

- [12] POHLMANN J L, COHAN S K. Simplified detection of quaternary ammonium compounds by gas chromatography [J]. J Chromatogr, 1977(131): 297-301.
- [13] NEEDHAM S R, YE B, SMITH J R, ET AL. Richard smith. development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of pyridostigmine bromide from guinea pig plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 796(2): 347-354.
- [14] YE Z, ZHOU Q. Assay of Fexofenadine Concentrations in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detector [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(8): 736-739.

收稿日期: 2012-07-26

氢化黄原素的质量标准研究

张金钟, 仲婕*, 朱德领, 李保山, 施明珠, 金艳, 殷爱军(杭州天龙药业有限公司, 杭州 310021)

摘要: 目的 建立氢化黄原素质量标准。方法 采用高效液相色谱法(HPLC)测定纯度, 采用薄层色谱法(TLC)进行鉴别; 并对干燥失重和灼烧残渣进行限度控制。结果 氢化黄原素的 TLC 斑点清晰, 专属性强; HPLC 主峰与相邻杂质分离度 >1.5, 主峰的重现性、日内精密度分别为 0.72%, 1.04%; 干燥失重不超过 3%, 灼烧残渣不超过 0.5%。结论 所建立的方法专属性好, 操作方便, 重现性好, 结果可靠, 可用于氢化黄原素的质量控制。

关键词: 氢化黄原素; 质量标准; 纯度测定; 鉴别方法

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0299-04

Study on Quality Standard for Xanthane Hydride

ZHANG Jinzhong, ZHONG Jie*, ZHU Deling, LI Baoshan, SHI Mingzhu, JIN Yan, YIN Aijun
(Hangzhoutianlong Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standards for xanthane hydride. **METHODS** The xanthane hydride was identified by thin layer chromatography(TLC), and its purity was determined by HPLC. **RESULTS** The TLC spots were clear and specific. The HPLC method results showed that, the degree of the separation between xanthane hydride and the next impurity was >1.5. The precision and repeatability were 0.72% and 1.04%, respectively. The loss on drying was less than 3% and the residue on ignition was lower than 0.5%. **CONCLUSION** A quick, easy and accurate method was established and used in the process of oligonucleotides synthesis.

KEY WORDS: xanthane hydride; quality standards; purity determination; identification

氢化黄原素, 别名 3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮, 分子式 $C_2H_2N_2S_3$, 黄色晶体, 常用于有机合成, 是硫代反义寡核苷酸固相合成的硫代步骤中常用的硫代试剂之一。硫代反义寡核苷酸是用硫原子将反义寡核苷酸磷酸骨架上的非成键氧原子取代而形成的一类反义寡核苷酸类似物, 由于寡核苷酸硫代修饰以后, 克服了反义寡核苷酸在血清中被酶降解的特性^[1], 因此在治疗癌症以及抑制基因的表达方面有着重要的作用^[2-4]。在硫代寡核苷酸的固相合成中, 一旦载体上的寡核苷酸与亚磷酸胺核苷偶联以后, 就需要对新偶联上的核苷酸硫代氧化, 硫代反应的收率影响硫代反义寡核

苷酸的产品纯度, 硫代的不完全会引入氧代的杂质, 因此硫代试剂的质量对硫代反义寡核苷酸的合成以及终产品的含量有着重要的影响。

目前, 氢化黄原素的质量标准未见有报道, 而且国标和中国药典均未收载其质量标准。作为一个重要的寡核苷酸合成原料, 本实验室对氢化黄原素的质量标准进行了研究。

1 主要仪器和试剂

Varian Inova 600 超导高分辨核磁共振波谱仪(美国 VARIAN); Waters 2695 高效液相色谱仪带 Waters-2490 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); Ultimate-3000 高效液相色谱仪带 Ultimate-

基金项目: “十二五”国家重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-001-07、2011ZX09102-009-09)

