

首批 *L*-甲硫氨酸亚砷国家药品对照品的研制*

刘景坤, 张斗胜, 范慧红, 廖海明**

(中国食品药品检定研究院 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的:建立首批 *L*-甲硫氨酸亚砷国家药品对照品。**方法:**采用红外吸收光谱仪、核磁共振波谱仪及高分辨质谱仪对 *L*-甲硫氨酸亚砷对照品原料进行结构确证,并检查其水分、炽灼残渣、金属元素含量、残留溶剂、有关物质,采用质量平衡法、液相色谱法及定量核磁法对其含量进行测定和计算,采用质量平衡法对其含量进行赋值,最后考察了其引湿性、均匀性和稳定性。**结果:**试验结果确证了 *L*-甲硫氨酸亚砷的结构,水分为 0.23%, 炽灼残渣为 0.20%, 金属元素含量为 $10.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 有关物质为 5.09%, 未检出残留溶剂。以质量平衡法赋值首批 *L*-甲硫氨酸亚砷对照品的含量为 94.5%。本批次对照品含量均匀,短期稳定性试验结果证明 *L*-甲硫氨酸亚砷短期内稳定。**结论:**首批 *L*-甲硫氨酸亚砷国家药品对照品的研制成功,可用于氨基酸类药物有关物质的检查,规范相关药品质量,保证用药安全。

关键词: *L*-甲硫氨酸亚砷; 对照品; 结构确证; 有关物质; 质量平衡法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)08-1373-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0311

Establishment of the first batch of national drug reference standard of *L*-methionine sulfoxide*

LIU Jing - kun, ZHANG Dou - sheng, FAN Hui - hong, LIAO Hai - ming**

(National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To establish the first batch of national drug reference standard of *L*-methionine sulfoxide. **Methods:** The molecular structure of methionine sulfoxide was confirmed by the methods of IR, NMR and high resolution MS. Moreover, the moisture, residual solvents, residual ignition and related substances of *L*-methionine sulfoxide were determined, and then, its hygroscopicity, homogeneity and stability were also observed. Finally, mass balance method, HPLC and quantitative NMR were applied to determine and calculate its contents. **Results:** The results of experiments showed the structure of *L*-methionine sulfoxide were confirmed, its contents of moisture, residual ignition, metal elements and related substances were 0.23%, 0.20%, $10.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and 5.09%. The residual solvents were not detected in the samples. The final content of methionine sulfoxide was 94.5% by mass balance method. The contents of this batch of *L*-methionine sulfoxide were uniform, and it is stable in short - terms. **Conclusion:** The first batch of national drug reference standard of *L*-methionine sulfoxide was established, and it is used for the inspection for related substances of amino acid drug, which is helpful in normalizing drug quality and guaranteeing drug safety.

* 中检院化药所学科建设项目(2024HYZX35)

** 通信作者 Tel:(010)53851522;E-mail:lhm6636@163.com

第一作者 Tel:(010)53851455;E-mail:liujk18@163.com

Keywords: *L*-methionine sulfoxide; reference standard; structure confirmation; related substances; mass balance method

L-甲硫氨酸亚砷(*L*-methionine sulfoxides)由*L*-甲硫氨酸氧化而来,是含有甲硫氨酸成分药物中的一种常见杂质^[1-2],会对药物的质量安全产生影响^[3-5]。甲硫氨酸氧化后会失去原有活性,导致甲硫氨酸实际含量降低,影响药效^[6];蛋白中的甲硫氨酸残基也会被氧化成亚砷残基,据文献报道,这种改变会影响蛋白质本身的生物活性^[7-11],因此也会对相关蛋白质药物的药效产生影响。同时,越来越多的研究表明,甲硫氨酸和*L*-甲硫氨酸亚砷以及相关组成的蛋白质在生物体内发挥着不同的作用^[12-15],因此,甲硫氨酸氧化为*L*-甲硫氨酸亚砷这一变化过程会对很多药物质量产生影响。*L*-甲硫氨酸亚砷也是氨基酸注射液等临床用药或相关生物制品质控中的重要检查对象。为规范产品质量,减少不良反应的发生,满足企业生产需求,同时也为相关药物研发或治疗方法的开发提供基础对照,研制*L*-甲硫氨酸亚砷国家对照品具有重要意义。本文对*L*-甲硫氨酸亚砷原料进行了质量分析,建立了首批*L*-甲硫氨酸亚砷国家药品对照品。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

