

摘 要

马兜铃酸 I (AA-I) 主要从马兜铃属植物分离而来, 在结构上与硝基菲羧酸相似, 具有肾毒性和强效致癌性, 主要存在于马兜铃、天线藤以及朱砂莲等中草药中。因此将中草药中的马兜铃酸 I 通过降解使其转化变为无毒性的产物, 以及检测中草药中的马兜铃酸 I, 对保障人们的健康有着重要意义。L-半胱氨酸 (L-cysteine) 通过将马兜铃酸 I 上的硝基 ($-\text{NO}_2$) 还原为氢 ($-\text{H}$), 使得有毒的马兜铃酸 I 转化降解为无毒的马兜铃次酸 I, 但此降解过程受到了很多因素影响, 包括 L-半胱氨酸的摩尔浓度、L-半胱氨酸与马兜铃酸 I 的体积比、反应 pH、反应温度等。本研究探索出了在以上条件的影响下最优的降解条件, 并最终应用到实际样品中。目前对于检测马兜铃酸 I, 最常用的检测方法是高效液相色谱 (HPLC) 等, 但此类方法不仅耗费大量的时间, 而且还需要专业人员进行操作。免疫层析快速检测试纸条, 具有特异性高、快捷和高效益等优点。本研究通过研制免疫层析快速检测试纸条来实现达到快速高效的检测马兜铃酸 I 的目的。为了保证该试纸条的有效性和长效性, 本文进行了试纸条性能评价以及与 HPLC 的检测结果比较实验。

首先, 利用 L-cy 降解 AA-I。用 HPLC 分别对降解 1、2、3、4、5 h 后的 AA-I 标准品进行定量检测, 研究了不同时间段不同实验条件的降解效果。通过比较在不同条件下降解的效率, 最终确立了在 0.15 M L-cy、体积比为 3: 1、pH 为 6、温度为 60 °C 是最优的降解条件, 并将此条件运用到实际样品中。

其次, 研制纳米硒免疫层析快速检测试纸条。目前, 在免疫层析快速检测试纸条这一领域, 最常用的探针是纳米金, 本研究在探针上进行了创新, 引入了纳米硒粒子。相比于胶体金, 胶体硒合成更为快捷、简便、经济。本研究制备的胶体硒是在稳定剂的作用下, 利用维生素 C (VC) 将亚硒酸 (H_2SeO_3) 还原为硒粒子。在制备胶体硒时, 本研究选用的稳定剂是聚乙二醇 8000 (PEG8000) 十二烷基硫酸钠 (SDS), 通过改变 PEG8000、SDS、VC 的添加量和 H_2SeO_3 的种类, 成功制备了几种具有均匀分散的, 球状等特征的橙色胶体硒溶液。经优化后, 最终确定了 PEG8000 0.25 g、0.1 mL 0.1M SDS、2.5 mL 0.32 M VC、2.5 mL 0.04 M H_2SeO_3 制成 50 mL 的胶体硒溶液。并成功将纳米硒与单克隆抗体偶联, 经过多重优化, 制备出灵敏度为 2.5 ng/mL, 并且在 10 min 内就能够完成检测的纳米硒

免疫层析试纸条 (SeICA)。

此外,本实验对试纸条开展了性能评价,主要集中于特异性和稳定性。本研究利用纳米硒免疫层析试纸条对马兜铃酸 II (AA-II)、T-2 毒素 (T-2) 和黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 等小分子毒素进行快速检测,结果表明并没有发生交叉反应。为了探究该试纸条的稳定性,本研究将其分别在常温下保存 4 周和在 25 °C 恒温保存 8 周,之后,再次将该试纸条进行实验,实验结果说明,该试纸条在长期保存后仍能进行再次检测,且灵敏度保存前后一致。故说明本研究所制备的试纸条已具备特异性和稳定性。

最后,本研究对 SeICA 与 HPLC 检测中草药中马兜铃酸 I 进行了比较。利用制备的试纸条对 16 个中草药样品进行快速检测,检测上述实际样品中是否存在 AA-I 毒素并用 HPLC 法进行验证。结果表明,两种方法所检测的结果趋于一致。由此可说明,本研究所制备的纳米硒免疫层析试纸条可直接运用于实地的检测分析中。

关键词: 马兜铃酸 I; 降解; 纳米硒免疫层析试纸条; 中草药

ABSTRACT

Aristolochic acid I (AA-I) is mainly isolated from Aristolochia plants and is structurally similar to nitrophilic carboxylic acid, which is nephrotoxic and potent carcinogenic, and is mainly found in herbal medicines such as Aristolochia, antennal vine, and viburnum. Therefore, it is important to protect people's health by degrading the aristolochic acid I in herbal medicine and transforming it into a non-toxic product, as well as detecting aristolochic acid I in herbal medicine. L-cy converts toxic aristolochic acid I into non-toxic aristolochic acid I by reducing the nitro ($-\text{NO}_2$) to hydrogen ($-\text{H}$) on aristolochic acid I. However, this degradation process is subject to many factors. However, this degradation process was affected by many factors, including the molar concentration of L-cy, the volume ratio of L-cy to aristolochic acid I, the reaction pH, and the reaction temperature. In this study, the optimal degradation conditions under the influence of the above conditions were explored and finally applied to the actual samples. Currently, for the detection of aristolochic acid I, the most commonly used detection methods are such as high performance liquid phase, but such methods are not only time consuming but also require professional personnel to operate. Immunochromatographic rapid test strips, which have the advantages of high specificity, rapidity and high efficiency. In this study, we developed immunochromatographic rapid test strips to achieve rapid and efficient detection of aristolochic acid I. In order to ensure the validity of the test strips, we developed a method for the detection of aristolochic acid I. In order to ensure the effectiveness and longevity of the test strips, the performance evaluation of the test strips and the comparison of the results with those of high performance liquid chromatography were carried out.

Firstly, AA-I was degraded by L-cysteine, and the AA-I standards were quantified by high performance liquid chromatography after 1, 2, 3, 4 and 5 h of degradation, and the degradation effects were investigated under different experimental conditions at different time periods. By comparing the degradation efficiency under different conditions, the best degradation effect was finally established at 0.15 M L-cysteine,

volume ratio of 3:1, pH 6 and temperature of 60 °C, and this condition was applied to the actual samples.

Second, the development of nano-selenium immunochromatographic rapid detection test strips. At present, in the field of immunochromatographic rapid test strips, the most commonly used probe is nanogold, and this study innovated on the probe by introducing selenium nanoparticles. Colloidal selenium is faster, simpler and more economical to synthesize compared to colloidal gold. The colloidal selenium prepared in this study was prepared by reducing selenite (H_2SeO_3) to selenium particles using vitamin C (VC) in the presence of stabilizer. In the preparation of colloidal selenium, the stabilizer selected in this study was polyethylene glycol 8000 (PEG8000) sodium dodecyl sulfate (SDS), and several orange colloidal selenium solutions with characteristics such as uniformly dispersed, spherical shape were successfully prepared by changing PEG8000, SDS, VC and H_2SeO_3 . Later, PEG8000 0.25 g, 0.1 mL 0.1 M SDS, 2.5 mL 0.32 M VC, 2.5 mL 0.04 M H_2SeO_3 were finally optimized to make 50 mL of colloidal selenium solution. The nano-selenium was successfully coupled with monoclonal antibodies, and after multiple optimization, nano-selenium immunochromatographic test strips with a sensitivity of 2.5 ng/mL were prepared, and the detection was completed in 10 min.

In addition, the performance evaluation of the test strips was carried out, mainly focusing on the specificity and stability. In this study, the rapid detection of small molecule toxins such as aristolochic acid II (AA-II), T-2 toxin (T-2) and aflatoxin B₁ (AFB₁) was carried out using the nano-selenium immunochromatographic strips, and the results showed that no cross-reactivity occurred. In order to investigate the stability of the test strips, experiments were conducted under two conditions: 4 weeks at room temperature and 8 weeks at a constant temperature of 25 °C, after which the test strips were again subjected to experiments, and the experimental results showed that the test strips could be re-detected after long-term storage, and the sensitivity was consistent before and after storage. Therefore, the test strips prepared in this study have been shown to be specific and stable.

Finally, this study compared SeICA with HPLC for the determination of aristolochic acid I in Chinese herbal medicine. Sixteen herbal samples were tested for

the presence of AA-I toxin using the prepared test strips and verified by HPLC. The results showed that the results obtained by both methods converged. It can be shown that the nanoselenium immunochromatographic test strips prepared in this study can be directly applied in the field for the detection and analysis.

