相材料。

2. 低压柱色谱和中压柱色谱

低压柱色谱和中压柱类似高效液相色谱,属于加压液相色谱。它们采用填充剂的颗粒直径大小介于常规柱色谱和高效液相色谱之间,在不同的压力下进行柱色谱,虽然低压、中压柱色谱的分离效果不及高效液相色谱,但比经典的常规柱色谱有显著提高,并具有设备简单、操作方便、分离快速等优点,适合于天然药物化学成分分离。

(三)真空液相色谱法

真空液相色谱法又称为减压柱色谱法,它是利用柱后减压使洗脱剂迅速通过固定相,从而很好地分离样品。通常以吸附剂为固定相,常用的吸附剂为薄层色谱颗粒直径的硅胶或氧化铝,样品量与吸附剂用量比值为 1:(30~200),吸附剂和洗脱剂可通过薄层色谱来选择,真空液相色谱法具有快速、简便、高效、价廉等优点,目前已成功用于许多中药化学成分分离。

(四)薄层色谱

薄层色谱法是一种简便、快速的色谱方法,常用薄层色谱按分离原理属吸附色谱,其固定相为吸附剂,流动相则习惯称为展开剂。薄层色谱主要用于化学成分的检识,通常作为柱色谱分离的检识手段,用于色谱条件的摸索、洗脱流分的归并、化学成分纯度的判定等。薄层色谱用于化学成分分离时称为制备薄层色谱,在中药化学成分分离中被广泛应用。制备薄层色谱是将吸附剂均匀地铺在玻璃板上,把要分离的样品点加到薄层上,经合适的展开剂展开后将分离后的谱带分别刮下,用溶剂洗脱后得到待分离的化合物。

薄层色谱中吸附剂和展开剂的选择原则和常规柱色谱相同,主要区别在于薄层色谱要求吸附剂的粒度更细且粒度均匀。最常用的吸附剂是硅胶或加有石膏作黏合剂的硅胶 G,有时另加其他黏合剂如羧甲基纤维素钠加固薄层板面,对于某些性质特殊的化合物的分离与检出有时需采用一些特殊薄层色谱方法。

1. 荧光薄层色谱

有些化合物本身无色,在紫外灯下也不显荧光,又无适当的显色剂,此时可在吸附剂中加入荧光物质制成荧光薄层进行色谱,展开后置于紫外光下照射,薄层板本身显荧光而样品斑点处不显荧光,即可检出样品的色谱位置。常用的荧光物质有两种:一种是能在 254 nm 紫外光激发下发出荧光的锰激活的硅酸锌;另一种为在 365 nm 紫外光激发下发出荧光的银激活的硫化锌和硫化镉。

2. 配合薄层色谱

常用的有硝酸银薄层色谱,用来分离碳碳双键数目和构型不同的一系列化合物。

3. 酸碱薄层色谱

分离碱性或酸性化学成分时可改变吸附剂原来的酸碱性,在铺制薄层时采用稀酸或稀碱以代替水调制薄层板,有时能够提高分离效果。

4. 高效薄层色谱

高效薄层色谱是在薄层色谱的基础上采用粒度更小和粒度范围更窄的吸附剂,结合特殊的黏合剂发展起来的一种色谱方法。高效薄层色谱的吸附剂粒度为 5~7 μm ,理论塔板高度仅为 12 μm ,而一般薄层色谱的理论塔板高度约为 30 μm ,因此高效薄层色谱的分离能力较薄层色谱提高 3 倍,检出灵敏度提高 1~2 个数量级,且使用时展开距离短,斑点集中,分离效果好。高效薄层板通常采用喷雾法预先制备,涂层均匀,重现性好。高效薄层色谱具有高效、微量、快速等特点,多用于中药中化学成分的检识和定量分析。

(五)液滴逆流色谱法

液滴逆流色谱法是一种在逆流分配法基础上改进的液-液分配技术,它要求流动相通过固定液相柱时能形成液滴。流动相形成的液滴在细的分配萃取管中与固定相有效地接触、摩擦,不断形成新的表面,促进溶质在两相溶剂中的分配,使混合物中的各化学成分在互不溶解的两相液滴中因分配系数不同而达到分离。该法适用于各种极性较强的中药化学成分分离,

如苷类等难分离的强极性成分,更适用于制备性纯化。其分离效果往往比逆流分配法好,且不会产生乳化现象,用氮气压驱动流动相,被分离物质不会因遇大气中氧气而氧化。但本法必须选用能生成液滴的溶剂系统,且处理样品量小,并需要有专门设备。

(六)高速逆流色谱法

高速逆流色谱法是一种无载体的液液分配色谱方法。该法利用聚氟乙烯螺旋分离柱的方向性和特定的高速行星式旋转所产生的离心力作用,使无载体支持的固定相稳定地保留在分离柱中,并使样品和流动相单向、低速通过固定相,使互不相溶的两相不断充分地混合,随流动相进入螺旋分离柱的混合物的各化学成分在两相之间反复分配,按分配系数的不同而逐渐分离并被依次洗脱,在流动相中分配系数大的化学成分先被洗脱,反之,在固定相中分配系数大的化学成分后被洗脱。

高速逆流色谱法由于不需要固体载体,克服了其他液相分配色谱中因为采用固体载体所引起的不可逆吸附消耗、样品的变性污染和色谱峰畸形拖尾等缺点,且溶剂固定相保留值高达 50%以上,性能稳定,样品可定量回收,还具有重现性好、分离纯度高和速度较快等特点,适用于皂苷、生物碱、黄酮、蒽醌、木脂素、三萜酸性化合物、蛋白质和糖类等化合物的分离和精制工作。

(七)旋转管式逆流色谱法

旋转管式逆流色谱法是一种全液-液分配技术。此法是使一种两相溶剂系统中的一相通过含有第二相的药室进行渗透,当移动相通过时,与管中相连的管室不停地转动以增加两相的接触。旋转管式逆流色谱具有和液滴逆流色谱相同的优点,但在旋转管式逆流色谱中溶剂不必形成液滴,因此可使用的溶剂系统增多,几乎不受限制。

(八)亲和色谱法

亲和色谱法是基于分子间高亲和力与高专一性可逆结合原理的一种独特的色谱分离方法,通过模拟生物分子之间可逆的特异性相互作用,利用偶联了亲和配基的吸附介质为固定相来亲和吸附目标化合物,是吸附色谱的发展。该方法能从复杂的样品中选择性分离和(或)分析特定化学成分。在亲和色谱中,先将能与目标化合物(配体)特异结合的配基固定于填料载体上制备色谱柱,再将含目标化合物的混合物通过色谱柱,只有与色谱柱中配基表现出亲和性的目标化合物才可与配基结合,保留在色谱柱上,最后被吸附的目标化合物通过改变流动相的组成被洗脱,从而与其他化学成分分离。

亲和色谱原来主要用于蛋白质尤其是酶、抗原、抗体的分离与纯化,近年来随着技术的不断发展,其应用范围也不断扩大,出现了分子印迹亲和色谱、免疫亲和色谱、细胞膜色谱等多种新型的亲和色谱。

1. 分子印迹亲和色谱

分子印迹亲和色谱是利用具有分子识别能力的聚合物材料--分子印迹聚合物作为亲和

色谱固定相来分离、筛选、纯化目标分子的技术。近年来该技术发展非常迅速、分子印迹聚合物在有机溶剂中更能表现出其分子识别能力,它不仅对模板分子具有很高的亲和性,而且对与模板分子结构类似的化合物也能表现出较高的结合能力,因此得到了越来越广泛应用。如果将其与质谱联用,可以快速有效地分离鉴定中药中的活性成分。

2. 免疫亲和色谱

免疫亲和色谱是利用抗原和抗体间的可逆结合作用高效选择性地分离和纯化复杂体系中微量成分的方法。将抗体固定到固相载体上,可用于从复杂的样品中分离得到所需的目标化合物。

3. 细胞膜色谱

细胞膜色谱是将活性组织细胞膜固定在特定载体表面,制备成细胞膜固定相,用液相色谱的方法根据化合物与固定相上细胞膜及膜受体的相互作用分离并筛选中药中的有效成分的方法。

亲和色谱具有高选择性、高活性回收率和高纯度等特点,利用它对粗提物经过一些简单的处理便可得到所需的高纯度活性物质。由于亲和配基往往是目标化合物的作用靶点,因此亲和色谱不仅能选择性分离,而且可同时进行活性的初步筛选,非常适合中药中有效成分的分离和筛选。

七、其他分离方法

1. 分馏法

分馏法是利用液体混合物中各组分沸点的差别,通过反复蒸馏来分离液体成分的方法。在中药中化学成分研究中,分馏法用于挥发油和一些液体生物碱的分离。液体混合物中所含的每种成分都有各自固定的沸点,在一定的温度下都有一定的饱和蒸气压,沸点越低,则该成分的蒸气压越大,即挥发性越大。当溶液受热汽化并呈气、液两相平衡时,沸点低的成分在蒸气中的分压高,因此在气相中相对含量也就较液相中大,即在气相中含较多低沸点成分,而在液相中含有较多的高沸点成分。经过一次理想的蒸馏后(即气、液两相达到平衡),馏出液中沸点低的成分含量提高,而沸点高的成分的含量降低。如果把馏出液再进行一次蒸馏,沸点低的成分含量又进一步增加,如此经过多次反复蒸馏就可将混合物中各成分分开。这种多次反复蒸馏而使混合物分离的过程称为分馏。实际分馏时是通过分馏柱来进行的,在一支分馏柱中完成这种多次蒸馏的复杂过程。

在分离液体混合物时,如液体混合物各成分沸点相差 100°C 以上可以不用分馏柱,如相差 25°C 以下则需采用分馏柱。沸点相差越小,需要的分馏装置越精细,分馏柱也越长,若液体混合物能生成恒沸混合物或所含化学成分较复杂,且有些成分沸点相差很小,用分馏法很难得到单体,须配合其他分离方法如色谱法进一步分离才能得到单体。另外,用分馏法分离挥发油时,由于挥发油中各成分沸点较高(常在 150°C 以上),并且有些成分在受热下易发生化学变化,因

此常常需在减压下进行操作。

2. 分子蒸馏法

分子蒸馏也称短程蒸馏,是一种在高真空度条件下进行分离操作的连续蒸馏过程。其基本原理是在高真空度下进行的非平衡蒸馏,具有特殊的传质传热机理。在高真空度下,蒸发面和冷凝面的间距有可能小于或等于分离物分子运动的平均自由程,当分子从蒸发面上形成的液膜表面蒸发逸出时分子不相互发生碰撞,毫无阻碍地到达冷凝面上凝集。不同种类的分子逸出液面后的平均自由程不同,依据不同分子,的这种性质差异而达到混合物的分离。由于待分离组分在远低于常压沸点的温度下挥发,以及各组分在受热情况下停留时间很短(0.1~1 s),因此该方法是分离中药化学成分最温和的蒸馏方法,适合于高沸点、黏度大和热敏性中药化学成分的分离。

3. 电泳法

电泳法是根据带电荷的各化学成分在电场中迁移的差异进行分离的方法,如毛细管电泳、毛细管区带电泳、凝胶电泳、等电聚焦电泳等速电泳及束胶电动毛细管色谱、快速蛋白液相技术等,现已逐步在中药化学成分的分离、分析及鉴定中得到普遍应用。

4. 手性分离

手性是自然界的一种普遍现象,由于药物分子所作用的受体或靶点对与其结合的药物分子的空间立体构型有一定的要求,因此,对映体化学成分的物理化学性质基本相同,但在体内往往呈现很大的药效学、药动学等方面的差异。从中药中得到的化合物许多是单一的光学异构体,但也有许多化合物往往是对映体混杂在一起,影响结构鉴定、药效研究等结果,更不利于后续的新药开发。因此,具有不对称中心的有效成分必须分离得到单一的光学异构体,手性拆分异构体的研究已成为新的研究热点。手性拆分的方法主要方法有以下几种。

(1)结晶法。结晶法是利用手性异构体在手性溶剂中溶解度不同,或加入晶种等方法,使溶解度产生差异,用结晶的方式实现手性化合物拆分的方法,可分为有直接结晶法和间接结晶法。结晶拆分法是目前最常用也是最主要的方法,但存在操作烦琐、拆分收率低、拆分剂消耗大等缺点。

(2)化学法。化学法是广泛使用的一种方法,经典的化学拆分是利用手性试剂与外消旋体反应生成两个非对映异构体,再利用其物理性质的差异将其拆分。但此类方法存在收率较低、拆分剂消耗大及在拆分的化合物类型上受到限制等缺点。新近发展起来的包结拆分由于其拆分效率高、操作简单及适用条件广泛等优点而受到重视。包结拆分的基本原理是:手性主体化合物通过氢键或范德华力等化学相互作用而产生的性质差异达到拆分的目的,通过选择性地与一个对映体形成稳定的包结配合物析出来,从而实现了对映体的分离。

(3)色谱法。用色谱方法进行手性化合物的分离是近年来报道最多的方法,其原理是利用手性色谱柱进行分离。当手性异构体进入手性固定相的空穴中时,由于在不对称环境中的配

合性不同而达到分离。色谱分离法可分为间接法和直接法,间接法是让手性衍生化试剂与被分析组分反应,将对映体转变成非对映体后,利用其物化性质的不同在非手性固定相上进行分离,然后经化学转化得到纯对映体的;直接法则采用手性固定相(chiral stationary phase,CSP)和手性流动相添加剂进行分离,应用范围较广。常用的色谱方法有气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳色谱法、超临界流体色谱法、模拟流动床色谱等。

(4)膜法。通过膜分离进行旋光异构体的拆分是对生物过程的模拟,手性异构体通过膜的渗透是由其在膜中的分配行为和扩散速度来决定的。膜法拆分具有低成本、低能耗、连续不断运转模式和易于规模化等优点,具有很好的应用前景。目前膜法拆分已由缺乏稳定性和载体耗量大的手性液膜发展到选择性和稳定性均较高的聚合物膜拆分。

(5)酶法。因为酶的活性中心是一个不对称环境,有利于识别手性异构体,在一定条件下酶只能催化消旋体中的一个对映体发生反应成为不同的化合物,从而使两个对映体分开。酶拆分具有反应条件温和、催化效率高、专一性强的优点,适于大规模生产。酶固定化技术和多相反应器等新技术日趋成熟大大促进了酶拆分技术的发展。

第三节 中药有效成分的鉴定的一般程序

一、化合物的纯度判定

结构研究是中药化学的一项重要研究内容。在进行结构鉴定之前必须对化合物的纯度进行检验,以确定其为单一成分。纯度检查的方法很多,如检查有无均匀一致的晶型,有无明确、敏锐的熔点等,一般常采用色谱方法,如薄层色谱、纸色谱(PC)、气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)等。一般样品用三种展开系统进行检查均显示单一斑点,HPLC显示单峰,结晶样品的熔距小于 2°C ,液体样品的沸程在 5°C 以内,即认为是较纯的单体化学成分,可用于化合物的鉴定和结构测定。

1. 结晶形态和色泽

结晶化合物都有一定的晶形和均匀的色泽。结晶的形态往往随结晶的条件不同而不同,但1个纯化合物的结晶形态总是一致的,如果样品的结晶形状不一致,就可能不是1个纯化合物。结晶的色泽如果不均匀,并随着结晶次数增多色泽变浅,说明有杂质存在,需继续重结晶除去杂质,或用活性炭脱色。

2. 熔点和熔距

1个纯化合物一般都有一定的熔点和较小的熔距。纯化合物熔距很短,一般在 $0.5^{\circ}\text{C}\sim 1.0^{\circ}\text{C}$ 的范围内。如熔距过大,则表明可能存在杂质,需要进一步精制。

3. 沸点和沸程

液体化合物的沸点和沸程是判断其纯度的重要常数。纯化合物应有恒定的沸点,除高沸点物质外,沸程一般不应超过 5°C。

4. 色谱法

主要有薄层色谱(TLC)法、纸色谱(PC)法及聚酰胺薄膜色谱法。

(1)展开溶剂的选择最好用 3 种以上不同极性的展开系统展开,如三氯甲烷-甲醇、石油醚-乙酸乙酯和石油醚-丙酮等,分别展开后使目标成分的 R_f 值在 0.5 左右,并为单一圆形斑点才能证明化合物的纯度较好。有时对于同一种溶剂系统,也可以用 3 种不同极性的系统展开,一种极性的展开系统使目标组分的 R_f 值达到 0.5,另外两种极性的展开系统使目标组分的 R_f 值达到 0.8 和 0.2。其作用是检查有没有极性比目标组分更大或更小的杂质。

(2)显色方法的选择判断化合物纯度时用多种显色方法比较好,因为每种显色剂(不论是通用型显色剂,还是专属显色剂)在工作中都可能遇到不显色的化合物。一般先使用通用型显色剂,如香草醛-浓硫酸、10%硫酸乙醇液和碘蒸汽等检查;再根据组分可能含有的杂质情况,选用专属显色剂。

只有在多种显色剂下均为单一规则斑点,才能认为样品为薄层纯。如果有条件也可以采用多种色谱原理不同的薄层板(硅胶、氧化铝、聚酰胺、RP-8 或 18)检查。

TLC 法快速,操作简便,所用仪器便宜,因此应用最广泛。

(3) HPLC 或 GC 法 HPLC 或 GC 是判断物质纯度的重要方法,一般不要求选择多种色谱条件,色谱峰(除去溶剂峰或空气峰)若规则对称并且单一,说明样品的纯度较好。

二、结构研究方法

各种波谱学方法因其灵敏度高、化合物用量少,测定操作简单,已经成为中药中化学成分结构研究的主要手段。而经典的化学方法如化学降解、衍生物的合成等,所用的样品量大、工作量大而复杂,故应用渐少。化合物结构的确定通常首先测定各种波谱数据,获得尽可能多的结构信息,通过综合解析,同时与文献数据进行比较分析,并配合必要的化学手段来推断其化学结构。

(一) 红外光谱(IR)

有机化合物吸收一定能量的红外线后,使分子中各原子之间的化学键发生振动,从而产生了红外光谱。红外光谱在有机化合物结构鉴定中具有快速可靠、操作简便、样品用量少、可以回收等优点。

可通过标准品的图谱与样品图谱比较鉴定已知成分,从特征吸收峰鉴定未知成分的官能团。IR 横坐标常用波数表示(即 1cm 中的波长数),单位为 cm^{-1} ,纵坐标用百分透光率表示。红外光谱主要用来判断羟基、羰基、苯环和双键等特征官能团的存在。

测定样品可以是固态、液态和气态,红外光谱一般需用固态样品 1~2mg,待测样品的纯度要求较高且不含水,通常在真空干燥器中干燥 24 小时,再用以下几种方法处理后用红外分光

