

间接竞争酶联免疫分析法测定葛根中葛根素的含量

单文超 冯会宾 赵琰 曾文浩 贺娜娜 赵妍 孙晔 屈会化

【摘要】 目的 利用间接竞争酶联免疫分析法(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA)测定葛根中葛根素的含量。**方法** 利用抗葛根素单克隆抗体,通过线性关系、精密度、回收率的考察,建立葛根素的 ic-ELISA 分析方法。**结果** 该方法的线性范围为 15.6 ~ 500 ng/mL,孔间差和板间差均不大于 3.5%,平均回收率为 101.8%,并且该法检测结果与高效液相色谱法检测结果一致。**结论** 本实验为葛根质量控制以及含葛根药材的中药复方中葛根素的含量测定提供了一种新技术方法。

【关键词】 间接竞争酶联免疫分析法; 葛根素; 葛根; 含量测定

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.09.014

Content determination of puerarin in puerariae lobatae radix by ic-ELISA SHAN Wen-chao, FENG Hui-bin, ZHAO Yan, et al. The School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: QU Hui-hua, E-mail: quhuihua@gmail.com

【Abstract】 Objective To detect the content of puerarin in puerariae lobatae radix by ic-ELISA. **Methods** Anti-Puerarin monoclonal antibodies were used to establish ic-ELISA method for puerarin by investigating the linear relationship, the precision and the recovery. **Results** The linear range of this method was 15.6 ng/mL ~ 500 ng/mL, the coefficients of variation for the intra-assay and the inter-assay are both less than 3.5% and the average recovery was 101.8%. The detection result of ic-ELISA method was consistent with that of HPLC test. **Conclusions** The ic-ELISA method can be applied to the quality control of puerariae lobatae radix and the content determination of puerarin in Chinese herbal formula.

【Key words】 ic-ELISA; Puerarin; Puerariae lobatae radix; Content determination

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根^[1],具有解肌退热、透发麻疹、生津止渴、升阳止泻的作用^[2]。葛根素属于异黄酮类,是葛根的质量控制成分^[1],已被广泛地应用于治疗临床多种疾病^[3-5]。

葛根素的含量测定主要采用高效液相色谱法

(high performance liquid chromatography, HPLC)^[6-8]。近年来,基于小分子单克隆抗体^[9-14]建立的间接竞争酶联免疫分析法(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA)具有特异性强,灵敏度高,重复性好,简便快捷,前处理简单,经济无污染^[15]等特点,特别适用于微量基质生物样品中小分子含量的分析。在 ic-ELISA 基础上建立的胶体金快速检测试纸可实现中药材的现场快检,更是引起了药品监管部门的关注。

本研究利用实验室制备的抗葛根素单克隆抗体^[16],建立了葛根素 ic-ELISA 法,准确测定了葛根中葛根素的含量,为微量基质生物样品中葛根素的含量分析及葛根素胶体金快速检测试纸的研究奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金(81274043)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[单文超(硕士研究生)、冯会宾(硕士研究生)、曾文浩(硕士研究生)、贺娜娜(硕士研究生)],基础医学院[赵琰、赵妍(博士研究生)、孙晔(博士研究生)],科研实验中心(屈会化)

作者简介:单文超(1990-),女,2013 级在读硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail: shan0913bj@163.com

通讯作者:屈会化(1966-),博士,副研究员。研究方向:中药免疫分析。E-mail: quhuihua@gmail.com

1 材料与仪器

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,含量 96%,批号:110752-200912),不同批次(3 批)葛根饮片均购于同仁堂药店。

高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1260 Infinity),甲醇(色谱纯,fisher),双蒸水(娃哈哈),ELISA 分析及其他相关药品如磷酸盐和 Tween-20 等均为国产分析纯。酶标二抗(HRP 标记羊抗鼠 IgG, GeneScript 公司),四甲基联苯胺(TMB)(美国 Amersco 公司),96 孔酶标板,酶标仪(Thermo MK3 型酶联检测仪)。