Key words: aristolochic acid I; degrade; selenium nanoimmunochromatographic test; chinese medicinal

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
AA-I	Aristolochic acid I	马兜铃酸 I
AA-II	Aristolochic acid II	马兜铃酸 II
AFB ₁	Aflatoxin B ₁	黄曲霉毒素 B ₁
SeNSs	Selenium nanoparticles	纳米硒粒子
A	Absorbance	吸光值
SeICA	Selenium immunochromatography assay	纳米硒免疫层析法
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
IARC	International Agency for Research on Cancer	国际癌症研究机构
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
CAC	Codex Alimentarius Commission	国际食品法典委员会
EU	European Union	欧盟
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
DON	Deoxynivalenol	脱氧雪腐镰刀菌烯醇
FB ₁	Fumonisin B ₁	伏马菌素
SAb	Secondary antibody	二抗
GC	Gas chromatography	气相色谱
GC-MS	Gas chromatography-mass	气相色谱-质谱
MAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
HPLC-MS/MS	Chromatography-tandem mass spectrometry	高效液相色谱-串联质谱

目 录

第 1 章 前言	1
1.1 马兜铃酸的概述	1
1.1.1 马兜铃酸	1
1.1.2 马兜铃酸I的危害	2
1.2 限量标准	4
1.3 检测方法	5
1.4 L-半胱氨酸概述.....	5
1.4.1 L-半胱氨酸.....	5
1.4.2 L-半胱氨酸的应用.....	6
1.5 纳米硒免疫层析法（SeICA）	6
1.5.1 纳米硒免疫层析法的原理	7
1.5.2 胶体硒	8
1.6 马兜铃酸 I 的降解和纳米硒免疫层析试纸条的研究进展	8
1.6.1 马兜铃酸 I 的降解的研究进展	8
1.6.2 纳米硒免疫层析法的研究进展	9
1.7 研究目的与内容	10
1.7.1 研究目的	10
1.7.2 研究内容	10
第 2 章 马兜铃酸 I 降解条件的优化以及将其应用于实际样品降解	11
2.1 引言	11
2.2 主要仪器设备与材料	11
2.2.1 主要试剂和材料	11
2.2.2 主要仪器和设备	11
2.2.3 主要试剂配制方案	11
2.3 实验方法	12
2.3.1 L-半胱氨酸的制备.....	12

2.3.2 马兜铃酸 I 的降解	12
2.3.3 马兜铃酸 I 的降解工艺参数的优化	12
2.3.4 将优化的条件应用于实际样品	14
2.3.4.1 样品前处理	14
2.3.4.2 样品的降解	14
2.4 实验结果与分析	14
2.4.1 标准品的实验结果与分析	14
2.4.2 实际样品的运用	20
2.5 讨论	21
2.6 本章小结	23
第 3 章 快速检测马兜铃酸 I 纳米硒免疫层析试纸条的制备	24
3.1 引言	24
3.2 主要仪器设备与试剂材料	24
3.2.1 主要试剂和材料	24
3.2.2 主要仪器和设备	24
3.2.3 主要试剂的配制方案	25
3.3 实验方法	25
3.3.1 不同粒径纳米硒的合成与表征	25
3.3.2 抗体与不同纳米硒的偶联	25
3.3.3 组装免疫层析试纸条	26
3.3.4 免疫层析试纸条工艺参数的优化	26
3.4 实验结果与分析	27
3.4.1 不同纳米硒粒子的制备与表征	27
3.4.2 马兜铃酸 I 纳米硒免疫层析试纸工艺参数的评价	29
3.4.3 纳米硒免疫层析试纸条性能分析	32
3.5 讨论	35
3.6 本章小结	36
第 4 章 SeICA 与 HPLC 检测中草药中马兜铃酸 I 的比较	37
4.1 引言	37

4.2 主要仪器设备与材料	37
4.2.1 主要试剂和材料	37
4.2.2 主要仪器和设备	37
4.3 实验方法	37
4.3.1 样品的前处理	37
4.3.2 SeICA 法检测中草药中的马兜铃酸 I.....	38
4.3.2 HPLC 法在中草药中的检测	39
4.4 实验结果与分析	39
4.4.1 纳米硒免疫层析试纸条应用	39
4.4.2 HPLC 法检测中草药中的马兜铃酸 I.....	40
4.5 讨论	40
4.6 本章小结	42
第 5 章 结论与展望	43
5.1 结论	43
5.2 展望	43
致谢	45
参考文献	46
附录 A 试剂材料	54
附录 B 仪器设备.....	55
附录 C 试剂配制.....	56
攻读学位期间的研究成果	57

第1章 前言

1.1 马兜铃酸的概述

1.1.1 马兜铃酸

马兜铃酸(AAs)是硝基菲羧酸家族中的化合物,广泛存在于马兜铃科植物和各种天然中草药中^[1]。含 AAs 的草药或产品表现出多种药理活性,它们有着悠久的历史使用历史。然而,随着科学研究的进步,与 AAs 和含 AAs 的传统中药的肾毒性、致癌性和致突变性有关的不良反应已被广泛描述,导致其安全性成为社会上激烈争论的话题,虽然许多含 AA-I 含量很高的中草药已被禁止或限制,如马兜铃草和青木香,但一些马蹄莲科草药,仍在临床使用中^[2]。据报道,AAs 可分为六种不同类型:马兜铃酸 I(AA-I)、马兜铃酸 Ia(AA-Ia)、马兜铃酸 II(AA-II)、马兜铃酸 III(AA-III)、马兜铃酸 IVa(AA-IVa)、马兜铃酸 IV(AA-IV),这些类型的区别主要在于它们的结构和化学性质的微小差异,因此,在进行马 AAs 的检测和分析时,需要考虑不同类型之间的区别,以确保能够准确识别和定量各种类型的马兜铃酸^[3]。在各种类型之中,马兜铃酸 I 对人体伤害最大^[4]。AAs 及其衍生物是从马兜铃属植物和细辛属植物中分离出的化学成分,这些植物一般作为草药材料用于治疗多种疾病,例如蛇咬伤、腹泻、妇科疾病等,除此之外,含有马兜铃酸的草药和药食两用产品也被广泛应用于治疗感冒、头痛、口疮以及炎症性疾病等健康问题^[5]。近年来,一些研究表明,AAs 及其类似物具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、降血压、保肝等多种生物活性,因此备受关注,然而,这些成分也可能引起肾毒性等副作用,因此需要注意使用安全性^[6]。总之,马兜铃酸及其衍生物在医学研究和临床实践中具有广阔的应用前景^[7]。尽管许多国家对含 AAs 产品的销售、供应和进口有严格的规定,但全球范围内仍然经常报告 AAs 暴露事件,因为含 AAs 的草药仍然可以通过互联网获得,且具有相似的中国民间名称和形态^[8],许多含 AAs 的草药被错误地用作不含 AAs 的草药。

AA-I(图 1.1)是一种含有单个羧基的有机酸,化学式为 $C_{17}H_{11}NO_7$,分子量是 341.27,熔点大约为 260 °C,在 286 °C 以上才可分解^[3]。它是典型的菲-1-羧酸,结构上在 3、4、8、10 位分别被亚甲二氧基、亚甲二氧基、甲氧基、硝基所取代。除了常用的名称外,AA-I 还可以根据不同的官能团命名为一元羧酸、芳香醚 C-硝基化合物等。其中,一元羧酸指的是只有一个羧基官能团的羧酸类化

合物；芳香醚 C-硝基化合物则表示苯环上存在有一个硝基和一个氧原子的化合物。AA-I 的名称多种多样，每种命名方式都从不同的角度描述了其化学性质和结构特征。在物理性质上，AA-I 虽然难以在水中溶解，但其能够在许多有机溶剂中迅速溶解，这些有机溶剂包括甲醇、乙醇和乙腈等极性较强的溶剂。马兜铃酸 I 是马兜铃属植物和细辛属植物中含量最高的成分，是一种天然存在的有毒有害物质^[9]。毫无疑问，AA-I 是一种有毒有害的化学物质，人们已经开始担忧其高含量的草药存在着潜在的肾毒性、致癌和诱变等不良影响^[10,11]。

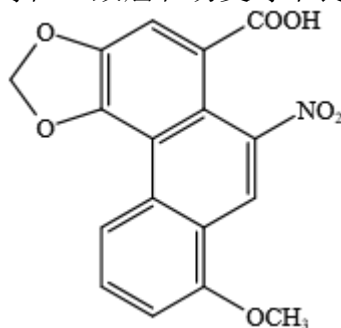


图 1.1 马兜铃酸 I 的化学结构式

Figure 1.1 Chemical structure formula of aristolochic acid I

1.1.2 马兜铃酸 I 的危害

马兜铃酸肾病（Aristolochic acid nephropathy，简称 AAN）是一种严重的肾脏疾病，以其快速进展、高度致残和可能导致死亡的风险而闻名，AAN 主要由长期接触含有马兜铃酸 I 的植物或通过食用被马兜铃酸 I 污染的食品所引起，人们广泛使用含有马兜铃草药作为传统草药疗法的一部分，这也是 AAN 流行的主要原因之一^[12]。巴尔干地区是世界上罹患肾脏疾病率最高的地区之一，其中一种被称为“巴尔干地方性肾病”的疾病备受关注^[13,14]。该病有着特殊的流行模式和严重的公共卫生问题，因其聚集性和潜伏期长、进展缓慢等特点而备受关注^[15]。据报道，该病主要影响年龄在 30 至 50 岁的男性，在患病初期可能没有明显的症状，但随着病情恶化会出现尿量减少、血压升高、贫血等表现，最终导致肾功能衰竭^[16-18]。由于该病的高发地区主要分布在巴尔干半岛地区，因此该病往往被称为巴尔干地方性肾病，对当地居民的健康和生活产生了严重影响^[19,20]。马兜铃酸肾病是一种罕见的慢性间质纤维化疾病，首次于 1992 年在比利时爆发，该病因涉及含马兜铃酸成分的中草药减肥方案的使用，给当地社区带来了严重的卫生与经济损失^[21]。据报道，在西班牙、日本、法国、英国、美国、德国、中国、韩国、

