

圆盘凝胶电泳法鉴别熊胆皮的研究

黑龙江省药品检验所(哈尔滨 150001) 仲昭庆* 钱忠直

摘要 以聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法,对熊、猪、牛、羊胆皮的水溶性蛋白进行凝胶电泳,采用凝胶电泳扫描对其电泳谱带进行分析,结果各胆皮均显示不同的谱带,可鉴别熊胆皮的真伪。

关键词 聚丙烯酰胺凝胶 圆盘电泳 凝胶电泳扫描 鉴别熊胆皮

熊胆系熊科动物黑熊 *Selenarctos thibetanus* Guvier, 或棕熊 *Ursus arctos* L. 的干燥胆囊。近年来随着活熊取胆技术的开发,市场上出现了大量的以其它动物胆皮,灌装引流熊胆汁的伪品熊胆,以现行熊胆检验标准检验,很难识别其真伪。本文采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法对熊、猪、牛、羊胆皮的水溶性蛋白进行电泳,并结合凝胶电泳扫描对其电泳谱带进行分析比较,识别熊胆皮,以鉴别熊胆真伪。

1 仪器、供试品和试药

1.1 仪器:电泳仪:国产, JMDY-WI型精密稳压电泳仪。附圆盘电泳槽,玻璃管为 $110 \times 5 \text{mm}$ 。高速离心机:日本产日立20PR-5型。薄层扫描仪:日本产岛津CS-910型,附岛津EIA型数据处理机。

1.2 供试品:熊胆皮₁:经鉴定为正品东北吊胆胆皮。熊胆皮₂:经鉴定为正品四川扁胆胆皮。猪胆皮:哈尔滨肉类联合加工厂提供。牛胆皮:哈尔滨牛羊肉加工厂提供。羊胆皮:哈尔滨牛羊肉加工厂提供。

1.3 试药:丙烯酰胺:临海化学厂(化学纯),含量不少于98.5%。亚甲基双丙烯酰胺:德国莫克公司,纯度为98%。三羟甲基胺基甲烷:美国产。四甲基乙二胺:上海前进试剂厂,纯度不少于98.0%。过硫酸铵:北京化学试剂三厂,分析纯。甘氨酸:天津市东方卫生材料厂。考马斯亮蓝R₂₅₀:北京化工厂, BDH进口分装,电泳分析用。试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 供试品液的制备:取熊、猪、牛、羊胆皮碎段各0.2g,分别置乳钵中加乙醚研磨2次,每次5ml,弃去乙醚液,残渣挥尽乙醚,再分别加生理盐水2ml,研磨成糊状,离心(10000r/min, 10℃), 15min,取上清液,以0.45μm的微孔滤膜滤过,滤液备用。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶管制备:按文献^[1]方法pH8.9系统制备,凝胶浓度为7.5%的聚丙烯酰胺凝胶液,分别在底端加橡皮塞的玻璃管中灌分离胶2ml,覆盖5mm厚的水层,室温放置3h,待胶液与水层界面消失后再现时,凝胶聚合完成,用滤纸吸干水层,再分别灌浓缩胶0.5ml,同样加水5mm厚,室温放置,聚合完成后,用滤纸吸干水层,备用。

2.3 加样:将供试品液制成含10%甘油的溶液后,分别加样0.2ml,置凝胶玻璃管胶面上,加少量电极缓冲液覆盖。

2.4 电泳:将已加样的各凝胶管,紧密插入电泳槽上槽底部的各个圆孔内,上、下槽分别加甘氨酸-三羟甲基胺基甲烷缓冲液400ml,上槽接负极,下槽接正极,通电后,前30min控制电压在60V,然后加至160V,电泳约3.5~4h后,停止电泳按文献^[1]方法取出胶。

2.5 染色:按文献^[2]方法配制0.025%考马斯亮蓝R₂₅₀染色液及脱色液。将胶条浸置染色液中5h以上,取出,以水迅速漂洗后,置脱色液中脱色,多次更换脱色液,至背景清晰后,

