

## HPLC 法测定复方氨基酸注射液(3AA)中主成分及有关物质含量\*

左利民<sup>1</sup>, 茹仙古丽·依明<sup>2</sup>, 郭鑫<sup>1</sup>, 肖菁<sup>3</sup>, 徐士婕<sup>1</sup>, 赵婷<sup>1</sup>,  
连晓芳<sup>1</sup>, 刘惠一<sup>1</sup>, 周怡<sup>4\*\*</sup>, 山广志<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国医学科学院医药生物研究所, 北京 100050; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004; 3. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 4. 国家药典委员会, 北京 100061)

**摘要 目的:**建立复方氨基酸注射液(3AA)的主成分和有关物质测定的高效液相色谱方法。**方法:**采用反相高效液相色谱法并结合二维柱切换 LC/MS<sup>n</sup>法对制剂中主要杂质进行分离和结构鉴定, 建立复方氨基酸注射液(3AA)中缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸及其有关物质含量检测方法。采用 Capcell PAK AQ C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 至 2.8) - 乙腈(98:2) 为流动相, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL。采用 Thermo Accucore AQ C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A, 以 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈为流动相 B, 流速 0.4 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C; 质谱条件采用 ESI 电离源, 正离子扫描模式, 扫描范围为 *m/z* 100 ~ 1 000, 二级质谱采用数据依赖型扫描开展。**结果:**主峰和相邻杂质峰分离度良好, 缬氨酸的线性范围为 1.263 ~ 5.050 mg · mL<sup>-1</sup>, 平均回收率(*n* = 9) 为 99.0%; 异亮氨酸的线性范围为 1.350 ~ 5.402 mg · mL<sup>-1</sup>, 平均回收率(*n* = 9) 为 99.4%; 亮氨酸的线性范围为 1.647 ~ 6.588 mg · mL<sup>-1</sup>, 平均回收率(*n* = 9) 为 99.5%。3 批样品中主要杂质均为原料引入的工艺杂质, 其中甲硫氨酸含量分别为 4.344、3.751、4.503 μg · mL<sup>-1</sup>, 苯丙氨酸含量分别为 4.636、4.889、4.753 μg · mL<sup>-1</sup>。其他单个未知杂质分别为 0.01%、0.02%、0.01%。**结论:**经方法学验证, 本方法可用于复方氨基酸注射液(3AA)的质量控制。

**关键词:**复方氨基酸注射液(3AA); 含量测定; 二维柱切换; 串联质谱法; 有关物质; 结构鉴定; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)07 - 1161 - 08

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0795

## HPLC determination of the content and the related substances of compound amino acid injection(3AA)\*

ZUO Li - min<sup>1</sup>, Ruxianguli · Yiming<sup>2</sup>, GUO Xin<sup>1</sup>, XIAO Jing<sup>3</sup>, XU Shi - jie<sup>1</sup>,  
ZHAO Ting<sup>1</sup>, LIAN Xiao - fang<sup>1</sup>, LIU Hui - yi<sup>1</sup>, ZHOU Yi<sup>4\*\*</sup>, SHAN Guang - zhi<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 3. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 4. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method of the content and related substances of compound amino acid injection(3AA). **Methods:** RP - HPLC was adopted to determine compound amino acid injection(3AA),

\* 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021 - I2M - 1 - 070); 湖南省自然科学基金科药联合基金项目(2022JJ80071)

