

文章编号: 1004-4353(2023)02-0170-05

高效液相色谱法定量分析硫醇化合物的研究

李航¹, 林志豪¹, 金彪², 金东日¹

(1. 延边大学 理学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学 分析测试中心, 吉林 延吉 133002)

摘要: 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)建立了一种柱前衍生化试剂丙烯酸 2'-甲氧基苯酯定量分析硫醇化合物的方法. 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯与半胱氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽进行衍生化反应所得产物的色谱分离条件为: Cicaeagent Mightysil RP-18 GP (150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 水-乙腈为流动相(含体积分数为 0.1% 的甲酸), 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 3 μL. 测定结果显示, 硫醇化合物的线性范围为 0.05~1.0 mmol/L, 最低检测限为 0.01 mmol/L (S/N=3). 该结果表明使用丙烯酸 2'-甲氧基苯酯柱前衍生化法可有效检测出 L-半胱氨酸胶囊中硫醇化合物的含量, 因此该方法对检测硫醇化合物含量具有良好的参考价值.

关键词: 高效液相色谱法; 柱前衍生化; 硫醇化合物; L-半胱氨酸胶囊; 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

Quantitative analysis of thiol compounds by high performance liquid chromatography

LI Hang¹, LIN Zhihao¹, JIN Biao², JIN Dongri¹

(1. College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China;

2. Analysis and Testing Center, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: A pre-column derivatization reagent (2'-methoxyphenyl acrylate) was developed for the quantitative analysis of thiol compounds by high performance liquid chromatography. The chromatographic separation conditions of 2'-methoxyphenyl acrylate with cysteine, homocysteine and glutathione derivatives are as follows: Cicaeagent Mightysil RP-18 GP (150 mm×4.6 mm, 3 μm) column, water-acetonitrile is the mobile phase (containing 0.1% formic acid by volume), with a flow rate of 0.3 mL/min and an injection volume of 3 μL. The results showed that the linear range of thiol compounds was 0.05 - 1.0 mmol/L and the lowest detection limit was 0.01 mmol/L (S/N=3), and the content of thiol compounds in L-cysteine capsules could be effectively detected. Therefore, the proposed method exhibit good reference value for the detection of thiol compound content.

Keywords: high performance liquid chromatography; pre-column derivatization; thiol compound; L-cysteine capsules; 2'-methoxyphenyl acrylate

小分子硫醇是生物体内多种蛋白质的重要组成部分, 它主要包括半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸

(Hcy)以及谷胱甘肽(GSH). 研究显示这 3 种硫醇化合物均具有较强的抗氧化性, 在生物体内不

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(22064017)

第一作者: 李航(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析.

通信作者: 金东日(1965—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物分析.

仅参与许多重要的生理反应,而且还能够有效清除体内所产生的过剩自由基,以及维持细胞压的动态平衡^[1].另外研究还显示,Cys、Hcy和GSH在细胞内的含量变化与体内的多种疾病密切相关.例如:当人体内的Cys含量过多或过少时都会引起儿童生长缓慢、肝脏损害、肌肉松弛和身体肥胖等疾病^[2-4].健康成年人体内血清中的Hcy超过15 $\mu\text{mol/L}$ (正常水平在9~13 $\mu\text{mol/L}$)时,不仅会造成先天性缺陷和认知功能障碍,还会引起心血管疾病、阿尔茨海默病等^[5-7].GSH的含量对细胞的生长、代谢以及对癌症患者放化疗的耐药性等均有显著影响^[8].因此,对Cys、Hcy和GSH等小分子硫醇进行快速、灵敏、精准的检测可有助于阐明疾病的发生和发展机制,并为预防和治疗疾病提供新的思路.目前检测硫醇化合物的常见方法有HPLC法^[9]、毛细管电泳法^[10]、电化学分析法^[11]、红外光谱法^[12]、紫外-可见光谱法^[13]和荧光光谱法^[14]等方法.由于HPLC法具有分析速度快、检测灵敏度高和样品用量少等优点,以及丙烯基可与硫醇化合物的巯基发生Michael加成反应^[15],因此本文利用HPLC法建立了一种柱前衍生化定量分析硫醇化合物的方法.实验表明,该方法可有效测定L-半胱氨酸胶囊中半胱氨酸的含量.

