

高效毛细管电泳法测定泰特中还原型和氧化型谷胱甘肽

徐志利 邓兆勇 杨仲元

(广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要 用高效毛细管电泳法测定泰特中还原型和氧化型谷胱甘肽含量。电泳系统由 100 mmol/L 硼酸盐缓冲液和 10 mmol/L *N*-[2-羟基-1,1-二羟甲基-乙基]甘氨酸 (tricine) 组成 (pH 8.5); 工作电压 20 kV, 检测波长 200 nm, 6 min 内两组分达到基线分离。选用腺苷作内标物进行测定, 两组分在 20~500 μg/ml 范围内呈线性。

关键词 泰特; 还原型谷胱甘肽; 氧化型谷胱甘肽; 高效毛细管电泳

谷胱甘肽广泛分布于机体各器官内, 防止自由基和其它氧化物损伤细胞, 为维持细胞生物功能所必需, 以还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSH) 两种形式存在, 其中 GSH 为主要存在形式^[1]。泰特是意大利福斯卡马生化公司生产的一种谷胱甘肽粉针剂, 作为外源性谷胱甘肽, 用于药物中毒、酒精中毒及其它化学中毒的治疗。主成分为 GSH 钠盐, GSSH 为限量杂质, 测定方法为 HPLC 法。有文献报道用高效毛细管电泳 (HPCE) 测定红细胞中的 GSH 和 GSSH^[1], 由于是内源性谷胱甘肽, 所处环境比较复杂, 所以测定条件非常苛刻, 需用特殊的键合亲水性涂层毛细管柱, 缓冲液为强酸性 (pH 2.1)。本文建立一种外源性谷胱甘肽 HPCE 测定方法, 采用普通非涂层毛细管柱, 碱性缓冲液, 用于泰特中 GSH 和 GSSH 含量测定。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Bio Focus 3000 型毛细管电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), 带操作积分软件和快速扫描紫外检测器; *N*-[2-羟基-1,1-二羟甲基-乙基]甘氨酸 (tricine) (Bio-Rad 公司产品), 硼酸、氢氧化钠和盐酸均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水 (自制); 还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽 (Sigma 公司), 腺苷 (意大利 Life Phama 公司), 泰特 (批号: 36051,

35040, 35110), 意大利 Foscam a 公司产品。

1.2 电泳条件

非涂层毛细管柱 50 cm × 50 μm (有效长度为 45.5 cm); 电泳缓冲液由 100 mmol/L 硼酸盐缓冲液和 10 mmol/L tricine 组成 (pH 8.5), 操作电压为 20 kV, 检测波长 200 nm, 柱温 20°C, 进样由正极至负极, 10 Psi* Sec 压力进样 (相当于 15 nl) 电泳缓冲液使用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

每次用毛细管柱时, 先用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 5 min, 再用去离子水冲洗 5 min, 最后用电泳缓冲液平衡 10 min, 2 次测定之间用电泳缓冲液冲洗毛细管 3 min。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

精密称取 GSH 和 GSSH 对照品适量, 置于同一量瓶中, 用水溶解, 制成浓度均为 5 mg/ml 的对照品储备液; 分别量取该储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 和 2.5 ml 置 25 ml 量瓶中, 分别精密加入用水制成的浓度为 1.5 mg/ml 的内标腺苷溶液 1.0 ml, 用水定容, 进样分析。以待测组分峰面积与内标峰面积比值为纵坐标 (*Y*), 浓度为横坐标 (*X*), 作工作曲线, GSH 线性方程为: $Y = 0.0180X + 0.0735$, $r = 0.9996$ ($n = 5$); GSSH 线性方程为 $Y = 0.0154X + 0.0035$, $r = 0.9999$ ($n = 5$); 线性范围均为 20~

500 $\mu\text{g/ml}$

2.2 精密度试验

本实验条件下,内标物脲苷、GSH和 GSSH在 6 min内达到基线分离(见图 1),迁移时间 RSD分别为 0.4%、0.6%和 0.5%;峰面积 RSD分别为 1.1%、2.2%和 1.0% ($n=5$).

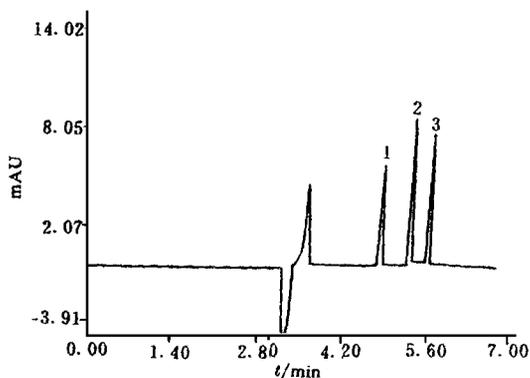


Fig 1. Spectra of glutathione

1. Uridine(4.77 min); 2. GSH(5.23 min); 3. GSSH(5.55 min)

2.3 加样回收率

精密量取 GSH和 GSSH对照品储备液适量,加到已知含量的泰特样品(批号:36051)中,并加入内标脲苷储备液 1 ml,进样分析。计算回收率,结果见表 1

Tab 1. The recovery test($n=3$)

No.	Added $\mu\text{g/ml}$	Found $\mu\text{g/ml}$	Recovery %	\bar{x}	RSD %	
GSH	1	37.66	37.10	98.5	98.1	1.0
	2	37.66	36.53	97.0		
	3	37.66	37.21	98.8		
GSSH	1	56.50	55.82	98.8	99.5	0.9
	2	56.50	56.10	99.3		
	3	56.50	56.78	100.5		

