

复方氨基酸注射液(18AA-II)中甲硫氨酸氧化杂质的研究

邵天舒, 周长明, 李辉, 郭雷*

(北京市药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 北京 102206)

摘要 建立柱前衍生-HPLC同时测定复方氨基酸注射液(18AA-II)中甲硫氨酸亚砜和甲硫氨酸砜含量的方法,以此方法考察了155批样品中这两种杂质的含量,并对其产生的原因进行分析。采用邻苯二甲醛-巯基丙酸溶液柱前衍生高效液相色谱法,色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈, 荧光检测器激发波长233 nm, 发射波长441 nm, 流动相A为醋酸钠/四氢呋喃溶液, 流动相B为醋酸钠溶液-乙腈-甲醇(200:400:400)(梯度洗脱), 流速为0.5 mL/min, 柱温为40 °C, 进样体积8 μL。以此方法对2019年国家评价性抽检的155批样品中甲硫氨酸亚砜及甲硫氨酸砜的含量进行测定,并用顶空气体测定仪测定上述样品的残氧量。结果显示,甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸砜的检测质量浓度线性范围分别为0.128 1~10.250 0 μg/mL ($r=0.999\ 9$)和0.261 0~10.440 0 μg/mL ($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.13和0.26 μg/mL,检测限分别为0.04和0.09 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD < 1.3%;回收率分别为98.00%~100.79% (RSD = 1.15%, $n=9$)和98.19%~102.31% (RSD = 1.33%, $n=9$)。不同厂家的样品中甲硫氨酸氧化产物含量差异较大,样品中甲硫氨酸氧化产物含量与残氧量具有一定相关性,但与样品中抗氧化剂焦亚硫酸钠添加量并无明显相关性。本方法可有效监控复方氨基酸注射液(18AA-II)中甲硫氨酸亚砜和甲硫氨酸砜的含量,在质量标准中增设甲硫氨酸氧化杂质的检查项很有必要,生产厂家应加强对产品残氧量的控制。

关键词 复方氨基酸注射液;甲硫氨酸;氧化杂质;含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)06-0713-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210609

引用本文 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): 713-718.

Cite this article as: SHAO Tianshu, ZHOU Changming, LI Hui, et al. Oxidized related substance of methionine in compound amino acid injection (18AA-II)[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(6): 713-718.

Oxidized related substance of methionine in compound amino acid injection (18AA-II)

SHAO Tianshu, ZHOU Changming, LI Hui, GUO Lei*

NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Institute of Drug Control, Beijing 102206, China

Abstract TA method for the content determination of methionine sulfoxide and methionine sulfone in compound amino acid injection (18AA-II) was established in order to investigate their level in 155 batches of this product, and to explore the reason for the generation of these two impurities. The determination was performed on an Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ column with mobile phases of sodium acetate/tetrahydrofuran solution (A) and sodium acetate solution-acetonitrile-methanol (B, 200:400:400) (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The excitation wavelength and the emission wavelength of the fluorescence detector were 233 nm and 441 nm, respectively. The column temperature was 40 °C, and the injection volume was 8 μL. The contents of methionine sulfoxide and methionine sulfone from 155 batches of compound amino acid injection (18AA-II) was determined using this method, and the residual oxygen content was detected by headspace gas analyzer. The results showed that the linear range of methionine sulfoxide and methionine sulfone were 0.128 1~10.250 0 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.261 0~10.440 0 μg/mL ($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantitation were 0.13 μg/mL and 0.26

收稿日期 2021-05-21 * 通信作者 Tel: 010-52779625 E-mail: leileimap@sina.com

基金项目 国家药品评价性抽检资助项目(2019年)

