

低分子肝素结构分析

王章杰, 徐晓晖, 李道远, 迟连利

(山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100)

摘要: 低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 是肝素经化学方法或酶法降解制备而成的新型抗血栓药物。研究开发了系统的糖链指纹图谱分析方法。离子对反相色谱与质谱 (reversed-phase ion-pairing liquid chromatography mass spectrometry, RPIP-LC-MS) 联用技术分析完整糖链, 成功检测到依诺肝素钠从四糖到二十六糖的 36 种主要组分。RPIP-LC-MS 分析部分酶解产物, 成功检测到依诺肝素钠部分降解产物中从二糖到十糖的 65 种主要组分。LMWH 完全降解产物应用 RPIP-LC-MS 并结合柱前衍生可用于分析 LMWH 完全降解产物的各个组分。除 8 种常见肝素二糖以外, 成功检测到依诺肝素钠完全降解产物中的末端修饰结构、3-O-硫酸四糖和三糖。

关键词: 分析化学; 低分子肝素; 离子对反相色谱与质谱联用; 完整糖链; 部分降解; 完全降解
中图分类号: Q53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2015)03-0278-07

Structural analysis of low molecular weight heparins

WANG Zhangjie, XU Xiaohui, LI Daoyuan, CHI Lianli

(National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Low molecular weight heparins (LMWH) are novel antithrombotic drugs prepared by either enzymatic or chemical depolymerization of heparin. In this study, systematic methodologies for fingerprinting analysis of LMWH were established. Reversed-phase ion-pairing liquid chromatography mass spectrometry (RPIP-LC-MS) approach revealed 36 components ranging from tetrasaccharides to hexacosasaccharides from enoxaparin. The partial digested fragments of enoxaparin was also analyzed using technique of RPIP-LC-MS. A total of 65 components from disaccharides to decasaccharides were characterized. RPIP-LC-MS coupled with pre-column derivatization was applied to analyze the exhaustive digests of enoxaparin. Besides the 8 natural common heparin disaccharides, many characteristic structures from enoxaparin, such as modified structures from both termini as well as 3-O-sulfated tetrasaccharides and trisaccharides, had been unambiguously identified.

Key words: analytical chemistry; low molecular weight heparin; reversed-phase ion-pairing liquid chromatography mass spectrometry; intact chain; partial digestion; exhaustive digestion

0 引言

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^[1~2]。LMWH 由肝素经化学方法或酶法降解制备而成, 常见的有依诺肝素钠 (enoxaparin)、那屈肝素钙 (nadroparin) 和达肝素钠 (dalteparin) 等 (如图 1 所示)。与肝素相比, LMWH 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, 得到越来越广泛的关注和应用。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100131120071)

作者简介: 王章杰 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 糖生物学

通信联系人: 迟连利, 教授, 主要研究方向: 生物大分子质谱分析. E-mail: lianlich@sdu.edu.cn

由于肝素及 LMWH 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^[3]。通常分析 LMWH 的方法有凝胶电泳及凝胶过滤渗透色谱法分析完整的 LMWH 糖链。另外一种方法是先用肝素酶将 LMWH 降解成肝素二糖等基本组成单元，然后用强阴离子交换色谱、RPIP-LC 等技术分析二糖组成^[4-5]。但通过这些方法仅能获得非常粗略的结构信息，难以满足 LMWH 精细结构的分析鉴定。而结构鉴定对于仿制药的研发、生产控制和保障药品安全必不可少。因此，开发了一系列的新方法，包括应用 RPIP-LC-MS 技术实现 LMWH 完整糖链指纹图谱、部分酶解糖片段指纹图谱以及柱前衍生 RPIP-LC-MS 技术分析完全酶解组成单元，从而实现对 LMWH 的精细结构表征。

