

《天然药物化学》项目化教学案例

案例撰写人：李荣

专业与班级：药学

日期：

项目序号	项目一	项目名称	绞股蓝总皂苷的提取和制剂鉴定	
项目任务	实训			
教学方法	实训		学时	4
教学设施及教具	多媒体教学设备（图片、幻灯、视频、多媒体课件）、实验相关器材		教学地点	化学实训室
项目目标	学习目标（重点★ 难点※）		工作任务（重点★ 难点※）	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 掌握药材的提取前处理方法 2. 掌握用大孔吸附树脂纯化样品的操作。 3. 掌握用薄层色谱法对样品进行鉴定 		<ol style="list-style-type: none"> 1. 能够熟练大孔吸附树脂树脂的柱层析操作。 2. 能够熟练薄层色谱法的操作流程。 3. 能够利用色谱方法对绞股蓝及其制剂进行鉴别。 	
必备知识	<p>1. 绞股蓝总皂苷有较好的水溶性，可用水为提取溶剂，利用绞股蓝皂苷分子中同时含有非极性部分三萜母核，使其在非极性大孔树脂上能较好地吸附，相反，极性较大的成分如糖类则在非极性大孔树脂上难以吸附，因而选用非极性大孔吸附树脂 D₁₀₁ 型可将绞股蓝水体液中的总皂苷和糖类水溶性成分较好地分离，最后用活性炭脱色，从而达到纯化的目的。</p> <p>2.大孔吸附树脂</p> <p> 大孔树脂(macroporous resin) 又称全多孔树脂，聚合物吸附剂，它是一类以吸附为特点，对有机物具有浓缩、分离作用的高分子聚合物。孔吸附树脂的吸附实质为一种物体高度分散或表面分子受作用力不均等而产生的表面吸附现象。</p> <p> 大孔树脂这种吸附性能是由于范德华引力或生成氢键的结果。同时由于大孔吸附树脂的多孔结构使其对分子大小不同的物质具有筛选作用。通过上述这种吸附和筛选原理，有机化合物根据吸附力的不同及分子量的不同进行分离和富集。</p> <p> 大孔吸附树脂主要用于水溶性化合物的分离和纯化，近年来多用皂苷及其他苷类化合物的分离。也可间接用于水溶液的浓缩，从水溶液中吸附有效成分。大孔吸附树脂具有吸附容量大、选择性好、成本低、收率较高、再生容易等优点。</p> <p>3.大孔吸附树脂操作步骤色谱柱分离的操作方法</p> <p> ○树脂的预处理：用树脂体积 0.4-0.5 倍的甲醇（或乙醇，下同）浸泡树脂 24 小时，使液面高于树脂层约 1cm（初次使用需预处理）。取一定量树脂湿法装柱，加入甲醇在柱上以 2 倍保留体积的流速清洗，洗至流出液与等量水混合后不呈白色浑浊位置，然后改用大量水洗至无醇味，且水溶液澄清即可使用。（树脂连续运行不必再进行预处理，停运时间过长，应考虑</p>			

