

问题肝素中多硫酸软骨素杂质的 柱前衍生高效液相色谱分析

赵 峡, 李广生, 于广利, 王金霞, 王 皓, 孙淑萌, 郑 晨
(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要 基于肝素和多硫酸软骨素(OSCS)在单糖组成上的差别,建立了可用于肝素中OSCS检测的柱前衍生高效液相色谱法.采用3 mol/L 三氟乙酸,将受污染的问题肝素在110 °C下充氮封管水解4 h,在碱性条件下与1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮进行衍生化反应,再采用C₁₈反相色谱柱,以0.1 mol/L 磷酸盐(pH=6.7)缓冲液/乙腈(体积比82:18)为流动相,在流速1.0 mL/min、柱温25 °C及紫外检测波长245 nm的条件下进行液相色谱分析.结果表明,肝素和OSCS的单糖色谱峰具有良好的分离度,测得2批问题肝素中OSCS杂质的质量分数分别为19.6%和28.3%.该方法具有良好的精密度和重现性,易于推广,适合于肝素中OSCS杂质的检测,并可用于硫酸软骨素A和C与硫酸软骨素B的区分和鉴别.

关键词 肝素;多硫酸软骨素;高效液相色谱;1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮

中图分类号 O657; O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)03-0479-05

肝素(Heparin, HP)是一种由葡萄糖醛酸(GlcUA)或艾杜糖醛酸(IdoUA)与乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)以-1,4-糖苷键连接的重复二糖单位组成的酸性粘多糖,在临床上作为抗凝血药物广泛应用于血液透析、外科手术和心血管疾病的治疗^[1].HP是目前在临床上使用时间最长而且仍在广泛使用的重要糖类药物^[2],但2008年初在美国及欧洲等12个国家发生了严重的“肝素钠注射液”不良反应事件,甚至导致了81例死亡病例^[3].因此,肝素钠的质量控制及临床使用的安全性引起了国际社会的广泛关注.

起初推测问题肝素严重不良反应发生的原因是由于HP受到了杂质的污染,但采用常规的检测方法对典型的蛋白质、脂类以及DNA等生物杂质进行检测,未发现异常,其它各项质量指标也符合美国药典(USP)标准的要求.通过进一步研究,多硫酸软骨素(Oversulfated chondroitin sulfate, OSCS)被证实为引发问题肝素严重不良反应的异常杂质^[4].硫酸软骨素(CS)是一类由GlcUA与乙酰半乳糖胺(GalNAc)以-1,3-糖苷键连接的重复二糖单位组成的酸性粘多糖,在结构上与HP十分相似,常用的生物和化学方法很难检测到HP中存在的OSCS杂质.最近国外报道的高分辨核磁共振氢谱(¹H NMR)^[4]和高效毛细管电泳方法^[5]虽可用于OSCS检测,但存在仪器昂贵及操作复杂等缺点,难以在日常检测中推广.

本文基于HP与OSCS的单糖组成不同的特点,建立了先将样品全水解,再经衍生处理进行检测的高效液相色谱法(HPLC).该方法具有操作简单、灵敏度高及仪器普及率高等特点,适用于问题肝素中OSCS杂质的检测与质量控制.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(包括LC-10Ai泵, CBM-20A控制器, SPD-20A紫外检测器和LC solution工作站,日本岛津公司); Zorbax Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国Agilent公司); 超导核

收稿日期: 2009-10-19.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30870506)和国际科技合作项目(批准号: 2007DFA30980)资助.

联系人简介: 赵 峡, 男, 博士, 副教授, 主要从事糖类药物化学研究. E-mail: zhaoxia@ouc.edu.cn

磁共振波谱仪(Jeol JNM-ECP 600M, 日本电子株式会社)。

硫酸软骨素 A(CSA, 来源于牛气管)、硫酸软骨素 B(CSB, 来源于猪肠粘膜)、硫酸软骨素 C(CSC, 来源于鲨鱼软骨)、肝素(HP, 来源于猪肠粘膜)以及氨基葡萄糖(GlcN)、氨基半乳糖(GalN)、葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、葡萄糖醛酸(GlcUA)和半乳糖醛酸(GalUA)单糖标准品均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 问题肝素样品 12[#]和 30[#]由中国药品生物制品检定所提供; OSCS 对照品由本实验室从问题肝素样品中分离得到; 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP, 纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 酸性粘多糖试样的水解

