

纸上色谱

及其在中草药成分分析中的应用

林启寿 编著

科学出版社

纸 上 色 谱

及其在中草药成分分析中的应用

林启寿 编著



科 学 出 版 社

1 9 8 3

内 容 简 介

本书介绍纸上色谱法的基本原理和操作技术，并按中草药成分的化学类型详细地讨论了生物碱类、糖类和糖醇类、黄酮类及其类似物、萜衍生物类、强心甙类、皂甙及皂甙元类等的纸上色谱的特点和应用实例。列举了大量文献数据，介绍了各类成分的化学结构与 R_F 值的关系等。

本书可供从事中草药研制的专业人员、医院药房和从事生化、医药、化学的工作人员，以及大专院校师生等有关人员参考。

紙 上 色 谱

及其在中草药成分分析中的应用

林启寿 编著

责任编辑 张英娥

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1983年2月第一版 开本：787×1092 1/32

1983年2月第一次印刷 印张：16 3/4

印数：0001—4,050 字数：381,000

统一书号：13031·2146

本社书号：2934·13-4

定价：2.60 元

54.6471

16

前 言

KG10/03

纸上色谱法从1944年创立以来，应用广泛，发展迅速。为了适应不同性质的各类成分的层离需要，具体方法千变万化，几乎成为生物及化学学科中一种不可缺少的实验手段。特别对于中草药成分的化学学科，由于成分复杂，许多成分的含量比较少，纸上色谱法能够协助解决许多过去不易用普通方法所能解决的问题。该法不仅可供中草药中复杂成分的分离、检识和含量测定，还可能作到少量成分的提取精制，甚至对未知成分结构的推测均有一定的应用价值。许多规律性的东西已能初步总结，并渐臻成熟。再者，为了发掘整理祖国医药宝库，寻找中草药的有效成分，其中水溶性成分，或亲水性强的成分，很可能也是重要的有效成分。对水溶性或亲水性强的成分的分析，尽管纸上色谱比薄层层离存在费时长、易拖尾等缺点，但有它的独到之处。在今后中草药的研究中，纸上色谱势必得到快速发展，成为重要工具之一。著者林启寿同志生前鉴于这种需要与可能，通过文献查阅，结合他本人工作中的心得，将中草药中主要类型成分的纸上色谱法作一小结，加以综合性讨论（有关蛋白质、氨基酸的纸上色谱法已有不少专著介绍，本书从略）。1966年已完成初稿，由于林彪、“四人帮”多年对科技出版事业的破坏，未能及时出版。林启寿同志于1978年再次进行修编，不幸，他于1978年8月病逝。我教研室李荣芷、舒永华、何云庆同志遵其遗愿，将其未完部分，尽量尊重原稿意见，整理定稿。由于我们经验不足，水平有限，书中难免存在一些错误，殷

切希望读者批评指正。本书承中国人民解放军军事医学科学院蒋滋慧、卢涌泉、马立人同志审阅，在此表示深切感谢。

北京医学院植物化学教研室

1979年6月

目 录

第一章 纸上色谱法的原理和操作技术	(1)
一、化合物的分子结构与其 R_F 值间的关系	(5)
(一) 与所接触的两相溶剂间的比例量	(5)
(二) 分配系数	(7)
二、 R_F 值与未知物的鉴定	(22)
(一) 混合糖类的单向层离	(24)
(二) 混合氨基酸类的双向纸上色谱法	(27)
三、 R_F 值与化学反应结合	(29)
四、 R_F 值与光谱、质谱分析结合	(31)
五、纸上色谱的操作技术	(31)
(一) 灵敏度	(31)
(二) 供层离用的样品溶液	(32)
(三) 滤纸	(33)
(四) 溶剂	(35)
(五) 点样	(39)
(六) 操作法及仪器装置	(41)
(七) 显色	(49)
(八) 色点	(51)
(九) R_F 值的测量	(53)
(十) 层离后斑点的剪洗技术	(54)
(十一) 纸上色谱法定量	(55)
六、双向纸上色谱法	(56)
七、单向多次层离法	(57)
八、反相纸上色谱法	(58)