$\mu\text{g/mL}$, respectively; the limits of detection were $0.04 \mu\text{g/mL}$ and $0.09 \mu\text{g/mL}$, respectively. RSDs of precision, stability and repetitive test were all lower than 1.3%. The recoveries ranged 98.00%-100.79% (RSD = 1.15%, $n = 9$) and 98.19%-102.31% (RSD = 1.33%, $n = 9$). The content level of oxidized related substances from different manufacturers showed significant difference, showing relevance with the residual oxygen content to some extent, yet no significant correlation with the added amount of antioxygen (sodium pyrosulfite). The method is validated to be useful for the content control of methionine sulfoxide and methionine sulfone in compound amino acid injection (18AA-II). It is quite necessary to include the determination of oxidized related substance into the quality specification. Manufacturers should strengthen the control of remaining oxygen in their products.

Key words compound amino acid injection; methionine; oxidized related substance; determination of content

This study was supported by the National Drug Evaluation Surveillance (2019)

复方氨基酸注射液(18AA-II)是北京市药品检验所承担的2019年国家药品评价性抽验品种之一。该产品是由18种氨基酸按一定比例配制而成的灭菌水溶液。作为临床上常用的一类平衡型氨基酸补充剂,主要用于不能口服或经肠道补给营养以及营养不能满足需要的患者通过静脉输注以满足机体获取氨基酸合成蛋白质的需要^[1-3]。其中,甲硫氨酸作为人体自身不能合成的8种必需氨基酸之一,含量占该产品氨基酸总量的5%左右。因甲硫氨酸化学结构中的硫元素带有两对孤对电子,极易与氧化剂发生氧化反应生成甲硫氨酸亚砷,进一步氧化还可生成甲硫氨酸砷(图1)。已有的实验结果表明,上述两种物质均存在引发肝癌的潜在风险^[4-6]:其中甲硫氨酸亚砷可能通过参与DNA甲基化而刺激小鼠肝癌的形成;而甲硫氨酸砷则可通过抑制酶前体降解途径提高肝癌细胞中谷氨酰胺合成酶的活性,而后者是肝癌的一个重要分子标记物。本品在生产灌装过程中,若工艺控制不严极易混入氧气,造成产品中存在一定量的氧残留,可导致甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷的产生。

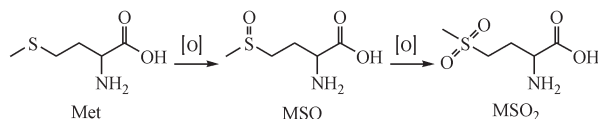


Figure 1 Generation of methionine sulfoxide and methionine sulfone
Met: Methionine; MSO: Methionine sulfoxide; MSO₂: Methionine sulfone

现行的法定标准《中华人民共和国药典》二部复方氨基酸注射液(18AA-II)品种项下尚未对甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷作为特定杂质进行控制^[7],造成产品质量存在一定风险。为精准控制产品工艺,提高产品质量,在此次国家评价性抽验的

探索性研究过程中,本研究探索并建立了一种采用邻苯二甲醛-巯基丙酸溶液为衍生剂,利用液相色谱仪自动进样器进行柱前衍生,通过C₁₈柱、梯度洗脱对甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷与其他氨基酸的衍生物进行分离,并采用高灵敏度的荧光检测器测定的分析方法,对此次评价性抽验涉及的国内7家生产企业共计155批样品中甲硫氨酸的杂质含量进行了考察,并对部分企业的产品中甲硫氨酸亚砷含量偏高的原因进行了初步探究。结果显示,建立的方法在专属性、线性、准确度、精密度、定量限、检测限和溶液稳定性等一系列方法学指标均良好,并在一定程度上优于现有的其他测定方法。样品中甲硫氨酸亚砷含量与样品残氧量存在一定相关性,而与抗氧剂的添加量并无明显关联。

1 仪器与试剂

Agilent 1260型高效液相色谱仪(配有自动进样器及FLD检测器,美国安捷伦公司);METTLERXA205型电子天平(瑞士梅特勒公司);METTLER Seven Easy型酸度计(瑞士梅特勒公司);GS1型顶空气体测定仪(残氧量测定用,英国Systech公司)。