分别精确称取 CS 和 HP 标准样品 5 mg, 置于安瓿瓶中, 加入 1.5 mL 3 mol/L 三氟乙酸(TFA), 在 110 °C 下充氮封管水解 4 h. 反应完成后, 旋转蒸发去除 TFA, 以纯水配制成浓度为 2 mg/mL 的水溶液, 备用^[6]。

1.3 单糖样品的衍生

分别精确移取浓度为 2 mg/mL 的单糖标准品水溶液或酸性粘多糖水解溶液 100 μ L, 加入 50 μ L 0.3 mol/L NaOH 溶液, 混合均匀, 再加入 60 μ L 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液, 在 70 °C 下保温反应 60 min. 反应结束后冷却, 用 50 μ L 0.3 mol/L HCl 中和, 再加入 0.5 mL 氯仿萃取, 充分振荡, 离心, 弃去有机相, 重复萃取 3 次后得到衍生试液, 用于 HPLC 分析^[7,8]。

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱; 流动相: 0.1 mol/L 磷酸盐(pH = 6.7)缓冲液-乙腈(体积比 82:18); 柱温 25 °C; 检测波长 245 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 10 μ L^[6]。

1.5 问题肝素样品异常杂质的分析

精确称取 5 mg 问题肝素供试品, 置于安瓿瓶中, 参照上述方法进行水解、衍生和色谱分析. 按色谱峰面积进行定量, 并对方法的精密度、重现性和加样回收率进行考察。

1.6 核磁共振氢谱分析

将 OSCS 用 D₂O 交换 2 次, 冻干后再用 D₂O 溶解, 以 4,4-二甲基-4-硅代戊磺酸钠(DSS)为内标, 在 20 °C 下记录 ¹H NMR 图谱。

2 结果与讨论

2.1 酸性粘多糖的水解和色谱分析

用于 CS 和 HP 等酸性粘多糖的降解方法主要有酶法降解、氧化降解和酸水解等. 酶法降解和氧化降解适用于低分子酸性粘多糖或寡糖样品的制备^[9], 但酶法降解易在糖环非还原端的 C₄和 C₅位之间发生 β -消除反应, 氧化降解则会产生较多的氧化副产物, 而且两者均难以获得完全水解的单糖, 不适用于酸性粘多糖的单糖组成分析. 硫酸多糖的酸水解方法主要有 H₂SO₄, HCl 和 HNO₃等无机酸水解以及 TFA、草酸等有机酸水解和固相酸水解^[10]. 本实验采用 TFA 进行水解, 在水解后可以利用 TFA 的挥发性采用旋转蒸发的方法加以去除, 具有操作简单、无残留且对衍生反应不产生干扰等特点. 采用正交试验分析, 用 3 mol/L TFA 对酸性粘多糖在 110 °C 下充氮封管水解 4 h, 可得到全水解的单糖. 在前期的研究工作中^[11], 对单糖与 PMP 衍生化反应条件进行优化, 结果表明, 当反应温度为 70 °C, 反应时间为 60 min, PMP 和供试品的摩尔比为 12:1 及 NaOH, 供试品的摩尔比为 6:1 时, 具有最佳的衍生效率. 将酸性粘多糖在水解过程中可能产生的 GlcN, GalN, Glc, Gal, GlcUA 及 GalUA 等单糖标准品经 PMP 衍生后再进行 HPLC 分析, 得到的色谱图如图 1 所示, 其中 IdoUA 因无法获得商业化的标准

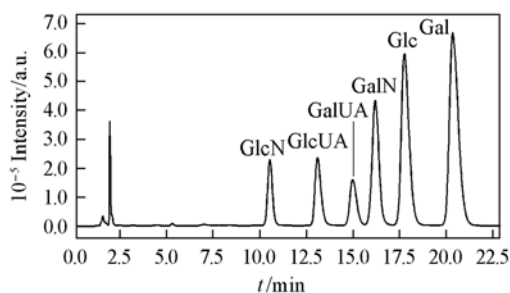


Fig. 1 Chromatogram of six monosaccharide standards derivatized by PMP

品,且在酸水解过程中极不稳定而未列入.从图1可以看出,6种相关单糖标准品在选定的色谱条件下具有良好的分离度,这为CS和HP等酸性粘多糖样品的分析检测提供了基础.

