

L-乙酰半胱氨酸对映体的手性荧光衍生化 高效液相色谱法分析

许 颖, 金东日

(延边大学 理学院 化学系, 吉林 延吉 133002)

摘 要: 以 R -(-)/ S -(+)-4- N , N -二甲基磺酰胺-7-(3-异氰酸吡咯烷)-2, 1, 3-苯并氧杂咪唑 [R -(-)/ S -DBD-PyNCS] 为荧光手性衍生化试剂, 用反相高效液相色谱法 (RP/HPLC) 对乙酰半胱氨酸 (NAC) 对映体进行分析。在含有 1% 吡啶溶液中, 50 °C 下衍生化反应 60 min, 生成具有荧光特性的 NAC 非对映体衍生物, 其结构用质谱 (MS) 表征。该衍生物在流动相为 25 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (pH 5.9) - 甲醇 (体积比 50:28), 流速 1 mL/min 时, 在 ODS HYPERSIL C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱上进行分离, 并在荧光检测器 (λ_{ex} = 450 nm, λ_{em} = 550 nm) 上检测。 L -NAC 在 0.4~40 mg/L 范围内与峰面积呈良好线性关系, 回归方程为 $Y = 2.716 \times 10^4 X + 2.959 \times 10^6$, $r = 0.9998$, 检出限 ($S/N = 3$) 为 0.4 ng, 该方法可用于乙酰半胱氨酸制剂含量的测定。

关键词: 手性荧光衍生化试剂; 高效液相色谱法; 乙酰半胱氨酸

中图分类号: O657.72 R977.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2010)07-0735-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.07.018

Analysis of Acetylcysteine Derivatized with Fluorescent Chiral Reagent by High Performance Liquid Chromatography

XU Ying JIN Dongri

(Department of Chemistry, College of Science and Engineering, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract A highly fluorescent chiral tagging reagents R -(-)/ S -(+)-4-(N , N -diethylamino-sulfonyl)-7-(3-isothiocyanatopyrrolidino)-2, 1, 3-benzoxadiazole [R -(-)/ S -DBD-PyNCS] was employed to develop an HPLC method for the analysis of acetylcysteine (NAC) enantiomers. The reaction of DBD-PyNCS with the NAC proceeded effectively at 50 °C for 60 min in the presence of 1% pyridine basic medium to produce the corresponding diastereomers. The structures of NAC derivatives were identified by MS under negative mode. The efficient separation of NAC derivatives was achieved on a reversed phase column by isocratic elution with 25 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 5.9) - MeOH (50:28 by volume) as mobile phase. The quantitative analysis of NAC was performed on a fluorescence detector (λ_{ex} = 450 nm, λ_{em} = 550 nm). The calibration curve of L -NAC was linear in the mass concentration of 0.4~40 mg/L with a correlation coefficient of 0.9998. The regression equation was $Y = 2.716 \times 10^4 X + 2.959 \times 10^6$ and the limits of detection ($S/N = 3$) was 0.4 ng. The proposed method could be applied in the determination of NAC in clinical pharmaceutical.

Key words fluorescent chiral derivatization reagent; HPLC; acetylcysteine

乙酰半胱氨酸 (N -乙酰基- L -半胱氨酸, L -NAC) 具有许多重要的生物活性, 可作为药物助剂、原料药、合成药原料和中间体, 在抗艾滋病、抗癌类药以及化妆品等方面的应用极为活跃^[1-2]。NAC 的测定方法有碘量法^[3]、比色法^[4]、紫外-可见分光光度法^[5-7]、电化学法^[8-9]和高效液相色谱 (HPLC) 法^[10-11]等。但上述方法或专属性差, 或检测灵敏度低。NAC 含有 1 个手性中心, 因此有 L -NAC 和 D -NAC 两个对映异构体, 有关 D -NAC 的药理活性及检测方法未见文献报道。因此, 研究 NAC 的液相色谱手性拆分技术对于医药品产品质量控制具有重要意义。

本文以 R -(-)/ S -(+)-DBD-PyNCS 为手性荧光衍生化试剂, 采用柱前衍生反相高效液相色谱法建

收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20865005)

第一作者: 许 颖 (1979-), 女, 黑龙江漠河人, 硕士研究生

通讯作者: 金东日, Tel: 0433-2732913, E-mail: drji@ybu.edu.cn

立了分离分析 *D*、*L*-NAC 对映体的高灵敏分析方法，并将此法应用于药物制剂的分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

