

电化学发光猝灭法检测环孢霉素 A

江晓芬¹, 钟茂生¹, 梁剑¹, 朱品玲¹, 陈舒奕¹, 邱彬²

(1. 中华人民共和国宁德出入境检验检疫局, 福建宁德 352100; 2. 福州大学, 福建福州 350026)

摘要 [目的] 建立用静态电化学发光分析法检测环孢霉素的方法。[方法] 以实验室自合成的羧基钉为发光试剂, 环境友好型二丁基乙醇胺为共反应试剂, 用静态电化学发光分析法检测环孢霉素。[结果] 在 pH 为 6.0 的 0.06 mol/L PBS 缓冲溶液中, 羧基钉发光强度的淬灭值与环孢霉素 A 浓度在 $9.3 \times 10^{-9} \sim 4.0 \times 10^{-7}$ mol/L 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9950$), 检测限达 5.4×10^{-7} mol/L。[结论] 该方法首次用电化学发光方法应用于环孢霉素的检测, 为电化学发光方法检测环孢霉素提供了理论与试验依据。

关键词 电化学发光; 羧基钉; 环孢霉素 A

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01444-02

Determination of Cyclosporine A by Electrochemiluminescent Method

JIANG Xiao-fen et al (Ningde Import and Export Inspection and Quarantine Bureau, Ningde, Fujian 352100)

Abstract [Objective] A static electrochemiluminescent approach was developed to determine cyclosporine A. [Method] By using the synthetic carboxyl ruthenium as luminescent reagents and environmental friendly dibutyl ethanolamine as the co-reaction reagent, cyclosporine was determined by static electrochemiluminescence analysis. [Result] Linear responses in chemiluminescence quenching of carboxyl ruthenium and concentration of cyclosporine A were good linearity ($R^2 = 0.9950$) between 9.3×10^{-9} mol/L and 4.0×10^{-7} mol/L in 0.06 mol/L PBS buffer solution (pH 6.0). The corresponding limit of detection (LOD) was 5.4×10^{-7} mol/L. [Conclusion] The method is suitable for the determination of cyclosporine by electrochemiluminescence for the first time and provides theoretical and experimental supports.

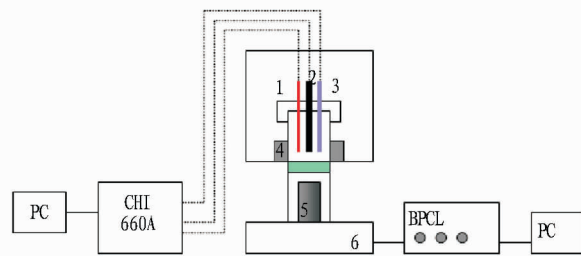
Key words Electrochemiluminescent; Carboxyl ruthenium; Cyclosporine A

环孢霉素 A (cyclosporine A, CsA)^[1] 具有高选择性和极强的细胞免疫抑制作用, 可有效抑制异体排斥反应, 明显提高器官移植的成功率, 现已被广泛应用于器官移植中。血药中 CsA 浓度过高或过低都会引起毒副作用, 因此及时检测其血药浓度并调整和优化给药方案, 在临床治疗中显得极其重要。目前国内外测定全血中 CsA 的方法主要有荧光偏振免疫测定法 (FPIA)^[2-3] 和高效液相色谱法 (HPLC)^[4-6]。虽然 FPIA 法的测定速度较快, 但由于其检测特异性及稳定性差, 且检测成本高, 实际应用中仍以 HPLC 法居多, 而电化学分析法的研究至今未见相关报道。笔者在文中以化学发光法定性定量检测环孢霉素, 以实验室自合成的羧基钉为发光试剂, 环境友好型二丁基乙醇胺为共反应试剂, 用静态电化学分析法 (ECL) 研究检测环孢霉素的电化学发光行为, 旨在为 CsA 的检测提供更为有效、便捷的方法。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 BPLC-K 电致化学发光检测仪 (上海辰华仪器有限公司); CHI1210a 电化学分析仪 (上海辰华仪器有限公司); 三电极系统: 玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂电极为对电极, 10 ml 石英检测池; PHS-3C 精密酸度计 (上海精密科学仪器有限公司)。将仪器按图 1 所示进行组装。环孢霉素 A (CsA) (1.0×10^{-3} mol/L 丙酮溶液)、羧基钉 (1.09×10^{-3} mol/L 水溶液)、二丁基乙醇胺 (DBAE) (1 mol/L 乙醇溶液) 购自 Sigma 公司; PBS 缓冲液; 其他试剂均为分析纯, 试验用水为二次纯化水。

