



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102759596 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201210235395. 4

(22) 申请日 2012. 07. 09

(71) 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路  
27 号

(72) 发明人 迟连利 李道远 王章杰

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限  
公司 37219

代理人 王绪银

(51) Int. Cl.

G01N 30/89 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

一种低分子肝素的离子对反相色谱质谱联用  
检测方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种低分子肝素的离子对反相色谱与高分辨质谱联用检测方法,该方法利用离子对反相色谱与高分辨质谱进行联用检测低分子肝素的各个组分,通过离子对反相色谱分离样品中各主要组分,并通过高分辨质谱获得精确的分子量,计算出其糖链序列信息,包括两端结构、糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,从而对低分子肝素的结构进行比较精细的表征。本发明对于提高肝素的检测水平、保障药品安全具有极大的实用价值。

1. 一种低分子肝素的离子对反相色谱质谱联用检测方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 将胺类离子对试剂溶解于去离子水,用 pH 调节试剂调 pH 值至 5.5 ~ 8.5,制得浓度为 10 ~ 30mM 的流动相 A;

(2) 将胺类离子对试剂溶解于体积百分比为 75% 的乙腈或体积百分比为 75% 甲醇溶液,用 pH 调节试剂调 pH 值至 5.5 ~ 8.5,制得浓度为 10 ~ 30mM 的流动相 B;

(3) 将待测低分子肝素样品溶于流动相 A,配制成浓度为 6 ~ 10mg/mL 的待测溶液,经过滤后,使用 C<sub>18</sub> 反相色谱柱;在流速 8 ~ 12 μL/min,洗脱梯度为:0 ~ 5min,80% 流动相 A,20% 流动相 B;5 ~ 65min,40 ~ 80% 流动相 A,20 ~ 60% 流动相 B,检测器波长为 232nm 的条件下进行检测,得到紫外检测色谱图;

(4) 然后,通过在正离子模式或负离子模式下用高分辨质谱仪进行检测,得到高分辨质谱图;

(5) 通过紫外检测色谱图确定低分子肝素的种类,然后根据步骤(4)获得的高分辨质谱图获得主要峰的质荷比 M,经如下公式计算组分的精确分子量 m:

正离子模式:  $m = zM - nX - zY$

负离子模式:  $m = zM - nX + zY$

其中:z 表示电荷数,n 表示离子对试剂分子个数,X 表示离子对试剂的分子量,Y 表示质子氢的分子量;

(6) 然后使用计算机辅助方法进行解谱,具体过程为:通过计算机生成各肝素组分的分子量数据库,数据库变量为肝素链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,用步骤(5)中得到的精确分子量与数据库中的理论分子量进行比对获得误差值 I,按误差值 I 的大小对数据库中的数据进行排列,然后,根据质谱仪检测标准品的误差值 II 与误差值 I 进行比对,选取误差值 II 与误差值 I 最为接近的数据库中的理论样品,通过该理论样品的信息即可获知待测低分子肝素样品的低分子肝素种类、肝素糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量信息。

2. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤(1)中的胺类离子对试剂选自:正丙胺、三正丙胺、正戊胺、正丁胺、正己胺。

3. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤(1)中的 pH 调节试剂为:六氟异丙醇、甲酸。

4. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤(4)中的高分辨质谱采用离子阱时间飞行串联质谱仪,设定参数为:正离子模式喷雾电压:+3.6kV;负离子模式喷雾电压:-3.0kV;喷雾气流速:1.5L/min;扫描质量范围:50 ~ 5000。

5. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤(4)中的高分辨质谱采用四级杆时间飞行串联质谱仪,设定参数为:正离子模式喷雾电压:+5.5kV;负离子模式喷雾电压:-4.0kV;帘气压 25psi;喷雾气压:30psi;扫描质量范围:50 ~ 4000。

## 一种低分子肝素的离子对反相色谱质谱联用检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种低分子肝素的离子对反相色谱与高分辨质谱联用检测方法,属于药物、原料药、原料检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 肝素是一种糖胺聚糖类药物,具有强抗凝作用,是治疗血栓栓塞性疾病的首选药物。低分子肝素是肝素经化学方法或者酶法降解制备而成,常见的有依诺肝素钠(Enoxaparin)、那屈肝素钙(Nadroparin)和达肝素钠(Dalteparin)等。与肝素相比,低分子肝素抗血栓活性较高、抗凝活性较低,具有出血副作用小、生物利用度高、体内半衰期长等优势,受到越来越广泛的关注和应用。

[0003] 由于肝素及低分子肝素具有强极性、不均一性、硫酸基团不稳定等特点,其结构表征十分困难。通常分析低分子肝素的方法有凝胶电泳(Cowman M K, et al. Biochemical Journal, 1984, 221(3):707-716.)及HPSEC法(Ahsan A, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995, 84(6):724-727.),但通过这些方法仅能获得非常粗略的分子量信息。用肝素酶将低分子肝素降解成肝素二糖,然后用离子对反相色谱与质谱联用技术分析二糖组成是近年来比较常用的表征方法(Zhang F, et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(9):2793-2803.),但由于检测样品为降解后的肝素二糖,导致该方法不能鉴定未经破坏的完整低分子肝素糖链的结构。

[0004] 除以上提及的方法外,美国药典、欧洲药典和中国药典规定的低分子肝素的检测方法也都是分析低分子肝素混合物,只能对混合物进行表征,而不能对其中的各单一组分进行直接的分析。

### 发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足,提供一种低分子肝素的离子对反相色谱与高分辨质谱联用检测方法,可用于全谱图鉴定低分子肝素原料药和注射剂中主要肝素糖链的结构。

#### [0006] 发明概述

[0007] 本发明利用离子对反相色谱与高分辨质谱进行联用检测低分子肝素的各个组分,通过离子对反相色谱分离样品中各主要组分,并通过高分辨质谱获得精确的分子量,计算出其糖链序列信息,包括两端结构、糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,从而对低分子肝素的结构进行比较精细的表征。

#### [0008] 发明详述

[0009] 一种低分子肝素的离子对反相色谱质谱联用检测方法,步骤如下:

[0010] (1) 将胺类离子对试剂溶解于去离子水,用pH调节试剂调pH值至5.5~8.5,制得浓度为10~30mM的流动相A;本步骤中所述浓度是指胺类离子对试剂中溶质在流动相A中的摩尔浓度;

[0011] (2) 将胺类离子对试剂溶解于体积百分比为75%的乙腈或体积百分比为75%甲醇

溶液,用 pH 调节试剂调 pH 值至 5.5 ~ 8.5,制得浓度为 10 ~ 30mM 的流动相 B;本步骤中所述浓度是指胺类离子对试剂中溶质在流动相 B 中的摩尔浓度;

[0012] (3)将待测低分子肝素样品溶于流动相 A,配制成浓度为 6 ~ 10mg/mL 的待测溶液,经过滤后,使用 C<sub>18</sub> 反相色谱柱;在流速 8 ~ 12 μL/min,洗脱梯度为:0 ~ 5min,80% 流动相 A,20% 流动相 B;5 ~ 65min,40 ~ 80% 流动相 A,20 ~ 60% 流动相 B,检测器波长为 232nm 的条件下进行检测,得到紫外检测色谱图;

[0013] (4)然后,通过在正离子模式或负离子模式下用高分辨质谱仪进行检测,得到高分辨质谱图;

[0014] (5)通过紫外检测色谱图确定低分子肝素的种类,然后根据步骤(4)获得的高分辨质谱图获得主要峰的质荷比 M,经如下公式计算组分的精确分子量 m:

[0015] 正离子模式:  $m = zM - nX - zY$

[0016] 负离子模式:  $m = zM - nX + zY$

[0017] 其中:z 表示电荷数, n 表示离子对试剂分子个数, X 表示离子对试剂的分子量, Y 表示质子氢的分子量;

[0018] (6)然后使用计算机辅助方法进行解谱,具体过程为:通过计算机生成各肝素组分的分子量数据库,数据库变量为肝素链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,用步骤(5)中得到的精确分子量与数据库中的理论分子量进行比对获得误差值 I,按误差值 I 的大小对数据库中的数据进行排列,然后,根据质谱仪检测标准品的误差值 II 与误差值 I 进行比对,选取误差值 II 与误差值 I 最为接近的数据库中的理论样品,通过该理论样品的信息即可获知待测低分子肝素样品的低分子肝素种类、肝素糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量信息。

[0019] 所述步骤(1)中的胺类离子对试剂选自:正丙胺、三正丙胺、正戊胺、正丁胺、正己胺。

[0020] 所述步骤(1)中的 pH 调节试剂为:六氟异丙醇、甲酸。

[0021] 所述步骤(4)中的高分辨质谱如采用离子阱时间飞行串联质谱仪(IT-TOF),设定参数为:正离子模式喷雾电压:+3.6kV;负离子模式喷雾电压:-3.0kV;喷雾气流速:1.5L/min;扫描质量范围:50 ~ 5000;如果采用四级杆时间飞行串联质谱仪(Q-TOF),设定参数为:正离子模式喷雾电压:+5.5kV;负离子模式喷雾电压:-4.0kV;帘气压 25psi;喷雾气压:30psi;扫描质量范围:50 ~ 4000。

[0022] 有益效果

[0023] 本发明可以检测低分子肝素的种类和各单一组分的两端结构、糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,解决了现有技术中检测低分子肝素分子量不精确、无法检测各单一组分的问题,对于提高肝素的检测水平、保障药品安全具有极大的实用价值。

## 附图说明

[0024] 图 1 欧盟依诺肝素钠对照品的紫外检测色谱图;

[0025] 图 2 欧盟依诺肝素钠对照品的总离子流图;

[0026] 图 3 欧盟依诺肝素钠对照品的高分辨质谱图示例;

[0027] 图 4 依诺肝素钠注射液样品的紫外检测色谱图;

[0028] 图 5 依诺肝素钠注射液样品的总离子流图;

- [0029] 图 6 欧盟那屈肝素钙对照品的紫外检测色谱图；  
[0030] 图 7 欧盟那屈肝素钙对照品的总离子流图；  
[0031] 图 8 欧盟达肝素钠对照品的紫外检测色谱图；  
[0032] 图 9 欧盟达肝素钠对照品的总离子流图。

### 具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明做进一步说明,但本发明所保护范围不限于此。

[0034] 液相色谱仪为 Agilent 1100 series 毛细管液相色谱仪,检测器为二极管阵列检测器,工作站为 Agilent ChemStation;质谱为岛津 IT-TOF 型高分辨质谱,工作站为 LC-Solution。

[0035] 实施例 1:

[0036] 一种低分子肝素的离子对反相色谱质谱联用检测方法,步骤如下:

[0037] 1.1 将正戊胺溶解于去离子水,用甲酸调 pH 值至 7.0,制得正戊胺浓度为 15mM 的流动相 A;

[0038] 1.2 将正戊胺溶解于溶解于体积百分比为 75% 的乙腈溶液,用甲酸调 pH 值至 7.0,制得正戊胺浓度为 15mM 的流动相 B;

[0039] 1.3 称取一定量欧盟依诺肝素钠对照品(批号:Batch/lot n° 4),用流动相 A 配置成 8mg/mL 的待测溶液,用 0.22 μm 的水相膜过滤后备用;

[0040] 1.4 使用填料粒径为 5 μm、色谱柱内径为 0.5mm、色谱柱长度为 250mm 的 C<sub>18</sub> 反相色谱柱;在流速 10 μL/min,洗脱梯度为:0 ~ 5min,80% 流动相 A,20% 流动相 B;5 ~ 65min,40 ~ 80% 流动相 A,20 ~ 60% 流动相 B,检测器波长为 232nm 的条件下进行检测,得到紫外检测色谱图;

[0041] 1.5 使用岛津 IT-TOF 高分辨质谱在正离子模式下进行检测,得到高分辨质谱图,设定参数为:喷雾电压:+3.6kV;喷雾气流速:1.5L/min;扫描质量范围:50 ~ 5000。

