

首批L-犬尿氨酸国家药品对照品的研制

刘景坤, 廖海明, 张斗胜, 范慧红* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 建立首批L-犬尿氨酸国家对照品。方法: 采用紫外吸收光谱、红外吸收光谱、核磁共振谱及高分辨质谱对犬尿氨酸进行结构确证, 测定了原料的水分含量、炽灼残渣量及元素含量, 并考察了其引湿性、均匀性和稳定性, 最后采用氮分析法、液相色谱法及定量核磁共振法对其含量进行测定, 最后采用质量平衡法对其含量进行赋值。结果: 确证了犬尿氨酸的结构, 以质量平衡法计算, 将本批次犬尿氨酸的含量定值为97.4%。结论: 经过结构确证和含量测定, 本批次犬尿氨酸能够满足相关药品检查使用, 首批L-犬尿氨酸国家对照品研制成功并通过审定, 可用于相关氨基酸药物的检查, 有利于提高相关药品质量, 保证用药安全。

关键词: 犬尿氨酸; 对照品; 结构确证; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)11-1326-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.11.013

Development of the First Batch National Reference Standard of L-kynurenine

Liu Jingkun, Liao Haiming, Zhang Dousheng, Fan Huihong* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To establish the first batch of national reference standard of L-kynurenine. **Methods:** The molecular structure of kynurenine was confirmed by the spectrum methods of UV, IR, NMR and high resolution MS. Moreover, the moisture content, residual ignition content and element content of the raw material were determined, and its hygroscopicity, homogeneity and stability were also observed. Finally, nitrogen analysis, HPLC and quantitative NMR were applied in the measurement, and mass balance method was used to determine its contents. **Results:** The structure of L-kynurenine was confirmed, and the content of L-kynurenine in this batch was determined to be 97.4% by mass balance method. **Conclusion:** This batch of L-kynurenine could meet the requirements of related drug detection after structure confirmation and contents determination. The first batch of national reference standard of L-kynurenine has been successfully developed and approved, and it is used for the detection for related amino acid drug, which is helpful in improving drug quality of related drugs and guaranteeing drug safety.

Keywords: L-kynurenine; reference standard; structure confirmation; content determination

L-犬尿氨酸 (Kynurenines) 由色氨酸分解代谢产生, 是一类非蛋白原性 *L*- α -氨基酸, 犬尿氨酸途径也是色氨酸的重要代谢途径^[1-2]。犬尿氨酸及其进一步分解产物具有多种生物学功能, 包括炎症期间扩张血管、调节免疫细胞反应和神经元兴奋性等^[3-4]。近年来研究表明, 犬尿氨酸和犬尿氨酸途径与衰老以及神经性疾病密切相关, 包括帕金森病、阿尔茨海默病, 以及精神分裂症和抑郁症等^[5-10]。因此, 有关犬尿氨酸以及犬尿氨酸途径的相关研究或药物开发能为此类疾病的研究进展提供新的思路; 同时, *L*-犬尿氨酸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。因此, 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, 研制犬尿氨酸国家对照品具有重要意义。本文对犬尿氨酸原料进行了质量分析, 建立了首批犬尿氨酸国家药品对照品。

1 仪器与材料

1.1 仪器

电子天平 (梅特勒, XPE205, 0.1 mg); 紫外-可见分光光度计 (岛津, UV-2600); 红外光谱仪 (Bruker, Alpha II); 高分辨质谱仪 (ThermoFisher, QE); 液相色谱仪 (岛津, LC-40); 氨基酸分析仪 (Syknan, s-433D), pH

计 (梅特勒, MP230K); 水分测定仪 (万通, Metrohm 890); ICP-OES (PE, Optima 7000); ICP-MS (PE, 350); 动态水分吸附仪 (SMS, DVS Advantage); 氮分析仪 (Thermo Fisher, Flash Smart); 核磁共振仪 (AVANCE, NEO 600 M)。