1.2 方法 将二丁基乙醇胺 (2.0×10^{-3} mol/L) 与羧基钉 (1.0×10^{-8} mol/L) 溶于 PBS 缓冲溶液中, 在 0.6 ~ 1.6 V 范围内, 分别研究电极电压施加方法、扫描速率、缓冲液的酸度和浓度、发光体系浓度对环孢霉素 A 化学发光的影响, 通过加入 CsA 前后电化学发光强度为依据进行定量分析。玻碳电极在每次试验前分别用 0.30 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 进行抛光处理, 再用二次水进行清洗后晾干备用。



注: 1. 工作电极; 2. 参比电极; 3. 对电极; 4. 检测池; 5. 光电倍增管; 6. 信号转换器。

图 1 ECL 试验装置

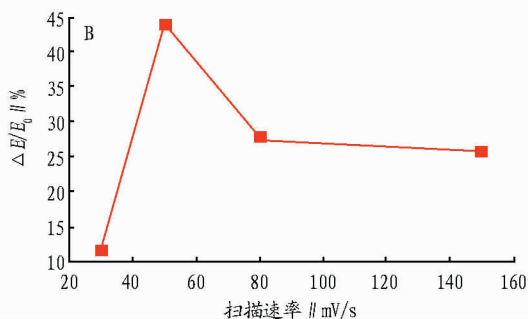
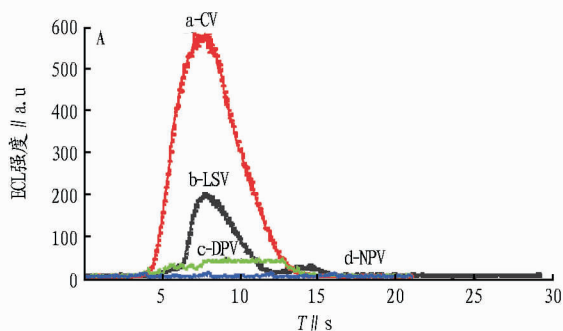
2 结果与分析

2.1 电压施加方法及扫描速率对发光体系的影响 如图 2A 所示, 循环伏安法 (a - CV) 中羧基钉的发光峰峰形较其他扫描方法好, 灵敏度较高。从图 2B 中可看出, 在 10 ~ 50 mV/s 的速率范围内, 随着扫描速率的增加 ECL 值也增加, 当扫描速率为 50 mV/s 时 CsA 猝灭发光率最高。

2.2 缓冲溶液对发光体系的影响 羧基钉的电化学发光受 pH 的影响显著, 由图 3A 可知, CsA 在酸性介质中会减弱对羧基钉体系的发光, 在 pH = 6 时 CsA 对羧基钉体系发光的淬灭效果最好, 达 60%; 在碱性介质中 CsA 会增强羧基钉体系的发光, 在 pH = 9 时 CsA 对羧基钉体系发光的增强效果最好, 达 50%。由于 pH = 6 更接近人体血药中 CsA 的酸

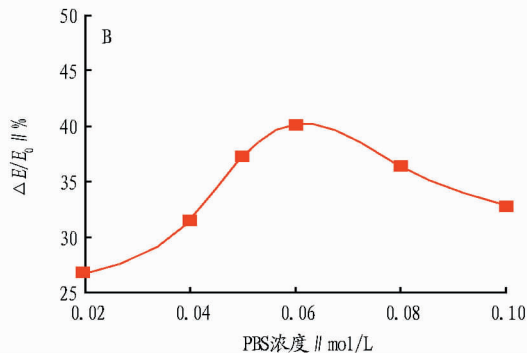
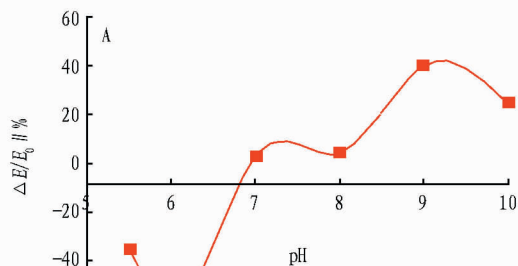
度环境,因此采用 pH = 6 的酸性 PBS 缓冲溶液。由图 3B