*Address: Zhong Zhaoqing, Heilongjiang Provincial Institute for Drug Control, Harbin

取出,置10%醋酸中保存,电泳后区带见图1。

2.6 谱带区域划分:4种胆皮在距前沿近端均有一颜色较深的主谱带X,但泳距不完全一致,将这一段谱带定为C区,近原点处均有1~3条狭细的谱带,将此段定为a区,a区与c区之间定为b区。

2.7 凝胶电泳扫描:将脱色后的凝胶条置比色管中,加10%的醋酸液,密塞,做凝胶电泳扫描用。

2.7.1 吸收光谱:采用单波长法扫描,吸收光谱见图2。测得最大吸收波长 λ_{max} =560nm,最小吸收波长 λ_{min} =460nm,故确定 λ_s 为560nm, λ_R 为460nm。

2.7.2 扫描:双波长透射法,直线扫描, λ_s 560nm, λ_R 460nm,狭缝 10×0.3 ,灵敏度 $\times 1$ 。扫描速度20mm/min,纸速20mm/min,各胆皮凝胶电泳谱带扫描谱见图3,经岛津EIA型数据处理机对各峰面积按归一化法计算,结果见表。

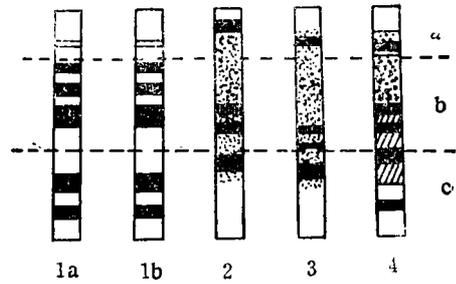


图1 电泳谱带

1a-东北吊胆胆皮 1b-四川扁胆胆皮 2-猪胆胆皮
3-牛胆胆皮 4-羊胆胆皮
■ 深蓝色 □ 乳白色半透明 图-背景较深

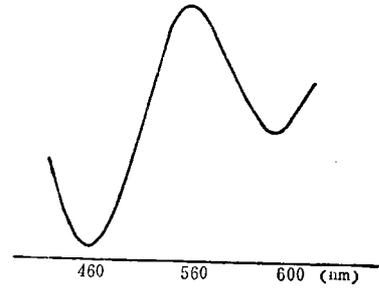


图2 吸收光谱图

表 各胆皮电泳谱带相对百分含量

| 序号 | 由原点至前沿依次排列(%) | | | | | |
|----|---------------|-------|------|-------|-------|-------------|
| | a区 | | b区 | | c区 | |
| 1a | 14.64 | 10.21 | 7.51 | 22.63 | 43.40 | 3.27 1.35* |
| 1b | 8.81 | 14.99 | 6.52 | 22.55 | 40.03 | 3.32 0.77* |
| 2 | 34.28 | 41.59 | | | 21.01 | 3.12* |
| 3 | 69.58 | 3.11 | 0.50 | | 23.37 | 3.45* |
| 4 | 44.71 | 13.69 | | | 25.27 | 4.06 12.27* |

