

[4] Luo D S. *Zhonghua Tibetan Herbal* (中华藏本草) [M]. Bei-jing National Press, 1997.

[5] Qinghai Medicine Test Institute & Qinghai Tibetan Medicine Research Institute. *China Tibetan Medicine* (中国藏药) [M]. Vol 3. Shanghai Shanghai Science and Technology Publishers, 1997.

[6] Mao J Z, Luo D S, Wang Z H, *et al.* *Jingzhu Herbal* (Chinese version) (晶珠本草汉译本) [M]. Shanghai Shanghai Science and Technology Pubilishers, 1986.

[7] Compiled by Chinese Medicinal Material Company. *Index of Chinese Traditional Medicine Resources* (中国中药资源志要) [M]. Beijing Science Press, 1994.

[8] Yang J S. *Diqing Tibetan Medicine* (迪庆藏药) [M]. Kun-ming Yunnan National Press, 1987.

[9] Wu Z Y. *Flora of Tibet* (西藏植物志) [M]. Vol 1- 4. Bei-jing Science Press, 1983-1987.

[10] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora of Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 55 (1). Beijing Sci-

ence Press, 1979.

[11] Editioinal Office of National Chinese Herbal Medicine Collec-tion. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing People's Medical Pulishing House, 1996.

[12] Chen J, Li F G, Fang S D, *et al.* Study on the chemical constituents of *Pleurospermum lindleyanum* Lipsky B. Fedtsch [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18 (7): 2-5.

[13] Li T, Wang T Z. Determination of three flavonoids and fer-ulic acid in *Pleurospermum hookeri* var. *thomsonii* by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24 (1): 44-45.

[14] Wang T Z, Li T. Study on the chemical constituents of *Pleu-rospermum hookeri* var. *thomsonii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10(4): 19-25.

[15] Li T, Wang T Z. Studies on chemical constituents of the es-sential oil of *Pleurospermum hookeri* var. *thomsonii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(9): 780-781.

紫河车的凝胶电泳鉴别研究

李 峰¹,孙 娟²,康廷国¹,裴世柱¹,王宇航^{1*},王 浩^{1*}

(1. 辽宁中医学院 中药系,辽宁 沈阳 110032; 2. 解放军第 406医院,辽宁 大连 116041)

紫河车 *Placenta Hominis*为健康人的胎盘干燥品^[1],具有温肾补精、益气养血的功效。因其来源有限,药效显著,常有伪品充斥市场。已有的鉴别多从真伪角度出发^[2~4],而对临床常用 3种药材规格(新鲜品、干燥品、炮制品)及是否混有脐带、胎膜等非药用部位的鉴别未见报道。为此,本实验将这 3种不同加工方法的紫河车药材及新鲜胎盘的不同部位进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别,为临床准确用药提供依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 新鲜品:健康人的新鲜胎盘(沈阳 157医院产科提供),反复冲洗至去净血,冷冻备用。干燥品:新鲜胎盘按《中华人民共和国药典》方法加工干燥。炮制品:市购。

1.2 仪器与试剂:DYY-III-5型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);DYY-III-27A型电泳槽(北京六一仪器厂,管长为 8.5 cm);DYY-III-27B型电泳槽(北京六一仪器厂,管长为 17.5 cm);800离心沉淀器(上海兴记机器厂);所用试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 紫河车 3种加工品的非解离系统聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法

- 2.1.1 溶液配制与凝胶制备:按文献^[5]方法。
- 2.1.2 样品制备:分别取上述 3种样品各 0.5 g,加稀释 4倍的浓缩胶缓冲液 25 mL,用研钵研细,离心(4 000 r/min) 15 min,取上清液备用。
- 2.1.3 加样与电泳:分取 3种样品处理液各 100 μ L上样(使用 DYY-III-27B型电泳槽),电泳开始时电流调至 10 mA,大约 0.5 h后,待样品液进入分离胶,调节电流至 25 mA,并保持电流不变,电泳至指示剂距离管口末端约 0.5 cm处(电泳约 5 h左右),停止电泳。
- 2.1.4 固定、染色、洗脱:将电泳后的凝胶于固定液中固定 30 min,再浸于染色液中染色过夜,最后用洗脱液洗脱至背景清晰。
- 2.1.5 电泳图谱测绘:按泳动率=(蛋白质谱带移动的距离/指示剂移动的距离) $\times$ (染色前凝胶长度/脱色后凝胶长度)计算出各样品中主要谱带泳动率,由各谱带泳动快慢将电泳图谱分为 A($R_f < 0.35$), B($0.35 \leq R_f < 0.65$), C($R_f \geq 0.65$) 3个区间,各样品中电泳谱带数目及泳动值见表 1。

