^{1}H NMR 法测定小儿复方氨基酸注射液中的氨基酸

黄　凯，胡亚一，孙文霞，贾幼智*，潘红娟
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：基于 ^{1}H NMR 法确定了 20 种常见氨基酸的鉴定特征峰，快速鉴别了小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）中除半胱氨酸外的 18 种氨基酸。排除重叠信号干扰，确定了专属性强的质子信号，并经 ^{13}C NMR 和异核单量子相关谱（HSQC）谱图验证准确有效。同时以吡嗪作为内标物，可定量测定酪氨酸和乙酰酪氨酸，为鉴别多组分氨基酸制剂提供了一种直接、快速、简便、有效的方法。

关键词：氨基酸；核磁共振；^{1}H NMR；定性分析；小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）09-1306-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.09.011

Determination of Amino Acids in Paediatric Compound Amino Acid Injection by ^{1}H NMR

HUANG Kai, HU Yayi, SUN Wenxia, JIA Youzhi*, PAN Hongjuan
(*State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The characteristic peaks of twenty common amino acids were determined by ^{1}H NMR, and eighteen amino acids except cysteine (Cys) were rapidly identified in paediatric compound amino acid injection (18AA-Ⅱ). The interference of overlapping signals was excluded, and the specific proton signal was determined, which was verified by ^{13}C NMR and heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC) spectra to be accurate and effective. And tyrosine (Tyr) and acetyltyrosine (*N*-acetyl-Tyr) could be quantitatively determined using pyrazine as an internal standard, which provided a direct, rapid, simple and effective method for identifying multi-component amino acid preparations.

Key Words: amino acid; nuclear magnetic resonance; ^{1}H NMR; qualitative analysis; paediatric compound amino acid injection (18AA-Ⅱ)

氨基酸是一种小分子两性化合物，含有氨基和羧基官能团。常见的 20 种氨基酸是构成人体中蛋白质的主要单元，包括甘氨酸（Gly）、丙氨酸（Ala）、亮氨酸（Leu）、异亮氨酸（Ile）、缬氨酸（Val）、脯氨酸（Pro）、苯丙氨酸（Phe）、甲硫氨酸（Met）、色氨酸（Trp）、丝氨酸（Ser）、谷氨酰胺（Gln）、苏氨酸（Thr）、半胱氨酸（Cys）、天冬酰胺（Asn）、酪氨酸（Tyr）、天冬氨酸（Asp）、谷氨酸（Glu）、赖氨酸（Lys）、精氨酸（Arg）和组氨酸（His）。按侧链结构可分为非极性氨基酸和极性氨基酸，其中极性氨基酸又可分为电离和非电离极性氨基酸。临床上，氨基酸类药物是治疗蛋白质代谢紊乱或摄入不足、吸收障碍等引起的一系列疾病的重要手段[1−2]。氨基酸类处方药以复方氨基酸注射液为主，其处方由最初含 3 种氨基酸一直发展到目前含 20 种氨基酸。《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）已收载了复方氨基酸注射液（18AA）和复方氨基酸（15）双肽（2）注射液。小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）是由 18 种氨基酸以及辅料亚硫酸氢钠和牛磺酸按一定比例配制而成的胃肠道营养液，其中 Tyr 由

收稿日期：2022-06-01
作者简介：黄　凯（1996—），男，硕士研究生，专业方向：药品质量控制研究。
通信作者：贾幼智（1978—），女，副研究员，从事药品质量的研究。
E-mail：jiayouzhi@sinopharm.com

