

- 1 四川省生物研究所,等.经济两栖爬行动物.上海:上海科学技术出版社,1978.14
- 2 李成义,等.氨基酸杂志,1992,(1):48
- 3 李明刚.中草药通讯,1978,(9):33
- 4 徐国钧,等编著.药材学.北京:人民卫生出版社,1960.
- 5 雷必武.野生动物,1994,(5):36
- 6 唐稚英,等.野生动物,1987,(1):30
- 7 马常夫,等.东北师大学报自然科学版,1985,(1):81
- 8 杨建民,等.食品与发酵工业,1992,(1):33

(1996-03-08 收稿)

Dynamic Analysis of Oviduct, Egg and Protein Contents in Chinese Linwa (*Rana chensinensis*) Grown in Liaoning Province

Jiang Chaoguang, Fang Wuxiong, Wang Shoubing, et al

Oviduct, egg and protein contents of 1~3 years old *Rana chensinensis* were studied. Results showed that the oviduct content and the absolute value of eggs were significantly higher in 3-year old frogs, While the relative value of eggs was highest in 2 years old frogs. Crude protein content varied in different aged group as well as in different parts of the body, with eggs containing the highest amount. Protein in oviduct was comparatively consistant. Protein content in deviscerized body was rather high with no significant difference between male and female. Frogs before and after hibernation have essentially similar oviduct and protein content, but egg content were significantly higher after hibernation. Protein content in eggs was not notably changed.

中药青箱子、土鳖虫的等电聚焦电泳研究

湖北中医学院物化教研室(武汉 430061) 陈振江*
湖北中医学院附属医院药剂科 张香梅

摘 要 应用等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis 简称 IFE)技术,对果实种子类中药青箱子 *Celosia argentea* L. 和动物类中药土鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walk 进行 IFE 研究。结果表明,清晰的电泳谱带既可作为鉴别药物纯度及真伪的依据,也可用于确定药物样品所含主要蛋白质成分的等电 pH,从而为中药材及其制剂的生产、贮藏提供定量参考数据。

关键词 青箱子 土鳖虫 等电聚焦电泳 等电 pH

在中医临床的应用上,果实种子类中药和动物类中药占有很大的比重,所以应确保用药质量。由于果实种子类和动物类中药材均富含蛋白质。故可以认为它们疗效的好坏与其所含蛋白质成分的性质密切相关。本实验选用的果实种子类中药青箱子和动物类中药土鳖虫为常用的中药材。在实际应用中经常有混淆品出现,需用有效的方法加以鉴别区分;此外,它们所含主要蛋白质成分性质如

等电 pH 的确定,对药材及制剂的生产、贮藏和使用有重要意义。IFE 技术可以满足这两方面的要求。

IFE 是比普通的聚丙烯酰胺凝胶电泳更为先进的一种电泳技术。含有不同蛋白质成分的各种中药及其制剂均可应用 IFE 技术对其进行质量分析与鉴定^[1]。然而一般的 IFE 需用两性电解质价格昂贵,且需配备较大功率的电泳仪及与之配套的带有冷却装

* Address: Chen Zhenjiang, Department of Physical Chemistry, Hube College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan

置的电泳槽,同时要求实验者具备较熟练的操作技巧方可完成。为减少昂贵试剂的用量,且用普通的电泳设备即可完成 IFE,使之能在广大基层单位推广应用,我们应用改进的 IFE 技术,以青箱子和土鳖虫及牛血清蛋白制剂为例,进行 IFE 可行性研究,效果良好。

1 仪器与试剂

DYY-Ⅲ4 型电泳仪,圆盘电泳槽;所用试剂均为 AR 级,双蒸水,pH5~8 及 pH3~10 两性电解质(北京军事医科院)。

样品:青箱子、土鳖虫由本院鉴定教研室鉴定并提供;牛血清蛋白由武汉大学生命科学院赵永芳教授提供(此为样品③)。

2 方法

2.1 样品液的制备:分别准称 2g 土鳖虫和 1.5g 青箱子分置于乳钵中捣碎后用适量有机溶剂(乙醚、无水乙醇各 50%)浸泡脱脂并过滤,待有机溶剂挥发后再各加 5ml 生理盐水研磨后置试管中离心(4000r/min)10min,取上清液分置于半透膜袋透析除盐即得样品液①、②。

2.2 凝胶的制备:在 20ml 烧杯中依次加入 30.8%凝胶母液 2ml,40%两性电解质 0.3ml,样品液① 0.3ml,蒸馏水 3ml,过硫酸钾(饱和)0.1ml,10%四甲基乙二胺 100 μ l,混匀后立即注入 2 支已准备好的凝胶管中,胶加到离顶部 3~5mm 处(注意管内不能有气泡,若有则应轻弹管壁排除掉)。胶上再小心注入 3mm 厚的水层,以隔绝空气并使胶面平整,室温下聚合 30min,待胶-水界面清晰可见后,用滴管吸去水层。

