

酶联免疫吸附测定法用于中药质量控制的研究进展

许源升^{1,2}, 刘姣², 张恬², 赵玉洋², 田慧¹, 南铁贵^{2*}, 袁媛^{2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 在中药质量控制过程中,有效成分和有毒有害成分的检测是2个重要环节,传统检测方法如高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法等虽然能准确对上述物质进行定量,但往往存在操作复杂、成本过高、不能随时检测、难溶及大分子物质检测困难等缺点。酶联免疫吸附测定法(ELISA)是将抗原或抗体吸附在固相载体表面,利用抗原抗体的特异性反应实现目标检测物的定性或定量分析。该方法具有操作简单、快速、敏感性高、特异性强、实验设备要求简单、应用范围广、成本低等众多优点。近年来,ELISA技术在中药质量控制领域运用越来越广泛,特别是在以黄曲霉毒素为代表的真菌毒素含量的检测和中药有效成分定性定量检测方面,ELISA以其独特的优势发挥着越来越重要的作用,为大批量中药的快速质量检测提供了新方法、新思路。该文对近年来ELISA用于中药质量控制的研究进展进行系统梳理,并对其技术发展和应用前景进行展望,以期为进一步应用该方法保障中药质量安全可控提供借鉴和研究思路。

[关键词] 中药质量控制; 酶联免疫吸附测定法; 有毒有害成分; 农药残留; 有效成分

[中图分类号] R284; R285; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2024)04-0012-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231019

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230823.1334.002>

[网络出版日期] 2023-08-24 13:32:42

Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Quality Control of Chinese Medicines: A Review

XU Yuansheng^{1,2}, LIU Jiao², ZHANG Tian², ZHAO Yuyang², TIAN Hui¹, NAN Tiegui^{2*}, YUAN Yuan^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] In the quality control of Chinese medicine, the detection of active components and toxic and harmful components are two important links. Although conventional methods such as high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry can accurately quantify the above substances, they have shortcomings such as complicated operation, high costs, inability of detection at any time, difficult detection of insoluble and macromolecular substances. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can adsorb antigens or antibodies on the surface of solid carriers and realize qualitative or quantitative analysis of targets by using the specific reactions of antigens and antibodies. This method is praised for the simple operation, high sensitivity, strong specificity, simple requirements for experimental equipment, a wide application range, and low costs. In recent years, ELISA has been widely used in the quality control of Chinese medicine,

[收稿日期] 2023-04-26

[基金项目] 国家科技部科技基础资源调查专项(2018FY100800);中国中医科学院科技创新工程项目(C12021B014,C12021A041);国家自然科学基金重大项目(81891013,81891010);青年岐黄学者支持项目

[第一作者] 许源升,在读硕士,从事中药资源与鉴定学研究,E-mail:xuyuansheng2022@163.com

[通信作者] *袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com;

*南铁贵,副研究员,从事中药质量分析研究,Tel:010-64087649,E-mail:nantiegui@163.com

especially in the content determination of mycotoxins represented by aflatoxin and the qualitative and quantitative analysis of active components. ELISA plays an increasingly important role with its unique advantages, providing new methods and ideas for the rapid quality examination of large quantities of Chinese medicines. This paper reviews the research progress in ELISA for the quality control of Chinese medicine in recent years and prospects its technical development and application prospects, aiming to provide reference and research ideas for further using this method to ensure the quality, safety, and controllability of Chinese medicine.

[Keywords] quality control of Chinese medicine; enzyme-linked immunosorbent assay; toxic and harmful components; pesticide residue; active component

中药是我国5 000年文明史孕育出的一个瑰宝,但是近代以后特别是改革开放以来,由于野生中药资源日渐濒危,人工种植、采收、加工标准不完善,不法商人以假乱真、以次充好等原因,导致中药材、中药饮片、中成药的质量不断下降。目前,中药质量存在的问题主要体现在掺假、农残重金属超标、发霉变质、有毒中药滥用等方面。2022年3月3日,国务院办公厅印发的《“十四五”中医药发展规划》中明确要求,加强中医药安全监管,提升药品检验机构的中药质量评价能力,建立健全中药质量全链条安全监管机制。传统色谱检测方法如高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法等虽然能够获得较高的准确性,但需要繁琐的样品前处理、大量的试剂消耗,以及大型检测仪器操作复杂、耗时长、仪器设备较为昂贵、维护成本较高,不能做到大批量样品的随时快速检测,也无法应用于中药全链条质量控制。因此亟需一种快捷、高效、灵敏度高的检测

方法对现有检测方法进行补充。

酶联免疫吸附测定法(ELISA)是一种基于免疫反应的生物学检测技术,其主要原理是利用抗原与特异性抗体结合,对某种生物分子进行定性和定量分析,基本包含3个步骤:①将抗原或抗体包被到固相载体的表面,使之成为固相抗原或抗体;②将受检样品与酶标抗原或抗体按照一定顺序加到固相抗原或抗体上,使二者与固相载体上的抗原或抗体发生反应,形成抗原抗体复合物;③最后加入底物与酶反应产生有色产物,根据颜色的有无和深浅进行定性和定量分析。与传统色谱检测方法相比,ELISA具有检测快、成本低、操作简单、准确度高等优点,近些年被越来越多地应用于中药质量控制,见表1。本文对近年来ELISA在中药质量控制方面的研究进展进行梳理,总结前人研究成果,以期为后续ELISA进一步运用于中药质量控制与中药安全使用提供借鉴和研究思路。