九、滤纸的预处理	(60)
十、制备型纸上色谱法	(61)
十一、纸上色谱重量分析法	(62)
十二、离子交换纸上色谱法	(64)
十三、吸附纸上色谱法	(65)
十四、纸上色谱法在中草药成分研究中的应用	(66)

第二章 生物碱类成分的纸上色谱..... (69)

一、滤纸不经预处理的方法	(71)
(一) 中性溶剂系统法	(71)
(二) 碱性溶剂系统法	(74)
(三) 酸性溶剂系统法	(76)
(四) 季铵盐类生物碱的纸上色谱	(85)
二、滤纸经预处理的方法	(88)
(一) 滤纸用盐类溶液预先处理法	(88)
(二) 滤纸用缓冲剂预先处理法	(93)
(三) 滤纸浸有固定液相法	(101)
三、其他方法	(119)
四、系统分离检识法	(126)

第三章 糖类和糖醇类的纸上色谱 (133) |

一、糖类的纸上色谱	(133)
(一) 溶剂系统	(133)
(二) 糖类纸上色谱需要注意的问题	(153)
(三) 显色剂	(155)
二、糖醇类的纸上色谱	(162)
三、应用纸上色谱法研究中草药成分中有关糖类的 举例	(166)

第四章 黄酮类及其类似物的纸上色谱 (171)

- 一、溶剂系统 (173)
 - (一) 中性溶剂系统 (173)
 - (二) 酸性溶剂系统 (174)
- 二、显色剂 (215)
 - (一) 于紫外光照射下观察 (216)
 - (二) 碱性试剂 (216)
 - (三) 金属盐类试剂 (219)
 - (四) 乙酸镁试剂 (221)
 - (五) 酰氯亚胺类试剂 (222)
 - (六) Erlich试剂 (223)
 - (七) 对甲苯磺酸试剂 (223)
 - (八) 其他反应 (223)
- 三、应用纸上色谱法研究植物中黄酮类的方法
 举例 (224)

第五章 蒽衍生物类的纸上色谱 (239)

- 一、羟基蒽醌衍生物的纸上色谱 (239)
 - (一) 中性溶剂系统法 (239)
 - (二) 酸性溶剂系统法 (253)
 - (三) 非水溶剂系统法 (256)
 - (四) 反相纸上色谱法 (257)
- 二、蒽醌还原衍生物的纸上色谱 (257)
- 三、蒽甙类的纸上色谱 (261)
- 四、蒽衍生物类的纸上显色反应 (263)
 - (一) Bornträger 反应 (264)
 - (二) 乙酸镁试剂 (265)
 - (三) 对亚硝基二甲基苯胺试剂 (266)

(四) 氢硼化钠-二甲基甲酰胺试剂	(266)
(五) 光谱分析	(268)
五、应用纸上色谱法研究植物原料中萜衍生物类 成分的举例	(270)
第六章 强心甙类的纸上色谱	(274)
一、强心甙类的纸上色谱法	(276)
(一) 滤纸预经固定液相处理	(276)
(二) 滤纸不经固定液相处理	(291)
(三) 反相纸上色谱法	(300)
二、强心甙类的纸上显色反应	(304)
(一) 改进的 Raymond 试剂	(305)
(二) 改进的 Kedde 试剂	(305)
(三) 三氯乙酸试剂	(306)
(四) 三氯化锑试剂	(309)
(五) Toller 氏试剂	(309)
三、植物原料中强心甙类成分研究中纸上色 谱法应用的举例	(310)
四、植物药品中 C_{21} 甙体成分的纸上色谱	(324)
第七章 皂甙及皂甙元的纸上色谱	(335)
一、皂甙及皂甙元的纸上色谱	(335)
(一) 皂甙类	(335)
(二) 甙体皂甙元	(340)
(三) 三萜式皂甙元	(347)
二、皂甙和皂甙元的纸上显色反应	(357)
(一) 利用溶血作用而显色	(357)
(二) 三氯乙酸试剂	(358)