甲硫氨酸亚砷(纯度:99.9%,批号:BCBZ3966)、甲硫氨酸砷(纯度:99.9%,批号:BCBV2699)、邻苯二甲醛(美国Sigma公司);复方氨基酸注射液(18AA-II)(共涉及国内7家企业(代号分别为B(11批)、F(40批)、H(8批)、G(16批)、L(42批)、C(1批)、D(37批)),3个规格(总氨基酸含量分别为5%、8.5%及11.4%),共计155批,均为2019年国家评价性抽验样品);乙腈、甲醇、四氢呋喃均为色谱纯;其他试剂均为市售分析纯;水为Millipore超纯水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈, 3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),以醋酸钠/四氢呋喃溶液(三水合乙酸钠 2.72 g 用适量水溶解,加入三乙胺 180 μL、乙二胺四乙酸二钠 0.1 g、四氢呋喃 3 mL,混匀加水至 1 000 mL,用冰醋酸调节 pH 至 7.2)为流动相 A,以醋酸钠溶液(三水合乙酸钠 2.72 g 加至水 200 mL 中,用冰醋酸调节 pH 至 7.2)-乙腈-甲醇(200:400:400)为流动相 B;按表 1 进行梯度洗脱;流动相流速 0.5 mL/min;柱温 40 ℃;荧光检测器激发波长 233 nm,发射波长 441 nm;自动进样器控温 8 ℃;采用仪器自动程序进样:①吸取硼酸盐缓冲液 5 μL;②吸取衍生剂 1 μL;③吸取水 0 μL(洗涤进样针);④吸取样品 1 μL;⑤吸取水 1 μL;⑥在空气中以最大速度混合 6 次;⑦等待 1 min;⑧进样。

Table 1 Gradient elution program

t/min	A/%	B/%
0.0	97	3
25	97	3
26	0	100
35	0	100
36	97	3
45	97	3

2.2 溶液的制备

2.2.1 衍生剂(邻苯二甲醛-巯基丙酸溶液) 取邻苯二甲醛 80 mg,加入 0.4 mol/L 硼酸缓冲液(pH 10.2)7 mL、乙腈 1 mL、巯基丙酸 125 μL,混匀,4 ℃保存。

2.2.2 硼酸盐缓冲液 取硼酸钠 15.25 g,加水 100 mL 溶解,用氢氧化钠溶液调 pH 至 10.2。

2.2.3 对照品溶液 取甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷对照品各约 50 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶,加水稀释至刻度,制成每 1 mL 约含甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷各 5 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液 精密量取复方氨基酸注射液(18AA-II)样品 2 mL,置 20 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.5 空白对照溶液 除不加甲硫氨酸外,照《中华人民共和国药典》复方氨基酸注射液(18AA-II)处方配制含其余 17 种氨基酸及辅料焦亚硫酸钠的溶液,作为空白对照溶液。

2.2.6 供试品添加对照品溶液 量取复方氨基酸注射液(18AA-II)样品 2 mL,置 20 mL 量瓶中,并加入甲硫氨酸亚砷和甲硫氨酸砷对照品,加水稀释至刻度,摇匀。

2.3 结果

2.3.1 专属性试验 取空白溶液、供试品溶液、对照品溶液以及供试品添加对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,结果显示对照品图谱中甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷峰型良好,两者分离度为 9.52,供试品图谱中两者与前后杂峰分离度分别为 4.93、2.19,空白辅料无干扰。色谱图见图 2。