\*\* 通信作者 周怡 Tel:(010)67079556; E - mail:zhouyi@chp.org.cn

山广志 Tel:(010)67019851; E - mail:shanguangzhi@imb.pumc.edu.cn

第一作者 左利民 Tel:(010)63021345; E - mail:zuolimin@imb.cams.cn

茹仙古丽·依明 Tel:(0991)2326560; E - mail:rxglym@163.com

combining with the use of two – dimensional column switching – LC/MS<sup>n</sup> method was applied to separate and identify the impurities. The determination was performed on Capcell PAK AQ C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) column with 0.2 mol · L<sup>-1</sup> sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH to 2.8 with phosphoric acid) – acetonitrile (98:2) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 40 °C, and the detection wavelength was 210 nm. And the injection volume was 20 μL. The LC/MS<sup>n</sup> method was performed on a Thermo Accucore AQ C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm) column with 0.1% formic acid solution as mobile phase A, 0.1% formic acid solution – acetonitrile as mobile phase B, at a flow rate of 0.4 mL · min<sup>-1</sup>, and at a column temperature of 40 °C. The mass spectrometry conditions were performed using an ESI ionisation source in the positive – ion scanning mode with a scan range of *m/z* 100 – 1 000, and the secondary mass spectrum was carried out by data – dependent scanning. **Results:** The related substances were completely separated from the main constituents in RP – HPLC. The standard curve of valine was linear over the range of 1.263 – 5.050 mg · mL<sup>-1</sup>, with the average recovery of 99.0% (*n* = 9). The standard curve of isoleucine was linear over the range of 1.350 – 5.402 mg · mL<sup>-1</sup>, with the average recovery of 99.4% (*n* = 9). The standard curve of leucine was linear over the range of 1.647 – 6.588 mg · mL<sup>-1</sup>, with the average recovery of 99.5% (*n* = 9). The main impurities in the three batches of samples were all process impurities introduced from the raw materials, with methionine content of 4.344 μg · mL<sup>-1</sup>, 3.751 μg · mL<sup>-1</sup>, 4.503 μg · mL<sup>-1</sup>, respectively, phenylalanine content of 4.636 μg · mL<sup>-1</sup>, 4.889 μg · mL<sup>-1</sup>, 4.753 μg · mL<sup>-1</sup>, respectively. The maximum single impurity contents were 0.01%, 0.02% and 0.01%, respectively. **Conclusion:** The method is proved by the methodology validation that it can be used for the quality control of compound amino acid injection(3AA).

**Keywords:** compound amino acid injection(3AA); content determination; two – dimensional column switching; tandem mass spectrometry; related substances; structural identification; control of drug quality

复方氨基酸注射液(3AA)是由3种支链氨基酸缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)和异亮氨酸(Ile)配制而成的灭菌水溶液,输注后能纠正血浆中支链氨基酸和芳香氨基酸失衡,防止因脑内芳香氨基酸浓度过高引起的肝昏迷<sup>[1-2]</sup>,促进蛋白质合成以及减少蛋白质分解。主要用于肝胆外科手术前后以及其他原因引起的肝性脑病、重症肝炎以及肝硬化、慢性活动性肝炎<sup>[3-4]</sup>。该品种在各国药典中均未收载,现行标准收载于《卫生部药品标准(二部)》第六册(生化药品第一分册)<sup>[5]</sup>。标准中采用氨基酸分析仪或高效液相色谱法进行含量测定,未给出具体色谱条件,且标准中未收载有关物质检查项,存在一定安全风险。2020年版《中华人民共和国药典》、EP 11.0、USP 43及JP 18均收载了包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸原料的其他氨基酸(茚三酮阳性物质、有关物质)检查方法<sup>[6-9]</sup>,多采用薄层色谱法(茚三酮显色)或氨基酸分析仪法(柱后茚三酮衍生)检测,方法仅针对氨基基团显色,无法全面反映制剂中杂质的整体情况<sup>[7,10]</sup>。

近年来,针对多种氨基酸同时检测的方法大多仍采用衍生化法,分为柱前衍生化和柱后衍生化,通常使用邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸苯酯(PITC)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)及茚三酮等与氨基酸的氨基进行反应<sup>[11-13]</sup>,但各种衍生化反应均存在一定的不足,如衍生产物不稳定、前处理复杂及存在对色谱柱损伤等<sup>[14-16]</sup>。本文中采用反相高效液相色谱技术,建立了同时测定复方氨基酸注射液(3AA)主成分含量及有关物质的新方法。通过柱切换的二维液相色谱联用高分辨质谱技术,对产品中主要有关物质进行结构鉴定。经方法验证显示,建立的方法灵敏度高,专属性强,准确度高,可有效用于复方氨基酸注射液(3AA)主成分及有关物质含量测定要求,对进一步保障产品质量及临床用药的安全有效提供方法参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

UltiMate – 3000 高效液相色谱仪(Thermo Fisher

公司), Thermo Orbitrap XL 高分辨质谱仪(Thermo Fisher 公司), XP205 型十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO 公司), Milli-Q 超纯水器(IQ7000, Merck Millipore 公司), pH 计(Seven Excellence, Mettler Toledo 公司)。

## 1.2 试剂

乙腈(北京百灵威科技有限公司, 纯度 99.9%, 批号 L850U47), 磷酸二氢钠(北京市通广精细化工有限公司, 纯度 99.0%, 批号 20200723), 磷酸(TEDIA 公司, 批号 19080735), 水为超纯水(实验室自制, 大于  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

