

环孢菌素 A 血药浓度快速检测试纸的初步研制

吕宗杰^{1*}, 郑永^{2#}, 程渝¹(1.重庆市妇幼保健院, 重庆 400013; 2.重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010)

中图分类号 R96;R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3087-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.06

摘要 目的:制备环孢菌素 A(CsA)血药浓度快速检测试纸。方法:将胶体金标记的 CsA 单克隆抗体吸附在玻璃纤维素膜上组装成试纸,将人工抗原固化于适合硝酸纤维素膜上,组装成检测试纸。考察检测试纸对血浆中 CsA 的检测范围、定量限、回收率、精密性、稳定性,以及不同浓度阿奇霉素、兰索拉唑、头孢拉定、氨溴索、格列本脲对检测试纸的测定是否有影响,并与荧光偏振免疫分析法比较 10 份 CsA 血浆样品的检测结果。结果:该试纸对血浆中 CsA 的检测质量浓度线性范围为 5~600 ng/ml($r=0.998 1$),定量限为 5 ng/ml,回收率为 86.51%~112.43%,日内、日间 RSD 均小于 20%($n=5$);常温下放置 15 d 不稳定,4℃下放置 3 个月稳定;阿奇霉素、兰索拉唑、头孢拉定、氨溴索、格列本脲对检测试纸的影响均小于 4 ng/ml;2 种方法 10 份血浆样品的检测结果间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:成功制备了 CsA 血药浓度快速检测试纸,且其特异性较好。

关键词 环孢菌素 A;快速检测试纸;血药浓度;制备

Primary Preparation of Test Papers for Rapid Detection of Blood Concentration of Cyclosporin A

Lü Zong-jie¹, ZHENG Yong², CHENG Yu¹ (1.Chongqing Maternal and Child Care Service Centre, Chongqing 400013, China; 2.The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare test papers for rapid detection of blood concentration of cyclosporin A (CsA). METHODS: CsA monoclonal antibody was marked by colloidal gold and attached to fibreglass cellulose membranes, and then assembled into test papers; artificial antigen was solidified onto cellulose nitrate membranes, and then assembled into test papers. The detection range, limit of quantification, recovery, precision and stability of CsA were detected in plasma. The effects of different concentrations of azithromycin, lansoprazole, cefradine, ambroxol and glibenclamide on test papers were also determined. Results of 10 plasma samples of CsA were compared between test paper and fluorescence polarization immunoassay. RESULTS: The detection range of CsA is 5-600 ng/ml by test papers ($r=0.998 1$). The limit of quantification was 5 ng/ml, and recovery rates were 86.51%-112.43%. RSDs of intra-day and inter-day were lower than 20% ($n=5$). CsA was not stable within 15 d at room temperature, but it was stable within 3 months at 4℃. The blood concentrations of azithromycin, lansoprazole, cefradine, ambroxol and glibenclamide were all lower than 4 ng/ml and had no significant effect on test paper. There was no statistical significance in the determination results of 10 plasma samples by 2 methods ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Test papers for rapid detection of blood concentration of CsA have been developed successfully and show sound specificity.

KEY WORDS Cyclosporin A; Rapid test papers; Blood concentration; Preparation

环孢菌素 A(Cyclosporin A, CsA)在免疫抑制治疗中仍具极其重要的地位,用于各种器官和组织移植(如肝、肾、心、骨髓、胰腺、肺、角膜、皮肤等),能有效抑制异体排斥反应,明显改善各种移植术的预后,大大提高移植物的存活率。但其毒副作用多且发生率较高、治疗窗狭窄、个体差异大、监测难度大,这些都一定程度地限制了其使用^[1]。本研究利用快速免疫层析的原理,将硝酸纤维素膜作为包被载体,胶体金作为标记载体,在试纸条上进行抗原抗体反应,建立了 CsA 的胶体金免疫层析法,制备了环孢菌素 A 血药浓度快速检测试纸,为 CsA

血药浓度的监测提供了一种快速、有效的检测方法。

1 材料

1.1 仪器

台式紫外分析仪(上海比朗仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);H2500R-2 高速冷冻离心机(上海凯鸣电子机械有限公司);紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TDX 血药浓度检测仪(美国 Abbott 公司)。

1.2 药品与试剂

CsA 原料药(武汉银河精细医药化工有限公司,批号:11698-201009,纯度:98.7%);阿奇霉素原料药(西安利君制药有限公司,批号:200905,纯度:95.2%);兰索拉唑原料药(成都华西药业有限公司,批号:200905,纯度:97.9%);头孢拉定原料药(山东淄博新达制药有限公司,批号:201007-10082,