XPE205 电子天平, $d=0.01$ mg, Mettler Toledo 公司;UV-2600 紫外-可见分光光度计,Shimadzu 公司;Alpha II 红外光谱仪,Bruker 公司;QE 高分辨质谱仪,Thermo Fisher 公司;LC-40 液相色谱仪,Shimadzu 公司;MP230K pH 计,Mettler Toledo 公司;Metrohm 890 水分测定仪,Metrohm 公司;7890B+7697A 顶空进样-气相色谱仪,Agilent 公司;Optima 7000 ICP-OES,PE 公司;350 ICP-MS,PE 公司;Advantage 动态水分吸附仪,SMS 公司;Flash Smart 氮分析仪,Thermo Fisher 公司;AVANCE NEO 600M 核磁共振仪,Bruker 公司。

1.2 试剂

L-甲硫氨酸亚砷原料(批号 0615-RD-0010)购自广州佳途科技股份有限公司;*L*-甲硫氨酸亚砷(98.0%)、*L*-甲硫氨酸砷(99.1%)对照品购自 USP;18 种必须氨基酸及脯氨酸对照品(批号 140624-201506)、马来酸内标对照品(批号 510137-201601,纯度 99.8%),中国食品药品检定研究院;钴、锂、砷、镉、汞、铅、铜、钒、镍、铈、铈等 12 种金属元素标准溶液购

自中国计量科学研究院,质量浓度均为 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;甲醇、乙腈、二氯甲烷、丙酮等有机溶剂均为色谱纯,购自 ThermoFisher 公司;重水购自 Sigma 公司;磷酸、硫酸、醋酸、磷酸盐等无机试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别与结构确证

2.1.1 外观性状 目视供试品为淡黄色粉末,无特殊异味。

2.1.2 引湿性 取本品适量,置动态水分吸附分析仪中测定,增重为 2.18%,归类为有引湿性(2%~15%)。

2.1.3 红外光谱 采用溴化钾压片法制样,分别取适量供试品和对照品加溴化钾研细后压片制样,利用傅里叶变换红外光谱仪扫描,次数为 32,分辨率为 4.0,得到供试品和对照品的红外光吸收图谱,如图 1 所示,二者红外吸收光谱一致。

