

金振口服液氨基酸特征指纹图谱及 29 种氨基酸同时定量的质量控制方法研究

李海波¹, 杨 群⁴, 区伟珍³, 王团结¹, 曹 亮¹, 王振中¹, 姚新生², 于 洋^{2*}, 肖 伟^{1*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 51063

3. 华南农业大学, 广东 广州 510642

4. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘 要:目的 氨基酸自动分析仪建立金振口服液(JOL)氨基酸特征指纹图谱及 29 种氨基酸(磷酸丝氨酸、牛磺酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、肌氨酸、甘氨酸、丙氨酸、瓜氨酸、 α -氨基丁酸、缬氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、 β -丙氨酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、3-甲基组氨酸、精氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸)同时定量的分析方法。方法 采用日立 855-4507 型离子交换色谱柱(60 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m);检测波长分别为 570、440 nm;流动洗脱泵体积流量 0.35 mL/min;衍生泵体积流量 0.30 mL/min;反应柱温 135 $^{\circ}$ C;以柠檬酸缓冲溶液为流动相进行梯度洗脱,建立 JOL 氨基酸特征指纹图谱,对 29 个主要特征峰进行化学成分指认,运用中药指纹图谱相似度软件对 16 批市售制剂进行相似度评价,同时对 29 种氨基酸进行含量测定。结果 建立了 JOL 氨基酸特征指纹图谱结合 29 种氨基酸同时定量的方法;16 批市售制剂的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度值在 0.989~1.000;29 种定量成分线性关系良好($R^2=1.000$),且平均回收率为 95.71%~101.87%;16 批市售制剂 29 种氨基酸的质量浓度分别为磷酸丝氨酸 15.457 2~29.362 4 μ g/mL、牛磺酸 64.423 4~114.238 6 μ g/mL、天冬氨酸 19.056 4~32.549 0 μ g/mL、苏氨酸 6.704 8~7.841 8 μ g/mL、丝氨酸 22.609 4~39.382 8 μ g/mL、天冬酰胺 61.134 0~115.456 0 μ g/mL、谷氨酸 32.254 6~63.127 2 μ g/mL、谷氨酰胺 5.223 8~8.953 2 μ g/mL、肌氨酸 4.081 0~44.007 6 μ g/mL、甘氨酸 12.403 0~23.516 4 μ g/mL、丙氨酸 33.876 8~44.257 4 μ g/mL、瓜氨酸 3.514 2~9.881 0 μ g/mL、 α -氨基丁酸 1.126 4~2.287 8 μ g/mL、缬氨酸 11.584 6~15.469 0 μ g/mL、胱氨酸 1.660 2~4.041 8 μ g/mL、异亮氨酸 4.087 8~5.469 2 μ g/mL、亮氨酸 8.295 2~11.724 0 μ g/mL、酪氨酸 7.492 6~10.761 2 μ g/mL、苯丙氨酸 4.856 4~9.248 0 μ g/mL、 β -丙氨酸 2.309 4~6.782 6 μ g/mL、 β -氨基丁酸 0.175 0~14.790 6 μ g/mL、 γ -氨基丁酸 17.654 4~26.621 8 μ g/mL、鸟氨酸 42.338 4~58.172 6 μ g/mL、赖氨酸 12.994 9~28.498 0 μ g/mL、组氨酸 1.802 6~4.067 4 μ g/mL、3-甲基组氨酸 2.608 4~4.384 0 μ g/mL、精氨酸 107.141 6~301.649 8 μ g/mL、羟脯氨酸 15.811 6~37.807 6 μ g/mL、脯氨酸 143.714 6~243.956 6 μ g/mL。结论 氨基酸自动分析仪法测定 JOL 中氨基酸具有重现性好、结果可靠的优点;且 JOL 中氨基酸类成分定性定量研究在一定程度上明确了君药山羊角对制剂组方的成分贡献,为构建 JOL 全方位质量评价体系提供了有益补充。

关键词:金振口服液;氨基酸自动分析仪;氨基酸特征指纹图谱;磷酸丝氨酸;牛磺酸;天冬氨酸;苏氨酸;丝氨酸;天冬酰胺;谷氨酸;谷氨酰胺;肌氨酸;甘氨酸;丙氨酸;瓜氨酸; α -氨基丁酸;缬氨酸;胱氨酸;异亮氨酸;亮氨酸;酪氨酸;苯丙氨酸; β -丙氨酸; β -氨基丁酸; γ -氨基丁酸;鸟氨酸;赖氨酸;组氨酸;3-甲基组氨酸;精氨酸;羟脯氨酸;脯氨酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-5972-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.009

Quality control of Jinzhen Oral Liquid based on amino acids fingerprint and simultaneous determination of 29 amino acids

LI Hai-bo¹, YANG Qun⁴, QU Wei-zhen³, WANG Tuan-jie¹, CAO Liang¹, WANG Zhen-zhong¹, YAO Xin-sheng², YU Yang², XIAO Wei¹

收稿日期: 2020-06-19

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81630097);现代中药创新集群与数字制药技术平台“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

作者简介: 李海波,女,福建省宁德市人,高级工程师,博士,研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: lihaibo1985124@sina.com

*通信作者 于 洋,副研究员,硕士生导师,研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: (020) 85225849 E-mail: 1018yuyang@163.com