乙酰酪氨酸（*N*-acetyl-Tyr）和 Tyr 按一定比例组成，所以实际为 19 种氨基酸。目前，国内外药典均采用氨基酸分析仪或高效液相色谱（HPLC）法定量分析和定性鉴别氨基酸[3]。但是，随着近年来定量核磁的日渐普及，核磁共振（NMR）在氨基酸的定性定量分析中也得到了广泛应用[4—5]。NMR 法的主要优点在于无需分离即可同时检测样品中所有的氨基酸，灵敏度不取决于分析物的化学性质（如 pK_a 或疏水性），具有较强的重复性[6]。但多组分氨基酸样品存在 NMR 信号显著重叠的问题，相关文献报道通过数学建模或多维 NMR 法，如 2D ^{1}H-^{13}C 异核单量子相关谱（heteronuclear single quantum coherence spectroscopy，HSQC）可解决此问题[7—8]。

本研究基于 ^{1}H NMR 法，结合 ^{13}C NMR 和 HSQC 法，确定 20 种常见氨基酸的 ^{1}H 特征峰，快速鉴别小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）中除 Cys 外的 18 种氨基酸，同时有效区分 Tyr 和 *N*-acetyl-Tyr，以期为后续多组分氨基酸制剂的鉴别提供一种直接、快速、简便、有效的方式。

1 仪器与试药

AVANCE 600 MHz 型核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；XP6 型百万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）（上海长征富民金山制药有限公司，批号 A20011501、A20010501、A20011301、A20122501）；Gly 和 Ala（国药集团化学试剂有限公司）；Val、Ile、His、Phe、Cys 和 Gln（上海麦克林生化科技有限公司）；Leu、Ser、Met 和 Asn［萨恩化学技术（上海）有限公司］；Pro、Trp、Tyr、Thr、Arg 和 Glu（上海泰坦科技股份有限公司）；Asp（上海百灵威化学技术有限公司）；Lys（上海毕得医药科技有限公司）；以上试剂均为分析纯。吡嗪（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号 L1715120）；重水（D_2O，上海泰坦科技股份有限公司，批号 01115677）。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

单标对照品溶液：取 20 种氨基酸适量，精密称定，分别用重水溶解并制成氨基酸浓度为 50 μmol/ml 的单标溶液，即得各氨基酸单标对照品溶液。

混合对照品溶液：取 20 种氨基酸适量，精密称定，置同一量瓶中，用重水溶解并制成各氨基酸浓度均为 2.5 μmol/ml 的混合对照品溶液。

内标溶液：精密称定适量吡嗪，用重水溶解并制成每 1 ml 中含吡嗪 80 μmol 的内标溶液。

样品溶液 1：取 18AA-Ⅱ 600 μl，加入重水 100 μl，混匀，即得样品溶液 1。

样品溶液 2：取 18AA-Ⅱ 600 μl，加入内标溶液 20 μl，混匀，即得样品溶液 2。

2.2 NMR 分析

分别量取“**2.1**”项下单标和混合对照品溶液各 600 μl，移至 5 mm 核磁管中，分别进行 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 HSQC 试验。脉冲系列分别为 zgig、zgpg30 和 hsqcedetgp；试验温度为 25 ℃；扫描次数（NS）分别为 16、512、4 次；^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 延迟弛豫时间（D1）分别为 1、2 s。

取“**2.1**”项下样品溶液 1，移至 5 mm 核磁管中，分别进行 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、HSQC 谱图试验。脉冲系列分别为 noesygppr1d（水压制）、zgpg30 和 hsqcedetgp；试验温度、NS、^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 的 D1 与单标和混合对照品溶液一致。取“**2.1**”项下样品溶液 2，除 ^{1}H NMR 的 D1 改为 60 s 以外，其他测定步骤和参数与样品溶液 1 相同。

2.3 ^{1}H NMR 特征峰确认

取“**2.1**”项下混合对照品溶液，按“**2.2**”项下方法进行测试。基于质子化学位移、耦合裂分等信息，与单标对照品溶液的 ^{1}H NMR 谱进行比对，确定混合对照品溶液中 20 种氨基酸各质子信号归属，排除干扰峰以及易发生交换的活泼氢，筛选不发生重叠质子信号峰作为 ^{1}H NMR 鉴别特征峰。特征峰分别由 ^{13}C NMR 谱和 HSQC 谱证实准确有效。20 种常见氨基酸的 ^{1}H 特征峰信号和 ^{13}C 直接相关信号见表 1，20 种常见氨基酸混合对照品溶液的 HSQC 谱见图 1。

