

of antibiotics. **Result:** The strains obtained from *A. cantoniensis* in subtropical zone produced alkali in YMA medium, the average generation time was 14.8 hours, and thus they belong to slow-growing rhizobia. Rhizobia strains differed greatly in respect to tolerance of high temperature, adaptability of acidic environment and sensitivity to four antibiotics, but they had the same abilities of using different carbon and nitrogen sources. After 70 days from inoculated strains, the seedling formed nodules on the root(85.0%), and the dry matter of vine was increased by 51.1%. **Conclusion:** The rhizobia strains isolated from different ecological environments are good germplasm resources of tolerances to high temperature and acidic environment. The research will greatly help utilize the rhizobia resources and enhance the quality of crude drugs of medicinal leguminosae.

[Key words] *Abrus cantoniensis*; rhizobium; isolation; characteristic

[责任编辑 张宁宁]

四川西北地区川西獐牙菜指纹图谱研究(I)

吉文鹤, 卢学峰, 陈桂琛, 纪兰菊*

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

[摘要] 目的:建立川西獐牙菜药材甲醇溶解部分的 HPLC 指纹图谱。方法:反相高效液相色谱法,流动相甲醇-水(水中含 0.02%的磷酸),梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 30 ℃。结果:精密性、重复性、稳定性试验中共有峰峰面积、保留时间的 RSD 均小于 5.0%;不同产地川西獐牙菜的相似度大于 0.805。结论:该方法简便、实用、可靠,可作为川西獐牙菜药材的质量标准。

[关键词] 川西獐牙菜;反相高效液相色谱法;指纹图谱;质量控制

[中图分类号] R 282;R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2005)13-0977-03

川西獐牙菜 *Swertia mussotii* var. *mussotii* 为龙胆科獐牙菜属植物,主要分布在青海、西藏、云南和四川部分地区^[1],其中青海玉树和四川川西北地区为其主产区。川西獐牙菜具有清肝利胆、退诸热之功效,主要用于黄疸型肝炎、病毒性肝炎和血病^[2],是传统的名贵藏药,俗称“藏茵陈”。研究资料表明,川西獐牙菜中主要含有獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷、当药黄素、齐墩果酸等^[3,4],其中抗肝炎有效成分主要为齐墩果酸和芒果苷^[3]。川西獐牙菜化学成分复杂,单一成分的确难以控制药材的质量。因此,在四川西北地区样品来源充足和稳定的不同产地进行样品采集,参照文献^[5,6],对采集的 10 批药材运用反相高效液相色谱法进行了指纹图谱研究。并对图谱中所有峰和共有峰的相似度进行评价和标

准指纹图谱的模拟。实验证明,该方法简便、可靠、重复性好,可以全面控制四川西北地区川西獐牙菜药材的质量,也可作为川西獐牙菜药材及其制剂指纹图谱研究的基础,并为其 GAP 生产基地建设提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料 采集了四川西北地区不同产地的川西獐牙菜样品 10 批,经西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定为川西獐牙菜 *S. mussotii*,具体见表 1。

表 1 川西獐牙菜样品

| 样品 | 产地 | 采集日期 |
|----|--------|------------|
| 1 | 小金新桥 | 2002-10-20 |
| 2 | 小金达维 | 2002-10-22 |
| 3 | 小金新民 | 2002-10-25 |
| 4 | 金川安宁 | 2002-10-20 |
| 5 | 丹巴牦牛沟 | 2002-10-27 |
| 6 | 马尔康,抚边 | 2002-10-19 |
| 7 | 小金县城 | 2002-10-20 |
| 8 | 丹巴岳扎村 | 2002-10-28 |
| 9 | 夹金山木检站 | 2003-11-03 |
| 10 | 小金两河口 | 2003-11-03 |

[收稿日期] 2005-03-16

[基金项目] 国家科技攻关计划项目(2001BA901A47);青海省重点科技攻关项目(2004-N-142)

[通讯作者] *纪兰菊, Tel: (0971) 8010092, E-mail: jilanj@ey-

ou.com

1.2 仪器与试剂 LC-10AT_{VP}二元泵(岛津公司); Rheodyne 7725 进样器; SPD-M10AVP 二极管阵列检测器; Class-VP 液相色谱工作站; Milli-Q 超纯水装置; AT-132 柱温箱; 梯度滞后时间为 0.25 min; 水为重蒸水并经 0.45 μm 滤膜过滤; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 龙胆苦苷对照品为中国科学院西北高原生物研究所植化室孙洪发教授赠。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(水中含 0.02% 的磷酸); 梯度洗脱程序为 0~20 min 甲醇的体积分数(下同)由 25% 增至 48%, 20~55 min 由 50% 增至 85%, 55~60 min 为 100%; 检测波长 260 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 15 μL。