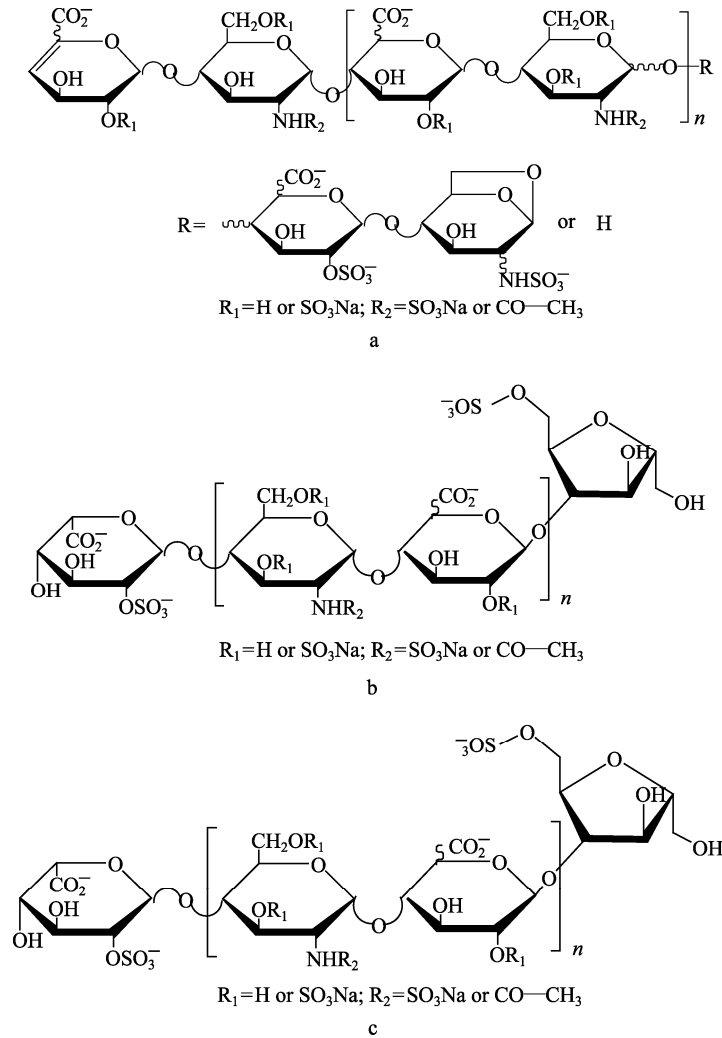


图 1 LMWH 结构

Fig. 1 Structure of LMWH

a—依诺肝素钠；b—达肝素钠；c—那屈肝素钙

a-Enoxaparin sodium; b-Dalteparin sodium; c-Nadroparin calcium

1 LMWH 完整糖链结构分析

利用 RPIP-LC-MS 进行联用检测 LMWH 的各个组分^[6-10]，通过 RPIC-LC 分离样品中各主要组分，并通过电喷雾质谱 (electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS) 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 LMWH 的结构进行比较精细的表征。结果如表 1 和图 2 所示。

表 1 依诺肝素钠样品各组分的信息

Tab. 1 Structure information of components of enoxaparin sodium

编号	寡糖大小	硫酸取代基数目	编号	寡糖大小	硫酸取代基数目
1	dp4	*1OS, 2NS	19	dp10	4OS, 2NS
2	dp4	*3OS, 2NS	20	dp10	*4OS, 3NS
3	dp4	3OS, 2NS	21	dp10	*5OS, 2NS
4	dp6	3OS, 1NS	22	dp10	*5OS, 3NS
5	dp6	*3OS, 2NS	23	dp10	5OS, 3NS
6	dp6	3OS, 2NS	24	dp12	5OS, 1NS
7	dp6	*3OS, 3NS	25	dp12	*5OS, 2NS
8	dp6	3OS, 3NS	26	dp12	5OS, 2NS
9	dp6	*4OS, 2NS	27	dp12	6OS, 2NS
10	dp6	4OS, 2NS	28	dp14	*6OS, 3NS
11	dp8	*3OS	29	dp16	7OS, 2NS
12	dp8	*3OS, 2NS	30	dp18	7OS, 3NS
13	dp8	3OS, 2NS	31	dp18	8OS, 3NS
14	dp8	4OS, 1NS	32	dp18	9OS, 3NS
15	dp10	*3OS, 1NS	33	dp20	9OS, 4NS
16	dp10	3OS, 1NS	34	dp22	*6OS, 5NS
17	dp10	4OS, 1NS	35	dp24	7OS, 6NS
18	dp10	*3OS, 4NS	36	dp26	*3OS, 12NS

