

• 药剂与工艺 •

猪去氧胆酸人工抗原的合成及鉴定

赵 妍^{1,4}, 屈会化^{2,4}, 张 越^{1,4}, 冯会宾^{3,4}, 孙 晔^{1,4}, 孔 慧^{1,4}, 赵 琰^{1,4}, 王庆国^{1,4*}

1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
4. 北京中医药大学“经典方剂的应用基础研究”创新团队, 北京 100029

摘 要: 目的 合成并鉴定猪去氧胆酸(hyodeoxycholic acid, HDCA)人工抗原,为进一步制备其特异性抗体,建立相应的免疫分析方法,并为其应用到药理药效的研究中奠定基础。方法 采用混合酸酐法合成 HDCA 人工抗原(HDCA-牛血清白蛋白),包被原(HDCA-鸡卵清白蛋白);应用硅胶薄层色谱法鉴定人工抗原、包被原合成是否成功;应用人工抗原与弗氏佐剂的乳化液背部皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠 4 次后,尾尖取血,通过酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法测定免疫小鼠抗血清的效价和特异性。结果 薄层色谱法检测结果表明,HDCA 与牛血清白蛋白(BSA)偶联成功;小鼠抗血清效价大于 1:8 000,竞争抑制曲线表明,血清中的抗体可与 HDCA 产生特异性结合。抗血清和甘草酸、黄芩苷、栀子苷等与其常配伍应用的中药化合物均无交叉反应,但与胆酸交叉反应率为 90%。结论 成功合成了 HDCA-BSA,并可诱发小鼠产生相应特异性抗体。为进一步制备抗 HDCA 单克隆抗体及 HDCA 药理作用靶点的研究奠定了基础。

关键词: 猪去氧胆酸;人工抗原;合成;混合酸酐法;薄层色谱;酶联免疫吸附测定

中图分类号: R284.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3387-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.006

Synthesis and identification of artificial antigen of hyodeoxycholic acid

ZHAO Yan^{1,4}, QU Hui-hua^{2,4}, ZHANG Yue^{1,4}, FENG Hui-bin^{3,4}, SUN Ye^{1,4}, KONG Hui^{1,4}, ZHAO Yan^{1,4}, WANG Qing-guo^{1,4}

1. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
4. “Classical Prescription Application Foundation Research” Innovation Team, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To synthesize and identify the hyodeoxycholic acid (HDCA) artificial antigen and to lay a foundation for the preparation of its specific monoclonal antibody, establishment of immunoassay method, and application in the pharmacological researches. **Methods** The HDCA artificial immunogen (HDCA-BSA) and coating antigen (HDCA-OVA) were synthesized by mixed anhydride method and then examined by TLC method. BALB/c mice were immunized with the emulgator containing the prepared HDCA-BSA conjugate and Freund's adjuvant by the back sc multipoint injection for three times following with a booster immunization by the prepared HDCA-BSA conjugate alone. Then the blood of mice was obtained from tail vein 24 h after the booster, and the sera were isolated for the titer and specificity test by ELISA. **Results** According to TLC, HDCA was successfully conjugated

收稿日期: 2014-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274043)

作者简介: 赵 妍(1987—),女,在读博士研究生,研究方向为经方的配伍规律及物质基础。

Tel: (010)64286705 E-mail: ysy58328@163.com

*通信作者 王庆国,男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为经方的配伍规律及物质基础。

Tel: (010)64286821 E-mail: wangqg8558@sina.com

to BSA. The antibody against HDCA obtained from immunized-mice could bind to HDCA and the titer was over 1 : 8 000. As shown in the competitive inhibition curves, the antibodies in the serum were specifically bound to HDCA without cross-relativities with glycyrrhizic acid, baicalin, geniposide, etc, except cholic acid (90%). **Conclusion** The HDCA-BSA is successfully synthesized, which could be used for the preparation of anti-HDCA monoclonal antibody and the research on pharmacological targets of HDCA.

