

# 反相液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱法 定量分析 *N*-非取代肝素/硫酸乙酰肝素

杜佳燕<sup>1,2</sup>, 黄海月<sup>1</sup>, 苏晓明<sup>1</sup>, 魏 峥<sup>2</sup>

(1. 福州大学化学学院, 福建 福州 350002;

2. 福州大学化肥催化剂国家工程研究中心糖生化研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:** 肝素和硫酸乙酰肝素由重复的二糖单元组成, 其组分和结构与重要的生物病理、生理作用息息相关。这些二糖单元包括含量较高的 *N*-硫酸化葡萄糖胺、*N*-乙酰化葡萄糖胺和含量较低的 *N*-非取代葡萄糖胺残基。本研究采用 2-氨基吡啶酮标记二糖, 结合反相液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱法 (RP-LC-ESI-IT-TOF MS) 分析肝素/硫酸乙酰肝素中 *N*-非取代二糖。通过优化检测条件, 实现了 12 种肝素/硫酸乙酰肝素二糖的基线分离, 并采用外标法相对定量分析各二糖组分。该方法适用于分析含有 *N*-非取代二糖的肝素衍生物, 可为进一步研究 *N*-非取代葡萄糖胺的结构与功能提供检测方法, 有助于更好地理解 *N*-非取代葡萄糖胺残基在人类健康与疾病管理中的重要作用。

**关键词:** 硫酸乙酰肝素; *N*-非取代二糖; 2-氨基吡啶酮; 反相液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱 (RP-LC-ESI-IT-TOF MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2019)03-0222-11

doi: 10.7538/zpxb.2018.0109

## Quantitative Analysis of *N*-unsubstituted Heparin/Heparan Sulfate by Reversed-phase Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Ion Trap-Time-of-Flight Mass Spectrometry

DU Jia-yan<sup>1,2</sup>, HUANG Hai-yue<sup>1</sup>, SU Xiao-ming<sup>1</sup>, WEI Zheng<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

2. Institute of Glycobiology, National Engineering Research Centre of Chemical Fertilizer Catalyst, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Heparan sulfate (HS) and heparin are complex sulfated glycosaminoglycans which have important biological activities in developmental processes, angiogenesis, blood coagulation, cell adhesion, and tumor metastasis. These interactions involve a wide variety of proteins, *i. e.* enzymes, cytokines, growth factors, extracellular matrix proteins. HS and heparin consist of repeating disaccharide units each composed of an

收稿日期: 2018-08-20; 修回日期: 2018-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(21343013)资助

作者简介: 杜佳燕(1990—), 女(汉族), 福建厦门人, 博士研究生, 工业催化专业。E-mail: 251629322@qq.com

通信作者: 魏 峥(1969—), 女(汉族), 福建福州人, 教授, 从事糖生物化学研究。E-mail: zheng0wei@hotmail.com

网络出版时间: 2019-04-16; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20190415.1735.012.html>

uronic acid (UA) or sulfated at C-2 (UA2S) and a derivative of glucosamine [*N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-sulfated glucosamine (GlcNS), or unsubstituted glucosamine (GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>)] that is variably O sulfated. The characterization of GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>-containing HS/heparin is fundamental to further elucidating such functional properties. In this study, a method of reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization ion trap-time-of-flight mass spectrometry (RP-LC-ESI-IT-TOF MS) was described for the separation and structural analysis of *N*-unsubstituted disaccharides from heparin/HS. Firstly, 12 disaccharides of heparin/HS were labeled with 2-aminoacridone (AMAC). Subsequently, the AMAC-labeled disaccharides were separated by RP-LC with varied reversed-phase columns. The results showed that the baseline separation of 12 AMAC-labeled heparin/HS disaccharides could be achieved by the ODS-2 HYPER-SIL C18 column with a linear elution comprised by eluent A (40 mmol/L ammonium acetate solution (pH 5.6)) and eluent B (methanol). The mass spectrometer detector voltage was 1.8 kV, and the curved desolvation line and heat block temperatures both were 200 °C. In mass spectrometry, both the ionization efficiency of each disaccharide, and the sulfate loss in the mass spectrometer ion source were different. In order to correct the quality deviation caused by above situation, the relative quantitative analysis of the 12 AMAC-labeled disaccharides was performed by calibration curves established by analyzing a series of increasing amounts of standard AMAC-labeled disaccharide mixtures (200-400 ng). Linearity was assessed based on the amount of AMAC-labeled disaccharide ( $x$ ) and the peak areas in extract ion chromatography ( $y$ ). All calibration curves of AMAC-labeled disaccharide showed a good linear relationship ( $R^2 \geq 0.98$ ). The limits of quantitation were determined by 10 times of the signal-to-noise ratio  $S/N$ , which was less than 170 ng for all disaccharides. The *N*-unsubstituted heparin derivatives (*N*-sulfated heparin, de-6, *N*-sulfated heparin and de-2,6, *N*-sulfated heparin) prepared by our laboratory were analyzed by this method. The results showed that in three *N*-unsubstituted heparin derivatives, various de-sulfation reactions had successfully converted *N*-sulfo groups into *N*-unsubstituted residues. The total *N*-unsubstituted disaccharides yields were as high as 60.51%, 67.43% and 68.39% for *N*-sulfated heparin, de-6, *N*-sulfated heparin and de-2,6, *N*-sulfated heparin, respectively, and the composition of *N*-unsubstituted disaccharides in each derivative was significantly different. These results indicated that this method is suitable for analyzing heparin derivatives containing *N*-unsubstituted disaccharides. At the same time, it is able to be applied to qualitatively and quantitatively analyze the disaccharides containing *N*-unsubstituted glucosamine in biological samples, and provides an important analysis method for further study on the structure and function of *N*-unsubstituted glucosamine, which helps to broaden our understanding of the important function of *N*-unsubstituted glucosamine residues in human health and disease.

