



利用颜色反应鉴别儿茶酚及其保护类型

孟明民, 徐鹏舒, 李如雯, 胡碧煌, 刘中强

(海南大学 药学院/热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了探索一种简便的鉴别儿茶酚及其保护基类型的方法, 比较了苯酚与儿茶酚在水溶液里的颜色反应及其在可见光区域的吸收谱, 测试了 30 余种酚类物质与 FeCl_3 在 TLC 硅胶板上的颜色反应, 对比了 4 种氯化物与酚类物质在硅胶板上的显色效果, 建立了酚类浓度梯度与样品点显色深浅的关系, 最后研究了缩丙酮保护在稀 FeCl_3 乙醇溶液中分解的反应动力学。结果表明: 在 TLC 硅胶板上, 络合能力弱的酚类与 FeCl_3 不发生显色反应, 儿茶酚等具有强螯合能力的酚类可以发生颜色反应, 儿茶酚样品点显示的青(蓝)黑色来自于其与 Fe(III) 形成的一配位和二配位络合物, 与三配位络合物无关。由于作为路易斯酸的 FeCl_3 具有选择性脱保护的特性, 不同类型保护基保护的儿茶酚显色现象不同: 对弱酸不稳定的, 在室温缓慢显色; 对强酸不稳定的, 室温不显色在 110°C 烤板 5 min 后显色; 对强酸稳定的, 2 种条件下都不显色。在 4 种金属氯化物中, FeCl_3 是最佳的检测试剂, 酚类检测浓度最合适的范围为 $10 \sim 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 儿茶酚; 保护基; 三氯化铁; 硅胶板; 颜色反应

中图分类号: TS201.2; R914.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2024)02-0232-09

孟明民, 徐鹏舒, 李如雯, 等. 利用颜色反应鉴别儿茶酚及其保护类型 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(2): 232-240.

doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20220091

酚类是重要的次生代谢产物, 广泛分布于水果、蔬菜与谷物种子里。龙爪藜豆 (*Mucuna Pruriens*) 在我国主要分布于广西、贵州等地区, 仅广西的巴马瑶族自治县种植面积就已达 $1\ 333.3 \text{ hm}^2$, 其种子俗称猫豆, 既是当地民众喜爱的食品, 也是提取酚类化合物左旋多巴 (L-DOPA, 1, 图 1) 的主要原料^[1]。热带海洋生物沙堡虫 (*Phragmatopoma californica*) 分泌含 L-DOPA 的生物黏胶, 用于在水中黏附砂石建造防御性堡垒^[2]。L-DOPA 是治疗帕金森病最重要的药物, 被称作“黄金标准”^[3], 还被用于治疗肝昏迷。在科研上, L-DOPA 被广泛用于生物黏胶^[4]、表面涂层^[5-6]、功能材料^[7] 和抗帕金森病前药等前沿领域^[8-9]。L-DOPA 侧链含有一个儿茶酚基团, 容易发生氧化交联反应, 因此在化学修饰 L-DOPA 的过程中, 引入了多种儿茶酚保护方式, 如缩醛/酮, 烷氧羰基、硅醚、烷

醚、羧酸酯和硼酸酯^[10-13]。由于薄层色谱法 (TLC) 具有操作简单、检测用时短、价格低廉等优点, 已成为目前应用最广的分析技术之一, 为此还开发了大量适用于 TLC 的显色剂, 例如碘蒸汽, 茚三酮, 溴酚蓝^[14]。在水溶液中, 酚类物质可以与 FeCl_3 发生颜色反应, 因条件不同可以显示多种多样的颜色, 不利于分析判断酚类的结构与类型。2008 年, Liu 等^[10] 在制备缩丙酮保护的 L-DOPA 衍生物 (7) 时指出: 在 TLC 硅胶板上化合物 7 与 FeCl_3 在室温下不显色而加热条件下显色, 但该文章没有给出显色的原因与适用范围。本研究选择了 30 余种代表性的酚类化合物 (图 1), 拟测试它们与 FeCl_3 在硅胶板上的颜色反应, 结合苯酚与儿茶酚在水溶液中的颜色反应与在可见光区域的吸收谱, 阐明自由的与保护的酚类物质在 TLC 硅胶板上显色的化学机制, 优化检测条件并推广可检测

收稿日期: 2022-10-28

修回日期: 2023-03-28

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2019135); 国家自然地区科学基金项目 (21462104)

