

高效离子交换色谱-电化学检测法测定 药物合成中间体中的 β -磷酸甘露糖

潘广文^{*}, 刘绿叶, 叶明立, 胡忠阳

(赛默飞世尔科技有限公司上海实验室, 上海 201203)

摘要: 在制备 β -磷酸甘露糖过程中, 将 β -磷酸甘露糖与磷酸根杂质分开是纯化过程和建立质量标准的重要环节。本文建立了 β -磷酸甘露糖和磷酸根的离子色谱分离-电化学检测方法。样品经溶解、过滤后进行色谱分析, 以 Ion-Pac AG18 离子交换柱 (50 mm \times 4 mm) 为保护柱, 在 Ionpac AS18 离子交换色谱柱 (250 mm \times 4 mm) 上分离, 以 25 mmol/L 氢氧化钾溶液为流动相, 等度淋洗, 流速 1.0 mL/min, 安培检测器和电导检测器串联检测, 外标法定量。先使用安培检测器检测, 在碱性条件下 β -磷酸甘露糖在安培检测器上被选择性检出; 后使用电导检测器检测, 经 ASRS 型抑制器抑制背景电导后 β -磷酸甘露糖和磷酸根同时被电导检测器检出, 二者分离度良好。采用安培检测器检测时, 进样量为 25 μ L, β -磷酸甘露糖的线性范围为 0.06 ~ 10.00 mg/L, 相关系数为 0.999 8, 回收率为 92.1% ~ 103.1%, 相对标准偏差均小于 3%, 检出限 (以信噪比为 3 计) 为 0.02 mg/L。该方法灵敏度高, 无杂质干扰, 前处理简便, 可用于原料药合成中间体的检测, 结果令人满意。

关键词: 离子交换色谱; 安培检测器; 电导检测器; 串联检测; β -磷酸甘露糖; 药物合成中间体

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)04-0395-05

Determination of mannose- β -phosphate in pharmaceutical intermediates by high performance ion-exchange chromatography-electrochemical detection

PAN Guangwen^{*}, LIU Lüye, YE Mingli, HU Zhongyang

(Shanghai Lab., Thermo Fisher Scientific Inc., Shanghai 201203, China)

Abstract: A novel method was developed for the determination of mannose- β -phosphate and the phosphate in pharmaceutical intermediates by high performance ion-exchange chromatography (IC) and electrochemical detection. The sample was dissolved with purified water, filtered by a 0.22 μ m nylon filter membrane, and then separated by ion-exchange chromatography. The separation was performed on an IonPac AS18 column (250 mm \times 4 mm) with an IonPac AG18 (50 mm \times 4 mm) as guard column, and 25 mmol/L KOH solution as the eluent at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection was performed with electrochemical detectors (an integrated pulsed amperometric detector and a suppressed conductivity detector in line). Mannose- β -phosphate was selectively determined with an integrated pulsed amperometric detector first. Then, both of mannose- β -phosphate and phosphate were determined with a suppressed conductivity detector after the background conductance of KOH was suppressed with the ASRS suppressor. The injection volume was 25 μ L. The external standard calibration curve was used for quantitative analysis. With an amperometric detector, the linear range of the method for mannose- β -phosphate were 0.06 - 10.0 mg/L ($r = 0.9998$). The recoveries were 92.1% - 103.1% with the relative standard deviations (RSDs) less than 3%. The detection limit was 0.02 mg/L for mannose- β -phosphate. The method is simple, effective, sensitive and selective. It can be used to determine the quality of pharmaceutical intermediates.

* 通讯联系人: 潘广文, 硕士, 离子色谱应用工程师. Tel: (021) 58957001, E-mail: arpanny@163.com.

基金项目: 安徽省教育厅高校省级科学研究项目 (KJ2011B211).

