

毛细管区带电泳法测定还原型谷胱甘肽中的有关物质

徐明明, 邵泓, 郑璐侠, 陈钢*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的:建立测定还原型谷胱甘肽中的有关物质的毛细管区带电泳方法。方法:采用未涂层熔融石英毛细管(60 cm × 75 μm,有效长度 50 cm);以 50 mmol·L⁻¹的磷酸二氢钠溶液(pH1.8),添加 10% 甲醇为运行缓冲液;运行电压为 20 kV,柱温 25℃;检测波长 200 nm;压力进样 3.45 kPa。结果:还原型谷胱甘肽中 4 个已知杂质半胱氨酰甘氨酸、γ-谷氨酰半胱氨酸、氧化型谷胱甘肽和半胱氨酸 杂质峰/内标峰校正峰面积精密度(RSD)分别为 0.57%、1.24%、0.58%、1.56%(n=5),最低检测浓度分别为 0.0263、0.0234、0.0099、0.0257 mg·mL⁻¹;在 0.005~0.2 mg·mL⁻¹范围内与各杂质峰/内标峰校正峰面积呈现良好线性(r 分别为 0.9996、0.9992、0.9998、0.9983);结论:方法快速、简单且准确,可用于还原型谷胱甘肽中有关物质的测定。

关键词:毛细管区带电泳;谷胱甘肽;有关物质;半胱氨酰甘氨酸;谷氨酰半胱氨酸

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)07-1353-05

Capillary zone electrophoresis determination of related substances in reduced glutathione

XU Ming-ming, SHAO Hong, ZHENG Lu-xia, CHEN Gang*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To establish a CZE method for determination of related substances in reduced glutathione.

Methods: A uncoated fused capillary(60 cm × 75 μm 50 cm to the detector) was used. The electrophoresis buffer was 50 mmol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate(pH1.8), add 10% methanol. The separation voltage was 20 kV, column temperature 25℃, detection wavelength 200 nm, pressure injection 3.45 kPa. **Results:** The precision of Cys-Gly, γ-Clu-Cys, GSSG, Cys was good (RSD = 0.57%, 1.24%, 0.58%, 1.56%, respectively; n = 5). The detection limits were 0.0263, 0.0234, 0.0099, 0.0257 mg·mL⁻¹, respectively. The calibration curve of these compounds was linear in the range of 0.005-0.2 mg·mL⁻¹ (r = 0.9996, 0.9992, 0.9998, 0.9983, respectively).

Conclusion: The proposed method can be applied to the determination of related substances in reduced glutathione.

Key words: capillary zone electrophoresis; glutathione(GSSG, GSH); related substances; Cys-Gly; Clu-Cys

谷胱甘肽是自然界广泛存在的三肽类物质,其有两种形态即还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)。在机体中大量存在的是还原型谷胱甘肽,它具有清除自由基、解毒、促进铁质吸收以及维持红细胞膜的完整性、维持 DNA 的生物合成、细胞的正常生长及细胞免疫等多种生理功能^[1]。目前临床上主要用于防治药物、放射治疗、酒精和有机磷等引起的组织细胞损伤,对于各种原因引起的肝脏损伤具有保护作用。

GSH 固体较为稳定,但是在水溶液中容易氧化降解^[2]。在中性和碱性溶液中氧化速度更快,而在

低 pH 溶液中,由于硫醇化合物的质子化作用阻止了其氧化过程^[3]。还原型谷胱甘肽可能存在的杂质为半胱氨酰甘氨酸(Cys-Gly)、γ-谷氨酰半胱氨酸(γ-Clu-Cys)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)和半胱氨酸(Cys)。目前进口药品注册标准 JX20030241 采用高效液相色谱方法控制其有关物质,国内外文献以及欧洲药典报道采用毛细管电泳法对其有关物质进行分析测定。本文在欧洲药典和文献^[3,4]的基础上,摸索并优化了毛细管区带电泳法(CZE)分析 GSH 中的有关物质,并与 HPLC 方法进行比较(4 个已知杂质的含量)。本法简捷、杂质分离度高分离出更多未知杂质,适于分析测定 GSH 中的有关