注：“*”表示糖链末端含内醚结构；“OS”表示“—O—SO₃H”；“NS”表示“—NH—SO₃H”，如“*6OS, 5NS”则表示这种组分还原末端含 1,6 内醚结构，有 6 个“—O—SO₃H”结构，5 个“—NH—SO₃H”结构；dp 后面数字均表示二糖单元个数，如“dp4”表示由 4 个二糖单元组成，二糖单元分别为己糖醛酸和己糖胺

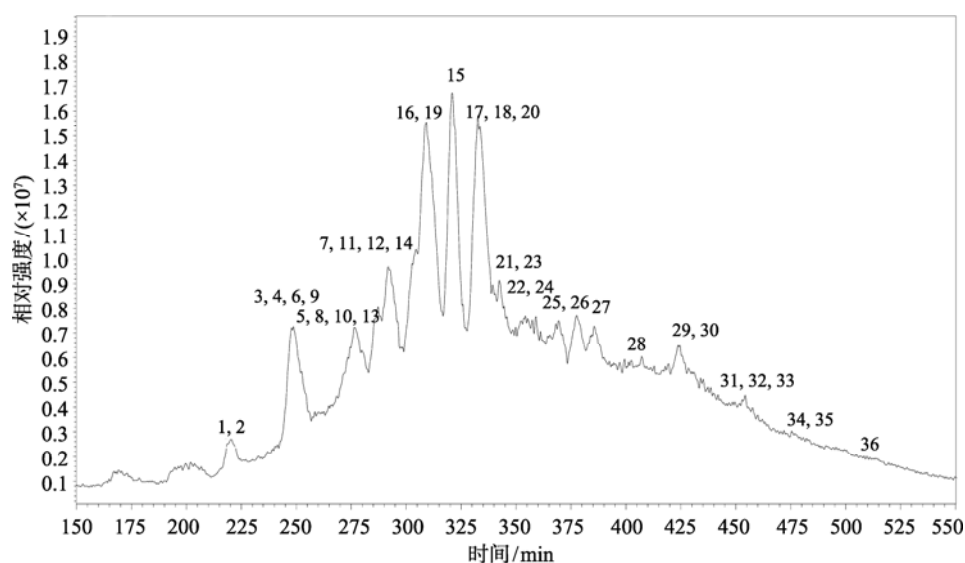


图 2 依诺肝素钠的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of enoxaparin sodium

2 LMWH 部分降解产物结构分析

RPIP-LC-MS 联用检测 LMWH 部分降解产物的两端结构、糖链长度、乙酰基及硫酸基取代数量, 解决了现有技术中仅能获得 LMWH 部分降解的紫外吸收图谱的问题, 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^[11-12]。结果如表 2 和图 3 所示。

表 2 依诺肝素钠样品部分降解各组分的信息

Tab. 2 Structure information of components of partial digestion of enoxaparin sodium