1 实验部分

1.1 实验仪器

先行者CP114电子分析天平,奥豪斯仪器上海有限公司;TGL-15B离心机,上海安亭科学仪器厂;6794-420D磁力加热搅拌器,CORNING公司;XW-80A旋涡混合器,上海驰唐电子有限公司;HB-100恒温金属浴,杭州大和热磁电子有限公司;SPD-16高效液相色谱仪,日本岛津公司;AV III-Ascend 500 HD超导傅里叶核磁共振谱仪,BRUKER公司;N-100旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司.

1.2 实验试剂

2-甲氧基苯酚(分析纯)、丙烯酰氯(分析纯)、氘代氯仿,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;碳酸氢钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;乙腈(分析纯),天津市大茂化学试剂厂;二氯

甲烷(分析纯)、甲醇(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司;甲酸(色谱级)、三乙胺(分析纯)、无水硫酸镁(分析纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;L-半胱氨酸,上海吉尔生化有限公司;乙腈(LC-MS级)、高半胱氨酸、谷胱甘肽,北京伊诺凯试剂有限公司;舒邦L-半胱氨酸胶囊,湖北舒邦药业有限公司;超纯水,采用Kertone Lab MINI-D仪自制.

1.3 衍生化试剂丙烯酸2'-甲氧基苯酯的合成

按照文献^[16]中的方法合成衍生化试剂丙烯酸2'-甲氧基苯酯.将邻甲氧基苯酚(0.62 g,5 mmol)、二氯甲烷(12.5 mL)、三乙胺(0.75 mL)置于冰水浴中的圆底烧瓶中,然后在搅拌下缓慢滴加入含有0.5 mL丙烯酰氯的2.5 mL二氯甲烷,室温下反应过夜;反应液用饱和碳酸氢钠溶液洗涤3次,并水洗3次;用无水硫酸镁将反应液干燥后再旋转蒸发掉溶剂,得0.5632 g淡黄色油状液体,收率为63.2%.¹H NMR(500 MHz,CDCl₃) δ : 7.25~7.18(m,1H), 7.08(dd, J =7.9,1.6 Hz,1H), 7.01~6.93(m,2H), 6.62(dd, J =17.3,1.3 Hz,1H), 6.36(dd, J =17.3,10.5 Hz,1H), 6.01(dd, J =10.5,1.3 Hz,1H), 3.83(s,3H);¹³C NMR(125 MHz,CDCl₃) δ : 164.1, 151.2, 139.6, 132.4, 127.6, 126.9, 122.8, 120.8, 112.5, 55.9; MALDI-TOF-MS, m/z [M+Na]⁺: 201.

1.4 溶液的配制

衍生化试剂:首先,准确称取丙烯酸2'-甲氧基苯酯89.1 mg(0.5 mmol),加入乙腈溶液后将其配制成浓度为50 mmol/L的储备液;然后,再将配制的储备液依次稀释为25、20、10、5、1 mmol/L的储备液.

标准对照溶液:分别配置10 mmol/L的Cys、Hcy、GSH混合标准品储备液.将3种硫醇化合物用乙腈-水(体积比为22:78)混合标准品溶液稀释成为1 mmol/L.

供试品溶液:取L-半胱氨酸胶囊1粒(0.40 g/粒),将内容物倾出后研磨成细粉;细粉装入离心管后加入适量乙腈-水(体积比为22:78),超声并离心10 min(7 000 r/min),并取其上清液将其配制成浓度为0.5 mmol/L的溶液.

1.5 衍生化反应

分别将 20 mmol/L 的丙烯酸 2'-甲氧基苯酯 (20 μ L) 和 1 mmol/L 的 Cys、Hcy、GSH 混合溶液 (20 μ L) 加入到 1.5 mL 聚丙烯离心管中, 用漩涡混合器振荡 1 min 后将其放入到恒温金属浴 (55 $^{\circ}$ C) 中反应 2 h. 反应结束后, 取反应液 3 μ L 进行 HPLC 检测.

1.6 色谱条件

色谱柱为 Mightsil RP-18 GP (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m); 流动相 A 为水溶液 (含体积分数为 0.1% 的甲酸), 流动相 B 为乙腈 (含体积分数为 0.1% 的甲酸); 有机相的体积分数为 26%; 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}$ C; UV 检测器波长为 270 nm; 进样量为 3 μ L.