R-(-)/*S*-(+)-DBD-PyNCS(纯度 99.3% 以上, 东京化成工业公司), *L*-NAC(A lfa A esar); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(优级纯, 天津市津科精细化工研究所); 乙腈、甲醇(色谱纯, 山东沈阳禹王实业有限公司); 吡啶(分析纯, 天津市迪博化工有限公司), 冰乙酸(色谱纯, 天津市迪博化工有限公司)。

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, 配有 SCL-6A 系统控制器, RF-6A 型荧光检测器; 浙江大学 N2000 色谱工作站; 日本岛津公司 CTO-6A 恒温箱。美国安捷伦 HPLC 1100 MSD 液相色谱-质谱联用仪。HB-100 恒温金属浴(杭州大和热电子有限公司)。

1.2 标准品溶液及供试品溶液的制备

标准品溶液的制备: 精密称定适量乙酰半胱氨酸标准品, 置于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇制成 0.1 g/L 的溶液。供试品溶液的制备: 按标示量取乙酰半胱氨酸泡腾片(3 批, 规格: 600 mg/片)适量, 精密称定(避光操作), 置于 100 mL 容量瓶中, 加甲醇制成 0.1 g/L 溶液, 摇匀。

1.3 色谱条件

色谱柱: Kromasil 100A C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Lichrospher 100 RP-18(250 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μ m), ODS HYPER SIL C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲盐溶液 (pH 5.9) - 甲醇 (体积比 50 : 28); 激发波长: 450 nm; 发射波长: 550 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L。

1.4 质谱条件

进样模式: 流动注射进样 (FIA); 离子化方式: ESI(-); 扫描电压: 70 V; 质量扫描范围: 100~800 u ; 干燥气 (N_2) 流速: 9 L/min; 干燥气温度: 350 $^{\circ}C$; 雾化器压力: 40 MPa。

1.5 衍生化反应

分别取 DBD-PyNCS 溶液、NAC 溶液和 3% 吡啶溶液各 10 μ L 混合于聚丙烯管中, 用涡旋搅拌器搅拌 1 min, 在恒温金属浴遮光 50 $^{\circ}C$ 下反应 60 min, 取衍生化产物 10 μ L 进样。

1.6 加标回收实验

精密称定适量 *L*-NAC 标准品, 加流动相溶解并稀释成 0.1 g/L 的溶液; 另取泡腾片样品适量, 精密称定, 加流动相稀释成质量浓度约 0.5 g/L 的溶液。精密量取 *L*-NAC 标准品溶液 4、5、6 mL, 分别与 1 mL 泡腾片样品溶液混合, 加流动相稀释至 100 mL, 过滤。取滤液适量, 按“1.5”条件进行衍生化反应。取反应液 10 μ L, 按“1.3”色谱条件进样分析。

2 结果与讨论

2.1 衍生化反应条件

图 1 表示 DBD-PyNCS 与 NAC 的衍生化反应。此反应在碱性介质中进行, 生成 NAC 非对映体衍生物。经质谱分析(图 2), $m/z = 515 [M - H]^-$ (M 为 NAC - DBD-PyNCS 的相对分子质量)。反应温度、反应时间、衍生化试剂用量对衍生化反应产生重要影响。

2.1.1 反应温度的选择 考察了反应时间为 60 min 时, 反应温度对衍生化反应的影响。结果表明, 随着反应温度的升高, 衍生物峰面积逐渐增加, 但 40 $^{\circ}C$ 开始峰面

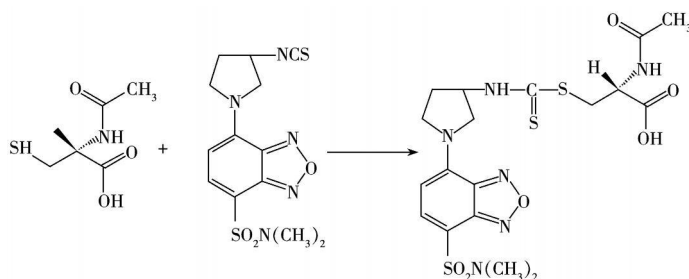


图 1 DBD-PyNCS 与 NAC 反应式
Fig. 1 Reaction of NAC with DBD-PyNCS

积不再随反应温度升高, 40~60℃间出现平台。从 60℃开始, 峰面积出现减小的趋势, 这可能是由于温度过高, 引起了 NAC 或其衍生化产物的分解。因此实验选择反应温度为 50℃。

