



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105628813 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201511006119. 0

(22) 申请日 2015. 12. 29

(71) 申请人 中国科学院过程工程研究所  
地址 100190 北京市海淀区中关村北二条 1 号

(72) 发明人 赵赫 杜朋辉 曹宏斌 张笛  
刘晨明

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332  
代理人 巩克栋 侯潇潇

(51) Int. Cl.  
G01N 30/02(2006. 01)

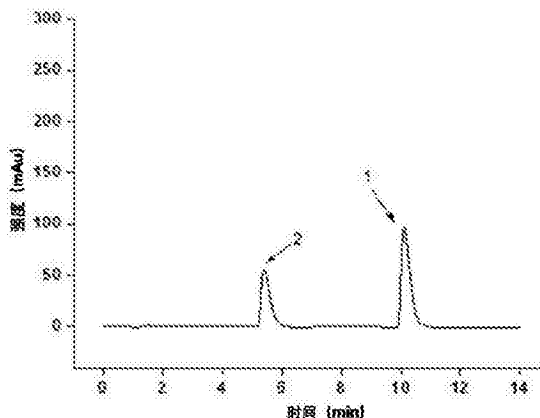
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种硫醇类药物含量的检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种硫醇类药物含量的检测方法,所述方法包括如下步骤:(1) 向硫醇类药物的溶液中加入还原试剂,还原溶液中的二硫聚体,得到还原产物溶液;(2) 将还原产物溶液与醌类衍生化试剂进行衍生化反应,得到衍生化产物溶液;(3) 检测衍生化产物的含量,得到硫醇类药物的含量。所述方法在还原硫醇类药物后,采用醌类化合物对硫醇类药物进行衍生化预处理,快速生成稳定的衍生化产物,再通过检测手段分离测定衍生化产物的含量,能够精确计算样品中硫醇类药物含量。本发明提供的检测方法回收率好,操作简单易行,准确率高,测量迅速,灵敏度高,可用于检测硫醇类药物的含量和人体体液药物动力学研究等领域。



1. 一种硫醇类药物含量的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括如下步骤:

(1)向含有硫醇类药物的溶液中加入还原试剂,还原溶液中的二硫聚体,得到还原产物溶液;

(2)将还原产物溶液与醌类衍生化试剂进行衍生化反应,得到衍生化产物溶液;

(3)检测衍生化产物的含量,得到硫醇类药物的含量。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)所述硫醇类药物为化学分子结构式中含有巯基的药物;

优选地,步骤(1)所述硫醇类药物为卡托普利、美司钠、青霉胺、半胱氨酸和硫普罗宁中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,步骤(1)所述硫醇类药物在溶液中的浓度为1~100ppm,优选为20~50ppm。

3. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,进行步骤(1)所述还原反应前,先调节硫醇类药物的pH值为6~8,优选为将pH值调节为7。

4. 根据权利要求1-3之一所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)所述还原试剂为三羧甲基磷酸、二硫苏糖醇、硼氢化钠和三丁基磷中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,步骤(1)所述还原试剂的投加量为1~80ppm,优选为30~45ppm,进一步优选为35ppm;

优选地,步骤(1)所述还原反应在搅拌条件下进行,所述搅拌的速率为150~250r/min,优选为200r/min;

优选地,步骤(1)所述反应的时间为3~8min,优选为5min。

5. 根据权利要求1-4之一所述的检测方法,其特征在于,步骤(2)所述醌类衍生化试剂为分子结构中含有醌式结构的化合物;

优选地,步骤(2)所述醌类衍生化试剂为苯醌、萘醌、菲醌和蒽醌中的任意一种或至少两种的组合。

6. 根据权利要求1-5之一所述的检测方法,其特征在于,步骤(2)所述醌类衍生化试剂的投加量为1~100ppm,优选为30~50ppm;

优选地,步骤(2)所述反应在水浴条件下进行;

优选地,所述水浴的温度为20~40℃,优选为25~35℃,进一步优选为30℃;

优选地,步骤(2)所述反应的时间为1~30min,优选为15min。

7. 根据权利要求1-6之一所述的检测方法,其特征在于,步骤(3)利用高效液相色谱串联紫外检测器检测衍生化产物的含量;

优选地,所述高效液相色谱检测使用的色谱柱为反相色谱柱;