Key words: hyodeoxycholic acid; artificial antigen; synthesis; mixed anhydride method; thin layer chromatography; ELISA

猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA) 是猪胆汁中的甾类成分, 也是中药牛黄及多种含牛黄的中成药中的活性成分, 具有广泛的药理活性。能够抑制胆酸的形成及溶解脂肪, 降低血中胆固醇和三酰甘油, 适用于 Ia 或 Ib 型高血脂症、动脉粥样硬化症^[1]。此外, HDCA 还具有显著的抗菌^[2]、抗缺氧损伤^[3]等作用。但对于其作用靶点, 量效关系等尚未阐明。目前的药理药效研究, 多是通过效应指标的变化, 间接推测 HDCA 的作用通路或作用靶点, 而对于 HDCA 的检测, 目前多采用薄层色谱扫描法^[4]、毛细管气-液色谱法^[5]、高效液相色谱-蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法^[6]、HPLC-UV 法^[7]等, 但它们均存在一定的弊端。如薄层扫描法对色谱条件要求高, 结果准确性差; 毛细管气-液色谱法因内径过小, 其柱容量小, 因材质因素, 易折断损坏, 且其柱长较长, 分析时间通常也比较长; HPLC-ELSD 法由于使用价格昂贵的蒸发光散射检测器而相对普适性较差; HPLC-UV 法虽较以上方法能够实现较为准确、可靠、便捷的测定, 但其前处理复杂, 且灵敏度有限, 当待测样品中 HDCA 的量较低时, 则很难满足研究需要。因此, 对于 HDCA 的深入研究, 迫切需要建立相应的技术方法, 以补充现有技术的不足。

本实验室近年来建立了中药化合物的单克隆抗体技术研究平台, 已成功制备了多种中药小分子的单克隆抗体, 并利用这些抗体相继建立了高灵敏度的 ELISA 分析方法^[8-9], 能够快速、灵敏、高通量的进行多种含该中药成分的药品及生物样品的检测, 可明确中药化合物在血液中的量及组织分布特点^[10-11]。此外, 将已有中药化合物单克隆抗体进行标记, 应用免疫组织化学技术、免疫荧光流式细胞分选技术, 可使之成为中药体内作用靶器官或靶点分子研究的有力工具。因此, 制备 HDCA 单克隆抗体对于其药理、药效的深入研究具有重要的应用意义。而抗体需要在免疫原的刺激下才能产生, HDCA 属于小分子化合物, 相对分子质量为 392.58, 只具有反应原性而不具有免疫原性, 因此必须和载体蛋白偶联, 才能作为免疫原使免疫动物产生特异性抗体。本实

验应用混合酸酐法, 将 HDCA 与牛血清白蛋白 (BSA) 进行偶联, 形成人工抗原免疫动物, 为进一步抗 HDCA 单克隆抗体的制备奠定了基础。

1 仪器与材料

Tecan Safire2 全波长多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 84—1A 磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; 96 孔酶标板购自 Corning 公司。

雌性 BALB/c 小鼠 4 只, 体质量 14~20 g, 6 周龄, 维通利华实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK-(京) 2012-0001。

胆酸、HDCA 对照品, 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$ (HPLC); 甘草酸、甘草次酸、黄芩苷、绿原酸、大黄酸、丹酚酸 B、栀子苷对照品, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 质量分数 $\geq 98\%$ (HPLC); BSA, 生产批号 29180102100, 购自美国 Genview 公司; 鸡卵清白蛋白 (OVA), 生产批号 115k0730, 购自北京欣经科生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂 (FCA, 批号 SLBD4763)、弗氏不完全佐剂 (FIA, 批号 SLBH1431V)、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) (批号 101347107), 购自美国 Sigma 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 批号 020110508170)、三正丁胺 (批号 20120427), 氯甲酸异丁酯 (批号 120820) 等均为国产分析纯, 购自国药集团化学试剂北京有限公司; 酶标二抗 (HRP-标记羊抗鼠 IgG, 批号 C1308), 购自北京普利莱基因技术有限公司。