图2为CSA,CSB,CSC和HP经TFA水解和PMP衍生后的HPLC图.从图2可以看出,3种CS的主要色谱峰均为GalN的衍生物,并含有少量GlcUA和GlcN衍生色谱峰(CSC中含量略多);而HP的主要色谱峰则为GlcN的衍生物,另含有少量GlcUA和GalN衍生色谱峰.这与两类酸性粘多糖在结构上的差异是相对应的,CS的重复二糖单位主要是GlcUA和GalNAc,而HP的重复二糖单位主要是GlcUA/IdoUA和GlcNAc.在酸降解过程中,GalNAc和GlcNAc分别经脱乙酰基转化为GalN和GlcN,所以相应地两者的色谱图中的主要色谱峰分别为GalN和GlcN.糖醛酸由于在酸降解的过程中不稳定,易发生脱羧反应,因此只能检测到少量的GlcUA,而IdoUA由于在酸中极不稳定,几乎检测不到信号.所以在对HP中混有的CS类杂质的含量进行测定时,宜选择对酸降解稳定的GalN和GlcN为基准进行定量分析.另外,在CSA和CSC中还出现了一个明显的未知杂质峰(图2中*处),而CSB中却未出现.因此,该法亦可用于CSA,CSC与CSB的区分和鉴别.对于出现的未知杂质峰,推测可能与降解过程中GlcUA脱羧产生的副产物相关(CSA和CSC中的糖醛酸主要为GlcUA,而CSB中的糖醛酸主要为对酸降解不稳定的IdoUA).

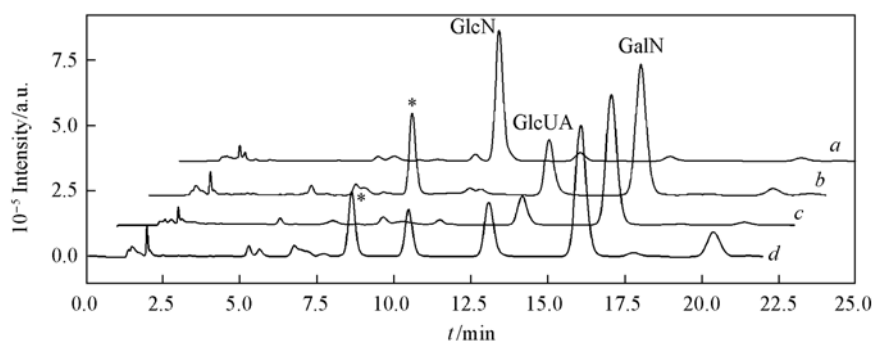


Fig. 2 Chromatograms of chondroitin sulfate A, B, C and heparin derivatized by PMP

a. Heparin, b CSA, c. CSB, d. CSC; * unknown impurity.

2.2 问题肝素中异常杂质的色谱分析

由非正常途径引入至HP中的OSCS是引发问题肝素严重不良反应的异常杂质.在前期的研究工作中^[12],我们采用Q Sepharose Fast Flow阴离子交换色谱柱,以不同浓度的NaCl溶液进行梯度洗脱,在NaCl浓度高达2.0 mol/L时从问题肝素中分离出一种具有高电荷密度的组分,该组分在正常HP中并不存在.经核磁共振氢谱分析(如图3所示)证实,该组分即为异常杂质OSCS,在 δ 2.13附近出现了明显的OSCS的N-乙酰基的甲基信号,而HP的N-乙酰甲基信号出现在 δ 2.04附近^[4].

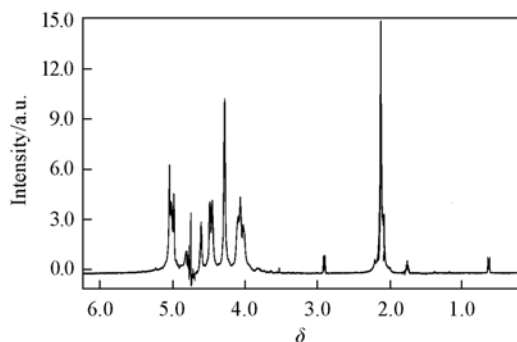


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of OSCS

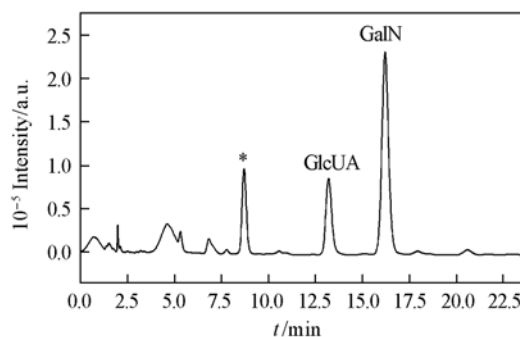


Fig. 4 Chromatogram of OSCS derivatized by PMP

* Unknown impurity.