作者简介: 张金钟, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0571)81635631

E-mail: zhjzhong1975@gmail.com

*通信作者: 仲婕, 女, 副研究员,

硕士 Tel: (0571)81635632 E-mail: law1022@163.com

3000 二极管阵列检测器(美国戴安公司); KNAUER pump 1000 高效液相色谱仪; FA1004 分析天平(上海良平仪器仪表有限公司); 烘箱(上海一恒科学仪器有限公司); KSW-6-12 型马弗炉(北京科伟永兴仪器有限公司); GL-9406 型手提紫外分析仪(海门市其林贝尔仪器制造公司)。

氢化黄原素对照品(东京化成工业株式会社, 色谱级, 批号: FCJ01, 纯度 $\geq 99\%$); 氢化黄原素样品(北京鲁玖信悦生物科技有限公司, 批号: 20090202, 规格: 5 kg; 批号: 20090412, 规格: 5 kg; 批号: 20100423, 规格: 2 kg)。

硫氰化钾、浓硫酸、N, N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 正己烷、乙酸为分析纯, 均来源于北京化工厂; 甲醇、乙腈为色谱纯, 均来源于天津市彪化奇科技发展有限公司; 薄层层析硅胶板(GF254)(烟台市芝罘黄务硅胶开发试剂厂); 超纯水($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, Millipore 公司)。

2 试验方法

2.1 合成方法

搅拌下将 8 g(0.08 mol)硫氰化钾溶于 50 mL 水中, 加热升温到 50°C 。缓慢滴加 30 mL 浓硫酸, 滴加结束后, 保温反应 1 h。降至室温, 过滤, 滤渣用水洗涤 2 遍; 滤饼放入烘箱烘干, 得氢化黄原素粗品 2.5 g; 用 DMSO 重结晶得精制品 2 g, 熔点: $201\sim 203^\circ\text{C}$ 。

结构表征: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 9.59 (1H, s, NH), 9.83(1H, s, NH); m/z (EI): 148.7(M^+ , 100); IR: 3 460, 3 015, 2 699, 1 628, 1 514, 1 312, 1 002, 644。

2.2 质量研究

2.2.1 质量控制 性状: 本品为黄色结晶或黄色结晶性粉末, 有臭味; 本品在四氢呋喃中溶解, 在甲醇中微溶, 在水中不溶。

熔点: 本品的熔点为 $201\sim 203^\circ\text{C}$ 。

鉴别: 取本品适量, 加四氢呋喃溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液。另取氢化黄原素对照品, 加四氢呋喃制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按中国药典 2010 年版二部附录 B 法试验^[5]Appendix 27-28, 吸取上述 2 种溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(5:4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm)下检

视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的斑点; 置碘蒸气中熏至斑点显色清晰, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的斑点。结果见图 1。

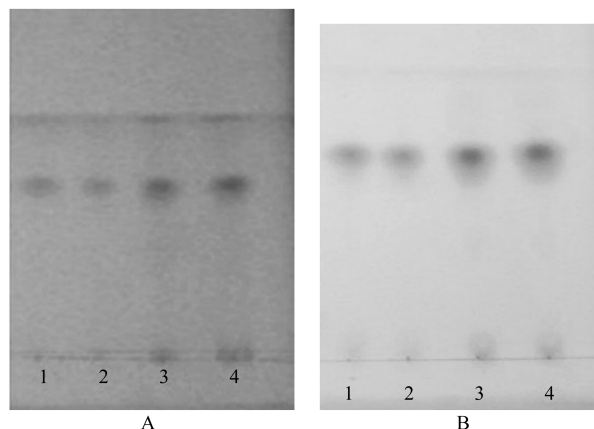


图 1 氢化黄原素 TLC 鉴别

A-254 nm 荧光下检视; B-碘熏后, 在日光下检视; 1-样品(批号: 20090202); 2-样品(批号: 20100423); 3-样品(批号: 20090412); 4-对照品

Fig 1 Hydrogenated xanthan TLC identification

A-fluorescence view under the 254 nm; B-view under the daylight after iodine smoked; 1-20090202; 2-20100423; 3-20090412; 4-reference substance