可知,浓度为 0.06 mol/L PBS 为缓冲介质时电化学发光的



注:PBS (pH=6, $c=0.08$ mol/L); CsA 浓度为 1.5×10^{-6} mol/L; Ru(bpy)₃²⁺ 浓度为 1.0×10^{-6} mol/L; DBAE 浓度为 1.5×10^{-3} mol/L。

图 2 不同扫描电压(A)和不同扫描速率(B)对 CsA-羧基钉-DBAE 体系的电化学发光影响



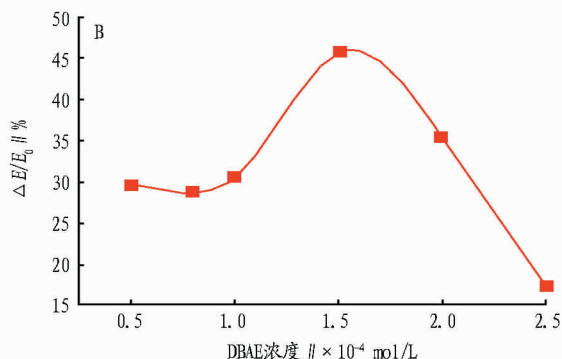
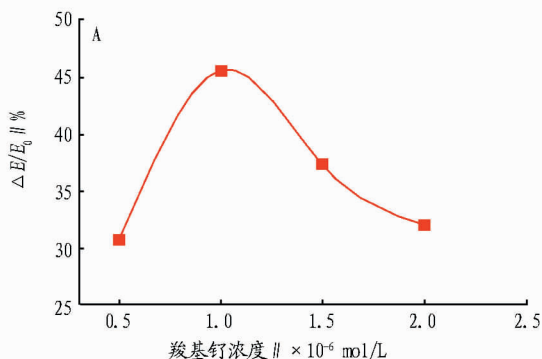
注:CsA 浓度为 1.5×10^{-6} mol/L; 羧基钉浓度为 1.0×10^{-6} mol/L; DBAE 浓度为 1.5×10^{-3} mol/L。

图 3 不同 pH PBS(A)和不同浓度(pH = 6)(B)缓冲溶液中 CsA 对发光体系的淬灭影响

淬灭率最大。

2.3 发光体羧基钉与共反应体 DBAE 浓度对 CsA 淬灭的影响 如图 4A 所示,羧基钉浓度为 1.0×10^{-6} mol/L 时发光淬灭率达最大,因此试验选择羧基钉的浓度为 1.0×10^{-6}

mol/L。固定羧基钉浓度,考察发光共同体 DBAE 浓度对发光淬灭率的影响(图 4B),发现在浓度为 1.5×10^{-3} mol/L 时发光淬灭率达最大。因此试验选择 DBAE 的浓度为 1.5×10^{-3} mol/L。



注:PBS (pH=6, $c=0.08$ mol/L); CsA 浓度为 1.5×10^{-6} mol/L。

图 4 发光体羧基钉(A)与共反应体 DBAE(B)浓度对 CsA 淬灭的影响

2.4 工作曲线与检测限 在 pH 为 6.0 的 0.06 mol/L PBS 缓冲溶液中,试验考察了环孢霉素 A 对 1.09×10^{-6} mol/L 羧基钉溶液发光强度猝灭的影响,结果如图 5 所示。发光强度的猝灭值与环孢霉素 A 浓度在 $9.3 \times 10^{-9} \sim 4.0 \times 10^{-7}$ mol/L 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9950$),检测限达 5.4×10^{-7} mol/L。