(三) 三氯化锑和五氯化锑试剂	(358)
(四) 芳香醛类试剂	(361)
(五) Wagner法	(361)
(六) Halphen-Hicks 反应	(362)
(七) Noller反应	(362)
(八) 甾体皂甙元与硫酸的反应	(362)
(九) 其他反应	(364)
三、应用纸上色谱法研究植物原料中皂甙类成分的举例	(364)
第八章 香豆精衍生物类的纸上色谱	(369)
一、滤纸不经预处理法	(370)
(一) 酸性溶剂系统	(370)
(二) 中性溶剂系统	(376)
(三) 碱性溶剂系统	(377)
二、滤纸预先处理法	(380)
(一) 滤纸预先以缓冲溶剂处理法	(380)
(二) 滤纸以固定液相预先处理法	(382)
三、显色剂	(383)
四、应用纸上色谱法研究植物原料中香豆精类衍生物成分的举例	(384)
第九章 酚及酚酸类的纸上色谱	(392)
一、酚和酚酸类纸上色谱法及其 R_F 值	(392)
二、酚、酚酸及其衍生物的纸上显色	(407)
三、研究植物体内酚和酚酸类成分时纸上色谱法应用的举例	(409)

第十章 不挥发性植物酸类的纸上色谱 (413)

一、不挥发性植物酸类的纸上色谱法 (413)

(一) 酸性溶剂系统法 (414)

(二) 碱性溶剂系统法 (420)

(三) 植物酸类的双向纸上色谱法 (424)

(四) 灯芯式纸上色谱法 (424)

(五) 讨论几种酸的 R_F 值与分离 (425)

二、植物酸类的纸上显色反应 (428)

(一) 植物酸的共同显色反应 (428)

(二) 植物酸的特殊反应 (430)

三、植物原料中植物酸类成分研究时, 纸上色谱法应用的举例 (433)

第十一章 植物挥发性成分的纸上色谱 (440)

一、挥发性醇类的纸上色谱 (440)

(一) 3,5-二硝基苯甲酸酯类 (441)

(二) 硝基酚酸酯类和联苯二甲酸酯类 (443)

(三) 黄原酸酯类 (445)

(四) 邻氨基苯甲酸酯类 (448)

(五) 氨基甲酸酯类 (449)

二、挥发性醛和酮类的纸上色谱 (451)

(一) 制成 2,4-二硝基苯腙衍生物再行层离法 (451)

(二) 亚硫酸氢钠加成产物的纸上色谱法 (458)

(三) 直接纸上色谱法 (458)

三、挥发性酯的纸上色谱 (461)

四、挥发油成分的反相纸上色谱 (462)

五、挥发油及其成分的纸上显色反应 (464)

第十二章 脂类的纸上色谱 (469)

一、单脂类的纸上色谱	(472)
二、脂肪酸类的纸上色谱	(476)
(一) 较低级脂肪酸类的纸上色谱	(477)
(二) 高级脂肪酸类的纸上色谱	(482)
三、复脂类的纸上色谱	(488)
四、脂类成分的纸上显色反应	(500)
(一) 酯类成分的显色反应	(500)
(二) 甾类成分的显色反应	(503)
(三) 不饱和成分的显色反应	(504)
(四) 脂肪酸类的显色反应	(504)
(五) 磷脂类含氮部分的显色反应	(506)
(六) 缩醛磷脂的显色反应	(507)
五、植物原料中脂类成分研究中纸上色谱法应用 的举例.....	(508)
中草药化学成分英汉名词索引	(512)

第一章 纸上色谱法的原理和操作技术

俄国植物学家 M.C. Ивер 在研究分离植物色素的过程中, 于 1903 年首先创造了色谱法, 又称为层离法。这是一种根据不同结构或性质的化合物具有不同吸附性能的原理, 以分离复杂混合物中各种成分的物理化学方法。对于近代化学科学的发展起了深刻和巨大的影响。