2.2.2 纯度测定

2.2.2.1 供试品溶液的制备 取本品 25 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加四氢呋喃-甲醇(1:1), 超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.2.2 波长选择 本品的四氢呋喃-甲醇(1:1)溶液经紫外分光光度计扫描(200~500 nm), 最大吸收在 285 nm。用 DAD 二极管阵列检测器在线监测, 监测时间为主峰出峰时间的 3 倍, 3D 图上显示, 本品主峰在 $\lambda=286.8 \text{ nm}$ 有最大吸收, 其他各波长处可显示出不同的杂质。进一步选择并提取了 214, 230, 286, 354 nm 下的色谱图平行比较, 主峰在 286 nm 为最大吸收, 在 230 nm 处杂质最多, 所以杂质检查波长选择在 230 nm。

2.2.2.3 色谱条件 Diamond 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: 10 μL ; 柱温: 25°C ; 检测波长: 230 nm。

2.2.2.4 分离系统选择 系统一: 流动相 A 为水; 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱: B 液 30 min 内从 0%~20%。系统二: 流动相 A 为水; 流动相 B 为乙腈, 等度洗脱: B 液 10%。系统三: 流动相 A 为水; 流动相 B 为乙腈, 等度洗脱: B 液 20%。系统四: 流动相 A 为水; 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱: B

液 30 min 内从 0%~20%。通过方法验证,可以看出从等度洗脱转换为梯度洗脱样品并未有新的杂质出现,故系统三:乙腈-水(20%:80%)等度洗脱方法可行。综合考虑分析时间及分离度等因素,最终选定系统三为最佳分离系统,因此选用该色谱条件来进行有关物质检查。

2.2.2.5 系统适用性试验 流动相:乙腈-水(20%:80%);二极管阵列检测器在 190~500 nm 内检测;流速:1.0 mL·min⁻¹;样品为粗品,溶剂四氢呋喃-甲醇(1:1),配制成每 1 mL 中含 0.25 mg 的供试液,进样量:10 μL;柱温:25 °C;记录时间为主峰保留时间的两倍。氢化黄原素与相邻峰之间的分离度规定>1.5(实测 11.36),理论板数以氢化黄原素峰计算应≥2 000(实测 18 054)。结果见图 2。

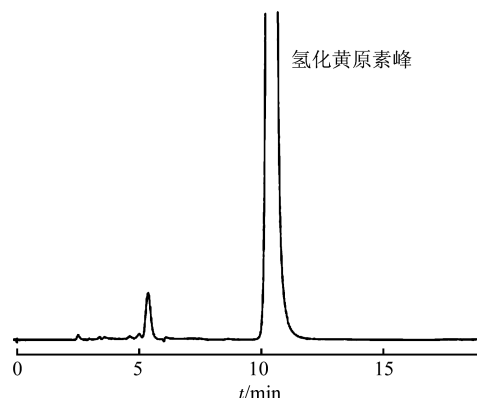


图 2 氢化黄原素系统适用性试验

Fig 2 System suitability test of hydrogenation xanthan

2.2.2.6 精密度与稳定性试验 精密称取氢化黄原素(批号:20090412)适量,用四氢呋喃-甲醇(1:1)配制成每 1 mL 中含 0.25 mg 的供试液,连续进样 6 次,每次 10 μL,按“2.2.2.3”项下色谱条件测定主峰面积,求得 RSD=0.72%(n=6);配制上述浓度的供试液 6 份,分别进样,每次 10 μL,按“2.2.2.3”项下色谱条件测定主峰面积,求得 RSD=1.04%(n=6)。分别于 0, 2, 4, 7, 11, 21, 25 h 后测定供试液中主峰面积,前 11 h 稳定性结果 RSD=1.31%,25 h 测定后稳定性结果 RSD=1.26%,无其他杂质峰产生,说明供试液在 25 h 内是稳定的。

