

图2 黄芪甲苷 HPLC制备色谱图

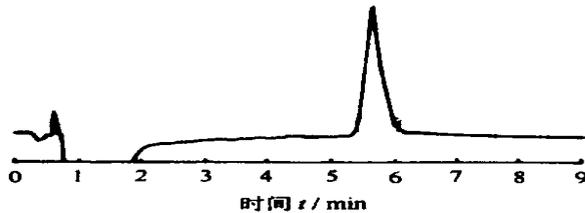


图3 目标产物黄芪甲苷 HPLC检测图

一些区别:准备分析用样品时,要求方法的回收率尽量接近100%。制备色谱的样品虽也有提取率高低的问题,但更注重样品溶液中目标分离产物的含量,杂质越少,制备时相对所得目标产物越多,制备效率越高。两者也有相似之处,即尽量避免在前处理时,由于酸碱或加热等原因造成目标分离分析成分的分解。

由于加热或药材长时间浸泡,会造成黄芪甲苷受到破坏或与其他成分发生反应而使结构改变。所以本实验控制溶剂减压蒸发时水浴温度在60℃,回流提取2h

用乙醚洗涤,主要是为了脱去一些脂溶成分和一些杂质峰的干扰,对黄芪甲苷含量和结构并无影

响,洗涤后在加入甲醇之前要减压水浴挥干乙醚

氧化铝同时对黄酮类和皂苷类有吸附作用,在准备分析用样品时,不宜使用,但应用于制备色谱样品则是可以的,因为通过氧化铝柱后,虽然皂苷类略有损失,但可以很好除去黄酮类和色素类成分,明显的提高了洗脱液中黄芪甲苷的含量。

文献中高效液相色谱法大多采用紫外检测,但由于黄芪甲苷仅在200nm左右有弱的末端吸收,色谱图中噪音对结果影响较大,灵敏度较差,采用示差折光检测,谱图清晰,峰位准确,制备时易于判断,收集目标产物

实验中考虑到普通实验室在进行制备实验时,没有大流量高效液相色谱制备泵,本文研究了流动相流速为5mL/min时多种制备色谱流动相的条件,实验结果表明在甲醇-水(45:55)的条件下,目标产物分离较为完全,单元分离时间也较为合适

本文研究了通过反相高效液相制备色谱从黄芪药材中提取、分离黄芪甲苷单体的完整方法,采用反相高效液相色谱制备的黄芪甲苷经四谱(核磁共振、红外光谱、紫外光谱、质谱)共同检测,并同文献数据对照,确定纯度达到98%,符合标准物质的质量要求

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977.
- [2] 王宝琴,苏健,鲁静. 黄芪甲苷的检测在中药质控中的应用[J]. 中国中药杂志,1996,21(3):1613.
- [3] 田丰,邓英杰. HPLC法测定黄芪中的黄芪甲苷含量[J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(1):43.

动物中药可溶性蛋白凝胶电泳图谱的研究

陈振江¹,陈科力¹,邹菁^{2*}

(1. 湖北中医学院药理学系,湖北 武汉 430061; 2. 武汉化工学院,湖北 武汉 430071)

中图分类号: 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)12-1088-03

动物胶和蛇类中药属贵重药材,经煎煮浓缩而成的胶均为部分水解的胶质蛋白,难以用传统的方法加以区分。我们采用凝胶电泳系列技术对下列动物药进行鉴别研究。

1 实验材料

- ① 乌梢蛇 *Zoocys dhumnacles* (cantor);
- ② 蕲蛇 *Agkistrodon acutus* Guenther 为蝮科动物五步蛇;
- ③ 水赤链游蛇 *Natrix annulari*;
- ④ 龟胶;
- ⑤ 鹿角胶;
- ⑥ 猪皮胶(自制);
- ⑦ 伪品胶;
- ⑧ 鲜王浆 A(湖北扬子江蜂业公司);
- ⑨ 鲜王浆 B(湖北崇阳,1999.11);
- ⑩

* 收稿日期: 2000-12-13
基金项目: 湖北省教委自然科学基金项目(98B03)

鲜王浆 C(华中农大永春蜂产品技术部, 1999. 11. 23); ⑩金钱白花蛇为眼镜蛇科 *Bungarus multicinctus* Blyth 的干燥幼蛇; ⑪阿胶(山东平阴阿胶厂, 批号 980906)。③、⑦由本院中药鉴定教学研究提供, 其余样品均为市售。全部样品经本院陈科力教授鉴定

