

酶联免疫吸附法测定血浆中芍药苷浓度

蒋慧娟 陈亮 孙洋 徐强 陈婷*

(南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘 要 建立了间接竞争酶联免疫吸附法测定血浆中芍药苷浓度。在 $10 \sim 200 \mu\text{g/L}$ 浓度范围内, 线性关系良好, 线性回归方程为 $Y = -0.1721 \lg C + 1.9645$, 相关系数 0.9927 , 回收率为 $89\% \sim 102\%$ 。运用本方法测定了大鼠一次灌胃后血浆中的芍药苷浓度。比较了分别给药芍药苷单体及中药复方四逆散提取物后, 血浆中的芍药苷浓度。研究结果表明: 四逆散配伍组方后, 芍药苷的生物利用度较低。

关键词 芍药苷, 四逆散, 酶联免疫吸附法

1 引 言

芍药苷 (Paeoniflorin) 为经典名方四逆散 (SiNiSan) 的主要成分之一, 具有解痉镇痛, 保护肝脏, 抗氧化、抗肿瘤, 抑制血小板凝集^[1, 2]等广泛的药理作用。四逆散方源自《伤寒论》, 由柴胡、白芍、枳实、甘草各等份组成。全方疏肝理脾、透郁解热、和中缓急, 后世多以和解名剂而广泛应用。在前期研究中, 对四逆散的药效物质基础和作用机理做了较深入的探讨。作为四逆散 4 个主要的活性成分之一, 研究表明^[3]芍药苷单体显著抑制了刀豆蛋白 A 体外活化的小鼠脾细胞增殖, 而对 2, 4, 6-三硝基氯苯诱导的小鼠接触性皮炎模型无显著作用。四逆散复方提取物对上述体外体内模型的作用效果都很显著。故阐明四逆散中芍药苷在机体内的药代动力学行为, 有助于探讨芍药苷在全方中发挥药理作用的机制。

酶联免疫吸附法 (ELISA) 已被广泛应用于生物学、医学等诸多领域^[4, 5]。本实验制备了中药活性成分芍药苷的抗体, 采用间接竞争 ELISA 测定血浆中芍药苷的浓度。比较研究了一次灌胃芍药苷及四逆散提取物后, 芍药苷在大鼠体内的药代动力学过程。与常用的高效液相色谱法 (HPLC) 相比^[6], ELISA 具有检测灵敏度高, 操作过程简单、快速等优点, 适用于现代药代动力学研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Sunrise Touchscreen Scanning 型酶联免疫检测仪 (Austria: Tecan); 21 CA 型核酸蛋白检测仪 (上海康华生化仪器厂); Hitachi CR 22 E 超速离心机 (Japan: Hitachi); 96 孔酶标板 (Denmark: Nunc); UV-1700 紫外-可见分光光度计 (Japan: Shimadzu)。

芍药苷 (Paeoniflorin, Wak); 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma); 卵清蛋白 (OVA, 华美生物工程公司); 弗氏完全佐剂 (CFA, Pierce); 弗氏不完全佐剂 (IFA, Pierce); 碳酸缓冲液 (CBS, pH 9.6); 磷酸缓冲盐 (PBS, pH 7.4, 0.02 mol/L PBS + 0.05% 吐温 20); 辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG (KPL); 2, 2'-连氮-3-乙苯二噻唑-6-磺酸 (ABTS, KPL); Sephadex G-25 (北京拜尔迪生物技术有限公司); Cellulose DE-32 (北京鼎国生物技术有限公司); 柴胡、白芍、枳实、甘草 (南京市药材公司); 所用试剂均为分析纯。水为二次蒸馏水。

2.2 动物

新西兰兔, 雄性, $2 \sim 3 \text{ kg}$, 购自江苏省农业科学院畜牧兽医研究所; SD 大鼠, 雄性, $250 \sim 300 \text{ g}$, 购自南京医科大学实验动物中心。

2.3 实验方法

2.3.1 芍药苷完全抗原及包被抗原的合成 参照文献 [7], 偏高碘酸钠法合成芍药苷-牛血清蛋白

2007-12-28 收稿; 2008-03-18 接受

本文系国家自然科学基金重大研究计划资助项目 (No. 90209040)

* E-mail: chenting_nj@163.com

(Paeoniflorin-BSA) 作为完全抗原, 用于免疫新西兰兔; 相同方法合成芍药苷-卵清蛋白 (Paeoniflorin-OVA) 作为包被抗原, 用于 ELISA 检测中包被酶标板。