	<p>重新预处理。停运前要充分解吸，洗净，并以大于 10%食盐溶液浸泡，以避免细菌在树脂中繁殖)</p> <p>预处理方法：用 2 倍保留体积的 5%HCL 溶液，以 4~6BV/h 的流速通过树脂层，并浸泡 2~4 小时，而后用水以同样流速洗至出水 pH 中性。用 2 倍保留体积的 2%NaOH 溶液，以 4~6BV/h 的流速通过树脂层，并浸泡 2~4 小时，而后用水以同样流速洗至出水 pH 中性。</p> <p>○药液的上柱吸附：样品应为澄清溶液（有颗粒可过滤），将树脂中的水尽量排尽，即可加入样品溶液。一边放出原来的溶剂，一边加入样品溶液，流速应适当。</p> <p>○树脂的解吸：待样品慢慢滴加完毕后，即可开始洗脱。先用 2 倍保留体积的水洗，然后用 30%的甲醇洗脱，最后用 90%的甲醇洗脱，收集 90%的甲醇洗脱液。</p> <p>○树脂的再生：先用 95%甲醇将其吸至无色，再用大量水洗去乙醇，即可再次使用。树脂强化再生方法：当树脂使用一定周期后，吸附能力降低或受污染严重时需强化再生，其方法是在容器内加入高于树脂层 10cm 的 3~5%盐酸溶液浸泡 2~4 小时，然后进行淋洗过柱。继用 3~4 倍保留体积同浓度的盐酸溶液过柱，然后用纯水洗至接近中性；再用 3~5%的氢氧化钠溶液浸泡 4 小时。最后淋洗过柱，用同浓度的 3~4 倍保留体积氢氧化钠溶液过柱，最后用纯水清洗至 pH 值为中性，备用。</p>
<p>实训范例</p>	<p>一、实验器材和试剂</p> <p>1.器材：超声清洗器、漏斗、铁架台、铁夹、锥形瓶、pH 试纸、大孔吸附树脂、玻璃色谱柱、烧杯。</p> <p>2.试剂及材料：2%氢氧化钠溶液、95%乙醇、薄层硅胶板、正丁醇、乙酸乙酯、纯化水、5%磷钼酸、活性炭、酸酐、浓硫酸、α-萘酚。</p> <p>二、实验操作</p> <p>(一) 提取</p> <p>取绞股蓝粗粉 5g，加水 80ml，超声振荡 15min，过滤，残渣加水 60ml，超声振荡 15min，过滤，合并两次滤液，用 2%氢氧化钠溶液调至 pH9~10，静置，滤除沉淀，滤液备用。</p> <p>(二) 纯化</p> <p>1.大孔吸附树脂的准备</p> <p>取 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂 5g，用 95%乙醇浸泡过夜，湿法装柱（1.0×28cm），继续用 95%乙醇洗涤至流出液加等量水后几乎无白色浑浊为止。然后用去离子水洗至无醇味。</p> <p>2.纯化</p> <p>将绞股蓝提取液以 2ml/ml 的速度通过大孔吸附树脂柱，待溶液全部进入柱后，用 2%氢氧化钠溶液洗涤，洗涤速度控制在 5ml/min 为宜。当流出液接近无色时，改用水洗，至流出液 pH 接近 7 为止。然后用 95%乙醇洗脱，收集醇洗脱液至无绞股蓝皂苷析出[薄层色谱法检查：硅胶薄层板，正丁醇-乙酸乙酯-水（4：1：5）上层，5%磷钼酸乙醇液，110℃显色]。醇洗脱液加入少量活性炭回流 10min，趁热过滤，滤液回收乙醇至小体积，水浴蒸干，刮松，得白色鳞片状结晶，为绞股蓝总皂苷。</p>

	<p>(三) 鉴定</p> <p>1. 显色反应</p> <p>(1) 醋酐-浓硫酸反应 取绞股蓝总皂苷少许，置蒸发皿中，滴加冰醋酸 1ml 溶解，再加 1ml 醋酐，然后于溶液边沿滴加浓硫酸，观察颜色变化。</p> <p>(2) Molish 反应：取绞股蓝总皂苷少许于试管中，加乙醇 1ml 溶解，滴加 1ml α-萘酚试剂，然后沿试管壁加入 2ml 硫酸，不要摇动，观察两液交界面的颜色。</p> <p>2. 薄层色谱鉴别</p> <p>薄层板：硅胶薄层板</p> <p>点样：绞股蓝皂苷乙醇液、人参皂苷 Rb₁ 对照品乙醇液</p> <p>展开剂：正丁醇-乙酸乙酯-水（4：1：5，上层）</p> <p>展开方式：上行展开</p> <p>显色：喷 5% 磷钼酸乙醇液显色（110℃，5min）</p> <p>观察记录：记录薄层图谱，计算 R_f 值</p> <p>(四) 制剂色谱鉴别—绞股蓝胶囊中皂苷的薄层色谱鉴别</p> <p>本品为绞股蓝浸膏加入淀粉等辅料制成的胶囊剂</p> <p>1. 预处理</p> <p>(1) 供试液的制备 本品 3 粒倾出内容物，加乙醇 5ml 浸渍提取 30min，时加振摇，过滤，滤液为供试液</p> <p>(2) 对照品液的制备 ①取自制绞股蓝总皂苷样品，加乙醇溶解成每 1ml 含 1mg 的溶液。②取人参皂苷 Rb₁ 对照品适量，加乙醇溶解成每 1ml 含 1mg 的溶液。</p> <p>2. 薄层色谱鉴别</p> <p>薄层板：硅胶 G 薄层板</p> <p>点样：供试液、对照液各 10μl。</p> <p>展开剂：正丁醇-乙酸乙酯-水（4：1：5，上层）</p> <p>展开方式：上行展开</p> <p>显色：喷硫酸-甲醇（1：1）溶液，105℃ 加热显色，于日光下及紫外灯（365nm）下检视。</p> <p>观察记录：记录斑点位置计算 R_r 值。</p> <p>三、附注</p> <p>1. 绞股蓝提取液用碱液调至 pH9~10 后，应放置适当时间，便于析出的粒子聚集以利过滤。在碱性条件下，绞股蓝皂苷能较好地吸附于树脂上而其他杂质成分形成离子型化合物随溶液流出，利于纯化。</p> <p>2. 上样速度不宜过快。过快影响树脂与溶质间的吸附交换平衡，导致吸附容量下降。</p> <p>3. 皂苷经树脂吸附后，洗除在树脂表面或内部残留的杂质时，用碱液效果较水洗为好。因为碱液改变了杂质的极性，从而改变了杂质被吸附的能力。</p> <p>4. 洗脱液含有少量的有色物质，可通过活性炭脱色除去。活性炭的用量不宜过多，以免造成皂苷的损失，本实验以 0.2~0.3g 为宜。</p>
背景资料	<p>绞股蓝为葫芦科植物绞股蓝的根茎或全草，中药名为七叶胆。在我国南部地区广有分布，现多栽培。全草有消炎解毒、止咳祛痰功能，用于治疗慢性支气</p>