澳大利亚和孟加拉国等地区都有人患上了这种疾病^[22-31]。虽然传统疗法中的草药产品被广泛认为是安全的,但事实上,一些植物所含的毒性成分可能并未被检测到或被低估,这些毒性成分可能会对人体造成不良影响,尤其是在未经专业医师指导下使用时,此外,由于草药治疗的流行和可获得性增加,许多人选择自行购买和使用草药制品,而不了解其潜在风险^[32]。传统东方国家和地区的草药历史悠久,被广泛应用于治疗儿童某些疾病或增强体质,然而,在使用草药制剂时需要谨慎,因为一些未经严格审查的制剂可能含有危害儿童肾脏健康的肾毒性物质,如马兜铃酸 I,可以在多种植物中发现,长期摄入含有马兜铃酸的药物会对肾脏造成不可逆的损伤,导致肾功能衰竭^[33]。

上尿路上皮癌(UTUC)是一种罕见的肿瘤类型,通常起源于肾盂、输尿管或肾盏的上皮细胞,有研究发现,在患有马兜铃酸肾病的患者中切除的肾上皮组织中存在中度异型和非典型增生,这表明,马兜铃酸暴露与尿路上皮异常之间存在显著关联^[34-37]。最近关于 AAN 的研究报告了脂质代谢的显著改变,包括肾组织中的脂肪酸,磷脂和甘油酯,以及环加氧酶(COX)的表达增加,环加氧酶参与前列腺素的产生,炎症反应的介质,前列腺素是一组脂质介质,来源于 COX 通过花生四烯酸级联引发的花生四烯酸的酶代谢,COX 衍生的前列腺素介导各种细胞内过程,这些过程在介导细胞增殖、分化、凋亡和炎症病理生理学等过程中起关键作用,花生四烯酸通过 COX 的过氧化物酶活性转化为前列腺 H₂(PGH₂)。然后 PGH₂ 通过不同的合酶代谢为生物活性前列腺素类化合物,前列腺素 E₂(PGE₂),前列腺素 D₂(PGD₂),前列腺素 F_{2α}(PGF_{2α}),前列腺素 I₂(PGI₂, 前列环素)和血栓素 A₂(TxA₂),在这些前列腺素类化合物中,众所周知,PGE₂ 是肾脏中 COX-2 途径的主要产物,据报道它可以介导肾损伤^[38]。

马兜铃酸具有强烈的致癌作用,已被证实在啮齿动物、细菌和哺乳动物模型中产生诱变效应^[39-40]。除此之外,马兜铃酸还能通过代谢形成马兜铃内酰胺等代谢产物,并与 DNA 发生加合反应,形成特定的 DNA 加合物,这些加合物不仅是暴露于马兜铃酸环境的标志物,也可作为患有马兜铃酸肾病患者肾脏组织的特异性指标^[41-43]。有研究发现,马兜铃酸中的硝基还原是导致其形成 DNA 加合物的关键步骤^[44,45]。p53 是一种重要的肿瘤抑制基因,它在人类癌症中发挥着至关重要的作用,p53 基因突变与多种癌症的发生密切相关^[46]。尿路上皮癌和尿路上皮异型性是马兜铃酸肾病患者中常见的恶性转化形式,这些恶性表现与 p53 蛋白的过度表达密切相关,进一步分析发现,在马兜铃酸肾病相关的尿路上皮癌中,

p53 基因也发生了突变, 导致其过度表达^[47]。马兜铃酸肾病患者服用含有该毒素的药物后, 其 p53 基因中的 DNA 结合谱与来自肿瘤的 p53 突变谱相比存在特定加合物形成, 这表明该加合物可能与马兜铃酸诱导的 p53 突变有关, 这些突变可能会导致人类肿瘤的发生^[48]。

一项研究发现, 摄入含有马兜铃酸的物质会导致肾小管细胞凋亡, 此外, 自噬也被证明是一种清除受损细胞器和蛋白质的重要过程^[49-50]。自噬通过一系列复杂的信号通路进行调节, 其中 ULK、mTOR 和 AMP 活化蛋白激酶是其中的关键调节因子^[51]。AA-I 通过多种分子机制导致肾损伤, 其中包括细胞凋亡和自噬等, 具体来说, AA-I 会引起线粒体的功能失调, 导致氧化应激反应和线粒体质量受损^[52]。自噬是一种重要的细胞代谢过程, 通过自我消化和再利用不必要或损坏分子来维持细胞内物质平衡, 自噬在细胞生长、发育、应激响应、免疫调节等各个方面都具有重要作用, 自噬也是一个复杂而多功能的过程, 在细胞生理和病理状态下都发挥着至关重要的作用^[53]。在小鼠急性马兜铃酸肾病模型中, 研究人员发现自噬是一种重要的细胞代谢途径, 可通过促进蛋白质降解和废旧细胞器清除等机制来维持细胞内环境的平衡, 研究表明, 自噬在缓解肾损伤方面发挥了关键作用, 具体而言, 自噬减轻了非凋亡性细胞死亡, 进而保护了肾脏免受马兜铃酸引起的毒性损害^[54]。

马兜铃肾病患者组织学报告显示肾脏已进入终末期前段或终末期, 但值得注意的是, 也有些患者在短期马兜铃中毒后(如摄入含马兜铃酸过量的保健品)会出现急性肾小管间质性肾炎的表现, 这种情况相对较为罕见^[55,56]。马兜铃酸引起的急性近曲小管上皮细胞坏死与早期间质炎症状有关, 在慢性小管损伤进展至小管萎缩和间质纤维化时, 炎症细胞可能是有毒近曲小管上皮细胞损伤与肾脏纤维化之间生理和病理联系的桥梁, 因此, 肾间质中炎症细胞的存在对于马兜铃酸诱导的肾脏疾病的发展起着至关重要的作用^[57]。

1.2 限量标准

人们对马兜铃酸草药的关注以及对它的限制经过了漫长的发展, 至今还未十分完善。自 20 世纪 60 年代我国学者吴松寒报道了马兜铃酸诱发急性肾功能衰竭以来到 1994 年比利时大面积爆发肾病, 越来越多的国家、地区或组织开始关注马兜铃酸, 并提出了一些应对措施。包括法国、英国、欧盟、世界卫生组织

(WHO)、国际癌症研究机构(IARC)和亚洲一些国家^[58-64]。在 2012 年,国际癌症研究机构(IARC)对 AA-I、AA-II 和马兜铃内酰胺进行了评估,并将它们归类为已证实的人类 I 类致癌物^[65]。2015 年版《中国药典》收录了马兜铃属 3 种药物。然而,2020 年版对这些药物的质量标准进行了更新。其中,中药材细辛干燥样品中 AA-I 的含量不得超过 0.001% (即 10 mg/kg),且马兜铃和天仙藤等被证实含有马兜铃酸的中药材不再被收录。此外,去除了寻骨风、朱砂莲、青木香、关木通和广防己等中草药的相关记录。这些变化反映了对中药材的质量控制和安全性持续关注 and 更新。

1.3 检测方法

目前,检测含有毒性化合物马兜铃酸 I 的方法有多种。其中包括高效液相色谱紫外检测法(HPLC-UV)、毛细管电泳电化学检测法(CE-ED)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)等^[66-73]。这些方法在不同场景下都具有优缺点,需要根据实际情况进行选择。至今,我国暂无报道在中草药中马兜铃酸 I 的相关检测标准。我国已经制定了适用于皮肤护理类化妆品和烟用添加剂中马兜铃酸 I 的 HPLC 检测方法。该方法具有高度准确性和可靠性,其检出限分别为 0.3 mg/kg 和 0.37 mg/kg。这种方法采用了成熟的技术,能够有效地检测马兜铃酸 I 在化妆品和烟用添加剂中的含量,从而保障了人们的健康和生命安全。

