

无胶筛分毛细管电泳法测定猕猴血浆中的反义寡核苷酸药物癌泰得

王秀中^{1,2}, 王清清², 王诗鸿², 李卫平¹, 宋海峰^{2*}, 鲁丹丹², 王升启²

(1. 安徽医科大学药理学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 :采用两步固相萃取(SPE)法结合无胶筛分毛细管电泳(NGCE)技术建立了猕猴血浆中的反义寡核苷酸药物癌泰得的定量分析方法。优化并确定了SPE的相关条件(阴离子交换柱,上样缓冲液pH值为9.0,上样体积及洗脱体积分别为5 mL和3 mL)和NGCE的分析条件(灌胶时间为30 min,分离电压为24 kV)。在优化的条件下,猕猴血浆中癌泰得在1.95~250 mg/L范围内呈良好的线性关系,定量限(LOQ)为1.95 mg/L。批内准确度为93.38%~100.71%,批内相对标准偏差<11%;批间准确度为89.46%~103.46%,批间相对标准偏差<9%。在不同条件(室温下存放4 h;4℃下存放24 h;反复冻融(-80℃至室温)2次;-80℃下保存1个月)下癌泰得在猕猴血浆中的稳定性良好。已将该方法成功地应用于癌泰得的猕猴药代动力学研究。

关键词 :固相萃取;无胶筛分毛细管电泳;反义寡核苷酸;癌泰得;猕猴

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)06-0561-05

Quantitative determination of Cantide, an antisense oligodeoxynucleotide in rhesus monkey plasma using non-gel sieving capillary electrophoresis method

WANG Xiuzhong^{1,2}, WANG Qingqing², WANG Shihong², LI Weiping¹,
SONG Haifeng^{2*}, LU Dandan², WANG Shengqi²

(1. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract : A dual solid phase extraction (SPE) pretreatment coupling with non-gel sieving capillary electrophoresis (NGCE) analysis method was established for the quantitative determination of an antisense oligodeoxynucleotide, Cantide, in rhesus monkey plasma. The conditions of SPE and the NGCE analysis were optimized. Under the optimized conditions (the SPE conditions: the pH of loading buffer was 9.0; the volumes of loading and the elution solution for the anion-exchange column were 5 mL and 3 mL, respectively. The NGCE analysis conditions: loading gel time was 30 min and the separation voltage was 24 kV), the linear dynamic range of Cantide in rhesus monkeys plasma was 1.95 - 250 mg/L, and the correlation coefficient (r) was more than 0.998. The limit of quantitation was 1.95 mg/L. The intra-batch accuracies ranged from 93.38% to 100.71% with the intra-batch relative standard deviation (RSD) less than 11%. The inter-batch accuracies were from 89.46% to 103.46% with the inter-batch RSD less than 9%. The stability experiment showed that the Cantide plasma sample was stable when stored at 4℃ for 24 h, room temperature for 4 h, -80℃ for 30 days and freeze-thaw for 2 cycles. This method was finally successfully applied to pharmacokinetic study of Cantide in rhesus monkeys.

Key words : solid phase extraction (SPE); non-gel sieving capillary electrophoresis (NGCE); antisense oligodeoxynucleotide; Cantide; rhesus monkey

* 通讯联系人 宋海峰, 博士, 副研究员, 硕士生导师. Tel : (010) 66930259, E-mail : bapklab@yahoo.com.

基金项目 : 国家“863”计划项目(No. 2007AA021602)、国家自然科学基金项目(No. 39870879)和新药科技重大专项(No. 2009ZX09503-021).