2 仪器与试剂

DYY-III 4型电泳仪, DYY-27A型圆盘电泳槽, TGL-16C台式高速离心机, PH3-10两性电解质, 其余所用试剂均为 AR级, 重蒸水

3 SDS-PAGE

3.1 试剂的配制^[1]: 参照文献^[2]的方法进行。所配各种试剂均应置于 4℃下贮存备用。

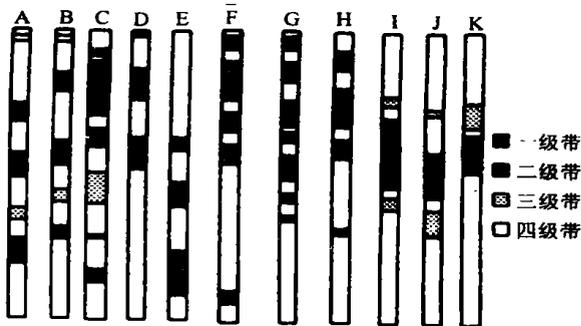
3.2 样品液的制备: A) 称取胶类样品各 1 g, 分置于 20 ml 烧杯中并各加 2 ml 重蒸水在热水浴上溶解, 超声振荡 30 min, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用样品缓冲液按 1: 3 比例稀释混匀, 置冰箱中保存备用。将各标准蛋白 0.2 g 加样品缓冲液 1 ml 配成溶液备用。

B) 将蛇类样品各取 0.5 g, 分别置于研钵中捣碎, 用有机溶剂浸泡脱脂, 过滤, 待溶剂挥发后用生理盐水研磨匀浆, 以 4 000 r/min 离心 15 min 取上清液置于半透膜袋中透析 48 h

C) 称取⑤、⑥、⑦样品各 0.5 g, 分别加入 1.5 ml 样品缓冲液研匀并依次标记为浆 1 2 3, 将 3 种样品分置于半透膜袋中透析 48 h 透析完毕后再用样品缓冲液按 1: 3 比例稀释混匀, 置冰箱中备用。

3.3 电泳分析: 参照文献^[2]方法进行。

3.4 样品电泳图谱及标准品相对迁移率 R_m 与分子量的关系如表 1 图 1 所示



A-鹿角胶 B-龟胶 C-阿胶 D-猪皮胶
E-水赤链游蛇 F-金钱白花蛇 G-蕲蛇
H-乌梢蛇 I-蜂王浆 A J-蜂王浆 B K-蜂王浆 C

图 1 蛇、动物胶及蜂王浆的 SDS-PAGE 图谱

4 等电聚焦电泳 (IFE)

4.1 试剂配制与凝胶制备: 参照文献^[2]的方法进行, 所用两性电解质为瑞典 LKB 公司 Ampholyte 1809-101 pH= 3.5~ 10, 并制备两支空白凝胶

表 1 主要蛋白质 SDS-PAGE 的 R_m 值及相应分子量

标准品与样品	特征蛋白质 迁移距离 (cm)	R_m	分子量 (M)	logM
牛血清蛋白	2.53	0.30	67500	4.829
胃蛋白酶	4.46	0.53	35000	4.544
糜蛋白酶原	5.73	0.68	25000	4.398
核糖核酸酶	7.75	0.92	13500	4.130
阿胶	1.45	0.172	91622	4.962
	2.20	0.260	73114	4.864
	5.20	0.615	29512	4.467
	6.20	0.733	21627	4.335
鹿角胶	3.55	0.420	48417	4.685
龟胶	2.20	0.260	73113	4.864
猪皮胶	0.254	0.030	13230	5.121
	2.03	0.240	76913	4.886
金钱白花蛇	0.60	0.069	119674	5.078
	1.90	0.217	81667	4.912
	8.40	0.961	12023	4.080
水赤链游蛇	4.04	0.48	42000	4.623
	5.56	0.66	26000	4.415
	8.42	1.00	11000	4.041
乌梢蛇	1.60	0.1813	89141	4.950
	2.80	0.321	62476	4.796
	6.40	0.733	21643	4.335
蕲蛇	1.60	0.179	89950	5.080
	4.35	0.487	40738	4.610
	5.60	0.627	28408	4.453
	6.20	0.694	23878	4.378

4.2 样品液的制备: 参照文献^[3]的方法操作, 样品称重 0.5 g

4.3 等电聚焦: 按文献^[4]的方法操作

4.4 固定及空白管 pH 梯度测定, 参照文献^[2]的方法进行, 结果见图 2

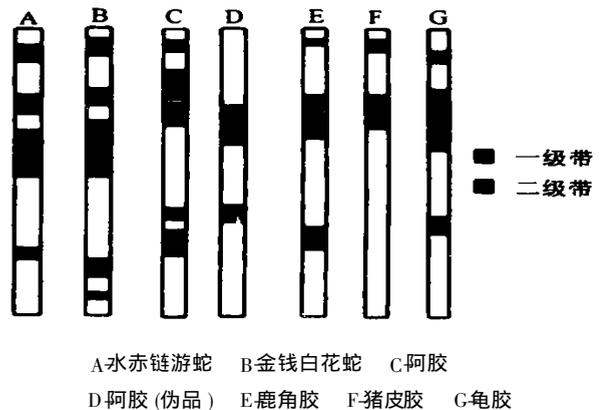


图 2 蛇、动物胶药材的 IFE 图谱

4.5 样品中主要蛋白质的 PI 测定: 因胶柱经固定后其长度会发生变化, 故由 pH 胶柱长度关系曲线求被测样品所含主要蛋白质成分的 PI 值, 所用长度

是经校正后的长度。即：胶柱长度 = 蛋白质迁移距离 × 原胶柱长(固定前) / 现胶柱长(固定后) 各样品固定后的电泳谱带位置经校正后，再分别与 pH 梯度曲线对应，可方便地得到各样品蛋白质成分的 PI，见表 2 我们先期的实验已经证明该方法的精确性和可靠性^[5]。