表1 ELISA与传统色谱检测方法对比

Table 1 Comparison between ELISA and traditional chromatographic detection methods

检测方法	应用范围	检测成本	检测耗时
ELISA	大批量样品初步检测	低	耗时短
薄层色谱法	小批量样品初步检测	低	耗时长
高效液相色谱法	《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)中规定的方法	高	耗时较长
液质联用法	适用于同时测定少量样品中多种化学物质的含量	高	耗时短

1 ELISA在中药有毒有害成分含量测定中的应用

1.1 ELISA检测中药黄曲霉毒素(AF)的含量 AF是由黄曲霉、寄生曲霉产生的次生代谢产物,广泛存在于花生、玉米、大豆等油脂含量丰富的产品中,是真菌毒素中毒性最大、对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素,被世界卫生组织确认为I类致癌物。AF约有17种衍生物,其中黄曲霉毒素B₁(AFB₁)毒性最强^[1],因此AFB₁的检测方法建立也是近些年研究人员的研究热点。ELISA以其检测迅速、灵敏度高、操作简单等优点被广泛用于中药中

AFB₁和黄曲霉毒素总量(AFT)残留量的检测,并且2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)通则2351《真菌毒素测定法》中已经收录了AFB₁和AFT的ELISA测定方法^[2]。

根据标记的对象不同,ELISA可分为间接竞争ELISA(ic-ELISA)和直接竞争ELISA(dc-ELISA)2种形式^[3],目前这2种方法在中药AF检测中已有较多应用,见表2。

ELISA不仅能够对少量药材的AF含量进行一次性准确、快速检测,还可以一次性检测大批量样

表2 ELISA检测中药中AF的情况统计

Table 2 Statistics on detection of aflatoxin in Chinese medicine by ELISA

中药名	AF种类	ELISA类型	灵敏度 IC ₅₀ /μg·L ⁻¹	AF含量/μg·kg ⁻¹	文献
牛膝	AFB ₁	ic-ELISA	-	<5	[4]
砂仁	AFB ₁	ic-ELISA	-	<5	[5]
莲子	AFB ₁	ic-ELISA	1.29	1.19~115.3	[6]
酸枣仁	AFB ₁	ic-ELISA	0.15	3.62~206.58	[7]
铁皮石斛	AFB ₁	ic-ELISA	-	0.88~2.16	[8]
山楂	AFB ₁	ic-ELISA	-	0.12	[9]
车前子	AFB ₁	ic-ELISA	-	0.39	[9]
王不留行	AFB ₁	ic-ELISA	-	0.84	[9]
薏苡仁	AFB ₁	ic-ELISA	-	8.95	[9]
麦芽	AFB ₁	ic-ELISA	-	0.42	[9]
山茱萸	AFB ₁	ic-ELISA	-	4.78	[9]
土鳖虫	AFB ₁	ic-ELISA	0.135	0.74~169.0	[10]
蟑螂	AFB ₁	ic-ELISA	0.122	-	[10]
家蚕	AFB ₁	ic-ELISA	0.092	-	[10]
蚯蚓	AFB ₁	ic-ELISA	0.097	0.98~3.76	[10]
金银花、胖大海、远志	AFB ₁	dc-ELISA	-	-	[11]
麦芽、酸枣仁等19种药材	AFB ₁ 、AFT	dc-ELISA	-	-	[12]

注: - 表示未标明或未检出

本。SHIM等^[13]运用ELISA方法检测了70种,每种10个批次中药的AFB₁的含量,这700份样品中有58份检出AFB₁阳性,其中有6份样品AFB₁质量分数超过韩国和欧盟标准规定,这与高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)方法的检测结果基本一致。TOSUN等^[14]随机选取了37种市售中草药,利用ELISA分析这些中草药中AFB₁分布情况,结果显示有32种中草药样品中检出AFB₁,其中玫瑰样品中AFB₁含量可达52.5 μg·kg⁻¹,有21种中草药中AFB₁含量高于欧盟标准。梁月秋等^[15]采用ic-ELISA对37种中药材和22批中成药中AFB₁进行检测,中药材与中成药分别有34批和19批检出AFB₁阳性。李延生等^[16]采用ELISA试剂盒检测了神曲、青皮、金钱草等20种中药材和银翘解毒丸、清眩治瘫丸2种中成药,结果检测到有18种中药材AFB₁阳性,残留量为2.3~200 μg·kg⁻¹,同时2种中成药AFB₁也呈现阳性。

利用ELISA方法可以加强中药在流通环节的质量控制,可以高效检测中药材及饮片中的真菌毒素污染情况,保障消费者安全用药。上述研究主要目的是建立具体某种药材中AF含量的测定方法,而基于AF本身特性进行抗体制备和ELISA检测方法优化也是目前研究的一个重要方向。

