

疏血通注射液中游离氨基酸的UPLC指纹图谱研究

尹艳微¹, 姚广哲¹, 马文娟¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何俊^{1*}

1. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 301617

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立疏血通注射液中游离氨基酸的UPLC指纹图谱分析方法。**方法** 采用异硫氰酸苯酯(PITC)衍生化方法, 使用Waters Acquity超高效液相色谱仪, 以CORTECS® C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm), 乙腈-0.1%甲酸水进行梯度洗脱, 体积流量为0.1 mL/min, 柱温为25℃, 进样量为2 μL, 检测波长为254 nm。**结果** 33批不同批次疏血通注射液中有28个共有峰, 其中有15个已知峰, 分别为组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe), 不同批次的样品与标准指纹图谱相似度均在0.994以上。**结论** 本实验建立的UPLC指纹图谱分析方法稳定、精密度高, 可应用于疏血通注射液的质量控制和评价。

关键词: 疏血通注射液; 氨基酸; 超高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)07-1350-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.016

Study on UPLC fingerprint of free amino acid in Shuxuetong Injection

YIN Yanwei¹, YAO Guangzhe¹, MA Wenjuan¹, OUYANG Huizi², CHANG Yanxu¹, HE Jun¹

1. Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a UPLC fingerprint analysis method for free amino acids in Shuxuetong Injection. **Methods** Using phenyl isothiocyanate (PITC) derivatization method, using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph, gradient elution with CORTECS® C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, 1.6 μm) in acetonitrile-0.1% formic acid water, the flow rate is 0.1 mL/min, column temperature is 25 °C, the injection volume is 2 μL, and the detection wavelength is 254 nm. **Results** There are 28 common peaks in 33 batches of different batches of Shuxuetong Injection, including 15 known peaks, namely histidine (His), arginine (Arg), serine (Ser), glycine (Gly), glutamic acid (Glu), aspartic acid (Asp), threonine (Thr), proline (Pro), alanine (Ala), tyrosine (Tyr), methionine (Met), valine (Val), leucine (Leu), lysine (Lys), phenylalanine (Phe), the similarity of samples and standard fingerprints of different batches are above 0.994. **Conclusion** The UPLC fingerprint analysis method established in this experiment is stable and has high precision. It can be applied to the quality control and evaluation of Shuxuetong Injection.

Key words: Shuxuetong Injection; amino acid; UPLC; fingerprint

疏血通注射液由水蛭、地龙2味中药经现代工艺提取有效成分精制而成, 临床用于治疗血栓性心、脑血管疾病^[1-2]。水蛭、地龙均为常用中药, 传统中医认为, 水蛭性味咸、苦、平, 具有破血、逐瘀、通经的功效; 地龙性味咸、寒, 具有平肝息风、通络利尿的功效, 两者配伍可增强破血逐瘀的功效。作为

活血化瘀类中药注射剂中常用的一种注射液, 疏血通注射液疗效确切, 受到广泛认可, 临床应用范围不断扩大。现代研究表明^[3-4], 疏血通注射液具有抗凝、溶栓、抗血小板聚集等作用^[5]。但疏血通注射液成分复杂, 主要化学成分除了核苷酸及微量元素外, 还含有多种氨基酸。

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673824, 81503457)

第一作者: 尹艳微(1991—), 女, 硕士研究生, 河北沧州人, 研究方向为中药学。Tel: 15222887562 E-mail: Yinyw8739@163.com

*通信作者: 何俊(1981—), 男, 副研究员, 吉林通化人, 研究方向为药物分析。Tel: (022)59596163 E-mail: hejun673@163.com

中药指纹图谱是能够代表该中药材或中成药特征共有峰的图谱,是一种全面评价中药材或中成药质量的手段,根据图谱的整体信息,反应中药材或中成药的整体特点,并对其内在质量做出整体性的评价。关于利用柱前衍生化法建立氨基酸指纹图谱对中药进行质量评价的方法已有报道^[6-7],本研究根据指纹图谱技术要求,针对疏血通注射液中游离氨基酸,采用异硫氰酸苯酯(PITC)衍生化方法,建立不同批次的疏血通注射液中游离氨基酸的UPLC指纹图谱,为疏血通注射液的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有在线脱气机、二元泵、恒温自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(PAD);AX 205 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Milli-Q 超纯水制备仪(Millipore 公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 试剂

