

基于黄芪甲苷单克隆抗体的 ELISA 检测方法的建立

于生兰¹, 徐加兵², 欧阳臻³ (1.江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 2.泰州市食品药品检验所, 江苏 泰州 225300; 3.江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 建立黄芪甲苷的酶联免疫分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测方法。方法 以制备的黄芪甲苷单克隆抗体为基础, 选择其最佳工作浓度, 建立黄芪甲苷间接竞争 ELISA 法, 并用该方法检测黄芪饮片中的黄芪甲苷含量。结果 该方法线性范围为 39~1 830 ng·mL⁻¹, 组内和组间差异均≤10%, 平均加样回收率为 102.7%(n=6)。采用该方法检测黄芪饮片中黄芪甲苷的含量, 所得结果与 HPLC 法基本一致。结论 建立了黄芪甲苷的 ELISA 检测方法, 可为黄芪饮片及其制品的质量控制提供方法补充。

关键词: 黄芪甲苷; 单克隆抗体; ELISA; 质量控制

中图分类号: R915 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)03-0322-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.013

引用本文: 于生兰, 徐加兵, 欧阳臻. 基于黄芪甲苷单克隆抗体的 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 322-326.

Establishment of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Method Based on Monoclonal Antibody Against Astragaloside IV

YU Shenglan¹, XU Jiabing², OUYANG Zhen³ (1.Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2.Taizhou Food and Drug Inspection Institute, Taizhou 225300, China; 3.School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method for the determination of Astragaloside IV(AST). **METHODS** Based on the preparation of monoclonal antibody against AST, an indirect competitive enzyme immunoassay method which could detect the content of AST in Radix Astragali was established by selecting the optimum working concentration. **RESULTS** The calibration curves were linear within the range of 39–1 830 ng·mL⁻¹. The average recovery(n=6) was 102.7%, and the relative standard deviations(RSD) of measurements in the intra-assay and in the inter-assay were ≤10%. The analysis result of ELISA method was consistent with that of HPLC test in AST determination of Radix Astragali. **CONCLUSION** ELISA method for the determination of AST is well established and can be applied to the quality control for Radix Astragali and its products.

KEYWORDS: Astragaloside IV(AST); monoclonal antibody; ELISA; quality control

黄芪甲苷(Astragaloside IV, AST)是中药黄芪的主要活性成分之一, 为黄芪药材及其制品质量鉴定的指标成分^[1]。据文献报道, 黄芪及其制剂中 AST 的含量多采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定^[2-5], 操作繁琐, 对仪器设备要求较高。而酶联免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种简便、快速、灵敏、精确的检测技术, 具有经济、无污染, 不需大型仪器设备等优点^[6-13]。本研究建立了检测 AST 的 ELISA 方法, 并对黄芪饮片进行了 HPLC 与 ELISA 方法的一致性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 AST 标准品(成都曼思特生物科技有

限公司, 批号: 20140613; 含量: 98%); 黄芪饮片(泰州百草中药有限公司, 批号: 20140120); 人工抗原(AST-OVA、AST-BSA 自制); AST 单克隆抗体(AST-MAb 自制); 羊抗鼠酶标抗体(批号: GAB20130619)、TMB 单组份显色剂(批号: Q20140511)、脱脂奶粉(批号: L20140816)购自美国 Pierce 公司; ELISA 分析及其他相关药品如磷酸盐和 Tween-20 等均为国产分析纯。

1.1.2 仪器 ELX-808IU 酶标仪、uQuant 酶标仪及 Elx50 自动洗板机均来自美国 Bio-Tek 有限公司; 可调微量移液器、30~300 μL 多道移液枪(德国 Eppendorf 有限公司); SPX-270 生化培养箱(杭州艾普仪器设备有限公司); BT25S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 96 孔酶标板(美国康

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXLX12_0669)

作者简介: 于生兰, 女, 博士, 教授 Tel: (0523)86158188 E-mail: slyu70@126.com

宁有限公司, 泰州市康威医疗器械有限公司, 海口市春博生物实验器材厂)。

1.1.3 实验动物 Balb/c 小鼠, ♀, 体质量(16~18)g, 扬州大学实验动物中心提供(SPF 级), 合格证号: SCXK(苏)2012-0004。