1.4 L-半胱氨酸概述

1.4.1 L-半胱氨酸

L-半胱氨酸(L-Cysteine CAS Reg.No.52-90-4)是一种无色至白的细柱状结晶或者白色结晶性粉末,有轻微特殊气味和滋味(略酸),分子量为 121.16,分子式为 $C_3H_7NO_2S$,熔点为 220 °C,密度为 1.197 g/cm³ (19 °C),是最小的氨基酸分子,L-半胱氨酸的化学式结构如图 1.2 所示^[74]。

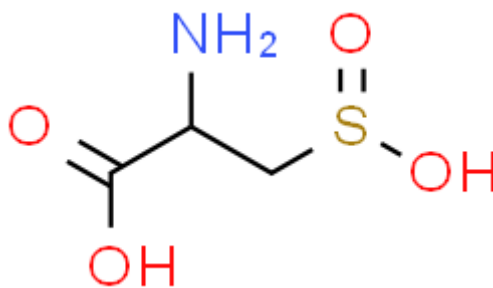


图 1.2 L-半胱氨酸化学结构式

Figure 1.2 Chemical structure formula of L-Cysteine

1.4.2 L-半胱氨酸的应用

L-半胱氨酸是一种非极性的、含有硫原子的氨基酸，是构成蛋白质中不可缺少的 20 多种氨基酸之一，它在生物体内具有重要的生理功能，如参与蛋白质的稳定化、抗氧化作用、维持二级结构以及信号转导等，相比其他氨基酸，L-半胱氨酸具有独特的活性巯基，因此在蛋白质合成和修饰中起着重要的作用，同时，这个活性巯基还能与其他分子形成二硫键，使得蛋白质分子间或者蛋白质与其他小分子之间的交互变得更加复杂和多样化，L-半胱氨酸被广泛应用于生物医药、生物化妆品以及食品中^[75]。

据报道，L-半胱氨酸可以通过还原反应可以将有毒的马兜铃酸 I 转化为无毒的马兜铃次酸^[76-80]，该反应如图 1.3 所示^[76]。

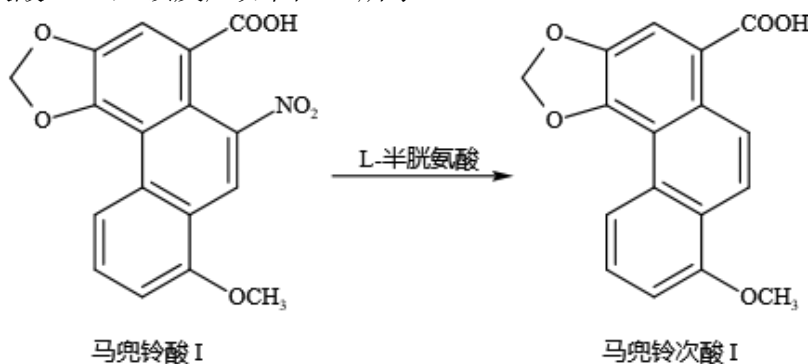


图 1.3 马兜铃酸 I 的降解

Figure 1.3 Degradation of aristolochic acid I

1.5 纳米硒免疫层析法 (SeICA)

免疫层析试纸条 (ICS) 是一种基于免疫学原理的快速检测技术，主要应用

于临床、环境监测和食品安全等领域，该技术利用了抗体与抗原之间的特异性反应，结合了纳米粒子标记技术和层析分析技术，可以在几分钟内对样本进行定性或半定量分析，相比于传统的检测方法，ICS 具有操作简单、结果迅速、灵敏度高和成本低等优势，因此备受青睐^[81]。疫情期间，ICS 还被广泛应用于新冠病毒检测，成为防控疫情的重要手段之一。免疫层析试纸条是一种常见的快速诊断工具，其结构主要包括样品垫、结合垫、PVC 底板、纤维素膜、检测线、质控线和吸收垫。其中，样品垫用于接收待检测样品，结合垫则含有与待检测物质特异性反应的荧光或酶标记抗体。当样品通过结合垫时，若存在与抗体相匹配的目标分子，则会形成复合物并继续沿着纤维素膜向前移动。如果在检测线上存在目标分子，则会与复合物结合并产生特定信号，从而进行初步的分析判断；而质控线则用于验证试剂盒的有效性。样品溶液在试纸条上通过毛细管作用力从样品垫开始一直移动至吸收垫，如图 1.4 所示。

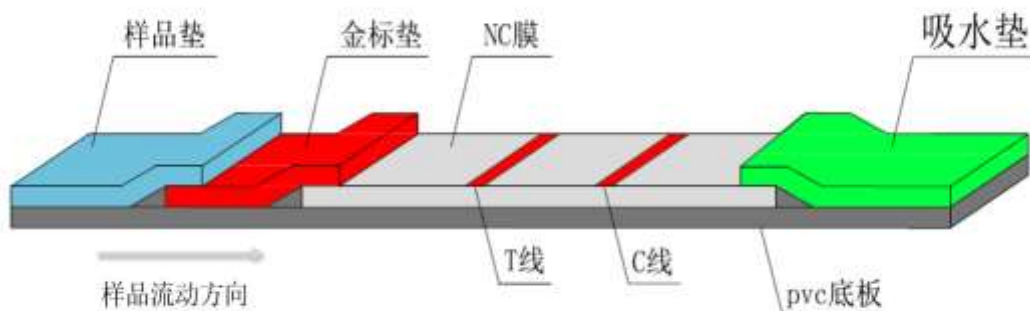
图 1.4 免疫层析试纸条结构示意图^[82]

Figure 1.4 Schematic diagram of the structure

1.5.1 纳米硒免疫层析法的原理

夹心形式和竞争形式是免疫层析试纸条的两种主要形式^[83]。

夹心式免疫层析试纸条常用于检测大分子目标分析物。试纸条上有 T 线和 C 线，分别固定了一抗和二抗，同时，在结合垫上施加了纳米粒子标记的一抗。当样品溶液滴加到样品垫上时，目标分析物与标记的一抗形成复合物，并在 NC 膜的协助下逐渐迁移到吸收垫上。与传统的免疫层析试纸条不同的是，夹心式免疫层析试纸条采用了夹心结构，将吸收垫置于两个结合垫之间，从而增加了反应面积，提高了检测灵敏度。夹心反应体系由上下两个薄膜组成，其中上面的薄膜

涂有对目标分析物特异性的捕获抗体，而下面的薄膜则涂有与其特异结合的金标抗体。当样品中存在目标分析物时，它将被捕获抗体所识别并结合，形成捕获-分析物-金标抗体夹心复合物，这种复合物会沿着薄膜向上移动，并在捕获抗体处停留，导致 T 线上出现颜色信号，同时，金标抗体也会与捕获-分析物复合物发生结合，从而在 C 线上显示出颜色信号。如果样品中不存在目标分析物，则只有 C 线会显色^[84]。

针对小分子分析物的免疫层析试纸条，常采用竞争形式进行。在这种设计中，抗原偶联蛋白被固定在 T 线上，而二抗则被固定在 C 线上。通过在金标垫上加入带有纳米粒子标记的一抗，检测样品中是否含有目标小分子分析物。这种试纸条适用于检测分子量较低和抗原决定簇单一的小分子分析物将样品溶液中含有超过一定量的目标分析物。当目标分析物被加入样品垫后，它会与特异性金标抗体竞争结合在抗原结合位点上。在经过金标垫后，金标抗体已被占据，因此只能与次级抗体（即 C 线二抗）结合，而不能与捕获抗原结合，阳性样品只有 C 线显色，而阴性样品则同时有 T 线和 C 线显色^[85]。

1.5.2 胶体硒

胶体硒溶液（Selenium nanoparticles, SeNPs）是一种新兴的材料，其制备方法为亚硒酸（ H_2SeO_3 ）经过还原反应得到^[86]。相比于传统硒化合物，纳米硒粒子具有较小的粒径、良好的生物相容性以及易于与生物分子结合等优点，在医药、食品和环境领域具有广泛的应用前景，同时，研究表明通过添加 L-抗坏血酸等还原剂以及稳定剂可以有效地调节纳米硒粒子的形貌和大小，进一步优化其不同领域中的应用效果，除此之外，纳米硒粒子还具有抗氧化、抗菌等多种生物学活性，因而备受关注^[87]。硒纳米粒子是一种制备简单且无需加热的纳米材料。与传统的金纳米粒子相比，硒纳米粒子在保证灵敏度的前提下制备试纸条的成本更低，这使得基于硒纳米粒子的免疫层析试纸（SeICA）具有更高的经济性和可行性^[88]。