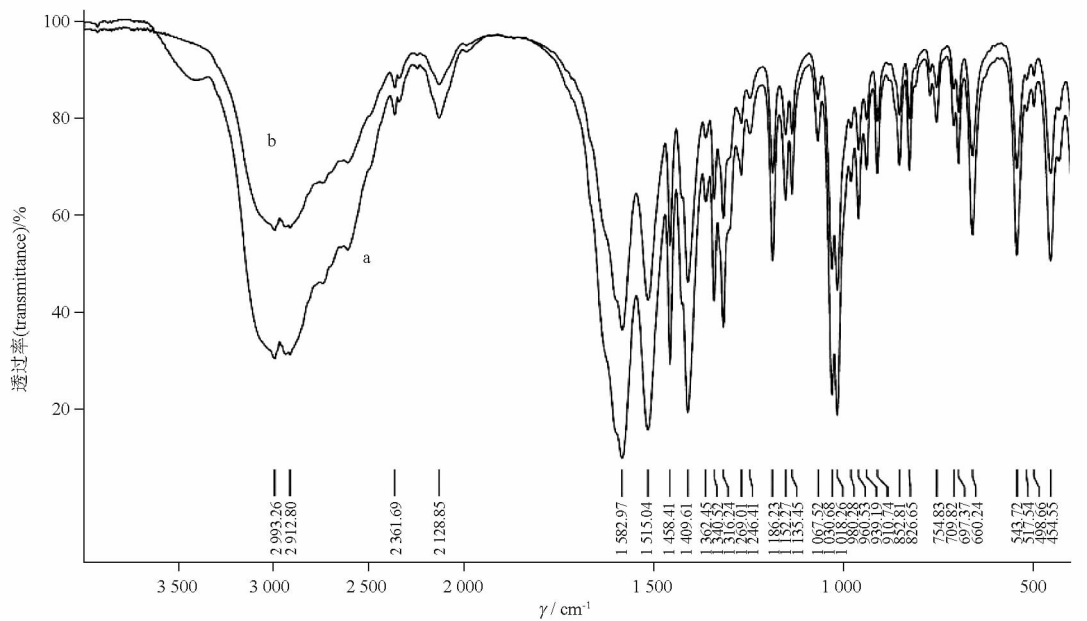
2.1.4 核磁共振图谱 分别称取适量*L*-甲硫氨酸亚砷对照品和供试品,用重水配制成质量浓度约为 $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,置核磁管中测试,结果如图 2 所示,对照品与供试品的氢谱、碳谱图谱一致。

2.1.5 高分辨质谱 称取适量供试品,用乙腈-水(1:1)配制成质量浓度约为 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,用高分辨质谱负离子模式扫描,喷雾电压设置为 3.5 kV,鞘气流速为 3 030 kPa,辅助器流速为 1 010 kPa,辅助气温度 320 °C,毛细管电压 15 V,毛细管温度 320 °C,分辨率为 70 000。结果如图 3 所示, $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 峰的质荷比为 164.037 40,其理论计算值应为 164.038 69,误差为 $\delta 7.86$,说明测量值与理论值吻合。

2.2 检查

2.2.1 水分 取供试品约 20 mg,置 10 mL 顶空瓶中,压盖密封,采用卡式炉加热库仑滴定方法测定,卡式炉温度为 120 °C,平行测定 6 次,空白 2 次,最后测得平均水分含量为 0.23%。

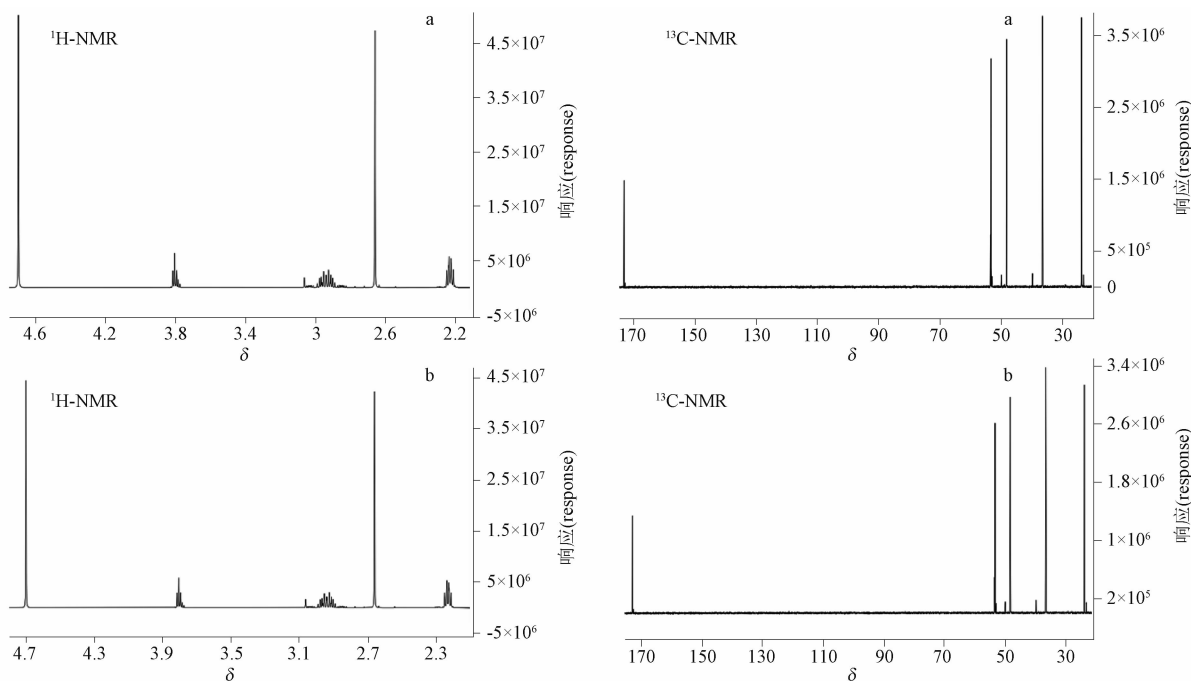
2.2.2 炽灼残渣 将坩埚 750 °C 炽灼冷却后称量,准确称取供试品约 1.0 g,置于恒重后的坩埚中炽灼完全后冷却称量,经测定,供试品炽灼残渣含量为 0.20%。



