

羟基红花黄色素 A 人工抗原的制备

侯世斌, 李江伟*, 苏幼红, 吕芳, 张富春

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的 研究羟基红花黄色素 A(HSYA)与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)的偶联方法,获得具有免疫原性的羟基红花黄色素 A 人工抗原。方法 通过偶联物透析液的颜色变化、紫外图谱、红外扫描图谱及动物免疫试验来鉴定制备的人工抗原。结果 HSYA-BSA 人工抗原在紫外扫描中表现出 HSYA 和 BSA 的特征吸收峰;在红外扫描中 HSYA-BSA 具有 HSYA 特征官能团的吸收峰和氨基酸的特征吸收峰;间接 ELISA 检测结果显示产生抗 HSYA 的特异性抗体,血清效价可达 $1:3\ 200$;标准曲线方程计算得 BSA 和 HSYA 的结合率是 $1:50$ 。结论 通过直接偶联法成功制备出具有免疫原性的羟基红花黄色素 A 人工抗原。

关键词:羟基红花黄色素 A;人工抗原;直接偶联法;间接 ELISA

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1483-04

Preparation of artificial antigen of hydroxysafflor yellow A

HOU Shi-bin, LI Jiang-wei, SU You-hong, LU Fang, ZHANG Fu-chun

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: **Objective** To develop the proper method for conjugating hydroxysafflor yellow A (HSYA) with carrier protein, bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA), as well as preparation of artificial immunogen of HSYA. **Methods** Immunogen HSYA-BSA and coating antigen HSYA-OVA were prepared by immediate coupling method, and the characterizations of the artificial antigen were studied by color change, ultraviolet, and infrared radiation spectra shift, and mice immunization of the conjugate. **Results** HSYA-BSA Artificial antigen exhibited characteristic ultraviolet spectra of BSA and HSYA and showed obvious absorption peak in characteristic functional group of HSYA and amino acid in infrared radiation spectra. The immunized mice antiserum specifically bound the HSYA; The specific antibody for HSYA was determined by indirect ELISA. The determination of antiserum was $1:3\ 200$. The conjugating rate between BSA and HSYA was $1:50$ calculated by regression equation. **Conclusion** The artificial immunogen of HSYA is synthesized by immediate coupling method successfully.

Key words: hydroxysafflor yellow A (HSYA); artificial antigen; immediate coupling; indirect ELISA

红花黄色素是红花的主要水溶性组分,为多种黄酮类混合物,具有活血通经、祛瘀止痛等功效。其中小分子有效成分羟基红花黄色素 A(HSYA)是红花的主要药效物质,是评价红花药材质量及相应中药制剂质量的主要指标。目前对该类小分子的成分分析主要采用高效液相色谱法测定,但是该方法的最大缺陷是重复性差、检测步骤多和需要专用设备^[1~4]。根据抗原抗体特异性结合原理,采用免疫酶标技术可以经济、简便、同步大量的测定红花样品中的 HSYA。实现本技术的关键是制备特异性高、亲和性强的抗体,但是 HSYA 是一种小分子半抗原,本身只具有免疫反应性而没有免疫原性,它只有结合到蛋白质等大分子物质上才可以用于动物免

疫^[5~7]。目前把小分子半抗原结合到大分子物质上采用的方法有高碘酸钠法、戊二醛法、混合酸酐法、碳二亚胺法等。因此本实验考察了羟基 HSYA 与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)的结合技术和相应的鉴定方法,采用直接合成法制备了高质量的人工抗原,为下一步获取高特异性的羟基 HSYA 抗血清和研发相应的高灵敏度的检测试剂盒提供参考。

1 材料

HSYA(新疆维吾尔自治区药品检验所赠,经 HPLC 法鉴定其质量分数大于 90%),甲醇(分析纯,西安化学试剂厂),BSA(Mw 67 000)、OVA(Mw 45 000)均为 Sigma 进口分装,弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)和四甲基联苯胺

收稿日期:2007-12-07

基金项目:科技部部共建新疆生物资源基因工程重点实验室开放基金资助(XJDX0201-2006-04)

