

GC 法测定丙酮酸乙酯注射液中 EP 的含量 *

彭洁¹ 王钊¹ 李晓晔² 陈宏莉¹ 李穆琼² 廖甯¹ 海春旭^{1△}

(1 第四军医大学军事预防医学院毒理学教研室, 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 陕西省自由基生物学与医学重点实验室 2 手性技术研究中心, 第四军医大学药学院药物化学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 建立测定丙酮酸乙酯的含量测定方法。方法: 采用气相色谱法, 以环戊酮为内标物。色谱柱为 VARIAN CP7502(25 m×0.25 mm×0.25 μm) 柱温 115℃, 进样口温度 210℃, FID 检测器温度 210℃, 氮气(载气)流量为 30 ml·min⁻¹, 氢气(燃气)流量为 40 ml·min⁻¹, 空气(助燃气)流量为 400 ml·min⁻¹, 分流比 1:100。结果: EP 进样浓度在 0.50035 mg·ml⁻¹~9.0063 mg·ml⁻¹ 范围内与峰面积积分呈良好的线性关系($r^2 = 0.9996$), 平均加样回收率为 99.76%, RSD 为 0.46%。结论: 本方法简便、快速、准确、重复性好, 可用于丙酮酸乙酯注射液的质量控制。

关键词: 气相色谱法; 丙酮酸乙酯; 含量测定

中图分类号: R285.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)15-2822-04

Determination of EP in Ethyl Pyruvate Injection by Gas Chromatography*

PENG Jie¹, WANG Zhao¹, LI Xiao-ye², CHEN Hong-li¹, LI Mu-qiong², LIAO Nai¹, HAI Chun-xu^{1△}

(1Department of Toxicology, the Ministry of Education Key Lab of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Shaanxi Provincial Key Lab of Free radical biology and medicine, School of Public Health; 2Research Center for chirotechnology, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To develop a content determination method for the Determination of EP in ethyl pyruvate injection.

Methods: The method of GC was applied to determine the content of EP. FID detector was used with cyclopentanone as internal standard for sample injection. The separation was performed on a VARIAN CP 7502 capillary column(25 m×0.25 mm×0.25 μm). The column temperature was 115℃; the injector temperature was 210℃; the FID temperature was 210℃. The flow rates were 30 ml·min⁻¹ for carrier gas (N₂), 40 ml·min⁻¹ for fuel gas (H₂) and 400 ml·min⁻¹ for assistant fuel gas (air) detector Split injection with a split ratio of 1:100 was used. **Results:** The calibration curve was linear within the concentration range of 0.50035 mg·ml⁻¹~9.0063 mg·ml⁻¹, $r^2 = 0.9996$, the average recovery rate was 99.76%, RSD was 0.46%. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate, with good reproducibility. It can be used for quality control of ethyl pyruvate injection.

Key words: GC; Ethyl pyruvate; Content determination

Chinese Library Classification: R285.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2822-04

前言

丙酮酸乙酯(Ethyl pyruvate, EP), 别名 2-氧代丙酸乙酯、酮基丙酸乙酯, 分子式 CH₃COCOOC₂H₅, 分子量 116.12, 常温常压下为无色液体, 具有类似花果的香气, 味甜。Holleman 等最初研究发现丙酮酸具有抗氧化作用^[1], 可以减少氧自由基的产生, 是有效的活性氧清除剂。但 Montgomery 等^[2]发现丙酮酸水溶液不稳定, 容易产生环化反应, 其生成产物具有一定的毒性, 故其在临床的应用受到一定的限制。2001 年, Sims 等^[3]研究发现林格氏丙酮酸乙酯溶液(REPS)较丙酮酸溶液更稳定, 而且无毒性。此后有关丙酮酸乙酯抗炎作用的研究倍受关注。经过大量的动物实验研究发现, 丙酮酸乙酯不仅对感染引起的炎症反应(如脓毒症、内毒素血症)和非感染性炎症(如急性胰腺炎)

具有抗炎作用^[4-10], 并且在休克、缺血-再灌注损伤中可抑制炎症因子的表达, EP 对能对抗多种组织和脏器损伤^[11-26]。由于丙酮酸乙酯的 α-酮基具有抗氧化性能, 无需酶的催化可降低 H₂O₂ 的产生, 因此是一种有效的抗氧化剂和活性氧(ROS)清除剂^[27]。

