

## • 基础研究 •

## 复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液制备工艺的优化

福建医科大学省立临床医学院 福建省急诊医学重点实验室 (福州 350001) 章九云 张嘉颖<sup>1</sup> 王立强<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 对复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液进行制备工艺的优化。**方法** 以注射液的颜色、氨基酸的含量、pH 值等作为指标, 采用单因素考察法对溶解温度、加料顺序、活性炭的使用量、抗氧化剂的种类和用量、灭菌工艺进行考察。**结果** 考察后的工艺条件为 70 ℃ 溶解原料, 加入醋酸调 pH 至 5.4~6.0, 分两次加入 0.01% 的活性炭吸附 15 min, 0.05% 的亚硫酸氢钠作为抗氧化剂, 121 ℃、10 min 灭菌。**结论** 优化后的工艺条件为复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液的工业化开发提供实验室依据。

**【关键词】** 复方氨基酸 (15) 双肽 (2); 单因素考察; 工艺研究

**【中图分类号】** R319 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2020)01-0138-03

复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液是一种含有 8 种氨基酸、2 种半必需氨基酸、5 种非必需氨基酸和甘氨酸-L-谷氨酰胺 (Gly-Gln)、甘氨酸-L-酪氨酸 (Gly-Tyr) 双肽的复方制剂, 其中甘氨酸-L-谷氨酰胺是由乙酰氯与 L-谷氨酰胺酰胺化得到<sup>[1]</sup>, 主要提供谷氨酰胺, 由于其热不稳定和灭菌过程中的降解作用<sup>[2]</sup>, 导致 L-谷氨酰胺在普通复方氨基酸中的应用受到限制, 不利于补充危重患者的肠外营养促进其治疗。甘氨酸与酪氨酸进行缩合成双肽之一甘氨酸-L-酪氨酸<sup>[3]</sup>, 从而改善酪氨酸水溶性差、生物利用度低的作用。含有双肽的复方氨基酸注射液一方面在体内可以分解成促进蛋白合成和调节人体氮平衡的甘氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸这 3 种氨基酸, 另一方面由于注射液中未添加游离的甘氨酸, 使其双肽结构稳定, 有利于工业开发与生产。本文对复方注射液的工艺条件进行研究, 拟得到质量优良的复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液, 为其工业化开发提供实验室依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 高效液相色谱仪 (日本岛津), 色谱柱: 4.6 mm×25 cm, 填料为 5 μm 的 C18 色谱柱; FA1004B 电子天平 (上海越平科学有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司); PHS-3C pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); YXQ-LS-50Si 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博迅实验公司医疗设备); 其他试剂均为分析纯。本研究采用的复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液为 15 种氨基酸和 2 种二肽组成的灭菌注射液, 规格为 500 mL: 67 g (氨基酸/双肽), 其单位处方组成参见文献<sup>[4-5]</sup>。

## 1.2 方法:

**1.2.1 温度对溶解的影响:** 根据对方中 15 种氨基酸理化性质的了解, 发现苯丙氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、谷氨酸和色氨酸在室温下较其他氨基酸不易溶于水。现称取处方量苯丙氨酸 ( $C_9H_{11}NO_2$ ) 2.925 g、天冬氨酸 ( $C_4H_7NO_4$ ) 1.700 g、亮氨酸 ( $C_6H_{13}NO_2$ ) 3.950 g、谷氨酸 ( $C_5H_9NO_4$ ) 2.800 g、色氨酸 ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) 0.950 g 各溶

解于 500 mL 水中, 确定磁力搅拌转速, 考察在 50、60、70、80 ℃ 4 种水浴温度下上述氨基酸的溶解时间。

### 1.2.2 复方氨基酸加料顺序的考察:

**1.2.2.1 醋酸加入顺序:** 作为 pH 调节剂, 本研究设计按照在溶解氨基酸之前加入醋酸和在溶解氨基酸之后加入 2.53 g/1 000 mL 醋酸两种方式考察其加入顺序对复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液 pH 的影响。

**1.2.2.2 氨基酸的加入顺序:** 预实验表明氨基酸的加入顺序会影响溶液的 pH 和颜色, 因此需要考察氨基酸的加入顺序。将醋酸先加入水中, 然后分别按照氨基酸等电点的升序和降序依次加入, 121 ℃ 15 min 灭菌, 70 ℃ 条件下放置 10 天后, 比较溶液的颜色。