2.4 样品测定

取 4 批小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ），按“**2.1**”项下方法制备样品溶液 1，并按“**2.2**”项下条件进行测试，所得 ^{1}H NMR 谱按“**2.3**”项下鉴别特征峰结果进行定性归属。

结果见表 1，所测样品中除 Cys 外，均能快速

检测到 18 种氨基酸。*N*-acetyl-Tyr 通过苯环上质子（AA'BB'）信号确认特征峰归属，即 δ：7.08 ～ 7.10(d) 和 6.78 ～ 6.80(d)；Tyr 质子鉴别特征峰 δ：6.83 ～ 6.85(d)；Tyr 和 *N*-acetyl-Tyr 的物质的量比值为 1 ∶ 2.43，符合处方投料量。上述结果分别由 ^{13}C NMR 谱和 HSQC 谱证实准确。

3　讨论

3.1　^{1}H 特征峰的构建

氨基酸脂肪族的质子信号常在 0.50 ～ 4.50 内，因信号较为密集，易造成谱峰重叠的现象。氨基酸芳香族的质子信号一般集中在 6.80 ～ 8.00 内，谱峰重叠较少，具有较好的专属性，但含苯环或杂环结构的氨基酸仅限于 Trp、Tyr、His 和 Phe。因此，排除谱峰干扰和确定氨基酸特征峰这 2 个步骤尤为重要，可以此作为氨基酸的定性标准。

以 Trp 为例，Trp 的结构式为 $C_{11}H_{12}N_2O_2$，含 5 个芳香质子、3 个脂肪链质子和 4 个活泼氢质子。Trp 对照品的 ^{1}H-NMR 图（图 2B）显示一共有 8 组质子信号，其中芳香族质子 5 组，分别为 1[7.72 ～ 7.74(d)]、2[7.53 ～ 7.55(d)]、3[7.32(s)]、4[7.27 ～ 7.28(t)]、5[7.18 ～ 7.22(t)]；脂肪族质子 3 组峰，分别为 6[4.04 ～ 4.06(dd)]、7[3.47 ～ 3.50(dd)] 和 8[3.29 ～ 3.32(dd)]。比对混合对照品的 ^{1}H NMR 图（图 2A），排除质子重叠峰信号 (3 和 8)，确认 1、2、4、5、6 和 7 为鉴别特征峰，虽然 1 与组氨酸质子信号 [7.72(s)] 存在部分重叠，但不影响其定性结果，因此仍确定其为特征峰。^{13}C NMR 谱和 HSQC 谱可进一步验证归属的色氨酸质子鉴别特征峰的准确性。

3.2　样品测定

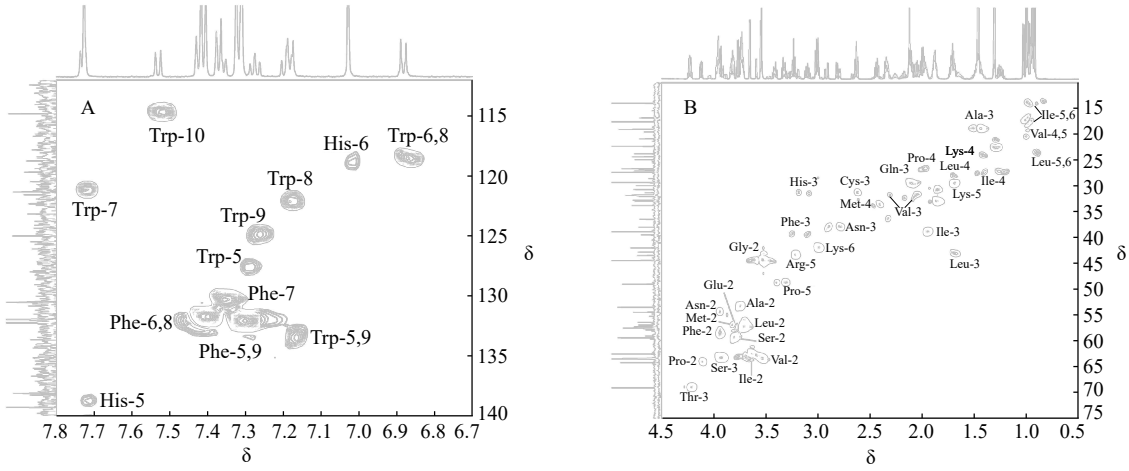
复方氨基酸注射液的 ^{1}H NMR 水峰信号极强，会干扰检测。因此本试验采用了水压制法，排除水峰干扰。为了核磁锁场，配制样品溶液时加入重水 100 μl，虽然样品经稀释后浓度略有降低，但不影