2.1.2 反应时间的选择 在反应温度为 50℃条件下, 考察反应时间对衍生化反应的影响。NAC 衍生物峰面积随着反应时间的增加而增大。当反应时间为 60 min 时, 衍生物峰面积最大且恒定。所以, 衍生化反应的最佳反应时间为 60 min。

2.1.3 衍生化试剂与 NAC 配比的选择 分别以 DBD-PyNCS 与 NAC 的浓度比为 1:1、2:1、3:1、5:1、10:1、20:1 进行衍生化反应。结果表明, 当两者浓度比为 10:1 时, 衍生化产物的色谱峰面积基本恒定。所以 DBD-PyNCS 与 NAC 的最佳配比为 10:1。

2.2 色谱分离条件的选择

DBD-PyNCS 有 *R*-(−)-和 *S*-(+)-两种对映体。利用这两种对映体可控制其他对映体在色谱柱上的流出顺序(如分离 *D*、*L* 氨基酸^[12])。当没有待测物的单一对映体标准品时, 也可利用这两种对映体试剂考察待测物中各对映体的保留时间和分离情况。本实验在没有 *D*-NAC 标准品情况下, 首先把 *L*-NAC 分别与 *R*-(−)-DBD-PyNCS 和 *S*-(+)-DBD-PyNCS 进行衍生化反应, 生成相应的两种非对映体衍生物。然后在 ODS HYPERSIL C₁₈ 柱上, 考察以甲醇-水-醋酸(70:30:0.1、50:50:1、45:55:1)、甲醇-磷酸盐缓冲溶液(pH=5.9 体积比 28:50)等为流动相时这两种衍生物分离效果。结果表明, 以甲醇-磷酸盐缓冲溶液(pH=5.9 体积比 28:50)作为流动相时得到较好的分离效果(如图 3 所示)。*R*-(−)-DBD-PyNCS-*L*-NAC 和 *S*-(+)-DBD-PyNCS-*L*-NAC 的保留时间分别为 46.5、49.1 min, 分离度 $R_s=1.2$ 。因此, 当用 *S*-(+)-DBD-PyNCS 作为衍生化试剂对 *D*-NAC 和 *L*-NAC 衍生化时, *D*-NAC 和 *L*-NAC 衍生物的保留时间应分别为 46.5、49.1 min, 而用 *R*-(+)-DBD-PyNCS 作为衍生化试剂时, *D*-NAC 和 *L*-NAC 衍生物的保留时间应分别为 49.1、46.5 min。考虑实际样品分析中, 当用 *R*-(−)-DBD-PyNCS 时, 可能发生相对大量的 *L*-NAC 衍生物峰覆盖相对较少的 *D*-NAC 衍生峰的情况。因此, 本实验以 *S*-(+)-DBD-PyNCS 作为手性衍生化试剂。

2.3 线性范围、精密度及加标回收率

L-NAC 在 0.4~40 mg/L 范围内, 其峰面积与质量浓度呈良好线性关系, 其回归方程为: $Y=2.716 \times 10^4 X + 2.959 \times 10^6$, $r=0.9998$ 。检出限($S/N=3$)为 0.4 ng。对 4 mg/L 的 *L*-NAC, 同一天连续进样 7 次, *L*-NAC 衍生物峰面积的相对标准偏差为 1.1%, 表明方法的精密度良好。按“1.6”方法进行加标回收实验, 3 批泡腾片的平均回收率($n=3$)分别为 97%、103%、99%。

2.4 乙酰半胱氨酸泡腾片含量测定

图 4 是乙酰半胱氨酸泡腾片样品的色谱图。根据 NAC 衍生物的保留时间, 图中的色谱峰是 *L*-NAC 的衍生物。在保留时间 46 min 左右没有明显的峰, 表明在本方法检测条件下未检出 *D*-NAC。按优化色谱条件, 各取 3 批乙酰半胱

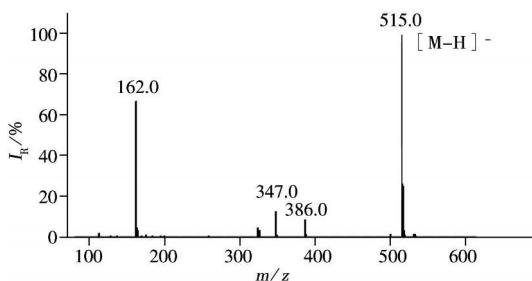


图 2 NAC-DBD-PyNCS 的质谱图

Fig. 2 MS spectra of NAC-DBD-PyNCS

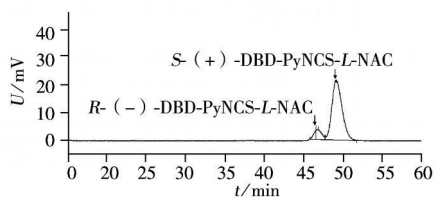


图 3 NAC 衍生物的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of NAC derivatives with *R*-(−)- and *S*-(+)-DBD-PyNCS

