

临床肝素类药物酶解分析二糖组成

韩章润¹ 邢新会² 于广利¹ 曾洋洋¹ 张丽娟^{* 1}

¹(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 青岛 266003)

²(清华大学化学工程系 工业生物催化教育部重点实验室, 生物化工研究所, 北京 100084)

摘 要 肝素是一类结构复杂的高分子糖类, 以 *N*-硫酸、6-*O* 硫酸氨基葡萄糖和 2-*O* 硫酸艾杜糖醛酸为主要成分组成二糖。常见的肝素注射液是以未分级肝素为原料纯化灭菌制备而来, 在临床上使用更为广泛的是将肝素降解得到的低分子片段, 低分子肝素保留了肝素糖链基本结构, 但是不同制备工艺导致其具有不同的还原及非还原端。本研究以肝素类药物为研究对象, 使用肝素裂解酶 I、II 及 III 将肝素注射液、低分子肝素注射液(达肝素、那屈肝素、依诺肝素)、化学合成的类肝素(磺达肝素) 进行酶催化降解产生二糖, 结合强阴离子交换色谱(Strong anion exchange high performance liquid chromatography, SAX-HPLC) 以及紫外检测器在线分析, 使用市售肝素二糖标准品确定各种二糖结构。此外, 使用反向离子对色谱和电喷雾质谱联用分析磺达肝素中的甲基二糖以及达肝素和那屈肝素中的脱氧二糖结构, 为肝素以及类肝素药物的质量控制提供更为精确的结构信息。

关键词 肝素; 低分子肝素; 肝素裂解酶; 二糖分析; 质谱

1 引 言

肝素不仅是临床上无可取代的经典抗凝剂, 还是抗血栓形成、治疗心血管、脑血管疾病的首选药物^[1,2]。原料肝素是提取畜牧类产品的副产物(猪或牛的肠黏膜中) 得到的一种磺化程度较高的糖胺聚糖。肝素注射液是在原料肝素基础上, 经过严格纯化手段除去蛋白、非肝素糖胺聚糖、病毒等杂质后, 按照其抗凝血酶活性为单位灌装得到的一种药物。通过降解纯化原料得到的低分子肝素具有出血概率低、用药时无需监测部分活化的凝血酶时间等优点。目前, 市场上广泛使用的低分子肝素^[3]及其制备方法有: (1) 依诺肝素(Enoxaparin) 是将原料肝素苄酯消除降解制备而来; (2) 达肝素(Dalteparin) 是由亚硝酸降解原料肝素制备; (3) 那屈肝素(Nadroparin) 是亚硝酸降解后将钠盐置换为钙盐形式的低分子肝素; (4) 还有一类是模拟肝素抗凝血酶最小单位五糖的化学全合成药物肝素五糖(Fondaparinux Sodium)。

作为一类与生命息息相关的药物及其本身结构复杂分析困难, 肝素的质量控制显得尤为重要。2008 年发生的肝素原料污染事件更是以 149 例死亡人数震惊了医药界^[4,5]。美国和欧洲药典在肝素事件之后重新编写了肝素原料的内容^[6,7], 在常规的效价、吸光度测定外, 引入了核磁共振(¹H-NMR) 及离子交换色谱来鉴别肝素中是否存在硫酸软骨素及硫酸皮肤素, 有效杜绝了其它天然或是化学修饰糖胺聚糖污染。中国药典暂时还未引入核磁共振测定肝素中污染物。化学合成磺达肝素因其具有更低出血概率, 也在中国抗凝市场占有一席之地^[8~10], 美国药典、欧洲药典都认识到了简单的效价测定不足以控制肝素的质量, 所以在杂质检测上进行了相当程度的强化^[6,7], 但是并没有对肝素, 低分子肝素的基本结构组成有一个很好的诠释。本研究对市场上常见的肝素注射液、低分子肝素注射液、磺达肝素注射液进行肝素酶降解后的二糖进行分析^[11], 通过阴离子交换色谱分析其组成二糖的结构种类, 并比较二糖含量, 采用液相色谱-质谱联用分析特殊二糖结构, 为肝素以及低分子肝素等药物的结构解析、质量控制提供了参考。

