

## ★综述★

## 肝素钠中多硫酸软骨素的测定技术进展

孙春晓<sup>1,2</sup>, 臧恒昌<sup>1,2\*</sup>, 董芹<sup>1,2</sup>, 王凤山<sup>1,2</sup>, 张天民<sup>1</sup>

(1. 山东大学药学院, 济南 250012 2 国家糖工程技术研究中心, 济南 250012)

摘要: 本文对多硫酸软骨素的相关性质及测定肝素钠中多硫酸软骨素的方法进行了综述。

关键词: 肝素钠; 多硫酸软骨素; 测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)02-0352-04

## Progress on determination of oversulfated chondroitin sulfate in heparin

SUN Chun-xiao<sup>1,2</sup>, ZANG Heng-chang<sup>1,2</sup>, DONG Qin<sup>1,2</sup>,WANG Feng-shan<sup>1,2</sup>, ZHANG Tian-min<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China 2. National Glycoengineering Research Center, Jinan 250012, China)

**Abstract** In this paper, correlative properties and determination of OSCS in heparin are reviewed**Key words** heparin; oversulfated chondroitin sulfate; determination

肝素钠自被发现以来已有 90 多年的历史, 是从猪小肠内膜中提取分离得到的一种糖胺聚糖类化合物。1935 年, Murray 进行了肝素钠的第一例临床试验, 从此, 肝素钠作为抗凝药物得到广泛运用<sup>[1]</sup>。除此之外, 肝素钠还具有调血脂、抗炎、抗过敏以及免疫调节等功能。其类似物质包括硫酸软骨素 (CS)、硫酸皮肤素 (DS)、硫酸乙酰肝素 (HS) 和多硫酸软骨素 (oversulfated chondroitin sulfate, OSCS) 等。作为肝素钠的一种类似物<sup>[1-5]</sup>, 对其中的 OSCS 进行测定具有一定的难度, 因此总结其测定方法具有重要的学术价值。本文即对测定肝素钠中 OSCS 的方法进行了综述。

## 1 肝素、OSCS 的相关理化性质

肝素主要组成部分是 L-艾杜糖醛酸和 D-葡萄糖构成的三硫酸双糖单位 (图 1), 未分级肝素的相对分子量分布为 3000~30000, 平均为 12000~15000。OSCS 是指 CS 经过硫酸化后的半合成产物, CS 主要由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基-D-半乳糖构成的双糖组成 (图 2), 相对分子量分布为 10000~50000。双糖单位中有 3 个羟基 (图 2 中的 R) 可被硫酸化, 完全硫酸化后即成为 FSCS (fully

sulfated CS)。OSCS 的抗凝活性高于 CS<sup>[6]</sup>, 但不具备肝素钠所具有的抗 Xa 因子活性<sup>[7]</sup>。OSCS 具有和肝素相似的结构、相对分子量范围, 因此在肝素钠中发现 OSCS 较为不易。

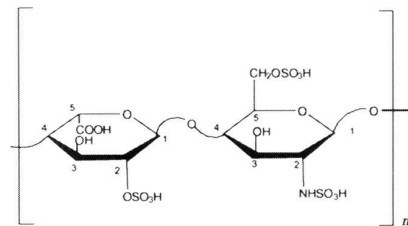


图 1 肝素的双糖单位

Fig 1 Disaccharides unit of heparin

## 2 测定肝素钠中 OSCS 的方法

FDA 曾经报道了筛查肝素钠中 OSCS 活性的 2 种检查技术, 即<sup>1</sup>H NMR 和毛细管电泳分离技术。目前报道的肝素钠中 OSCS 的测定方法, 除对 FDA 的 2 种方法进行了改进和优化之外, 还包含了其他的技术, 总的来说可以分为电泳技术、红外光谱分析技术、核磁共振技术和高效液相技术。这些方法也可以对肝素钠中其他糖胺聚糖类物质进行分析。

