

低分子量肝素核磁共振波谱法的定性鉴别方法研究

张琪¹, 王爱法¹, 李慧义², 范慧红¹, 杨化新¹, 肖新月¹, 李晓东¹

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京, 100050; 2. 国家药典委员会, 北京, 100061)

摘要 目的: 建立低分子量肝素核磁共振波谱法(NMR)的定性鉴别方法。方法: 一维¹³C-NMR实验是在装配5 mm BBO探头的Bruker Ascend-500核磁共振谱仪上采集。采样时间1.1秒; 弛豫延长时间(D1)1秒; 测量温度40℃; 谱宽 δ 236。结果: 通过不同类型低分子量肝素标准品和市售产品的核磁共振一维碳谱精细结构信息比较发现, 不同类型的低分子量肝素都可以通过碳谱特征信号进行区分。结论: 核磁共振一维碳谱定性鉴别低分子量肝素类型的方法, 专属性强, 简单方便, 是鉴别低分子量肝素较好的方法。
关键词: 低分子量肝素; 碳谱; 核磁共振波谱法; 鉴别

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)09-1727-06
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.09.27

Identification of low molecular weight heparin by NMR

ZHANG Qi¹, WANG Ai-fa¹, LI Hui-yi², FAN Hui-hong¹,
YANG Hua-xin¹, XIAO Xin-yue¹, LI Xiao-dong¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;
2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

Abstract Objective: To establish an NMR method for the identification of low molecular weight heparin. **Method:** Carbon nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) spectra were collected by using a Bruker Ascend 500 spectrometer with 5 mm BBO probe. The measurement parameters setting were: acquisition time 1.1 s, relaxation delay (D1) 1 s, temperature 40 °C, and spectrum width δ 236. **Result:** By comparing the ¹³C-NMR spectra of low molecular weight reference standard and purchased heparin, there were some unique signals in the ¹³C-NMR spectra, which could be used to identify different types of low molecular weight heparin. **Conclusion:** 1D ¹³C-NMR spectroscopy is a specific, simple and convenient method for the identification of low molecular weight heparin. **Keywords:** low molecular weight heparin; ¹³C-NMR; nuclear magnetic resonance spectroscopy; identification

肝素是一种抗凝剂,是由葡萄糖胺、L-艾杜糖醛苷、N-乙酰葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸交替组成的黏多糖硫酸酯^[1,2],在体内外都有抗凝血作用。肝素的主要不良反应是易引起自发性出血、诱导血小板减

少症^[3]及骨质疏松^[4]。为了减少以上副作用,20世纪80年代末,欧洲首先研发出了低分子量肝素(low molecular weight heparin, LMWH)。经大量临床论证证实,低分子量肝素的活性/抗凝血活性的比值为

第一作者 Tel:(010)67095655; E-mail:xdli@nifdc.org.cn

1.5~4.0,而普通的肝素为1,既保持了肝素的抗血栓作用,又降低了出血的危险^[5-7]。

目前国内外已有10多种不同类型的低分子量肝素产品^[8],按生产工艺不同常见的有:依诺肝素钠(enoxaparin sodium)^[9]、那曲肝素钙(nadroparin calcium)、达肝素钠(dalteparin sodium)、帕肝素钠(parnaparin sodium)和亭扎肝素钠(tinzaparin sodium)等。目前欧洲药典(EP)已收录了上述5种低分子量肝素产品,美国药典(USP)也收录了依诺肝素钠。低分子量肝素的制备是以肝素为原料,用物理、化学或生物的方法将其分级或降解,得到具有较低分子量的组分或片段^[10]。例如,依诺肝素钠为肝素苄酯碱性 β -裂解制得;帕肝素为肝素被 Cu^{2+} 与过氧化氢氧化解聚制得;亭扎肝素为肝素由肝素酶酶解制得;达肝素和那曲肝素为亚硝酸控制解聚降解制得^[11]。

