苷和苷元)进行分离,10 cm 色谱柱能较好地达到分离效果。乙醇-水体系(20%乙醇)适用于银杏黄酮的分离纯化,甲醇体系(甲醇-NaAc, pH 6.0)适用于银杏黄酮苷元的分离。槲皮素和山柰酚的最佳分离度为 1.7,山柰酚和异鼠李黄素的最佳分离度为 1.0,苷元分离的负荷量可以达到 6.7 mg。槲皮素的收率可达到 95%以上,纯度在 95%以上;山柰酚和异鼠李素的纯度均可达到 90%以上。色谱柱通过反复再生其寿命在 25 mg/mL 固定相以上。表明该固定相具有一定应用潜力。

References:

[1] Ma H Y, Xue Y Y. Advances of the applications in pharmacology and pharmaceutical analysis of cyclodextrin [J]. *J Yan'an Univ* (延安大学学报), 1998, 17(2): 48-53.

[2] Haginaka J, Wakai J. β-Cyclodextrin conded silica for direct injection analysis of drug enantiomers in serum by liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1990, 62: 997-1000.

[3] Sebille B, Guillaume M, Vidal-Madjar C, *et al*. Retention and enantioselectivity properties of β-cyclodextrin polymers and derivatives on porous silica for reverse-phase liquid chromatographic separation of enantiomers [J]. *Chromatographia*, 1997, 45: 383-389.

免疫磁性捕获 ELISA 法检测甘草中甘草蛋白的研究

曹 宇,曹学琳,田 旺,杨文博,白 钢*

(南开大学生命科学学院,天津 300071)

摘 要:目的 制备甘草蛋白免疫磁性微球,并建立快速、精确的免疫磁性捕获 ELISA 法检测甘草蛋白。**方法** 采用种子聚合法合成聚苯乙烯磁性微球,并以兔抗甘草蛋白 IgG 抗体致敏,制备特异性捕获甘草特征蛋白的免疫磁性微球。以生物素标记抗体为示踪抗体,结合辣根过氧化物酶标亲和素建立 ELISA 检测系统,用于甘草药材和含甘草中成药中甘草蛋白的分析。**结果** 利用该方法对甘草药材和中成药中甘草蛋白抗原检测,检测灵敏度达到 10 ng/mL。**结论** 免疫磁性捕获 ELISA 检测技术方便、快速、准确,为生药的品种鉴定及中成药的质量控制提供一种新方法。

关键词:甘草;甘草蛋白;免疫磁性微球;免疫磁性捕获 ELISA 技术

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)10-1109-04

Immunomagnetic separation ELISA for identification of protein in *Radix Glycyrrhizae*

CAO Yu, CAO Xue-lin, TIAN Wang, YANG Wen-Bo, BAI Gang*

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin, 300071, China)

Abstract: Object To provide a quick and precise immunomagnetic separation enzyme-linked immuosorbent assay (IMS-ELISA) for protein detecting of *Radix Glycyrrhizae* by immunomagnetic microspheres (IMMS). **Methods** Using dispersion polymerization, polystyrene magnetic microspheres as carriers were prepared. IMMS coating with rabbit anti-*Radix Glycyrrhizae* protein (RGP) IgG can specifically capture RGP. Taking biotinylated anti-RGP rabbit IgG as a tracer antibody, together with horseradish peroxidase (HRP) labeled avidin, an ELISA on IMMS was developed. **Results** The method was specific to RGP antigen and could identify 10 ng/mL RGP antigen. **Conclusion** IMS-ELISA shows a new practicality of the unequivocal identification of effective constituent for its speedness, convenience, and accuracy.

Key words: *Radix Glycyrrhizae*; *Radix Glycyrrhizae* protein (RGP); immunomagnetic microspheres; immunomagnetic seperation enzyme linked immunosorbent assay (IMS-ELISA)

免疫磁性微球(immunomagnetic microspheres, IMMS)是近年来兴起的一类新型磁性活性材料,是连有抗体或抗原的磁性微球,通过表面的抗体或抗原特异性地与靶物质结合,从而赋予其磁响应性,在特定磁场的作用下,这些结合了 IMMS 的细胞和分子可以发生定向移动,从而实现其免疫

收稿日期:2004-01-05

基金项目:天津市自然科学重点基金资助项目(003805311);教育部回国留学人员启动基金[(2000)479 号]