2015-01-14 收稿; 2015-03-26 接受

本文系国家自然科学基金(No. 91129706) 资助

* E-mail: lijuanzhang@ouc.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent Zorbax SAX 色谱柱(250 mm × 4.6 mm)。液相色谱-质谱联用系统: Agilent1290 毛细管高效液相系统, Agilent Zorbax 300SB C₁₈ 色谱柱(250 mm × 0.3 mm), 美国 Agilent 公司; Thermo LTQ XL 电喷雾离子源质谱仪(美国 Thermo 公司)。酶标仪 Spectramax M5 plate reader (Molecular Devices)。8 种肝素不饱和二糖标准品: ΔUA2S-GlcNAc6S (D2A6), ΔUA2S-GlcNS6S (D2S6), ΔUA-GlcNS6S (D0S6), ΔUA2S-GlcNS (D2S0), ΔUA-GlcNAc (D0A0), ΔUA-GlcNS (D0S0), ΔUA-GlcNAc6S (D0A6), ΔUA2S-GlcNAc (D2A0)^[1] 购自美国 Sigma 公司。重组肝素酶: 肝素酶 I (Heparinase I)、肝素酶 II (Heparinase II)、肝素酶 III (Heparinase III) (北京思清源公司); 肝素注射液(上海第一生化制药厂); 依诺肝素注射液(赛诺菲安万特); 那屈肝素和磺达肝素(葛兰素史克); 达肝素(齐鲁制药)。

2.2 实验方法

2.2.1 酶水解制备肝素二糖 将干燥后的肝素标准品、肝素注射液、低分子肝素注射液、磺达肝素注射液配制成 10 mg/mL 溶液, 取 20 μL 肝素溶液加入 180 μL 酶解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 含 5 mmol/L CaCl₂), 加入肝素酶 I, II, III 各 20 mU, 密封置于 37℃ 反应。并用 232 nm 处紫外吸收检测酶解程度^[3], 待反应完全后(232 nm 吸光度不再上升)取出备用。

2.2.2 SAX-HPLC 分析^[4] 将二糖标准品单独进行 SAX-HPLC 分析, 确定不同二糖在色谱系统上的出峰时间。酶解液高温灭活然后离心, 上清液进行色谱分析。条件如下: Agilent Zorbax SAX 色谱柱, 流动相 A 为 2 mmol/L NaH₂PO₄ (用 H₃PO₄ 调节至 pH 3.0), 流动相 B 为 1.0 mol/L NaClO₄, 梯度洗脱: 0~25 min, 97%~65% A; 25~50 min, 65%~0% A; 50~70 min, 100% B, 然后用 3% A 平衡色谱系统。系统流速 1.0 mL/min, 结合紫外检测器 232 nm 在线检测。各肝素的酶解产物也进行阴离子交换色谱分析, 通过比对二糖标准品的出峰时间确定产物结构。积分 232 nm 处的峰面积计算其含量。

2.2.3 反向离子对色谱联合电喷雾质谱^[5] 检测肝素 将磺达肝素、那屈肝素、达肝素、依诺肝素、肝素的酶降解产物进行反向离子对色谱分析, 使用 Agilent1290 毛细管高效液相系统, Zorbax 300SB C₁₈ 色谱柱, 流动相 A 为 5% 甲醇溶液, 流动相 B 为 70% 甲醇溶液。流动相 A 和 B 都含有 5 mmol/L 离子对试剂二丁基胺、8 mmol/L 醋酸。洗脱条件: 0~10 min 100% A; 10~25 min, 83% A; 25~40 min, 68% A; 40~45 min, 60% A; 45~60 min, 40% A; 60~80 min, 100% B; 然后 100% A 平衡系统 10 min。联用电喷雾离子源质谱 Thermo LTQ-XL 在负离子模式采集信号, 数据处理使用 Xcalibur Quan Browser 软件。

3 结果与讨论

3.1 肝素酶 I, II, III 裂解肝素类药物的最佳时间

用于肝素二糖分析的肝素酶^[6]都是来自肝素黄杆菌(Flavobacterium heparinum), 它们是一类可以裂解肝素多糖的裂合酶。其在催化裂解的过程中, 会在糖醛酸 C4, C5 位脱去一分子水, 导致肝素糖链在糖胺和糖醛酸之间的糖苷键断裂并且在糖醛酸处形成一个双键, 糖醛酸的 C=O 和双键共轭产生 232 nm 紫外吸收。所以 232 nm 处的吸光度上升可以用于检测糖链是否降解以及反应进行程度。本研究使用无紫外吸收的酶标板为酶解容器, 使用酶标仪方便快速的检测酶解缓冲液的紫外吸光度。并对肝素, 低分子肝素, 肝素五糖的酶解动力学进行简单分析(图 1)。肝素、低分子量肝素、磺达肝素在肝素酶的催化裂解酶解液的 232 nm 吸收随着时间延续而持续上升, 但是不同的底物在这一酶解过程中具有不同的动力学特征, 如 Sigma 来源的肝素、肝素注射液及依诺肝素在加入酶后开始迅速降解, 35 min 左右到达最高值; 而那屈肝素、达肝素, 肝素五糖则在 50 min 处才达到最高值。继续反应 24 h, 测得的吸光度也变化不大, 说明酶解在 1 h 内可以完成绝大部分糖链的降解, 为了达到获得最大量的二糖, 本研究选择酶解反应 24 h。