**1.2.3 活性炭用量的筛选:** 按处方比例配置复方氨基酸注射液, 选用活性炭吸附杂质和热源, 其用量会影响个别氨基酸的含量, 考察 0.01%、0.02% 和 0.03%、0.04% (w/v) 4 种不同浓度下的吸附效果与对氨基酸含量的影响, 时间为 20 min, 溶解温度为 70 ℃。根据每 1 mL 中含内毒素量小于 0.5 EU 的要求对细菌内毒素进行检测, 最终对各组分的含量进行检测, 优选最佳的活性炭用量<sup>[6-7]</sup>。

**1.2.4 活性炭吸附时间的考察:** 吸附时间对氨基酸含量的影响较大, 因此考察活性炭的浓度为 0.02% 时吸附时间。按处方比例配置复方氨基酸注射液, 采用单因素考察法对 15、25、35 min 3 个时间进行保温吸附, 以各氨基酸的含量为指标确定最优吸附时间。

**1.2.5 抗氧化剂种类与用量的筛选:** 注射液中色氨酸易被氧化, 因此选择加料前向溶液中通入氮气, 控制残氧量为 5 ppm 以减少抗氧化剂的用量提高安全性<sup>[8]</sup>, 加入抗氧化剂以保证除氧效果, 其种类和用量为考察目标。2015 年版药典收载的复方氨基酸注射液, 目前选用亚硫酸氢钠和焦亚硫酸钠作为抗氧化剂。将分别加入 0.1% (W/V) 亚硫酸氢钠和焦亚硫酸钠的样品, 放置于 70 ℃ 恒温箱, 10 天后取出对比颜色。抗氧化剂的用量不仅影响抗氧化效果, 还与注射液的安全性相关, 考察用量很重要。将处方量下制备的注射液平

均分为 5 份, 分别加入 0.00%、0.03%、0.05%、0.075% 和 0.1% (W/V) 的亚硫酸氢钠, 放置于 70 °C 恒温箱中, 10 天后取出。

1.2.6 灭菌参数的筛选: 根据上述考察的工艺条件制备一批样品, 平均分为 5 等份, 编号为样品 A、样品 B、样品 C、样品 D、样品 E。按照欧盟对 F<sub>0</sub> 值的要求进行灭菌条件筛选。

## 2 结果

2.1 温度对溶解的影响: 结果如图 1 所示, 当温度达到 70 °C 时, 5 种氨基酸的溶解时间均控制在 10 min 之内, 溶液颜色无变化; 当温度高至 80 °C 时, 溶解时间短暂, 但溶液颜色明显变化, 分析原因为高温导致氨基酸降解, 因此确定氨基酸的溶解温度为 70 °C。

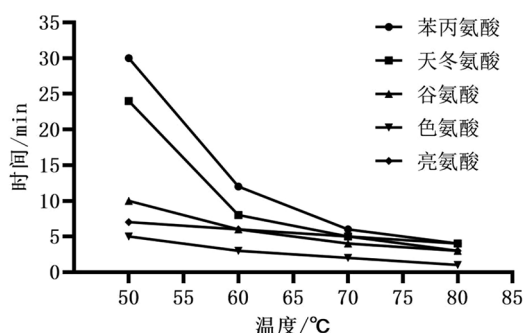


图 1 不同氨基酸溶解温度—时间图

## 2.2 复方氨基酸加料顺序的考察:

2.2.1 醋酸加入顺序: 处方中的醋酸为 pH 调节剂, 其加入的先后顺序会影响复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液的 pH。先加入醋酸, 最终测定溶液的 pH 为 5.8, 在溶解氨基酸之后加入醋酸, 最终测定溶液的 pH 为 5.1, 依据处方的质量标准要求, 采用先加入醋酸再加入处方量的氨基酸的方法调节 pH。

2.2.2 氨基酸加入顺序: 结果显示按升序加料颜色浅于降序加料顺序, 因此确定氨基酸加入顺序为门冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、甘氨酸。

2.3 活性炭用量的筛选: 上述 4 种活性炭用量均对 pH 无影响。当活性炭用量为 0.01% 时, 细菌内毒素检测为不合格; 其余 3 种均检测合格。活性炭用量为 0.02%、0.03% 时活性炭对氨基酸的吸附影响较小, 但使用 0.03% 用量的活性炭时对谷氨酸、赖氨酸等个别氨基酸的含量影响较大。因此确定活性炭浓度为 0.02%。

2.4 活性炭吸附时间的考察: 当吸附时间为 15 min 时, 活性炭对氨基酸含量的影响最小。活性炭加入一定时间后, 吸附和脱吸附会达到动态平衡<sup>[9]</sup>, 为此我们采用分次吸附的方法分两次加入活性炭。加入量均为 0.01%, 在 70 °C 下保温吸附 15 min, 经过对分次加入活性炭和一次性加入活性炭的药液澄清度进行对比, 发现分次吸附效果优于一次吸附。