2.2.2.7 专属性试验 取样品适量,2 份加 1 mol·L⁻¹ 硫酸溶液,80 °C 水浴下放置 30 min,分别定量稀释至刻度[溶剂分别为四氢呋喃、四氢呋喃-甲醇(1:1)溶液,浓度分别为 0.5 mg·mL⁻¹ 和 0.25

mg·mL⁻¹],备用。

取样品适量,2 份,加入 6%双氧水溶液,常温下放置 30 min,分别定量稀释至刻度[溶剂分别为四氢呋喃、四氢呋喃-甲醇(1:1)溶液,浓度分别为 0.5 mg·mL⁻¹ 和 0.25 mg·mL⁻¹],备用。

按“2.2.2.3”项下色谱条件,进样 10 μL,在酸性条件下破坏会产生 2 个杂质,与主峰分离度较好。而在双氧水条件下进行破坏,新产生 8 个杂质峰,主峰与杂质、杂质与杂质间能够实现完成分离。以上结果证明,建立的方法专属性强,本品在合成中或在贮藏过程中,如产生新的杂质,能够有效地加以控制。结果见图 3。

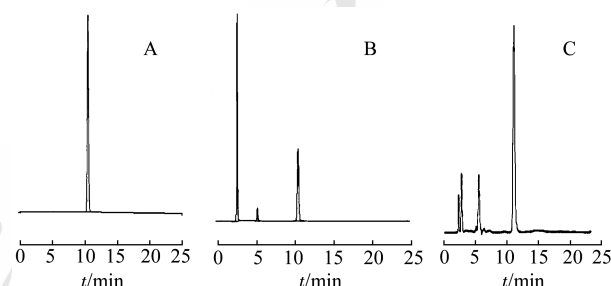


图 3 杂质谱图

A-未破坏;B-酸破坏;C-氧化破坏

Fig 3 Impurity spectra

A-original, B-acid sabotage, C-oxidative damage

同样,将上述酸破坏后的样品,用 TLC 方法验证,方法:在硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(5:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,有杂质斑点出现,斑点圆整,斑点间分离清晰。置碘蒸气中熏至斑点显色清晰,各斑点分离较好,结果见图 4。

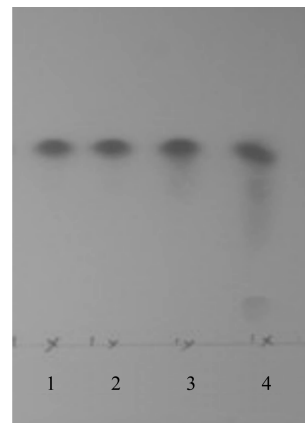


图 4 薄层色谱图

1~2-供试样;3-酸破坏;4-氧化破坏

Fig.4 Thin layer chromatogram

1-2-sample; 3-acid sabotage; 4-oxidative damage

2.2.2.8 耐用性试验 在本标准建立过程中,先后采用 3 种反相 HPLC 分析色谱柱,有 Waters 公司生产的 X-terra(4.6 mm×250 mm, 5 μm),有 Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),还有迪马公司生产的 Diamond C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。发现后 2 种柱子较好,其中,迪马公司的钻石柱较适合氢化黄原素主峰与杂质峰的最佳分离。

在 3 台仪器上验证建立的色谱系统, Waters 2695 高效液相色谱仪、DIONEX Ultimate-3000 高效液相色谱仪和 KNAUER pump 1000 高效液相色谱仪,均显示出较佳的色谱分离和几乎一致的保留时间。

2.2.3 干燥失重 分别取 3 批供试样品适量,按中国药典 2010 年版二部附录 VIII L 法^{[5]Appendix 59-60},在 105℃ 下干燥至恒重,重量减失为 2.697%~2.825%,平均值为 2.741%(n=3)。暂定干燥失重不得超过 3%,结果见表 1。

2.2.4 灼烧残渣 分别取 3 批供试样品,按中国药典 2010 年版二部附录 VIII N 法规定测定^{[5]Appendix 61}灼烧残渣,结果为 0.23%~0.43%,平均值为 0.329%(n=3)。因此暂定灼烧残渣不得超过 0.5%,结果见表 1。

