

NMR 定量分析法检测肝素钠中主要杂质技术的研究进展

孟永玉

河北常山生化药业股份有限公司 050800

【摘要】 肝素钠是一种硫酸氨基葡萄糖的钠盐，具有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗哮喘及抗肿瘤等多种生物功能，在临床上得到广泛应用。但是其中存在的污染物多硫酸软骨素 (OSCS) 会使患者产生严重的过敏反应，而常规生物化学方法难以将其检测出来。因此，准确测定 OSCS 杂质，并将污染肝素分离显得尤为重要。此次研究目的在于讨论 NMR 定量分析法检测肝素钠中主要杂质及分离污染肝素技术的研究进展。

【关键词】 肝素钠；多硫酸软骨素；定量分析

【中图分类号】 R927.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4596 (2018) 12-170-02

1 肝素钠概述

肝素钠是分离提纯后具备抗凝血作用。在临床上广泛应用于治疗关节炎，神经痛，心绞痛等，且无明显副作用。硫酸软骨素的种类多，结构复杂。每种硫酸软骨素并非完全由一种理想的二糖重复单元构成，而是由多种含量不同的二糖结构组成的。其结构式见图 1。

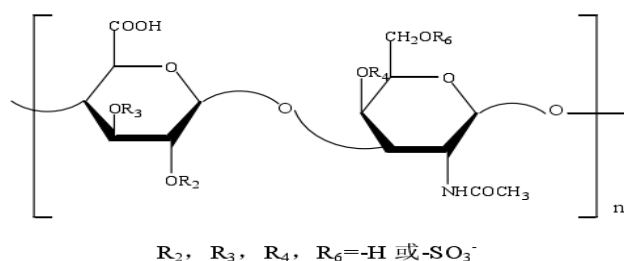


图 1: 硫酸软骨素结构式

硫酸皮肤素 (DS) 其基本结构与 CS 相似，具有抗凝血和抗血栓的活性，是较为理想的抗凝血和抗血栓药物，能够很好地发挥抑制炎症的作用^[2]。

通过理解 DS 与微生物和病原体结合的 GAGs 结构基序，可以为我们研制新型疫苗提供新的思路。其结构式见图 2。

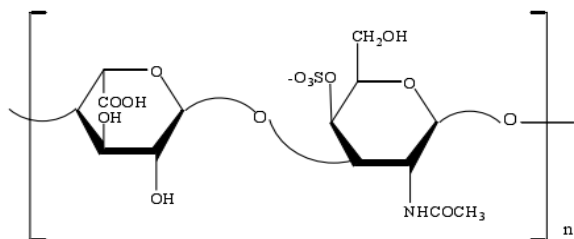


图 2: 硫酸皮肤素结构式

我们用 UV、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析了 OSCS 的结构。UV 显示，样品不含共轭双键，也不含有蛋白质和核酸等杂质。经与 CS 的红外光谱对比，证实了 OSCS 具有 CS 的基本母链结构，可以判断半乳糖胺 6 位碳上羟基被硫酸基取代。经过 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 进一步解析，葡萄糖醛酸的 C-2、C-3 位都连接上了硫酸基。OSCS 主要双糖结构应该为由 2, 3 位硫酸化的葡萄糖醛酸和 4, 6 位硫酸化的半乳糖胺组成，其结构式见图 3。

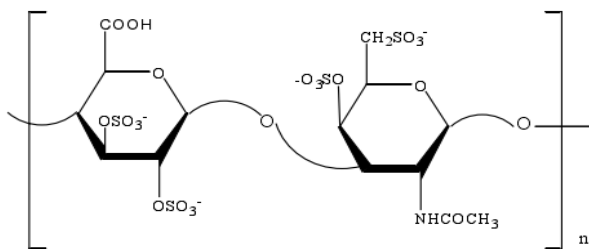


图 3: 多硫酸软骨素结构式

2 NMR 定量分析法检测肝素钠中主要杂质研究进展

自上世纪七十年代末，核磁共振已成为鉴定化合物结构的重要工具，测定肝素钠中污染物 OSCS 的方法主要有核磁共振波谱法、红外光谱法、毛细管电泳法、电化学等方法。这里主要介绍 NMR 定量分析法检测肝素钠中主要杂质研究进展。

Marco 等应用高分辨率核磁共振波谱法对肝素钠中的潜在污染物进行了分析。通过核磁共振氢谱和碳谱分析发现污染肝素钠比正常肝素钠多了许多新信号，其化学位移结果表明污染肝素钠中有氧取代的 N-乙酰半乳糖胺；通过二维核磁共振测试以及进一步的详细结构解析，发现污染物的重复二糖单元为葡萄糖醛酸 1, 3 位连接 N-乙酰半乳糖胺，该二糖结构有着不同寻常的硫酸化模式，葡萄糖醛酸的 2 位与 3 位被硫酸化、半乳糖胺的 4 位与 6 位被硫酸化，从而确定污染物为 OSCS^[3]。