2.3.2 抗体的制备和纯化 新西兰兔 2 只, 参照文献 [8] 用 Paeoniflorin-BSA 进行常规免疫。5 次免疫后, 从兔耳缘静脉取血, 间接 ELISA 法测抗体效价, 当效价符合要求时颈动脉采全血。全血于 37 °C 下放置 1 h 后, 4 °C 静置过夜, 以 3000 r/min 离心 10 min 取血清。采用 (NH₄)₂SO₄ 沉淀法, 从血清中分离得到粗 IgG 蛋白; 过 Sephadex G-25 柱脱盐, 除去硫酸铵; 再用 Cellulose DE-32 离子交换柱纯化。核酸蛋白检测仪监测蛋白出峰情况, 将 280 nm 下高吸光值各管洗脱液合并, 置于蒸馏水中透析 3 次, 冷冻干燥, 得 IgG 纯品, 于 -70 °C 下保存。

2.3.3 ELISA 测定步骤 采用间接竞争酶联免疫吸附法测定样品中芍药苷浓度。以 Paeoniflorin-OVA (20 mg/L, PBS 稀释) 包被酶标板, 每孔 100 μL。洗涤, 封闭, 将 50 μL 各样品与 50 μL 100 mg/L 的芍药苷抗体混合后加入酶标板上各孔, 空白对照不加抗体, 空白血浆作阴性对照。37 °C 孵育 1 h 后, 加入 1:2000 PBS 稀释的辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG, 每孔 100 μL。37 °C 孵育 1 h 后, 加入 ABTS-H₂O₂ 底物溶液, 每孔 100 μL。避光室温反应 30 min。每孔加 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测吸光值 (410 nm)。

2.3.4 四逆散提取物的制备 取柴胡、白芍、枳实、甘草各 10 g 以 200 mL 70% 乙醇浸泡 2 h 回流 1 h 过滤; 残渣用 120 mL 70% 乙醇回流 1 h 过滤。合并两次滤液, 低压回收乙醇, 水浴蒸干即得四逆散提取物。

2.3.5 大鼠给药及采血方法 将 10 只大鼠随机平均分为两组。实验前禁食 12 h 按体重灌胃给药, A 组芍药苷剂量为 100 mg/kg, B 组四逆散提取物剂量为 5.8 g/kg (含与 A 组等量的芍药苷)。分别于给药后 0、10、20、40、60、90、180、240 和 300 min 眼眶取血 0.5 mL, 加肝素抗凝, 即时分离血浆, -20 °C 保存。

3 结果与讨论

3.1 人工抗原鉴定结果

芍药苷半抗原、BSA 及其偶联物的紫外扫描图谱见图 1 (包被抗原图谱略)。从图中可以看出: 蛋白质上共价结合了半抗原后, 明显具有半抗原的紫外吸收光谱特征, 表明半抗原与载体蛋白有效偶联。依照公式 [9] 计算得芍药苷与 BSA 的偶联比为 13.5%; 芍药苷与 OVA 的偶联比为 9.5%。免疫抗原 Paeoniflorin-BSA 的偶联比在 10% ~ 30% 之间, 达到了常规免疫的要求。

3.2 ELISA 工作曲线

在上述条件下, 芍药苷在 10 ~ 200 μg/L 浓度范围内线性关系良好。线性方程 $Y = -0.1721 \lg C + 1.9645$ 相关系数 $r = 0.9927$; 其中 Y 为 410 nm 下的吸光度值。

3.3 回收率及方法精密度

空白血浆中添加芍药苷标样, 3 个浓度 (2.53、189 mg/L) 的加样回收率分别为 94%、89% 和 102% (见表 1)。

在线性范围内, 配制芍药苷浓度分别为 10、50、100、150 和 200 μg/L 的血浆样品, 每种浓度重复 5 次, 得板内差异; 各浓度样品连续 5 次, 得板间差异。间接竞争 ELISA 法精密度的酶标板内 (intra-assay) 差异及板间 (inter-assay) 差异见表 2。从表 2 可看出板内差异明显低于板间差异。故在检测过程中, 为减小差异, 每次测定都应随行绘制 ELISA 工作曲线。

3.4 大鼠一次灌胃芍药苷单体与四逆散提取物的血浆中芍药苷浓度对比

大鼠灌胃芍药苷单体与四逆散提取物后, 血浆中的芍药苷浓度随时间变化情况见图 2。四逆散复方中芍药苷相比于芍药苷单体消除快, 血药浓度-时间曲线下总面积 (AUC) 小。表明四逆散配伍组方后

