

毛细管电泳-安培检测法用于7-甲基鸟苷与 丝裂霉素 C 分离检测的研究

张 兰, 何 聿, 陈毅挺, 童 萍, 陈国南

(福州大学化学化工学院, 福建 福州 350002)

摘要:建立了一种同时分离检测7-甲基鸟苷与丝裂霉素C的毛细管电泳-安培检测方法。在950 mV电极(工作电极:0.3 mm微型石墨圆盘电极;参比电极:Ag/AgCl;辅助电极:Pt丝)电位下,于20 mmol/L的磷酸盐缓冲体系(pH 9.4)中,采用18 kV的分离电压进行分离。在最佳条件下,7-甲基鸟苷与丝裂霉素C在10 min内实现分离,7-甲基鸟苷与丝裂霉素C的线性范围均为0.50~50 mg/L,检测限分别为0.050 mg/L与0.025 mg/L。将该方法用于模拟尿样和模拟兔血清样的检测,7-甲基鸟苷与丝裂霉素C的回收率为93.0%~97.2%,结果令人满意。

关键词:毛细管电泳;安培检测法;7-甲基鸟苷;丝裂霉素C

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)02-0138-04

Study on the Simultaneous Determination of 7-Methylguanosine and Mitomycin C by Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection

ZHANG Lan, HE Yu, CHEN Yiting, TONG Ping, CHEN Guonan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A method based on capillary electrophoresis with amperometric detection (CE-AD) has been developed for the simultaneous determination of 7-methylguanosine and mitomycin C. The detection electrode was a 0.3 mm carbon disc electrode at a working potential of 950 mV (versus Ag/AgCl electrode). A suitable electrolyte consists of 20 mmol/L phosphate buffer (pH 9.4), with the separation voltage of 18 kV, the injection time of 10 s, and the injection voltage of 18 kV. Under optimum conditions, the two analytes could be well separated within 10 min in a 60 cm length capillary. The current responses were linear over about two orders of magnitude (0.50–50 mg/L) with detection limits ($S/N = 3$) of 0.050 and 0.025 mg/L for 7-methylguanosine and mitomycin C, respectively. The proposed method was successfully applied to determine the synthetic urine and serum samples. The recoveries were found in the range of 93.0%–97.2%.

Key words: capillary electrophoresis; amperometric detection; 7-methylguanosine; mitomycin C

7-甲基鸟苷(7-methylguanosine,简称7MG)是一种修饰核苷,它是脱氧核糖核酸(DNA)被甲基化剂损伤的主要产物之一^[1]。核苷是核糖核酸(RNA)的代谢产物,正常核苷可被机体重新利用而很少从尿中排出;但修饰核苷(modified nucleoside)不像正常核苷那样可以被降解或被重新利用,而是随尿以原形方式排除,因而尿中修饰核苷的排量可以反映体内细胞的增殖状态。由于修饰核苷主要存在于转移核糖核酸(tRNA)中,所以尿中修饰核苷的含量反映了tRNA的代谢速度。健康成年人

的尿中修饰核苷排量的变化很小,表明机体对RNA代谢有精细的调节作用。恶性肿瘤的一个最重要特征是持续无限制地增殖,由于其大量细胞处于旺盛生长状态,肿瘤组织中核酸与蛋白质的代谢速度加快,因而肿瘤组织中tRNA的转化速度显著高于正常组织,其代谢产物修饰核苷的排量也随之升高,因此,修饰核苷可以成为一种肿瘤标记物。

