

的分离,符合生物样品测定的要求,与文献[5]相比检测时间缩短,更适合大量样品测定。

给药后 5 min 均可检测到 RNZ 及其光学异构体,这一点说明该药物在大鼠体内口服吸收迅速。由测得的血药浓度-时间数据计算药动力学参数并进行比较。统计学结果表明,R-RNZ、S-RNZ 的  $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、AUC 差异均无统计学意义。RNZ 消旋体与不同光学异构体相比在体内有较好的吸收。虽然初步研究结果表明,R-RNZ、S-RNZ 在大鼠体内的吸收过程差异无统计学意义,但本研究得到的药动力学数据对于手性药物雷诺嗪的注册和申报具有重要的意义和参考价值。

## REFERENCES

- [1] STANLEY W C. Ranolazine: new approach for the treatment of stable angina pectoris [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005, 3(5): 821-829.
- [2] BHAUMIK U, GHOSH A, SARKAR A K, et al. Determination of ranolazine in human plasma by LC-MS/MS and its application in bioequivalence study [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(5): 1404-1410.
- [3] REN P. Pharmacokinetics and toxicokinetics of ranolazine [D]. Shandong University(山东大学), 2007.
- [4] HU K, HU R, XU P Q, et al. Study on pharmacokinetics of astilbin solid dispersion in rat [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1102-1104.
- [5] YE Y L, LI X, XU J P, et al. Pharmacokinetics of ranolazine in rats [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2006, 37(7): 478-480.

收稿日期: 2013-09-23

## 石杉碱甲免疫层析试纸条的研制

邹艳辉, 邱亚利, 余宇燕\*, 凌伟坚, 张淑玲 (福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要:** 目的 利用胶体金免疫层析技术建立一种快速检测石杉碱甲的方法。方法 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记抗石杉碱甲单克隆抗体并于 4℃ 保存。石杉碱甲和羊抗鼠二抗分别结合于硝酸纤维素膜上, 依次将硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫、吸水纸组装于 PVC 底板上, 切割成胶体金试纸条。结果 石杉碱甲快速检测试纸条的灵敏度为 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 检测时间为 5 min, 特异性高, 批内和批间重复性良好。结论 该法操作简单, 使用方便, 可用于现场快速检测石杉碱甲。

**关键词:** 石杉碱甲; 胶体金免疫层析; 试纸条

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)11-1370-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.018

## Study on Gold Immunochromatography Assay for Rapid Detection of Huperzine A

ZOU Yanhui, QIU Yali, YU Yuyan\*, LING Weijian, ZHANG Shuling (College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a rapid assay for detection of huperzine A based on gold immunochromatography assay. **METHODS** Colloidal gold marked coupled with monoclonal antibody against huperzine A was jet sprayed onto the glass fiber and stored at 4℃. Huperzine A and anti-mouse goat immunoglobulins were jet-positioned onto a nitrocellulose membrane. Nitrocellulose membrane, gold combined pad, sample pad and absorbent paper were assembled and cut into detecting card, respectively. **RESULTS** The results showed that the sensitive of rapid for huperzine A visual detection limit was 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and detection time within 5 min. Repeatability and specificity of strip was good. **CONCLUSION** It is very simple and convenient to rapidly detect huperzine A on the spot.

**KEY WORDS:** huperzine A; gold immunochromatography assay; strip

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202914); 福建省科技厅科技计划重点项目(2011Y0035); 福建省教育厅 A 类科技项目(JA12171)

作者简介: 邹艳辉, 女, 硕士生 Tel: 13489955016

E-mail: zyh05100613@163.com

\*通信作者: 余宇燕, 女, 博士, 副教授

Tel:

13705073317 E-mail: yyyfj@163.com

石杉碱甲是从石杉科石杉属植物蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thumb.) Trev 的酚性部分中提取的一种生物碱, 是一种高效的、高选择性的可逆性乙酰胆碱酯酶抑制剂, 主要用于治疗重症肌无力, 并具有提高学习和记忆的功能, 对阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)患者的症状有明显的缓解作用, 且治疗指数高, 作用时间长, 无不良反应, 是临床治疗 AD 的理想药物。AD 的发病率随年龄的增长呈指数性增长, 随着中国人口老龄化的迅速发展, 使得建立一种快速检测药材中石杉碱甲含量的方法以减少人力、物力、财力的损耗显得尤为重要。

目前国内外石杉碱甲主要分析方法有高效液相色谱法<sup>[1-2]</sup>、薄层扫描法<sup>[3]</sup>、液相-质谱联用<sup>[4]</sup>等, 尚无发现有关石杉碱甲快速检测试纸条的研究报道。本实验所研制的试纸条基于胶体金免疫层析法, 即以胶体金颗粒作为跟踪标记物, 利用自制的包被抗原<sup>[5]</sup>(Hup A-OVA)及单克隆抗体<sup>[6]</sup>反应作为一种免疫标记技术, 并利用该技术建立了一种简便、快速、特异性强的石杉碱甲免疫胶体金检测试纸条。