VIRENDRA等^[17]基于高通量单克隆抗体筛选技术,制备了能特异性识别中药中AFB₁的单克隆抗体,并且通过优化ELISA实验中的包被抗体浓度、酶标抗原浓度和反应体系等因素指标,建立了检测中药材、中药饮片和中成药中AFB₁的ELISA方法。经过验证,该方法对实际样品的回收率为60%~120%,相对标准偏差(RSD)<15%。王彤颖等^[11]通过使用自制的AFB₁人工抗原免疫小鼠,获取到AFB₁单克隆抗体,对检测体系的包被浓度、温度、离子强度、酸碱度、封闭液等多项影响因素进行考察并建立了dc-ELISA法,利用建立的方法对中药材中AFB₁残留量进行检测,检测结果与高效液相色谱检测结果基本一致。南铁贵等^[12]利用高通量单克隆抗体筛选技术,筛选出两类可以分别专属性识别AFB₁和AFT(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)的单克隆抗体,并且基于这两种抗体分别建立了可用于中药材、中药饮片及中药制剂中AFB₁含量和AFT测定的dc-ELISA方法;经验证,该方法在实际样品测定中回收率为60%~120%,RSD<15%,阳性符合率100%,与LC-MS检测方法的测定结果一致。刘蕊等^[18]通过建立ic-ELISA法快速检测中药材AFT,并对该方法的封闭液、包被液、包被方式、竞争反应时间、显色时间、离子强度等指标进行探索优化;使用所建立

的ELISA方法检测6种共60批中药材AFT,并与HPLC法测定结果进行比较验证,结果显示平均回收率为94.5%~109.0%,RSD在5.11%~14.56%,且ELISA检测结果与HPLC法一致。

ic-ELISA和dc-ELISA是目前主要使用的2种方法,为了比较他们的效率,WANG等^[19]利用2种ELISA检测方法对中药材黄芪、生姜、大枣和莲子中AFB₁含量进行检测。结果表明,ic-ELISA和dc-ELISA的灵敏度(IC₅₀)分别为0.046、0.023 μg·L⁻¹,检出限(LOD)分别为0.007、0.004 μg·L⁻¹,检测时间分别为3 h、50 min;且2种方法检测结果经过LC-MS/MS确证,都可以用于中药中AFB₁残留量的快速准确检测。基于此项研究,可以根据实际检验需要灵活选择检测方法。

1.2 ELISA检测中药其他有毒有害成分的含量

1.2.1 其他真菌毒素的含量检测

除了AF外,2020年版《中国药典》通则2351《真菌毒素测定法》中还规定了赭曲霉毒素A测定法、玉米赤霉烯酮测定法、呕吐毒素测定法、展青霉素测定法等^[2],但是一般都是基于高效液相法或液质联用方法进行测定,尚未收载采用ELISA检测上述真菌毒素的方法,因此进一步拓展ELISA在其他真菌毒素测定中的应用很有必要。

GAO等^[20]为了解决传统抗玉米赤霉烯酮抗体特异性不高的缺点,基于玉米赤霉烯酮阳离子蛋白偶联物生产了新一代玉米赤霉烯酮多克隆血清和玉米赤霉烯酮单克隆抗体,2种新抗体可将与其他5种玉米赤霉烯酮类似物的交叉反应率分别降低到7%以下和2%以下,并且基于玉米赤霉烯酮单克隆抗体建立了ic-ELISA方法。YI等^[21]应用一种新的等离子dc-ELISA检测赭曲霉毒素A,这种方法在定量赭曲霉毒素A时有良好的灵敏度和准确性,线性范围为12.5~150 ng·L⁻¹,相关系数R²=0.992,检测限为17.8 ng·L⁻¹。刘云翔等^[22]利用单克隆抗体制备技术,制备得到玉米赤霉烯酮单克隆抗体4F6,该抗体可高度特异性识别玉米赤霉烯酮,与AF等其他真菌毒素无交叉反应,检测灵敏度IC₅₀为1.3 μg·L⁻¹,检测范围为0.22~21.92 μg·L⁻¹,与高效液相色谱法检测结果显著相关(R²=0.993 9)。刘云翔等^[23]还利用单克隆抗体制备技术制备了呕吐毒素的单克隆抗体,并且建立了薏苡仁中呕吐毒素的酶联免疫检测方法,检测灵敏度IC₅₀为3.88 μg·L⁻¹,检测结果与LC-MS结果高度相关(R²=0.997 8),可用于薏苡仁中呕吐毒素残留量的快速定量检测。

1.2.2 中药有毒成分的含量检测

中药中有些有效成分也是毒性成分,如果使用不当会对人体产生严重的健康影响,因此建立这些成分的含量测定方法,对于有毒中药的用药安全非常关键。目前ELISA技术在中药有毒成分含量的测定中也有运用。南铁贵等^[24]建立了测定中药材及中成药中肾毒性成分马兜铃酸A含量的ic-ELISA法,灵敏度IC₅₀为1.9 μg·L⁻¹,检测范围为0.5~7.5 μg·L⁻¹;运用此法测定了6个中药材和5个中成药中马兜铃酸A的含量,测定结果与HPLC结果一致。黄磊等^[25]以乌头碱多克隆抗体建立ELISA测定川乌、附子中的毒性成分双酯型生物碱含量,与HPLC法相比,ELISA法在保证结果的同时,其灵敏度提高了约200倍,更适用于川乌、附子药材及其饮片中微量甚至痕量双酯型生物碱的检测。袁帅等^[26]以苯甲酰新乌头原碱抗体建立了ELISA,对乌头属药材中的单酯型乌头碱类生物碱含量进行测定;经考察,该方法具有良好的特异性和灵敏度,其中灵敏度较HPLC法提高约112倍。谢雨薇等^[27]采用杂交瘤细胞技术对半夏中主要有毒成分半夏凝集蛋白制备了单克隆抗体,基于该抗体建立了双抗夹心ELISA,并检测半夏及其炮制品的半夏凝集蛋白含量,测定发现炮制后的半夏中凝集蛋白的含量明显降低,该方法的建立为半夏炮制过程中半夏凝集蛋白含量的检测提供了一种简便有效的方法。

