

# 离子色谱法测定反义寡核苷酸抗流感新药中铵残留量<sup>Δ</sup>

仲 婕\*,李保山,朱德领#,张金钟,金 艳,施明珠,殷爱军(杭州天龙药业有限公司,杭州 310021)

中图分类号 R927.2;R978.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2360-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.20

**摘要** 目的:建立测定反义寡核苷酸抗流感新药 Flutide 中铵残留量的方法。方法:用阴离子交换树脂前处理样品去除核酸干扰(去除效果用紫外分光光度法进行监测),用阳离子色谱法测定铵含量。阳离子交换色谱柱为 IonPac CS12,淋洗液为 12 mmol/L 甲磺酸,电导检测,流速为 1 ml/min,抑制器抑制电流为 59 mA。结果:铵离子检测质量浓度线性范围为 0.6~30 μg/ml( $r=0.999\ 5$ ),平均回收率为 99.44% (RSD=1.3%,  $n=6$ ),检测限为 0.12 ng。结论:该方法结果准确,可用于生物大分子水溶性寡核苷酸原料药中杂质铵的控制。

**关键词** 反义寡核苷酸;离子色谱法;铵残留量;Flutide;测定

## Content Determination of Residual Ammonia in Antisense Oligonucleotide Antiviral Drugs by Ion Chromatography

ZHONG Jie, LI Bao-shan, ZHU De-ling, ZHANG Jin-zhong, JIN Yan, SHI Ming-zhu, YIN Ai-jun (Hangzhou Tianlong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the determination of residual ammonia in antisense oligonucleotide antiviral drugs (Flutide). METHODS: The sample was pre-treated by anion-exchange resin and removed interference from nucleic acid (monitored with UV spectrophotometry). The content of ammonia was determined by cation exchange chromatography. IonPac CS12 column was used with elutriant consisted of 12 mmol/L loprazolam at the flow rate of 1 ml/min. The current of suppressed conductivity detector was 59 mA. RESULTS: The linear range of ammonia ion were 0.6-30 μg/mL ( $r=0.999\ 5$ ) with average recovery rate of 99.44% (RSD=1.3%,  $n=6$ ). The detection limit was 0.12 ng. CONCLUSIONS: The method is accurate and suitable for the residual ammonia control in macromolecule water-soluble antisense oligonucleotide.

**KEY WORDS** Antisense oligonucleotide; Ion chromatography; Residual ammonia content; Flutide; Determination

流感泰得(代号 Flutide)是一种新型的抗病毒靶向治疗药物,是由“十二五”国家重大新药创制-科技重大专项课题立项研制的一类新药。其结构为反义寡核苷酸,化学名:2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'->5' O, O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基。

由于该原料药在合成工艺中使用了大量氨水,因此有必要建立本品原料药中杂质铵的质控方法。另由于本品极易溶

于水,水溶性样品中含有大分子(分子质量大于 4 000)的主产物,故因为受到复杂基体的干扰,直接测定无机微量水溶性铵离子比较困难。笔者前期研究过采用干法化学消解基体干扰测定寡核苷酸原料药中无机杂质的方法<sup>[1]</sup>和固相萃取法前处理样品后测定杂质离子的方法<sup>[2]</sup>,但都不适合铵的测定。

为此,笔者针对铵这种既易挥发、水溶性又好的离子所具有的特殊性,对其原料药中无机易挥发微量杂质,进行了进一步的探讨性研究。先采用阴离子交换树脂预处理样品,紫外分光光度法监测预处理样品的效果,阳离子色谱法测定铵残留量;平行试验采用蒸馏法<sup>[3]</sup>进行样品预处理。比较两种方法的效果,最后筛选出最优化的前处理方法即阴离子交换树脂预处理法,再据此建立铵残留量测定法。结果表明该法操作简便、快速、回收率高、结果准确,可用于生物大分子水溶性寡核苷酸原料药中杂质铵的控制。

### 1 材料

ICS-900 离子色谱仪、抑制型电导检测器、Chromleon 色谱工作站(美国 Dionex 公司)。

Flutide(军事医学科学院放射与辐射医学研究所九室提供,批号:2010512-2、2010512-3、2010512-5,纯度:>95%);铵标准溶液[全国化工标准物质委员会标准物质研究开发中心,编号:GBW(E)080525,质量浓度:1 000 mg/L];D201 大孔强碱性季铵 I 型阴离子交换树脂(江苏色可塞思树脂有限公司,批

<sup>Δ</sup> 基金项目:“十二五”国家重大新药创制-科技重大专项课题资助(No.2011ZX09102-009-09)