* 通讯作者 Tel: (021) 38839900-26103; E-mail: mingmingxu.smile@163.com

物质。

1 仪器与试剂

Beckman PA 800Plus 型高效毛细管电泳仪,紫外检测器,32Karat™ Software ver 5.0;未涂层石英毛细管(河北永年光导纤维厂);

GSH(国内某厂家提供的3批原料药,编号1-3;4批还原型谷胱甘肽片,编号4-7;1批注射用还原型谷胱甘肽,编号8);Cys-Gly(纯度90.6%,bachem), γ -Clu-Cys(纯度100%,KOUJIN),GSSG(纯度98%,水分3.9%,sigma),Cys(纯度100%,sigma);磷酸二氢钾、磷酸、盐酸、氢氧化钠等试剂均为分析纯,去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制 分别精密称取对照品Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys适量,加运行缓冲液溶解制成每1 mL中含2 mg的溶液作为对照品储备溶液。精密称取苯丙氨酸适量,加运行缓冲液溶解制成每1 mL中含2 mg的溶液作为内标溶液。

精密称取还原型谷胱甘肽原料0.2 g,加内标溶液1 mL,Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys对照品储备液适量,加运行缓冲液定容至10 mL作为系统适用性溶液。

分别精密称取还原型谷胱甘肽原料、注射用粉末0.2 g,还原型谷胱甘肽片(取20片研细)0.4 g,

表1 Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys的精密度($n=5$)和线性关系

Tab 1 The precision ($n=5$) and linearity of Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG and Cys

杂质(impurity)	迁移时间(migration time)	精密度(precision) /%	线性(linear)	
		杂质峰(impurity peak) / 内标峰校正峰面积(internal emendation peak)	线性方程(linear equation)	r
Cys-Gly	0.11	0.57	$Y = 0.1504X + 0.001$	0.9996
γ -Clu-Cys	0.27	1.24	$Y = 0.0575X + 0.0007$	0.9992
GSSG	0.23	0.58	$Y = 0.1811X - 0.0008$	0.9998
Cys	0.23	1.56	$Y = 0.0976X + 0.0017$	0.9983

2.5 线性关系 精密量取Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys对照品储备液和内标溶液适量,分别制成含4种杂质浓度均为0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.2 mg·mL⁻¹的溶液(相当于GSH浓度的0.025%~1.0%)。平行进样,各杂质峰与内标峰校正峰面积比(Y)与样品浓度之间呈良好线性关系,结果见表1。

2.6 准确度试验 精密称取3份还原型谷胱甘肽原料(约0.2g),精密加入Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys对照品储备液各0.25 mL、0.5 mL、

各加内标溶液1 mL,运行缓冲液定容至10 mL作为供试品溶液;分别精密称取还原型谷胱甘肽原料、注射用粉末0.02 g,还原型谷胱甘肽片(取20片研细)0.04 g,各加内标溶液1 mL,运行缓冲液定容至10 mL作为每个样品的对照溶液。其中还原型谷胱甘肽片溶液经过过滤。

2.2 毛细管电泳条件 未涂层石英毛细管柱(60 cm×75 μ m,有效长度50 cm,使用前用甲醇、0.1 mol·L⁻¹的HCl、1 mol·L⁻¹的NaOH和去离子水各冲洗10 min);运行缓冲液为50 mmol·L⁻¹的磷酸二氢钠溶液(pH1.8),添加10%甲醇;压力进样3.45 kPa;运行电压为20 kV,柱温25℃;检测波长200 nm;每次进样前,依次去离子水、0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液、去离子水、0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液清洗毛细管柱各2 min,然后用运行缓冲液冲洗10 min;所用溶液均经0.45 μ m的微孔滤膜过滤。

2.3 系统适用性 取“2.1”项下的系统适用性溶液进样分析,样品峰以及各杂质峰之间达到基线分离,见图1。

2.4 精密度试验 取内标溶液1 mL,Cys-Gly、 γ -Clu-Cys、GSSG、Cys对照品储备液各0.5 mL,加运行缓冲液定容至10 mL作为精密度实验溶液。连续进样5次,计算各杂质峰迁移时间、杂质峰/内标峰校正峰面积比的RSD,结果见表1。