Zhang 等对 31 批不同来源的肝素钠样品进行了 ¹H-NMR 检测，指出污染物 OSCS、OSDS、OSHA 的乙酰基中甲基信号的化学位移 (ppm) 分别为 2.15、2.14、2.17。分别提供了纯肝素钠加入 20 种类型肝素污染物的 ¹H-NMR 谱图，得出这 20 种污染物的检出限为 0.5%~10%，其中 OSCS 的检出限为 0.5%^[4]。Keire 等应用核磁共振氢谱法检测肝素钠粗品中的污染物 OSCS，检出限和定量检出限分别为 0.1% 和 0.3%^[5]。

Sitkowski 等应用 DOSY-NMR 方法对肝素钠及低分子肝素钠 (LMWH) 中的污染物 OSCS 进行了分析。研究结果表明：OSCS、LMWH、肝素钠相应的 N-乙酰氨基信号的 Dt 分别为： $0.30 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $1.05 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $0.38 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ，根据 Dt 值不仅可对污染物 OSCS 进行鉴别，而且还能区分开 LMWH 与肝素钠^[6]。

Keire 等应用 500MHz ¹H-NMR 分析了肝素钠类似物 CSA、CSB、OS-CSA、OS-CSB。作者指出了核磁共振氢谱的缺陷：HS、OS-HS、OS-HEP 和局部硫酸化 CSA 的特征峰的化学位移和肝素钠特征峰的化学位移在同一位置 2.04ppm 处，单用核磁共振氢谱很难鉴别这些污染物^[7]。

Peter 等应用标准 2D ¹H-¹H-NMRNOESY 谱鉴别肝素钠中潜在的污染物。通过污染物与肝素钠中 N-乙酰氨基信号不同来鉴别和区分的，化学位移主要集中在 2.00~2.20ppm，此法不只局限于 N-乙酰氨基的信号，同时将相应的鉴别信号延伸至糖环信号部分，弥补了常规 1D ¹H-NMR 方法的不足。此外，作为常规 1D ¹H-NMR 的补充，对肝素钠中污染物提供更为精细的指纹分析与鉴别，可为鉴别结果提供更为可靠的依据^[8]。

3 讨论

肝素钠中主要污染物 OSCS 的检测方法很多，其中 NMR 和 ACE 是最早应用的方法，NMR 定量分析是通过比较不同的吸收峰强度实现的，只要样品中每个组分有一个或一组特征的、且互不重叠的吸收峰存在时，一般都有可能应用 NMR 进行定量分析。其具有以下特点：1) 对于确定的核 (质子)，其信号强度与产生该信号的核 (质子) 的数目成正比，而与核的化学性质无关。2) 利用内标法或相对比较法分析混合物中某一化合物时，无需该化合物的纯品作为对照标准。3) 信号峰的宽度很窄，远小于各信号之间的

化学位移的差值,因而混合物中不同组分的信号之间很少发生明显的重叠。4)方法简单快速、准确、专属性高和不破坏被测样品,可选择性地测定混合药物或药物制剂中的组分乃至药物的立体异构体。OSCS的定量分析方法中,NMR结合强阴离子交换高效液相色谱法可保证肝素钠不受OSCS的污染,可作为肝素钠质量控制的分析方法。

参考文献

- [1] 陈思,张小军,龙举,严忠雍,李佩佩,方益.海洋生物中肝素类物质的提取纯化技术研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(32):82-84.
- [2] 张晓娟,熊双丽,周涛.肝素钠效价测定方法的筛选[J].食品工业科技,2014,35(12):66-69.
- [3] 方井晋.肝素钠有关物质检测方法学研究及效价的快速测定[D].浙江大学,2012.
- [4] 徐俊涛,王玉芬,谢华,黄现青,李苗云,柳艳霞,赵改名.粗

品肝素钠精制工艺优化研究[J].食品与机械,2012,28(04):206-208+244.

- [5] 高照明.肝素钠中主要杂质的NMR定量分析方法及污染肝素的分离技术研究[D].青岛科技大学,2012.
- [6] 王国栋,杨佳艺,杨佳,李洪军.肝素提取纯化技术研究进展[J].食品工业科技,2012,33(09):436-440.
- [7] João Rocha,Filipe A. Almeida Paz,Mariana Sardo,Luís Mafrá. Revisiting the crystal structure of dickite: X-ray diffraction, solid-state NMR, and DFT calculations study[J]. American Mineralogist,2018,103(5).
- [8] Martin Brodrecht,Edda Klotz,Christina Lederle,Hergen Breitzke,Bernd Stühn,Michael Vogel,Gerd Buntkowsky. A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in Lowly Hydrated MCM-41 Samples[J]. Zeitschrift für Physikalische Chemie,2018,232(7-8).

