

[文章编号] 1007-7669(2012)06-0308-04

高效液相色谱法测定炔丙基半胱氨酸及其有关物质的含量

徐琛¹, 陈益乐¹, 赵志鹏², 吕燕平¹, 段更利¹, 郁颖佳¹

(1. 复旦大学药学院 药物分析教研室, 上海 201203; 2. 同济大学经济与管理学院, 上海 200092)

[关键词] 炔丙基半胱氨酸; 色谱法, 高效液相; 有关物质; 大蒜

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定炔丙基半胱氨酸 (SPRC) 及有关物质的含量。方法 采用 Welchrom-AQ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-离子对缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠 + 20 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, H₃PO₄ 调 pH 至 2.4) (10 : 90, V/V), 紫外检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 SPRC 在 5.0 ~ 25.0 mg·L⁻¹ 范围内具有良好的线性关系 ($r = 0.999\ 5$), 最低检测限 0.2 mg·L⁻¹; 样品溶液在 24 h 内稳定, 精密度良好 (< 1.0%), 回收率在 98.0% ~ 100.0% 之间, 3 批样品的标示百分含量分别为 96.94%、96.67% 和 96.56%, 有关物质的含量分别为 3.20%、3.43% 和 3.65%。结论 本方法简便、灵敏, 结果可靠准确, 可用于 SPRC 及其有关物质的含量测定。

[中图分类号] R917 [文献标志码] A

Determination of S-propargylcysteine and its related substances by high performance liquid chromatography

XU Chen¹, CHEN Yi-le¹, ZHAO Zhi-peng², LÜ Yan-ping¹, DUAN Geng-li¹, YU Ying-jia¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Fudan University, SHANGHAI 201203, China; 2. College of Economic and Management, Tongji University, SHANGHAI 200092, China)

[KEY WORDS] S-propargylcysteine; chromatography, high pressure liquid; related substances; garlic

[ABSTRACT] AIM To establish a HPLC method for the quality control of S-propargylcysteine (SPRC) and its related substances. METHODS The separation was performed on a Welchrom-AQ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and ion buffer (10 mmol·L⁻¹ heptane sulfonate + 20 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH was adjusted to 2.4 by phosphoric acid) (10 : 90, V/V). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection was set at 210 nm. RESULTS The assay showed good linear correlation over the range of 5.0 - 25.0 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 5$). The limit of detection of SPRC was 0.2 mg·L⁻¹. The sample solution was stable in 24 h. The RSD were less than 1.0%. The average recovery of the method was between 98.0% - 100.0%. The content of SPRC in three batches of samples was 96.94%, 96.67%, and 96.56%. And the content of related substance was 3.20%, 3.43%, and 3.65%, respectively. CONCLUSION This method is rapid, simple, sensitive and accurate with valuable application to the quality control of SPRC and its related substances.

[收稿日期] 2011-09-22 [接受日期] 2012-04-13

[作者简介] 徐琛 (1988—), 女, 上海人, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究

[责任作者] 郁颖佳, Phn: 86-21-5198-0052, E-mail: yuyj@fudan.edu.cn

大蒜为百合科葱属植物蒜 (*Allium sativum* L.) 的鳞茎, 具有抗肿瘤、抗病原微生物和调血脂等多种药理作用^[1-4]。炔丙基半胱氨酸 (S-propargylcysteine, SPRC) 是大蒜中主要活性成分烯丙基半胱氨酸 (S-allylcysteine, SAC) 的结构类似物^[5]。近年来大量的研究表明内源性 H₂S 在神经系统、消化系统、心血管系统、内分泌系统及呼吸系统等均有重要生理作用, 并参与了一些疾病的病理生理过程, 被认为是继一氧化氮和一氧化碳之后的第 3 类气体信号分子^[6]。初步药理学研究^[7]显示, SPRC 在抗心肌缺血性疾病方面的效果强于 SAC, 且可介导内源性 H₂S 生成, 具有更为显著的心血管药理活性, 有潜在药用价值和良好的应用前景。

SPRC 是创新型的调血脂药物, 目前只有对其在大鼠体内含量测定方法的少量文献报道, 尚未有对 SPRC 原料药及其有关物质的体外含量测定的报道。已有报道的 SPRC 体内含量测定所采用的 HPLC-MS/MS 技术对仪器要求高, 普及率低^[8], 而采用的 HPLC 梯度洗脱模式进行检测则耗时较长, 步骤繁琐^[9]。本实验首次同时对 SPRC 和其有关物质进行含量测定, 利用特定配比的流动相, 使用色谱法成功分离了 SPRC 及其有关物质^[10, 11], 且峰形良好, 该方法在其他文献中均未有报道。