对照品: 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸(纯度均为 99.9%, 批号为 140624-201506, 中国食品药品检定研究院); 市售复方氨基酸注射液(3AA)(批号为 1020010101、1020010102、1020010103)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Capcell PAK AQ  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 以  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 至 2.8) - 乙腈(98:2) 为流动相, 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 检测波长 210 nm, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 精密称取缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸的对照品各适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 约含缬氨酸 2.5 mg、异亮氨酸 2.7 mg、亮氨酸 3.3 mg 的混合溶液, 作为含量测定用对照品溶液。精密称取甲硫氨酸、苯丙氨酸对照品各适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中甲硫氨酸、苯丙氨酸各含 25  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 作为有关物质检查用对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 精密量取复方氨基酸注射液(3AA) 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为含量测定用供试品溶液。取复方氨基酸注射液(3AA) 滤过, 取续滤液作为有关物质检查用供试品溶液。

**2.2.3 对照溶液** 精密量取复方氨基酸注射液(3AA) 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.4 空白溶液** 取流动相作为空白溶液, 滤过, 即得。

### 2.3 二维柱切换有关物质鉴定条件

#### 2.3.1 色谱条件

一维液相色谱条件同“2.1”项。  
二维液相色谱条件: 采用 Thermo Accucore AQ  $C_{18}$  (100 mm  $\times$  4.6 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液 - 乙腈, 梯度洗脱 [ $0 \sim (t_R + 1) \text{ min}$  ( $t_R$  为目标杂质在一维色谱系统的保留时间), 2% B (脱盐处理);  $(t_R + 1) \text{ min} \sim (t_R + 5) \text{ min}$ , 90%B;  $(t_R + 5) \text{ min} \sim (t_R + 7) \text{ min}$ , 90% B;  $(t_R + 7.1) \text{ min} \sim (t_R + 10) \text{ min}$ , 2%B], 流速  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

二维柱切换构型图如图 1 所示, 其色谱系统工作流程: ①将切换阀设为位置 A, 采用一维液相色谱系统(泵 1 及色谱柱 1)分离供试品中相关杂质, 同时二维液相色谱系统(泵 2)对二维分析色谱柱(色谱柱 2)进行预平衡; ②当采用一维液相色谱系统分离的目标杂质出峰后, 将切换阀设为位置 B, 色谱柱 1 流出组分进入切换阀 1 中定量环(loop), 出峰结束随即切回初始位置 A; ③采用二维液相色谱系统将定量环中的目标组分反冲至第二维分析色谱柱(色谱柱 2)中, 并通过切换阀 2 脱盐处理后进入下一级质谱检测器进行相应的结构分析。

**2.3.2 质谱条件** 采用 ESI 电离源, 正离子扫描模式, 喷雾电压 4.5 kV, 加热电压 25 V, 离子导入电压(skimmer 电压) 20 V, 鞘气流速 30 arb, 吹扫气流速 10 arb, 离子传输毛细管温度  $375 \text{ }^\circ\text{C}$ , 扫描范围为  $m/z$  100 ~ 1 000; 二级质谱采用数据依赖型扫描(data dependent MS/MS), 用于监测一级质谱全扫描中已确定质量数离子的二级质谱, 二级质谱碰撞诱导解离归一化能量值设置为 35%。

### 2.4 主要杂质结构鉴定

**2.4.1 二级色谱 - 质谱联用分析** 采用 Thermo U3000 - Orbitrap XL 二维液质联用系统, 一维液相色谱采用“2.1”项色谱条件进行, 将一维液相色谱图中目标杂质切入二维液相色谱柱, 使用“2.3.1”项的二维液相色谱条件进行分析, 洗脱液进 Orbitrap XL 质谱检测器, 使用“2.3.2”项的质谱条件进行目标化合物的一级、二级质谱数据采集。目标杂质色谱图见图 2。

**2.4.2 杂质结构鉴定** 采用建立的高效液相色谱方法并结合二维柱切换 LC/MS<sup>n</sup> 法对样品进行有关物质检查, 样品中较大杂质分别标注为杂质 I 和杂质 II, 结合强酸 ( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液)、强碱 ( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液)、氧化 (10% 过氧