2.5 干扰物质影响 人体血液中含大量的无机离子、糖类、氨基酸等,所以在对实际样品的测定过程中会有大量的共存

物质干扰测定。文中考察了一些物质对该体系发光的影响,发现相对于 1×10^{-7} mol/L 的环孢霉素 A,控制误差在 $\pm 10\%$ 以内的干扰离子情况为: Mg^{2+} 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} (500 倍); l-酪氨酸、l-色氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、l-组氨酸、l-赖氨酸、l-缬氨酸(100 倍); Cu^{2+} 、 Fe^{3+} (50 倍); l-苏氨酸小牛胸腺 DNA、腺嘌呤(20 倍); Ca^{2+} 、 K^+ 、 NO_3^- 、 Na^+ 、 Cl^- 不干扰试验的测定。

验证,洗净毛含脂率为 1.031%,鞘氨醇杆菌对羊毛生物脱脂有较好的帮助性。张健等^[22]用固定化脂肪酶对羊毛进行生物酶法洗毛,在固定化酶最适 pH 值作用条件下研究了洗毛的温度、浴比和时间 3 个因素对洗毛效果的影响,得到最佳的洗毛条件为温度 45 ℃、浴比 1:35、时间 20 h。

4.4 其他方面的应用 随着生物技术的发展,微生物脂肪酶在家禽饲料加工、医药、香料生产、化妆品等工业领域也发挥了重要作用。例如,抗抑郁药 thiazesim 合成时中间体的拆分及抗高血压药 captopri 的立体合成都有微生物脂肪酶的参与;作为提取天然 V_E 的宝贵资源植物油脱臭馏分,利用脂肪酶可催化油脂水解反应将其中的甘油酯分解,从而大幅提高了 V_E 的提取率。

5 展望

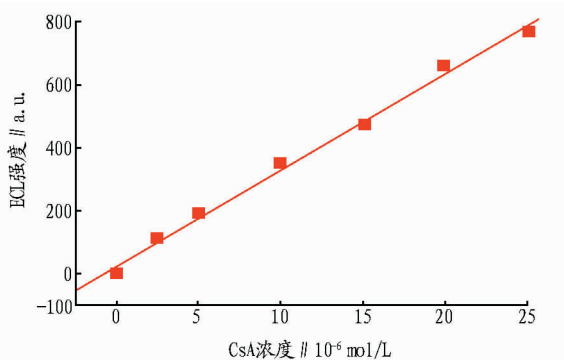
近年来,我国在微生物产脂肪酶的菌种筛选、工业发酵条件优化、基因工程方面均有深入研究,和国外相比,我国对脂肪酶的研究和开发起步较晚,而且工业化的微生物脂肪酶制剂种类有限,因此,筛选具有新特性的活力高、产量高及成本低的脂肪酶菌种,运用高端的基因工程技术改善野生菌产酶量低的特性及开发脂肪酶新品种等仍需深入研究,以拓宽其应用领域,满足各个相关工业领域的需求。

参考文献

- [1] 张树政. 酶制剂工业(下)[M]. 北京:科学出版社,1984,655-670.
- [2] 孙宏丹,孟秀香,贾莉,等. 微生物脂肪酶及其相关研究进展[J]. 大连医科大学学报,2001,23(4):292-295.
- [3] 王小花,洪枫,陆大年,等. 脂肪酶在纺织工业中的应用[J]. 毛纺科技,2005(6):22-24.
- [4] KOHNO M,ENASTU M,FUNATSU J, et al. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and its structural interpretation[J]. J Biotechnol, 2001,87(3):203-210.
- [5] 彭立凤. 微生物脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报,1999(2):18-19.
- [6] FICKERS P,FUDALEJ F,NICAUD J M, et al. Selection of new overproducing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by

