

高效液相色谱法检测肝素中核苷酸含量的研究

米文强¹, 耿文飞¹, 任凤芝¹, 刘建芬^{2*}, 李俊德¹

- (1. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 河北 石家庄 050000;
2. 华北制药华坤河北生物技术有限公司, 河北 石家庄 050000)

摘要:建立了高效液相色谱法检测肝素钠中核苷酸杂质含量的方法并进行了方法学研究。结果表明,适当的酶解时间约为6 h;酶解溶液在5℃下16 h内稳定;本检测方法重复性检查的RSD为4.38%;9种核苷酸在0.025~12.5 μg/mL范围内线性良好, $R \in (0.9997, 0.9998)$;3个水平的腺苷加样回收率均在90%以上, RSD为1.37%。该方法具有较好的可信度,可操作性强,可用于肝素中核苷酸含量的测定。

关键词:肝素;核苷酸含量;高效液相色谱;方法学

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2015)12-0170-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2015.12.047

Detection of nucleotidic impurities in heparin by HPLC

MI Wen-qiang¹, GENG Wen-fei¹, REN Feng-zhi¹, LIU Jian-fen^{2*}, LI Jun-de¹

- (1. North China Pharmaceutical Group Corporation New Drug Research and Development Co., Ltd., National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industrial Microbial Metabolic Engineering Technology Research Center, Shijiazhuang 050000, China;
2. North China Pharmaceutical Huakun Hebei Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: A method for detection of nucleotidic impurities in heparin is established by HPLC. The methodological research shows that about 6 hours are required for enzyme digest. The solution digested by enzyme is stable within 16 hours at 5℃. An excellent reproducibility is achieved with a RSD of 4.38%. 9 nucleotides show good linearity with correlation coefficient (R) of 0.9997 - 0.9998 over the mass concentration range of 0.025 - 12.5 μg/mL. The recoveries of adenosine at three different levels are all over 90% with a RSD of 1.37%. Therefore, it can be used as a reliable assay method.

Key words: heparin; nucleotidic impurities; HPLC; methodological research

肝素是一种复杂的黏多糖聚合物,是最早的生物聚合体类药物及糖类药物之一,广泛应用于抗凝血、抗血栓、抗炎等领域^[1]。目前的肝素产品多提取自猪肠黏膜,是短期内难有人工合成替代品的资源性产品^[2-3]。2008年春,多国发生肝素召回事件^[4],残留核苷酸杂质是导致肝素不良反应的重要原因之一^[1,4-5]。因此,2011年9月,新版 USP 的肝素钠原料各论纳入了关于残留核苷酸的检查规定^[6]。

肝素成分复杂,质量控制须采用多成分定量、多指标质量控制的模式;同时,其化学对照品性质不稳定且成本高昂,与“一测多评”分析法的适用体系一致^[7]。王悦等^[6]的研究指出,2'-脱氧胞苷、尿苷、

2'-脱氧鸟苷、鸟苷的色谱峰的相对保留时间漂移较大,建议在鉴别溶液中加入腺苷对照品。据此,以腺苷等9种核苷酸标准品配制鉴别溶液。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

岛津公司 LC-2010C 高效液相色谱仪及 LCoS-lution 色谱工作站。

腺苷购自 USP;尿苷购自北京索莱宝科技有限公司;超纯核酸酶购自上海拜朗生物科技有限公司;磷酸二酯酶 I(PDE I)购自南京森贝伽生物科技有限公司;碱性磷酸酶、胞苷、2'-脱氧胞苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、2'-脱氧腺苷、胸苷

收稿日期:2015-05-24

作者简介:米文强(1987-),硕士,助理工程师,研究方向为天然药物提取, mwq718_gw@126.com;刘建芬(1976-),本科,执业药师,研究方向为药学,通讯联系人, 119797212@qq.com。