[0042] 1.6 根据步骤 1.5 中获得的高分辨质谱图中获得的主要峰的质荷比 M,经如下公式计算组分的精确分子量 m:

$$[0043] \quad m = zM - nX - zY$$

[0044] 其中:z 表示电荷数,n 表示离子对试剂分子个数,X 表示离子对试剂的分子量,Y 表示质子氢的分子量。

[0045] 1.7 通过计算机生成依诺肝素各组分的分子量数据库,数据库变量为肝素链长度、乙酰基及硫酸基取代数量,用步骤 1.6 中得到的精确分子量与数据库中的理论分子量进行逐一比对,获得误差值 I,其计算公式如下:

$$[0046] \quad \text{误差值 } I = (\text{实测分子量} - \text{理论分子量}) / \text{理论分子量}$$

[0047] 按误差值 I 的大小对数据库中的数据进行排列,然后,根据质谱仪检测标准品的误差值 II 与误差值 I 进行比对,选取误差值 II 与误差值 I 最为接近的数据库中的理论样品,通过该理论样品的信息即可获知待测低分子肝素样品的低分子肝素种类、肝素糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量信息。总离子流图(TIC)中所标依诺肝素钠样品各组分的结构信息如表 1 所示。

[0048] 表 1

[0049]

编号	寡糖大小	硫酸取代基数目
1	dp4	*10S, 2NS
2	dp4	*30S, 2NS
3	dp4	30S, 2NS
4	dp6	30S, 1NS
5	dp6	*30S, 2NS
6	dp6	30S, 2NS
7	dp6	*30S, 3NS
8	dp6	30S, 3NS
9	dp6	*40S, 2NS
10	dp6	40S, 2NS
11	dp8	*30S
12	dp8	*30S, 2NS
13	dp8	30S, 2NS
14	dp8	40S, 1NS
15	dp10	*30S, 1NS
16	dp10	30S, 1NS
17	dp10	40S, 1NS
18	dp10	*30S, 4NS
19	dp10	40S, 2NS
20	dp10	*40S, 3NS
21	dp10	*50S, 2NS
22	dp10	*50S, 3NS

23	dp10	50S, 3NS
24	dp12	50S, 1NS
25	dp12	*50S, 2NS
26	dp12	50S, 2NS
27	dp12	60S, 2NS
28	dp14	*60S, 3NS
29	dp16	70S, 2NS
30	dp18	70S, 3NS
31	dp18	80S, 3NS
32	dp18	90S, 3NS
33	dp20	90S, 4NS
34	dp22	*60S, 5NS
35	dp24	70S, 6NS
36	dp26	*30S, 12NS

[0050]

[0051] 注：“\*”表示糖链末端含内醚结构，“OS”表示“-O-SO<sub>3</sub>H”，“NS”表示“-NH-SO<sub>3</sub>H”，如“\*60S, 5NS”则表示这种组分还原末端含 1,6 内醚结构，有 6 个“-O-SO<sub>3</sub>H”结构，5 个“-NH-SO<sub>3</sub>H”结构。

[0052] 依诺肝素钠对照品的紫外检测色谱结果如图 1，由于依诺肝素钠各组分在非还原端有不饱和双键，故其在 232nm 处有紫外吸收。依诺肝素钠对照品的质谱分析示例如图 2，各组分的归属如图 3。通过本方法成功检测到依诺肝素钠对照品中从四糖到二十六糖的 36 种主要组分，并对其糖链长度、末端结构及“-O-SO<sub>3</sub>H”和“-NH-SO<sub>3</sub>H”数目进行确定。

[0053] 实施例 2：

[0054] 与实施例 1 的分析方法相同，不同之处在于所分析的样品为依诺肝素钠注射液（克赛，购自法国 AVENTIS Pharma Specialites 公司，分装批号：7910）经 48h 透析后冷冻干燥获得的药物有效成分。TIC 中所标依诺肝素钠注射液样品各组分的结构信息如表 2 所示。

[0055] 表 2

[0056]

编号	寡糖大小	硫酸取代基数目
1	dp4	*10S, 2NS
2	dp4	*30S, 2NS
3	dp4	30S, 2NS
4	dp4	30S
5	dp4	40S
6	dp4	50S
7	dp6	30S, 1NS
8	dp6	*30S, 3NS
9	dp6	30S, 3NS
10	dp8	*30S
11	dp8	20S, 2NS
12	dp8	*30S, 2NS
13	dp8	30S, 2NS
14	dp10	*30S, 1NS
15	dp10	40S, 1NS
16	dp10	40S, 2NS
17	dp10	40S, 3NS
18	dp10	*60S, 3NS
19	dp10	60S, 3NS
20	dp12	50S, 1NS
21	dp12	*50S, 2NS
22	dp12	50S, 2NS
23	dp12	60S, 2NS

24	dp14	*60S, 3NS
25	dp16	70S, 2NS
26	dp18	70S, 3NS
27	dp18	80S, 3NS
28	dp18	90S, 3NS
29	dp20	90S, 4NS
30	dp22	*60S, 5NS
31	dp24	70S, 6NS
32	dp26	*30S, 12NS

[0057] 注：“\*”表示糖链末端含内醚结构，“OS”表示“-O-SO<sub>3</sub>H”，“NS”表示“-NH-SO<sub>3</sub>H”。

[0058] 依诺肝素钠注射液样品的紫外检测色谱结果如图 4，由于依诺肝素钠各组分在非还原端有不饱和双键，故其在 232nm 处有紫外吸收。依诺肝素钠注射液样品的质谱分析示例如图 5。通过本方法成功检测到依诺肝素钠中从四糖到二十六糖的 32 种主要组分，并对其糖链长度、末端结构及“-O-SO<sub>3</sub>H”和“-NH-SO<sub>3</sub>H”数目进行确定。

[0059] 实施例 3：

[0060] 与实施例 1 的分析方法相同，不同之处在于所分析的样品为欧盟那屈肝素钙对照品(批号：Batch/lot n° 1)。TIC 中所标那屈肝素钙样品各组分的结构信息如表 3 所示。

