

邻苯二甲醛-9-氯甲酸苄甲酯柱前衍生 HPLC 法测定血必净注射液中氨基酸

黄 浩, 侯媛媛*, 肖 雪, 傅俊曾, 宋生有, 白 钢, 罗国安

南开大学 药学院, 天津 300071

摘 要: 目的 通过建立 HPLC 分析法测定血必净注射液中氨基酸, 为提高中药注射液质量标准提供依据。方法 通过 OPA-FMOC 柱前衍生化法, 建立同时检测血必净注射液中 18 种常见氨基酸的液相色谱法。色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.02 mol/L 醋酸钠溶液 (含 200 μL/L 三乙胺和 3.5 mL/L 四氢呋喃, 2%醋酸溶液调 pH 7.2±0.05), 流动相 B 为 0.02 mol/L 醋酸钠溶液-甲醇-乙腈 (200:400:400) (pH 7.2±0.05), 梯度洗脱; 体积流量: 0~38 min 为 1.0 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 0~32.5 min 为 338 nm, 32.5 min 以后为 262 nm。结果 所测 18 种氨基酸在各自的高、低质量浓度范围内线性关系良好; 3 个批次血必净注射液中, 游离氨基酸测定平均值为 1.320 mg/mL, 总氨基酸测定平均值为 2.027 mg/mL。结论 所建立的氨基酸定量方法结果准确可靠, 重现性好, 有助于血必净注射液的质量控制, 对中药注射剂安全评价标准的提高具有指导意义。

关键词: 血必净注射液; 氨基酸; 柱前衍生化法; 高效液相色谱; 质量控制

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2011)01-0058-05

Determination of amino acids in Xuebijing Injection by *o*-phthalaldehyde-9-fluorenylmethyl chloroformate pre-column derivatization HPLC

HUANG Hao, HOU Yuan-yuan, XIAO Xue, FU Jun-zeng, SONG Sheng-you, BAI Gang, LUO Guo-an

College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To enhance the standards of injection of Chinese materia medica (CMM) by establishing a RP-HPLC method for simultaneous quantitative determination of amino acids in Xuebijing Injection. **Methods** Liquid chromatographic fingerprint method for simultaneous determination of 18 kinds of common amino acids was established by *o*-phthalaldehyde-9-fluorenylmethyl chloroformate (OPA-FMOC) pre-column derivatization. The column was Agilent SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase consisted of 0.02 mol/L sodium acetate (A), including 200 μL/L triethylamine and 3.5 mL/L tetrahydrofuran with pH value (7.2±0.05) regulated by 2% acetic acid solution, and 0.02 mol/L sodium acetate-methanol-acetonitrile (200:400:400) with pH value (7.2 ± 0.05) (B) for gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min within 0—38 min. The detection wavelength was 338 nm within 0—32.5 min and 262 nm, after 32.5 min, while the column temperature was 40 ℃. **Results** There was a good linear relationship of 18 kinds of amino acids with a range of 0.001 2—0.195 4 mg/mL in both high and low concentration. In three batches of Xuebijing Injections, the mean value was 1.320 mg/mL for free amino acids and 2.027 mg/mL for total amino acids. **Conclusion** The optimized method is accurate and reproducible, and is suitable for the determination of amino acids in Xuebijing Injection. It contributes to the quality control of the injection and guides the improvement of safety evaluation standard of CMM injections.

Key words: Xuebijing Injection; amino acid; pre-column derivatization; HPLC; quality control

血必净注射液是在血府逐瘀汤的基础上加减药味制备的注射剂, 由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等活血化瘀药组成, 具有化瘀解毒的功效, 主要用于治疗全身炎症反应综合征^[1-3]。血必净注射液中含多种氨基酸类成分。为了更准确地控制其质量, 本实验对所含氨基酸进行了测定。由于大多数氨基

酸无紫外或荧光吸收, 无法直接检测, 通常的做法是进行衍生化处理^[4-5]。柱前衍生化法多用于高效液相色谱, 先用衍生试剂与氨基酸衍生化反应, 再用紫外或荧光检测器进行检测^[6]。柱前衍生试剂种类较多, 均有其优缺点。虽然邻苯二甲醛 (OPA) 法中过量衍生试剂不干扰检测, 但却不能与二级氨基酸