组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe)均购自中国食品药品检定研究院(批号均为 140624-200805);不同批次疏血通注射液购自牡丹江友搏药业有限责任公司,共 33 个批次;异硫氰酸苯酯(色谱纯)、三乙胺(色谱纯)、正己烷(色谱纯)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈(色谱纯)均购自美国 Fisher 公司,甲酸(色谱纯)购自美国 ROE 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:CORTECS® C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm);流动相:A 相 0.1% 甲酸水,B 相乙腈;梯度洗脱,洗脱梯度为:0~6 min, 5%~20% B; 6~14 min, 20%~25% B; 14~16 min, 25%~25% B; 16~19 min, 25%~38% B; 19~28 min, 38%~38% B; 28~40 min, 38%~65% B; 40~41 min, 65%~5% B, 体积流量为 0.1 mL/min;柱温 25 °C;进样量 2 μL;检测波长 254 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 衍生化试剂溶液的制备 取异硫氰酸苯酯 10 mL,置 50 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,即得

衍生化试剂 A(异硫氰酸苯酯试剂储备液);取三乙胺 10 mL,置 50 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,即得衍生化试剂 B(三乙胺试剂储备液)。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取酪氨酸(Tyr)对照品 5.00 mg,加水定容至 50 mL,配制成 100 μg/mL 的储备液;精密称取组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)对照品 5.00 mg,加水定容至 5 mL,配制成 1 mg/mL 的储备液;甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)甲缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)对照品 10.00 mg,加水定容至 5 mL,配制成 2 mg/mL 的储备液 4 °C 冰箱储存备用。

2.2.3 样品溶液的制备 准备不同批次疏血通注射液,用超纯水稀释 2 倍,4 °C 冰箱储存备用。不同批次疏血通注射液见表 1。

表 1 不同批次疏血通注射液

Table 1 Different batches of Shuxuetong injection

批次	批号	批次	批号
1	17010211	18	17092121
2	17032311	19	17092222
3	17032812	20	17092611
4	17033024	21	17092711
5	17040421	22	17092811
6	17040511	23	17102311
7	17040613	24	17102711
8	17040711	25	17102811
9	17040911	26	17102911
10	17041821	27	17110111
11	17042021	28	17110311
12	17042121	29	17110511
13	17050711	30	17110611
14	17051312	31	17110711
15	17051411	32	17110811
16	17051611	33	17111021
17	17052711		

2.2.4 空白对照品溶液的制备 以超纯水作为空白对照品溶液,4 °C 冰箱储存备用。

2.2.5 衍生化方法 精密吸取样品溶液、对照品溶液和空白溶液 1 mL 于 10 mL 离心管中,依次加入衍生化试剂 A 和衍生化试剂 B 各 250 μL,漩涡混合 3 min,室温下放置 1 h,后加入 2 mL 正己烷,漩涡振荡 3 min,静置,萃取完全后,弃去上层溶液,下层溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,等待进样分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取1 mL 疏血通注射液(样品16),按“2.2.4”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件连续进样6次,进样量为2 μ L,记录共有色谱峰保留时间及峰面积,计算其RSD值,结果见表2,表明该方法精密度较好。

2.3.2 重复性实验 精密吸取1 mL 疏血通注射液(样品16)6份,按“2.2.4”项下制备供试品溶液,按上述液相条件进样2 μ L,测得各共有色谱峰相对保留时间及峰面积,计算其RSD值,结果见表2,表明

该方法重复性较好。

2.3.3 稳定性实验 精密吸取1 mL 疏血通注射液(样品16),按“2.2.4”项下制备供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h进样2 μ L,记录共有色谱峰保留时间及峰面积,考察室温条件下样品的稳定性,计算其RSD值,结果见表2,表明样品在室温下放置12 h稳定。