2.3.2 线性关系考察 精密称取甲硫氨酸亚砷对照品 10.25 mg 至 100 mL 量瓶中,加水溶解稀释至刻度,摇匀,作为甲硫氨酸亚砷对照品贮备液(甲硫氨酸亚砷质量浓度:0.102 5 mg/mL);精密称取甲硫氨酸砷对照品 10.44 mg 至 100 mL 量瓶中,加水溶解稀释至刻度,摇匀,作为甲硫氨酸砷对照品贮备液(甲硫氨酸砷质量浓度:0.104 4 mg/mL);精密量取上述对照品贮备液各 5 mL,置同一 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为混合线性对照品贮备液。分别精密量取上述混合线性对照品贮备液 0.25,0.5,2.5,5.0,7.5 mL,置 20 mL 量瓶,加水稀释至刻度,并取混合线性对照品贮备液原液,作为线性试验溶液。照“2.1”项下色谱条件,以各对照品溶液质量浓度(x)为横坐标,以相应峰面积(Y)为纵坐标,按最小二乘法计算线性回归方程。甲硫氨酸亚砷在 0.128 1~10.250 0 μg/mL 范围内,甲硫氨酸亚砷溶液的质量浓度与峰面积的线性方程为 $Y = 58.746x - 1.0501$, $r = 0.9999$;甲硫氨酸砷在 0.261 0~10.440 0 μg/mL 范围内,甲硫氨酸砷溶液的质量浓度与峰面积的线性方程为 $Y = 47.240x - 1.0157$, $r = 0.9998$ 。表明两者在一定的范围内峰面积与质量浓度线性关系均良好。

2.3.3 检测限与定量限 取线性试验用甲硫氨酸亚砷对照品贮备液(甲硫氨酸亚砷质量浓度:0.102 5 mg/mL)、甲硫氨酸砷对照品贮备液(甲硫氨酸砷质量浓度:0.104 4 mg/mL)各 1 mL,分别置 100 mL 量瓶,加水稀释至刻度,摇匀。再将上述稀

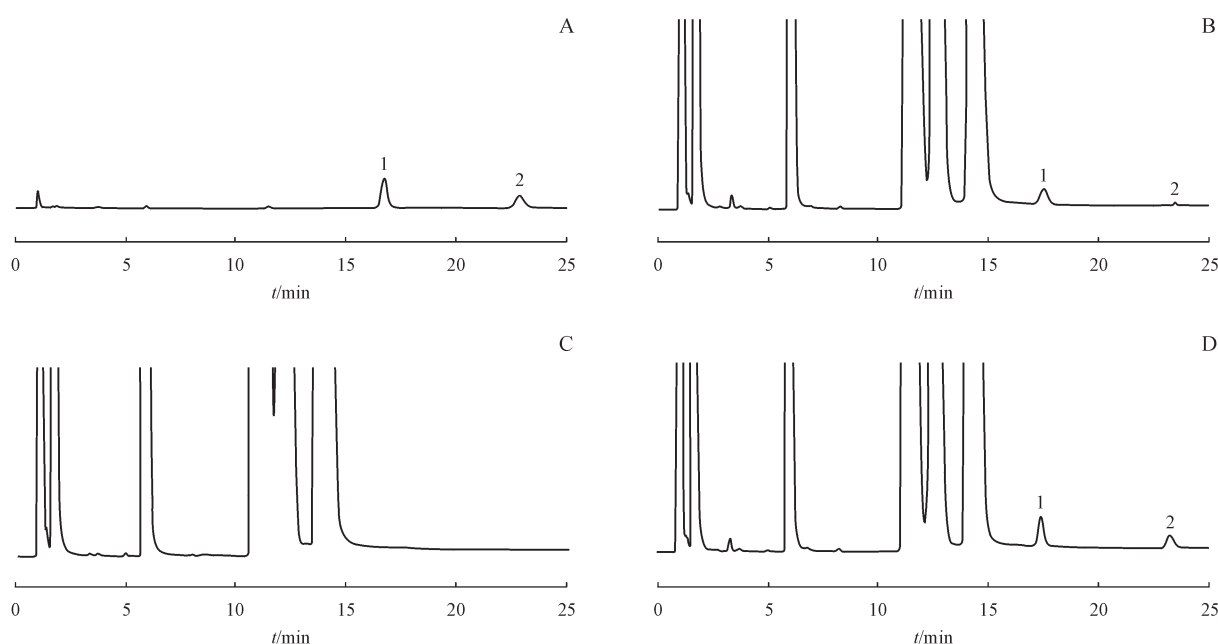


Figure 2 HPLC chromatograms of system suitability test

A: Standard solution; B: Sample solution; C: Blank solution; D: Sample solution with standard. 1: Methionine sulfoxide; 2: Methionine sulfone