1.2.3 中药材农药残留检测

随着中药使用量的不断增大,人工栽培品逐步替代野生品成为中药材主要来源,随之而来的农药残留问题也成为影响中药质量的重要因素,严重影响着中药的临床使用疗效和安全。目前农药残留的检测方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、液质联用法等,ELISA在农残检测上也有广泛应用。高宏斌等^[28]总结了包括ELISA在内的免疫分析技术在拟除虫菊酯类农残检测中的应用,也有学者整理了国内外相关文献,对运用ELISA方法检测食品中杀虫剂、杀菌剂、除草剂和生物调节剂等农药残留的进展进行了综述,为将ELISA用于中药材农残检测提供了参考^[29-30]。

2 ELISA在中药有效成分含量测定中的应用

中药有效成分的含量测定主要依靠传统的薄层色谱法、高效液相色谱法等分析技术。这些方法需依赖大型仪器设备,操作繁琐,检测时间长。而采用ELISA测定中药有效成分含量,可大幅提高检测效率和降低检测成本,具有广泛的应用前景。目

前利用ELISA检测中药有效成分含量研究取得了一系列成果,见表3。

表3 利用ELISA检测中药有效成分种类统计

Table 3 Detection of effective components in Chinese medicine by ELISA

中药名	有效成分	化合物类型	ELISA类型	线性范围/mg·L ⁻¹	文献
黄芩	黄芩苷	黄酮类	ic-ELISA	0.000 2~0.002	[31]
-	葛根素	黄酮类	ic-ELISA	0.01~1.28	[32]
-	栀子苷	萜类	ic-ELISA	1.25~40	[32]
-	黄芩苷	黄酮类	ic-ELISA	0.002~1.029	[32]
-	柚皮苷	黄酮类	ic-ELISA	0.001 7~0.45	[32]
龙血竭	剑叶龙血素A	黄酮类	ic-ELISA	0.05~0.80	[33]
淫羊藿	淫羊藿苷	黄酮类	ic-ELISA	0.007 8~1	[34]
淫羊藿	淫羊藿次苷II	黄酮类	ic-ELISA	0.004 6~0.05	[35]
金银花	木犀草苷	黄酮类	ic-ELISA	0.009~0.26	[36]
-	柚皮素	黄酮类	ic-ELISA	0.001~0.015	[37]
葛根	葛根素	黄酮类	ic-ELISA	0.015~0.5	[38]
葛根	葛根素	黄酮类	ic-ELISA	0.008~0.29	[40]
柴胡	柴胡皂苷a	皂苷类	ic-ELISA	0.16~2.5	[41]
甘草	甘草酸	皂苷类	ic-ELISA	0.003~0.12	[43]
三七及其制品	三七皂苷R ₁	皂苷类	ic-ELISA	0.56~9	[44]
麦冬	鲁斯可皂苷元	皂苷类	ic-ELISA	0.01~5	[45]
黄芪及其制品	黄芪甲苷	皂苷类	ic-ELISA	0.039~1.83	[46]
-	红景天苷	皂苷类	ic-ELISA	0.004~0.59	[47]
蛇足石杉	石杉碱甲	生物碱类	ic-ELISA	0.005~1	[48]
白芍	芍药苷	萜类	ic-ELISA	0.003 9~0.25	[49]
秦艽	龙胆苦苷	萜类	ic-ELISA	-	[50]
天花粉	天花粉蛋白	蛋白质	ic-ELISA	0.01~1	[51]
冬虫夏草	IP4蛋白	蛋白质	i-ELISA	-	[52]
人参	人参皂苷Rb ₁	皂苷类	ic-ELISA	0.02~0.4	[53]
	人参皂苷Rf	皂苷类	ic-ELISA	-	[54]
柴胡	柴胡皂苷a	皂苷类	ic-ELISA	0.026~1.5	[55]
银杏	银杏酸	有机酸类	ic-ELISA	0.3~1	[56]
黄连	黄连碱	生物碱类	ic-ELISA	0.56~2.5	[57]
甘草	甘草酸	皂苷类	ic-ELISA	0.2~5.1	[58]
	甘草酸	皂苷类	ic-ELISA	-	[59]
斑蝥	斑蝥素	萜类	ic-ELISA	0.002 4~2.4	[60]
黄芩	黄芩苷	黄酮类	ic-ELISA	0.2~2	[61]
白花丹	白花丹素	醌类	ic-ELISA	0.2~0.25	[62]
青蒿	青蒿素	萜类	ic-ELISA	0.2~5.8	[63]