* 药师,硕士研究生。研究方向:临床药学。E-mail:lvzongjie@163.com

通信作者:副主任药师。研究方向:生物药剂学。E-mail:zhengyong68@tom.com

纯度:96.5%);氨溴索原料药(天津亚宝药业科技有限公司,批号:200908-11279,纯度:97.2%);格列本脲原料药(宁波市天衡制药有限公司,批号:20090506,纯度:97.6%);4-苯甲酰苯甲酸(BBa,上海迈瑞尔化学技术有限公司,分析纯);牛血清白蛋白(BSA)、CsA单克隆抗体、羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Sigma公司);柠檬酸钠、碳酸钾均为国产分析纯;胶体金套装(胶体金溶液、硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、滤纸、吸水垫、粘性底板)购自派坤生物中国上海公司。

2 方法与结果

2.1 胶体金标记抗体的制备

取胶体金溶液 100 ml,用 0.1 mol/L K_2CO_3 调节 pH 值至 8.2,搅拌下滴加入 CsA 单克隆抗体 1.5 mg,搅拌 20 min,再滴加 25 mg/ml 聚乙二醇(PEG)2000 溶液 2 ml,搅拌 15 min,4 °C 下 4 000×g 离心 20 min,取上清液在 4 °C 下 10 000×g 离心 60 min,弃上清液,将沉淀用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)5 ml 溶解,4 °C 冰箱中保存备用^[2]。

2.2 CsA 人工抗原的合成

2.2.1 CsA-BBa 的合成:精密称取 CsA 原料药 120.0 mg 和 BBa 24.0 mg,置于石英比色皿中,加入 3.7 ml 丙酮溶解,在避光环境中,将比色皿置于 1 kW 的碘钨灯中照射 4 h,每 1 h 补充丙酮溶剂 1 次,用薄层层析(TLC)法分离提纯产物。

2.2.2 CsA-BSA 的合成:取“2.2.1”项下制得的 CsA-BBa,溶于 0.7 ml 的二甲基甲酰胺(DMF)中;另取 10 mg BSA,溶于 1 ml 超纯水中,将 CsA-BBa 的 DMF 溶液在搅拌下缓慢滴加入 BSA 中,调 pH 值至 6.8,加入 30 mg 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC),静置过夜^[3]。用透析法分离产品,每 5 h 换透析液 1 次,共换液 4 次,将产物置于 4 °C 下保存。

2.3 CsA 血药浓度快速检测试纸的组装

CsA 血药浓度快速检测试纸的结构示意图见图 1。

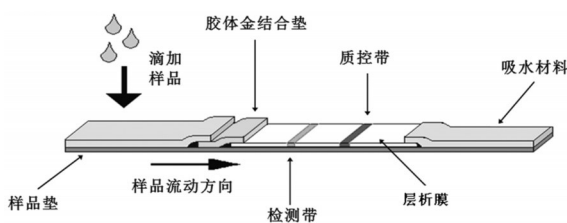


图 1 CsA 血药浓度快速检测试纸的结构示意图

Fig 1 Structure diagram of test papers for rapid detection of blood concentration of CsA

由图 1 所示,在聚氯乙烯(PVC)底板上依次粘贴上样品垫(GF-08 玻璃纤维素膜)、胶体金结合垫(GF-06 玻璃纤维素膜)、层析膜(硝酸纤维素膜)、吸水材料(滤纸)。将“2.1”项下制备的胶体金标记抗体滴加在样品垫上,将 CsA-BSA 固化在检测带上,将羊抗鼠 IgG 二抗固化在质控带上,37 °C 干燥 2 h,置于密闭容器中备用^[4]。

2.4 试纸的使用方法

精密吸取 100 μ l 血浆样品,加样至 CsA 血药浓度快速检测试纸的加样孔上,显色 5 min,将测得的吸光度值代入吸光度-血药浓度标准曲线,计算所测血浆样品中 CsA 的浓度。

2.5 检测试纸工艺参数的优化

2.5.1 最优胶体金标记抗体量的确定:用不同胶体金标记抗体量制备的检测试纸测定 CsA 标准血浆样品,以 CsA 血药浓度为横坐标、535 nm 波长处吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。对个各条标准曲线作线性分析,结果表明最佳的胶体金标记抗体量为 4 μ g(具体方法另文发表)。

2.5.2 最优抗原包被量的确定:用不同抗原包被量制备的检测试纸测定 CsA 标准血样,以 CsA 血药浓度为横坐标、535 nm 波长处吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。对个各条标准曲线作线性分析,结果表明最佳的抗原包被量为 1 μ g(具体方法另文发表)。

