

表 3

丹参注射液特征色谱峰的保留值和相对保留值

峰号	301025 (上海)		800523 (北京)		820113 (浙江)		800914 (浙江)		801203 (江苏)		8109080 (山西)		811220 (杭州)	
	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)	保留值 (分)	相对保留值 (%)
1	2.33±0.01	47	2.31±0.01	47	2.31±0.01	47	2.32±0.01	47	2.30±0.01	48	2.36±0.01	48	2.29±0.03	46
2	2.91±0.01	59	2.89±0.01	59	2.90±0.01	59	2.91±0.01	59	2.89±0.01	59	2.91±0.02	59	2.89±0.01	58
3	4.90±0.03	100	4.88±0.02	100	4.88±0.02	100	4.89±0.02	100	4.87±0.01	100	4.86±0.04	100	4.90±0.01	100
4	9.38±0.48	186	9.08±0.03	185	9.13±0.05	186	9.09±0.05	185	9.02±0.02	185	8.94±0.09	185		
5	15.55±0.29	317	15.48±0.06	316	15.57±0.10	318			15.31±0.06	314	14.99±0.01	308		
6	23.77±0.47	484	23.63±0.09	483	23.63±0.16	486	23.60±0.17	482	23.49±0.01	482			24.39±0.11	497

\* 此色谱峰为相对保留值的基准峰。保留值为三次分析的平均值。

致谢: 本文得到中医研究院陆广莘副主任和中国医学科学院药物研究所谢晶曦副研究员审阅。特此致谢。

参 考 文 献

- (1) 张安楠, 中草药通讯, (7), 33(1978).
- (2) 杨树德、周同惠等, 药学学报, 16(3), 190 (1981).
- (3) 河南南阳化学制药厂试制室, 医药工业, (7), 14(1976).
- (4) 梁子钧等, 活血化瘀专业委员会成立大会暨全国第一次学术会议论文汇编, 1982:12.  
(收稿日期: 1985年8月15日)

Analysis of Injection of Chinese Drug *Salvia Miltiorrhiza* Bge by High Performance Liquid Chromatography *Wen Tian-ming, Qin Sheng-li & Ma Pei,*

*Central Laboratory of Academy on Traditional Chinese Medicine*

In this article reversed-phase high performance liquid chromatography was employed for the separation and determination of the active constituent, 3, 4-dihydroxybenzaldehyde, in the injection of *Salvia miltiorrhiza* Bge and the method, combined with the identification of the fingerprint chromatographic peaks, was used to control the quality and to ensure the efficiency of the Chinese drug. This is a simple and accurate method for the analysis of this kind of drugs. It is not necessary to pretreat the samples before chromatographic determination. The method can also be used to determine 3,4-dihydroxybenzaldehyde in other preparations which contain *Salvia miltiorrhiza* Bge.

纸 色 谱 测 定 A 型 肉 毒 素

胡云梯

童秀珍 何育方

(新疆八一农学院, 乌鲁木齐) (新疆防疫站, 乌鲁木齐)

肉毒素是肉毒梭菌(*Clostridium botulium*)的外毒素。自1897年 Ermegen 从中毒火腿中分离出肉毒梭菌以来, 目前已分离出 A, B, C, D, E, F, G 七个不同型的肉毒梭菌, 相应七种不同型的毒素, 它们都是分子量较大, 结构复杂, 可溶于水的神经性毒蛋白。关于肉毒素组成, 结构与毒理的研究,

国内尚未见报道, 仅限于流行病学和临床诊断。DasGupta 和 Boroff 等曾用离子交换色谱分离 A 型毒素 (分子量 900,000), 分离出两种蛋白质, 一种无凝血活力, 毒性极强, 分子量 150,000 一种无毒性, 有凝血活力, 分子量较前者小<sup>[1, 2]</sup>。

本文介绍我们用纸色谱分离 A 型肉毒素

并结合紫外光谱探讨其组成及结构。

## 实验部分

### (一) 试剂和仪器

1. 巴比妥钠-醋酸钠-醋酸: 取2.89克巴比妥钠, 1.9克醋酸钠, 溶于水, 用醋酸调至pH6.5, 加水至100毫升。

2. 正丁醇-醋酸-水(3:1:4)

3. 磷酸盐缓冲液(pH6.8): 将0.2MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液, 按49:51体积比混合, 用正丁醇饱和。