收稿日期: 2011-12-19

Key words: ion-exchange chromatography (IEC); amperometric detector; conductivity detector; tandem detection; mannose-6-phosphate (M6P); pharmaceutical intermediates

在蛋白质代谢过程中,与细胞核内体、细胞膜和细胞外分泌物有关的蛋白质必须经过修饰才能转运到细胞中的最终位置。6-磷酸甘露糖(mannose-6-phosphate, M6P)是生命体中广泛存在的与蛋白质修饰密切相关的磷酸化糖类化合物^[1-3]。M6P与其受体结合后,在溶酶体酶的发生过程中起着重要的作用,是溶酶体酶的分拣员和投送员。在高尔基体中,当特定的糖分子被添加到与蛋白质相连的核心寡糖时修饰才能发生。这些糖的复合物常常是将蛋白质引导到最终位置所需的分拣信号,M6P就是最常见的分拣信号之一^[4,5]。缺乏M6P容易诱发细胞内含物病(I-cell disease)等非常严重的疾病,以M6P为前体的药物研究日益受到关注^[6,7]。

由于M6P分子结构中含有磷酸基团和多羟基糖,其极性非常大,在常规的C18柱上几乎没有保留。目前文献报道的M6P的分析方法比较少,仅有离子色谱^[8]和毛细管电泳^[9]两种分析方法。离子色谱分离-安培检测是近年来分析糖类化合物的热门方法^[8,10-15]。它是根据糖类化合物分子具有的电化学活泼性及在强碱性溶液中呈离子化状态的特性进行分离检测^[12],但该方法对于没有活泼羟基的无机离子,如磷酸根等没有检出信号。在研究开发M6P为前体的药物过程中,M6P往往是通过化学手段合成的,其合成中间体样品中存在大量的反应原料磷酸盐,单纯用安培检测难以满足实际样品的检测要求。M6P的结构中含有甘露糖单元,具有糖类化合物的性质,因此能够利用离子色谱分离-安培检测器检测^[8],而且该方法中使用的色谱柱是专门用来分析糖的高容量离子交换色谱柱。糖柱的专属性很高,常见阴离子在这种色谱柱中具有较强的保留,因此需要增加淋洗液中乙酸钠的浓度且往往需要梯度淋洗来达到充分清洗的目的,这就提高了对分析仪器的要求。本文尝试采用等浓度氢氧化钾溶液淋洗,安培、电导检测器串联测定M6P及磷酸杂质,并将该方法应用于实际样品的测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Dionex ICS-3000 离子色谱仪(美国戴安公司),包括DP四元梯度泵、EGC II KOH发生器、在线脱气单元、DC电导检测器、ED安培检测器(含金电极、pH/Ag/AgCl复合电极和钛对电极)、ASRS-

300 4 mm 抑制器、Chromleon 6.8 色谱工作站、IonPac AG18 保护柱(50 mm × 4 mm)、IonPac AS18 分离柱(250 mm × 4 mm)、Barnstead-Nanopure 纯水机、0.22 μm 尼龙滤膜过滤头。

M6P 购自 Sigma 公司,纯度大于 98%。一系列合成药物中间体样品(0700 到 0712 号)是以甘露糖、羟基保护试剂和磷酸为原料在实验室经合成反应制得的 M6P 粗品。实验用水均为大于 18.2 MΩ · cm 的二次去离子水。

1.2 实验步骤

1.2.1 标准溶液的配制

称取标准样品,用水配制 1.0 g/L 的 M6P 标准贮备液,保存于 -4 °C 冰箱冷藏室中。临用时将其稀释成 10.0 mg/L 的 M6P 标准溶液。分别准确移取该 M6P 标准溶液 0、0.3、0.5、2.5、5.0、25 mL 分置于 50 mL 容量瓶中,用水准确定容至刻度,配制成质量浓度为 0、0.06、0.1、0.5、1.0 和 5.0 mg/L 的标准工作溶液。

1.2.2 样品制备

称取 M6P 的合成中间体 0.1000 g 置于 100 mL 容量瓶中,加水准确定容至刻度,振荡溶解;取该溶液经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤,弃去初滤液,进样前取续滤液稀释 10 倍后供色谱测定。

1.2.3 色谱条件

淋洗液为 25 mmol/L 氢氧化钾溶液(由 EGC II KOH 发生器在线产生);流速为 1.0 mL/min;进样体积为 25 μL;安培检测器和电导检测器串联检测,安培检测器放置在前,电导检测器放置在后;安培检测采用 Au 工作电极、Ag/AgCl 参比模式、碱性条件下糖四电位波形(见表 1)和脉冲积分法;电导检测池的温度为 35 °C,抑制器电流为 62 mA;外标法定量。

表 1 6-磷酸甘露糖的四电位波形
Table 1 Quadruple waveform of mannose-6-phosphate (M6P)