\* 通讯作者 Tel (0531) 88380288 E-mail zanghcw@126.com

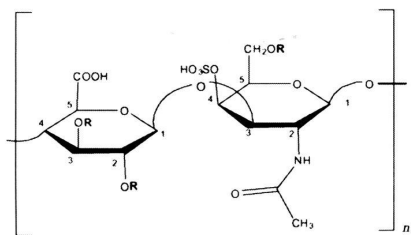


图 2 CS 的双糖单位  
Fig 2 Disaccharides unit of CS

**2.1 醋酸纤维薄膜/平板 (cellulose acetate plate membrane/plate, CAM/P) 电泳技术** CAM/P 电泳技术用于糖胺聚糖类物质的分离和纯度测定已有很久的历史<sup>[8]</sup>, 常用的缓冲系统有 Tris- 盐酸缓冲液、醋酸钡缓冲液、硼酸盐缓冲液等, 染色液有阿利新蓝和甲苯胺蓝染色液等。其分离原理是: 各种糖胺聚糖的组成、相对分子量、等电点以及形状各不相同, 在电场中的荷质比不同。这种电泳技术操作简便, 可通过与对照品的迁移位置进行比较, 对样品做出定性判断。

Domanig 等<sup>[9]</sup> 运用一维 CAP 电泳技术分离了药用肝素钠中的糖胺聚糖类物质——DS、CS 以及 OSCS 并针对肝素钠中的 DS 进行了定量分析。在样品制备以及点样之后, 将 CAP 浸于亚硝酸钠溶液中以降解其中的肝素钠, 然后在 pH 为 5 的醋酸钡-异丙醇缓冲溶液中电泳, 经过阿利新蓝染色显示, 肝素钠中的物质 DS、CS 和 OSCS 得到较好的分离。其中, CS 电泳迁移率大于 DS, OSCS 没有发生电泳迁移, 依然保留在点样点。运用吸光度扫描仪对含标准 DS 样品的斑点进行扫描, 测得其吸光度值, 和 DS 的浓度关联做标准曲线, 在 0.4% ~ 4.8% 的范围内,  $r$  为 0.9997。在 0.4% ~ 0.8% 的浓度范围内, DS 的最低测定限度 (limit of determination, LOD) 为 0.4%, 最低定量测定限度 (limit of quantitation, LOQ) 为 0.5%。

**2.2 毛细管电泳 (capillary electrophoresis CE) 技术**

CE 已广泛用于单一糖胺聚糖的纯度鉴定和糖胺聚糖混合物的分离和定量分析<sup>[8, 10]</sup>。该技术具有分离效率高、分析时间短、样品和缓冲液用量少、可与质谱技术联用、可以在线分析等特点<sup>[11]</sup>。其分离原理是: 毛细管柱在 pH > 3 的情况下, 内表面带负电, 和溶液形成双电层, 在高压电作用下, 双电层中的水合离子引起流体整体朝向负极方向移动, 表面带负电荷的糖胺聚糖在毛细管柱中向正极移动, 不同的糖胺聚糖因电泳速度不同而得以分离。

FDA 公布的测定肝素钠中的 OSCS 的 CE 方法, 所用磷酸盐缓冲液的浓度为  $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , LOD 为 1% ~ 5%。但此法不具备足够的分辨率用于 DS 以及 HS 的定量分析, 并且 LOD 较高。Wiegos 等<sup>[12]</sup> 对 CE 的实验条件——缓冲液浓度、pH 以及缓冲液种类进行优化, 分离了肝素钠中的 OSCS、DS 和 HS, 并对这 3 种物质进行了定量分析, UV 测定波长为 200 nm, 毛细管柱的内径为 25  $\mu\text{m}$ 。结果证明, 在  $600 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的缓冲液浓度和 3.5 的 pH 下, 肝素钠中 OSCS、DS 和 HS 的分离效果比 FDA 公布的结果更好。通过配制系列标准溶液, 制得 OSCS 含量和峰面积关联的标准曲线,  $r$  可达 0.9994 OSCS 的 LOD 低于 0.1%。同样制得了 DS 和 HS 的校正曲线, 线性良好。DS 的 LOD 为 0.5%, HS 为 2%。此外, 选用具有更大水合作用面积的锂盐缓冲液代替钠盐缓冲液, 使得缓冲液移动性进一步降低, 场强得到提升, 分离效果更好, 分离时间也明显降低。Votpi 等<sup>[13]</sup> 对肝素钠和 OSCS 进行化学降解, 并对肝素钠的葡糖残基和 OSCS 的 N-乙酰氨基半乳糖残基进行邻氨基苯甲酸衍生, 之后运用 CE 技术对两者进行分离和定量分析, 进而通过计算得到 OSCS 的含量, UV 测定波长为 214 nm。Samson 等<sup>[14]</sup> 通过对不同电解质液种类和浓度、毛细管温度、样品浓度以及进样量等条件下的实验结果进行对比, 确立了 CE 技术分离并定量分析肝素钠中 OSCS 和 DS 的优化条件。结果显示定量分析 OSCS 的 LOD 小于 0.1%。