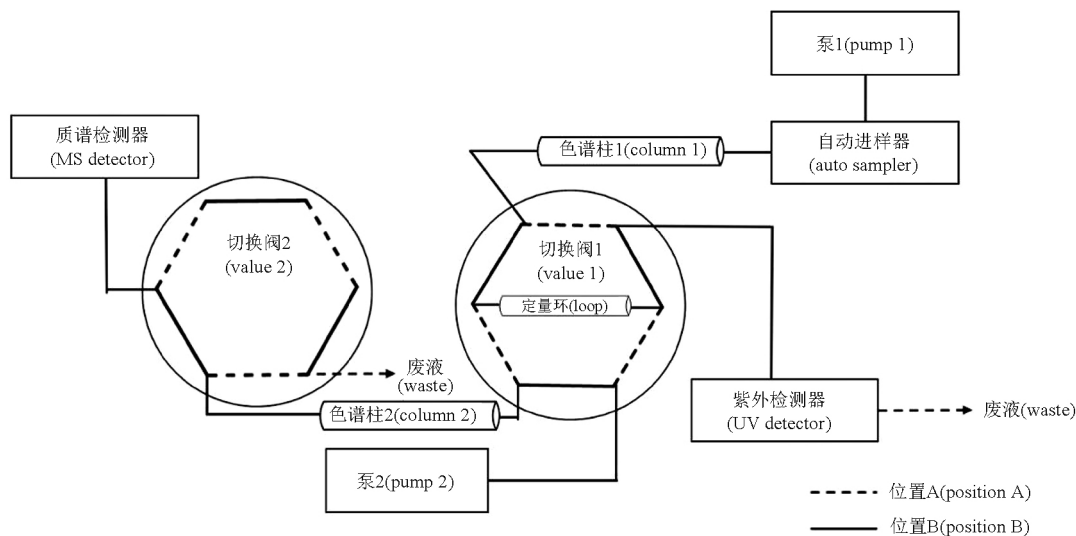
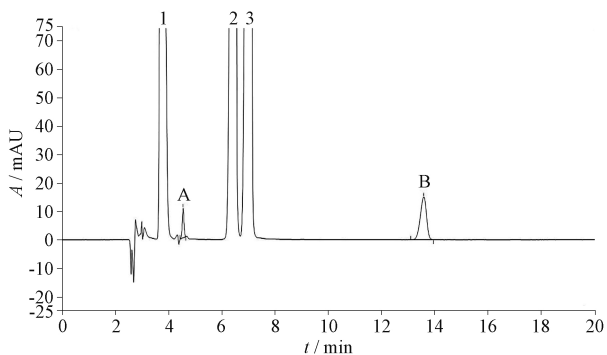


图1 二维柱切换-LC/MS<sup>n</sup>构型图

Fig. 1 2D column switching - LC/MS<sup>n</sup> configuration diagram



A. 杂质 I (impurity I) B. 杂质 II (impurity II) 1. 缬氨酸 (valine) 2. 异亮氨酸 (isoleucine) 3. 亮氨酸 (leucine)

图2 复方氨基酸注射液(3AA)有关物质测定谱图

Fig. 2 Determination spectrum of related substances in compound amino acid injection(3AA)

化氢溶液)、高温(105 ℃加热)及光照(紫外光 365 nm)条件强制降解试验分析,2个杂质均为工艺杂质而非降解生成,首先对复方氨基酸注射液(3AA)杂质 I 的一、二级质谱图进行分析,确定加合物及二级碎片裂解规律。如图 3 所示,杂质 I 所得  $m/z$  150.058 15 分子离子峰,根据高分辨数据推测元素组成与  $[M + H]^+ C_5H_{12}NO_2S$  相匹配(偏差值  $-1.17 \times 10^{-6}$ )。二级质谱图主要碎片离子包括  $m/z$  133.11、87.89 离子,其中  $m/z$  133.11 离子为母离子丢失 1 分子  $NH_3$  后的产物,该离子进一步分别丢失  $HCOOH$  后得到  $m/z$  87.89 离子,根据高分辨质量数元素匹配及碎片信息推测,鉴定杂质 I 为

甲硫氨酸。杂质 II 所得  $m/z$  166.086 10 分子离子峰,根据高分辨数据推测元素组成与  $[M + H]^+ C_9H_{12}NO_2$  相匹配(偏差值  $-0.93 \times 10^{-6}$ )。二级质谱图主要碎片离子包括  $m/z$  149.04、120.00 离子,在该正离子模式下, $m/z$  149.04 离子为母离子丢失 1 分子  $NH_3$  后的产物,另外母离子丢失  $HCOOH$  后得到  $m/z$  120.00 离子,推测鉴定杂质 II 为苯丙氨酸,相关质谱图见图 4。