a. 对照品 (reference substance) b. 供试品 (sample)

图 1 L-甲硫氨酸亚砜红外图谱

Fig. 1 IR absorption spectra of L-methionine sulfoxide



a. 对照品 (reference substance) b. 供试品 (sample)

图 2 L-甲硫氨酸核磁共振图谱

Fig. 2 NMR spectra of L-methionine sulfoxide

2.2.3 残留溶剂 精密称定供试品约 200 mg, 置于 20 mL 顶空瓶中, 加无水硫酸钠 0.2 g 及水 1 mL 后压盖密封, 剧烈震荡促进分散, 后用顶空进样-气相色谱法进行测定, 顶空温度为 90 °C, 时间为 30 min,

进样口 200 °C, 色谱柱为 DB-624, 50 °C 保持 6 min, 以 40 °C · min⁻¹ 后升至 220 °C 保持 2 min, FID 检测器, 温度为 280 °C。结果无溶剂峰检出, 表明供试品未检出残留溶剂。

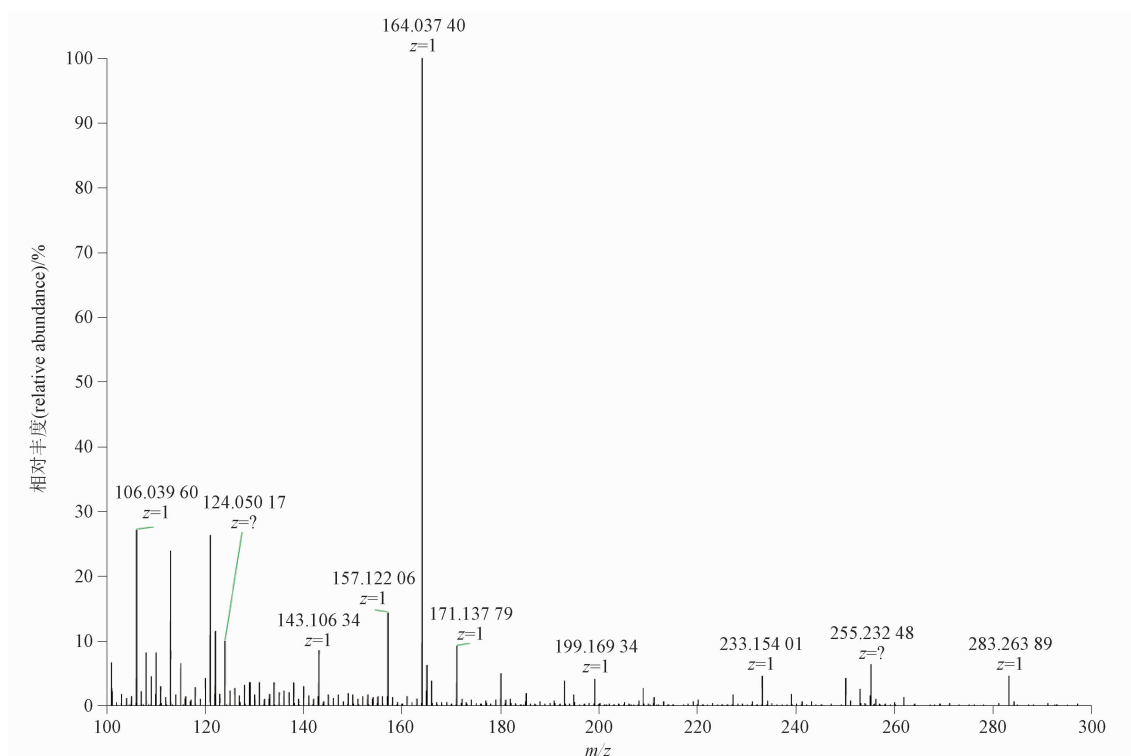


图3 L-甲硫氨酸亚砜氨酸负离子扫描模式高分辨质谱图

Fig. 3 HR-MS spectrum of L-methionine sulfoxide

2.2.4 金属元素 精密称定供试品约 25 mg, 用 2% 稀硝酸溶解并定容至 50 mL 备用, 用 2% 稀硝酸稀释钾元素的标准溶液得到质量浓度分别为 1、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 建立标准曲线, 以 2% 稀硝酸溶液为空白溶液, 采用电感耦合等离子体发射光谱法测定, 外标法定量, 结果测得供试品中钾、钙、钠的含量分别为 0.01%、0.05%、0.05%。