通过比较类似工艺制备低分子量肝素产品(例如,达肝素和那曲肝素之间),发现其具有更多的相似性,然而,依诺肝素和亭扎肝素的比较表明其物理、化学和生物学特性彼此相差很大^[12]。肝素解聚过程的微小变化可能会造成低分子量肝素结构或组成的巨大变化,因此,通过不同方法制备得到的低分子量肝素产品具有不同的物理、化学和生物学特性。由于不同生产工艺低分子量肝素产品在分子结构、理化和生物学特性等方面的确定和潜在差异性,美国FDA、欧洲药品局(European Medicines Agency)和世界卫生组织(WHO)等机构,把不同低分子量肝素作为单独的产品,不被视为临床等效。根据国际标准,低分子量肝素产品的选择应基于其各自成熟的临床安全性和有效性数据^[13]。

我国目前市售的低分子量肝素产品分为进口产品和仿制产品:进口产品有那曲肝素钙注射剂、达肝素钠注射剂等;仿制产品有低分子量肝素钠注射剂和低分子量肝素钙注射剂。目前我国没有对低分子量肝素进行分类,而相关报道称不同生产工艺的低分子量肝素的毒副作用不同^[14-15]。

USP和EP收录的低分子量肝素质量标准^[16-17]中,主要包括重均分子量、抗Xa效价、抗Xa/抗IIa、钠盐与钙盐的鉴别、重金属的限量、核酸类杂质、杂蛋白的测定及安全性检查项等。此外,还增加了核磁共振一维碳谱定性鉴别低分子量肝素类型的方法,要求样品与标准物质的¹³C-NMR谱相似。通过大量文献和实验比较,目前核磁共振法能很好地区别不同类型的低分

子量肝素,而中国药典没有相关方法的收录。2008年肝素中毒事件^[18]给我们很好的警示,中国药典也需要与时俱进,尽早研究出低分子量肝素的有效鉴别方法。本课题组已经对不同类型低分子量肝素标准品进行了初步研究,对其碳谱精细结构信息解析发现,不同类型的低分子量肝素都有其特征的碳谱信号,因此可以通过碳谱特征信号对低分子量肝素进行区分^[19]。

本文通过对美国及国内一些厂家的低分子量肝素产品进行核磁共振一维碳谱鉴定研究,对市售的不同类型、不同批次低分子量肝素核磁共振碳谱进行比较,建立低分子量肝素核磁共振碳谱数据库,对市售低分子量肝素产品的质量进行摸底考察,为核磁共振法应用,为低分子量肝素药品质量提升打下基础。

1 实验方法

1.1 仪器及试剂 Bruker公司Ascend-500核磁共振仪,milli-Q的纯水仪,试剂氘代甲醇、重水,购自SIGMA-Aldrich;EP标准品:依诺肝素钠,code号E0180000;那曲肝素钙,code号N0025000;达肝素钠,code号D0070000;帕肝素钠,code号P0305000;亭扎肝素钠,code号T1490000。USP标准品:依诺肝素钠,批号GOL137。市售低分子量肝素样品详细信息见表1。

表1 低分子量肝素样品信息

Tab. 1 Sample information of low molecular weight heparin

样品号 (sample number)	样品名称 (sample name)	生产厂家 (venders)
1	低分子量肝素钠(low molecular weight heparin sodium)	厂家1 (vender 1)
2	依诺肝素钠(enoxaparin sodium)	厂家2 (vender 2)
3	低分子量肝素钙(low molecular weight heparin calcium)	厂家3 (vender 3)
4	低分子量肝素钙(low molecular weight heparin calcium)	厂家4 (vender 4)
5	低分子量肝素钠(low molecular weight heparin sodium)	厂家5 (vender 5)
6	低分子量肝素钠(low molecular weight heparin sodium)	厂家6 (vender 6)
7	那曲肝素钙(nadroparin calcium)	厂家7 (vender 7)

1.2 供试品溶液配制 按照USP和EP收录的方法配制溶液,称取低分子量肝素约200 mg,加入纯水、重水、氘代甲醇的混合溶剂(体积比例为8:2:0.5)1 mL,使其完全溶解,转移到5 mm核磁管中采集数据。

