

(C-4), 128.1(C-5), 67.0(C-6), 65.8(C-7)。以上数据与文献报道^[5]基本一致。

4 讨论

色谱分离方法的选择:紫玉盘醇和大花紫玉盘醇 G 为一对同分异构体,仅 C-6 的绝对构型不同,极性十分相近,普通方法很难将它们分离开。由于紫玉盘醇和大花紫玉盘醇 G 的极性较小,适合用正相 HPLC 分离,但正相色谱试剂要求较高,价格昂贵,故采用反相 HPLC 分离制备单体,正相 HPLC 鉴定质量分数。

制备条件的选择:紫玉盘醇和大花紫玉盘醇 G 的极性小,性质相近,实验起初采用 ODS 柱,甲醇-水(75:25)为流动相,流量 2 mL/min,120 min 出峰,未分离开。根据它们的性质,考虑改用苯基柱分离制备单体,经摸索采用甲醇-水(70:30)为流动相,可将它们基本分开,时间虽然稍长,但每次制备

量较大,基本达到半制备目的。

致谢:感谢贵州省林业研究所邓朝义研究员采集植物材料,军事医学科学院陈合兵和薛燕等同志代测 NMR 和 MS 谱。

References:

- [1] Leboeuf M, Cave A, Bhaumik P K, et al. The phytochemistry of the annonaceae [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21 (12): 2783-2813.
- [2] Nkunya M H H, Weenen H, Koyl N J, et al. Cyclohexene epoxides, (+)-pandoxide, (+)- β -senepoxide and (-)-pipoxide, from *Uvaria pandensis* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26 (9): 2563-2565.
- [3] Liu A, Xu L Z, Zou Z M, et al. The phytochemistry of the *Uvaria* genus [J]. *Foreign Med Sci: Tradit Chin Med* (国外医学: 中医中药分册), 2001, 23(4): 195-204.
- [4] Liao Y H, Xu L Z, Yang S L, et al. Three cyclohexene oxides from *Uvaria grandiflora* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(4): 729-732.
- [5] Xu Q M, Xu L Z, Yang S L. New polyoxygenated cyclohexenes from *Uvaria kweichowensis* and their antitumor activities [J]. *Chem Pharm Bull.* 2005, 53(7): 826-829.

象皮与拟替代品黄牛皮、水牛皮中蛋白的研究

李 莹¹, 李秀兰³, 张燕玲¹, 石 森², 王 昊¹, 李惠芬^{1*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津市天津医院, 天津 300210; 3. 天津市安定医院, 天津 300052)

象皮属象科动物亚洲象 *Elephas maximus* Linnaeus. 的皮, 具有止血敛疮、祛腐生肌作用。其主要成分为蛋白质、氨基酸及微量元素^[1]。以象皮为君药的生肌象皮膏可以促进表皮细胞的增生、分化, 对巨噬细胞膜 Fc 及 C₃b 受体有明显的增强作用, 还可以使伤口的 pH 值变化过程加快, 促进伤口愈合^[2]。但是《中华人民共和国野生动物保护法》已将大象列为国家一级保护动物。为寻找替代品, 本实验选择与象皮具有相似药效作用的黄牛皮和水牛皮作为比较对象, 将 3 种样品提取液中蛋白质的量及组成进行对比分析。

1 仪器与材料

日本日立 U-3310 分光光度计, DYY-III 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

象皮由天津医院骨研所组织工程室李秀兰研究员提供, 经天津医科大学药学院周晔副教授鉴定。黄牛皮、水牛皮采自河北省承德市郊区, 属于壮年期 4 岁的牛, 该年龄的牛其后背皮中的蛋白质的量较高,

宰杀放血直至放尽后取该部位的皮。对照品人胎盘血蛋白由天津医科大学检验系生化教研室张燕玲教授提供。丙烯酰胺(Acr, 电泳级)、甲叉丙烯酰胺(Bis)、葡聚糖凝胶树脂(中国医药集团上海化学试剂公司), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 双缩脲法^[3,4]测定蛋白质

2.1.1 供试品溶液的提取^[4,5]: 精密称取象皮、黄牛皮、水牛皮粉末各 1 g, 加聚山梨酯 80 与少许石英砂于研钵中冰浴研磨 10 min, 加 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 300 mL, 于冰浴条件下超声混匀 2 h, 0~4 °C 冰箱中放置过夜使之充分溶胀。次日冰浴超声提取 6 h 后, 4 000 r/min 离心 15 min, 转移上清液, 下层沉淀加缓冲液 300 mL, 重复操作 4 次, 弃去沉淀, 合并上清液, 加固体 (NH₄)₂SO₄ 至 100% 饱和度, 4 000 r/min 离心 15 min, 沉淀以 Tris-HCl 缓冲液溶解定容 50 mL 量瓶, 得初提液, 0~4 °C 冰箱中短期保存。