1.2 材料

犬尿氨酸原料购自广州佳途科技股份有限公司; 甲醇、乙腈、二氯甲烷、丙酮等有机溶剂均为色谱纯, 购自Fisher公司; 犬尿氨酸对照品购买自USP, 含量99.9%; 氘代DMSO购自Sigma公司, 纯度99.5%; 磷酸、硫酸、醋酸、磷酸盐、枸橼酸盐等无机试剂购自国药试剂公司, 均为分析纯; 金属离子标准液购自有色金属研究院; 18种氨基酸套装 (含量均>99.5%)、标定液均为中检院提供。

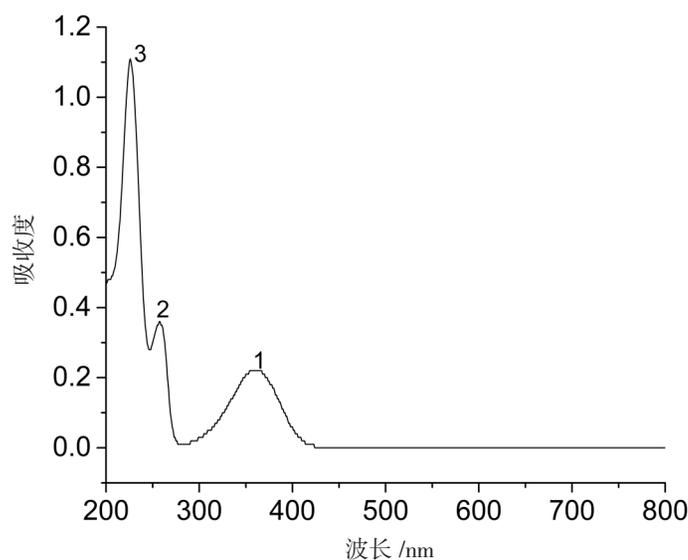
2 方法与结果

2.1 外观性状

本品为淡黄色粉末, 无特殊异味。

2.2 紫外可见吸收性质

取本品, 制成约 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水溶液, 置于石英比色皿中, 用紫外可见分光光度计在200~800 nm波长范围内中速进行扫描, 采样间隔1.0 nm, 狭缝宽2.0 nm, 光源转换波长232 nm。结果表明, 本品在226 nm、257 nm、361 nm有吸收峰, 吸光度依次减小, 如图1所示。