优选地,所述高效液相色谱检测使用的色谱柱为C18柱,优选为AgilentPH5-C18柱;

优选地,所述高效液相色谱检测的柱温为20~60℃,优选为35℃;

优选地,所述高效液相色谱柱检测使用等梯度洗脱。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述高效液相色谱检测的流动相为乙腈-磷酸水体系;

优选地,所述流动相的流动相A为磷酸水溶液,其中磷酸含量为0.1~0.3wt%,流动相B为乙腈;

优选地,所述流动相A与流动相B的体积比为60/40~80/20,优选为75/25;

优选地,所述高效液相色谱检测的流动相流速为0.1~1.2mL/min,优选为0.25mL/min。

9. 根据权利要求7或8所述的检测方法,其特征在于,所述高效液相色谱检测的进样量为1~30 $\mu$ L,优选为20 $\mu$ L;

优选地,所述紫外检测器的检测波长为220~390nm,优选为280~320nm。

10. 根据权利要求1-9之一所述的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括如下步骤:

(1) 向pH值为6~8、浓度为1~100ppm的硫醇类药物溶液中加入1~80ppm的还原试剂,还原溶液中的二硫聚体,还原过程中的搅拌速率为150~250r/min,反应时间为3~8min,得到还原产物溶液;

(2) 将还原产物溶液与醌类衍生化试剂在20~40 $^{\circ}$ C的水浴条件下反应1~30min,其中,醌类衍生化试剂的投加量为1~100ppm,得到衍生化产物溶液;

(3) 利用高效液相色谱串联紫外检测器衍生化产物进行分离检测,得到衍生化产物的含量,进一步得到硫醇类药物的含量,其中,高效液相色谱检测的条件为:色谱柱为Agilent PH5-C18柱,柱温为20~60 $^{\circ}$ C,流动相A为0.1~0.3wt%的磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流动相A与流动相B比例为60/40~80/20,流动相流速为0.1~1.2mL/min,等梯度洗脱,进样量为1~30 $\mu$ L,紫外光检测器的检测波长为220~390nm。

## 一种硫醇类药物含量的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,涉及一种硫醇类药物的定量检测方法,尤其涉及一种使用衍生化预处理和液相色谱-紫外检测器分离检测硫醇类药物的方法。

### 背景技术

[0002] 硫醇类药物是一类具有巯基结构药物的总称,主要包括美司钠(mesna),卡托普利(captopril),半胱氨酸(cysteamine)和硫普罗宁(tiopronin)等化合物,目前在医学领域被广泛用于心力衰竭,X射线损伤,肝炎和血性膀胱炎等疾病的治疗。这些药物多有一定的副作用,可能引起咳嗽,头痛,瘙痒,胸闷等症状。

[0003] 硫醇类药物常见的分析定量方法有液相色谱,离子色谱分离,紫外、电化学、蒸发光散射以及近红外光谱法,还有滴定法、旋光检测法等。如CN102520093A提出一种离子色谱串联紫外检测法测定卡普托利含量的方法,该方法采用离子色谱阳离子交换系统与紫外检测器联用,根据物质在色谱柱上保留行为的差异,选择合适的分离条件,再选择最优的紫外检测波长,能够在比较高的灵敏度下分离检测卡托普利,该方法虽然简单,但硫醇类药物极性较强,在色谱柱分离过程通常出峰时间过早,得不到有效分离;另外,硫醇类药物的化学结构一般缺少匹配的紫外或荧光信号响应,导致该方法灵敏度低,重现性差。

[0004] 已有文献使用衍生化预处理的方法检测硫醇类药物,如文献已报道使用3-溴甲基-异丙安替比林(BMP)作为衍生化试剂屏蔽卡普托利结构中的巯基基团,能够在比较高的灵敏度下分离检测卡普托利(3-Bromomethyl-propyphenazone as a new derivatization reagent for high performance liquid chromatography of captopril and hydrochlorothiazide with UV-detection, Biomed. Chromatogr., 1998, 12:57),但该方法衍生化过程需要加入碳酸钾作为催化剂,操作步骤相对复杂,成本较高;CN 102977113A公开了一种基于一种香豆素色烯衍生物检测硫醇的方法,所述的香豆素色系衍生物为8,9-dihydro-2H-cyclopenta[b]pyrano[2,3-f]chromene-2,10(7AH)-dione(简称:CPC),检测方法是基于CPC,在pH为7.4的HEPES溶液中定量地检测硫醇的含量;CN 103575727A公开了一种检测硫醇的试剂,所述试剂是马来酰亚胺衍生物:2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-1H-苯并(de)异喹啉-1,3(2H)-二酮;CN 102183471A公开了一种硫醇的定量检测方法和试剂盒,所述方法和试剂盒基于一种色烯衍生物NPC:7-nitro-2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]chromen-1-one,在pH为7.0的缓冲溶液中定量地检测硫醇的含量。但是,这些方法不能避免硫醇类药物的聚合,并且检测灵敏度不高。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种硫醇类药物含量的检测方法,所述方法简单易行,操作简便,且具有较高的灵敏度和重现性,可广泛应用于生物制药、药物动力学及药品安全等领域。