肖 伟,研究员级高级工程师,博士生导师,研究方向为中药新剂型的研究与开发。

Tel: (0518) 85521956 E-mail: xw_kanion@163.com

1. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China
3. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
4. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the amino acids fingerprint of Jinzhen Oral Liquid (JOL) and simultaneous determination of 29 amino acids (P-Ser, Tau, Asp, Thr, Ser, Asn, Glu, Gln, Sar, Gly, Ala, Cit, α -ABA, Val, Cys, Ile, Leu, Tyr, Phe, β -Ala, β -AiBA, γ -ABA, Orn, Lys, His, 3-Mehis, Arg, Hypro, Pro) by automatic amino acid analyzer. **Methods** The separation was developed on HITACHI HPLC PACKED column (60 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m) by gradient elution with citric acid buffer solution at 570 and 440 nm, reaction column temperature was maintained at 115 $^{\circ}$ C and the carrier gas flow rate was 0.35 mL/min and flow rate of derivative pump was 0.30 mL/min. An amino acid fingerprint of JOL was set up, and 16 batches of JOL were evaluated by similarity assay. Furthermore, the contents of the main 29 amino acids were determined. **Results** The amino acid fingerprint of JOL was established with good separation, and 29 amino acids were determined simultaneously. The similarity of 16 batches of JOL was about 0.989 to 1.000. Moreover, good linear relationships were found ($R^2 = 1.000$), and the average recovery rates were 95.71%—101.87%, the content range of quantitative components in 16 batches of JOL was as following: P-Ser 15.457 2—29.362 4 μ g/mL, Tau 64.423 4—114.238 6 μ g/mL, Asp 19.056 4—32.549 0 μ g/mL, Thr 6.704 8—7.841 8 μ g/mL, Ser 22.609 4—39.382 8 μ g/mL, Asn 61.134 0—115.456 0 μ g/mL, Glu 32.254 6—63.127 2 μ g/mL, Gln 5.223 8—8.953 2 μ g/mL, Sar 4.081 0—44.007 6 μ g/mL, Gly 12.403 0—23.516 4 μ g/mL, Ala 33.876 8—44.257 4 μ g/mL, Cit 3.514 2—9.881 0 μ g/mL, α -ABA 1.126 4—2.287 8 μ g/mL, Val 11.584 6—15.469 0 μ g/mL, Cys 1.660 2—4.041 8 μ g/mL, Ile 4.087 8—5.469 2 μ g/mL, Leu 8.295 2—11.724 0 μ g/mL, Tyr 7.492 6—10.761 2 μ g/mL, Phe 4.856 4—9.248 0 μ g/mL, β -Ala 2.309 4—6.782 6 μ g/mL, β -AiBA 0.175 0—14.790 6 μ g/mL, γ -ABA 17.654 4—26.621 8 μ g/mL, Orn 42.338 4—58.172 6 μ g/mL, Lys 12.994 9—28.498 0 μ g/mL, His 1.802 6—4.067 4 μ g/mL, 3-Mehis 2.608 4—4.384 0 μ g/mL, Arg 107.141 6—301.649 8 μ g/mL, Hypro 15.811 6—37.807 6 μ g/mL, Pro 143.714 6—243.956 6 μ g/mL. **Conclusion** The method for the determination and analysis of amino acids in JOL by automatic amino acid analyzer has the advantages of good reproducibility, reliable results, and the qualitative and quantitative study of amino acids in JOL has clarified the contribution of *Caprae hircus cornu's* horn to the composition of preparation to a certain extent, which provides a useful supplement for the construction of the quality evaluation system of JOL.

Key words: Jinzhen Oral Liquid; amino acid automatic analyzer; amino acid fingerprint; P-Ser; Tau; Asp; Thr; Ser; Asn; Glu; Gln; Sar; Gly; Ala; Cit; α -ABA; Val; Cys; Ile; Leu; Tyr; Phe; β -Ala; β -AiBA; γ -ABA; Orn; Lys; His; 3-Mehis; Arg; Hypro; Pro

金振口服液 (Jinzhen Oral Liquid, JOL) 为江苏康缘药业股份有限公司独家产品, 收载于《中国药典》2015 年版一部, 由山羊角、黄芩、平贝母、甘草、大黄、石膏、人工牛黄及青礞石 8 味中药配伍而成, 具有清热解毒、祛痰止咳之功^[1]。临床上主要用于治疗小儿急性支气管炎^[2-5]、手足口病^[6-8]、肺炎^[9]和流感^[10-11]等。其疗效确切、安全性好、依从性高, 是我国儿童医疗保险品种, 被誉为治疗小儿肺热咳嗽的妙药。

目前 JOL 的质量标准偏低: 现行《中国药典》2015 年版采用 HPLC 对单一指标黄芩苷进行含量测定 (不少于 0.25 mg/mL) 来控制制剂质量^[1]。刘晓秋等^[12]对药典方法进行优化, 除黄芩苷以外, 增加了另一个指标成分甘草酸的含量测定。含量测定方面, 曹云飞等^[13]利用 HPLC 测定 JOL 中大黄素和大黄酚的含量。杨智慧等^[14]利用 HPLC 对 JOL 中的黄

芩苷、甘草酸、大黄素、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素 6 个成分进行含量测定。指纹图谱方面, 胡军华等^[15]建立了 JOL 的 HPLC-UV 指纹图谱, 标定 17 个共有峰, 但是仅明确指认了 1 个色谱峰。

基于以上文献调研, 课题组前期建立了 JOL 的高效液相色谱-紫外真空波-蒸发光散射检测器 (HPLC-UV-ELSD) 特征指纹图谱, 结合 13 个主要代表性成分同时定量的方法, 对市售制剂进行整体质量控制^[16], 但是尚未能反映君药山羊角对制剂的成分贡献。因此, 为表征源于山羊角的氨基酸类成分, 本研究采用氨基酸自动分析仪建立 JOL 氨基酸特征指纹图谱, 对 29 个主要特征峰进行明确化学指认, 运用中药指纹图谱相似度软件对 16 批市售制剂进行相似度评价, 同时对 29 种氨基酸进行含量测定。多批次市售制剂质量评价结果显示, JOL 中氨基酸总含量平均值为 1 014.375 μ g/mL, 约占固含物

的 0.65%。氨基酸类成分定性定量研究在一定程度上明确了动物药材山羊角对制剂组方的成分贡献,为构建 JOL 全方位质量评价体系提供了有益补充。

1 仪器与材料

L-8900 氨基酸自动分析仪,日立 Hitachi 公司; SI-234 电子天平,美国 Denver 公司; P300H 超声波清洗器,德国 Elma 公司; Milli-Q 超纯水仪,美国密理博公司。