2.6 标准曲线的制备

在 CsA 血药浓度快速检测试纸上分别加样 100 μ l 质量浓度分别为 5、25、50、100、200、400、600 ng/ml 的 CsA 标准血浆,按“2.4”项下方法测定,以血浆中 CsA 浓度为横坐标、测得的吸光度为纵坐标,绘制吸光度-血药浓度标准曲线,并进行线性回归分析。得标准曲线方程为: $A = -0.1750c + 137.12$ ($r = 0.9981$),结果表明,CsA 检测质量浓度的线性范围为 5~600 ng/ml,定量限为 5 ng/ml(信噪比>10)。

2.7 回收率与精密度试验

配制高、中、低质量浓度(400、100、25 ng/ml)的 CsA 标准血浆样品,按“2.4”项下方法测定 CsA 浓度,并计算方法回收率;同日内测定 5 次考察日内精密度,每日测定 1 次、连续测定 5 d 考察日间精密度。结果表明,高、中、低质量浓度标准血浆样品的平均方法回收率分别为 112.43%、108.92%、86.51%,RSD 分别为 11.29%、14.14%、17.91%;日内 RSD 分别为 12.54%、13.17%、17.62% ($n=5$),日间 RSD 分别为 14.75%、13.29%、18.21% ($n=5$)。

2.8 特异性考察

在临床中,患者在给予 CsA 的同时可能会给予其他药物,如抗生素、降糖药、保胃药等。本研究检测了临床常用药阿奇霉素(A)、兰索拉唑(B)、头孢拉定(C)、氨溴索(D)、格列本脲(E)对检测试纸测定 CsA 时的影响。在含 CsA 100 ng/ml 的血浆样品中加入临床常用药 A、B、C、D、E 溶液,使添加药物血药浓度分别为 10、100、1 000、10 000 ng/ml,用检测试纸按“2.4”项下方法进行检测,将测得的各药的吸光度值代入吸光度值-CsA 血药浓度标准曲线,计算所对应的 CsA 质量浓度,结果见表 1。

表 1 不同浓度药物对检测试纸测定 CsA 质量浓度的影响

Tab 1 Effects of different concentrations of drugs on the concentration of CsA by test papers

药物	药物浓度,ng/ml							
	10		100		1 000		10 000	
	测得值,ng/ml	RSD,%	测得值,ng/ml	RSD,%	测得值,ng/ml	RSD,%	测得值,ng/ml	RSD,%
A	102.15±8.58	10.52	101.64±9.56	10.13	100.45±7.13	9.25	103.91±7.68	8.54
B	103.37±6.01	9.62	103.25±7.02	6.27	102.15±7.35	8.46	97.85±10.25	11.81
C	98.67±7.40	8.51	96.39±7.75	9.59	96.29±9.80	10.57	102.26±9.39	8.61
D	103.91±7.54	8.96	98.51±6.56	8.53	98.54±8.41	9.65	101.74±8.14	9.75
E	96.48±6.73	7.22	102.34±5.19	7.14	103.52±10.95	11.27	98.86±9.04	10.56

由表 1 可知,A、B、C、D、E 对检测试纸测定 CsA 质量浓度的 RSD 均<12%。

2.9 稳定性试验

将检测试纸分别密闭置于常温及4℃冰箱中,于0、15、30、60、90 d时分别测定高、中、低质量浓度(400、100、25 ng/ml)的CsA标准血浆样品,每个浓度测5次,考察试纸的稳定性。结果表明,检测试纸在常温下放置15 d后,检测高、中、低质量浓度标准血浆样品中CsA质量浓度的结果分别为(642.64±56.54)、(631.41±71.15)、(606.48±54.37) ng/ml,已不能正确反映真实值,故常温不能作为试纸的保存条件。用SPSS 11.0统计软件作配对样本 t 检验,检测试纸在4℃下放置90 d后,检测标准血浆样品中CsA的质量浓度的结果与真实值间差异无统计学意义($P>0.05$),RSD为8.74%~19.09%,结果见表2。

表2 检测试纸在4℃下放置不同时间后的检测结果(ng/ml, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of the concentrations of CsA by test papers at 4℃(ng/ml, $\bar{x} \pm s, n=5$)

CsA质量浓度,ng/ml	0 d	15 d	30 d	60 d	90 d
400	423.72±37.32	437.64±45.52	417.29±62.15	415.32±58.15	437.29±67.15
100	116.61±12.27	117.28±14.19	129.79±25.42	121.79±15.57	91.79±14.73
25	28.94±9.52	20.27±4.35	21.29±4.26	29.26±5.57	21.32±4.43