3.2 酶解肝素二糖的 SAX-HPLC 分析

通过结构确定的市售肝素二糖标准品在 SAX-HPLC 系统上分离确定出峰时间,对于肝素类酶降解产物则直接对比出峰时间就可以确定其结构。选择常见的 8 种肝素二糖为主要分析目标,SAX-HPLC 可以完全分离肝素二糖,一些二糖(如 D0H0,D0A0)因为本身还原端异构导致峰的开叉现象。确定的出峰先后及时间如下: D0A0(10.4 min),D0S0(26.5 min),D0A6(27.5 min),D2A0(29.5 min),D0S6(30.0 min),D2S0(39.9 min),D2A6(42.7 min),D2S6(55.0 min)。

购自 Sigma 以及上海第一生化的肝素注射液都属于未分级肝素具有类似的二糖组成。Sigma 肝素中乙酰二糖比例较其它肝素高(图 2A),肝素注射液以二糖 D2S6 为主,含量是所检测样品中最高为 67.2%,其它以肝素为原料制备的低分子肝素 D2S6 含量均高于 65% 以上,具有很强的一致性。这一结果间接说明,肝素的纯化和降解获得低分子肝素都可以在一定程度上富集其主要二糖 D2S6(图 2C)。

依诺肝素是苄酯水解所产生的低分子肝素,其产物中非还原端具有类似于酶解产物的双键,但是在后续的二糖分析过程中酶降解也会产生脱水二糖,导致无法区分(图 2D)。达肝素以及那屈肝素(图 2E,F)都是亚硝酸降解产生的低分子肝素,其通过亚硝酸降解在糖链的还原端产生脱氨结构(脱水甘露糖),其又被 NaBH₃ 还原生成还原的脱水甘露糖醇(anM),二糖组成如表 1。

磺达肝素结构为(GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(3S)(6S)-IdoA(2S)-GlcNS(6S)OCH₃),其中在艾杜糖醛酸处能被肝素酶 I 裂解生成两个片段: GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(3S)(6S)和 ΔUA2S-GlcNS(6S)OCH₃^[17],在这两个产物中只有 ΔUA2S-GlcNS(6S)OCH₃(D2S6*)有 UV 232 nm 的吸收,可被检测到(如图 2A),其 SAX-HPLC 结果完全不同于肝素以及低分子肝素。

表 1 酶解肝素类二糖结构、质量数以及含量

Table 1 Structure, composition and mass of disaccharides generated by heparin lyase I, II and III digestion

二糖 Disaccha- rides	结构式 Formula	结构 Structure	分子量 Molecular weight		232 nm 紫外吸收计算含量比值 Disaccharide composition calculated based on UV 232 nm absorbance (%)					
			理论值 Theoretical value	检测值 Detected [M-H] ⁻	肝素 Sigma-Hp	肝素 Hp-Inj	依诺肝素 Enoxaparin	那屈肝素 Nadroparin	达肝素 Dalteparin	磺达 HP5
D0A0	C ₁₄ H ₂₁ NO ₁₁	ΔUA-GlcNAc	379.1115	378.0949	5.7	4.8	3.7	4.4	4.7	ND
D0S0	C ₁₂ H ₁₉ NO ₁₃ S	ΔUA-GlcNS	417.0577	416.0404	3.6	2.6	2.7	3.8	3.2	ND
D0A6	C ₁₄ H ₂₁ NO ₁₄ S	ΔUA-GlcNAc6S	459.0683	458.0449	4.4	3.2	3.8	3.2	3.9	ND
D2A0	C ₁₄ H ₂₁ NO ₁₄ S	ΔUA2S-GlcNAc	459.0683	458.0449	2.0	1.5	2.0	2.9	2.2	ND
D0S6	C ₁₂ H ₁₉ NO ₁₇ S ₂	ΔUA-GlcNS6S	497.0145	495.9954	14.0	13.1	14.3	9.6	11.0	ND
D2S0	C ₁₂ H ₁₉ NO ₁₇ S ₂	ΔUA2S-GlcNS	497.0145	495.9954	7.5	7.0	7.1	7.1	6.0	ND
D2A6	C ₁₄ H ₂₁ NO ₁₇ S ₂	ΔUA2S-GlcNAc6S	539.0251	538.0044	0.7	0.6	0.7	0.8	1.0	ND
D2S6	C ₁₂ H ₁₉ NO ₁₉ S ₃	ΔUA2S-GlcNS(6S)	576.9713	575.9514	62.0	67.2	66.3	65.4	65.8	ND
D2S6*	C ₁₃ H ₂₁ NO ₁₉ S ₃	ΔUA2S-GlcNS(6S)OCH ₃	590.987	589.9872	ND	ND	ND	ND	ND	100
D0M6	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₆ S ₂	ΔUA-anM6S	402.0037	401.0299	ND	ND	ND	2.8	1.9	ND