### 2.5 含量测定方法学考察

**2.5.1 专属性试验** 分别量取空白溶液、混合对照品溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。在该色谱条件下,缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸分别在 3.82、6.39 和 6.94 min 出峰(图 5)。取复方氨基酸注射液(3AA)(批号 1020010101)各 2 mL 置 10 mL 量瓶中,分别进行强酸降解(2 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL,破坏 2 h)、强碱降解(2 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 2 mL,破坏 2 h)、氧化降解(10% 过氧化氢溶液 2 mL,放置 2 h)、高温降解(105 ℃加热破坏 2 h)和光照降解(紫外光 365 nm 下照射 24 h),酸碱降解后进行中和,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过。取各强制降解后供试溶液测定,结果表明,3 个氨基酸完全分离且峰形良好,空白溶液不干扰待测组分测定,供试溶液在各降解条件下较为稳定,无较明显杂质生成。色谱图中杂质峰与主成分峰的分离度良好。

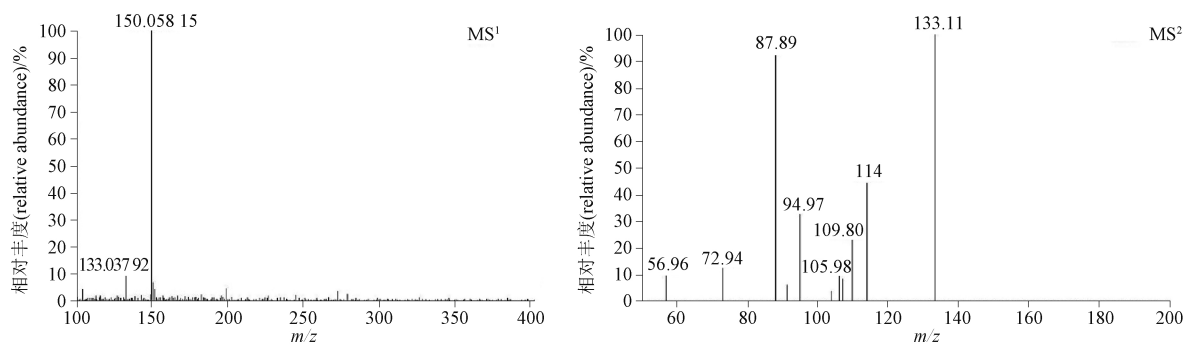


图3 杂质 I 一级和二级质谱图

Fig. 3 MS<sup>1</sup> and MS<sup>2</sup> of impurity I

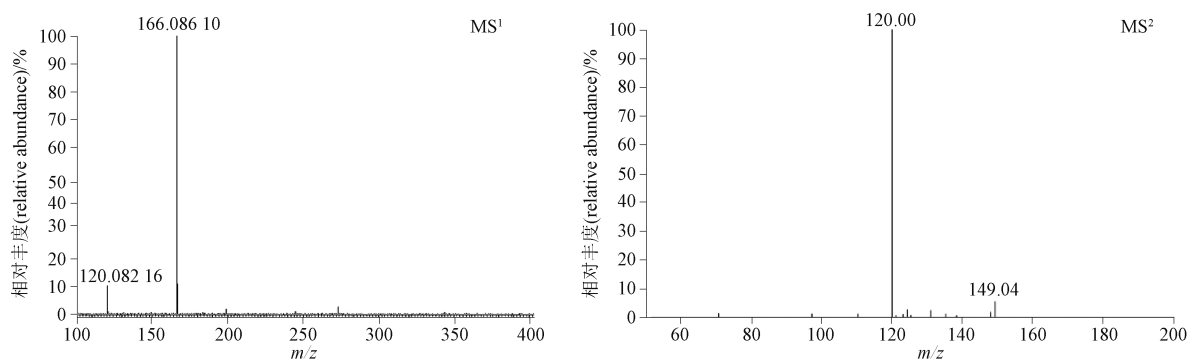
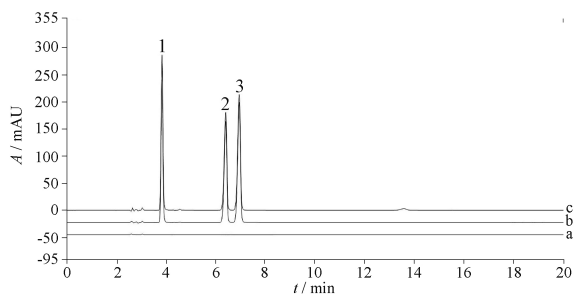