将 12 种金属元素的标准溶液用 5% 硝酸配制系列浓度的对照溶液 (不同元素浓度不同), 分别加金元素的标准溶液。取供试品适量, 精密称定, 加硝酸 2.5 mL 消解后加水稀释, 加金元素标准溶液 (使得金的终浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 将以上溶液用电感耦合等离子体质谱法测定, 对照品中钴含量 $0.06 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、砷含量 $0.36 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、镉含量 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、汞含量 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、铅含量 $0.11 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、铜含量 $9.07 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、镍含量 $1.15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、铈含量 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、铯含量 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 总量为 $10.87 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

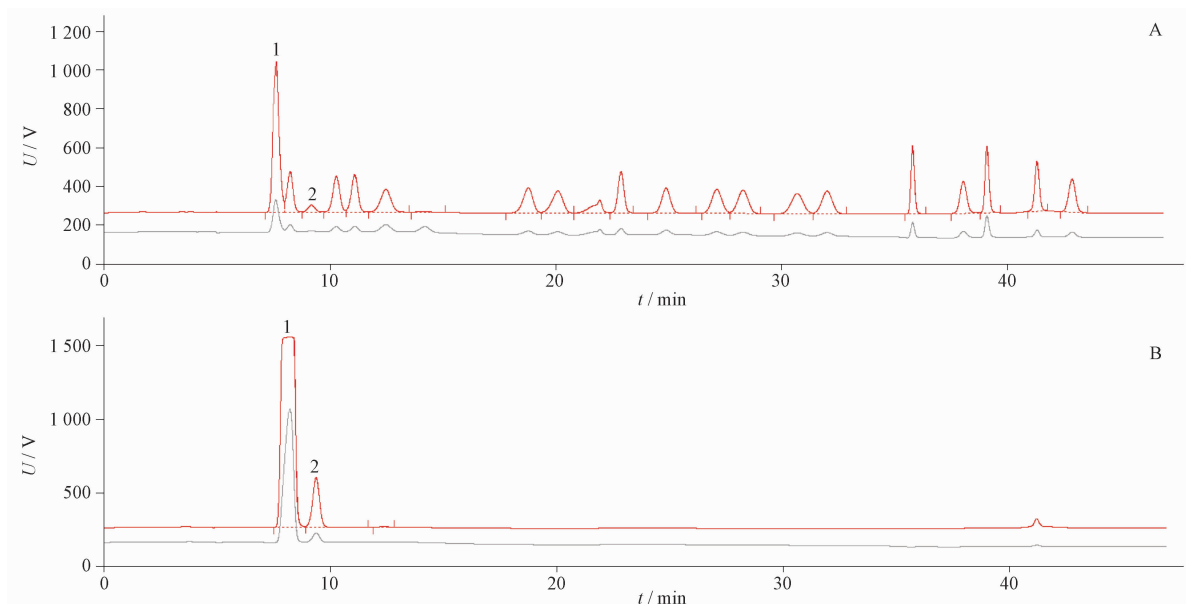
2.2.5 有关物质 分别对氨基酸类和非氨基酸类的有关物质进行考察。氨基酸类有关物质采用氨基酸分析仪, 离子交换柱-茚三酮衍生法进行检查, 非氨基酸类有关物质采用 C_{18} 柱紫外检测进行检查。