ND: 未检出(Not detected)。

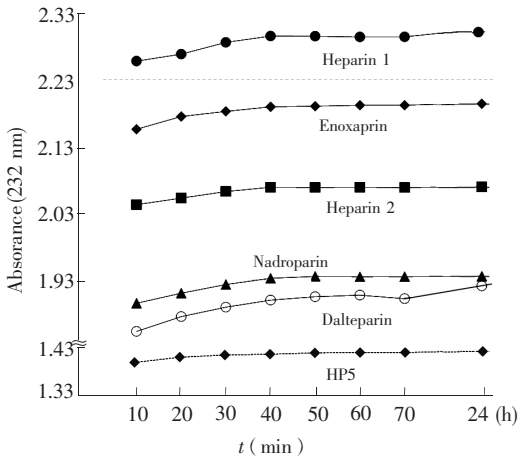


图 1 肝素裂解酶降解肝素导致整体紫外吸收 UV 232 nm 变化

Fig. 1 UV absorption of heparin lyase-digested heparinoids Heparin 1: 上海第一生化生产的肝素注射液; Heparin 2: 购自 Sigma 试剂公司的肝素; Enoxaparin: 依诺肝素注射液; Nadroparin: 那屈肝素注射液; Dalteparin: 达肝素注射液; HP5: 磺达肝素注射液。

Heparin, heparin injection, Enoxaparin, Nadroparin, Dalteparin, and HP5 (Fondaparinux sodium)。