2.2 供试品和对照品溶液的制备 取川西獐牙菜干燥全草 0.5 kg 粉碎, 过 20 目筛, 混合均匀以后精密称取 2.50 g 于具塞三角瓶中, 加甲醇 20 mL 回流提取 2 h, 过滤、定容至 25 mL 量瓶中, 制成 0.1 g·mL⁻¹ 的供试品溶液, 0.45 μm 膜滤过, 备用。

精确称取龙胆苦苷对照品 2 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制成 0.2 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 精密度试验 取同一批号的供试品溶液, 连续进样 5 次, 测得各共有峰峰面积和保留时间的 RSD 分别小于 2% 和 0.5%, 表明精密度良好。

2.4 稳定性试验 取同一批号供试品溶液, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 进样, 测得各共有峰峰面积和保留时间的 RSD 分别小于 4% 和 1%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 重复性试验 取同一批号的样品 5 份, 精密称量, 按 2.2 项下制备供试品溶液, 分别进样, 测得各共有峰峰面积和保留时间的 RSD 分别小于 3.2% 和 1.0%, 表明重复性良好。

2.6 指纹图谱分析、数据处理及相似度 用 2.1 的色谱条件测定了 10 批川西獐牙菜药材样品指纹图谱。选择 4 号样品为对照, 按照“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”进行对照指纹图谱的模拟, 标准指纹图谱的生成原理为中位矢量法, 标准指纹图谱如图 1 所示, 对各个峰紫外光谱图进行对比分析, 找到 9 个共有峰。对各个样品相对峰面积、相对保留时间及相似度进行计算, 采用的原理是夹角余弦法。以所有峰的峰面积计算相似度, 10 个样品

的相似度为 0.805~0.999, 平均相似度为 0.922; 以共有峰的相对峰面积计算相似度, 10 个样品的相似度为 0.908~0.992; 平均相似度为 0.973, 以共有峰的相对保留时间计算 10 个样品的相似度均为 0.999。

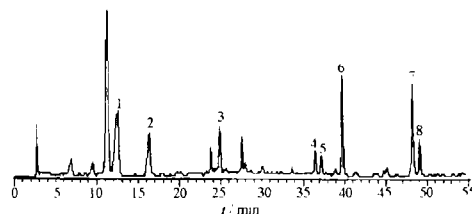


图1 川西獐牙菜的指纹图谱

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 试验考察了粉碎(过 20 目筛)、超微粉碎、回流提取和超声提取等条件下的提取率, 结果显示, 粉碎的样品回流提取时的提取率比其他方法高。由于被研究的化合物为水溶性的, 选择甲醇为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择及优化 试验考察了以下几种色谱系统: 甲醇-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水、乙腈-水-磷酸, 所获得的色谱图以甲醇-水-磷酸最佳。为了提高色谱图的分离度和减少色谱图的脱尾, 改善了磷酸在水中的体积分数, 分别考察了 0.01%, 0.02%, 0.03% 的磷酸缓冲液, 其结果显示甲醇-水-磷酸(0.02%) 系统得到的色谱图最佳。

3.3 检测波长的选择 对 190~370 nm 扫描的各波长下的色谱图进行比较分析, 结果 260 nm 各峰分离良好, 峰数目也比较多, 而且参照物龙胆苦苷在此波长下有最大吸收。因此, 选择 260 nm 作为检测波长。同时按照试行标准的要求考察了其他波长下的色谱图, 其结果显示 10 批在不同波长下的色谱指纹图谱具有很好的相似度。

3.4 所研究的四川地区川西獐牙菜药材指纹图谱 具有比较好的稳定性和重复性, 10 批川西獐牙菜药材样品指纹图谱的特征性和专属性很强, 9 个共有峰稳定性很好。10 批川西獐牙菜药材样品指纹图谱的平均相似度为 0.922 4, 符合国家药典委员会颁发的“中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南”的要求。通过对川西獐牙菜药材指纹图谱的研究可以有效控制四川地区川西獐牙菜药材及其中间体的质量。

川西獐牙菜因其中的水溶性成分具有很好的保

肝作用而格外受人关注,已有多种剂型问世,并且疗效已经得到肯定。因此对川西獐牙菜的研究也越来越多,越来越深入,本研究为进一步开发川西獐牙菜药材提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志. 第三卷. 西宁:青海人民出版社,1996.93.
[2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志. 西宁:青海人民出版社,1991.110.