1. 在361 nm处吸收峰; 2. 在257 nm处吸收峰; 3. 在226 nm处吸收峰。

图1 犬尿氨酸紫外-可见吸收光谱图

2.3 红外光谱

采用溴化钾压片法制样，利用傅里叶变换红外光谱仪扫描，波数400~4000，次频次为32，分

辨率为4.0，得到本品的红外光吸收图谱，如图2所示，符合其化学结构，与对照品犬尿氨酸红外光谱一致。

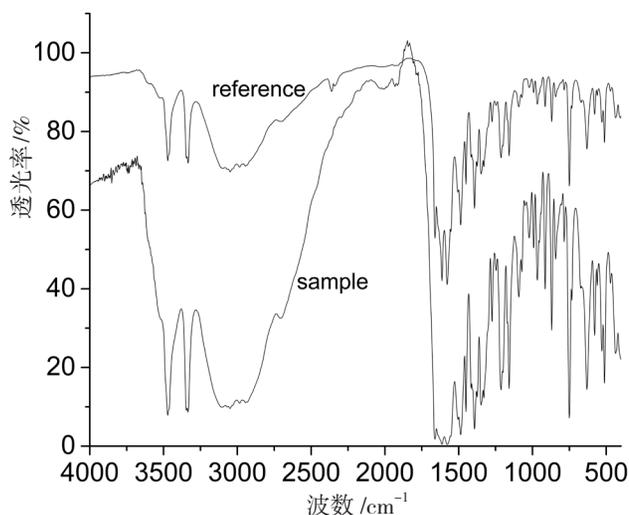
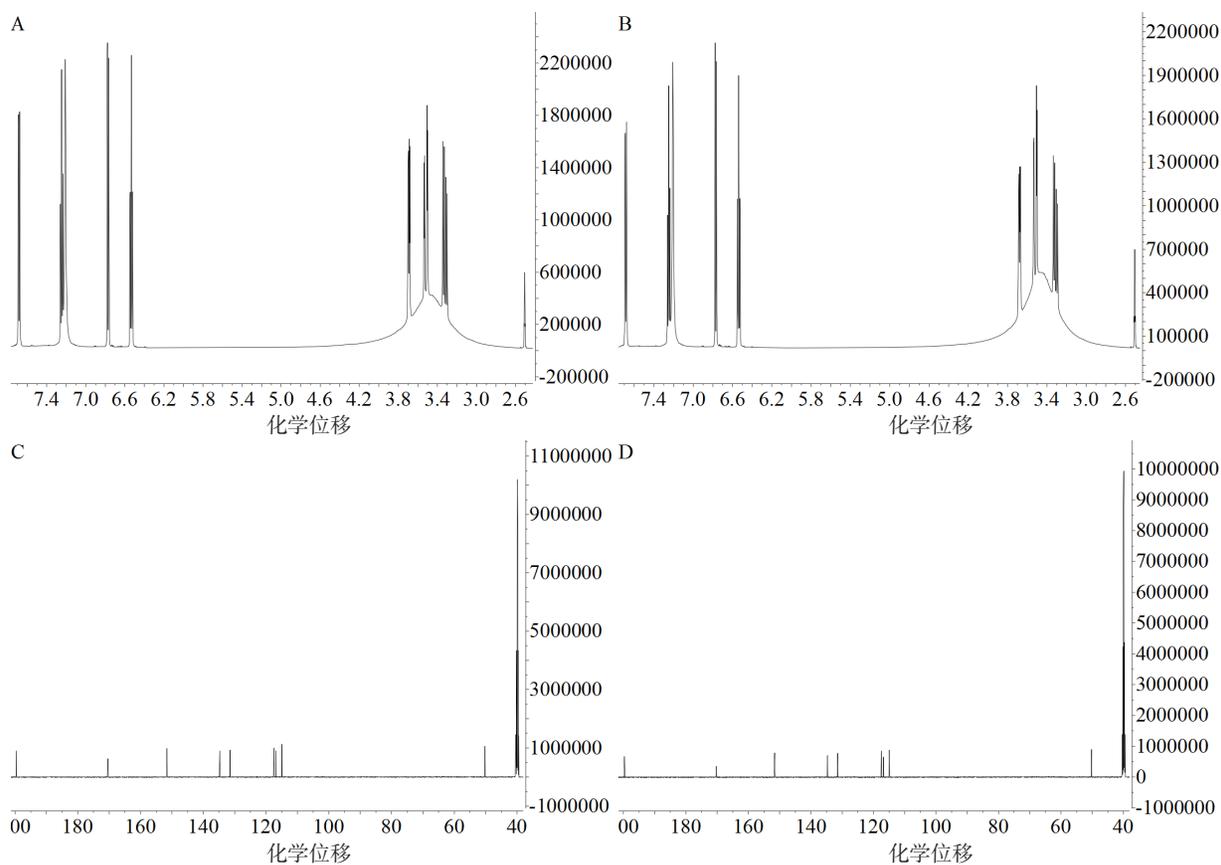


图2 犬尿氨酸红外图

2.4 核磁共振图谱

称取适量样品，用氘代DMSO配制成约10 mg · mL⁻¹的溶液，置核磁管中上机测试，结果如

图3所示，其氢谱核磁归属如表所示，与犬尿氨酸结构吻合。



A. 对照品 ¹H; B. 供试品 ¹H; C. 对照品 ¹³C; D. 供试品 ¹³C。

图3 犬尿氨酸核磁共振图谱(氘代DMSO)