*为电泳前沿的吸收峰百分含量

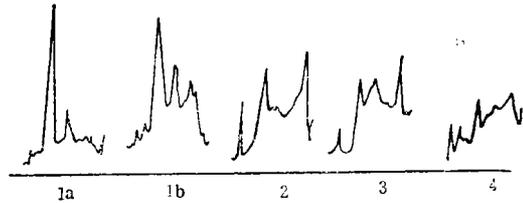


图3 胆皮凝胶电泳扫描图谱

1a-东北吊胆胆皮 1b-四川扁胆胆皮 2-猪胆胆皮
3-牛胆胆皮 4-羊胆胆皮

从4种胆皮的凝胶电泳谱带看,熊胆皮8条,猪胆皮4条,牛胆皮4条,羊胆皮7条、熊、猪、牛、羊胆皮的谱带分布为,a区各有谱带2、1、1、3条;b区各有谱带4、2、2、2条;c区各有谱带2、1、1、2条。猪和牛胆皮的谱带数与熊胆皮有显著性差异。熊和羊胆皮的谱带数随相近,但分布有异,在b区熊胆皮4条谱带有2条分子量较大,泳距较短,另两条分子量较小,泳距较长;而羊胆皮在b区的2条谱带分子量比较小,泳距较长。若将凝胶对光观察,羊胆皮凝胶主谱带X上、下1~2cm内均有乳白色半透明谱带,其它胆皮均无此谱带。东北吊胆皮及四川扁胆皮实验结果谱带一致。猪、牛、羊、在a区和b区均有较深的背景,使得凝胶电泳扫描基线抬高。而熊胆皮则背景较浅,扫描基线亦不高。

参 考 文 献

- 1 中国科学院上海药物研究所编著. 中草药有效成分提取与分离. 第二版. 上海: 上海科学出版社, 1983. 185
- 2 童明庆, 主译. 实用免疫化学(英). 南京: 南京出版社, 1990. 34

(1993-08-30收稿)

Pharmacological Studies on "Baxianjiangtang" (II)

Chen Shuanghou, Wu Zhikui, Liu Fengyun, et al

The ingredients of compound "Baxianjiangtang" are *Radix Rehmanniae*, *Radix Polygoni Multiflori* prepartate, *Radix Astragali*, *Radix Ophiopogonis* etc. Pharmacological tests showed that it can decrease LPO and increase the activity of SOD in blood and liver of Alloxan induced diabetic rats and mice. It also increased that phagocytosis of phagocytes of experimental animals. It can increase tolerance to fatigue at low and high temperature conditions. According to the above results, it can be considered as safe and effective.

(Original article on page 366)

Studies on the Original Plant and Pharmacognosy of Aiye from Gansu Province

Song Pingshun, Wei Yuling, Zhang Bochong

Investigation on the plant origin and Pharmacognosy of Aiye grown in Gansu revealed that 12 species of the *Artemisia* genus were used either as or adulterated with Aiye, instead of the genuine drug. Morphological and histological identifications were presented to distinguish the faked drug.

(Original article on page 372)

Study on the Identifi-Cation of Bile-Cyst of Bear by Disc Gel Electrophoresis

Zhong Zhaoqing, Qian Zhongzhi

Disc polyacrylamide gel electrophorsis was performed to detect water soluble proteins of the bile-cysts of bear, pig, cow and sheep. The bands of electrophorsis were analysed by means of gel electrophoresis scan. The results showed that different bile-cysts have different bands. Thus, this method can be used to identify the bile-cyst of bear.

(Original article on page 377)

《药代动力学数据库—临床部分》征订启事

临床药学的最新工具书和参考书《药代动力学数据库—临床部分》一书由刘昌孝主编，中国医药科技出版社出版，书号：ISBN7-5067-1141-9/R·1023。

编辑者从大量国内外药代动力学文献中选择了临床上使用的480多种药物，将其药代动力学参数以表的形式印刷成书，一种药物制剂列一个表，总计480个表，每个表包括药名(中文名、外文名)、试验对象(健康人、病人)、药物剂型、剂量、给药途径、测定方法、药代参数和资料来源(作者、书刊名、年、卷、页)八个栏目。目录按通用分类法分类列出中文、外文药名。书末附有外文索引，均便于读者查阅。本书另备软盘，可供读者在计算机上查找、演示和打印(软盘另行订购)。书前论述了药代动力学参数的基本知识和基本计算方法，可供读者计算试验数据用。

本书为临床药学的工具书和参考书，可供医生、药师、医药研究人员和医药生产的技术人员参阅，也可作为医药院校师生的参考书。

全书40万字，500页，胶版纸印刷，塑料压膜(加厚)装订，定价每本42.00元，邮购不另加费，1994年4月出版，现在开始征订，印刷有限(仅1500本)欲购从速。

凡订购者请汇款至天津鞍山西道308号 邮码300193 《中草药》杂志编辑部黄永谦收