收稿日期: 2007-01-30

基金项目: 天津市自然科学基金重点资助项目(033802911)

* 通讯作者 李惠芬 Tel: (022)23529243 E-mail: lihuifen@tjmu.edu.cn

2.1.2 供试品溶液的透析^[6,7]:量取初提液各4 mL于透析袋中,置 Tris-HCl 缓冲液中纯化,每30 min换1次透析液,以蔡试剂颜色反应检视透析液,直至无颜色反应。已透析好的溶液在0~4℃冰箱中短期保存。

2.1.3 对照品溶液的制备:精密称取人胎盘血蛋白18 mg,用 Tris-HCl 缓冲溶液溶解定容于5 mL量瓶,0~4℃冰箱中短期保存。

2.1.4 回收率试验:精密移取象皮、黄牛皮、水牛皮提取液各4 mL,分别加入人胎盘血蛋白14.4 mg,制备供试品溶液,平行制备6份,测定,结果平均回收率分别为101.11%、99.84%、100.83%。

2.1.5 样品测定:采用2005年版《中国药典》附录双缩脲法测定蛋白质。制备象皮、黄牛皮、水牛皮供试品溶液,每批各6份。分别精密量取供试品溶液与对照品溶液各4 mL置玻璃试管中,分别加入双缩脲试剂3 mL,混匀,置37℃水浴中30 min,照紫外-可见分光光度法,在波长540 nm处测定吸光度。另精密量取 Tris-HCl 缓冲溶液4 mL,同法操作,作为空白对照。测定样品的吸光度值,计算其质量分数,结果见表1。

表1 象皮、水牛皮和黄牛皮中蛋白质的测定结果(n=6)

Table 1 Determination of protein in *Corium Elephantis*, *Corium Bubali*, and *Corium Bos* (n=6)

样 品	蛋白质/%	RSD/%
象 皮 0601	15.15	0.170
0602	14.57	0.177
0603	14.89	0.035
水牛皮 0611	12.35	0.089
0612	12.52	0.046
0613	12.85	0.098
黄牛皮 0621	15.91	0.126
0622	15.97	0.200
0623	15.79	0.116

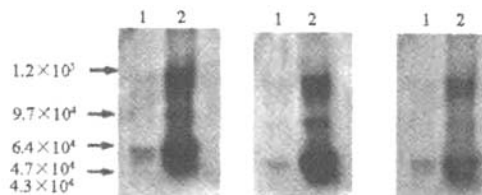
2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[8,9]分析

2.2.1 胶板制备:取一定量琼脂粉溶于蒸馏水中,加热使其黏稠,均匀涂在电泳专用玻璃板周边,使其成袋状,冷却备用。将配制好的分离胶与浓缩胶胶液于冰箱中冷却,待其较黏稠时置于袋状玻璃板中,并在玻璃板上方插入梳子,夹紧,冷却,备用。

2.2.2 样品上样:将聚合好的胶板放入电泳槽中夹紧,上、下槽分别加入适量电泳缓冲液,小心拔去梳子,将蔗糖与溴酚蓝混合液分别加入对照品溶液和供试品溶液中混匀,用可调式移液器吸取混合对照品溶液10 μL、混合供试品溶液30 μL,上样。

2.2.3 电泳过程及显色:先调节电泳仪电压至100

V,电泳2h后再调节电压至140 V,再电泳2h,取出胶板。将胶板置于盛有考马斯亮蓝染色液的染缸中染色2h,取出放入考马斯亮蓝脱色液中脱色,1h更换1次洗脱液,直至胶板染色完全被洗脱,取出并记录图像,见图1。其中相对分子质量 1.2×10^5 对应肌动结合蛋白 ABP-120 及胶原蛋白, 9.74×10^4 对应辅肌动蛋白, 7.4×10^4 对应肌动蛋白结合蛋白, 6.4×10^4 对应血红蛋白, 4.7×10^4 对应肌球蛋白, 4.3×10^4 对应肌动蛋白^[10]。



