

# 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳 比较加热前后巴豆霜蛋白成分的变化\*

□陈彦琳\*\* 杜杰 白宗利 梁焕 田壮 周林  
(中国药材公司 北京 100195)

**摘要:**目的:研究巴豆霜蛋白成分加热前后发生的变化,为选择巴豆霜加热炮制减毒方法提供数据支持。方法:采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳对不同炮制方法和不同加热时间制备的巴豆霜进行蛋白含量测定和电泳图谱分析。结果:测定了巴豆霜蛋白含量,发现巴豆霜不同炮制品 SDS 图谱中,分子量 15~170kD 内的特征性条带有 6 条,加热后有明显的条带消失现象。结论:SDS 电泳操作简便、结果可靠、重现性好、专属性强,可用于鉴别不同炮制方法和不同加热时间的巴豆霜。

**关键词:**电泳 巴豆霜 蛋白 加热 变化 炮制

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.021

巴豆为大戟科植物巴豆 *Croton tiglium* L. 的干燥成熟果实,多系栽培。药材以颗粒饱满,种仁色黄白者为佳。巴豆含有机酸、甘油酯类成分、生物碱类成分及植物蛋白质类成分。生巴豆味辛、性热,有大毒,归胃、大肠经,外用蚀疮,用于恶疮疥癣,疣痣。巴豆霜是巴豆除去部分巴豆油后的炮制品,味辛、性热,有大毒,归胃、大肠经,具有峻下积滞、逐水消肿、豁痰利咽的功效,用于寒积便秘,乳食停滞,下腹水肿,二便不通,喉风,喉痹。

巴豆从汉时入药至今,炮制方法有 30 多种。巴豆制霜法最早记载于宋《苏沈良方》<sup>[1]</sup>:“以巴豆剥去壳,取净肉,去肉上嫩皮,纸包水湿,入慢火中煨极熟,取出,另以绵纸包之,缓缓捶去其油,纸湿则另

换,以成白粉为度”,之后各代均沿袭使用巴豆仁或巴豆霜。主要通过加热后压榨除去部分油脂来降低毒性,便于临床应用。其炮制原理,传统经验认为“得火则良,若急治为水谷道路之剂,去心皮,膜油,生用。若缓治为消坚磨积之剂,炒烟去令紫黑研用,可以通肠,可以止泄”。“本草云生温有毒,熟寒无毒,今之去油生用为避寒也,殊不知寒不足避,当避其大毒,况本经全无去油之制法,陶氏煮令黄黑,然亦太过,不如取其心膜者五度换水,各煮一沸为佳。局方化滞丸而巴豆不去油,只以巴豆煮熟用之,深得其性也”<sup>[2]</sup>。我们可以看出,古人已经认识到了巴豆加热后不仅易于除去油脂,更重要的是破坏了毒性成分,保证了用药安全。

通过文献研究,可知以前对巴豆的炮制原理研

收稿日期:2010-05-07

修回日期:2010-11-24

\* 科学技术部“十一五”国家科技支撑课题(2006BAI09B06-05):中药饮片炮制共性技术和相关设备研究,负责人:任玉珍。

\*\* 通讯作者:陈彦琳,副主任中药师,主要研究方向:中药炮制,中药饮片质量控制技术, Tel:010-89493406, E-mail:carro129@yahoo.com.cn。

究主要集中于巴豆油的炮制前后的变化,而对于巴豆所含蛋白的研究却并不多,由于蛋白质在加热过程中性质改变会影响其电泳行为,如白扁豆、水蛭等炮制品的电泳谱带都明显少于生品<sup>[3]</sup>,巴豆中含有巴豆毒蛋白,能够溶解兔、猪、蛇、鸡的红细胞<sup>[4]</sup>,遇热可失去活性。观察巴豆霜不同加热方式和加热时间在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS)电泳中发生的电泳谱带变化,有助于推测巴豆所含毒蛋白的分子量及鉴别巴豆炮制品与生品。