**2.3 红外 (IR) 光谱分析技术** IR 技术是分析糖胺聚糖结构的重要工具, 通过和标准品的红外光谱对照, 可对样品进行定性判别。可是, 肝素钠和 OSCS 的红外吸收峰重叠在一起, 单靠肉眼很难分辨出来。Nowig 等<sup>[15]</sup> 将多变量数据分析和 IR 技术结合, 建立了衰减全反射红外 (attenuated total reflectance infrared, ATR-IR) 分析技术, 使得辨认肝素钠中的 OSCS 成为可能。

**2.4 近红外 (NIR) 光谱分析技术** NIR 技术是利用物质在近红外谱区的信息, 依靠化学计量学和计算机技术对物质进行定量和定性分析的物理分析技术。因其快速无损、无污染、无需样品预处理, 使其在在线质量控制方面显示出优势。2008 年, Spencer 等<sup>[16]</sup> 采用 NIR 光谱分析技术对肝素钠中 OSCS 的含量进行了测定, 通过偏最小二乘法将样品的 NIR 光谱和 CE 方法得到的相对峰面积关联, 用 28 个样品建立模型, 对 41 个样品进行了成功的预测, 证明

了 NRS 用于测定肝素钠中 OSCS 的可行性。

**2.5 核磁共振 (NMR) 技术** NMR 常用于测定肝素钠的精细结构<sup>[17, 18]</sup>和肝素钠中的物质, 如 CS<sup>[19, 20]</sup>。简便的样品处理、直接的光谱判断是该技术的优点。肝素钠不良反应事件后, FDA 的 NMR 实验证明在 *N*-乙酰基信号区域 2.15 ppm 处存在 OSCS 的特征吸收峰, 可用于 OSCS 的定性判别。在 Ca<sup>2+</sup> (肝素钙) 存在的情况下, OSCS 的特征吸收峰则位移至 2.18 ppm 处<sup>[21]</sup>。Sikowski 等<sup>[22]</sup>运用扩散排序谱<sup>1</sup>H NMR (diffusion ordered spectroscopy<sup>1</sup>H NMR, DOSY<sup>1</sup>H NMR) 技术在 *N*-乙酰基信号区域鉴定了肝素钠中的 OSCS。Beyer 等<sup>[23]</sup>使用<sup>1</sup>H NMR 技术在 *N*-乙酰基信号区域分别对肝素钠中的 OSCS 和 DS 进行了辨认以及定量分析, 其中 OSCS 的 LOD 为 0.1%。同时对从国际市场中搜集的 100 多份肝素钠样品进行了主成分分析 (PCA), 结果显示样品在 PCA 得分分布图上分成了含少量 DS、含大量 DS、含大量 DS 和少量 OSCS、含大量 OSCS 和少量 DS 这 4 大类。Böglér 等<sup>[24]</sup>运用二维核奥弗豪泽增强谱 NMR (2D nuclear overhauser enhancement spectroscopy NMR, 2D NOESY NMR) 技术测定肝素钠中潜在的物质, 分别获取含有 CSA、CSB 和 OSCS 的肝素钠的二维氢谱, 并抽提出一维氢谱, 一方面和物质纯品的图谱对比, 对物质进行确认, 另一方面和普通的一维氢谱进行比较, 评价两者的专一性。以 OSCS 为例, 含有 OSCS 的肝素钠的二维氢谱图中抽提出的一维氢谱图中, 也可以看到肝素钠的一些弱峰, 但是通过和纯 OSCS 的共振信号比较, 根据它一些显著的共振信息, 可以确认物质的种类。同时可以看出从二维图谱中提取的一维氢谱比普通的一维氢谱更具有专属性和特征性, 因此 2D NOESY NMR 技术能够可靠地识别和确认物质。

