

件,比例为2:1:3时效果最好。

3.3 利用束花石斛植株上具有隐腋芽的特性,进行了高位芽培植实验,该法操作简单,并且大大缩短了育苗周期,降低了成本。实验结果发现在同等条件下3年生的枝条发芽效果最好;4年生的次之;2年生、5年生和6年生的最差。而剪段后发芽率比例比整丛培养更差。

3.4 组培育苗和腋芽繁殖都是束花石斛快繁育苗的有效途径,各有优缺点,本实验只做了初步的探索,大量的工作还有待进一步完善。根据实际情况,

合理应用组培和高位芽培植两条途径快繁育苗,对于束花石斛人工产业化发展有重要意义。

References:

- [1] C_HP (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Xu H, Wang Z G, Ding J Y, et al. General aspect of biotechnology about medical *Dendrobium* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2001(1): 1-4.
- [3] Zhang M, Xia H X. Advances in research of tissue culture for *Dendrobium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(6): 325.
- [4] Zeng S J. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 1998, 25(1): 77.

HPLC 法测定金荞麦中(一)-表儿茶素含量

何美珊,钱炳辉,王兆龙,顾理群,王志勇,闫玉梅,王凤如

(南通精华制药有限公司,江苏 南通 226005)

金荞麦为蓼科植物金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 的干燥根茎。其有效成分为原花色素类缩合鞣质及其前体的混合物^[1],包括(一)-表儿茶素[(一)-epicatechin]及其衍生物的单体、二聚体和多聚体。金荞麦收载于《中华人民共和国药典》2000年版一部^[2],其质量标准中无含量测定项。文献报道的金荞麦药材含量测定方法采用比色法^[3]和薄层扫描法^[4],本实验采用 HPLC 法测定金荞麦中(一)-表儿茶素的含量。

1 仪器、试剂与样品

Waters 600E 高效液相色谱仪、2487 双波长紫外检测器、Millennium³² 色谱管理系统, Varian Cary 50 conc 紫外-可见分光光度计, Sartorius BP211D 电子天平, pH S-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。聚酰胺 30~60 目,批号 F20000817,中国医药(集团)上海化学试剂公司。乙腈为色谱纯,乙醇、甲醇、磷酸均为分析纯,水为去离子双蒸水。

(一)-表儿茶素对照品:批号 878-200001,中国药品生物制品检定所提供,高效液相色谱归一化法测定其纯度为 99.63%。

金荞麦药材由江苏省药品检验所和南通精华制药有限公司提供,经江苏省药品检验所刘舞霞主任药师鉴定为蓼科植物金荞麦 *F. dibotrys* (D. Don) Hara 的根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm × 3.9 mm, 5 μm); 流动相: 水(用磷酸调 pH 值至 3.00 ± 0.02)-乙腈(92:8); 体积流量: 0.8 mL/min。检测波长 280 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。在此条件下金荞麦供试品溶液的(一)-表儿茶素峰与相邻峰能达到基线分离,其保留时间为 15.35 min, 色谱柱理论板数按(一)-表儿茶素峰计算为 6 109, 对照品与供试品的色谱图见图 1。

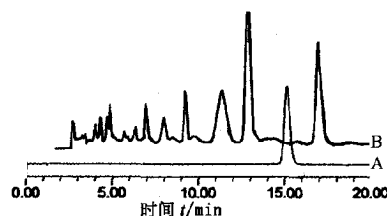


图1 (一)-表儿茶素(A)与金荞麦(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatogram of (一)-epicatechin (A) and *F. dibotrys* rhizome (B)

2.2 测定波长的选择: (一)-表儿茶素对照品的乙腈-水(1:9)溶液,经 Varian Cary 50 conc 紫外-可见分光光度计在 190~400 nm 进行光谱扫描,280 nm 左右峰形较好,最大吸收波长为 280.0 nm。

收稿日期:2004-05-28

作者简介:何美珊(1959),女,江苏如皋人,高级工程师,学士,主要从事中药研究及开发工作。
Tel: (0513)5609133 Fax: (0513)5609115 E-mail: hems136@sina.com