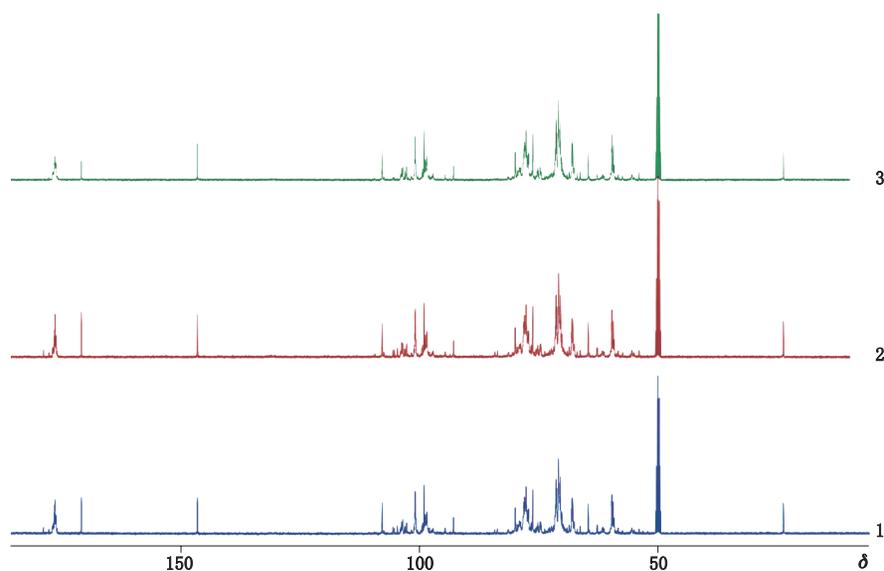
1.3 仪器参数设置 一维 ^{13}C -NMR 实验是在装配 5 mm BBO 探头的 Bruker Ascend-500 核磁共振谱仪上采集。采样时间(AQ) 1.1 s, 弛豫延长时间(D1) 1 s, 测量温度(T) 40 $^{\circ}\text{C}$, 谱宽(SW) δ 236.6, 采样点数(data point) 64 k, 扫描次数(NS) 32 768 次, 线展宽因子(line-broadening factor) 0.3 Hz。

在上述实验条件下, 调整仪器参数、调谐、锁场、匀场、采样, 得到 ^{13}C -NMR 谱, 再进行基线和相位调整。用氘代甲醇定标, 甲醇中碳的化学位移定为 δ 50.0^[16-17] (USP 和 EP 收录方法)。

2 结果与讨论

2.1 乙醇残留 比较不同样品的碳谱, 发现其中一些样品有乙醇残留, 其特征化学位移在 δ 18.7 和 δ 59.3 附近(图 3)。由于在肝素的生产工艺中用到乙醇, 乙醇残留也属于正常, 本文不对乙醇残留信号进行特殊讨论。

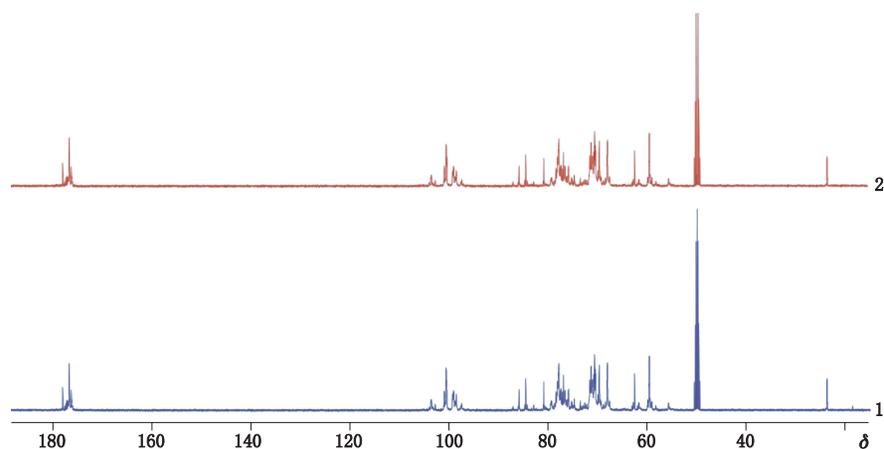
2.2 样品 2、样品 5 和样品 7 厂家 2 和厂家 5 明确说明其生产的低分子量肝素是依诺肝素钠, 厂家 7 给出其生产的低分子量肝素是那曲肝素钙, 通过比较其与欧洲药典的相应标准品的一维碳谱发现, 这几个样品与相应的 EP 标准品碳谱信号的化学位移, 峰形和强度基本一致(图 1 和图 2)。