氨基酸类有关物质检查, 使用 Skyam LCAK06/Na 柱分离, 枸橼酸缓冲液-硼酸盐缓冲液-甲醇洗脱体系进行洗脱, 检测波长为 570 nm (一级氨基酸) 和 440 nm (二级氨基酸), 系统适应性为 18 种氨基酸及脯氨酸混合溶液, 采用主成分自身对照法计算, 结果表明氨基酸类有关物质主要为甲硫氨酸砜 (含量 4.25%), 部分为谷氨酸 (含量 0.08%), 二者总含量为 4.33%, 其他氨基酸未检出, 如图 4、5 所示。

非氨基酸类有关物质检查, 采用乙腈-磷酸水溶液体系洗脱, 经试验, 甲硫氨酸砜和谷氨酸不存在末端吸收, 故检测波长采用 205 nm。结果表明, 非氨基酸类有关物质总量为 0.76%, 其中单个最大有关物质含量为 0.53%, 如图 4 所示。最后确定, 本批次甲硫氨酸有关物质总含量为 5.09%, 单个最大含量有关物质为甲硫氨酸砜, 含量为 4.25%, 最大单个未知杂质含量为 0.53%。

2.3 含量赋值

分别用氮分析法、核磁定量法和质量平衡法来测定和计算供试品的含量。氮分析法中左右炉温分别为 950 $^{\circ}\text{C}$ 和 840 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速

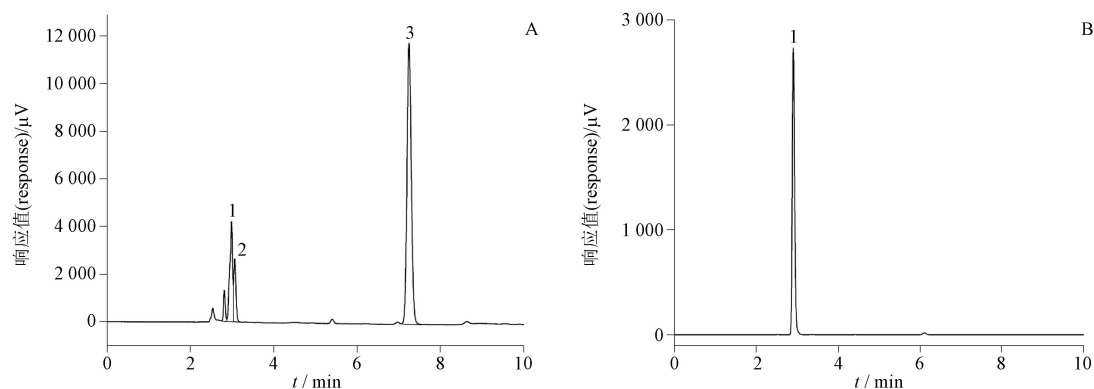


1. *L*-甲硫氨酸亚砜(*L*-methionine sulfoxide) 2. 甲硫氨酸砜(methionine sulfone)