## 1 材料

石杉碱甲(万邦药业股份有限公司, 纯度: 99%); 石杉碱甲片(上海复旦复华药业有限公司, 批号: 120301, 规格: 50 mg·片<sup>-1</sup>); 牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA); 羊抗鼠二抗(南京生兴生物技术有限公司); 自制的包被抗原(Hup A-OVA)及石杉碱甲单克隆抗体; 氯金酸、柠檬酸三钠、蔗糖、叠氮钠、吐温 20 等试剂均为分析纯; 娃哈哈纯净水。

硝酸纤维素膜(NC 膜)、样品垫、胶体金垫、吸水纸及底板均购自上海金标科技生物有限公司; FA2104N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); TDC-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂); 全自动新型培养箱 ZSD1160(上海智城分许仪器制造有限公司); 85-2 恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司); 烘箱等。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 样品垫处理液及胶体金标记抗体稀释液的配制** 制备含 5%蔗糖, 1%BSA, 0.05%吐温 20, 0.1%叠氮钠的 0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲溶液(PBS), 即得。

**2.1.2 胶体金结合垫处理液的配制** 制备含 10%蔗糖, 5%BSA, 0.1%吐温 20, 0.1%叠氮钠的 PBS 溶液, 即得。

**2.1.3 包被抗原工作液及羊抗鼠二抗工作液的配制** 制备含 0.05%吐温 20, 3%甲醇的 PBS 溶液, 即得。

### 2.2 胶体金的制备

在 250 mL 圆底烧瓶中加入 100 mL 水, 烧沸后用一次性移液管迅速加入 1 mL 的 1%氯化金母液; 在高速搅拌下, 加入 1.8 mL 的 1%柠檬酸三钠母液; 溶液变红后继续煮沸 10 min 左右或稍长, 直至红色保持不变; 冷却后定容至 100 mL, 加少许 1%NaN<sub>3</sub>, 于 4 °C 避光保存。目测金胶溶液不浑浊, 无漂浮物, 无颗粒沉淀, 在日光灯下观察无微小颗粒, 用光电笔透过金胶溶液成一条直线, 无散光现象; 各种研究证实, 通过可见光光谱峰形可以初步判断胶体金的分散状态、粒径和均匀度<sup>[7]</sup>, 将制备好的胶体金在 450~600 nm 内进行紫外扫描, 结果见图 1。胶体金在 520 nm 处有最大吸收, 此时所对应的胶体金的粒径适合做蛋白标记。

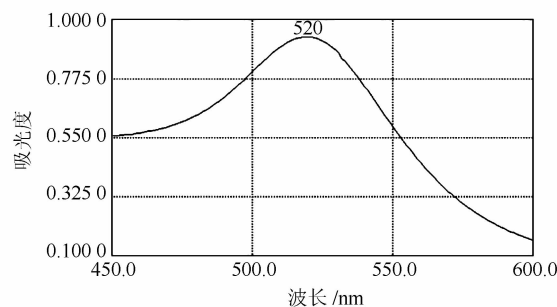


图 1 胶体金紫外扫描图谱

Fig. 1 The UV scan spectrum of colloidal gold

### 2.3 石杉碱甲单克隆抗体-胶体金标记物的制备

取 10 mL 胶体金溶液, 用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液调 pH 至 8.0。将调节好的胶体金溶液加入 110 μL 石杉碱甲单克隆抗体(82.5 μg·mL<sup>-1</sup>), 室温搅拌 15 min 后, 缓慢加入 10% BSA 1 mL, 室温放置 30 min; 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.4)重悬后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用金标抗体稀释液稀释至 1 mL, 于 4 °C 保存。

### 2.4 组装材料的筛选

分别筛选样品垫膜材料(KB50、SB08、SB06、CB06)、金标垫膜材料(VL68、VL78、VL98、RB45)、NC 膜(Millipore135、Millipore180)及样品垫膜浸泡

处理液(配方 1: 含 5%BSA、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 2: 含 5%蔗糖、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 3: 含 0.05%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 4: 含 5%蔗糖、1%BSA、0.05%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 5: 含 10%蔗糖、5%BSA、0.1%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 6: 含 5%蔗糖、0.05%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液)、金标垫膜浸泡处理液(配方 1: 0.05%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 2: 含 5%蔗糖、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 3: 1%BSA、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 4: 含 5%蔗糖、1%BSA、0.05%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液; 配方 5: 含 10%蔗糖、5%BSA、0.1%吐温 20、0.1%叠氮钠的 PBS 溶液)、羊抗鼠二抗浓度 (0.25, 0.5, 0.75  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、包被抗原与工作液的稀释比例(1:0.5, 1:1, 1:2)。考察组装好的试纸条在测试过程中的吸金量、迁移速率、膜背景颜色、线条的显色情况, 最终确定样品垫为 SB06、金标垫为 VL78、NC 膜为 Millipore135; 各溶液的筛选结果见“2.1”项下。