**2.6 高效液相色谱 (HPLC) 分析技术** HPLC 已被广泛应用于肝素钠的分离和测定<sup>[25]</sup>。Trehy 等<sup>[26]</sup>采用梯度洗脱的方式, 使用强阴离子交换柱结合 HPLC 成功分离了肝素钠样品中的 OSCS 和 DS 并对它们进行了定量分析。液相色谱柱为 AS11-HC 柱, 流动相为水-NaCl-Tris 盐酸缓冲液, UV 测定波长为 215 nm。结果显示, 在测定范围内 OSCS 和 DS 定量分析的标准曲线线性关系良好, *r* 均达到了 0.9999, 测定 OSCS 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.03% 和 0.1%, 测定 DS 的两者则分别为 0.1% 和 0.8%。同时指出, HPLC 也可在粗品肝素钠精制之前测定其中的 OSCS 将 HPLC 技术同 CE 和 NMR 测定技术

相结合, 能够为患者提供更为有效的保护。

### 3 结语

以上几类技术可对肝素钠中潜在的 OSCS 进行定性或定量测定, 不难看出, 在测定肝素钠中 OSCS 的分析技术中, CE 和 NMR 得到了广泛的研究, 对 OSCS 进行的所有定量分析中, HPLC 技术得到的 LOD 最小。

肝素钠具有重要的临床价值和经济效益, 为确保肝素钠的质量, 保证患者用药安全, 并能实现更好的经济效益, 对肝素钠中的 OSCS 等相似物质进行准确的确认和测定十分重要, 因此得到了越来越多的深入分析与研究。然而只对肝素钠进行已知相似物质的测定是不够的, 随着研究的不断深入, 全面而有效的分析应该能够测定肝素钠中任何已知的和未知的相似物质, 使肝素钠生产过程得到更加安全、调控措施更好的质量控制。

### 参考文献

- 1 Longstaff C, Whitton CM, Stebbings R, *et al* How do we assure the quality of biological medicines *Drug Discov Today*, 2009, 14(1-2): 50
- 2 Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, *et al* Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med*, 2008, 358(23): 2457
- 3 [http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin\\_CE\\_method](http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_CE_method)
- 4 [http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin\\_NM\\_method](http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_NM_method)
- 5 Bairstow S, McKee J, Northhaus M, *et al* Identification of a simple, sensitive microplate method for the detection of oversulfated chondroitin sulfate in heparin products *Anal Biochem*, 2009, 388(2): 317
- 6 Maniyam T, Toida T, Inanari T, *et al* Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr Res*, 1998, 306(1-2): 35
- 7 Clark M, Hoppenslead D, Walenga J, *et al* Molecular profiling of heparinase-I resistant glycosaminoglycans in contaminated heparins: Comparative studies with uncontaminated heparin and porcine oversulfated chondroitin sulfate *Angiol*, 2008, 27(5): 370
- 8 Volpi N, Maccari F. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides *J Chromatogr B Analyt Technol Bioméd Life Sci*, 2006, 834(1-2): 1
- 9 Dananig R, Jbstl W, Gruber S, *et al* One-dimensional cellulose acetate plate electrophoresis - A feasible method for analysis of dermatan sulfate and other glycosaminoglycan impurities in pharmaceutical heparin *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(1): 151
- 10 Volpi N, Maccari F, Linhardt RJ. Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides *Electrophoresis*, 2008, 29(15): 3095
- 11 Simonet BM, Rosas A, Gases F, *et al* Determination of myo-inositol