表 1 氢化黄原素干燥失重、灼烧残渣和纯度测定结果
Tab 1 The results of the purity, loss on drying and residue of ignition in xanthane hydride

编 号	干燥失重/%	灼烧残渣/%	纯度/%
20090202	2.697	0.230	99.44
20090412	2.700	0.328	99.85
20100423	2.825	0.430	99.48

3 讨论

3.1 展开剂的选择

根据本品极性大小首先选用正己烷与乙酸乙酯作为展开剂进行预实验,结果发现正己烷-乙酸乙酯(1:1)展开剂, R_f 和拖尾现象相比正己烷-乙酸乙酯(2:1)稍好一些,故初步选择正己烷:乙酸乙酯(1:1)作为展开剂。本品的 R_f 值都偏大,因此降低展开剂极性,采用正己烷:乙酸乙酯(5:4)为展开剂,试验发现 R_f 值有所降低。在试验中发现,本品的四氢呋喃溶液在展开剂体系正己烷:乙酸乙酯(5:4)中仍有拖尾现象,将展开剂改为正己烷-乙酸乙酯-乙酸(5:4:1)后,拖尾现象消失,因此最终选择正己烷-乙酸乙酯-乙酸(5:4:1)为展开剂。

3.2 溶剂的选择

本品难溶于常规溶剂,如水,乙醇,乙酸乙酯和氯仿等,在二甲基亚砜中易溶解,在甲醇中微溶,在四氢呋喃中易溶。TLC 预试时用甲醇和四氢呋喃作为样品溶剂,结果发现,甲醇作为溶剂有拖尾现象,且本品在四氢呋喃中溶解性比甲醇更佳,故选择四氢呋喃为溶剂。但在高效液相色谱法中,考虑到四氢呋喃的易挥发性,所以选择四氢呋喃和甲醇的混合溶剂(1:1),既保证样品完全溶解,又可以保证自动进样器内待测样品不易挥发。

3.3 溶液浓度的确定

鉴于本品溶解的特殊性,选择四氢呋喃作为溶剂时,配制溶液浓度分别为 0.5, 0.25, 0.125 mg·mL⁻¹;选择甲醇作为溶剂时,配制溶液浓度分别为 0.5, 0.25 mg·mL⁻¹。甲醇作为溶剂,一是溶解度较四氢呋喃差,二是 TLC 有拖尾现象。结果发现,浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的四氢呋喃的薄层板上斑点较明显且无拖尾现象,故选择溶液浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的四氢呋喃-甲醇(1:1)溶液能显示出可能出现的杂质峰,且主峰基本不拖尾。

氢化黄原素中水分含量直接影响到硫代寡核苷酸固相合成中硫代的效率和速度,并且会产生氧代杂质,因此笔者对干燥失重进行了检测并制定了相应的标准。目前,氢化黄原素在硫代寡核苷酸制备中的标准,未见有报道,笔者建立了氢化黄原素的 TLC 鉴别方法和 HPLC 的含量检测方法,该方法专属性好,操作方便,重复性好,结果可靠,可以有效的对氢化黄原素的质量进行控制。

REFERENCES

- [1] BENNETT C F. Antisense oligonucleotides is the glass half full or half empty [J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(1): 9-19.
- [2] AGRAWAL S. Antisense oligonucleotides as antiviral agents [J]. Trends Biotechnol, 1992, 10(5): 152-158.
- [3] GOODARZI G, GROSS S C, TEWARI A, et al. Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen [J]. J Gen Virol, 1990, 71(12): 3021-3025.
- [4] YAO Z Q, ZHOU Y X. Inhibihon of hepatitis B viral gene expression by anti-sense phosphrothioate oligonucleotides [J]. Chin Med J(中华医学杂志), 1994, 74(2): 74-76.
- [5] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 版·二部)[S]. 2010: Appendix 27-28, Appendix 59-60, Appendix 61.

收稿日期: 2012-07-10