

剑叶龙血素 A 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

沈洲,雷丽云,龙蓉,陈素,刘向明\*  
(中南民族大学生物医学工程学院,武汉 430074)

〔摘要〕 目的:建立间接竞争酶联免疫吸附分析法(ELISA)用于测定剑叶龙血素 A(CA)含量。方法:合成半抗原剑叶龙血素 A-4'-羧甲基醚(CA-4'-CME),再用碳二亚胺法将其与牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清蛋白(OVA)分别偶联制备免疫原(CA-BSA)和包被原(CA-OVA),免疫小鼠制备多克隆抗体,建立间接竞争 ELISA 法并评估其分析性能。结果:通过紫外扫描分析 CA-BSA 和 CA-OVA 的偶联比分别为 18:1 和 24:1。抗血清效价最高达到 12 000。用四参数 logistic 方程拟合 CA 标准曲线,在分析范围 0~0.80 mg·L<sup>-1</sup>内,相关系数( $R^2$ )≥0.99,IC<sub>50</sub> 0.66 mg·L<sup>-1</sup>,最低检测限 0.045 mg·L<sup>-1</sup>,批内 CV≤12.5%,批间 CV≤14.7%,回收率 92.7%~118.7%,对 5 种 CA 类似物的交叉反应率<5.38%。此方法检测龙血竭和龙血竭总黄酮中 CA 含量分别为 1.27%,3.08%。结论:剑叶龙血素 A 间接竞争 ELISA 法精密度、准确度和特异性均较好,可方便地用于药物检测和分析。

〔关键词〕 剑叶龙血素 A; 人工抗原; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附分析  
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2013)20-0241-05  
〔doi〕 10.11653/syfy2013200241

Development of Indirect Competitive ELISA for the  
Detection of Cochinchinenin A

SHEN Zhou, LEI Li-yun, LONG Rong, CHEN Su, LIU Xiang-ming\*  
(College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of Cochinchinenin A (CA). **Method:** Cochinchinenin A-4'-Carboxymethyl ether (CA-4'-CME) was synthesized as hapten. The hapten was attached to Bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) as artificial antigen by carbodimide method. Anti-CA polyclonal antibody was obtained from mice which were immunized with CA-BSA. A method of the indirect competitive ELISA for CA was established, and the analytical performance of this method was evaluated. **Result:** The conjugation molar ratio of CA to BSA and OVA were 18:1 and 24:1, respectively, calculated by UV spectrophotometry. The highest titer of Anti-CA sera was 12 000. Standard curve of CA was fitted by four-parameter logistic equation. In the analysis range of 0-0.80 mg·L<sup>-1</sup>, the correlation coefficient was larger than 0.99. The IC<sub>50</sub> and LOD of the method were 0.66 mg·L<sup>-1</sup> and 0.045 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The intra and inter assay precisions were less than 12.5% and 14.7% respectively. And recoveries ranged from 92.7%-118.7% in typical matrixes. The cross-reactivities of five structural analogues of CA were less than 5.38%. Detected by this method, the mass proportion of CA in Chinese Dragon's blood and total flavonoids of Chinese Dragon's blood were 1.27%, 3.08% respectively. **Conclusion:** Indirect competitive ELISA for the determination of CA, with its high sensitivity, specificity and accuracy, can be conveniently used in drug testing and analysis.

〔Key words〕 cochinchinenin A; artificial antigen; polyclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

〔收稿日期〕 20130312(024)  
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(30973961);中南民族大学学术团队项目(XTZ09010)  
〔第一作者〕 沈洲,硕士,从事药物发现研究,Tel:027-67843892, E-mail:shenzhou09@aliyun.com  
〔通讯作者〕 \*刘向明,博士,教授,从事药物发现研究工作,Tel:027-67843892, E-mail:liu.xiangming@263.net

剑叶龙血素 A (CA), 化学名 4'-羟基-2,6,-二甲氧基双氢查耳酮<sup>[1]</sup>, 提取自传统名贵药物龙血竭<sup>[2]</sup>。龙血竭具有抗炎止痛、抗真菌、抗心率失常、增强机体免疫功能等多种药效作用<sup>[3-4]</sup>。已有研究发现 CA 浓度依赖性抑制背根神经节细胞上 TTX-R 型电压门控钠通道电流<sup>[5]</sup>和辣椒素激发的 TRPV1 电流<sup>[6]</sup>, 在体实验中 CA 对脊髓背角广动力范围神经元诱发放电频率也有抑制作用<sup>[7]</sup>。CA 作为龙血竭的重要药效物质之一, 建立方便有效的 CA 分析方法对龙血竭的现代化研究有重要意义。