编号	寡糖大小	硫酸取代基数目	编号	寡糖大小	硫酸取代基数目
1	dp2	*1NS	34	dp6	2OS, 2NS
2	dp2	1NS	35	dp6	2OS, 3NS
3	dp2	*1OS, 1NS	36	dp6	3OS, 1NS
4	dp2	1OS, 1NS	37	dp6	*3OS, 2NS
5	dp2	2OS, 1NS	38	dp6	3OS, 2NS
6	dp3	2OS, 1NS	39	dp6	*3OS, 3NS
7	dp3	3OS, 1NS	40	dp6	3OS, 3NS
8	dp4	*2NS	41	dp6	*4OS, 2NS
9	dp4	2NS	42	dp6	4OS, 2NS
10	dp4	1OS, 1NS	43	dp6	*4OS, 3NS
11	dp4	*1OS, 2NS	44	dp6	4OS, 3NS
12	dp4	1OS, 2NS	45	dp6	*5OS, 2NS
13	dp4	*2OS, 1NS	46	dp6	5OS, 2NS
14	dp4	2OS, 1NS	47	dp6	*5OS, 3NS
15	dp4	*2OS, 2NS	48	dp6	5OS, 3NS
16	dp4	2OS, 2NS	49	dp6	6OS, 2NS
17	dp4	3OS, 1NS	50	dp7	2OS
18	dp4	4OS	51	dp7	5OS, 2NS
19	dp4	*3OS, 2NS	52	dp7	6OS, 2NS
20	dp4	3OS, 2NS	53	dp8	1OS, 4NS
21	dp4	4OS, 1NS	54	dp8	3OS, 3NS
22	dp4	5OS	55	dp8	4OS, 2NS
23	dp4	*4OS, 2NS	56	dp8	4OS, 3NS
24	dp4	4OS, 2NS	57	dp8	*5OS, 3NS
25	dp5	3OS, 1NS	58	dp8	5OS, 3NS
26	dp5	3OS, 2NS	59	dp8	*5OS, 4NS
27	dp6	*3OS, 2NS	60	dp8	5OS, 4NS
28	dp5	4OS, 1NS	61	dp8	7OS, 3NS
29	dp5	4OS, 2NS	62	dp8	7OS, 4NS
30	dp5	5OS, 1NS	63	dp8	8OS, 4NS
31	dp5	5OS, 2NS	64	dp9	2OS, 3NS
32	dp6	2OS, 1NS	65	dp10	5OS, 3NS
33	dp6	1OS, 2NS			

注: “*”表示糖链末端含内醚结构; “OS”表示“—O—SO₃H”; “NS”表示“—NH—SO₃H”, 如“*6OS, 2NS”表示这种组分还原末端含 1,6-内醚结构, 有 6 个“—O—SO₃H”结构, 2 个“—NH—SO₃H”结构; dp 后面数字均表示二糖单元个数, 如“dp2”表示由 2 个二糖单元组成, 二糖单元分别为己糖醛酸和己糖胺