2 方法与结果

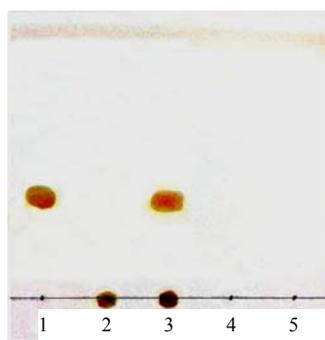
2.1 HDCA 人工抗原的合成

采用混合酸酐法, 合成 HDCA 的人工抗原及包被原。具体操作参照文献方法^[12]加以改进。方案如下: 称取 HDCA 37 mg 溶解到 0.5 mL DMF 中, 将 36 μ L 三正丁胺及等量的氯甲酸异丁酯混合液逐滴加入到上述 HDCA 溶液中, 成为 A 液, 于室温下搅拌 2 h, 同时称取 20 mg BSA, 加入到 8 mL 蒸馏水中, 将此 2.5 mg/mL 的 BSA 水溶液逐滴加入到上述完成搅拌后的 A 液中, 室温下搅拌 16 h, 于碳酸盐缓冲液 (CBS) 中透析, 每 2 个小时换液 1 次, 共换液 6 次。透析后的产物分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待用。

2.2 HDCA 人工抗原的鉴定

参照文献报道方法^[13], 利用薄层色谱法对合成的完全抗原进行鉴定: 用蒸馏水配制 1 mg/mL 的 HDCA、BSA、OVA 标准溶液, 将待测样品 HDCA-BSA、HDCA-OVA 用蒸馏水稀释到 1 mg/mL。将 HDCA、BSA、OVA、HDCA-BSA、HDCA-OVA 5 个样品分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-醋酸乙酯-醋酸-甲醇 (20:25:2:3) 为展开剂, 展开后晾干, 用 10%硫酸-乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。

从薄层结果 (图 1) 中可以看出, 在该展开条件下, HDCA 移动到了一定的位置上, 并在显色剂作用下, 显示出黄色斑点; BSA 和 OVA 在此条件下未展开, 且不显色。HDCA-BSA 和 HDCA-OVA 在原点可见到显色的黄色斑点, 说明 HDCA-BSA 和 HDCA-OVA 既具备小分子的显色特性, 又兼有载体蛋白不随展开剂移动的性质, 说明该抗原合成成功。因 HDCA-OVA 未透析, 故在小分子显色的位置仍可见显色斑点。



1-HDCA 2-HDCA-BSA (已透析) 3-HDCA-OVA (未透析)
4-BSA 5-OVA

图 1 HDCA-BSA 和 HDCA-OVA 的薄层色谱
Fig. 1 TLC of HDCA-BSA and HDCA-OVA

2.3 人工抗原免疫原性鉴定

2.3.1 动物免疫 使用 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠进行免疫。初次免疫前, 尾尖取血, 分离血清, 作为后续免疫结果的对照。第 1 次免疫, 免疫剂量为 50 μg/只, 用生理盐水将人工抗原稀释到所需体积, 再加等体积 FCA, 充分乳化成油包水 (W/O) 状态, 采用背部皮下多点注射的方法进行免疫。2 周后以相同剂量的免疫原与 FIA 混合乳化, 进行加强免疫, 此后同样方法进行第 3、4 次免疫, 每次间隔 14 d。

2.3.2 动物血清效价测定 待第 4 次免疫后 1 周, 小鼠尾静脉采血分离血清, 检测血清效价。将合成

的 HDCA 的包被原 HDCA-OVA, 用 CBS 稀释成 1:2 000, 以每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板, 于 37 °C 温箱孵育 1 h, PBST 洗板 3 次, 用 5%脱脂奶粉封闭, 37 °C、1 h, 洗板 3 次。将小鼠血清从 1:1 000 2 倍稀释到 1:128 000, 每孔分别加入 100 μL 不同稀释倍数的血清, 于 37 °C 温箱孵育 1 h, PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1:10 000), 37 °C 孵育 30 min, PBST 洗板 4 次, 加入 TMB 工作液 100 μL/孔, 37 °C 孵育 15 min。以 50 μL/孔的 2 mmol/L 硫酸溶液终止反应。于波长 450 nm 处读取吸光度 (A₄₅₀) 值。以待测孔 A₄₅₀ (P) 与阴性对照孔 A₄₅₀ (N) 的比值 ≥ 2.1, 即 P/N ≥ 2.1 且两者之差大于 0.2 时的最小值的血清稀释度为待测血清效价。

