

· 药物分析 ·

## HPLC 法测定氧化型和还原型谷胱甘肽

孙伟张<sup>a</sup>, 于波涛<sup>b</sup>, 蒋燕<sup>b</sup>, 周毛仔<sup>a</sup> (成都军区总医院, a. ET-CT 中心; b. 药剂科, 四川 成都 610083)

**[摘要]** 目的 建立同时测定谷胱甘肽原料及制剂中氧化型和还原型谷胱甘肽的反相高效液相色谱法。方法 采用外标法,以 Hypersil C<sub>18</sub> 为色谱柱, 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) : 四氢呋喃(100 : 1) 为流动相,流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,检测波长 230 nm,进行分离测定。结果 在 3.12 ~ 2490.0 μg/ml 间,GSH 线性关系良好( $r = 0.9999$ ),测得回收率为 101.84%。在 3.25 ~ 975.0 μg/ml 间,GSSG 线性关系良好( $r = 0.9999$ ),测得回收率为 97.84%。结论 所用方法准确可靠、专属性强,可用于 GSH 和 GSSG 的同时测定。

**[关键词]** 还原型谷胱甘肽;氧化型谷胱甘肽;高效液相色谱法;含量测定

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)04-0305-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.04.018

## Determination of glutathione and oxidized glutathione by HPLC

SUN Wei-zhang<sup>a</sup>, YU Bo-tao<sup>b</sup>, JIANG Yan<sup>b</sup>, ZHOU Mao-zai<sup>a</sup> (General Hospital of Chengdu Military Command, a. PET-CT center; b. Department of Pharmacy, Chengdu 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method to determine GSH and GSSG by HPLC. **Method** The analytical column was Hypersil C<sub>18</sub>. The mobile phase consisted of 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) : tetrahydrofuran(100 : 1). The flow rate was 1.0 ml/min. Column temperature was 30 ℃ and the detective wavelength was 230 nm. **Result** The calibration curve of GSH was linear within the range of 3.12 μg/ml ~ 2490.0 μg/ml( $r = 0.9999$ ) and the average recovery was 101.84%. The calibration curve of GSSG was linear within the range of 3.25 μg/ml ~ 975.0 μg/ml( $r = 0.9999$ ) and the average recovery was 97.84%. **Conclusion** The method was proved to be reliable and accurate, which could be used to determinate GSH and GSSG simultaneously.

**[Key words]** GSH; GSSG; HPLC; Determination

谷胱甘肽 (glutathione) 是由谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸组成的三肽,是体内最重要的抗氧化剂和自由基清除剂。糖尿病、爱滋病、青光眼以及各种肝脏疾病都与体内 GSH 缺乏有关,因此,补充外源性 GSH,提高 GSH 血清水平,从而增加细胞内 GSH 量,具有十分重要的临床意义。谷胱甘肽极易被氧化,因此,本文建立了同时测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的 HPLC,用于谷胱甘肽制剂的工艺研究和质量评价。

### 1 仪器和试剂

1500 型高效液相色谱仪 (美国 Alltech); HA-202 型电子天平 (日本 A&D); 还原型谷胱甘肽对照品 (Sigma, 北京百灵威公司); 氧化型谷胱甘肽对照品 (Boliman, 迪马公司); 其余试剂均为 AR 级。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件与系统适应性试验 采用外标法,以

Hypersil C<sub>18</sub> 为色谱柱, 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH2.5) - 四氢呋喃 (100 : 1) 为流动相,流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,检测波长 230 nm,进行分离测定。在上述色谱条件下 GSH 保留时间约 2.8 min,理论塔板数 2260, GSSG 保留时间约 4.8 min,理论塔板数 3070,二者的分离度 R 为 2.1。在选定的色谱条件下, GSH 和 GSSG 可得到较好的峰形且分离完全 (图 1)。

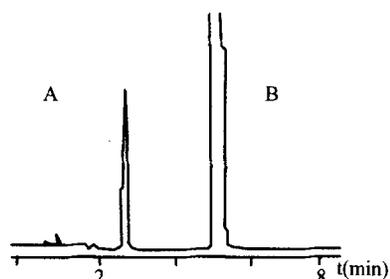


图 1 GSH (A) 和 GSSG (B) 对照品溶液 HPLC 色谱图

#### 2.2 线性关系的考察

##### 2.2.1 GSH 线性关系的考察 取 GSH 对照品适量,

精密称定,置 25 ml 量瓶中,用蒸馏水溶解、稀释至刻度,摇匀,得浓度为 2.49 mg/ml GSH 对照品贮备液,精密量取 GSH 对照品贮备液适量,以蒸馏水稀释成浓度为 2 490.0、1 245.0、249.0、49.8、24.9、12.45、6.23、3.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 GSH 对照品溶液。取上述不同浓度 GSH 对照品溶液,进样 20  $\mu\text{l}$ ,在选定的色谱条件下进行分离测定,记录色谱图和 GSH 峰面积 A,以浓度 C 值为横坐标,A 为纵坐标,直线回归,得 GSH 线性方程, $A = 1\ 225.58C - 26.525\ 1$ ,  $r = 0.999\ 9$ 。