[3] 孙洪发,胡柏林,丁经业,等. 川西獐牙菜甙类成分. 植物学报,1991,33(1):31.
[4] 纪兰菊,廖志新,孙洪发. 青海龙胆科部分藏药植物化学成分研究进展. 高原生物学集刊,2002, 15: 243.
[5] 宋万志. 中国龙胆科药用植物概况. 中药通报,1986,11(11):643.
[6] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术. 北京:化学工业出版社,2002.1.
[7] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹图谱. 上海:上海科学技术出版社,2003.1.

Study on HPLC fingerprint of *Swertia mussotii* var. *mussotii* from north-west area of Sichuan province I

Ji Wen-he, LU Xue-feng, CHEN Gui-chen, Ji Lan-ju

(Northwest Institute of Plateau Biology, Academia Sinica, Xining 810003, China)

[Abstract] **Objective:** To constitute HPLC fingerprint of the methanol extract from *Swertia mussotii* grown in Sichuan Province. **Method:** RP-HPLC, methanol and water including 0.02% acid as mobile phase. Gradient elution, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 260 nm, temperature was 30 °C. **Result:** The RSD values of peak area and retention time of common peaks in precision, repeatability and stability were lower than 5.0%, respectively, similarity was over 0.805 in *S. mussotii* collected from 10 different habitats. **Conclusion:** All results above exhibit that this method is simple, practicable, and reliable as a standard method in controlling the quality of *S. mussotii*.

[Key words] *Swertia mussotii* var. *mussotii*; RP-HPLC; fingerprint; quality control

[责任编辑 张宁宁]

全国第七届中医治则治法暨肝胆病的中医治疗学术研讨会征文

经国家中医药管理局批准,由中国中医研究院基础理论研究所和《中国中医基础医学杂志》社共同主办的“全国第七届中医治则治法暨肝胆病的中医治疗学术研讨会”定于2005年10月中旬在贵州省贵阳市召开。届时将邀请姚乃礼、钱英、陈立华、朱培庭等教授作专题讲座。到会者可获得国家级继续教育学分11分。欢迎从事治则治法及肝胆病的临床、科研、教育的同仁参会。

一、征文内容:1. 中医治则治法的现代研究进展;2. 中医治疗肝胆病的指导思想、治则与治法研究;3. 中医治疗肝胆病的新理论、新进展研究;4. 肝胆病的中医古代文献研究;5. 肝胆病的中医临证经验与心得;6. 肝胆病的中医药现代实验研究;7. 治疗肝胆病的中药合理应用与不良反应研究;8. 治疗肝胆病的中药药理和毒理研究;9. 治疗肝胆病的中药化学与中药制剂研究;10. 肝胆病的中医食疗与养生康复研究;11. 肝胆疾病的新药介绍和保肝食品的研究进展;12. 与肝胆病相关的胃、肠、胰、肾疾患的中医药研究。

二、相关费用:1. 参会并发表论文者交会议费680元(含审稿费30元)。2. 仅发表论者,交版面费330元(含审稿费30元)。3. 仅参会不发表论者,交会议费500元。食宿统一安排,费用自理。

三、征文要求:1. 论文字数在2500字左右,附500字以内的摘要,用Word格式打印,软盘随打印稿一起寄出,也可网上寄至;xiaojin0808@sina.com。文责自负概不退稿。2. 请写明单位、作者姓名及邮编。3. 已在全国性学术会议上交流或已在刊物上公开发表的论文不再受理。4. 会议采用的论文将收集在会议论文集,并推荐在《中国中医基础医学》杂志上优先发表。5. 截稿日期:2005年8月30日。6. 论文与相关费用请寄:北京市东直门内南小街16号,中国中医研究院基础理论研究所金香兰收,邮编:100700。电话:(010)640144111转2542。传真:(010)64013896。联系人:金香兰、王左原、李海玉、贾海骅。