丝裂霉素C(mitomycin C,简称MMC)是抗生素类抗癌药物,对于胃癌、肠癌、肝癌等有较好的疗效,但是有较强的骨髓抑制毒性^[2],因此对其服用

量进行监测和个体化给药是必要的。

毛细管电泳(CE)是经典电泳技术和现代微柱分离相结合的产物,具有柱效高、试样和流动相用量少、分析速度快等特点。由于其符合以生物工程为代表的生命科学领域对多肽、蛋白质、核苷酸及DNA分离的要求,近几年来得到了迅速发展^[3]。CE在分析领域的发展前景广阔,已广泛应用于药物分析^[4-5]。电化学检测法可避免商品化毛细管电泳仪中光学类检测器光程太短的问题,具有灵敏度高、选择性好、线性范围宽、设备简单及造价低等优点^[6]。应用高分辨率、高灵敏度的毛细管电泳-安培检测(CE-AD)联用技术同时测定肿瘤标记物和抗癌药物,有望通过考察抗癌药物对修饰核苷的抑制程度来表征药物的治疗效果,以找出抗癌药物使用的平衡点。这对于降低服用抗癌药的不良反应,了解抗癌药物在体内的代谢原理都很有意义。已有用高效液相色谱^[7-8]和极谱法^[9]测定丝裂霉素C、用液相色谱法测定7-甲基鸟苷^[1]的报道,但未见有同时分离检测丝裂霉素C和7-甲基鸟苷两种组分的报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

自组装毛细管电泳-安培检测装置(以0.3 mm微型石墨圆盘电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,Pt丝为辅助电极)^[10],包括(0~±30) kV高压电源(上海原子核研究所)、BAS LC-4C恒电位安培检测仪(美国Bioanalytical公司)、TL9900色谱数据工作站,硅熔毛细管(360 μm o. d. × 25 μm i. d.,河北永年光纤纤维厂)。

7-甲基鸟苷标准品购自德国Sigma公司;丝裂霉素C标准品购自中国药品生物制品检定所。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

标准溶液的配制:准确称取7MG(或MMC)标准品0.50 mg,用H₂O溶解,用20 mmol/L的Na₂HPO₄-NaOH缓冲溶液(pH 9.4)定容于5 mL容量瓶中,从而得到100 mg/L 7MG(或MMC)标准溶液。MMC需要避光保存。

在本实验中,所有的溶液均用二次蒸馏水配制,并用0.22 μm聚丙烯微孔滤膜过滤,过滤后经超声波处理(或静置)去除溶液内的微小气泡。实验在(20±0.5)℃的室温下进行。

1.3 样品制备

模拟兔血清样品的制备:将兔血清离心(4 000 r/min速率下)处理10 min,取上层清液,用20

mmol/L的Na₂HPO₄-NaOH缓冲液(pH 9.4)稀释10倍。在稀释过的兔血清中加入7MG与MMC的混合标准溶液,制得模拟兔血清样品溶液。

模拟尿样的制备:尿样直接用上述缓冲溶液稀释10倍,在稀释的尿样中加入7MG与MMC的混合标准溶液,制得模拟尿样。

2 结果与讨论

2.1 电化学性质与电极电位的选择

在20 mmol/L的Na₂HPO₄-NaOH缓冲溶液(pH 9.4)中,以上述三电极系统作静态循环伏安图,考察7MG与MMC在微型石墨圆盘电极上的电化学行为。首先对20 mmol/L的Na₂HPO₄-NaOH缓冲溶液(pH 9.4)的空白溶液进行考察,发现空白液在200~1 200 mV的电压范围内没有出现氧化还原峰。在空白溶液中添加7MG后,在750 mV左右出现了氧化峰,同样在空白溶液中添加MMC后,在-450 mV左右出现了氧化峰。说明7MG与MMC在微型石墨圆盘上均具有电化学活性,因此可以用安培检测法测定。

进一步考察了动态电极电位对7MG与MMC峰电流的影响(见图1)。由图1可以看出,随着电极电位的增大,两组分的峰电流增大。但是当电极电位大于950 mV时,基线电流急剧增大。为了获得最佳的信噪比,选择950 mV作为最佳电极电位。

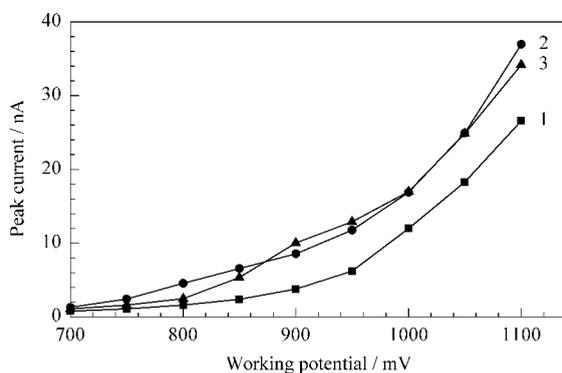


图1 电极电位对峰电流的影响

Fig. 1 Effects of the working potential on peak currents

Capillary: 60 cm × 25 μm i. d.; injection: 18 kV × 10 s; separation voltage: 18 kV; buffer solution: 20 mmol/L Na₂HPO₄-NaOH (pH 9.4); temperature: (20 ± 0.5) °C; working electrode: 0.3 mm carbon disk electrode; auxiliary electrode: platinum; reference electrode: Ag/AgCl.
1. elementary current; 2. MMC; 3. 7MG.