1.0 mL,用运行缓冲液定容至10 mL作为准确度实验溶液。各杂质浓度分别为0.05 mg·mL⁻¹、0.1 mg·mL⁻¹、0.2 mg·mL⁻¹,相对与GSH浓度的0.25%、0.5%、1.0%。分别进样3针,记录电泳图谱,测得回收率结果见表2。低浓度的回收率相对于高浓度偏低。

2.7 稳定性实验 取“2.2”项下供试品溶液1,室温放置,分别在0、2、4、6、8 h测定,发现图谱中的4个杂质含量呈上升趋势,测定结果见表3,说明该供试品溶液在室温下不稳定,很快降解,主要是杂质

表 2 Cys - Gly、 γ - Clu - Cys、GSSG、Cys 的回收率 (n = 9)
Tab 2 The recovery of Cys - Gly、 γ - Clu - Cys、GSSG and Cys

杂质(impurity)	n	准确度(precision) 回收率(recovery) /%			平均(average) /%
		0.05mg · mL ⁻¹	0.1mg · mL ⁻¹	0.2mg · mL ⁻¹	
Cys - Gly	1	91.0	96.0	102.1	96.8
	2	91.4	96.8	100.3	
	3	92.5	98.5	102.3	
γ - Clu - Cys	1	99.3	93.3	101.9	98.7
	2	99.9	93.2	104.0	
	3	98.4	95.1	103.4	
GSSG	1	92.6	94.7	107.1	98.3
	2	94.8	94.4	107.2	
	3	93.7	97.0	103.2	
Cys	1	92.2	97.8	101.5	98.0
	2	92.5	97.0	105.2	
	3	93.0	96.1	106.5	

GSSG 含量增加,因此需控制进样室温度在 2 ~ 8℃,并且供试品溶液临用新配,配制后马上进样。

本实验同时考察了用碱性缓冲液(pH = 10)配制供试品溶液的稳定性,结果见表 3。由表 3

可见,供试品在碱性缓冲液中杂质 GSSG 含量增长速度大于供试品在酸性缓冲液中 GSSG 的增长速度,样品在酸性条件下相对更稳定,降解速度慢。

表 3 供试品溶液稳定性试验
Tab 3 The stability of test solution

t/h	0		1		2		4		6		8	
	酸性	碱性										
Cys - Gly 含量 (Cys - Gly content) /%	0.10	0.10	0.41	0.14	0.67	0.23	1.22	0.43	1.82	0.62	2.42	0.80
未知杂质含量 (unknown impurity) /%	0	0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.06	0.13	0.08	0.23
相对迁移时间 (relative migration) 0.98												
未知杂质含量 (unknown impurity) /%	0.21	0.23	0.86	0.61	1.12	0.67	1.35	0.68	1.49	0.69	1.69	0.65
相对迁移时间 (relative migration) 1.2												
GSSG /%	0.68	0.90	0.93	2.37	0.99	3.52	1.14	5.93	1.30	9.42	1.51	11.0

酸性(acidic) 碱性(alkalinescence)

2.8 检测限 分别精密量取 Cys - Gly、 γ - Clu - Cys、GSSG、Cys 对照品储备液定量稀释,进样并记录电泳图。S/N ≈ 3 时,最低检测限依次为 0.0263, 0.0234, 0.0099, 0.0257 mg · mL⁻¹。

2.9 样品中有关物质的测定 取“2.2”项下配制

的对照品溶液和供试品溶液,按给定的 CZE 和进口药品注册标准 JX20030241 中的 HPLC 方法,分别进样,采用内标校正因子加 1% 自身对照法计算 GSH 中有关物质的量。两种方法的测定结果进行比较,见表 4。