光度计测定。

1. 固体样品

可以采用溴化钾压片法、研糊法、液膜法、熔融法和溶液法。①溴化钾压片法:是固体样品最常用的方法。取 1~2mg 样品和约 200mg 溴化钾,在红外灯照射下(防止样品研磨过程中吸水)用玛瑙研钵研磨成颗粒均匀的粉末。压片时,注意要使空白片和样品片的透明度尽量好,并且一致。②研糊法:取 2~3mg 样品与 1~2 滴液体石蜡混合研磨一定时间,均匀涂抹在 2 块溴化钾制成的盐片之间,夹紧后测定。③液膜法:将适量样品溶于适当有机溶剂(易挥发)中,然后用滴管滴于溴化钾制成的盐片上,待溶剂挥发后形成一层薄膜,可检测。④熔融法:将样品置于盐片上,轻轻盖上另一块溴化钾制成的盐片,放入烘箱中徐徐加热(温度稍高于样品熔点),熔化后冷却至室温测定。⑤溶液法:将样品配制成一定浓度的溶液,用注射器注入吸收池内测定,该法可以消除多晶现象。

2. 液体样品

可用液膜法和溶液法。①液膜法:取一滴纯液体样品(特别是黏度较大的)置于溴化钾或氯化钠盐片上,然后盖上另一盐片,轻轻压紧测定。②溶液法:常用的有机溶剂以 CCl_4 和 CS_2 最好,也可采用分析纯的三氯甲烷、乙腈、苯、吡啶等。将样品配制成 5%~10% 的溶液,注入吸收池中测定。需注意溶剂本身的吸收带,避免对样品测定的干扰。用氟化钙或氯化银吸收池可以测定水溶液的红外光谱。

3. 气体样品

室温下将样品以负压吸入气体吸收池内即可测定。长光路吸收池可测定微量的气体样品。该法可以与气相色谱联用测定混合物中某成分的红外光谱。

(二)紫外光谱(UV)

紫外光谱使用的波长范围为 200~400nm,是以波长 λ 为横坐标、吸收值 A 为纵坐标的曲线,但一般用吸收峰的波长位置和摩尔吸收系数 ϵ 或其对数值表示。紫外光谱一般是 π 键电子跃迁产生,主要用来判断分子中的共轭体系,共轭链越长紫外吸收波长越大。

紫外光谱实验中要选择两个相匹配的石英比色皿。一般液层的厚度为 0.50、1.00、2.00cm 或 4.00cm,根据朗伯定律,需要提高测定的灵敏度时,可以选择厚度大的比色皿。所用的溶剂应使样品易溶且在测定波长范围内无吸收,常用乙醇、甲醇、水、正己烷和环己烷等,避免使用苯、醛和酮作溶剂。

如果是碱性成分可以用 0.1mol/L HCl 水溶液;酸性成分可以用 0.1mol/L NaOH 水溶液。再者空白溶液和样品溶液要一致。

(三)质谱(MS)

有机化合物经高温气化,在一定能量的轰击下发生电离,形成带电荷的离子(分子离子峰或碎片离子峰),加速后经磁场分离,按照一定的质荷比(m/z)顺序排列,通过检测器记录信号,所

得谱图称 MS 图。在 MS 中,横坐标以质荷比表示(m/z),纵坐标以相对强度表示。从 MS 中分子离子峰可以得到化合物的分子量,碎片离子峰可以得到化合物的结构单元及连接顺序信息。

MS 的灵敏度高、样品用量少,一般只需几微克到 0.1mg,样品的纯度要求高。实验操作时,取样品 0.01~1mg 加约 0.5ml 溶剂(样品易溶,极性最好)溶解,严禁使用氘代试剂溶解样品。

依据待测有机化合物可能的结构类型,选择合适的离子源。①EI-MS 法碎片信息丰富,利于推测化合物结构。适用于易挥发、热稳定性好的化合物。②FAB-MS 法利用氢、氙等中性高速原子轰击样品,可获得分子离子峰及主要碎片,适合分子量稍大($MW < 3000$)或难于气化的化合物如糖苷类、肽类的测定。常可获得分子中苷元、糖的结构碎片峰,产生 $[M+Na]^+$ 或 $[M+K]^+$ 峰。③ESI-MS 可适合大分子、小分子化合物结构分析,尤其适合分析极性强的的大分子有机化合物,可产生 $[M+1]^+$, $[M-1]^+$, $[M+Na]^+$ 或 $[M+K]^+$ 离子峰。

另外用高分辨质谱可以测出化合物的分子式,测定时务必提供化合物所含元素、原子个数或原子个数范围,其他事项同普通质谱法。

(四)核磁共振(NMR)

NMR 是有机化合物分子中的质子,如 1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 和 ^{31}P 等,在外加磁场中受到一定频率的电磁波照射后,原子核吸收一定的能量产生能级跃迁而发生的核磁共振,以吸收峰的频率对吸收强度作图获得 NMR 谱。图谱中峰的吸收位置常以化学位移(δ)表示。核磁共振氢谱(1H -NMR)可以提供有机化合物中各类复的信息,测定时仅需 2~5mg 样品。核磁共振碳谱(^{13}C -NMR)可直接提供化合物中碳的信息,测定时需要样品量为 2~100mg。测定 NMR 时,先将样品溶解于 0.5ml 不含氢的氘代溶剂中,再以四甲基硅烷为内标。常用氘代溶剂有甲醇、二甲亚碱、三氯甲烷、丙酮和重水等。

1. 1H -NMR

可以推导出化合物中的含氢官能团及所处的化学环境,其中用重水交换能够判断出分子中是否含有活泼氢(羧基、羟基和氨基等)。

(1)化学位移 δ 单位 ppm,一般 0~13ppm。氢质子核外电子云密度越低,化学位移值越大。分子中不同氢质子由于所处化学环境不同,即受诱导效应、共轭效应、氢键等因素的影响,信号峰会有不同的化学位移,也就是出现在氢谱中不同的位置,是鉴定成分结构的重要参数。

(2)偶合与裂分空间距离相近,磁不等同的质子,可以发生自旋偶合使共振峰发生分裂,形成二重峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)和多重峰(m)等。裂分峰之间的距离称为偶合常数,用符号 J 表示,单位是 Hz,一般 0~20Hz。从偶合常数和峰的分裂情况可以判断官能团所处的化学环境,一级图谱中峰的分裂符合 $n+1$ 规律,如甲基和亚甲基相连时甲基被分裂为三重峰,亚甲基被分裂为四重峰;和季碳相连时为单峰。

(3)峰面积表示吸收峰中所包含的最小氢的个数比。

2. ^{13}C -NMR

一般化合物碳吸收峰化学位移值(δ)在 0~230ppm 之间。 ^{13}C -NMR 谱可提供化合物结构中各种不同类型及化学环境的碳核化学位移。常用的 ^{13}C -NMR 测定技术介绍如下。

(1) 质子宽带去偶谱(proton broad band decoupling, BBD) 也称质子噪音((proton noisedecoupling spectrum)或全去偶谱(proton complete decoupling, COM)。该技术将化合物中所有质子与碳的偶合消除,每个不等价碳原子都会给出一个单峰,因而可获得分子中各个碳的精确化学位移值,有利于初步判断化合物碳的类型。

(2) 偏共振去偶谱(off-resonance decoupling) 可直接观察到各碳直接相连的质子数。在所得谱中次甲基(-CH)碳核呈双峰,亚甲基(-CH₂)呈三重峰,甲基(-CH₃)呈四重峰,季碳呈单峰强度最低。据此可获得碳所连接的质子数、偶合情况等信息。

(3) INEPT (低灵敏核极化转移增强法, insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) 用节弛豫时间(Δ)来调节 CH、CH₂、CH₃信号的强度,从而有效地识别 CH、CH₂、CH₃。当 $A=1/4J$ 时, CH、CH₂、CH₃ 皆为正峰;当 $\Delta=2/4J_{\text{CH}}$ 时,只有正的 CH 峰;当 $\Delta=3/4J_{\text{CH}}$ 时, CH、CH₃ 为正峰 CH₂ 为负峰。由此可区别 CH、CH₂、CH₃ 信号,再与质子宽带去偶谱对照,可以确定季碳信号。

(4) DEPT (极化转移增强法, distortionless enhancement by polarization transfer) INEP 的一种改进方法。在 DEPT 法中,通过改变照射¹H 的脉冲宽度(Θ),使为 45°、90°、135°变化并测定 ^{13}C -NMR 谱。即当 $\Theta=45^\circ$ 时,所有 CH、CH₂、CH₃ 均显正信号;当 $\Theta=90^\circ$ 时,仅显示 CH 正信号;当 $\Theta=135^\circ$ 时, CH 和 CH₃ 为正信号,而 CH₂ 为负信号。在 DEPT 谱中,季碳均无信号,但可与质子宽带去偶谱对照,确定碳信号是 CH₃、CH₂、CH 或是季碳。

3. 二维核磁共振谱(2D-NMR 谱)

二维化学位移相关谱(chemical shift correlation spectroscopy,COSY)在 2D-COSY 谱中最重要,是常用的一种测试技术。相关谱的二维坐标 F_1 、 F_2 都表示化学位移值,根据需要测定不同的二维图谱,可以更清楚、准确地反映出复杂分子结构中碳-氢、氢-氢原子之间的连接、偶合及空间信息。2D-COSY 谱又分为同核和异核相关谱两种,中药有效成分结构研究中常用的相关谱类型介绍如下。

(1) 氢-氢相关谱(¹H-¹H COSY) 用于测定氢-氢间相互偶合的二维图谱。相关谱上的横轴和纵轴均为氢信号的化学位移。沿对角形成的斑点称为对角峰,其他斑点称为相关峰。从相关峰出发,分别向横轴、纵轴引垂线,与两轴交叉处的氢信号表示有偶合关系。该法适用于复信号相对复杂,在 ¹H NMR 中不易观测的偶合关系的确定。

(2) 异核单量子相关谱(heteronuclear single-quantum correlation, HSQC) 把核和其直接相连的碳核关联起来,从而可以找到直接相连的氢和碳。它不能用来判断季碳。

(3) 异核多量子相关谱(heteronuclear multiple quantum correlation, HMQC) 是通过 ¹H 核检测的异核多量子相关谱,能反映 ¹H 核与其直接相连的 C 的关联关系,确定 C-H 偶合关系(J_{CH})。在 HMQC 谱中, F_1 域、 F_2 域分别为 ^{13}C 、¹H 化学位移值,直接相连的 C 与 ¹H 将在对应的 C 和

^1H 化学位移的交点处给出相关信号。由相关信号分别沿两轴画平行线就可将相连的 C 和 ^1H 信号予以直接归属。HMQC 是目前获得碳-氢直接连接信息最主要的手段之一。

(4) 异核多重键相关谱(heteronuclear multiple bond correlation, HMBC) 是通过 H 核检测相隔 2 个键(J_{CH})和相隔 3 个键(J_{CH})的碳氢之间的偶合。在 HMBC 谱中,通过碳-氢之间的远程偶合信息间接地获得碳和碳之间的连接信息、季碳的结构信息及因杂原子存在而被切断的偶合系统之间的结构信息,是结构鉴定中较为常用的测定方法。

(五) 旋光谱和圆二色谱

1. 旋光谱(optical rotatory dispersion, ORD)

许多天然化合物具有手性碳原子,能使偏振光的偏振平面发生旋转,这种现象称为旋光。以旋光度或摩尔旋光度为纵坐标,以平面偏振光的波长入为横坐标作图,得到的图谱即是旋光谱。旋光谱的谱形与手性化合物的分子结构有关,有平坦曲线和 cotton 效应的谱线。

分子中没有发色团的光学活性化合物,其旋光谱是平坦的(没有峰和谷),包括正性(相当于右旋)和负性(相当于左旋)两种谱线,但谱形的正负性与旋光值的正负无关。当分子手性中心邻近有发色团时,谱图中出现峰、谷的 S 形变化,称 cotton 效应。如在长波长处有谷、短波长处有峰则为负 cotton 效应;相反,在长波长处有峰、短波长处有谷则为正 cotton 效应。正、负 cotton 效应与靠近生色团的手性中心的构型有关。

2. 圆二色谱(circular dichroism spectrum, CD)

光学活性分子对左、右圆偏振光的吸收不同,使左、右圆偏振光透过后变成椭圆偏振光,这种现象称为圆二色性。以波长与摩尔吸光系数之差分别作为横、纵坐标,可获得圆二色光谱。旋光色散和圆二色散是同时产生的,它们包括同样的分子结构信息,即从 ORD 和 CD 的特征,可以得出相同的立体化学结构。

实验时选择样品溶解性好的溶剂,浓度大于 2mg/ml,溶液透明、色浅、无悬浮物、无沉淀。

第四节 中药有效成分含量测定方法

中药是指在中医药理论指导下认识和应用的药物,也是人们对我国传统药物的总称。中药除少数品种如青黛、冰片和阿胶等为人工制品外,大都是来自于植物、动物和矿物的非人工制品,并以植物来源为主,且种类繁多。中药材作为一种天然药物,其化学成分复杂,往往很难确定其有效成分的组成、含量、结构及物理化学性质,最终导致临床疗效不稳定。因此,运用现代的科学理论和技术,选择中药中具有生物活性的主要化学成分作为该中药的测定指标,建立定性鉴别和含量测定的方法,以此来控制中药材的质量具有实际意义。中药的含量测定就是测定其某类或某种成分的含量高低,以之作为判断该中药质量优劣的重要指标。为了确保

临床用药安全有效,应对中药进行含量测定。

一、化学对照品的选定与制备

药品检验用标准品和对照品系指用于鉴别、检查和含量测定的标准物质。2020年版《中国药典》(四部)的凡例规定,标准品、对照品(不包括色谱用的内标物质)均由国务院药品监督管理部门指定的单位制备、标定和供应。我国药品标准物质是国家颁布的药品标准使用的一种实物标准,其研制、标定、分装和发放的确认必须具有国家认可的合法程序。中国食品药品检定研究院标准物质与标准化研究所为我国药品标准物质管理、研究、制备、标定、审核、分发的唯一法定机构。

(一)化学对照品的选定

中药化学成分复杂,往往多种成分共同发挥临床疗效,因此,中药进行含量测定时,如何选取测定成分,确定测定所需的对照品是关键。在对中药进行质量控制时,应尽量选择与该中药临床疗效相一致的药效成分作为测定指标,进行含量测定。中药含量测定所需化学对照品的选定主要从以下几方面来考虑。

1. 测定有效成分

对于有效成分清楚,其药理作用与该味药的主治功能相一致的成分,应作为首选的含量测定指标。

2. 测定毒性成分

对于一些毒性中药,如千里光中含有吡咯里西啶类生物碱-阿多尼弗林碱(adonifoline),该类生物碱具有肝毒性,2020年版《中国药典》(一部)千里光项下规定对阿多尼弗林碱含量进行限量检查,将其作为质控指标之一,以保证临床用药安全。

3. 测定总成分

有效部位或指标性成分类别清楚的,可进行总成分的测定,如总黄酮、总生物碱、总皂苷、总有机酸和总挥发油等。

4. 对有效成分不明确的中药可采用以下几种方法:

(1)测定指标性成分即可选定药材的主要成分进行测定,指标性成分专属性要强,其含量高可代表药材的内在质量。

(2)测定浸出物溶剂的选择应具针对性,能达到控制质量的目的。选择溶剂有醚溶性、醇溶性和水溶性3部分。

5. 测定专属性成分被测成分应归属于某一药味,若为两味或两味以上药材所共有,则不应选为定量指标。如处方中同时含有黄连和黄柏,因二者均含有小檗碱,最好不选小檗碱作为定量指标。

6. 测定易损失的成分测定在制备、贮存过程中易损失的成分。如冰片中的挥发性成分。

7. 检测成分时要注意结合中医临床功能主治与现代药理学研究结果来共同确定。有时须选择总成分和某一单一成分分别测定,同时作为该中药含量测定的指标。

(二)化学对照品的制备

与其他化学对照品相比,中药化学对照品绝大多数从天然动、植物中提取分离得到。由于天然产物成分复杂,含量相对较低,提取得到一定数量的化合物有相当难度。大多无相应的国际对照物质和系统的文献资料,只能利用大量散在的原始文献资料。因此,中药化学对照品的制备除遵循一般化学对照品制备的原则外,还要对原料的提取及精制技术、结构鉴定、纯度分析方法进行细致的研究,以保证对照品质量的提高和品种增长的需求。

原料的选择是制备中药化学对照品首先要解决的问题。不同的原料其共存成分不同,所需成分的含量不同,会产生不同的分离效果和收率。中药化学对照品的来源有二、一是从动植物(主要是植物)材料中提取分离;二是化学合成。动植物的不同品种,不同采收时期,由于受遗传及生态环境的影响。化学成分含量会有很大的差异。对要选用的原料,事先要经过鉴定,确保所用原料的品种正确,所用品种的产地相对稳定。

在原料选定后,化学对照品制备方法大体为采用适合的溶剂进行提取,提取方法可用溶剂提取法然后采用适当方法进行浓缩、蒸馏和萃取,再采用适当方法进行分离,一般可用柱色谱进行分离,经一系列处理后可得到粗晶,再进一步分离,可得到纯化合物,最后对纯化合物进行纯度和结构鉴定。不同化学对照品其制备方法不一样,可参考文献制备方法。

(三)制备对照品的评价

备选对照物质的适用性评价需要综合应用多种分析方法进行评价,其评价工作分为鉴定和纯度测定两个主要内容。

1. 对照品的鉴定

中药化学对照品鉴定的目的就是验证其化学结构。对于新建立的品种,可以通过与已知物的 IR、NMR、MS 和 X-射线衍射谱的比较进行结构鉴定;对于无已知物比较或缺乏关于其性质的权威性资料的,就要采用鉴定新化合物的测试技术来进行鉴定工作。这些分析方法包括元素分析或高分辨质谱、NMR、IR、UV、晶体学研究以及其他必要的附加试验。

2. 对照品的纯度

中药化学对照品的纯度要求取决于它的使用目的。含量测定用对照品应符合相应检测对象所需纯度要求。用于中药材、中药饮片、中药提取物及中成药的紫外分光光度法、比色法、薄层扫描法、高效液相色谱法和气相色谱法等测定用,纯度应达到 98%以上;用于单一成分原料及其制剂的含量测定对照品,则被视同化学药品对照品对待,纯度要求在 99.5%以上,其中也包括色谱法中的内标物质。

二、提取物成分的含量测定

中药提取物是以中药为原料药,利用中药化学的提取分离技术,提取分离所获得的具有明确指标成分的单一组分或混合组分。在我国,中药提取物超过一百种,如传统中药提取物有人参提取物、甘草提取物、银杏叶提取物、连翘提取物和黄芩提取物等。2020 年版《中国药典》(一部)收录的提取物和植物油脂共有 47 种,比 2005 年版收录品种(31 种)显著增加。中药

