

HPLC同时测定人血浆中乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽浓度

戚静燕¹, 鲍红荣¹, 俞建平¹, 崔健¹, 陈振明², 王佶² (1.浙江省临安市人民医院, 浙江 临安 311300; 2.浙江大学, 杭州 310058)

摘要:目的 建立高效液相色谱法同时测定人血浆中乙酰半胱氨酸 (NAC)和谷胱甘肽 (GSH)浓度的方法。方法 采集血样, 立即注入预加衍生化试剂 DNTB的真空采血管中, 25 min内分离血浆, 以青霉胺为内标, 10%三氯乙酸 (TCA)沉淀蛋白, 上清液进样 20 μ L。色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)及保护柱。流动相为 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹乙酸钠缓冲液 (pH 5.6) 甲醇 (90:10), 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹。柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 320 nm。结果 NAC和 GSH在浓度 3.05 ~ 61 μ g $\cdot$ mL⁻¹范围内

基金项目:浙江省临安市科学技术局 2006年科技发展项目 (No. 2006071)。

作者简介:戚静燕,女,主任药师 Tel: (0571) 63686856 E-mail: qjy640624@163.com

呈良好的线性关系, NAC $r=1$ ($n=5$), GSH $r=0.9998$ ($n=5$), 检测限均为 $3.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。日内误差及日间误差 RSD 均在 10% 以内。低、中、高 3 个浓度的质控样品回收率在 88.2% ~ 101% 之间。结论 该方法准确、快速、简便、重现性好, 可供 NAC 的体内药动学研究。

关键词: 乙酰半胱氨酸 (NAC); 谷胱甘肽 (GSH); 人血浆; 浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R17.1; R979.19 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)03-0244-04

Simultaneous Determination of N-acetylcysteine and Glutathione in Human Plasma by HPLC

QI Jing-yan¹, BAO Hong-rong¹, YU Jian-ping¹, CUI Jian¹, CHENG Zheng-ming², WANG Ji¹ (1. Linan People's Hospital, Linan 311300, China; 2. Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination N-acetylcysteine and glutathione in human plasma by HPLC. **METHODS** Blood samples were immediately injected into heparinized tubes pretreated with derivatization reagent DTNB and centrifuged within 25 minutes after sampling. Penicillamine was used as an internal standard. 10% TCA was added to precipitate the proteins. 20 μL of the supernatant liquid was injected into the HPLC system. The samples were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) and a guard column. Using a mobile phase consisting of 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ sodium acetate buffer (pH 5.6) and methanol (90:10), the flow rate was 1 mL $\cdot$ min⁻¹. At 30 $^{\circ}\text{C}$, the detection wavelength was set at 320 nm. **RESULTS** The standard curve was linear over the range of 3.05 to 61 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentrations of the NAC and GSH. NAC $r=1$ ($n=5$), GSH $r=0.9998$ ($n=5$). The limit of detection was 3.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The intraday and interday RSDs were below 10%. The recoveries of the control samples of low, medium and high concentrations were within the range of 88.2% ~ 101%. **CONCLUSION** This method is rapid, simple, accurate, reproducible, and suitable for the pharmacokinetics studies of NAC.