1939 年 Syngé^[1] 制得了许多氨基酸的乙酰化衍生物, 它们在水和氯仿中的分配系数多不相同, 所以想利用这种性质, 设计出分离脂肪族一元氨基酸类混合物的方法。Martin 以往曾应用逆流提取器精制维生素类而获得成功, 但这样的提取器不适用于水和氯仿分配系统的乙酰基氨基酸类的分离。1941 年他们^[2]合作, 改进了 Martin 原来的装置, 能适用于羊毛水解产物中某些氨基酸的分离, 可惜结果并不大满意, 主要困难是在提取器中分散相的颗粒太小, 于短时间内就达到平衡状态很难得到两相间所需要的相对的移动作用, 分离也就不会完全。经过改进, 采用固定一个液相为静止相 (也称固定液相), 使另一不混溶的液相为移动液相, 可以自由流过静止相。硅胶能用以达到此种目的, 作为支持剂或称载体, 因为硅胶可以吸收水分, 作为固定液相并能任氯仿自由流过而不会影响其所吸收的水分。从而他们^[3]在 1941 年报道了所谓分配色谱法。

分配色谱法是根据上述的想法在 Ивер 色谱法的基础上发展而成的。其主要原理是根据化合物在两种不混溶的溶剂中 (即所谓两种不同的液相) 能够按照其分配系数而产生一

1105171

定的分配比例。其中一相（水）是固定在支持剂上称为固定液相或静止液相，另一液相（有机溶剂）在支持剂（装在玻筒中含有固定液相）上通过，称为移动液相。当移动液相在支持剂上移动时，一方面能将留在支持剂上端欲分离的物质带往下移动，同时与吸收在支持剂内的固定液相形成分配的二液相。物质由于在二液相间的分配比例各有一定，因而在玻筒内支持剂中向下移动的速度也不会一样，在水相中分配量多的物质，移动要慢些，在移动相中分配量多的物质自然会随移动液相向下移动得快。再按照 U_{ber} 色谱法的技术进行操作，混合物就不难得到分离。

淀粉、纤维素等均具有类似硅胶的性质，能够吸收一定量的水分而让移动液相自由流过，所以它们都可以因为支持剂而进行分配色谱。例如 Gordon, Consden 和 Martin^[4] 在硅胶作支持剂的分配柱上，不能很好地将移动慢的乙酰基氨基酸类相互分离，于是改用纤维素作支持剂。它是取筒状的滤纸卷吸收水分为支持剂和固定液相，以代替硅胶装在玻筒中，再按相似的方法操作，但需在密闭器内进行，器内的空气也预先用水气饱和，如此就能得到满意的分离效果。进一步为了简化操作，改用滤纸条代替滤纸卷，在纸条的一端加有欲分离的物质，同样固定水相，而使移动液相因毛细管现象在纸条上移动，从而进行了分配色谱操作，或者更简便地将纸条悬在槽中，槽内盛有以水饱和的有机溶剂，将槽和滤纸条全部放在密闭的容器中，器内的空气曾以水和有机溶剂的蒸气所饱和，也同时能达到分配色谱法的目的，由此又诞生了纸上色谱法的分析技术。

构成滤纸的纤维素，分子中有许多羟基，亲水性很强，能够吸收22%左右的水分，其中大约6%的水分与纤维素结合成复合物降低了在纸上扩散的速度，形成了固定液相。而

移动液相(系与水不混溶的有机溶剂,也包括与水能混溶的有机溶剂如乙醇、丙醇、丙酮甚至水)因毛细管现象在纸上展开移动与这一部分固定在纸纤维上的水形成两相,产生了分配现象。经过一段时间的展开后,化合物依其在两相间分配系数的不同,随着移动液相在纸上移动了不同的距离,达到了相互分离的目的。

化合物经层离后在纸上移动的位置,可以用 R_F 值来表示。例如图 1·1。化合物甲经层离后在纸上移动的距离

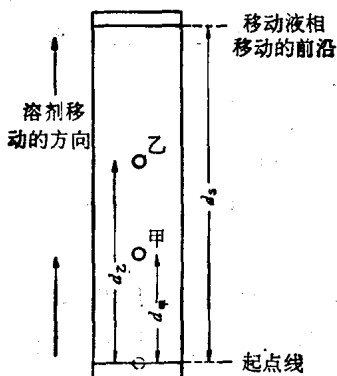


图 1·1 R_F 值计算示意图

为 $d_{\text{甲}}$, 化合物乙移动的距离为 $d_{\text{乙}}$, 而溶剂(移动液相)走动的距离为 d_s , 则化合物甲的 R_F 值为

$$R_F = d_{\text{甲}}/d_s$$

化合物乙的 R_F 值则为

$$R_F = d_{\text{乙}}/d_s$$

也就是说, 只要构成两相的溶剂性质和组成不变, 则各种化合物在纸上色谱中位置的移动和溶剂先端前进的速度(即溶剂移动的距离)有着一定的比值, 所以 R_F 值就是比移值。它可通过米尺在层离后的纸条上测量计算而得。例