2.5 抗氧化剂种类与用量的筛选: 加入亚硫酸氢钠的样品

颜色明显浅于焦亚硫酸钠, 因此确定亚硫酸氢钠作为抗氧化剂。当加入 0.03% 亚硫酸氢钠的溶液变微黄, 而加入 0.05%、0.075% 和 0.1% 亚硫酸氢钠的未发生变化。因此确定抗氧化剂的加入量为 0.05%。

2.6 灭菌参数的筛选: 4 个不同灭菌参数的 F<sub>0</sub> 值均大于 8, 对 pH 几乎无影响; 但灭菌时间较长时会影响溶液颜色 (表 1)。表 2 为各灭菌参数对氨基酸含量的影响, 以样品 E 中各氨基酸含量按 100% 计, 计算样品 A、B、C、D 中各氨基酸的含量, 对比结果可知, 样品 A 和样品 C 中的含量变化较小, 综合考虑产品质量和灭菌效果, 最终采用 121 °C、10 min 灭菌。

表 1 不同灭菌参数汇总表

样品名称	灭菌温度	灭菌时间	最小 F <sub>0</sub> 值	pH 值	性状
样品 A	121 °C	10 min	16.8	5.84	几乎无色
样品 B	121 °C	15 min	18.9	5.74	微黄色透明
样品 C	105 °C	30 min	8.9	5.69	几乎无色
样品 D	115 °C	25 min	12.6	5.75	微黄色透明
样品 E		未灭菌		5.92	几乎无色

表 2 不同灭菌条件氨基酸的含量

氨基酸名称	氨基酸含量/%				
	样品 E	样品 A	样品 B	样品 C	样品 D
门冬氨酸	100.0	94.7	89.2	91.2	85.7
丝氨酸	100.0	92.9	90.1	91.2	91.5
谷氨酸	100.0	94.4	85.3	93.1	86.8
组氨酸	100.0	95.0	92.3	96.2	95.5
甘氨酸	100.0	97.3	94.5	95.3	96.1
精氨酸	100.0	94.6	91.2	94.9	94.8
苏氨酸	100.0	94.8	91.8	93.2	93.5
丙氨酸	100.0	94.5	88.3	92.0	90.2
脯氨酸	100.0	96.1	93.2	94.8	95.0
缬氨酸	100.0	94.2	90.1	92.3	93.0
甲硫氨酸	100.0	95.5	94.3	97.3	96.6
赖氨酸	100.0	93.8	85.3	92.0	88.9
异亮氨酸	100.0	94.9	91.4	93.7	94.1
亮氨酸	100.0	96.7	93.4	95.7	96.1
苯丙氨酸	100.0	98.0	95.3	98.8	98.3
色氨酸	100.0	97.4	85.5	92.2	87.5

## 3 讨论

本文考察了溶解温度、加料顺序、活性炭用量和时间、抗氧化剂的种类和用量、灭菌参数对复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液 pH 和质量的影响, 优选制备工艺。溶解温度不仅影响注射液中氨基酸的质量和含量, 在实际生产时也是影响制备总时长的一大因素, 根据对处方中氨基酸理化性质的考察, 挑选出对温度敏感与难溶的氨基酸, 进行溶解温度测试, 最终得出最适宜溶解温度即为 70 °C。注射液最终 pH 值会影响长期稳定性, 因此根据此复方注射液处方的质量标准要求, 进行 pH 调节剂和氨基酸的加入顺序选择。为保证该注射液在后续处理、存储和运输过程中的质量, 以溶液性状为观察指标, 对抗氧化剂的种类和用量进行了考察, 最终

确定为 0.05% (w/v) 的亚硫酸氢钠, 同时, 整个操作过程保持通氮气以保证残氧量, 使处方中的氨基酸不被氧化分解。以 pH 和细菌内毒素为指标, 对活性炭用量进行首次筛选, 进而以各类氨基酸的吸附影响为标准进行二次筛选最终确定活性炭用量为 0.02%; 在进行吸附测试时发现: 采用分次吸附的方式效果优于单次吸附, 因此分次加入 0.01% 和 0.01% 的活性炭进行保温吸附 15 min 以得到最优吸附效果; 以 pH、性状和氨基酸含量为指标进行灭菌条件的考察, 最终选用 121 °C、10 min 作为灭菌生产条件。

复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液为平衡型肠外营养注射类药物, 直接输注的方式令其使用便捷, 被报道的不良反应事例较少; 但在很多医院使用的普及度却不如其他品种复方氨基酸注射液<sup>[10]</sup>, 考虑原因之一为制备生产成本相对较高。对复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液生产过程中部分关键因素进行工艺考察, 拟得到质量稳定的注射液, 以此为前提优化工艺与操作以减少生产时的所需成本是关键, 这也为复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液工业实际大生产提供实验室依据。本文所涉及的考察因素仅为部分因素, 我们进一步将仍以质量稳定为前提进行深入因素考察和工艺优化, 以期真正达到减少生产成本的目的, 使复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液成为临床中较为普及的营养注射液。