图4 杂质 II 一级和二级质谱图

Fig. 4 MS<sup>1</sup> and MS<sup>2</sup> of impurity II



1. 缬氨酸 (valine) 2. 异亮氨酸 (isoleucine) 3. 亮氨酸 (leucine)  
a. 空白溶液 (blank solution) b. 混合对照品溶液 (mixed reference substance solution) c. 复方氨基酸注射液 (3AA) 溶液 [compound amino acid injection (3AA)]

图5 复方氨基酸注射液 (3AA) 专属谱图

Fig. 5 Specific spectrum of compound amino acid injection (3AA)

**2.5.2 线性关系考察** 精密称取缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的对照品各适量,加流动相溶解并稀释得到系列浓度的混合对照品溶液(缬氨酸质量浓度为 1.263、1.512、2.016、2.525、5.050 mg · mL<sup>-1</sup>,异亮氨酸质量浓度为 1.350、1.621、2.161、2.701、5.402 mg · mL<sup>-1</sup>,亮氨酸质量浓度为 1.647、1.976、2.635、3.294、6.588 mg · mL<sup>-1</sup>)。取系列浓度的混合对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,以浓度(X)为横坐标、色谱峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得复方氨基酸注射液(3AA)中缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的线性回归方程。见表 1。

表 1 缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸线性范围、回归方程

Tab. 1 Regression equation, linearity range of Val, Ile and Leu

成分 (component)	线性范围 (linearity range)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	回归方程 (regression equation)	r
缬氨酸 (valine)	1.263 ~ 5.050	Y = 9.545 6X + 0.240 3	1.000
异亮氨酸 (isoleucine)	1.350 ~ 5.402	Y = 8.725 3X + 0.112 8	1.000
亮氨酸 (leucine)	1.647 ~ 6.588	Y = 8.842 4X + 0.239 1	1.000

**2.5.3 精密度和重复性试验** 精密称取对照品缬氨酸 505.02 mg、亮氨酸 658.81 mg、异亮氨酸 540.20 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。按“2.1”项色谱条件进样分析。3 个主成分连续进样测定 6 次, 峰面积的 RSD 分别为 0.31%、0.29% 和 0.31%, 表明仪器的精密度良好。

取复方氨基酸注射液(3AA)(批号 1020010101)6 份, 分别按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的平均含量分别为 98.13%、97.91% 和 97.30%, RSD 分别为 0.89%、0.89%、0.87%, 表明该方法重复性良好。

**2.5.4 稳定性试验** 取复方氨基酸注射液(3AA)(批号 1020010101), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在室温下分别于 0、2、4、6、8、12 h 进行测定。结果供试品溶液中缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸浓度的 RSD 分别为 0.13%、0.11%、0.11%, 表明供试品溶液在室温条件下放置 12 h, 稳定性良好。

**2.5.5 回收率试验** 分别精密称取对照品缬氨酸 252.13 mg、亮氨酸 269.71 mg、异亮氨酸 330.23 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。精密量取复方氨基

酸注射液(3AA)(批号 1020010101)1 mL, 9 份, 每 3 份为一组, 分别置 10 mL 量瓶中, 每组分别精密加入混合对照品溶液 4、5、6 mL, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得低、中、高浓度的供试溶液各 3 份, 按“2.1”项下条件进样测定, 计算平均回收率和 RSD。结果显示, 在标示浓度的 80%~120% 范围内, 缬氨酸平均回收率( $n=9$ )为 99.0%, RSD=0.90%; 异亮氨酸平均回收率( $n=9$ )为 99.4%, RSD=0.82%; 亮氨酸平均回收率( $n=9$ )为 99.5%, RSD=0.77%, 表明该方法准确度良好。

## 2.6 有关物质方法学考察

**2.6.1 线性关系考察及定量限、检测限测定** 精密称取甲硫氨酸、苯丙氨酸的对照品各约 25 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液。精密量取上述储备液逐级进行稀释, 得到质量浓度为 2.5、5、10、25、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列混合对照品溶液。取各浓度混合对照品溶液 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以质量浓度( $X$ )为横坐标、色谱峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归, 得甲硫氨酸和苯丙氨酸的线性回归方程。将混合对照品储备液加流动相逐级稀释成所需的不同浓度, 进样测定, 以信噪比( $S/N$ )为 10:1 时的浓度为定量限, 以信噪比( $S/N$ )为 3:1 时的浓度为检测限。结果见表 2。

表 2 甲硫氨酸、苯丙氨酸杂质线性范围、回归方程、定量限及检测限

Tab. 2 Regression equation, linearity range, LOQ and LOD of methionine and phenylalanine