### 一、实验目的

本研究采用测定总蛋白含量和 SDS 电泳方法,比较巴豆毒蛋白灭活前后蛋白质性质和电泳谱带发生的变化,推测巴豆毒蛋白的分子量范围和性质。

### 二、仪器与试剂

#### 1. 实验仪器

分析天平:SE2,德国 Sartorius 公司;自动 PH 计:PB-10,德国 Sartorius 公司;磁力搅拌器:85-2 型,天津泰斯特仪器有限公司;纯水器:Milli-Q,美国 Millipore 公司;超速离心机:Centrifuge5417R,德国 Eppendorf 公司;低温离心机:德国 Beckman 公司;恒温水浴箱:SHH.W21.420,余姚市东方电工仪厂;紫外分光光度计:DU800,美国 Beckman Coulter 公司;电泳仪:Power PAC3000,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像仪:美国 Bio-Rad 公司。

#### 2. 实验试剂

Tris,SDS,N,N'-Bisacrylamide, Acrylamide, Glycine, DTT, Glycerol, Brophenol Blue, APS, Methanol, 冰醋酸, 盐酸, 硝酸, 均购自北京化学试剂公司, 分析纯。

BSA 试剂盒(2mg·mL<sup>-1</sup>)购自 BIO-RAD 公司。

宽范围预染蛋白购自碧云天公司, 目录编号:PP2301。

### 三、样品制备

巴豆样品经北京中医药大学金

世元教授鉴定为大戟科乔木植物巴豆 *Croton tiglium* L.的成熟果实,去壳取仁,10个炮制品的制备方法见表1。

### 四、SDS 电泳方法<sup>[5]</sup>

#### 1. 灌 胶

此方法基于 BIO-RAD Mini-gel (8×10cm;厚 0.75mm)系统。

酒精清洁玻板,将玻板安装于 BIO-RAD 制胶架上,加入下层缓冲液约 6cm 高后,迅速用少量水封住上方,室温下静置 10~15min,当胶与水之间显示出清楚的折线后,倾去覆盖在胶上的水,加入上层缓冲液,并插入上样梳。

#### 2. 上 样

当浓缩胶完全聚合后,缓慢拔出上样梳,用电泳液冲洗胶孔。取出胶板,安装于电泳槽中,下槽加入部分电泳液,上槽加至于胶板顶部齐平。用微量上样器上样。取制备好的样品,每样本含蛋白约 30μg,加入 1/5 体积的 6XSDS 样本缓冲液,沸水浴 5min。等蛋白量上样。

表 1 样品制备方法

样品编号	方法	操作步骤	巴豆霜含油量
D1	冷压法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	18.3%
D2	稀释法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,加入适量淀粉,研匀,制备巴豆霜。	18.4%
D3	加热稀释法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,常压蒸制 40min,加入适量淀粉,研匀,制备巴豆霜。	18.0%
D4	提油返油法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,用石油醚(30~60℃)低温提油 3 次,至油提尽,残渣与油挥发溶剂,称定残渣量,通过计算,将适量油加入残渣中,混匀,制备巴豆霜。	19.6%
1	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,常压蒸制 20min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	18.7%
2	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,常压蒸制 30min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	19.7%
3	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,常压蒸制 40min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	17.7%
4	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,100℃烘制 90min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	18.2%
5	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,100℃烘制 100min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	19.9%
6	加热压榨法	将生巴豆仁测定含油量,碾碎成泥,100℃烘制 120min,投入压榨机,压榨制备巴豆霜。	18.8%

### 3. 总蛋白提取方法

每个样本称取 0.1g, 分别加入 1mL 丙酮于 EP 管中, 翻转摇匀 1h, 14000rpm 离心 20min, 弃去上清液, 再分别加入 1mL 丙酮, 重复上述操作, 弃上清液后过夜晾干。去油脂后所得的样本, 每个加裂解液 700 $\mu$ L, 冰中孵育 30min, 超声提取蛋白(每隔 5min 一次, 共 5 次)。将裂解后的液体低温离心(4 $^{\circ}$ C, 14000rpm, 20min), 用 1mL 注射器小心吸取上清液备用。