第一作者: 孟明民 (1990-), 男, 海南大学药学院 2014 级硕士研究生。E-mail: mingmin-meng@outlook.com

通信作者: 刘中强 (1974-), 男, 研究员, 硕士生导师。研究方向: 药物化学。E-mail: zqliu@hainanu.edu.cn

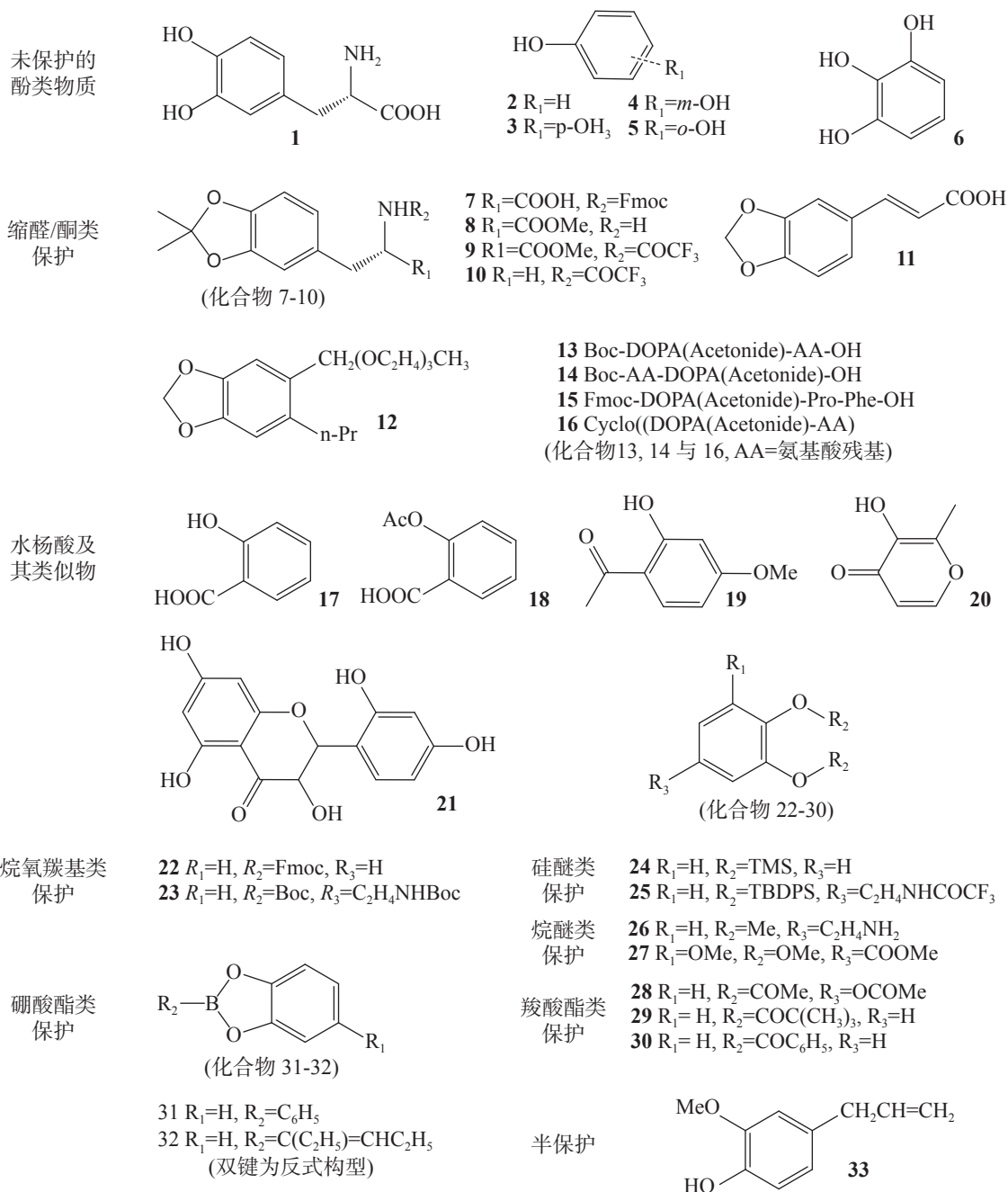


图 1 未保护的酚类与保护的酚类衍生物

儿茶酚保护基的范围,旨在为多酚类天然产物及其衍生物提供一种准确、简捷与价廉的鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 六水合三氯化铁、氯化亚铁、氯化铜、六水合三氯化铝、L-DOPA(1)、苯酚(2)、对苯二酚(3)、间苯二酚(4)、儿茶酚(5)、多巴胺、连苯三酚(6)、3,4-(亚甲二氧)肉桂酸(11)、水杨酸(17)、乙酰水杨酸(18)、丹皮酚(19)、麦芽酚

(20)、桑黄素(21)、2-(3,4-二甲氧基苯基)乙胺(26)、3,4,5-三甲氧基苯甲酸甲酯(27)、1,2,4-苯三酚乙酸酯(28)、(Z)-3-己烯基-3-硼酸儿茶酚酯(32)与丁香酚(33)等化合物购自阿拉丁试剂(上海)有限公司或上海泰坦科技股份有限公司。缩酮保护的 L-DOPA 与多巴胺衍生物,叔丁氧羰基(Boc)、9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、三甲基硅烷基(TMS)与叔丁基二苯基硅烷基(TBDPS)保护的儿茶酚等衍生物为实验室根据文献合成^[13, 15-16]。台式三用紫外线分析仪 ZF-1, GF254 型硅胶板购自

青岛海洋化工有限公司。

1.2 苯酚、儿茶酚与 FeCl_3 在水溶液中的颜色反应暨分光光度法分析 配制 $120 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯酚水溶液(记为 X)、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 水溶液(记为 Y)和 pH 调节溶液: $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液。配制待测液: 取一支 15 mL 的离心管, 准确加入 2.5 mL 溶液 X 与 2.5 mL 溶液 Y; 另取一定量 pH 调节溶液, 以蒸馏水调体积到 3.0 mL; 二者相混合, 得一系列 pH 不同, 但苯酚与 FeCl_3 浓度 ($37.5/6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 不变的待测液。采用类似方法, 配制了 2 个系列的 pH 不同, 但儿茶酚与 FeCl_3 浓度不变的待测液: $0.75/0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (记为 1 倍浓度) 和 $1.5/0.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (记为 2 倍浓度)。不添加 pH 调节溶液, 直接混合儿茶酚与 FeCl_3 的水溶液, 配制了 1、2、4、6、8、10 和 20.8 倍浓度的儿茶酚- FeCl_3 溶液。记录溶液颜色, 然后, 用分光光度计测量其在 $380 \sim 800 \text{ nm}$ 区域的吸收谱。

硅胶粉对显色反应的影响: 取苯酚- FeCl_3 ($37.5/6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 2.38, **a**)、儿茶酚- FeCl_3 ($0.75/0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.85, **b**) 与 ($0.75/0.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.15, **c**) 3 种溶液和蒸馏水(对照), 添加 GF254 硅胶粉 ($0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 涡旋 5 min 后离心, 观察颜色并测量水相 pH。

1.3 酚类化合物与金属氯化物在 TLC 硅胶板上的颜色反应 配制金属氯化物检测液: 称取六水合三氯化铁 (1.62 g , $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶于 100 mL 乙醇中, 得 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl_3 检测液; 采用类似方法, 分别制得 FeCl_2 、 CuCl_2 和 AlCl_3 检测液, 浓度均为 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