盐酸,优级纯,国药集团化学试剂有限公司; 茚三酮显色溶液套装、氨基酸混合标准溶液 B 型(批号 016-08641)、氨基酸混合标准品 AN-II 型(批号 015-14461)、L-天冬酰胺标准溶液(批号 016-14131),和光纯药株式会社;氨基酸分析仪配套缓冲溶液,三菱化学株式会社;5-磺基水杨酸二水合物,批号 S112086-100g,阿拉丁试剂(上海)有限公司;L-谷氨酰胺,批号 G3126,美国 Sigma 公司。

16 批市售 JOL 制剂,江苏康缘药业股份有限公司,批号 190228、190328、191026、191123、191124、191203、191204、191205、191206、191207、191208、191209、101210、191211、191212、191214,编号分别为 S1~S16。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为日立 855-4507 型离子交换色谱柱(60 mm×4.6 mm, 3 μm);流动相为柠檬酸锂缓冲溶液;检测器为紫外检测器;洗脱泵体积流量 0.35 mL/min;衍生泵体积流量 0.30 mL/min;反应柱温 135 °C(程序升温);检测波长 570、440 nm;进样量 20 μL;分析时长 148 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 按照氨基酸自动分析仪对样品的要求,进行样品前处理。取成品 2 mL,加入等体积 5%磺基水杨酸,在 4 °C 冰箱放置 24 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入等体积的 0.02 mol/mL HCl 稀释即为供试品溶液。

2.2.2 氨基酸标准溶液的制备 精密称取 L-谷氨酰胺对照品 36.535 mg,置 100 mL 量瓶中,加适量水,超声 5 min 使其溶解,用水定容至刻度,得 2.5 μmol/mL L-谷氨酰胺对照品储备液;精密移取氨基酸混合标准溶液 B 型、AN-II 型、L-天冬酰胺标准溶液和 L-谷氨酰胺对照品储备液各 400 μL,置 10 mL 量瓶中,加适量 0.02 mol/L 盐酸稀释,超声 5 min 使其混匀,用 0.02 mol/L 盐酸定容至刻度,得 100

nmol/mL 的氨基酸标准溶液,即为标准品溶液 1。

标准曲线溶液的配制:精密移取 6 mL 标准品溶液 1,以 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 mL,得含氨基酸标准品 60 nmol/mL 的标准品溶液 2;精密移取 5 mL 标准品溶液 2,以 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 mL,得含氨基酸标准品 30 nmol/mL 的标准品溶液 3;精密移取 2 mL 标准品溶液 1,以 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 mL,得含氨基酸标准品 20 nmol/mL 的标准品溶液 4;精密移取 5 mL 标准品溶液 3,以 0.02 mol/L 盐酸定容至 10 mL,得含氨基酸标准品 15 nmol/mL 的标准品溶液 5;精密移取 5 mL 标准品溶液 1,以 0.02 mol/L 盐酸定容至 100 mL,得含氨基酸标准品 5 nmol/mL 的标准品溶液 6。

2.3 特征图谱研究

2.3.1 JOL 氨基酸特征图谱的建立 16 批 JOL 分别按照“2.2.1”项方法制备 16 份供试品溶液,按“2.1”项分析条件依次进样检测,记录荧光色谱图。将生成的 16 批次色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 A 版)”,生成对照指纹图谱(R),并计算各批次 JOL 氨基酸指纹图谱的相似度值。结果显示,570 nm 下 16 批市售制剂指纹图谱之间的相似度在 0.989~1.000;440 nm 下 16 批市售制剂指纹图谱之间的相似度在 0.998~1.000,结果见图 1 和表 1,说明市售 JOL 各批次间氨基酸指纹图谱相似度良好、批间差异小、质量较稳定。

2.3.2 JOL 氨基酸指纹图谱色谱峰的指认 取批次为 S1 的 JOL,按“2.2.1”项方法制备供试品溶液,并按“2.2.2”项下方法制备混合氨基酸标准溶液,按“2.1”项分析条件依次进样检测,根据保留时间定性,将供试品溶液色谱图和对照品溶液色谱图进行对比分析,在 570 nm 下指认 27 个共有峰,在 440 nm 下指认了 2 个共有色谱峰;指认的色谱峰依次为 1 号峰磷酸丝氨酸(P-Ser)、2 号峰牛磺酸(Tau)、3 号峰天冬氨酸(Asp)、4 号峰苏氨酸(Thr)、5 号峰丝氨酸(Ser)、6 号峰天冬酰胺(Asn)、7 号峰谷氨酸(Glu)、8 号峰谷氨酰胺(Gln)、9 号峰肌氨酸(Sar)、10 号峰甘氨酸(Gly)、11 号峰丙氨酸(Ala)、12 号峰瓜氨酸(Cit)、13 号峰 α-氨基丁酸(α-ABA)、14 号色谱峰缬氨酸(Val)、15 号色谱峰胱氨酸(Cys)、16 号色谱峰异亮氨酸(Ile)、17 号色谱峰亮氨酸(Leu)、18 号色谱峰酪氨酸(Tyr)、19 号色谱峰苯丙氨酸(Phe)、20 号色谱峰 β-丙氨酸(β-Ala)、21 号色谱峰 β-氨基丁酸(β-AiBA)、22 号色谱峰 γ-

