

薄层层离法在研究天然化合物中的应用

III. 強心甙的鉴定

孙南君 耶蕙英

(中国医学科学院藥物研究所,北京)

提要 本文选择了12个強心甙作为样品,对三氧化鋁为吸附剂的薄层层离的各种条件,进行了初步的研究。結果表明,此法完全可以应用于強心甙类的鉴定工作,并拟定下列条件作为应用时的参考:(1)吸附剂:不加粘合剂的III級中性三氧化鋁。(2)吸附剂細度:160—200号篩孔的粉末。(3)吸附剂厚度:1毫米。(4)推进剂:对单糖甙較好的有:氯仿-甲醇(99:1,95:5);乙醚;二甲苯-甲乙酮(1:1);氯仿-二氧六环-正丁醇(70:20:5)等。(5)样品与玻板端的距离:1.5厘米。(6)样品与样品間的距离:1厘米。(7)玻板斜度:5—10°。(8)层离槽內溶剂蒸气的飽和度:不必預先飽和,可直接层离。(9)显色剂:Kedde, Raymond, Liebermann, 三氯化錒,三氯乙酸,磷鉬酸等均可,但在应用上各有其优缺点。

引 言

近年来薄层层离法在天然化合物的研究工作中,得到了广泛的应用,但是关于強心甙类的薄层层离工作做得較少。1961年 Stahl^[1] 首先用硅胶为吸附剂对洋地黄甙类进行了薄层层离的工作。最近 Reichelt^[2] 亦有类似报告。到目前为止,以三氧化鋁为吸附剂的薄层层离法用于強心甙类的研究尚未見有报导。

本文选择了12种強心甙,采用不加粘合剂的三氧化鋁为吸附剂,对推进剂的选择、三氧化鋁的細度和酸碱度、层离槽內溶剂蒸气飽和和所需的时间及显色剂等較重要的薄层层离条件进行了初步的研究。結果表明,薄层层离法完全可应用于強心甙类的鉴定。

实 驗 部 分

(一) 推进剂选择

根据推进剂极性的大小和某些对強心甙类較好的紙层离溶剂,我們选择了17种推进剂。試驗結果(表1)表明,对样品中大多数单糖甙和甙元較好的推进剂有:氯仿-甲醇(99:1)(图1),氯仿-甲醇(95:5)(图2),乙醚(图3),二甲苯-甲乙酮(1:1)(图4)和氯仿-二氧六环-正丁醇(70:20:5)(图5)等。但对多糖甙未能找到理想的推进剂。

(二) 吸附剂三氧化鋁細度的选择

試驗了三种不同細度的III級碱性三氧化鋁(pH 8 ±),即120—160号篩孔,160—200号篩孔和小于200号篩孔。实验結果表明,細度愈小則层离所需時間愈长, R_f 值愈

表 1 各种强心甙在不同推进剂中薄层层离的 R_f 值

推 进 剂	强 心 甙	R_f 值											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
苯-氯仿(1:1)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
氯仿		0	—	0	0	0	0.21	0	0	0.26	0.06	0	0.57
氯仿/甲酸胨		0	0.06	0	0	0	0	0	0	0.05	0.03	0	0
氯仿-甲醇(99.5:0.5)		0	0.28	0	0	0	0.37	0	0	0.36	0.16	0	0.63
氯仿-甲醇(99:1)		0	0.54	—	—	0.18	0.48	0	0	0.56	0.41	0.21	0.84
氯仿-甲醇(95:5)		0	0.75	0	0	0.56	0.70	0	—	0.72	0.65	0.57	0.90
氯仿-乙醇(95:5)		0	0.90	0	—	0.84	0.90	0	0.09	0.90	0.84	0.84	0.90
氯仿-乙醇(2:1)		0	0.92	0	0	0.93	0.93	0	0	0.90	0.90	0.90	0.90
苯-甲醇(98:2)		0	0.19	0.04	0	0.04	0.12	0	0	0.15	0.09	0.04	0.45
苯-甲醇(95:5)		0	0.28	0.06	0	0.10	0.19	0	0	0.24	0.15	0.09	0.51
苯-正丁醇(1:1)		0	0.92	0.06	0.03	0.81	0.95	0	0	0.90	0.86	0.56	0.90
正丁醇		0	0.93	—	—	—	0.92	0.03	0.03	0	0.90	—	0.95
乙醚		0	0.54	0	0	0.12	0.60	0	0	0.33	0.41	0.06	0.86
丙酮		0	0.81	0	0	0	0.82	0	0	0.86	0.86	0	0.75
二甲苯-甲乙酮(1:1)		0	0.51	0	0	0.22	0.60	0	0	0.63	0.57	0.21	0.75
甲苯-正丁醇(1:1)		0	—	0	0	—	—	0	0	—	—	—	—
氯仿-二氧六环-正丁醇 (70:20:5)		0	0.90	0.37	0.36	0.69	0.89	0	0.15	0.93	0.84	0.75	0.94