表 1 为 HDCA-BSA 免疫小鼠血清在不同稀释倍数下效价的测定结果。由此可知, 1 号小鼠血清效价较低为 1:8 000 左右, 2、3 号小鼠血清效价在 1:16 000 左右, 4 号小鼠的效价最高在 1:32 000 左右。此结果表明, 4 只免疫小鼠的抗血清均产生了抗体, 但效价不一。

2.3.3 抗血清特异性检测 采用间接竞争 ELISA 方法进行检测。将 HDCA 的包被原, 以 CBS 稀释成 1:2 000, 每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板, 封闭同前。称取一定量的 HDCA, 并倍比稀释成一定梯度, 将抗血清稀释 1 000 倍, 待用。在 HDCA 的酶标板上先分别加入 50 μL/孔各浓度的 HDCA, 再加入 50 μL/孔的抗血清, 阳性对照孔为 50 μL/孔 PBS 加 50 μL/孔抗血清, 其余同“2.3.2”项操作。计算出抗血清对 HDCA 的半数抑制浓度 (IC₅₀ 值, IC₅₀ 值定义为 A₄₅₀ 值为阳性对照孔, A₄₅₀ 值一半时对应

表 1 间接 ELISA 法测定小鼠抗血清效价
Table 1 Determination of antiserum titer by indirect-ELISA method

抗血清稀释 倍数 (×10 ³)	P/N			
	1	2	3	4
1	9.98	12.93	13.22	13.14
2	6.98	10.18	11.26	11.30
4	4.72	8.23	9.78	9.08
8	3.01	5.92	6.06	6.71
16	1.74	3.59	3.17	4.97
32	0.89	1.79	1.63	2.71
64	0.62	0.75	0.77	1.51
128	0.60	0.61	0.60	0.98

的 HDCA 浓度)。

选择胆酸、绿原酸、甘草酸、甘草次酸、大黄酸、丹酚酸 B、栀子苷、黄芩苷这 8 种与 HDCA 结构相似物或常配伍应用的其他中药有效成分进行抗体特异性检测。将这 8 种化合物倍比稀释成一系列浓度梯度替代 HDCA 溶液。其他条件相同,测定它们与抗血清之间的交叉反应。计算各个类似物的 IC₅₀ 值, 根据下列公式计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率} = \text{HDCA 对照品的 IC}_{50} / \text{类似物的 IC}_{50}$$

对 4 只小鼠的抗血清均进行竞争抑制曲线的测定, 如图 2 和表 2 所示。可见 4 号小鼠灵敏度最高,

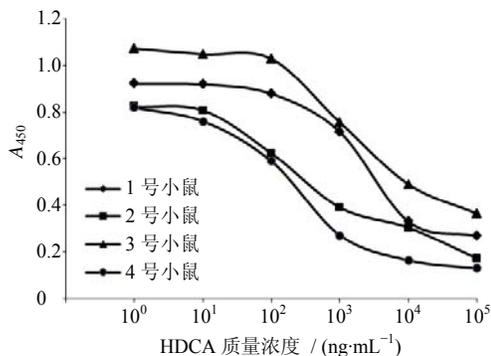


图 2 抗血清竞争抑制曲线图

Fig. 2 Inhibition curves of antibody in serum

表 2 间接竞争 ELISA 法测定小鼠抗血清与 HDCA 的线性回归方程及抗血清对 HDCA 的灵敏度
Table 2 Determination of linear regression equation and sensitivity of serum in mice against HDCA by indirect competitive ELISA method