表 1　20 种常见氨基酸的 ^{1}H 特征峰和 ^{13}C 直接相关信号

Tab.1　^{1}H Characteristic Peaks and ^{13}C Direct Correlation Signals of Twenty Common Amino Acids

氨基酸	对照品		样品		氨基酸	对照品		样品	
	^{1}H特征峰	^{13}C	^{1}H特征峰	^{13}C		^{1}H特征峰	^{13}C	^{1}H特征峰	^{13}C
Gly	α: 3.55(s)	44.3	3.51(s)	44.3	Gln	γ: 2.41～2.50(m)	33.7	N.D.	N.D.
Ala	β: 1.47～1.48(d)	19.0	1.42～1.43(d)	18.9	Asn	β_1: 2.84～2.98(dd)	37.3	N.D.	N.D.
Tyr	ε和η: 6.88～6.90(d)	118.7	6.83～6.85(d)	118.6	Cys	β_1: 3.10～3.13(dd)	27.6	N.D.	N.D.
	α: 3.66～3.67(d)	62.4	3.61～3.62(d)	62.3		α: 3.60～3.61(d)	63.2	3.55～3.56(d)	63.2
	γ: 1.22～1.29(m)	27.3	1.17～1.25(m)	27.1		β: 2.24～2.60(m)	32.0	2.19～2.25(m)	31.8
Ile	β～CH_3: 1.00～1.01(d)	17.5	0.95～0.96(d)	17.4	Val	γ: 1.03～1.04(d)	20.8	0.98～0.99(d)	20.7
	δ: 0.92～0.95(t)	14.0	0.87～0.90(t)	13.8		β～CH_3: 0.98～0.99(d)	19.5	0.93～0.94(d)	19.4
Leu	α: 3.71～3.75(dd)	56.3	3.67～3.69(dd)	56.3	Met	γ: 2.62～2.64(t)	31.6	2.57～2.60(t)	31.5
	δ: 0.95～0.97(t)	23.7	0.90～0.92(t)	23.6		S～CH_3: 2.13(s)	16.8	2.08(s)	16.7
	ε和η: 7.41～7.43(t)	132.0	7.36～7.38(t)	131.8		β: 4.24～4.28(m)	68.7	4.19～4.23(m)	68.7
Phe	ζ: 7.36～7.38 (t)	130.5	7.31～7.33 (t)	130.3	Thr	α: 3.59～3.60(d)	63.3	3.54～3.55(d)	63.2
	δ和θ: 7.32～7.33(d)	132.2	7.27～7.28(d)	132.0		γ: 1.32～1.33(d)	22.3	1.27～1.28(d)	22.2
	α: 4.11～4.13(dd)	64.1	4.06～4.08(dd)	64.0		ζ: 7.72～7.74(d)	121.3	7.67～7.69(d)	121.1
						ι: 7.53～7.55(d)	114.7	7.48～7.50(d)	114.7
Pro	δ_1: 3.40～3.44(m)	48.9	3.35～3.39(m)	48.9	Trp	θ: 7.27～7.28(t)	124.9	7.22～7.24(t)	124.8
						η: 7.18～7.22(t)	122.3	7.13～7.16(t)	122.1
	δ_2: 3.30～3.36(m)	48.9	3.26～3.31(m)	48.9		α: 4.04～4.06(dd)	58.1	3.99～4.01(dd)	57.9
						β_1: 3.47～3.50(dd)	29.3	3.42～3.45(dd)	29.2
Ser	β_1: 3.93～3.97(dd)	63.0	3.88～3.91(dd)	63.0	Lys[1)]	ε: 2.92～2.95(t)	42.6	2.96～2.99(t)	42.0
His[1)]	δ: 7.73(s)	139.3	7.88(s)	138.7	Arg[1)]	δ: 3.18～3.21(t)	43.8	3.17～3.20(t)	43.3
	ε: 7.03(s)	119.6	7.06(s)	119.8					
Glu[2)]	β: 2.09～2.20(m)	28.5	2.17～2.26(m)	32.4	Asp[2)]	β_1: 2.94～2.98(dd)	37.8	3.02～3.05(dd)	39.1
N-acetyl-Tyr	—	—	δ和θ: 7.08～7.10(d)	133.2					
			ε和η: 6.78～6.80(d)	118.0					