收稿日期: 2010-09-18

作者简介: 黄 浩 (1983—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药复方物质基础及作用机制。

*通讯作者 侯媛媛 Tel: (022)23506930 E-mail: houyy@nankai.edu.cn

反应，而 9-氯甲酸苄酯（FMOC）却可同时与一级和二级氨基酸反应^[7]。本实验采用 OPA-FMOC 联用柱前衍生法，让样品先与 OPA 充分反应，使一级氨基酸完全反应，继而样品中剩余的二级氨基酸再与 FMOC 反应，以测定血必净注射液中所含的 18 种氨基酸。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相色谱仪，包括在线真空脱气机，二元梯度泵，DAD 二极管阵列检测器，柱温箱，自动进样器（美国 Agilent 公司）；Agilent ChemStation 工作站；Agilent SB-C₁₈ 柱（美国 Agilent 公司）；XP205 型十万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo）；KQ—500E 超声波处理器（昆山超声设备有限公司）；Millipore Elix 5 超纯水仪（美国 Millipore）。

血必净注射液（天津红日药业股份有限公司，批号 10022402、10030901、10030602）。乙腈（J.T. Baker 公司）、甲醇（Fisher 公司）均为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯；FOMC、OPA、巯基丙酸及各氨基酸对照品均为 Sigma 公司产品，其中天冬氨酸（Asp，批号 2009082601）、谷氨酸（Glu，批号 032K0183）、天冬酰胺（Asn，批号 082K5418）、丝氨酸（Ser，批号 2009112505）、甘氨酸（Gly，批号 42K2506）、苏氨酸（Thr，批号 32K0896）、胱氨酸（Cys，批号 2009101501）、丙氨酸（Ala，批号 042K0900）、精氨酸（Arg，批号 9081211）、酪氨酸（Tyr，批号 2009112505）、蛋氨酸（Met，批号 2009112505）、缬氨酸（Val，批号 12K0903）、色氨酸（Try，批号 91103001）、苯丙氨酸（Phe，批号 61K0883）、异亮氨酸（Ile，批号 59H07111）、亮氨酸（Leu，批号 91K0906）、赖氨酸（Lys，批号 32K1110）、脯氨酸（Pro，批号 U32K0881）。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 OPA 衍生试剂的配制 精密称取 OPA 40 mg，加入 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液（pH 10.4）3.5 mL，乙腈 0.5 mL，巯基丙酸 63 μL，混匀，0.45 μm 针头滤器滤过，即得。

2.1.2 FOMC 衍生试剂的配制 精密称取 FMOC 25 mg，加入 5 mL 乙腈溶解，0.45 μm 针头滤器滤过，即得。

2.1.3 混合对照品溶液的配制 精密称取各氨基

酸对照品适量，一起置于 100 mL 量瓶中，1%盐酸溶解，定容，0.45 μm 针头滤器滤过，即得。

2.1.4 游离氨基酸供试品溶液的配制 取血必净注射剂原液，直接用 0.45 μm 针头滤器滤过，即得。

2.1.5 总氨基酸供试品溶液的配制 分别取各注射液 1 mL 于具塞试管中，加入 6 mol/L 盐酸 9 mL，充氮气封口，盖紧瓶盖，置于 110 ℃ 恒温干燥箱中水解 24 h，取出后将样品倒入蒸发皿中，水浴中蒸干，然后加入 1%盐酸 2 mL，超声处理 10 min，0.45 μm 针头滤器滤过，即得。

2.2 色谱条件

Agilent SB-C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.02 mol/L 醋酸钠溶液（含 200 μL/L 三乙胺和 3.5 mL/L 四氢呋喃，2%醋酸溶液调 pH 7.2±0.05）（A），流动相 B 为 0.02 mol/L 醋酸钠溶液－甲醇－乙腈（200：400：400）（2%醋酸溶液调 pH 7.2±0.05）；柱温 40 ℃；检测波长：0～32.5 min 为 338 nm，32.5 min 以后为 262 nm；洗脱梯度、体积流量见表 1。

表1 流动相梯度及体积流量

Table 1 Gradient elution and flow rate of mobile phase

时间/min	流动相B/%	体积流量/(mL·min ⁻¹)
0.0	0	1.0
12.0	22	1.0
15.0	22	1.0
30.0	70	1.0
35.0	70	1.0
38.0	100	1.5
49.0	100	1.5