1. EP 标准品依诺肝素钠 (EP reference standards, enoxaparin sodium) 2. 样品 2 (依诺肝素钠) (sample 2, enoxaparin sodium) 3. 样品 5 (依诺肝素钠) (sample 5, enoxaparin sodium)

图 1 3 种低分子量肝素的一维 ^{13}C 谱图

Fig. 1 The 1D ^{13}C -NMR spectra of 3 low molecular weight heparin



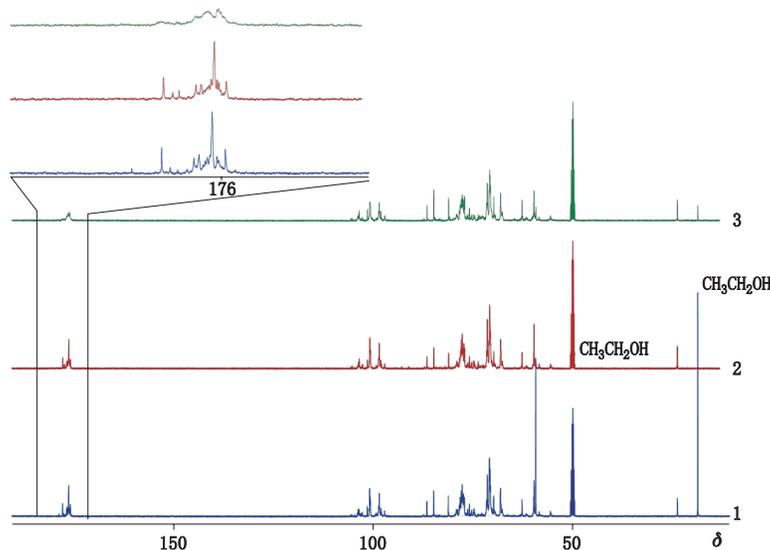
1. EP 标准品那曲肝素钙 (EP reference standards, nadroparin calcium) 2. 样品 7 (那曲肝素钙) (sample 7, nadroparin calcium)

图 2 2 种低分子量肝素的一维 ^{13}C 谱图

Fig. 2 The 1D ^{13}C -NMR spectra of 2 low molecular weight heparin

厂家1和厂家6没有明确说明其生产的低分子量肝素类型。通过与EP标准品的一维¹³C谱图比较发现,其与EP达肝素钠标准品的一维¹³C相似性较高(图3)。不同处有:(1)样品6的一维¹³C谱图中在 δ 175.5~178.0处的峰与EP达肝素钠标准品在相同

化学位移处的峰形不一致(图3放大图);(2)信号峰峰形明显不一致。表明样品6与达肝素钠标准品中相同的糖单元的空间结构不同^[20-22],因此样品6所使用的生产工艺与EP标准品的生产工艺不完全一致。



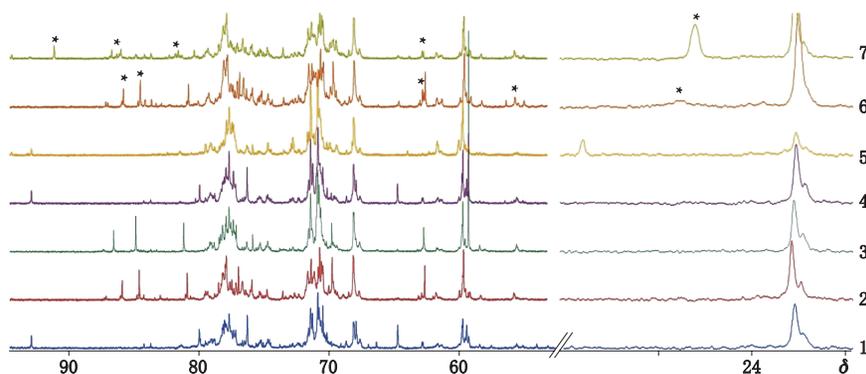
1. EP 标准品达肝素钠 (EP reference standard, dalteparin sodium) 2. 样品 1 (sample 1) 3. 样品 6 (sample 6)