[注] 1. “0”者表示原点不动;“—”者表示拖尾较长。
 2. 表中的强心甙: 1—Thevetin AB; 2—Neriifolin; 3—Lanatoside ABC; 4—Lanatoside C; 5—Gitoxin; 6—Divaside; 7—Strophanthin-G; 8—K-Strophanthin-β; 9—Cymarlin; 10—Strophanthidin; 11—Erysimin; 12—Oleandrin. 在以下所有图中的数字符号, 除另有说明外, 均代表以上的各种强心甙。

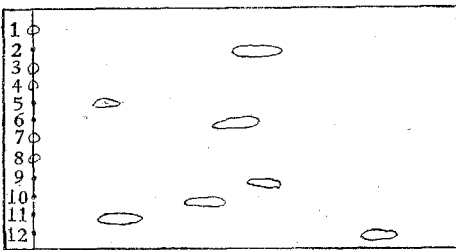


图 1

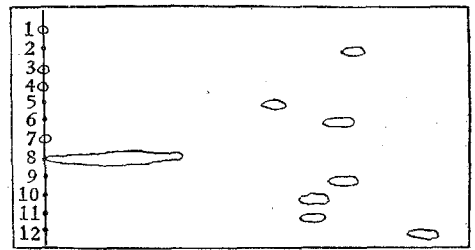


图 2

推进剂: 氯仿-甲醇(99:1);
 吸附剂: III 級碱性三氧化鋁(160—200 号篩孔);
 显色剂: Kedde.

推进剂: 氯仿-甲醇(95:5);
 吸附剂: III 級碱性三氧化鋁(160—200 号篩孔);
 显色剂: Kedde.

小,层离所得强心甙点的形状亦較圓。細度为 120—160 号篩孔的层离点的形状很长,有拖尾現象,所以不能应用。細度为 160—200 号篩孔和小于 200 号篩孔的三氧化鋁均可应用,而前者更好一些。

(三) 层离槽内溶剂蒸气飽和和所需時間对层离結果的影响

用氯仿-甲醇(99:1)为推进剂,选择两种条件进行了比較試驗:第一,层离槽内放入溶剂后直接进行层离;第二,层离槽内放入溶剂后,放置 30 分钟再进行层离。試驗表明,直

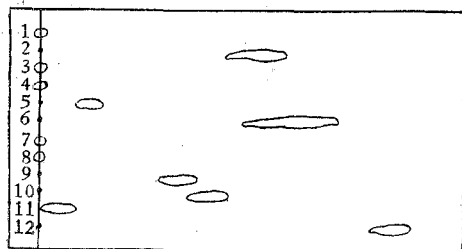


图 3

推进剂：乙醚；
 吸附剂：III 級碱性三氧化鋁(160—200 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

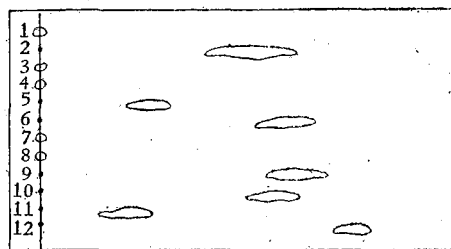


图 4

推进剂：二甲苯-甲乙酮(1:1)；
 吸附剂：III 級碱性三氧化鋁(160—200 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