Time/s	Potential/V	Integration
0.00	-0.1	
0.20	-0.1	begin
0.40	-2.0	end
0.41	-2.0	
0.42	+0.6	
0.43	+0.6	
0.44	-0.1	
0.50	-0.1	

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 电化学检测器的考察

离子色谱常用的电化学检测器有电导和安培两种。电导检测器是测定可离解化合物的通用型检测器,主要用于测定无机阴、阳离子和部分极性有机物;安培检测器是一种专属性检测器,常用于测定那些在外加电压下能够在工作电极上发生氧化或者还原反应的物质^[12]。M6P的结构中含有磷酸根和甘露糖,磷酸根的离解性很强,在电导检测器上具有很强的信号;甘露糖具有多个活性羟基,在给定电压下,该类结构能够在安培检测器上发生氧化还原反应,产生强烈的电信号,即M6P在电导和安培两种电化学检测器上都有检出信号。M6P粗品是以磷酸等为主要原料经化学合成制得的,含有较多的杂质,在建立分析方法时需要同时检测M6P和反应原料磷酸。由于磷酸根在安培检测器上没有响应,考虑到中间体中化合物的性质,本实验选择安培、电导两种电化学检测器串联使用。

2.1.2 电化学检测条件的考察

安培检测器测定糖类化合物具有较高的灵敏度和专属性,通常可以达到 pmol 的水平^[10-12]。在特定电位下,利用糖在金电极上发生的氧化还原反应,记录产生的电流变化,可以达到含量测定的目的。本实验测定M6P时采用的是脉冲积分安培检测器。脉冲积分安培检测在一个周期中对工作电极所施加的是对应时间波形的循环电位,在整个分离过程中循环是连续的。这种电位波形的循环不但保持了检测的高灵敏度,而且基线平稳,重复性非常好。该循环电位被称为糖的四电位波形^[12]。在M6P的分子结构中磷酸根取代了甘露糖上的一个羟基,其他的活性羟基在碱性条件下的特定电位仍可发生氧化还原反应使电流产生变化。实验结果表明M6P结构中的活性羟基使其在安培检测器上具有很高的灵敏度和良好的重现性。

安培检测器分析活性羟基时需要在碱性环境下,因此两种电化学检测器串联使用时需将安培检测器放置在前、电导检测器放置在后。使用电导检测器分析磷酸根时需要降低背景电导,氢氧化钾淋洗液经过抑制器后,钾离子被离子交换除去,溶液基本为水,背景电导大大降低,可满足磷酸根测定对灵敏度的要求。

2.1.3 淋洗液浓度的考察

IonPac AS18 和 IonPac AG18 是以苯乙烯-二乙烯基苯为基质,烷醇季铵基为功能基团的离子交

换色谱柱,具有较弱的疏水性,常用的淋洗液是氢氧化钠或氢氧化钾溶液,是分析无机阴离子常用的色谱柱^[12]。在KOH淋洗液浓度为25 mmol/L时,阴离子磷酸根的保留时间约为20 min。考虑到M6P中磷酸根的存在,尝试采用这一色谱柱分析M6P。实验发现,中间体样品中大量存在的反应原料甘露糖在IonPac AS18色谱柱上基本没有保留,但当甘露糖键合了磷酸根形成M6P后,化合物的保留明显增强。推测磷酸基团的存在使M6P的 pK_a 大大降低,离解性显著增强,能够在常规的离子交换柱IonPac AS18上有较强的保留。根据文献^[8]用NaOH溶液和NaAc溶液梯度淋洗(A相为200 mmol/L NaOH溶液,B相为2~300 mmol/L NaAc溶液),在Carbopac PA 100糖柱上可将M6P与其他磷酸甘露糖杂质分离。我们在分析实验中发现磷酸根在Carbopac PA 100糖柱上的保留很强,需要更高浓度的淋洗液才能将磷酸根从色谱柱上洗脱下来。但高浓度的淋洗液无法使用常规的抑制器(ASRS-300 4 mm)抑制背景电导,因而无法使用抑制型电导检测器检测磷酸根。在M6P的合成过程中还会产生其他杂质,使用较高浓度的KOH溶液(如50 mmol/L KOH溶液)时磷酸根的出峰时间可缩短至10 min左右,但M6P与其他杂质的分离度下降,无法完全分离。经过优化,以浓度为25 mmol/L的KOH溶液为淋洗液,在Ionpac AS18色谱柱上分离M6P基本不受其他杂质干扰,与磷酸根的保留时间相差较大(见图1)。