本实验室研制出丙酮酸乙酯注射剂, 通过药理实验研究发现, 该注射剂可不同程度增加抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等的活性, 并且降低脂质过氧化反应的产物丙二醛(MDA)的含量, 减少炎症介质的释放, 对急性中毒性肺水肿有很好的治疗和保护作用。笔者采用气相色谱(GC)对该注射剂的有效成分 EP 进行含量测定, 所建立的方法简便、灵敏、重现性好, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

* 基金项目: 长江学者, 创新团队发展计划资助和十一五“重大新药创制”资助(2009ZXJ09002-021)

作者简介: 彭洁(1983-) 女, 硕士, 助教, 研究方向: 自由基生物学与药理学, E-mail: liluo_2006@163.com

△通讯作者: 海春旭, 电话: 029-84774897, E-mail: cx-hai@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-03-05 接受日期: 2012-03-30)

1.1 仪器

岛津 GC-2010plus 气相色谱仪, 氢火焰离子化检测器 (FID), 岛津色谱工作站, 电子天平 (METTLER TOLEDO AL 204)

1.2 试剂

丙酮酸乙酯注射剂 (第四军医大学毒理教研室提供, 批号 20101213) EP 对照品 (批号 MKBF2740V), 环戊酮 (1382633V), 正己烷为色谱纯 (Fisher Scientific), 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。色谱柱载气为高纯 N_2 气 ($\geq 99.99\%$); FID 燃烧气为高纯 H_2 ($\geq 99.999\%$), FID 助燃空气 ($\geq 99.999\%$) 均由西安天泽物资公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

毛细管色谱柱 (VARIAN, CP 7502, 固定相 CP-Chirasil-Dex CB, 柱长 25 m, 内径 0.25 mm, 外径 0.39 mm, 膜厚 0.25 μm); 载气: 氮气, 流量为 $30 ml \cdot min^{-1}$; 燃气: 氢气, 流量为 $40 ml \cdot min^{-1}$; 助燃气: 空气, 流量为 $400 ml \cdot min^{-1}$; 色谱柱柱温 $115^\circ C$, 进样器化室温度 $210^\circ C$, FID 检测器温度 $210^\circ C$, 分流比 1:100。进样量 $1 \mu L$ 。在上述条件下 EP 峰与环戊酮 (内标) 峰及其他杂质峰达到基线分离, 理论塔板数按 EP 计算不低于 5000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 EP 对照品 1.9212 g, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加正己烷溶液使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即

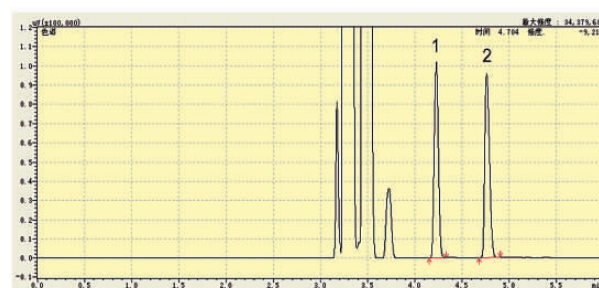
得 (EP 浓度为 $192.12 mg \cdot ml^{-1}$) 精密吸取该对照品溶液 $200 \mu L$ 置 10 mL 棕色量瓶中, 加正己烷溶液使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (EP 浓度为 $3.84 mg \cdot ml^{-1}$)。

2.2.2 内标溶液的制备 精密吸取环戊酮 $24 \mu L$, 置 10 mL 棕色量瓶中, 正己烷定容至刻度, 摇匀即得。

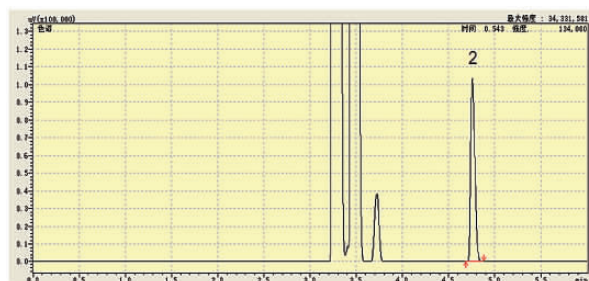
2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取丙酮酸乙酯注射剂适量, 置 10 mL 棕色量瓶中, 向其中加入环戊酮 (内标) 纯品 $24 \mu L$, 正己烷定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 阴性溶液的制备 精密称取不含 EP 的抗炎注射剂适量, 置 10 mL 棕色量瓶中, 向其中加入环戊酮纯品 $24 \mu L$, 正己烷定容至刻度, 摇匀, 即得。