2.5 高分辨质谱图

称取适量样品,用乙腈-水($V:V=1:1$)配制成浓度约为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的试液,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30 arb,辅助气流速为10 arb,辅助气温度

320 ℃,毛细管电压15 V,毛细管温度320 ℃,分辨率为70000。结果如图4所示, $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 峰的质核比为207.07663,其理论计算值应为207.07752,误差为4.2 ppm,说明分子量测量值与理论值吻合。

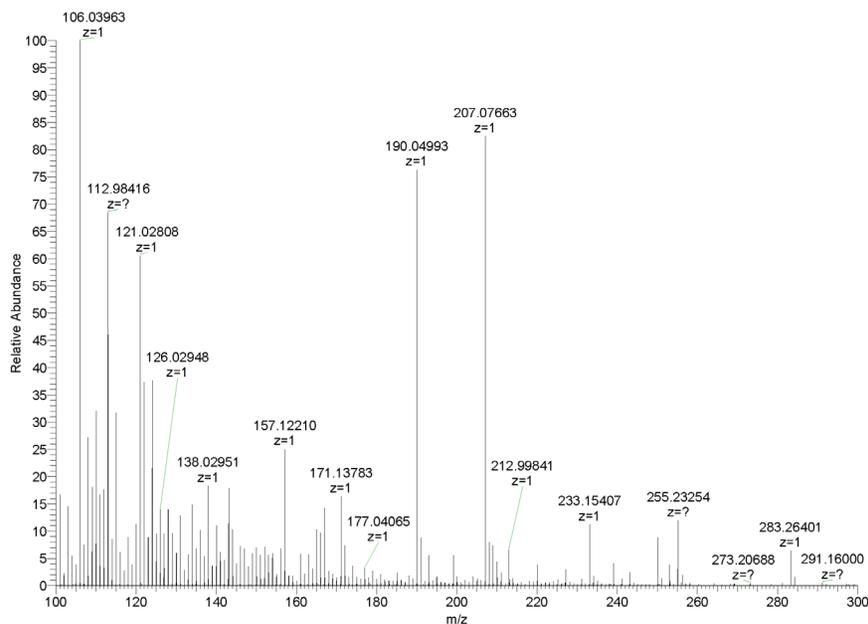


图4 犬尿氨酸负离子扫描模式高分辨质谱图

2.6 水分含量

取本品约20 mg,置10 mL的顶空瓶中,压盖密封,采用卡式炉加热库伦滴定方法测定,卡式炉温度为120 ℃,平行测定6次,空白2次,最后测定平均水分含量为1.08%,RSD为8.90%。

2.7 炽灼残渣

将坩埚750 ℃炽灼冷却后称重,准确称取试样约1.0 g,置于恒重后的坩埚中炽灼完全后冷却称重,经平行测定,试样炽灼残渣平均含量为0.31%。

2.8 元素含量

精密称定试样约25 mg,用2%稀硝酸溶解并定容至50 mL备用,用2%稀硝酸稀释K、Ca、Na元素的标准溶液得到系列浓度的溶液,分别为1、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,建立标准曲线,2%稀硝酸溶液为空白溶液,将以上样品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K含量为0.02%,Ca含量为0.22%,Na含量为0.02%。

将钴、锂、砷、镉、汞、铅、铜、钒、镍、

铈、铈元素标准溶液用5%硝酸配制成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(金的终浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。取供试品适量,精密称定,加2.5 mL硝酸消解后加水稀释,加金元素溶液(定容体积为25 mL,使得金的终浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。),然后定容至25 mL,将以上溶液用电感耦合等离子体质谱法测定,最终所有元素含量和为4.03 ppm。