A. 系统适用性溶液(system suitability solution) B. 供试品溶液(sample solution)

图4 离子色谱图

Fig. 4 Ion chromatography spectra



1. *L*-甲硫氨酸亚砜(*L*-methionine sulfoxide) 2. 甲硫氨酸砜(methionine sulfone) 3. 甲硫氨酸(methionine)

A. 系统适用性溶液(system suitability solution) B. 供试品溶液(sample solution)

图5 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms

$140 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 参比流速 $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 氧气流速 $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分析时间 450 s, 注氧时间 15 s, 扣除 *L*-甲硫氨酸砜和谷氨酸, 测得甲硫氨酸亚砜含量为 94.6%。称取样品 14.72 mg, 马来酸内标 14.39 mg, 用氘代 DMSO 溶解后, 置核磁测定管中上机测定, 扣除 *L*-甲硫氨酸砜, 测得含量 94.7%。根据水分、炽灼残渣及 HPLC 纯度的测定结果, 以质量平衡法计算, 供试品(*L*-甲硫氨酸亚砜对照品)的 HPLC 法含量 = (1 - 水分 - 炽灼残渣) × HPLC 纯度 × 100%, 结

果为 94.5%。3 种方法测得的结果基本一致, 最终采用质量平衡法赋值, 为 94.5%。

2.4 均匀性与稳定性试验

2.4.1 均匀性试验 随机取供试品 24 份, 每份约 20 mg, 用水溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 供液相色谱分析用, 采用“2.2.5”项下试验方法进行测定。对目标峰面积与称样量的比值进行单因素方差分析, *P* 值为 0.78, 表明各取样间无明显差异, 供试样均匀性较好。

2.4.2 短期稳定性 取适量供试品置于 40 ℃, 75% 相对湿度的环境条件下, 分别避光储存 0、5、10 d, 使用液相色谱测定不同处理时间下样品中 L-甲硫氨酸亚砷含量及杂质的变化(方法同均匀性), 测定结果(主成分自身对照法)显示, 0、5、10 d 处理的主成分含量分别为 95.32%、95.31%、95.53%, 杂质含量分别为 4.68%、4.69%、4.47%, 表明储存期内无明显变化, 短期稳定。

3 讨论

对供试品作为首批 L-甲硫氨酸亚砷对照品进行标定, 对其化学结构确证、纯度及杂质、理化性质等进行了考察, 并采用氮分析法、质量平衡法及核磁共振法多种方法对其含量进行测定。此外, 参考 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 <9901 国家药品标准物质制备指导原则>, 对本批待标品的均匀性和稳定性进行考察。最终通过 WHO 推荐的标准物质定值法, 即质量平衡法, 以扣除水分、炽灼残渣、残留溶剂后的 HPLC 纯度对本批对照品含量进行赋值。经国家药品标准物质专家委员会审定, 批准其作为 L-甲硫氨酸亚砷检查用国家药品对照品, 其含量为 94.5%。