收稿日期 2009-12-16

硫代反义寡核苷酸药物癌泰得是以人端粒酶催化亚基(hTERT)信使核糖核酸(mRNA)为靶点,通过抑制端粒酶的活性而抑制肿瘤细胞的生长,从而达到治疗癌症的目的。针对反义寡核苷酸的定量分析,早期多采用放射性同位素示踪技术,随后高效液相色谱、高效薄层色谱、毛细管电泳和液相色谱-质谱联用等方法也被应用于反义寡核苷酸的定量分析^[1-3]。近年来,还出现了基于杂交技术的酶联免疫吸附分析(ELISA)方法^[4,5]。毛细管凝胶电泳法能分离序列长度相差一个核苷酸的寡核苷酸,既能测定全长序列,又可测定在体内代谢过程中截短为不同长度的代谢产物,是反义寡核苷酸相关药学研究中高选择性的定量分析方法^[6]。鉴于毛细管电泳以上特点并结合本实验室前期工作的基础^[7,8],在本研究中我们详细优化了基于离子交换和反相色谱分配原理的两步固相萃取法的相关条件,并结合无胶筛分毛细管电泳(NGCE)技术对猕猴血浆中的癌泰得进行了定量分析,并进一步将此方法应用于癌泰得在猕猴体内的药代动力学研究。该方法的建立为类似化合物的含量测定和相关药学研究奠定了良好的基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪,配用于单链脱氧核糖核酸(DNA)分析的 eCAP™ ssDNA 100-R 试剂盒(批号:709077)(美国 Beckman Coulter 公司)。Millipore 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

全硫代寡聚脱氧核糖核苷酸(癌泰得)和内标 IS24(CTGACTCACTCAGGCCTCAGACT)(军事医学科学院放射与辐射医学研究所合成,白色冻干粉,毛细管电泳检测纯度大于 97%,于 4℃ 保存)。癌泰得批号 D408-3,规格 400 mg/支;内标 IS24 批号:20080529。其他试剂:三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、溴化钠、氯化钾、乙腈(ACN)、乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)等试剂为进口或国产分装试剂,以上试剂均为分析纯或色谱纯。

样品前处理用强阴离子交换柱(200 mg, 3 mL, Agilent 公司)和反相 C₁₈ 柱(200 mg, 3 mL, GracePure 公司),0.025 μm VS 滤膜购自 Millipore 公司。

1.2 溶液

样品标准溶液:精密称定癌泰得和内标各约 0.001 0 g,分别加入 1 mL 去离子水溶解,作为母液。实验中用去离子水将其稀释成不同浓度的标准

溶液,并储存于 4℃ 冰箱中备用。

标准曲线和质控(QC)样品配制:用空白猕猴血浆配制 250、125、62.5、15.63、7.81、3.91、1.95 mg/L 系列质量浓度的癌泰得样品,作为制作标准曲线的样品;另外配制 200、100、10、5 mg/L 质量浓度的癌泰得样品,作为 QC 样品。

固相萃取用缓冲液的配制:上样缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)+0.5 mol/L KCl+20% ACN,洗脱缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)+0.5 mol/L KCl+1.0 mol/L NaBr,稀释缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)+0.05 mol/L KCl+0.1 mol/L NaBr。

毛细管电泳用缓冲溶液(Tris-硼酸-尿素缓冲液)的配制:将 27 mL 去离子水加入到 eCAP™ ssDNA 100-R 分离试剂盒中提供的含 1.065 6 g Tris-硼酸的瓶内,磁力搅拌 20~30 min,确定 Tris-硼酸完全溶解后,缓慢地将 16.83 g 7M 尿素加入到 Tris-硼酸缓冲液中,在室温下搅拌 0.5~2 h。每天取出当天的用量并用 0.45 μm 的滤膜过滤,超声脱气 5 min 后使用,将余下的缓冲液保存在 4℃ 冰箱中。

ssDNA 100-R 凝胶的配制:称取 0.2 g ssDNA 100-R 胶,加入 1 mL 经过滤的 Tris-硼酸-尿素缓冲液,磁力搅拌 3~5 h,配制后放置于 4℃ 冰箱中储存,当天使用前取出 50 μL,于 12 000 r/min 离心 10 min 脱气后使用。

1.3 动物

猕猴 4 只,雌雄各半,体重(4.6±0.2) kg,由北京协尔鑫生物资源研究所提供,动物合格证号:SCXK(京)2005-0005。分笼饲养于军事医学科学院实验动物中心,饲以该实验动物中心配制的标准颗粒饲料,自由饮水。

1.4 实验方法

1.4.1 样品采集

空白猕猴血浆采自各猕猴个体的血浆,混合均匀后分装在 4 mL 离心管中于 -80℃ 保存待用。实验中,猕猴静脉滴注 8 mg/kg 癌泰得,滴注时间 30 min,于给药前 10、20、30、35、40、45、50、60、70、80、90 min 及给药后 2、2.5、3、4、5、6、7、8、10 h 对侧后肢用 EDTA-K₂ 抗凝管采集血样,4 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,分别装在离心管中置于 -80℃ 保存待测。