2 方法与结果

2.1 葛根素单克隆抗体的制备

本实验室采用高碘酸钠法^[17]成功合成了葛根素的人工抗原,并成功筛选出能够分泌抗葛根素单克隆抗体的细胞株 AA9,通过腹水生产法制备出葛根素单克隆抗体^[16]。具体过程为:取 6~8 周龄的雄性 BALB/C 小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂 0.2 mL/只;5 天后,接种细胞株 AA9;接种 10 天后,待小鼠腹部明显膨大,收集腹水,3000 rmp 离心 20 分钟,离心后收集上清,分装,于 -20℃ 冻存。

2.2 葛根素单克隆抗体最佳工作浓度的确定

葛根素单克隆抗体以 PBS(0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液)分别稀释为 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 之后,以每孔 100 μ L 加入到已预先包被并封闭好的酶标板中。按照常规 ic-ELISA 法测定 A₄₅₀ 值,恒温培养箱 37℃ 孵育 1 小时, PBST 洗板 3 次;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 用磷酸盐缓冲液 1:20000 倍稀释后,以 100 μ L/孔加入,恒温培养箱 37℃ 孵育 1 小时, PBST 洗板 3 次;TMB 显色液 100 μ L/孔加入,恒温培养箱 37℃ 孵育 30 分钟,以 50 μ L/孔加入终止液(2 mol/L 硫酸)后立即放入酶标仪,检测 450 nm 处的吸光值。选定葛根素单克隆抗体的最佳工作浓度。

结果测得上述由 1:2000 至 1:32000 的 5 个稀释比的 A₄₅₀ 值分别为 1.43, 1.28, 1.02, 0.83, 0.63。因酶标仪测定 A 值的敏感范围在 1.00 左右,为保证测定结果的灵敏可靠,抗体稀释比可选择为 1:8000。因此,选取葛根素单克隆抗体最佳稀释比为 1:8000。

2.3 Ic-ELISA 方法学考察

2.3.1 线性关系 (1) 包被:96 孔酶标板加入经

0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)1:4000 稀释的包被原,孵育 1 小时后,用洗涤缓冲液(PBS with Tween-20, PBST)洗板 3 次;(2)封闭:以 10% 马血清为封闭液,37℃ 封闭反应 1 小时;(3)加样:不同质量浓度梯度的葛根素对照品溶液(以水溶解稀释)与葛根素单克隆抗体(1:8000 稀释)的混合液(1:1)加入酶标板的测定孔中,孵育 0.5 小时,洗板。以加有葛根素质量浓度为 0 的混合液的测定孔为阳性对照孔,以只加 PBS 溶剂的测定孔为空白对照孔;(4)加酶标二抗:加入经 PBS 1:10000 稀释的酶标二抗,孵育 0.5 小时,洗板;(5)显色与测定:加入显色液 TMB,显色 15 分钟,以 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,用酶标仪测定各孔在波长 450 nm 处的吸光度 A 值。以上孵育过程均在 37℃ 恒温孵育箱中完成。以葛根素对照品质量浓度的对数(X)为横坐标,其对应计算所得的 A/A₀ (A₀ 为阳性对照孔的吸光度)为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为: $Y = -0.159 \ln(x) + 1.2145$, $R^2 = 0.9921$, 以抑制率达到 50% 时所对应的葛根素质量浓度为 ic-ELISA 的灵敏度 IC₅₀,结果显示该单克隆抗体抗葛根素的灵敏度为 89.5 ng/mL。该法检测葛根素的线性范围为 15.6 ~ 500 ng/mL。见图 1。

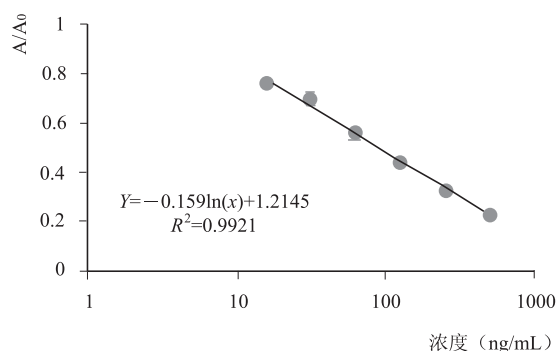


图1 Ic-ELISA 测定葛根素标准曲线

2.3.2 精密度试验 取 6 个不同质量浓度的葛根素对照品溶液,按照“2.3.1”项下 ic-ELISA 法进行测定,每个浓度设置 3 个平行孔,每个样品重复 3 次,分别测定孔间差和板间差,对测定结果进行数据分析可知,平行孔之间检测值的 RSD 为 0.1% ~ 3.3%,各酶标板之间检测值的 RSD 为 0.5% ~ 3.5%。见表 1。

