

# 原儿茶醛分析方法的研究

## II. 四季青和丹参中原儿茶醛的测定

杨树德 周同惠

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

**摘要** 应用间苯三酚和原儿茶醛在浓硫酸存在下的显色反应, 结合薄层层析法建立了测定四季青和丹参中原儿茶醛的分析方法。本法简便准确, 原儿茶醛在生药中的含量为万分之几而其测定结果的变更系数小于2%。

原儿茶醛为近年来从四季青 (*Ilex chinensis* Sims)<sup>(1)</sup>和丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge)<sup>(2)</sup>中分离的有效成分, 可增加冠脉血流量。前文<sup>(3)</sup>报告了间苯三酚和原儿茶醛在浓硫酸存在下的比色方法。本文报告应用该方法于四季青和丹参中原儿茶醛的测定。生药的提取以及薄层层析条件的研究系以四季青为对象进行的, 实验表明, 该条件也完全适用于丹参中原儿茶醛的测定。

### 实 验 部 分

#### (一) 生药的提取条件

试用了乙醇以及氯仿-甲醇(1:1)等溶剂冷浸的提取方法, 结果因原儿茶醛在生药中含量甚低而同时又提取出了大量杂质, 如不进一步净化, 则根本无法用薄层层析进行分离。用乙醚浸提, 则生药中的原儿茶醛大部分不能提出。因原儿茶醛系水溶性成分, 遂试用了以水浸提后继用有机溶剂萃取的方法。结果表明, 这种方法可除去许多其他成分而使原儿茶醛在薄层上得到满意的分离。故首先研究了与此有关的提取条件。

**1. 不同溶剂的提取效果** 于10 ml分液漏斗中, 加入2 ml蒸馏水, 准确加入约10  $\mu$ g原儿茶醛, 分别用3 ml不同溶剂提取一次, 分出有机相, 于水浴上挥去溶剂, 依法测定<sup>(3)</sup>, 由此计算所得原儿茶醛在两相中的分配系数对下列溶剂分别为: 氯仿: 0.069, 甲酸乙酯: 0.77, 苯: 0.016, 乙醚: 2.5。

**2. 盐析作用对乙醚提取效率的影响** 上述结果表明, 乙醚的提取效果较好, 但仍不理想, 一次回收率仅80%左右。为此, 进行了用盐析作用来提高乙醚提取效率的实验: 于10 ml分液漏斗中, 加入1.5 ml水和0.5 ml饱和氯化钠水溶液\*, 准确加入约10  $\mu$ g原儿茶醛, 加入3 ml乙醚。振摇, 分出乙醚层, 水相继用3 ml乙醚提取数次并分别收集每次提取的乙醚液。于温水浴上挥去乙醚, 再依法测定并计算回收的原儿茶醛量; 同时用不加饱和氯化钠溶液者按同法操作作为对照。结果如表1所示: 加入饱和氯化钠溶液可显著提高提取效率, 提取两次的总回收率已达98.5%。但其后的实验表明, 按此条件提取生药水煎液时乳化现象严重, 操作困难。考虑到上述实验系在分液漏斗中进行, 为完全分离水相以避免带入食盐(若带入食盐则显色后有丁达尔现象, 影响测定), 完全有可能将前一次的乙醚液部分地带到

本文于1980年5月26日收到。

\* 饱和氯化钠溶液先在分液漏斗中用乙醚洗涤4次。

下一次的乙醚液中,因此,实际上在氯化钠存在下用乙醚提取原儿茶醛的回收率可能比所测得者为高,同时,加大乙醚用量也将有助于提高原儿茶醛的回收率,为此,进行了如下的实验:于 20 ml 磨口具塞刻度试管中加入 3 ml 水、1 ml 饱和氯化钠溶液及不同量原儿茶醛,准确加入 10.0 ml 乙醚,用少量水湿润磨口塞,密塞,振摇约 3 分钟,静置,准确吸取上清液 5.0 ml 置另一 20 ml 刻度试管中,加入数粒小沸石,热水浴上挥去溶剂后依法测定,计算回收率。结果表明,在此条件下原儿茶醛已定量回收,测定四次的平均回收率为 99%。故以后测定生药时采用此条件。

表 1 盐析作用对乙醚提取效率的影响

提 取 序 数		1	2	3	4	5	6	累 计
原儿茶醛回收量 (%)	加入 NaCl	88.0*	10.5	0.8	0.5	0	0	99.8
	不加 NaCl	76.4	15.6	2.5	1.5	1.2	0.8	98.0

\* 分配系数: 4.9

**3. 水提生药的条件** 准确称取四季青叶粉(40目)约 0.2 g, 置 20 ml 磨口具塞刻度试管中,加入 3 ml 蒸馏水,轻塞,置沸水浴上不同时间,冷至室温,加入 1.0 ml 饱和氯化钠水溶液,准确加入 10.0 ml 乙醚,用少量水湿润磨口塞,塞紧,猛力振摇约 3 分钟,静置,待上层乙醚液澄清后,准确吸取乙醚液 5.0 ml 至 25 ml 磨口具塞鸡心瓶中,加入数粒小沸石,置热水浴上挥干溶剂,冷却,残渣用 0.20 ml 乙醇溶解,取 20  $\mu$ l 点于硅胶 G 薄层上,并按下文所述方法展开和洗脱定量。结果表明,加热 1~2 小时,测定结果相同,冷浸 48 小时,测定结果明显偏低。故以后固定生药加入水后于沸水浴上加热约 1.5 小时。