图4为OSCS经TFA水解和PMP衍生后的HPLC图.可以看出,OSCS虽是CS经硫酸酯化反应得到的一种高硫酸根含量的衍生物,采用TFA进行水解所得到的单糖组成仍具有CS的单糖组成特征,其主要色谱峰为GalN和少量的GlcUA,而且还明显出现了与CSA和CSC同样的未知杂质峰(图4中*处),这表明制备OSCS的主要原料来源于CSA和CSC.

精确称取干燥的 OSCS 对照品,按本实验方法进行降解、衍生和 HPLC 分析,结果表明,在 0.2 ~ 4.0 mg/mL 浓度范围内, GalN 的色谱峰面积与 OSCS 的浓度具有良好的线性关系,以 GalN 的色谱峰面积(A , $\times 10^5$ mAu)为横坐标,以 OSCS 的浓度(ρ , mg/mL)为纵坐标绘制标准曲线,其线性回归方程为 $A = 34.7071\rho - 0.9811$ ($r = 0.9987$).

图 5 为受污染的问题肝素经 TFA 水解和 PMP 衍生后的 HPLC 图.从图 5 可以看出,与标准 HP 相比较,两批问题肝素(12[#]和 30[#])中 GalN 的色谱峰面积明显增加,而且也明显出现了 OSCS 的特征未知杂质峰(图 5 中 * 处).按 OSCS 标准曲线进行计算,12[#]和 30[#]问题肝素中异常杂质 OSCS 的质量分数分别为 19.6% ($n = 3$)和 28.3% ($n = 3$).在对问题肝素中 OSCS 含量进行计算时,需扣除 HP 中自身含有的少量 GalN 产生的背景含量(6.4%).另外,本实验中还发现,各样品在降解过程中因降解条件的细微波动, GalN 色谱峰的面积会略有差别,但 GalN 与 GlcN 色谱峰面积的比值($A_{\text{GalN}}/A_{\text{GlcN}}$)具有很好的重复性.因此,在采用外标法计算 OSCS 的含量时,需参照 HP 以同一基准进行计算,如能找到与酸性粘多糖结构类似且单糖组成不产生干扰的硫酸多糖作为内标进行降解和衍生,其测定结果会更为理想.另外,即使在没有 OSCS 标准样品进行对照的条件下,根据问题肝素和标准肝素中 GalN/GlcN 比值的增加值,也可大致估算异常杂质 OSCS 的污染程度.

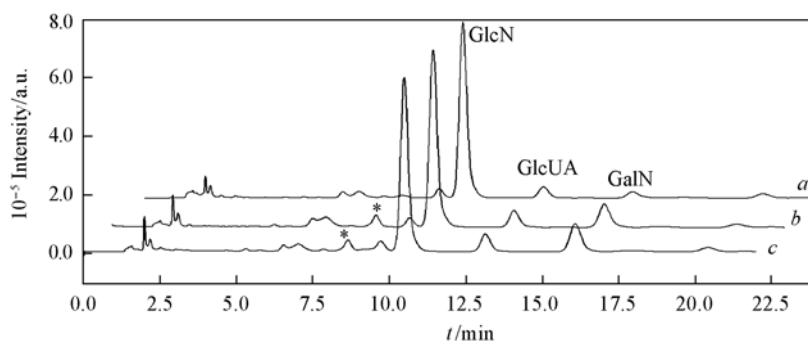


Fig. 5 Chromatograms of contaminated heparins derivatized by PMP

a. Heparin standard; b. contaminated heparin 12[#]; c. contaminated heparin 30[#]; * unknown impurity.

2.3 色谱分析的方法学考察

精确吸取同一批问题肝素经降解和衍生后的反应溶液,重复进样 5 次,按色谱条件测定峰面积,其 RSD 为 0.97% ($n = 5$),表明该方法具有很好的精密性.精确吸取同一批问题肝素样品进行平行降解和衍生后的反应溶液 5 份测定其色谱,按色谱条件测定峰面积,其 RSD 为 3.39% ($n = 5$),表明该方法具有良好的重复性.