2 结果与分析

2.1 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯的结构确认

邻甲氧基苯酚与丙烯酰氯发生反应生成的丙烯酸 2'-甲氧基苯酯的色谱图如图 1 所示. 由图 1 可以看出, 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯的质量分数为 95%. 进一步综合衍生化试剂的核磁共振氢谱、碳谱和基质辅助飞行时间质谱可知, 反应所得的目标产物为丙烯酸 2'-甲氧基苯酯.

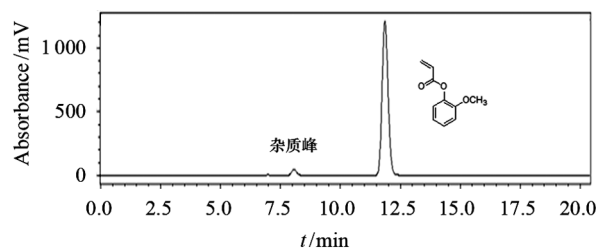


图 1 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯的液相色谱图

2.2 丙烯酸 2'-甲氧基苯酯与含硫醇化合物发生衍生化反应的条件

为探讨最佳的衍生化反应条件, 分别从反应温度、时间、摩尔比对其进行分析.

2.2.1 反应温度对衍生化反应的影响

在 25、45、55、65、75 $^{\circ}$ C 下将 Cys、Hcy、GSH 混合溶液与衍生化试剂进行反应. 反应完成后, 分别取少量反应液进行 HPLC 分析. 以反应温度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制的衍生化产物的峰面积随反应温度变化的曲线如图 2 所示. 由图 2

可知, 反应温度在 25~55 $^{\circ}$ C 时, 衍生化产物的峰面积随反应温度的升高而增加; 当反应温度高于 55 $^{\circ}$ C 时, 其变化趋势逐渐保持平稳. 因此, 本文将最佳反应温度确定为 55 $^{\circ}$ C.

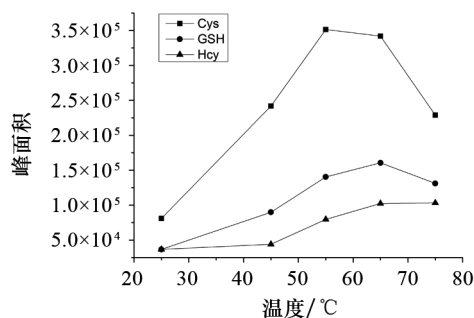


图 2 反应温度对衍生化反应的影响

2.2.2 反应时间对衍生化反应的影响

将 Cys、Hcy、GSH 混合溶液与衍生化试剂分别反应 10、30、60、120、180 min. 反应完成后, 取少量反应液进行 HPLC 分析. 以反应时间为横坐标、峰面积为纵坐标绘制的衍生化产物的峰面积随反应时间变化的曲线如图 3 所示. 由图 3 可知, 当反应时间在 10~120 min 时, 衍生化产物的峰面积随反应时间的增加而增加, 当反应时间大于 120 min 时, 其变化趋势逐渐保持平稳. 因此, 本文将最佳反应时间确定为 120 min.

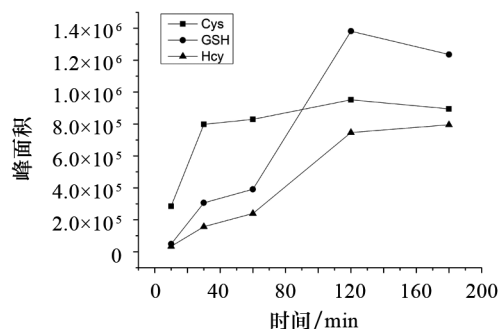


图 3 反应时间对衍生化反应的影响

2.2.3 反应摩尔比对衍生化反应的影响

将 Cys、Hcy、GSH 混合溶液与衍生化试剂分别在摩尔比为 1:1、1:5、1:10、1:20、1:25 下进行反应. 反应完成后, 取少量反应液进行 HPLC 分析. 以反应摩尔比为横坐标、峰面积为纵坐标绘制的衍生化产物的峰面积随反应摩尔比的变化曲线如图 4 所示. 由图 4 可以看出, 当反应摩尔比在小于 20 范围内时, 衍生化产物的峰面积随反应摩