	管炎、肾盂炎、肠胃炎等。全草含甾醇、糖类、色素及皂苷等成分，皂苷含量约3%。药理实验表明绞股蓝皂苷具有类似人参的免疫增强作用，且过量服用不会引起副作用，因而引起了广泛的关注。绞股蓝已经工业提取，广泛用于食品、饮料、药品方面。在抗衰老、抗疲劳、降低血脂、促进细胞新陈代谢、强壮补益、调理神经等方面有较好地效果。		
项目任务实施过程	教师活动	学生活动	时间
	1. 安排项目任务、项目目标和要求。请你根据实训范例完成实训任务	设计方案，准备实训材料	20分钟
	2. 组织实施项目任务，巡回指导。	2. 学生分为若干组（每组2-3人）根据所给背景资料完成实训。	100分钟
	3. 成果展示	3. 每小组将产品在课堂上向老师和全班同学展示。	10分钟
	4. 教师评析，对每组实训情况提出意见。	4. 认真听，做记录；讨论	20分钟
	5. 学生自评后教师根据考核标准给出学生考核分值；	5. 小组间互相评价。	10分钟
	6. 对本次项目任务完成情况做评论总结。		
布置作业	完成实训报告		

评分标准

测试项目	分项指标	技术要点	分值	得分
项目前准备	查找资料	正确查找项目资料	2	
	选用试药和仪器	找齐所需要试药和仪器	3	
	配制试液	按标准正确配制实验中的试液	5	
绞股蓝水体制的制备	超声清洗器的使用	能够熟练正确地使用超声提取器	10	
	pH值的调节	能够熟练准确的调节溶液的pH值	10	
大孔吸附树脂的使用	预处理	能够对大孔吸附树脂正确的处理	5	
	装柱	能够熟练掌握湿法装柱的操作	8	
	洗脱	调节洗涤的速度在5ml/min 能够用合适的方法检验绞股蓝皂苷是否流出完全	8	
活性炭脱色	回流	正确搭建回流装置 10min内完成	10	

硅胶薄层色谱操作	点样	点样量的控制，分次点样操作	5	
	展开	展开之前的饱和，展开剂的配制 检查层析缸的密闭性	8	
	显色	显色剂的喷洒	5	
项目后处理	清洁卫生	台面整洁、仪器清洁完好 器皿清洗干净，摆放整齐	5	
原始记录及检验报告书	原始记录	台面整洁、仪器清洁完好 器皿清洗干净，摆放整齐记录原始、真实，内容完整、齐全，书写清查，整洁，数据无误，结论明确	8	
	检验报告书	格式规范，结论明确，内容准确	8	
合计			100	