作者简介:曹 宇(1977—),男,辽宁铁岭人,硕士研究生,主要从事免疫磁性微球的研究。

*通讯作者 Tel: (022) 23508318 E-mail: gangbai@eyou.com

学检测等方面的目的[1]。免疫磁性捕获 ELISA 技术（immunomagnetic separation enzyme linked immuno- sorbent assay，IMS-ELISA）将 IMMS 的捕获技术与 ELISA 检测技术相结合，对于常规 ELISA 灵敏限以下无法检测到的抗原也可获得较高的检出率，因此日益受到人们的关注。目前，IMS-ELISA 已应用于病原微生物[2,3]、细胞[4]、蛋白质[5]的检测。本实验以甘草为例，采用种子聚合法制备粒径在 50～100 μm 的聚苯乙烯磁性微球，并以兔抗甘草蛋白 IgG 抗体致敏，制备出检测甘草特异性蛋白的免疫磁性微球，进一步结合酶标抗体建立免疫学分析方法用于甘草成分的检测，为中药及其部分制剂的分析鉴定开辟了一条简便快速的途径。

1 仪器与材料

酶标仪（BIOTECH，ELX800）；96 孔酶标板（COSTAR，美国）；漩涡混合器、ZW—A 型微量振荡器、电子分析天平、磁力搅拌器、电动搅拌器均为国产仪器。活化生物素（sulfo-NHS-LC-Biotin EZ-Link™，PIERCE）；3，3′，5，5′-四甲基联苯胺（TMB）；辣根过氧化物酶（HRP）标记亲和素；牛血清白蛋白（BSA）购自瀛洋生物制品公司，其他试剂均为分析纯。

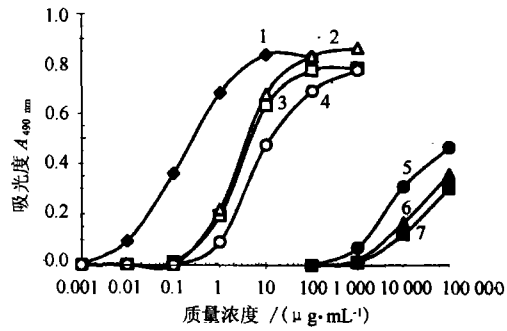
内蒙、赤峰和东北产乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 由天津市药品检验所提供；参苓白术丸、止嗽青果丸、香连化滞丸均为市售中成药。

2 方法与结果

2.1 特异性抗体的制备及标记：Anti-RGP 抗体及生物素标记 Anti-RGP 抗体按文献[6]方法制备。

2.2 生物素亲和素-ELISA（BAS-ELISA）夹心法检测甘草蛋白：按照文献[6]方法进行。分别取内蒙、赤峰和东北产甘草粉末，超声波提取法制备生药抗原提取液，配成 1 mg/mL 的混悬液；另取参苓白术丸、止嗽青果丸、香连化滞丸，剥去糖衣，用乳钵研碎，分别配成 100 mg/mL 的混悬液，作为测试用抗原溶液。将上述抗原溶液经 PBS 稀释后，采用 BAS-ELISA 法对其中的甘草蛋白成分进行检测。结果见图 1，以甘草蛋白为标准对照，分别测得 3 种甘草中甘草蛋白的量依次为 25、30、20 mg/g；3 种中成药中甘草蛋白的量依次为 4.4、6.5、45.0 μg/g。

2.3 IMMS 的制备：采用种子聚合法制备[7]。取 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 6 g 溶于 400 mL 37.5%聚乙二醇溶液中，加入 NaOH 溶液至 pH 11，60 ℃反应 4 h，形成棕黑色磁流体悬浮液。取上述磁流体 1 g，于 60%乙醇溶液中，依次加入 36 mL 苯乙烯，0.3 mL 二乙烯基苯和 6 g 过氧化苯甲酰，在氮气保护下 65 ℃反应 10 h，筛分后得到 50～100 μm 的聚苯乙烯磁性微球（图 2），收率大于 65%。