[0061] 表 3

[0062]

编号	寡糖大小	硫酸基、乙酰基取代基数目
1	dp8	4S, 2Ac
2	dp8	5S, 2Ac
3	dp8	6S, 2Ac
4	dp8	7S, 2Ac
5	dp10	5S, 3Ac
6	dp10	6S, 2Ac
7	dp10	6S, 3Ac
8	dp10	7S, 2Ac

9	dp10	7S, 3Ac
10	dp10	8S, 2Ac
11	dp12	7S, 3Ac
12	dp12	7S, 4Ac
13	dp12	8S, 3Ac
14	dp12	9S, 3Ac
15	dp12	10S, 2Ac
16	dp12	10S, 3Ac
17	dp12	11S, 2Ac
18	dp12	12S, 2Ac
19	dp14	12S, 3Ac
20	dp14	13S, 2Ac
21	dp14	13S, 3Ac
22	dp16	13S, 4Ac
23	dp16	15S, 3Ac
24	dp16	17S, 2Ac
25	dp16	18S, 2Ac
26	dp20	19S, 4Ac

[0063] 注：“Ac”表示“-CO-CH<sub>3</sub>”，“S”表示“-SO<sub>3</sub>H”。

[0064] 那屈肝素钙对照品的紫外检测色谱结果如图 6，由于那屈肝素钙各组分不含不饱和和双键，故在 232nm 处没有紫外吸收。那屈肝素钙对照品各组分的归属如图 7。通过本方法成功检测到那屈肝素钙中从八糖到二十糖的 26 种主要组分，并对其糖链长度、“-CO-CH<sub>3</sub>”和“-SO<sub>3</sub>H”数目进行确定。

[0065] 实施例 4：

[0066] 与实施例 1 的分析方法相同，不同之处在于所分析的样品为欧盟达肝素钠对照品（批号：Batch/lot n° 2）。TIC 中所标达肝素钠样品各组分的结构信息如表 4 所示。

[0067] 表 4

[0068]

编号	寡糖大小	硫酸基、乙酰基取代基数目
1	dp8	6S, 2Ac
2	dp10	5S, 4Ac
3	dp10	7S, 2Ac
4	dp10	7S, 3Ac
5	dp10	8S, 2Ac
6	dp12	7S, 4Ac
7	dp14	8S, 5Ac
8	dp14	9S, 4Ac
9	dp16	8S, 6Ac
10	dp16	10S, 5Ac
11	dp16	12S, 4Ac
12	dp16	13S, 4Ac
13	dp18	15S, 4Ac
14	dp20	16S, 5Ac
15	dp20	17S, 4Ac
16	dp20	17S, 5Ac
17	dp20	18S, 4Ac
18	dp20	19S, 4Ac
19	dp22	22S, 4Ac

[0069]

[0070] 注：“Ac”表示“-CO-CH<sub>3</sub>”，“S”表示“-SO<sub>3</sub>H”。

[0071] 达肝素钠对照品的紫外检测色谱结果如图 8，由于达肝素钠各组分不含不饱和双键，故在 232nm 处没有紫外吸收。达肝素钠样品各组分的归属如图 9。通过本方法成功检测到达肝素钠对照品中从八糖到二十二糖的 19 种主要组分，并对其糖链长度、“-CO-CH<sub>3</sub>”和“-SO<sub>3</sub>H”数目进行确定。