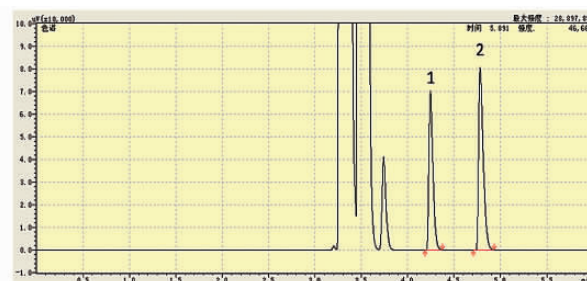
2.2.5 专属性试验 分别吸取正己烷、EP 对照品溶液、内标溶液、供试品溶液、阴性溶液各 $1 \mu L$ 注入气相色谱仪, 记录色谱图 (图 1), 结果表明阴性溶液色谱图中无干扰吸收峰, 因此用此种方法测定样品专属性强。



A



B



C

图 1 专属性试验 GC 色谱图 (A) 对照品 (B) 阴性 (C) 供试品 1 丙酮酸乙酯 2 环戊酮 (内标)

Fig. 1 GC chromatogram of specificity experiment (A) reference substance (B) negative (C) sample. 1. EP 2. cyclopentanone (internal standard)

2.3 线性关系考察

精密称取 1.0007 g EP 对照品, 于 10 mL 棕色容量瓶中, 正己烷稀释至刻度, 后精密吸取上述对照品溶液 $50 \mu L$ 、 $150 \mu L$ 、 $300 \mu L$ 、 $450 \mu L$ 、 $600 \mu L$ 、 $750 \mu L$ 、 $900 \mu L$, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 各加环戊酮量 $24 \mu L$, 再加正己烷定容至刻度, 摇匀。取 $1 \mu L$ 注入气相色谱仪, 以浓度 (X) 为横坐标, EP 与环戊酮 (内标) 的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $y = 0.2147x - 0.0303$ ($r^2 = 0.9996$, $n = 6$), 结果表明 EP 在浓度为 $0.50035 mg \cdot ml^{-1} \sim 9.0063 mg \cdot ml^{-1}$ 的范围内与其内标的峰面积比值呈良好的线性关系。

2.3.1 精密度试验 分别精密吸取 2.2.1 项下对 EP 对照品溶液

($192.12 mg \cdot ml^{-1}$) $160 \mu L$ 、 $200 \mu L$ 、 $240 \mu L$ 各 1 份置 10 mL 棕色容量瓶中, 分别加入内标溶液 $24 \mu L$, 正己烷定容至刻度, 摇匀, 取 $1 \mu L$ 注入气相色谱仪, 每样重复进样 3 次, 测定峰面积。结果 $RSD = 0.391\%$ ($n = 9$), 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 精密吸取 EP 注射剂适量, 共 6 份, 按照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取样品溶液 $1 \mu L$, 注入气相色谱仪, 测定峰面积, 计算 EP 与环戊酮 (内标) 的比值, 结果平均比值为 0.767, $RSD = 1.02\%$ ($n = 6$), 表明本法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取 EP 注射剂适量, 共 6 份, 按照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、

24 h、2 d、4 d、6 d 吸取样品溶液 1 μ L, 注入气相色谱仪, 测定峰面积, 计算 EP 与环戊酮(内标)的比值, 结果平均比值为 0.752, RSD = 0.351 % (n = 9), 表明供试品溶液在 6 天内稳定性良好。

2.3.4 加样回收率试验 分别精密吸取 EP 含量为 192.23 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EP 注射剂 0.1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 共 6 份, 分

别其中加入浓度为 192.20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EP 标准品溶液 0.08 mL、0.1 mL、0.12 mL 各两份, 分别加入内标溶液 24 μ L, 正己烷定容至刻度, 摇匀, 取 1 μ L 注入气相色谱仪测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收实验结果
Table 1 The result of recovery experimentation