尔比的增加而增加,当反应摩尔比大于20时,其变化趋势逐渐保持平稳;因此,本文将最佳反应摩尔比确定为1:20。

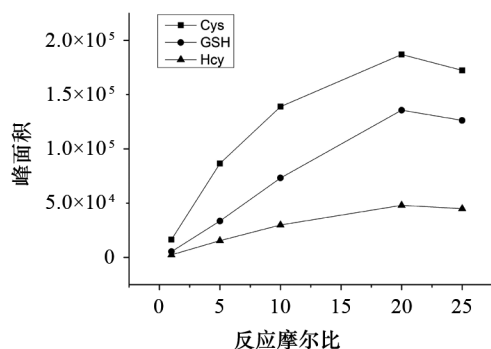


图4 反应摩尔比对衍生化反应的影响

2.3 色谱条件的选择

为了完全分离3种物质(丙烯酸2'-甲氧基苯酯分别与Cys、Hcy、GSH进行反应所得的衍生化产物),本文利用不同流动相比(流动相A与B的体积比分别为48:52、58:42、68:32、74:26、77:23)进行分离,其中流动相A为水溶液(含体

积分数为0.1%的甲酸),流动相B为乙腈(含体积分数为0.1%的甲酸)。不同流动相比例下3种物质的保留时间变化如图5所示。由图5可知,当流动相B的体积分数为26%时,3种衍生化产物的峰的保留时间分别为11、13、15 min。当流动相A与B的体积比为74:26时,3种物质的HPLC图如图6所示。由图6可以看出,该条件下可快速洗脱和完全分离3种产物。

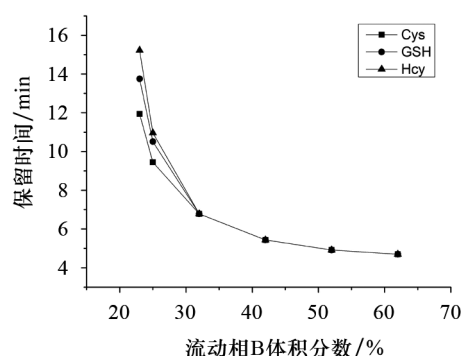


图5 3种产物的峰的保留时间随流动相B体积分数的变化趋势

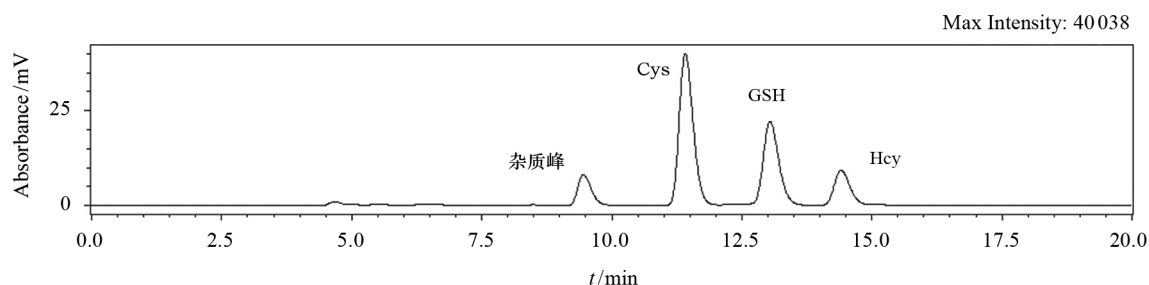


图6 丙烯酸2'-甲氧基苯酯与Cys、GSH、Hcy分别反应所得衍生物的液相色谱图

2.4 线性关系及最低检测限

按1.5中衍生化方法将丙烯酸2'-甲氧基苯酯分别与1.0、0.5、0.2、0.1、0.05 mmol/L的Cys、Hcy、GSH标准品混合液进行衍生化反应。反应完成后,取少量反应液进行HPLC分析。以Cys、Hcy、GSH标准品溶液浓度为横坐标、衍生化产物的峰面积为纵坐标建立的线性方程及相关系数和最低检测限见表1。

2.5 胶囊样品含量的测定

由于实际样品中的其他掺杂物质可能会消耗衍生化试剂,因此本文采用过量的衍生化试剂进行反应;在55℃的恒温金属浴条件下,将0.5

mmol/L的供试品溶液与20.0 mmol/L的衍生化试剂反应2 h,然后进行HPLC检测。根据表1中Cys的线性方程计算胶囊中的半胱氨酸含量,经计算其含量为0.02 g(药品标示成分含量为每100 g含L-半胱氨酸18.0 g)。