材料与方 法

试剂与仪器 乙腈 (HPLC 纯, TEDIA COMPANY INC, 批号: 903901), 庚烷磺酸钠 (分析纯, 国药集团化学试剂公司, 批号: 20100224), 磷酸二氢钾 (分析纯, 国药集团化学试剂公司, 批号: F20070705), 三蒸水 (由 Millipore Direct-Q 纯水发生器制得), SPRC 对照品由复旦大学药学院药理学教研室提供, SPRC 供试品批号分别为 091209、100115、100201。Shimadzu LC-10AD 型高效液相色谱仪, 包括 LC-10AD 两元泵, SPD-A 紫外检测器, STO-10A 柱温箱, 含有 20 μ L 定量环的手动进样器 (日本岛津公司); N-2000 SP1 色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司)。

色谱条件 色谱柱: Welchrom-AQ C₁₈ 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈-离子对缓冲液 (10 mmol \cdot L⁻¹ 庚烷磺酸钠 + 20 mmol \cdot L⁻¹ KH₂PO₄, H₃PO₄ 调 pH 至 2.4) = 90 : 10 (V/V), 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹, 紫外检测波长: 210 nm, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量: 20 μ L。

对照品溶液的配制 取 SPRC 对照品约 0.02 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解, 定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 2 g \cdot L⁻¹ 溶液。精密量取此溶液 0.5 mL 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。得 20.0 mg \cdot L⁻¹ 的 SPRC 对照品溶液。

样品溶液的配制 取 SPRC 供试品约 0.02 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解, 定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 2 g \cdot L⁻¹ 溶液。精密量取此溶液 0.5 mL 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 得 SPRC 样品溶液。

样品含量计算方法 样品含量的测定结果计算方法为: 样品百分含量 (%) = (样品峰面积 \times 对照品浓度 \times 对照品色谱法纯度) / (对照品峰面积 \times 样品理论浓度) \times 100%。

系统适用性试验 取浓度为 20.0 mg \cdot L⁻¹ 的 SPRC 对照品溶液 20 μ L 进样分析, 理论板数按 SPRC 峰计算不低于 2 500, 分离度满足要求。

结 果

专属性试验

1 定位试验 取 SPRC 样品溶液 20 μ L 进样分析, 记录色谱图。结果表明在 SPRC 出峰处, 没有其他杂质干扰, 主峰与各分解产物分离完全, 峰形较好, 专属性较高。见图 1。

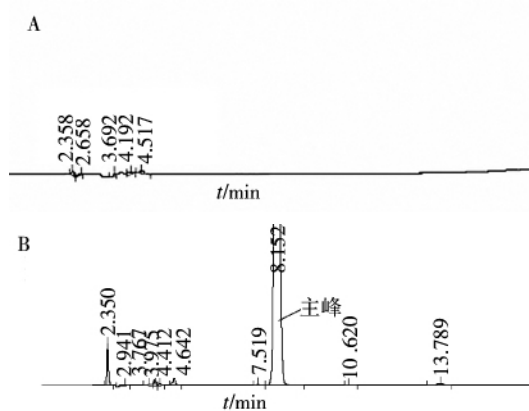


图 1 炔丙基半胱氨酸 (SPRC) 色谱图 A: 空白流动相, B: SPRC 样品

2 强制降解试验 将 SPRC 样品用强酸 (1 mmol \cdot L⁻¹ HCl 溶液破坏 10 min)、强碱 (1 mmol \cdot L⁻¹ NaOH 溶液破坏 10 min)、强氧化剂 (1% H₂O₂ 溶液破坏 30 min)、高温 (100 $^{\circ}$ C 破坏 6 h)、强光 (4 500 lx, 5 d) 进行破坏后进样分析, 发现主峰和各分解产物亦分离良好, 分离度大于 1.5, 说明