1.2 方法

1.2.1 AST-MAb 的制备 笔者所在课题组成功合成了 AST 人工抗原^[14], 并筛选出 AST-MAb 杂交瘤细胞株(编号: 3D11), 通过小鼠腹水法生产制备^[15]。

1.2.2 抗 AST-MAb 最佳工作浓度的确定 抗 AST-MAb 以 PBST 分别稀释为 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3 200, 1:6 400, 1:12 800, 1:25 600, 1:51 200 后加样, 常规间接 ELISA 法测定 450 nm 处吸光度(*A* 值), 选定单抗的最佳工作浓度。

1.2.3 间接竞争 ELISA 方法的建立 ①方阵(棋盘)滴定法确定最佳的包被抗原浓度: 采集的小鼠血先室温放置 15 min(具体时间视温度而定), 然后 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取出上层血清于 0.6 mL 离心管中, 4 ℃冰箱放置(或分装后-20 ℃保存), 备用。包被抗原 AST-OVA 从 10 μg·mL⁻¹ 开始倍比稀释, 免疫血清 400 倍开始倍比稀释, 按间接 ELISA 操作步骤进行实验。

以抗体稀释倍数为横坐标, *A* 值为纵坐标作曲线, 考察不同包被抗原浓度下曲线的平滑度。选取 *A* 值为 1.0 左右对应的抗原浓度作为最佳包被浓度。

②间接 ELISA 法检测血清效价: 采用“1.2.2”项下测到的最佳包被抗原浓度包被酶标板, 每孔 100 μL, 4 ℃冰箱过夜(或 37 ℃下温育 1 h); 恢复至室温, 倾去包被液, 加 PBST 洗液(0.02% pH 7.4, 磷酸盐缓冲液加吐温-20), 每孔 380 μL, 洗涤; 每孔加 300 μL 封阻液, 37 ℃温育 60 min。恢复至室温, 倾去封阻液, 洗涤; 加一定浓度的待测血清 100 μL, 从 400 倍开始倍比稀释, 同时设置空白对照孔(加 PBS 溶液)和阴性孔(未免疫小鼠的血清为阴性血清), 37 ℃温育 1 h, 洗涤; 每孔加入 100 μL 1:10 000 稀释(PBS 液稀释)的 HRP 酶标记的山羊抗鼠 IgG, 37 ℃温育 1 h 后, 洗涤; 每孔加 TMB 显色液 100 μL, 37 ℃保温避光反应 15 min; 每孔加 50 μL 2NH₂SO₄ 终止液终止反应; 酶标仪 450 nm 测定 *A* 值。

结果的判定:

以 *A* 值为 1.0 左右对应的稀释倍数为血清效价, 也为抗体最佳工作浓度, 阳性判定标准: P/N(阳性孔 *A* 值/阴性对照孔 *A* 值)>2.1, 且 *P*>0.2。

③间接竞争 ELISA 法鉴定免疫血清抗体敏感性 配制浓度分别为 0(S0), 5(S1), 10(S2), 50(S3), 100(S4), 500(S5), 1 000(S6)ng·mL⁻¹ 的 AST 标准品溶液作为竞争品, 血清抗体浓度按“1.2.2”项下确定的抗体最佳工作浓度, 按“1.2.3”项下建立的间接竞争 ELISA 法步骤进行实验。

加入不同浓度的 AST 标准品后, *A* 值呈现梯度, *A* 值越低, 抑制率越高, 说明血清抗体对 AST 特异性越高。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{未加竞争品孔}A\text{值} - \text{加竞争品孔}A\text{值}}{\text{未加竞争品孔}A\text{值}} \times 100\%$$

1.2.4 标准曲线的建立 取 AST 对照品适量, 精密称定, 加入合适的量瓶中, 加 10%甲醇溶液至刻度, 精密量取该溶液适量, 加 10%甲醇分别稀释成 0, 100, 250, 500, 1 000, 4 000 ng·mL⁻¹ 作为 AST 标准品溶液, 按“1.2.3”项下建立的间接 ELISA 法进行测定并计算竞争抑制率。