(上接第167页)

出低血清白蛋白是肺炎死亡发生独立危险因素,在本组分析中研究结果与以往研究相一致,单因素回归分析,死亡危险因素包括年龄、血清清蛋白,将年龄和血清清蛋白因素纳入多因素回归分析,结果显示年龄增加是肺炎患者死亡独立危险因素(HR=2.237, P=0.042),推测高龄患者往往会合并多种并发症,增加肺炎死亡率。在生存分析中,结果表明非糖尿病肾病患者全因死亡67例,全因死亡率为11.3%,肺炎相关死亡7例,肺炎相关死亡率为1.2%,糖尿病肾病患者全因死亡108例,全因死亡率为29.9%,肺炎相关死亡19例,肺炎相关死亡率为5.3%,糖尿病肾病患者血压透析患者肺炎全因死亡率和相关死亡率均要显著要求非糖尿病肾病患者血压透析患者, P<0.05,推测糖尿病肾病患者免疫功能低下,容易受到感染,存在多种并发症,容易出现微炎症,肺炎发病率以及肺炎死亡率都较高。

总之,血液透析糖尿病肾病患者肺炎发病率为12.5%,肺炎全因死亡率为29.9%,肺炎相关死亡率为5.3%,独立危险因素包括年龄,推测与肺炎导致的微炎症活动有关。

参考文献

- [1] 曹子顺,刘俊峰.慢性肾衰竭维持性血液透析患者医院感染的临床分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(22):2991-2992.
- [2] 郑世霞.2型糖尿病患者社区获得性肺炎的临床特征分析[J].检验医学与临床,2011,09(15):1885-1886.
- [3] 徐丽云.维持性血液透析患者合并肺部感染的危险因素分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2011,11(02):59-158.
- [4] 何剑,潘险峰.两种终末期糖尿病肾病患者血透相关死亡因素分析[J].西部医学,2015,27(2):246-248.
- [5] 张新华,耿梅.老年2型糖尿病并发肺部感染危险因素分析[J].中国老年学杂志,2011,31(24):4811-4812.

(上接第168页)

一.特别是一些青年女性朋友口服自杀者,该病具有发病快、病情严重和病情易变等特点,中毒患者在入院接受治疗时,极容易出现水肿、呼吸困难和昏迷等器问题,若不采取正确院前抢救会出现极高的死亡率,所以需要进行院前基础抢救措施。针对口服有机磷中毒的患者,普遍采用洗胃、输液和使用阿托品及氯磷定等方式进行治疗。

对于急性有机磷农药中毒患者来说,在服药早期会出现气道分泌物增多的现象,正确清理气道分泌物是避免早期出现死亡的重要措施^[7]。所以,在进行院前抢救时要备有充足的阿托品。医护人员要及时的为患者进行阿托品的注射,从而减轻患者呼吸受阻,出现昏迷、窒息和呼吸困难的患者,要保持抢救现场空气流通,必要时可以采取气管插管,为进行院内抢救争取时间。此外要对中毒部位进行反复的冲洗,防治皮肤对毒物的进一步吸收。

院前急救作为急诊医学的重要组成部分,科学正确的院前抢救对进行院内抢救治疗有着极大的帮助作用,正确的处理每一个

环节,对提高有机磷农药中毒抢救成功率都有着极大的意义。

参考文献

- [1] 胡政,朱小芳,梅祖胜.院前急救对于急性有机磷农药中毒患者预后的影响[J].今日健康,2016,15(4).
- [2] 董元和.农药中毒患者紧急院前急救对预后的影响[J].今日健康,2016,15(9).
- [3] 李健.院前急救在改善有机磷农药中毒患者预后结局中的应用[J].中国现代医生,2016,54(16):81-83.
- [4] 刘志明.院前急救对重度急性有机磷农药中毒患者的影响[J].人人健康,2016(6).
- [5] 杨腊梅.院前急救与急诊科抢救急性有机磷农药中毒护理体会[J].中国保健营养,2016,26(33).
- [6] 范新,牛庆学,李伟荣.院前急救对危急重症有机磷农药中毒者的抢救效果分析[J].医学综述,2016,22(14):2901-2903.
- [7] 周维明.浅谈不同院前急救措施对急性有机磷农药中毒患者的影响[J].医药,2016(9):80.

(上接第169页)

治疗方案,迅速止血,减少创伤,挽救患者的生命。同时,应尽可能保留患者的生育功能,提高其生活质量。

参考文献

- [1] 陈捷.宫缩乏力性产后出血的预防及治疗新进展[J].中外女性健康研究,2016(07):26-27.
- [2] 李红.探析治疗产后出血的新进展[J].当代医药论丛,2014,12(18):255-256.
- [3] 王欣.剖宫产产后出血的治疗新进展[J].中国医药指南,

2012,10(35):59-60.

- [4] 张杨.手术治疗产后出血新进展[J].中国现代药物应用,2011,5(02):239-240.
- [5] 葛海艳,应小燕.宫缩乏力性产后出血的预防及治疗新进展[J].医学信息(中旬刊),2010,5(09):2652-2654.
- [6] 杨芸.产后出血治疗新进展[J].中国医疗前沿,2009,4(13):25-26.
- [7] 高原.产后出血治疗的新进展[J].中国社区医师(医学专业半月刊),2009,11(12):5.