1.6 马兜铃酸 I 的降解和纳米硒免疫层析试纸条的研究进展

1.6.1 马兜铃酸 I 的降解的研究进展

Priestap 等^[76]报道了马兜铃酸 I 的氢解反应，即对其中硝基的还原，可借助

半胱氨酸或谷胱甘肽在 pH=7.0、37 °C 的水溶液中进行，而生成无毒的马兜铃次酸 I。Wang 等^[77]采用 L-半胱氨酸将没有荧光的马兜铃酸 I 和 II 降解成了有强烈荧光的马兜铃次酸 I 和 II。马兜铃酸 I 的结构中，硝基（-NO₂）是决定其毒性的关键因素，L-半胱氨酸可对硝基的进行还原使马兜铃酸 I 失去大部分毒性^[78]。马兜铃酸 I 结构中的硝基可被氢取代而还原，生成马兜铃次酸（Aristollic acid）^[79]。然而，该反应效率较低^[89]。为了提高反应效率，可以通过探究和优化实验方法来实现。

1.6.2 纳米硒免疫层析法的研究进展

Mees 等^[90]报道硒纳米粒子可由抗坏血酸钠还原亚硒酸所制备，并且实验结果良好。Zhang 等^[86]报道了一种合成方法，用于制备稳定的单分散球形硒纳米颗粒，该方法利用抗坏血酸还原亚硒酸溶液，并在多糖的存在下进行反应，多糖包括壳聚糖、魔芋葡甘露聚糖、阿拉伯树胶和羧甲基纤维素等，这些多糖对于稳定硒纳米颗粒起到了重要的作用。Wang 等^[91]阐述了一种基于硒纳米粒子的免疫层析分析法，用于检测乳制品或其他食品中是否含有三聚氰胺，具体步骤包括室温下使用 L-抗坏血酸还原硒酸来合成 SeNPs，并将其与抗 MEL 单克隆抗体结合以制备试纸条。该试纸条的灵敏度很高，可以检出 150 µg/kg 以下的氰化物含量，并且在奶粉和动物饲料中可以检测到 1000 µg/kg 和 800 µg/kg 的氰化物含量。同时，该试纸条还具有不与氰尿酸、氰尿二酰胺或酰胺同系列物质发生交叉反应的特性，从而保证测试结果的准确性。除此之外，该试纸条还有一个显著的优点，即能够长期稳定地保存。根据实验结果显示，即使在常温下存放 1 年，该试纸条仍能保持良好的品质和准确性。这一特性极大地方便了使用者的操作，并降低了使用成本。Zhang 等^[92]探讨了在壳聚糖存在下，以抗坏血酸还原亚硒酸钠合成球形硒纳米颗粒的过程，并比较了不同分子量壳聚糖的作用，研究结果显示，在 30 天的生长过程中，低分子量和高分子量壳聚糖均可通过自下而上和自上而下的方法稳定合成的硒纳米颗粒。这些纳米颗粒具有核壳结构，直径约为 103 纳米。Wang 等^[88]使用 L-抗坏血酸还原亚硒酸作为硒离子的还原剂，并添加 SDS 和 PEG 作为稳定剂，以促进纳米硒颗粒的形成和稳定性。该试纸条可用于室温下对克仑特罗 (CLE) 的检测，并且可以在猪尿中检出低至 3 ng/mL 的 CLE。此外，经过实验验证，该试纸条保存一段时间后依旧能再次检测。这一发现为 CLE 的快速、准确检测提供了可能性，并有望在农业和环境监测领域得到广泛应用。Wang 等

[93]利用也硒纳米粒子制备了试纸条，实验结果符合预期且试纸条特异性和稳定性良好。

由上可知，制备纳米硒免疫层析试纸条检测 AA-I 毒素是经济可行的。

1.7 研究目的与内容

1.7.1 研究目的

AA-I 是一种有毒物质，具有强肾毒性、致癌性和致突变性，会对人体造成巨大的伤害，且难以通过加热的方式使其降解为无毒物质。尽管美国食品和药物管理局（FDA）、欧洲药品管理局（EMA）和国际癌症研究机构（IARC）就含有马兜铃酸的产品的安全性发出警告，但包括中国在内的一些亚洲国家仍在使用含有马兜铃属植物成分的药物 [94-96]，且这些药物可以通过互联网轻松购买。因此，对中草药中 AA-I 含量的控制，对保护人们的身体健康有重要意义。

对中草药中 AA-I 含量的控制，可从降解与检测这两方面入手。

对于 AA-I 的降解，可以采用 L-cy 还原的方法^[76]，虽然该反应较慢^[89]，但通过优化条件可提高反应速率，在短时间内将 AA-I 转化为无毒物质，可大幅度降低 AA-I 所带来的伤害。

对于 AA-I 的检测，传统的仪器检测方法虽能定量检测，但费时费力，便捷性低。快速免疫层析试纸条，具有即时即地检测、便捷性高、经济高效、即学即用等优点。本研究将着眼于通过用更具经济效益的纳米硒颗粒作为标记物以研制免疫层析试纸条，可随时随地对 AA-I 含量进行检测，有效的保护人们的身体健康。

1.7.2 研究内容

本研究实验内容如下：

- （1）马兜铃酸 I 降解条件的优化；
- （2）将优化的降解条件应用于实际样品；
- （3）快速检测马兜铃酸 I 硒纳米免疫层析试纸条的研制；
- （4）将研制的硒纳米免疫层析试纸条应用于实际样品并作验证。

第 2 章 马兜铃酸 I 降解条件的优化以及将其应用于实际样品降解

2.1 引言

马兜铃酸是一种由许多植物产生的有毒化合物，主要存在于马兜铃科植物的种子、根茎和叶子中，它具有肾毒性和致癌性，并且已被国际癌症研究机构（IARC）列为 I 类致癌物，被认为对人体健康有潜在的威胁^[97]。马兜铃酸 I 是一种在自然界中普遍存在的毒性化合物，属于二苯并喹啉酮类化合物，它主要分布在马兜铃属植物中^[98]。

L-半胱氨酸具有独特的活性巯基，能与其他分子形成二硫键，使得蛋白质分子间或者蛋白质与其他小分子之间的交互变得更加复杂和多样化，现今已在医药、食品添加剂和化妆品中广泛应用^[75]。通过进行还原降解马兜铃酸 I 是控制马兜铃酸 I 的有效途径之一，影响降解效率的条件，一般有 L-cy 的摩尔浓度、与马兜铃酸 I 的体积比、温度、pH。

本章的主要内容为，探究在 0-5 h 之内不同条件对马兜铃酸 I 降解效率的影响，直至探究出较佳的降解条件，最后应用于实际样品的降解。由于马兜铃酸 I 的具体含量无法用试纸条和酶标仪测出，故本实验对马兜铃酸 I 降解前后的含量采用 HPLC 测定。

2.2 主要仪器设备与材料

2.2.1 主要试剂和材料

见附录 A。

2.2.2 主要仪器和设备

见附录 B。

2.2.3 主要试剂配制方案

见附录 C。

2.3 实验方法

2.3.1 L-半胱氨酸的制备

称取 L-cy 粉末，溶解，制成 5 mL L-cy 水溶液，置于 4 °C 冰箱保存。当 L-cy 水溶液浓度超过 0.15 mol/L，置于 4 °C 冰箱保存时，会有晶体析出，故本实验采用的最大 L-cy 溶液浓度为 0.15 mol/L。

2.3.2 马兜铃酸 I 的降解

马兜铃酸 I 的降解步骤如下：

- (1) 采用甲醇作为稀释剂，将高浓度标准品稀释为理想浓度的标准品，获得样品溶液。配置一定比例流动相，观察出峰时间。
- (2) 采用甲醇作为稀释剂，将高浓度标准品稀释为理想浓度的标准品，使用 HPLC 对马兜铃酸 I 标准品工作液进行检测，绘制马兜铃酸 I 标准曲线。
- (3) 取干燥洁净的玻璃烧杯，加入一定量 L-cy 溶液，置于磁力搅拌上，使其以合适的速度匀速搅拌，再添加一定量马兜铃酸 I 标准品。
- (4) 加入 1% K_2CO_3 溶液，并利用 pH 试纸测定溶液的 pH 值。
- (5) 在一定温度下进行降解反应，取降解 0、1、2、3、4、5 h 后的溶液作为样品溶液。
- (6) 采用 HPLC 测定降解之后马兜铃酸 I 的含量。

2.3.3 马兜铃酸 I 的降解工艺参数的优化

2.3.3.1 马兜铃酸 I 出峰时间的优化

在色谱条件为 C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱，流速为 1.0 mL/min，以 30 °C 柱温进样，20 μ L 量的情况下，分别采用流动相比比例为乙腈：1%冰醋酸水溶液为 60:40 (v/v)、70:30 (v/v)、75:25 (v/v)、80:20 (v/v)，观察出峰时间。

2.3.3.2 标准曲线的绘制

采用甲醇作为稀释剂，将高浓度标准品稀释为理想浓度的标准品，获得样品溶液。得到一组浓度分别为 50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 的样品溶液，采用 HPLC 对上述一组浓度的 AA-I 样品溶液进行检测，得出检测结果。分别将 AA-I 样品溶液质量浓度做为横坐标，HPLC 中的峰面积作为为纵坐标，建立标准曲线，之后进行加标回收处理。

