

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101865914 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 201010185346. 5

(22) 申请日 2010. 05. 28

(71) 申请人 中国人民解放军第三〇二医院

地址 100039 北京市西四环中路 100 号解放军 302 医院中药研究所

(72) 发明人 肖小河 金城 罗云 赵艳玲

周健 温瑞卿

(74) 专利代理机构 北京东正专利代理事务所

(普通合伙) 11312

代理人 刘瑜冬

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 35/55 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种麝香抗炎活性的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种麝香抗炎活性的检测方法,方法包括待测品溶液的制备和对照品的制备,根据待测品对环氧酶 II (COX-2) 产生的抑制作用,通过所建立的麝香抗炎活性效价测定方法,评价麝香质量,即,采用酶免疫测定法,测定麝香作用前后 COX-2 催化的由花生四烯酸 (AA) 生成前列腺素 (PGs) 量的变化,从而给出麝香对 COX-2 的抑制作用量效关系。根据测定结果,按照“二剂量”法进行可靠性检验及效价计算,获得麝香的抗炎活性效价。本发明首次建立了麝香的抗炎活性的生物测定方法,具有在检测过程中所受干扰因素少、操作简单、节约经费并可独立特异性表征麝香抗炎活性的优点。

1. 一种麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 取麝香提取、提取液配制成不同浓度的溶液为待测品 A;

(2) 配制系列浓度的前列腺素 (PG) 标准品溶液 B;

(3) 配制系列浓度的阿司匹林溶液作为阳性对照品 C;

(4) 分别配制背景组,环氧酶 II (COX-2) 100% 初始活性组,阳性对照组及麝香供试品组 4 种反应体系组;

(5) 进行环氧酶 II (COX-2) 反应步骤:即取上述步骤 (4) 所制得的四组反应液,混匀,37°C 水浴孵育 10 ~ 20min;孵育后的四组反应液中均加入 1 份花生四烯酸,混匀,37°C 水浴孵育 2min;

(6) 取步骤 (5) 中经 COX-2 反应的四组反应液,加入 1M HCl 50 μ l,停止水浴,每组均加入与反应体系组等体积的饱和 S_nCl_2 溶液,混匀,室温放置 5min;

(7) 将步骤 (6) 所得的四组反应液分别稀释;

(8) 将步骤 (7) 获得的一系列前列腺素供试品,采用试剂盒,通过酶免疫法,测定各组反应液吸收度值,并以 PG 标准品溶液 B 得到的吸收度标准曲线计算各组反应液中前列腺素的含量,供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别为 C_D , C_E , C_F , C_G ;

(9) 根据供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别计算阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率;

(10) 根据 (9) 步得到的阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率,采用“二剂量”法对麝香供试品组抑制率进行可靠性检验,从而确定麝香抗炎活性效价。

2. 根据权利要求 1 所述的麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,步骤 (1) 中所用的溶剂为选自水、甲醇、乙醇中的一种或两种以上的混合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,步骤 (1) 中配置不同浓度待测品 A 的方法是以 20-100 倍麝香样品量的溶剂进行分步提取 10-60 分钟,滤过,收集滤液;或以 20-100 倍麝香样品量的溶剂静置提取 30 分钟后超声 10 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述的麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,步骤 (1)、(2)、(3) 中的待测品 A 浓度为大于 0% 小于 100%,前列腺素 (PG) 标准品溶液 B 对数浓度为 3.3、3.2、2.7、2.4、2.1、1.8、1.5、1.2 及阳性对照品 C 的浓度为大于 0% 小于 80%。

5. 根据权利要求 1 所述的麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,步骤 (4) 中 4 种反应体系组的配置方法为:

背景组:反应缓冲液 + 经高温灭活的 COX-2+ 抗氧化剂,体积比为 97 : 1 : 1;

COX-2 100% 初始活性组:反应缓冲液 + COX-2+ 抗氧化剂,体积比为 97 : 1 : 1;