表1 3种硫醇化合物的线性方程、相关系数和最低检测限

	线性方程	相关系数	最低检测限/(mmol/L)
Cys	$y = 465276x - 8229.7$	0.9991	0.01
Hcy	$y = 177485x + 23404$	0.9700	0.01
GSH	$y = 334524x + 24926$	0.9903	0.01

3 结论

本文采用柱前衍生化 HPLC 法对 3 种硫醇衍生物(以衍生化试剂丙烯酸 2'-甲氧基苯酯与 Cys、Hcy、GSH 3 种硫醇进行衍生化反应所生成的硫醇衍生物)进行分离检测显示,该方法不仅具有良好的灵敏度(线性范围为 0.05~1.0 mmol/L,最低检测限为 0.01 mmol/L),而且还具有反应条件温和、操作简单等优点;因此,该方法可为实际生物样品中的硫醇检测提供良好参考。

参考文献:

- [1] NIU L Y, GUAN Y S, CHEN Y Z, et al. BODIPY-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134: 18928-18931.
- [2] CHEN D G, ZHONG C, ZHAO Y, et al. A two-dimensional molecule with a large conjugation degree: synthesis, two-photon absorption and charge transport ability[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2017, 5: 5199-5206.
- [3] LI D P, ZHANG J F, CUI J, et al. A ratiometric fluorescent probe for fast detection of hydrogen sulfide and recognition of biological thiols[J]. *Sensors & Actuators: B Chemical*, 2016, 234: 231-238.
- [4] ZHANG Y D, WANG X, BAI X Y, et al. Highly specific Cys fluorescence probe for living mouse brain imaging via evading reaction with other biothiols[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(13): 8591-8594.
- [5] CHAO J B, LI M, LIU Y M, et al. Fluorescence detection and imaging in zebrafish and *Arabidopsis thaliana* based on Cys/Hcy breaking space effect[J]. *Sensors and Actuators: B Chemical*, 2019, 298: 126844.
- [6] HUANG Y H, MEI J, MA X. A novel simple red emitter characterized with AIE plus intramolecular charge transfer effects and its application for thiol-containing amino acids detection[J]. *Dyes and Pigments*, 2019, 165: 499-507.
- [7] CHEN H, TANG Y H, LIN W Y. Recent progress in the fluorescent probes for the specific imaging of small molecular weight thiols in living cells[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 76: 166-181.
- [8] 陈莉,黎俊波,陈杜刚. 生物硫醇荧光探针的研究进展[J]. *有机化学*, 2021, 41(2): 611-623.
- [9] NIA N N, HADJMOHAMMADI M R. The application of three-phase solvent bar microextraction based on a deep eutectic solvent coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of flavonoids from vegetable and fruit juice samples[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11: 5134-5141.
- [10] ZHANG Y, ZHANG Y T, ZHU L Q, et al. High sensitivity detection of *Escherichia coli* based on the measurement of β -galactosidase activity by microchip capillary electrophoresis combined with field-amplified sample injection[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11: 1558-1565.
- [11] ZHANG Y N, NIU Q Y, GU X T, et al. Recent progress on carbon nanomaterials for the electrochemical detection and removal of environmental pollutants[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(25): 11992-12014.
- [12] HAGEMANN L T, MCCARTNEY M M, FUNG A G, et al. Portable combination of Fourier transform infrared spectroscopy and differential mobility spectrometry for advanced vapor phase analysis[J]. *Analyst*, 2018, 143(23): 5683-5691.
- [13] JIANG T, WANG X, WANG G, et al. Light-activated "cycle-reversible intramolecular charge transfer" fluorescent probe: monitoring of pH trace change induced by UV light in programmed cell death[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(36): 5279-5282.
- [14] LI R R, HUANG X Y, LU G L, et al. A fluorescence and UV/vis absorption dual-signaling probe with aggregation-induced emission characteristics for specific detection of cysteine[J]. *RSC Advances*, 2018, 8: 24346-24354.
- [15] LI H D, JIN L Y, KAN Y H, et al. A visual and "turn-on" fluorescent probe for rapid detection of cysteine over homocysteine and glutathione[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 196: 546-554.
- [16] 金彪,张敬东,王思宏. 2-氨基-3-[(3-(苄氧基)-3-氧代丙基)]硫代丙酸的合成[J]. *化学试剂*, 2018, 40(10): 1002-1004.