作者简介:侯世斌(1970—),男,新疆伊犁人,在读研究生,从事分子免疫学研究。E-mail: hsb121@sohu.com

* 通讯作者 李江伟 Tel: (0991)8583259 E-mail: jiangwei.lee@163.com

(TMB)为 Sigma 产品,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(北京博奥森生物技术有限公司),BCA 蛋白测定试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),其他试剂均为国产分析纯。昆明种雌性小鼠,体质量 18~22 g,购自新疆医科大学动物中心。

U—3010 Spectrometer(日本 Hitachi 公司);ND—1000 Uv/Vis 超微量分光光度计(美国 NRTL 公司);傅里叶-拉曼红外光谱仪;真空冷冻干燥机(德国 CHIST);Benchmark Plus 酶标仪(日本 BIO—RAD 公司)。

2 方法与结果

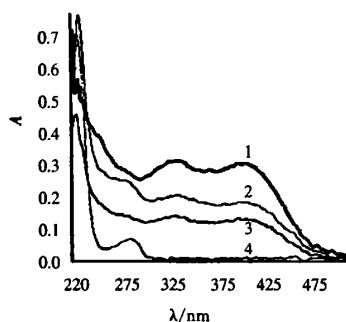
2.1 人工抗原 HSYA-BSA 的制备:以 80%甲醇为溶剂,配制 1 mg/mL HSYA 溶液,滤过,低温保存备用。以水作溶剂,现用现配制 1 mg/mL BSA 溶液。分别取 HSYA 溶液和 BSA 溶液各 10 mL,将 BSA 缓慢地滴加到 HSYA 溶液中,于 4 ℃ 下轻微搅拌过夜。将反应后的反应液移入透析袋中,置于 50 倍以上的蒸馏水中于 4 ℃ 下透析 3 d,每天换水 3 次,以透析袋颜色不再发生变化为止。将透析产品用蔗糖浓缩,并采用 BCA 法测定蛋白水平,结果近似认为是 HSYA-BSA 的水平。然后将产品分装于 -70 ℃ 冰柜过夜,真空冷冻干燥,备用(避免反复冻融样品)。

包被抗原选用 OVA 作为载体,合成方法同 HSYA-BSA。

2.2 人工抗原的鉴定:从透析的颜色变化、紫外图谱、红外扫描图谱以及特异性的抗血清的产生进行鉴定。

2.2.1 反应溶液颜色变化:HSYA 的甲醇溶液为黄色,BSA 的水溶液为无色,将二者过夜反应的混合液置于透析袋透析,随着透析次数的增加,袋内黄色会变淡。但经过 3 d 透析后,袋内颜色最终不再发生变化,保持淡黄色,说明溶液中不存在游离的 HSYA,保持的淡黄色是 HSYA 和 BSA 结合后的颜色。透析液经蔗糖浓缩,黄色又见加深。

2.2.2 人工抗原的紫外光谱:以最后一次的透析液为空白对照,将 HSYA、BSA 和透析前后的反应产物 HSYA-BSA 分别做紫外光谱鉴定,见图 1。可见 HSYA 在 321、400 nm 处有最大吸收峰,BSA 在 280 nm 处有最大吸收峰。透析前的混合物峰形不明显,尤其是 280、275 nm 处的吸收峰没有凸现,这主要是过多的 HSYA 没有除去,掩盖了蛋白的特征吸收峰。透析后的 HSYA-BSA 在 275 nm 处有最大吸收峰,同时保留有 HSYA 的 321、400 nm 的特征峰。



1-0.5 mg/mL HSYA 2-透析后 0.85 mg/mL HSYA-BSA
3-未经透析的 0.75 mg/mL HSYA-BSA 4-1 mg/mL BSA
1-0.5 mg/mL HSYA 2-0.85 mg/mL HSYA-BSA after dialysis
3-0.75 mg/mL HSYA-BSA before dialysis 4-1 mg/mL BSA