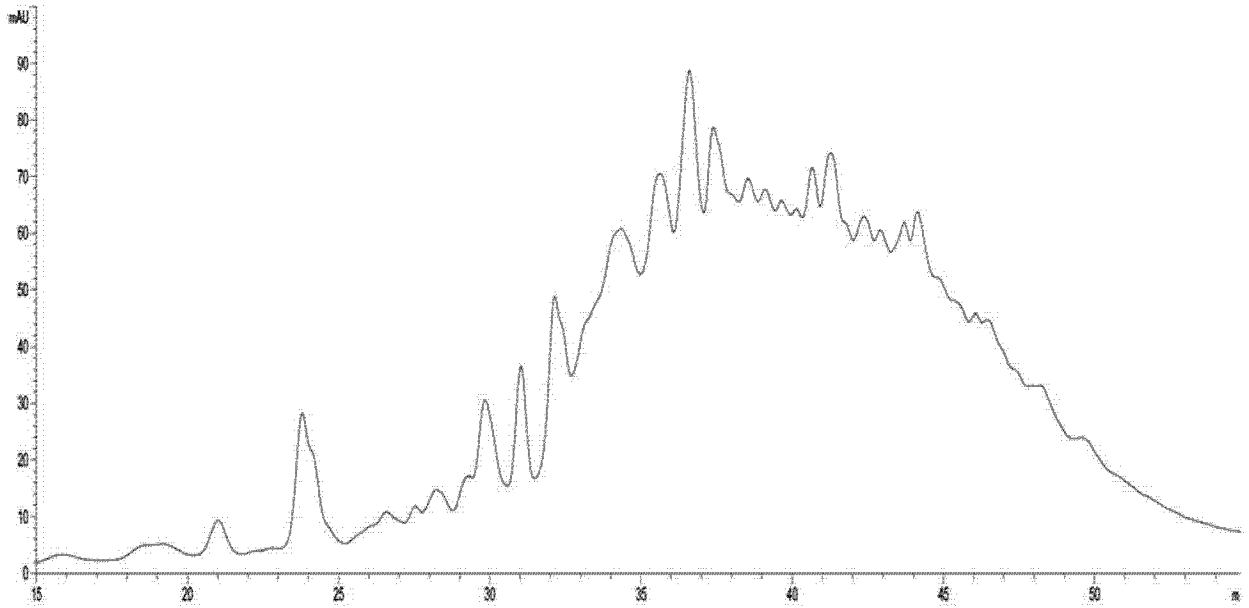


图 1

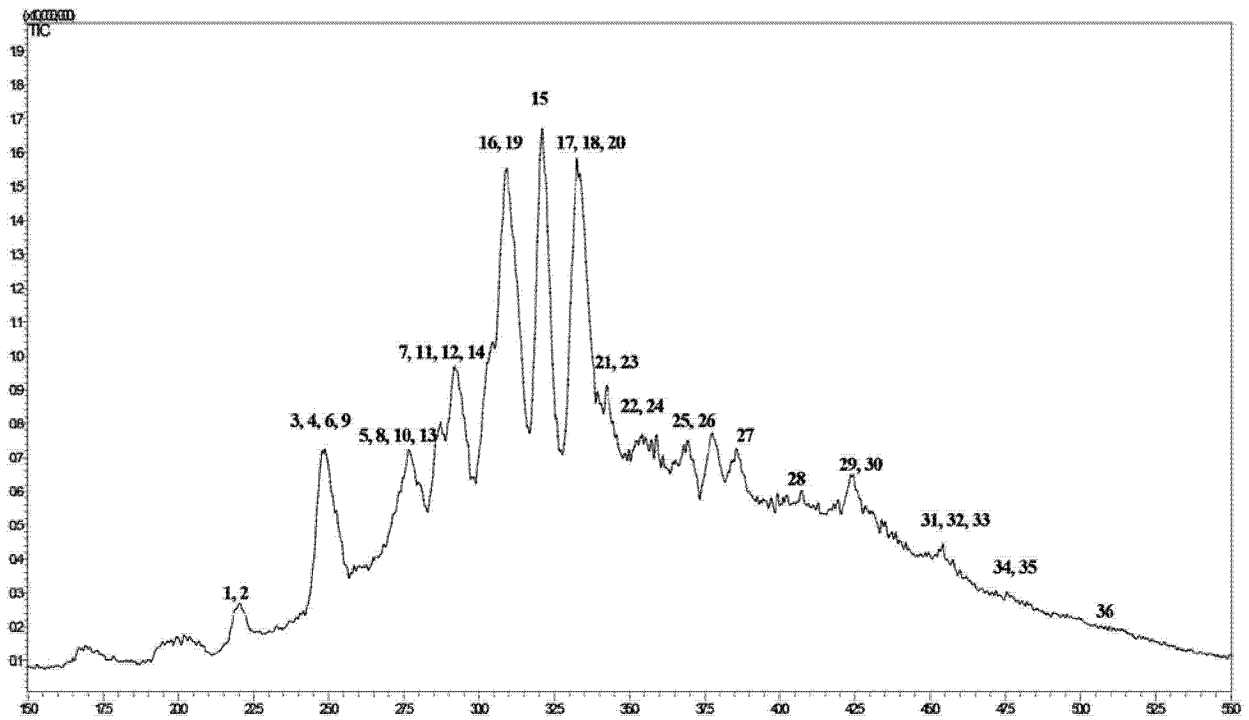


图 2