均购自 Sigma-Aldrich 公司;六水合氯化镁、三羟甲基氨基甲烷(Tris)为进口分装试剂;乙酸铵、冰乙酸、盐酸、氯化钠、甘油为国产分析纯试剂;乙腈为色谱纯试剂。

1.2 溶液配制

腺苷标准溶液:精密称取 USP 腺苷,制备质量浓度为 2.5×10^{-5} mg/mL 的腺苷溶液。

系统适用性溶液:质量浓度为 5×10^{-7} mg/mL 的腺苷溶液。

核苷鉴别溶液:每 1 mL 溶液中含胞苷、2'-脱氧胞苷、尿苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、5-甲基-2'-脱氧胞苷、胸苷、2'-脱氧腺苷 2.5×10^{-5} mg 的混合液。

酶反应缓冲液:每 1 mL 溶液中含氯化镁、Tris 各 2 mol,氯化钠 1 mol 的溶液,并以 1 mol/L 的盐酸调节 pH 为 (7.9 ± 0.1) 。

酶消化液:将酶反应缓冲液与甘油等比例混合制得 PDE I 稀释剂,精密称取 PDE I、核酸酶和碱性磷酸酶,以 PDEI 稀释剂为溶剂,使每毫升溶液中含 PDE I 2.5 U,核酸酶 500 U,碱性磷酸酶 22.2 U。

供试品溶液:配制质量浓度为 20 mg/mL 的样品溶液,将样品溶液与酶消化液等体积混合即得,进样前在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下放置 6 h。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Synergi FUSION-RP C₁₈

(上接第 169 页)

用峰面积与浓度进行线性回归。定量方法使用归一化法。

2.5 新旧方法分析数据对比

利用丙烯酸异辛酯反应物料在新、旧方法各自的色谱条件下进行分析,分析结果对比如表 7 所示。由表 7 可以看出,2 种分析方法的结果相差较大。

表 7 分析结果对比表

| 化合物 | 分析结果/% | |
|------------|--------|--------|
| | 旧方法 | 新方法 |
| 水 | 0.351 | 0.746 |
| 甲苯 | 5.265 | 4.738 |
| 丙烯酸 | 7.247 | 8.225 |
| 2-乙基乙醇 | 20.842 | 21.073 |
| 醋酸辛酯 | 0.120 | 0.251 |
| 丙烯酸 2-乙基己酯 | 64.354 | 62.086 |
| 羟基丙酸异辛酯 | 未检出 | 未检出 |

(4.6 mm × 250 mm, 4 μm); 流动相 A: 0.02 mol/L 乙酸铵溶液,以冰乙酸调节 pH 为 (4.4 ± 0.2) ; 流动相 B: 乙腈; 采用低压线性梯度洗脱,流动相 A、B 的初始体积比为 97:3, 5 min 时变为 84:16, 20.1 min 变回 97:3, 平衡 8.5 min。

1.3.2 实验方法

酶解时间:按 1.2 所述方法配制供试品溶液,从 0 h 开始,每隔 1 h 进样 1 次,确定适当的酶解时间。

酶解后放置稳定性:酶解完成后溶液置于 5°C 下,从酶解后第 0 h 开始,每隔 4 h 进样 1 次,确定酶解后溶液放置稳定时间。

回收率:向供试品溶液中添加 USP 腺苷标准品,使各供试品溶液中分别含有低、中、高 3 种不同质量浓度的腺苷,每个浓度制备 3 份样品,按 1.2 所述进样,计算腺苷回收率。

1.3.3 计算方法

记录色谱图,按美国药典规定的方法计算,公式如下:

$$Q = (10A)/(S/N) \quad (1)$$

$$\text{核苷酸}(\%) = \frac{\sum [(CS/AS) \times A_i \times (M_w/RRFi)] \times (DF/W) \times 100\%}{\quad} \quad (2)$$