2.3.3 回收率实验 精密吸取已知含量的(20 ng/mL)葛根素溶液共 6 份,分别加入等体积的葛根素对照品 10、20、40、80、160、320 ng/mL,混匀后葛根素的质量浓度为 15、20、30、50、90、

170 ng/mL。按照本实验所建立的 ic-ELISA 法测定其在 450 nm 波长处的吸收值。每个浓度平行测定 6 次,带入标准曲线线性方程计算,测得浓度分别为 14.1、21.2、28.4、52.3、95.0、180.3 ng/mL。回收率为 94.0%、106.0%、94.7%、104.6%、105.6%、106.1%,回收率均值为 101.8%。

表 1 ic-ELISA 测定不同浓度梯度的葛根素标准溶液的检测精密度

葛根素浓度 (ng/mL)	精密度(RSD/%)	
	孔间差	板间差
16	0.1	0.5
32	0.5	3.5
64	0.2	3.2
128	0.9	2.6
256	2.0	0.8
512	3.3	2.0

2.3.4 含量测定 不同批次的葛根饮片分别称取 3 g,加 6 倍量水煎煮 2 次,每次 2 小时,合并煎液,滤过,浓缩,去离子水定容至 50 mL,制备葛根供试品溶液^[18]。分别采用本实验建立的 ic-ELISA 法和传统 HPLC 对葛根中葛根素含量进行测定,平行测定 3 次。Ic-ELISA 测定:回归方程为: $Y = -0.159 \ln(x) + 1.2145$,稀释至适宜倍数后,按照“2.3.1”下方法检测葛根提取液中葛根素的含量。HPLC 测定:参考 2010 年版中国药典(一部),选用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相为甲醇与水(25:75)(V:V),检测波长 250 nm,进样量 10 μL(标准曲线为 $Y = 43.475x + 0.4417$)。两种方法检测结果见表 2,采用 Excel 软件进行 t 检验, $P = 0.478 > 0.05$,两组数据差异无统计学意义。因此,ic-ELISA 与 HPLC 检测结果具有一致性,从而验证了所建立的 ic-ELISA 的准确性。

表 2 3 批葛根饮片中葛根素的含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	含量测定(μg/mL)	
	HPLC	ic-ELISA
1	186±2.1	194±7.8
2	232±3.1	210±8.0
3	234±5.2	246±6.5

3 讨论

本实验室合成了葛根素人工抗原,筛选出能稳定分泌抗葛根素的特异性杂交瘤细胞系,制备出抗

葛根素的单克隆抗体,检测抗体效价大于 128 000,检测灵敏度为 89.50 ng/mL,且对结构类似黄酮类化合物显示极低的交叉反应(<0.01%)(另文发表)。在此基础上,本研究建立了葛根素 ic-ELISA 方法。

Ic-ELISA 方法的建立会受到很多因素的影响,除了单克隆抗体的质量因素外,还包括包被原的工作浓度、封闭液种类、单抗的工作浓度等。按照常规 ic-ELISA 法测定,本实验最终确定:包被原最佳工作浓度为 1:4000,封闭液为 10% 马血清,葛根素单抗最佳工作浓度为 1:8000。