提取物检测项目包括鉴别、检查和含量测定 3 个部分,其中含量测定是对中药提取物内在质量优劣控制的重要手段。根据提取物纯度不同,可以选取不同指标采取不同的方法进行测定。

(一)测定指标的选定

提取物含量测定按其纯度不同,测定指标的选择也各不相同。纯度达 95%以上的中药提取物,般选择单一化合物进行测定,如穿心莲内酯的含量测定,以穿心莲内酯化学对照品进行其含量测定。

提取物中含量较低的但为活性成分的,可以采用该活性成分进行测定。

提取物中有效成分不明确的,可以测定其主要成分或其他指标性成分;或作浸出物测定。2020 年版《中国药典》中浸出物测定分为水溶性浸出物测定、醇溶性浸出物测定和挥发性融浸出物测定。

(二)提取物含量测定

中药提取物含量通常采用的分析方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、薄层扫描法和紫外-可见分光光度法。

在含量测定之前,纯度不同的中药提取物,供试品的处理方法有较大区别。纯度高的单一成分中药提取物,只需经过简单前处理,有时直接采用适当的溶剂溶解后即可进行含量测定;而纯度不高,特别是含有多种组分的制剂,其样品前处理特别重要。

样品前处理一般使用超声提取法和索氏提取法。超声提取法由于其操作简便、快速,而且提取充分,已经广泛采用。固相萃取技术也是一种用途广泛而且日益受欢迎的样品前处理技术,它采用高效、高选择性的固定相,能显著减少溶剂用量,简化样品预处理过程,可很好地消除样品中杂质成分对检测的影响,提高检测的准确性,而且可以有效地延长仪器的使用寿命。

高效液相色谱法是目前应用最广的含量测定方法,其通过相应的检测器对中药提取物中的组分进行检测。大多数植物活性成分对紫外光有响应,因此在检测中紫外检测器应用最多。其他常用的检测器有蒸发光散射检测器、荧光检测器等。如银杏叶提取物中银杏内酯类成分,一些提取物中皂苷类成分、甾体类成分的检测可用蒸发光散射检测器进行检测;多环芳烃类物质可用荧光检测器进行检测。

气相色谱主要用于具有挥发性成分的检测,如芳香类化合物。如在 2020 年版《中国药典》(一部)中,薄荷素油中薄荷酮和薄荷脑的含量测定采用气相色谱法。

紫外-可见分光光度法测定快速,如岩白菜素的含量测定,采用紫外-可见分光光度法在 275nm 波长处进行含量测定。但如提取物纯度不高,需要前处理。有时也可以采用紫外-可见分光光度法测定提取物的总有效部位,如测定总黄酮、总生物碱的含量。

除此之外,尚可采用其他方法进行含量测定。如益母草流浸膏中盐酸水苏碱的含量测定,采用薄层扫描法。对于纯度较高的化合物提取物还可以采取经典的化学分析方法进行测定。如从小叶黄杨提取精制所得的环维黄杨星 D 采用非水滴定法进行测定。

第四章 中药化学各类成分的基本实验

第一节 色谱分析实验(薄层色谱、柱色谱)

一、薄层色谱

薄层色谱法是一种在色谱法中应用最广泛的方法,适用于微量样品的分离鉴定,具有分离速度快、效率高等特点。

(一)目的要求

学习和掌握硅胶薄层色谱板的制备方法。

(二)基本原理

薄层色谱是在薄层板上点样,在展开容器内用展开剂展开,使供试品所含成分分离,与适宜的对照物按同法所得色谱图对比,并可用薄层扫描仪进行扫描,用以样品的鉴别、杂质检查或含量测定。

薄层色谱按分离机制可分为吸附、分配、离子交换和凝胶过滤色谱等。通常使用的是吸附色谱,是将适宜的吸附剂或载体均匀涂布于玻璃板、塑料或铝基片上,形成薄层,利用吸附剂对化合物吸附能力的不同而达到分离。

固定相或载体有硅胶 GF₂₅₄、硅胶 G、硅胶 H、硅胶 HF₂₅₄、硅藻土、硅藻土 G、氧化铝、氧化铝 G、微晶纤维素和微晶纤维素 F₂₅₄ 等,常用的固定相为硅胶 GF₂₅₄ 和硅胶 G。薄层板制备一般可分为不含黏合剂和含黏合剂两种,前者系将固定相直接涂布于玻璃板上,而后者在固定相中加入一定量的黏合剂。

常用的黏合剂为羧甲基纤维素钠(CMC-Na),其配制成 0.3%~0.5%水溶液,与适量固定相混合后调成糊状,均匀涂布于玻璃板上;或用 10%~15%煅石膏(CaSO₄·2H₂O 在 140℃烘 4 小时),混匀后加水适量使用。

(三)实验方法

1. 薄层板制备

将玻璃板在排列盘中依次相邻放好,置涂布器于其中一端。除另有规定外,将 1 份固定相硅胶 H 和 3 份 CMC-Na 溶液在研钵中沿一方向研磨混合,去除表面的气泡后,倒入涂布器中,在玻板上平稳地移动涂布器进行涂布(厚度为 0.2~0.3mm)。取下涂好薄层的玻板,置水平台上于室温下晾干,后在 110℃烘 30 分钟,即置于有干燥剂的干燥箱中备用。使用前检查其均匀度(可通过透射光和反射光检视)。

2. 点样

取管口平整的专用毛细管吸取样品溶液,点样于上述制好的薄层板上,样品点的形状通常

为圆点状或窄细的条带状,在离薄层一端为 2cm 左右的起始线上,离板边约有 1cm 的距离,点的直径一般为 2~3mm,点与点之间的距离一般为 1.5cm 左右,以不影响检出为宜。点样时必须注意勿损伤薄层表面。

3. 展开

点样完毕,待溶剂挥干后,用相应展开剂上行展开。样品展开前,展开缸需预先用展开剂饱和,即先加入足够量的展开剂,并在壁上贴二条与缸一样高、宽的滤纸条,一端浸入展开剂中,密封 15~20 分钟,使展开剂气液状态平衡。而后迅速将薄层板斜放在盛有展开剂的层析槽内,使其与液面成 15°左右的夹角,点有样品的一端浸入溶剂中,深达 0.5cm 左右,切勿使溶剂浸没原点,盖好层析槽盖。当溶剂前沿展开至板的另一端 1cm 左右时,即可取出薄层板,标出溶剂前沿位置。

需要注意的是,若展开剂为水饱和有机试剂或展开剂组成复杂,最好同时进行薄层板的饱和,即在展开缸饱和后将薄层板先放置于双槽层析缸未加展开剂的一侧,饱和完成,小心地将展开剂倾倒在放有板的一侧,进行展开。

4. 显色

取出薄层板,立即喷洒显色试剂,使其显色,计算 R_f 值。必要时可使用加热板等加热设备,使薄层板显色明显。样品如果有荧光或遇某些试剂可激发荧光的物质,可在 365nm 紫外灯下观察荧光色谱。若物质在可见光下无色,但在紫外灯下有吸收,可选用带荧光剂的硅胶板(硅胶 GF₂₅₄ 板),在 254nm 紫外灯下观察荧光板面上的荧光淬灭物质形成的色谱。

二、柱色谱

(一)目的要求

1. 掌握硅胶色谱柱的填充方法。
2. 了解测定硅胶的活度及硅胶减活的方法。

(二)基本原理

柱色谱法是将色谱填料装填在色谱柱管内作固定相的色谱方法,根据色谱柱的尺寸、结构和制作方法的的不同,又可分为填充柱色谱和毛细管柱色谱。柱色谱常用的有吸附色谱和分配色谱两类。吸附色谱常用氧化铝和硅胶作固定相,而分配色谱中以硅胶、硅藻土和纤维素作为支持剂,以吸收较大量的液体作固定相,而支持剂本身不起分离作用。

吸附柱色谱为内径均匀、下端(带或不带活塞)缩口的硬质玻璃管,端口或活塞上部具有筛板或铺垫适量棉花,管内填入表面积很大、经过活化的多孔性或粉状固体吸附剂,除另有规定外,通常采用直径为 0.07~0.15mm 的颗粒。当洗脱剂洗脱时,由于不同化合物吸附能力不同,往下洗脱的速度也不同,于是形成了不同层次,即溶质在柱中自上而下按对吸附剂的亲和力大小分别形成若干色带,再用溶剂洗脱时,已经分开的溶质可以从柱上分别洗出收集;还可以将柱内洗脱剂流干,挤出吸附剂后按色带分割开,再用溶剂将各色带中的溶质萃取出来。

吸附剂的吸附能力用活度来衡量,活度可以分为五级(见表 4-1)。通常认为其与吸附剂、被吸附物质和能产生这种吸附的位置的个数有关。I 级活度最高,对硅胶来说可以在不超过 300°C 的温度下加热数小时达到,向其中加入适量的水可以进一步降低其活度到 I~V 级,可以用特定染料的色谱行为来判断吸附剂的活度等级。

表 4-1 硅胶的活度与含水量之间的关系

硅胶的含水量(重量百分比)	0	5	15	25	38
活度(依次降低)	I	II	III	IV	V

(三)实验方法

1. 硅胶活度的测定(见表 4-2)

(1)取一个 3mmx105mm 玻璃管,用棉花封住一端,从另一端向内加入待测活度的硅胶,同时轻敲玻璃管,使管内充满吸附剂。

(2)制备 0.02%~0.05% 的对二甲基氨基偶氮苯溶液。

(3)将上述溶液滴于棉花上,置玻璃管于一小试管中,用苯展开。

(4)当溶剂到达管的顶端时取出玻璃管,观察色带位置并计算染料 R_f 值。

(5)根据计算硅胶的活度。

表 4-2 硅胶活度的测定

染料比移值(R_f)	0.15	0.55	0.65
硅胶含水量(重量百分比)	0	12	15
活度	I	II	III

2. 硅胶的减活

(1)用上法测定所用硅胶的活度。

(2)根据硅胶的重量和要达到的活度计算减活所需加入水的体积。

(3)把水加入盛有硅胶的三角烧瓶中,密封,不时用力振摇。

(4)1 小时后测定减活后的硅胶的活度。

3. 硅胶柱的填装

(1)湿法装柱将脱脂棉或玻璃丝置于柱底部使形成一个松软的垫层,将吸附剂与洗脱剂混合,搅拌除去气泡,沿壁缓慢加入色谱柱中,倒入同时轻敲柱子外侧,使硅胶均匀沉降,下端打开活塞,保持洗脱剂流动状态,然后加入纯净洗脱剂使附着在管壁的吸附剂洗下,最后使色谱柱面平整。

(2)干法装柱将脱脂棉或玻璃丝置于柱底部使形成一个松软的垫层,将吸附剂一次加入色谱柱中,振动管壁使其均匀下沉(必要时可使用真空泵由下端抽气),然后沿管壁缓慢加入适量洗脱剂,缓慢打开活塞,使展开剂均匀润湿下沉,洗脱剂缓慢流出,最后使吸附剂完全润湿,操作

过程中应保持有充分的洗脱剂留在吸附剂的界面以上。

(四)思考与作业

- 1.为何在铺板之前,色谱用的玻璃板要完全洗净并干燥?
- 2.为何铺好的 TLC 板用前要在烘箱中干燥?
- 3.实验中我们总是尽量避免使流动相液面低于色谱柱中吸附剂的上端,为什么?

第二节 化合物的精制纯化(结晶、重结晶)

通常从中药材中分离得到的成分都有一定的结晶形态,当得到结晶型化合物时,所得化合物纯度较好。结晶过程本身可用于进一步分离纯化,但只有二者在溶解度上有明显差别时,方可根据化合物溶解度的不同用结晶法来达到目的。一般能结晶的化合物可得到单纯晶体,纯化合物的结晶有一定的熔点和结晶学特征,有利于判断化合物的性质,所以结晶法是研究分子结构的重要步骤。

由于初析出的结晶多少总会带有一些杂质,因此需要通过反复结晶,才能得到单一晶体,故此步骤称为复结晶或重结晶。有时植物中某一成分含量特别高,用合适的溶剂进行提取,提取液放冷或稍浓缩,便可得到结晶,这种例子屡见不鲜。

一、目的要求

1. 学习结晶和重结晶法提纯固体化合物的原理和方法。
2. 掌握抽滤、热滤操作和滤纸的折叠方法。
3. 了解重结晶时溶剂的选择。

二、基本原理

1. 结晶的条件

需要结晶的溶液,往往呈过饱和状态,然后在加温的情况下,使化合物溶解,过滤,除去不溶解的杂质,浓缩,放冷后析出,最合适的温度为 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ (若室温可析出晶体,则无须放入冰箱)。放置对形成结晶来说是一个重要条件,它可使溶剂自然挥发到适当的浓度即可析出结晶,特别在探索过程中,未知成分的结晶浓度很难预测。有时溶液太浓,黏度大就不易结晶,如果浓度适中,逐渐降温,有可能析出纯度较高的结晶,X-射线衍射用的单晶即采用此法。在结晶过程中溶液浓度高则析出结晶的速度快,颗粒较小,夹杂的杂质可能多些,有时自溶液中析出结晶的速度太快,超过化合物晶核的形成和分子定向排列的速度,往往只能得到无定形粉末。结晶过程和结晶条件的选择有时会花费很长时间,结晶的形状很多,常见为针状、柱状、棱柱状、板状、

片状、方晶、粒状、簇状及多边形棱柱状晶体等,结晶形状随结晶的条件不同而异。

2. 结晶溶剂的选择

选择合适的溶剂是形成结晶的关键,所选溶剂应具备以下条件:①不与被提纯物质发生化学反应;②高温时被提纯物溶解度较高,低温时只能溶解很少量;③杂质溶解度极大或极小(前者杂质将留在母液中不析出,后者杂质将在热过滤时被除去);④沸点不宜太高,也不宜太低,易挥发除去;⑤毒性小,便宜易得。

常用的结晶溶剂有甲醇、乙醇、丙酮和乙酸乙酯等,但所选溶剂的沸点应低于化合物的熔点以及结晶时的温度,以免受热分解变质或混入溶剂的结晶。不能选择适当的单一溶剂时可选用两种或两种以上溶剂组成的混合溶剂,要求低沸点溶剂对物质的溶解度大、高沸点溶剂对物质的溶解度小,这样在放置时,沸点低的溶剂较易挥发,而比例逐渐减少易达到过饱和状态,有利于结晶的形成。选择溶剂的沸点不宜太高,约在 60°C 左右,沸点太低溶剂损耗大,亦难以控制;太高则不易浓缩,同时不易除去。寻找合适的溶剂,一方面可参考同类型化合物的结晶条件,另一方面也可参考“相似相溶”的原则。如极性的羟基化合物易溶于甲醇、乙醇或水;多羟基化合物在水中比在甲醇中更易溶解;芳香族化合物易溶于苯和乙醚;杂环化合物可溶于醇,难溶于乙醚或石油醚;不易溶解于有机溶剂的化合物可用冰醋酸或吡啶。另外可用简单实验来选择合适的溶剂:取 0.1g 目标物质于一小试管中,滴加约 1ml 溶剂,加热至沸。若完全溶解,且冷却后能析出大量晶体,一般认为这种溶剂合适。如样品在冷时或热时,都能溶于 1ml 溶剂中,则这种溶剂不合适。若样品不溶于 1ml 沸腾溶剂中,再分批加入溶剂,每次加入 0.5ml,并加热至沸,总共用 3ml 热溶剂,而样品仍未溶解,这种溶剂也不合适。若样品溶于 3ml 以内的热溶剂中,冷却后仍无结晶析出,这种溶剂也不合适。如果难于选择一种适宜的溶剂,可考虑选用混合溶剂。混合溶剂一般由两种能互相溶解的溶剂组成,目标物质易溶于其中一种溶剂,而难溶于另一种溶剂。先将目标物质溶于易溶溶剂中,沸腾时趁热逐渐加入难溶的溶剂,至溶液变浑浊,再加入少许前一种溶剂或稍加热,溶液又变澄清。放置,冷却,使结晶析出。在此操作中,应维持溶液微沸。

在结晶或重结晶时要注意化合物是否和溶剂结合成加成物或含有结晶溶剂的化合物,有时也利用此性质使本来不易形成结晶的化合物得到结晶。

3. 制备结晶的方法

结晶形成过程包括晶核的形成与结晶的增长两步骤,因此选择适当的溶剂是形成晶核的关键。通常将化合物溶于适当溶剂中,过滤、浓缩至适当体积后,置三角瓶中塞紧瓶塞,静置。如果放置一段时间后没有结晶析出,可松动瓶塞,使溶剂自动挥发,可望得到结晶,或可加入少量晶种,加晶种是诱导晶核形成的有效手段。一般地说,结晶化过程具有高度的选择性,当加入

同种分子,结晶便会立即增长。如果是光学异构体的混合物,可依晶种性质优先析出的是其同种光学异构体。若没有晶种时,可用玻璃棒摩擦玻璃容器内壁,产生微小颗粒代替晶核,以诱导方式使形成结晶,或用玻璃棒蘸取过饱和液在空气中挥发除去部分溶剂后形成固体或结晶,再摩擦玻璃器壁产生晶核。另外采用降低温度及自然挥发等条件促使晶核的形成,对蛋白质等大分子物质可加有机可溶性盐类盐析。

4. 结晶的操作

首先筛选合适的溶剂,将化合物加热溶解,溶液趁热抽滤或过滤,以除去其中的不溶性杂质;有时在过滤之前加入少量活性炭脱色处理,然后将溶液适当浓缩,使所需的化合物达到饱和,而其中的可溶性杂质尚未饱和,将其静置放冷,使其中的有效成分大部分析出后,抽滤结晶,并用少量不溶性溶剂洗涤,抽干后即得所需化合物。

由于中药材中某些化合物含量非常少,故小量的物质的结晶或重结晶时均采用与该物质的量相适应的小容器。微量物质的结晶和重结晶可在小的离心管中进行。热溶液制备后立即离心,使不溶的杂质沉于管底,用吸管将上层清液移至另一个小的离心管中,令其结晶。结晶后,用离心的方法使晶体和母液分离。同时可在离心管中用小量的溶剂洗涤晶体,用离心的方法将溶剂与晶体分离。

5. 不易结晶或非晶体化合物

化合物不易结晶,一方面是本身的性质所决定,化合物本身就不能形成晶体的化合物,如烟碱等;另一种可能纯度不够(通常要求杂质在 5%以下),杂质含量较高引起。若是后者就需要进一步分离纯化,若是本身的性质,往往需要制备结晶性的衍生物或盐,然后用化学方法处理还原到原来的化合物,达到分离纯化的目的(见表 4-3)。