按同样的方法制备样品②、③的凝胶柱各 2 支。

2.3 电泳槽的安装:将制备好的 6 支凝胶管编号并分别用阳极电极液(5%磷酸缓冲液)洗涤各凝胶管上端 3 次;用阴极电极液(5%乙二胺缓冲液)洗涤各凝胶管下端 3 次。然后将各凝胶管按统一的方法垂直固定于圆盘电泳槽中,上槽加入阳极电极液(以恰好浸没各凝胶管为宜),下槽加入阴极电极液(以凝胶

管浸入 3/5 为宜)。

2.4 等电聚焦:按上(+)、下(-)接通电泳槽电源。调整电流为 3.5mA/管,进行电泳。电泳开始,电流不断下降,以电流不再下降(电流表指针指向零)作为样品已聚焦的标志。全程电泳 3h 左右。

2.5 样品 pH 梯度的测定:电泳结束后,从电泳槽中小心取出各凝胶管(注意标记好各管的上、下端),用蒸馏水洗涤凝胶两端及玻璃管外壁 3 次。随后取出胶条(方法是用注射器向凝胶柱与玻璃管壁之间轻轻注入少量蒸馏水,必要时用吸耳球从胶管顶端轻轻将胶条压出),精确测量各样品胶柱的长度后,将 1、2、3 号样品胶柱各取一条置于 20%三氯醋酸中固定 40min;各样品剩余的一条胶柱按 0.5cm/段切成若干段(必要时胶段可以分的更小),分置于各已编号并盛有 1ml 蒸馏水的 10ml 试管中,4℃下浸泡 1h,用精密 pH 试纸(或精密 pH 计)测定各样品各段浸泡液的 pH 值。

3 结果与讨论

3.1 经固定后的样品的胶柱上出现清晰的乳白色电泳谱带,如图 1 所示。青箱子在酸性区域有 2 条带,近中性区有一条较强带,碱性区有一条弱带;土鳖虫在偏酸性区有一条较强带,在碱性区有两条较弱带;牛血清蛋白在偏酸性区有一条较强带。

3.2 以各段胶所在位置(即胶柱长度)为横坐标,以相对应的浸泡液的 pH 值为纵坐标作图可求得各样品胶柱上的 pH 梯度曲线。以样品①为例结果见图 2。因胶柱经固定后其长度会发生变化,故由 pH-长度关系曲线求被测样品所含主要蛋白质成分的等电点(PI),所用长度是经校正后的长度即:

$$\text{胶柱长度} = \text{蛋白质迁移距离} \times \frac{\text{原胶柱长(没经固定)}}{\text{现胶柱长(经固定后)}}$$

根据各样品在各自 IFE 胶柱上的谱带位置(经校正后),再分别与各自的 pH-长度关系曲线对比,可方便地得出各样品的蛋白质 PI。例如样品①所含主要蛋白质的 PI 分

别为 4.7 和 5.7(指图 1A 中的两条较粗谱带);样品②所含主要蛋白质成分的 PI 为 4.5;样品③所含蛋白质的 PI 为 4.8,其中样品③用此法求得的 PI 与文献值完全一致,进而证明本实验所得数据是可靠的。

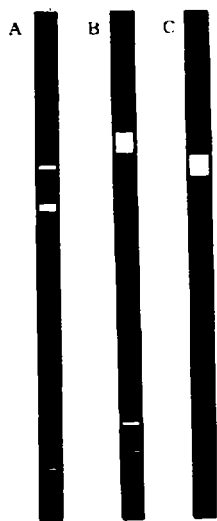


图 1 青箱子、土鳖虫及牛血清蛋白的 IFE 图谱

A-青箱子 B-土鳖虫
C-牛血清蛋白

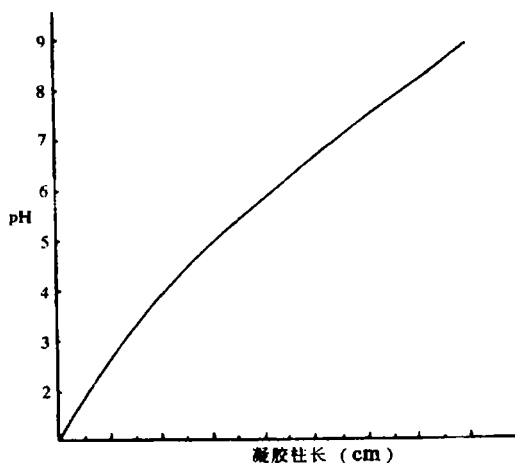


图 2 青箱子 IFE-pH-胶柱长度关系曲线

3.3 两性电解质的加入是为了在电泳支持

物上产生适宜平滑的 pH 梯度。其 pH 灌输选择得当可提高 IFE 分辨率。在测定未知样品 PI 时,可先采用 pH=3~10 的两性电解质,等初步测出 PI 后,再改用包括样品 PI 在内的窄的 pH 范围的两性电解质。在实际工作中,为获得均一的场强同时节省试剂简化操作,可在 pH=3~10 的两性电解质中加入占载体总量 10% 的 pH=5~8 的两性电解质。本实验即采用此法效果良好。

3.4 本实验采用将样品液混入凝胶液中的点样方法,即简化了操作,增大加样量,同时依据 IFE 特点,避免了样品液体在胶柱中所占的一段 pH 梯度,从而扩大了电泳分离范围,提高分辨率并缩短电泳时间。