1.4.2 血浆样品的前处理

(1)血浆样品的固相萃取

将血浆样品快速融化,于 12 000 r/min 速率离心 10 min;用微量加样器吸取 200 μL,并在其中加

入 8 μL 的内标,充分混匀,用 5 mL 上样缓冲液稀释并放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,待加载到强阴离子交换柱。

依次用 1 mL 乙腈、1 mL 去离子水、3 mL 上样缓冲液活化强阴离子交换柱。将准备好的血浆样品室温复温 5 min 后加载到柱上,待其完全流出后,用 3 mL 上样缓冲液淋洗,最后用 3 mL 洗脱缓冲液洗脱并收集。

依次用 1 mL 乙腈、1 mL 去离子水和 3 mL 稀释缓冲液平衡 C_{18} 柱,然后将阴离子交换柱洗脱液用 5 mL 稀释缓冲液稀释后上样至 C_{18} 柱,并用 5 mL 去离子水淋洗,用 3 mL 乙腈洗脱癌泰得,在氮吹仪中吹干洗脱液。

(2) 样品检测前的处理

将吹干的样品重新溶解于 50 μL 去离子水中,将其滴加到悬浮于去离子水上的 VS 滤膜上透析脱盐,检测前采用高速离心(12 000 r/min, 10 min)脱除样品中的气泡。

1.4.3 无胶筛分毛细管电泳检测条件

涂层毛细管 2 根(65 cm \times 75 μm),线性大分子 ss-DNA 100-R 凝胶等。毛细管柱总长为 27 cm,有效长度为 20 cm,灌胶时间 30 min;紫外检测器,检测波长 254 nm;电动进样 10 kV \cdot 10 s;毛细管温度 25 $^{\circ}\text{C}$;负极到正极模式于 24 kV 恒压分离。

1.5 数据处理

毛细管电泳谱图用毛细管电泳仪自带的 32 Karat 软件进行积分计算样品和内标的峰面积,实验结果计算用 MicroCal 公司 Origin7.5 软件对浓度与归一化积分面积绘制标准曲线。用双对数线性回归拟合实验数据,得到 $Y = A + BX$, 式中 Y 为癌泰得与内标的积分面积比值的对数, X 为样品中癌泰得浓度的对数。

2 结果与讨论

2.1 固相萃取条件的优化

生物基质中大量的蛋白质和盐不仅会影响寡核苷酸的分离,更会严重降低吸光值,从而降低方法的灵敏度,因此需要对样品进行处理。本研究在前期试验基础^[9,10]上对样品前处理中的阴离子交换柱所用的缓冲液 pH 值、上样体积和洗脱体积等条件进行了优化。

2.1.1 阴离子交换柱上样缓冲液的 pH 值

在萃取过程中,由于反义寡核苷酸是弱酸性分子,溶液的 pH 值直接影响其解离程度,从而改变其在固相萃取柱上的保留行为。本研究考察了阴离子交换柱萃取时所用上样缓冲液不同 pH 值(6.0、

7.0、8.0、9.0、10.0)对癌泰得萃取回收率的影响,结果(图 1)表明,pH 为 9.0 时萃取回收率最高,而在 pH 为 6.0 时未能检测到癌泰得。故将上样缓冲液的 pH 调节为 9.0。

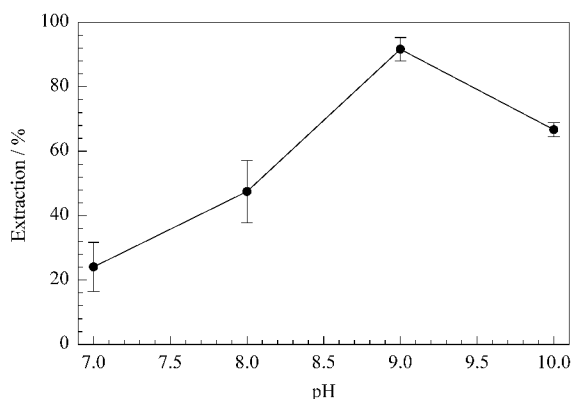


图 1 上样缓冲液 pH 不同对癌泰得萃取回收率的影响($n=3$)
Fig. 1 Extraction recovery of Cantide at different pH values of loading buffer ($n=3$)