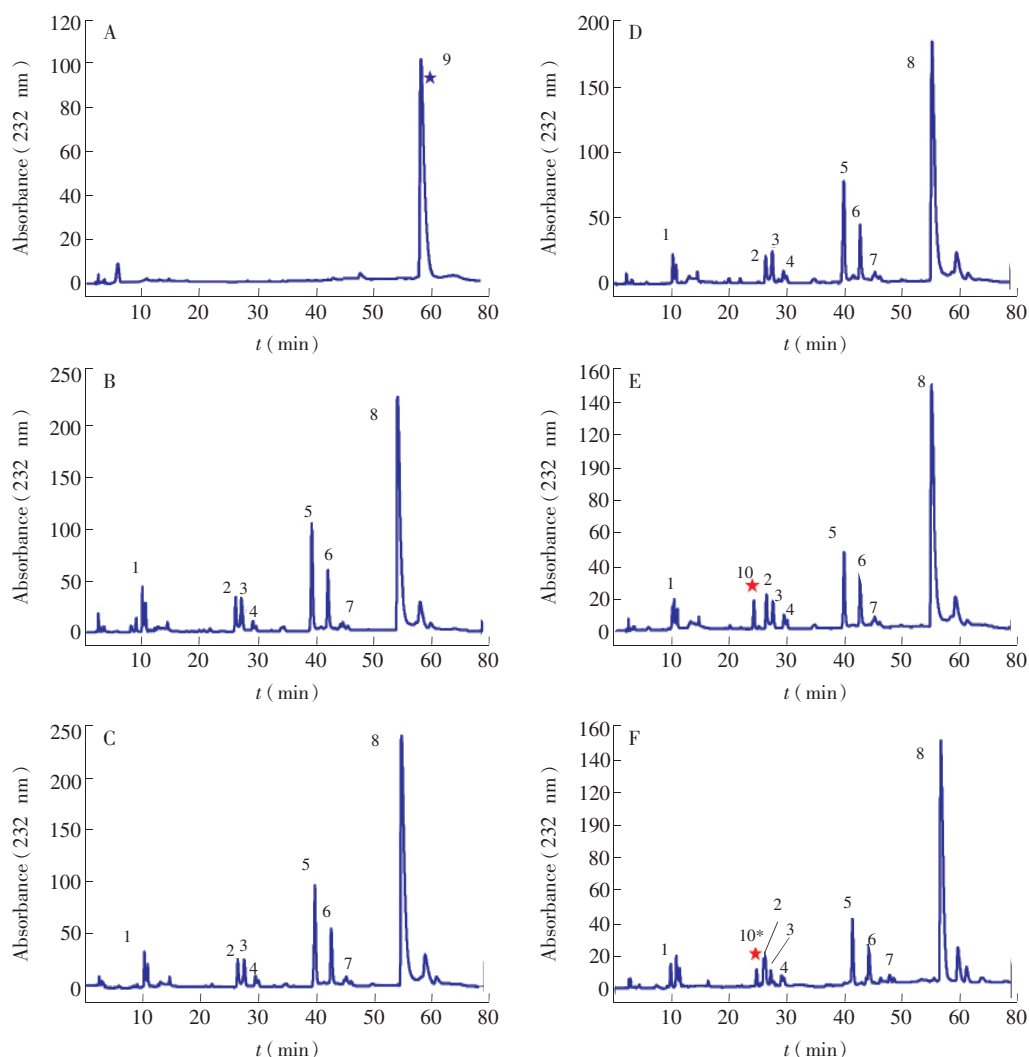


图2 磺达肝素,肝素,肝素注射液,依诺肝素注射液,那屈肝素注射液达肝素酶解二糖 SAX-HPLC 分析

Fig.2 SAX-HPLC chromatograms of heparin lyase-produced disaccharides

A: 磺达肝素; B: 肝素; C: 肝素注射液; D: 依诺肝素注射液; E: 那屈肝素注射液; F: 达肝素注射液。各色谱峰对应的二糖分别是: 1, D0A0; 2, D0S0; 3, D0A6; 4, D2A0; 5, D0S6; 6, D2S6; 7, D2A6; 8, D2S6; 9, D2S6⁺; 10, D2M0。

A: HP5(Fondaparinux Sodium); B: Heparin(Sigma); C: Heparin injection from shanghai pharma; D: Enoxaparin; E: Nadroparin; F: Dalteparin. 1, D0A0; 2, D0S0; 3, D0A6; 4, D2A0; 5, D0S6; 6, D2S6; 7, D2A6; 8, D2S6; 9, D2S6⁺; 10, D2M0。

3.3 反向离子对色谱联合电喷雾质谱检测肝素酶降解特殊二糖

反向离子对色谱可以分离极性化合物,选用二丁基胺作为离子对试剂改性 C_{18} 柱和质谱系统在线联用,肝素酶降解的产物在此系统上具有不同保留时间(图3A),但是其分离度不及 HPLC-SAX, D0A6 和 D2A0, D0S6 和 D2S0 这些具有相同电荷的二糖无法分离。肝素酶 I 能够将磺达肝素降解形成 GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(3S)(6S) 以及 Δ UA2S-GlcNS(6S)OCH₃, 只有二糖具有双键 UV 232 nm 处强吸收。这两种糖都是磺达肝素所特有的结构,尚无市售标准品可以用于对比分析。磺达肝素的肝素酶降解产物中的质谱出现两种信号,一种产物的质量数是 m/z 589.97, 加合离子对试剂二丁基胺(129)的离子 m/z 719.13, 从其质量数可以推测是甲基化的脱水二糖 Δ UA2S-GlcNS(6S)OCH₃(图3)。另一种质量数是 m/z 456.97, 加合二丁基胺 m/z 521.55, 通过质量数计算可知是 GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(3S)(6S) 三糖。实验只有质量数为 m/z 589.97 即 Δ UA2S-GlcNS(6S)OCH₃ 具有 232 nm 处的吸收,进一步确认了磺达肝素的肝素酶降解产物的结构(图3)。