目前对龙血竭中化学成分的检测以高效液相色谱法为主<sup>[8-10]</sup>, 尽管色谱方法灵敏可靠, 但需要复杂的设备, 检测成本高, 而酶联免疫检测法 (ELISA) 具有高通量、操作方便、成本低廉等特点, 在药物检测中已有广泛的应用。剑叶龙血素 A 属于小分子, 不具有免疫原性, 本试验中首先合成 CA 半抗原和人工抗原, 再制备针对 CA 的多克隆抗体, 建立 CA 的间接竞争 ELISA 检测方法。

## 1 材料

**1.1 动物** 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 体重 18 ~ 20 g, 购自湖北省实验动物研究中心, 许可证号 SCXK (鄂) 2008-0005。

**1.2 药物和试剂** 龙血竭、龙血竭总黄酮、剑叶龙血素 A、龙血素 B、剑叶龙血素 B 均由广西中医药研究院卢文杰教授提取并鉴定, 经鉴定龙血竭为百合科植物剑叶龙血树 [*Dranaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen] 的含脂木材经提取得到的树脂, 龙血竭总黄酮中总黄酮含量  $\geq 70\%$ , 剑叶龙血素 A、龙血素 B 和剑叶龙血素 B 的纯度均  $> 98\%$ 。弗式完全佐剂 (批号 038K8726)、弗式不完全佐剂 (批号 031M8700)、二甲基亚砷 (DMSO, 批号 RNBB4300)、辣椒素 (Capsaicin, 批号 018K5051)、辣椒平 (Capsazepine, 批号 039K46156V) 均为 Sigma 公司产品, 溴乙酸 (色谱纯,  $\geq 99.5\%$ , 上海晶纯实业有限公司, 批号 28112), 吐温-20、牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清蛋白 (OVA) Biosharp 公司, HRP 标记羊抗小鼠 IgG (天津三箭生物技术有限公司, 批号 20120418), TMB 底物液 (双组分显色液 A、B, 郑州博威嘉生物科技有限公司, 批号 20120522), 总蛋白定量测试盒 (BCA 法, 南京建成生物工程研究所, 批号 20120312)。其他化学试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** UV-3200PC 型扫描型紫外-可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司), Thermo Labsystems Multiskan Ascent 354 型酶标仪 (赛默飞

世尔科技公司), 96 孔可拆酶标板 (美国 Corning 公司), HH-CP-T 型二氧化碳细胞培养箱 (上海益恒实验仪器有限公司), 101-1AB 型电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 半抗原的合成** 使用溴乙酸法<sup>[11]</sup>给 CA 加上游离羧基基团合成半抗原。取 CA 10 mg ( $35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 溶于 1 mL 干燥 DMSO, 并加入 KOH 粉末 0.17 g, 搅拌 5 min 后, 加入溴乙酸 10 mg ( $70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续在室温搅拌反应 4 h, 加入冰水 20 mL, 用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 酸化, 出现白色浑浊,  $4^\circ\text{C}$  过夜后, G5 砂芯漏斗过滤, 沉淀物用冰蒸馏水洗 1 次, 丙酮收集沉淀, 真空干燥得目标产物 CA 半抗原剑叶龙血素 A-4'-羧甲基醚。合成路线见图 1。