配制六浓度梯度酚类样品液: 称取待测酚类化合物, 溶于合适溶剂中, 得样品液 A ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); 取 0.50 mL 样品液 A, 添加 1.00 mL 溶剂稀释, 得样品液 B ($17 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); 采用类似方法, 制得浓度等比递减(公比 1/3)的样品液 C ($5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、D ($1.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 E ($0.62 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); 以纯溶剂为对照液 F ($0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

制备 6 浓度梯度样品点: 采用模板在 TLC GF254 硅胶板上画 6 个大小一样的圆(直径 3.9 mm, 面积 12 mm^2), 从左至右依次记为 A 至 F。用毛细管(内径 0.3 mm)移取 $0.7 \mu\text{L}$ 样品液 A(液柱

高 10 mm)点在 A 圆内, 形成样品点 A(单位面积载样量 $0.0029 \text{ mol}/\text{m}^2$); 采用类似方法, 吸取等量样品液 B、C、D、E 和对照液 F, 制得载样量等比递减的样品点 B、C、D、E 和对照点 F。

TLC 硅胶板上的显色方法: 用喷瓶均匀喷 FeCl_3 检测液到 TLC 板上, 室温晾干, 观察显色情况并拍照; 如需烤板, 将上述 TLC 板放入 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中加热 5 min。采用类似方法测试酚类物质与 FeCl_2 、 CuCl_2 和 AlCl_3 的颜色反应。鉴别 4 种酚类化合物的方法: 以 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酚类样品液在 TLC 板上点样, 在二氯甲烷(DCM)/甲醇(5%)混合液中展开, 依次采用紫外光(254 nm)照、室温下喷 FeCl_3 和 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 的方式进行检测。

1.4 不同温度下缩丙酮保护在 FeCl_3 检测液中的分解实验 取 50 mL 单口烧瓶, 加入六水合三氯化铁 (0.16 g , $0.60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、9.50 mL 无水乙醇与 0.50 mL 蒸馏水; 在油浴中预热到设定温度 (50 、 60 或 $70 \text{ }^\circ\text{C}$) 后, 加入缩丙酮化合物 10 (0.20 g), 搅拌并计时。每隔约 20 min 取 1.00 mL 混合溶液, 快速冷却终止反应; 旋蒸去除溶剂, 加水与 DCM 各 5.0 mL 并振荡; 取有机相 3.0 mL, 用无水 Na_2SO_4 干燥; 取 1.00 mL 上层清液, 去除溶剂后, 加 1.00 mL 乙腈提取; 采用 HPLC 分析化合物 10 的剩余量, 以准一级降解动力学曲线对其峰面积进行拟合。

2 结果与分析

2.1 苯酚或儿茶酚与 FeCl_3 在水溶液中的颜色反应和浓度、pH 与硅胶粉对显色的影响 苯酚- FeCl_3 ($37.5/6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水溶液在 pH 1.78 ~ 2.41 间显紫色(图 2-i, 表 1-i); pH 降低时, 混合液颜色极淡; pH 升高时, 显棕色。儿茶酚与 FeCl_3 的 1 倍浓度水溶液(图 2-ii, 表 1-ii)在 pH 4.00 ~ 5.53 间显青色, 在 pH 6.15 ~ 8.99 间显蓝黑色; 2 倍浓度水溶液在更低的 pH 即可显色(图 2-iii, 表 1-iii), 在 pH 3.2 时显青色, 在 pH 5.52 显蓝黑色; 在相同 pH 时, 2 倍浓度的颜色比 1 倍浓度的深很多。等比升高儿茶酚与 FeCl_3 的浓度对混合液的 pH 与颜色有显著影响(图 2-iv, 表 1-iv): 浓度升高, 混合液 pH 降低, 颜色加深。添加硅胶粉严重影响酚类与 FeCl_3 在水中的显色反应: 测试的 a、