No.	EPcontent in sample (mg)	Standard (mg)	Total EPcontent (mg)	Recovery (%)	Average recovery (%)	RSD(%)
1	19.223	15.376	34.635	100.23	99.76	0.460
2	19.223	15.376	34.492	99.31		
3	19.223	19.220	38.404	99.80		
4	19.223	19.220	38.374	99.64		
5	19.223	23.064	42.110	99.23		
6	19.223	23.064	42.363	100.33		

2.4 样品含量测定

EP 含量, 结果见表 2。

按上述色谱条件和方法测定三批样品, 记录峰面积, 计算

表 2 含量测定试验结果
Table 2 The result of assaying

Batch No.	No.	EPcontent(%)	Average content(%)	RSD%
20101213	1	99.10	99.85	0.660
	2	100.35		
	3	100.09		
20101214	1	100.70	100.11	0.835
	2	99.52		
	3	100.70		
20101215	1	100.522	100.23	0.814
	2	100.852		
	3	99.303		

3 讨论

气相色谱具有高柱效、高灵敏度、用量少、分析速度快等优点, 同时 EP 具有在常温下为液态, 易挥发、紫外吸收较弱、在高温下稳定的特点, 本实验室首选气相色谱对其进行含量测定, 在预实验过程中, 分别使用无水乙醇、乙腈、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、丙酮溶剂, 进行筛选, 发现无水乙醇作为溶剂溶解 EP 时, 溶解良好, 溶液澄清透明, 但注入气相色谱仪后观察色谱图发现, 在出峰之后基线明显漂移, 进样无水乙醇溶剂与其对比, 发现此原因并非溶剂带来。改变色谱条件如色谱柱温、气化室温度、检测器温度、以及柱流量、分流比均未有明显改变, 并且同时发现无水乙醇溶解 EP 平行进样后峰面积相差甚远, 加入内标, 内标峰面积相对稳定, 但两者比值仍平行性很差。此现象在甲醇和乙腈中均有相似之处。猜测, EP 与此三种溶剂可能存在相互作用, 使得测量结果不稳定。在正己烷、乙酸乙酯和丙酮溶

液中, EP 均溶解性好, 色谱行为稳定。综合多种因素, 最终选择正己烷为其样品处理溶剂。在色谱条件优化的过程中, 我们选择了 80 $^{\circ}\text{C}$ - 130 $^{\circ}\text{C}$ 范围进行摸索, 发现柱温过高 EP 与溶剂峰不能达到基线分离, 温度过低 EP 对称性差, 拖尾因子大(2 以上), 此种现象改变其他条件变化不明显, 最终我们选择 115 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳柱温。

本实验通过 GC 法, 首次对丙酮酸乙酯注射液进行质量检测, 证明该方法专属性强, 灵敏度高, 重现性好, 可用于本制剂的质量控制。

参考文献(References)

- [1] Desagher S, Glowinski J, Pr  mont J. Pyruvate Protects Neurons against Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity[J]. Neuroscience, 1997, 17(23): 9060-9067
- [2] Montgomery CM, Webb JL. Metabolic studies on heart mitochondria. II. The inhibitory action of parapyruvate on the tricarboxylic acid