- the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. J Biotechnol,2005,115(4):379-386.
- [7] LARIOS A,GARCIA H S,OLIART R M,et al. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida Antarctica lipase*[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2004,65(4):373-376.
- [8] 郭显章,郭敏辰. 脂肪酶分子生物学的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2002,21(1):96-97.
- [9] GIJS G, RONALD W J, WIM J Q. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain [J]. Appl Environ Microbiol,1998,64(7):2644-2651.
- [10] SHIMADA Y,SUGIHARA A,LIZUML T,et al. Cloning and sequencing of two chromosomal lipase genes from *Geotrichum candidum* [J] Biochem, 1993,113(6):776-780.
- [11] BOEL E,HUGE J B. Manufacture of *Humicola lanuginosa* Lipase by recombinant *Aspergillus* [J]. Patent:Wo,1992,12(10):921-972.
- [12] YAMAGUCHI S,MASE T,TAKEUCHI K. Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150 [J]. Gene,1991,103(1):61-67.
- [13] FERNANDEZ L,PEREZ-VICTORIA I,ZAFRA A,et al. High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I [J]. Protein Expr,2006,49(2):256-264.
- [14] MACHIDA M,ASAI K,SANO M,et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. Nature,2005,438(7071):1157-1161.
- [15] PIGNDE Q,WANG H,FUDALE J F,et al. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia Lipolytica* [J]. Journal of Bacteriology,2000,182(10):2802-2810.
- [16] BEER H D,MCCARTHY J E,BOMSCHUEUR U T,et al. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopusoryzae* [J]. BBA - Gene Structure and Expression, 1998, 1399(2/3):173-180.
- [17] KUGIMIYA W,OTANI Y,KOHNO M,et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *Rhizopusniveus* lipase [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,1992,56(5):716-719.
- [18] ANTONIAN E. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipase [J]. Lipids,1988,23:1101-1106.
- [19] 郭敏辰. 脂肪酶基因结构和氨基酸序列的比较 [J]. 江南大学学报,2001,16(2):1-5.
- [20] 马玲,刘会平. 干酪中风味化合物的形成及其影响因素 [J]. 乳业科学与技术,2005(4):145-148.
- [21] 郑来久,徐春圆,杜冰. 生物酶洗毛鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium* sp. 的筛选与表征 [J]. 科技导报,2011,29(23):29-31.
- [22] 张健,郑来久,薛永常. 固定化脂肪酶性能研究及在洗毛中的应用 [J]. 毛纺科技,2012,40(7):31-32.

(上接第 1445 页)



注: pH 6.0, 0.06 mol/L PBS 缓冲溶液; 羧基钌浓度为 1.0×10^{-6} mol/L; DBAE 浓度为 1.5×10^{-3} mol/L; 扫描电位 0.6 ~ 1.6 V; 扫描速率 50 mV/s。

图 5 环孢霉素 A-羧基钌体系工作曲线

3 讨论

该试验以电化学发光方法,以羧基钌及其反应试剂

DBAE 发光体系为基础建立了电化学发光检测环孢霉素的新方法。羧基钌在酸性缓冲溶液中有电致化学发光,当加入环孢霉素后其发光强度明显降低,因此可以此检测环孢霉素。该试验中电化学发光法检测环孢霉素仪器简单,操作方便,灵敏度高,检测限达 5.4×10^{-7} mol/L。该方法是首次用电化学发光方法应用于环孢霉素的检测,为电化学发光方法检测环孢霉素提供了理论与试验依据。

参考文献

- [1] 涂水平. 环孢菌素的临床应用进展 [J]. 上海医学,1992,15(6):362-365.
- [2] 牛发良,张志华,张秀琰,等. 荧光偏振免疫分析法检测环孢霉素血药浓度 [J]. 张家口医学院学报,2003,20(5):23-25.
- [3] 张培环. 化学发光微粒子免疫分析与荧光偏振免疫分析检测环孢霉素血药浓度比较 [J]. 实用医药杂志,2012,29(5):424-425.
- [4] 孙祥德,高革,齐伟,等. 反相高效液相色谱法测定全血环孢霉素 A 的含量 [J]. 新乡医学院学报,2003,20(4):31-33.
- [5] 王彬,李翔,柴逸峰,等. 高效液相色谱-质谱联用测定全血中环孢霉素 A 含量 [J]. 第二军医大学学报,2006,27(8):899-901.
- [6] 刘茂雄,张晓光,姜铁夫. 高效液相色谱法测定兔眼房水中环孢霉素 A 的含量 [J]. 中国实验诊断学,2005,9(4):619-620.