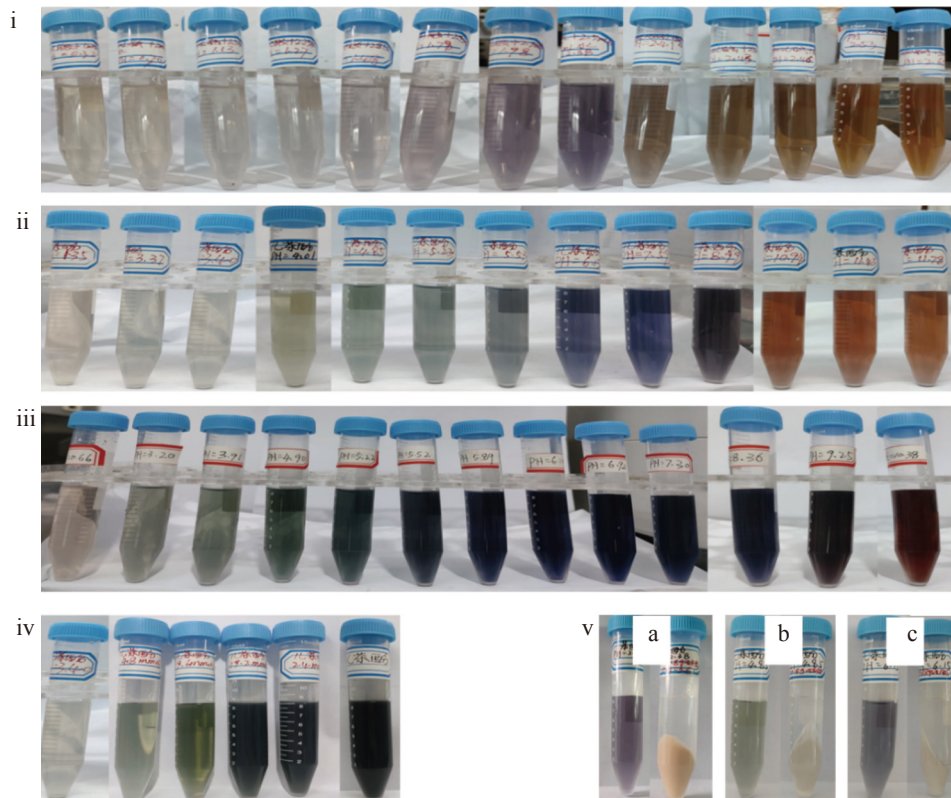


图 2 苯酚或儿茶酚与 FeCl_3 在水溶液中的颜色反应

不同 pH 的苯酚- FeCl_3 ($37.5/6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水溶液的显色结果(i); 不同 pH 的儿茶酚- FeCl_3 水溶液的显色结果(1 倍浓度, ii; 2 倍浓度, iii); 不同浓度倍数儿茶酚- FeCl_3 水溶液(从左至右依次为 1、2、4、8、10、20.8 倍)的显色结果(iv); 硅胶粉对显色反应的影响(v), 添加前(左管)和添加后(右管)。

表 1 苯酚或儿茶酚与 FeCl_3 在水溶液中的显色结果与对应的 pH 值

酚类	颜色与浓度和pH的关系											
苯酚(i)	pH	0.32	0.7	1.13	1.27	1.48	1.78	1.98	2.38	2.41	2.43	2.46 ~ 2.61
	颜色	极淡紫	极淡紫	淡紫	淡紫	淡紫	紫色	紫色	深紫	棕色	棕色	棕色
儿茶酚(ii)	pH	0.67	1.35	3.4	4.01	4.85	5.23	5.53	6.15	7.59	8.99	10.94 ~ 11.78
	颜色	极淡紫	极淡紫	极淡青	青色	青色	青色	深青	深蓝	深蓝	深蓝	棕红
儿茶酚(iii)	pH	0.66	3.2	3.91	4.9	5.22	5.52	5.89	6.1	6.92	7.3	9.25 ~ 10.38
	颜色	极淡紫	青色	青色	青黑	青黑	蓝黑	蓝黑	蓝黑	蓝黑	蓝黑	深棕红
儿茶酚(iv)	浓度 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.75		1.5		3.0		6.0		7.5		15.6
	pH 颜色	3.40	极淡青	3.32	青色	3.04	青色	2.66	青黑	2.57	青黑	2.22

b、c 3 种溶液的颜色都消失了; 经测量上层清液的 pH 值向对照液的 pH(5.9)偏移。

2.2 分光光度法测定儿茶酚与 FeCl_3 水溶液在可见光区域的吸收谱 在 pH 4.85 时, 儿茶酚与 FeCl_3 的 1 倍浓度水溶液在 434 nm 与 719 nm 处有吸收峰, 表明主产物为单儿茶酚配位络合物 (mono-coordinated complex, MCC)(图 3-i); 当

pH 提高到 6.15 时, 吸收谱在 583 nm 出现了新吸收峰, 表明主产物为双儿茶酚配位络合物 (bi-coordinated complex, BCC)。在相同 pH 下, 2 倍浓度溶液的吸光度比 1 倍浓度的大很多, 如在 pH 4.9, 2 倍浓度溶液在 719 nm 处的吸光度约是 1 倍浓度的 3 倍(图 3-ii); 当 pH 提高到 10.38 时, 2 倍浓度溶液的吸收谱在 471 nm 出现了新吸收峰, 表

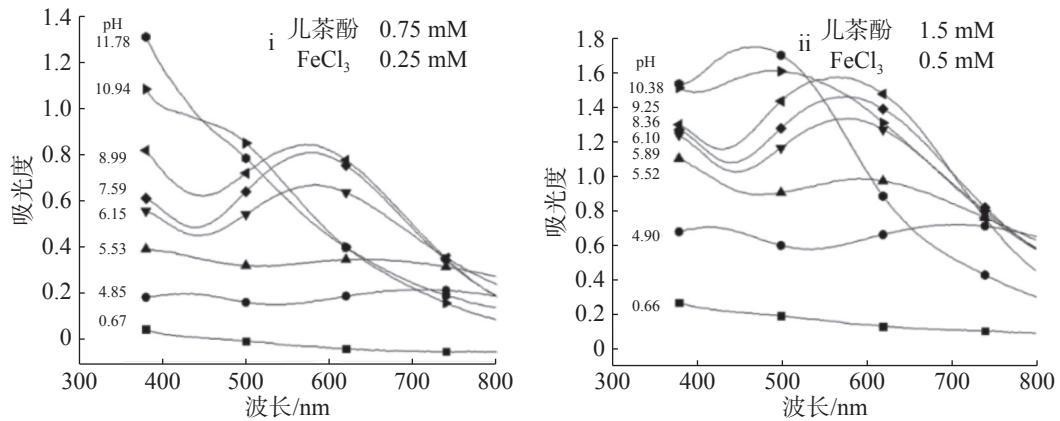


图3 不同 pH 儿茶酚与 FeCl_3 水溶液在可见光区域的吸收谱

1 倍浓度(i); 2 倍浓度(ii)。

明产生了三儿茶酚配位络合物 (tri-coordinated complex, TCC)。

2.3 酚类物质与金属氯化物在 TLC 硅胶板上的颜色反应 未保护的酚类物质与 FeCl_3 在 TLC 硅胶板上的显色结果很不相同。苯酚、对苯二酚与间苯二酚的点样点均为无色, 喷 FeCl_3 检测液并晾

干后, 转为淡黄色, 与背景色一致(图 4-i); 儿茶酚与连苯三酚样品点在喷 FeCl_3 后立刻呈青黑色, 室温下晾干转为蓝黑色。水杨酸 17、丹皮酚 19 和麦芽酚 20 在 TLC 板上的点样点为无色(图 4-ii), 喷 FeCl_3 后显紫红色(图 4-iii); 桑黄素 21 为黄色粉末, 点样点也为黄色, 在室温下喷 FeCl_3 后转为棕黑色。