### 4. 测定总蛋白质浓度

用 DU800 分光光度仪对样本蛋白浓度进行检测, 测得各样本蛋白浓度。结果见表 2。

去油脂后, 粉末颜色发生改变, 从去油脂前的黄色或浅黄色, 变为乳白色。

### 5. 电泳结果

样品等质量提取蛋白后上样, 染色后, 条带成像理想。谱带见图 1~3。

## 三、结果与讨论

### 1. 巴豆霜蛋白不同炮制品 SDS 图谱的比较

在分子量 15~170kD 内的特征性条带有 6 条, 各样品共有谱带情况和蛋白分子量估计范围见表 3。

条带 A1~A5 为各样本共有条带, 条带 A6 为未经加热样本的特征条带, 加热处理的样本 D3、3、6 其条带 A6 也相应的不能用肉眼辨别。

由图 3 可见, 不同加热烘制时间对条带 A6 的影响也比较明显, 烘制 90min 的条带 A6 仍然可用肉眼辨别, 烘制 100min 和烘制 120min 条带 A6 基本用肉眼已不能辨别其存在。根据 SDS 电泳谱图, 巴豆霜是否加热对 SDS 谱带的变化影响最为明显。我们推测巴豆所含溶血性毒蛋白分子量约在 22kD, 应在炮制过程中加热足够的时间以使其灭活。

### 2. 稀释法与去油制霜法总蛋白含量的比较

采用 UV 法测定不同炮制方法制备的巴豆霜中的总蛋白含量, 稀释法制备的巴豆霜蛋白含量明显低于其他方法, 约为其他方法的 1/2, 由 SDS 图谱可见, 采用稀释法制备的 D2 和 D3 样品的谱图条带明显颜色浅于其他炮制方法制备的巴豆霜, 这个结果与总蛋白浓度测定的结果相一致, 说明采用稀释法不但降低了巴豆霜中的含油量, 也使总蛋白浓度降低。现代研究发现, 巴豆蛋白中富含多种人体必需氨基酸<sup>[9]</sup>, 且并无明显毒性, 可认为是有益成分, 而稀释法制备的巴豆霜蛋白和水溶性成分巴豆苷含

量远低于其他方法, 说明这种炮制方法并不适宜用于制霜。

### 3. SDS 电泳图谱在巴豆霜炮制程度鉴别上的应用

SDS 电泳是最常用的定性分析蛋白质的电泳方法, 特别是用于蛋白质纯度检测和测定蛋白质分子

表 2 各样本蛋白质浓度

编号	液体性状	OD(n=3)	蛋白浓度(mg·mL <sup>-1</sup> )
D1	混浊	0.4769	0.26
D2	轻微混浊	0.2651	0.13
D3	澄清	0.2250	0.10
D4	混浊	0.4577	0.25
1	澄清	0.4581	0.25
2	澄清	0.4489	0.24
3	澄清	0.3934	0.21
4	澄清	0.4769	0.26
5	澄清	0.4744	0.26
6	澄清	0.4516	0.24