注:-表示未针对具体药材或无线性范围数据

中药有效成分主要分为两类:一类是小分子物质,如黄酮类、皂苷类、生物碱类、萜类等;另一类是大分子物质,如蛋白质、核酸、多糖等。大分子物质具有免疫活性,属于完全抗原,可以直接免疫机体产生抗体;而小分子物质没有免疫活性,需要将小分子物质与蛋白质载体相结合制备成完全抗原才

可使机体产生免疫反应。中药中小分子物质占到90%以上,因此抗体制备是建立ELISA检测方法的关键一步。

2.1 ELISA检测中药小分子物质

2.1.1 黄酮类有效成分的含量检测 PAUDEL等^[31]制备了抗黄芩苷单克隆抗体,并且将ic-ELISA

法与快速一步免疫色谱法联用,以用于黄芩中黄芩苷的快速检测,该方法具有较高的灵敏度,可有效检测黄芩及其复方的黄芩苷含量。孙慧^[32]分别用 ic-ELISA 和 HPLC 检测了含有葛根素、栀子苷(环烯醚萜类化合物)、黄芩苷、柚皮苷 4 种物质的中成药,并通过对比 2 种方法的结果以验证 ic-ELISA 法在含量检测中的可靠性、准确性,同时也说明了 ELISA 不仅可以用于中药材有效成分的测定,也可以对中药复方制剂中有效成分进行定性定量分析。沈洲等^[33]制备了剑叶龙血素 A 多克隆抗体,并建立了 ic-ELISA 法测定剑叶龙血素 A 的含量;该方法 IC_{50} $0.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、最低检测限 $0.045 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,表明所建立的检测方法具有良好的准确性和灵敏度,对 5 种剑叶龙血素 A 类似物的交叉反应率 $<5.38\%$,说明该方法在检测剑叶龙血素 A 方面具有较高的特异性。成金俊^[34]制备了中药活性成分淫羊藿苷的单克隆抗体,利用单克隆抗体建立 ELISA 分析方法,并进行方法学考察;制备的抗体对淫羊藿其他有效成分的交叉反应率均 $<0.09\%$,说明淫羊藿苷单克隆抗体有很好的特异性;对于含淫羊藿的中药方剂进行检测,ELISA 与 HPLC 的检测结果具有较高的相关性,表明 ELISA 方法准确可靠。许永德等^[35]利用淫羊藿次苷 II 单克隆抗体建立了检测淫羊藿次苷 II 的 ic-ELISA 分析方法,并借助超高效液相色谱串联质谱法检验其可靠性;此方法的 IC_{50} 为 $15.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测结果与 UPLC-MS/MS 结果具有良好的相关性 ($R^2=0.998$)。ZHANG 等^[36]建立了 ic-ELISA 分析方法检测金银花指标成分木犀草苷的含量,检测灵敏度高 (IC_{50} 为 $42.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),可以对金银花药材进行质量控制。ZHAO 等^[37]针对中药中柚皮素的检测,提出了一种基于柚皮素单克隆抗体的灵敏、实用的 ic-ELISA 方法,该方法的 IC_{50} 为 $4.43 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 且检测结果与超高效液相色谱方法的测定结果具有良好的相关性,该方法的建立为陈皮、青皮、枳实、枳壳等含有柚皮素的中药的质量控制提供了新思路。单文超等^[38]建立了 ic-ELISA 测定葛根中葛根素的含量,该方法检测结果与 HPLC 检测结果一致,为葛根质量控制及含葛根药材的中药复方中葛根素的含量测定提供了一种新方法。曹鹏等^[39]研究了使用 ELISA 和 HPLC 两种方法对葛根素进行含量测定所得结果的相关性,二者检测结果相关系数为 0.993,呈现极显著相关 ($P<0.01$),说明 ELISA 检测准确度高,可用于葛根素含量的快速检测。魏文斌等^[40]制备了具有高度特异性的抗葛

根素单克隆抗体 M1,并建立了 ic-ELISA 法检测葛根素含量,采用该方法测定 6 批葛根类药材中葛根素含量,同时利用 UPLC-MS 对结果进行验证,两方法结果的相关性 R^2 为 0.999。