向已测定 OSCS 杂质含量的同一批问题肝素(12[#])降解液中分别加入含 2%, 5% 和 10% OSCS 的标准溶液($n = 3$),经衍生化后按色谱条件测定杂质含量,计算平均回收率为 101.6%, RSD 为 2.46%.

本实验建立的柱前衍生高效液相色谱法具有操作简单、灵敏度高及重现性好等特点,与目前国外报道的高分辨核磁共振氢谱和高效毛细管电泳方法相比,具有更易于普及和推广等特点,适用于问题肝素中 OSCS 异常杂质的分析和检测,为肝素的质量控制和临床使用的安全性提供了保障.另外,该方法还可用于 CSA, CSC 与 CSB 的区分和鉴别.

感谢国家药品与食品监督管理局和中国药品生物制品检定所对问题肝素样品的提供及在分析检测过程中给予的指导和帮助.

参 考 文 献

- [1] Fischer K. G. . Hemodial Int. [J], 2007, **11**(2): 178—189
- [2] Zhang Z. , Weiwei M. , Li B. , et al. . J. Med. Chem. [J], 2008, **51**(18): 5498—5501
- [3] Kishimoto T. K. , Viswanathan K. , Ganguly T. , et al. . N. Engl. J. Med. [J], 2008, **358**(23): 2457—2467
- [4] Guerrini M. , Beccati D. , Shriver Z. , et al. . Nat. Biotechnol. [J], 2008, **26**(6): 669—675

- [5] Somsen G. W. , Tak Y. H. , Torano J. S. , *et al.* . J. Chromatogr. A[J] , 2009 , **1216**(18) : 4107—4112
- [6] WANG Jin-Xia(王金霞) , ZHAO Xia(赵峡) , YU Guang-Li(于广利) , *et al.* . Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J] , 2009 , **37**(5) : 648—652
- [7] Fu D. , O'Neill R. A. . Anal. Biochem. [J] , 1995 , **227**(2) : 377—384
- [8] LIN Xue(林雪) , WANG Zhong-Fu(王仲孚) , HUANG Lin-Juan(黄琳娟) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2006 , **27**(8) : 1456—1458
- [9] Karst N. A. , Linhardt R. J. . Curr. Med. Chem. [J] , 2003 , **10**(19) : 1993—2031
- [10] ZHAO Xia(赵峡) , FU Hai-Ning(付海宁) , YU Guang-Li(于广利) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2008 , **29**(7) : 1344—1348
- [11] FU Hai-Ning(付海宁) , ZHAO Xia(赵峡) , YU Guang-Li(于广利) , *et al.* . Chin. J. Mar. Drugs. (中国海洋药物)[J] , 2008 , **27**(4) : 30—34
- [12] WANG Hao(王皓) , YU Guang-Li(于广利) , ZHAO Xia(赵峡) , *et al.* . Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J] , 2009 , **37**(8) : 1147—1151

Analysis of Oversulfated Chondroitin Sulfate in Contaminated Heparin by Precolumn Derivatization High Performance Liquid Chromatography

ZHAO Xia* , LI Guang-Sheng , YU Guang-Li , WANG Jin-Xia , WANG Hao ,
SUN Shu-Meng , ZHENG Chen

(Key Laboratory of Marine Drugs , Ministry of Education , School of Medicine and Pharmacy ,
Ocean University of China , Qingdao 266003 , China)

Abstract Based on the monosaccharide composition difference between heparin and Oversulfated chondroitin sulfate(OSCS) , a simple and quantitative high performance liquid chromatography method has been established to determine OSCS present in contaminated heparin in this paper. After degradation of contaminated heparin by 3 mol/L trifluoroacetic acid(TFA) at 110 °C for 4 h , the monosaccharides were derivatized with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP) , and separated on a C₁₈ reversed phase column with a mobile phase of 0.1 mol/L phosphate buffer-acetonitrile(82:18 , volume ratio) at a column temperature of 25 °C. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 245 nm. There is a good separation between the peaks of monosaccharide-PMP derivatives of heparin and OSCS under the chromatographic conditions , and the two lots of contaminated heparin were found to contain 19.6% and 28.3% OSCS , respectively. This method is easy to apply and suitable for the determination of OSCS contaminant in heparin with high accuracy , reproducibility and sensitivity.

Keywords Heparin ; Oversulfated chondroitin sulfate ; High performance liquid chromatography ; 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone

(Ed. : A , G)