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 最初考察了从母液至稀释30倍样品的一系列质量浓度梯度，结果发现受衍生反应动力学影响，在该范围内氨基酸混合对照品溶液标准曲线不呈线性，而近乎呈现一级动力学曲线。最后，分别考察了小范围内较高质量浓度梯度和较低质量浓度梯度，发现各氨基酸线性关系均良好。结果见表2。

2.3.2 精密度试验 取氨基酸混合对照品溶液，按上述色谱条件进样分析，连续进样6次，记录各氨基酸色谱峰的保留时间和峰面积，并计算其RSD，结果见表3。可知大部分氨基酸的精密度较好，RSD值小于2%；只有Tyr和Pro的精密度稍差，RSD分别

表2 18种氨基酸的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of 18 kinds of amino acids

氨基酸	较高质量浓度			较低质量浓度		
	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程	r^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程	r^2 值
Asp	21.6~129.4	$Y=58.662 X-0.857 1$	0.999 5	3.6~ 6.7	$Y=2.10 X+16.680$	0.994 4
Glu	44.8~268.6	$Y=116.76 X-1.510 5$	0.999 9	7.5~14.0	$Y=4.03 X+16.970$	0.996 2
Asn	12.8~ 76.8	$Y=34.846 X+0.042 4$	0.999 9	2.1~ 4.0	$Y=1.22 X+5.220$	0.995 7
Ser	10.7~ 64.3	$Y=37.557 X-0.146 2$	0.999 3	1.8~ 3.4	$Y=1.19 X+10.490$	0.938 3
Gly	32.6~195.4	$Y=161.31 X-4.641 4$	0.999 9	5.4~10.2	$Y=5.53 X+23.990$	0.995 3
Thr	7.2~ 43.0	$Y=22.065 X+26.516 0$	0.999 1	1.2~ 2.2	$Y=0.79 X+29.370$	0.855 9
Cys	20.8~124.9	$Y=11.854 X-0.409 2$	0.999 9	3.5~ 6.5	$Y=0.43 X+1.590$	0.989 8
Ala	28.5~171.1	$Y=121.64 X-1.258 1$	0.999 9	4.8~ 8.9	$Y=4.14 X+18.580$	0.996 1
Arg	29.6~177.5	$Y=65.119 X-1.324 3$	0.999 9	4.9~ 9.2	$Y=2.21 X+9.310$	0.996 5
Tyr	8.3~ 50.0	$Y=14.857 X-2.549 6$	0.995 5	1.4~ 2.6	$Y=0.60 X+2.180$	0.992 3
Met	8.2~ 49.1	$Y=21.049 X-0.149 3$	0.999 6	1.4~ 2.6	$Y=0.73 X+2.550$	0.992 0
Val	25.3~152.0	$Y=84.534 X-2.390 4$	0.999 7	4.2~ 7.9	$Y=3.06 X+11.660$	0.993 9
Try	9.9~ 59.4	$Y=16.157 X-0.255 7$	0.998 9	1.7~ 3.1	$Y=0.54 X+2.400$	0.982 5
Phe	15.5~ 93.0	$Y=35.345 X-1.486 2$	0.999 6	2.6~ 4.8	$Y=0.88 X+6.140$	0.984 2
Ile	16.7~100.1	$Y=51.749 X-4.061 3$	0.996 4	2.8~ 5.2	$Y=1.90 X+7.520$	0.992 1
Leu	28.2~169.0	$Y=83.238 X-0.893 1$	0.999 3	4.7~ 8.8	$Y=3.04 X+11.860$	0.994 1
Lys	7.9~ 47.5	$Y=25.006 X-1.920 0$	0.999 2	1.3~ 2.5	$Y=0.68 X+2.760$	0.988 0
Pro	39.1~234.7	$Y=131.93 X+5.626 7$	0.998 4	6.5~12.2	$Y=6.67 X+28.590$	0.959 6

表3 方法学试验结果 ($n=6$)Table 3 Results of methodology ($n=6$)