2.4 样品测定

精密称取泰特样品适量,用水溶解,用 0.1 mol/L 盐酸调 pH至 3.0,加入内标脲苷储备液 1 ml 3次测得各组峰面积与内标物峰面积之比平均值代入标准曲线方程,计算 GSH和 GSSH含量并与 HPLC法测定结果进行比较,见表 2

2.5 实验条件优化

2.5.1 缓冲液 pH的影响

电泳缓冲液 pH对 GSH和 GSSH的迁移行为影响很大。当 $\text{pH} < 2.5$ 时, GSSH迁移率大于 GSH,由于电渗流较小,迁移时间长达 15 min,峰形展宽严重, $\text{pH} = 6.0$ 时, GSH和 GSSH迁移率基本无差别; $\text{pH} > 7.5$ 时, GSH的迁移率开始快过 GSSH;值得一提的是 $\text{pH} = 8.0$ 时, GSH峰出现分裂。色谱峰的分裂是体内药物分析中存在的一个较为普遍的问题^[2],但此处的峰形分裂是何机理,尚有待于进一步研究, $\text{pH} = 8.5$ 时, GSH峰的分裂消失,迁移时间在 6 min内,且峰形对称,故选择 $\text{pH} 8.5$

Tab 2. Content of GSH and GSSH in TAD($n=3$)

Batch No.	GSH(%)		GSSH(%)	
	HPCE	HPLC	HPCE	HPLC
36051	89.3	90.2	1.4	1.0
35040	90.1	90.4	1.5	1.0
35110	90.0	91.2	1.4	1.2

2.5.2 tricine浓度的影响

tricine是一种两性电解质, $\text{pK}_a = 8.15$,它的加入可增加缓冲液离子强度但不增加电导率^[3],不会增加焦耳热的产生。本实验中, tricine的加入及其浓度大小对 GSSH峰形基本无影响,但对 GSH峰形影响很大,作用类似于 HPLC中的峰形扫尾剂,当不加入 tricine或浓度低于 10 mmol/L时, GSH峰拖尾严重,加入 10 mmol/L tricine时, GSH峰对称性好。

参考文献

- Giovanni P, Mara F, Beatrice B, *et al.* Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *J Chromatogr*, 1994, **676**(1): 239
- 杜迎翔,陈玉英,李康乐等. 双氯灭痛血药浓度的高效液相色谱分析. 中国药科大学学报, 1995, **26**(1): 23
- Sally AS. Use of non-ionic and zwitterionic surfactants to enhance selectivity in high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr*, 1990, **503**(2): 449

Determination of Reduced and Oxidized Glutathione in TAD by High-Performance Capillary Electrophoresis

Xu Zhili, Deng Zhaoyong, Yang Zhongyuan

Guangzhou Municipal Institute for Drug Control, Guangzhou 510160

Abstract A high-performance capillary electrophoresis (HPCE) method for the separation and determination of reduced and oxidized glutathione in TAD was developed. The run buffer contained 100 mmol/L borate and 10 mmol/L *N*-[2-hydroxy-1, 1-bis(hydroxymethyl)-ethyl] glycine (tricine) (pH 8.5), and the applied voltage was 20 kV with the detection wavelength of 200 nm. A baseline separation of the two types of glutathione could be achieved in 6 minutes. The standard curves were both linear from 20 to 500 μ g/ml, using uridine as internal standard.

Key words TAD; Reduced glutathione; Oxidized glutathione; High-performance capillary electrophoresis

全国中医药临床学术研讨会征文通知

中国中医药学会拟于 1998年 9- 10日在安徽省黄山市召开“首届全国中医药临床学术研讨会”,现向全国中医药临床工作者征集稿件。

- 1 中医药临床各科研的现状、问题、对策、未来预测和设想及发展战略,临床各科疾病的诊治思路与方法。
- 2 易、儒、释、道对中医药临床诊疗的影响,中医药古典医籍在临床工作中的地位及其指导作用,古代医家临床经验的挖掘和整理。
- 3 名老中医之路,要求被介绍者为全国中医药学术继承人导师。
- 4 当代名老中医经验介绍,要求被介绍者在某一地域内有较高知名度,在某一学科中有一定造诣,具副高以上职称。
- 5 临床各种常见病、多发病的诊治经验、应用体会和新认识、新方法、新技术、新成果、新进展。
- 6 临床各种疑难杂病如心脑血管疾病、心肺疾患、肝病、肾病、内分泌系统疾病、风湿病、颈椎病、肝癌、艾滋病、急症、老年病、妇儿杂症等的诊治经验和体会。
- 7 方药运用,中药复方的临床研究和药理实验,各类中药新药和制剂的疗效分析评价以及老药新用介绍。
- 8 祖传或自创的中草药单方偏方、验案验方、民间疗法、特种疗法的经验介绍。
- 9 针灸、推拿、按摩、理疗、保健等生方法介绍。
- 10 如何避免中医临床研究、临床报道的“低水平重复”?
- 11 中医药临床实用人才培养的途径和方法。
- 12 计算机在中医药临床诊疗中的应用。

本次大会由安徽中医临床杂志社承办,入选论文由安徽《中医临床杂志》(国内统一刊号 CH34- 1132/R,国际标准刊号 ISSN 1005- 7331)以专辑形式正式发表,1998年 8月中旬出版。本次征文不收审稿,酌收版面费: 2000字以内 160元, 2000字以上 240元,请作者在寄出稿件的同时汇寄版面费,未录用者原款退回。具体参会事宜另行通知。

来稿请附作者简介,包括姓名、性别、出生年月、职务职称、诊疗特长、通讯地址、邮政编码、联系电话等。征文截稿日期: 1998年 6月 30日(以邮戳为准),信封上请标明“临床征文”字样。应征稿件和版面费请寄合肥市六安路 205号安徽《中医临床杂志》编辑部收,邮码: 230061,联系人: 黄辉