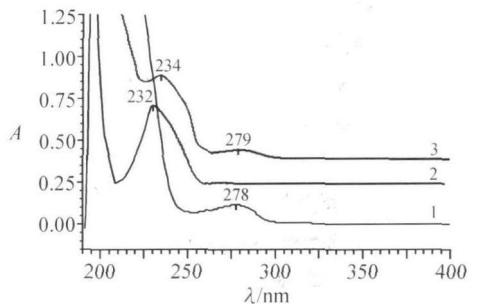


图 1 芍药苷、牛血清白蛋白及偶联物的紫外吸收光谱图

Fig 1 Ultraviolet adsorption spectra of paeoniflorin, BSA and conjugate

- 1 牛血清白蛋白 (BSA); 2 芍药苷 (paeoniflorin);
- 3 偶联物 (paeoniflorin-BSA)。

表 1 空白血浆中芍药苷加样回收率

Table 1 Recovery of paeoniflorin in blank plasma

加标浓度 Added (mg/L)	测定浓度 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)
2	1.89 ± 0.15	94.50
53	47.20 ± 2.06	89.00
103	105.16 ± 4.09	102.10

芍药苷的生物利用度下降,此结果与文献 [6] 的结果相一致。

表 2 间接竞争 ELISA 酶标板内及板间差异

Table 2 Variability of intra-assay and inter-assay of the ELISA for paeoniflorin

芍药苷浓度 Paeoniflorin concentration ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	
	板内差异 Intra-assay	板间差异 Inter-assay
200	1.96	7.44
150	3.11	4.43
100	2.39	5.19
50	3.36	8.46
10	5.44	7.91

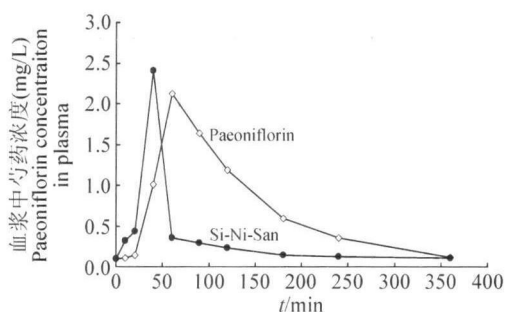


图 2 血浆中芍药苷浓度-时间曲线 (\diamond 为芍药苷单体, \bullet 为四逆散中芍药苷)

Fig. 2 Curve of paeoniflorin concentration in plasma of rats after oral administration

References

- 1 Wang ChaoHong(王朝虹), Min ZhiDa(闵知大). *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*(时珍国医国药), **1999**, 10(7): 544~546
- 2 Wu LingShan(吴玲善), Yan XueSheng(宴雪生), Liu XinLian(刘新莲), Le HuiRong(乐惠荣). *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases* 中西医结合肝病杂志, **2006**, 16(5): 278~279
- 3 Zhang L, Dong Y, Sun Y, Chen T and Xu Q. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2006**, 58: 1~8
- 4 Han Dan(韩丹), Yu Meng(于梦), Wu Mei(吴梅), Deng AnPing(邓安平). *Chinese J Anal Chem* (分析化学), **2007**, 35(8): 1168~1170
- 5 Li Bo(李波), Shi HaiYan(施海燕), Wang MingHua(王鸣华). *Chinese J Anal Chem* (分析化学), **2008**, 36(1): 34~38
- 6 Liu DongFeng(刘东锋), Zhang Li(张莉), Chen Ting(陈婷). *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae* 中国实验方剂学杂志, **2005**, 11: 36~38
- 7 Lu ZH, Morinaga Q, Tanaka H, Shoyama H. *Biol Pharm Bull*, **2003**, 26(6): 862~866
- 8 Norris CR, Decile KC, Beyerl JR, Berghaus RD, Scheele E S. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **2003**, 96: 149~57
- 9 Yang LiGuo(杨利国), Wei PingHua(魏平华), Guo AiZhen(郭爱珍). *Enzyme Immunoassay Technique*(酶免疫测定技术). Nanjing(南京): Nanjing University Press(南京大学出版社), **1998**: 141

Enzyme linked Immunosorbent Assay for the Determination of Paeoniflorin in Plasma

JIANG HuiJuan, CHEN Liang, SUN Yang, XU Qiang, CHEN Ting*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract A method was developed for the determination of paeoniflorin in plasma by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The artificial antigen was used as immunogen and applied in New Zealand rabbits to get the anti-paeoniflorin antibodies. Hapten coupled with OVA was used as coating antigen. The linear concentrations ranged from $10 \mu\text{g/L}$ to $200 \mu\text{g/L}$ and the calibration curve was $Y = -0.1721 \lg C + 1.9645$. Recoveries for the standard addition paeoniflorin to blank plasma were 89%–102%. The method has been successfully applied to determine the concentration of paeoniflorin in rat plasma. After an oral administration of the Si-Ni-San decoction, the bioavailability of paeoniflorin was lower than a single dose of paeoniflorin.

Keywords Paeoniflorin, Si-Ni-San, enzyme-linked immunosorbent assay

(Received 28 December 2007; accepted 18 March 2008)