1.2.5 间接竞争 ELISA 方法的精密度试验 取 6 个不同质量浓度的 AST 标准品溶液(0, 100, 250, 500, 1 000, 1 800 ng·mL⁻¹)按“1.2.3”项下建立的间接 ELISA 法进行测定, 每次设 2 个平行孔, 连续 3 d 每个实验重复 3 次。分别计算日内精密度和日间精密度。

1.2.6 间接竞争 ELISA 方法专属性验证 选择与 AST 结构类似的人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及甘草酸, 将不同浓度的 AST 类似物替代 AST 标准溶液测定其标准曲线, 计算 IC₅₀ 抑制浓度, 并按下式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率(\%)} = (\text{引起 50\%抑制的 AST 浓度} / \text{引起 50\%抑制的类似物浓度}) \times 100\%$$

1.2.7 方法耐用性考察 该检测方法在不同实验条件下的影响因素主要为酶标仪型号、96 孔酶标板厂家及洗板方式。本研究针对以上因素采用不同厂家酶标板、不同型号酶标仪及手动、自动 2 种洗板方式对该方法进行了耐用性考察, 具体操作如下: 取 AST 标准品适量, 精密称定, 加 80%甲醇溶液稀释成浓度约为 500 ng·mL⁻¹ 的溶液, 按“1.2.3”项下建立的间接 ELISA 法分别采用不同

酶标仪、不同厂家 96 孔酶标板及不同洗板方式对所配标准品溶液进行测定,并计算各组实验测定结果的相对偏差以考察所建方法的耐用性。

1.2.8 间接竞争 ELISA 方法测定回收率 精密吸取已知含量($100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 AST 溶液 6 份,分别加入等体积 50, 100, 200, 300, 400, $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AST 标准溶液,混匀后 AST 质量浓度分别为 75, 100, 150, 200, 250, $300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按“1.2.3”项下建立的间接 ELISA 法测定其在 450 nm 的 A 值,每个浓度平行测定 6 次,代入标准曲线方程计算。

1.2.9 间接竞争 ELISA 方法测定黄芪饮片中 AST 含量 ①样品处理:粉碎黄芪饮片,称取粉末 1 g ,加入 10 mL 的 80% 甲醇+ 20% $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min ,离心,取上清液,用 $1\times\text{PBS}+10\%$ 的甲醇稀释至 $4\text{ }000$ 倍。②含量测定:分别采用“1.2.3”建立的 ELISA 法和传统 HPLC 法对黄芪饮片中的 AST 含量进行测定。HPLC 条件参照文献^[16],采用 HPLC-ELSD 法检测上述 2 种提取方法所得的 AST 含量,色谱条件如下:WatersSunFire C_{18} 柱($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:乙腈-水($34:66$);流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;漂移管温度为 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$;载气流量为 $2.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;压力为 0.4 MPa ;进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2 结果

2.1 抗 AST-MAb 最佳工作浓度的确定

抗 AST-MAb 稀释度为 $1:400$, $1:800$, $1:1\text{ }600$, $1:3\text{ }200$, $1:6\text{ }400$, $1:12\text{ }800$, $1:25\text{ }600$, $1:51\text{ }200$ 时的间接 ELISA 测定结果分别为 1.738, 1.564, 1.216, 1.019, 0.904, 0.842, 0.731, 0.587。根据上述测定结果,确定抗 AST-MAb 稀释比为 $1:3\text{ }200$ 时为最佳工作浓度。

2.2 间接竞争 ELISA 方法的建立

2.2.1 酶标抗体最佳稀释倍数确定实验 由测定结果可知,当酶标抗体稀释 $6\text{ }000$ 倍数对应的孔 A 值最接近 1.0 ,因此可以得出结论酶标抗体稀释 $6\text{ }000$ 倍时为最适工作浓度。结果见图 1。