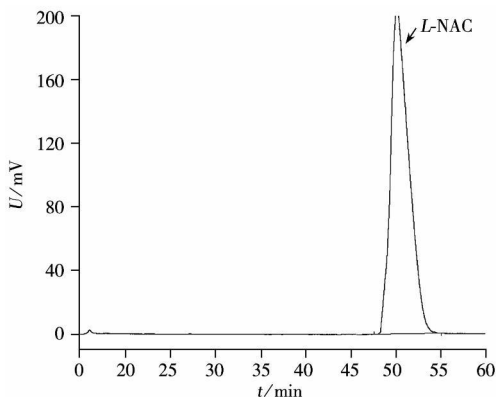


图 4 乙酰半胱氨酸泡腾片的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of acetylcysteine effervescent tablets

氨酸泡腾片和标准品衍生化产物溶液各 10 μL 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积分别计算, *L*-NAC 的平均含量 ($n = 3$) 为 599.8 mg

3 结 论

在本文所建立的分析方法中, 衍生化试剂溶液稳定 (冰箱中至少稳定存在 3 周以上), 衍生化条件温和, 操作简单, 且生成的衍生物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下能保存 24 h, 用 *S*-(+)-DBD- PyNCS 进行衍生化时, 从色谱柱上先流出 *D*-NAC 非对映体衍生物, 后流出 *L*-NAC 非对映体衍生物。这种流出顺序有利于相对比率小的 *D*-NAC 的测定。实验结果表明, 本方法是一种可分离检测 *D*、*L*-NAC 的高灵敏分析方法, 适用于乙酰半胱氨酸实际药品的质量控制。

参考文献:

- [1] TELLIS A M, COY W W. Process for the *N*-monoacetylation of cysteine [P]. 1965-05-18
- [2] CHDOSE S. Acetylcysteine in chronic bronchitis[J]. Eur J Respir Dis Suppl. 1980 (3): 90-92
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 5-6
- [4] OGWU V, COHEN G. A simple colorimetric method for the simultaneous determination of *N*-acetylcysteine and cysteine[J]. Free Radic Biol Med. 1998. 25(3): 362-364
- [5] EDM A. Spectrophotometric determination of cysteine and *N*-acetylcysteine in pharmaceutical preparations[J]. Microchim Acta. 1998. 129(1/2): 91-95
- [6] SUAREZ W T, VIEIRA H J, FATIBELLO-FILHO O. Generation and destruction of unstable reagent in flow injection system: determination of acetylcysteine in pharmaceutical formulations using bromine as reagent[J]. J Pharm Biomed Anal. 2005. 37(4): 771-775
- [7] GARCIA-MOLINA F, PENALVER M J, RODRIGUEZ-LOPEZ J N, GARCIA-CANOVAS F, TUDELA J. Enzymatic method with polyphenol oxidase for the determination of cysteine and *N*-acetylcysteine[J]. J Agric Food Chem. 2005. 53(16): 6183-6189
- [8] SUAREZ W T, MARCOLINO L H, FATIBELLO O. Voltammetric determination of *N*-acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with copper(II) hexacyanoferrate(III)[J]. Microchem J. 2006. 82(2): 163-167
- [9] 王春梅, 高作宁. *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸在咖啡酸修饰碳糊电极上的电催化氧化[J]. 分析测试学报, 2008. 27(12): 1326-1329
- [10] CELMA C, ALLUE J A, PRUNONOSA J, PERAIRE C, OBACH R. Determination of *N*-acetylcysteine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A. 2000. 870(1/2): 13-22
- [11] NOZAL M J, BEMAL J L, TORIBIO L, MARINERO P, MORAL O, MANZANAS L, RODRIGUEZ E. Determination of glutathione, cysteine and *N*-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high performance liquid chromatography and post column derivatization with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)[J]. J Chromatogr A. 1997. 778(1/2): 347-353
- [12] JIN D R, NAGAKURA K, MUROFUSHI S, MIYAHARA T, TOYO'OKA T. Total resolution of 17 *D/L*-amino acids labeled with a fluorescent chiral reagent: *R*-(+)-4-(3-isothiocyanatopropyl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A. 1998. 822(2): 215-224