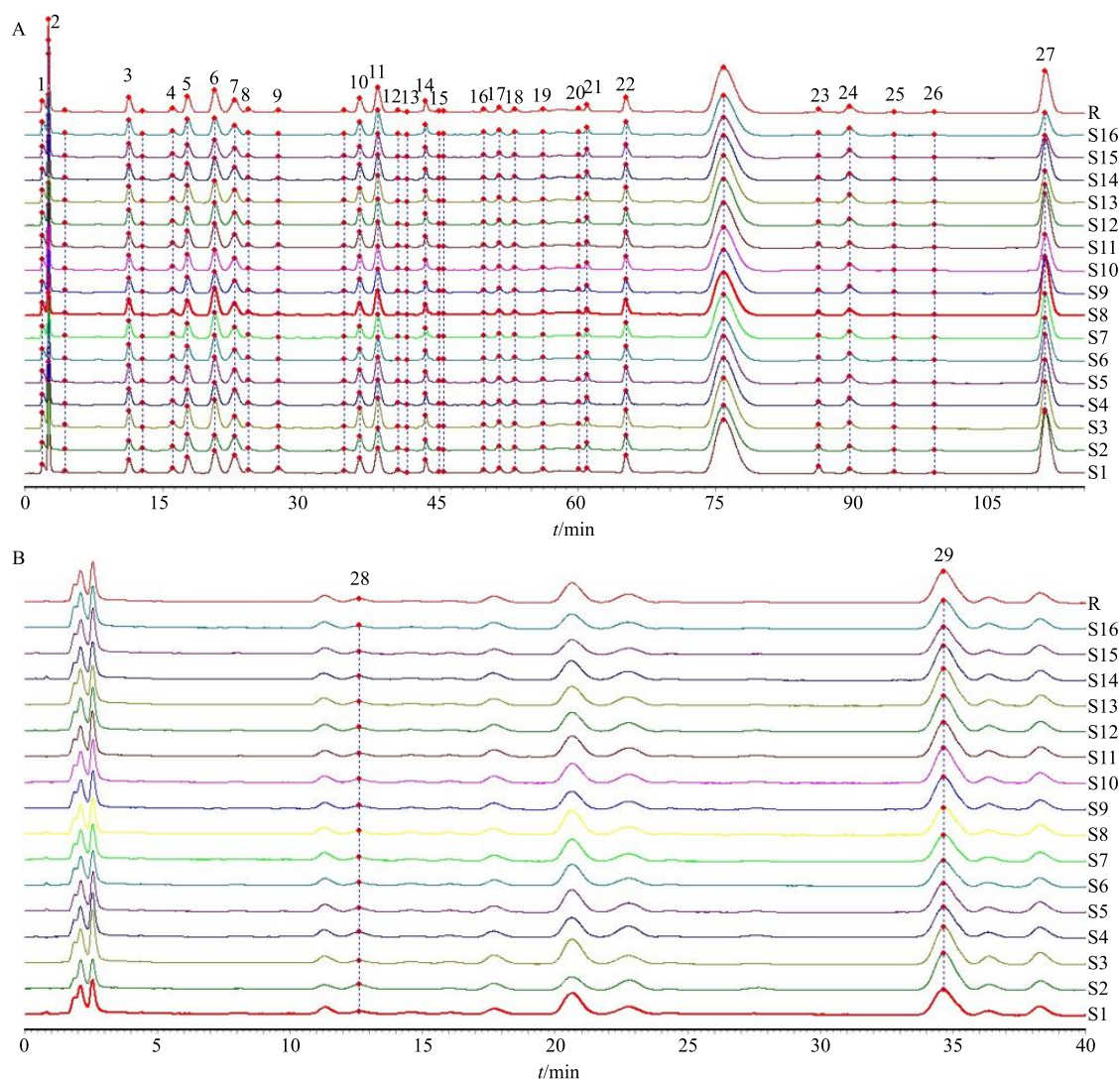


图 1 16 批市售 JOL 在 570 nm (A) 和 440 nm (B) 下氨基酸指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)
Fig. 1 Amino acids fingerprints at 570 nm (A) and 440 nm (B), and amino acids reference fingerprints (R) of JOL

表 1 16 批 JOL 氨基酸指纹图谱的相似度值
Table 1 Similarities of amino acids fingerprints of 16 batches of JOL

批号	相似度		批号	相似度	
	440 nm	570 nm		440 nm	570 nm
S1	0.999	0.989	S9	0.999	1.000
S2	0.999	0.998	S10	1.000	1.000
S3	0.999	0.998	S11	0.998	0.994
S4	0.999	0.999	S12	1.000	1.000
S5	0.999	0.998	S13	0.998	0.997
S6	0.999	0.998	S14	0.999	1.000
S7	0.998	0.998	S15	0.999	0.989
S8	0.999	0.996	S16	0.998	0.995

氨基丁酸 (γ -ABA)、23 号色谱峰鸟氨酸 (Orn)、24 号色谱峰赖氨酸 (Lys)、25 号色谱峰组氨酸

(His)、26 号色谱峰 3-甲基组氨酸 (3-Mehis)、27 号色谱峰精氨酸 (Arg)、28 号色谱峰羟脯氨酸 (Hypro)、29 号色谱峰脯氨酸 (Pro)，见图 2。

2.4 29 种氨基酸同时定量测定

2.4.1 专属性考察 取批号为 190228 的 JOL，按“2.2.1”制备供试品溶液，并取已配好的混合氨基酸标准溶液及空白试剂溶液，按“2.1”项分析条件依次进样检测，考察结果如图 3、4 所示，空白溶剂对定量氨基酸无干扰，将混合标溶液和供试品溶液对比，相邻的定量色谱峰之间无干扰，专属性良好。

2.4.2 线性关系及线性范围考察 按照“2.2.2”项下方法依次配制系列不同浓度的标准溶液，按“2.1”项分析条件依次进样检测，记录并分析定量成分的色谱峰面积。以氨基酸浓度为横坐标 (x)，色谱峰峰面积为纵坐标 (y)，对定量氨基酸成分进行线性