2.1.2 阴离子交换柱的上样体积及洗脱体积

在固相萃取过程中,除了缓冲溶液的组成、盐浓度、pH 值等因素外,缓冲液的上样体积和洗脱体积也会较大程度地影响样品在固相萃取柱上的萃取和洗脱效率,从而影响样品的回收率。本研究考察了阴离子交换柱上不同体积的上样缓冲液(3、4、5 mL)和洗脱缓冲液(1、2、3 mL)对血浆样品中癌泰得回收率的影响。结果表明,用 5 mL 上样缓冲液稀释血浆样品,用 3 mL 洗脱缓冲液进行洗脱时,癌泰得的萃取回收率最高,说明在此条件下样品在阴离子交换柱上的离子交换更充分,洗脱更完全。

2.2 NGCE 条件的优化

2.2.1 灌胶时间

无胶筛分毛细管电泳是以毛细管内壁涂层中充盈的线性大分子 ss-DNA 100-R 凝胶作为分离介质的,它结合了电泳和分子筛的原理,按照反义寡核苷酸所带的电荷及其分子质量大小的不同分离原形药物和它的代谢产物,检测到的光吸收峰积分面积与样品的浓度呈正相关。灌胶是否均匀和电泳时介质的浓度对检测结果有直接影响,介质浓度增大时迁移时间延长,介质流失会导致迁移时间缩短,同时影响样品的峰形,导致定量重现性差。本研究考察了不同时间的灌胶时间(10、20、30、40 min)对系统稳定性和样品分离的影响,发现 30 min 的灌胶时间即可确保介质在涂层毛细管中充分分布,并可以在连续进样 > 15 次时仍保持分析过程中的电流稳定。当迁移时间和毛细管电流值明显改变时说明介质出现流失,需要重新灌胶以保证检测的重现性。

2.2.2 分离电压

在样品的 NGCE 分离过程中,过高的分离电压会降低分离度,而过低的分离电压会导致迁移时间过长,使被测组分峰展宽。因此选择合适的分离电压是达到合适的分离度及分析时间的关键。本研究考察了不同分离电压(18、21、24、27 kV)对迁移时间和分离度的影响(见图 2)。综合考虑灵敏度和分析时间等因素,最终选择分离电压为 24 kV。在此条件下,癌泰得和内标 IS24 能够在 12 min 内达到基线分离。

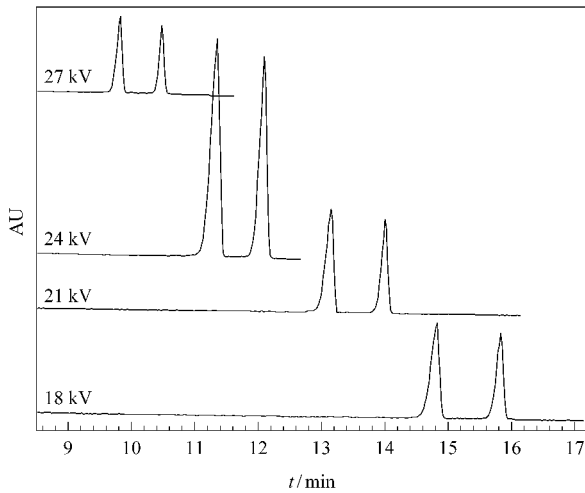


图 2 癌泰得标准品和内标在不同分离电压下的电泳图

Fig. 2 CE electropherograms of Cantide and internal standard (IS) at different separation voltages

2.3 方法学确证

2.3.1 特异性

图 3 为猕猴血浆中癌泰得和内标经过两步固相萃取后毛细管电泳分离示意图。从图 3 中可见内源性物质对癌泰得和内标均无干扰,说明方法的特异性良好。

2.3.2 线性范围和定量限

标准曲线和 QC 样品按照血浆样品的前处理方法进行处理后检测,双对数线性回归拟合标准曲线方程,并倒算考察各点的相对标准偏差(RSD)。猕猴血浆中癌泰得在 1.95 ~ 250 mg/L 范围内呈良好的线性关系(见表 1),定量限(LOQ)为 1.95 mg/L,标准曲线和 QC 样品中最低浓度点和其余各浓度点的 RSD(见表 2)均符合《化学药物非临床药理学研究技术指导原则》的要求(RSD < 15%)。结果表明,通过优化固相萃取条件和毛细管电泳分析条件,大幅度提高了萃取回收率和检测灵敏度,较之前文献报道方法的 LOQ(12.5 mg/L)^[8]提高了 6 倍多,为其相关的药学研究提供了有力的定量分析手段。