4. 柠檬酸缓冲液: 4克柠檬酸和8.7克柠檬酸钠, 溶于水稀至500毫升, pH=5。

5. 0.3%茚三酮溶液: 0.3克茚三酮溶于100毫升柠檬酸缓冲液中。

6. 岛津RF-502型荧光分光光度计。

### (二) 试样

1. **A型毒素原品**: 购自兰州生物制品研究所, 批号为61-2, 是用硫酸铵从培养液中盐析并在常温真空干燥的产品, 呈黄褐色, 含氮量为10.44%, 其中有不溶于水、乙醇但可溶于0.1N NaOH的固体, 约占原品20%, 原品生理盐水溶液作小白鼠腹腔注射, LD<sub>50</sub>为0.035毫克/公斤。原品水溶液(浓度100微克/毫升)除去不溶物后置荧光分光光度计中, 先将发射光波长旋钮固定在400nm扫描激发光谱, 激发峰在295nm, 然后将激发光波长旋钮固定在295nm扫描荧光光谱, 荧光峰在360nm, 分别如图1中曲线(1), (2); 这与色氨酸曲线(7), (8)完全一致。

2. **A型毒素透析品**: 取A型毒素原品100毫克于离心管中, 加水5毫升, 搅拌, 离心弃去不溶物, 收集上清液置透析袋中透析。将透析液如前扫描, 将图1中曲线(3), (4), 激发峰和荧光峰亦与色氨酸一致; 用特征显色试验(3)也证明透析液中有游离色氨酸。透析液中还检出Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 最后透析到透析液中无成分为止。取透析液10毫升, 室温浓缩至约1毫升, 于二小白鼠腹腔注射0.5毫升, 均未有中毒现象, 说明无有毒成分透出。将透析袋埋入蔗糖糖水浓缩至原体积五分之一, 分装三支试管, 在-30℃真空干燥, 将灰白色晶体, 测得LD<sub>50</sub>为0.106毫克/公斤。透析品晶体水溶液(100微克/毫升)如前扫描, 在紫外区无吸收也不发射荧光。

### (三) 层析、浸提液毒性检验和扫描激

### 发光谱及荧光光谱

1. 取A型毒素原品水溶液(浓度2.5毫克/毫升)20微升, 点在30×3厘米新华1号滤纸上, 挂在盛有巴比妥钠-醋酸钠-醋酸溶液的层析筒中饱和30分钟, 然后将下端浸入展开剂中, 长度约0.5厘米, 上行展开14厘米。平行展二张, 一张喷茚三酮溶液在80℃15分钟显色, 红色斑点R<sub>f</sub>=0.85(图2中a)。一张不显色, 按前张色斑位置剪下, 剪碎, 用1毫升生理盐水浸提1小时, 取0.25毫升注射二鼠, 历24小时死亡。

2. 取A型毒素原品水溶液20微升如前点样, 挂在盛有正丁醇-醋酸-水的层析筒中饱和30分钟, 然后展开14厘米。平行展三张, 一张喷茚三酮显色, 原点有无色残痕, 其上部有约长8厘米的红色带, 如图2中B。将另一张原点剪下如前浸提, 注二鼠均死亡, 色带浸提液注二鼠, 未见中毒现象。第三张将原点和色带剪下, 各用5毫升水浸提, 如前扫描; 原点浸提液在紫外区无吸收也不发射荧光, 色带浸提液扫描曲线如图1中(5), (6)。

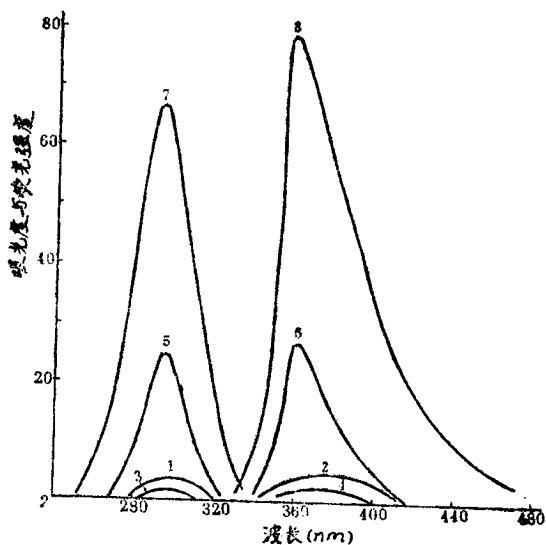


图1 肉毒素A原品水溶液、透析液、原品纸色谱色斑浸提液和色氨酸的激发光谱和荧光光谱曲线

(扫描条件: 负高压600mv, 激发光狭缝7nm, 发射光狭缝5nm, 灵敏选择20mv, 其中(5)(6)为10mv, 纸速4厘米/分)

3. 取A型毒素透析品水溶液(2.5毫克/毫升)20微升如(2)点样、展开和显色。平行展二张, 一张显色后, 有一个红色斑点, R<sub>f</sub>=0.3, 如图2中c, 原点有无色残痕。一张按前张位置, 将原点和色斑位置剪下, 用5毫升水浸提, 如前扫描, 二者在紫外区均无吸收, 也无荧光。