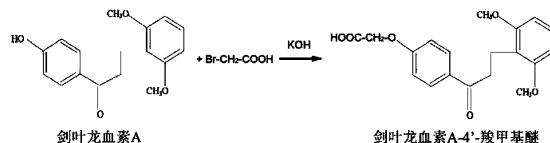


图 1 剑叶龙血素 A-4'-羧甲基醚的合成

**2.2 人工抗原的合成和鉴定** 使用碳化二亚胺法<sup>[12]</sup>合成完全抗原。取 2.8 mg ( $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 半抗原, 1.7 mg ( $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 0.9 mg ( $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 0.15 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 于室温下密闭搅拌 4 h,  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜。次日 4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 取上清——活性酯液待用。称取 BSA 14 mg, 溶于 2 mL  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH 8.0 PBS, 取活性酯液, 冰浴下逐滴滴加到 BSA 溶液中, 室温反应 2 h, 于  $4^\circ\text{C}$  冰箱缓慢搅拌反应过夜。将反应液装入透析袋, 于  $4^\circ\text{C}$  下, pH 7.4,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PBS 中透析 3 d, 紫外扫描透析外液中无半抗原紫外吸收为止。取出透析袋内溶液, 分装,  $-20^\circ\text{C}$  保存, 得 CA-BSA 偶联物, 即 CA 免疫原。CA 包被原采用剑叶龙血素 A 半抗原与鸡卵清蛋白 OVA 偶联, 使用上述方法合成 CA-OVA 偶联物。

使用总蛋白定量测试盒 (BCA 法) 测定 CA 人工抗原的浓度。采用紫外扫描光谱法检测人工抗原。在 190 ~ 300 nm 波长间分别扫描 CA、人工抗原和载体蛋白, 参照文献<sup>[13]</sup>中的方法估算 CA 与载体蛋白的偶联率, 选择偶联物与载体蛋白吸光度差别较大的一个波长, 计算此波长下 CA 的摩尔消光系数  $K = A / (C \times L)$ , 其中  $A$  为 CA 的吸光度,  $C$  为剑叶龙血素 A 的摩尔浓度,  $L$  为比色皿光程, 估算半抗原质量浓度。

$$C_{\text{半抗原}} = M_{\text{半抗原}} \times (A_{\text{偶联物}} - A_{\text{蛋白质}}) / K$$

其中  $M_{\text{半抗原}}$  为半抗原相对分子质量,  $A_{\text{偶联物}}$  和  $A_{\text{蛋白质}}$  为偶联物和相应载体蛋白吸光度, 再按下式计算偶联比  $\tau$ 。

$$\tau = (C_{\text{半抗原}} \times M_{\text{蛋白质}}) / (C_{\text{偶联物}} \times M_{\text{半抗原}} - C_{\text{半抗原}} \times M_{\text{半抗原}})$$

其中  $C_{\text{半抗原}}$  和  $C_{\text{偶联物}}$  分别是半抗原和偶联物质量浓度,  $M_{\text{蛋白质}}$  为相应载体蛋白相对分子质量。

**2.3 动物免疫** 用 CA-BSA 偶联物作为免疫原免疫 3 只 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 首次免疫时取免疫原与等体积弗式完全佐剂混合, 充分乳化后, 经背部皮下多点注射, 每只注射免疫原 25  $\mu\text{g}$ 。之后每隔 2 周加强免疫, 加强免疫采用等量弗氏不完全佐剂乳化免疫原(剂量同首次免疫), 3 次免疫后第 10 天摘小鼠眼球取血, 同时取 1 只未免疫的小鼠血作阴性对照。全血置 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱 1 h, 再置 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜后 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 在无菌条件下分离出血清, 分装后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。

**2.4 抗血清效价的测定** 通过棋盘滴定检测各动物抗血清效价。①包被酶标板: 用包被缓冲液稀释包被原至一定浓度, 包被酶标板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。2 ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 倒去包被液, 洗涤液洗板 3 次, 甩干; ②封闭: 每孔加入封闭液给 120  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 2 h, 洗涤液洗板 3 次, 甩干; 干燥箱中室温干燥 34 h, 2 ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  密封存放备用; ③包被酶标板相应孔内添加 PBST(phosphate buffered saline with Tween-20), 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 各孔再添加 50  $\mu\text{L}$  不同稀释度的抗血清溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 洗板 5 次, 甩干; ④每孔添加 5 000 倍稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 洗板 5 次, 甩干; ⑤每孔依次添加显色液 A, B 各 50  $\mu\text{L}$ , 避光反应 10 min, 再加入 2  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸 100  $\mu\text{L}$  终止反应; ⑥用酶标仪测量 450 nm 和 630 nm 双波长  $A$ , 以  $A_{450 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$  作为反应  $A$ , 以  $A$  在 0.9 ~ 1.2 的最大抗血清稀释度作为抗血清的效价。