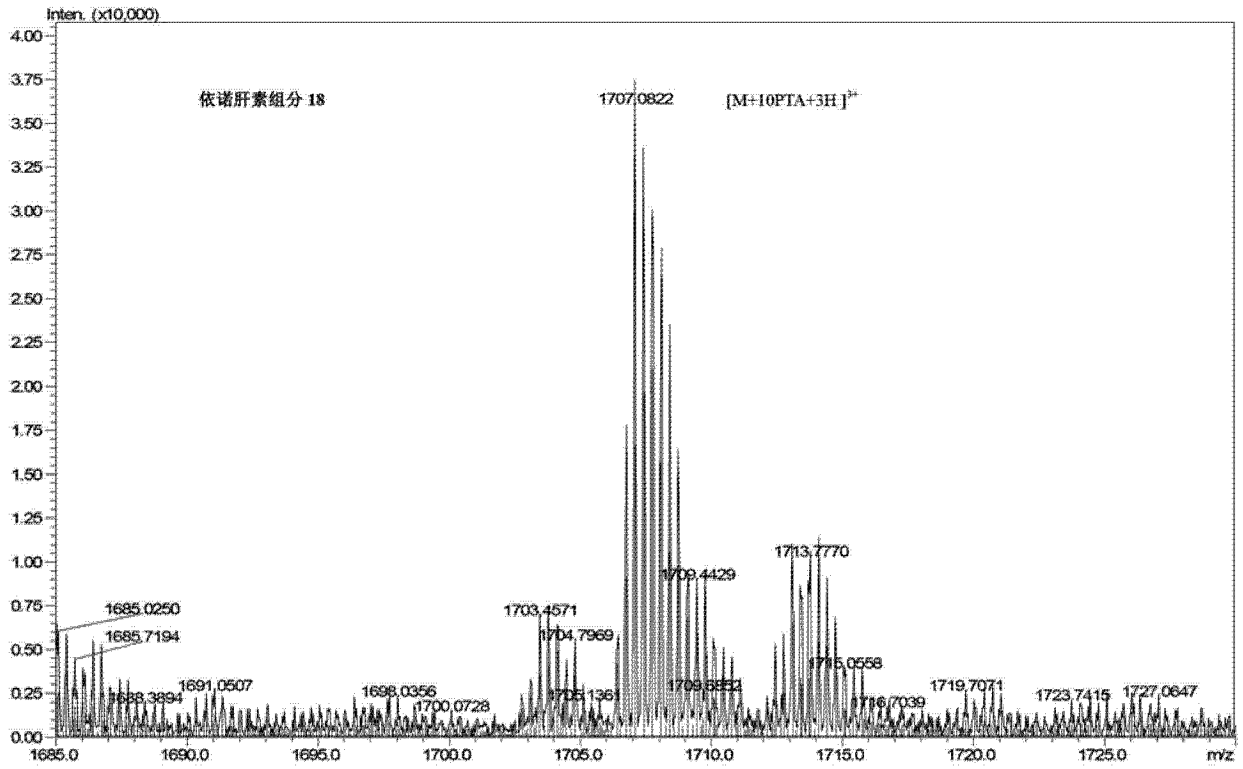


图 3

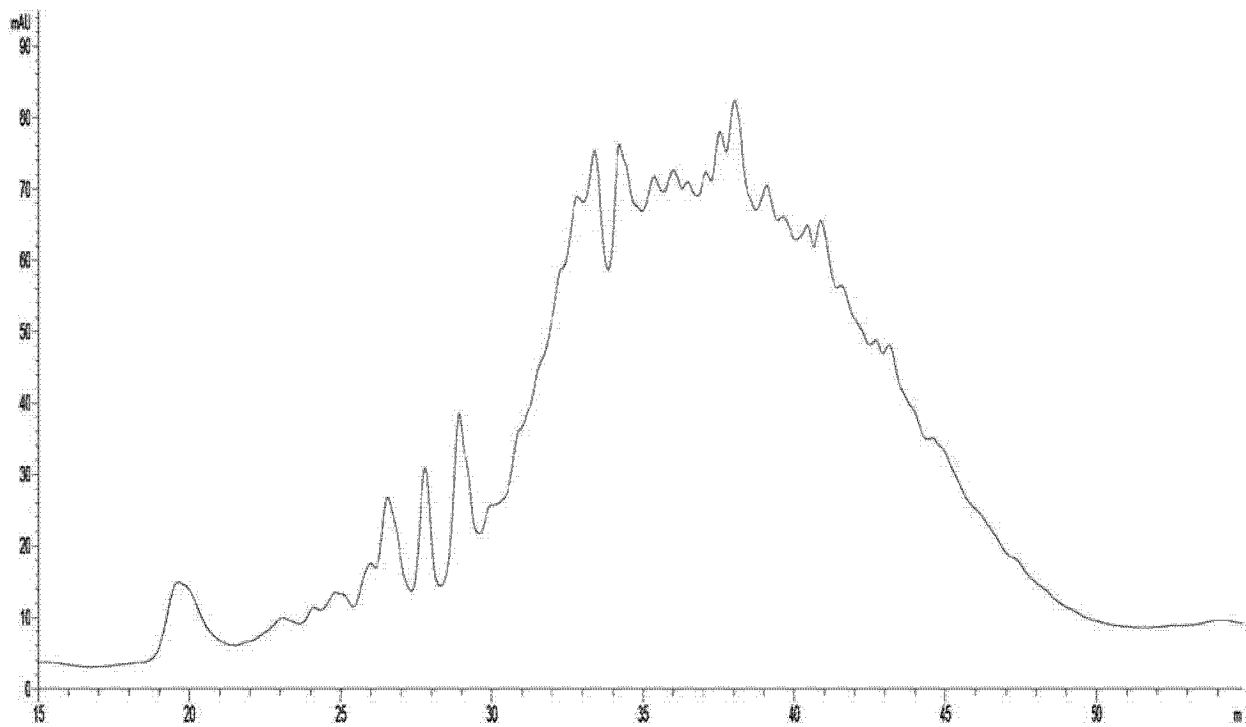


图 4

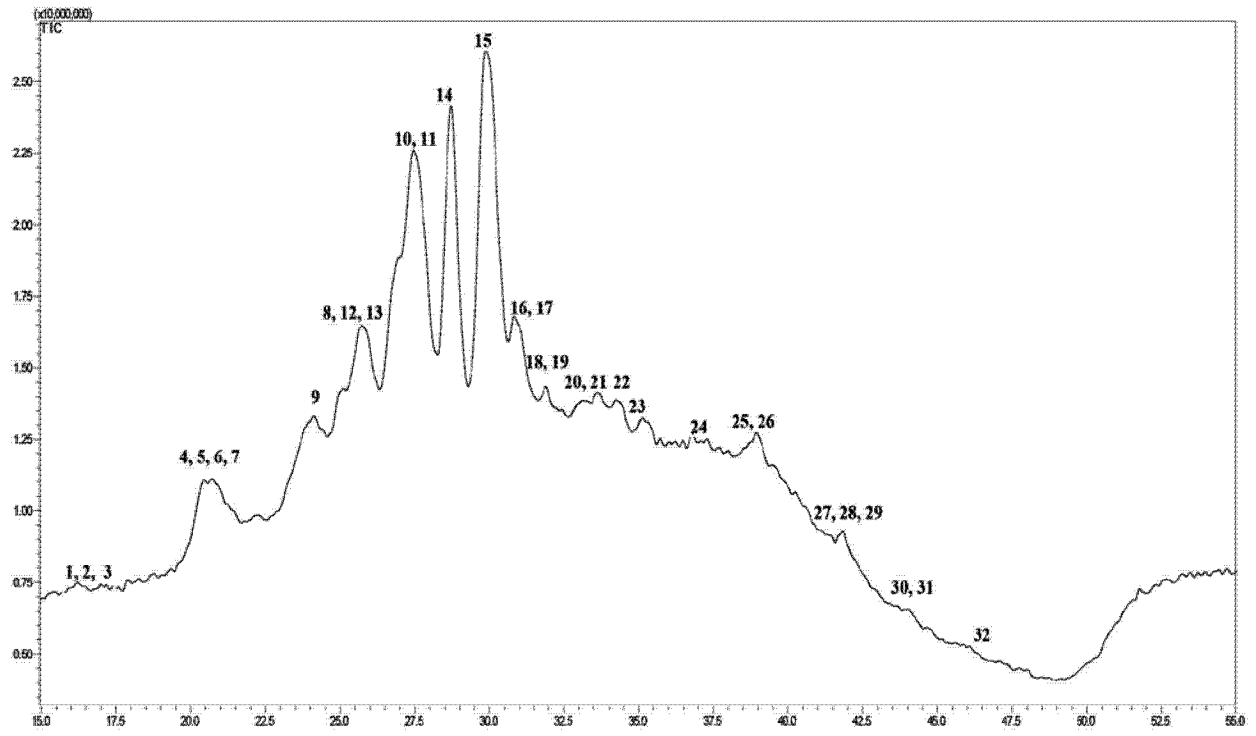