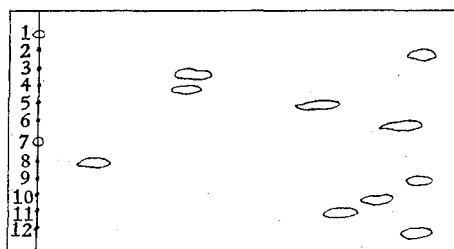


图 5

推进剂：氯仿-二氧六环-正丁醇(70:20:5)；
 吸附剂：III 級碱性三氧化鋁(160—200 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

接层离所得結果比放置 30 分鐘后再进行层离的結果要好得多。因为飽和 30 分鐘后所得层离点有拖尾現象，并証明这主要由于在飽和过程中，溶剂中甲醇蒸气对三氧化鋁吸附性的影响所致。

(四) 三氧化鋁酸碱性对薄层层离的影响

选择細度均小于 160 号篩孔的三种不同酸碱度的三氧化鋁，即碱性(pH 8 ±)，中性和酸性(pH 4—5)的三氧化鋁，进行了比較，所得結果相近，而只是 R_f 值的大小稍有不同。酸性三氧化鋁所得的 R_f 值較大，碱性次之，中性最小。

(五) 显色剂选择

根据強心甙类常用显色剂，选择了以下 6 种显色剂，即 Kedde、Raymond、Liebermann、三氯化錒、三氯乙酸和磷鉬酸，进行了比較試驗。結果(表 2)表明，以上 6 种显色剂均可应用，只是所显顏色各有不同，在应用上亦各有优缺点。

(1) Kedde 和 Raymond 试剂 应用比較方便，噴洒后立刻显色，但顏色消失較快，对各种不同的強心甙所显顏色的选择性較差，几乎均呈蓝紫色。

(2) Liebermann 试剂 价格較便宜，对多种不同強心甙的显色亦有差別，但噴洒后須在 110—140°C 加热 30 分鐘左右才能显色。

(3) 三氯化錒试剂 噴洒后，須在 110—140°C 加热 5—20 分鐘后才显色。对不同強心甙所显顏色各有不同。各种強心甙的显色時間亦有快慢。在紫外光下观察时，各种強心甙的螢光亦各有不同，这对強心甙的鉴别是很有意义的。但顏色消失較快，三氯化錒的

毒性較大,使用过三氯化錒的仪器,洗滌比較困难;而且噴洒过三氯化錒的三氧化鋁等吸附剂不易回收再生。

(4) 三氯乙酸試剂 噴洒后,須在 100°C 左右加热 2 分鐘才能显色。在紫外光下观察时,有的甙現螢光,有的甙則不現螢光。

(5) 磷鉬酸試剂 噴洒后,須在 140°C 加热 15—30 分鐘后才显色。对各种不同強心甙所显顏色的选择性較差,均显蓝色。

表 2 各种显色剂对強心甙类在三氧化鋁薄层层离板上的顏色反应

強 心 甙	Kedde		Raymond		Liebermann		三 氯 化 錒		三 氯 乙 酸		磷 鉬 酸	
	日光	紫外光	日光	紫外光	日光	紫外光	日光	紫外光	日光	紫外光	日光	紫外光
1	紫	—	深蓝	—	淡褐	同左	黄	黄	蓝綠	—	蓝色	—
2	蓝紫	—	綠	—	淡黄	”	綠	黄	”	—	”	—
3	紫	—	深蓝	—	蓝	”	深褐	深蓝	”	蓝綠	”	—
4	紫	—	深蓝	—	蓝	”	深褐	深蓝	”	”	”	—
5	蓝紫	—	棕	—	蓝綠	”	綠	棕	”	”	”	—
6	紫	—	黄綠	—	淡蓝	”	蓝	棕	”	”	”	—
7	紫	—	棕	—	淡黄	”	淡黄	黄	”	—	”	—
8	紫	—	深蓝	—	淡黄	”	黄綠	黄	”	—	”	—
9	紫	—	蓝	—	淡蓝	”	灰	蓝紫	”	—	”	—
10	紫	—	蓝	—	淡黄	”	黄綠	黄	”	—	”	—
11	紫	—	綠	—	蓝綠	”	蓝	紫	”	—	”	—
12	蓝紫	—	紫	—	黄綠	”	綠	黄綠	”	蓝綠	”	—