**2.2.2 GSSG 线性关系的考察** 取 GSSG 对照品适量,精密称定,置 25 ml 容量瓶中,用蒸馏水溶解、稀释至刻度,摇匀,得浓度为 1.95 mg/ml GSSG 对照品贮备液,精密量取贮备液适量,以蒸馏水稀释成浓度为 975.0、312.01、156.0、78.0、39.0、13.0、6.5、3.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 GSSG 对照品溶液。取上述 GSSG 对照品溶液,进样 20  $\mu\text{l}$ ,在选定的色谱条件下分离测定,记录色谱图和 GSSG 峰面积 A,以浓度 C 为横坐标,A 值为纵坐标,直线回归,得 GSSG 线性方程: $A = 1\ 955.04C + 2\ 737.48$ ,  $r = 0.999\ 9$ 。

### 2.3 回收率实验

**2.3.1 GSH 回收率实验** 精密量取 GSH 对照品贮备液适量,用蒸馏水稀释成高、中、低 3 种不同浓度的 GSH 对照品溶液,按标准曲线制备方法进样,测定 5 次,记录 GSH 色谱峰面积 A,代入标准曲线方程,以测得量与加入量之比计算回收率,结果见表 1。

表 2 GSH 回收率试验结果 ( $n = 15$ )

加入量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
49.8	48.72	97.83	104.31
	51.50	103.41	
	52.36	105.14	
	54.04	108.51	
	53.12	106.67	
99.6	100.85	101.25	100.49
	97.62	98.01	
	101.43	101.83	
	102.03	102.44	
	98.51	98.91	
498.0	493.01	99.00	100.72
	500.43	100.49	
	510.89	102.59	
	507.96	102.00	
	495.54	99.51	

**2.3.2 GSSG 回收率实验** 精密量取 GSSG 对照品贮备液适量,用蒸馏水稀释成高、中、低三种不同浓度的 GSSG 对照品溶液,按标准曲线制备方法进样,测定 5 次,记录 GSSG 色谱峰面积 A,代入标准曲线方程,以测得量与加入量之比计算回收率,结果见表 2。

表 2 GSSG 回收率试验结果 ( $n = 15$ )

加入量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)
39.0	37.30	95.64	96.17
	40.26	103.23	
	36.29	93.05	
	35.30	90.51	
	38.38	98.41	
78.0	75.18	96.38	97.81
	75.23	96.45	
	77.85	99.81	
	74.61	95.65	
	78.59	100.76	
312.0	296.96	95.18	99.55
	330.00	105.77	
	290.00	92.95	
	324.48	104.00	
	311.53	99.85	

### 2.4 精密度测定

**2.4.1 GSH 测定的日内和日间精密度** 按回收率试验项下方法,测定 GSH 高、中、低三种不同浓度对照品溶液,以一天内 5 次测定结果计算日内 RSD,以 3 天内 15 次测定结果计算日间 RSD,结果见表 3。GSH 日内 RSD  $\leq 3.91$ , 日间 RSD  $\leq 5.12$ 。

**2.4.2 GSSG 日内和日间精密度测定** 按回收率试验项下方法,测定 GSSG 高、中、低三种不同浓度对照品溶液,以一天内 3 次测定结果计算日内 RSD,以 5 天内 15 次测定结果计算日间 RSD,结果见表 4。GSSG 日内 RSD  $\leq 5.53\%$ , 日间 RSD  $\leq 4.23\%$ 。

表 3 GSH 精密度实验结果

项目	均值( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{ml}$ )	RSD(%)
日内( $n = 5$ )	51.95 $\pm$ 2.03	3.91
	100.09 $\pm$ 1.92	1.92
	501.57 $\pm$ 7.72	1.54
日间( $n = 15$ )	50.57 $\pm$ 2.59	5.12
	98.68 $\pm$ 2.20	2.23
	494.99 $\pm$ 8.20	1.65

表 4 GSSG 精密度实验结果

项目	均值( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{ml}$ )	RSD(%)
日内( $n = 5$ )	37.51 $\pm$ 1.92	4.92
	76.29 $\pm$ 1.80	2.31
	310.59 $\pm$ 17.18	5.53
日间( $n = 15$ )	38.78 $\pm$ 1.64	4.23
	76.84 $\pm$ 1.95	2.54
	306.24 $\pm$ 12.05	3.93

**2.5 GSH 对照品溶液稳定性考察** 取谷胱甘肽(GSH)对照品适量,精密称定,用水溶解稀释成浓度为 498.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  谷胱甘肽对照品溶液。置冰箱

(下转第 315 页)