## (二) 薄层层析条件

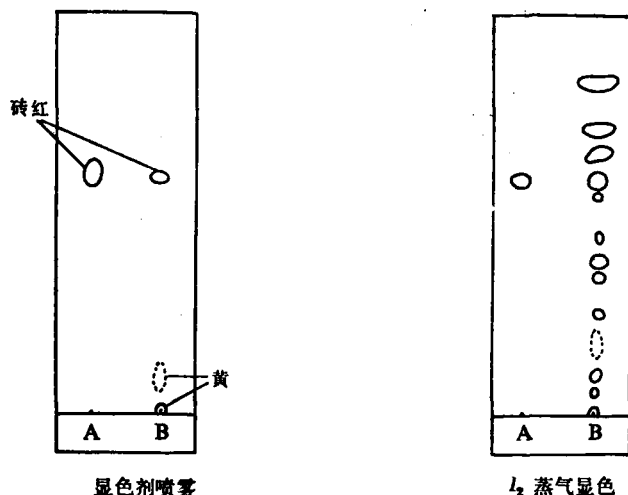
**1. 薄层的制备** 称取硅胶 G (青岛海洋化工厂,薄层层析用,粒度 10~40 $\mu$ m) 5 g,加水约 14 ml,调成匀浆后铺板(5.5 $\times$ 20 cm)4~5 块,室温阴干后于 105 $^{\circ}$ C 活化半小时。

**2. 层析条件** 将以上乙醇溶解之生药浓缩提取液少量点于薄层一侧,另一侧点纯品适量作为对照。试用不同溶剂系统展开,先用碘蒸气显色,标记出斑点,待碘大部分挥去后,喷以 2% 间苯三酚乙醇溶液和浓硫酸的 1:1 冷混合液,记录斑点情况。结果表明,展开剂以氯仿-甲醇-甲酸(90:8:2)效果最好,而用间苯三酚-硫酸试剂喷雾显色,观察到的斑点明显少于碘蒸气显色所观察到的色点(图 1),这证明该显色剂的特异性较强。原儿茶醛在薄层上自然放置时呈现暗点,但即使放置过夜对测定也无影响,故定量时即用此法定位。

**3. 薄层回收试验** 用微量注射器准确吸取原儿茶醛标准溶液适量,点样,依法展开,于室温放置至可观察到原儿茶醛的发暗斑点(其中有三次展开后放置过夜,测定结果相同),然后按下文“拟定方法”一节自“将其刮入具塞离心管中”起依法测定,计算回收率,结果表明,10 次测定的平均回收率为 98.9%。

## (三) 拟定方法和加料回收试验

根据以上实验,确定生药的分析方法如下:准确称取样品(40目)0.2~0.3 g,置 20 ml 磨口具塞刻度试管中,加入 3 ml 蒸馏水浸透,轻塞,置沸水浴上加热约 1.5 小时并不时摇动,冷至室温,加入 1.0 ml 饱和氯化钠溶液,准确加入 10.0 ml 乙醚,用少量水湿润磨口塞,密塞,猛力振摇约 3 分钟,静置。待上层乙醚液澄清后,准确吸取 5.0 ml 至 25 ml 磨口具塞鸡心瓶中,加入数粒小沸石,置热水浴上挥去溶剂,准确加入甲醇-氯仿混合液(1:1)



A. 原儿茶醛纯品  
B. 生药浓缩提取液  
展开剂  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-HCOOH}$   
(90:8:2)

图 1 四季青浓缩提取液的薄层层析

0.20 ml, 密塞, 振摇, 使残渣全部溶解。准确吸取此溶液  $20\sim 30\ \mu\text{l}$  点在薄层上, 使成一直线, 同时以原儿茶醛纯品作为对照, 用  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-HCOOH}$  (90:8:2) 展开。取出, 放置至显出原儿茶醛的发暗色带 (约半小时左右), 将其刮入具塞离心管中, 准确加入 2% 间苯三酚乙醇溶液和浓硫酸的 1:1 冷混合液 5.0 ml, 密塞, 猛力振摇片刻, 置  $50^\circ\text{C}$  水浴上加热 5 分钟, 并振摇数次。取出, 流水冷至室温, 离心, 倾取上清液并以显色剂 (同样置  $50^\circ\text{C}$  水浴上加热 5 分钟) 为空白, 用 1 cm 吸收池, 于 496 nm 处测定, 并据标准曲线计算含量。

对所拟方法用加料回收试验进行了验证, 结果表明, 纯品的平均回收率为 96.6%。

#### (四) 样品测定结果

按所拟方法测定四季青样品中原儿茶醛的含量七次, 结果为:  $0.0547 \pm 8.54 \times 10^{-4}\%$  (标准偏差), 变异系数为 1.56%。测定的几批四季青和丹参中原儿茶醛的结果见表 2。