[0006] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种硫醇类药物含量的检测方法,所述方法包括如下步骤:

[0008] (1)向硫醇类药物的溶液中加入还原试剂,还原溶液中的二硫聚体组分,得到还原产物溶液;

[0009] (2)将还原产物溶液与醌类衍生化试剂进行衍生化反应,得到衍生化产物溶液;

[0010] (3)检测衍生化产物的含量,得到硫醇类药物的含量。

[0011] 所述还原产物为硫醇药物的单体结构形式,所述衍生化产物为醌类衍生化试剂与硫醇类药物的硫醇基团反应生成的以C-S键合的产物。

[0012] 本发明提供的硫醇类药物含量的检测方法,其检测原理为:先使用还原试剂对待检测的硫醇类药物的溶液进行还原性处理,之后,使用醌类衍生化试剂对硫醇类药物进行预衍生化,由于醌类衍生化试剂的结构式中存在大量吸电子位点,可与富电子的硫醇基团通过亲核加成反应生成以C-S键合的衍生化产物,并且所述加成反应迅速且无其他副反应,由于硫醇基团被醌类化合物屏蔽,氧化副反应得到抑制,所述C-S键合的衍生化产物易检测分离。

[0013] 本发明提供的检测方法得到的数据精确,分析时间短,灵敏度高,为硫醇类药物的定量提供了一种优选的方法。

[0014] 步骤(1)所述硫醇类药物为化学分子结构式中含有巯基的药物。

[0015] 优选地,步骤(1)所述硫醇类药物为卡托普利、美司钠、青霉胺、半胱氨酸和硫普罗宁中的任意一种或至少两种的组合。典型但非限制性的组合为卡托普利与美司钠,青霉胺、半胱氨酸与硫普罗宁,卡托普利、美司钠、青霉胺与半胱氨酸,卡托普利、美司钠、青霉胺、半胱氨酸与硫普罗宁。

[0016] 优选地,步骤(1)所述硫醇类药物在溶液中的浓度为1~100ppm,如2ppm、3ppm、5ppm、10ppm、15ppm、20ppm、30ppm、40ppm、50ppm、70ppm或90ppm等,优选为20~50ppm。

[0017] 进行步骤(1)所述还原反应前,先调节硫醇类药物的pH值为6~8,如调节至6.3、6.7、7、7.2、7.5、7.6或7.8等,优选为将pH值调节为7。

[0018] 步骤(1)所述还原试剂为三羧甲基磷酸(TCEP)、二硫苏糖醇、硼氢化钠和三丁基膦中的任意一种或至少两种的组合。典型但非限制性的组合为:三羧甲基磷酸与二硫苏糖醇,硼氢化钠与三丁基膦,三羧甲基磷酸、二硫苏糖醇与硼氢化钠,三羧甲基磷酸、二硫苏糖醇、硼氢化钠与三丁基膦。所述还原剂能够将溶液中硫醇类药物的二硫聚体还原,从而有利于硫醇类药物含量的准确检测。

[0019] 优选地,步骤(1)所述还原试剂的投加量为1~80ppm,如3ppm、5ppm、10ppm、15ppm、20ppm、25ppm、37.3ppm、45ppm、55.2ppm、65ppm、68.5ppm、70.2ppm或77.5ppm等,优选为30~45ppm,进一步优选为35ppm。

[0020] 优选地,步骤(1)所述还原反应在搅拌条件下进行,所述搅拌的速率为150~250r/min,如150.12r/min、168r/min、190r/min、207r/min、238.6r/min、225r/min、220r/min等,优选为200r/min。