2.3.3.3 L-半胱氨酸质量浓度的优化

L-cy 质量浓度的优化实验步骤如下：

(1) 分别称取 0.0061、0.0303、0.0605、0.0908 g L-cy 固体粉末，溶解于 5 mL 超纯水中，制成质量浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.15 M L-cy 溶液，置于 4 °C 冰箱保存。

(2) 取洁净干燥的玻璃烧杯（5 mL），分别加入 L-cy 溶液，置于磁力搅拌器上，使其以合适的速度匀速搅拌，再添加一定量马兜铃酸 I 标准品。

(3) 在一定温度下进行降解反应，取降解 0、1、2、3、4、5 h 后的溶液作为储备液。

(4) 采用 HPLC 测定降解之后马兜铃酸 I 的含量，记录马兜铃酸 I 的降解随时间的变化情况。

2.3.3.4 L-半胱氨酸与马兜铃酸 I 体积比的优化

L-半胱氨酸与体积比的优化实验步骤如下：

(1) 取洁净干燥的玻璃烧杯（5 mL），分别加入 L-cy 溶液，置于磁力搅拌器上，使其以合适的速度匀速搅拌，再添加一定量马兜铃酸 I 标准品。其中，加入的 L-cy 溶液与马兜铃酸 I 溶液的体积比分别为 3：1、2：1、1：1、1：2 以及 1：3。

(2) 在一定温度下进行降解反应，取降解 0、1、2、3、4、5 h 后的溶液作为储备液。

(3) 采用 HPLC 测定降解之后马兜铃酸 I 的含量，记录马兜铃酸 I 的降解随时间的变化情况。

2.3.3.5 降解 pH 值的优化

降解 pH 值的优化实验步骤如下：

(1) 取洁净干燥的玻璃烧杯（5 mL），分别加入 L-cy 溶液，置于磁力搅拌器上，使其以合适的速度匀速搅拌，再添加一定量马兜铃酸 I 标准品。

(2) 加入不同量的 1% K₂CO₃ 溶液，并利用 pH 试纸测定溶液的 pH 值。

(3) 在一定温度下进行降解反应，取降解 0、1、2、3、4、5 h 后的溶液作为样品溶液。

(4) 采用 HPLC 测定降解之后马兜铃酸 I 的含量，记录马兜铃酸 I 的降解

随时间的变化情况。

2.3.3.6 降解温度的优化

降解温度的优化实验步骤如下：

(1) 取洁净干燥的玻璃烧杯 (5 mL)，分别加入 L-cy 水溶液，置于磁力搅拌器上，使其以合适的速度匀速搅拌，再添加一定量马兜铃酸 I 标准品。

(2) 加入一定量的 1% K_2CO_3 溶液。

(3) 在不同温度下进行降解反应，取降解 0、1、2、3、4、5 h 后的溶液作为样品溶液。

(4) 采用 HPLC 测定降解之后马兜铃酸 I 的含量，记录马兜铃酸 I 的降解随时间的变化情况。

2.3.4 将优化的条件应用于实际样品

2.3.4.1 样品前处理

选取马兜铃酸样品检测。采用甲醇进行提取，方法为：先将实际样品用高速粉碎机粉碎，粉碎至粉末状；再利用 100 目筛进行筛选，用自封袋收集；接下来，向 0.5 g 实际样品加入 2 mL 甲醇，快速混匀 6 min；之后，利用离心机进行离心操作，20 min 后，将离心后获得的上清液在 0.22 μm 滤膜上过滤两次，再利用甲醇稀释 10 倍，获得样品溶液。

2.3.4.2 样品的降解

将优化好的条件应用于处理后的样品，采用 HPLC 进行检测，得出样品随时间的降解情况。

2.4 实验结果与分析

2.4.1 标准品的实验结果与分析

2.4.1.1 不同流动相比比例的出峰时间

当选用 0.2 $\mu g/mL$ AA-I 标准品当作储备液，采用流动相比比例为乙腈：1%冰醋酸水溶液为 60:40 (v/v)、70:30 (v/v)、75:25 (v/v)、80:20 (v/v)，采用 HPLC 检测，出峰时间分别为 33 min、23 min、18 min、16.8 min (图 2.1 所示)。为了

降低检测时间对降解效果随时间变化的影响，应尽可能选用出峰时间短的流动相比，故本文选取流动相比比例为乙腈：1%冰醋酸水溶液 80:20 (v/v)。当选用更高的流动相比比例，在检测实际样品时，会导致一些峰不能分开，以至于出现双头峰情况，无法检测出 AA-I 具体含量。

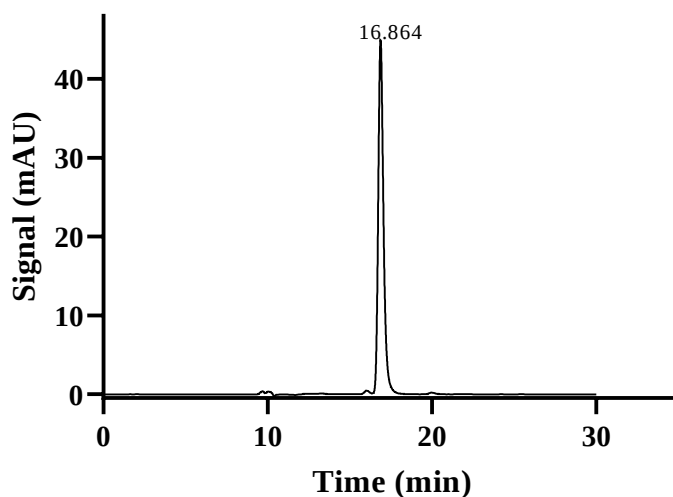


图 2.1 出峰时间

Figure 2.1 Peak time

2.4.1.2 标准曲线的建立

分别将 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ AA-I 标准品作为储备液，用 HPLC 对其进行检测，记录峰面积，绘制出 AA-I 的标准曲线图（图 2.2），所得回归方程为 $y=257.8x-5.924$ ， $R^2=0.9991$ ，证明该工作曲线线性相关性良好。在之后的实验中，以此标准曲线结合 HPLC 检测出的峰面积计算出 AA-I 的具体含量。

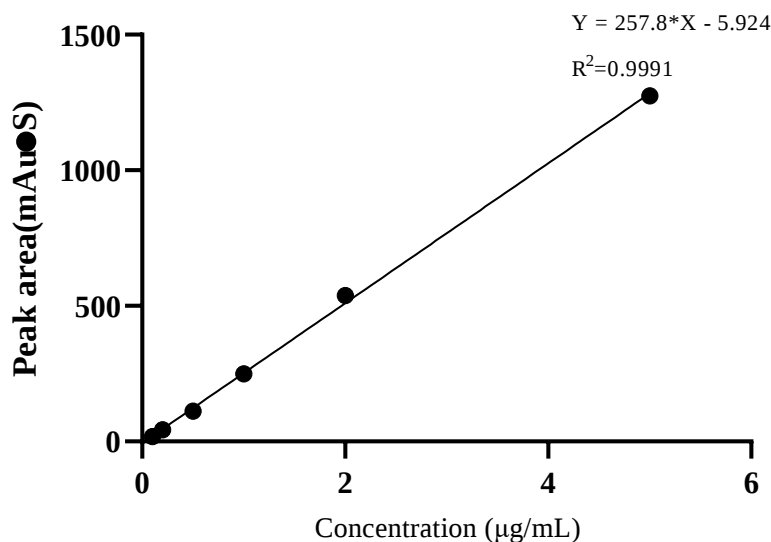


图 2.2 标准曲线

Figure 2.2 standard chromatogram

2.4.1.3 L-半胱氨酸质量浓度对降解的影响

分别用 1.5 mL 0.01、0.05、0.10、0.15 M L-cy 溶液与 0.5 mL 8 µg/mL AA-I 标准品进行反应，结果如图 2.3 所示。当利用 0.15 M L-cy 溶液降解时降解效果最好，且在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段，分别降解了 697.8、1084.6、1383.4、1538.3、1596.5 ng/mL，降解率分别为 34.9、54.2、69.2、76.9、79.8%；在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5h 时间段，分别降解了 697.8、386.8、298.8、154.9、58.2 ng/mL，降解率分别为 34.9、19.3、15.0、7.7、2.9%。由图可得知当 L-cy 溶液质量浓度越高，降解效率越高，且随着反应的进行降解效率越来越低。这是因为当底物浓度越少时，反应也就更缓慢。当选用 0.10、0.15 M L-cy 溶液两者的降解效率未像 0.01、0.05 M L-cy 溶液两者的降解效率差别那么大，可能是因为越接近反应阈值，随质量浓度的影响越小，故在后续的实验优化过程中，选择 L-cy 溶液质量浓度为 0.15 M，进行进一步优化。

