

聚丙烯酰胺凝胶电泳技术在天然药物方面的应用

河北省药品检验所(石家庄050011) 王丽萍* 封淑华

摘要 介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理及其在天然药物方面的应用。

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的电泳方法(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)^[1],自50年代起广泛应用于蛋白质、核酸等生物大分子的分离并且发挥了很大的作用,近年来国内开始应用于天然药物分析,主要依据天然药物内在的蛋白质行为不同而达到分离、鉴别及成分分析。最早是1984年王龙的PAGE圆盘电泳鉴别虎骨^[2],现已引起许多研究者的兴趣。现简介PAGE的基本原理及在天然药物方面的应用。

1 原理

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体在交联剂、甲叉双丙烯酰胺存在下,经催化剂作用,引发聚合作用而形成的高分子聚合物。PAGE分离样品取决于其自身的净电荷和分子的大小。100ml凝胶溶液中含有单体和交联剂总克数称为凝胶浓度,记号为T%,通常将凝胶浓度T%=7.5%的凝胶称为“标准凝胶”。在电泳过程中,如使用单一电泳缓冲液和单一浓度的凝胶,这种电泳体系称为连续缓冲体系;如使用一种以上电泳缓冲液和一种以上浓度的凝胶,称为不连续缓冲体系。调整T%和选择缓冲体系可以获得较好的分离效果。一般的实验步骤为:凝胶制备——加样——电泳——染色。

2 应用

2.1 鉴别:中国药典1990年版一部和各地方标准中天然药物多采用形态学鉴定。但由于天然药物分布广泛,同属同种植物产地不同其外观都有差异,动物类药材品种多,来源复杂,而且伪药几可乱真,因此需要准确、可靠的方法加以区分、鉴别。PAGE技术是对天然药物鉴别的补充和完善,根据生物蛋白质具有种的特异性,其蛋白质序列可显示种间的不同而达到鉴别的目的。例如:哈蟆油是名贵中药,蟾蜍输卵管常混充入药,药典和现有资料多限于性状和膨胀度2项进行鉴别,实践证明仅以这2项作为鉴别依据是不确切的,通过PAGE可以看到蟾蜍输卵管与正品哈蟆油的图谱差异很大,极易鉴别;对于来自同属动物不同种的哈蟆油(中国林蛙)和哈蟆油(黑龙江林蛙),两者除具有相同的谱带外,其它谱带也不相同^[3]。刘惠娟等对不同产地的蛇床子及同属植物兴安蛇床、碱蛇床果实的可溶性蛋白进行了PAGE电泳分析研究,发现不同产地同种的蛇床子电泳图谱基本相似,仅存在微小的差别,这与形态学鉴定是一致的;同属不同种间图谱差异明显,但也存在相似之处,反映了同属植物之间的亲缘关系^[4]。王龙的PAGE对虎骨与其它哺乳动物骨的鉴别^[2];赵曦等的PAGE在山药类生药及其伪品鉴定中的应用^[5];郭澄等对7种菟丝子生药及其伪品的PAGE鉴别^[6];对鸡内金和鸭内金、广地龙(参环毛蚓)和土地龙、水蛭、蜈蚣、全蝎、壁虎、僵蚕等的PAGE电泳分析也见报道^[3,7]。以上研究表明,根据天然药物蛋白质的种的特异性,利用PAGE技术,不但能用于天然药物与伪品的鉴别,而且还可将同属不同种间药物区分开来,证明PAGE可以用为鉴别天然药物的简便、可靠的新方法。

2.2 成分分析:天然药物成分复杂,人们不断探索用适宜的方法进行成分分析,徐康森等^[8]首先对家、野麝香的水溶性成分进行了质量比较,发现家、野麝香水溶性成分主要含有多肽或小分子蛋白成分,用PAGE分析并扫描,家麝香为5条电泳区带,野麝香为7条,通过计

*Address: Wang Liping, Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang

算表明家、野麝香电泳百分含量上有一定的差别,但其成分的迁移率相近,很可能为一组相似的成分,在此基础上进一步用HPLC和FPLC(快速蛋白液相层析)及氨基酸分析考察,证明两者成分非常相似。姚文兵^[9]等对大黄进行生化研究,系采用凝胶柱层析分离、纯化后,经PAGE鉴定波叶大黄多糖RHP—A、RHP—B。PAGE无疑是分离天然药物成分的有效手段之一。

2.3 同工酶分析:同工酶是指能催化相同的化学反应,但酶蛋白分子结构与理化性质不完全相同的一类酶。同工酶分析已广泛地应用于作物品种资源调查、育种亲本的选择、杂交子代的测定及植物阶段发育研究等各个领域,也可用于研究不同种类植物的亲缘关系。何执中等^[10]利用PAGE对8种贝母属植物进行同工酶分析,这8种贝母属植物为:太白贝母(属“川贝”类)、浙贝母、东阳贝母(属“浙贝”)、湖北贝母、蒲圻贝母、鄂北贝母、紫花鄂北贝母和漳县贝母,表明不同种贝母属植物的同工酶谱显示了明显的差异性,但漳县贝母与太白贝母间酶谱差异较小,表明两者亲缘关系较近;同种栽培植物但产地不同其同工酶谱差异较小,同种植物野生与栽培品之间的酶谱不尽相同。朱俭等^[11]利用PAGE对甘草属7种及2个变种叶片中的过氧化物酶和酯酶同工酶进行分析。