2.2.2 棋盘方阵法测定结果 棋盘方阵筛选测定 AST-BSA 免疫小鼠所得抗血清最佳包被抗原工作浓度与抗血清工作浓度结果见图 2。

由结果可知, A 值最接近 1.0 的孔为 E4 和 E5,其对应的抗血清稀释倍数(图 2 纵向)为 $16\text{ }000$ 倍,

抗原包被浓度(图 2 横向)分别为 1.25 和 $0.625\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。分别以抗原包被浓度为 1.25 , $0.625\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时不同抗血清稀释倍数所测得的 A 值做相关曲线,对比不同抗原包被浓度所对应相关曲线的平滑度,结果显示抗原包被浓度为 $1.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对应的相关曲线平滑度较好,故确定最适抗原包被浓度为 $1.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最适抗血清稀释倍数为 $16\text{ }000$ 倍。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.121	3.213	3.043	2.747	1.841	1.043	0.904	0.637	0.044	0.046	0.042	0.043
B	3.413	3.198	3.144	2.942	1.737	1.041	0.841	0.636	0.044	0.043	0.043	0.042
C	3.218	3.276	3.083	2.783	1.643	1.039	0.844	0.644	0.043	0.044	0.043	0.044
D	3.541	3.044	2.943	2.764	1.943	1.041	0.841	0.673	0.043	0.044	0.044	0.043
E	3.19	3.144	3.644	2.454	1.544	1.043	0.845	0.663	0.044	0.043	0.043	0.043
F	3.241	3.345	3.564	2.9	1.743	1.042	0.842	0.653	0.042	0.044	0.043	0.042
G	3.416	3.047	3.242	2.84	1.645	1.144	0.844	0.645	0.045	0.044	0.044	0.043
H	3.146	3.444	3.047	2.642	1.542	1.14	0.842	0.645	0.043	0.043	0.045	0.042

250 500 1000 2000 4000 6000 8000 10000 阴性对照 空白对照孔
酶标抗体稀释倍数

图 1 酶标抗体最佳工作浓度筛选结果

Fig. 1 Results of screening the optimum working concentration of the antibodies labeled by enzyme

		1	2	3	4	5	6	7	8	
血清稀释倍数	200	A	2.21	2.068	2.282	2.964	2.903	2.968	0.043	0.043
	400	B	1.87	1.713	1.888	1.958	1.88	1.786	0.042	0.042
	800	C	1.978	1.788	1.736	1.744	1.718	1.74	0.044	0.044
	1600	D	1.331	1.307	1.251	1.347	1.216	1.188	0.043	0.043
	3200	E	1.051	1.033	1.033	1.002	0.997	0.93	0.043	0.043
	6400	F	1.016	1.101	1.101	0.91	1.076	0.829	0.042	0.042
	12800	G	1.121	1.105	0.742	0.692	0.669	0.689	0.043	0.043
	25600	H	0.352	0.386	0.381	0.371	0.333	0.301	0.042	0.042
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	阴性对照	空白对照	
抗原包被浓度/μg·mL ⁻¹										

图 2 棋盘方阵法确定包被抗原及抗血清最佳工作浓度结果

Fig. 2 Determine the optimal working concentration of antigen and antiserum by checkerboard array method

2.2.3 标准曲线的建立 以 AST 标准品质量浓度的对数 $\lg C$ 为横坐标(X),其对应计算所得的竞争抑制率 IC 为纵坐标(Y),绘制标准曲线,求得回归方程为 $Y=0.419\text{ }2X-0.567\text{ }7(r^2=0.992\text{ }3)$ 。

2.2.4 间接竞争 ELISA 方法的精密度测定 对 3 次平行测定结果进行数据分析可知,平行孔之间检测值的 RSD 为 $0.49\%\sim 1.4\%$,各酶标板之间检测值的 RSD 为 $0.74\%\sim 3.2\%$ 。日内精密度和日间精密度测定结果见表 1。

2.2.5 间接竞争 ELISA 方法专属性验证 间接竞争 ELISA 法测定 AST 与其结构类似物交叉反应结果显示,AST 结构类似物的交叉反应率均 $<1\%$,说明该方法专属性较好,结果见表 2。