**2.5 最佳血清稀释倍数和包被浓度的确定** 使用棋盘滴定法, 包被原按 1, 2, 4, 8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  包被酶标板, 抗血清分别稀释 1 000, 2 000, 4 000, 8 000 倍, 测定 PBST 空白样品和 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  CA 样品的  $A$ 。

$$\text{CA 抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{CA}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

选择空白样品  $A$  在 1.0 ~ 1.4, 且 CA 抑制率最大的包被原浓度和抗血清稀释度组合作为最适条件。以下实验采用此最适条件进行。

**2.6 ELISA 标准曲线的建立** 将 CA 用 PBST 稀

系列质量浓度如下作为对照品: 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按上述间接 ELISA 法反应条件检测, 以 CA 对照品质量浓度为横坐标、以标准化  $A/B_0$  为纵坐标( $B$  为反应  $A$ ,  $B_0$  为 0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品反应  $A$ ), 用 ELISAcac 软件做四参数 Logistic 方程拟合得到标准曲线。

**2.7 最低检测限实验** 重复检测 10 次 0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  CA 对照品, 通过标准曲线拟合计算测得的浓度, 以其均值加上 2 个标准差( $\bar{x} + 2s$ )作为最低检测限。

**2.8 精密度评价** 用本法分 3 批次测定 0.60, 0.30, 0.15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  CA 样品, 每批次各设 10 个复孔, 分别计算批内精密度和批间精密度, 以  $\text{CV} = \text{SD}/\bar{x}$  表示。

**2.9 准确度评价** 用本法分别测定 0.60, 0.30, 0.15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的高、中、低浓度 CA 样品, 各设 10 个复孔, 计算回收率。

**2.10 交叉反应率检测** 使用上述间接 ELISA 方法检测 5 种 CA 结构类似物并绘制标准曲线, 求出  $\text{IC}_{50}$ , 计算类似物的交叉反应率(CR)。

$$\text{CR} = \text{CA 的 } \text{IC}_{50} / \text{类似物的 } \text{IC}_{50} \times 100\%$$

**2.11 样品中 CA 含量测定** 将龙血竭、龙血竭总黄酮分别配制为 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液, 用上述方法检测它们的 CA 含量, 每个样品检测 3 次。

### 3 结果

**3.1 人工抗原的定量和紫外扫描光谱鉴定** BCA 法测定 CA-BSA 偶联物质量浓度为 2.04  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; CA-OVA 偶联物质量浓度为 4.80  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 190 ~ 300 nm 分别扫描 CA、蛋白质和人工抗原的紫外吸收光谱, 人工抗原偶联物的图谱与载体蛋白和 CA 的图谱明显不同, 在波长 275 nm 处人工抗原的吸光度显著高于载体蛋白, 可认为半抗原与 BSA, OVA 已发生偶联, 按 2.2 中方法计算 CA-BSA 的偶联比为 18:1, CA-OVA 的偶联比为 24:1。见图 2, 3。