Ic-ELISA 法逐渐应用于中药现代化的化学成分检测与质量控制评估领域,成为仪器分析技术的补充。目前,对于葛根素的含量测定主要采用高效液相色谱法、薄层色谱法、毛细管电泳法等,其中高效液相色谱法最为常用。但是上述方法或样品前处理过程复杂,或仪器昂贵、检测成本高,或对操作人员实验技能要求较高。Ic-ELISA 法的优势主要体现在:(1)与常规理化分析技术相比,具有特异性强、灵敏度高的特点,甚至可检测到飞摩尔或亚飞摩尔低浓度水平;(2)方便快捷,取样量少,前处理简单,仪器化程度低,分析效率约为 HPLC 或 GC 的几十倍。

本实验准确测定了葛根中葛根素的含量,因此利用此技术的准确性以及灵敏度高、特异性强等优点,可分析中药复方中葛根素在血液、器官及组织样品中的含量分析;甚至可以制成葛根素胶体金试纸条、试剂盒等,从而为中药质量控制以及中药作用机制的阐明奠定基础。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 陈文杰. 葛根研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009,7(1):6-8.

[3] 宋卉,李银花,郑晖,等. 葛根素的药理作用与临床研究进展[J]. 现代医药卫生,2011,27(19):2936-2937.

[4] 姚丹,丁选胜. 葛根素药理作用机制探讨及临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(4):468-474.

[5] 白东义,佟春玲,韩慧,等. 葛根素的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 江苏中医药,2009,41(3):76-78.

[6] 王淑美,冯素香,梁生旺,等. 脑脉通有效部位中葛根素的含量测定[J]. 北京中医药大学学报,2007,30(2):121-123.

[7] 任亚东,朱艳林. 不同产地葛根中总黄酮和葛根素的含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(5):160-161.

[8] 毕何锋,张婕,蒋东旭,等. HPLC 法测定柴葛解肌汤中葛根素

- 的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(1): 161-162.
- [9] 苏歆, 屈会化, 赵琰, 等. 基于黄芩苷单克隆抗体的 ELISA 快速检测方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(6): 946-949.
- [10] 张越, 屈会化, 吴婷婷, 等. 甘草酸单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 770-774.
- [11] ZHAO Y, KONG H, SUN Y, et al. Assessment of baicalin in mouse blood by monoclonal antibody-based icELISA [J]. Biomedical Chromatography, 2014, 28(12): 1864-1868.
- [12] 徐金森. 芍药苷单克隆抗体的特异性检测[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008, 47(22): 45-48.
- [13] TANAKA H, PUTALUN W, D-EKNAMKUL W, et al. Preparation of a Novel Monoclonal Antibody against the Antimalarial Drugs, Artemisinin and Artesunate [J]. Planta Med, 2007, 73(10): 1127-1132.
- [14] ZHU S, SHIMOKAWA S, SHOYAMA Y, et al. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins [J]. Fitoterapia, 2006, 77(2): 100-108.
- [15] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 基于中药活性小分子单克隆抗体的复方配伍机理研究新思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(10): 1416-1419.
- [16] QU HH, ZHANG GL, LI YF, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on anti-puerarin monoclonal antibody and its applications[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 953(5): 120-125.
- [17] 屈会化, 张桂亮, 赵琰, 等. 梔子苷人工抗原的合成与鉴定[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(6): 387-392.
- [18] 公衍玲, 黄山, 于慧荣. 葛根提取方法的比较研究及其工艺条件优化[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2009, 30(5): 415-417.

(收稿日期: 2014-11-27)

(本文编辑: 蒲晓田)

【编者按】“铿锵中医行”学术沙龙第九讲以“如何运用毒药提高临床疗效”为议题, 2015 年 7 月 1 日在北京中医药大学东直门医院举行。毒药攻邪, 屡起沉疴, 但若使用不当, 则易导致患者出现诸多不良反应, 引发医疗纠纷。如何运用毒药, 提高中医临床疗效, 同时又能降低毒药的不良反应, 已成为当前研究的热点和方向。针对此议题, 本次邀请的临床专家、学者们各抒己见, 阐述各自对毒药的认识及其运用经验, 从辨证运用、用量、炮制方法、服用方法、服用时间、配伍减毒、代谢排毒、改变给药途径、结合现代药理学知识等多方面对毒药的安全、合理、规范应用进行了广泛而深刻的探讨和交流。