氨基酸	精密度RSD/%		稳定性RSD/%		重现性RSD/%	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
Asp	0.103	0.994	0.258	0.864	0.091	2.9
Glu	0.414	0.565	0.552	0.473	0.220	2.1
Asn	0.285	1.381	0.350	1.191	0.330	2.8
Ser	0.191	1.261	0.219	1.113	0.210	2.9
Gly	0.217	0.441	0.249	0.564	0.076	2.2
Thr	0.133	0.527	0.171	0.586	0.061	3.4
Cys	0.158	0.884	0.164	1.241	0.038	2.4
Ala	0.135	0.539	0.204	0.421	0.046	2.2
Arg	0.148	0.509	0.208	0.381	0.033	2.0
Tyr	0.139	2.564	0.178	2.632	0.160	13
Met	0.093	0.561	0.096	0.383	0.009	1.2
Val	0.088	0.611	0.094	0.488	0.009	2.4
Try	0.078	0.579	0.089	0.506	0.011	2.4
Phe	0.067	0.757	0.077	0.961	0.012	3.9
Ile	0.061	0.669	0.071	0.548	0.009	2.2
Leu	0.057	0.626	0.066	0.492	0.009	2.2
Lys	0.059	0.894	0.076	0.806	0.016	5.0
Pro	0.048	2.516	0.061	1.714	0.020	11

为2.564%、2.516%，这可能与其衍生化反应程度或衍生物的稳定性有关。

2.3.3 稳定性试验 取氨基酸混和对照品溶液，按上述色谱条件进样分析，分别于0、2、4、8、12、24 h进样分析，记录各氨基酸色谱峰的保留时间和峰面积，并计算其RSD，结果见表3。可知除Tyr（2.632%）外，其余氨基酸稳定性均较好。

2.3.4 重现性试验 取血必净注射液适量（批号10022402），稀释10倍，滤过，平行操作，配制3个

样品，进样，结果见表3。绝大多数氨基酸重现性良好，RSD值小于5%。

2.4 样品的测定

取3批血必净注射液（批号分别为10022402、10030901、10030602），按上述方法分别制备游离氨基酸和总氨基酸供试液，按色谱条件测定，以外标法计算游离氨基酸和总氨基酸，结果见图1、表4。可计算出游离氨基酸测定平均值为1.320 mg/mL，总氨基酸测定平均值为2.027 mg/mL。

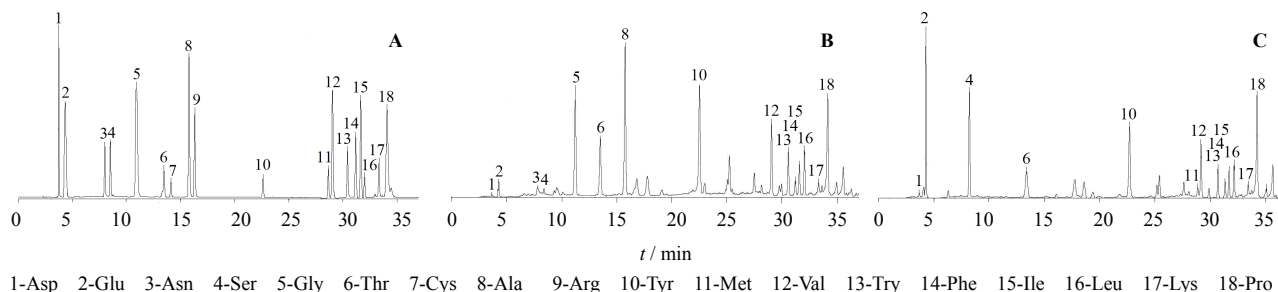


图1 氨基酸混和对照品 (A)、血必净注射液中游离氨基酸 (B)、总氨基酸 (C) 的色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of amino acid mixed standards (A), free amino acid in Xuebijing Injection (B), and total amino acid (C)