表 4-3 乙酰苯胺在水中的溶解度数据

T(°C)	20	25	50	80	100
S(g/mol)	0.46	0.56	0.84	3.45	5.50

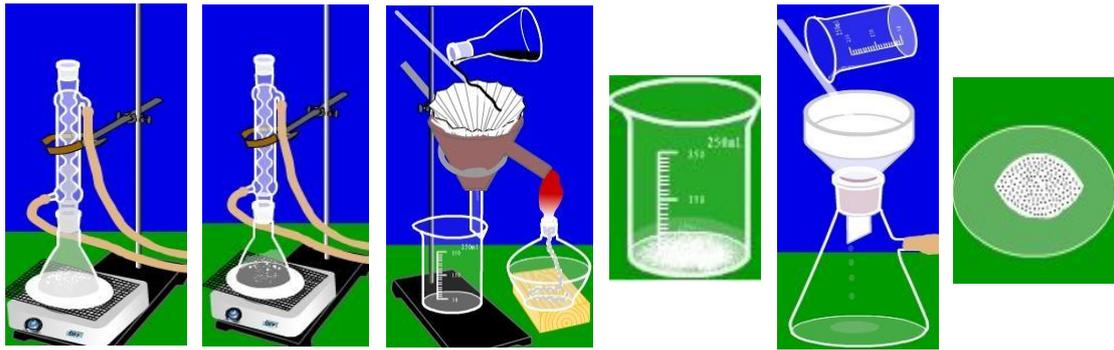
三、实验方法

1.称 2g 含乙酰苯胺粗品于 250ml 烧杯中,加入 40ml 蒸馏水,加热至沸腾使其溶解,再分次加水搅拌至乙酰苯胺全部溶解,再加入 20~30ml 的纯净水,并微沸 2~3 分钟,直到油状物质消失为止,稍冷,加少量活性炭吸附可能含有的色素,继续加热煮沸 5~10 分钟。

2. 溶液趁热在热过滤装置上使用扇形滤纸过滤,滤液用烧杯收集,滤毕,将烧杯放于冷水浴中冷却,使结晶完全析出,同时可借助玻璃棒搅拌促使结晶形成。

3.用抽滤瓶和布氏漏斗抽滤使结晶与母液分离,并用冷水洗涤结晶 3 次,抽滤至干后转移至滤纸上,置于表面皿凉干或烘干。

4.称重并计算产率,将纯乙酰苯胺倒入制定回收瓶中。



①加热溶解 ②脱色 ③趁热过滤 ④冷却析晶 ⑤抽滤结晶 ⑥结晶

四、注意事项:

1. 在固体样品溶解时,为减少样品遗留在母液中的损失,溶剂沸腾温度下溶解混合物,使之饱和并滴加溶剂保持微沸,直到混合物恰好溶解。但热过滤过程中,会因冷却而在漏斗中出现结晶,引起很大损失,故一般多加需要量 20%的溶剂。

2. 若热滤液中有奇异的颜色,应待溶液冷却后加入活性炭,沸煮 5 分钟左右脱色,然后趁热过滤。

3. 收集的热滤液要静置缓慢冷却,一般情况下不要急冻滤液,不然会形成表面积大、杂质吸附较多的结晶。

4. 活性炭要在溶液稍冷后放入,防止引起溶液暴沸。

5. 真空抽滤时,滤纸不应大于布氏漏斗底面;停止抽滤时应先将抽滤瓶与泵间橡皮连接管拆开,再关闭泵,防止水倒流入抽滤瓶内。

五、思考与作业

1. 某有机化合物进行重结晶,最适合的溶剂应该具有哪些性质?
2. 重结晶时,溶剂的用量为什么不能过量太多,也不能过少?
3. 为何活性炭要在固体物质完全溶解后加入?为何不能在溶液沸腾时加入?
4. 使用布氏漏斗过滤时,如果滤纸大于漏斗瓷孔面时,有什么影响?

第三节 中药中有效成分(黄酮类化合物)的提取、分离和鉴定

实验 4-3-1 槐花中黄酮类化合物的提取、分离和鉴定

一、实验目的的要求

学习黄酮类化合物的提取、分离和检识,通过实验要求:

1. 通过芸香苷提取与精制,掌握沸水提取黄酮类化合物的原理和操作。

2. 掌握由芸香苷水解制取槲皮素的方法。
3. 掌握黄酮苷和黄酮苷元的分离。
4. 掌握黄酮类化合物的主要性质及黄酮苷、苷元和糖部分的检识方法。

二、实验原理

由槐花中提取芸香苷的方法很多,本实验是根据芸香苷在冷水和热水中的溶解度差异的特性进行提取和精制,或根据芸香苷分子中具有酚羟基,显弱酸性,能与碱成盐而增大溶解度,以碱水为溶剂煮沸提取,其提取液加酸酸化后则芸香苷游离析出。

三、仪器设备

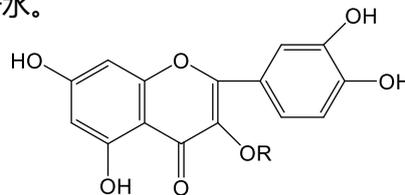
单口圆底烧瓶,冷凝管,铁架台,烧杯,电炉,烘箱,水浴锅,三角烧瓶,滤纸,微量抽滤器,布氏漏斗,试管,层析槽,石棉网,毛细管等。

四、相关知识点

槐花为豆科植物槐 *SopHora japonica* L. 的干燥花及花蕾,主要含芸香苷(芦丁),含量高达 12~20%,水解生成槲皮素、葡萄糖及鼠李糖。

芸香苷(rutoside),分子式 $C_{27}H_{30}O_{16}$,分子量 610.51,淡黄色针状结晶,mp.177~178°C。难溶于冷水(1:8000),略溶于热水(1:200),溶于热甲醇(1:7),冷甲醇(1:100),热乙醇(1:30),冷乙醇(1:650),难溶于乙酸乙酯、丙酮,不溶于苯、氯仿、乙醚、石油醚等,易溶于吡啶及稀碱液中。

槲皮素(quercetin),分子式 $C_{15}H_{10}O_7$,分子量 302.23,黄色针状结晶,mp.314°C(分解)。溶于热乙醇(1:23),冷乙醇(1:300),可溶于甲醇、丙酮、乙酸乙酯、冰醋酸、吡啶等,不溶于石油醚、苯、氯仿、乙醚中,几不溶于水。



芸香苷 R=—葡萄糖—鼠李糖

槲皮素 R=H

五、实验步骤

(一)芸香苷的提取(水提取法)

称取槐花米 50 克,置 1000ml 烧杯中,加沸水 800ml,加热保持微沸 1 小时趁热用棉花过滤,滤渣再加 600ml 水煮沸 1 小时,趁热过滤,合并 2 次滤液放置过夜,析出大量淡黄色沉淀,抽滤,沉淀用水洗 3~4 次,抽干置于空气中干燥即得粗芸香苷,称重计算得率。

(二)芸香苷的水解

称取芸香苷粗品 2 克,尽量研细,投入 500ml 圆底烧瓶中,加 2% H_2SO_4 溶液 150ml,接上冷凝管,直火加热煮沸 1.5 小时,滤取沉淀物(即苷元槲皮素),滤液保留以鉴定糖部分,槲皮素沉淀

经水洗涤抽干,自然干燥,称重并计算水解得率。

(三)芸香苷、槲皮素重结晶

称取芸香苷粗品 2 克,加甲醇 50ml,加热溶解,趁热过滤,滤液浓缩一半,放置析晶,过滤。滤液适当浓缩后放置,复析出结晶,滤取结晶。必要时结晶再用甲醇重结晶一次。取槲皮素全部,加适量 95%乙醇,同上法重结晶一次。

(四)芸香苷、槲皮素和糖的纸色谱鉴定

1. 点样:取新华一号色谱滤纸,规格 20cm×20cm,在滤纸下端约 2cm 处用铅笔画一直线,间隔 2cm 分别点上下列样品或标准溶液:

- (1)糖样品溶液(2)标准葡萄糖溶液
- (3)标准鼠李糖溶液(4)芸香苷样品甲醇溶液
- (5)芸香苷标准品溶液(6)槲皮素样品甲醇溶液
- (7)槲皮素标准品溶液

2. 展开剂:正丁醇-醋酸-水(4:1:5)上层上行展开。

3. 显色:展开完毕,将滤纸取出,记录溶剂前沿位置。待溶剂挥尽后,在(3)与(4)点之间剪开,分别显色。

(1)糖的显色:喷苯胺-邻苯二甲酸试剂,在 105°C 烘 10 分钟,显棕色斑点。计算并比较样品和标准品的 R_f 值。

(2)黄酮化合物的显色:

- ①可见光下观察色斑,紫外灯下观察荧光斑点。
- ②经氨气熏后再观察。
- ③待氨气挥尽后,喷 1% $AlCl_3$ 甲醇溶液,再观察。
- ④计算并比较样品与标准品的 R_f 值。

(五)芸香苷和槲皮素性质试验

1. 酸性试验:取小试管 8 支,每 4 支一组,第一组每管中加入芸香苷 1mg,第二组每管中加入槲皮素 1mg,每组四管中分别加入稀氨水、5% 碳酸氢钠水溶液、5% 碳酸钠水溶液、1% 氢氧化钠水溶液各 2ml,振摇后观察各管溶解情况。溶解的溶液应呈黄色。再加浓盐酸数滴酸化,黄色褪去或变浅,并有沉淀析出或产生浑浊。

2. Molish 反应:取试样 1mg 置小试管中,加乙醇 0.5ml 溶解,加 α -萘酚试剂 1~2 滴,摇匀。倾斜试管,沿管壁徐徐注入浓硫酸约 0.5ml 静置。观察两层溶液的界面变化,出现紫色环者为阳性,表示样品分子中含有糖的结构(糖和苷类均呈阳性反应),比较芸香苷和槲皮素的不同。

3. Fehling 试验:取试样数 mg,溶于 0.5ml 热水中,加斐林氏试剂甲、乙等量混合液 2ml,沸水浴上加热,如产生氧化亚铜的暗红色或黄色沉淀表示有还原糖或其它还原性物质。充分加热作用后滤去沉淀,滤液滴加浓盐酸酸化,在水浴上加热水解,水解液以 10% NaOH 中和,再进

行斐林氏试验,此时显阳性反应者表示样品为糖苷化合物。比较芸香苷和槲皮素的不同。

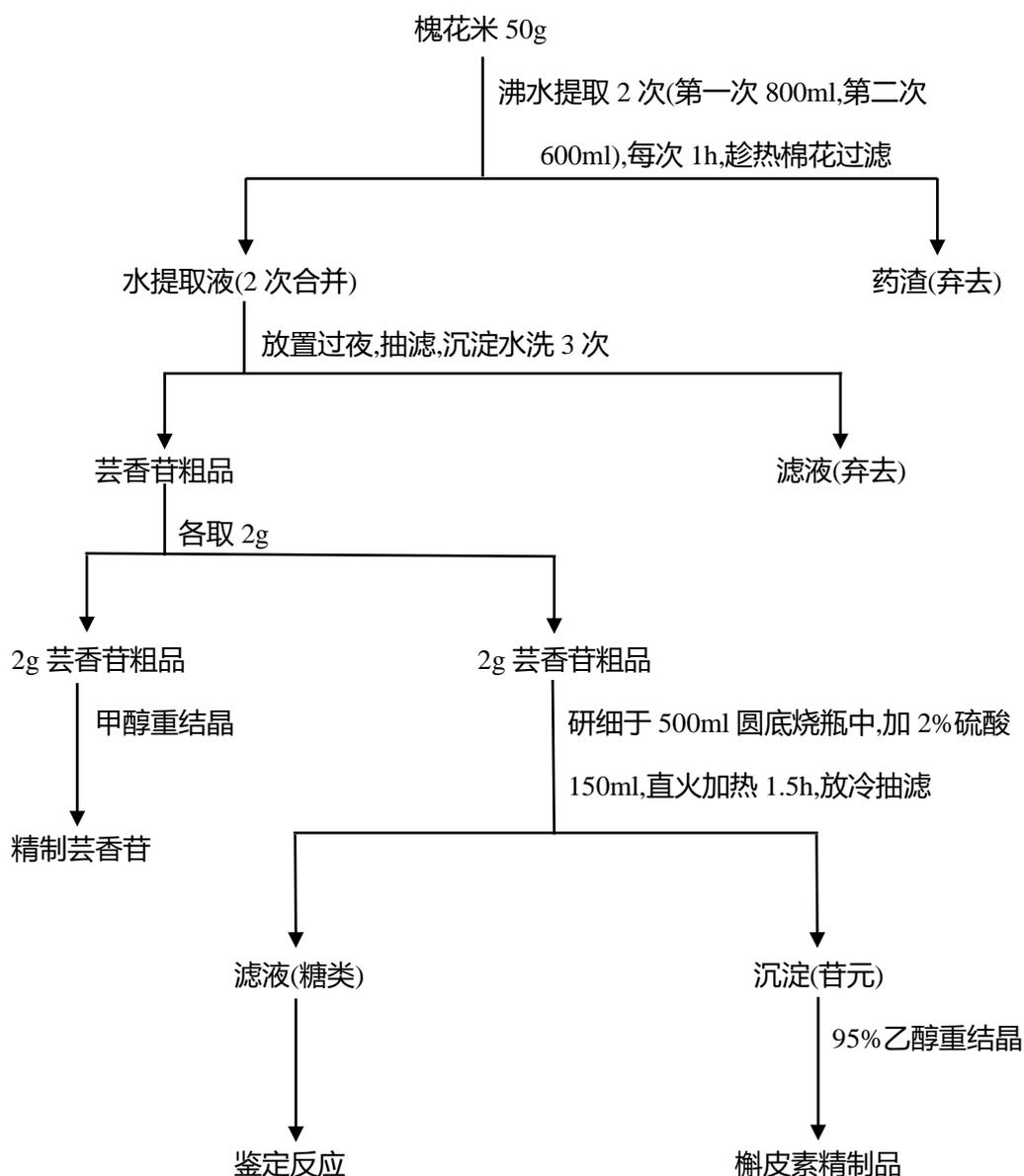
4. 盐酸-镁粉反应:取芸香苷 1mg,加乙醇 2ml,在水浴上加热溶解,加镁粉约 50mg,滴加数滴浓盐酸,溶液由黄色渐变红色者表示有黄酮类化合物。以同法试验槲皮素。

如用锌粉代替镁粉,则芸香苷(3-羟基与糖结合成苷)仍有作用,而槲皮素(黄酮醇类)不呈还原显色反应。因此可区别两者。

5. 锆-柠檬酸反应:取样品 1mg,加乙醇 2ml,在水浴上加热溶解,再加 2%二氯氧锆甲醇溶液 3~4 滴,凡有 3-羟基或 5-羟基的黄酮即呈鲜黄色。然后加 2%柠檬酸甲醇溶液 3~4 滴,有 3-羟基的黄酮黄色不褪。比较芸香苷和槲皮素的不同。

6. 三氯化铝反应:取样品 1mg 溶于甲醇中,加 1%三氯化铝甲醇溶液 2~3 滴,黄酮类呈鲜黄色,并有荧光。

(六)实验流程



六、实验报告要求

应包括原理描述、实验流程、数据记录、解决问题的能力、实验结果、实验效果及建议等。

七、思考题

1. 黄酮类化合物还有哪些提取方法？芸香苷的提取还可用什么方法？
2. 酸水解常用什么酸？为什么用硫酸比用盐酸水解后处理更方便？
3. 本实验中各种色谱的原理是什么？解释化合物结构与 R_f 值的关系。
4. 试讨论苷类成分的检识程序。

第四节 中药中有效成分(生物碱类化合物)的提取、分离和鉴定

实验 4-4-1 防己中生物碱的提取、分离和鉴定

一、实验目的要求

学习生物碱类成分的一般提取分离法,通过实验要求:

1. 掌握生物碱的溶剂提取法和粉防己碱与防己诺林碱的分离方法。
2. 熟悉生物碱的一般理化性质。
3. 熟悉粉防己碱和防己诺林碱的检识方法。
4. 掌握回流法、萃取法、结晶法等的基本操作过程及注意事项。

二、实验原理

本实验是根据粉防己碱和防己诺林碱游离时难溶于水,易溶于氯仿,成盐后易溶于水,难溶于氯仿的性质提取得到总生物碱。再利用两者在冷苯中的溶解度不同,使之相互分离。

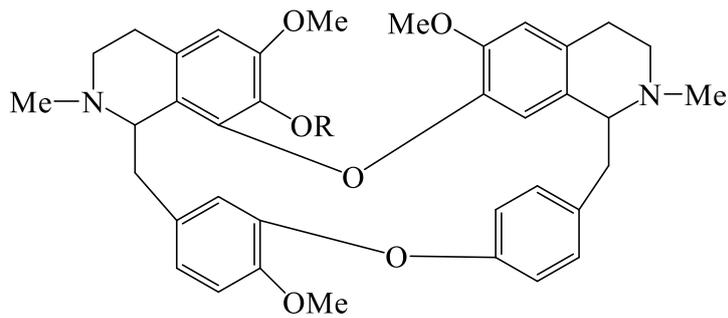
三、仪器设备

(单口,双口)圆底烧瓶,冷凝管,铁架台,分液漏斗,三角烧瓶,滤纸,微量抽滤器,布氏漏斗,层析槽,毛细管等。

四、相关知识点

防己为防己科植物粉防己(*Stephanandra tetrandra* S.Moore)的干燥根。总生物碱含量约为 1.5~2.3%,主要为粉防己碱和防己诺林碱。

1. 粉防己碱(tetrandrine),又称汉防己甲素,分子式 $C_{38}H_{42}N_2O_6$,在防己中的含量约为 1%,为无色针状结晶(乙醚),mp.217~218°C。易溶于甲醇、乙醇、丙酮、氯仿,溶于乙醚、苯等有机溶剂,几乎不溶于水和石油醚。



粉防己碱 R=CH₃

防己诺林碱 R=H

2. 防己诺林碱(fangchinoline),又称汉防己乙素,分子式 C₃₇H₄₀N₂O₆,在防己中的含量约为0.5%,六面体粒状结晶(丙酮), mp237~238°C。溶解度与粉防己碱相似,但因较粉防己碱多一个酚羟基,故极性较粉防己碱稍大,因此在冷苯中的溶解度小于粉防己碱,可利用此性质相互分离。

五、实验步骤

(一)总生物碱的提取

称取粉防己粗粉 150 克,置 1000ml 圆底烧瓶中,加 95%乙醇以浸透并盖没生药为度(约需 400ml)。水浴加热回流 1 小时(加热期间振摇数次),滤出提取液,药渣再加 95%乙醇以浸没为度(约需 300ml),如上法再热提一次,滤出提取液,最后将瓶内药渣倒在布氏漏斗上抽滤压干,药渣弃去。合并两次乙醇提取液,放冷后如有絮状物析出,再抽滤一次,澄清液回收乙醇,浓缩至糖浆状无乙醇味为止,得乙醇总提取物。

