

毛细管电泳法对谷胱甘肽中杂质E的定量分析

Identification and quantitative analysis of impurity E in glutathione by capillary electrophoresis

唐红梅, 王文涛, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Hongmei Tang, Wentao Wang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: Capillary electrophoresis, Quantitative analysis, glutathione, Impurity E

引言

谷胱甘肽是一种含 γ -酰胺键和巯基的三肽, 由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成, 广泛存在于动、植物组织和微生物中, 在生物体内能帮助免疫系统保持正常的功能, 并具有抗氧化和整合解毒的作用。谷胱甘肽固体较为稳定, 但是在水溶液中容易氧化降解; 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。还原型谷胱甘肽中可能存在的杂质为L-半胱氨酰甘氨酸 (杂质A)、L-半胱氨酸 (杂质B)、氧化型谷胱甘肽 (杂质C)、 γ -谷氨酰半胱氨酸 (杂质D), 还可能存在未知杂质E。还原型与氧化型谷胱甘肽含量的比值可作为细胞氧化还原状态的主要动态指标。谷胱甘肽中杂质的产生会影响到后续产品的质量及其生产的进行, 因此需要建立一种能准确确认及定量的分析方法。毛细管电泳方法 (CE) 可以实现杂质E与主成分谷胱甘肽及其他杂质 (B、C、D) 的有效分离, 并且欧洲药典中规定每个峰相对于内标 (约14分钟) 的相对迁移时间: 杂质E约等于1.2; 毛细管电泳是欧洲药典收录方法, 并且毛细管电泳法可以同时谷胱甘肽中的杂质E进行确认及定量分析, 具有灵敏度高、稳定性好、对环境友好、分析速度快等特点。

本文参照欧洲药典的方法选用毛细管电泳法对谷胱甘肽中的杂质E进行定量分析。本方法简捷、杂质分离度高, 适于分析测定谷胱甘肽中的有关杂质E。

2. 试剂及方法

2.1 仪器和试剂

L-苯丙氨酸标准品 (Sigma-Aldrich); L-半胱氨酸标准品 (Sigma-Aldrich); 氧化型谷胱甘肽标准品 (Sigma-Aldrich); 无水磷酸二氢钠 (Sigma-Aldrich); 去离子水 (Millipore); 磷酸 (Sigma-Aldrich); 盐酸 (Sigma-Aldrich); 氢氧化钠 (Sigma-Aldrich); 样品: 谷胱甘肽粉末样品 (0.6 g左右)。

2.2 样品及前处理

2.2.1 背景电解质溶液制备

背景电解质溶液: 将1500 mg无水磷酸二氢钠溶解在230 mL去离子水中, 并用磷酸调节至pH值1.80用去离子水稀释至250 mL。

2.2.2 内标溶液制备

内标溶液: 取L-苯丙氨酸约10 mg, 置于50 mL容量瓶中, 加背景电解质溶液溶解并稀释至刻度, 内标溶液浓度为0.2 mg/mL。

2.2.3 系统适用性溶液制备

系统适用性溶液: 取杂质B标准品约5 mg、杂质C标准品约5 mg, 置于50 mL容量瓶中, 加内标溶液溶解, 杂质B终浓度为0.1 mg/mL, 杂质C中浓度为0.1 mg/mL, 作为系统适用性溶液。

2.2.4 供试品溶液制备

供试品溶液: 精确称取20 mg谷胱甘肽粉末样品置于1.5 mL离心管中, 加1 mL内标溶液溶解, 浓度为20 mg/mL, 作为供试品溶液。

2.2.5 对照品溶液制备

精密量取供试品溶液10 μ L, 放置于1.5 mL离心管中, 用内标溶液稀释100倍, 浓度为0.2 mg/mL, 作为对照品溶液。

2.3 仪器及方法设置

毛细管：SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统，匹配UV检测器，采集频率：2 Hz，检测波长：200 nm；熔融石英毛细管，75 μm 内径，50/60.2 cm (有效/总长度)；进样：0.5 psi，5 s；分离电压：20 kV，45 min；毛细管温度：25 °C；样品室温度：10 °C。

新毛细管的预处理：先用0.1 N HCl在20 psi压力下冲洗毛细管20 min；再用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管10 min；为了实现毛细管完全平衡，先用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管40 min，然后在20 kV下加电平衡毛细管60 min。

每次运行前毛细管预处理：用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管40 min；

毛细管运行间冲洗：用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管1 min；然后用0.1 N NaOH在20 psi压力下冲洗毛细管2 min；再用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管1 min；再用0.1 N HCl在20 psi压力下冲洗毛细管3 min；最后再用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管10 min。

3. 结果与分析

3.1 系统适用性验证

为了保证分离结果，需要先进行系统适用性验证，利用前文2.2.5制备的系统适用性溶液进行实验验证，得到的毛细管电泳分离谱图如下所示；

欧洲药典中规定每个峰相对于内标 (约14分钟) 的相对迁移时间：杂质A= 约0.77；杂质B= 约1.04，杂质E= 约1.2；杂质C= 约1.26，杂质D= 约1.3。由系统适用性溶液分离结果可知，系统适用性测试正常，满足欧洲药典的要求。