[0021] 优选地,步骤(1)所述反应的时间为3~8min,如5.3min、3.03~7.76min、3.44~7.4min、3.75~7.12min、4.3~5.6min等,优选为5min。

[0022] 步骤(2)所述醌类衍生化试剂为分子结构中含有醌式结构的化合物。

[0023] 优选地,步骤(2)所述醌类衍生化试剂为苯醌、萘醌、菲醌和蒽醌中的任意一种或

至少两种的组合。典型但非限制性的组合为：苯醌与萘醌，菲醌与蒽醌，萘醌与菲醌，苯醌、萘醌与菲醌，苯醌、萘醌、菲醌与蒽醌。

[0024] 步骤(2)所述醌类衍生化试剂的投加量为1~100ppm,如1.3ppm、5ppm、10ppm、20ppm、25ppm、46.8ppm、55ppm、65ppm或98.7ppm等,优选为30~50ppm。

[0025] 优选地,步骤(2)所述反应在水浴条件下进行。

[0026] 优选地,所述水浴的温度为20~40℃,如20.1℃、23℃、27.1℃、28℃、29.8℃、31℃、34℃、34.1℃或39.4℃等,优选为25~35℃,进一步优选为30℃。

[0027] 优选地,步骤(2)所述反应的时间为1~30min,如1.06min、3.5min、8.6min、11min、13.6min、17.5min、21.4min、25min或28.4min等,优选为15min。

[0028] 步骤(3)采用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测。步骤(2)得到的加成产物经过色谱柱后可得到有效分离,在紫外光检测下有特征峰出现,选择合适的紫外检测波长,根据特征峰的出峰面积和出峰时间,能够精确测定硫醇类物质的含量最终达到精确检测硫醇类药物含量的目的。所述高效液相色谱与紫外检测器的使用能够快速检测得到硫醇类药物的含量,处理简单,分析时间短,灵敏度高,重现性好。所述衍生化产物也可采用其他的仪器分离检测,得到硫醇类药物的含量,如高效液相色谱与质谱联用等。

[0029] 优选地,所述高效液相色谱检测使用的色谱柱为反相色谱柱。

[0030] 优选地,所述高效液相色谱检测使用的色谱柱为C18柱。所述色谱柱优选为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm)。所述衍生化产物经过C18反相柱洗脱后可得到有效分离。

[0031] 优选地,所述高效液相色谱检测的柱温为20~60℃,如柱温为22.5℃、27.8℃、32℃、43℃、47.5℃、50℃或56.7℃等,优选为35℃。

[0032] 优选地,所述高效液相色谱柱检测使用等梯度洗脱。

[0033] 所述高效液相色谱检测的流动相为乙腈-磷酸水体系。

[0034] 优选地,所述流动相A为磷酸水溶液,其中磷酸含量为0.1~0.3wt%,如0.2wt%等,流动相B为乙腈。

[0035] 优选地,所述流动相A与流动相B的体积比为60/40~80/20,如流动相A与流动相B的体积比为65/35、70/30、62/38、72/28、75/40或78/22等,优选为75/25,其中,“/”为“相比”的意思。

[0036] 优选地,所述高效液相色谱检测的流动相流速为0.1~1.2mL/min,如流动速度为0.12mL/min、0.24mL/min、0.4mL/min、0.5mL/min、0.7mL/min、0.9mL/min、1.08mL/min或1.15mL/min等,优选为0.25mL/min。

[0037] 所述高效液相色谱检测的进样量为1~30μL,如2.2μL、3μL、5μL、6.6μL、8μL、9μL、10μL、12μL、15μL、18μL、21μL、25.6μL或28.4μL等,优选为20μL。

[0038] 优选地,所述紫外检测器的检测波长为220~390nm,如检测额波长为225nm、235nm、254nm、360nm、375nm或380nm等,优选为280~320nm。

[0039] 作为优选的技术方案,所述检测方法包括如下步骤:

[0040] (1)向pH值为6~8、浓度为1~100ppm的硫醇类药物溶液中加入20~80ppm的还原试剂,进行还原反应,反应过程中的搅拌速率为150~250r/min,搅拌时间为3~8min,得到还原产物溶液;

[0041] (2)将还原产物溶液与醌类衍生生化试剂在20~40℃的水浴条件下反应1~30min,其中,醌类衍生生化试剂的投加量为1~100ppm,得到衍生生化产物溶液;