(二)生物碱的分离

1. 亲脂性生物碱和亲水性生物碱的分离

糖浆状总提取物移至大三角烧瓶中,逐渐加入 1%盐酸稀释,充分搅拌使生物碱溶解,不溶物呈树脂状析出,直至加水溶液不再发生混浊为止(约需 300ml),静置,倾出上清液,瓶底的树脂状杂质以 1%盐酸少量分次洗涤,直至洗液对生物碱沉淀试剂反应微弱时为止。

合并洗液和滤液,静置片刻,抽滤得澄清滤液,置 1000ml 三角烧瓶中,滴加浓氨水至 pH9 左右,此时亲脂性叔胺碱游离析出(如有发热现象,设法冷却),待溶液冷后,移至 1000ml 的分液漏斗中,加氯仿 150ml 振摇萃取。分取氯仿层,氨碱性水溶液再以新鲜氯仿萃取数次,每次用氯仿 100ml,直至氯仿抽提液的生物碱反应微弱时止(检查时取少量氯仿抽提液置表面皿上,待溶剂挥干,残留物中加稀盐酸数滴使溶解,再加生物碱沉淀试剂试之),合并氯仿液。

此氯仿液中含亲脂性叔胺碱,氯仿萃取过的氨碱性水溶液含亲水性季铵碱。后者取出少量,加盐酸酸化至 pH4~5,滴加雷氏铵盐饱和水溶液,观察有无沉淀出现。

2. 亲脂性碱中酚性和非酚性碱的分离

氯仿萃取液合并约(300~400ml)移至 1000ml 的分液漏斗中,以 2%氢氧化钠水溶液 40ml

一次,萃取 2 次,氯仿液再用水 20ml 一次,洗涤 2 次。分取氯仿层,加无水碳酸钾脱水干燥,过滤,滤液常压下回收氯仿。将氯仿全部蒸去,残留溶剂去瓶塞后挥干,得粗总非酚性生物碱。

2% 氢氧化钠提取液合并后取出少量,加盐酸酸化后进行生物碱反应。

附注:防己诺林碱虽有酚羟基但不溶于氢氧化钠水溶液中,因而和非酚性生物碱一起在氯仿层中。

3. 叔胺生物碱的纯化

在盛有非酚性生物碱的圆底烧瓶中,加丙酮加热溶解,过滤,用热丙酮洗涤滤纸,滤液、洗液合并,回收丙酮至适量,放冷,加塞静置待结晶析出。析出完全后抽滤收集。母液再浓缩重复收集,尚可得结晶。合并数次结晶即为粉防己碱和防己诺林碱的混合物。

4. 粉防己碱和防己诺林碱的分离

苯冷浸法:取上述结晶状混合物碱称重,置于 50ml 三角瓶中,加 5 倍量的苯冷浸,时时振摇,冷浸半小时后,过滤分开苯溶液和苯不溶物。

苯溶液回收苯至尽,残留物以丙酮重结晶,得细针状结晶,为粉防己碱。

苯不溶物待挥发去残留的苯后,也用丙酮重结晶,可得粒状结晶,为防己诺林碱。

(三)生物碱的一般鉴定方法

1. 沉淀反应

(1)碘化汞钾试验:取样品的稀酸水溶液 1ml,加碘化汞钾试剂(Mayer 试剂)1~2 滴,出现白色或类白色沉淀者为阳性反应,表示有生物碱存在。

(2)碘化铋钾试验:取样品的稀酸水溶液 1ml,加碘化铋钾试剂(Dragendorff 试剂)1~2 滴,出现棕黄至棕红色沉淀者为阳性反应,表示有生物碱存在。

(3)碘—碘化钾试验:取样品的稀酸水溶液 1ml,加碘—碘化钾试剂(Wagner 试剂)1~2 滴,生成褐色至暗褐色沉淀者为阳性反应,表示有生物碱存在。

(4)雷氏铵盐试验:取样品的稀酸水溶液(pH4~5)1ml,加雷氏铵盐试剂数滴,生成黄红色沉淀者为阳性反应,表示有生物碱存在。

(5)苦味酸试验:取样品的中性溶液 1ml,加苦味酸的饱和水溶液 1~2 滴,生成黄色沉淀者为阳性反应,表示有生物碱存在。

2. 薄层色谱

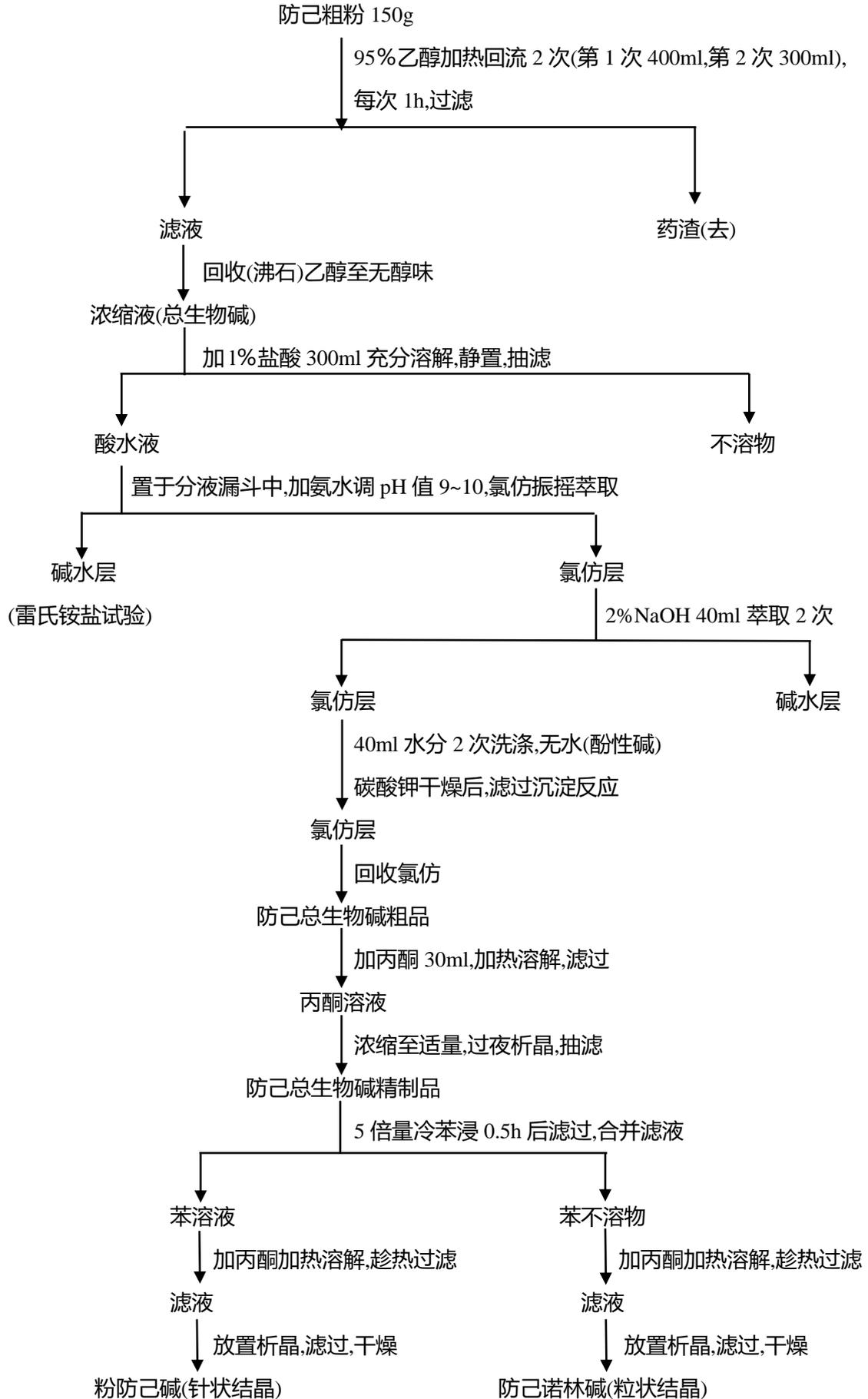
吸附剂:中性氧化铝(Ⅲ级)干法制版

样品:(1)粉防己碱(2)防己诺林碱(3)总提取物(均以氯仿溶解)

展开剂:氯仿-丙酮-苯(3:1:4)

显色剂:喷以改良碘化铋钾试剂(干法铺板显色时,要在溶剂未干前喷显色剂,否则氧化铝粉末易飞散,使薄层破坏)。

(四)实验流程



六、实验报告要求

应包括原理描述、实验流程、数据记录、解决问题的能力、实验结果、实验效果及建议等。

七、思考题

1. 粉防己碱和防己诺林碱在结构与性质上有何异同点? 实验过程中,应怎样利用它们的共性及个性进行提取分离? 请设计方案。
2. 分离水溶性与脂溶性生物碱的常用方法有哪些?
3. 从防己中分离脂溶性、水溶性碱、酚性、非酚性碱的依据是什么?
4. 萃取过程中怎样防止和消除乳化?
5. 生物碱的沉淀反应应在什么条件下进行,为什么?

第五节 中药中有效成分(蒽醌类化合物)的提取、分离和鉴定

实验 4-5-1 大黄中蒽醌的提取、分离和鉴定

一、实验目的要求

学习蒽醌类成分的一般提取分离法,通过实验要求:

1. 掌握两相酸水解提取大黄总羟基蒽醌苷元的方法。
2. 掌握 pH 梯度萃取法的原理及操作技术。
3. 熟悉缓冲液的配制方法、如何选择萃取剂及其用量。
4. 掌握大黄中蒽醌类化合物的理化性质和鉴定方法。
5. 了解大黄中蒽醌类成分的含量测定方法。

二、实验原理

1. 双相酸水解法,一相为酸水,另一相为与酸水不相溶的有机溶剂,加热回流水解的方法。由于大黄中的羟基蒽醌类化合物多以苷的形式存在,所以首先将蒽醌苷水解成苷元,利用游离苷元极性较小,溶于乙醚和三氯甲烷等亲脂性有机溶剂的性质,从水解物中将游离羟基蒽醌提取出来,通过双相酸水解法提取得到总蒽醌苷元。

2. 大黄中游离羟基蒽醌类成分由于结构中羧基、酚羟基和醇羟基数目及位置的不同而表现出不同程度的酸性。具有羧基或 2 个或 2 个以上的 β -酚羟基的蒽醌可溶于 5% 碳酸氢钠溶液;具有 1 个 β -酚羟基的蒽醌可溶于 5% 碳酸钠液;只具有 α -酚羟基的蒽醌,酸性弱,只溶于氢氧化钠溶液。根据此性质,采用 pH 梯度萃取法分离酸度不同的游离蒽醌类成分。

3. 利用游离蒽醌的极性不同,采用色谱法进行分离和鉴定。

三、仪器设备

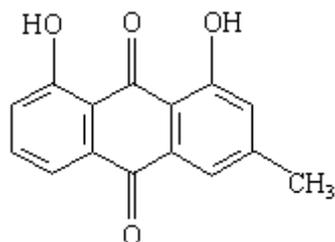
圆底烧瓶、烧杯、滴管、橡皮管、球形冷凝管、层析缸、标本瓶、索氏提取器一套、分液漏斗、布氏漏斗、抽滤瓶、普通滤纸、薄层板、喷雾器、广泛 pH 试纸。

四、相关知识点

大黄为泻下、清热解毒、活血化瘀中药,有“推陈致新”的作用。品种繁多,质优者为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum Palmatum* L.)。药用大黄(*Rheum officinale* Baill)和唐古特大黄(*R. tanguticum* Maxim ex Reg)的根。

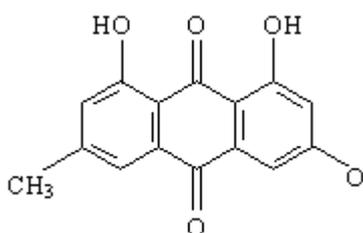
大黄中具有泻下作用的成分是几种蒽醌衍生物,其中苷是主要的成分,因其泻下作用常强于相应的苷元,苷元主要包括大黄酚、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素和大黄素甲醚共五种蒽醌苷元。大黄的致泻效力与其中的结合性大黄酸含量成正比。游离的蒽醌苷元几无致泻作用。具有较强的致泻作用的蒽醌苷有以下几种:大黄酚-1-葡萄糖苷、大黄素-6-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-葡萄糖苷、大黄酸-8-葡萄糖苷、大黄素甲醚葡萄糖苷、还含有蒽醌衍生物的双糖苷,如:大黄素双葡萄糖苷、芦荟大黄素双葡萄糖苷、大黄酚双葡萄糖苷以及番泻苷 A 和 B,番泻苷 C,番泻苷的泻下作用,较蒽醌苷为强,但含量远较后者为少。近年来,日本人西冈五夫从大黄中分离出四种新的大黄泻下成分,称大黄酸苷 A、B、C、D。除此外还含有大黄鞣酸及相关物质。如:没食子酸(一部分是游离的,一部分是结合成没食子酰葡萄糖苷),儿茶精,此类鞣质及相关物质有止泻作用与蒽醌衍生物的苷类之泻下作用恰恰相反。

1. 大黄酚(chrysopanol)



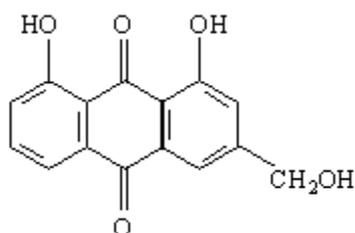
金黄色片状结晶, mp196°C(乙醇或苯),能升华,可溶于丙酮、醋酸、氯仿、甲醇、乙醇、热苯,微溶于石油醚、乙醚,不溶于水,NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 水溶液,可溶于 NaOH 溶液。

2. 大黄素(Emodin)



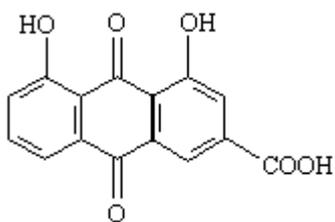
橙黄色针状结晶, mp256~257°C(乙醇或冰醋酸)能升华,其溶解度:乙醚 0.14%,苯 0.041%,氯仿 0.0718%,几不溶于水,易溶于乙醇,可溶于稀氨水,Na₂CO₃ 水溶液。大黄素具有抑制小鼠黑色瘤和小鼠乳腺癌的作用。

3. 芦荟大黄素(Aloeemodin)



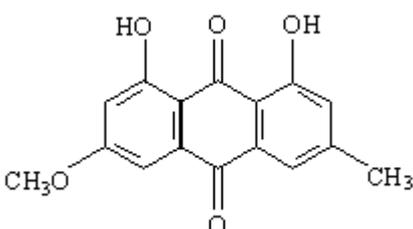
黄色针状结晶, mp223~224°C(甲苯)能升华,可溶于乙醚、苯、热乙醇、稀氨水、Na₂CO₃ 和 NaOH 水溶液。

4. 大黄酸(Rhein)



黄色针状结晶, mp321~322°C(升华)。不溶于水,能溶于吡啶、碳酸氢钠水溶液,微溶于乙醇、苯、氯仿、乙醚、石油醚。大黄酸对艾氏腹水癌有抑制作用。

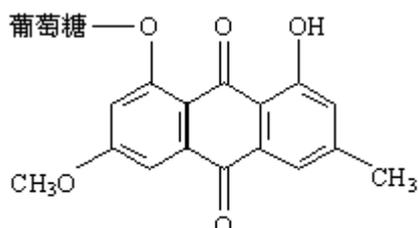
5. 大黄素甲醚(PHyscion)



红色针晶 mp206°C(苯)能升华。溶解性能似大黄酚。

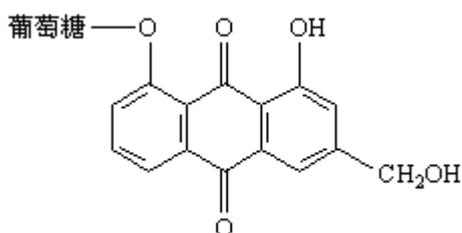
6. 羟基蒽醌苷类

①大黄素甲醚葡萄糖苷(PHyscion monoglucoside)



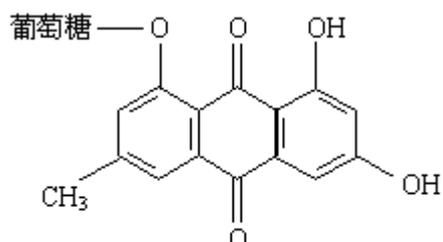
黄色针晶 mp235°C

②芦荟大黄素葡萄糖苷(Aloe-emodin monoglucoside)



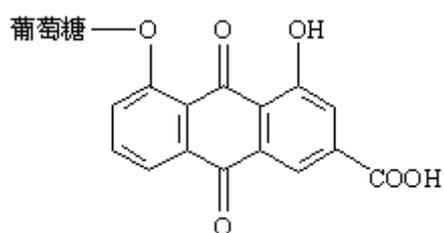
mp239°C

③大黄素葡萄糖苷(Emodin monoglucoside)



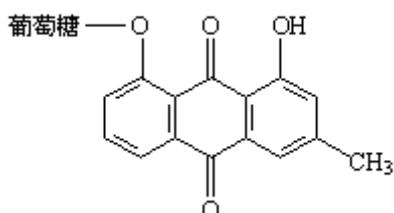
mp190~191°C浅黄色针晶

④大黄酸葡萄糖苷(Rhein monoglucoside)



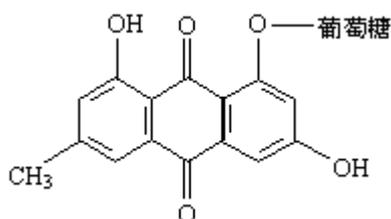
mp266~270°C

⑤大黄酚葡萄糖苷(Chrysophanol monoglucoside)



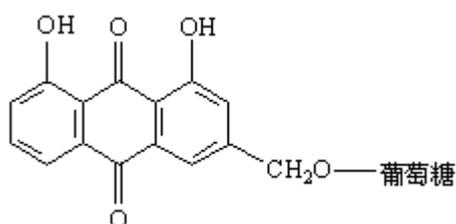
mp245~246°C

⑥大黄素-1-O-β-D-葡萄糖苷(1-O-β-D-glucopyranosyl emodin)