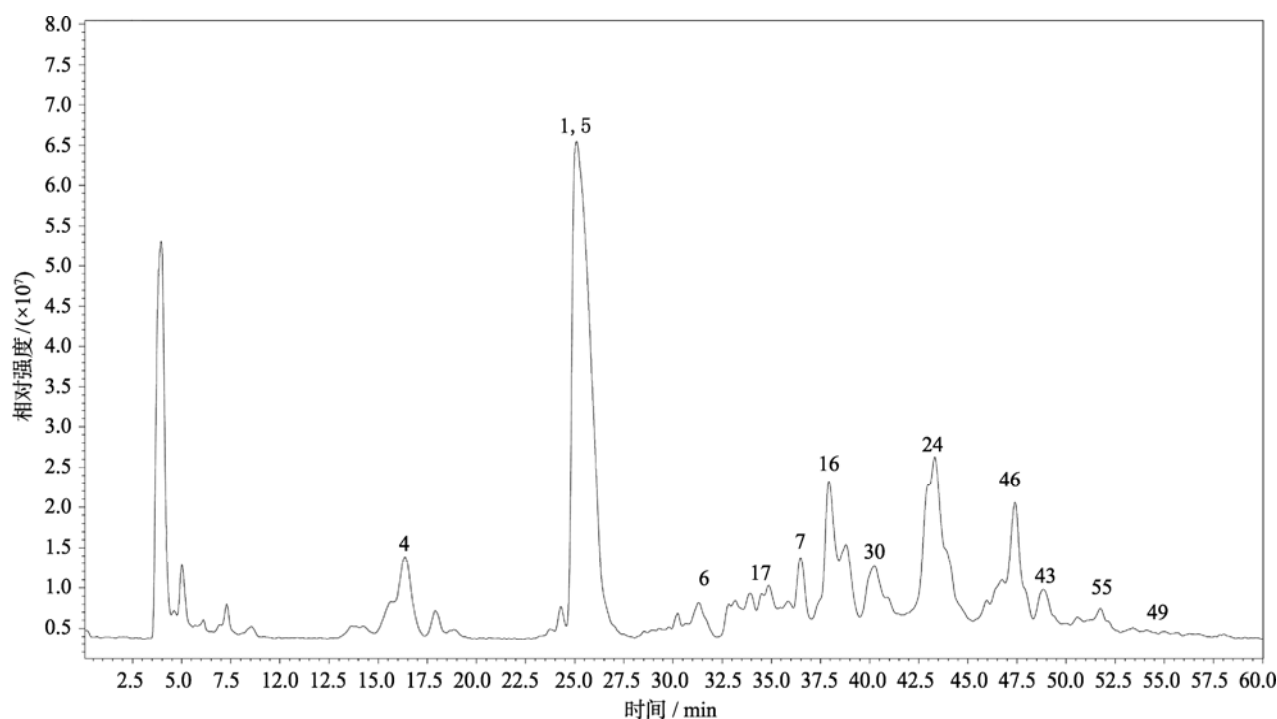


图3 依诺肝素钠部分降解产物的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of partial digestion of enoxaparin sodium

3 LMWH 完全降解产物结构分析

首先用 2-氨基吡啶酮对酶解产物进行标记, 反应机理如图 4 所示。然后利用 RPIC-LC-MS 联用技术检测 LMWH 完全降解产物的各个组分(如表 3 和图 5 所示), 并对样品各组分定性和定量, 从而对 LMWH 完全降解产物的结构进行比较精细的表征^[13~16]。

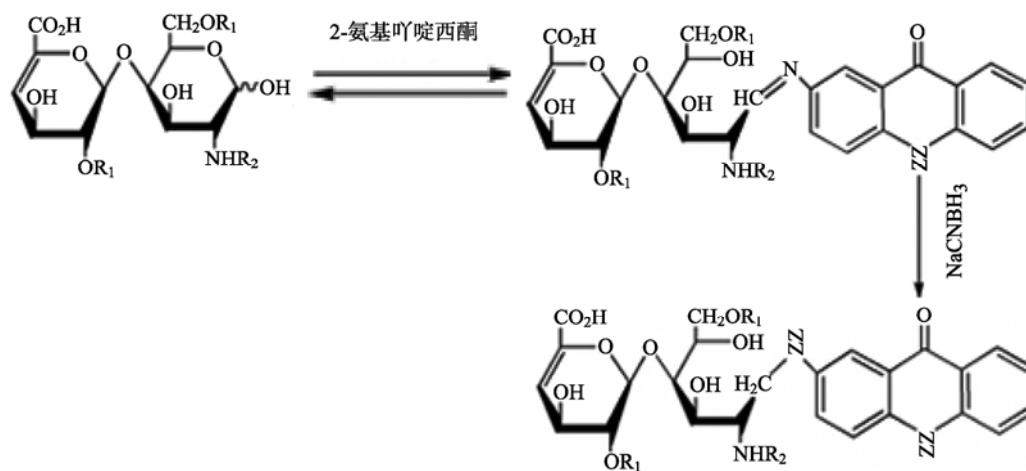


图4 荧光标记原理图

Fig. 4 Reaction mechanism of fluorescent derivatization

表 3 依诺肝素钠样品完全降解各组分的结构信息
Tab. 3 Structure information of components of complete digestion of enoxaparin sodium