- cycle[J]. Biol Chem, 1956, 221(1): 359-368
- [3] Sims CA, Wattanasrichaigoon S, Menconi MJ, et al. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats[J]. Crit Care Med, 29(8): 1513-1518
- [4] Cook VL, Holcombe SJ, Gandy JC, et al. Ethyl pyruvate decreases proinflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated equine monocytes [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 141(1-2): 92-99
- [5] Park SY, Yi EY, Jung M, et al. Ethyl pyruvate, an anti-inflammatory agent, inhibits tumor angiogenesis through inhibition of the NF-kappaB signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2011, 303(2): 150-154
- [6] Jang IS, Park MY, Shin IW, et al. Ethyl pyruvate has anti-inflammatory and delayed myocardial protective effects after regional ischemia/reperfusion injury[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(6): 838-844
- [7] Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(2): 151-159
- [8] Dong W, Cai B, Peña G, et al. Ethyl pyruvate prevents inflammatory responses and organ damage during resuscitation in porcine hemorrhage[J]. Shock, 2010, 34(2): 205-213
- [9] Wang P, Gong G, Wei Z, et al. Ethyl pyruvate prevents intestinal inflammatory response and oxidative stress in a rat model of extrahepatic cholestasis[J]. J Surg Res, 2010, 160(2): 228-235
- [10] Davé SH, Tilstra JS, Matsuoka K, et al. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis [J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(3): 633-643
- [11] Jang HJ, Kim YM, Tsoyi K, et al. Ethyl pyruvate induces HO-1 through p38 MAPK activation by depletion of glutathione in RAW 264.7 cells and improves survival in septic animals [J]. Antioxid Redox Signal, 2012 [Epub ahead of print]
- [12] Onur E, Akalin B, Memisoglu K, et al. Ethyl Pyruvate Improves Healing of Colonic Anastomosis in a Rat Model of Peritonitis[J]. Surg Innov, 2012 [Epub ahead of print]
- [13] Zhang J, Zhu JS, Zhou Z, et al. Inhibitory effects of ethyl pyruvate administration on human gastric cancer growth via regulation of the HMGB1-RAGE and Akt pathways in vitro and in vivo[J]. Oncol Rep, 2012, 27(5): 1511-1519
- [14] Hu X, Cui B, Zhou X, et al. Ethyl pyruvate reduces myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 227-231
- [15] Tian XX, Wu CX, Sun H, et al. Ethyl pyruvate inhibited HMGB1 expression induced by LPS in macrophages [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2011, 27(12): 1304-1307, 1311
- [16] Yuan Y, Su Z, Pu Y, et al. Ethyl pyruvate promotes spinal cord repair through ameliorating the glial microenvironment [J]. Br J Pharmacol, 2011 [Epub ahead of print]
- [17] Chen HL, Bai H, Xi MM, et al. Ethyl pyruvate protects rats from phosgene-induced pulmonary edema by inhibiting cyclooxygenase2 and inducible nitric oxide synthase expression [J]. J Appl Toxicol, 2011 [Epub ahead of print]
- [18] Su X, Wang H, Zhao J, et al. Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF-kappaB pathway after traumatic brain injury in the rat[J]. Mediators Inflamm, 2011, 2011: 807142
- [19] Huh SH, Chung YC, Piao Y, et al. Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease[J]. J Immunol, 2011, 187(2): 960
- [20] Kung CW, Lee YM, Cheng PY, et al. Ethyl pyruvate reduces acute lung injury via regulation of iNOS and HO¹ expression in endotoxemic rats[J]. J Surg Res, 2011, 167(2): 323-331
- [21] Di Paola R, Mazzon E, Galuppo M, et al. Ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe arthritis caused by type II collagen (CII) in the mouse (CIA)[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(4): 1087-1098
- [22] Moro N, Sutton RL. Beneficial effects of sodium or ethyl pyruvate after traumatic brain injury in the rat [J]. Exp Neurol, 2010, 225(2): 391
- [23] Yu DH, Noh DH, Song RH, et al. Ethyl pyruvate downregulates tumor necrosis factor alpha and interleukin (IL)-6 and upregulates IL-10 in lipopolysaccharide-stimulated canine peripheral blood mononuclear cells[J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(10): 1379-1381
- [24] Mizutani A, Maeda N, Toku S, et al. Inhibition by ethyl pyruvate of the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in cultured lung epithelial cells[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2010, 23(4): 308-315
- [25] Shen H, Hu X, Liu C, et al. Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms[J]. Neurobiol Dis, 2010, 37(3): 711-722
- [26] Shang GH, Lin DJ, Xiao W, et al. Ethyl pyruvate reduces mortality in an endotoxin-induced severe acute lung injury mouse model [J]. Respir Res, 2009, 10: 91
- [27] Varma SD, Devamanoharan PS, Ali AH. Devamanoharan PS and Ali AH. Prevention of intra-cellular oxidative stress to lens by pyruvate and its ester[J]. Free Rad Res, 1998, 28: 131-135

(上接第 2870 页)

- [24] Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N2-methyl-2D2-aspartate[J]. J Neurosci, 1995, 15(10): 6377-6388
- [25] Raghupathi R, Graham D I. Mc Intosh TK Apoptosis after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 927-938
- [26] Du Y, Dodel RC, Bales KR. Involvement of a caspase-2-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. J Neurochem, 1997, 69(4): 1382-1388
- [27] Meek DW. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53[J]. Cell Signal, 1998, 10(3): 159-166