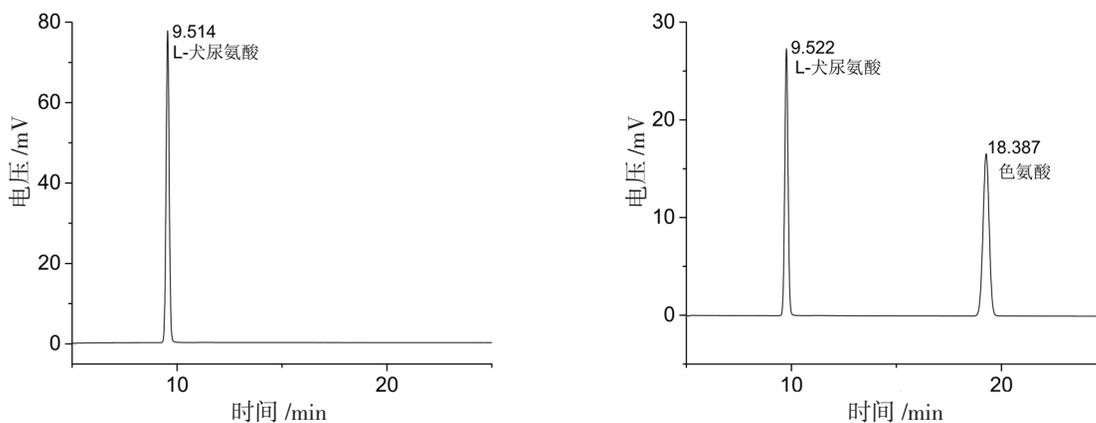
2.9 有关物质

犬尿氨酸为氨基酸类物质,有关物质中可能包含其他氨基酸类(或其他含氮类物质)和非氨基酸类(无氮类物质),含氮类有关物质能与茚三酮显色,采用衍生法能提高检测灵敏度,非氨基酸类物质采用紫外吸收检测,利用二者不同性质分别进行检查能更全面、准确地对有关物质进行考察。

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,本批次分析使用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种一级氨基酸, 1种二级氨基酸及犬尿氨酸; 非氨基酸类有关物质采用C₁₈柱紫外检测进行检查, 所用色谱柱为Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相由A 0.02 M磷酸盐缓冲

液 (pH=4.3): 甲醇=92:8和B乙腈:水=4:6组成, 采用梯度洗脱方式, 系统适应性溶液包含色氨酸和犬尿氨酸, 典型色谱图如图5所示。结果表明, 未检出氨基酸类有关物质, 有关物质总量为1.21%。



左: 犬尿氨酸; 右: 系统适应性 - 犬尿氨酸、色氨酸。

图5 犬尿氨酸典型色谱图

2.10 引湿性

取适量本品, 置动态水分吸附分析仪中测定, 增重小于0.1%, 为无或几乎无引湿性 (<0.2%)。

2.11 均匀性

均匀取供试品24份, 每份约10 mg, 用甲醇溶解定容至500 mL容量瓶中, 供液相色谱分析用, 采用非氨基酸类有关物质测定的试验方法进行测定。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 $0.96 > 0.05$, 同时 F 值 (0.36) < F_{crit} (2.22), 表明各供试品含量间无明显差异, 供试样均匀性较好。

2.12 短期稳定性

取适量供试品置于40 °C, 75%相对湿度的环境条件下, 分别避光储存0、5、10天, 使用液相色谱测定不同处理时间下样品中犬尿氨酸含量及杂质的变化 (方法同均匀性), 测定结果显示, 0、5、10天处理的主成分含量分别为98.79%、98.78%、98.78%, 杂质含量分别为1.21%、1.22%、1.22%, 结果表明储存期内无明显变化, 短期稳定。