如化合物 A 的 $R_F = 0$ ，即其在纸上不随溶剂的展开而移动，仍留在原有的位置上；化合物 B 的 $R_F = 0.10$ ，表示 B 移动很慢，仅移动到溶剂前沿的 $1/10$ 处；化合物 C 的 $R_F = 0.80$ ，表示 C 占据了溶剂前进 $8/10$ 的距离……等。这种 R_F 值的主要决定因素，是在其层离条件下两相间化合物的分配系数。以化合物甲为例，其分配系数 (α)：

$$\alpha = \frac{\text{固定液相含有的甲量 (克/1000毫升)}}{\text{移动液相含有的甲量 (克/1000毫升)}}$$

如果甲在水中分配量大， R_F 值必定小，在纸上移动的距离短，因而 $d_s - d_{\text{甲}}$ 的距离就会长些，它们与其分配系数间的关系应该是

$$\frac{1}{\alpha} \propto \frac{d_{\text{甲}}}{d_s - d_{\text{甲}}}$$

另外从两相间体积比来看，体积愈大，甲在其中的分配量也将愈多，假若以

A_L 代表移动液相的横切面面积

A_s 代表固定液相的横切面面积

$$\text{则 } \frac{A_L}{A_s} \propto \frac{d_{\text{甲}}}{d_s - d_{\text{甲}}}$$

合并上述二种因素，则

$$\frac{d_{\text{甲}}}{d_s - d_{\text{甲}}} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{A_L}{A_s}$$

$$\text{或 } \frac{d_s - d_{\text{甲}}}{d_{\text{甲}}} \approx \alpha \cdot \frac{A_s}{A_L}$$

$$\text{因为 } R_F = \frac{d_{\text{甲}}}{d_s}$$

$$\text{则 } \frac{1}{R_F} = \frac{d_s}{d_{\text{甲}}} = 1 + \frac{d_s - d_{\text{甲}}}{d_{\text{甲}}}$$

$$= 1 + \frac{\alpha A_s}{A_L} = \frac{A_L + \alpha A_s}{A_L}$$

$$\text{或 } R_F = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_s}$$

$$\text{或 } \alpha = \frac{A_L}{R_F \cdot A_s} - \frac{A_L}{A_s} = \frac{A_L}{A_s} (1/R_F - 1)$$

在同一试验情况下，两相间体积比是一常数，所以能够影响到 R_F 值的主要因素只是分配系数了。Martin^[5]曾作过一些氨基酸的纸上色谱测出的 R_F 值，按照以上公式改算出其分配系数，以其与由 England 和 Cohn^[6] 方法实际测得的分配系数相比较，结果二者基本上一致，证明了决定 R_F 值的主要因素是分配系数。

滤纸纤维与化合物间也可能存在着吸附现象，从而影响到层离时的 R_F 值^[7]，特别对于多数色素和染料类，吸附现象是比较显著的。此外，滤纸纤维还可能呈显似弱阳离子交换剂的作用，与某些化合物，例如羧酸类在层离过程中同时产生离子交换反应，自然也会影响到 R_F 值，以及其他已知或未知的因素都可能或多或少地影响到化合物的 R_F 值，但是这些都不是主要的，在一般情况下是可以略而不计的。

一、化合物的分子结构与其 R_F 值间的关系

除去一些次要的因素，决定化合物在纸上色谱中的 R_F 值应该是以下几方面。

(一) 与所接触的两相溶剂间的比例量

如果固定液相（水相）比例量大，偏于亲脂性化合物的 R_F 值就会小，偏于亲水性化合物的 R_F 值就会大一些；移动液相（有机溶剂相）比例量大，所得的结果正好与前者相反。这种