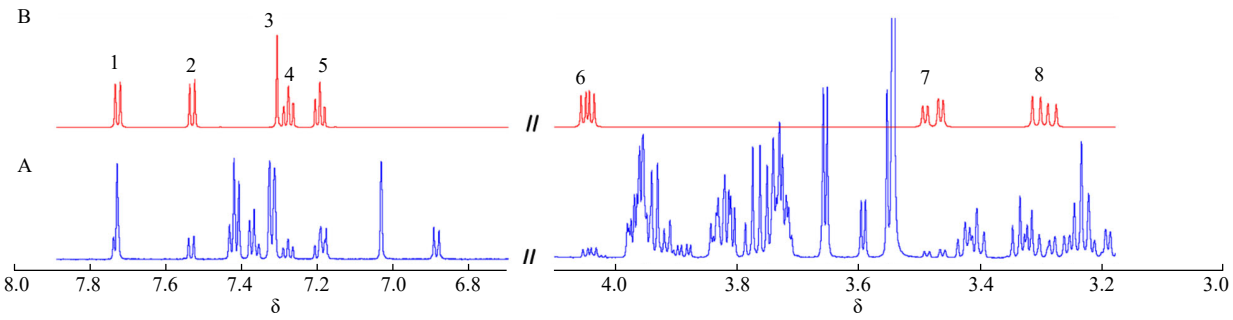
注：[1)] 碱性氨基酸；[2)] 酸性氨基酸；“—”表示未测试该数据；“N.D.”表示未检出。



A：低场区（上：^{1}H NMR 谱，左：低场 HSQC 谱，^{1}H NMR 谱化学位移：6.7 ～ 7.8），
B：高场区（上：^{13}C NMR 谱，左：高场 HSQC 谱，^{1}H NMR 谱化学位移：0.5 ～ 4.5）

图 1　20 种常见氨基酸混合对照品的 HSQC 谱

Fig.1　HSQC Spectra of Twenty Common Amino Acid Mixed Reference Materials



A：混合对照品溶液，B：单标（Trp）对照品溶液

图 2　Trp 的 ^{1}H NMR 特征峰的构建

Fig.2　Construction of ^{1}H NMR Characteristic Peaks of Trp

响后续定性试验。

通过对比小儿复方氨基酸注射液（18AA-Ⅱ）样品的 ^{1}H NMR 谱与“**2.3**”项下的 ^{1}H 鉴别特征峰，发现样品中目标氨基酸化学位移会有一定的偏移，其中非电离氨基酸 ^{1}H 特征峰化学位移均比对照品特征峰低约 30 Hz，而酸性或碱性氨基酸与对照品特征峰差异一般在 6 ～ 90 Hz 不等。分析其原因可能为溶液的 pH 值和样品浓度是影响化学位移的重要因素，而混合对照品溶液的 pH 值（pH 5.9）和样品溶液的 pH 值（4 批样品的 pH 值均在 6.6 ～ 6.8）有差异。4 批样品的 ^{1}H NMR 谱显示各个质子的化学位移几乎未发生变化，说明本方法适用性良好。