1-甘草蛋白标准品 2-赤峰产甘草 3-内蒙产甘草 4-东北产甘草 5-香连化滞丸 6-止嗽青果丸 7-参苓白术丸
1-RGP standard product 2-*G. uralensis* from Chifeng 3-*G. uralensis* from Inner Mongolia 4-*G. uralensis* from Northest of China 5-Xianglian Huazhi Pill 6-Zhisou Qingguo Pill 7-Shenling Baizhu Pill

图 1 BAS-ELISA 检测甘草蛋白

Fig. 1 Analysis of RGP by BAS-ELISA

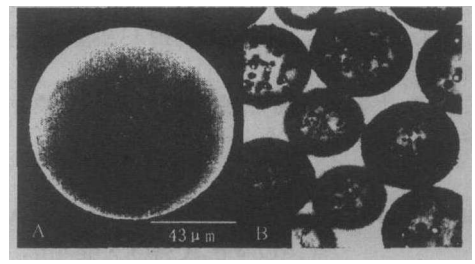


图 2 聚苯乙烯免疫磁性微球的扫描电镜照片（×700 倍）（A）和光镜照片（×300 倍）（B）

Fig. 2 Photographs by scanning electroscope (×700) (A) and optical microscope (×300) (B) of polystyrene magnetic microspheres

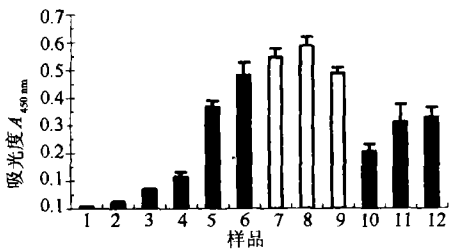
2.4 IMMS 的致敏：取 2 mL 聚苯乙烯磁性微球，加入 5 mg/mL Anti-RGP IgG 抗体溶液 2 mL，于 4 ℃放置 4 h，包被微球，通过 Lowry 法考察致敏前后溶液中的抗体的质量浓度，并推算聚苯乙烯磁性微球的抗体吸附量为 0.6 mg/mL。用 PBS 反复清洗 3 次，经 1% BSA 封闭后，制成抗体致敏的免疫磁性微球，4 ℃保存备用。

2.5 IMS-ELISA：分别取阴性对照（空白溶液）及待测样品溶液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中，加入 15 μL 抗体致敏的免疫磁性微球，37 ℃振荡反应 1 h。以磁铁的磁场聚集固定微球，弃去反应液，用 PBS 反复清洗 3 次。加入 100 倍稀释的生物素标记 Anti-RGP IgG 抗体 1 mL，37 ℃振荡反应 1 h。清洗后再加入 2 000 倍稀释的 HRP 标记亲和素 1 mL，室温

反应 30 min。清洗后加入新配制的 TMB 底物 1 mL，反应 5 min，加入 1 mol/L H_2SO_4 终止反应，观察颜色变化，并于 450 nm 处测定其吸光度。

以致敏的 IMMS 为固相载体，分别加入 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 μg/mL 甘草蛋白抗原，依据 IMS-ELISA 法考察检测限，每个质量浓度重复考察 3 次，结果取平均值，见图 3。与阴性对照相比其 P/N 值分别为 2.0、6.0、9.9、32.0、41.9。因此，IMS-ELISA 法检测甘草蛋白抗原的最低检测限为 10 ng/mL ($P/N=2$)。

分别取 100 μg/mL 内蒙、赤峰和东北产甘草测试用抗原溶液，100 mg/mL 参苓白术丸、香连化滞丸、止嗽青果丸测试用抗原混悬液，采用 IMS-ELISA 法对其中甘草蛋白抗原进行检测，每个样品重复测定 3 次，结果取平均值，见图 3。结果表明，采用 BAS-ELISA 法和 IMS-ELISA 法对药材和中成药丸剂中甘草蛋白的检测结果完全一致，均可检出微量甘草蛋白的存在。特异性分析也表明，Anti-RGP 抗体有良好的特异性，同甘草以外的其他生药没有交叉反应[6]。因此，IMS-ELISA 检测法用于中药材及其制剂的分析可行，其检测结果准确可靠。