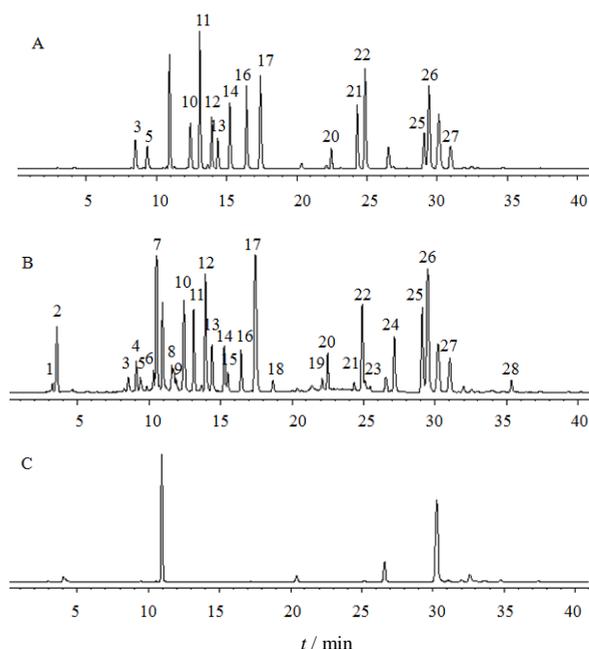
2.4 指纹图谱的建立及相似度分析

分别精密吸取对照品溶液、疏血通注射液(样品16)、空白对照品溶液1 mL,按照按“2.2.4”项方法制备供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件分别测定,记录UPLC图谱,见图1。分别取33个不同批次的疏血通注射液1 mL,按“2.2.4”项方法制备供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件分别测定,得到不同批次的疏血通注射液UPLC指纹图谱,并以丙氨酸(Ala)作为参照峰,使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2.0版,国家药典委员会,2010)对33个不同批次

表2 疏血通注射液中游离氨基酸指纹图谱的精密度、稳定性、重复性结果($n=6$)

Table 2 Precision, stability, and reproducibility results of free amino acid fingerprints of Shuxuetong Injection ($n=6$)

峰号	精密度RSD/%		重复性RSD/%		稳定性RSD/%	
	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
1	0.06	3.34	0.10	3.47	0.17	4.21
2	0.12	4.40	0.10	2.36	0.10	2.85
3	0.18	2.80	0.24	4.76	0.23	4.69
4	0.20	3.20	0.21	1.71	0.20	4.23
5	0.16	4.87	0.19	4.28	0.14	2.55
6	0.16	6.15	0.19	6.15	0.20	4.72
7	0.18	4.62	0.17	4.42	0.19	1.50
8	0.15	5.20	0.16	3.31	0.20	4.71
9	0.22	5.20	0.25	5.00	0.27	7.21
10	0.26	2.35	0.32	4.23	0.31	2.52
11	0.26	3.03	0.29	4.42	0.33	4.88
12	0.28	1.99	0.32	3.92	0.37	1.92
13	0.33	2.57	0.36	5.04	0.41	2.63
14	0.23	2.44	0.33	4.63	0.31	2.68
15	0.23	5.10	0.27	4.30	0.31	4.59
16	0.20	3.30	0.25	4.56	0.28	6.14
17	0.26	1.62	0.27	2.44	0.36	1.86
18	0.24	4.88	0.29	4.32	0.32	4.12
19	0.11	4.22	0.13	4.42	0.15	7.57
20	0.12	4.19	0.13	4.48	0.15	3.27
21	0.13	5.63	0.15	7.08	0.16	5.83
22	0.12	2.06	0.15	5.08	0.14	4.27
23	0.17	6.26	0.19	6.24	0.20	5.10
24	0.18	3.23	0.21	4.56	0.20	4.45
25	0.15	3.31	0.19	4.54	0.17	3.71
26	0.20	2.39	0.25	3.93	0.22	2.26
27	0.23	4.23	0.26	4.50	0.25	4.77
28	0.13	5.37	0.13	5.97	0.15	4.70