本次试验未检测到 Cys（说明书标示量<0.2 g/L），主要原因很可能是其在样品中含量较低，600 MHz NMR 检测仪的灵敏度不满足其检测要求；另一方面，Cys 的性质不稳定，样品说明书中未控制 Cys 含量，同时 ChP 2020 收载的复方氨基酸注射液部分品种也未控制 Cys 含量，或放宽了含量限度。

样品处方显示 Tyr 和 *N*-acetyl-Tyr 的质量浓度分别为 0.4、1.2 g/L，物质的量浓度比为 1 ∶ 2.44。^{1}H NMR 谱显示 2 组 AA′ BB′ 峰［7.08 ～ 7.10 (d) 和 6.78 ～ 6.80 (d)］，归属为 *N*-acetyl-Tyr 苯环上的特征

峰；Tyr 的特征峰［6.83 ～ 6.85(d)］。采用 ^{1}H NMR 相对定量法测得 Tyr ∶ *N*-acetyl-Tyr 物质的量比为 1 ∶ 2.43（图 3）。进一步采用 ^{1}H qNMR 定量法，平行配制 2 份样品溶液 2，按照选定的 NMR 条件测定峰面积，以内标法进行测定。*N*-acetyl-Tyr 和 Tyr 的含量按式①进行计算。

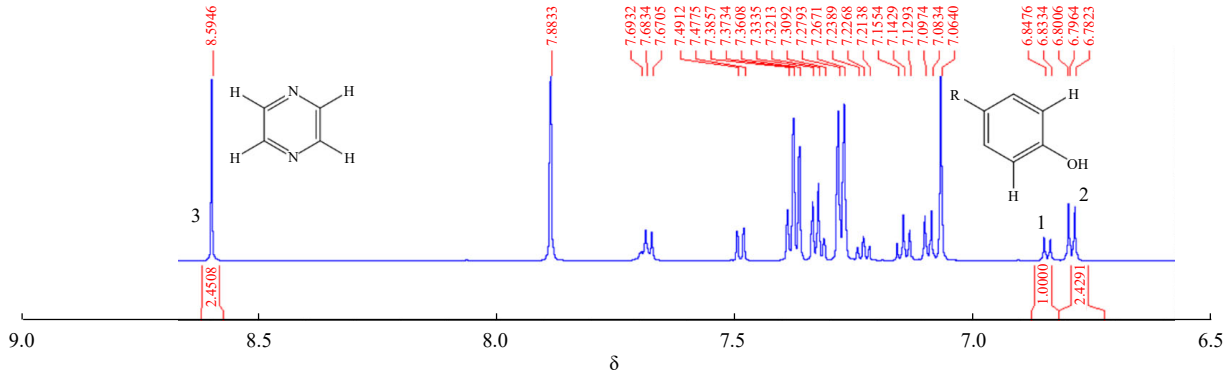
$$W=\frac{(A_s/n_s)\times M_s\times m_r}{(A_r/n_r)\times M_r\times m_s}\times W_r \qquad 式①$$

式中：A_s 为被测样品定量峰的积分面积；n_s 为被测样品定量峰包含的质子数；M_s 为被测样品的相对分子质量；A_r 为内标物质定量峰的积分面积；n_r 为内标物质定量峰包含的质子数；M_r 为内标物质的相对分子质量；m_r 为称取的内标物质量；W_r 为内标的质量分数；m_s 为样品质量。

以吡嗪作为内标物，分别以 δ 6.83 ～ 6.85(d) 和 δ 6.78 ～ 6.80(d) 作为 Tyr 和 *N*-acetyl-Tyr 的定量峰，2 份溶液测定结果的含量平均值（*n*=2）分别为 100.4%和 98.6%，与处方基本一致，说明本方法准确度良好。