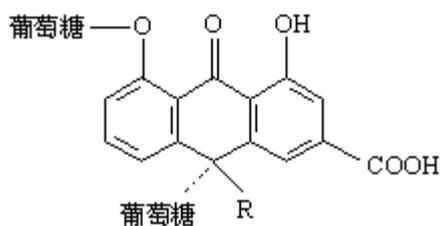
mp239~241°C

⑦芦荟大黄素-W-O-β-D-葡萄糖苷(W-O-β-D- glucopyranosyl aloe-emodin)



mp187~189°C

⑧大黄酸苷 A、B、C、D



大黄酸苷 A:R=OH

大黄酸苷 C:R=H



大黄酸苷 B:R=OH

大黄酸苷 D:R=H

本实验根据大黄中的蒽醌苷类在酸性条件下加热,可水解成游离羟基蒽醌和糖,而游离羟

基蒽醌不溶于水,可溶于乙醚、氯仿等亲脂性有机溶剂的性质,从水解物中将游离羟基蒽醌提出,再利用游离羟基蒽醌的酸性不同,采用 pH 梯度萃取法将其分离。也可利用游离蒽醌的极性不同,采用硅胶柱色谱方法进行分离。

五、实验步骤

(一)游离蒽醌的提取

称取大黄粗粉 50g,加 20% H_2SO_4 水溶液 150mL,在水浴上加热 3~4 小时,放冷,抽滤,滤饼水洗至近中性,抽滤,于 70°C 干燥后,研碎,置索氏提取器中,加入乙醚 150mL 回流提取 3-4 小时,得到乙醚提取液。

乙醚提取液经薄层层析检查有大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚和大黄酚。薄层板为硅胶—CNC 粘合板,展开剂为石油醚(60~90°C):乙酸乙酯(7:3)近水平或直立展开,在可见光下,可看到四个斑点。其中 $R_f=0.9$ 的黄色斑点为大黄酚和大黄素甲醚的混合物,在此条件下,不能分开,其余 3 个斑点依 R_f 值(由大到小)的顺序是大黄素(橙色斑点)、芦荟大黄素(黄色斑点)、大黄酸(黄色斑点)。

(二)PH 梯度萃取分离

(1)将乙醚提取液加入 250mL 分液漏斗中,以 40mL 2.5% NaHCO_3 水溶液萃取三次,乙醚层经薄层层析检查(薄层层析条件同上),提示乙醚提取液提出大黄酸后,合并三次 NaHCO_3 萃取液,用浓盐酸酸化,可得大黄酸沉淀。(注意:加酸时应缓慢加入,以防酸液溢出)

(2)经 2.5% NaHCO_3 水溶液萃取后的乙醚层,继以 2.5% NaHCO_3 水溶液萃取三次,每次 40mL,用薄层层析法检查乙醚层,结果说明已提尽大黄素后,合并三次 Na_2CO_3 萃取液,并酸化,得大黄素沉淀。(酸化时注意操作同前)经 2.5% Na_2CO_3 水溶液提取后的乙醚液,再以 2.5% Na_2CO_3 水溶液提取约四次,每次 30mL,经薄层检查,指示提尽芦荟大黄素,合并四次萃取液,酸化得芦荟大黄素沉淀。(酸化时操作注意同前)

(3)经 2.5% Na_2CO_3 水溶液萃取过后乙醚层以 2.5% NaOH 水溶液萃取至碱水层无色为止(约四次),每次 50mL,合并 NaOH 萃取液,酸化得沉淀。过滤、水洗至洗出液呈中性。低温干燥后溶于小体积石油醚中,作为柱层析的样品溶液,用薄层层析检查样品溶液有一个黄色斑点(为大黄酚和大黄素甲醚混合物的斑点),若改用下述纸层析条件可将两者分开。

纸层析条件:新华滤纸 7×20(cm)

展开剂:水饱和的石油醚(bp60~90°C)

展开方式:上行法

显色剂:4% NaOH 乙醇溶液

(三)用纤维素粉柱层析法分离大黄酚和大黄素甲醚。

(1)纤维素粉的制备:

将新华滤纸(或其边角纸屑)剪成小片,称取 15g,加入稀硝酸(每 100mL 水中加 65~68%的

硝酸 5mL)300mL,加热水解(约 2 小时),抽滤(G₃ 号耐酸漏斗),滤饼用蒸馏水洗至中性,再加少量乙醇、乙醚依次各洗涤一次,待挥发掉残存的乙醚后,低温烘干,粉碎,过 120 目筛备用。

(2)装柱:将纤维素粉约 8g,用水泡和石油醚(bp60~90°C)按湿法装柱。

(3)样品上柱:将样品溶液用移液管小心加入层析柱柱床顶端。

(4)洗脱:用水泡和石油醚(bp60~90°C)洗脱,分段收集,每份 10mL,分别浓缩,经纸层析检查(纸层析条件同上),相同者合并,分别收集大黄酚和大黄素甲醚。大黄酚用醋酸乙酯重结晶后测熔点。

(四)大黄酚的鉴定

(1)在薄层板上用点滴反应检查大黄酚对 NaOH, MgAc₂ 试液的反应。

(2)测定大黄酚的紫外光谱。

(3)用溴化钾压片法,测定大黄酚的红外光谱。

六、检识

1. 碱液试验:分别取蒽醌化合物结晶少许,置试管中,加 1ml 乙醇溶解,加数滴氢氧化钾试剂振摇,溶液呈红色;

2. 醋酸镁试验:分别取各蒽醌化合物结晶少许,置试管中,加 1ml 乙醇溶解,加数滴 0.5% 醋酸镁试剂,产生橙、红、紫等颜色。

七、思考题

1. 简述大黄中 5 种游离羟基蒽醌化合物的酸性与结构的关系。
2. pH 梯度萃取法的原理是什么? 如何利用该方法分离大黄中的 5 种游离羟基蒽醌化合物?

第六节 中药中有效成分(香豆素类化合物)的提取、分离和鉴定

实验 4-6-1 秦皮中七叶苷、七叶内酯的提取、分离和鉴定

一、实验目的要求

学习香豆素类成分的一般提取分离法,通过实验要求:

1. 掌握从秦皮中提取、分离七叶苷、七叶内酯的方法。
2. 熟悉七叶苷、七叶内酯的性质及鉴定法。

二、实验原理

根据七叶苷、七叶内酯均能溶于沸乙醇,可用沸乙醇将二者提取出来,再利用二者在乙酸乙酯中的溶解性不同而分离之。

三、仪器设备

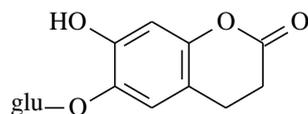
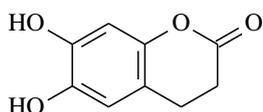
索氏提取器、紫外灯、试管、梨形分液漏斗、布氏漏斗、精制棉、循环水泵、旋转蒸发器、电热套、水浴锅。

四、相关知识点

秦皮为本樾科白蜡树属植物白蜡树 (*Fraxinus Chinensis* Poxb) 或苦沥白蜡树 (*F. rhynchophylla* Hance) 或小叶白蜡树 (*F. bungeana* DC) 的树皮, 味苦, 性微寒。具有清热、燥湿、收涩作用。主治温热痢疾、目赤肿瘤等症。

秦皮中含有多种内酯类成分及皂苷、鞣质等, 其中主要有七叶苷、七叶内酯、秦皮苷及秦皮素等。多有抗菌消炎的生理活性, 七叶内酯对细菌性痢疾、急性肠炎有较好治疗效果, 兼有退热作用, 毒付作用小, 几无苦味。适于小儿服用。

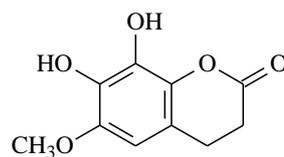
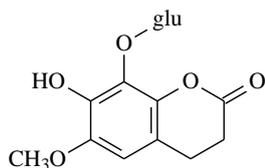
1. 七叶苷(esculin), 又叫马栗树皮苷: 白色粉末状结晶, mp205~206°C。易溶于热水(1:15), 可溶于乙醇(1:24), 微溶于冷水(1:610), 难溶于乙酸乙酯, 不溶于乙醚、氯仿。在稀酸中可水解。水溶液中有蓝色荧光。



七叶苷(esculin)七叶内酯(esculetin)

2. 七叶内酯(esculetin): 黄色针状结晶, mp276°C。易溶于沸乙醇及氢氧化钠溶液, 可溶于乙酸乙酯, 稍溶于沸水, 几不溶于乙醚、氯仿。

3. 秦皮苷(fraxin): mp205°C。



秦皮苷(fraxin)秦皮素(fraxetin)

4. 秦皮素(fraxetin): mp227~228°C。

五、实验步骤

(一)提取: 取秦皮粗粉 150g 于索氏提取器中, 加 400ml 乙醇回流 10-12 小时, 得乙醇提取液, 减压回收溶剂至浸膏状, 即得总提取物。

(二)分离: 在上述浸膏中加 40ml 水加热溶之。移入分液漏斗中, 以等体积氯仿萃取二次, 将氯仿萃取过的水层蒸去残留氯仿后加等积乙酸乙酯萃取二次, 合并乙酸乙酯液, 以无水硫酸钠脱水, 减压回收溶剂至干, 残留物溶于温热甲醇中, 浓缩至适量, 放置析晶, 即有黄色针状结晶析出。滤出结晶。甲醇、水反复重结晶, 即得七叶内酯。

将乙酸乙酯萃取过的水层浓缩至适量, 放置析晶, 即有微黄色晶体析出。滤出结晶。以甲

醇,水反复重结晶,即得七叶苷。

六、鉴定

1. 化学检识:

①三氯化铁反应:取七叶苷、七叶内酯各少许分别置试管中,加乙醇 1ml 溶解。加 1%FeCl₃ 溶液 2~3 滴,显暗绿色,再滴加浓氨水 3 滴,加水 6ml,日光下观察显深红色。

②荧光:取样品少量,加入乙醇 0.5ml,用毛细管滴于滤纸上,在 UV₂₅₄ 灯下观察。

③内酯的颜色反应:取样品量少许,加 0.5ml 乙醇溶液,加 10% 盐酸羟胺甲醇溶液数滴,10% 氢氧化钠 5~6 滴,水浴加热 2 分钟,放冷后加 5% 盐酸数滴(pH3~4),加 5% 三氯化铁 2~3 滴,观察颜色变化。

2. 薄层鉴定:

吸附剂:硅胶 G

样品:七叶苷、七叶内酯标准品及自制七叶苷、七叶内酯的醇溶液。

展开剂:甲醇-甲酸乙酯-甲苯(1:4:5)

显色:1)UV₂₅₄ 灯下观察,七叶苷为灰色荧光,七叶内酯为灰褐色。

2)以重氮化对硝基苯胺喷雾显色,七叶苷和七叶内酯均呈玛瑙色。

结果:七叶苷 R_f=0.04,七叶内酯 R_f=0.28

七、思考与作业

1. 从中药中提取分离香豆素有哪些方法?分离秦皮甲素和秦皮乙素的依据是什么?
2. 重结晶的过程中应该注意哪些问题?
3. 香豆素的内酯环有何性质?异羟肪酸铁反应机理如何?其主要用途是什么?香豆素的荧光有何特征?
4. 选择干燥剂的原则是什么?市售无水硫酸钠使用前是否要处理过?
5. 硅胶薄层色谱鉴别秦皮乙素、秦皮甲素时如何避免拖尾现象?

第七节 中药中有效成分(挥发油)的提取、分离和鉴定

实验 4-7-1 八角茴香油中强心苷类化合物的提取、分离和鉴定

一、实验目的要求

学习挥发油类成分的一般提取分离法,通过实验要求:

1. 掌握水蒸气蒸馏法提取挥发油的操作技术。
2. 熟练操作挥发油的一般检识及挥发油中固体成分的分离。
3. 熟悉挥发油中化学成分的薄层点滴定性检识。

二、实验原理

依据挥发油具有挥发性,能随水蒸气蒸馏的性质,利用水蒸气蒸馏法提取挥发油。本实验采用挥发油测定器提取。挥发油中各类成分的极性不相同:一般不含氧的化合物极性小,在薄层板上能被石油醚较好的展开;而含氧的衍生物极性较大,要用极性稍大的乙酸乙酯-石油醚混合溶液进行展开。为了使挥发油中的各种组分能在同一块薄层板上很好的分离,可采用单向二次色谱展开样品。

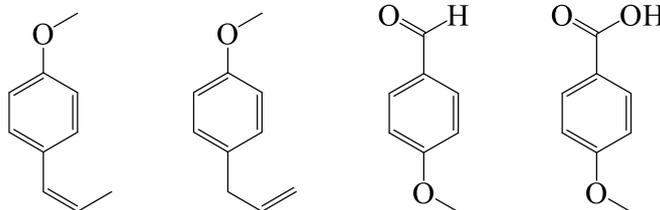
三、仪器设备

1. 实训仪器 挥发油测定器、烧瓶、冷凝管、硅胶薄层板、毛细管、硅胶 G 薄层板、紫外光灯(254nm)、层析缸(槽)等。

2. 实训药品及试剂 八角茴香粗粉、95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚、香草醛浓硫酸试剂、1%三氯化铁试剂、溴甲酚绿试剂、2,4-二硝基苯肼试剂、氨性硝酸银试剂、碱性高锰酸钾试剂等。

四、相关知识

八角茴香为木兰科植物八角茴香(*Illicium verum* Hook.f.)的干燥成熟果实。含挥发油 4%~9%,一般约 5%(果皮中较多)、脂肪油约 22%(主要存在于种子中)及蛋白质、树胶、树脂等。挥发油中主要成分是茴香醚,约为总挥发油的 80%~90%。此外,尚含少量甲基胡椒酚、茴香醛、茴香酸等。



茴香醚 甲基胡椒酚 茴香醛 茴香酸

茴香脑为茴香醚冷冻时析出的晶体,为白色结晶, mp21.4°C, bp235°C,可与乙醚、三氯甲烷混溶,能够溶于亲脂性有机溶剂,几乎不溶于水。

五、实验步骤

1. 挥发油的提取分离:

将八角茴香 40g,掰(剪)碎后,置挥发油测定器的烧瓶中,加适量的水使液面高度至烧瓶的 1/2 处。将挥发油测定器自上端加水使刻度部分灌满并溢流,连接好挥发油测定器,在铁架台上固定好。

用两根橡皮管分别接到冷凝管的入水端及出水端,与挥发油测定器连接好,固定在铁架台上。检查各接口是否连接紧密。先打开水龙头开关,再打开电热套的开关,启动实验。

缓缓加热至沸,30min 后,至测定器中油量不再增加,挥发油提取完全,关闭电热套,再关闭

水龙头开关。观察挥发油的量(挥发油测定器上有刻度线),放出测定器下段的水,取干净小瓶收集挥发油,备用。

2. 析脑

将所得的八角茴香油置冰箱中冷却 1 小时,即有白色结晶析出,趁冷滤过,用滤纸压干。结晶为茴香脑,滤液为析出茴香脑后的八角茴香油。

六、鉴定

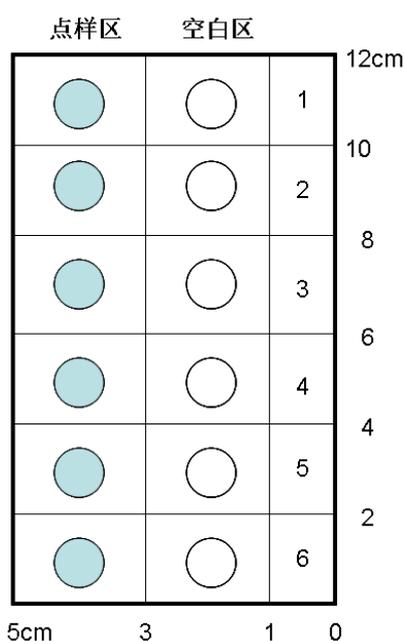
1. 挥发油一般检识

(1)芳香性嗅挥发油的气味。

(2)油斑试验取八角茴香油适量,滴于滤纸片上,常温下(或加热烘烤),观察油斑是否消失,滤纸上有无清晰的油迹,与菜油对照。

(3)不饱和性将挥发油滴入 0.5ml 溴的四氯化碳溶液中,溴褪色。

2. 薄层色谱板点滴反应



取硅胶薄层板(5cm×12cm)一块,在薄层板上打出格子。点样用的挥发油,用乙醇稀释成 5~10 倍的溶液,每个点样区域中心用毛细管重复点样 3~4 次,再用毛细滴管吸取不同的试剂分别点在竖排的每个小方格区域内,控制斑点的大小不要超格,每横排只点一种试剂,空白格点相同的试剂。立即观察每一方格内颜色的变化,推断挥发油中可能含有的化学基团。

检测试剂:

- 1.三氯化铁试液
- 2.0.05%溴酚蓝试液
- 3.氨性硝酸银试液
- 4.2,4-二硝基苯肼试剂
- 5.香草醛-浓硫酸试液
- 6.碱性高锰酸钾试液

3. 色谱检识八角茴香的单向二次薄层色谱检识

吸附剂:硅胶 G 薄层板(自制,120°C活化 1 小时)

展开剂:①石油醚-乙酸乙酯(85:15)②石油醚

显色剂:香草醛-浓硫酸试液

试样:样品八角茴香油、八角茴香脱脑油、茴香脑(自制)

对照品茴香醛/石油醚溶液(或其他相应对照品)

操作:分别将试样和对照品点于薄层色谱板上。首先用展开剂①展开至色谱板中段,取出,挥干溶剂;再用展开剂②展开至前沿,取出色谱板,挥干溶剂,喷显色剂,观察结果。

七、注意事项

1. 提取完毕,需待油水完全分层后,再将油放出。
2. 挥发油易挥发逸失,因此进行色谱检识时,操作应及时,不宜久放。
3. 喷洒香草醛-浓硫酸显色剂时(危险操作),应于通风橱进行操作。

八、思考与作业

1. 水蒸气蒸馏的流出液加入食盐的目的是什么?
2. 挥发油的通性有哪些?
3. 如何测定八角茴香油的含量?