KEY WORDS: N-acetylcysteine; glutathione; human plasma; concentration; HPLC

乙酰半胱氨酸 (NAC) 是一种巯基化合物, 为还原型谷胱甘肽 (GSH) 的前体, 不仅作为黏液溶解剂, 且具有干扰自由基生成, 清除已生成的自由基, 调节细胞的代谢活性, 预防 DNA 的损伤, 调整基因的表达和信号转导系统, 抗细胞凋亡, 抗血管生成, 抑制恶性肿瘤发展, 抑制新生物的生成和转移^[1], 保护肝脏细胞等作用。最近大量研究发现 NAC 在艾滋病、癌症、药物及重金属中毒、心脏病、帕金森病以及吸烟损害等方面具有广泛的作用^[2]。因其药理作用正受到更大的关注, 对其药动学的研究更显重要。目前国内文献报道主要集中在用 HPLC 测定复合氨基酸注射液 (17AA) 中 NAC 的含量^[3-4]。对于利用 HPLC 测定 NAC 血药浓度的方法未见报道。本研究在文献^[5]的基础上, 建立了 HPLC 同时测定人血浆中 NAC 和 GSH 血药浓度的方法。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (包括在线脱气机, 四元泵, 紫外检测器, Agilent 1100 Chem station); Agilent Anke TGL-18G-C 高速离心机; SZ-1 型快速混匀器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。NAC 对照品 (武汉武大弘远药品有限公司, 批号: 20051202, 含量 101.1%); GSH 标准品 (日本 KYOWA HAKKO KOGYOCO, LTD. 批号: IZ39126, 含量 99.3%); 青霉胺 (d-3-巯基缬氨酸, 上海信谊药业, 批号: 061201); 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸 (DTNB, Sigma 公司); 甲醇 (色谱纯, Merck 公司); 水 (灭菌注射用水, 浙江平湖莎普爱思制药有限公司)。乙酸钠 (NaAc)、乙酸 (HAc)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)、磷酸氢二钾 (K₂HPO₄)、三氯乙酸

(TCA) 均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 及保护柱 (美国 Agilent 公司); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 乙酸钠缓冲液 (pH 5.6) - 甲醇 (90:10); 流速: 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 320 nm; 进样量: 20 μL 。

2.2 标准溶液的配制

对照品溶液: 分别精密称取 GSH、NAC 对照品各 25 mg, 各置于 50 mL 量瓶中, 用 2.7 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 EDTA-2Na 溶液溶解并稀释至刻度, 即得质量浓度为 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 并用其稀释成 250, 125, 50, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GSH, NAC 系列浓度标准储备液。

内标储备液: 精密称取青霉胺适量, 用 5 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EDTA 配制成药 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为内标溶液。

衍生化试剂: 以 0.5 mol $\cdot$ L⁻¹ K₂HPO₄ 溶液为溶剂, 将 DTNB 配制成 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的溶液, 备用。

以上试液均置冰箱内 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存, 待用。

2.3 血浆样品处理

取空白血浆 65 μL , 加入 DTNB 溶液 35 μL , 再加入内标溶液 20 μL , 加入 25 μL 测试浓度的 NAC、GSH 标准储备液, 漩涡混合 30 s, 室温反应 10 min, 加入 10% TCA 35 μL 沉淀蛋白, 漩涡 30 s, 10 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 2 min。吸取上清液, 20 μL 进样, 记录色谱图。

2.4 色谱行为

2.4.1 空白血浆色谱图 按“2.3项”下方法操作,不加入内标溶液及 NAC, GSH标准储备液,进样 20 μL ,得色谱图。

2.4.2 空白血浆+内标色谱图 按“2.3项”下方法操作,加入内标溶液 20 μL ,但不加入 NAC, GSH标准储备液,进样 20 μL ,得色谱图。

2.4.3 GSH, NAC,内标血浆样品色谱图 按“2.3项”下方法操作,得色谱图, GSH, NAC,内标保留时间分别为 5.68, 11.40, 21.77 min左右。

2.5 标准曲线的绘制(平行样 $n=5$)

分别取浓度为 25, 50, 125, 250, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GSH, NAC标准储备液各 25 μL ,按“2.3”项下方法操作后,配制得 NAC, GSH 的血浆浓度分别为 3.05, 6.1, 15.25, 30.5, 61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,进样后分别以 GSH, NAC的质量浓度为纵坐标, NAC, GSH与内标峰面积之比为横坐标进行线性回归。结果表明:两标准曲线在质量浓度为 3.05 ~ 61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,标准曲线方程为 NAC: $y=4.9126x-0.7637$, $r=0.9998$; GSH: $y=8.4163x-1.5837$, $r=1$;检测限均为 3.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 回收率试验 ($n=5$)

按“2.3项”下方法操作,取 25, 125, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的

表 2 精密度实验 ($n=5$)