本法专属性强, 适用于SPRC及其有关物质的分离测定, 见图2。

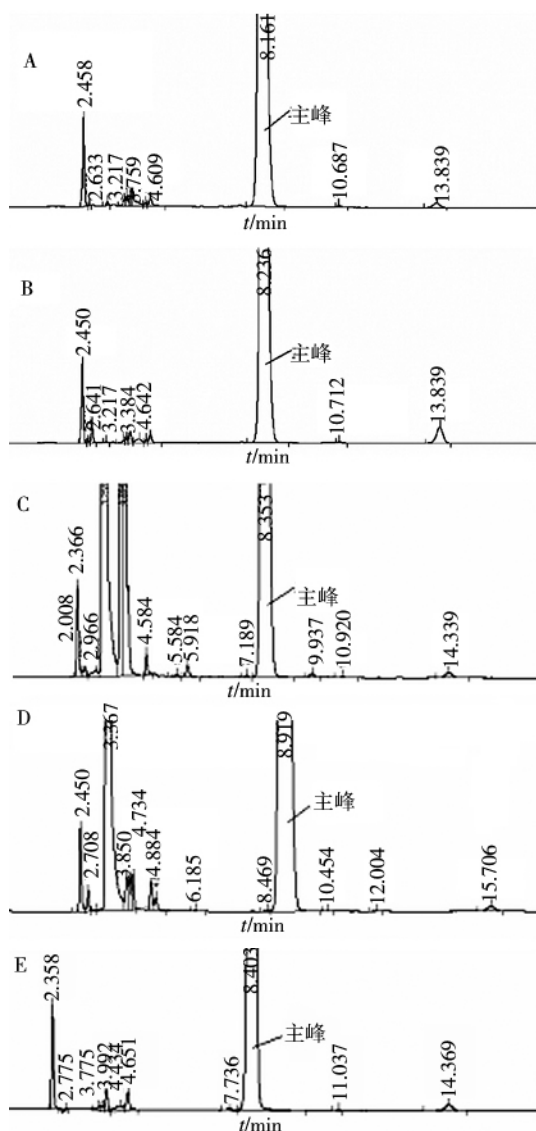


图2 强制降解试验色谱图 A: 1 mmol·L⁻¹ HCl 溶液破坏 10 min, B: 1 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液破坏 10 min, C: 1% H₂O₂ 溶液破坏 30 min, D: 100 °C 破坏 6 h, E: 4 500 lx 光照 5 d 后

线性与范围 配制浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0 和 25.0 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。各取 20 μL 进样。SPRC 峰面积 (*A*) 与浓度 (ρ) 成良好线性关系。在 5.0 ~ 25.0 mg·L⁻¹ 的范围内, 将 *A* 与 ρ 进行回归处理, 结果为: $A = 855\ 565.44\rho - 428.38$ ($r = 0.999\ 5$)。

检测限和定量限 经测定, 本法对该药的最低检测限为 0.2 mg·L⁻¹ [信噪比 (S/N) = 3], 定量限为 0.6 mg·L⁻¹ ($S/N = 10$)。

精密度试验 取浓度为 5.0、15.0 和 25.0 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 1 d 内测

定 5 次, 测得日内精密度, 见表 1。

表 1 HPLC 法测定炔丙基半胱氨酸含量的精密度试验结果 $n = 5, \%$

理论浓度/mg·L ⁻¹	精密度	准确度
5.0	0.98	106.63
15.0	0.22	99.20
25.0	0.27	100.19

稳定性试验 20.0 mg·L⁻¹ 对照品溶液室温 (25 °C) 放置每隔 2 h 进样 1 次, 考察溶液的稳定性。结果药物峰面积 24 h 内未有明显变化, 峰面积 RSD = 0.98% ($n = 8$)。

回收率试验 称取对照品适量, 配成一定浓度的溶液, 依法进行回收率测定, 测得对照品溶液的方法回收率, 见表 2。

表 1 HPLC 法测定炔丙基半胱氨酸含量的精密度试验结果 $n = 5, \%$

理论浓度/mg·L ⁻¹	精密度	准确度
5.0	0.98	106.63
15.0	0.22	99.20
25.0	0.27	100.19

样品及其有关物质的含量测定 取 SPRC 样品溶液 20 μL 进样分析, 并取 SPRC 对照品溶液 20 μL 进样分析, 作为对照。按照 SPRC 主成分自身对照法检测对照品和 3 批样品中有关物质含量, 见表 3。

表 2 HPLC 法测炔丙基半胱氨酸含量方法回收率 $n = 5, \%$

理论浓度/mg·L ⁻¹	平均方法回收率	准确度
11.4	100.06	0.60
16.2	100.47	1.77
28.5	100.65	1.11

讨 论

SPRC 因含有 S 杂原子使其稳定性较差, 其有关物质含量相对偏高。这类药物如要使其含量达到一般化药要求 (> 98.5%) 较为困难。建议控制或优化合成工艺, 使得样品含量得到一定提高。

本研究选择不同厂家、不同长度及填料的色谱柱, 包括 Dikma C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Dikma C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Welchrom C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Welchrom-AQ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 进行考察, 以获得对于主峰最佳的保留时间以及对有关物质的最佳检出条件, 结果显示 Welchrom-AQ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为最优选择。由于仅仅改变柱子类型对该强极性化合物的保留仍然不够理想, 所