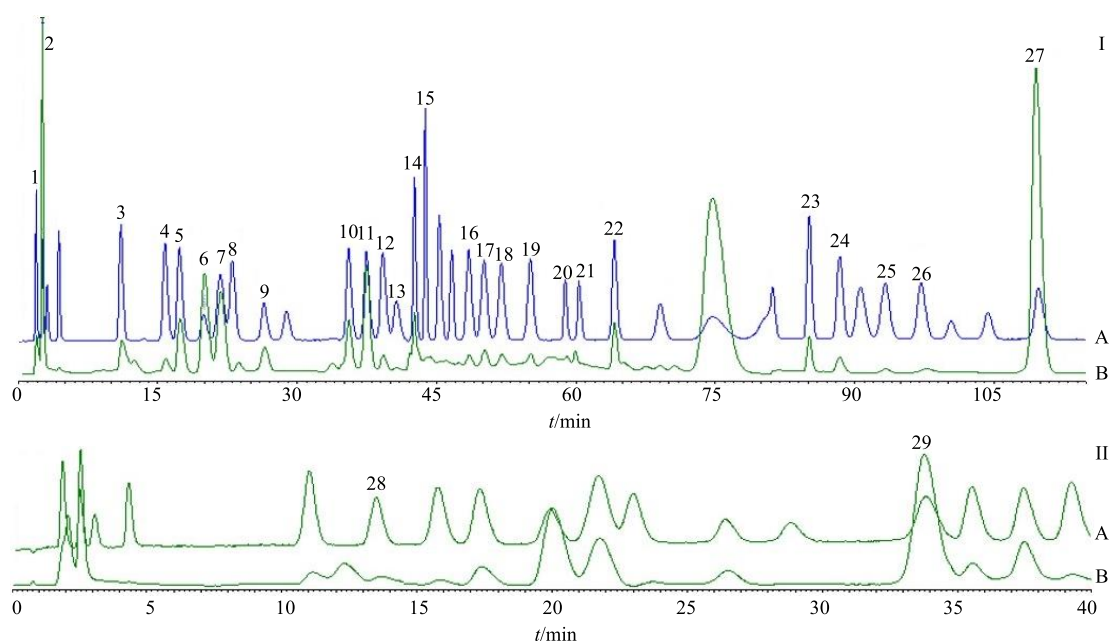


图 2 混合对照品溶液 (A) 及 JOL (B) 的 570 nm (I) 和 440 nm (II) 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of mixed reference substances (A) and JOL (B) at 570 nm (I) and 440 nm (II)

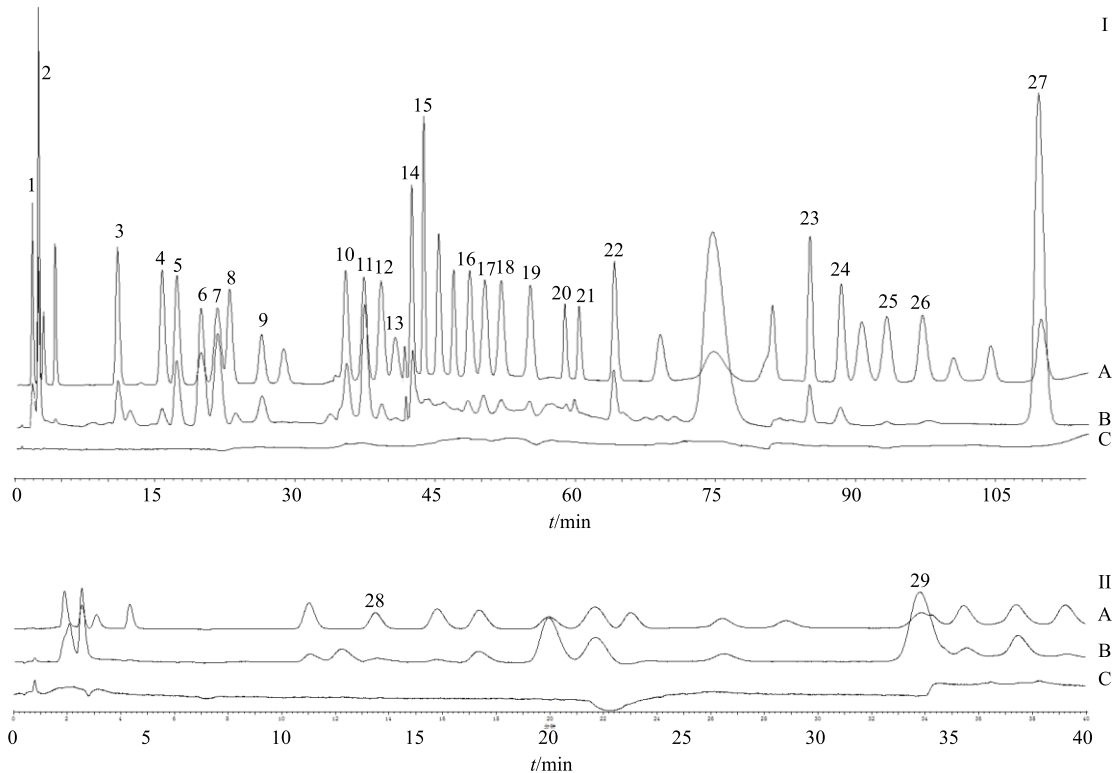


图 3 混合对照品 (A)、JOL 供试品 (B) 和空白溶液 (C) 在 570 nm (I) 和 440 nm (II) 下色谱图

Fig. 3 Chromatograms of mixed reference substances (A), JOL (B) and blank solution (C) at 570 nm (I) and 440 nm (II)

回归计算, 得到各定量氨基酸的回归方程、相关系数和线性范围。用最低浓度的氨基酸标准溶液, 以信噪比为 3 的浓度作为检测限, 以信噪比为 10 的浓度作为定量限。结果显示氨基酸定量成分在相对应的浓度范围内线性关系良好 (表 2)。

2.4.3 精密度考察 取 20 nmol/mL 的氨基酸标准溶液, 按“2.1”项下分析条件连续进样 6 针, 记录每个定量氨基酸成分峰面积, 计算峰面积的 RSD, 峰面积的 RSD 均不大于 2%, 表明该方法仪器精密度良好。

表 2 氨基酸定量成分的线性关系、检测限及定量限

Table 2 Linear relationship, detection limit and quantitative limit of amino acids quantitative components