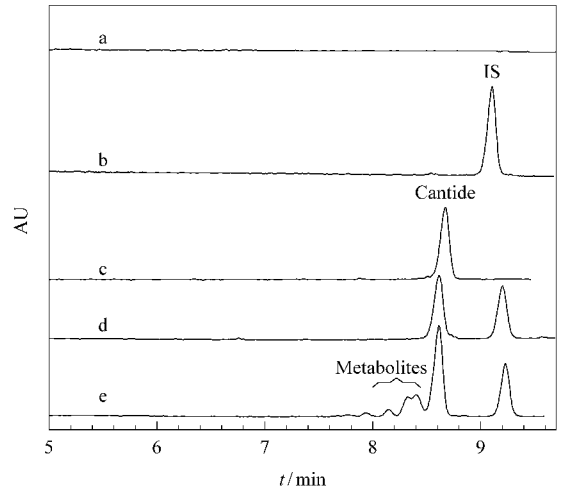


图 3 癌泰得和内标分离方法的特异性

Fig. 3 Specificity of the separation of Cantide and IS by NGCE

a. blank rhesus monkey plasma ; b. blank rhesus monkey plasma spiked with IS of 5 mg/L ; c. blank rhesus monkey plasma spiked with Cantide of 5 mg/L ; d. blank rhesus monkey plasma spiked with Cantide and IS of 5 mg/L for both ; e. the plasma sample from arhesus monkey after a single administration of 8 mg/kg of Cantide for 45 min and spiked with IS.

表 1 猕猴血浆中癌泰得 5 次实验得到的标准曲线的斜率、截距及相关系数

Table 1 Standard calibration curves of Cantide in rhesus monkey plasma

Curve	A	B	r
1	-1.4856	0.9916	0.9994
2	-1.4419	1.0022	0.9996
3	-1.4893	1.0032	0.9985
4	-1.5259	0.9993	0.9993
5	-1.5475	0.9866	0.9992
Mean	-1.4980	0.9966	0.9992
SD	0.0406	0.0072	0.0004
RSD/%	-2.71	0.72	0.04

A and B are the coefficients in $Y = A + BX$, Y is the logarithm of the peak area ratio of Cantide and IS, and X is the logarithm of the mass concentration of Cantide. r is the linear correlation coefficient.

2.3.3 准确度和精密度

4 批批内和 5 批批间 QC 样品的测定结果表明,NGCE 测定猕猴血浆中癌泰得的批内准确度(以回收率计)为 93.38% ~ 100.71%,相对标准偏差(RSD)小于 11%;批间准确度为 89.46% ~ 103.46%,RSD < 9%(见表 2)。

2.3.4 癌泰得在猕猴血浆中的稳定性

猕猴血浆样品中的癌泰得在不同条件下的稳定性结果见表 3。结果表明,含有癌泰得的猕猴血浆样品分别在室温下放置 4 h、反复冻融 2 次(-80 °C 至室温)、长期在 -80 °C 下保存 30 d 以及在 4 °C 下存放 24 h 条件下稳定性良好。

表 2 NGCE 法测定猕猴血浆中癌泰得的准确度和精密度

Table 2 Accuracies (recoveries) and precisions (RSD) of Cantide in rhesus monkey plasma by NGCE method

Nominal concentration/ (mg/L)	Intra-batch (n = 4)			Inter-batch (n = 5)		
	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD%	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
5	5.16 ± 0.41	96.79	8.03	5.02 ± 0.43	99.65	8.60
10	9.93 ± 1.06	100.71	10.66	11.05 ± 0.39	89.46	3.52
100	106.62 ± 7.26	93.38	6.81	101.79 ± 8.22	98.21	8.07
200	201.84 ± 17.64	99.08	8.74	193.07 ± 12.27	103.46	6.36

表 3 癌泰得在猕猴血浆中的稳定性(以回收率计)(n=4)

Table 3 Stability (recovery) of Cantide in rhesus monkey plasma (n = 4)