(六) 对強心甙类較好的薄层层离条件

根据以上各种薄层层离条件的初步試驗結果,我們認為,不加粘合剂的三氧化鋁薄层层离法,完全可以应用于強心甙类的鉴定工作。特別对极性較小的強心甙和甙元,以下的条件,可作为薄层层离时的参考:

吸附剂: III 級中性三氧化鋁。

細度: 160—200 号篩孔的粉末。

吸附剂厚度: 1 毫米。

推进剂: 氯仿-甲醇(99:1)等(根据強心甙的性質,选择适合推进剂)。

样品与玻板端的距离: 1.5 厘米。

样品与样品之間的距离: 1 厘米。

玻板的大小: 根据样品多少选择。

玻板的斜度: 5—10°。

层离槽內溶剂蒸气的飽和度: 层离槽內不必預先飽和,可直接层离。

层离槽体积: 根据玻板大小决定。

推进剂体积: 根据玻板大小决定。

显色剂: Kedde 或三氯化錒等。

(七) 薄层层离法在強心甙鉴定工作中的应用

(1) 黄花夹竹桃果仁中的总单糖甙,用三氧化鋁柱层离进行分离时,用上述薄层层离

法代替紙层离法检查各层离部分中甙的洗脱和分离情况，并鉴定甙的純度和性质。試驗表明，薄层层离法所得結果与紙层离法結果完全相符(图 6, 图 7)。而且前者比后者方便、简单、迅速。

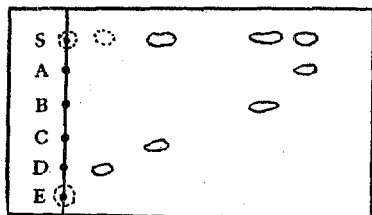


图 6

推进剂：氯仿-甲醇(99:1)；
 吸附剂：III級中性三氧化鋁(小于 160 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

S——黄花夹竹桃总单糖甙；
 A——cerberin；
 B——neriifolin；
 C——peruvoside；
 D——ruvoside；
 E——perusitin.

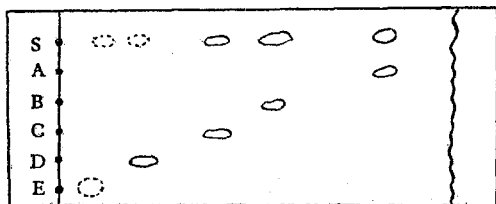


图 7 黄花夹竹桃中強心甙的紙层离

二甲苯-甲乙酮(1:1)/甲酰胺；
 显色剂：Kedde.

S——黄花夹竹桃总单糖甙；
 A——cerberin；
 B——neriifolin；
 C——peruvoside；
 D——ruvoside；
 E——perusitin.

(2) 当做衍生物时，可利用薄层层离法检查反应是否已經完全。例如 Neriifolin 的乙酰化反应和 Cerberin 的去乙酰基反应等，用薄层层离法检查，均得到較好的結果(图 8, 9)。

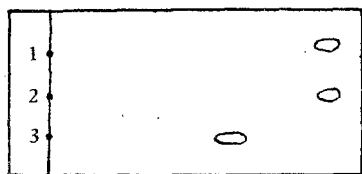


图 8

推进剂：氯仿-甲醇(99:1)；
 吸附剂：III級中性三氧化鋁(小于 160 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

1——neriifolin 二乙酰衍生物；
 2——neriifolin 乙酰化反应产物；
 3——neriifolin.

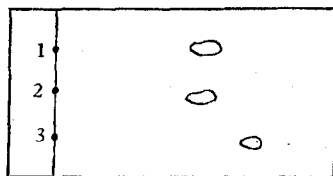


图 9

推进剂：氯仿-甲醇(99:1)；
 吸附剂：III級中性三氧化鋁(小于 160 号篩孔)；
 显色剂：Kedde.