1-阴性对照 2-0.01 μg/mL 甘草蛋白 3-0.05 μg/mL 甘草蛋白 4-0.1 μg/mL 甘草蛋白 5-0.5 μg/mL 甘草蛋白 6-1.0 μg/mL 甘草蛋白 7-内蒙产甘草 8-赤峰产甘草 9-东北产甘草 10-参苓白术丸 11-止嗽青果丸 12-香连化滞丸
1-negative sample 2-0.01 μg/mL RGP standard product 3-0.05 μg/mL RGP 4-0.1 μg/mL RGP 5-0.5 μg/mL RGP 6-1.0 μg/mL RGP 7-*G. uralensis* from Inner Mongolia 8-*G. uralensis* from Chifeng 9-*G. uralensis* from Northeast of China 10-Shenling Baizhu Pill 11-Zhisou Qingguo Pill 12-Xianglian Huazhi Pill

图 3 免疫磁性捕获-ELISA 检测甘草蛋白

Fig. 3 Analysis of RGP by IMS-ELISA

3 讨论

现代免疫学检测技术作为蛋白质和小分子药物等的检测手段之一，已经开始应用在传统的中药鉴定领域，并在中药成分的分析鉴定上具有十分重要的价值[8]。本研究选用甘草为实验对象，利用甘草种属特异性蛋白建立一种免疫学鉴定方法，从蛋白质方面进行中药材鉴别，为生药品种鉴定和质量控制提供一种新方法[6,9,10]。

作为近年来国内外新兴的一种免疫学技术，免疫磁性微球以其灵敏度高、检测速度快、特异性高及重复性好等优点开始在病原生物和生物大分子抗原检测中广泛地应用。本研究采用种子聚合法制备聚苯乙烯磁性微球，并以兔抗甘草蛋白 IgG 致敏制备出甘草蛋白检测用的免疫磁性微球。利用 IMMS 可以从复杂的中药混悬液中直接特异性地捕获和浓集甘草蛋白，通过生物素标记甘草蛋白抗体，并结合酶标亲和素建立 IMS-ELISA 方法，用于甘草药材及其部分制剂中甘草蛋白抗原的检测，其灵敏度可达 10 ng/mL。

另外，本实验曾尝试对复方甘草片、银翘解毒片和桑菊感冒片进行检测，未检测出甘草蛋白抗原。其原因可能由于醇提取使蛋白质类抗原的构型发生改变，导致 Anti-RGP 抗体不予识别，故该方法更适合水提中药制剂和生药材样品的分析和鉴定。

IMS-ELISA 检测法只需借助一块磁铁及相应的试剂即可在 3 h 内对药品进行检测，因此与传统的检测技术相比，该方法不仅检测灵敏度高，特异性强，而且操作简单，不需要借助仪器设备，可以在短时间内对大量的药品进行现场检测，便于普及推广，是一种实用的中药分析新方法。

References:

[1] Ugelstad J, Soderberg L, Berge A, *et al*. Monodisperse polymer particles — a step forward for chromatography [J]. *Nature*, 1983, 303: 95-98.

[2] Yazdankhah S P, Hellemann A L, Ronningen K, *et al*. Rapid and sensitive detection of *Staphylococus* species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles [J]. *Vet Microbiol*, 1998, 62: 17-26.

[3] Nibbeling H A M, Van Etten L, Fillie Y E, *et al*. Enhanced detection of Schistosoma circulating antigens by testing 1 mL urine samples using immunomagnetic beads [J]. *Acta Trop*, 1997, 66(2): 85-92.

[4] Li Y R, Wu J M, Zou P. Isolation of eosinophils from peripheral blood by the negative selection procedure of magnetic activated cell sorting [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2000, 16(8): 423-427.

[5] Muller-Schulte D, Brunner H. Novel magnetic microspheres on the basis of poly (vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycated haemoglobin [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 711(1): 53-60.

[6] Bai G, Cao X L, Yang W B, *et al*. The study of immunoassay method for *Radix Glycyrrhizae* identification [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 35(1): 83-86.

[7] Qiu G M. Studies on magnetic polystyrene microspheres: copolymerization and characterization of acrolein and styrene [J]. *Chin J Colloid Polymer* (胶体与聚合物), 1999, 17(4): 1-4.

[8] Yuan J R, Yuan H. The studies of quality control methods for traditional Chinese medicines [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(8): 566-569.

[9] Bai G, Fujiwara K, Tanimori H, *et al*. Development and application of a sandwich enzyme immunoassay for *Radix Glycyrrhizae* protein (RGP) using monoclonal antibodies [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(12): 1224-1228.