阳性对照组:反应缓冲液 + COX-2+ 抗氧化剂 + 阳性对照 C,体积比为 95 : 1 : 1 : 2;

麝香供试品组:反应缓冲液 + COX-2+ 抗氧化剂 + 待测品 A,体积比为 95 : 1 : 1 : 2;

其中,反应缓冲液的配制为:Tris-HCl+EDTA+ 苯酚,并调节 pH 至 8.0,质量比为 1.6 : 0.15 : 0.02。

6. 根据权利要求 1 所述的麝香抗炎活性的检测方法,其特征在于,步骤 (7) 中对 4 种反应体系组的稀释方法为:背景组以 EIA 缓冲液稀释 100 倍;COX-2 100% 初始活性组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;阳性对照组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;麝香供试品组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;

其中, EIA 缓冲液的配制为: 磷酸盐 + NaCl + BSA + EDTA + 叠氮化钠, 质量比为 3.4 : 23.3 : 1.0 : 0.3 : 0.1。

7. 根据权利要求 1 所述的麝香抗炎活性的检测方法, 其特征在于, 步骤 (9) 中的阳性对照组抑制率计算方法为 $\frac{C_E - C_F}{C_E - C_D} \times 100\%$; 麝香供试品组抑制率计算方法为

$$\frac{C_E - C_G}{C_E - C_D} \times 100\%。$$

一种麝香抗炎活性的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于中药活性参数检测技术领域,具体是涉及一种麝香抗炎活性检测方法的技术。

背景技术

[0002] 麝香作为中药具有开窍醒神、消肿止痛、活血调经的功效,临床上广泛用于治疗疮疡肿毒,咽喉肿痛、跌打损伤等症,抗炎作用被认为是麝香的主要药理活性之一。

[0003] 现有技术检验中药抗炎活性时,通常采用的药理实验方法是整体动物实验法,该方法首先通过一些炎症介质致使动物某些部位发生炎症,然后对该炎症部位使用不同抗炎药物进行对比实现,根据炎症部位的重量、体积等变化判断药物的抗炎活性强度,如小鼠耳肿胀、大鼠足肿胀实验法等。一般来说,上述整体动物实验法难以给出精确地量化评价,操作步骤复杂,费用高,干扰因素多,作为麝香的生物效价检测方法具有一定局限性。

[0004] 已有药物分析中发现,环氧酶(COX)是花生四烯酸(AA)代谢过程中重要的限速酶之一,COX有两中结构型,即COX-1和COX-2,通过抑制COX可以减轻炎症反应、从而实现抑制炎症的发展。因此,COX途径是抗炎药物发挥作用的重要途径之一,然而由于COX-1选择性不强,药物对其抑制往往产生许多副作用;相比之下,特异性地抑制COX-2的功能逐渐成为研究开发抗炎药物的目标。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决已有整体动物实验法检测中药抗炎活性时,检测结果不能定量,成本高,操作步骤复杂的缺陷,利用抗炎中药对COX-2活性抑制强度可以表征待测品抗炎活性原理,提供了一种测定麝香抗炎活性的方法。

[0006] 实现上述目的本发明的技术方案为,一种麝香抗炎活性的检测方法,该方法包括以下步骤:

[0007] (1) 取麝香提取、提取液配制成不同浓度的溶液为待测品A;

[0008] (2) 配制系列浓度的前列腺素(PG)标准品溶液B;

[0009] (3) 配制系列浓度的阿司匹林溶液作为阳性对照品C;

[0010] (4) 分别配制背景组,环氧酶II(COX-2)100%初始活性组,阳性对照组及麝香供试品组4种反应体系组;

[0011] (5) 进行环氧酶II(COX-2)反应步骤:即取上述步骤(4)所制得的四组反应液,混匀,37°C水浴孵育10~20min;孵育后的四组反应液中均加入10 μ l花生四烯酸,混匀,37°C水浴孵育2min;