第八节 中药中有效成分(三萜皂苷、强心苷)的提取、分离和鉴定

实验 4-8-1 黄花夹竹桃中强心苷类化合物的提取、分离和鉴定

一、实验目的要求

学习三萜皂苷、强心苷类成分的一般提取分离法,通过实验要求:

1. 了解利用中药材中共存酶进行酶解、提取强心苷类的方法。
2. 掌握强心苷类的一般提取、分离方法。
3. 掌握强心苷的鉴定和含量测定的方法。

二、实验原理

利用黄花夹竹桃果仁中的原生苷经酶解后产生次生苷,然后用甲醇提取次生苷。

三、仪器设备

索氏提取器、紫外灯、试管、梨形分液漏斗、布氏漏斗、精制棉、循环水泵、旋转蒸发器、电热套、水浴锅。

四、相关知识点

夹竹桃科植物黄花夹竹桃 *Thevetia peruviana*(Pers.)K.Schum.,产于我国南方各省,多见于公园、厂矿、行道绿化。其茎、叶、花朵都含有强心苷类成分,其果仁中含有多种强心苷,总强心苷含量达 8%左右,主要有黄夹苷甲、乙(ThevetinA,B)、次生苷为黄夹次苷甲、乙、丙、丁、单乙酰黄夹次苷乙。其中单乙酰黄夹次苷乙、黄夹次苷乙和黄夹次苷甲等的混合物,其强心效价比原来的多糖苷提高 5 倍左右,称为强心灵。

强心灵为白色结晶,无臭,味极苦,易溶于乙醇、甲醇、氯仿、丙酮,微溶于乙醚、水,不溶于苯及石油醚。有刺激粘膜、强心作用,主要用于治疗因心脏病引起的心力衰竭、阵发性室上性心动过速、阵发性心房纤颤等症。

五、实验步骤

(一)脱脂称取黄花夹竹桃果仁 30g,置研钵中研碎,装入滤纸筒中,然后放入索氏提取器中用石油醚(沸程 60~90°C)连续提取至脱脂完全。脱脂是否完全,可用滴管吸取索氏提取器中的石油醚,滴于滤纸上检查,若石油醚挥干后滤纸上不留油迹,表示脱脂完全,此时将脱脂果仁粉取出干燥,称重。

(二)酶解将脱脂粉置于三角烧瓶中,加 40°C的自来水适量至脱脂粉能完全润湿为止,再加入脱脂果仁粉重量的 2.5%的甲茱苯,振摇后加塞,在 35~40°C的恒温箱中酶解 24 小时,观察发酵物的颜色,检查发酵液的 pH 变化,并用 TLC 检查酶解前后成分变化情况。

方法:取脱脂果仁粉末少许加适量甲醇振摇数分钟,得甲醇提取液。另取少许发酵后的粉末加适量氯仿振摇数分钟,得氯仿提取液,将二提取液点于中性氧化铝(200~300 目 1 级)的薄层板上,用展开剂氯仿-甲醇(97:3)展开,用 Kedde 试剂显色检查。

(三)提取将发酵后的粉末加入 15 倍量 95%乙醇,振摇 10 分钟后用布氏漏斗过滤,残渣再用 5 倍量乙醇振摇提取,布氏漏斗过滤,抽干,残渣于布氏漏斗上用适量乙醇洗涤一次,合并乙醇,减压回收乙醇至脱脂粉末的 5 倍量体积,加脱脂粉末的 12.5 倍量水,放置,析出沉淀,过滤得粗品,干燥称重。

(四)精制取上述粗品,加相当粗品 40 倍量的 95%乙醇回流 10 分钟,稍放冷,加相当粗品量 16%的活性炭回流脱色 10 分钟,过滤,滤液减压浓缩至粗品 5 倍量的体积,再加入浓缩液 3 倍量的蒸馏水,放置,析出结晶,抽滤,结晶以少量乙醚洗涤,70°C干燥,称量,即得精制的黄夹苷。

(二)分离:在上述浸膏中加 40ml 水加热溶之。移入分液漏斗中,以等体积氯仿萃取二次,将氯仿萃取过的水层蒸去残留氯仿后加等积乙酸乙酯萃取二次,合并乙酸乙酯液,以

六、鉴定

1. 化学检识:

①Kedde 反应:取少量样品于小试管中,加 1ml 乙醇溶解后加入 4%NaOH 乙醇溶液 2 滴,再加作 2%3,5-二硝基苯甲酸甲醇溶液 2 滴,强心苷溶液呈紫红色。

②Baljet 反应:取少量样品于小试管中,加 1ml 乙醇溶解后加 1~2 滴碱性苦味酸试剂,放置 15 分钟,强心苷溶液呈橙红色。

③Keller-Killiani 反应:取少量样品于小试管中,加 0.5% FeCl₃的冰醋酸溶液 2ml 使之溶解,然后沿试管壁加入浓硫酸 1ml。观察现象,若有 α -去氧糖则两界面呈棕色,渐变为浅蓝色,最后冰醋酸层现蓝色。

2. 色谱鉴别

(1)纸色谱

①滤纸处理:取所需大小的层析滤纸均匀通过盛有甲酰胺-丙酮(3:7)的培养皿,然后吊置风干 15 分钟待用,(也可将浸透甲酰胺的滤纸条放于干净的普通滤纸中压干)。

②点样:取黄夹苷少许溶于 1ml 氯仿中用毛细管点于处理过的滤纸上。

③展开:将点样了的滤纸条置层析筒中,以甲酰胺饱和的二甲苯—甲乙酮(1:1)的上层液为展开剂,先用展开剂饱和半小时,然后上行展开约 20cm 左右时取出,纸条在空气中干燥后,置恒温箱 120°C 烤 1 小时或于电炉上烤至无白烟(除去纸上的甲酰胺),然后显色。

④显色剂:用 Kedde 试剂显色,试剂的组成为:2%的 3,5-二硝基苯甲酸乙醇液,5%NaOH 乙醇液。

(2)薄层色谱

薄层色谱取本品和黄夹苷标准品各 5mg,分别溶于 1ml 甲醇中,用毛细管分别点于硅胶 G 板上,用氯仿—甲醇(10:1)为展开剂展开,以硫酸—水(1:1)为显色剂,于 105°C 烘于 10 分钟。样品呈现与标准品 R_f 值相同的一些斑点,其中主要有三个斑点, R_f 值由小到大,依次为 a 黄夹次苷甲,b 黄夹次苷乙和 c 单乙酰黄夹次苷乙,其中以 b 含量最高,在 a 和 b 之间、b 和 c 间允许各有一个小而弱的强心苷斑点。靠近原点处,有时可以出现另一颜色较浅的斑点。除此之外,不应出现其他斑点。

3. 黄夹苷中各强心苷的测定

(1)标准曲线的制备精密称取干燥的黄夹苷标准品 12mg 左右,于 50ml 容量瓶中用乙醇溶解,并稀释到刻度,取 0.6, 0.9, 1.2,1.5,2.0ml 上述溶液,加乙醇至 2ml,再加 2ml2%的 3,5-二硝基苯甲酸的乙醇溶液、5ml150%乙醇,混匀,加 1ml1mol/L 的氢氧化钠溶液,在波长 500nm 测吸光度,待吸光度达最大时,记下读数;绘制吸光度与浓度曲线。

(2)测定方法精密称取 250mg 左右的黄夹苷样品,在 10ml 容量瓶中加氯仿溶解至刻度。

在氧化铝(200 目、III-IV 级)薄层上点加 20 微升上述溶液,以氯仿-甲醇(95:5)展开。然后于碘蒸气中显色,当色点显出,立即取出,划出三种主要成分的位置,在空气中挥去碘,用收集器将色点分别吸下,用 5ml 氯仿-甲醇(1:1)洗脱,洗脱液在水浴上蒸干,加 2ml95%乙醇,同前比色。由标准曲线求出浓度,计算含量。

七、思考与作业

1. 本实验提取的强心苷是否为原生苷,为什么?
2. 本实验为何要进行脱脂处理?
3. 分配层析有何优缺点?操作时应注意哪些问题?
4. 强心苷的酶水解有何特点?

第九节 多糖的提取、鉴定及除多糖方法(大枣和黄芪) 设计性试验

多糖(polysaccharide)是由单糖通过糖苷键结合形成的糖链,至少要超过 10 个的单糖组成

的聚合糖高分子碳水化合物,可用通式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 表示。由相同的单糖组成的多糖称为同多糖,如淀粉、纤维素和糖原;以不同的单糖组成的多糖称为杂多糖,如阿拉伯胶是由戊糖和半乳糖等组成。多糖亦可分为植物多糖(纤维素、淀粉、黏液质、果聚糖、树胶、人参多糖和黄芪多糖等)、菌类多糖(猪苓多糖、茯苓多糖和灵芝多糖)和动物多糖(肝素、透明质酸、硫酸软骨素和甲壳素)。多糖不是一种纯粹的化学物质,而是聚合程度不同的物质的混合物。多糖类一般不溶于水,无甜味,不能形成结晶,无还原性和变旋现象。多糖也是糖苷,可以水解,在水解过程中,往往产生一系列的中间产物,最终完全水解得到单糖。

大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。性温,味甘。具有补中益气,养血安神的功效。用于脾虚食少,乏力便溏,妇人脏躁。其含皂苷类、多糖类、有机酸类、生物碱类、黄酮类、维生素类、甾醇类、维生素类等成分。此外,大枣中尚含树脂、黏液质、香豆素类衍生物、鞣质、挥发油、13种氨基酸及钙、磷、铁和硒等36种微量元素。

黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *A. membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。性微温,味甘。具有补气升阳,固表止汗,利水消肿,生津养血,行滞通痹,托毒排脓,敛疮生肌之功效。用于气虚乏力,食少便溏,中气下陷,久泻脱肛,便血崩漏,表虚自汗,气虚水肿,内热消渴,久溃不敛。其主要含黄酮类、皂苷类、多糖类、氨基酸及微量元素等化学成分。其中黄芪多糖类(*astragalus polysaccharides*, APS)成分主要有葡聚糖和杂多糖。葡聚糖又分为水溶性葡聚糖和水不溶性葡聚糖;杂多糖多为水溶性酸性杂多糖,主要由葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖组成,少量含有糖醛酸由半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸组成,而有些杂多糖仅由葡萄糖和阿拉伯糖组成。

一、实验目的

1. 掌握多糖类成分的提取、纯化方法;多糖可水解得到单糖的性质和水解方法。
2. 熟悉多糖的性质和鉴别方法。

二、实验原理

利用多糖溶解性的差异进行提取和分离,根据多糖可发生水解得到单糖的性质提取制备单糖,并鉴定。

三、提取分离方法(参考)

1. 水提醇沉法以不同次数、不同量的水煮沸回流提取,过滤,合并滤液,减压浓缩,加入一定体积分数的乙醇或甲醇,静置,离心,去除上清液,真空干燥,得粗多糖。
2. 碱水提取法利用碱溶液对植物细胞起到破壁作用,促进内容物溶出。
3. 超声细胞粉碎提取法利用超声作用将组织细胞破碎,释放内容物,提高提取率。
4. 醇碱提取法利用碱溶液对植物细胞起到破壁作用和醇溶液较强的渗透作用,在碱与醇的共同作用下,增加多糖渗透率,降低多糖残留量,提高提取率。
5. 微波辅助提取法利用微波辐射后细胞内部温度迅速升高,其内压增加,细胞壁不断破裂,促进多糖等物质的溶出,同时产生的电磁场加速多糖等物质的热运动速率,缩短其向溶剂

面的扩散时间。

6. 纤维素酶法纤维素酶的功能是通过将细胞壁主要结构成分纤维素分解为还原糖,细胞壁破裂,有利于多糖的溶出,提高多糖的得率。

四、纯化分离方法(参考)

1. 分步沉淀法根据各种多糖在不同浓度的低级醇或丙酮中具有不同溶解度的性质,逐次按比例由小到大加入甲醇、乙醇或丙酮,收集不同浓度下析出的沉淀,经反复溶解与沉淀后,直到测得的物理常数恒定(最常用的是比旋光度测定或电泳检查)。这种方法适合于分离各种溶解度相差较大的多糖。

2. 盐析法在天然产物的水提液中,加入无机盐,使其达到一定浓度或饱和,促使有效成分在水中溶解度降低沉淀析出,与其他水溶性较大的杂质分离。常做盐析的无机盐有氯化钠、硫酸钠、硫酸镁和硫酸铵等。

3. 季铵盐沉淀法季铵盐及其氢氧化物是一类乳化剂,可与酸性糖形成不溶性沉淀,常用于酸性多糖的分离。通常季铵盐及其氢氧化物并不与中性多糖产生沉淀,但当溶液的 pH 增高或加入硼砂缓冲液使糖的酸度增高时,也会与中性多糖形成沉淀。常用的季铵盐有十六烷基三甲胺的溴化物(CTAB)及其氢氧化物(CTA-OH)和十六烷基吡啶(CP-OH)。

4. 纤维素柱色谱纤维素柱色谱对多糖的分离既有吸附色谱的性质,又具有分配色谱的性质。所用的洗脱剂是水和不同浓度乙醇的水溶液,流出柱的先后顺序通常是水溶性大的先出柱,水溶性差的最后出柱,与分级沉淀法正好相反。

5. 纤维素阴离子交换柱色谱最常见的交换剂为 DEAE-纤维素(硼酸型或碱型),洗脱剂可用不同浓度的碱溶液、硼砂溶液和盐溶液等。此方法目前最为常用。它一方面可纯化多糖,另一方面还适于分离各种酸性多糖、中性多糖和黏多糖。

6. 凝胶柱色谱凝胶柱色谱可将多糖按分子大小和形状不同分离开来。常用的凝胶有葡聚糖凝胶(sepHadex)、琼脂糖凝胶(sepHarose bio-gel A)和聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide bio-gel P)等;常用的洗脱剂是各种浓度的盐溶液及缓冲液,但它们的离子强度最好不低于 0.02。出柱的顺序是大分子的先出柱,小分子的后出柱。由于糖分子与凝胶间的相互作用,洗脱液的体积与蛋白质的分离有很大的差别。在多糖分离时,通常是用孔隙小的凝胶如 sepHadex G-25、G-50 等先脱去多糖中的无机盐及小分子化合物,然后再用孔隙大的凝胶 sepHadex G-200 等进行分离。

7. 超滤法选择合适截留分子量的膜,利用超滤膜对多糖和杂质的截留性不同进行分离。

五、蛋白去除方法(参考)

1. Sevag 法根据蛋白质在三氯甲烷等有机溶剂中变性而不溶于水的特点,将多糖水溶液、三氯甲烷和戊醇(或正丁醇)调为一定比例,混合物剧烈振摇,蛋白质与三氯甲烷-戊醇(或正丁醇)生产凝胶物而分离。

2. 盐析法蛋白质在水溶液中的溶解度是由蛋白质周围亲水基团与水形成水化膜的程度,

以及蛋白质分子带有电荷的情况决定的。当用中性盐加入蛋白质溶液,中性盐对水分子的亲和力大于蛋白质,于是蛋白质分子周围的水化膜层减弱乃至消失。同时,中性盐加入蛋白质溶液后,由于离子强度发生改变,蛋白质表面电荷大量被中和,更加导致蛋白溶解度降低,使蛋白质分子之间聚集而沉淀。

3. 金属络合法甲乙两种斐林试剂混合在一起,里面的铜离子在碱性条件下产生络合状态的铜离子,这样的铜离子可以和蛋白质结合产生沉淀。

4. 酶法在粗多糖溶液中加入一定量的木瓜蛋白酶,在 60°C 水浴一定时间,然后在 100°C 下水浴 3 分钟灭酶,最后加入 TCA 去除游离蛋白。

5. 盐酸法利用盐酸能使蛋白变性沉淀,除去蛋白。样品浓缩液,加 2mol/L 盐酸调 pH 至 3,放置,离心,弃去蛋白。

6. 三氯乙酸(TCA)法向粗多糖水溶液加入 5%~30%三氯乙酸,直至溶液不再继续混浊为止,在 5°C~10°C 放置过夜,离心去除蛋白。

7. 三氟三氯乙烷法利用三氟三氯乙烷使蛋白变性沉淀,除去蛋白。多糖溶液与三氟三氯乙烷等体积混合,低温下搅拌 10 分钟,离心水层,水层继续用上述方法处理几次。

8. 阳离子交换树脂法利用蛋白质带有电荷,能被交换到离子交换树脂上,达到去除蛋白、纯化多糖效果。

六、鉴定方法(参考)

1. 纯度鉴定常用的纯度鉴定方法有超离心、比旋光度测定、高压电泳、凝胶色谱和高效液相色谱等。

2. 含量测定

(1)苯酚-浓硫酸法

苯酚-浓硫酸法是目前多糖的含量测定的主要方法之一。该法是糖在浓硫酸作用下,脱水生成呋喃环结构的糠醛及其衍生物,能与苯酚缩合成一种橙红色化合物,在 10~100mg 范围内其颜色深浅与糖的含量成正比,且在波长 485nm 下有特征吸收峰,故可用比色法在此波长下测定。苯酚-硫酸法主要用于甲基化的糖、戊糖和多聚糖的测定。

(2)蒽酮-浓硫酸法

蒽酮-浓硫酸法测定多糖具有很高灵敏度,适用于糖的微量测定,且试剂简单,操作简便,因而得到普遍应用。蒽酮-浓硫酸法是糖类(包括单糖、双糖和寡糖)在浓硫酸作用下,脱水生成呋喃环结构的糠醛或羟甲基糠醛,然后蒽酮与糠醛或羟甲基糠醛经脱水缩合,生成蓝绿色的糠醛衍生物,颜色深浅与糖浓度成正相关,且在波长 625nm 下有特征吸收峰,故可用比色法在此波长下测定。

(3)DDS 法(3,5-二硝基水杨酸法)

DDS 法(3,5-二硝基水杨酸法)测定多糖是 3,5-二硝基水杨酸与多糖还原产物还原糖共热后,被还原成棕红色的氨基化合物,在一定范围内,还原糖的量和反应液颜色深浅成比例关系,

且在波长 540nm 下有特征吸收峰。以葡萄糖为对照品,含糖量控制在 100~400 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内,用分光光度法可测知样品的含糖量。该方法为半微量定糖法,操作简便,快速,较少受其他杂质干扰。

(4)碘量法(水解后用碘量法)

多糖含量的测定多采用间接碘量法。样品经处理后,糖类(包括单糖、双糖和寡糖)在浓硫酸作用下,脱水生成呋喃环结构的糠醛或羟甲基糠醛;取一定量样液于碘量瓶中,加入过量的碘液和过量的氢氧化钠溶液,样液中的醛糖在碱性条件下被碘氧化为醛糖酸钠,由于反应液中碘和氢氧化钠都是过量的,两者作用生成次碘酸钠残留在反应液中,当加入盐酸使反应液呈酸性时,析出碘;用硫代硫酸钠标准溶液滴定析出的碘,至近终点时,加淀粉指示液 2ml,继续滴定至蓝色消失,并同时作空白试验校正,则可计算出氧化醛糖消耗的碘量,从而计算出样液中多糖的含量。

3. 组成分析将多糖链水解为单糖,是分析多糖链组成成分的主要手段。水解法包括完全酸水解、部分酸水解、乙酰解和甲醇解等。一般呋喃糖苷键较吡喃型易水解, α 型较 β 型易水解,含有糖醛酸或氨基糖的多糖不易水解。水解试剂的不同会影响水解条件。水解之后生成的单糖混合物经中和、过滤,可采用纸色谱(PC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱法(GC)、液相色谱法(HPLC)和离子色谱法进行分析。高碘酸氧化和 Smith 降解是分析多糖结构的经典方法。

七、去除多糖方法(参考)

1. 醇沉法多糖水提液经适当浓缩后,加入数倍量的乙醇,振摇,放置,多糖沉淀。

2. 盐析法在天然产物的水提液中,加入无机盐,使其达到一定浓度或饱和,促使有效成分在水中溶解度降低沉淀析出,与其他水溶性较大的杂质分离。常做盐析的无机盐的有氯化钠、硫酸钠、硫酸镁、硫酸等。