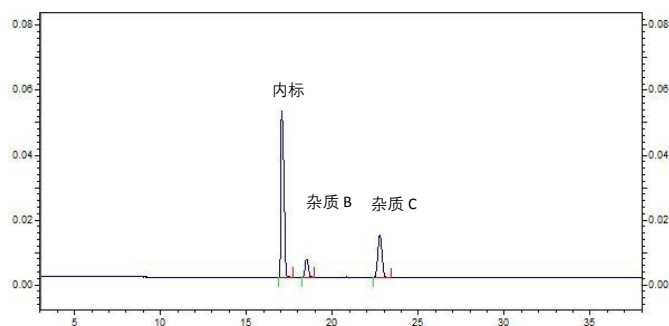


图1. 系统适用性毛细管电泳分离谱图

表1. 系统适用性溶液分离结果表

名称	相对迁移时间(min)		分辨率	
	欧洲药典标准	实验数据	欧洲药典标准	实验数据
内标	0.00	0.00	0.00	0.00
杂质B	1.04	1.08	>1.5	4.20
杂质C	1.26	1.33	--	10.61

3.2 毛细管电泳法对样品中杂质E的分析

利用毛细管电泳法对供试品中的杂质进行分析；供试品的毛细管电泳分离谱图如下图2所示；分离度以及相对迁移时间结果如表2所示；

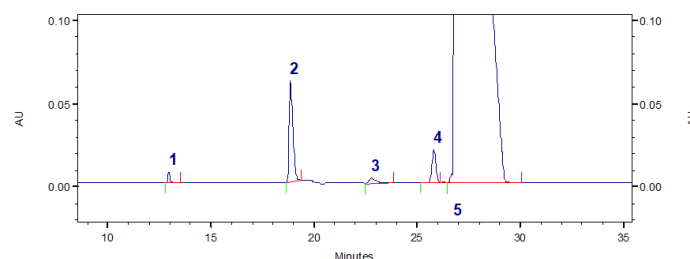


图2. 供试品毛细管电泳分离谱图

通过供试品溶液的毛细管电泳分离谱图结果可知：2号峰为内标，5号峰为谷胱甘肽主成分峰；欧洲药典规定：杂质E可以通过相对迁移时间进行确认，杂质E与内标的相对迁移时间为1.2；结合供试品毛细管电泳分离谱图可知：3号峰与内标的相对迁移时间是1.2，因此3号峰为杂质E，说明毛细管电泳法可以对谷胱甘肽中的杂质E进行很好的分离。

3.3 毛细管电泳法对样品中杂质E的定量分析

通过毛细管电泳法得到对照品溶液以及供试品溶液的电泳分离谱图，根据两者电泳分离谱图中内标峰的峰面积、供试品杂质的峰面积以及对照品中谷胱甘肽的峰面积即可根据公式计算即可得到杂质E的百分比含量。计算公式如下：

$$\text{杂质E} = \frac{(A_{\text{供试品杂质E}} \times A_{\text{对照品内标}})}{(A_{\text{供试品内标}} \times A_{\text{对照品谷胱甘肽}})}$$

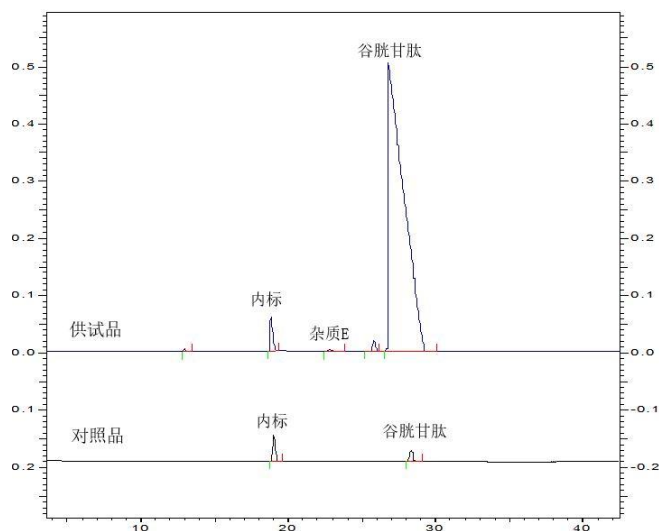


图3. 比较供试品以及对照品的毛细管电泳分离谱图

根据上述公式计算，该供试品中杂质E的百分含量为0.17%；因此利用毛细管电泳法可以对谷胱甘肽中的杂质E进行快速的定量分析。

4. 结论

本文借助于毛细管电泳法谷胱甘肽样品中杂质E进行定量分析。通过系统适应性试验实验结果得到杂质B、杂质C的峰相对于内标峰的迁移时间，以及内标峰与杂质B的分离度大于1.5，均满足欧洲药典对于分离度的要求；根据欧洲药典中对杂质E的相对迁移时间规定，利用毛细管电泳方法对谷胱甘肽供试品溶液进行测试，可以对杂质E进行很好的分离；另外通过对供试品溶液以及对照品溶液的毛细管电泳分离谱图进行对比得到计算公式中的相应峰面积，从而可以对杂质E进行简单快速的定量。

*产品或方法仅限于科研用途，不用于临床诊断

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14995-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China