2.4 其它:冬虫夏草是一种名贵天然药物,经过多年研究发现可以通过人工培养获得接近天然虫草物,有几种人工培养虫草菌丝体的方法:a)子囊孢子分离培养、b)僵虫组织分离培养、c)僵虫体外菌丝分离培养、d)子实体分离培养。杨跃雄等^[12]用PAGE技术对这几种方法进行了比较,发现以方法d)的电泳图谱接近天然子实体,而且方法d)的菌丝体越培养至晚期,图谱越接近于天然子实体,同时用氨基酸分析和微量元素分析也表明d)与天然子实体接近。以上结果表明PAGE可用于工业上生产虫草菌的菌种鉴定和种质筛选。曹立亚^[12]对冻干参和传统商品参化学成分进行比较研究,人参蛋白是人参的活性成分,几种人参样品的SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠——聚丙烯酰胺凝胶电泳)图谱表明冻干参与鲜参谱带相同,生晒参谱带相同但含量低些,红参谱带少,由此说明冻干参在加工过程中发生的蛋白质水解变性的机会明显少于传统加工人参,为人参饮片加工方法的改进提供了理论依据,无疑会引起饮片加工方法的改革。

3 展望

PAGE在天然药物方面的应用仍处于探索阶段,但它使人们对天然药物内在成分的认识提高了新的水平——蛋白质、核酸的分析,必将深刻揭示天然药物的组成,PAGE将在天然药物的分析方面起重要作用。

高效毛细管电泳技术(High Performance Capillary Electrophoresis,HPCE)是80年代新发展起来的一种高效分离分析技术^[14~16],它包括毛细管中进行的自由溶液区带电泳(CZE)、凝胶电泳(GE)、等速电泳(CITP)、等电聚焦电泳(CIEF)和电泳与层析结合的毛细管胶束电动色谱(CMEC)、毛细管电色谱(CEC),较常用的是CZE和CMEC。HPCE可分析离子、中性分子,更适于大分子分析,而且高效快速,尚未见有关HPCE在天然药物方面应用的研究报道,但相信会取得满意的效果。

致谢:本文承蒙本所朱代舜主任药师审阅。

参 考 文 献

- 1 刘培楠,等.仪器分析及其分子生物学中的应用. 第三册.北京:科学出版社,1978.297
- 2 王 龙.中药通报,1984(5):16

(下转第336页)

and salt were studied. The results showed that the suitable germinating conditions were: temperature from 15~30°C, soil water content above 7.5 per cent, pH range 7 to 9, salt (sodium chloride) below 0.15 per cent.

(Original article on page 312)

The Medicinal Plants of Genus Purslane (*Portulaca* L.) in China

Lu Dequan

There are 6 species of purslane in China, namely *Portulaca oleracea* L., *P. pilosa* L., *P. grandiflora* Hook., *P. quadrifida* L., *P. psammotrophica* Hance and *P. insularis* Hosok. The author compiled an index for the species, examined and revised their trivial and botanical names recorded their blooming and fruiting bearing seasons, the locations of their growth habitats and uses. *P. hainanensis* Chun et How is a synonym of *P. psammotrophica* Hance.

(Original article on page 315)

(上接第229页)

- | | |
|------------------------------------|--|
| 3 石俊英,等.中草药,1993,24(4):201 | 11 朱 俊,等.复旦学报(自然科学版),1990,29(2):225 |
| 4 刘惠娟,等.中国中药杂志,1992,18(8):405 | 12 杨跃进,等.中草药,1993,19(9):28 |
| 5 赵 曦,等.药物分析杂志,1992,12(3):170 | 13 曹立正.中草药,1991,22(11):496 |
| 6 郭 澄,等.第二军医大学学报,1991,12(4):378 | 14 朱一川,等.第二届全国生物医学药学色谱学术会论文集.上册.1990.20 |
| 7 赵 曦,等.中国中药杂志,1993,18(7):396 | 15 陈 义,等.第二届全国生物医学药学色谱学术会论文集.下册.1990.274 |
| 8 徐康森,等.药物分析杂志,1992,12(5):280 | 16 陈 义译.分析仪器,1991,1:79 |
| 9 姚文兵,等.生物化学与生物物理学报,1991,23(6):482 | |
| 10 何执中,等.中国药科大学学报,1987,18(2):120 | |

(1993-11-06收稿)

欢迎订阅《有毒中草药彩色图鉴》

由张庆荣等主编的《有毒中草药彩色图鉴》已于1994年6月由天津科技翻译出版公司正式出版(书号 ISBN 7-5433-0466 X/R.126)。该书收载有毒中草药500余种。“图鉴”全部采用彩色实物照片,照片清晰、逼真,如实地反映出这些有毒中草药的形态全貌,生长习性及其生态环境。书中每一品种分别按来源、形态、生境分布、采制、成分、功能主治等项进行了简要的描述,对直观鉴别物种、形态特点是一部具有珍贵,科学价值和实用价值的大型精装彩色图谱。书后有中文及拉丁名索引。它是中医药科研、教学、生产及临床方面的参考书,同时也是识别中药和药材鉴别人员的实用工具书。订价每册130元,另加邮费13元,共143元。订阅者请寄300193(邮编)天津市鞍山西道《中草药》编辑部 金秀莲收。

中国自然科学核心期刊研究课题组公布了最新的“1992~1993年中国自然科学核心期刊”300种。使用“引文法”进行客观统计后得出结果,《中草药》名列第24位,位居中药学期刊之首。