编号	组分	编号	组分
1	Δ UA2S-GlcNS, 6S-IdoA2S-ManNS-1, 6-anhydro	9	Δ UA2S-GlcNS
2	Δ UA2S-GlcNS-1, 6-anhydro	10	Δ UA-GlcNS
3	Δ UA-GlcNAc, 6S-GlcA-GlcNS, 6S, 3S	11	Δ UA2S-GlcNAc6S
4	Δ UA-GlcNAc, 6S-GlcA-GlcNS, 3S	12	Δ UA-GlcNAc, -IdoA(1OS)
5	Δ UA2S-GlcNS6S	13	Δ UA-GlcNAc6S
6	IdoA2S-GlcNS, 6S	14	Δ UA2S-GlcNCOEt6S
7	Δ UA2S-GlcNS, 6S-IdoA2S	15	Δ UA2S-GlcNAc
8	Δ UA-GlcNS6S	16	Δ UA-GlcNAc

注： Δ UA 为不饱和糖醛酸；GlcA 为葡萄糖醛酸；IdoA 为艾杜糖醛酸；GlcN 为葡萄糖胺；ManN 为甘露糖胺；Ac 为乙酰基团；S 为硫酸基团；NS 为 N-硫酸基团；COEt 为乙酯基

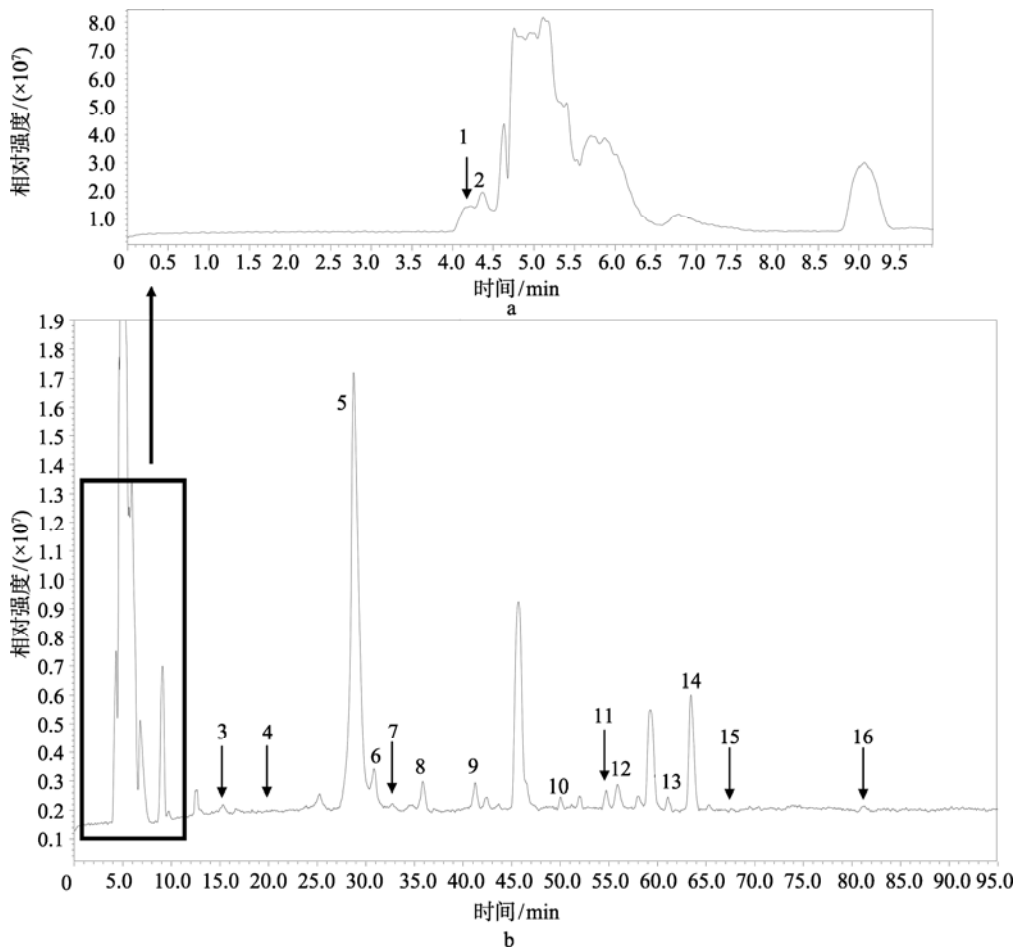


图 5 依诺肝素钠完全降解产物的总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of complete digestion of enoxaparin sodium

a—局部放大图；b—依诺肝素钠完全降解产物的总离子流图

a-Partially enlarged total ion chromatogram; b-Total ion chromatogram of complete digestion of enoxaparin sodium