2.10 临床验证

目前临床上测定CsA血药浓度最常用的方法是荧光偏振免疫分析(FPIA)法,该方法具有精密度高、灵敏度高、抗干扰能力强等特点,但缺点在于成本较高、需专业人员操作。笔者分别用检测试纸测定10份CsA血浆样品,将测得结果与FPIA法进行比较,结果见表3。用SPSS 11.0统计软件作配对样本 t 检验,表明检测试纸检测结果与FPIA法检测结果间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3 2种方法测定10份血浆样品中CsA质量浓度的检测结果(ng/ml, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Blood concentrations of CsA in 10 plasma samples by 2 methods(ng/ml, $\bar{x} \pm s, n=5$)

编号	FPIA法	检测试纸
1	156.29±18.29	151.27±23.21
2	62.33±15.51	68.62±13.53
3	54.00±21.36	64.21±36.32
4	183.15±17.65	167.63±21.43
5	55.30±17.51	62.74±10.72
6	62.72±13.95	71.51±13.87
7	69.16±15.59	78.57±10.42
8	60.31±10.25	67.47±15.03
9	37.64±12.62	32.35±6.39
10	115.63±23.74	120.31±12.83

3 讨论

CsA分子质量为1 202.62,分子结构中没有NH₂、COOH、OH等活性基团,无法与载体蛋白连接,需要经过修饰后加入活性基团才能制备大分子人工抗原^[9]。本试验中采用了BBa

作为CsA和大分子蛋白结合的中间臂,其具有化学活性基团(羧基)和光化学活性基团(α, β -不饱和酮)。在紫外光的激发下,BBa与CsA均失去氢原子,形成自由基,两者再发生偶联结合,使CsA上接上羧基,从而能够与大分子蛋白偶联制备人工抗原。

CsA血药浓度快速检测试纸的原理是将胶体金标记的CsA单克隆抗体吸附于胶体金结合垫上,将CsA人工抗原固定在检测带上。检测时,血样中环孢菌素A与结合垫上的金标CsA抗体相结合形成的抗原抗体复合物,流经检测带不能被检测带上的CsA人工抗原捕获,最终停留在质控带上。血样中的CsA浓度越高,金标CsA抗体被检测带上的人工抗原捕获越少,检测带显色越弱,反之则显色越强。本实验用紫外分析仪记录检测带上的吸光度值,考察CsA血药浓度与检测带上吸光度值之间关系,作出吸光度值-血药浓度标准曲线,并可依据检测带上的吸光度值计算血浆样品中CsA的血药浓度。

常用CsA血药浓度的检测方法有高效液相色谱法^[6]、气相色谱-质谱联用^[7]和FPIA^[8]等,但以上方法均耗时较长,且均需要专用仪器、专人操作,为临床CsA血药浓度的测定带来诸多不便。笔者成功制备了CsA血药浓度快速检测试纸,且其特异性较好、操作简便、测定快捷、灵敏度高、检测成本低,可用于临床上CsA血药浓度的快速检测,但其制备工艺及各项参数仍需要进一步研究和完善。

参考文献

- [1] 吴俊珠,金拓.环孢菌素A安全应用及药动学研究新进展[J].中国药房,2007,18(8):634.
- [2] 吴巧丽,叶春生.胶体金免疫层析技术快速检测沙丁胺醇残留[J].现代食品科技,2012,28(11):1595.
- [3] 王琳,齐孟文.抗环孢菌素A单克隆抗体的制备和特性鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2006,22(2):211.
- [4] 吴广红,何良兴,张少恩.胶体金免疫层析法快速检测磺胺嘧啶残留[J].现代食品科技,2009,25(5):577.
- [5] 刘一超,戴晓雁,黄文才,等.环孢菌素A人工抗原的制备[J].四川大学学报:自然科学版,2001,38(3):407.
- [6] 孙岫峰,高峰丽,李建成,等.高效液相色谱法测定环孢菌素A的血药浓度[J].内蒙古医学院学报,2002,24(3):156.
- [7] Taylor PJ. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Ther Drug Monit, 2004, 26(2): 215.
- [8] 夏东亚,刘宝庆,刘龙,等.单克隆抗体与多克隆抗体荧光偏振免疫分析法测定环孢素A全血浓度的比较[J].中国医院药学杂志,1993,13(1):484.

(收稿日期:2013-04-02 修回日期:2013-06-14)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