[0012] (6) 取步骤(5)中经COX-2反应的四组反应液,加入1M HCl 50 μ l,停止水浴,每组均加入100 μ l饱和SnCl₂溶液,混匀,室温放置5min;

[0013] (7) 将步骤(6)所得的四组反应液分别稀释;

[0014] (8) 将步骤(7)获得的一系列前列腺素供试品,采用试剂盒,通过酶免疫法,测定

各组反应液吸收度值,并以 PG 标准品溶液 B 得到的吸收度标准曲线计算各组反应液中前列腺素的含量,供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别为 C_D , C_E , C_F , C_G ;

[0015] (9) 根据供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别计算阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率;

[0016] (10) 根据 (9) 步得到的阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率,采用“二剂量”法对麝香供试品组抑制率进行可靠性检验,从而确定麝香抗炎活性效价。

[0017] 步骤 (1) 中的溶剂通常采用强极性溶剂,可以选自水、甲醇、乙醇中的一种或两种以上的混合物,不同浓度待测品 A 的方法是以 20-100 倍麝香样品量的强极性溶剂进行分步提取 10-60 分钟,滤过,收集滤液;或以 20-100 倍麝香样品量的强极性溶剂静置提取 30 分钟后超声 10 分钟。

[0018] 步骤 (1)、(2)、(3) 中的待测品 A 浓度为大于 0% 小于 100%,前列腺素 (PG) 标准品溶液 B 对数浓度为 3.3、3.2、2.7、2.4、2.1、1.8、1.5、1.2 及阳性对照品 C 的浓度为大于 0% 小于 80%。

[0019] 步骤 (4) 中 4 种反应体系组的配置方法为:

[0020] 背景组:反应缓冲液+经高温灭活的 COX-2+ 抗氧化剂,体积比为 97 : 1 : 1;

[0021] COX-2100% 初始活性组:反应缓冲液+COX-2+ 抗氧化剂,体积比为 97 : 1 : 1;

[0022] 阳性对照组:反应缓冲液+COX-2+ 抗氧化剂+阳性对照 C,体积比为 95 : 1 : 1 : 2;

[0023] 麝香供试品组:反应缓冲液+COX-2+ 抗氧化剂+待测品 A,体积比为 95 : 1 : 1 : 2;

[0024] 其中,反应缓冲液的配制为:Tris-HCl+EDTA+ 苯酚,并调节 pH 至 8.0,质量比为 1.6 : 0.15 : 0.02。

[0025] 步骤 (7) 中对 4 种反应体系组的稀释方法为:背景组以 EIA 缓冲液稀释 100 倍;COX-2100% 初始活性组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;阳性对照组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;麝香供试品组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍;其中,EIA 缓冲液的配制为:磷酸盐+NaCl+BSA+EDTA+ 叠氮化钠,质量比为 3.4 : 23.3 : 1.0 : 0.3 : 0.1。

[0026] 步骤 (9) 中的阳性对照组抑制率计算方法为 $\frac{C_E - C_F}{C_E - C_D} \times 100\%$; 麝香供试品组抑

制率计算方法为 $\frac{C_E - C_G}{C_E - C_D} \times 100\%$ 。

[0027] 本发明与现有技术相比具有以下有益效果:(1) 本发明的技术方案克服了目前抗炎活性实验中整体动物实验方法难以精确给出量化评价,操作步骤复杂、费用高、干扰因素多的局限性,具有易于操作且结果稳定的优点;(2) 本发明的技术方案开创了一种新的检测中药麝香抗炎活性的方法,通过生物学手段来实现对麝香抗炎活性定性定量的检测。

附图说明

[0028] 图 1 是图 1PG 标准曲线。

具体实施方式

[0029] 为便于本发明技术方案的理解,下面结合具体的实施方式进行介绍。(1) 取一定量的麝香样品,向其中加入 20 ~ 100 倍样品量的强极性溶剂进行分步提取 10 ~ 60 分钟,滤