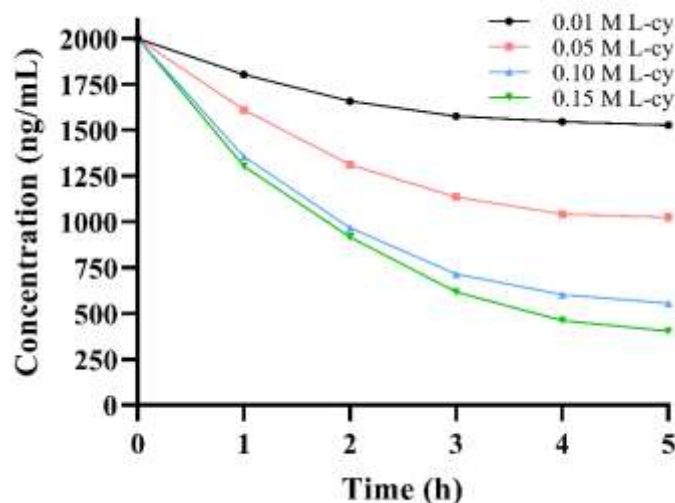


图 2.3 质量浓度降解曲线

Figure 2.3 Mass concentration degradation curves

2.4.1.4 体积比对降解的影响

利用 0.15 M L-cy 溶液与 AA-I 标准品以不同体积比进行反应，结果如图 2.4 所示。当利用 0.15 M L-cy 溶液体积比为 3: 1 降解时降解效果最好且在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 时间段，分别降解了 697.8、1084.6、1383.4、1538.3、1596.5 ng/mL，降解率分别为 34.9、54.2、69.2、76.9、79.8%；在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5h 时间段，分别降解了 697.8、386.8、298.8、154.9、58.2 ng/mL，降解率分别为 34.9、19.3、15.0、7.7、2.9%。由图可得知当 0.15 M L-cy 溶液与 AA-I 标准品体积比越高时，降解效率越高，且随着反应的进行降解效率越来越低；当体积比 3: 1 和 2: 1 降解反应效率只有细微的差别，可能是因为 L-cy 溶液质量浓度很高，在体积比 3: 1 和 2: 1 的条件下都可以进行充分反应，已不用探究更高体积比的降解效率。故在后续的实验优化过程中，选择 L-cy 溶液质量浓度为 0.15 M、体积比为 3: 1，进行进一步优化。

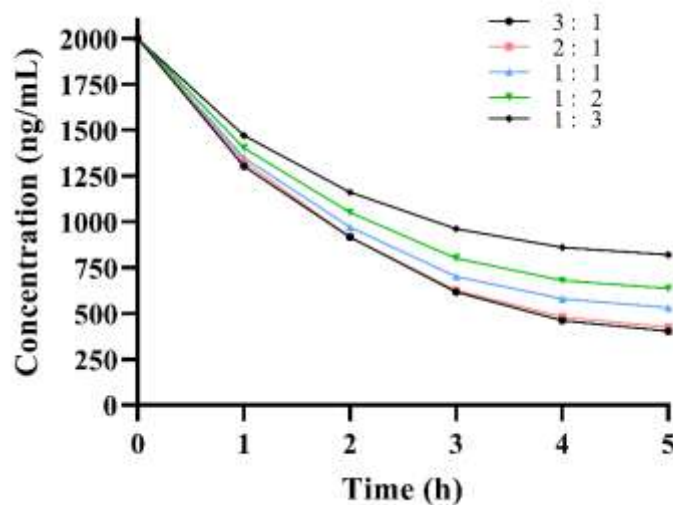


图 2.4 体积比降解曲线

Figure 2.4 Degradation curves of volumetric

2.4.1.5 pH 对降解的影响

利用 0.15 M L-cy 溶液与 AA-I 标准品以体积比 3: 1, 加入不同量的 1% K_2CO_3 溶液, 并测定降解溶液的 pH 值, 进行充分反应, 结果如图 2.5 所示。由图可得知, 当利用 0.15 M L-cy 溶液、体积比为 3: 1 且 pH 为 6.0 时, 降解效果最好; 在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段, 分别降解了 829.1、1273.7、1575.8、1779.5、1849.9 ng/mL, 降解率分别为 41.5、63.7、78.8、89.0、92.5%; 在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5 h 时间段, 分别降解了 829.1、444.6、302.1、203.7、70.4 ng/mL, 降解率分别为 41.5、22.2、15.1、11.8、3.5%。由图可得知, 反应条件 pH 从最好到最差的排序为 6.0、5.5、6.5、7.0; 当 pH 为 6.0 时, 是最佳 pH 反应条件。故在后续的实验优化过程中, 选择 L-cy 溶液质量浓度为 0.15 M、体积比为 3: 1, 以及 pH 为 6.0, 进行进一步优化。

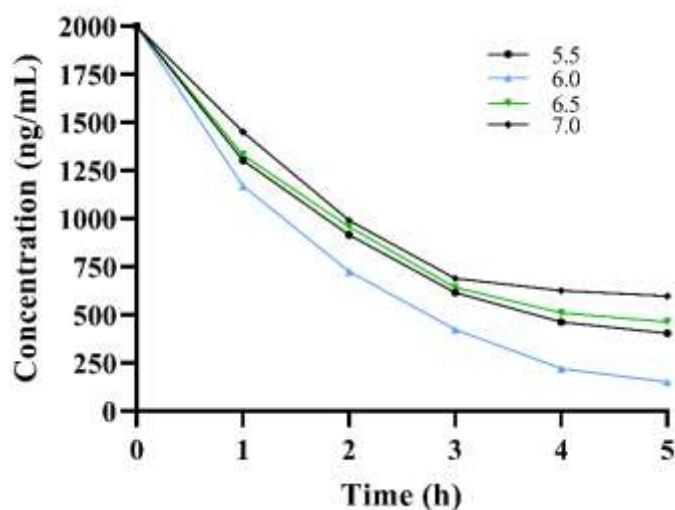


图 2.5 pH 降解曲线

Figure 2.5 Degradation curve of pH

2.4.1.6 温度对降解的影响

利用 0.15 M L-cy 溶液与 AA-I 标准品以体积比 3: 1, 加入一定量的 1% K_2CO_3 溶液, 用精密 pH 试纸测定降解溶液的 pH 值, 以不同的温度进行充分反应, 结果如图 2.6 所示。由图可得知, 当利用 0.15 M L-cy 溶液、体积比为 3: 1、pH 为 6.0 且温度为 60 °C, 降解效果最好; 在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段, 分别降解了 1149.8、1712.3、1864.7、1910.5、1942.4 ng/mL, 降解率分别为 57.5、85.6、93.2、95.5、97.1%; 在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5 h 时间段, 分别降解了 1149.8、562.5、154.2、45.8、31.9 ng/mL, 降解率分别为 57.5、28.1、7.6、2.3、2.1%。本研究发现, 当底物浓度越接近于 0 时, 降解反应速率会显著下降。本文欲探究更高温度对降解效率的影响, 但是当温度超过 60 °C 会产生蒸汽 (甲醇的沸点为 64.8 °C)。若利用回流装置需收集全部液体会导致时间过长而影响实际结果出现较大偏差。

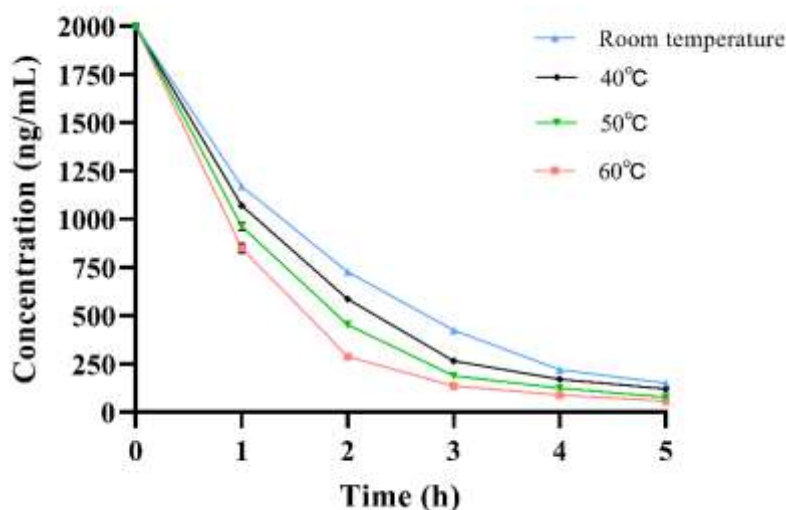


图 2.6 温度降解曲线

Figure 2.6 Degradation curve of temperature

2.4.2 实际样品的运用

将处理后的实际样品（即马兜铃、细辛、天仙藤实际样品）作为储备液，利用 HPLC 检测，计算得出原始实际样品的实际浓度分别为 3261.2、2567.2、2580.6 ng/mL。