式中:Q 为最小积分峰面积;A 为系统适用性溶液色谱图峰面积;S/N 为信噪比;CS 为腺苷标准溶液质量浓度(mg/mL);AS 为腺苷标准溶液色谱图峰面积平均值($n=6$);A_i 为供试品所含核苷 i 的峰面积,

经过一系列测试表明,新方法的分析数据更能满足生产装置的要求。

3 结束语

将不锈钢填充柱色谱法改为毛细柱色谱法后,分别对方法改进前后各组分的检出限、重复性和实际样品等分析数据进行分析,结果表明,改进的分析方法解决了分析工作中存在的实际问题,为保证装置长周期平稳运行并指导工艺生产提供了更准确的分析数据。

参考文献

- [1] 饶兴鹤. 丙烯酸及酯产需分析与技术进展[J]. 中国石油和化工, 2004, (11): 63-66.
- [2] 钱伯章. 丙烯酸及酯的技术进展和应用[J]. 精细化工原料及中间体, 2011, (11): 33-36.
- [3] 吕常钦. 丙烯酸及酯生产与管理[M]. 北京: 中国石化出版社, 2009: 468-472. ■

可根据核苷鉴别溶液的出峰位置确定; M_w 为相对分子质量系数(见表 2, 其中, 未知组分按 1.00 计算); $RRFi$ 为相对吸收系数(如表 2 所示, 其中, 未知组分按 1.00 计算); DF 为稀释倍数; W 为样品质量(mg)。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件考察

采用 1.3.1 所述色谱条件对核苷鉴别溶液进行分析, 结果如图 1 所示。根据美国药典的要求, 2'-脱氧胞苷与尿苷的峰的分离度应当不低于 1.3, 相对系统偏差高于 10%, 信噪比不低于 10。

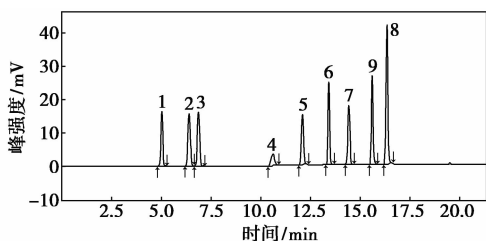


图 1 核苷鉴别溶液色谱图

各方法学检查项中, 分离度、相对标准偏差及信噪比如表 1 所示。

表 1 色谱条件考察

| 分离度 | 2.06 | 2.06 | 2.09 | 2.00 |
|----------|-------|-------|-------|-------|
| 相对标准偏差/% | 0.530 | 0.490 | 0.095 | 0.031 |
| 信噪比 | 19.31 | 19.89 | 19.56 | 18.43 |

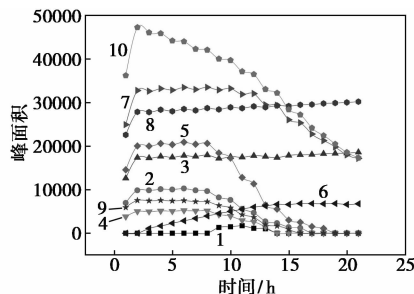
分离度、相对标准偏差及信噪比均符合美国药典的要求, 证明 1.3.1 所述色谱条件可用于本实验的方法学研究。

2.2 方法学考察

2.2.1 酶解时间考察

进样前需将样品溶液在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下进行

酶解, 为确定适当的酶解时间, 使用核苷酸杂质质量分数较高的粗肝素, 按 1.3.2 所述方法进行酶解时间考察。如图 2 所示。



1—未知组分 1; 2—胞苷; 3—2'-脱氧胞苷; 4—尿苷; 5—鸟苷; 6—未知组分 2; 7—2'-脱氧鸟苷; 8—胸苷; 9—腺苷; 10—2'-脱氧腺苷