1-供试品 2-人胎盘血蛋白

1-sample 2-human placenta serum

图1 象皮(A)、水牛皮(B)、黄牛皮(C)和人胎盘血蛋白的电泳谱图

Fig. 1 Electrophoretogram of proteins of *Corium Elephantis* (A), *Corium Bubali* (B), and *Corium Bos* (C) with human placenta serum

2.3 醋酸纤维素薄膜电泳法^[8,9]分析

2.3.1 薄膜制备:取醋酸纤维素薄膜(8 cm×2 cm),将无光泽面向下浸入pH8.6巴比妥-巴比妥钠缓冲液中,待完全浸透取出,夹于滤纸中以吸去多余的缓冲液,备用。

2.3.2 样品上样:取样品液分别采用葡聚糖凝胶树脂和透析法脱盐纯化。取溶液于膜条一端2 cm处条状点样,上样量为2~3 μL。

2.3.3 电泳过程及显色:将已点样的醋酸纤维素薄膜置于盛有巴比妥-巴比妥钠缓冲液的电泳架上,100 V电压条件下电泳1h,电泳后的薄膜以氨基红溶液染色2~3 min,漂洗数次,直至脱去底色为止。结果见图2。透析法纯化的蛋白溶液浓度较高,出现明显的红色电泳带,而葡聚糖凝胶树脂法纯化的蛋白无明显电泳带,分析原因可能是在分离过程中葡聚糖凝胶树脂吸附了蛋白,致使其浓度较低。

3 讨论

由于炮制后的象皮十分坚硬,其细粉经石英砂研磨后加入聚山梨酯80呈黏团状,且不易被缓冲液溶胀并分散,故需超声分散并溶胀过夜;又因高温易使蛋白质变性,故实验操作需0~4℃冰浴超声提取,提取液以茚三酮试剂检视蛋白质是否提取完全,根据茚三酮试剂的颜色反应判断每次提取6h方能

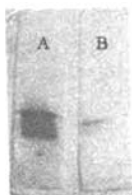


图2 透析法(A)与葡聚糖凝胶树脂法(B)纯化蛋白液的电泳谱图

Fig. 2 Electrophoregram of proteins purified by dialysis (A) and Sephadex (B) methods

提取完全。

聚丙烯酰胺凝胶电泳实验中优化筛选了4种分离胶Acr/Bis的配比,分别为20、25、37.5、60,结果发现比例在25~37.5时显色比较明显,故选择Acr/Bis为32.33配比。

从蛋白质量角度分析象皮与拟替代品黄牛皮近似,水牛皮差距较大;从蛋白质组成成分角度分析,3种样品中均含有药用所需的肌球蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白、血红蛋白等,为今后进一步探讨象皮替代品研究提供了重要参考依据。

References:

- [1] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai, Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [2] Li J. Mechanism of action of Sheng ji Xiangpo Mastic [J]. *J Liaoning Coll Tradit Chin Med* (辽宁中医学院学报), 2005, 7(4): 329.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol II. 2005.
- [4] Li L, Zhu H F. Application of spectrophotometric method in determination of the contents of the protein in the milk products [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2005, 4(2): 34.
- [5] Wang X Y, Li X L, et al. Study of antiinflammation effect of *Corium power* [J]. *China Osteol* (中国骨伤), 1993, 6(2): 6-7.
- [6] Yang D L. Choose protein purification [J]. *Prac J Med Pharm* (实用医学杂志), 2004, 12, 21(12): 1121.
- [7] Hefti M H, van Vugt-Van der Toorn C J G, Dixon R. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site [J]. *Anal Biochem*, 2001, 295(2): 180.
- [8] Cheng Z Y. *Clinical Biochemistry and Short Protocols in Biochemistry* (临床生物化学和生物化学检验实验指导) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003.
- [9] Tao J Y. Application of electrophoresis method in pharimic analyse [J]. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 2004, 9(2): 125-126.
- [10] Wang L F, Yang L F. *Protein and Nucleic Acid* (蛋白质与核酸) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Publishing House, 1998.