3. 季铵盐沉淀法季铵盐及其氢氧化物是一类乳化剂,可与酸性糖形成不溶性沉淀,常用于酸性多糖的分离。通常季铵盐及其氢氧化物并不与中性多糖产生沉淀,但当溶液的 pH 增高或加入硼砂缓冲液使糖的酸度增高时,也会与中性多糖形成沉淀。常用的季铵盐有十六烷基三甲胺的溴化物(CTAB)及其氢氧化物(CTA-OH)和十六烷基吡啶(CP-OH)。

4. 凝胶色谱法凝胶柱色谱可将多糖按分子大小和形状不同分离开来。常用的凝胶有葡聚糖凝胶(sepHadex)、琼脂糖凝胶(sepHarose bio-gel A)、聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide bio-gel P)等;常用的洗脱剂是各种浓度的盐溶液及缓冲液。

5. 超滤法选择合适截留分子量的膜,利用超滤膜对多糖和杂质的截留性不同进行去除。

八、思考与作业

1. 多糖的提取分离方法有哪些?
2. 多糖的鉴别方法有哪些?
3. 简述多糖类成分研究的一般程序。

第十节 中药化学成分系统预试验

一、简介

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有哪些类型的化学成分。利用各类成分的颜色反应和沉淀反应,对中药的提取液进行检查可以初步判断其中的化学成分。由于提取液的颜色通常较深,影响对颜色变化的观察,可以使用薄层色谱(TLC)或纸色谱(PC)等方法对中药的提取液进行初步分离,再进一步检查。

二、实验目的

掌握未知成分的中药是怎样初步提取分离,熟悉各主要成分的试管试验、沉淀反应和纸色谱、薄层色谱的方法并根据试验结果判断含有什么类型的化学成分。

三、实验步骤

利用不同成分在各种溶剂中溶解度的不同,一般可采用以下 3 种溶剂分别提取,试验。

1. 水浸液

取中药粗粉 5g 加水 60ml,在 50~60°C的水浴上加热 1 小时,过滤,滤液做下列试验(见表 10-1)。

表 10-1 水浸液中成分检查

检查项目	试剂名称
糖	*1.酚醛缩合反应 *2.菲林试剂
有机酸	Δ 1.pH 试纸 Δ 2.溴甲酚蓝试剂
酚类	Δ 1%FeCl ₃ 试剂
鞣质	Δ 1.1%FeCl ₃ 试剂*2.明胶试剂
氨基酸	Δ 茚三酮试剂
蛋白质	*双缩脲反应
苷类或多糖	*1.酚醛缩合反应 *2.菲林试剂 *3.6mol/LHCl 酸化,加热煮沸数分钟,冷却后观察有无絮状沉淀。
皂苷	*泡沫试验
生物碱	*1.碘化铋钾试剂 *2.硅钨酸试剂

*在试管中反应, Δ 在滤纸或硅胶 CMC-Na 薄层板上试验(以下相同)。

2. 乙醇提取液

取中药粗粉 10g,加 5~12 倍的 95%乙醇,在水浴上加热回流 1 小时,过滤,滤液留 2ml 做①项实验(见表 10-2),其余浓缩成浸膏。浸膏分为两部分,一部分加少量 2%HCl 过滤。分出酸液,作②项试验(见表 10-3),附于滤纸上的残渣再加少量乙醇溶解,做③项试验(见表 10-4);另一部

分浸膏以少量的乙酸乙酯溶解,溶液置分液漏斗中加适量 5%NaOH 振摇、使酚性物及有机酸等转入下层氢氧化钠水溶液中,剩下的乙酸乙酯为中性部分,用蒸馏水洗至中性即可备用,取乙酸乙酯液 2~3ml,在水浴上蒸干,以 1~2ml 乙醇溶解做④项试验(见表 10-5)。

表 10-2 项试验①

检查项目	酚类	鞣质	有机酸
试剂名称	Δ 1%FeCl ₃ 试剂	Δ 1%FeCl ₃ 试剂	Δ 溴甲酚蓝试剂
结果			

表 10-3 项试验②

检查项目	生物碱
试剂名称	*1.碘化铋钾试剂 *2.硅钨酸试剂 *3.鞣酸试剂 *4.苦味酸试剂
结果	

表 10-4 项试验③

检查项目	黄酮	蒽醌
试剂名称	Δ 1.1%FeCl ₃ 试剂 *2.盐酸-镁粉反应	Δ 1.10%KOH Δ 2.0.5%Mg(Ac) ₂ 试剂 Δ 3.氨熏
结果		

表 10-5 项试验④

检查项目	香豆素与萜类内酯	强心苷
试剂名称	*1.开环与闭环反应 Δ 2.氨基安替比林-铁氰化钾呈色反应 Δ 3.羟胺反应	Δ 1.Kedde 试剂 Δ 2.三氯乙酸试剂 *3.苦味酸试剂
结果		

3. 石油醚提取液

取中药粗粉 1g, 加 10ml 石油醚(沸程 60~90℃),放置 2~3h,过滤,滤液置表面皿上挥发,残留物进行下列试验(见表 10-6)。

表 10-6 石油醚提取液中成分检查

检查项目	甙体或三萜类	挥发油和油脂
试验方法	*1.醋酐-浓硫酸试验	石油醚滴于滤纸上,观察有无油斑并在加热后
	△2.25%钼磷酸试剂	能否挥发
结果		

4. 甙体的检查

取中药粗粉 0.2g,置于试管中,加入 3~5ml 5%硫酸溶液,摇匀混合,在试管口置一条浸过苦味酸钠盐的滤纸条,然后紧塞试管口(滤纸不要接触溶液),试管于沸水浴上加热十几分钟,如纸条显红色表示有甙体。

各类化学成分的薄层或纸层预试条件大致如下,并可根据具体对象适当调整展开剂的比例(见表 10-7)。

表 10-7 各类化学成分的展开剂展开条件

化合物类别	色谱种类	展开条件	检出试剂
酚类化合物	硅胶-TLC	氯仿-丙酮(8:2)	1%FeCl ₃ 乙醇液
有机酸	硅胶-TLC	氯仿-丙酮-甲醇-乙酸 (7:2:1.5:0.5)	溴甲酚蓝
	PC	正丁醇-乙酸-水(4:1:5,上层)	茚三酮
生物碱	硅胶-TLC	氯仿-甲醇(9:1)氨熏	碘化铋钾
强心苷	PC	氯仿-丙酮-甲醇-甲酰胺	咕吨氢醇
	滑石粉-TLC(甲酰胺为固定相)	(8:2:0.5:0.5)	
甙体三萜	硅胶-TLC	氯仿-丙酮(8:2)	硫酸-醋酐 5%硫酸乙醇
蒽醌	硅胶-TLC	环己烷-乙酸乙酯(7:3)	氨熏
挥发油	硅胶-TLC	石油醚	香草醛-浓硫酸
		石油醚-乙酸乙酯(85:15)	
香豆素	硅胶-TLC	正丁醇-乙酸-水(4:1:1)	用 5%KOH 甲醇液喷后紫外灯下看荧光
黄酮苷及苷元	PC	乙酸-水(15:85)	三氯化铝
		正醇-乙酸-水(4:1:1)	
糖	PC	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)	剂

附录:常用检识试剂的配制方法

一、生物碱检识试剂

1. 碘-碘化钾试剂取 1g 碘和 10g 碘化钾,溶于 50ml 水中,加热溶解,加 2ml 醋酸,再加水稀释至 100ml。

2. 碘化汞钾试剂取 1.36g 氯化汞和 5g 碘化钾各溶于 20ml 水中,将两液混合后再加水稀释至 100ml。

3. 碘化铋钾试剂取 8g 次硝酸铋溶于 17ml 30%硝酸(相对密度 1.18)中,在搅拌下缓慢滴加碘化铋钾水溶液(碘化钾 27g 溶于 20ml 水中),静置过夜,滤过,加蒸馏水稀释至 100ml。

附:改良碘化铋钾试剂

甲液取 0.85g 次硝酸铋溶于 10ml 冰醋酸中,加 40ml 水。

乙液取 8g 碘化钾溶于 20ml 水中。

将溶液甲和乙等量混合,置棕色瓶中能保存较长时间,可作生物碱沉淀试剂用。如作色谱显色剂用,需取上述混合液 1ml 与 2ml 醋酸、10ml 水的比例混合即得。

4. 苦味酸试剂取 1g 苦味酸,溶于 100ml 水中即得。

5. 硅钨酸试剂取 5g 硅钨酸,溶于 100ml 水中,用盐酸调 pH2。

6. 磷钨酸试剂取 20g 钨酸钠、10g 磷酸(相对密度为 1.13)与水混合后,加热煮沸 20 分钟,稍冷后加盐酸至酸性。

7. 鞣酸试剂取 1g 鞣酸,加 1ml 乙醇,溶解后加水至 10ml。

二、糖检识试剂

1. 斐林试剂(碱性酒石酸铜试剂)

甲液取 6.93g 结晶硫酸铜,加水至 100ml。

乙液取 34.6g 酒石酸钾钠,10g 氢氧化钠,加水至 100ml。使用时甲、乙两液等量混合。

2. 多伦试剂(氨性硝酸银试剂)取 1g 硝酸银,加 20ml 水溶解,小心滴加适量氨水,随加随搅拌至开始产生的沉淀将近全部溶解为止,滤过即得。

3. α -萘酚-浓硫酸试剂

甲液取 1g α -萘酚,加 95%乙醇至 10ml。

乙液 浓硫酸。

使用时分别加入两液。

4. 苯胺-邻苯二甲酸试剂取 0.93g 苯胺及 1.6g 邻苯二甲酸,溶于 100ml 水饱和的正丁醇中。

三、黄酮类检识试剂

1. 盐酸-镁粉试剂浓盐酸和镁粉,使用时分别加入。

2. 三氯化铝试剂 2%三氯化铝乙醇或甲醇溶液。

3. 醋酸镁试剂 1%醋酸镁甲醇溶液。
4. 碱式醋酸铅(或醋酸铅)试剂饱和碱式醋酸铅(或饱和醋酸铅)水溶液。
5. 硼氢化钾(钠)试剂 2%四氢硼钾甲醇液和浓盐酸,使用时分别加入。
6. 锆-枸橼酸钠试剂
甲液 5%二氯氧锆甲醇溶液。
乙液 2%柠檬酸甲醇溶液。
应用时分别加入。
7. 氢氧化钾试剂 10%氢氧化钾水溶液。

四、蒽醌类检识试剂

醋酸镁试剂、碱式醋酸铅试剂、氢氧化钾试剂参见黄酮类检出试剂 3,4,7。
对亚硝基-二甲苯胺试剂 1%对亚硝基-二甲苯胺吡啶溶液。

五、香豆素类及内酯类检识试剂

1. 异羟肟酸铁试剂
甲液新鲜配制的 7%羟胺盐酸甲醇溶液。
乙液 10%氢氧化钾甲醇溶液。
丙液取 1g 三氯化铁溶于 100ml 1%盐酸中。
应用时甲、乙、丙三溶液按次序滴加,或甲、乙两溶液等量混合滴加后再加丙液。
2. 内酯环的开环-闭环试剂
甲液 1%氢氧化钠水溶液。
乙液 2%盐酸溶液。使用时分别加入。
3. 重氮化试剂
甲液取 0.35g 对硝基苯胺,溶于 5ml 浓盐酸中,加水至 50ml。
乙液取 5g 亚硝酸钠,加 50ml 水溶解。使用前同时取甲、乙两液等量在冰水浴中混合。
本试剂系由对硝基苯胺和亚硝酸钠在强酸性条件下经重氮化作用而成。由于重氮盐不稳定,故本试剂应在临用时配制。
4. 4-氨基安替比林-铁氰化钾试剂
甲液 2% 4-氨基安替比林乙醇溶液。
乙液 8%铁氰化钾水溶液(或用 0.9%4-氨基安替比林和 5.4%铁氰化钾水溶液)。
应用时分别加入。

六、皂苷类检识试剂

1. 溶血试验 2%血细胞生理盐水混悬液:取新鲜兔血(由心脏或耳静脉取血)适量,用洁净小毛刷迅速搅拌,除去纤维蛋白,用生理盐水反复离心洗涤至上清液无色后,量取沉降的红细胞,加入生理盐水配成 2%混悬液,贮存于冰箱内备用(贮存期 2~3 天)。

2. 醋酐-浓硫酸试剂

甲液 醋酐。

乙液 浓硫酸。

使用时将样品蒸干,溶于醋酐,沿管壁小心滴加浓硫酸。

3. 氰苷类检出试剂

(1)苦味酸钠试纸取适当大小的滤纸条,浸入苦味酸饱和水溶液中,浸透后取出晾干,再浸入10%碳酸钠水溶液内,迅速取出,晾干即得。

(2)亚铁氰化铁(普鲁士蓝)试剂

甲液 10%氢氧化钾水溶液。

乙液 10%硫酸亚铁水溶液。

丙液 10%盐酸水溶液。

丁液 5%三氯化铁水溶液。

七、甾体和三萜类检识试剂

1. 醋酐-浓硫酸试剂参见皂苷类检识试剂 2。

2. 三氯甲烷-浓硫酸试剂

甲液三氯甲烷(溶解试样)。

乙液浓硫酸。

3. 三氯化锑试剂取 25g 三氯化锑,溶于 75g 三氯甲烷中(亦可用三氯甲烷或四氯化碳的饱和溶液)。

4. 五氯化锑试剂五氯化锑和三氯甲烷(或四氯化碳)按 1:4 于用前配制。

5. 间二硝基苯试剂

甲液 2%间二硝基苯乙醇溶液。

乙液 14%氢氧化钾乙醇溶液。用前等量混合。

6. 三氯醋酸试剂取 3.3g 三氯醋酸,溶于 10ml 三氯甲烷中,再加入过氧化氢 1~2 滴。

7. 香草醛-浓硫酸试剂 1%香草醛 60%硫酸液或取 0.5g 香草醛溶解于 100ml 硫酸-乙醇(4:1)混合液中。

八、强心苷类检识试剂

1. 碱性 3,5-二硝基苯甲酸试剂

甲液 2%3,5-二硝基苯甲酸甲醇溶液。

乙液 8%氢氧化钾水溶液。应用前甲、乙两液等量混合。

2. 碱性苦味酸试剂

甲液 1%苦味酸水溶液。

乙液 10%氢氧化钠水溶液。应用前甲、乙两液以 9:1 混合。

3. 碱性亚硝酰铁氰化钠试剂

甲液吡啶溶液。

乙液 0.5%亚硝酰铁氰化钠乙醇溶液。

丙液 10%氢氧化钠乙醇溶液。使用时样品蒸干,溶于吡啶,先乙液,再加丙液。

4. 间硝基苯试剂 2%间硝基苯乙醇液。

5. α -去氧糖试剂

(1)三氯化铁-冰醋酸试剂

甲液取 0.5ml 1%三氯化铁水溶液,加冰醋酸至 100ml。

乙液浓硫酸。使用时分别加入两液。

(2)咕吨氢醇冰醋酸试剂取 10mg 咕吨氢醇溶于 100ml 冰醋酸(含 1%盐酸)中。

九、鞣质检识试剂

1. 氯化钠-明胶试剂取 1g 白明胶,溶于 100ml 10%氯化钠水溶液中。

2. 醋酸铅试剂饱和醋酸铅水溶液。

3. 咖啡碱等生物碱试剂 0.1%咖啡碱水溶液。

4. 三氯化铁-铁氰化钾试剂

甲液 2%三氯化铁水溶液。

乙液 1%铁氰化钾水溶液。

应用时甲、乙两溶液等量混合或分别滴加。

十、酚类检识试剂

1. 三氯化铁试剂 5%三氯化铁水溶液或乙醇溶液。

2. 三氯化铁-铁氰化钾试剂参见鞣质检识试剂 4。

3. 香草醛-盐酸试剂取 0.5g 香草醛,溶于 50ml 盐酸中。

4. 重氮化试剂参见香豆素类及内酯类检识试剂 3。

5. 4-氨基安替比林-铁氰化钾试剂参见香豆素类及内酯类检识试剂 4。

十一、氨基酸、多肽和蛋白质检识试剂

1. 双缩脲试剂

甲液 1%硫酸铜水溶液。

乙液 10%氢氧化钠水溶液。

2. 茚三酮试剂取 0.3g 茚三酮,溶解于 100ml 乙醇中,再加 3ml 冰醋酸即得。

3. 鞣酸试剂参见生物碱检识试剂 7。

十二、有机酸检识试剂

1. 溴酚蓝试剂 0.1%溴酚蓝乙醇溶液。

2. 溴甲酚绿试剂在 80% 甲醇溶液中加 30%氢氧化钠 8 滴作为溶剂,配成 0.3%的溴甲酚绿

溶液。

十三、通用及其他试剂

1. 重铬酸钾-硫酸试剂检查一般有机物。

显色剂取 5g 重铬酸钾,溶于 100ml 40%硫酸中。

薄层检查喷洒后加热至 150°C至斑点出现。

2. 荧光素-溴试剂检查不饱和化合物。

甲液 0.1%荧光素乙醇溶液。

乙液 5%溴的四氯化碳溶液。喷甲液后,再用乙液熏。

喷洒后处理喷洒荧光素溶液后,放置存有溴溶液的缸内,可于紫外灯下检查荧光,荧光素与溴化合成曙红(无荧光),而不饱和化合物则成溴加成物,保留了原有荧光;若点样量较多,则呈黄色斑点,底板呈红色。

3. 碘试剂检查一般有机物,方法有二:

(1)将层析板放密闭缸内或瓷盘内,缸内预先放有碘结晶少许,大部分有机化合物呈棕色斑点。

(2)层析板放碘蒸汽中 5 分钟(或喷 5%碘的三氯甲烷溶液),取出置空气中待过量的碘蒸气全部挥发后,喷 1%淀粉的水溶液,斑点转成蓝色。

4. 2,4-二硝基苯肼试剂检查醛、酮类。

配制 2%2,4-二硝基苯肼盐酸(2mol/L)溶液。

5. 硝酸铈试剂检查挥发油中的醇类。

取 3g 硝酸铈,溶于 50ml25%硝酸。

6. 氨性氯化锶试剂检查邻二酚羟基。

甲液 1%氯化锶甲醇溶液。

乙液氨气饱和后的甲醇溶液。

7. 碱性高锰酸钾试剂检查还原性物质。

甲液 1%高锰酸钾溶液。

乙液 5%碳酸钠溶液。

临用前等量混合即可。

8. 硫酸试剂

显色剂 5%的浓硫酸乙醇溶液,或 15%浓硫酸正丁醇溶液,或浓硫酸-醋酸(1:1)。

喷洒后处理空气中干燥 15 分钟,再加热至 110°C直至出现颜色或荧光。