参考文献

- [1] 邵天舒, 周长明, 李辉, 等. 复方氨基酸注射液(18AA-Ⅱ)中甲硫氨酸氧化杂质的研究[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(6): 713
SHAO TS, ZHOU CM, LI H, *et al.* Oxidized related substance of methionine in compound amino acid injection (18AA-Ⅱ) [J]. *J Chin Pharm Univ*, 2021, 52(6): 713
- [2] 王纪, 廖海明, 范慧红. 混合模式色谱-CAD-LTQ Orbitrap MS 联用分析甲硫氨酸中的杂质[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(22): 1824
WANG J, LIAO HM, FAN HH. Analysis of impurity in methionine by mixed-Mode chromatography-CAD-LTQ orbitrap MS [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(22): 1824
- [3] BOCHI MS, BRANLANT G. Methionine sulfoxide reductase: chemistry, substrate binding, recycling process and oxidase activity [J]. *Bioorg Chem*, 2014, 57: 222
- [4] ACHILLI C, CIANA C, MINETTI G. The discovery of methionine sulfoxide reductase enzymes: an historical account and future perspectives [J]. *BioFactors*, 2015, 41(3): 135
- [5] 杨加伟, 彭辽天, 程小玲. 甲硫氨酸亚砷还原酶 A 高通量活性筛选体系的建立[J]. 遵义师范学院学报, 2019, 21(4): 115
YANG JW, PENG LT, CHENG XL. Establishment of high throughput activity screening of methionine sulfoxide reductase A [J]. *J Zunyi Norm Coll*, 2019, 21(4): 115
- [6] 江舸, 朱恒怡, 郭志渊, 等. HPLC 测定小儿复方氨基酸注射液中甲硫氨酸的有关物质[J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(4): 440
JIANG G, ZHU HY, GUO ZY, *et al.* Determination of related substances of methionine in pediatric compound amino acid injection [J]. *West Chin J Pharm Sci*, 2022, 37(4): 440
- [7] DAN H, HUIJF, BELEN S, *et al.* Methionine oxidation activates pyruvate kinase M2 to promote pancreatic cancer metastasis [J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(16): 3045
- [8] SMITH AS, GOSSMAN KR, DYKSTRA B, *et al.* Protective effects against the development of Alzheimer's disease in an animal model through active immunization with methionine-sulfoxide rich protein antigen [J]. *Antioxidants*, 2022, 11: 775
- [9] 师腾瑞, 杨玉洁, 刘琼, 等. 硒蛋白 R——一个独特的甲硫氨酸亚砷还原酶[J]. 化学进展, 2018, 30(10): 1496
SHI TR, YANG YJ, LIU Q, *et al.* Selenoprotein R: a unique methionine sulfoxide reductase [J]. *Prog Chem*, 2018, 30(10): 1496
- [10] 赵蓓蓓, 占建华, 胡琴, 等. 细胞色素 c 甲硫氨酸氧化机制的 NMR 研究[J]. 波谱学杂志, 2023, 40(3): 246
ZHAO BB, ZHAN JH, HU Q, *et al.* NMR study on the mechanism of cytochrome c methionine oxidation [J]. *Chin J Magn Reson*, 2023, 40(3): 246
- [11] 封严严. 谷氨酸棒杆菌中甲硫氨酸亚砷还原酶生理功能及抗氧化机制探究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2017
FENG YY. Studies on the Physiological Function and Antioxidative Mechanisms of Methionine Sulfoxide Reductase in *Corynebacterium glutamicum* [D]. Xi'an: Northwest Agriculture & Forest University, 2017
- [12] 胡培蓉, 余龙, 张民, 等. 人类肽-甲硫氨酸亚砷还原酶的 cDNA 克隆、组织表达谱特征及染色体定位[J]. 科学通报, 2000(12): 1289
HU PR, YU L, ZHANG M, *et al.* cDNA clone, tissue expression profile characteristics, and chromosome localization of human peptide-methionine sulfoxide reductase [J]. *Chin Sci Bull*, 2000(12): 1289
- [13] GOUNDRY WRF, ADAMS B, BENSON H, *et al.* Development and scale-up of a biocatalytic process to form a chiral sulfoxide [J]. *Org Proc Res Dev*, 2017, 21(1): 107
- [14] TROST BM, RAO M. Development of chiral sulfoxide ligands for asymmetric catalysis [J]. *Angew (Int Ed Engl)*, 2015, 54(17): 5026
- [15] OTOCKA S, KWIATKOWSKA M, MADALINSKA L, *et al.* Chiral organosulfur ligands/catalysts with a stereogenic sulfur atom: applications in asymmetric synthesis [J]. *Chem Rev*, 2017, 117(5): 4147
- [16] FERNÁNDEZ I, KHIAR N. Recent developments in the synthesis and utilization of chiral sulfoxides [J]. *Chem Rev*, 2003, 103(9): 3651

(本文于 2023 年 5 月 18 日收到)