#### 参考文献

- [1] 解晓帅, 褚燕琦, 白向荣, 等. 复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液临床应用药调查研究 [J]. 药实践杂志, 2014, 32 (5): 374-375.
- [2] Peter F, Karin P, Peter S. Glutamine dipeptides in clinical nutrition [J]. Nutrition, 1997, 13 (7-8): 731-737.
- [3] Jiang Z M, Wang L J, Qi Y, et al. Comparison of parenteral nutrition supplemented with L-glutamine or glutamine dipeptides [J]. J parenter Enter Nutr, 1993, 17 (2): 134.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 (二部) 第 6 册 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 811-817.
- [5] 博思数据研究中心. 2012—2016 年中国仿制药行业市场分析 & 投资前景研究报告 [R]. 中商经济研究院 (北京), 2012.
- [6] 祝清芬, 冯巧巧, 肖英, 等. 复方氨基酸 (15AA) 双肽 (2) 注射液细菌内毒素检查方法研究 [J]. 中国药房, 2016, 33 (27): 4742-4744.
- [7] 周恩利, 王仁杰, 李森, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液活性炭吸附工艺的优选 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (20): 3993-3997.
- [8] 梁林. 复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液的工艺研究与质量评价 [D]. 黑龙江中医药大学, 2014.
- [9] 王璐璐, 陈少华, 相莉, 等. 门冬氨酸鸟氨酸注射液的处方与工艺优化研究 [J]. 中国医药指南, 2014, 12 (12): 51-52.
- [10] 周方杰, 赵云燕, 朱虹, 等. 复方氨基酸 (15) 双肽 (2) 注射液致不良反应 1 例 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30 (6): 764.
- [9] Kapoor G, Sinha R, Abedin S. Experience with high dose methotrexate therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia in a tertiary care cancer centre of a developing country [J]. Pediatric Blood & Cancer, 2012, 59 (3): 448-453.
- [10] Hashimoto H, Kubota M, Shimizu T, et al. Effect of high-dose methotrexate on plasma hypoxanthine and uridine levels in patients with acute leukemia or non-Hodgkin lymphoma in childhood [J]. Leukemia, 1992, 6 (11): 1199-1202.
- [11] 王弘, 迟昨非, 赫良纯, 等. 大剂量甲氨蝶呤治疗 180 例儿童急性淋巴细胞白血病的疗效、副作用和血药浓度监测意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19 (4): 949-952.
- [12] Ylinen E, Jahnukainen K, Saarinenpihkala U M, et al. Assessment of renal function during high-dose methotrexate treatment in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatric Blood Cancer, 2014, 61 (12): 2199-2202.
- [13] Sazawal S, Chaubey R, Kaur P, et al. MTHFR gene polymorphisms and the risk of acute lymphoblastic leukemia in adults and children: a case control study in India [J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2014, 30 (4): 219-225.
- [14] Cadenas N M, Yanes S F, Gonzalez M A, et al. Association of neural tube defects in children of mothers with MTHFR 677TT genotype and abnormal carbohydrate metabolism risk: a case control study [J]. Genet Mol Res, 2014, 13 (1): 2200-2207.
- [15] Karathanasis N V, Stiakaki E, Goulielmos G N, et al. The effect of RFC G80A polymorphism in Cretan children with acute lymphoblastic leukemia and its interaction with MTHFR C677T and A1298C polymorphisms [J]. Inter J Lab Hematol, 2014, 36 (4): 425-430.
- [16] 陈先睿, 黄建琪, 吴谨准, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与儿童急性淋巴细胞白血病化疗中甲氨蝶呤毒性相关性的 Meta 分析 [J]. 临床儿科杂志, 2018, 36 (6): 467-475.
- [17] 李菲, 尹郸丹, 孟黎, 等. 急性淋巴细胞白血病患者 GSTP1 及 MTHFR 基因多态性对大剂量甲氨蝶呤不良反应的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25 (3): 723-728.
- [18] Skarby T V, Anderson H, Heldrup J, et al. High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia, 2006, 20 (11): 1955-1962.
- [19] Widemann B C, Schwartz S, Jayaprakash N, et al. Efficacy of glucarpidase (carboxypeptidase g2) in patients with acute kidney injury after high-dose methotrexate therapy [J]. Pharmacotherapy, 2014, 34 (5): 427-439.

(上接第 124 页)