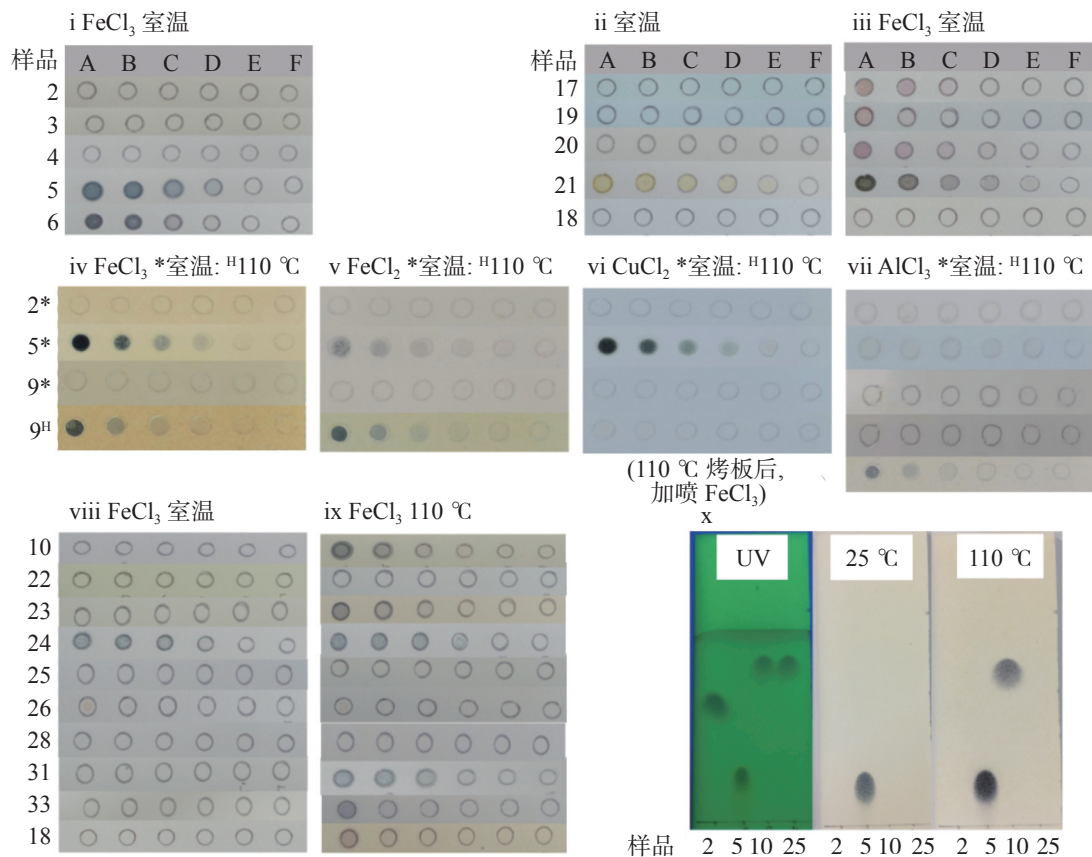


图4 酚类与金属氯化物在硅胶板上的颜色反应结果

未保护的酚类与 FeCl_3 在硅胶板上的显色(i); 水杨酸等样品点的颜色(ii)和在室温下与 FeCl_3 的显色(iii); 苯酚、儿茶酚、缩丙酮 9 与金属氯化物(从左至右依次为 FeCl_3 、 FeCl_2 、 CuCl_2 和 AlCl_3) 在硅胶板上的显色(iv 至 vii)(*: 室温; H: 110 °C 烤板 5 min); 保护的酚类与 FeCl_3 在 TLC 板上的显色结果(viii: 室温; ix: 110 °C 烤板 5 min); 采用颜色反应鉴别四种酚类化合物的实验结果(x)。

3 种酚类化合物与 FeCl_3 、 FeCl_2 、 CuCl_2 和 AlCl_3 在 TLC 板上的显色结果: 苯酚在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 或室温与 4 种氯化物都不显色(图 4-iv ~ 图 4-vii)。儿茶酚在室温与 Fe^{2+} 显浅灰色, 与 Cu^{2+} 显棕黑色, 与 Al^{3+} 不显色。缩丙酮 **9** 在室温与 4 种金属氯化物都不显色, 但在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 后, 显色结果不同: 喷过 FeCl_3 或 FeCl_2 的, 显蓝黑色; 喷过 CuCl_2 或 AlCl_3 的, 不显色; 先喷 AlCl_3 , 接着烤板 ($110\text{ }^\circ\text{C}$), 再加喷 FeCl_3 , 样品点显蓝黑色(图 4-vii, 末尾 TLC 板)。

保护的儿茶酚衍生物与 FeCl_3 的颜色反应可分成三类(图 4-viii ~ 图 4-ix): (1) 在室温不显色, 在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 后显蓝黑色, 如缩丙酮保护的多巴胺与多巴衍生物 **10**、**13**、**14** 和 **16**, Boc 保护的多巴胺 **23**; 当检测分子量较大结构较复杂的儿茶酚衍生物时, 如三肽 **15**, 显色反应变得困难, 在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 时显色很淡, 升温至 $140\text{ }^\circ\text{C}$, 才显较深颜色; (2) 在室温与在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 的条件下都不显色, 如亚甲基缩醛(缩甲醛)保护的儿茶酚 **11** 与 **12**, Fmoc 保护的儿茶酚 **22**, TBDPS 保护的多巴胺 **25**, 甲醚保护的多巴胺 **26** 与邻苯三酚 **27**, 乙酰基(Ac)保护的 **28**, 特戊酰基(Piv)保护的 **29** 和苯甲酰基(Bz)保护的 **30**; (3) 在室温晾板过程中逐渐显蓝黑色, 如 TMS 保护的儿茶酚 **24**, 硼酸酯保护的儿茶酚 **31** 与 **32**。单保护的丁香酚 **33** 和乙酰水杨酸 **18** 在室温下不显色, 在 $110\text{ }^\circ\text{C}$