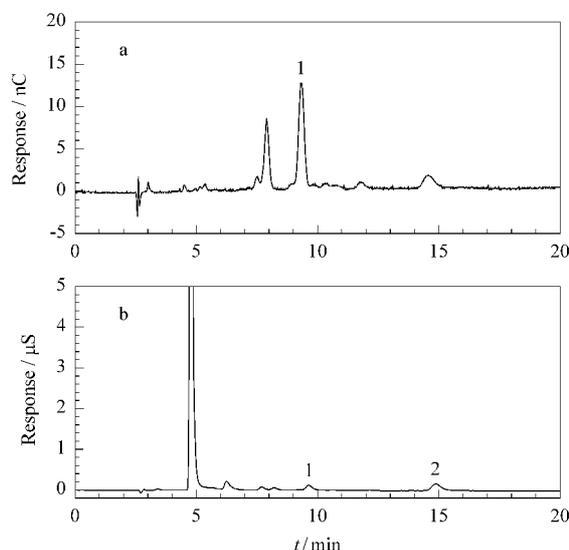


图1 样品中6-磷酸甘露糖与磷酸根的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mannose-6-phosphate and phosphate in a real sample

a. amperometric detection; b. conductivity detection.

1. mannose-6-phosphate (about 2.00 mg/L); 2. phosphate (1.00 mg/L).

等度淋洗大大简化了仪器设备。使用等度泵和普通的阴离子交换柱分析样品,还可使淋洗液进入抑制器降低背景电导后进入电导检测器测定氯离子和磷酸根等阴离子。与使用 Carbobac PA 100 糖柱的色谱条件^[8]相比,使用这一方法在对实际样品进行分析时收到了良好的效果,有效测定了合成中间体中 M6P 的含量,指导了药物合成方法的研究。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系与方法检出限

按 1.2.3 节的色谱条件测定 1.2.1 节配制的 M6P 标准工作溶液。以峰面积 Y 对质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归,其线性方程为 $Y = 0.6947X - 0.0120$, 相关系数为 0.9998, M6P 在其质量浓度为 0.06 ~ 10.0 mg/L 范围内线性关系良好。以信噪比为 3 计 M6P 的方法检出限为 0.02 mg/L (用安培检测器测定)。标准溶液的色谱图见图 2。

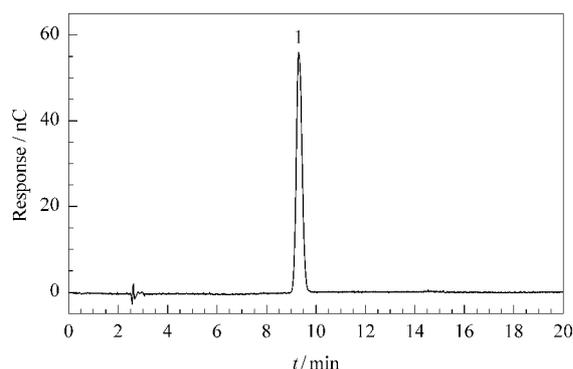


图 2 安培检测器检测 6-磷酸甘露糖标准溶液 (8.00 mg/L) 的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of mannose-6-phosphate standard solution (8.00 mg/L) detected with an amperometric detector
1. mannose-6-phosphate.

2.2.2 方法的重复性

取同一样品,按 1.2.2 节方法平行处理 8 份,按 1.2.3 节色谱条件测定,考察方法的重复性。M6P 的保留时间、峰面积、峰高和含量的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.47%、1.60%、1.26%、1.67%,均小于 2%,表明方法的重复性较好。

2.2.3 回收率

根据文献^[16]的合成方法,M6P 的反应原料主要是甘露糖、羟基保护试剂和磷酸。准确称取除甘露糖外的反应原料,按照反应条件制成空白反应液 10.000 g,分别加入低、中、高 3 种不同浓度的 M6P 标准溶液,按 1.2.2 节方法制备样品,按 1.2.3 节色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2,样品中 M6P 的回收率为 92.1% ~ 103.1%,RSD 均小于 3%。

表 2 6-磷酸甘露糖的加标回收率测定 (n=6)