4　小结

本研究基于水压制 ^{1}H NMR 法抑制了水信号，建立了 20 种常见氨基酸的质子鉴别特征峰并应用于含 19 种氨基酸的小儿复方注射液的组分快速分析。本次研究仅选择 1 个品种的 4 批样品进行氨基酸 NMR 定性方法的应用，后期将扩展至不同样品、更多批次以及更多品种，进一步考察质子鉴别特征峰的适用性和有效性。在本研究建立的质子鉴别特征峰的基础上，进一步筛选可定量的质子信号，并选择合适的脉冲序列和优化参数，以确保水压制脉冲可准确定量分析。



1 - Tyr［δ: 6.83 ～ 6.85(d)］；2 - *N*-acetyl-Tyr［δ: 6.78 ～ 6.80(d)］；3 - 吡嗪［δ: 8.59(s)］

图 3　*N*-acetyl-Tyr 和 Tyr 的 ^{1}H qNMR 谱（低场）

Fig.3　^{1}H qNMR Spectrum of *N*-acetyl-Tyr and Tyr (Low Field)

参考文献：

［1］ 顾　燕, 钟晓萍, 王承芳. 小儿复方氨基酸注射液与小剂量654-2联合应用治疗小儿轮状病毒感染性腹泻的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2014, **12**(17): 270-271.

［2］ 陆崇兴. 小儿复方氨基酸注射液治疗小儿腹泻效果评价[J]. 中国药物经济学, 2014, **9**(11): 12-13.

［3］ 万丹晶, 陈妙芬, 翟咏虹. 用HPLC法和氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中18种氨基酸[J]. 药学服务与研究, 2006, **6**(3): 212-214.

［4］ 常利平, 杨　扬. 甘氨酸的核磁共振分析研究[J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(19): 9937-9938.

［5］ YAMAZAKI T, EYAMA S, TAKATSU A. Concentration measurement of amino acid in aqueous solution by quantitative ^{1}H NMR spectroscopy with internal standard method [J]. *Anal Sci*, 2017, **33**(3): 369-373.

［6］ KASPAR H, DETTMER K, GRONWALD W, *et al*. Advances in amino acid analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, **393**(2): 445-452.

（下转第1317页）

and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **174**: 471-478.

[14] 任 锟, 邱怡婷, 王晓兰, 等. 基质补偿-电感耦合等离子体质谱法测定脂肪乳注射液中铝元素含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, **38**(20): 2572-2574.

[15] 乔 娜, 包毓含, 杨 丽, 等. 基体稀释或基体匹配石墨炉原子吸收光谱法测定土壤样品中铅和镉[J]. 冶金分析, 2019, **39**(11): 9-15.

[16] 廖奕鸥, 刘 聪, 赵素云. 电感耦合等离子体原子发射光谱-内标法和基体匹配法测定氧化铝基催化剂中铂含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, **40**(S1): 295-296.

[17] 荣丽丽, 王 磊, 赵铁凯, 等. 微波碱熔ICP-AES基体匹配法测试石油焦中多元素研究[J]. 石油炼制与化工, 2020, **51**(9): 92-97.

[18] 徐长龙, 赵志飞, 宋娟娥. 电感耦合等离子体质谱法分析碘元素时的有机增敏效应及消除[J]. 环境化学, 2022, **41**(1): 405-408.

(上接第1310页)

[7] WELJIE A M, NEWTON J, MERCIER P, *et al*. Targeted profiling: quantitative analysis of ^{1}H NMR metabolomics data [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(13): 4430-4442.

[8] MARTINEAU E, TEA I, AKOKA S, *et al*. Absolute quantification of metabolites in breast cancer cell extracts by quantitative 2D ^{1}H INADEQUATE NMR [J]. *NMR Biomed*, 2012, **25**(8): 985-992.