达肝素和那屈肝素的酶降解产物中都有一种在肝素和依诺肝素中不存在的色谱峰,如图2E和2F

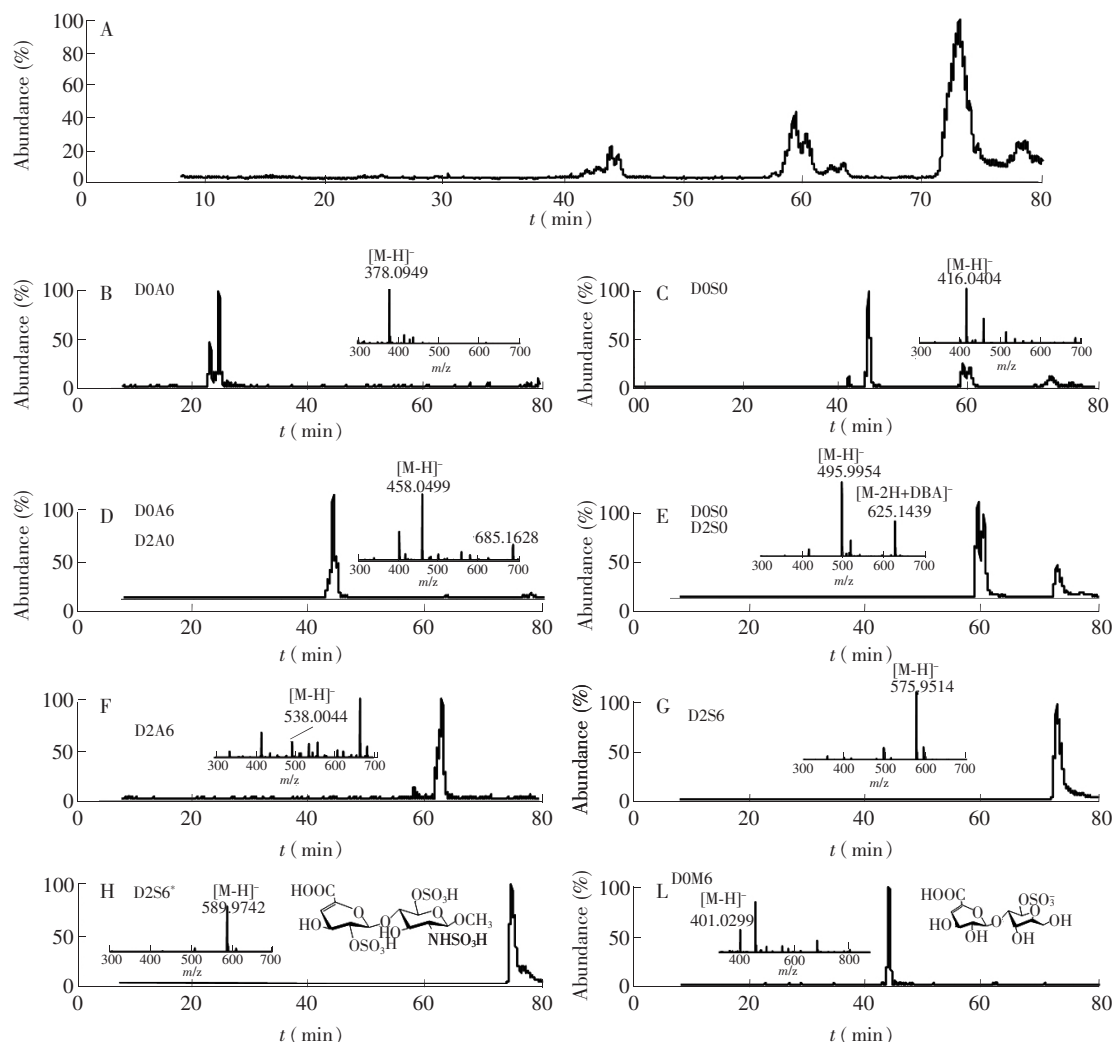


图 3 反向离子对色谱分析酶解二糖: A. 酶解达肝素反向离子对色谱总离子图, B. D0A0 提取离子流和质谱图 m/z 378.0949, C. D0S0 提取离子流和质谱图 m/z 416.0404, D. D0A6/D2A0 提取离子流和质谱图 m/z 458.0449, E. Δ D0S6 和 D2S0 提取离子流和质谱图 m/z 495.9954, F. D2A6 提取离子流和质谱图 m/z 538.0044, G. D2S6 提取离子流和质谱图 m/z 575.9514, H. 磺达肝素 D2S6* 提取离子流图、质谱图 m/z 589.9742 和结构, L. 达肝素中脱氨二糖醇 D0M6 提取离子流、质谱图 m/z 401.0299 和结构。