根据各样品谱带的 R_f 值、形态和着色程度绘制电泳图谱,以完全涂黑、框内斜线、框内打点、横线下虚线

* 收稿日期: 2002-08-27

作者简介:李 峰(1963-),女,副教授,现在辽宁中医学院在职攻读生药学博士学位,研究方向为中药材鉴别与质量评价。

* 本院中药系 2001届毕业生

4种符号分别代表凝胶谱带的I ~ IV级,见图 1-A

2.2 紫河车 3种加工品的解离系统聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)法

2.2.1 溶液配制与凝胶制备:按文献^[6]方法

2.2.2 样品制备:按 2.1.2方法将离心后的上清液加样品水解液按 1∶3混合,过夜,备用

2.2.3 加样与电泳:同 2.1.3方法,但由于无浓缩胶,故电泳时电流应始终保持为 25 mA,直到电泳结束

2.2.4 固定、染色、洗脱:同 2.1.4方法

2.2.5 电泳图谱测绘:同 2.1.5方法,电泳谱带数

目和谱带泳动值见表 2,结果见图 1-B

2.3 紫河车新鲜品不同部位的 SDS-PAGE法

2.3.1 溶液配制与凝胶制备:同 2.2.1方法。

2.3.2 样品制备:将鲜胎盘分取脐带、脐带和胎盘、胎盘、胎膜 4部各 1g 匀浆,离心 (4 000 r/min) 15 min,取上清液,分别按 2.2.2方法制成样品液备用

2.3.3 加样与电泳:同 2.2.3方法 (使用 DYY-III-27A型电泳槽)。

2.3.4 固定、染色、洗脱:同 2.1.4方法。

2.3.5 电泳图谱测绘:同 2.1.5方法,见表 3,图 2

由表 1及图 1-A可见,新鲜品共有 13条谱带,

表 1 紫河车 3种加工品的 PAGE结果 (° 为特征谱带)

Table 1 Results of three kinds of processed *Placenta Hominis* by PAGE (° characteristic charts)

样品	电泳谱带分布				各级电泳谱带				主要谱带泳动率值
	总量	A区	B区	C区	I级	II级	III级	IV级	
新鲜品	13	2	7	4	1	4	4	4	0.1, 0.21, 0.41, 0.43, 0.45°, 0.4 0.55°, 0.61°, 0.65, 0.8, 0.82 0.85°, 0.89
干燥品	9	3	4	2	1	5	1	2	0.17, 0.23, 0.34°, 0.41°, 0.45° 0.62, 0.69, 0.90, 0.94
炮制品	-	-	-	-	-	-	-	-	

表 2 紫河车 3种加工品的 SDS-PAGE 结果 (° 为特征谱带)

Table 2 Results of three kinds of processed *Placenta Hominis* by SDS-PAGE (° characteristic charts)

样品	电泳谱带分布				各级电泳谱带				谱带泳动率值
	总量	A区	B区	C区	I级	II级	III级	IV级	
新鲜品	6	4	2	-	1	1	1	3	0.09, 0.17, 0.31°, 0.42°, 0.60, 0.89
干燥品	7	5	2	-	1	1	1	3	0.07, 0.09°, 0.17, 0.30°, 0.40°, 0.64, 0.71
炮制品	5	3	2	-	-	-	3	2	0.10, 0.39, 0.48, 0.65, 0.74

表 3 紫河车新鲜品不同部分的 SDS-PAGE结果 (° 为特征谱带)

Table 3 Results of different positions of *Placenta Hominis* by SDS-PAGE (° characteristic charts)