时仅高浓度样品点显色。

显色深浅与样品浓度的关系: 儿茶酚在浓度为 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(A 点)显色非常深, 降至 $17\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(B 点), 显色适中; 降至 $5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(C 点), 颜色较淡; 降至 $1.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(D 点), 颜色极淡, 难以观察; 低至 $0.62\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(E 点), 不显色。保护的儿茶酚显示的颜色比同浓度未保护的略浅, 例如 **10** 和 **23**, 在 $5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(C 点)显色非常淡, 不方便观察。

酚类化合物 **2**、**5**、**10** 与 **25** 的简单区分实验结果(图 4-x): 紫外光照下, 4 种酚类物质都显黑色; 喷 FeCl_3 后, 儿茶酚样品点呈蓝黑色而苯酚不显色; 在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 后, 缩丙酮保护的儿茶酚 **10** 转为蓝黑色而 TBDPS 保护的儿茶酚 **25** 依旧不显色。

2.4 不同温度下缩丙酮在 FeCl_3 乙醇溶液中的分解实验结果 在室温, 未观测到缩丙酮化合物 **10** 在稀 FeCl_3 乙醇溶液 ($60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中发生分解; 当温度升高到 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 检测到缩丙酮发生了显著分解。采用一级降解曲线拟合缩丙酮化合物 **10** 的剩余量(HPLC 峰面积)与时间(min)的关系 ($R^2 > 0.99$) 并经计算得到: 在 50 、 60 和 $70\text{ }^\circ\text{C}$, 缩丙酮 **10** 的分解半衰期分别为 266 (图 5-i)、 93.8 (图 5-ii) 和 78.8 min ; 当分解温度接近乙醇沸点时, 溶剂挥发严重, 剩余缩丙酮 **10** 的测量值偏高, 导致半衰期计算值偏大。

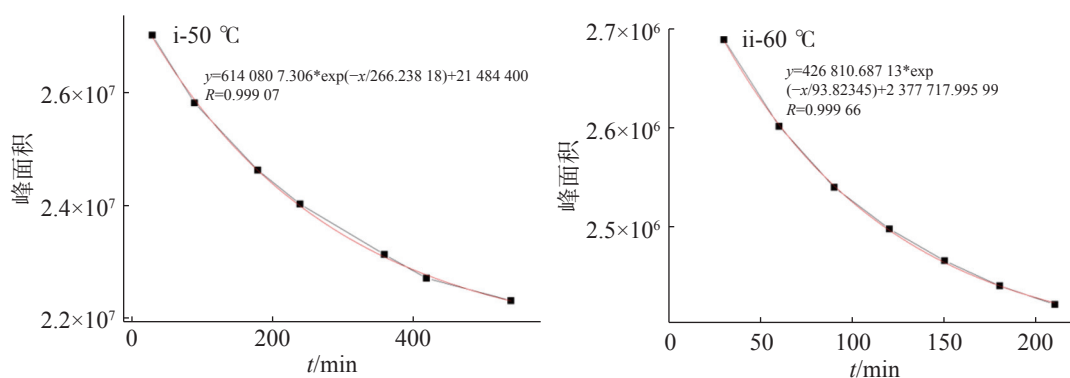


图 5 缩丙酮 **10** 在 FeCl_3 乙醇溶液中脱保护反应的动力学分析

3 讨论

3.1 苯酚或儿茶酚与 FeCl_3 在水溶液中的显色反应及影响因素 酚类与 FeCl_3 在水溶液中的显色反应是一种可逆络合反应, 受到酚类络合能力、浓度与溶液 pH 的影响。苯酚与 FeCl_3 需在较高浓

度 ($37.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与较窄的 pH 范围才能显示清晰的紫色; 儿茶酚在低浓度 ($0.75\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 苯酚的 $1/50$) 即能显示清晰的颜色, 具体颜色与主要络合产物存在形式有关并受到 pH 与溶液浓度的影响: 在低 pH 主要以 MCC 与 BCC 形式存在, 显青黑色或蓝黑色; 在高 pH (>9) 以 TCC 形式存在, 显

棕红色^[17-20];同比增加儿茶酚与 FeCl₃ 浓度可以促进多配位络合物的生成。

3.2 苯酚或儿茶酚与 FeCl₃ 在 TLC 硅胶板上的显色反应及其显色机制 GF254 硅胶表面与孔隙中有大量的硅羟基与平衡离子,具有一定的 pH(本实验采用的硅胶板 5.9)缓冲能力;硅胶的硅羟基对 Fe³⁺有络合作用,其生成常数 LogK 应接近于原硅酸的 8.9(表 2);随着溶剂的挥发,硅胶上加载的

样品液被逐渐浓缩并被吸附到硅胶表面。实验发现,往苯酚或儿茶酚与 FeCl₃ 的水溶液中添加少量硅胶粉,溶液的颜色消失;这证明硅胶对酚类的显色反应有显著性影响。因此,与水溶液中的显色反应不同,酚类与 FeCl₃ 在 TLC 板上的颜色反应受到硅胶特殊理化性质的影响:一个弱酸性的 pH 缓冲环境、一个硅羟基参与的竞争络合环境和一个样品液被浓缩的吸附环境。

表 2 几种配体与金属离子的络生成常数 LogK 值

	苯酚	氢氧根	原硅酸	儿茶酚	水杨酸			
Fe ³⁺	7.8	11.8	34.4 ^{Te}	8.9	20.2	34.7 ^B 43.8 ^T	16.3	28.5 ^B 35.3 ^T
Fe ²⁺	NA	4.5	10.0 ^T	NA	8	13.5 ^B	6.6	11.2 ^B
Cu ²⁺	NA	6.3	12.8 ^B	NA	13	24.9 ^B	10.6	18.5 ^B
Al ³⁺	NA	9	33 ^{Te}	NA	16.3	29.3 ^B 37.6 ^T	12.9	23.2 ^B 29.8 ^T