2.1.2 皂苷类有效成分的含量检测 马丽玲等^[41]用 ELISA 测定市售柴胡药材中柴胡皂苷 a 的含量,所选用的 10 份市售柴胡药材样品中柴胡皂苷 a 的含量在 $0.32\sim 6.87 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。蔡庆春^[42]随机抽取药店 10 份柴胡药材作为样本药材,利用基于抗柴胡皂苷 a 单克隆抗体建立的 ELISA 对柴胡药材样品中的柴胡皂苷 a 含量进行测定,结果表明柴胡皂苷 a 浓度在 $0.16\sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好线性关系,证明可以使用 ELISA 对柴胡药材进行质量快筛,值得推广。李刚等^[43]制备了甘草酸多克隆抗体并建立了甘草酸 ELISA 检测方法,利用该方法对 4 个甘草样品进行检测,并利用 HPLC 进行确证,两种方法结果的相关性 $R^2=0.990$,表明利用 ELISA 检测甘草酸结果准确。LIMSUWANCHOTE 等^[44]利用三七皂苷 R_1 -牛白蛋白结合物免疫 BALB/c 雄性小鼠制备单克隆抗体,该抗体对人参皂苷 R_g 和人参皂苷 R_e 的交叉反应率低于 1.02%,基于此抗体建立了 ic-ELISA 测定三七及三七制品中三七皂苷 R_1 的方法。XU 等^[45]用杂交瘤细胞系制备了麦冬中 1 种重要甾体皂苷元鲁斯可皂苷元单克隆抗体,该抗体对鲁斯可皂苷元具有高度特异性,与薯蓣皂苷元有极轻微的交叉反应,与菝葜皂苷元、甘草酸二铵、齐墩果酸和三七皂苷 R_1 无交叉反应;基于该单克隆抗体建立的 ELISA 检测 IC_{50} 为 $157.55 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $20.57 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。于生兰等^[46]建立了 1 种黄芪甲苷含量测定的 ELISA,用以对黄芪饮片及黄芪药材制品进行质量控制。以制备的黄芪甲苷单克隆抗体为基础,考察了其最佳的工作浓度,并利用该方法检测黄芪饮片中的黄芪甲苷含量,所得结果与 HPLC 结果基本一致,准确度高。王伟等^[47]通过杂交瘤细胞技术制备出红景天苷单克隆抗体,基于此抗体建立了高灵敏度的 ic-ELISA 红景天苷含量的方法,经过方法学考察和 HPLC 结果确证,证明该方法准确性好、灵敏度高。该方法的建立实现了红景天苷含量的快速批量检测,同时也为进一步开发红景天苷快检试剂盒奠定了基础。

2.1.3 生物碱类及萜类有效成分的含量检测 余宇燕等^[48]制备了石杉碱甲单克隆抗体,并分析了其免疫学特性,基于此抗体建立了快速灵敏的蛇足石杉中石杉碱甲 ELISA 检测。该方法线性检测范围

5~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限 7.361 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 适用于石杉碱甲的快速准确检测。屈保平等^[49]以制备出的芍药苷特异性单克隆抗体为基础, 建立了芍药苷 ic-ELISA 检测中药材白芍中的芍药苷含量, 为含芍药苷的微量生物样品检测、中药材及复方的质量控制分析提供了更加快速灵敏的检测方法。该方法线性关系、精密度、回收率考察结果均较好, 检测结果与 HPLC 检测结果一致, 且检测时长能够控制在 2 h 以内。吴启航^[50]制备了龙胆苦苷多克隆抗体, 该抗体对龙胆苦苷的交叉反应率为 100%, 对獐牙菜苷和獐牙菜苦苷的交叉反应率 < 0.5%, 对栀子苷、马钱苷和橄榄苦苷的交叉反应率 < 0.1%; 基于此抗体建立了 ELISA 检测秦艽中龙胆苦苷的方法用于快速鉴别市场上假冒伪劣秦艽药材。

2.2 ELISA 检测中药大分子物质 冯成强等^[51]利用天花粉蛋白对照品免疫家兔, 制备并纯化了天花粉蛋白多克隆抗体, 基于此抗体建立了 dc-ELISA 以检测真伪品天花粉药材中天花粉蛋白含量。邱乙^[52]用冬虫夏草指标蛋白 IP4 作为抗原免疫小鼠制备到了多克隆抗体, 基于该抗体建立了特异性检测冬虫夏草蛋白 IP4 的 ELISA, 考察并优化了包被液的选择、抗原包被时间、封闭液的选择与封闭时间、辣根过氧化物酶标二抗的工作浓度、底物显色时间等 ELISA 影响因素, 该方法对正品冬虫夏草具有高度特异性, 为后期中药真伪快速鉴定奠定了基础。

3 展望

中药由于兼具治疗和养生的双重功能, 越来越受到关注。但随着使用量的不断提高, 野生中药资源逐渐枯竭, 人工栽培中药材面临农药残留、霉菌污染、药效降低等一系列问题, 因此需要在种植、采收、仓储、流通等各个环节加强中药全链条质量控制。ELISA 技术是完善中药质量控制体系的有效工具, 2020 年版《中国药典》对包括大枣、水蛭、地龙、全蝎、决明子、陈皮、桃仁、蜈蚣、槟榔、酸枣仁、薏苡仁等在内的 19 味易发生霉变的中药材、饮片项下专门制定了“黄曲霉毒素”检查项目和限度标准^[64], 有助于实现中药质量仪器检测“简便易廉”。

从技术层面上, 在 ELISA 研究的过程中需要注意以下问题: ①在研究过程中, 抗体的制备是最重要的一步, 决定着整个实验的成败, 提高抗体制备的速度与质量是目前亟待解决的难题; ②保证制备出的抗体的稳定性, 特别是检测试剂盒中抗体的超长时间储存是另一个技术难点; ③每个 ELISA 方法的建立后, 其检测精度和重复性均需要进一步

提高。

目前 2020 年版《中国药典》仅收录了 ELISA 用于 AF 的含量测定, 应拓展其在其他真菌毒素、农药残留、有效成分等的应用范围。在中药有效成分含量测定方面, ELISA 方法多用于小分子物质的检测, 建议加大对蛋白质、多糖等大分子有效成分的测定研究, 另一方面还可基于中药指标性成分建立中药真伪优劣鉴定的 ELISA 体系。综上, ELISA 技术在中药质量控制方面具有较大的应用潜力, 随着相关研究技术的不断深入, ELISA 技术也必将在中药质量保障中发挥更重要的作用。