4. 取A型毒素原品水溶液20微升点样,用磷酸盐缓冲剂展14厘米。平行展三张,一张喷茛三酮显色,如图1中d,色斑  $R_f = 0.90$ 。将另一张色斑部位及其下部至原点无色部分剪下,剪碎,各用1毫升生理盐水浸提,色斑浸液未使小鼠中毒,下部至原点无色部分浸液注二鼠,一鼠注0.3毫升,历26小时死亡,一鼠注0.5毫升,历22小时死亡。第三张将色斑位置和色斑下部至原点剪下,各用5毫升水浸提,下部至原点浸液在紫外区无吸收也无荧光,色斑浸液扫描曲线与图1中(5)(6)一致。

5. 取A型毒素透析品水溶液20微升如(4)点样,展开和显色,平行展二张,一张显色,有一个色斑,  $R_f$  亦为0.9,但色度比(4)浅的多(图2中e)。一张将下部至原点和色斑部位剪下分别浸提和扫描,在紫外区均无吸收和荧光。

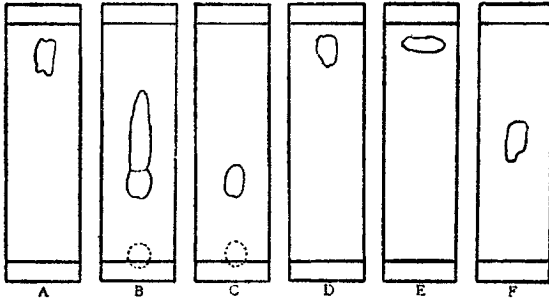


图2 毒素A原品、透析品、色氨酸色谱图

a. 原品用巴比妥-醋酸展开; b,c. 原品和透析品用正丁醇-醋酸-水展开; d,e. 原品和透析品用磷酸盐缓冲液展开; f. 色氨酸用正丁醇-醋酸-水展开。

6. 色氨酸点500微克,用正丁醇-醋酸-水展开,喷茛三酮显色,色斑  $R_f = 0.52$ ,如图2中f。取色氨酸弱碱性(pH约为8)溶液(100微克/毫升)如前扫描其激发光谱和荧光光谱,如图1中(7)(8)。激发峰在295nm, 荧光峰在360nm。

### 讨 论

据以上实验,作如下探讨:

1. 毒素A原品经透析除去游离氨基酸和无机成分后,留在透析袋中应仅有非透析性蛋白质。透析品用正丁醇-醋酸-水展开和茛三酮显色所得纸色谱(图2中c),说明从透析品可分离出两种(或者两组)分子量与结构不同的蛋白。其一留在原点附近,不与茛三酮反应,浸液无色氨酸特征光谱和可

使小鼠中毒,证明它是毒蛋白,其分子中不含色氨酸(一般含色氨酸的蛋白如人血清都有色氨酸特征紫外光谱和荧光光谱)。其二在  $R_f = 0.30$  的色斑处,可与茛三酮反应,浸液无色氨酸特征光谱,但不使小鼠中毒,证明它是非毒蛋白,其分子中也不含色氨酸。用磷酸盐缓冲液展开所得A原品和透析品的色谱(图2中d, e)亦证明上述事实,唯磷酸盐极性比正丁醇-醋酸强,故前者  $R_f$  值(0.9)比后者大。

2. 毒素A原品水溶液、透析液及图2b和d中色斑浸液均有色氨酸特征光谱,透析品水溶液及图2c和e中色斑浸液均无色氨酸特征光谱;同时b中色斑I, II, III处与c, f中色斑有相近的  $R_f$  值;说明从A原品中除分离出毒蛋白和非毒蛋白外,还透析出和分离出色氨酸,说明A原品中存在游离态色氨酸。比较图1中各峰高,估计A原品中所含色氨酸约3%。因此,A原品中的色氨酸不可能是培养基中所固有,而是与毒蛋白、非毒蛋白同是肉毒梭菌A生活过程中的代谢产物。

3. 从毒蛋白不与茛三酮反应这一现象,推测此种毒蛋白可能以分子链末端  $\alpha$ -氨基酸的羧基为起点向内卷曲而骨架侧链上的极性基团又以氢键相互键合,从而形成极性很弱的螺旋球状结构。因为茛三酮只能氧化蛋白质分子末端的  $\alpha$ -氨基酸为醛、氨和二氧化碳,生成的氨与过量茛三酮及其还原产物缩合成红紫色物质。如毒蛋白分子末端  $\alpha$ -氨基酸被色藏在螺旋球状结构的中心,故不被茛三酮氧化显色。此点尚有待进一步证实。