2.2 运行液的浓度与pH值的影响

运行液体系不但影响缓冲液在毛细管中的电渗流,而且还会影响溶液中被分离物质的离解,因此对分离的影响很大。首先试验了不同的缓冲溶液体系:H₃BO₃ + NaCl-NaB₄O₇、H₃BO₃-NaB₄O₇、柠檬酸

-柠檬酸三钠、HAc-NaAc 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$,结果表明 ,以 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液的分离效果最好 ,峰形尖锐对称 ,故采用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液体系作为运行液。

运行液的酸度对毛细管壁的 ξ 电位影响很大 ,从而影响缓冲液在毛细管中的电渗流。考察了酸度对分离的影响 ,结果表明 ,pH 值为 8.2 ~ 9.8 时 ,两组分都能够实现基线分离 ;但酸度对峰电流响应的影响实验表明 ,MMC 的峰电流随着 pH 的增大而增大。为了兼顾分离度与灵敏度 ,选定 pH 9.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液作为运行液。

进一步考察了 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液的浓度为 10 20 30 40 50 mmol/L 时的分离情况。结果表明 ,浓度为 20 mmol/L 时 ,7MG 与 MMC 达到了基线分离 ,但是随着 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液浓度继续增大 ,两组分的迁移时间越来越长 ,同时还有明显的峰形展宽现象发生。为了达到分离目的以及节省分离检测时间 ,选择 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液 (pH 9.4) 的浓度为 20 mmol/L。

2.3 分离电压与进样条件的影响

当毛细管长度和内径选定以后 ,分离电压是影响电渗流大小的最直接因素。在分离电压分别为 15 18 21 24 kV 的条件下 ,试验了分离电压对分离的影响 (见图 2)。结果表明 ,随着分离电压的升高 ,两组分的迁移时间也随之变小 ;但当分离电压大于 18 kV 时 ,两组分无法达到基线分离 ,同时基线噪声明显增大。因此 ,本实验选择分离电压为 18 kV。

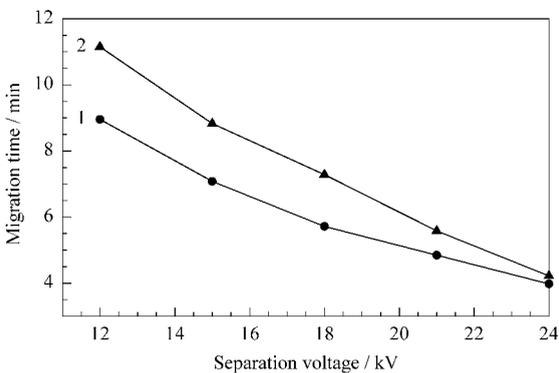


图 2 分离电压对迁移时间的影响

Fig.2 Effects of separation voltage on migration time

Working potential : 950 mV. The other conditions as in Fig. 1.

1. MMC ; 2. 7MG.

进样电压和时间的控制直接影响了试样的进样量 ,从而影响测定的灵敏度和重现性。保持进样电压为 18 kV ,依次在进样时间为 2 5 10 15 20 s 的条件下进行实验 (混合标准溶液中 MMC 与 7MG 的浓度均为 10 mg/L)。结果表明 ,在一定的进样电压

下 ,峰电流随着进样时间的增大而增大 ;当进样时间大于 10 s 时 ,峰电流增大趋势趋于平缓 ,而且两组分的峰形开始展宽。因此 ,本实验将进样时间选定为 10 s。在保持进样时间为 10 s 的条件下 ,试验了进样电压对峰电流的影响。结果表明 ,峰电流随着进样电压的增大而增大 ,当进样电压高于 18 kV 时 ,这种增大趋势趋于平缓。为了保持体系的稳定性 ,选择 18 kV 为进样电压。