图 2 粗肝素酶解不同时间后的各核苷含量

由图 2 可以看出, 粗肝素经酶解后, 2'-脱氧鸟苷的质量分数在 2.5 h 附近达到最大, 随后持续下降; 未知组份 2 的质量分数则持续上升, 约 13 h 后达到稳定。其他核苷酸在 4~7 h 范围内的质量分数趋于稳定, 认为在此时间段内核酸已充分酶解, 为保证检出灵敏度, 选定酶解时间为 6 h。

2.2.2 稳定性考察

依照 1.3.2 所述方法考察酶解后溶液的稳定性, 第 0、4、8、12、16 h 的核苷酸质量分数依次为 0.001 3%、0.001 2%、0.001 3%、0.001 2%、0.001 2%, RSD 为 4.42%。结果证明, 酶解完成后, 溶液可继续在 5°C 条件下放置 16 h 保持稳定。

2.2.3 线性范围的考察

量取 1.2 所述核苷鉴别溶液适量, 逐级稀释成 9 份质量浓度为 $0.025 \sim 12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 按色谱方法进样, 实验结果如表 2 所示。

表 2 线性范围

| 组分 | 线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 线性方程 | R | $\text{LOD}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $\text{LOQ}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $RRFi$ | M_w |
|--------------|--|-----------------------|--------|---|---|--------|--------|
| 胞苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 17411x - 271.02$ | 0.9997 | 0.0015 | 0.0051 | 0.53 | 1.2548 |
| 2'-脱氧胞苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 16609x - 114.69$ | 0.9998 | 0.0019 | 0.0063 | 0.56 | 1.2727 |
| 尿苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 24373x - 169.93$ | 0.9997 | 0.0037 | 0.0124 | 0.75 | 1.2537 |
| 5-甲基-2'-脱氧胞苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 11369x - 398.64$ | 0.9997 | 0.0004 | 0.0013 | 0.25 | 1.2569 |
| 鸟苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 29322x - 304.83$ | 0.9997 | 0.0012 | 0.0041 | 0.74 | 1.2188 |
| 2'-脱氧胞苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 28174x - 56.771$ | 0.9997 | 0.0005 | 0.0017 | 0.83 | 1.2319 |
| 胸苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 22122x - 24.575$ | 0.9998 | 0.0008 | 0.0026 | 0.68 | 1.2558 |
| 腺苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 31782x - 29.326$ | 0.9998 | 0.0007 | 0.0023 | 1.00 | 1.2319 |
| 2'-脱氧腺苷 | 0.025 ~ 12.5 | $y = 32125x - 159.14$ | 0.9997 | 0.0005 | 0.0018 | 1.09 | 1.2466 |

由表 2 可以看出,该方法在各核苷质量浓度 0.025 ~ 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好。

2.2.4 重复性考察

依照 1.3.2 所述方法考察方法重复性,6 次检测所得核苷酸杂质的质量分数依次为 0.001 2%、0.001 2%、0.001 3%、0.001 3%、0.001 2%、0.001 3%,核苷酸 $RSD = 4.38\%$ 。方法重复性良好。

2.2.5 回收率考察

依照 1.3.2 所述方法对腺苷加样回收率进行考察,结果如表 3 所示。

表 3 回收率

| | 加样量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | RSD/% |
|-------|---------|----------|-------|-------|
| 低浓度溶液 | 0.04016 | 0.037768 | 94.04 | |
| | | 0.037589 | 93.60 | |
| | | 0.037391 | 93.11 | |
| 中浓度溶液 | 0.05020 | 0.046356 | 92.34 | |
| | | 0.046658 | 92.94 | 1.37 |
| | | 0.046556 | 92.74 | |
| 高浓度溶液 | 0.06024 | 0.054967 | 91.25 | |
| | | 0.054666 | 90.75 | |
| | | 0.054512 | 90.49 | |