表 2 IFE 各样品主要蛋白质成分的 PI

样品	固定前	固定后	电泳谱带			PI
	胶长 (cm)	胶长 (cm)	位置 (cm)			
金钱白花蛇	9.5	10.2	7.71	8.77	10.0	7.0 7.5 8.1
水赤链游蛇	9.5	10.1	7.29	8.35	9.62	6.8 7.3 7.9
阿胶	8.5	9.2	2.54	3.30	6.33	7.90 4.56 4.82 6.35 7.09
龟胶	8.9	9.3	3.26	6.60	7.99	4.89 6.48 7.13
猪皮胶	8.5	9.2	6.38	7.99		6.37 7.13
鹿角胶	8.8	9.3	2.70	6.48	8.33	4.63 6.42 7.29
伪品胶	8.5	9.2	3.10	6.24		4.82 6.30

4.6 样品蛋白质成分 PI 均值的显著性测验：为获得可靠的科学结论，将金钱白花蛇与其它蛇、阿胶与其它胶蛋白质成分的 PI 均值进行显著性测验，由于实验的重现性好，故其显著性测验十分灵敏的结果均为 $P < 0.01$

5 结果讨论

5.1 SDS-PAGE 具有凝胶过滤和普通 PAGE 分离的双重效应，可灵敏地分离亚基分子量不同的蛋白质，从图 1 可见，不同来源的胶类、蛇类药材的电泳图谱存在着显著的差异，可根据谱带的位置、数目、着色程度方面来区别胶类、蛇类药材。同时依据 SDS-PAGE 技术的特点，可快速测定各样品中主要蛋白质成分的分子量。

5.2 大多数蛋白质在 SDS 中是可溶的，如果一种蛋白质是由相同的亚基所构成，那么未折叠的比折

叠的蛋白质对二硫键还原剂的还原作用更灵敏，其在电场中的泳动位置更接近标准分子量的蛋白质电泳位置。故用普通 PAGE 难以获得清晰电泳图谱的胶类药材，用 SDS-PAGE 则可获得。

5.3 蛋白质结合 SDS 的量，受溶液 pH 离子强度和缓冲液组分的影响，所以用 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量时，在统一的条件下进行。

5.4 IFE 两性电解质的加入是为了在电泳支持物上产生“平滑”的 pH 梯度，实践证明，只有在“平滑”的 pH 梯度的胶柱上，才能获得分辨率高的 IFE 谱带。

5.5 IFE 即可获得分辨高的电泳图谱 (如图 2)，也可依据 IFE 技术的特点测定样品蛋白质成分的 PI (如表 2) PI 确定后，我们可以将正品与伪品的 PI 作均值显著性测验，所得结论均 $P < 0.01$ 从而提示我们，金钱白花蛇及其它蛇、阿胶与其它胶的 PI 数据可以做为二者内在质量的指标之一。从而使难以用传统方法鉴别真伪的动物类及其它种类的中药进行电泳技术鉴别既有直观的图谱又有相应精确的定量数据。

参考文献：

- [1] 徐康森,郝苏丽. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法在药物分析中的应用——蛋白及酶的分子量测定及其实验误差 [J]. 药物分析杂志, 1982, 2(4): 193.
- [2] 陈振江,张香梅. 中药青箱子、土鳖虫的等电聚焦电泳研究 [J]. 中草药, 1996, 27(10): 593.
- [3] 袁晓华,杨中汉. 植物生理生化实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1983.
- [4] 陈振江,刘静芬,邹志凌. 阿胶及其伪品的 IFE 研究 [J]. 中成药, 1998, 20(12): 31.
- [5] 陈振江,陈科力,王曦,等. 金钱白花蛇可溶性蛋白凝胶电泳图谱的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(5): 374.

气相色谱法测定健心片中冰片的含量

许妍¹, 周彦如², 章红^{1*}

(1. 江西省药品检验所, 江西南昌 330046 2. 江西药都樟树医药集团公司, 江西樟树 331200)

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)12-1090-02

健心片为江西樟树制药厂产品，是由毛冬青、三七、红花、丹参、冰片等 7 味中药制成的片剂。具活血、止痛的功效，适用于心肌劳损、心绞痛、动脉硬化

等症。本品种目前的国家药品标准中只有检查项，无法控制产品质量。因此，用气相色谱法建立冰片的含量测定，以便准确定量。

* 收稿日期: 2001-07-10

作者简介: 许妍, 中国药科大学毕业, 理学学士学位, 主管药师, 主要从事药品检验、新药审批、各级标准的起草以及药品的仪器分析工作, 在国内公开刊物上发表论文数篇。