3.5 由于 IFE 谱带经固定后即可清晰地呈现出来,故本实验简化了“染色”操作。但如果是对药材所含蛋白质成分进行精密地测定,一般应采用“染色”手段,同时将胶段分割的更小。

3.6 聚丙烯酰胺的纯度、待测样品液的脂、盐含量均对 pH 梯度有一定的影响。本实验样品的脱脂、脱盐处理其目的就在于消除不利影响,以获得理想 IFE 谱带。

上述实验,所得结果重现性良好。目前我们继续应用该技术做着果实种子类及动物类中草药的 IFE 研究,以为含有蛋白质成分的中药及其制剂的鉴别和生产,提供一套较完整的参考标准。

致谢:本实验工作得武汉大学生命科学院生化技术实验室赵承芳教授的热情指导和帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 陈振江,等. 中成药,1994,16(9):52
- 2 赵承芳编著. 生物化学技术原理及其应用. 武汉:武汉大学出版社,第二版,1994. 331

(1996-01-22 收稿)

Characterization of Semen of Feather Cockscomb(*Celosia argentea*)and Chinese Ground Beetle (*Eupolyphage sinenses*)by Isoelectric Focusing Electrophoresis

Chen Zhenjiang, Jin Tao

Isoelectric focusing Electrophoresis (IFE) was used to determine the isoelectric point of main protein com-

position in Chinese Traditional Medicine (TCM) either of animal origin Such as (*Eupotyphage sinenses*) or from fruit or seed of plants (such as the seed of *Celosia argentea*). Results showed that their IFE bands were always quite distinct, which can be used to assess their quality and to distinguish them from confusable varieties.

紫外分光光度法测定八宝丹中胆红素含量的改进

厦门中药厂(361009) 吴咏勤* 黄建平 郑一民 周佩珊

摘要 分别以(a)乙醇-氯仿(3:7)和(b)醋酸-氯仿(1:4)为溶媒,以相应试剂作空白,用标准曲线法和吸收系数法测定八宝丹中胆红素的含量,并进行比较。结果表明,吸收系数法简便可行,溶媒(b)较合理。

关键词 紫外分光光度 八宝丹 胆红素 酸催化异构化

八宝丹中含牛黄、田七、蛇胆、麝香等,胆红素是天然牛黄的主要成分。现行标准中的含量测定系以(a)乙醇-氯仿(3:7)作溶媒,其中滴加1滴浓盐酸,使胆红素从钙盐中游离出来,溶解在溶媒中。我们注意到胆红素在强酸中易发生酸催化异构化(即由天然牛黄中的BRIXa转变成BR \blacksquare a+BRX \blacksquare a)⁽¹⁾和红色反应,其稳定性受到一定影响⁽²⁾。采用(b)醋酸-氯仿(1:4)作溶媒,其中醋酸既能代替乙醇溶解包在胆红素钙盐外面的胆汁酸,使胆红素游离出来,且不易使其发生异构化及红色反应。为此将溶媒(b)与原来的溶媒(a)进行比较,考察溶媒(b)用于测定八宝丹中胆红素含量的可行性。

1 仪器与试剂

岛津UV-265紫外可见分光光度计;QC250型超声波清洗器;胆红素对照品(中国药品生物制品检定所);所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 最大吸收波长的选择:取胆红素对照品和样品适量,分别用溶媒(a)、(b)制备检测溶液,以相应的试剂为空白,分别在500~400nm波长段扫描,结果表明,最大吸收波长均为453nm,与部颁标准一致。

2.2 标准曲线的绘制:精密称取胆红素对照品5mg,置50ml棕色量瓶中,加溶媒(b)溶解,并稀释至刻度,摇匀。精确吸取0.2,0.4,0.6,0.8,1.0ml,分别置10ml棕色量瓶中,加溶媒(b)至刻度,摇匀,以相应的试剂为空白,照分光光度法在453nm波长处直接测定吸收度。结果在2~10 μ g/ml范围内,具有良好的线性关系,回归方程为 $A=10.407C+0.00209$, $r=0.9999$ 。

2.3 胆红素提取方法的比较:将八宝丹研细,各精密称取10份样品,分别以溶媒(b)作冷浸、加热回流和直接超声波处理。结果表明,冷浸提取需3h,加热回流提取需1h,而直接超声波处理5min已完全。超声波处理方便、省时。我们选用超声波处理10min。

2.4 加抗氧化剂对样品测定的影响:取同一批样品若干份,分别作加抗氧化剂10%NaHSO₃2滴与不加抗氧化剂的样品测定。结果表明,两种溶媒不加抗氧化剂NaHSO₃,均使测定结果偏低约20%,而对测定的稳定性影响不明显。

2.5 稳定性实验:按样品的测定方法,每隔30min测吸收值,结果(a)、(b)溶媒系统均在2.5h内稳定,吸收值几乎不变。

2.6 精密度试验:取同一批样品,精确称取

* Address: Wu Yongqin, Xiamen Factory of Chinese Materia Medica, Xiamen