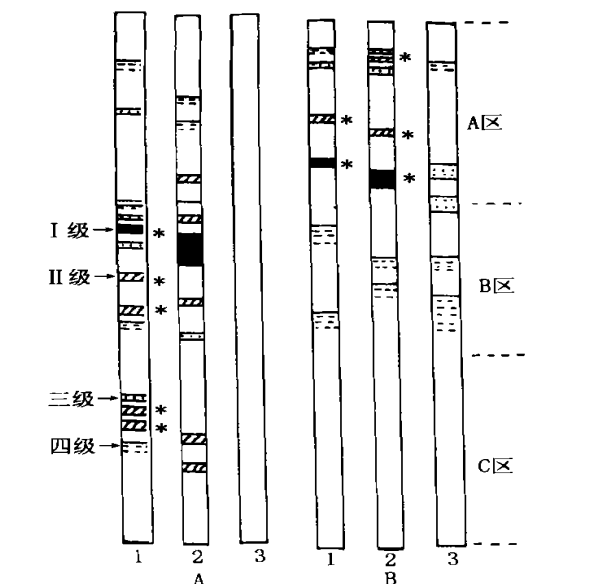
样品	电泳谱带分布				各级电泳谱带				谱带泳动值
	总量	A区	B区	C区	I级	II级	III级	IV级	
脐带	9	2	5	2	1	3	3	2	0.21°, 0.28, 0.38°, 0.46, 0.49°, 0.54, 0.58, 0.65°, 0.81
脐带+ 胎盘	12	1	5	6	1	2	6	3	0.33, 0.36, 0.47, 0.54°, 0.62°, 0.64, 0.68, 0.73, 0.82, 0.92, 0.96
胎盘	9	1	3	5	1	2	1	5	0.19, 0.45°, 0.53°, 0.6°, 0.71, 0.81, 0.91, 0.95, 0.98
胎膜	1	-	1	-	-	1	-	-	0.54

分为 4级 其中以 A区的 Rf= 0.2, B区的 Rf= 0.45, 0.55, 0.61和 C区的 Rf= 0.85为特征谱带。干燥品共有 9条谱带,分为 4级 其中以 A区的 Rf= 0.34, B区的 Rf= 0.41, 0.45和 C区的 Rf= 0.94为特征谱带。炮制品无明显谱带产生。

由表 2及图 1-B可见,新鲜品共有 6条谱带,分为 4级。其中以 A区的 Rf= 0.31, B区的 Rf= 0.42

为特征谱带。干燥品共有 7条谱带,分为 4级 其中以 A区的 Rf= 0.09, B区的 Rf= 0.30, 0.40为特征谱带。炮制品的 5条谱带均为不明显III、IV级谱带。

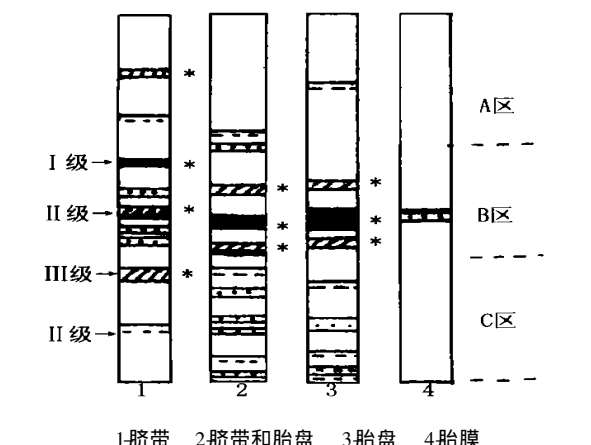
表 3及图 2可见,脐带部分共有 9条谱带,分为 4级 其中以 A区的 Rf= 0.21, B区的 Rf= 0.38, 0.49和 0.65为特征谱带。脐带和胎盘部分共有 12条谱带,分为 4级。其中以 B区的 Rf= 0.54, 0.62



1 新鲜品 2 干燥品 3 炮制品 * 为特征谱带
1-fresh *Placenta Hominis* 2-dried *Placenta Hominis* 3-products of prepared *Placenta Hominis* * characteristic charts