比色法测定阿诺宁脂肪乳注射剂中总内酯

潘小平, 吴萍, 林立东*

(中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

阿诺宁是我国从国产番荔枝科植物番荔枝 *Annona squamosa* 种子中发现的一个具有高抗癌活性的番荔枝内酯有效部位药物。该药是由质量分数大于90%的5~6个番荔枝内酯化合物和质量分数小于10%的未知成分组成^[1]。阿诺宁的活性部位为番荔枝内酯, 含有一个不饱和五元内酯环, 在碱性溶液中, 双键转位形成活性次甲基, 从而能够与Kedde试剂反应而显色^[2], 在534 nm波长下有最大吸收值, 可用于总内酯的测定^[3]。因此本实验建立比色法测定阿诺宁脂肪乳注射剂中番荔枝总内酯的方法。

1 试剂与仪器

Kedde试剂: 1g 3,5-二硝基苯甲酸溶于50 mL无水乙醇中, 缓慢加入50 mL 1 mol/L NaOH, 摇匀待用(新鲜配置)。阿诺宁脂肪乳注射剂由桂林三金

制药有限公司生产, squamocin 对照品(华南植物园植物化学实验室制备), Lambda 25 UV/Vis 紫外分光光度计, PerkinElmer 公司。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的制备: 精密称取 squamocin 约24.5 mg, 置于5 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 制得对照品储备液(4.9 mg/mL)。

2.2 供试品溶液的制备: 精密移取阿诺宁脂肪乳注射剂5 mL, 加入少量无水乙醇, 用旋转蒸发仪浓缩, 得淡黄色透明油状物。加入约4 mL 氯仿溶解, 过2 g 硅胶柱(内径: 8 mm, 100~200 目柱色谱硅胶, 青岛海洋化工厂), 再用15 mL 氯仿洗脱油脂后, 用30 mL 氯仿-甲醇(95:5)洗脱, 收集洗脱液, 用旋转蒸发仪浓缩蒸去溶剂后, 加入1 mL 乙醇溶解, 即得。

收稿日期: 2006-12-08

作者简介: 潘小平, 女, 华南植物园公共实验室工程师。Tel: (020)37252699-550 E-mail: xppan@scbg.ac.cn

* 通讯作者 林立东 Tel: (020)37252537 E-mail: lind@scbg.ac.cn

象皮与拟替代品黄牛皮、水牛皮中蛋白的研究

作者：[李鋈](#)，[李秀兰](#)，[张燕玲](#)，[石森](#)，[王昊](#)，[李惠芬](#)
作者单位：[李鋈, 张燕玲, 王昊, 李惠芬 \(天津医科大学, 天津, 300070\)](#)，[李秀兰 \(天津市安定医院, 天津, 300052\)](#)，[石森 \(天津市天津医院, 天津, 300210\)](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2007, 38 (11)
被引用次数：5次

参考文献(10条)

1. [Editorial Board of China Herbal State Administration of Traditional Chinese Medicine China](#) [中华本草](#) 1999
2. [Li J Mechanism of action of Sheng ji Xiangpo Mastic](#) 2005(04)
3. [中华人民共和国药典\(三部\)](#) 2005
4. [Li L;Zhu H F Applification of sepectrophotometric method in determination of the contents of the protein in the milk products](#)[期刊论文]-[江西医学院学报](#) 2005(02)
5. [Wang X Y;Li X L Study of antiinflammation effect of Corium power](#) 1993(02)
6. [Yang D L Choose protein purification](#) 2004(12)
7. [Hefti M H;van Vµgt-Van der Toorn C J G;Dixon R A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site](#)[外文期刊] 2001(02)
8. [Cheng Z Y 临床生物化学和生物化学检验实验指导](#) 2003
9. [Tao J Y Applification of electrophoresis method in pharimic analyse](#) 2004(02)
10. [Wang L F;Yang L F 蛋白质与核酸](#) 1998

引证文献(5条)

1. [石森. 李惠芬. 李新元 工业提取重楼薯蓣皂苷元的工艺研究](#)[期刊论文]-[天津药学](#) 2010(5)
2. [王智慧. 赵红心. 谷小芳 龟象膏治疗糖尿病肢端坏疽40例疗效观察](#)[期刊论文]-[河北中医](#) 2009(11)
3. [杜韦静. 陈宝元. 薛晓东. 刘芳 生肌象皮膏与无象皮处方生肌膏的体外抗炎及免疫调节作用](#)[期刊论文]-[中国组织工程研究](#) 2012(7)
4. [王春来. 梁海英. 王智慧. 赵红心. 谷小芳 龟象膏皮肤毒性实验研究](#)[期刊论文]-[中国中医急症](#) 2011(12)
5. [王智慧. 赵红心. 吴连杰 于晓东治疗糖尿病肢端坏疽经验](#)[期刊论文]-[河北中医](#) 2011(10)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200711020.aspx