1——neriifolin；
 2——cerberin 去乙酰基产物；
 3——cerberin.

討 論

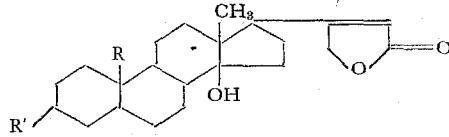
(1) 在上述所試驗的 17 种推进剂中可以看出，单糖甙的 R_f 值比多糖甙的 R_f 值大。如 Neriifolin > Thevetin AB；Cymarín > K-Strophanthin- β 等。这大概由于单糖甙的极性比多糖甙小，因而在一些极性較小的推进剂中，三氧化鋁对单糖甙的吸附力比对多糖甙的吸附力要小。

(2) 在 Oleandrin 的甙元上有一个乙酰基，使其极性大大减小，因而它的 R_f 值比其他一些不含乙酰基的单糖甙要大。

(3) 相同甙元的一些单糖甙，如 Erysimin (Strophanthidin + digitoxose) 和 Cymarín (Strophanthidin + Cymarose) 等，由于糖的不同，則其 R_f 值亦有差别。

(4) 糖相同而甙元结构稍有不同(表 3), 则其 R_f 值亦各有差异(图 6)。

表 3



	R	R'
cerberin	-CH ₃	Thevetose + CH ₃ CO-
neriifolin	-CH ₃	Thevetose
peruvoside	-CHO	Thevetose
ruvoside	-CH ₂ OH	Thevetose
perusitin	-COOH	Thevetose

(5) 强心甙类所用的纸层离溶剂, 大多数需要用甲酰胺或水进行饱和, 如氯仿/甲酰胺; 二甲苯-甲乙酮(1:1)/甲酰胺; 正丁醇/水等。但在不加粘合剂的三氧化铝薄层层离时, 所用推进剂不能用甲酰胺或水进行饱和。

(6) 如果应用含有甲醇的混合溶剂作为推进剂时, 层离槽内不能预先以溶剂蒸汽饱和, 否则由于甲醇蒸气对三氧化铝吸附性的影响, 致使产生拖尾现象。

(7) 影响薄层层离 R_f 值的因素很多, 在相同条件下, 几次重复薄层层离所得 R_f 值亦往往稍有差异, 但各种甙的相对位置不变。因此, 当鉴定一个化合物时, 应有标准样品作对照。

参 考 文 献

- [1] Stahl, E. & Kaltenbach, U.: Dünnschicht-chromatographie IX. Mitteilung. Schnelltrennung von Digitalis und Podyphyllum Glykosidgemischen, *J. Chromatog.*, 1961, 5(5), 458—460.
- [2] Reichelt, J. & Pitra, J.: Methoden zur Trennung von Naturstoffen VI. Dünnschicht-chromatographie der Cardenolide, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1962, 27, 1709—1711.

APPLICATION OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY IN THE STUDY NATURAL PRODUCTS

III. IDENTIFICATION OF CARDIAC GLYCOSIDES

SUN NAN-JUN AND LANG HUI-YING

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

ABSTRACT

The present paper reports investigations on thin layer chromatography for the identification of cardiac glycosides, using active alumina without binder.

Factors influencing R_f values and shape of spots of cardiac glycosides have been studied. Satisfactory results were obtained with following appropriate factors:

1. Adsorbent—Neutral active alumina (III) with particle sizes of 160—200 mesh.
2. Thickness of layer—1 mm.
3. Solvent system—Mixture of chloroform-methanol (99:1); (95:5); xylene-methyl ethyl ketone (1:1); Chloroform-dioxane-n-butanol (70:20:5) and ether.
4. Angle of inclination by the plate: 5—10°.
5. Distance between samples—1 cm.
6. Spray reagent—Kedde and Raymond reagent.

According to the results so far obtained, it is considered that thin layer chromatography can be used as an effective and rapid method for cardiac glycosides, especially monoglycosides and aglucones.