过、收集滤液；或以 20 ~ 100 倍麝香样品量的强极性溶剂静置提取 30 分钟后超声 10 分钟，滤过、收集滤液，加入不同量强极性溶剂经过上述步骤后所收集的滤液中所得的麝香待测品 A 的浓度将不同，从而配制成为一系列不同浓度的待测品 A，浓度范围可以是 0% ~ 100% 之间，不包括两个端点。这里所使用的强极性溶剂为选自水、甲醇、乙醇中的一种或两种以上的混合物。

[0030] (2) 配制系列浓度的前列腺素 (PG) 标准品溶液 B，取试剂盒中前列腺素 (PG) 标准品冻干粉，加入 1ml EIA 缓冲液制成 10ng/ml 的储备液，并用 EIA 缓冲液稀释成 2000pg/ml (S1)、1000pg/ml (S2)、500pg/ml (S3)、250pg/ml (S4)、125pg/ml (S5)、62.5pg/ml (S6)、31.3pg/ml (S7)、15.6pg/ml (S8) 的标准品溶液，上述溶液的对数浓度为 3.3、3.2、2.7、2.4、2.1、1.8、1.5、1.2。

[0031] (3) 配制系列浓度的阿司匹林溶液作为阳性对照品 C，精密称取阿司匹林 20.0mg，加反应缓冲液 5.0ml，该缓冲液含 0.1M Tris-HCl、5mM EDTA、2mM 苯酚，pH 8.0，超声使溶解，制成 4.0mg/ml 的对照品溶液，并以反应缓冲液稀释成不同浓度的阳性对照品溶液，上述系列阳性对照品 C 的浓度为大于 0% 小于 80%，置 4℃ 冰箱中保存备用；

[0032] (4) 分别配制背景组，环氧酶 II (COX-2) 100% 初始活性组，阳性对照组及麝香供试品组 4 种反应体系组，背景组：反应缓冲液 + 经高温灭活的 COX-2 + 抗氧化剂，体积比为 97 : 1 : 1；COX-2 100% 初始活性组：反应缓冲液 + COX-2 + 抗氧化剂，体积比为 97 : 1 : 1；阳性对照组：反应缓冲液 + COX-2 + 抗氧化剂 + 阳性对照 C，体积比为 95 : 1 : 1 : 2；麝香供试品组：反应缓冲液 + COX-2 + 抗氧化剂 + 待测品 A，体积比为 95 : 1 : 1 : 2；其中，反应缓冲液的配制为：Tris-HCl + EDTA + 苯酚，并调节 pH 至 8.0，质量比为 1.6 : 0.15 : 0.02；

[0033] (5) 进行环氧酶 II (COX-2) 反应步骤：即取上述步骤 (4) 所制得的四组反应液，混匀，37℃ 水浴孵育 10 ~ 20min；孵育后的四组反应液中均加入 1 份花生四烯酸（反应体系组：花生四烯酸 = 99 : 1），混匀，37℃ 水浴孵育 2min；

[0034] (6) 取步骤 (5) 中经 COX-2 反应的四组反应液，加入 1M HCl 50 μl，停止水浴，每组均加入等体积饱和 SnCl₂ 溶液，混匀，室温放置 5min；

[0035] (7) 将步骤 (6) 所得的四组反应液分别稀释，稀释方法如下：背景组以 EIA 缓冲液稀释 100 倍；COX-2 100% 初始活性组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍；阳性对照组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍；麝香供试品组以 EIA 缓冲液稀释 1000 倍；