氨基酸	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
P-Ser	$y=197\,437x-0.163$	1.000	0.428 5~9.255 0	3.7	12.4
Tau	$y=208\,391x-1.938\,6$	1.000	0.300 6~6.266 0	3.6	12.0
Asp	$y=254\,270x+254.64$	1.000	0.664 9~13.310 0	7.0	23.4
Thr	$y=300\,805x-1.377$	1.000	0.579 7~11.910 0	7.4	24.8
Ser	$y=338\,166x+1.395\,3$	1.000	0.518 3~10.510 0	6.9	22.8
Asn	$y=183\,723x+0.064\,9$	1.000	0.334 8~6.605 0	13.9	46.3
Glu	$y=233\,713x-0.438\,4$	1.000	0.571 6~14.710 0	12.6	41.9
Gln	$y=231\,390x-1.592\,6$	1.000	0.520 8~14.610 0	10.3	34.4
Sar	$y=79\,726x-11.811$	1.000	1.089 9~22.272 5	32.7	109.0
Gly	$y=475\,564x-520.93$	1.000	0.440 1~7.507 0	5.4	17.9
Ala	$y=406\,524x+0.043\,8$	1.000	0.445 2~8.909 0	6.3	21.0
Cit	$y=214\,534x+0.880\,3$	1.000	0.778 2~17.520 0	11.6	38.8
α -ABA	$y=361\,365x+1.672\,9$	1.000	0.176 0~5.155 0	7.1	23.6
Val	$y=309\,731x+0.411\,6$	1.000	0.614 9~11.710 0	4.7	15.6
Cys	$y=170\,855x-579.47$	1.000	1.180 8~24.030 0	6.9	23.0
Ile	$y=278\,658x-1.637\,2$	1.000	0.604 1~13.120 0	8.4	28.1
Leu	$y=276\,249x+2.095\,4$	1.000	0.616 9~13.120 0	9.4	31.3
Tyr	$y=194\,292x+37.82$	1.000	0.845 0~18.121 0	13.2	43.8
Phe	$y=211\,187x+0.148\,3$	1.000	0.887 5~16.520 0	14.0	46.7
β -Ala	$y=180\,412x+2.224\,8$	1.000	0.421 3~8.909 0	8.5	28.3
β -AiBA	$y=160\,784x-1.219\,9$	1.000	0.494 8~10.310 0	10.4	34.6
γ -ABA	$y=348\,819x+1.503\,8$	1.000	0.501 3~10.310 0	6.3	21.0
Orn	$y=319\,081x-0.551\,3$	1.000	0.635 2~13.220 0	6.6	22.0
Lys	$y=319\,081x-0.551\,3$	1.000	0.715 3~14.620 0	10.5	35.1
His	$y=239\,539x+2.293\,7$	1.000	0.758 6~15.520 0	16.2	54.0
3-Mehis	$y=209\,380x-0.885\,7$	1.000	0.906 6~16.920 0	19.1	63.6
Arg	$y=194\,442x-0.085\,7$	1.000	0.866 0~17.420 0	19.7	65.6
Hypro	$y=33\,918x-0.151\,9$	1.000	0.736 8~13.110 0	96.3	321.1
Pro	$y=58\,339x-0.036\,1$	1.000	0.797 5~11.510 0	80.1	266.9

2.4.4 重复性考察 按照“2.2.1”项方法平行配制 6 份的 S1 批次供试品溶液,按“2.1”项分析条件依次进样,记录每个定量氨基酸成分的峰面积,并计算峰面积的 RSD,结果均不大于 2%,表明该方法的仪器重复性良好。

2.4.5 稳定性考察 按照“2.2.1”项方法配制 1 份 S1 批次的供试品溶液,室温下放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h,按“2.1”项分析色谱条件依次进样,记录每个定量氨基酸成分的峰面积,并计算峰面积的 RSD,结果均不大于 2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 准确度考察 精密吸取已知氨基酸含量的 JOL (批号 190228) 9 份,每份 0.5 mL,按“2.2.1”项制备 9 份供试品溶液,在每 3 份的供试品溶液中分别加入混合对照品溶液 1 各 0.5、0.6、0.7 mL,按照“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,计算各定量成分的回收率、平均回收率及 RSD。各氨基酸的平均加样回收率为 95.71%~101.87%,RSD 均不大于 2.76%,说明该方法的准确度良好。