【参考文献】

- [1] 公爱娟, 刘春娟, 辛杰, 等. 酶联吸附免疫法和胶体金免疫色谱技术在中药黄曲霉毒素检测中的应用进展[J]. 中草药, 2018, 49(9): 2195-2202.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [3] 单利楠, 豆小文, 刘好, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 免疫快速检测技术研究进展及其在中药中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 194-209.
- [4] 张振凌, 陈红, 石延帮. 不同牛膝饮片黄曲霉毒素 B₁ 含量比较和限度的确定[J]. 中成药, 2005, 27(5): 612-614.
- [5] 陈红, 程再兴, 詹吉鹤. 闽产砂仁中黄曲霉毒素 B₁ 的含量测定及限量制定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1879-1880.
- [6] 褚先锋, 豆小文, 孔维军, 等. 间接竞争酶联免疫吸附法快速筛检莲子中黄曲霉毒素 B₁ 的污染水平[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 704-709.
- [7] 蒋佳伊, 张磊, 秦露, 等. 高灵敏度黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及其在中药材酸枣仁污染快速检测中的应用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3900-3907.
- [8] 杨东顺, 王莉丽, 马芙蓉, 等. 酶联免疫吸附法测定云南铁皮石斛中黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 7052-7056.
- [9] 张爱婷, 石延榜, 张振凌, 等. ELISA 法测定部分种子和果实类中药黄曲霉毒素 B₁ 含量[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(10): 48-49.
- [10] WANG C, ZHANG L, LUO J, et al. Development of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for high-throughput detection and risk assessment of aflatoxin B₁ in animal-derived medicines[J]. Toxicon, 2021, 197: 99-105.
- [11] 王彤颖, 陈媛媛, 高璇, 等. 中药材中黄曲霉毒素 B₁ 免疫学快速检测方法研究[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(2): 177-179.

- [12] 南铁贵,洪小棚,徐昕怡,等. 中药黄曲霉毒素测定酶联免疫吸附法的研制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4158-4162.
- [13] SHIM W B, KIM K, OFORI J A, et al. Occurrence of aflatoxins in herbal medicine distributed in South Korea[J]. J Food Prot, 2012, 75(11): 1991-1999.
- [14] TOSUN H, ARSLAN R. Determination of aflatoxin B₁ levels in organic spices and herbs [J]. Sci World J, 2013, 2013: 874093.
- [15] 梁月秋,黄荣芳. 中药污染黄曲霉毒素B₁检测分析[J]. 中国现代应用药学, 2000(3): 224-226.
- [16] 李延生,陈建民. ELISA试剂盒定量检测中药材和中药成药的黄曲霉毒素B₁[J]. 中草药, 2000(8): 28-29.
- [17] VIRENDRA K U, AJAY K, SHAIKESH K K, et al. Development of molecular marker and variability characterization of aspergillus flavus isolates of Chilies (*Capsicum frutescens* L.) through RAPD-PCR and estimation of aflatoxin B₁ by indirect competitive ELISA in India[J]. OALib, 2014, 1(9): 1-11.
- [18] 刘蕊,赵新悦,毛雯雯,等. ELISA法快速检测中药材黄曲霉毒素总量[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2376-2381.
- [19] WANG C J, LUO J Y, QIN J A, et al. Rapid detection of aflatoxin B₁ in Chinese herbal medicines by indirect and direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays: A comparative analysis [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2021, 46(22): 5861-5866.
- [20] GAO Y, YANG MH, PENG C, et al. Preparation of highly specific anti-zearalenone antibodies by using the cationic protein conjugate and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analyst, 2012, 137(1): 229-236.
- [21] YI L, HUANG X L, CHEN X R, et al. Plasmonic ELISA for naked-eye detection of ochratoxin A based on the tyramine-H₂O₂ amplification system [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2018: 259.
- [22] 刘云翔,高鹏超,詹志来,等. 基于酶联免疫分析的中药薏苡仁玉米赤霉烯酮残留快速检测技术研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 2919-2924.
- [23] 刘云翔,周荣荣,詹志来,等. 薏苡仁中呕吐毒素酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6581-6586.
- [24] 南铁贵,何素平,谭桂玉,等. 中药致肾毒性成分马兜铃酸A单抗制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1206-1210.
- [25] 黄磊,许玉,袁帅,等. 川乌附子中双酯型生物碱的ELISA法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(8): 895-897.
- [26] 袁帅,许玉,黄磊,等. 乌头属药材中单酯型乌头碱的ELISA法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(7): 897-901.
- [27] 谢雨薇,郁红礼,吴皓,等. 半夏凝集素蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心ELISA的建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6076-6081.
- [28] 高宏斌,许艇,李季. 免疫分析方法在拟除虫菊酯类农药残留检测中的应用进展[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(z1): 425-428.
- [29] 李卫霞,王素娟. ELISA在农药残留检测中的应用与质量控制[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(8): 241-243.
- [30] 武中平,徐春祥,高巍,等. 酶联免疫分析法及其在食品农药残留检测中的应用[J]. 江苏农业科学, 2007(1): 198-201.
- [31] PAUDEL M K, PUTALUN W, SRITULARAK B, et al. Development of a combined technique using a rapid one-step immunochromatographic assay and indirect competitive ELISA for the rapid detection of baicalin [J]. Anal Chim Acta, 2011, 701(2): 189-193.
- [32] 孙慧. 葛根素、栀子苷、黄芩苷、柚皮苷含量测定的ELISA方法与HPLC方法的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [33] 沈洲,雷丽云,龙蓉,等. 剑叶龙血素A间接竞争ELISA检测方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 241-245.
- [34] 成金俊. 淫羊藿苷单克隆抗体的制备及其ELISA法的建立和FLISA法的初探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [35] 许永德,关瑞礼,孙东翀,等. 基于淫羊藿次苷II单克隆抗体的ELISA检测方法的建立[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(3): 465-468.
- [36] ZHANG B, NAN T, ZHAN Z, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for luteoloside detection in Flos Lonicerae Japonicae [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(22): 6053-6061.
- [37] ZHAO J, ZHANG Y, ZHAO Q, et al. A sensitive and practical ELISA for analyzing naringenin in pummelo and herb samples [J]. Food Chem, 2021, 362: 130223.
- [38] 单文超,冯会宾,赵琰,等. 间接竞争酶联免疫分析法测定葛根中葛根素的含量[J]. 环球中医药, 2015(9): 1089-1092.
- [39] 曹鹏,沈建梅,赵琰,等. 葛根素含量检测酶联免疫法与高效液相色谱法相关性的研究[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(4): 20-22.
- [40] 魏文斌,岳世彦,周荣荣,等. 葛根素单克隆抗体的制备及酶联免疫分析方法建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 48-53.