图 1 HSYA、BSA、HSYA-BSA 的紫外光谱

Fig. 1 UV Absorption spectra of HSYA, BSA, and HSYA-BSA

表明合成的人工抗原保留了 280 nm 的特征吸收峰,只是受 HSYA 基团的影响使蛋白特征峰蓝移至 275 nm 处,同时又保留 HSYA 的 321、400 nm 的特征峰。由此可以初步推断 HSYA 已经结合到 BSA 上。

2.2.3 人工抗原的红外光谱:见图 2。比较 BSA 和 HSYA-BSA 的红外光谱发现,在 3 600~3 200 cm^{-1} (O—H 的伸缩振动)具有相似的吸收峰,在 1 700~1 600 cm^{-1} (酰胺键 1 680 cm^{-1}), (蛋白质中氨基酸的特征峰)亦具有相似的吸收,只是合成后的 C=O 键的吸收强度变弱,说明合成的 HSYA-BSA 具有 BSA 的特征官能团。比较 HSYA 与 HSYA-BSA 在 1 100±50 cm^{-1} 有较强吸收峰,这是 C—O—C 的吸收峰,说明 HSYA-BSA 具有 HSYA 的特征官能团。由此证明合成的人工抗原 HSYA-BSA 偶联成功,可以作为免疫抗原。

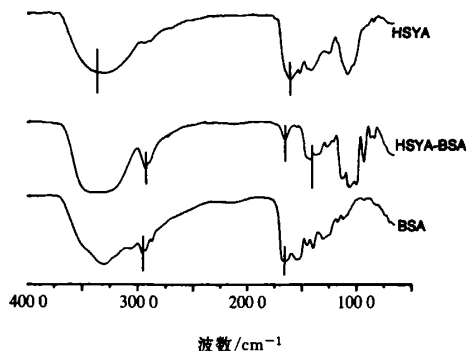


图 2 HSYA、HSYA-BSA 和 BSA 的红外光谱

Fig. 2 IR Spectra of HSYA, HSYA-BSA, and BSA

2.2.4 抗血清的鉴定:小鼠第 1 次免疫剂量按每只 50~100 μg 注射,同时加入等体积的 FCA,用注射器来回抽拉制成乳剂,背部选 2~3 点皮下注射。间

隔 10 d 加强免疫,免疫剂量按 50 μg 注射,与 FIA 制成乳剂,如此共加强 5 次。每次免疫前小鼠眼部采血制备抗血清,采用间接 ELISA 法测定抗 HSYA 的抗体水平。检测三免第 5 天的血清。包被抗原 (HSYA-OVA) 质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,用 3% OVA 作为封闭液,1% OVA 作为稀释液,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 按照 1:2 000 稀释,用 TMB 显色。在 450 nm/655 nm 波长处测定吸光度 (A) 值,以大于阴性血清 A 值 2.1 倍计 ($P/N \geq 2.1$) 阳性,检测抗 HSYA 的特异性抗体,血清效价可达 1:3 200。见图 3。

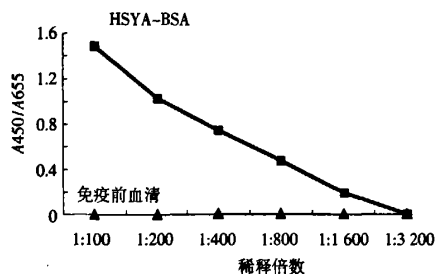


图 3 HSYA-BSA 免疫小鼠血清 ELISA 分析
Fig. 3 ELISA Analysis of serum from mice immunized by HSYA-BSA

2.3 半抗原与蛋白结合比的测定

2.3.1 HSYA 的标准曲线和线性方程的建立: HSYA 溶液按照 1 000、500、250、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释,以最后一次的透析液为对照,分别进行紫外扫描,得 HSYA 标准曲线方程 $A=0.0006C-0.0064$, $r=0.9998$,测定范围 0~1 mg/mL 。

2.3.2 BSA 的标准曲线和线性方程的建立:BSA 溶液按照 2、1、0.5、0.25 mg/mL 稀释,以最后一次的透析液为对照,分别进行紫外扫描,得 BSA 标准曲线方程 $A=0.0669C+0.0108$, $r=0.9996$,测定范围 0.25~2 mg/mL 。