2.13 含量分析

分别用氮分析法、核磁共振定量法和质量平衡分析法来测定和计算供试样品的含量, 能够相互印证, 更加准确地对含量进行测定。

氮分析法中左右炉温分别为950 °C和840 °C,

柱温50 °C, 载气流速 $140 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 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, 测得犬尿氨酸含量为97.0%, 计算含量=测得含量 × (1-有关物质), 含量为95.8%。核磁共振定量法采用天冬氨酸作为标准物质建立标准曲线, 测定样品平均含量为97.0%, RSD为0.20%。称取样品8.72 mg, 马来酸内标约7.01 mg, 用氘代DMSO溶解后, 置核磁测定管中上机测定, 测得含量为97.5%, 计算含量=测得含量 × (1-有关物质), 含量为96.3%。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, 对照品的HPLC法含量=(1-水分-炽灼残渣) × HPLC纯度=97.4%。

由于质量平衡法具有较高准确度, 能够溯源到国际单位制中的质量单位, 同时, 质量平衡法是世界卫生组织推荐的标准物质的定值方法, 因此, 最终依据水分、炽灼残渣、残留溶剂及HPLC纯度, 采用质量平衡法对本批对照品含量进行赋值为97.4%。

3 讨论

本待标品作为首批L-犬尿氨酸对照品, 对其化学结构确证、纯度及杂质、理化性质等进行了考察, 参考《中华人民共和国药典》2020年版四部通则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了考察,最后采用氮分析法、质量平衡法及核磁共振定量分析法多种方法对其含量进行测定。由于质量平衡法具有较高准确度,是世界卫生组织推荐的标准物质的定值方法,同时本批次供试品主成分及各部分杂质均是通过基准方法进行测试,所以质量平衡法也是本批次对照品赋值的基准方法,采用质量平衡法定值更为科学和准确^[11]。最终本批次对照品经过药品标准物质专家委员会审定,批准作为L-犬尿氨酸检查用国家对照品使用。

参考文献:

- [1] Kolodziej L. An Exploratory Study of the Interplay Between Decreased Concentration of Tryptophan, Accumulation of Kynurenes, and Inflammatory Arthritis[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64 (12) : 983-987.
- [2] Majl ú th Z, Toldi J, F ü löp F, et al. Excitotoxic Mechanisms in Non-motor Dysfunctions and Levodopa-induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: The Role of the Interaction Between the Dopaminergic and the Kynurenine System[J]. *Current Medicine Chemistry*, 2016, 23: 874-883.
- [3] Gao J, Xu K, Liu H, et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism[J]. *Front Cell Infectious Microbiology*, 2018, 8: 13-24.
- [4] Labadie BW, Bao R, Luke JJ. Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan-kynurenine-aryl Hydrocarbon Axis[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25 (5) : 1462-1471.
- [5] 苏旭. 色氨酸/犬尿氨酸代谢途径在ST段抬高型心肌梗死患者中的预后研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019: 1-61.
- [6] Chang KH, Cheng ML, Tang HY, et al. Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson's Disease[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55 (8) : 6319-6328.
- [7] Behl T, Kaur I, Sehgal A, et al. The Footprint of Kynurenine Pathway in Neurodegeneration: Janus-faced Role in Parkinson's Disorder and Therapeutic Implications [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (13) : 6737.
- [8] Masaru T, Zsuzsanna B, Di ú na M, et al. Antidepressant Like Effects of Kynurenic Acid in a Modified Forced Swim Test[J]. *Pharmacological Reports*, 2020, 72 (4) : 1-7.
- [9] Bai JH, Zheng YL, Yu YP. Urinary Kynurenine as a Biomarker for Parkinson's Disease[J]. *Neurological Sciences*, 2021, 42 (2) : 697-703.
- [10] Havelund JF, Andersen AD, Binzer M, et al. Changes in Kynurenine Pathway Metabolism in Parkinson Patients with LDOPA-induced Dyskinesia[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2017, 142 (5) : 756-766.
- [11] 郑子繁, 刘卫晓, 金尧军, 等. 质量平衡法及其在标准物质定值中心的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2020, 10 (6) : 623-629.

(收稿日期 2023年4月24日 编辑 肖妍)