### 2.5 试纸条的组装

首先, 将金标垫用处理液浸泡后置 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥过夜。其次, 将样品垫用处理液浸泡后置 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥过夜; 并将处理好的金标垫用金标抗包被, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥过夜; 用包被抗原工作液与 HupA-OVA 以 1:1 的比例稀释, 用毛细管将其包被于 NC 膜的检测线(T 线); 在距离 4~5 nm 处用毛细管将被二抗工作液稀释至 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的羊抗鼠二抗包被于质控线(C 线), 包被完后将 NC 膜置 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱烘干 2 h, 取出, 置 1%BSA 中在 37  $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中孵育 2 h, 取出, 用 PBST 清洗 3 次, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥过夜。最后, 按照 NC 膜、金标垫、样品垫、吸水纸的顺序组装于 PVC 底板上, 并做好标记, 切割成 4 mm 宽备用。试纸条的结构见图 2。

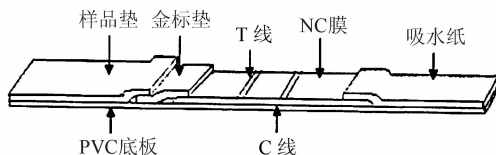


图 2 试纸条的结构图

Fig. 2 Schematic representation of a dipstick showing its components

T/C 线的调试目标为: 样品中不含被分析物的阴性检测液后, 试纸条显示结果应为 T 线与 C 线

颜色深浅相当, 或者 T 线颜色深于 C 线颜色; 当样品中含有一定浓度的被分析物, 试纸条显示结果为 T 线颜色弱于或明显弱于 C 线颜色, 甚至 T 线不显色。同时, 不论阴性或阳性结果, C 线都应显示为颜色适中、显色均匀红色线条, 表明试纸条是有效的。

### 2.6 方法学考察

**2.6.1 检测限** 配制浓度为 0, 5, 9, 15, 30, 45, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  石杉碱甲对照品溶液, 各取 1 mL 作为测定样品, 检测 5 min 后结果显示, 添加石杉碱甲浓度为 0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, C 线和 T 线出现明显的红色条带; 当浓度增加到 5, 9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, T 线的红色条带几乎消失, 但仍可以看出有残留; 当浓度为 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, T 线红色条带消失, 只有 C 线显示红色, 检测结果全为阳性, 因此本试纸条对石杉碱甲的检测限为 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果见图 3。

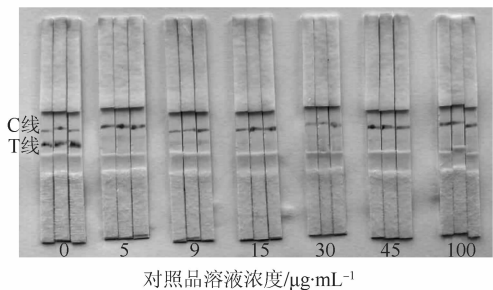


图 3 试纸条检测限检测结果

Fig. 3 Determination of the sensitivity of the immunochromatographic strip

**2.6.2 特异性** 以 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  石杉碱甲为阳性对照, 以同浓度的盐酸小檗碱、青藤碱、东莨菪碱、樟柳碱及水为阴性对照, 进行试纸条特异性检验, 结果显示, 石杉碱甲 C 线显红色, 为阳性; 盐酸小檗碱、青藤碱、东莨菪碱、樟柳碱、水的 C 线及 T 线均有红色条带, 为阴性, 结果见图 4。

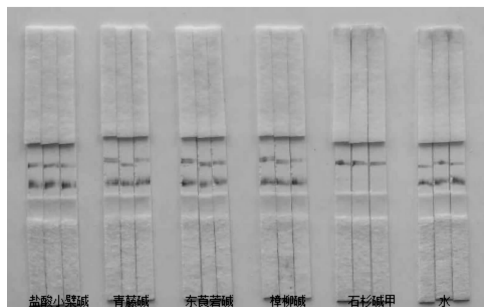


图 4 石杉碱甲特异性检测结果

Fig. 4 Specificity of the strip test in the detection of huperzine A

**2.6.3 重复性** 不同批次检测试纸条重复性检测结果显示, 用不同批次的试纸条对浓度为 0 和  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的石杉碱甲样液进行检测, 其结果完全一致, 试验证明不同批次生产的检测试纸条检测结果稳定可靠, 具有良好的重复性。结果见图 5。