表 2 几批样品的测定结果

样 品 名 称	产 地 及 外 观	生药中原儿茶醛含量(%)
四季青叶	浙江, 陈叶, 黑褐色	0.034
		0.033
四季青叶	浙江, 新鲜干叶, 暗绿色	0.055
		0.055
丹 参	河北, 兴隆	0.038
		0.037
丹 参	四 川	0.040
		0.038

## 讨 论

一、实验结果表明, 原儿茶醛在生药中的含量甚低而测定结果的精密度仍然较好, 主要为显色反应本身的特异性较强而又相当稳定之故。因此, 只要控制适当条件以保证生药中的

原儿茶醛得到定量的提取、层析和洗脱，就能得到较为满意的分析结果。事实上，由于原儿茶醛在生药中的含量甚低，有时层析后的发暗色带并不十分清晰，但因在该色带上下的其他成分和显色剂无反应，故此时可将稍大于相应纯品部分的硅胶刮下定量。实验证明，这种情况对测定结果没有影响。

二、具有邻苯二酚结构的化合物易被空气氧化，这可能就是原儿茶醛(3,4-二羟苯甲醛)在硅胶 G 薄层上放置时出现暗点的原因。但放置过夜对测定结果并无影响，原因可能是由于原儿茶醛氧化产物的醛基部分仍然存在，且它和间苯三酚-硫酸试剂显色时在给定波长下的吸收系数与原儿茶醛的吸收系数比较接近。

三、进行条件实验时，乙醚提取液挥干后的残渣系用乙醇溶解，但以后发现有的样品按同样操作所得残渣在乙醇中不易溶解，故最后拟定的方法规定用 1:1 的氯仿-甲醇溶解残渣。

四、测定结果表明，河北兴隆的丹参和四川产丹参中原儿茶醛含量基本相同，但同一产地的四季青，呈黑褐色的陈叶与呈暗绿色的干鲜叶比较，前者中的原儿茶醛含量几乎仅为后者的二分之一，可见原儿茶醛的含量与四季青生药保存的情况关系很大。本文报告的方法，除可应用于测定生药中原儿茶醛的含量以外，亦可用于测定制剂中原儿茶醛的含量。

#### 参 考 文 献

1. 王明时：四季青化学成分的研究 II. 药学资料(南京药学院)(3):9, 1973
2. 姚俊严等：丹参中有效成分原儿茶醛的分离鉴定. 南京药学院学报, (1):74, 1979
3. 杨树德：原儿茶醛分析方法的研究 I. 原儿茶酸存在下测定原儿茶醛的比色方法. 药化学报 16:190, 1981

## STUDIES ON THE ANALYSIS OF PROTocatechualdehyde

### II. DETERMINATION OF PROTocatechualdehyde IN *ILEX CHINENSIS* SIMS AND *SALVIA MILTIORRIZA* BGE

Yang Shude and Zhou Tonghui

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy  
of Medical Sciences, Beijing*)

#### ABSTRACT

A method for the determination of protocatechu aldehyde in *Ilex chinensis* Sims and *Salvia miltiorrhiza* Bge was developed by using phloroglucinol—sulfuric acid as the colorimetric reagent and TLC as the separation means. The method is steady and reproducible: Seven determinations of protocatechualdehyde in crude drug gave a result of  $0.0547 \pm 8.54 \times 10^{-4}\%$  with a variation coefficient of 1.56%.

The analytical procedure is as follows: Put 0.2~0.3 g pulverized sample of crude drug in a 20 ml glass-stoppered test-tube. After having soaked the sample with 3 ml H<sub>2</sub>O, place the test tube in a boiling waterbath for an hour and a half. Cool, add 1ml of saturated sodium chloride solution and 10.0ml of ethyl ether, stopper tightly (wet the stopper first) and shake the mixture for about three minutes. After the supernatant solution has cleared up, transfer 5.0 ml into a glass-stoppered pear-shaped flask and add several small chips of pumice. Put the flask in a warm waterbath to evaporate the solvent. Cool, add 0.20 ml of 1:1 MeOH-CHCl<sub>3</sub>, stopper tightly, shake the flask until the residue has been completely dissolved. Put 20~30  $\mu$ l of this solution on a silica gel G plate (5.5×20 cm) in the form of a line, at the same time spot a pure protocatechualdehyde sample as the reference standard and develop with CHCl<sub>3</sub>-MeOH-HCOOH (90:8:2). Then, take out the plate from the chromatographic chamber and let it stand for about half an hour to allow the dark band of protocatechualdehyde to show up. Scrape this band into a 10 ml glass-stoppered centrifuge tube, add 5.0ml of 1:1 cold mixed solution of 2% phloroglucinol solution (in ethanol) and concentrated sulfuric acid. Shake the mixture vigorously for a moment and put it together with a reagent blank in a waterbath at 50°C for 5 minutes. Cool with cold water and centrifuge the mixture for several minutes. Determine the absorbance of the supernatant liquid at 496 nm in an 1 cm cell against the reagent blank. Calculate the content of protocatechualdehyde from a calibration curve.