[0036] (8) 将步骤 (7) 获得的一系列前列腺素供试品，采用试剂盒，通过酶免疫法，测定各组反应液吸收度值，并以 PG 标准品溶液 B 得到的吸收度标准曲线计算各组反应液中前列腺素的含量，供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别为 C_D、C_E、C_F、C_G；具体测定各组反应液吸收度值如下：将上一步骤获得的供试品在试剂盒提供的 96 孔酶标板中进行酶免疫测定，设置空白孔 (Blk)、非特异性吸附孔 (NSB)、最大结合孔 (B₀)、全活性孔 (TA)、PG 标准品孔 (S1 ~ S8)、背景孔 (BC)、100% 初始活性孔 (IA)、麝香供试品孔 (AM)，分别在 NSB 孔中加入 100 μl EIA 缓冲液和 50 μl PG tracer；在 B₀ 孔中加入 50 μl EIA 缓冲液、50 μl PG tracer 和 50 μl PG antiserum；在 PG 标准品孔 (S1 ~ S8)、背景孔 (BC)、100% 初始活性孔 (IA)、麝香供试品孔 (AM) 中加入 50 μl 前列腺素 (PG) 标准品或 PGs 供试品溶液、50 μl PG tracer 和 50 μl PG antiserum。用塑料膜盖好酶标板，室温振摇孵育 18 小时后；用缓冲液洗板 5 次，然后每孔分别加入 200 μl Ellman 试剂，TA 孔另加 5 μl PG tracer，盖好，暗室中振摇孵

育 30 ~ 90min, 放入 405-420nm 酶标仪, 测定吸光度, B₀ 孔的吸光度应在 0.3 ~ 0.8A. U. 范围内 (扣除空白); PG 标准品溶液 B 得到的吸收度标准曲线就是 PG 标准品孔 (S1 ~ S8) 吸光度与最大结合孔 (B₀) 吸光度的比值乘以 100 得 B/B₀%, 如图 1, 是绘制的 PG 标准曲线, $y = -38.923x + 140.75$, 结果表明, 在 15.6 ~ 2000pg/ml 的浓度范围内, B/B₀% 值与 PG 的浓度的对数值具有良好的线性关系; 将各组反应液吸收度值与标准曲线对比即可得供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别为 C_D, C_E, C_F, C_G;

[0037] (9) 据供试品 D、E、F、G 的前列腺素含量分别计算阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率, 阳性对照组抑制率计算方法为 $\frac{C_E - C_F}{C_E - C_D} \times 100\%$; 麝香供试品组抑制率计算方法为

$$\frac{C_E - C_G}{C_E - C_D} \times 100\%;$$

[0038] (10) 根据 (9) 步得到的阳性对照组抑制率和麝香供试品组抑制率, 采用“二剂量”法对麝香供试品组抑制率进行可靠性检验, 从而确定麝香抗炎活性效价。

[0039] 下面具体给出测定的相关结果, 表 1 是图 1 数据的具体数值。

[0040] 表 1 PG 浓度 B/B₀% 值表

	PG 浓度 (pg/ml)	B/B ₀ %
	15.6	97.0
	31.3	83.7
	62.5	72.2
[0041]	125	57.1
	250	42.1
	500	31.8
	1000	23.5
	2000	18.8

[0042] 利用阿司匹林对照品和麝香样品对 COX-2 抑制作用分别进行了测试, 结果见表 2。

[0043] 表 2 不同浓度的麝香和阿司匹林对 COX-2 的抑制率

[0044]

样品	C/ mg • ml ⁻¹	抑制率 (%)		
阿司匹林 (S)	1.0	72.3	73.3	74.1
	2.0	81.1	83.3	84.9
麝香 (T)	10.0	68.9	70.8	73.9
	20.0	76.3	77.2	85.3

[0045] 麝香抗炎效价测定

[0046] 以 COX-2 抑制率 (I%) 为指标, 以阿司匹林 (S) 为参照, 采用二剂量法计算麝香 (T) 的效价, 结果见表 3。

[0047] 表 3 麝香抗炎效价测定可靠性检验结果

[0048]

变异来源	df	差方和	方差	F 值	P 值
试品间	1	22.963	22.963	2.5953	>0.05
回归	1	250.25	250.25	28.283	<0.01
偏离平行	1	1.6133	1.6133	<1	>0.05
剂间	3	274.84	91.612	10.354	<0.01
误差	8	70.785	8.8481		