利用 0.15 M L-cy 溶液与 AA-I 标准品以体积比 3: 1，加入一定量的 1% K_2CO_3 溶液，用精密 pH 试纸测定降解溶液的 pH 值，以 60 °C 温度与实际样品进行充分反应，结果如图 2.7 所示。实际样品马兜铃（如图 2.7 A），在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段，分别降解了 419.1、610.7、661.2、675.9、689.7 ng/mL，降解率分别为 51.4、74.9、81.1、82.9、84.6%；在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5 h 时间段，分别降解了 338.2、191.6、50.5、14.7、13.8 ng/mL，降解率分别为 51.4、23.4、6.2、1.8、1.7%。实际样品细辛（如图 2.7 B），在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段，分别降解了 338.2、489.7、528.2、538.5、546.8 ng/mL，降解率分别为 52.7、76.3、82.4、83.9、85.2%；在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5 h 时间段，分别降解了 338.2、151.5、38.5、10.3、7.7 ng/mL，降解率分别为 52.7、23.6、6.1、1.5、1.3%。实际样品细辛（如图 2.7 C），在 0-1、0-2、0-3、0-4、0-5 h 时间段，分别降解了 349.7、495.5、540.0、551.6、560.7 ng/mL，降解率分别为 54.2、76.8、83.7、85.5、86.9%；在 0-1、1-2、2-3、3-4、4-5 h 时间段，分别降解了 349.7、

145.8、45.5、11.6、9.1 ng/mL，降解率分别为 52.7、23.6、6.1、1.5、1.3%。

由上可知，三种实际样品随反应的进行，降解效率越来越低，且降解率的走势与标准品相似，但是低于标准品。这是由于实际样品中杂质较多影响了反应的进行，或者有其它物质与 L-cy 进行了反应，导致反应效率降低。

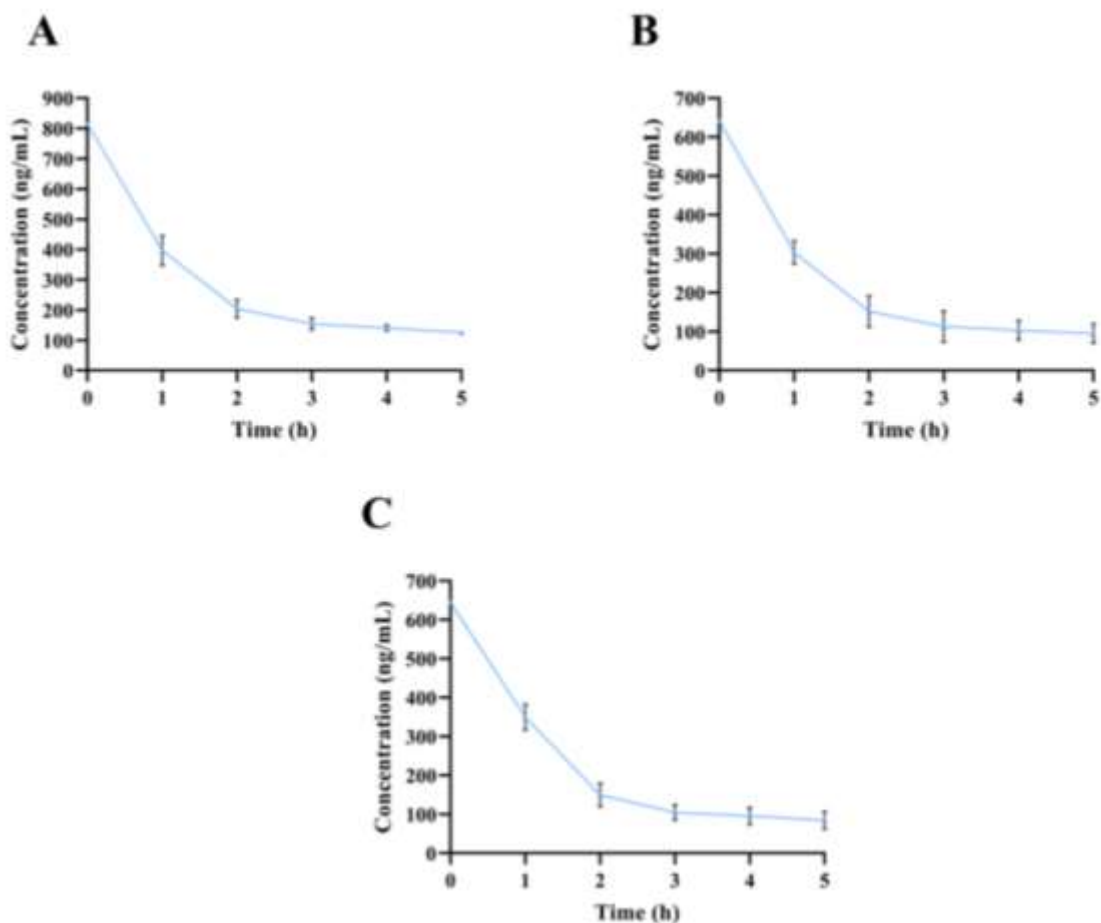


图 2.7 实际样品的降解 (A)马兜铃; (B)细辛; (C)天仙藤

Figure 2.7 Degradation of actual samples (A) Aristolochia; (B) Mangosteen; (C) Amanita vine

2.5 讨论

L-cy 是构成蛋白质 20 多种氨基酸唯一具有独特的活泼的（巯基）氨基酸同时是一种小的两性离子分子，广泛用于生化和电化学研究，这也导致了 L-cy 能够与 AA-I 发生反应。有研究表明^[76]L-cy 可以将没有荧光的 AA-I 降解成有强烈荧光的马兜铃次酸。

本研究在探究降解后的含量时，一开始为了能够快速检测出具体浓度，利用了酶标仪和分光光度计等仪器测定，发现由于 AA-I 浓度过低，难以利用酶标仪和分光光度计等仪器测定具体含量，最后只能利用 HPLC 测定。虽然 HPLC 测定会耗费较长时间，但本研究优化了出峰时间，在一定程度上，降低了该方法对实验的影响。

在降解过程中，L-cy 将 AA-I 上-NO₂ 还原为-H，使得有毒的 AA-I 转变为无毒的马兜铃次酸，但是具体反应过程无法得知，导致无法通过直接计算来验证实验的准确性，只能通过重复实验降低误差，故本章的所有实验都进行了三次平行实验，组内误差良好。在优化 L-cy 质量浓度过程中，发现质量浓度越高时，反应速率越高，本文最高的质量浓度是 0.15 M，是由于在这种情况下 L-cy 溶液已接近饱和；在优化体积比时，体积比为 2: 1 和 3: 1 在反应速率上没有太大区别，体积比 3: 1 只略微高于 2: 1，可能是因为此时已接近反应的阈值；在优化温度时，没有去探究更高温度对实验的影响是由于甲醇的沸点接近于 60°C，若继续探究更高温度对实验的影响，会导致甲醇沸腾蒸发。本研究利用回流装置避免甲醇挥发，但是在之后收集液体时，耗费时间过长，会对实验造成误差。在实验过程中，反应速率会随着底物浓度下降而下降，特别是当底物浓度低于 200 ng/mL，反应速率会显著下降。

在测定实际样品是，发现实际样品的反应速率在每个时间段都要低于标准品的反应速率，可能是由于实际样品中杂质较多与 L-cy 发生了反应，或者是杂质影响了反应过程。在利用 HPLC 测定实际样品时，峰与峰之间比较靠近，所以一定要记录反应前后哪个波峰发生了显著变化。

本研究为进一步提高反应效率，查阅了大量文献，发现半胱氨酸（Cys）具有对于金特别高的亲和力，由于其巯基（硫醇基）的侧链，这使得含有半胱氨酸的肽和蛋白质与金属表面的粘接，在理想情况下 L-cy 可与纳米金联合，组成纳米酶提高反应速率。但在实际操作中，发现当 L-半胱氨酸溶液、胶体金溶液和马兜铃酸 I 溶液混合在一起时，溶液会由粉红色变为无色。粉红色是因为胶体金呈粉红色，而变为无色可能是因为三者发生了不知名的反应。本研究为了探究这一现象，将反应后的液体利用 HPLC 检测，结果表明 AA-I 的含量并未发生变化，而纳米金的含量却减少了，故纳米金在实验过程中发生了聚集。本研究为了避免此类情况做了许多尝试，比如改变各溶液添加的前后顺序、加入盐溶液、加入稳定剂等，溶液颜色依旧会发生变化，利用 HPLC 检测，依旧与最初的实验结果相

同。

2.6 本章小结

本章成功探究出了 L-cy 降解 AA-I 的最佳反应条件，通过实验，最终确立了在 0.15 M L-cy、体积比为 3: 1、pH 为 6、温度为 60 °C 的条件下降解效果最好，并将此条件运用到实际样品中。虽然实际样品的反应效率比标准品略低，但在一定程度上能缓解 AA-I 带来的问题。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/057066126133006032>