综合上述试验 ,本文选择的分离检测条件为 :进样时间为 10 s ,进样电压和分离电压均为 18 kV ,运行液为 20 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液 (pH 9.4) ,在电极电位为 950 mV 时检测。在此条件下 ,得到 7MG (25 mg/L) 与 MMC (25 mg/L) 混合标准溶液分离的电泳谱图 (见图 3)。两组分在 10 min 内达到基线分离。

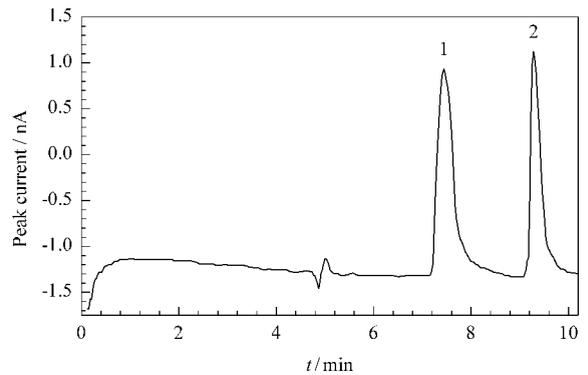


图 3 7MG 与 MMC 混合标准溶液的 CE 分离图

Fig.3 Electropherogram of 7MG and MMC standards

Capillary : 60 cm \times 25 μm i. d. ; injection : 18 kV \times 10 s ; separation voltage : 18 kV ; buffer solution : 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ (pH 9.4) ; temperature : (20 \pm 0.5) $^\circ\text{C}$; working electrode : 0.3 mm carbon disk electrode ; auxiliary electrode : platinum ; reference electrode : Ag/AgCl ; working potential : 950 mV. Concentrations of 7MG and MMC : 25 mg/L.

1. MMC ; 2. 7MG.

2.4 线性范围与检测限

根据“ 1.2 ”节的实验方法分别配制 100 mg/L 7MG 与 MMC 标准溶液 ,将二者按 1:1 的体积比混合 ,得到混合标准溶液 (7MG 与 MMC 的质量浓度均为 50 mg/L)。将此混合标准溶液用 20 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液 (pH 9.4) 稀释 1 倍 ,得到 7MG 与 MMC 均为 25 mg/L 的混合标准溶液 ,以此类推 ,逐级稀释 ,得到一系列 7MG 与 MMC 的混合标准溶液。在本实验中 ,依据上述最佳条件对系列 7MG 与 MMC 混合标准溶液进行测定 ,得到线性回归方程、线性范围、相关系数和最低检测限 (见表 1)。结果表明 ,该法具有很高的灵敏度。

2.5 模拟尿样、模拟兔血清样品与回收率的测定

将模拟兔血清样品和模拟尿样溶液过滤后直接

进行毛细管电泳-安培检测分析,图 4 为模拟兔血清样品的电泳谱图。经过加标试验验证,峰 1 和 2 分别为 MMC 和 7MG。从图 4 中可以清楚地看到模拟兔血清样品中存在一些不明物质峰,但对 MMC 和 7MG 的分离测定没有影响。

表 1 7MG 与 MMC 的线性回归方程、相关系数、线性范围及最低检测限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and detection limits of 7MG and MMC

| Compound | Regression equation ¹⁾ | r | Linear range/ (mg/L) | Detection limit ²⁾ / (mg/L) |
|----------|-----------------------------------|--------|-------------------------|---|
| 7MG | $I = 0.1013C + 0.065$ | 0.9997 | 0.50 - 50 | 0.050 |
| MMC | $I = 0.0916C + 0.1496$ | 0.9998 | 0.50 - 50 | 0.025 |

1) I: peak current, nA; C: concentration of the standard, mg/L. 2) at S/N=3. For conditions, see legend of Fig. 3.