- phosphates in food samples by flow injection- capillary zone electrophoresis *Electrophoresis* 2003 24( 12- 13): 2092
- 12 Wielgos T, Havel K, Ivanova N, *et al* Determination of impurities in heparin by capillary electrophoresis using high molarity phosphate buffers *J Pharm Biomed Anal* 2009 49(2): 319
  - 13 Volpi N, Accari E, Linhardt RJ Quantitative capillary electrophoresis determination of oversulfated chondroitin sulfate as a contaminant in heparin preparations *Anal Biochem*, 2009 388( 1): 140
  - 14 Samson GW, Tak YH, Torao JS *et al* Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis *J Chromatogr A*, 2009 1216( 18): 4107
  - 15 Nowig J, Beyer T, Brinz D, *et al* Prediction of the oversulfated chondroitin sulfate contamination of unfractionated heparin by ATR- IR spectrophotometry. *Pharm Sci News* 2009 17
  - 16 Spencer JA, Kauffman JF, Reepmeyer JC, *et al* Screening of heparin API by near infrared reflectance and Raman spectroscopy. *J Pharm Sci* 2009 98( 10): 3540
  - 17 Toila T, Huang Y, Washio Y, *et al* Chemical microdetermination of heparin in plasma *Anal Biochem*, 1997, 251( 2): 219
  - 18 Sugahara K, Tsuchida H, Yoshida K, *et al* Structure determination of the octa- and decasaccharide sequences isolated from the carbohydrate- protein linkage region of porcine intestinal heparin. *J Biol Chem*, 1995 270(39): 22914
  - 19 Holme KR, Perlman AS Nuclear magnetic resonance spectra of heparin in admixture with dermatan sulfate and other glycosaminoglycans 2 - D spectra of the chondroitin sulfates *Carbohydr Res* 1989 186 (2): 301
  - 20 Atha DH, Coxon B, Reipa V, *et al* Physicochemical characterization of low molecular weight heparin. *J Pharm Sci* 1995, 84( 3): 360
  - 21 McEwen I, Rundliff T, Marianne Ek, *et al* Effect of Ca<sup>2+</sup> on the <sup>1</sup>H NMR chemical shift of the methyl signal of oversulfated chondroitin sulfate, a contaminant in heparin *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49( 3): 816
  - 22 Sikowski J, Bednarek E, Bocian W, *et al* Assessment of oversulfated chondroitin sulfate in low molecular weight and unfractionated heparins diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy method *J Med Chem*, 2008 51( 24): 7663
  - 23 Beyer T, Diehl B, Randel G, *et al* Quality assessment of unfractionated heparin using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2008, 48( 1): 13
  - 24 Bigler P, Breimeisen R. Improved impurity fingerprinting of heparin by high resolution <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49( 4): 1060
  - 25 Walenga JM, Hoppensteadt DA. Monitoring the new antithrombotic drugs *Semin Thromb Hemost*, 2004 30( 6): 683
  - 26 Trehy ML, Reepmeyer JC, Kolinski RE, *et al* Analysis of heparin sodium by SAX HPLC for contaminants and impurities *J Pharm Biomed Anal*, 2009 49(3): 670

(本文于 2009年 7月 13日收到)

## 欢迎订阅《中国临床药学杂志》

《中国临床药学杂志》主要报道我国临床药学及相关领域的新成果、新技术、新方法,有关临床用药的基础研究,合理用药、药物不良反应、药物相互作用、药物动力学、血药浓度监测以及有关医院药理学学科的研究成果与实践。旨在为我国广大临床药学工作者提供一个学术交流、信息传递和了解国内外临床药学及相关学科发展情况的窗口与平台。作为本专业特色明显的全国性期刊,本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、国家级火炬计划项目“中国科学引文数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库来源期刊”,“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”和“万方数据资源系统(China info)数字化期刊群”,并从 1998 年起被美国《国际药文摘》(IPA)和美国化学文摘(CA)摘录转载。

本刊的主要读者对象为医院药师、医师和大专院校、科研单位研究人员和临床药学工作者。

本刊为双月刊,大 16 开本,64 页,逢单月 25 日出版。每期定价 8 元,全年 48 元。邮发代号 4-573 欢迎广大读者到本地邮局订阅。国外代号 4726BM(中国国际图书贸易公司,北京 399 信箱)。国内统一刊号: CN31-1726 国际标准出版物编号: ISSN1007-4406 杂志社地址:上海市医学院路 138 号 290 信箱,邮编: 200032 电话: (021) 54237256 传真(021) 64176498 E-mail: lcyx@fudan.edu.cn