Tab 2 Precision of the method($n=5$)

理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	NAC				GSH			
	日内精密度		日间精密度		日内精密度		日间精密度	
	实测浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	实测浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	实测浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	实测浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%
3.05	2.69 $\pm$ 0.1	2.18	2.906 $\pm$ 0.2	3.19	2.988 $\pm$ 0.1	2.56	2.934 $\pm$ 0.3	9.13
15.25	15.25 $\pm$ 0.1	0.65	15.504 $\pm$ 0.8	3.36	15.362 $\pm$ 0.2	0.49	15.448 $\pm$ 0.7	2.75
61.00	61.00 $\pm$ 0.7	0.79	60.788 $\pm$ 0.5	0.58	61.161 $\pm$ 1.3	1.20	60.803 $\pm$ 0.9	1.15

2.8 稳定性实验

2.8.1 标准储备液稳定性 取在冰箱内 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存的 25, 125, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GSH, NAC标准储备液各 25 μL ,按“2.3”项下方法操作,配制得 NAC, GSH 血浆标准液低、中、高三个浓度水平的血浆浓度分别为 3.05, 15.25, 61.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别在 1, 10, 15, 20 d进样测定,记录峰面积,计算 RSD,结果见表 3,数据显示 RSD值均小于 10%,表明 GSH, NAC的标准储备液在 20 d内室温下稳定性较好。

表 3 稳定性实验 ($n=5$)

Tab 3 Stability of the method ($n=5$)

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标准储备液稳定性		冻融稳定性			
	NAC	GSH	NAC		GSH	
			RSD /%	RSD /%	RSD /%	RSD /%
	RSD /%	RSD /%	(24 h)	(48 h)	(24 h)	(48 h)
3.05	7.71	6.07	5.10	20.6	15.05	16.2
15.25	3.89	1.80	1.19	20.9	1.89	15.3
61.00	1.94	4.42	0.89	20.3	1.12	15.7

2.8.2 血浆样品冻融稳定性 按“2.3”项下方法操作,取 25, 125, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GSH, NAC标准储备液各 25 μL ,配

GSH, NAC标准储备液各 25 μL ,配制得 NAC, GSH 血浆标准液低、中、高三个浓度水平的血浆浓度为 3.05, 15.25, 61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以血浆样品标准曲线 NAC, GSH测得值与加入量之比计算方法回收率。结果见表 1。

表 1 方法回收率 ($n=5$)

Tab 1 Results of the recovery test($n=5$)

理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	NAC /%		GSH /%	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
3.05	88.2 $\pm$ 2.7	2.18	98.0 $\pm$ 2.6	1.76
15.25	100.4 $\pm$ 0.5	0.65	100.7 $\pm$ 0.6	0.49
61.00	99.4 $\pm$ 1.2	0.78	100.3 $\pm$ 2.1	1.19

2.7 精密度试验

按“2.3”项下方法操作,取 25, 125, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GSH, NAC标准储备液各 25 μL ,配制得 NAC, GSH 血浆标准液低、中、高三个浓度水平的血浆浓度为 3.05, 15.25, 61 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,进行 1 d内按血样处理和色谱分析方法平行操作 5次,日内重复测定 5次,连续测定 5 d,计算得日内精密度及日间精密度均在 10%以内,表明本试验所建立的测定方法具有良好的重现性,结果见表 2。

制得 NAC, GSH 血浆标准液低、中、高三个浓度水平的血浆浓度为 3.05, 15.25, 61.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻,分别经 24, 48 h复融后测定,结果见表 3,数据显示, NAC冷冻保存 24 h后, RSD值小于 10%,稳定性尚可,但冷冻保存 48 h后, RSD值大于 20%,稳定性较差; GSH冷冻保存 24 h后, RSD值大于 15%,稳定性较差。