注:所有数据来自文献^[21];上标B、T、Te分别代表二配位、三配位、四配位络合物。

苯酚对 Fe³⁺的络合能力只有硅羟基的 1/10(表 2)并且苯酚点样液被限制在较低浓度,因此在大量硅羟基存在下,苯酚不能有效结合 Fe³⁺并形成紫色的六配位络合物;另外,苯酚载样量很少,不足以改变硅胶板的低 pH 大环境,因此苯酚与 FeCl₃ 在 TLC 板上不显色。其他只含孤立酚羟基的化合物,如对苯二酚和邻苯二酚它们对 Fe³⁺的络合能力与苯酚相似,在 TLC 板上也不显色。

儿茶酚对 Fe³⁺的络合能力是硅羟基的一千亿倍(表 2),远高于大多数配体^[22],因此儿茶酚不受硅羟基竞争络合的影响。喷 FeCl₃ 后,儿茶酚样品点显青黑色,表明主要络合产物为 MCC;晾干后,转为蓝黑色,表明生成了较多的 BCC。三配位络合物 TCC 颜色偏棕红,其形成所需的 pH 与配体浓度都很高。因此,儿茶酚显示的颜色主要来源于 MCC 和 BC 而与 TCC 无关。同样原因,其他络合能力强的螯合型配体,如邻苯三酚 **6** 和水杨酸 **17**(表 2),也能与 FeCl₃ 在硅胶板上发生显色反应。在测试的 4 种金属离子中,Fe³⁺与儿茶酚的络合能力最强,受硅羟基的干扰最小;生成的络合物呈现特征性蓝黑色,方便判断;FeCl₃ 是一种较强的路易斯酸,可以选择性分解对酸不稳定的保护基;因此,FeCl₃ 成为在 TLC 硅胶板上通过颜色反应来区分儿茶酚保护基类型的最佳试剂。

3.3 保护的儿茶酚与 FeCl₃ 在硅胶板上的颜色反应及其显色机制 保护的儿茶酚类化合物由于不能与 Fe³⁺形成络合物,因此在硅胶板上不与 FeCl₃ 发生颜色反应。以缩丙酮保护的多巴胺 **10** 和 Boc 保护的多巴胺 **23** 为例,二者的样品点从 A 到 E 在室温下喷 FeCl₃ 检测液后都不显色。在 110℃ 烤板 5 min 后,样品 **10** 与 **23** 的 A 与 B 点显示清晰的蓝黑色,与儿茶酚在晾干的硅胶板上显示的颜色一致,只是略淡,暗示样品 **10** 与 **23** 的 A 与 B 点可能含有 BCC 型络合产物。

缩丙酮 **10** 在 FeCl₃ 乙醇溶液中的分解实验揭示了上述显色反应的化学机制。在室温,缩丙酮基本不被稀 FeCl₃ 溶液分解,而保护状态的儿茶酚不能与 Fe³⁺形成有颜色的络合物,因此样品点不显色;随着温度升高,缩丙酮分解加快,在 60℃ 时半衰期只有 93.8 min,在 110℃ 时,其分解半衰期应更短;烤板 5 min 后,样品点内应已生成大量脱保护的儿茶酚基,后者与 Fe³⁺络合形成了 BCC 型产物,所以显蓝黑色。由于总有部分缩丙酮未被分解,因此缩丙酮样品点的颜色,比同浓度的儿茶酚样品点的颜色,略淡一些。酚类浓度梯度与显色深浅的关系表明:儿茶酚在 50 mmol·L⁻¹ 时显色已很深,继续增加浓度会引起样品过载或改变硅胶限定的反应条件;另外,虽然儿茶酚在 5.6 mmol·L⁻¹

时的显色可辨,但保护的儿茶酚在该浓度显色较淡,而在 $17 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显色明显;综合考虑,最佳酚类检测浓度范围介于 10 至 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

缩甲醛、Fmoc、TBDPS、甲基(醚)、Piv 或 Bz 等对强酸稳定的保护基,在室温和 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤板 5 min 条件下,不被 FeCl_3 分解或分解极少,因此这些保护基保护的儿茶酚衍生物在 TLC 硅胶板上不显色。TMS 和硼酸酯等对酸非常敏感的保护基,在室温即可被稀 FeCl_3 溶液脱保护,引起自由儿茶酚基的含量逐渐升高,因此不需要烤板,在 TLC 板晾干过程中即渐渐呈现蓝黑色。另外,只有一个酚羟基被保护的儿茶酚,如丁香酚 **33**,邻位自由羟基可以促进 FeCl_3 对单保护基的分解,导致单保护酚类化合物的稳定性比全保护的差;在烤板条件下,丁香酚高浓度样品点可以产生足够多的自由儿茶酚基,从而与 Fe^{3+} 络合并显色。对乙酰水杨酸 **18**,由于邻位活泼羧基的影响,也具有类似丁香酚的显色现象。

综上所述,TLC 硅胶板提供了一个与水相不同的特殊反应环境,由于儿茶酚等螯合型配体对 Fe^{3+} 的络合能力远大于硅羟基与单酚羟基的,因此在硅胶板上苯酚等含孤立酚羟基的化合物不能与 FeCl_3 发生颜色反应,而儿茶酚等络合能力强的化合物则可以;儿茶酚与 FeCl_3 显示的颜色来自一配位和二配位络合物,与三配位络合物无关。保护的儿茶酚不能直接与 FeCl_3 络合而在硅胶板上显色,但是对酸不稳定型保护基保护的儿茶酚,因 FeCl_3 检测液同时具有选择性脱保护的特性,在室温或烤板条件下,也能发生颜色反应;对强酸稳定型保护基保护的儿茶酚,两种条件下都不显色。本研究开发的在 TLC 硅胶板上的颜色反应能够快速、准确地检测出保护的与未保护的儿茶酚类物质,可用于监控儿茶酚类化合物的反应进程,特别是 L-DOPA 的衍生物,促进多酚类天然产物、抗帕金森病前药与功能材料等研究领域的发展。