杂质 (impurity)	线性范围 (linearity range)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回归方程 (regression equation)	$r$	定量限 (LOQ)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检测限 (LOD)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
甲硫氨酸(methionine)	2.649 ~ 52.98	$Y = 0.1877X - 0.0143$	1.000	0.1022	0.0511
苯丙氨酸(phenylalanine)	2.622 ~ 52.44	$Y = 0.8752X - 0.0517$	1.000	0.0709	0.0354

**2.6.2 精密度和重复性试验** 精密称取甲硫氨酸、苯丙氨酸的对照品各适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中均含 25  $\mu\text{g}$  的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 甲硫氨酸、苯丙氨酸色谱峰面积的 RSD( $n=6$ ) 分别为 0.74% 和 0.47%。精密量取复方氨基酸注射液(3AA)(批号 1020010101)6 份, 分别滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 按“2.1”项下条件进样测定, 甲硫氨酸、苯丙氨酸的含量均值( $n=6$ )分别为 3.92、4.83  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其 RSD 分别为

1.2% 和 0.60%。表明仪器精密度及方法重复性均良好。

**2.6.3 稳定性与回收率试验** 取由复方氨基酸注射液(3AA)(批号 1020010101)制备的供试品溶液, 在室温下分别于 0、2、4、6、8、12 h 进行测定, 记录色谱图。供试品溶液中甲硫氨酸峰面积的 RSD 为 0.92%, 苯丙氨酸峰面积的 RSD 为 0.62%, 表明供试品溶液在室温条件下稳定性良好。

精密量取复方氨基酸注射液(3AA)(批号

1020010101) 5 mL, 9 份, 每 3 份为一组, 分别置 10 mL 量瓶中, 每组分别精密加入“2.6.1”项下混合对照品储备液 0.8、1、1.2 mL, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得低、中、高浓度供试溶液各 3 份。按“2.1”项下色谱条件分别进样, 测定甲硫氨酸、苯丙氨酸的含量, 计算回收率。在限度浓度的 80%~120% 范围内, 甲硫氨酸的平均回收率 ( $n=9$ ) 为 102.2% (RSD=0.67%), 苯丙氨酸的平均回收率 ( $n=9$ ) 为 99.8% (RSD=

0.70%), 表明方法准确度良好。

### 2.7 样品测定

取不同批号的复方氨基酸注射液(3AA), 按“2.2”项方法制备供试品溶液、对照品溶液及对照溶液, 并按“2.1”项色谱条件进行分析, 测定峰面积。采用外标法计算缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸以及杂质甲硫氨酸、苯丙氨酸的含量, 未知杂质含量采用异亮氨酸主成分自身对照法计算, 结果见表 3。

表 3 复方氨基酸注射液(3AA)含量及有关物质测定结果

Fig. 3 Content and related substance determination results of compound amino acid injection (3AA)

批号 (batch)	主成分含量(content of principal component)/%			有关物质含量(content of related substance)			
	缬氨酸 (valine)	异亮氨酸 (isoleucine)	亮氨酸 (leucine)	甲硫氨酸 (methionine)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	苯丙氨酸 (phenylalanine)/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	单个杂质 (single impurity)/%	总杂质 (total impurities)/%
1020010101	97.51	97.15	96.60	4.344	4.636	0.01	0.01
1020010102	99.97	99.63	98.96	3.751	4.889	0.02	0.02
1020010103	97.75	97.39	96.75	4.503	4.753	0.01	0.01

## 3 讨论

### 3.1 方法选择及建立

参考美 USP 43 中收载的缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸原料药有关物质检测方法, 缬氨酸原料有关物质检测方法采用氨基柱, 在基于磷酸盐-乙腈体系下填料流失较为严重, 稳定性低, 方法耐用性有一定限制; 亮氨酸和异亮氨酸原料有关物质检测方法均采用反相  $C_{18}$  柱, 经实验测定各成分峰形较好, 本研究在此基础上进行方法优化。

### 3.2 色谱方法优化

本实验中通过优化流动相组成、pH、柱温及色谱柱规格等, 对各实验条件下主成分分离保留及杂质分析进行了评估, 结果显示, 在磷酸盐缓冲液 (pH 2.8)-乙腈条件下, 各色谱峰对称性更优; 柱温升高至 40 °C, 在聚合物包被型 AQ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 条件下, 亮氨酸和异亮氨酸分离度可达到 2.5 以上, 各主成分及杂质分离效果更优, 并且在高水相条件下该方法色谱柱耐用性更好。方法使用紫外末端吸收, 不需要特殊设备, 通用性较强。