释后的甲硫氨酸亚砜溶液、甲硫氨酸砜溶液逐级稀释后注入液相色谱仪测定,至信噪比S/N作为10:1为定量限,S/N为3:1作为检测限。结果:甲硫氨酸亚砜定量限为0.13 $\mu\text{g/mL}$,检测限为0.04 $\mu\text{g/mL}$;甲硫氨酸砜定量限为0.26 $\mu\text{g/mL}$,检测限为0.09 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 回收率 精密量取复方氨基酸注射液(18AA-II)样品(批号:1118100305)2 mL,置20 mL量瓶,分别加入甲硫氨酸亚砜及甲硫氨酸砜混合对照品贮备液(含甲硫氨酸亚砜10.25 $\mu\text{g/mL}$ 及甲硫氨酸砜10.44 $\mu\text{g/mL}$)0.8、1.0、1.2 mL,加水稀释至刻度,摇匀,各质量浓度分别平行配制3份,分别精密量取上述各对照品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,按外标法分别计算回收率,结果见表2。

2.3.5 精密度 取“2.2.3”项下混合对照品溶液,照“2.1”项下色谱条件重复进样6次,甲硫氨酸亚砜峰面积RSD为0.36%,甲硫氨酸砜峰面积RSD为0.64%。

2.3.6 重复性 取样品(批号:1118100305),按照“2.2.4”项下供试品溶液配制方法配制6份,作为重复性样品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算,重复性样品溶液中甲硫氨酸亚砜含量的平均值为0.49 $\mu\text{g/mL}$,RSD为

Table 2 Results of methionine sulfoxide and methionine sulfone recovery tests($n=9$)

Substance	Spiked/ μg	Recovery/ %	Average recovery %	RSD/ %
Methionine sulfoxide	8.20	98.05	98.99	1.15
		100.79		
		98.17		
	10.25	98.10		
		98.00		
		100.78		
	12.30	100.08		
		98.29		
		98.62		
Methionine sulfone	8.352	98.25	99.10	1.33
		98.53		
		98.31		
	10.440	100.47		
		102.31		
		98.38		
	12.528	98.49		
		98.19		
		98.92		

0.71%;甲硫氨酸砜含量的平均值为0.23 $\mu\text{g/mL}$,RSD%为1.29%。

2.3.7 稳定性 取“2.4”项下供试品(批号:1118100305)溶液分别于0、2、4、8、12、16 h进样,

照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰峰面积,甲硫氨酸亚砷峰面积RSD为0.12%,甲硫氨酸砷峰面积RSD为0.30%,表明供试品溶液在16 h内稳定。

2.3.8 样品甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷的测定结果 取本品,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,对7个厂家的155批样品进行了检测,结果见表3。

Table 3 Results of methionine sulfoxide and methionine sulfone determination from sample

Substance	Manufacturer	Batch quantity	Range of content/%	Average content/%	SD
Methionine sulfoxide	B	11	0.27-0.50	0.40	0.09
	F	40	0.02-0.18	0.07	0.04
	H	8	0.55-0.95	0.78	0.14
	G	16	0.02-0.11	0.05	0.02
	L	42	0.08-0.41	0.17	0.08
	C	1	0.11-0.11	0.11	-
	D	37	0.04-0.19	0.11	0.04
Methionine sulfone	B	11	-	-	-
	F	40	-	-	-
	H	8	-	-	-
	G	16	-	-	-
	L	42	-	-	-
	C	1	-	-	-
	D	37	0.03-0.08	0.04	0.01