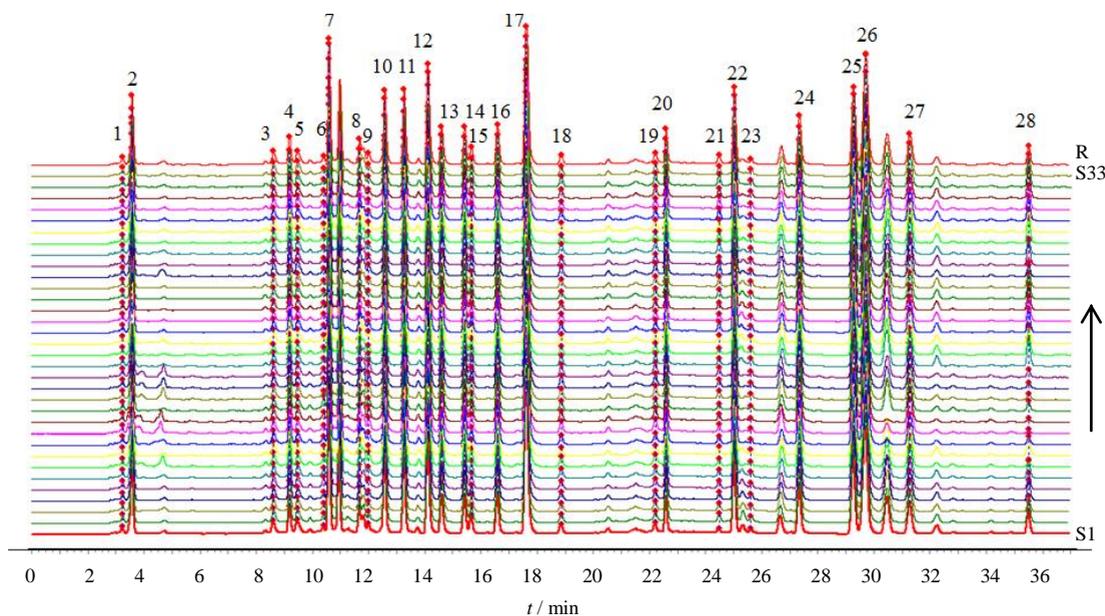
3-组氨酸(His);5-精氨酸(Arg);10-丝氨酸(Ser);11-甘氨酸(Gly);
12-谷氨酸(Glu);13-天冬氨酸(Asp);14-苏氨酸(Thr);16-脯氨酸(Pro);17-丙氨酸(Ala);20-酪氨酸(Tyr);21-甲硫氨酸(Met);22-缬氨酸(Val);25-亮氨酸(Leu);26-赖氨酸(Lys);27-苯丙氨酸(Phe)
3- histidine (His); 5- arginine (Arg); 10- serine (Ser); 11- glycine (Gly); 12- glutamic acid (Glu); 13- aspartic acid (Asp); 14- threonine (Thr); 16- proline (Pro); 17- alanine (Ala); 20- tyrosine (Tyr); 21- methionine (Met); 22- valine (Val); 25- leucine (Leu); 26- lysine (Lys); 27- phenylalanine (Phe)

图1 混合对照品(A)、疏血通注射液样品(B)和空白对照UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of mixed reference (A), Shuxuetong injection sample (B), and blank control (C)

的疏血通注射液的实验数据进行分析,以S1为参照色谱图,得到33个不同批次的疏血通注射液特征图谱,见图2,从该软件分析得出这33个不同批次的疏血通注射液有28个共有峰,标定出15个已知峰,分别为组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe)。33个不同批次的疏血通注射液相似度分析结果见表3。

酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、苯丙氨酸(Phe)。33个不同批次的疏血通注射液相似度分析结果见表3。



3-组氨酸(His);5-精氨酸(Arg);10-丝氨酸(Ser);11-甘氨酸(Gly);12-谷氨酸(Glu);13-天冬氨酸(Asp);14-苏氨酸(Thr);16-脯氨酸(Pro);17-丙氨酸(Ala);20-酪氨酸(Tyr);21-甲硫氨酸(Met);22-缬氨酸(Val);25-亮氨酸(Leu);26-赖氨酸(Lys);27-苯丙氨酸(Phe)
3- histidine (His); 5- arginine (Arg); 10- serine (Ser); 11- glycine (Gly); 12- glutamic acid (Glu); 13- aspartic acid (Asp); 14- threonine (Thr); 16- proline (Pro); 17- alanine (Ala); 20- tyrosine (Tyr); 21- methionine (Met); 22- valine (Val); 25- leucine (Leu); 26- lysine (Lys); 27- phenylalanine (Phe)