对 3 个水平的腺苷加样量的回收率均高于 90%, RSD 为 1.37%,回收率良好。

3 结论

将美国药典推荐的色谱柱填料粒径由 5 μm 变为 4 μm ,色谱柱长度由 15 cm 增长至 25 cm,结果 2'-脱氧胞苷与尿苷的分离度提高至 2.0 以上。经初步验证,与 Phenomenex Synergi FUSION-RP C_{18} 色谱柱类似,均具有极性封端,适用极性与碱性化合物的平衡保留特征的资生堂 CAPCELL PAK C_{18} AQ 色谱柱也具有很好的分离度,并且峰形良好;而采用一

次封尾、中等极性 C_{18} 的 venusil mp C_{18} 色谱柱则拖尾严重,且分离度较低。表明本项目检验的色谱柱选择范围可以更宽泛。

酶解实验表明,各核苷在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的酶解温度下稳定性各不相同,只有在某一检测时间窗范围内检测质量分数才是可靠的。经稳定性验证,酶解溶液在 5°C 条件下,16 h 内稳定,这较美国药典所规定的 60 min 以上的酶解条件的可操作性进一步增强。

根据“一测多评”检测法的要求^[7-8],线性范围、重复性及回收率等实验结果表明,采用“一测多评”检测法对肝素中核苷酸杂质的质量分数进行质量控制是准确、可行的。

参考文献

- [1] Auguste C, Dereux S, Martinez C, et al. New developments in quantitative polymerase chain reaction applied to control the quality of heparins[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2011, 399(2): 747-755.
- [2] 桑青, 崔慧斐, 姬胜利. 肝素类抗凝药物研究进展[C]//山东省药学会 2010 年生化与生物技术药物学术研讨会论文集, 2010.
- [3] 郭静萱, 刘健. 抗凝治疗新进展[J]. 中国循环杂, 2012, (4): 243-245.
- [4] Dietz S, Muller I, Schneider H T. The validity of chemical analytical methods by the example of the heparin product recall[J]. Current Pharmaceutical Analysis, 2009, 5: 34-46.
- [5] Huang Q, Xu T, Wang G Y, et al. Species-specific identification of ruminant components contaminating industrial crude porcine heparin using real-time fluorescent qualitative and quantitative PCR[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2012, 402(4): 1625-1634.
- [6] 王悦, 李京, 范慧红. 肝素中残留核苷酸检测方法国际协作研究[J]. 药物分析杂志, 2013, (10): 1796-1800.
- [7] 陆逸林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药, 2012, (12): 2525-2529.
- [8] 宋永贵, 张武岗, 刘岩庭, 等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1418-1421. ■

SABIC 推出新型 LEXAN™ 薄膜解决方案

2015 年 11 月 17 日, SABIC 推出全新的 LEXAN™ 薄膜解决方案。SABIC 的新 LEXAN OQ6DA 薄膜产品系列采用可满足消费电子产品防刮花、耐冲击性能要求的设计, 因而十分适合用在智能手机和平板电脑的平面触摸屏上, 以及可携式电子产品的窗口镜头、外壳和键盘。SABIC 采用的新型材料具有轻质化和不易碎裂的特点, 产品包括双面或单面加硬涂层聚碳酸酯膜片, 耐磨性和透光性皆十分出色。

“聚碳酸酯技术在各行各业的应用日益广泛, 尤其是

消费电子工业, 由于此类材料具有重量轻、耐冲击的特性, 因而成为玻璃的替代方案。”SABIC 创新塑料业务部门消费电子技术与创新部主管 Alan Tsai 表示。“聚碳酸酯触摸屏是一项切实可行的先进技术, 目前已可供 OEM 使用。他们如今可将这些材料用在大众市场的设备上, 某些情况下甚至能减轻多达 50% 的重量, 而且还可以增加设计的灵活性, 并帮助改进防碎特性。SABIC 在聚碳酸酯领域拥有雄厚的技术实力, 今后还将加大对 LEXAN 薄膜解决方案的投入, 以期服务于客户当前和未来的需要。”(Irene Chen)