- [41] 马丽玲, 谭铭铭, 晁志. 用ELISA法检验柴胡药材的质量[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(6): 1006-1008.
- [42] 蔡庆春. ELISA法用于检验柴胡药材质量的可行性分析[C]//中国中药杂志社. 中国中药杂志2015/专集: 基层医疗机构从业人员科技论文写作培训会议论文集. 中国中药杂志编辑部, 2016: 2.
- [43] 李刚, 赵静, 何素平, 等. 甘草酸多克隆抗体的制备及ELISA方法建立[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2956-2958.
- [44] LIMSUWANCHOTE S, WUNGSINTAWEEKUL J, YUSAKUL G, et al. Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R₁, a distinctive saponin from *Panax notoginseng*, and its application to indirect competitive ELISA [J]. *Planta Med*, 2014, 80(4): 337-342.
- [45] XU Y, LIU J H, WANG J, et al. A monoclonal antibody-based competitive ELISA for the determination of ruscogenin in Chinese traditional medicines and biological samples [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(10): 794-799.
- [46] 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.
- [47] 王伟, 胡立新, 伏光华, 等. 红景天苷单克隆抗体的制备及间接竞争酶联免疫方法的建立[J]. 福建农业学报, 2019, 34(5): 595-599.
- [48] 余宇燕, 张淑玲, 邹艳辉, 等. 珍稀药源植物蛇足石杉中石杉碱甲的免疫学快速检测[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(1): 44-48.
- [49] 屈保平, 冯红, 续洁琨, 等. 基于芍药苷单克隆抗体的ELISA快速检测方法建立[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1931-1935.
- [50] 吴启航. 龙胆苦苷多克隆抗体的制备及ELISA检测方法的建立[D]. 西安: 陕西科技大学, 2017.
- [51] 冯成强, 黄璐琦, 柳川, 等. 蛋白免疫检测技术在天花粉真伪鉴别中的初步研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(8): 574-577.
- [52] 邱乙. 基于冬虫夏草标志性蛋白质IP4的ELISA定量评价新方法研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [53] TANAKA H, FUKUDA N, SHOYAMA Y. Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb₁ and its characterization [J]. *Cytotechnology*, 1999, 29(2): 115-120.
- [54] NAH J J, SONG J Y, CHOI S, et al. Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(5): 523-526.
- [55] ZHU S H, SHIMOKAWA S, TANAKA H, et al. Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(1): 66-71.
- [56] LOUNGRATANA P, TANAKA H, SHOYAMA Y. Production of monoclonal antibody against ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* Linn [J]. *Am J Chin Med*, 2004, 32(1): 33-48.
- [57] KIM J S, TANAKA H, YUAN C S, et al. Development of monoclonal antibody against isoquinoline alkaloid coptisine and its application for the screening of medicinal plants [J]. *Cytotechnology*, 2004, 44(3): 115-123.
- [58] ZHAO J, LI G, WANG B M, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of glycyrrhizic acid [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(6): 1735-1740.
- [59] XU J, TANAKA H, SHOYAMA Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 850(1/2): 53-58.
- [60] 陈阶. 斑蝥素提取、特异性抗体的制备及其酶联免疫检测方法的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2008.
- [61] KIDO K, MORINAGA O, SHOYAMA Y, et al. Quick analysis of baicalin in *Scutellariae Radix* by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody [J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 346-350.
- [62] SAKAMOTO S, PUTALUN W, TSUCHIHASHI R, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using highly-specific monoclonal antibodies against plumbagin [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 607(1): 100-105.
- [63] HE S P, TAN G Y, LI G, et al. Development of a sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the antimalaria active ingredient artemisinin in the Chinese herb *Artemisia annua* L [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(4): 1297-1303.
- [64] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[责任编辑 顾雪竹]