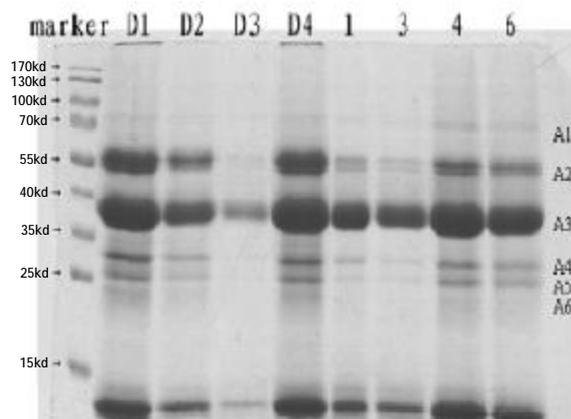


图 1 巴豆霜不同炮制方法 SDS 谱图

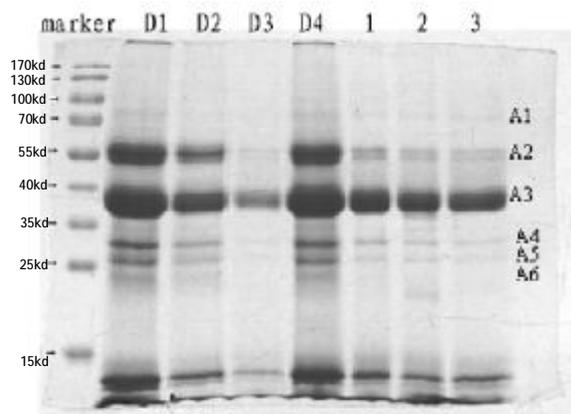


图 2 不同蒸制时间样品的 SDS 谱图

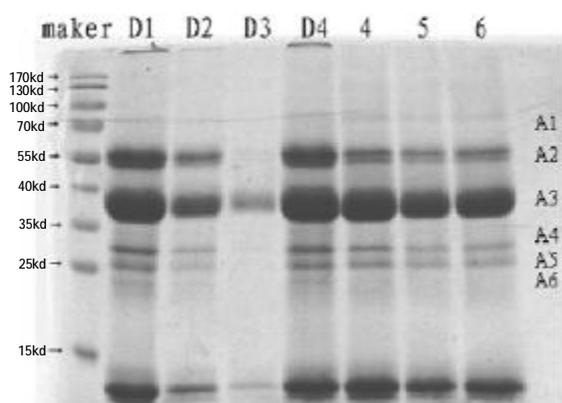


图3 不同烘制时间样品的 SDS 谱图

表3 各样本蛋白条带质量范围

编号	样本共有情况	蛋白分子量范围
A1	D1、D2、D3、D4、1、3、4、6	约 70kD
A2	D1、D2、D3、D4、1、3、4、6	约 55kD
A3	D1、D2、D3、D4、1、3、4、6	35~40kD
A4	D1、D2、D3、D4、1、3、4、6	约 30kD
A5	D1、D2、D3、D4、1、3、4、6	约 25kD
A6	D1、D2、D4、1、4	约 22kD

质量。此法仪器简单、操作方便、重复性好、可靠性强,可用于区别巴豆霜不同加热炮制程度的样品,灵敏度很高。

#### 参考文献

- 1 苏轼,沈括撰.苏沈良方.北京:人民卫生出版社影印,1956.
- 2 王孝涛.历代中药炮制法汇典(古代部分).南昌:江西科学技术出版社,237~241.

- 3 石俊英,孙伶俐,荆雪梅.6种中药及其不同炮制品的电泳分析.中国中药杂志,1995,20(9):533.
- 4 国家中医药管理局《中华本草》编委会编.中华本草第四卷.上海:上海科学技术出版社,1999:769~774.
- 5 郭尧君.蛋白质电泳实验技术.北京:科学出版社,2005:55~61.
- 6 孙公军,贾元印,姚乾元.巴豆总蛋白的提取及氨基酸的测定.山东医药工业,1999,13(2):39~40.

### Changes in SDS Protein Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Crotonis Semen Pulveratum

Chen Yanlin, Du Jie, Bai Zongli, Liang Huan, Tian Zhuang, Zhou Lin

(China National Group Corp. of Traditional & Herbal Medicine, Beijing 100195, China)

**Abstract:** This work aimed to develop an SDS protein polyacrylamide gel electrophoresis method for crotonis semen pulveratum in order to determine the quality of prepared samples. Ten different samples of crotonis semen pulveratum were determined by SDS protein polyacrylamide gel electrophoresis. According to the analysis of the band characteristics of different samples of crotonis semen pulveratum, one of the six characteristic bands disappeared in the samples processed by heating. The results show that this method is suitable for quality analysis of crotonis semen pulveratum.

**Keywords:** Crotonis semen pulveratum, SDS protein polyacrylamide gel electrophoresis, Characteristic bands, Change

(责任编辑:张志华 李沙沙,责任译审:张立崑)