以考虑在水相中加入一定比例的离子对试剂,本研究分别使用了几种不同的离子对试剂,包括戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、辛烷磺酸钠和癸烷磺酸钠进行考察,结果显示使用庚烷磺酸钠作为离子对试剂时所获实验结果最优。在此基础上,本研究调节了流动相 pH 使供试品能够最大程度的离子化从而和离子对试剂结合,增加其在色谱柱上的保留,分别对离子对试剂的浓度(庚烷磺酸钠 2.5、5.0、7.5、10.0、20.0 mmol·L⁻¹)和流动相 pH (2.0、2.4、4.6)进行了考察。最后选定的流动相为乙腈-离子对缓冲液(10 mmol·L⁻¹庚烷磺酸钠 + 20 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, H₃PO₄ 调 pH 为 2.4) = 10 : 90 (V/V)。

本实验通过一系列条件优化和选择,成功建立了候选药物 SPRC 及其有关物质的 HPLC 含量测定方法,能快速、简便、准确地分析 SPRC 及其有关物质的含量,且灵敏度较高,为该创新药物的质量控制和评价提供了技术支持。

[参考文献]

- [1] ARIGA T, SEKI T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review[J]. *Biofactors*, 2006, 26(2): 93-103.
- [2] GONCAGUL G, AYZAZ E. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*)[J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2010, 5(1): 91-93.
- [3] 刘佩梅, 申力, 郑凯, 等. 大蒜素与复方磺胺甲噁唑联用对弓形虫感染小鼠的保护作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2002, 21(4): 226-228.
- [4] RAHMAN K, LOWE GM. Garlic and cardiovascular disease: a critical review[J]. *J Nutr*, 2006, 136 Suppl 3: 736S-740S.
- [5] KODERA Y, SUZUKI A, IMADA O, *et al.* Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(3): 622-632.
- [6] TSUGANE M, NAGAI Y, KIMURA Y, *et al.* Differentiated astrocytes acquire sensitivity to hydrogen sulfide that is diminished by the transformation into reactive astrocytes[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(2): 257-269.
- [7] WANG Q, LIU HR, MU Q, *et al.* S-propargyl-cysteine protects both adult rat hearts and neonatal cardiomyocytes from ischemia/hypoxia injury: the contribution of the hydrogen sulfide-mediated pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(2): 139-146.
- [8] ZHENG Y, LIU H, MA G, *et al.* Determination of S-propargyl-cysteine in rat plasma by mixed-mode reversed-phase and cation-exchange HPLC-MS/MS method and its application to pharmacokinetic studies[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2011, 54(5): 1187-1191.
- [9] 张琳, 马国, 蔡卫民, 等. 炔丙基半胱氨酸的 HPLC 法测定及其大鼠在体肠吸收[J]. *中国医药工业杂志*, 2011, 42(5): 370-373.
- [10] 国家药典委员会, 编. 中华人民共和国药典: 2010 年版[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 28-附录 30.
- [11] 郑筱萸. 化学药品和治疗用生物制品研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.

“重大创新药物——石杉碱甲”专题征稿启事 为展示近年来石杉碱甲相关研究成果,进一步开发、利用石杉科植物资源,本刊将出版 1 期“重大创新药物——石杉碱甲”专题。关注与石杉碱甲有关的研究、开发与应用。专题注重内容包括石杉科植物的资源、栽培、采收加工及与石杉碱甲相关的化学、质量分析、药理、毒理、制剂、药动、临床、上市等方面的研究、应用。征文要求稿件内容应属未在国内外公开刊物发表过的研究成果。请登陆编辑部网址 <http://xyyl.cbpt.cnki.net>, 注册登录后进行投稿,并可在实时查询稿件处理进展,请在留言中注明“石杉碱甲专题征稿”,以便于及时进行稿件处理。如有问题请联系编辑部,电话:021-64511836。联系人:王茜, E-mail: xyylc_wangqian@126.com。

截稿日期:2012年9月30日。

“药物评价与循证研究”专题征稿启事 本刊将于 2012 年出版 1 期“药物评价与循证研究”专题,反映药物有效性、安全性和经济学评价及其循证研究中的新成果、新方法和新进展,内容包括专家述评(本刊特约组稿)、药物流行病学研究与评价、药物经济学与循证医学、临床联合用药和合理用药、药物不良反应、老药新用、药物准入与循证遴选方法等。请登陆编辑部网址 <http://xyyl.cbpt.cnki.net>, 注册登录后进行投稿,并可在实时查询稿件处理进展,请在留言中注明“专题征稿”。如有问题请联系《中国新药与临床杂志》编辑部,电话:021-64511836。联系人:王茜。

截稿日期:2012年8月30日。