图2 33个不同批次的疏血通注射液UPLC指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of 33 different batches of Shuxuetong Injection

表3 33个不同批次的疏血通注射液相似度分析结果

Table 3 Similarity analysis results of 33 different batches of Shuxuetong Injection

批次	相似度	批次	相似度	批次	相似度
1	1	12	0.998	23	0.999
2	0.999	13	0.998	24	0.999
3	1	14	0.997	25	0.999
4	0.999	15	0.997	26	0.999
5	0.998	16	0.999	27	0.999
6	0.999	17	0.999	28	1
7	0.998	18	1	29	0.999
8	0.999	19	1	30	0.999
9	0.998	20	0.997	31	0.998
10	0.994	21	0.997	32	0.999
11	0.995	22	0.998	33	1

3 讨论

天然存在的氨基酸有很多种,但大多数氨基酸

没有紫外吸收。采用衍生化方法对样品进行处理,不需要氨基酸专用分析柱分离,即可使用紫外检测器进行检测。目前,氨基酸柱前衍生化的方法主要有2,4-二硝基氟苯(DNFB)衍生化方法、异硫氰酸苯酯(PITC)衍生化方法及邻苯二甲醛(OPA)-氯甲酸苄基酯(FMOC)衍生化方法等^[8-10]。DNFB柱前衍生化方法检测氨基酸,对色谱柱的要求较高,易降低色谱柱的柱效,损坏色谱柱,而且衍生化试剂的水解产物对丝氨酸的测定产生一定的影响;OPA-FMOC衍生氨基酸分析测定方法中,中间产物OPA-氨基酸的稳定性较差。本研究采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生化法,建立疏血通注射液中游离氨基酸的UPLC指纹图谱,不用使用氮气使其混合,室温下放置就可以反应完全,操作简便,而且紫外检测器254 nm波长下便可检测。实验结果显示,血通注射液UPLC指纹图谱中共有28个共有峰,标定出15种氨基酸,且相似度大于0.994。本研究可为疏血通注射液的质量控制与评价提供参考依据。

参考文献

- [1] 汪立明, 朱守非. 疏血通注射液在急性脑梗死临床治疗中的应用进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(1): 100-102.
- [2] 侯珊珊. 疏血通注射液的临床应用进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(44): 4217-4219.
- [3] 于福恩, 杨淑珍, 王振才, 等. 疏血通治疗脑梗死及其对血流动力学、血凝及纤溶系统影响的临床研究 [J]. 中国综合临床, 2003, 19(8): 695-696.
- [4] 邹耀兵, 江思德, 唐明山, 等. 疏血通注射液治疗短暂性脑缺血临床观察 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(7): 83-84, 90.
- [5] 赵静, 李艳, 李紫薇. 疏血通注射液的药理作用与临床应用进展 [J]. 北方药学, 2015, 12(12): 91-93.
- [6] 柯雪红, 孙维广, 姚江雄, 等. 夏桑菊颗粒氨基酸类成分指纹图谱的研究 [J]. 中成药, 2007, 29(6): 781-784.
- [7] 詹云丽, 黄璐敏, 黄丹莹, 等. 广地龙药材氨基酸类成分指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2009, 32(9): 1350-1353.
- [8] 黄蕴芝, 祁龙凯, 林励, 等. 蜂蜜中氨基酸类成分高效液相指纹图谱研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(4): 745-750, 758.
- [9] 何新荣, 古今, 朱旻, 等. 雌、雄地鳖中17种氨基酸的含量测定及指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2607-2611.
- [10] 赵祎武, 张宏达, 谢雪, 等. 柱前衍生化HPLC法测定注射用芪红脉通中氨基酸 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(5): 1080-1084.