\* 副研究员,硕士研究生导师。研究方向:天然产物中药新药、寡核苷酸新药。电话:010-66931423,0571-81635632。E-mail:law1022@163.com

# 通信作者:教授级高级工程师,硕士研究生导师。研究方向:寡核苷酸新药。电话:0571-81635678。E-mail:delinzhu@163.com

号:86120525);甲烷磺酸为优级纯,超纯水每天新制。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Ionpac CS12 离子交换柱(250 mm×4 mm);Ionpac CS12 离子交换柱保护柱(50 mm×4 mm);保护柱淋洗液:12 mmol/L 甲烷磺酸;电导检测;流速:1 ml/min;抑制器抑制电流:59 mA;进样量:10 μl。

### 2.2 对照品溶液的制备和线性关系试验

取铵标准溶液用超纯水稀释至系列质量浓度为0.6、1.5、3.0、6.0、12.0、30 μg/ml的溶液,作为对照品溶液,采用上述离子色谱条件测定峰面积。以质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标得标准曲线方程: $y=0.0547x+0.0332$ ( $r=0.9995$ ),表明其检测质量浓度线性范围为0.6~30 μg/ml。

### 2.3 样品前处理与铵残留量测定方法

采用下面两种方法进行平行试验,优选最佳前处理方法:

2.3.1 2种方法操作。①阴离子交换树脂(吸附)法:将处理过的阴离子交换树脂,用湿法填入内径为2 cm的层析柱中,装柱高度约为10 cm。取样品约0.2 g,精密称定,加2 ml水溶解,加入层析柱上端,加样时封住柱下口。放置20 min后,柱下口放开,以1 ml/min的流出速度在柱上端滴加新沸过的超纯水,冲柱,合并冲洗液至25 ml量瓶中,继续以同样的速度,自柱上端滴加水直至量瓶至刻度。以水为参比,测定260 nm波长处的紫外吸光度,检测干扰物核酸的吸附效率。再将离线预处理后的待测液注入离子色谱仪,进样10 μl,用外标法计算本品中铵残留量(对照品溶液质量浓度:6 μg/ml)。②蒸馏法:取样品约0.5 g,精密称定,加5 ml水使溶解,加入圆底烧瓶中,置于旋转蒸发仪上,减压(真空度:0.09 Mpa)下加热至沸腾。收集瓶中放有少量新沸过的超纯水,收集馏出液直至圆底烧瓶刚好蒸干,停止。以水为参比,测定馏出液260 nm波长处的紫外吸光度,检测核酸残留量。再将馏出液定量转移至25 ml量瓶中,加水至刻度,取10 μl注入离子色谱仪,用外标法计算本品中铵残留量(对照品溶液质量浓度:6 μg/ml)。

2.3.2 两种方法样品前处理效果比较。阴离子交换树脂法去核酸结果见图1中曲线2;蒸馏法去除核酸结果见图1中曲线3;过柱前样品的水溶液结果见图1中曲线1;再生处理后柱流出液结果见图1中曲线4。

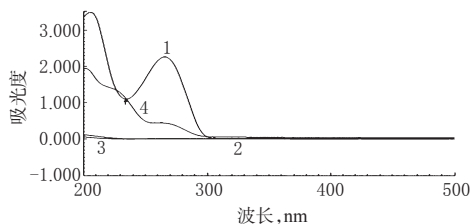


图1 两种样品前处理方法的效果比较

1.过柱前样品的水溶液;2.蒸馏法的蒸馏液;3.阴离子交换法流出液;4.再生处理后柱流出液

Fig 1 Comparison of the effects between 2 kinds of pretreatment method

1. sample before treatment; 2. samples prepared by distillation; 3. sample through anion-exchange column; 4. effluent liquid after for regeneration treatment

从图1可以看出,两种方法得到的供试品溶液未见260 nm波长处的核酸特征吸收峰,证明两种方法都可以去除核酸的干扰。

2.3.3 两种方法的回收率比较。用回收率测定法来进一步验

证所测成分铵的损失情况,以确定方法的准确性和可行性。

①阴离子交换树脂法回收率测定:选取1批不含铵残留的成品(批号:2010512-2),进行3个不同加标水平的回收率测定。取成品溶液(每1 ml含成品2.5 mg)1 ml,共6份,各分别加入50 μg/ml的对照品溶液0.8、0.8、1.0、1.0、1.2、1.2 ml;混匀后,各加入柱上端,封住柱下口,放置20 min后,柱下口放开,以1 ml/min的流出速度顺柱上口端滴加新沸过的超纯水,冲柱,合并冲洗液至50 ml量瓶中;继续以同样的速度,自柱上端滴加水直到量瓶至刻度。进样10 μl,测定铵离子的峰面积。另取600 μg/ml对照品溶液1 ml,置于50 ml量瓶中,用水稀释至刻度,同法测定,计算回收率。结果平均回收率达到99.44%,RSD=1.3%,见表1。