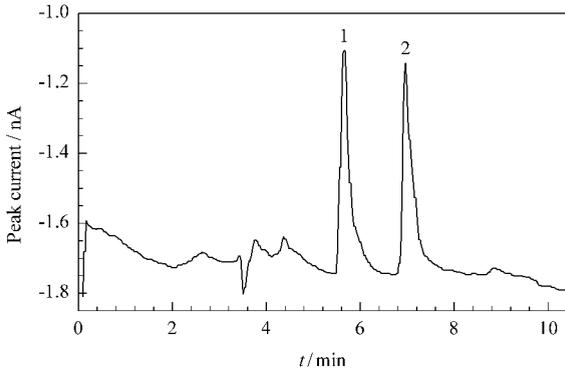


图 4 加入混合标准溶液的兔血清的 CE 图

Fig. 4 Electropherogram of rabbit blood serum spiked with 7MG and MMC standards

For conditions, see legend of Fig. 3.

1. MMC; 2. 7MG.

为了进一步验证该方法的可行性,在上述最佳条件下进行了回收率实验。在模拟兔血清样品和模拟尿样中分别按两个添加水平加入 7MG 和 MMC 标准样,每一份试样平行测定 5 次。回收率测定结果列于表 2。由表 2 可以看出,在模拟尿样和模拟兔血清样品中 7MG 和 MMC 的回收率均在 93.0% 以上,结果令人满意。

3 结论

采用高分离效率的毛细管电泳和高灵敏度的安

表 2 7MG 和 MMC 标准品在尿样和兔血清中的回收率(n=5)
Table 2 Recoveries of 7MG and MMC standards in synthetic urine and rabbit blood serum samples (n=5)

| Sample | Compound | Added/ mg | Found/ mg | Recovery/ % | RSD/ % |
|-------------|----------|--------------|--------------|----------------|-----------|
| Urine | 7MG | 5.0 | 4.71 | 94.2 | 4.3 |
| | | 10.0 | 9.71 | 97.1 | 3.7 |
| | MMC | 5.0 | 4.66 | 93.2 | 3.6 |
| | | 10.0 | 9.67 | 96.7 | 5.0 |
| Blood serum | 7MG | 5.0 | 4.86 | 97.2 | 3.9 |
| | | 10.0 | 9.53 | 95.3 | 5.1 |
| | MMC | 5.0 | 4.65 | 93.0 | 3.3 |
| | | 10.0 | 9.33 | 93.3 | 4.7 |

For conditions, see legend of Fig. 3.

培检测联用技术,建立了同时分离检测肿瘤标记物 7MG 和抗癌药物 MMC 的新方法,并对模拟尿样和模拟兔血清样品中的这两种物质进行了分离检测,取得了令人满意的结果。该方法具有快速、简单、样品用量少、灵敏度和重现性高等特点,有望用于肿瘤的早期诊断和肿瘤药物疗效等方面的研究。

参考文献:

[1] Yoshihito O, Masaaki K, Kiyoshi Z. Anal Chim Acta, 1998, 365: 233

[2] Chen Xinqian, Jin Youyu. New Medicament. Beijing: People's Medical Publishing House (陈新谦,金有豫. 新编药理学. 北京:人民卫生出版社), 1998. 515

[3] Chen Yi. Techniques and Applications of Capillary Electrophoresis. Beijing: Chemical Industry Press (陈义. 毛细管电泳技术与应用. 北京:化学工业出版社), 2000. 1

[4] Wang A B, Fang Y Z. Electrophoresis, 2000, 21(7): 1281

[5] Zhang L, Liu Y H, Chen G N. J Chromatogr A, 2004, 1043: 317

[6] Zhang L, Hu Q, Chen G N, Fang Y Z. Anal Chim Acta, 2000, 424: 257

[7] Ge Yongqian, Lu Guochun, Ling Yunhua. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology (葛勇前,陆国椿,凌云华. 中国临床药理学杂志), 2001, 17(3): 225

[8] Zhang Z D, Guetens G, De Boeck G, Van Cauwenberghe K, Maes R A A, Ardiet C, Van Oosterom A T, Highley M, de Bruijn E A, Tjaden U R. J Chromatogr B, 2000, 739: 281

[9] Zuman P. Microchemical J, 2002, 72: 241

[10] Zhang Lan, Chen Guonan, Fang Yuzhi. Journal of Fuzhou University (张兰,陈国南,方禹之. 福州大学学报), 2000, 28(6): 85