Nominal concentration/ (mg/L)	%			
	Repeated freeze-thaw for 2 cycles	Room temperature for 4 h	4 °C for 24 h	-80 °C for 30 d
5	98.16 ± 10.62	105.24 ± 8.27	98.70 ± 5.21	94.83 ± 5.95
25	91.08 ± 5.77	100.82 ± 2.60	109.17 ± 11.34	93.54 ± 2.86
200	88.87 ± 8.09	91.15 ± 8.79	111.86 ± 13.92	96.57 ± 9.62

2.4 NGCE 在癌泰得药代动力学研究中的应用

给猕猴按 8 mg/kg 的剂量静脉滴注癌泰得,分别在不同的时间点采血样,采用本文建立的方法测定血药浓度。结果表明,血药浓度在静脉滴注期间逐渐升高,滴注结束即刻达到峰值,随后逐渐降低,4 h 后低于定量下限(见图 4)。该方法可以检测到峰浓度的 1/20 以下的浓度,该给药剂量下能观察到猕猴给药后消除相的血药浓度变化情况,可以满足药代动力学研究的需要。

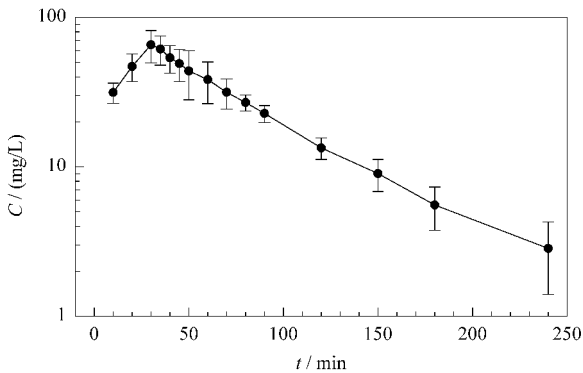


图 4 猕猴静脉滴注癌泰得(8 mg/kg)的血药浓度-时间曲线(n=4)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curve of Cantide in rhesus monkeys after intravenous infusion of 8 mg/kg of Cantide for 30 min (n = 4)

3 结论

本研究通过优化固相萃取的相关条件(阴离子交换柱上样缓冲液的pH值、上样体积及洗脱体积)

和毛细管电泳的分析检测条件(灌胶时间和分离电压),进而采用优化条件下的两步固相萃取法结合 NGCE 技术建立了猕猴血浆中癌泰得的定量分析方法。实验结果表明,该方法准确,灵敏度高,特异性强,线性范围宽,可作为反义寡核苷酸药物药代动力学的定量分析方法。

参考文献:

- [1] Yu R Z , Geary R S , Levin A A . *Curr Opin Drug Discov Devel* , 2004 , 7(2) : 195
- [2] Dai G W , Wei X H , Liu Z F , et al . *J Chromatogr B* , 2005 , 825 : 201
- [3] Li Q , Chen R , Sun Y Q , et al . *Chinese Journal of Chromatography* (李茜,陈蓉,孙毓庆,等.色谱), 2007 , 25(1) : 101
- [4] Dai G W . [PhD Dissertation]. Columbus , Ohio State , USA : The Ohio State University , 2005
- [5] Wei X H , Dai G W , Marcucci G , et al . *Pharm Res* , 2006 , 23 (6) : 1251
- [6] Li Q , Chen R , Luo X F , et al . *Progress in Pharmaceutical Sciences* (李茜,陈蓉,骆雪芬,等.药学进展), 2006 , 30 (3) : 97
- [7] Yang B H , Sun O J , Zhang M L , et al . *Chinese Journal of Chromatography* (杨秉呼,孙偶君,张敏丽,等.色谱), 2004 , 22(3) : 202
- [8] Zhang W , Yang B H , Liang Q D , et al . *Chinese Journal of Chromatography* (张巍,杨秉呼,梁乾德,等.色谱), 2005 , 23(4) : 374
- [9] Shang M M , Song H F , Liu X W , et al . *Acta Pharmacol Sin* , 2004 , 25(6) : 801
- [10] Shang M M , Liu X W , Tang Z M , et al . *Bulletin Academy Military Medical Sciences* (尚明美,刘秀文,汤仲明,等.军事医学科学院院刊), 2005 , 29(3) : 268