表1 两种方法回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery tests of 2 kinds of methods

编号/指标	蒸馏法			阴离子交换树脂法		
	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %
1	600	205.98	34.33	40	40.51	101.28
2	600	339.60	56.60	40	40.36	100.90
3	600	410.94	68.49	50	49.18	98.35
4	600	514.32	85.72	50	49.15	98.31
5	600	461.82	76.97	60	59.19	98.65
6	600	458.22	76.37	60	59.48	99.13
平均回收率, %			66.41			99.44
RSD, %			27.90			1.30

②蒸馏法回收率测定:取成品溶液(每1 ml含成品0.5 mg)5 ml,共6份,各加入120 μg/ml对照品溶液5 ml,蒸馏,收集馏出液,转移至50 ml量瓶中,用水稀释至刻度。进样10 μl,测定峰面积。另取120 μg/ml对照品溶液5 ml,置于50 ml量瓶中,用水稀释至刻度,进样10 μl,测定峰面积。计算回收率,结果见表1。

从表1数据看出,蒸馏法回收率较低(平均回收率66.41%),方法的精密度差(RSD=27.90%)。故确定阴离子交换树脂法为样品前处理方法。

### 2.4 精密度试验

确定阴离子交换树脂法去核酸干扰效果后,考察本方法的精密度。取对照品溶液(7.5 μg/ml),进样6次,每次10 μl,得峰面积平均值为0.466 μs·min, RSD=0.39%。

### 2.5 仪器的灵敏度试验

检测限:取铵标准溶液,逐步稀释,进样10 μl,使信号响应值为噪声的3倍,此时溶液质量浓度为0.012 μg/ml,即本品检测限为0.12 ng。

定量限:取铵标准溶液,定量稀释到一定质量浓度,进样10 μl,使信号响应值为噪声的10倍,并连续进样5次,计算得5次峰面积的RSD=3.19%。此时质量浓度为0.04 μg/ml,即本品的定量限为0.4 ng。

### 2.6 样品中铵残留量测定

用建立的铵离子残留量测定方法对Flutide成品的铵残留进行检测;用未纯化的中间体验证铵的存在。

2.6.1 成品铵残留量测定。取成品约0.2 g,精密称定,其余操作同“2.3.1①”项下,得到待测液,用0.45 μm的微孔滤膜过滤后,取10 μl进样,按“2.1”项下色谱条件测定,用外标法计算本品中铵残留量(对照品溶液质量浓度:6 μg/ml)。结果3批样品均无铵残留。

2.6.2 中间体铵测定:从工艺中取中间体(液体)1 ml,置于100 ml量瓶中,加水至刻度;再取此溶液1 ml置于100 ml量瓶中,加水至刻度。取此水溶液2 ml,加入层析柱上端,封住柱下口,放置20 min后,柱下口放开,以1 ml/min的流出速度顺柱上口端滴加新沸过的超纯水,冲柱,合并冲洗液至50 ml量瓶中;继续以同样的速度,自柱上端滴加水直至量瓶刻度处,得到待测液。用0.45 μm的微孔滤膜过滤后,取10 μl进样,测得峰面积为1.467 2 μs·min。用外标法计算得中间体中铵的含量为6.622 g/ml(对照品溶液质量浓度:30 μg/ml)。