图 3 3 种低分子量肝素的一维¹³C谱图及其低场区放大图

Fig. 3 The expanded and total 1D ¹³C-NMR spectra of 3 low molecular weight heparin

2.3 样品 3 和样品 4 将低分子量肝素样品 3 和样品 4 与 EP 5 种标准品一维¹³C谱图(图 4)对比发现,这 2 个样品与 EP 现有的 5 种标准品相似度都不高,不同处有:(1)在化学位移 δ 56.0, δ 62.3 和 δ 80.0~92.0 区间处的信号峰与 5 种标准品在相应化学位移处峰在精细化学位移、峰形、峰强度等方面有很大差别,表明这 2 个样品与现有的 5 种标准品在所

含糖单元种类、数量、空间结构及其可能的基团修饰等方面不一致;(2)样品 4 在化学位移 δ 24.5 处多了 1 个甲基峰,表明样品 4 在甲基端的空间结构与 EP 5 种标准品有明显的不同。一般情况下,低分子量肝素在所含糖单元种类、数量、空间结构及其可能的基团修饰等方面与其生产工艺密切相关,因此样品 3 和样品 4 所使用的生产工艺与 EP 5 种标准品不完全一致。



*. 样品 3、4 与标准品差别大的信号峰 (the major differences between sample 3, 4 with reference standards)

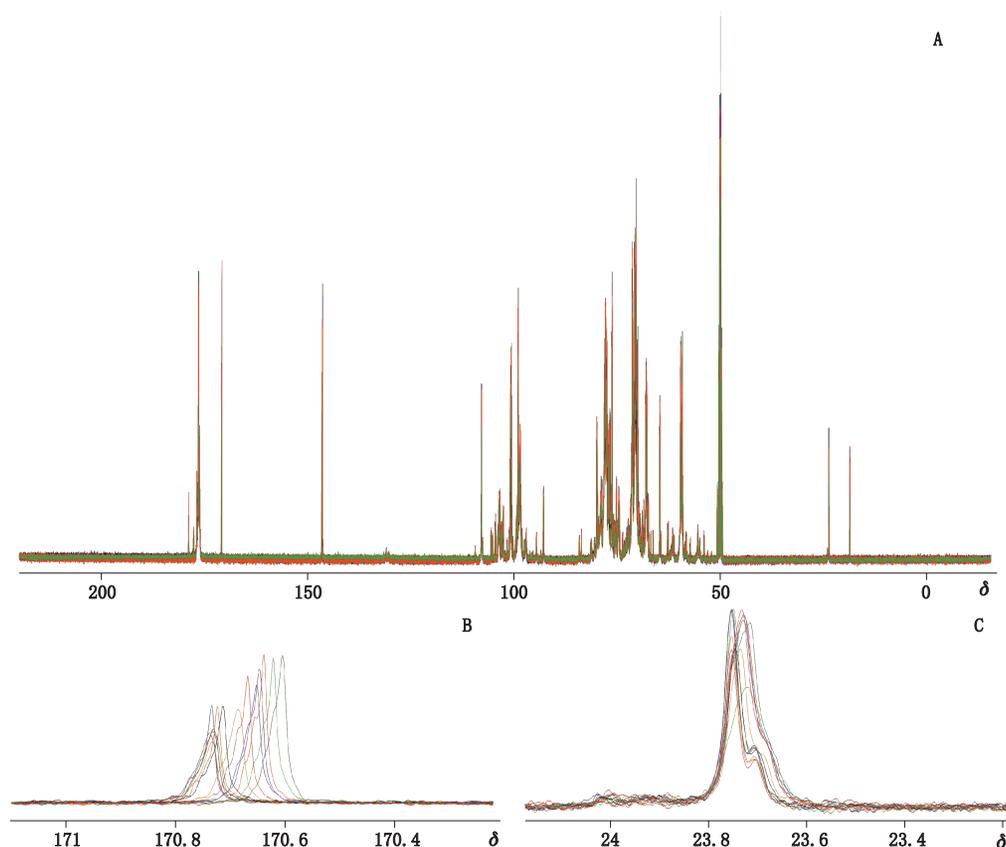
1. EP 标准品依诺肝素钠 (EP reference standards, enoxaparin sodium) 2. EP 标准品那曲肝素钙 (EP reference standards, nadroparin calcium) 3. EP 标准品达肝素钠 (EP reference standards, dalteparin sodium) 4. EP 标准品亭扎肝素钠 (EP reference standards, tinzaparin sodium) 5. EP 标准品帕肝素钠 (EP reference standards, parnaparin Sodium) 6. 样品 3 (sample 3) 7. 样品 4 (sample 4)