2.3.3 测定:由于 BSA 在 400 nm 处的 A 值几乎为零,在 BSA 质量浓度低的情况下可以忽略不计,所以可以认为 HSYA-BSA 在 400 nm 的 A 是由结合上的 HSYA 引起的。根据建立的线性方程计算免疫抗原和包被抗原上结合的 HSYA 数目。测定 HSYA-BSA 结合物在 400 nm 的 A ,将其代入 HSYA 的标准曲线方程得到 HSYA 的质量浓度为 0.277 mg/mL 。根据 HSYA 和 BSA 的质量浓度,可以得出 HSYA-BSA 中二者的结合比为 50:1。同样的方法得到 HSYA-OVA 的结合比为 112.8:1。

3 讨论

日本九州大学药学府正山征洋教授针对中药有效成分专门进行单克隆抗体的制备,并对其在中药

领域的应用进行了广泛的探讨,取得了可喜的成就。正山征洋教授实验室许多中药有效成分的人工抗原获取是采用高碘酸钠法制备的,于是笔者也曾采用过碘酸钠法制备 HSYA-BSA 免疫抗原和 HSYA-OVA 包被抗原。虽然合成的人工抗原保留了 321 nm HSYA 的特征峰,进行 SDS-PAGE 电泳分析也出现一条相对分子质量大于 6.7×10^4 的条带,但经过五免小鼠始终没有检测到抗 HSYA 的抗体。相反,采用直接合成法反应条件温和,HSYA 上两个大的亲水基团几乎不被破坏,合成的 HSYA-BSA 人工抗原经过二免就检测到针对 HSYA 的特异性抗体。初步推断认为经过高碘酸钠处理后,HSYA 芳环 1,2 位原子活化的同时可能会破坏 HSYA 上的两个大的亲水基团,结果导致 HSYA 的 400 nm 特征峰也消失。事实上恰好是这些被破坏的亲水基团非常利于小鼠产生相应抗体。因为 HSYA 上大的亲水基团遭到破坏,它结合到蛋白质上后就会变成蛋白质的一个疏水性的基团,这样它就会因为疏水相互性作用被蛋白包裹到内部而不能直接和 B 细胞的表面接触,从而也就不会有机会刺激 B 细胞产生针对 HSYA 的抗体^[8]。这应该就是用过碘酸钠法的免疫原经过五免始终不能激发机体产生抗 HSYA 抗体的根本原因。直接法合成不会破坏 HSYA 上的两大亲水基团,所以结合到 BSA 上就会成为蛋白质的一个外露的人工抗原决定簇,这样外露的人工抗原决定簇就有可能直接与 B 细胞表面接触,最终会刺激机体产生相应抗体。

采用直接合成法合成 HSYA 人工抗原是一种新方法。从化学结构上分析,HSYA 上的羰基比其他基团活泼,在弱酸性(一般在醋酸的催化下)反应体系中,酸的作用是增强羰基的亲电性,使其有利于亲核试剂的进攻,它容易同氨基酸残基上的氨基加成缩合形成一个不稳定的中间体,此中间体一经形成,氢离子立即由氮移至氧上,形成醇胺。最后由醇胺中失去一分子水,形成碳-氧双键。另外,在弱酸性反应体系中,可以控制酚羟基参与反应,避免酚负离子 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$) 作为亲核试剂参与反应,结果会使反应产物更加单一稳定。所以将 BSA 缓慢滴加到 HSYA 溶液中并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下轻微搅拌过夜的整个过程,保持反应体系处于偏酸性有利于得到目的产物。但是确切的反应机制需要进一步的实验验证。

致谢:新疆大学理化测试中心唐健老师、化工学院谢正峰博士、王尉及王儒祥硕士给予帮助。

参考文献:

- [1] 赵明波,邓秀兰,王亚玲,等.红花 RP-HPLC 指纹图谱的建立

- 及其质量研究[J]. 药学报, 2004, 39(3): 212-216.
- [2] 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 高效液相色谱法测定红花中的羟基红花黄色素 A[J]. 色谱, 2003, 21(6): 593-595.
- [3] 陆仙芸, 林德君, 徐升亮. HPLC 法测定注射用红花黄色素中羟基红花黄色素 A[J]. 中草药, 2006, 37(5): 704-705.
- [4] 祝明, 郭增喜. 红花药材中红花黄色素含量的测定[J]. 中药材, 2000, 23(8): 458-459.
- [5] 滑静, 徐修远. 氯霉素人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(4): 30-31.
- [6] 曾华金, 刘吉华, 余伯阳, 等. 抗甘草酸二铵抗血清的制备[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(5): 570-576.
- [7] Morinaga O. Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re [J]. *Chromatogr B*, 2006, 830: 100-104.
- [8] Fodey T L. Use of antigen mimics to produce specific antibodies to anti-coccidial drugs [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 323: 31-38.

Box-Behnken 中心组合设计优化甘草酸二铵缓释片的处方

马伟, 尹莉芳*, 周建平, 赵存婕

(中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 考察甘草酸二铵缓释片的制备工艺, 并对其体外释药机制进行研究。方法 采用羟丙基甲基纤维素(HPMCk4m)、山萘酸甘油酯为骨架材料, 制备甘草酸二铵缓释片; 使用 Box-Behnken 中心组合设计试验方案, 借助试验设计软件 Design Expert 绘制响应面曲线图, 筛选适合的处方; 并通过方程拟合探讨释药机制。结果 按预测处方制备的缓释片, 在 2、4、8、12 h 的体外累积释放率均值分别为 32.55%、49.94%、73.88%、97.89%。对其体外释药曲线进行模型拟合, 结果表明药物的释放机制为扩散和骨架溶蚀二者的协同作用。结论 验证试验证实了预测处方与实际处方之间具有较好的拟合度, Box-Behnken 中心组合设计可以应用于甘草酸二铵缓释片处方的筛选。

关键词:甘草酸二铵; 缓释片; Box-Behnken 中心组合设计

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)10-1486-05

Optimized formulation of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablet by Box-Behnken design

MA Wei, YIN Li-fang, ZHOU Jian-ping, ZHAO Cun-jie

(College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To investigate the preparation technique and optimal formulation of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablets and study the release mechanism of diammonium glycyrrhizinate release from the tablet. **Methods** Using HPMCK4m, Compritol 888 as skeleton material to prepare the diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablet. To optimize the formulations by Box-Behnken design, and use Design Expert program for statistical analysis of experimental results. Release mechanism of diammonium glycyrrhizinate from sustained release tablets was established by equation fitting. **Results** The average accumulate release rates of diammonium glycyrrhizinate sustained-release tablets in 2, 4, 8, and 12 h were 32.55%, 49.94%, 73.88%, and 97.89%. And the release of diammonium glycyrrhizinate could be controlled by diffusion associated with erosion. **Conclusion** Box-Behnken design could be successfully used to optimize the sustained-release tablet of diammonium glycyrrhizinate.

Key words: diammonium glycyrrhizinate; sustained-release tablets; Box-Behnken design

甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate)是在甘草的有效成分及其衍生物的基础上研究的第三代产品, 临床应用多年, 除在治疗病毒性肝炎方面取得显著疗效外, 还被广泛应用于临床各个领域, 治疗多种疾病和理化因素引起的肝脏损伤。由于肝炎需

要长期治疗, 而目前市场上的甘草酸二铵注射剂和胶囊剂用药次数频繁, 患者用药不便, 且血药浓度波动较大, 因此将甘草酸二铵制备成为持续 24 h 释药的缓释制剂可以提高患者的顺应性, 降低药物不良反应。响应曲面优化设计法(response surface

收稿日期: 2007-12-07

作者简介: 马伟(1981—), 男, 内蒙古包头市人, 中国药科大学药剂学专业硕士研究生, 从事药物新剂型与新技术的研究。

E-mail: xmgmw@163.com

* 通讯作者 尹莉芳 Tel: (025)85391080 E-mail: lifangyin@hotmail.com