图 5

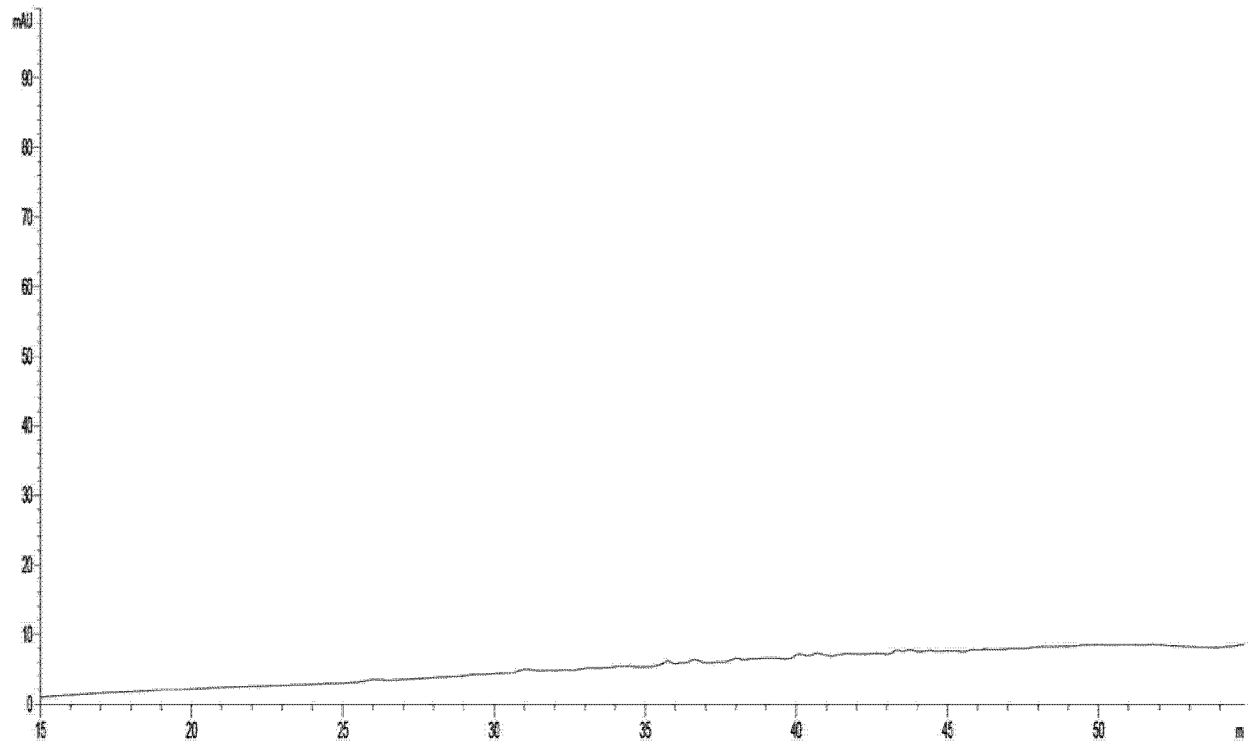


图 6

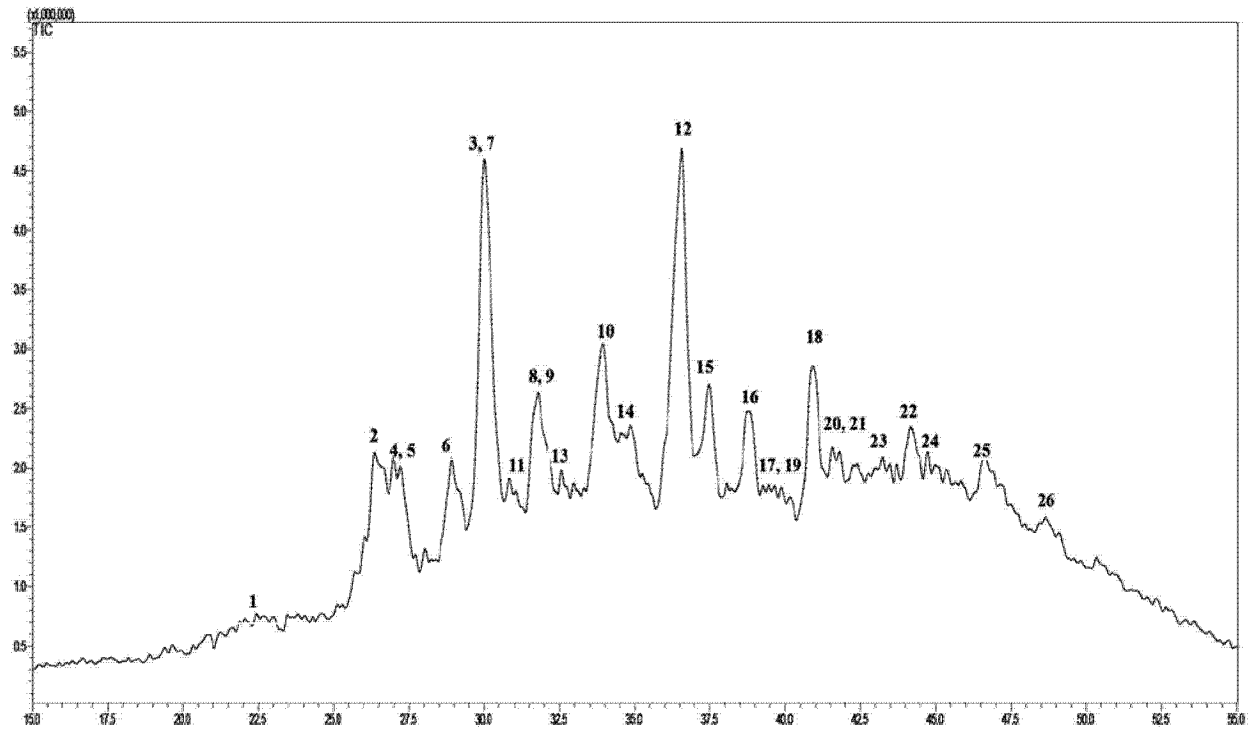