[0042] (3)利用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生生化产物分离检测,得到衍生生化产物的含量,进而得到硫醇类药物的含量,其中,高效液相色谱检测的条件为:色谱柱为C18柱,柱温为20~60℃,流动相A为0.1~0.3wt%磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流动相A与流动相B的体积比为60/40~80/20,流动相流速为0.1~1.2mL/min,等梯度洗脱,进样量为1~30μL,紫外光检测器的检测波长为220~390nm。

[0043] 本发明提供的检测方法可广泛应用于生物制药、药物动力学和药品安全等领域,等度条件下能够分离检测硫醇类药物,操作简便,重现性好,灵敏度高。

[0044] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0045] (1)测量结果准确:本发明所涉及方法对硫醇类药物进行还原和衍生生化处理,可以阻止硫醇类药物自发氧化生成二硫聚体的反应,同时,醌类衍生生化试剂可屏蔽活泼巯基基团,产物在色谱柱上得到有效分离,实际测量结果准确度达到98.3%以上。

[0046] (2)灵敏度高:醌类衍生剂与硫醇类药物可特异性发生亲核加成反应,生成以C-S键键合聚合物,该步骤反应速度快且衍生生化产物单一稳定,产物结构产生特征紫外吸收。

## 附图说明

[0047] 图1是实施例1提供的卡托普利与2,6-二甲氧基苯醌反应的机理图。

[0048] 图2是实施例1提供的2,6-二甲氧基苯醌的高效液相色谱图,检测波长254nm。

[0049] 图3是实施例1提供的衍生生化产物的高效液相色谱图,检测波长为254nm。其中,峰1为2,6-二甲氧基苯醌峰(出峰时间10.3min),峰2为衍生生化产物峰(出峰时间5.6min)。

## 具体实施方式

[0050] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。

[0051] 为更好地说明本发明,便于理解本发明的技术方案,本发明的典型但非限制性的实施例如下:

[0052] 实施例1

[0053] 测量溶液中卡托普利的含量:

[0054] (1)将浓度为35ppm的卡托普利样品溶液pH调至7,投加45ppm还原剂TCEP,快速搅拌5min,搅拌强度为200r/min,得到还原产物;

[0055] (2)向还原产物中加入2,6-二甲氧基苯醌作为醌类衍生生化试剂,投加量为40ppm,30℃条件下水浴反应15min,即可得到衍生生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用,所述衍生生化产物的产生机理如图1所示;

[0056] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为35℃,流动相为80%含0.1wt%磷酸水溶液+20%乙腈,流速0.25mL/min,进样量为20μL,检测波长为254nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y = 76.21x - 14.66$ ,  $r^2 = 0.9997$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中卡托普利的含量。

[0057] 图1为卡托普利与2,6-二甲氧基苯醌反应的机理图,两者通过亲核加成反应,生成

以C-S键键合的共价衍生化产物。

[0058] 图2为2,6-二甲氧基苯醌在80%含0.1%磷酸水溶液+20%乙腈的流动相条件下的分离谱图,检测波长为254nm。从图中可以看出,2,6-二甲氧基苯醌的出峰时间为10.3min。

[0059] 图3为卡托普利样品在经过TCEP还原和2,6-二甲氧基苯醌衍生化处理后,在80%含0.1%磷酸水溶液+20%乙腈的流动相条件下的分离谱图,检测波长254nm。结合图2的结果知,图3中,峰1为2,6-二甲氧基苯醌峰(出峰时间10.3min),峰2为衍生化产物峰(出峰时间5.6min)。

[0060] 根据标准曲线与图3得到的衍生化产物峰的面积,得到衍生化产物中卡托普利与2,6-二甲氧基苯醌反应得到的以C-S键合的聚合产物的含量,从而得到卡托普利的含量。计算公式如下: $C=(S+14.66)/76.21$ ,其中C为卡托普利的浓度含量,S为图3所得衍生化产物的峰面积。

[0061] 该实施例中,卡托普利含量的测量准确率为99.4%。

[0062] 实施例2

[0063] 测量溶液中硫普罗宁的含量:

[0064] (1)将浓度为45ppm的硫普罗宁样品溶液pH调至6,投加40ppm还原剂硼氢化钠,快速搅拌3min,搅拌强度为150r/min,得到还原产物;