表 1 间接竞争 ELISA 方法的精密度测定结果

Tab. 1 The accuracy results of idc ELISA method

AST 浓度/ng·mL ⁻¹	精密度/%	
	日内	日间
0	0.52	0.74
100	0.44	1.3
250	0.58	1.1
500	0.49	2.3
1 000	1.40	3.2
1 800	0.68	1.9

表 2 AST 与其结构类似物的交叉反应率

Tab. 2 The cross-reaction rate of AST and its structural analogues IC₅₀

化合物	半数抑制浓度 IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	交叉反应率/%
AST	2.55	100.0
人参皂苷 Re	318	0.8
人参皂苷 Rb ₁	426	0.6
柴胡皂苷 a	584	0.4
柴胡皂苷 d	549	0.5
甘草酸	283	0.9

2.2.6 方法耐用性考察结果 采用不同酶标仪、不同厂家的 96 孔酶标板及不同洗板方式测定 AST 标准溶液结果 RSD 分别为 1.7%, 3.9%, 0.9%。由实验结果可知, 采用不同酶标仪和采用不同洗板方式进行测定对实验结果几乎没有影响 (RSD<2%), 采用不同厂家生产的 96 孔酶标板进行实验时对实验结果略有影响, 但影响较小 (RSD<5%), 说明该方法具有较好的耐用性。

2.2.7 间接竞争 ELISA 方法的回收率测定 6 个样品的回收率在 95%~110%之间, 说明该 ELISA 方法的准确度较高, 符合验证要求。结果见表 3。

表 3 间接竞争 ELISA 方法回收率

Tab. 3 The recovery rate of idc-ELISA

AST 浓度/ng·mL ⁻¹	平均回收率/%	RSD/%
50	99.5	5.10
100	98.5	6.28
200	104.3	3.62
300	103.8	4.71
400	107.5	5.78
500	102.6	3.66

2.2.8 含量测定 黄芪饮片提取液稀释 4 000 倍后, 按照所建立的间接 ELISA 法, 代入标准曲线方程, 计算可知 AST 含量为 338.2 ng·mL⁻¹, 则未稀释原样品中 AST 含量为 1.352 8 mg·mL⁻¹。黄芪饮片提取液稀释 4 000 倍后, 按照 HPLC-ELSD 方

法测定(进样量 10 μL), 测定其峰面积为 153 987, 代入建立的质量浓度自然对数-峰面积自然对数标准曲线方程 $Y=1.115X+10.579$, 计算得 AST 含量为 330.0 ng·mL⁻¹, 则未稀释原样品中 AST 含量为 1.320 0 mg·mL⁻¹, 2 种方法之间的相对误差为 2.42%, 表明 2 种分析方法所得结果一致。

3 讨论

中国药典(2015 版一部)规定, 黄芪中 AST 含量不得<0.040%(按干燥品计算)。因黄芪中 AST 含量较低, 建立快速、灵敏的黄芪饮片及其制品中 AST 含量检测方法十分必要。

通过制备针对中药成分的特异性单克隆抗体, 可以建立起简单、快速的中药免疫分析法, 由于免疫分析法利用了抗原与抗体的特异性结合, 通常制备出的单克隆抗体对于抗原具有高灵敏度, 从而保证了该法对中药成分含量检测的准确度和敏感度。

除了抗体质量因素外, ELISA 方法的建立还受很多因素的影响, 如酶标板的吸附性能、抗体在工作浓度等因素都能影响其检测线性、灵敏度等方法学指标^[17]。本研究中对 AST-Mab 最佳工作浓度进行了试验, 确定了最佳稀释度为 1:3 200。同时建立了间接竞争 ELISA 分析方法, 并进行了相关的方法学考察。结果表明, 该方法的线性范围 39~1 830 ng·mL⁻¹, 平均回收率为 102.7%, 且与 HPLC-ELSD 方法结果具有一致性。