3 讨论

3.1 国外有文献报道, Dimitrios等^[6],对口服 NAC前后人体血浆内的半胱氨酸(Cys)和 NAC的浓度进行检测。血样经亚硝酸盐衍生,采用反相离子对色谱法; Heyden等^[7]采用 LiChrosorb RP-18色谱柱,荧光检测器分别测定人体血浆中内源及高治疗浓度的 NAC含量。但不能同时测定 NAC及 GSH;经大量实验数据表明,本实验采用的柱前衍生 HPLC法同时测定人血浆中 NAC和 GSH含量,快速、简便、精确、重现性好,同时也证实虽然 GSH为内源性物质,但使用此法测定,并不干扰 GSH、NAC和内标的测定。

NAC作为小分子物质,脱乙酰基后成为 GSH合成的前体,体内外的实验证据均提示 NAC能提高细胞内进行 GSH的生物合成^[2],本方法虽已证实人体使用 NAC前, GSH几乎

无影响,但使用 NAC 后对 GSH 浓度的影响程度及幅度,还有待于下一步检测,从而了解人体使用 NAC 后,转化为 GSH 的各项数据,可进一步揭示 NAC 提高细胞内进行 GSH 的生物合成,发挥药理效应的因素,具较大临床意义。

3.2 据报道^[8],血液离体后,血浆中 GSH 的巯基迅速氧化,很难测到其真实浓度,因此本实验采用预加衍生生化试剂 DTNB^[5]方法,以使测定结果准确。经稳定性试验,证实其血浆样品冻融稳定性不佳,建议测定 NAC 血药浓度时,在 -20℃ 冰箱冷冻保存不得超过 24 h,测定 GSH 血药浓度时,应立即采测。

3.3 有报道^[5]用 10% 高氯酸溶液沉淀蛋白时, GSH 和青霉胺内标保留时间分别为 5.34, 12.75 min。但我们同法试验,结果不理想,因此,改用 TCA 作蛋白沉淀剂, GSH 和青霉胺内标保留时间分别为 5.68, 21.77 左右,结果较为理想。

3.4 如果将柱温提高至 40℃,保留时间可缩短,尤其是青霉胺内标较为明显,可缩短 5 min 左右,结果不受影响,这样可缩短实验时间。

3.5 由于本实验所用的沉淀剂 TCA 浓度较大,导致吸收响应大,出峰时间慢,经实验证实,如采用连续进 3 个样品,(注意在 26 min 左右有个杂峰,可忽略),再将流动相 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液 (pH 5.6) 甲醇比例调整为 50:50,此时柱压约为 17 MPa,待出现溶剂峰及 TCA 峰后,再将流动相比例调整为 90:10,柱压约为 12 MPa,此时基线能快速走平,出峰时间加快,实验能快速稳定进行。

REFERENCES

- [1] LI Y M, ZHAO S Y. Progress in Research on N-acetylcysteine [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2003, 15(2): 50-53.
- [2] WU G Y, ZHAO Y R. Progress in Research of Pharmacological Action Mechanism on N-acetylcysteine [J]. Mod Med Health (现代医药卫生), 2004, 20(19): 2001-2002.
- [3] GAO C, JI H, GAO H Y, YAO Y. HPLC method for determination of N-acetyl-L-tyrosine and N-acetyl-L-Cysteine in Compound Amino Acid Injection(17AA) [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2001, 32(2): 65-66.
- [4] JI Y. RP-HPLC method determination N-acetyl-L-Cysteine and N-acetyl-L-tyrosine in Compound Amino Acid Injection (17AA) [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2002, 22(3): 240-241.
- [5] DU X L, ZHU Z, FU Q, *et al*. HPLC method for determination of glutathione in human plasma [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2005, 40(6): 454-457.
- [6] DIMITRIOS T, JORG S, MILOS I, *et al*. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine [J]. J Chromatogr B, 1998, 708: 55-60.
- [7] HEYDEN Y V, MANGELINGS D, BREMPT J V, *et al*. Development and validation of an HPLC method with post-column derivatisation for assay of N-acetylcysteine in plasma [J]. ACTA Chromatographica, 2004, 14: 149-163.
- [8] MEISTER A, ANDERSON M E. Glutathione [J]. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 711.

收稿日期: 2007-11-01