铵标准溶液、中间体、成品的离子色谱结果见图2。

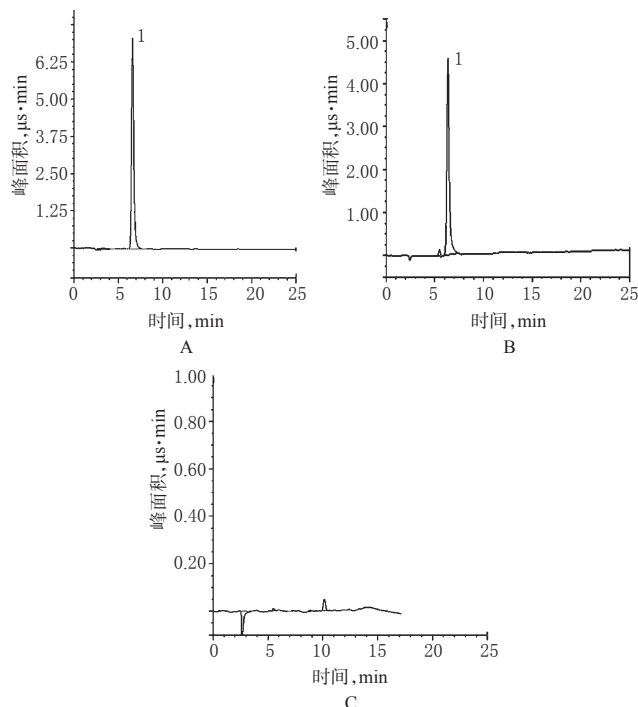


图2 离子色谱图

A.铵标准溶液;B.中间体;C.成品;1.铵离子

Fig 2 Ion chromatograms

A.ammonia standard solution;B.intermediate;C.sample;1.ammonia ion

### 3 讨论

(1)从测定结果看,Flutide成品中已经不含有残留的铵,原料药纯化工艺成功地完成了除杂质技术处理,中间体经过几步处理纯化得到的成品,已除尽了残留溶剂。

(2)因为核酸的特征吸收在260 nm波长处,故本试验用紫外分光光度法对两种前处理方法去除核酸的效果进行验证。

(3)紫外分光光度法验证结果表明,蒸馏法能全部去除核酸干扰,但铵的回收率太低,操作方法也不好控制,造成测定结果不稳定;阴离子交换树脂法可以达到与蒸馏法同样的去除核酸效果,同时回收率也高。

(4)本试验用阴离子交换树脂法处理样品后,测定铵残留无需繁杂的样品处理步骤,方法简便、快捷,线性范围内相关性好、准确度高,受其他因素干扰小,选择性高,具有较高的实用价值。

(5)用12 mmol/L 甲烷磺酸为淋洗液,可以使铵离子峰与相邻杂质峰分离较好,分离度大于2.4。

(6)处理样品后,对用过的阴离子交换树脂,用较强洗脱液碳酸盐(5 ml、4.5 mmol/L 碳酸钠冲洗柱子3次)进行再生处理,再用紫外分光光度法观察再生柱的处理效果。结果见图1中的曲线4,表明仍有核酸吸收峰。继续冲洗,直到冲洗至此核酸特征吸收峰为止。建议用大于3倍柱体积的4.5 mmol/L 碳酸钠或者更强的洗脱剂冲洗以再生树脂。

### 参考文献

- [1] 仲婕,李保山,朱德领,等.寡核苷酸抗流感药物流感泰得钠含量测定[J].中国现代应用药学杂志,2012,29(8):730.
- [2] 马金平,仲婕,鲁丹丹,等.固相萃取离子色谱法测定反义寡核苷酸药物杂质[J].医药导报,2012,31(2):202.
- [3] 堵小东,李艳萍.离子色谱法废水样品的前处理和氟离子的测定[J].现代科学仪器,2002(6):28.

(收稿日期:2012-09-11 修回日期:2012-11-01)

## 国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽出席第26个世界无烟日宣传活动

本刊讯 2013年5月31日是第26个世界无烟日,世界卫生组织确定今年的主题是“禁止烟草广告、促销和赞助”。5月30日,国家卫生和计划生育委员会(卫生计生委)在京举行第26个世界无烟日宣传活动,崔丽副主任出席活动并讲话。崔丽指出,我国政府积极履行世界卫生组织《烟草控制框架公约》(以下简称《公约》),推动落实《公约》要求,取得了积极进展。卫生计生部门按照履约职责,以创建全国无烟医疗卫生系统为突破口,多措并举,发挥示范带头作用,积极推进控烟履约的进程。

崔丽要求,各级卫生计生部门要坚持为人民群众健康服务的方向,坚持预防为主工作方针,结合深化“医改”统筹推进控烟履约工作。要继续发挥示范带头作用,加强对控烟工作的领导,实行“一把手”负责制,巩固创建无烟医疗卫生系统工

作成果,将创建无烟医疗卫生机构作为医院等级评审和医疗卫生机构能力建设的重要内容。要主动加强与相关部门的合作,积极推动控烟法制建设。要落实世界无烟日主题,禁止本系统相关机构和个人接受烟草广告、促销和赞助,已经接受的烟草广告、促销和赞助项目或活动要及时终止,并采取措施消除不良影响。广大卫生计生工作者要以身作则,主动学习和传播烟草危害健康的科学知识,积极开展控烟宣传和健康教育,发挥专业优势,为群众提供适宜的戒烟服务,帮助吸烟者戒烟。

另外世界卫生组织驻华代表处代表蓝睿明在会上致辞,蓝睿明向中国控制吸烟协会会长黄洁夫颁发2013年世界卫生组织世界无烟日奖。

会议由国家卫生计生委宣传司司长毛群安主持。