Fig. 3 Reversed-phase ion pair HPLC coupled with mass spectrometry analysis of heparin lyase-produced disaccharides. A. Total ion chromatogram (TIC) of dalteparin. B. Extracted ion current of D0A0 and MS (m/z 378.0949), C. Extracted ion current of D0S0 and MS (m/z 416.0404), D. Extracted ion current of D2A0/D0A6 and MS (m/z 458.0449), E. Extracted ion current of D0S6/D2S0 and MS (m/z 495.9954), F. Extracted ion current of D2A6 and MS (m/z 538.0044), G. Extracted ion current of D2S6 and MS (m/z 575.9514), H. Extracted ion current of D2S6* from heparin lyase-produced disaccharides of Fondaparinux, MS (m/z 589.9872) and structure, L. Extracted ion current of D0M6 from heparin lyase-produced disaccharides of dalteparin, MS (m/z 401.0299) and structure.

所示。质谱检测可得其质量数 m/z 401.03 (图 3)。通过计算可以确定其结构是 Δ UA-anM6S, 此二糖是由 HNO_2 降解 GlcNS(6S)、 NaBH_3 还原产生。达肝素的分子量在 5600 ~ 6400 Da 之间, 而那屈肝素其分子量较小在 3600 ~ 5000 Da 之间, 那屈肝素的还原端 anM6S 比例应比达肝素高, 分析结果, 达肝素中 Δ UA-anM6S 含量 1.9%, 那屈肝素 Δ UA-anM6S 较多 2.8%。符合分子量大的还原端较少规律。在肝素、依诺肝素、磺达肝素的质谱检测中发现 D0M6 二糖。以未加合离子对试剂的二糖 D0A0, D0S0 在质谱上强度对比发现离子强度约是 1.9: 5.1, 而通过 HPLC-SAX-UV 计算其比例约是 5: 3, 带有更多电荷

的 D0S0 在质谱上有更强的响应值, 所以质谱计算含量不准确, 积分计算酶解二糖都具有的紫外吸收色谱峰是最有效合理的方法。

4 结 论

本研究以临床上使用的肝素、低分子肝素和类肝素为研究对象, 通过肝素酶降解, 结合紫外吸收判断酶解反应的进行程度, 利用阴离子交换色谱分析并, 以市售肝素二糖标准品作为对照, 进行结构确认。对于酶解特殊二糖产物, 使用反向离子对色谱联合在线电喷雾质谱检测器进行质量数测定, 成功确认了酶降解磺达肝素的甲基二糖、三糖及一种在达肝素和那屈肝素中存在的脱氨二糖。本研究解析了肝素、低分子肝素(那屈肝素, 达肝素, 依诺肝素) 和磺达肝素等市场上主流肝素药物的酶降解产物结构, 为肝素类药物质量控制提供了依据。