小鼠编号	线性方程	R ²	灵敏度 (IC ₅₀) / (μg·mL ⁻¹)
1	$Y = -0.092 \ln X + 0.6739$	0.9941	9.26
2	$Y = -0.087 \ln X + 0.4656$	0.9901	1.05
3	$Y = -0.100 \ln X + 0.7719$	0.9973	13.20
4	$Y = -0.107 \ln X + 0.3497$	0.9903	0.39

而抗血清效价的测定结果也表明, 4 号小鼠血清的效价最高, 由此可见, 4 号小鼠针对本实验中合成的人工抗原产生了更强的免疫反应, 为进一步明确 4 号小鼠抗血清的特异性, 本实验选取 4 号小鼠的血清进行特异性检测。

根据 4 号小鼠抗血清对 HDCA 的线性回归方程 $Y = -0.107 \ln X + 0.3497$ 计算其 IC₅₀ 值为 390 ng/mL, 以交叉反应率公式计算抗血清与另 8 种结构相似或常配伍使用的化合物的交叉反应率, 结果如表 3 所示。其中胆酸与该抗血清中的抗体的交叉反应率为 90%, 其余均小于 0.01%, 可认为血清中的抗体与除胆酸外的其余 7 种化合物无交叉反应。但能识别胆酸, 与其发生抗原抗体的结合。

表 3 抗血清与化合物交叉反应率

Table 3 Cross-reaction rate of antibody in serum against various compounds

化合物	交叉反应率 / %	化合物	交叉反应率 / %
HDCA	100	绿原酸	<0.01
胆酸	90	大黄酸	<0.01
甘草酸	<0.01	丹酚酸 B	<0.01
甘草次酸	<0.01	栀子苷	<0.01
黄芩苷	<0.01		

3 讨论

中药小分子化合物人工抗原的合成是后续制备单克隆抗体的前提, 也是最为关键的一步。人工抗原合成之前, 需根据不同化合物的结构及理化性质选择不同的合成方法。本实验利用 HDCA 在结构上具有羧基的特点, 先后采用了 2 种方法进行人工抗原的合成。分别是混合酸酐法和碳二亚胺法。碳二亚胺是常见的一类交联试剂, 能使羧基和氨基脱水形成酰胺键。在反应时, HDCA 的羧基先与碳二亚胺反应生成一个加成中间产物, 再与 BSA 上的氨基反应形成酰胺键, 实现两者的交联。混合酸酐法是利用 HDCA 中的羧基可以在三级胺存在下与氯甲酸异丁酯反应, 生成活泼中间体混合酸酐, 然后与蛋白载体上的伯氨基反应, 形成酰胺交联键的原理合成人工抗原。经鉴定, 此 2 种方法均可成功合成 HDCA 人工抗原。经动物免疫获得的抗 HDCA 的血清多克隆抗体以混合酸酐法免疫所得的特异性更好。因此本研究报道了经混合酸酐法合成的人工抗原, 并获得了抗 HDCA 的血清多克隆抗体。人工抗原合成成功与否, 直接关系到动物的免疫反应以及抗体的产生, 因此人工抗原的鉴定是抗原合成中的一项关键步骤^[14]。目前常用的方法有紫外光谱扫描法、红外光谱扫描法、核磁共振法、标记抗原示

踪法、SDS-PAGE电泳法、飞行质谱鉴定(MALDI-TOF-MS)、快速蛋白液相色谱及免疫鉴定等^[15]。鉴于 HDCA 无紫外吸收,故紫外光谱法并不能完全证明是否偶联成功,也难以计算偶联比, MALDI-TOF-MS 鉴定依赖贵重仪器,且成本也较高。为此,本研究室提出了基于薄层色谱法进行人工抗原的鉴定^[16],较好地解决了人工抗原合成的鉴定问题。从实验结果来看, HDCA、BSA、OVA、HDCA-BSA、HDCA-OVA 的显色位置明显不同,根据蛋白质与小分子物质在薄层板展开特征的不同,易于判断人工抗原合成的成功与否。