图 4 7 种低分子量肝素一维¹³C谱图比较

Fig. 4 The 1D ¹³C-NMR spectra of 7 low molecular weight heparin

2.4 厂家 2-15 批样品 对 15 批依诺肝素钠样品 2 的同生产工艺不同生产批次的样品进行测定,发现 15 批样品的相似度都很高(图 5-A)。表明在严格控制生产工艺、保证生产质量的条件下,生产得到样品的一维 ^{13}C 谱图具有很高相似度,可以作为低分子量肝素产品质量控制的方法。尽管这 15 批次样品一维 ^{13}C 谱图相似度很高,但在某些化学位移处有偏差(δ 0.1~0.3)(图 5-B, C)。通常情况下,核磁共振谱

图中化学位移的细微变化有许多影响因素,具体到低分子量肝素样品中可能有以下几种情况:(1)低分子量肝素样品自身的不一致性;(2)核磁共振样品制备过程中引入的影响因素(样品的浓度、pH、离子强度等);(3)核磁共振数据采集过程中的影响因素(温度的准确性,温度的波动范围,核磁样品管的均一性等)。目前,在 USP 和 EP 的相关项下要求样品与标准物质的 ^{13}C -NMR 谱相似,没有具体的标准。



A. 叠加图全谱(overlaid total spectrum) B, C. 局部放大图(expanded spectra)

图 5 厂家 2 的 15 批次样品叠加图

Fig. 5 Overlaid spectra of 15 batches from manufacturer 2

2.5 药典相关标准 目前,USP 和 EP 收录的低分子量肝素质量标准项下的核磁共振 ^{13}C 谱定性鉴别方法只简单描述了样品的制备和相关放行标准,即相关项下要求样品与标准物质的 ^{13}C -NMR 谱相似。本课题组在研究过程中发现,核磁样品的制备及数据采集参数可能会对 ^{13}C 谱图产生一定的影响,应该对其进行详细的描述。

核磁共振 ^{13}C 谱中包含许多结构信息,如化学位移、峰形、相对强度等,通常情况下, ^{13}C 谱的比较需要对上述信息都进行比较。而 USP 和 EP 只描述

谱图相似,其中化学位移的精细差别(如厂家 2 的 15 批次样品)、精细峰形比较(样品 6)等均未说明,造成在具体的检验过程中判定困难。建议应具体描述如何进行相似度比较,对参数进行量化,以便于比较,例如:(1)化学位移(δ)精细差别应规定在什么范围内为相似;(2)比较精细峰形时应规定其中一些特征峰的半峰宽、多重峰等参数;(3)在峰相对强度比较中应使用相对定量方法规定每组峰的强度范围等。

中国药典中目前还未加入低分子量肝素 ^{13}C 谱

定性鉴别项,建议增加该项鉴别,并研制相应的标准物质。在研制相应标准物质的过程中,应加大样本量对其结构进行深层次的研究,充分考虑生物活性与¹³C谱得到的结构信息之间的关系,必要时可以与国外产品进行结构一致性的考察。