4. 三种不同展开剂所得谱图明显不同。极性弱、分子量大的巴比妥酸不能将毒蛋白与非毒蛋白分开,极性较强、分子量小的正丁醇-醋酸和磷酸盐可分开它们;其中正丁醇-醋酸分离效果更佳,它可将毒蛋白与非毒蛋白推开,还可将色氨酸推开。极性弱、分子量大的毒蛋白留在原点附近,极性较强、分子量小的非毒蛋白和色氨酸其  $R_f$  值相应增大。

## 参 考 文 献

- (1) H.Sugiyama, Microbiological Reviews, 44 (3), 419(1980).  
 (2) B.R.DasGupta et al., Biochem. Biophys. Res., 22, 750 (1966).  
 (3) 胡云梯, 童秀珍, 分析化学9(4),436(1981).  
 (收稿日期: 1983年8月15日)

On the Study of the Components of Botulin A and Their Structures by Paper-Chromatography *Hu Yun-ti, Xinjiang August 1st Agriculture College; Tong Xiu-zhen, He Yu-fang, Xinjiang Anti-Epidemic Station.*

This paper is intended to describe the study of the components and their structures of botulin A by paper-chromatography and ultraviolet spectro-

graphy. Two proteins with different structures are separated from the botulin A by means of paper-chromatography. The first one, of low molecular weight and probably in chain mode, is non-toxic, and reacts with ninhydrin. The other one, of higher molecular weight, is extremely toxic and non-reactive with ninhydrin. The toxic protein may coil up towards the interior with the end group, COOH, as a starting point and the polar radicals on its carbon skeleton link with it by hydrogen bonds. The whole molecule, therefore, forms a spiral spherical structure. These two kinds of proteins contain no tryptophan. The tryptophan in the initial sample is in free state: the tryptophan, the toxics and the nontoxics are metabolites of clostridium botulinum.

## 弦距离法在选取薄层色谱和纸色谱最佳系统中的应用

罗 治 权 程 玲

(湖北省麻城县药品检验所)

在薄层层析(TLC)和纸层析(PC)中,欲选取最佳系统组合,达到使其供试物能最大限度地分离,重要的是如何描述供试物 $R_f$ 之间的数量关系和采用什么样的聚类分析方法。在这方面,国内外已做了些研究<sup>[1-3]</sup>,数值分类-信息量选取法<sup>(1,3)</sup>(NT-I)和系统差值-信息量分类法<sup>(2)</sup>(SD-I)的实际效果都是较好的。

本文使用氨基酸的PC系统和食用染料TLC系统的实验数据<sup>(1,4)</sup>,用弦距离(CD)描述样品间的距离关系,采用权重成对组合法(WPG)和最短距离法(SHD)进行聚类分析,都有较好的分类效果,即采用选取后的最佳系统组合都可最大限度地分离供试物。

## 实 验 数 据

(一) 14种氨基酸药物的15种PC系统的 $R_f$ 值见文献<sup>(4)</sup>。

(二) 26种食用染料10种TLC系统的 $R_f$ 值见文献<sup>(1)</sup>。

## 计算弦距离和聚类

由 Shannon 方程计算各系统的信息量 (I)

$$I = - \sum_{p=1}^m \frac{\gamma_p}{N} \log_2 \left( \frac{\gamma_p}{N} \right) \quad (1)$$

式中:  $m$ 为分组数(本例取 $m=20$ ,组距0.05);  $\gamma_p$ 为第 $P$ 组中 $R_f$ 出现的个数;  $\frac{\gamma_p}{N}$

为第 $P$ 组在 $N$ 个供试物中出现的几率。14种氨基酸的15种PC系统的 $I$ 值见文献<sup>(4)</sup>。

(一) 计算弦距离<sup>(5)</sup>:

$$e_{jk} = [2(1 - Q_{jk}/\sqrt{Q_{jj}Q_{kk}})]^{1/2} \quad (2)$$

$$\text{式中 } Q_{jk} = \sum_{i=1}^p X_{ij}X_{ik} \quad (3)$$

$$Q_{jj} = \sum_{i=1}^p X_{ij}^2 \quad (4)$$

$$Q_{kk} = \sum_{i=1}^p X_{ik}^2 \quad (5)$$

其中:  $X_{ij}$ 和 $X_{ik}$ 分别为供试物 $i$ 在系统 $j$ 和 $k$ 中的 $R_f$ 值,  $P$ 为供试物的种数。

按(2)式计算14种氨基酸的15种PC系统的 $e$ 值,可得到 $N \times N$ 对称方阵,见表1。