-: Not detected

2.3.9 样品残氧量的测定结果 取本品,用顶空气体测定仪对7个厂家的155批样品上部空间气体中氧气比例进行了检测,B、F、H、G、L、C、D厂家产品残氧量均值分别为0.091%、0.053%、0.127%、0.000%、0.065%、0.004%、0.041%。

3 讨论

3.1 测定方法的选择

现有文献资料中,可同时测定多种氨基酸混合产物中甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷的方法有肖玉霞等^[8]的氨基酸分析仪法和李莉等^[9]的HPLC直接测定法,上述方法虽均有一定的优势,但也存在诸多不足之处:氨基酸分析仪法需单独购置特定的仪器,成本较高,且该方法涉及的样品系明胶水解产物,与复方氨基酸注射液(18AA-Ⅱ)的氨基酸组成存在一定差异,是否适用于本品尚不可知;HPLC直接测定法为保证甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷的分离,需将色谱柱柱温严格控制在4℃,因而需配备带有冷却功能并精确控温的柱温箱,且该方法所用流动相为含有离子对试剂的100%水相且pH低至1.9对C₁₈柱有一定损害,不利于大

批量长期测定用,此外因其测定波长选用205 nm的末端吸收波长,在检测限和定量限方面也不及本方法灵敏。当前,柱前衍生化测定的方法已成为氨基酸类化合物测定的一种常用方法^[10-11]。本方法通过采用适当的缓冲体系及流动相梯度洗脱条件,使样品中的18种氨基酸衍生产物均在15 min前洗脱,残余的过量衍生剂在25 min之后洗脱,而待测的甲硫氨酸亚砷和甲硫氨酸砷的衍生产物在此两者之间的水平基线区段出峰,避免了样品中的其他18种组分的干扰,同时选用检测灵敏度更高的荧光检测器进行测定。此外,本实验还针对样品自动进样器柱前衍生程序中的关键项目邻苯二甲醛(OPA)用量进行了摸索,分别尝试吸取OPA 0.5、1.0、2.0 μL。发现当OPA用量从0.5 μL增至1.0 μL时,相应峰面积亦有所增大;但从1.0 μL增至2.0 μL时,不仅相应峰面积不再增大,且在保留时间26 min左右出现的过量的衍生剂峰明显展宽,并对样品中甲硫氨酸砷峰造成了一定干扰,故OPA用量定为1.0 μL为宜。全部方法学验证的一系列指标均符合《中华人民共和国药典》^[12]。

3.2 甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷限度的确定

按本研究建立的方法对155批样品测定了甲硫氨酸亚砷和甲硫氨酸砷含量,结果发现各批次样品中均有甲硫氨酸亚砷检出,不同厂家产品间甲硫氨酸亚砷含量差异较大,H企业产品的甲硫氨酸亚砷含量最高(均值达0.78%);而G企业产品的甲硫氨酸亚砷含量最低(均值仅为0.05%)。另有D企业的22批样品中检出甲硫氨酸砷。由于《中华人民共和国药典》该品种项下未涉及甲硫氨酸亚砷与甲硫氨酸砷的控制,而国外药典亦未收录此品种,按照复方氨基酸注射液(18AA-II)说明书中最大日使用剂量计算,甲硫氨酸每日最大摄入量为7 g左右。参考ICH Q3b新药制剂中杂质限度的指导原则^[13],每日最大摄入剂量在100 mg~2 g的,杂质限度为0.2%(相对原料药的百分比,下同);每日最大摄入剂量在2 g以上的,杂质限度为0.15%,拟定复方氨基酸注射液(18AA-II)甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷含量均不得过甲硫氨酸标示量的0.2%。依据拟定的标准限度,155批样品中有27批甲硫氨酸亚砷含量超出限度,占比17.4%;甲硫氨酸砷含量均未超出限度。