3 总结

本文通过核磁共振一维碳谱鉴定了EP低分子量肝素标准物质和一些厂家市售的低分子量肝素产品,比较5种不同低分子量肝素EP标准物质¹³C谱精细结构信息发现,不同类型的低分子量肝素都有其特征的¹³C谱信号。在不同厂家低分子量肝素样品检测中,可以通过样品特征信号与标准物质¹³C谱信号的比较,确认其类型和来源。USP和EP相关项下要求样品与标准物质的¹³C-NMR谱相似,相似的判断标准有待进一步研究。

参考文献

- [1] CASU B, NAGGI A, TORRI G. Re-visiting the structure of heparin [J]. *Carbohydr Res*, 2015; 403(1): 60
- [2] CASU B. Heparin structure [J]. *Haemostasis*, 1990, 20(Suppl 1): 62
- [3] LEE GM, AREPALLY GM. Heparin-induced thrombocytopenia [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 2013: 668
- [4] REES S. How common medicines can affect bone health [J]. *Nurs Times*, 2014, 110(32-33): 25
- [5] LIU Z, JI S, SHENG J, *et al.* Pharmacological effects and clinical applications of ultra low molecular weight heparins [J]. *Drug Discov Therap*, 2014, 8(1): 1
- [6] HULL RD, LIANG J, BERGQVIST D, *et al.* Benefit-to-harm ratio of thromboprophylaxis for patients undergoing major orthopaedic surgery. A systematic review [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 111(2): 199
- [7] HIRSH J, WARKENTIN TE, SHAUGHNESSY SG, *et al.* Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety [J]. *Chest*, 2001, 119(1 Suppl): 64S
- [8] KLEINSCHMIDT K, CHARLES R. Pharmacology of low molecular weight heparins [J]. *Emerg Med Clin North Amer*, 2001, 19(4): 1025
- [9] QUARTERMAIN D, LI Y, JONAS S. Enoxaparin, a low molecular weight heparin decreases infarct size and improves sensorimotor function in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 288(2): 155
- [10] 董学畅,张淑桂,杨素仙. 低分子肝素及其制备 [J]. *云南化工*, 2000, 27(1): 44
DONG XC, ZHANG SG, YANG SX. The low molecular weight heparin and its preparation [J]. *Yunnan Chem Technol*, 2000, 27(1): 44
- [11] SHIVELY JE, CONRAD HE. Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin [J]. *Biochemistry*, 1976, 15(18): 3932
- [12] LINHARDT RJ, GUNAY NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1999, 25(Suppl 3): 5
- [13] NICOLAIDES AN, FAREED J, KAKKAR AK, *et al.* Prevention and treatment of venous thromboembolism—International Consensus Statement [J]. *Inter Angiol: J Inter Union Angiol*, 2013, 32(2): 111
- [14] GUERRINI M, BECCATI D, SHRIVER Z, *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 669
- [15] MARUYAMA T, TOIDA T, IMANARI T, *et al.* Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 306(1-2): 35
- [16] USP 36 [S]. 2017: 3979
- [17] EP 8.0 [S]. 2014: 0828
- [18] 彭向宇. 百特事件后我国肝素企业首位度分析 [J]. *肉类工业*, 2014, 394(2): 108
PENG XY. The analysis of Baxter incident after the first heparin enterprises in China [J]. *Meat Ind*, 2014, 394(2): 108
- [19] 张琪,王爱法,朱红波,等. 低分子量肝素核磁共振鉴别方法的研究 [J]. *中国药品标准*, 2015, 16(2): 123
ZHANG Q, WANG AF, ZHU HB, *et al.* Study of NMR identification method for low molecular weight heparin [J]. *Drug Stand China*, 2015, 16(2): 123
- [20] SANDERSON PN, HUCKERBY TN, NIEDUSZYNSKI IA. Chondroitinase ABC digestion of dermatan sulphate. N.m.r. spectroscopic characterization of the oligo- and poly-saccharides [J]. *Biochem J*, 1989, 257(2): 347
- [21] MULLOY B, FORSTER MJ, JONES C, *et al.* NMR and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin [J]. *Biochem J*, 1993, 293(Pt 3): 849
- [22] MULLOY B, MOURAO PA, GRAY E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR [J]. *J Biotechnol*, 2000, 77(1): 123

(本文于2016年8月29日收到)