### 3.3 二维色谱质谱联用鉴定杂质

由于建立的液相色谱方法中采用磷酸盐为流动

相, 不适用于直接进行 LC/MS 分析。二维液相色谱-质谱联用技术通过在线联用的自动化操作, 可在二维液相色谱体系中使用质谱不兼容流动相对目标杂质进行分析, 通过柱切换技术实现对组分的捕集和脱盐, 并转移至二维液相色谱中进行质谱采集, 使用适宜的流动相进行组分结构鉴定。本研究采用在线二维液相质谱联用技术对复方氨基酸注射液(3AA)中 2 个主要杂质峰进行了结构解析, 确定了产品中 2 个主要杂质为原料药的工艺杂质甲硫氨酸和苯丙氨酸。

本文建立了反相高效液相色谱法并利用柱切换技术联合高分辨质谱鉴定了复方氨基酸注射液(3AA)中 2 个主要杂质, 对复方氨基酸注射液(3AA)进行含量及有关物质检测。该方法专属性强, 准确度高, 可有效地控制复方氨基酸注射液(3AA)的产品质量。

### 参考文献

- [1] UNGER N, HOLZGRABE U. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147: 125
- [2] YARANDI SS, ZHAO VM, HEBBAR G, et al. Amino acid composition in parenteral nutrition: what is the evidence? [J]. Curr

- Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(1): 75
- [ 3 ] 陈鼎雄, 林立. HPLC - ELSD 测定复方氨基酸注射液(3AA)中三组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1649  
CHEN DX, LIN L. HPLC - ELSD determination of three components in compound amino acid injection(3AA)[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(10): 1649
- [ 4 ] 张莹, 黄哲甦. 异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定复方氨基酸注射液(3AA)中氨基酸含量[J]. 天津药学, 2013, 25(4): 17  
ZHANG Y, HUANG ZS. Determination of compound amino acid injection (3AA) by HPLC with precolumn phenylisothiocyanate derivatization[J]. Tianjin Pharm, 2013, 25(4): 17
- [ 5 ] 卫生部药品标准. 二部. 第六册[S]. 1996: 78  
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health. P R China. Part 2. Vol 6[S]. 1996: 78
- [ 6 ] 中华人民共和国药典2020年版. 二部[S]. 2020: 1832, 509, 1010  
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1832, 509, 1010
- [ 7 ] EP 11.0 [S]. 2023: 4346, 3136, 3213, 109
- [ 8 ] USP 43 - NF 38[S]. 2020: 4571, 2422, 2565
- [ 9 ] JP 18[S]. 2021: 1897, 1196, 1251
- [ 10 ] WAHL O, HOLZGRABE U. Amino acid analysis for pharmaceutical purposes[J]. Talanta, 2016, 154: 150
- [ 11 ] ZHAO M, MA Y, DAI L, *et al.* A high - performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of 21 free aminoacids in tea[J]. Food Anal Methods, 2013, 6(1): 69
- [ 12 ] WILSON SF, JAMES CA, ZHU X, *et al.* Development of a method for the determination of glycine in human cerebrospinal fluid using pre - column derivatization and LC - MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(2): 315
- [ 13 ] 朱影恬, 曾雯瑜, 张中伟, 等. 柱前衍生高效液相色谱测定小儿复方氨基酸注射液中氨基酸[J]. 分析科学学报, 2009, 25(6): 685  
ZHU YT, ZENG WY, ZHANG ZW, *et al.* Determination of amino acids in children compound amino acid injection by pre - column derivatization high performance liquid chromatography[J]. J Anal Sci, 2009, 25(6): 685
- [ 14 ] 汪媛, 王海龙, 金高娃, 等. PITC 柱前衍生 HPLC 测定复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸的含量[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2014, 16(6): 1347  
WANG Y, WANG HL, JIN GW, *et al.* Content determination of 18 amino acids in compound amino acid injection by HPLC with pre - column PITC derivatization[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med - World Sci Technol, 2014, 16(6): 1347
- [ 15 ] HERBERT P, BARROS P, RATOLA N, *et al.* HPLC determination of amino acids in musts and port wine using OPA/FMOC derivatives[J]. J Food Sci, 2000, 65(7): 113
- [ 16 ] 邓红英, 张永文, 李永贵. 柱前衍生高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量[J]. 药学研究, 2020, 39(1): 27  
DENG HY, ZHANG YW, LI YG. Determination of amino acids in compound amino acids injection by HPLC after pre - column derivatization[J]. J Pharm Res, 2020, 39(1): 27

(本文于2023年12月12日收到)