表 4 CZE 和 HPLC 测定 GSH 中有关物质含量的比较

Tab 4 Comparison of the content of related substance in GSH by CZE and HPLC

编号(number) / 方法(method)	Cys - Gly		γ - Clu - Cys		GSSG		Cys		总杂质(杂质数) (total impurity)	
	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE
1	0.03	0.10	0.34	0.31	0.71	0.68	0.19	0.04	1.27(5)	1.62(17)
2	0.03	0.09	0.34	0.31	0.72	0.68	0.20	0.05	1.29(5)	1.46(17)
3	0.03	0.10	0.34	0.32	0.72	0.71	0.14	0.05	1.23(5)	1.55(17)

续表 1

编号(number) / 方法(method)	Cys - Gly		γ - Clu - Cys		GSSG		Cys		总杂质(杂质数) (total impurity)	
	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE
4	0.05	0.11	0.26	0.26	1.21	0.95	0.27	0.05	1.79(5)	1.87(17)
5	0.05	0.09	0.28	0.28	1.24	1.00	0.27	0.05	1.84(5)	1.92(17)
6	0.05	0.11	0.27	0.28	1.33	1.05	0.22	0.06	1.87(5)	1.99(17)
7	0.08	0.10	0.02	0.07	0.79	0.63	0.18	0.01	1.07(5)	1.27(17)
8	0.12	0.13	0.02	0.02	1.19	1.16	0.25	0.01	1.58(5)	1.53(17)
限度(limit)	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	2.8%	1.0%	未控制(have not control)	0.5%	未控制(have not control)	2.5%

由表 4 可见 ,CZE 方法相对于 HPLC 分离出更多的杂质峰 ,因此更适用于测定 GSH 中的有关物质 ,严格控制药品的质量。

3 讨论

3.1 运行缓冲液的选择 实验中考察了 50 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 pH 值在 1.0 ~ 12.0 范围内对杂质分离度的影响 ,结果发现 pH 值在 1.0 ~ 2.5 和 6.0 ~ 9.0 范围内 ,样品峰和杂质峰分离。由于酸性条件下样品比较稳定 ,氧化较为缓慢 ,本实验在 pH1.0 ~ 2.5 范围内继续考察 ,发现 pH1.8 时杂质峰 10 和 11 杂质峰 13 与 GSSG ,Cys 与 GSH 主峰都能达到基线分离 ,pH 值增加 ,杂质峰 13 与 GSSG ,Cys 与 GSH

主峰不能达到基线分离 ,pH 减小则杂质峰 10 和 11 之间分离度下降。

实验考察了 25 ~ 200 mmol · L⁻¹ 范围内 5 个不同浓度的磷酸二氢钠溶液(pH1.8) 对杂质分离度的影响。发现低浓度时杂质峰 13 与 GSSG ,Cys 与 GSH 主峰之间不能达到基线 ,高浓度时杂质峰 10 和 11 之间分离度降低。50 mmol · L⁻¹ 的磷酸二氢钠溶液(pH1.8) 各杂质峰之间达到基本分离。本实验考察在运行缓冲液中添加有机溶剂甲醇和乙腈(5 ~ 10%) ,降低缓冲液的离子强度 ,电渗流下降 ,出峰时间延长从而改善分离度。实验选择了添加 10% 的甲醇 ,该条件各杂质峰之间达到基线分离 ,见图 1。