[10] Bai G, Yang W B, Cao X L, *et al*. Using immunological method for detection and quantitative measurement of the contents of *Radix Glycyrrhizae* component composing traditional Chinese medicines [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai* (南开大学学报), 2002, 35(3): 87-90.

Ⅲ型山东药圣 1+1 澄清剂用于抗流感滴鼻剂的澄清工艺

张会宗，潘明云，张若石，李大明

（辽宁省中医研究院，辽宁 沈阳 110034）

摘 要：目的 考察抗流感滴鼻剂的絮凝除杂工艺条件。**方法** 以澄清效果为指标，对影响Ⅲ型山东药圣 1+1 澄清剂絮凝除杂的 5 种因素进行了考察。以栀子苷量为定量考察指标，木兰脂素、栀子苷的 TLC 检识为表观考察指标，对Ⅲ型山东药圣 1+1 澄清剂絮凝、50%乙醇醇沉、75%乙醇醇沉除杂情况进行对比，确定最佳的除杂工艺条件。**结果** 采用优化后的絮凝除杂工艺条件，絮凝组中栀子苷含量明显高于 50%、75%乙醇醇沉组；TLC 显示，絮凝除杂组与原液组斑点基本一致。**结论** Ⅲ型山东药圣 1+1 澄清剂在抗流感滴鼻剂的除杂工艺中，具有活性成分保留率高，操作简便，成本低廉，工艺稳定等优点，是较理想的除杂方法之一。

关键词：抗流感滴鼻剂；Ⅲ型山东药圣 1+1 澄清剂；栀子苷；木兰脂素；高效液相色谱；薄层色谱

中图分类号：R286.02 **文献标识码：**B **文章编号：**0253-2670(2004)10-1112-04

Application of Shandong Yaosheng 1+1 (Ⅲ) clarificant in clarifying process of Anti-flu Nose Drops

ZHANG Hui-zong, PAN Ming-yun, ZHANG Ruo-shi, LI Da-ming

(Liaoning Academy of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

Abstract: Object To investigate the process of flocculation impurity removal for the Anti-flu Nose Drops (AND). **Methods** Five kind of effective factors on flocculation impurity removal with the index of clarifying results were studied. Comparative tests for Shandong Yaosheng 1+1 (Ⅲ) clarificant, 50% alcohol precipitation, and 75% alcohol precipitation were performed with the quantitative index of gardenoside contents, the qualitative index of magnolin and gardenoside TLC chromatograms. The optimum process condition was selected out. **Results** Under the optimum process condition of flocculation impurity removal, gardenoside contents in the flocculation group is higher than those in 50%, 75% alcohol groups. TLC chromatograms showed that the spots of flocculation group are the same as those in the original liquid group. **Conclusion** Shandong Yaosheng 1+1 (Ⅲ) clarificant has following advantages: high reserved rate of active components, simple operation, cheap cost, stable process, which is a ideal method for the impurity removal.

Key words: Anti-flu Nose Drops (AND); Shandong Yaosheng 1+1 (Ⅲ) clarificant; gardenoside; magnolin; HPLC; TLC

自 20 世纪 50 年代末有机高分子絮凝剂制成以来[1]，吸附澄清技术逐渐应用于食品、医药领域。特别在中药除杂方面，絮凝剂通过架桥吸附，选择性地去除杂质，克服醇沉脱水因物质的溶解度改变而造成活性成分遗失，客观上与中医的整体观、中药多靶点发挥作用的内在机制相吻合。抗流感滴鼻剂由白芷、辛夷等 4 味中药组成，具有辛凉解表、疏散风热之功效，临床用于风热证流感。辛夷挥发油有抗组胺样作用[2]，白芷中香豆素类有治疗头痛作用[3]。该制剂的提取工艺为提取挥发油后，对药渣进行水煎，因此水煎液的除杂问题成为直接影响制剂澄清度和药物稳定性的关键问题之一。为了寻求最佳除杂工艺

收稿日期：2003-12-25

基金项目：辽宁省科技厅资助项目(00226003)

作者简介：张会宗(1971—)，男，助理研究员，辽宁省凌源市人，现在攻读辽宁中医学院生药学硕士学位，主要从事中药新制剂的研制开发工作。Tel: (024) 86110027 E-mail: hzzhanglzyk@vip.sina.com