参考文献:

[1] 黄肖桦. 巴马紧盯关键环节强化监督推动春耕备耕“齐步走”[N/OL]. 河池日报, 2021-03-18(2). <http://www.gx-hcxc.gov.cn/html/news-view-37219.html>.
[2] ZHAO H, SUN C, STEWART R J, et al. Cement proteins of the tube-building polychaete *Phragmatopoma californica*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005,

280(52): 42938 – 42944.
[3] ABBOTT A. Levodopa: the story so far[J]. *Nature*, 2010, 466(7310): 6 – 7.
[4] ZHU W, CHUAH Y J, WANG D A. Bioadhesives for internal medical applications: A review[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 74: 1 – 16.
[5] SAHA A, NIR S, RECHES M. Amphiphilic peptide with dual functionality resists biofouling[J]. *Langmuir*, 2020, 36(15): 4201 – 4206.
[6] BLACK, K C L, LIU Z, MESSERSMITH P B. Spontaneous formation of polymer-stabilized noble metal nanoparticles using catechol polymers[J]. *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)*, 2010, 51(2): 52 – 53.
[7] HEBEL M, RIEGGER A, ZEGOTA M M, et al. Sequence programming with dynamic boronic acid/catechol binary codes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(36): 14026 – 14031.
[8] MOROKUMA K, LIJIMA D, OKUNO M, et al. Liquid compositions comprising a levodopa amino acid conjugate and uses thereof. WO2021044420[P]. 2021-03-01.
[9] LIU Z, ZHANG X Y, HU B H, et al. Method for synthesizing DOPA-containing oligopeptide, and its application in preparing prodrug for treating Parkinson disease. WO2020169012[P]. 2020-08-27.
[10] LIU Z, HU B H, MESSERSMITH P B. Convenient synthesis of acetonide protected 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) for Fmoc solid-phase peptide synthesis[J]. *Tetrahedron Lett*, 2008, 49(38): 5519 – 5521.
[11] WUTS P G M, GREENE T W. Greene's protective groups in organic synthesis[M]. 5ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2014.
[12] YAMAMOTO Y. New DOPA derivative and its production. JPH05112576 [P]. 1993-05-07.
[13] MESSERSMITH P B, HU B H, LIU Z. Method of synthesizing acetonide-protected catechol-containing compounds and intermediates produced therein. US20100087622[P]. 2019-01-31.
[14] PETER W, ROGER M S. Thin-Layer Chromatography: A modern practical approach[M]. London: Royal Society of Chemistry, 2009: 134–153.
[15] 陈瑜, 李如雯, 谢树英, 等. 新型¹⁸F 标记的多巴胺正电子发射显影剂前体的合成[J]. *化学试剂*, 2022, 44(8): 7 – 16.
[16] SEVER M J, WILKER J J. Synthesis of peptides containing DOPA (3, 4-dihydroxyphenylalanine)[J]. *Tetrahedron*, 2001, 57(29): 6139 – 6146.
[17] SEVER M J, WILKER J J. Absorption spectroscopy and binding constants for first-row transition metal complexes of a DOPA-containing peptide[J]. *Dalton Transactions*, 2006, 14(6): 813 – 822.
[18] WEISSER J T, NILGES M J, SEVER M J, et al. EPR investigation and spectral simulations of iron-cat-

- echolate complexes and iron peptide models of marine adhesive cross-links[J]. *Inorganic Chemistry*, 2006, 45(19): 7736 – 7747.
- [19] PERSSON I. Ferric chloride complexes in aqueous solution: An EXAFS study[J]. *Journal of Solution Chemistry*, 2018, 47(5): 797 – 805.
- [20] SEVER M J, WILKER J J. Visible absorption spectra of metal –catecholate and metal-tironate complexes[J]. *Dalton Transactions*, 2004(7): 1061 – 1072.
- [21] SMITH R M, MARTELL A E. Critical Stability Constants[M]. Boston, MA: Springer US, 1989.
- [22] AVDEEF A, SOFEN S R, BREGANTE T L, et al. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(17): 5362 – 5370.

Identification of catechols and their protecting groups using color reactions

MENG Mingmin, XU Pengshu, LI Ruwen, HU Bihuang, LIU Zhongqiang

(School of Life Sciences and Pharmacy, Hainan University / Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: To explore a simple analytical method for identifying catechols and the types of their protecting groups, the colors of phenol and catechol with FeCl_3 in aqueous solutions and their visible absorption spectra were compared, and over thirty phenolic substances were tested for color developments with FeCl_3 on TLC silica-gel plates. Color-developing effectiveness between phenols and four metal chlorides were evaluated to establish a correlation between catechol concentrations and shades of spot colors. The kinetics of acetone decomposition in dilute FeCl_3 ethanol solution were analyzed. The experiments demonstrated that phenols with weak binding abilities did not develop colors with FeCl_3 on TLC silica-gel plates while phenols with strong chelating abilities such as catechol did. The greenish/bluish black color on the spots of catechol samples arose from the mono- and bi-coordinated Fe(III) complexes, not from the tri-coordinated ones. Since FeCl_3 is a strong Lewis acid and can selectively cleave phenol protections, catechols protected by various types of protecting groups showed different color changes. Catechols protected by weak-acid labile protecting groups exhibited slow color development at room temperature; those protected by strong-acid labile protecting groups displayed no color at room temperature but bluish-black after heated on the silica-gel plate at 110°C for 5 min; those protected by strong-acid stable protecting groups showed no color change under both conditions. The results also indicated that FeCl_3 was the best color-developing agent among the four metal chlorides in testing phenols, with the optimum concentration of the phenols ranging from 10 to $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Keywords: catechol; protecting group; ferric chloride; silica-gel plate; color reaction

(责任编辑:潘学峰)