References

- 1 CAO Ping, ZHANG Lin-Sheng. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, **2001**, 21(5): 33–35
曹 苹, 张麟生. *中国医院药学杂志*, **2001**, 21(5): 33–35
- 2 GUO Nan, CUI Wei, LU Jing-Chao, DU Jun, LIU Fan, XIE Rui-Qin, YANG Xiao-Hong, GU Guo-Qiang, YANG Xiu-Chun. *Chinese Journal of Cardiovascular Medicine*, **2008**, 13(5): 325–327
郭 楠, 崔 伟, 鲁静朝, 都 军, 刘 凡, 谢瑞芹, 杨晓红, 谷国强, 杨秀春. *中国心血管杂志*, **2008**, 13(5): 325–327
- 3 XIONG Lou-Hua. *Modern Business Trade Industry*, **2012**, (24): 235–236
熊露华. *现代商贸工业*, **2012**, (24): 235–236
- 4 Pan J, Qian Y, Zhou X, Pazandak A, Frazier S B, Weiser P, Lu H, Zhang L. *Nat. Biotechnol.*, **2010**, 28(3): 203–207
- 5 Guerrini M, Shriver Z, Naggi A, Casu B, Linhardt R, Torr G, Sasisekharam R. *Nat. Biotechnol.*, **2010**, 28(3): 207–211
- 6 ZHANG Qing. *Food and Drug*, **2013**, 15(3): 228–231
张 青. *食品与药品*, **2013**, 15(3): 228–231
- 7 ZHANG Qing. *Food and Drug*, **2013**, 15(2): 147–149
张 青. *食品与药品*, **2013**, 15(2): 147–149
- 8 YANG Chao, LI Yan, YANG Yong-Zhong. *China Medical Herald*, **2013**, 10(3): 91–92
杨 超, 李 彦, 杨永忠. *中国医药导报*, **2013**, 10(3): 91–92
- 9 GAO Yuan, ZHANG Hai-Shan, GUO Liang, LI Yu-Ze, GUAN Qi-Gang, TIAN Wen, JIA Zhi-Mei, JIA Da-Lin, ZHANG Yue-Lan, QI Guo-Xian, SUN Ying-Xian. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, **2013**, 51(6): 71–74
高 远, 张海山, 郭 亮, 李玉泽, 关启刚, 田 文, 贾志梅, 贾大林, 张月兰, 齐国先, 孙英贤. *山东大学学报(医学版)*, **2013**, 51(6): 71–74
- 10 CHANG Gui-Ying. *Chinese and Foreign Medical Research*, **2013**, 11(20): 22–23
常桂英. *中外医学研究*, **2013**, 11(20): 22–23
- 11 LIN Xue-Song, HOU Li-Zhong, YANG Tong-Shu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **1996**, 24(12): 1396–1399
林雪松, 侯立中, 杨同书. *分析化学*, **1996**, 24(12): 1396–1399
- 12 Lawrence R, Lu H, Rosenberg R D, Esko J D, Zhang L. *Nat. Methods*, **2008**, 5(4): 291–292
- 13 Pan J, Qian Y, Zhou X, Pazandak A, Frazier S B, Zhang P W. *Glycobiology Insights*, **2010**, 2010(2): 1–12
- 14 WANG Hao, YU Guang-Li, ZHAO Xia, HAO Cui, LI Guang-Sheng, WANG Pei-Pei. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2010**, 30(9): 2484–2487
王 皓, 于广利, 赵 峡, 郝 翠, 李广生, 王培培. *光谱学与光谱分析*, **2010**, 30(9): 2484–2487
- 15 Lawrence R, Olson S K, Steele R E, Wang L, Warrior R, Cummings R D, Esko J D. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(48): 33674–33684
- 16 CHEN Yin, YE Feng-Chun, KUANG Ying, XING Xin-Hui. *China Biotechnology*, **2007**, 27(8): 116–124
陈 银, 叶逢春, 况 莹, 邢新会. *中国生物工程杂志*, **2007**, 27(8): 116–124

- 17 YU Guang-Li, GUAN Hua-Shi, Robert J L, Jawed F. *Periodical of Ocean University of China*, **2001**, 31(4): 529–535
于广利, 管华诗, Robert J L, Jawed F. *青岛海洋大学学报(自然科学版)*, **2001**, 31(4): 529–535

Heparinase Digestion-based Disaccharide Analysis of Clinical Heparin and Heparinoids Drug

HAN Zhang-Run¹, XING Xin-Hui², YU Guang-Li¹, ZENG Yang-Yang¹, ZHANG Li-Juan^{* 1}

¹(Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

²(Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Heparin and low molecular weight heparin have been widely used in clinical therapy as anticoagulants in cardiovascular disease and in hemodialysis. Crude heparin is usually prepared from porcine intestinal mucosa. Purified heparin is a mixture of polysaccharides consisting mainly of repeating GlcNS(6S)–IdoA2S disaccharides and other disaccharides with different GlcNAc/GlcNS ± 3S ± 6S–GlcA/IdoA ± 2S residues. Heparin injections are drugs prepared from heparin active pharmaceutical ingredient (API) that is prepared from crude heparin. Low molecular weight heparins are dominant heparin-based drugs used clinically, which are prepared by degrading heparin into smaller sizes. As a result, low molecular weight heparins are sharing the same major disaccharides but have different reducing and non-reducing ends. In current study, we focused on the disaccharide compositional analysis of clinically used heparin and heparin-based drugs. Heparinase I, II, and III were used to degrade all heparin and heparin-based drugs including heparin sodium injection, Enoxaparin sodium injection, Nadroparin calcium injection, Dalteparin sodium injection, Fondaparinux sodium into disaccharides. All the degraded products were analyzed by strong anion high performance liquid chromatography (SAX-HPLC) coupled with an UV-detector. Commercially available unsaturated disaccharide standards were then used for structural identification. Furthermore, unusual disaccharides present in Nadroparin, Dalteparin, and Fondaparinux were confirmed by reversed-phase ion pair HPLC coupled with mass spectrometry. The developed method produced detailed structural information, which should be useful for quality control of heparin and heparin-based drugs.

Keywords Heparin; Low molecular weight heparin; Heparinase; Disaccharide analysis; Mass spectrometry

(Received 14 January 2015; accepted 26 March 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91129706)