ELISA 法还可用于含黄芪制品体内代谢研究。相比于其他方法, ELISA 方法可解决对动物取血量较大, 动物有耐受极限而导致代谢研究的检测时间受限等问题, 同时检测过程简单、灵敏度高、快速, 检测限可达纳克级^[18], 从而可以检测到 HPLC-ELSD 等方法无法检测出的成分含量。

4 结论

本研究建立了灵敏、简便、快速、有效的 AST 间接竞争 ELISA 法。该方法的建立, 为研制 AST 免疫分析试剂盒奠定了基础, 所研制的 AST 免疫分析试剂盒不仅可用于黄芪饮片的质量控制, 也可用于含黄芪制品的质量控制, 具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] DUAN L J, SUN B H. Research reviews on astragaloside IV [J]. J Shengyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2011,

- 28(5): 410-416.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 附录 283-284.
 - [3] WANG Y X, ZENG D F, ZHU L, et al. Determination of astragaloside IV and total saponins in Huangqi granules [J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2011, 26(4): 375-377.
 - [4] DU Z H. Determination of astragaloside IV in Shengqijiangtang granules by HPLC-ELSD [J]. Qilu Pharm Affa(齐鲁药事), 2010, 29(2): 86-87.
 - [5] WANG J F, ZHANG Q, MU X. Determination of astragaloside IV in Yupingfeng oral solution by HPLC-ELSD method [J]. Agric Basic Sci Technol, 2015, 16(2): 197-199.
 - [6] TENG H Y, YU Y Y. Application of immunoassay in chemical composition of traditional Chinese medicine [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2012, 21(21): 2511-2515.
 - [7] QU H H, QU B P, WANG, X Q, et al. Rapid, sensitive separation of the three main isoflavones in soybean using immunoaffinity chromatography [J]. J Sep Sci, 2016, 39(6): 1195-1201.
 - [8] XU F M. Preparation and application of monoclonal antibody against Baicalin [D]. Xiamen: University of Xiamen, 2009.
 - [9] SU X. Preparation of monoclonal antibody against astragaloside IV and establishment of enzyme-linked immunosorbent assay [D]. Beijing: University of Beijing Chinese Medicine, 2013.
 - [10] LIU Y. Synthesis of artificial antigens for Saikosapogenin-a and preparation of monoclonal antibody against it [D]. Beijing: University of Beijing Chinese Medicine, 2013.
 - [11] SHAO Y Y. Preparation and immunoassay of monoclonal antibody against Bioactive paeoniflorin of Chinese materia medica [D]. Xiamen: University of Xiamen, 2008.
 - [12] 余伯阳, 刘吉华. 中药有效成分皂苷类化合物快速微量免疫分析方法研究[C]. 药用植物化学与中药有效成分分析讨论论文集(上), 2008: 10.
 - [13] YU S L, OUYANG Z, XU J B, et al. Synthesis and evaluation of artificial antigens for astragaloside IV [J]. Rev Bras Farmacogn, 2014, 25(24): 282-287.
 - [14] YU S L, OUYANG Z, XU J B, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against astragaloside IV [J]. Nat Pro Res Develop(天然产物研究与开发), 2013, 25(11): 1568-1571.
 - [15] ZHANG J H, ZHOU J, WU Z L, et al. Determination of astragaloside IV in radix astragali and Jinqi jiangtang tablet by HPLC-ELSD [J]. J Tianjin Med Univ(天津医科大学学报), 2010, 11(1): 26-29.
 - [16] POWERS J L, RIPPE K D, IMARHIA K, et al. A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a quantitative [J]. J Chem Edu, 2012, 89(12): 1587-1590.
 - [17] SAI J Y. Preparation of monoclonal antibody against GRE and establishment of enzyme-linked immunosorbent assay [D]. Beijing: University of Beijing Chinese Medicine, 2014.
 - [18] WANG J, LIU J H, GUO X, et al. A sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sarsapogenin in rat plasma [J]. Acta Pharmacol Sinica, 2010, 31(2): 984-989.

收稿日期: 2018-04-16

(本文责编: 李艳芳)