此外,从小鼠抗血清的效价与竞争抑制曲线的结果可以看出,人工抗原 HDCA-BSA 有效的激活了小鼠的免疫反应,使得其体内产生了针对 HDCA 的抗体,但其效价不一,灵敏度各异,可能与个体免疫反应的不同有关。

HDCA 与胆酸为多种含牛黄的中成药及清开灵注射液的主要成分,也是其药效发挥的重要物质基础。此二者母核结构相似,只是在 6、7、12 位碳处羟基的位置有所不同。因此,此 3 处所形成的抗原决定簇亦可能有一定的差异。然而,免疫反应的特异性,能够自然地筛选出针对不同抗原决定簇的抗体。因此,理论上能够推测出抗血清中抗体可能既含有抗 HDCA 的特异性抗体,也含有能同时结合 HDCA 和胆酸的抗体,即针对二者共同抗原决定簇的抗体。本实验中抗血清效价及检测灵敏度均较高的 4 号小鼠的血清对胆酸具有 90% 的交叉反应,可见该鼠抗血清中含有能够识别并结合 HDCA 与胆酸的抗体。因此,如何从血清多抗中筛选出抗 HDCA 的单克隆细胞株则是下一步实验要解决的重点。

由此,本实验结果为进一步筛选出能够分泌抗 HDCA 特异性抗体的单克隆细胞株,制备其特异性抗体,建立 ELISA 免疫分析方法并将其应用到药理药效的研究中奠定了基础。

参考文献

- [1] Sehayek E, Ono J G, Duncan E M, *et al.* Hyodeoxycholic acid efficiently suppresses atherosclerosis formation and plasma cholesterol levels in mice [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(8): 1250-1256.
- [2] Kong W J, Wang J B, Zang Q C, *et al.* A novel "target constituent knock-out" strategy coupled with TLC, UPLC-ELSD and microcalorimetry for preliminary screening of antibacterial constituents in *Calculus bovis* [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(30): 3565-3573.
- [3] 闫彦芳, 张 壮, 王硕仁, 等. 猪、熊胆粉主要成分对 ECV304 细胞缺氧损伤保护作用的比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(1): 33-35.
- [4] 叶蓓蓓, 潘 莉, 王 栋, 等. 薄层扫描法同时测定人工牛黄中胆酸及猪去氧胆酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 706-709.
- [5] Batta A K, Aggarwala S K, Tintb G S, *et al.* Capillary gas-liquid chromatography of 6-hydroxylated bile acids [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 704(1): 228-233.
- [6] 唐元军, 陈育琳, 陈庆辉. HPLC-ELSD 法同时测定猪胆粉中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 651-653.
- [7] 周海燕, 李 丹, 黄 莹. HPLC 法测定胆酸和猪去氧胆酸的含量 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(2): 91-94.
- [8] 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.
- [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] Qu H H, Zhang G L, Li Y F, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on anti-puerarin monoclonal antibody and its applications [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 953/954: 120-125.
- [11] Zhao Y, Kong H, Sun Y, *et al.* Assessment of baicalin in mouse blood by monoclonal antibody-based icELISA [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, doi: 10.1002/bmc.3235.
- [12] Tanaka H, Yan S Y, Miura N, *et al.* Preparation of anti-2, 4-dichlorophenol and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid monoclonal antibodies [J]. *Cytotechnology*, 2003, 42(2): 101-107.
- [13] 史国举. 薄层荧光扫描法对清肝片中含量测定 [J]. 河南中医学院学报, 2005, 20(4): 27-28.
- [14] 屈会化, 赵 琰, 李翼飞, 等. 中药活性小分子人工抗原合成的技术要点 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1880-1885.
- [15] 赵津子, 郑 礼, 谢文艳, 等. 药物残留免疫分析研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(2): 85-88.
- [16] 刘 洋, 屈会化, 任 燕, 等. 人参皂苷 Rg₁ 人工抗原的合成及免疫原性鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1738-1742.