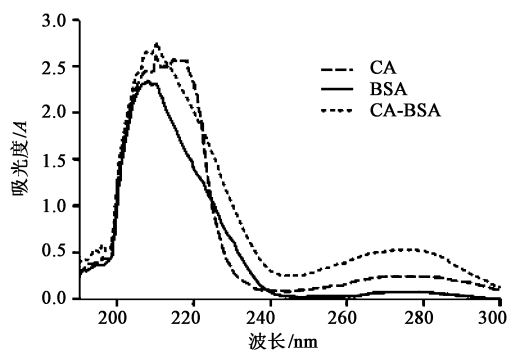


图 2 CA, BSA, CA-BSA 的紫外吸收图谱

**3.2 抗血清效价的测定** CA-BSA 免疫动物所获

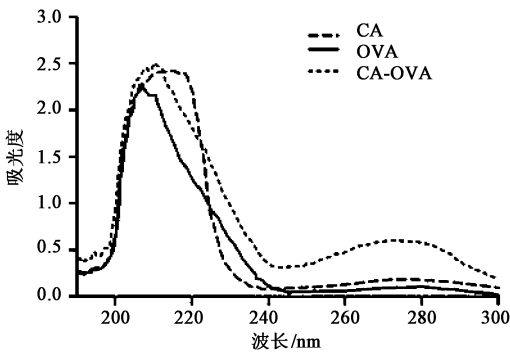


图 3 CA,OVA,CA-OVA 的紫外吸收图谱

得的抗血清经间接 ELISA 测试,当包被抗原质量

表 1 棋盘滴定实验测得吸光度

| 包被原质量浓度<br>/mg·L <sup>-1</sup> | 抗血清稀释倍数                    |       |       |       |                              |       |       |       |
|--------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|------------------------------|-------|-------|-------|
|                                | 添加 0 mg·L <sup>-1</sup> CA |       |       |       | 添加 0.5 mg·L <sup>-1</sup> CA |       |       |       |
|                                | 1 000                      | 2 000 | 4 000 | 8 000 | 1 000                        | 2 000 | 4 000 | 8 000 |
| 1                              | 1.347                      | 0.685 | 0.634 | 0.407 | 0.766                        | 0.387 | 0.362 | 0.235 |
| 2                              | 1.867                      | 1.152 | 0.764 | 0.65  | 1.154                        | 0.642 | 0.435 | 0.366 |
| 4                              | 2.109                      | 1.338 | 0.980 | 0.717 | 1.185                        | 0.761 | 0.585 | 0.425 |
| 8                              | 1.986                      | 1.408 | 1.186 | 0.925 | 1.122                        | 0.789 | 0.674 | 0.536 |

血清稀释度 1:2 000,二抗稀释度 1:5 000,测定 0,0.05,0.10,0.20,0.40,0.80 mg·L<sup>-1</sup> CA 对照品 A,得到的方程为  $Y=0.020+(0.998-0.020)/[1+(X/0.636)^{0.961}]$ ,相关系数( $R^2$ ) $\geq 0.99$ ,CA 的 IC<sub>50</sub> 为 0.66 mg·L<sup>-1</sup>。

3.5 最低检测限 重复检测 10 次 0 mg·L<sup>-1</sup> CA 对照品,通过标准曲线拟合计算测得的质量浓度,以其均值加上 2 倍标准差( $\bar{x}+2s$ )作为最低检测限,为 0.045 mg·L<sup>-1</sup>。

3.6 精密度 用本法分 3 个批次测定 0.60,0.30,0.15 mg·L<sup>-1</sup> 的高、中、低浓度 CA 样品,综合结果可见批内 CV $\leq 12.5\%$ ,批间 CV $\leq 14.7\%$ 。见表 2。

表 2 批内精密度和批间精密度 %

| CA 质量浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 批内 CV | 批间 CV |
|----------------------------|-------|-------|
| 0.60                       | 12.5  | 14.7  |
| 0.30                       | 12.3  | 13.6  |
| 0.15                       | 10.9  | 9.5   |
| 平均值                        | 11.9  | 12.6  |

3.7 准确度 用本法测定高、中、低浓度 CA 样品,测得回收质量浓度均值分别为 0.556,0.335,0.178 mg·L<sup>-1</sup>,回收率分别为 92.7%,111.7%,118.7%。

3.8 交叉反应率 检测 CA 的类似物的 IC<sub>50</sub>,计算得到各类似物的交叉反应率,结果显示与 5 种类似

CA-OVA 的质量浓度为 8 mg·L<sup>-1</sup> 时,3 只小鼠血清效价分别达到 12 000,8 000 和 6 000。因此选择效价 12 000 的抗血清进一步优化。

3.3 最佳血清稀释倍数和包被浓度的确定 经间接竞争 ELISA 法棋盘滴定实验,选择空白样本 A 在 1.0~1.4 之间,且 CA 抑制率最大的包被原浓度和抗血清稀释度组合作为最适条件。最终选择最适工作条件为:包被原质量浓度 2 mg·L<sup>-1</sup>,抗血清稀释倍数 2 000 倍。见表 1。

3.4 ELISA 标准曲线的建立 综合上述条件进行间接竞争 ELISA 检测,以包被原 2 mg·L<sup>-1</sup> 包板,抗

物的交叉反应率均较低。见表 3。

3.9 样品中 CA 含量测定 检测 10 mg·L<sup>-1</sup> 龙血竭和龙血竭总黄酮中 CA 含量分别为 (0.127 $\pm$ 0.013),(0.308 $\pm$ 0.026) mg·L<sup>-1</sup>,CA 在药材龙血竭和龙血竭总黄酮中的含量分别为 1.27%,3.08%。