图 7

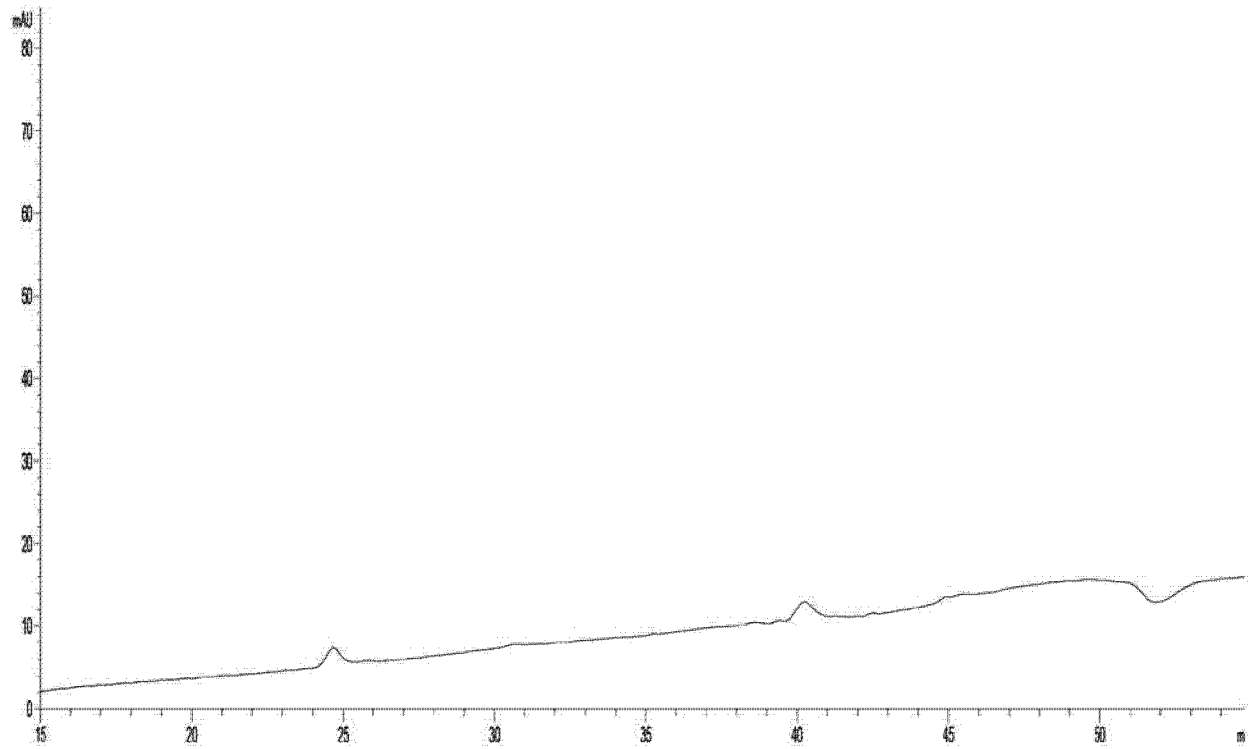


图 8

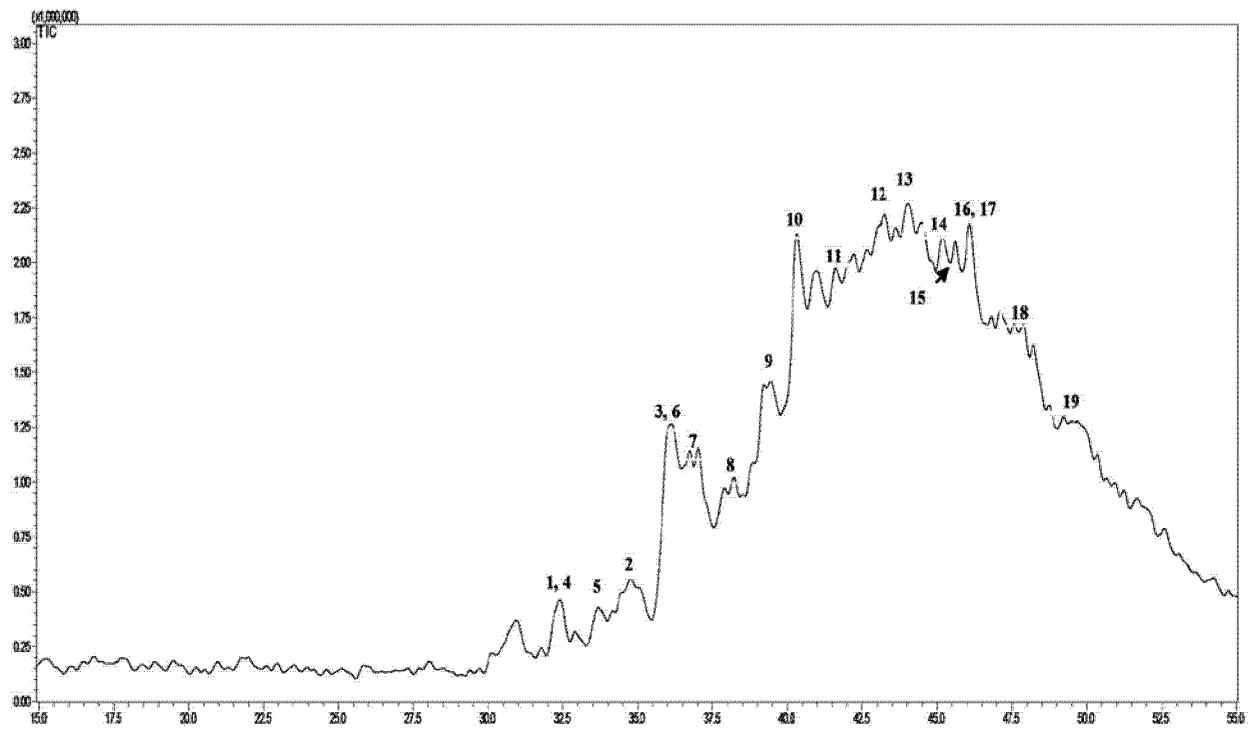


图 9