3.3 杂质来源分析

通过对各生产厂家所用甲硫氨酸原料药的测定,均未检出甲硫氨酸亚砷及甲硫氨酸砷,表明这两种杂质均非原料带入,而是在制剂生产过程中产生的。由于这两种杂质均是甲硫氨酸的氧化产物,其生成可能与产品生产灌装过程中混入的氧气有关。通过7家生产企业产品残氧量均值的比较可见,H企业产品残氧量整体水平最高,其次是B企业产品,而H企业产品甲硫氨酸亚砷含量均值亦最高,B企业产品甲硫氨酸亚砷含量均值排第二位;而产品甲硫氨酸亚砷含量最低的G企业,其产品残氧量接近为零。表明甲硫氨酸氧化杂质的产生与产品中残留氧有明显关联。另外,H、B企业生产的产品均为5%规格,依照药典处方规定其抗氧化剂焦亚硫酸钠添加量为0.3 g/L,是8.5%、11.4%规格产品焦亚硫酸钠添加量(0.03 g/L)的10倍,但前者甲硫氨酸氧化杂质的含量均值却比后者更高,此结果提示添加的抗氧化剂是否发挥了预想的作用亦值得商榷。因此,为更好控制产品质量,建议生产厂家进一步优化充氮工艺,同时对不同类型包材对产品残氧量的影响进行深入研究,以减

少甲硫氨酸氧化杂质的产生。同时建议在现行标准的基础上增订甲硫氨酸亚砷和甲硫氨酸砷的检查项目,以对产品质量进行更为有效的控制。

References

- [1] Lian Y, Du ML, Qiao C, et al. Nutritional value evaluation of amino acid compound injection[J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2019, 28(5): 584-588.
- [2] Zhou M, Xiong X, Wang X, et al. Quality evaluation of amino acid injection(18AA)[J]. *Drug Res* (药物研究), 2020, 17(23): 20-22.
- [3] Gao C, Li M, Wei JM, et al. Expert consensus on clinical use of compound amino acid injection [J]. *Electron J Metab Nutr Cancer* (肿瘤代谢与营养电子杂志), 2019, 6(2): 183-189.
- [4] Joseph TD, Adnan AE. L-methionine-dl-sulfoxide metabolism and toxicity in freshly isolated mouse hepatocytes: gender differences and inhibition with aminooxyacetic acid[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(11): 2252-2260.
- [5] Joseph TD, Adnan AE. The biochemical and toxicological significance of hypermethionemia: new insights and clinical relevance[J]. *Expert Opin Drug Met*, 2010, 6(11): 1333-1346.
- [6] Arad G, Kulka RG. Effects of glutamine, methionine sulfone and dexamethasone on rates of synthesis of glutamine synthetase in cultured hepatoma cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, 544(1): 153-162.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: part 2* (中华人民共和国药典: 二部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 811.
- [8] Xiao YX, Ni JH. The determination of met, metson and metsox in gelatins[J]. *J Amino Acid* (氨基酸杂志), 1994, 1: 31-34.
- [9] Li L, Cui HY, Zhong JQ, et al. Simultaneous and direct determination of methionine sulfoxide and methionine sulfone in compound amino acid injection (18AA) by HPLC[J]. *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2018, 37(11): 1309-1314.
- [10] Kan WN, Teng YK, Yang HW, et al. Simultaneous determination of 18 kinds of amino acids in compound amino acid injection by DTDPA-PITC combined with pre-column derivatization HPLC [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2014, 25(12): 1122-1125.
- [11] Wang Z, Feng F. Determination of 12 depression-related amino acids in rat plasma and brain tissue by HPLC with pre-column derivatization[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, 43(4): 345-349.
- [12] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: part 4* (中华人民共和国药典: 四部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [13] ICH. Q3B(R2): impurities in new drug products [EB/OL]. 2006. [2021-04-27]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>