2.4.7 JOL 中氨基酸含量测定 取 16 批次 JOL 制剂按“2.2.1”项制备供试品溶液,按“2.1”项分析条件依次进样测定,结果见表 3、4。

表 3 16 批 JOL 中氨基酸成分的含量测定结果
Table 3 Contents of amino acids in 16 batches of JOL

样品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)														
	P-Ser	Tau	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Sar	Gly	Ala	Cit	α-ABA	Val	Cys
S1	17.632 0	101.713 0	25.582 6	8.451 6	29.504 4	89.716 6	63.127 2	7.850 0	44.077 6	17.497 6	37.661 6	9.881 0	1.542 8	15.469 0	4.041 8
S2	15.475 2	64.423 4	19.056 4	6.704 8	28.341 2	61.134 0	49.648 8	6.743 6	30.684 4	17.102 0	34.117 0	7.440 6	1.126 4	14.020 6	3.230 6
S3	29.362 4	114.238 6	32.494 2	9.188 0	39.382 8	115.456 0	41.950 8	8.953 2	8.089 6	23.516 4	44.257 4	4.986 4	2.287 8	14.744 6	2.445 2
S4	21.358 6	92.278 0	30.545 4	7.392 2	26.490 6	90.040 4	55.469 2	6.288 0	24.932 0	14.954 6	38.058 2	8.554 2	1.440 2	13.882 4	3.306 6
S5	22.858 2	83.349 4	32.549 0	7.841 8	27.877 8	102.188 3	46.542 2	7.694 0	14.571 8	15.571 8	38.363 6	6.065 0	1.510 6	13.473 2	3.576 8
S6	20.989 8	70.633 6	30.133 0	7.006 4	24.105 8	97.733 2	36.708 4	7.969 6	6.881 4	13.037 2	33.876 8	3.890 4	1.395 4	11.584 6	3.339 2
S7	21.605 4	74.169 0	31.364 8	7.332 2	25.485 8	100.894 3	37.931 8	7.944 4	7.085 4	13.904 8	35.191 4	3.977 4	1.490 2	12.137 0	3.409 2
S8	22.866 2	77.275 2	28.947 0	7.708 4	26.016 4	110.681 8	39.479 6	8.288 8	9.353 8	14.314 0	35.837 8	4.460 4	1.565 4	12.225 0	3.514 2
S9	21.188 6	80.216 2	27.320 4	7.091 0	27.960 0	82.621 8	40.794 8	6.055 8	15.455 4	15.894 0	34.925 8	4.697 4	1.421 0	12.445 6	2.713 4
S10	22.943 4	89.604 6	28.657 0	7.689 4	30.028 0	90.081 6	43.885 4	6.709 4	17.559 4	17.721 2	37.698 4	4.993 4	1.708 8	13.114 0	3.000 0
S11	23.588 4	96.580 6	25.810 8	7.859 8	30.520 4	96.296 0	44.823 2	6.653 6	21.411 0	18.285 6	37.549 2	5.304 6	1.800 8	12.757 4	1.660 2
S12	24.078 2	91.104 2	29.348 8	7.676 4	30.440 8	90.215 2	44.538 8	6.712 0	16.850 2	17.863 8	38.245 4	4.940 8	1.762 8	13.540 2	2.826 4
S13	25.088 2	79.819 4	31.572 6	7.615 4	30.358 6	88.174 2	44.785 0	6.791 0	14.220 6	17.407 6	39.537 0	4.913 8	1.790 8	13.935 2	3.172 4
S14	22.304 2	78.442 6	28.337 4	7.506 8	29.998 0	88.168 2	43.844 2	6.646 6	17.028 8	17.724 6	37.184 2	4.962 4	1.772 2	12.953 8	2.976 8
S15	22.131 0	94.439 6	26.938 6	6.454 0	22.609 4	68.509 4	32.254 6	5.223 8	4.081 0	12.403 0	34.320 0	3.514 2	1.355 8	11.931 4	2.782 6
S16	25.703 2	87.489 2	28.401 3	6.803 4	27.769 3	68.784 9	34.384 3	5.863 2	4.606 3	15.647 2	36.780 0	3.780 3	1.426 3	13.212 3	3.001 2

样品	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)														
	Ile	Leu	Tyr	Phe	β-Ala	β-AiBA	γ-ABA	Orn	Lys	His	3-Mehis	Arg	Hyp	Pro	
S1	5.469 2	9.736 0	9.809 2	8.962 4	6.782 6	8.733 2	26.014 8	58.172 6	12.994 9	3.912 6	3.254 9	301.649 8	37.807 6	243.956 6	
S2	4.742 4	8.775 4	8.288 0	9.248 0	6.726 6	13.862 8	21.982 3	48.760 2	13.942 3	2.473 0	2.773 8	200.843 2	32.361 1	207.861 7	
S3	5.407 4	11.724 0	10.761 2	7.401 6	3.079 2	1.236 4	26.621 8	53.361 2	18.263 4	3.632 4	3.954 8	232.294 1	16.432 4	208.162 4	
S4	4.778 6	8.694 8	8.976 4	6.155 4	3.460 8	13.395 6	21.653 4	51.063 2	24.701 1	3.332 0	4.384 0	229.271 8	33.210 4	168.913 4	
S5	4.681 2	9.202 2	9.075 0	6.230 8	3.405 6	13.153 2	21.354 1	50.451 1	24.253 8	3.812 4	4.163 9	240.323 9	24.051 3	163.254 9	
S6	4.087 8	8.295 2	8.008 0	6.214 0	3.283 6	13.297 6	19.453 9	44.583 9	22.953 7	3.493 5	3.134 9	211.134 9	15.932 4	143.714 6	
S7	4.250 4	8.623 6	8.270 4	5.281 8	3.290 8	12.027 8	20.436 9	46.574 6	22.971 4	3.621 8	3.534 8	222.400 9	18.100 5	149.351 8	
S8	4.405 4	8.944 8	8.570 8	5.753 6	2.914 4	0.175 0	21.000 0	46.621 8	18.371 2	3.751 1	2.753 1	278.931 1	16.723 1	152.541 1	
S9	4.240 4	8.536 6	7.725 2	5.165 2	2.995 0	12.974 6	19.153 6	46.159 3	21.510 3	2.673 8	3.971 1	180.193 8	20.283 8	181.063 8	
S10	4.610 6	9.169 8	8.337 2	5.245 2	3.082 4	0.644 6	20.923 8	48.501 8	20.673 5	2.653 4	3.842 3	209.543 8	21.384 9	195.421 3	
S11	4.649 0	9.282 6	8.544 2	5.080 2	2.309 4	1.062 2	20.964 6	49.153 6	14.603 5	3.021 9	3.751 2	265.061 1	20.601 9	194.214 6	
S12	4.651 0	9.256 8	8.379 0	5.677 4	3.270 4	0.583 0	21.810 0	50.021 1	22.362 4	2.641 5	4.142 3	197.943 9	22.434 9	198.021 4	
S13	4.669 8	9.184 2	8.246 8	6.414 6	3.408 4	14.790 6	21.543 2	50.143 6	28.498 0	2.736 1	3.823 2	153.641 1	21.243 8	206.789 6	
S14	4.512 6	9.008 0	8.202 6	5.868 4	2.949 0	0.547 4	20.314 9	48.103 9	22.103 0	4.067 4	3.934 1	195.384 9	21.342 8	192.823 8	
S15	4.352 2	8.555 2	7.492 6	4.856 4	3.005 8	13.973 8	17.654 4	42.951 1	25.460 2	1.082 6	2.608 4	107.141 6	15.811 6	153.904 8	
S16	4.546 3	9.270 4	8.113 0	5.661 9	2.910 0	0.242 6	17.943 8	42.338 4	25.613 5	1.830 2	3.181 1	107.883 2	15.861 4	158.151 6	