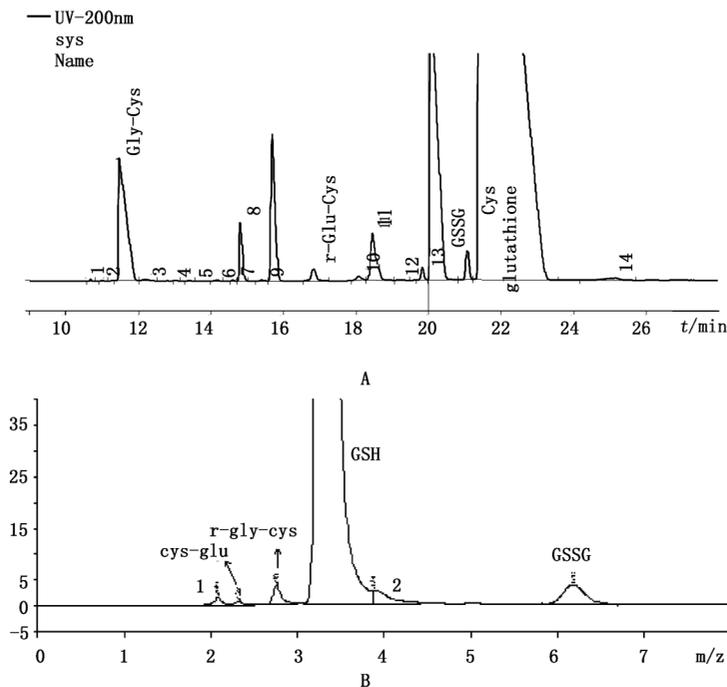


图 1 GSH 的 CZE 图谱和 HPLC 图谱

Fig 1 the chromatography of GSH by CZE and HPLC

A. 1 ~ 14 为未知杂质(unknown impurity) B. 1 和 2 为未知杂质(unknown impurity)

3.2 采用校正峰面积代替峰面积以及内标校正因子 毛细管电泳进行定量分析时 ,组分以不同速度

经过检测窗口 ,组分淌度越大经过检测窗口的时间越短 ,峰面积越小 ,反之则峰面积越大。因此采用峰

面积(*A*) 与迁移时间(*t*) 之比获得校正峰面积(*A/t*) 代替峰面积, 消除组分的消度差异而导致的峰面积响应误差^[5~8]。

另外由于 CZE 进样量极少, 为纳升级, 进样体积误差较大, 使用内标则可以减小这种效应。本实验参照文献^[4], 选择了苯丙氨酸为内标物质, 该内标迁移时间和 4 种有关物质相近, 并且与所有杂质峰不重叠。

4 结论

本实验建立的毛细管区带电泳分离还原型谷胱甘肽中的有关物质, 方法快速、简单且准确, 较 HPLC 方法具有更高的杂质分离度, 更适用于 GSH 中有关物质的测定, 控制其药品质量。

参考文献

- 1 Vina J. Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990
- 2 ZHOU Xue-qin(周学琴), FANG Jing(方静). Stability of reduced glutathione sodium in four different injections (注射用还原型谷胱甘肽钠与 4 种注射液的配伍稳定性考察). *China Pharmacy*(中国药房) 2008, 19(35): 2759
- 3 Luo X, Lu JD, Fu XY. Study of oxidation of glutathione by capillar-

- y electrophoresis. *Chin Chem Letters*, 2001, 12: 363
- 4 N. Novatchev, U. Holzgrabe. Capillary electrophoresis method for determination of related substances in glutathione reduced drug substance. *Chromatographia*, 2003, 57: 345
- 5 YANG Zhao-peng(杨昭鹏), WANG Guo-feng(王国峰), ZENG Wen-shan(曾文珊) *et al.* Study on assay and determination of related substances of acetylcysteine(乙酰半胱氨酸含量及其相关物质测定方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(3): 189
- 6 SHAO Hong(邵泓), ZHENG Lu-xia(郑璐侠), SUN Dai-ni(孙黛妮) *et al.* HPLC ion chromatography determination of free ammonium salt in glutathione and other drugs containing amide(离子色谱法测定谷胱甘肽等含酰胺基药物中游离铵盐的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2009, 29(6): 901
- 7 Kunkel A, Degenhardt M, Schirm B *et al.* Performance of instruments and aspects of methodology and validation in quantitative capillary electrophoresis an up date. *J Chromatogr A*, 1997, 768: 14
- 8 GUO Huai-zhong(郭怀忠), BI Ka-shun(毕开顺), SUN Yu-qing(孙毓庆). Factors affecting reproducibility of analytical results of capillary electrophoresis and their control(影响毛细管电泳分析结果重现性的因素及其控制). *Anal Instrum*(分析仪器), 2005, 2: 42

(本文于 2010 年 8 月 31 日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起, 凡投稿本刊, 请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后, 可在线了解稿件情况: 编辑 - 送审 - 专家已审 - 待编辑处理稿件 - 退修 - 编辑加工完成 - 已刊出等。

读者可在线查看本刊目录, 了解本刊编委及其他信息, 并可在在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题, 请与技术支持联系: 010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部