Table 2 Recoveries of the M6P spiked in blank reaction liquids (n=6)

Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
0.080	0.073	92.1	2.79
0.100	0.103	103.1	1.44
0.500	0.496	99.2	1.09

2.3 样品测定

按 1.2.2 节的方法对中间体样品稀释,按 1.2.3 节色谱条件测定一系列合成中间体样品中 M6P 的含量。其中 0710 号中间体样品中 M6P 的质量浓度为 9.56 mg/L,经计算得含量为 9.56%,其色谱图见图 3。

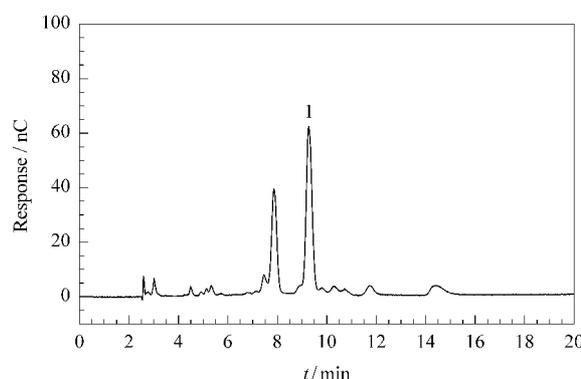


图 3 0710 号中间体样品的安培检测色谱图

Fig. 3 Chromatogram of Sample 0710 intermediate detected with an amperometric detector
1. mannose-6-phosphate.

3 结论

以 25 mmol/L 氢氧化钾为淋洗液,利用 M6P 的强离解性,采用离子交换色谱分离、安培和电导串联检测,可排除合成中间体中糖类化合物和磷酸根对 M6P 测定的干扰。本方法快速、准确,选择性好,样品处理步骤简单,分析周期短,不受杂质干扰,适用于量产样品的测定。本方法是对磷酸化糖类化合物分析方法的一种尝试。同时本方法的淋洗液经抑制器抑制后基本为水,完全可与质谱检测器联用对磷酸化糖类化合物进行分析,为生命体样品中 6-磷酸甘露糖及其他磷酸化糖类化合物的分析提供了一种思路。

参考文献:

- [1] Maeda Y, Kinoshita T. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780 (6): 861
- [2] Huang X X, Piao Y J, Huo X, et al. *Journal of Jinan University: Medicine Edition* (黄许, 朴英杰, 霍霞, 等. 暨南大学学报: 医学版), 1996, 17(4): 156
- [3] González-Noriega A, Michalak C, Antonio Sosa Melgarejo J. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1745(1): 7

- [4] Coutinho M F, Prata M J, Alves S. *Mol Genet Metab*, in press
- [5] Zhou Y L, Wu J X, Xiong M L, et al. *Chinese Journal of Gastroenterology* (周韵澜, 吴建新, 熊敏莉, 等. *胃肠病学*), 2008, 13(11): 651
- [6] Hardré R, Khaled A, Willemetz A, et al. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(1): 152
- [7] Ramírez-Mata A, Michalak C, Mendoza-Hernández G, et al. *Exp Cell Res*, 2011, 317(16): 2364
- [8] Orvisky E, Stubblefield B, Long R T, et al. *Anal Biochem*, 2003, 317(1): 12
- [9] Ferro V, Li C P, Fewings K, et al. *Carbohydr Res*, 2002, 337(2): 139
- [10] Morales V, Corzo N, Sanz M L. *Food Chem*, 2008, 107(2): 922
- [11] Sevcik R S, Mowery R A, Becker C, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 1236
- [12] Mou S F, Liu K N, Ding X J. *Ion Chromatographic Method and Its Application*. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (牟世芬, 刘克纳, 丁晓静. *离子色谱方法及应用*. 2版. 北京: 化学工业出版社), 2005: 76, 140, 154
- [13] Grey C, Edebrink P, Krook M, et al. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 1827
- [14] Mou S F, Yu H, Cai Y Q. *Chinese Journal of Chromatography* (牟世芬, 于泓, 蔡亚歧. *色谱*), 2009, 27(5): 667
- [15] Fan L, Xu Y, Lian Z N, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (范丽, 徐勇, 连之娜, 等. *色谱*), 2011, 29(1): 75
- [16] Khanjin N A, Montero J L. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(22): 4017