[0065] (2)向还原产物中加入2-羟基-1,4-萘醌作为醌类衍生化试剂,投加量为50ppm,25℃条件下水浴反应10min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用;

[0066] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为30℃,流动相为70%含0.2wt%磷酸水溶液+30%乙腈,流速0.5mL/min,进样量为10μL,检测波长为281nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y=63.34x-7.21$ , $r^2=0.9989$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中硫普罗宁的含量。

[0067] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0068] 该实施例中,硫普罗宁含量的测量准确率为98.9%。

[0069] 实施例3

[0070] 测量溶液中美司钠的含量:

[0071] (1)将浓度为25ppm的美司钠样品溶液pH调至7.5,投加30ppm还原剂三丁基膦,快速搅拌4min,搅拌强度为175r/min,得到还原产物;

[0072] (2)向还原产物中加入1,2-蒽醌作为衍生剂,投加量为63ppm,28℃条件下水浴反应18min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用;

[0073] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为40℃,流动相为60%含0.1wt%磷酸水溶液+40%乙腈,流速0.6mL/min,进样量为30μL,检测波长为323nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y=88.24x-12.17$ , $r^2=0.9986$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中美司钠的含量。

[0074] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0075] 该实施例中,美司钠含量的测量准确率为98.7%。

[0076] 实施例4



[0077] 测量溶液中半胱氨酸的含量：

[0078] (1)将浓度为60ppm的半胱氨酸样品溶液pH调至8,投加65ppm还原剂二硫苏糖醇,快速搅拌4.5min,搅拌强度为190r/min,得到还原产物；

[0079] (2)向还原产物中加入3-甲基邻苯二醌作为衍生剂,投加量为60ppm,30℃条件下水浴反应5min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0080] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为35℃,流动相为75%含0.1wt%磷酸水溶液+25%乙腈,流速0.45mL/min,进样量为15μL,检测波长为291nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y=71.21x-21.36$ , $r^2=0.9992$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中半胱氨酸的含量。

[0081] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0082] 该实施例中,半胱氨酸含量的测量准确率为99.2%。

[0083] 实施例5

[0084] 测量溶液中青霉胺的含量：

[0085] (1)将浓度为60ppm的青霉胺样品溶液pH调至6,投加65ppm还原剂TCEP,快速搅拌5min,搅拌强度为210r/min,得到还原产物；

[0086] (2)向还原产物中加入4-甲基-1,2-萘醌作为衍生剂,投加量为60ppm,30℃条件下水浴反应5min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0087] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为30℃,流动相为70%含0.1wt%磷酸水溶液+30%乙腈,流速0.6mL/min,进样量为20μL,检测波长为345nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y=89.12x-14.38$ , $r^2=0.9993$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中青霉胺的含量。

[0088] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0089] 该实施例中,青霉胺含量的测量准确率为98.3%。

[0090] 实施例6

[0091] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0092] (1)将浓度为25ppm的卡托普利样品溶液pH调至7.5,投加55ppm还原剂三丁基膦,快速搅拌10min,搅拌强度为220r/min,得到还原产物；

[0093] (2)向还原产物中加入2-羟基-1,4-萘醌作为衍生剂,投加量为55ppm,35℃条件下水浴反应15min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0094] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为40℃,流动相为65%含0.1wt%磷酸水溶液+35%乙腈,流速0.2mL/min,进样量为10μL,检测波长为278nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y=56.28x-12.63$ , $r^2=0.9988$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中卡托普利的含量。

[0095] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0096] 该实施例中,卡托普利含量的测量准确率为99.5%。

[0097] 实施例7

[0098] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0099] (1)将浓度为1ppm卡托普利样品溶液pH调至6,投加1ppm还原剂三丁基膦,快速搅拌3min,搅拌强度为250r/min,得到还原产物；

[0100] (2)向还原产物中加入2-羟基-1,4-萘醌作为衍生剂,投加量为1ppm,40℃条件下水浴反应1min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0101] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为60℃,流动相A为0.2wt%磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流动相A与流动相B体积比为60/40,流速1.2mL/min,进样量为1μL,检测波长为278nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y = 56.28x - 12.63$ ,  $r^2 = 0.9988$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中卡托普利的含量。

[0102] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0103] 该实施例中,卡托普利含量的测量准确率为98.7%。

