

西藏冬虫夏草中D-甘露醇的薄层扫描分析

西安医科大学药理学系(710061) 汪宝琪* 庞志功

摘要 采用薄层色谱法,对冬虫夏草中D-甘露醇进行分离后,用高碘酸钾-联苯胺显色,采用薄层扫描法,在 $\lambda_s = 295\text{nm}$ 、 $\lambda_R = 370\text{nm}$ 的条件下进行双波长反射锯齿形扫描,测得西藏产冬虫夏草中D-甘露醇的含量为8.4%,回收率为98.0%~101.6%。

关键词 冬虫夏草 薄层扫描法 含量测定 D-甘露醇

冬虫夏草*Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc藏名雅杂滚卜^[1],对其化学成分的研究表明,它含有粗蛋白、氨基酸、D-甘露醇、麦角甾醇等^[2]。其中对D-甘露醇的测定多采用化学分析中的氧化还原法^[3, 4],而用薄层扫描测定冬虫夏草中D-甘露醇含量未见报道。

西藏的冬虫夏草生长在海拔4000m以上的高山草地上,菌座单生,高约6cm,稍弯曲,上部稍膨大呈圆锥形,紫黑色,下部细长、棕色,有纵直条纹,虫体如蚕,长约5cm,表面深黄色,内部白色,外表粗糙,背部有多数横生皱纹,腹部有足8对,中部4对较明显,菌柄略显膨大黑棕色^[5],是西藏药材中重要的补肺益肾、止血化痰、壮阳滋补的藏药之一。性味甘平,临床多用于治疗久咳虚喘、劳嗽咯血、阳痿遗精、腰膝酸痛等病症。所含甘露醇具有利尿脱水作用。但由于生长的生态环境不同,D-甘露醇的含量各异,因此对西藏产的冬虫夏草中所含甘露醇及其它有效成分,进行了科学的定量分析。

本文根据甘露醇能被高碘酸氧化,并在联苯胺作显色剂时,能在蓝色背景下出现白色斑点的原理,对冬虫夏草中的D-甘露醇经薄层分离显色后,在 λ_s 为295nm, λ_R 为370nm的条件下进行薄层扫描,分别求出标准品斑点和样品斑点的积分面积,按积分面积对点样量作图绘制标准曲线,按回归方程求取含量。

1 仪器试剂试材

CS-930型双波长薄层色谱扫描仪(日本)。甘露醇标准品(中国药品生物制品检定所)。冬虫夏草:产于西藏日喀则地区定日县雪山上,由西藏自治区党委办公厅周宽厚同志提供,经我系生药教研室主任吕居娴教授鉴定。联苯胺溶液的配制:称取0.5g联苯胺,加入100ml 80%的乙醇,振荡使之溶解,得0.5%的联苯胺乙醇溶液。

2 实验方法

2.1 冬虫夏草中甘露醇的提取:精密称取干至恒重的冬虫夏草0.4990、0.5000、0.5013g,共3份,分别置沙氏提取器中用95%乙醇40ml回流提取至无色,取提取液在水浴上浓缩至干、用无水乙醇溶解过滤、洗涤,将滤液置25ml容量瓶中用无水乙醇稀释定容待测。

2.2 甘露醇的分离:用微量注射器准确移取待测液5 μ l点样于硅胶G薄板上,并用标准品点样对照,用1号展开剂-2号展开剂-冰醋酸(60:40:1)上行展开〔1号为二氧六环-乙酸异戊酯-异丙醇-水(5:15:5:2),2号为异丙醇-乙酸乙酯-水(54:7:8)〕待溶剂前沿达13cm时,取出薄板,冷风吹干,均匀地喷洒0.015mol/L的高碘酸钾的0.12mol/L的盐酸溶液和0.5%联苯胺乙醇溶液,即在蓝色背景下出现白色斑点。

2.3 薄层扫描: $\lambda_s = 295\text{nm}$, $\lambda_R = 370\text{nm}$,狭缝为0.4 $\times$ 0.4mm,扫描速度为 $\Delta x = 12$,

*Address: Wang Baoqi, Department of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an

$\Delta y = 5$, 线性参数 $S_x = 3$, 双波长反射法锯齿形扫描, 测定斑点的积分面积, 求取含量。

2.4 测定结果: 根据同一扫描条件下斑点的峰面积, 用回归方程求得含量见表1。

3 讨论

3.1 线性范围考察: 用微量注射器分别取1mg/ml的标准溶液0.5、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11 μ l点样于同一薄板上, 按实验方法薄层展开, 展开后取出薄板晾干, 喷洒显色剂, 在同一条件下进行扫描求得不同的斑点面积, 以斑点面积对D-甘露醇点样量作图得标准曲线, 其回归方程为 $Y = 13000.5X + 4154.3$, $r = 0.9986$, 线性范围在1~9 μ g之间。

3.2 精密度实验: 分别在同一薄板上点样5个相同浓度D-甘露醇和在5块薄板上点样5个相同浓度的D-甘露醇, 所得结果板内RSD为3.2%, 板间RSD为6.96%。表明板内差小于板间差。点样量越大误差越大。

3.3 薄层分离条件的选择: 先后选用不同的固定相和流动相进行薄层分离, 结果见表2。

3.4 显色剂的选择: 本文先后用碘蒸气、荧光素钠的甲醇溶液、高锰酸钾醇溶液进

表1 测定结果

样品编号	样品重(g)	含量(g)	平均含量(%)	RSD(%)
1	0.4990	8.80		
2	0.5013	8.90	8.84	0.60
3	0.5000	8.82		

表2 固定相和流动相的选择

固定相	流动相	效果
硅胶H	2号展开剂	板脆易断, 分离效果不好
硅胶G	2号展开剂	斑点拖尾, 无法定量
硅胶G	1号展开剂	溶剂前沿不整齐, 边缘效应明显
硅胶G	1号展开剂-2号展开剂-冰醋酸(60:40:1)	前沿整齐, 斑点明显, 分离效果好

行显色, 有的重现性不好, 有的斑点不清晰, 只有用高碘酸钾和联苯胺显色, 才有良好的显色效果。

3.5 消除薄层扫描斑点误差的几个技术问题: a)点样量不宜太大, 曾以5、10、20 μ l分别点样, 结果表明, 斑点拖尾, 产生较大的误差。b)原点直径不宜超过2~3mm, 斑点直径太大会产生锯齿形斑点, 在扫描仪上出现几重峰形成正误差。c)点样的样品溶剂应是易挥发的有机溶剂, 不应为水, 甘露醇虽是水溶性物质, 但不宜用水作溶剂, 由于不易挥发, 点样原点易于扩大造成误差。本文选用无水乙醇作样品溶剂, 边点样边用电风吹干溶剂, 减少原点扩大, 使斑点成椭圆形, 减少误差。

3.6 回收试验: 在已知浓度样品液中, 加入D-甘露醇标准液2、4、6、8 μ g/ml, 点于同一薄层板上, 按实验方法薄层分离, 上机扫描, 得回收率为98.6%(97%~101.6%)。

参 考 文 献

1 中国药典。一部。1990。81

2 肖家庆, 等。中药通报, 1983, 8(2): 32

3 钟裕容, 等。中国中药杂志, 1990, 15(4): 39

4 黄和意, 等。中草药, 1980, 11(10): 435

5 西藏自治区卫生局, 西藏军区后勤部卫生处编。西藏常用中草药。拉萨: 西藏人民出版社, 1971。340

(1693-12-27收稿)