表4 血必净注射液中氨基酸测定结果

Table 4 Determination of amino acids in Xuebijing Injection

氨基酸	批号10022402		批号10030901		批号10030602	
	游离氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)	总氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)	游离氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)	总氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)	游离氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)	总氨基酸/ (mg·mL ⁻¹)
Asp	0.015	0.114	0.015	0.128	0.015	0.118
Glu	0.010	0.138	0.013	0.140	0.011	0.138
Asn	0.030	—	0.021	—	0.023	—
Ser	0.008	0.226	0.014	0.292	0.017	0.258
Gly	0.120	—	0.129	—	0.125	—
Thr	0.053	0.028	0.054	0.056	0.056	0.062
Cys	—	—	—	—	—	—
Ala	0.552	0.972	0.518	0.188	0.330	0.096
Arg	0.160	0.022	0.017	0.020	0.018	0.024
Tyr	0.051	0.058	0.017	0.054	0.055	0.062
Met	—	0.022	—	0.022	—	0.042
Val	0.045	0.058	0.046	0.054	0.052	0.062
Try	0.017	0.022	0.018	0.024	0.018	0.026
Phe	0.045	0.052	0.043	0.046	0.050	0.054
Ile	0.030	0.050	0.022	0.036	0.032	0.046
Leu	0.042	0.072	0.041	0.056	0.047	0.066
Lys	0.165	0.128	0.175	0.164	0.116	0.248
Pro	0.158	0.046	0.173	0.300	0.177	0.326
总和	1.501	3.014	1.316	1.572	1.142	1.494

— 未检出

— not detected

3 讨论

通过OPA-FMOC联用柱前衍生HPLC法很好地分离检测了血必净注射液中18种氨基酸,分离度良好,精密度和稳定性均满足定量要求,绝大多数氨基酸的重现性良好。本实验所建立的HPLC分析方法对氨基酸的检测选择性好,可用于血必净注射液中氨基酸的检测及其质量控制。

由样品测定结果可知:在游离氨基酸中Ala较多;在总氨基酸的测定中,由于酸的水解作用,注射液样品经酸水解后氨基酸的量和种类均有不同程度的增加,说明注射液中有一定量的结合氨基酸存在,其中Glu的量增加显著。另外,注射液经酸水解后,图谱中除氨基酸的峰外,其他峰较水解前显著减少。但也有少数几种氨基酸的量在水解后反而减少,如天冬酰胺在酸性条件下,酰胺键断裂而形成羧基;色氨酸含有吲哚基团,吲哚在强酸性条件下不稳定,其氮原子易被质子化,从而破坏了吲哚原有的芳香结构,稳定性下降,易发生开环、聚合、氧化等副反应,从而使其量减少。

按照《国家中药注射液安全再评价标准》的规定:“多成分制成的注射剂,所测成分应大于总固体量的80%;而经质量研究明确结构的成分,应当在指纹图谱中得到体现,一般不低于已明确成分的90%”。血必净注射液中含有多种氨基酸,质量分数约占总固体的13%,因此测定其中氨基酸的量势在必行。当前中药注射液的不良反应中以过敏反应最为明显,引起过敏的异体蛋白可能和其中所含结合氨基酸有关^[8]。本实验中氨基酸类成分研究可为更

好地探究中药注射液的物质基础提供依据,以期达到临床安全用药的目的。

参考文献

- [1] 胡 晶, 商洪才, 李 晶, 等. 血必净注射液治疗脓毒症的系统评价 [J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(1): 9-12.
- [2] 赵志伟, 雷 晋, 成 剑, 等. 血必净注射液对烧伤脓毒症患者脏器功能的影响 [J]. 中国医药与临床, 2010, 10(2): 202-203.
- [3] 明自强, 俞林明, 吕银翔, 等. 血必净注射液对脓毒症患者凝血功能的影响 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(1): 40-41.
- [4] Herbert P, Cabrita M J, Ratola N, *et al.* Relationship between biogenic amines and free amino acid contents of wines and musts from Alentejo (Portugal) [J]. *J Environ Sci Health B*, 2006, 41(7): 1171-1186.
- [5] 尤进茂, 樊兴君, 欧庆瑜, 等. 氨基酸柱前衍生化的3种新荧光试剂的光谱特性及高效液相色谱研究 [J]. 分析化学, 1998, 26(10): 1196-1200.
- [6] 王 棘, 毕开顺. 柱前衍生-异硫氰酸苯酯法测定宁心宝胶囊中水解氨基酸 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1027-1029.
- [7] Furst P, Pollack L, Graser T A, *et al.* Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials [J]. *J Chromatogr*, 1990, 499: 557-569.
- [8] 郭 青, 吴晓燕, 史清水, 等. 中药注射剂质量评价的有关研究思路、方法和建议 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 351-360.

中草药杂志社4种期刊为允许刊载处方药广告的

第一批医药专业媒体

据国家食品药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》、*Chinese Herbal Medicines (CHM)*、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。