[0104] 实施例8

[0105] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0106] (1)将浓度为100ppm的卡托普利样品溶液pH调至8,投加80ppm还原剂三丁基膦,快速搅拌8min,搅拌强度为150r/min,得到还原产物；

[0107] (2)向还原产物中加入2-羟基-1,4-萘醌作为衍生剂,投加量为100ppm,20℃条件下水浴反应30min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0108] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为20℃,流动相A为0.3wt%磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流动相A与流动相B体积比为80/20,流速0.1mL/min,进样量为30μL,检测波长为278nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y = 56.28x - 12.63$ ,  $r^2 = 0.9988$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中卡托普利的含量。

[0109] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0110] 该实施例中,卡托普利含量的测量准确率为99.3%。

[0111] 实施例9

[0112] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0113] (1)将浓度为20ppm的卡托普利样品溶液pH调至7,投加35ppm还原剂三丁基膦,快速搅拌5min,搅拌强度为200r/min,得到还原产物；

[0114] (2)向还原产物中加入2-羟基-1,4-萘醌作为衍生剂,投加量为30ppm,30℃条件下水浴反应15min,即可得到衍生化产物,样品经0.45μm滤头过滤后备用；

[0115] (3)使用高效液相色谱串联紫外检测器对衍生化产物进行分离检测,色谱柱为Agilent PH5-C18柱(100×2.1mm 1.d,2.7μm),柱温为35℃,流动相A为0.1%磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流动相A与流动相B的体积比为75/25,流速0.25mL/min,进样量为20μL,检测波长为278nm。根据已知浓度的标准样品和对应出峰面积绘制标准曲线,公式为 $y = 56.28x - 12.63$ ,  $r^2 = 0.9988$ 。然后根据公式和出峰面积计算待测样品中卡托普利的含量。

[0116] 本实施例的衍生化反应机理图和分析色谱图分别与实施例1中的图1和图2类似。

[0117] 该实施例中,卡托普利含量的测量准确率为99.0%。

[0118] 对比例1

[0119] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0120] 除不进行步骤(1)外,其余与实施例9相同。

[0121] 该对比例中,卡托普利含量的测量准确率为73.5%。

[0122] 对比例2

[0123] 测量溶液中卡托普利的含量：

[0124] 除将步骤(3)中的高效液相色谱串联紫外检测器替换为高效液相色谱与质谱外,其余与实施例9相同。

[0125] 该对比例中,卡托普利含量的测量准确率为97.3%,但是使用质谱方法测量硫醇药物的含量操作步骤繁琐,且仪器保养维修费用昂贵。

[0126] 申请人声明,以上所述仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,所属技术领域的技术人员应该明了,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