的优势,为高年级学生设立“原创药物研发、质量标准制定、药物剂型辅料研究、生物大分子化学标记、绿色化学研究”等本科生科研方向;为低年级学生组建实验联合课程的学习团体;建立相应的创新活动实验室,丰富大学生创新活动,并开展大学生综合技能竞赛活动。使整个实验教学过程充满灵动,研究性教学成效显著。近年来,我校药学专业本科生获学校大学生创新课题基金立项共45项,发表论文36篇,作全国性大会报告4次,获得实用新型专利授权8项,参加各类竞赛活动获奖14项,其中特等奖、金奖、创新成果奖等全国性高等级奖项6项。

**3.3 建设“服务军队需求,增强工作能力”的实践训练环境** 依托“军队特需药品中试生产基地”(解放军总后勤部立项建设),在药剂学实验课程内,安排学生进行参观、见习,使学生了解中试基地基本构成、仪器设备特点等内容。根据基地生产任务情况安排学生学习半固体制剂和固体制剂(片剂、胶囊)的制备流程。利用中试基地生产间隙,让学生使用基地中试设备进行如维生素C泡腾片制备、复方抗疟三号制备等生产课题研究。拓展学生的实践领域,缩短学生在校学习与实际工作间的距离,加快学生毕业后适应工作岗位的时间,实现对学生军事素质、创新实践综合能力的培养。

综上所述,在研究性教学的内容、组织形式和条件建设的基础上,我们还在不断探索研究性教学的可操作的评价方式,以及如何把研究性教学深入到教学的各个方面。相信随着研究的深入和课程的扩大化,研究性教学必将渗透到各专业各课程教学过程中,具有广泛的适应性。

### 【参考文献】

- [1] 刘赞英,王 岚,朱静然,等.国外大学研究性教学经验及其启示[J].河北科技大学学报(社科版),2007,7(1):68.
- [2] 姚利民,史曼莉,康 雯,等.大学研究性教学理论基础研究[J].大学教育科学,2008,4:55.
- [3] 孟 凡.本科研究性教学的理论基础述评[J].煤炭高等教育,2009,27(1):40.
- [4] 蔡亚萍.化学教学中研究性学习的适应性研究[J].化学教育,2004,5:20.
- [5] 郑家茂,张 胤.论研究型大学本科人才培养模式的特点[J].清华大学教育研究,2008,29(1):108.
- [6] 别敦荣.大学教学方法创新与提高高等教育质量[J].清华大学教育研究,2009,30(4):95.
- [7] 庄丽君,刘少雪.美国研究型大学本科教育改革现状及其个案研究[J].清华大学教育研究,2008,29(2):43.

[收稿日期]2011-09-28

[修回日期]2012-02-21

(上接第306页)

4℃放置,在不同时间取出测定其浓度,结果见表5。由表5可见,谷胱甘肽对照品溶液宜临用新配。

表5 谷胱甘肽对照品溶液4℃贮存的稳定性结果

贮存时间(d)	浓度变化(μg/ml)
0	501.57
3	495.48
5	479.32
7	464.65
10	454.34

### 3 讨论

GSH含量测定方法的文献报道主要有酶免疫测定法和HPLC法。由于GSH紫外吸收较弱,文献报道的方法多采用柱前衍生化后以紫外或荧光检测器进行测定。为考察GSH的稳定性,需同时测定GSH和GSSG,而GSSG是两GSH分子的-SH键脱氢缩合而成,衍生化试剂如OPA试剂、Ellman's试剂等与GSH和GSSG均发生反应,不能区分二者,因此不宜选用柱前衍生化法。研究中曾采用多种流动相进行考察,如0.01 mol/L磷酸溶液-乙腈;0.02 mol/L醋酸

钠溶液-乙腈;磷酸钠缓冲液(pH6.5)-乙腈,均未有效的分离GSH和GSSG。最后确定以0.025 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH2.5)-四氢呋喃(100:1)作流动相,GSH和GSSG可较好的分离,测定峰形和保留时间均较好。目前同时分离测定GSH和GSSG的方法尚未见报道。该方法的建立为谷胱甘肽制剂的质量评价、稳定性考察和胃肠道生物模型研究的进行奠定了基础,试验证明,该方法简便、可靠。

### 【参考文献】

- [1] 杜小莉,朱 珠,傅 强,等.HPLC测定还原性谷胱甘肽的血浆浓度[J].中国药学杂志,2005,40(6):454.
- [2] Miguel A, Juan S, Federico V, et al. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples[J]. Anal Biochem, 1994, 217:323.
- [3] Raggi MA, Mandrioli R, Bugamelli F, et al. Comparison of analytical methods for quality control of pharmaceutical formulations containing glutathione[J]. Chromatography, 1997, 46(1-2):17.
- [4] Toshiaki Y. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection[J]. J Chromatogr B, 1996, 678:157.

[收稿日期]2012-03-12

[修回日期]2012-05-21