表 3 CA 类似物的交叉反应率

| 检测物     | IC <sub>50</sub> /mg·L <sup>-1</sup> | 交叉反应率/% |
|---------|--------------------------------------|---------|
| 剑叶龙血素 A | 0.66                                 | 100     |
| 龙血素 B   | 12.27                                | 5.38    |
| 剑叶龙血素 B | 631                                  | 0.10    |
| 血竭素     | 1 225                                | 0.05    |
| 辣椒素     | 257                                  | 0.26    |
| 辣椒平     | >6 600                               | <0.01   |

4 讨论

剑叶龙血素 A(CA)是小分子物质,没有免疫原性,不能直接刺激机体产生特异性抗体,必须与大分子偶联后才具有免疫原性,一般偶联大分子选择牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白等作为载体蛋白<sup>[14]</sup>。但 CA 分子内没有可直接与蛋白质偶联的游离羧基或羟基,考虑其有 1 个酚羟基,采用 williamson 合成法使龙血素 A 与溴乙酸发生醚化,改造为剑叶龙血素 A-4'-羧甲基醚,添加上游离的羧基,然后再与载体蛋白偶联。

利用本方法测定样品中 CA 含量具有较高的灵敏度和准确度,经测定龙血竭总黄酮中 CA 含量是龙血竭中含量的 2.4 倍(3.08%:1.27%),证明龙血竭总黄酮提取物进一步浓缩了 CA。

# 参考文献

[ 1 ] 卢文杰,王雪芬,陈家源,等. 剑叶龙血树氯仿部位化学成分的研究[J]. 药学学报,1998,33(10):755.

[ 2 ] 屠鹏飞,王钰芳,邵杰,等. 龙血竭中黄酮类成分提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):30.

[ 3 ] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses [ J ]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(3):361.

[ 4 ] 徐红英,张晓燕. 中药血竭研究进展[J]. 中医药学报,2011,39(4):101.

[ 5 ] LIU Xiang-ming, CHEN Su, ZHANG Yu-xia, et al. Modulation of dragon's blood on tetrodotoxin-resistant sodium currents in dorsal root ganglion neurons and identification of its material basis for efficacy [ J ]. Science in China Series. C: Life Sciences, 2006, 49(3):274.

[ 6 ] WEI Li-si, SU Chen, HUANG Xian-ju, et al. Material basis for inhibition of dragon's blood on capsaicin-induced TRPV1 receptor currents in rat dorsal root

ganglion neurons [ J ]. Eur J Pharmacol, 2013, 702(2013):275.

[ 7 ] GUO Min, CHEN Su, Liu Xiang-ming. Material basis for inhibition of Dragon's Blood on evoked discharges of wide dynamic range neurons in spinal dorsal horn of rats [ J ]. Science in China Series. C: Life Sciences, 2008, 51(11):1025.

[ 8 ] 马颖清,张天宝,吕敬慈,等. 龙血竭提取物有效成分剑叶龙血素 A 小鼠药动学研究[J]. 现代生物医学进展,2010,10(8):1536.

[ 9 ] 李云,萧伟,秦建平,等. HPLC 测定龙血竭提取物中龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):45.

[ 10 ] 高秀丽,蒋倩,王鹏娇,等. 龙血竭高效液相色谱特征研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(19):2025.

[ 11 ] 刘肆,雷红涛,孙远明,等. 雌二醇间接竞争酶联免疫吸附方法的建立[J]. 食品科学,2012,33(8):146.

[ 12 ] 甘金华,邓薇,李进平,等. 强力霉素人工抗原的合成与抗体制备[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(2):316.

[ 13 ] 汪晓莉. 己烯雌酚人工抗原的制备和间接竞争 ELISA 检测方法的建立[D]. 武汉:湖北大学,2009.

[ 14 ] 宋娟,王榕妹,王悦秋,等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J]. 分析化学,2010,38(8):1211.

[ 责任编辑 李玉洁 ]

## 天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网 址:http://www.tjzhongyiyao.com,地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网 址:http://www.tjzhongyiyao.com,地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。