图 1 紫河车 3 种加工品的 PAGE 图谱 (A) 和 SDS-PAGE 图谱 (B)

Fig. 1 PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of three kinds of processed *Placenta Hominis*



1-脐带 2-脐带和胎盘 3-胎盘 4-胎膜
1-umbilical cord 2-umbilical cord and *Placenta Hominis* 3-*Placenta Hominis* 4-foetal membrane * -characteristic charts

图 2 紫河车新鲜品不同部位的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of different parts of fresh *Placenta Hominis*

为特征谱带。胎盘部分共有 9 条谱带,分为 4 级 其中以 B 区的 $R_f = 0.45, 0.53$ 和 0.60 为特征谱带。胎膜仅在 $R_f = 0.54$ 处有一 II 级带。

3 讨论

3.1 电泳作为分离 (分析) 蛋白质及带电物质的一种有效手段,已应用于中药的鉴别中^[7],但由于某些药材,尤其动物类药材,其蛋白质成分多为不溶于水的大分子,故采用普通的聚丙烯酰胺凝胶电泳法,难

将其蛋白质成分进行有效的分离与鉴别,如在 2.1 方法中紫河车炮制品即无明显的电泳级谱带。为此,实验采用解离系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (即 SDS-PAGE 法),因为在该系统中 SDS (十二烷基硫酸钠) 具有解离蛋白质分子的作用,它可将一些分子量较大,不溶于水的蛋白质分子解离成易溶于水的小分子蛋白质,如在 2.2 方法中紫河车炮制品便出现了较明显的 III、IV 级谱带,故采用连续系统 SDS-PAGE 法对本品的鉴别较为适宜。

3.2 与其他鉴别方法相比,电泳方法具有专属性更强的特点,不仅可以进行真伪鉴别^[4],而且本实验方法可以鉴别紫河车的非药用部分,因此更具有实用价值。

3.3 由图 1-B 比较紫河车的 3 种不同加工品的电泳图谱可见,其新鲜品与干燥品,无论在蛋白质谱带数目与位置匀有一定的对应,说明这种加工法 ($50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 干燥),基本上保持新鲜品蛋白质成分;相反,炮制品的电泳级谱带明显减少,说明炮制过程对其蛋白质的损失较大,从其温肾补精,益气养血的角度,应以新鲜品和干燥品为宜。

3.4 从不同部位的电泳图谱分析,胎膜部分由于其谱带数量较少,可推测其蛋白质种类及含量均较少 (其主要结构大多是纤维),因此《中华人民共和国药典》中紫河车除去胎膜的加工方法是有道理的。至于《中华人民共和国药典》中除去脐带的加工,虽然脐带也含有较多的蛋白质,但从谱带位置及谱带着色程度分析与胎盘有较大差异,且从脐带和胎盘与胎盘在此电泳条件下,多数谱带位于 C 区,泳动率 R_f 值较接近,说明此电泳条件对它们的分离不够完全 (可通过延长电泳时间加以解决),因此,从鉴别角度上看,如将脐带部分加入,可能导致蛋白质鉴别的困难,故以除去脐带为宜。

References

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I .
- [2] Zhu Z X. Identification of TLC on dried human *Placenta Hominis* and its falses [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(8): 402-403.
- [3] Li F R. The comparison on dried human *Placenta Hominis* and sheep *Placenta Hominis* in characters and TLC [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1997, 20(6): 295-296.
- [4] Liu Y Q, Huang X R, Lu P Y, et al. Identification of dried human *Placenta Hominis* and its falses by electrophoresis [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1997, 20(11): 557-558.
- [5] Zhang S Z, Wang Y S. Disc gel electrophoresis [J]. *Chem Bull* (化学通报), 1973, (1): 35-38.
- [6] Xu K S, Hao S L. The application of SDS polyacrylamide gel electrophoresis in quality control of pharmaceutical products [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 1982, 2(4): 193-199.
- [7] Li F, Zheng Z Q. *Electrophoretic Technology on Chinese Medicinal Materials* (中药电泳技术) [M]. Shenyang Liaoning University Publishing House, 1996.