2.3 对照品溶液的制备:精密称取(-)-表儿茶素对照品适量,加乙腈-水(1:9)制成含(-)-表儿茶素 30 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备:取本品细粉约 2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇 50 mL,密塞,称定质量,放置过夜,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,减压浓缩至近干,残渣加乙腈-水(1:9)分次洗涤,洗液转移至 10 mL 量瓶中,加乙腈-水(1:9)至刻度,摇匀,离心(3 000 r/min)5 min,精密量取上清液 5 mL,加入聚酰胺柱(30~60 目,3 g,内径 1.0 cm,湿法装柱),以水 30 mL 洗脱,弃去水液,再用甲醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,减压浓缩至近干,残渣加乙腈-水(1:9)使溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加乙腈-水(1:9)至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.5 线性关系考察:精密称取(-)-表儿茶素对照品 5.68 mg 置 25 mL 量瓶中,加乙腈-水(1:9) 20 mL 超声溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5 mL,分别置 5 mL 量瓶中,加乙腈-水(1:9)稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取 10 μL 进样,测定峰面积,以(-)-表儿茶素对照品进样量(μg)为横坐标(X)、(-)-表儿茶素峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 1.475\,990 \times 10^3 + 1.190\,198 \times 10^6 X$, $r = 0.999\,968$ 。(-)-表儿茶素在 0.113 6~2.272 μg 与峰面积线性关系良好。

2.6 精密度试验:取质量浓度为 0.227 2 $\mu\text{g/mL}$ 的(-)-表儿茶素对照品溶液重复进样 6 次,每次 10 μL ,测得(-)-表儿茶素峰面积 RSD 为 0.4%。

2.7 重现性试验:取批号为 040501 的金荞麦药材细粉 6 份,每份 2.5 g,依法制备供试品溶液并测定,(-)-表儿茶素质量分数为 254.79 $\mu\text{g/g}$,RSD = 2.12%。

2.8 稳定性试验:取金荞麦药材,依法制备供试品溶液,室温放置,在 0、2、4、6、8、24 h 分别进样 10 μL ,测得 8 h 内(-)-表儿茶素峰面积 RSD 为 1.05%,24 h 内(-)-表儿茶素峰面积 RSD 为 1.82%,试验结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.9 回收率试验:采用加样回收法,取已知含量的金荞麦药材(批号 040501)细粉 6 份,每份约 1.25 g,精密称定,分别精密加入 324 $\mu\text{g/mL}$ (-)-表儿茶

素对照品溶液 1 mL、50%乙醇 49 mL,密塞,称定质量,摇匀,按 2.4 项下方法,依法制备供试品溶液,测定。(-)-表儿茶素平均回收率 95.21%,RSD = 1.51%。

2.10 样品测定:取产地分别为江苏、安徽、云南、贵州、重庆、江西的 6 个批号样品,制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积,计算质量分数,结果见表 1。

表 1 金荞麦中(-)-表儿茶素质量分数的含量测定($n=3$)

Table 1 Determination of (-)-epicatechin in *F. dibotrys* rhizome ($n=3$)

批号	产地	(-)-表儿茶素/%	批号	产地	(-)-表儿茶素/%
030307	重庆	0.045 4	030308	江西	0.045 1
030401	贵州	0.024 5	030402	云南	0.032 4
040501	江苏	0.025 5	040502	安徽	0.035 2

3 讨论

3.1 供试品提取方法的选择:(-)-表儿茶素易溶于水、乙醇,在稀醇中溶解度大,但对湿、热不稳定。用不同粒度的供试品,以不同浓度的乙醇提取,结果显示供试品细粉以 50%乙醇提取(-)-表儿茶素提取率最高。经比较超声提取、加热回流、先浸泡再超声提取、先浸泡再加热回流、不同浸泡时间及不同回流时间的试验,结果以先浸泡过夜再加热回流 1 h 最佳,(-)-表儿茶素提取完全,且(-)-表儿茶素回收率较高。

3.2 供试品溶液的预处理:取金荞麦提取液直接进行高效液相色谱分析,(-)-表儿茶素峰不能达到基线分离,且污染色谱柱难以清洗。曾选用醋酸乙酯进行液液萃取,操作复杂,(-)-表儿茶素转移率低,需多次萃取。选用聚酰胺小柱进行固液萃取预处理,供试品溶液经高效液相色谱分析,(-)-表儿茶素峰能达到基线分离,(-)-表儿茶素转移率高,操作简便,有利于保护色谱柱。

致谢:江苏省药品检验所中药室刘舞霞老师帮助收集、鉴定金荞麦药材,并予以必要的技术指导。

References:

- [1] Yao R C. Activity constituents of antitumor from *Fagopyrum cymosum* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1989, 11 (2): 215-218.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [3] Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Determination of activity component condensed proanthocyanidins in *Rhizoma Fagopyri Dibotrys* by colorimetry [J]. *Nantong Med J* (南通医药), 1982(1): 24-28.
- [4] Liang X Z, Xiao P G. Determination of procyanidin B₂ in *Rhizoma Fagopyri Dibotrys* by TLC scanning [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1990, 10(4): 227-230.