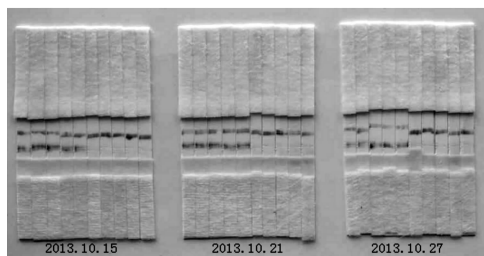


图 5 不同批次试纸条重复性检测结果

Fig. 5 The results of the repeatability test of different batches of strips

**2.6.4 稳定性** 将制备好的试纸条置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  和室温常规保存, 在制备当天、第 5 天、第 15 天、第 25 天、第 35 天、第 45 天取 2 个环境下的试纸条各 10 条, 检测浓度为  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的石杉碱甲对照品溶液。观察检测限的有无、颜色深浅及膜背景颜色。结果显示, 该试纸条可以常温放置 30 d。

## 2.7 样品测定

取石杉碱甲片(批号: 120301)20 片, 精密称定, 研细, 称取细粉适量(约相当于石杉碱甲  $0.5 \text{ mg}$ ), 置于  $10 \text{ mL}$  量瓶中, 加  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸适量, 振荡溶解, 再用  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 超声  $30 \text{ min}$ , 并补足超声损失量, 平行配制 10 份石杉碱甲片的盐酸溶液。以  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液作阴性对照, 用 20 份组装好的试纸条进行检测, 结果显示, 10 份试纸条呈阴性, 10 份试纸条呈阳性, 表明该试纸条能够对样品中一定浓度的石杉碱甲进行定性分析, 结果见图 6。

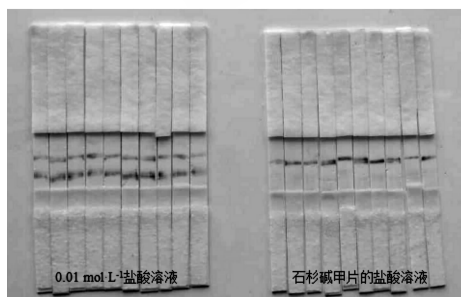


图 6 样品测定结果

Fig. 6 Detection results of sample

## 3 讨论

本实验制备的试纸条能够快速检测样品中是否含有石杉碱甲, 简单直接、无需大型仪器及专业人员操作, 虽然灵敏度可能不如气相、液相色谱以及酶联免疫吸附试验, 但在药材中是否含有石杉碱甲的大量样本的现场初筛中, 无疑具有绝对的优势。通过考察该试纸条的灵敏度、特异性、重复性、稳定性等方法学指标, 该试纸条适合室温存放 30 d, 且检测限为  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。若对该试纸条进行产业化, 将做进一步的优化: 稳定性试验时, 温度和湿度都会对金标垫上的胶体金标记抗体和 NC 膜上的包被抗原、羊抗鼠二抗的索性有所影响, 若是加以真空密闭保存, 可延长保存期; 点膜所用的毛细管点样以及喷涂的微量加样器均改用点膜仪点样、专业喷涂机喷涂胶体金标记抗体以使试纸条灵敏度提高。

## REFERENCES

- [1] ZHOU X L, YUAN J Q, WANG S, et al. Determination of huperzine A and huperzine B in *Huperzia serrata* collected at different collecting times by HPLC [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2013, 28(2): 504-506.
- [2] WU X Q, GU Y H. Quantification of huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(4): 993-998.
- [3] ZHOU H H, JIA X S, GAO Y M, et al. Thin layer scanning method determination of huperzine A in *Huperzia crispata* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2008, 31(2): 235-237.
- [4] ZHANG Z H, CHEN W, XU M J, et al. Analysis of measurement uncertainty of huperzine A content in human plasma by LC-MS/MS [J]. China Pharm(中国药房), 2011, 22(38): 3582-3585.
- [5] TEHG H Y, YU Y Y, LU L, et al. Synthesis of huperzine A artificial antigens by glutaraldehyde and its identification [J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med(福建中医药大学学报), 2012, 22(6): 41-44.
- [6] YU Y Y, ZHANG S L, ZOU Y H, et al. Establishment of immunology rapid test method for huperzine A in rare source plant *Huperzia serrata* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 44-48.
- [7] PENG J C, LIU X D, DING X P, et al. Evaluation of particle diameter of colloidal gold and its distribution through visible spectroscopy [J]. Bull Acad Mil Med Sci(军事医学科学院院刊), 2000, 24(3): 211-212, 237.

收稿日期: 2014-03-31