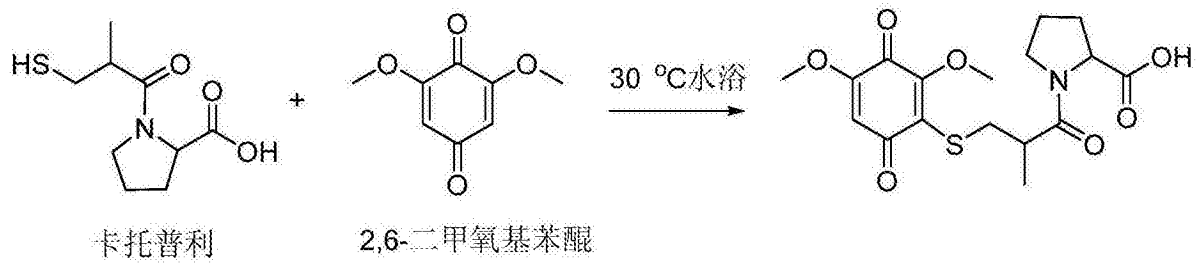


图1

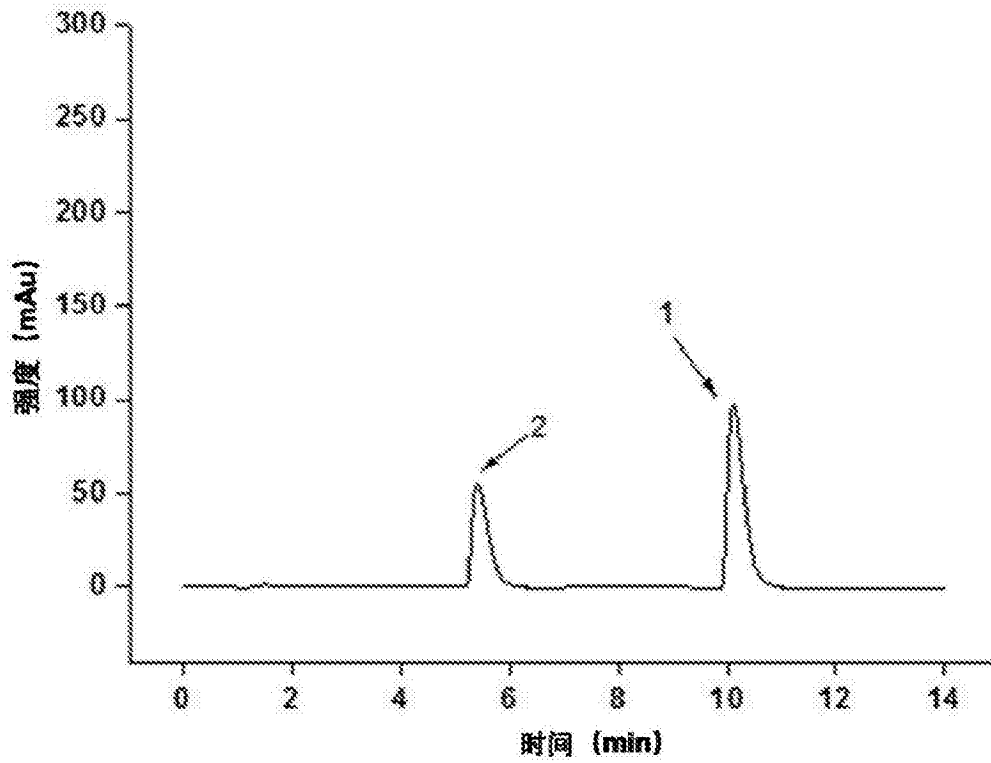


图2

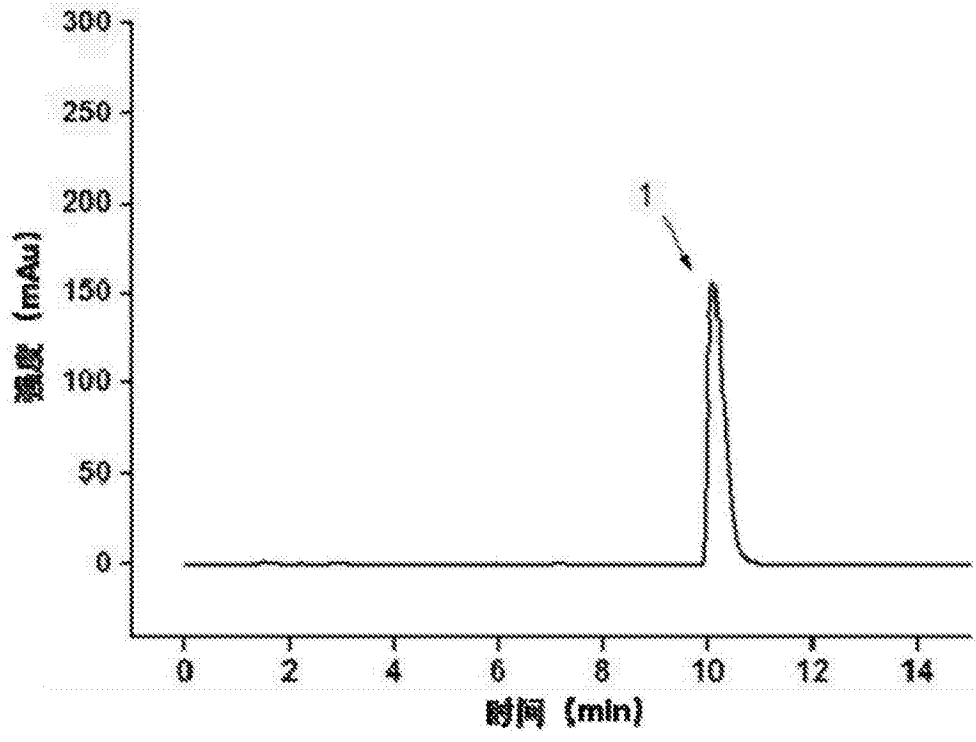


图3