3 讨论

3.1 检测器检测波长的选择

经过对氨基酸自动分析仪的反复调试, 确定仪器的最优条件, 使得各氨基酸成分能得到较好的基线分离。

由于 Pro 和 Hypro 只在 440 nm 下有最大吸收, 其余氨基酸最大吸收波长均为 570 nm, 故选择 440 nm 和 570 nm 作为检测波长。

3.2 样品前处理条件的确定

JOL 中的氨基酸成分主要来自于君药山羊角。

表 4 16 批 JOL 中氨基酸成分的含量范围

Table 4 Ranges of contents of amino acids in 16 batches of JOL

氨基酸	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			氨基酸	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			氨基酸	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	最低	最高	差值		最低	最高	差值		最低	最高	差值
P-Ser	15.475 2	29.362 4	13.887 2	Ala	33.876 8	44.257 4	10.380 6	β -AiBA	0.175 0	14.790 6	14.615 6
Tau	64.423 4	114.238 6	49.815 2	Cit	3.514 2	9.881 0	6.366 8	γ -ABA	17.654 4	26.621 8	8.967 4
Asp	19.056 4	32.549 0	13.492 6	α -ABA	1.126 4	2.287 8	1.161 4	Orn	42.338 4	58.172 6	15.834 2
Thr	6.454 0	9.188 0	2.734 0	Val	11.584 6	15.469 0	3.884 4	Lys	12.994 9	28.498 0	15.5031
Ser	22.609 4	39.382 8	16.773 4	Cys	1.660 2	4.041 8	2.381 6	His	1.802 6	4.067 4	2.264 8
Asn	61.134 0	115.456 0	54.322 0	Ile	4.087 8	5.469 2	1.381 4	3-Mehis	2.608 4	4.384 0	1.775 6
Glu	32.254 6	63.127 2	30.872 6	Leu	8.295 2	11.724 0	3.428 8	Arg	107.141 6	301.649 8	194.508 2
Gln	5.223 8	8.953 2	3.729 4	Tyr	7.492 6	10.761 2	3.268 6	HypPro	15.811 6	37.807 6	21.996 0
Sar	4.081 0	44.077 6	39.996 6	Phe	4.856 4	9.248 0	4.391 6	Pro	143.714 6	243.956 6	100.242 0
Gly	12.403 0	23.516 4	11.113 4	β -Ala	2.309 4	6.782 6	4.473 2				

生产工艺中对山羊角的处理过程如下:山羊角粉碎,加入 10 倍量的碱水,水解 24 h,滤过所得药渣再次加入 5 倍量的碱水,水解 24 h,滤过,合并 2 次滤液,浓缩得山羊角浸膏。最后将山羊角浸膏与其他药味浸膏一起合并煮沸,调节 pH 值,冷藏,滤过,灌封,灭菌,得 JOL。由此可知,在整个生产工艺中山羊角得到了充分的碱水解,故无需再对 JOL 进行水解处理。

本研究聚焦 JOL 的氨基酸类成分,首次建立了 JOL 氨基酸特征指纹图谱,并同时完成 29 种氨基酸类成分的定性定量研究,弥补了 HPLC- UVD-ELSD 指纹图谱中缺少药君(山羊角)关联成分检测的不足,为建立 JOL 全面整体的质量控制评价体系提供研究依据

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 孙海军, 刘光丽, 高有桂, 等. 金振口服液治疗小儿急性支气管炎痰热内蕴证 43 例 [J]. 中医研究, 2016, 29(5): 12-14.
- [3] 舒毅芳, 牛小玲, 吴杰. 金振口服液治疗小儿支气管炎的临床疗效观察 [J]. 贵州医药, 2018, 42(1): 48-50.
- [4] 李娅凤, 平雯. 金振口服液治疗小儿支气管炎临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(4): 467.
- [5] 刘光磊. 金振口服液治疗小儿支气管炎的疗效观察 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2013, 15(10): 218.
- [6] 谭丽琴. 金振口服液防治手足口病的初步临床观察 [J]. 中外妇儿健康, 2011, 19(6): 300-301.
- [7] Liu J, Zhang G L, Huang G Q, *et al*. Therapeutic effect of

Jinzen oral liquid for hand foot and mouth disease: A randomized, multi-center, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *PLoS One*, 2014, doi:10.1371/journal.pone.0094466.

- [8] 徐航, 韩国坤, 李红芳, 等. 金振口服液治疗儿童手足口病普通型 96 例临床观察 [J]. 河北中医, 2011, 33(2): 259-260.
- [9] 季汝凤, 夏煜. 金振口服液治疗小儿支气管肺炎的疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(17): 195-196.
- [10] 杨莉颖, 陈慧, 杨红丽, 等. 金振口服液治疗风热犯卫型小儿流行性感冒的临床观察 [J]. 中国社区医师, 2019, 35(23): 117-119.
- [11] Ma L L, Ge M, Wang H Q, *et al*. Antiviral activities of several oral traditional Chinese medicines against influenza viruses [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 367250.
- [12] 刘晓秋, 付云云, 徐佳佳, 等. 金振口服液质量标准研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(11): 987-991.
- [13] 曹云飞, 吴小峰, 蔡芳, 等. HPLC 法测定金振口服液中 6 种成分含量 [J]. 现代仪器与医疗, 2013, 19(5): 69-71.
- [14] 杨智慧, 程诚, 姚青. 高效液相色谱法测定金振口服液中 6 种成分含量 [J]. 中国药业, 2017, 26(23): 22-25.
- [15] 胡军华, 苏倩倩, 李婷婷, 等. 金振口服液的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3768-3771.
- [16] 李海波, 王团结, 杨群, 等. 金振口服液 HPLC-UVD-ELSD 特征指纹图谱及 13 个成分同时定量的整体质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5737-5747.