4 结论

给出 LMWH 精细结构表征的 3 种方法。利用 RPIP-LC-MS 联用技术对 LMWH 完整糖链和部分降解

糖链进行高分辨的指纹图谱分析; 利用 RPIP-LC-MS 联用并结合柱前衍生检测 LMWH 完全降解产物的各个组分。通过这 3 种检测方法能对各 LMWH 的结构进行比较精细的表征。

[参考文献] (References)

- [1] HIRSH J, WARKENTI T E, SHAUGHNESSY S G, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety[J]. *Chest*, 2001, 119(Suppl. 1): 64S-94S.
- [2] PETITOU M, CASU B, LINDAHL U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site[J]. *Biochimie*, 2003, 85(1-2): 83-89.
- [3] SOMMERS C D, YE H, KOLINSKI R E, et al. Characterization of currently marketed heparin products: analysis of molecular weight and heparinase-I digest patterns[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(8): 2445-2454.
- [4] BRUSTKERN A M, BUHSE L F, NASR M, et al. Characterization of currently marketed heparin products: reversed-phase ion-pairing liquid chromatography mass spectrometry of heparin digests[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(23): 9865-9870.
- [5] ZHANG F M, YANG B, LY M, et al. Structural characterization of heparins from different commercial sources[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(9): 2793-2803.
- [6] DONEANU C E, CHEN W B, GEHLER J C. Analysis of oligosaccharides derived from heparin by ion-pair reversed-phase chromatography/mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(9): 3485-3499.
- [7] GALEOTTI F, VOLPI N. Novel reverse-phase ion pair-high performance liquid chromatography separation of heparin, heparin sulfate, and low molecular weight heparins, disaccharides, and oligosaccharides[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1284: 141-147.
- [8] THANAWIROON C, RICE K G, TOIDA T, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry sequencing approach for highly sulfated heparin-derived oligosaccharides[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(4): 2608-2615.
- [9] XIAO Z P, TAPPEN B R, LY M, et al. Heparin mapping using heparin lyases and the generation of a novel low molecular weight heparin[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(2): 603-610.
- [10] LI L Y, ZHANG F M, ZAIA J, et al. Top-down approach for the direct characterization of low molecular weight heparins using LC-FT-MS[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 84(20): 8822-8829.
- [11] LI G Y, STEPPICH J, WANG Z Y, et al. Bottom-up low molecular weight heparin analysis using liquid chromatography-fourier transform mass spectrometry for extensive characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(13): 6626-6632.
- [12] AMBROSIUS M, KLEESIEK K, GÖTTING C. Quantitative determination of the glycosaminoglycan delta-disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1201(1): 54-60.
- [13] PLAAS A H, HASCALL V C, MIDURA R J. Ion exchange HPLC microanalysis of chondroitin sulfate: quantitative derivatization of chondroitin lyase digestion products with 2-aminopyridine[J]. *Glycobiology*, 1996, 6(8): 823-829.
- [14] KITAGAWA H, KINOSHITA A, SUGAHARA K. Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232(1): 114-121.
- [15] KINOSHITA A, SUGAHARA K. Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides[J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 269(2): 367-378.
- [16] VOLPI N, GALEOTTI F, YANG B, et al. Analysis of glycosaminoglycan-derived, precolumn, 2-aminoacridone-labeled disaccharides with LC-fluorescence and LC-MS detection[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 541-558.