[0049] 由表 3 可见,可靠性检验表明剂间和回归项差异非常显著 ($P < 0.01$),偏离平行差异不显著 ($P > 0.05$),因此 S 和 T 两条直线呈平行直线关系,可按照平行线原理的方法计算麝香的抗炎效价及可信限。

[0050] 研究结果表明,以阿司匹林的效价 1000U/mg 计算,麝香的效价为 81.1U/mg,可信限率 $FL = 20.0\%$,基本符合生物测定的要求。

[0051] 上述技术方案仅体现了本发明技术方案的优选技术方案,本技术领域的技术人员对其中某些部分所可能做出的一些变动均体现了本发明的原理,属于本发明的保护范围之内。

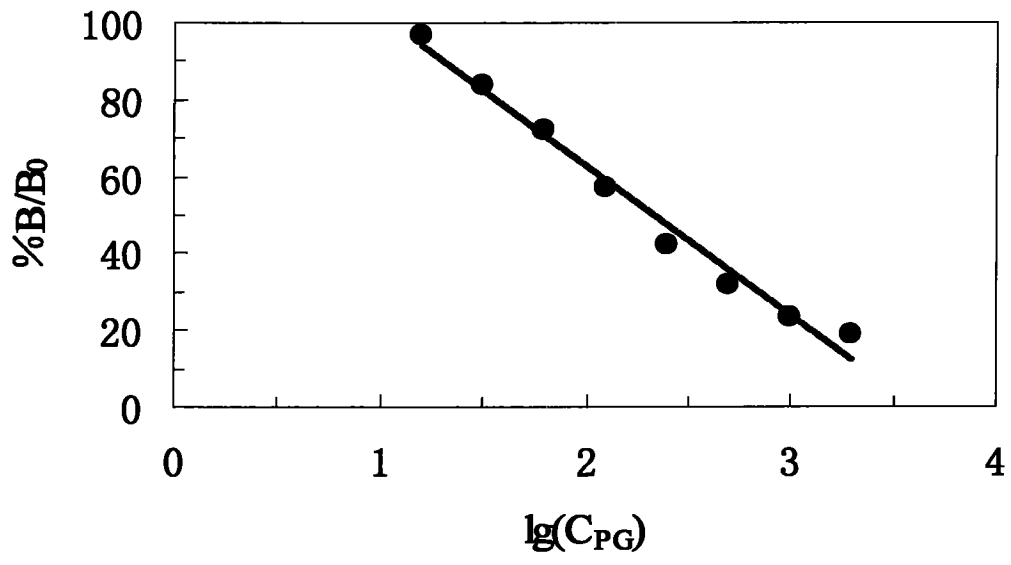


图 1

专利名称(译)	一种麝香抗炎活性的检测方法		
公开(公告)号	CN101865914A	公开(公告)日	2010-10-20
申请号	CN201010185346.5	申请日	2010-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇二医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇二医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇二医院		
[标]发明人	肖小河 金城 罗云 赵艳玲 周健 温瑞卿		
发明人	肖小河 金城 罗云 赵艳玲 周健 温瑞卿		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/55 A61P29/00		
代理人(译)	刘瑜冬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种麝香抗炎活性的检测方法，方法包括待测品溶液的制备和对照品的制备，根据待测品对环氧酶II(COX-2)产生的抑制作用，通过所建立的麝香抗炎活性效价测定方法，评价麝香质量，即，采用酶免疫测定法，测定麝香作用前后COX-2催化的由花生四烯酸(AA)生成前列腺素(PGs)量的变化，从而给出麝香对COX-2的抑制作用量效关系。根据测定结果，按照“二剂量”法进行可靠性检验及效价计算，获得麝香的抗炎活性效价。本发明首次建立了麝香的抗炎活性的生物测定方法，具有在检测过程中所受干扰因素少、操作简单、节约经费并可独立特异性表征麝香抗炎活性的优点。

PG 浓度 (pg/ml)	B/B0%
15.6	97.0
31.3	83.7
62.5	72.2
125	57.1
250	42.1
500	31.8
1000	23.5
2000	18.8