**Key words:** heparan sulfate; *N*-unsubstituted disaccharide; 2-aminoacridone; reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization ion trap-time-of-flight mass spectrometry (RP-LC-ESI-IT-TOF MS)

肝素 (heparin, HP) 和硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 是带有负电荷的线性糖胺聚糖, 参与了众多生物活动过程, 如血管形成、血液凝固、细胞粘附及增生和肿瘤转移等<sup>[1-6]</sup>。它们的结构是影响糖胺聚糖与蛋白质结合的关键因素<sup>[7-9]</sup>, 它们与蛋白质的相互作用与其生物功能息息相关。肝素和硫酸乙酰肝素均由重复的二糖单元组成, 二糖单元是由己糖醛酸 (hexuronic acid, HexA) 和葡萄糖胺 (glucosamine, GlcN) 以 1-4 糖苷键连接而成, 含有较多的 *N*-硫酸化葡萄糖胺 (*N*-sulfated Glucosamine, GlcNS)、*N*-乙酰化葡萄糖胺 (*N*-acetylated, GlcNAc) 和较少的 *N*-非取代葡萄糖胺 (*N*-unsubstituted glucosamine, Glc-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) 残基。其中, 己糖醛酸以葡糖醛酸和艾杜糖醛酸两种差向异构体形式存在, 具有 C-2 位氧硫酸化。葡萄糖胺上的修饰方式具有 C-6 位氧硫酸化、*N* 位硫酸化、*N* 位乙酰化以及罕见的 *N* 位非取代和 C-3 位氧硫酸化<sup>[10-11]</sup>。在肝素/硫酸乙酰肝素的生物合成途径中, 葡糖醛酸和 *N*-乙酰化葡萄糖胺首先以 1-4 糖苷键交替连接的方式合成无硫酸化的前体<sup>[12-14]</sup>, 该前体中的 *N*-乙酰化葡萄糖胺残基在 *N*-脱乙酰/*N*-磺基转移酶的作用下生成 *N*-非取代葡萄糖胺中间体, 然后该中间体发生 *N*-硫酸化修饰, 生成 *N*-硫酸化葡萄糖胺。随后发生的修饰主要有葡糖醛酸的 C-5 位差向异构化与 C-2 位氧硫酸化, *N*-硫酸化葡萄糖胺的 C-6 位与 C-3 位氧硫酸化和 *N*-乙酰化葡萄糖胺的 C-6 位氧硫酸化。多种修饰作用模式和不同修饰程度的组合, 导致肝素/硫酸乙酰肝素的结构具有多样性且高度复杂。

在 *N*-脱乙酰化和随后的 *N*-硫酸化过程中, *N*-脱乙酰/*N*-磺基转移酶的活性受到限制, 产生含量较低的 *N*-非取代葡萄糖胺。在不同来源的生物体中, *N*-非取代葡萄糖胺的含量存在差异。除了在牛肾硫酸乙酰肝素中, *N*-非取代葡萄糖胺的含量高达 12%<sup>[11]</sup> 外, 在其他硫酸乙酰肝素中其含量都普遍较低, 通常占 0.2%~4%<sup>[15-18]</sup>。虽然 *N*-非取代葡萄糖胺在硫酸乙酰肝素中的含量较低, 但其与一些重要的细胞生物学和病理生理学现象关系紧密<sup>[12, 19, 20-22]</sup>。Hering 等<sup>[3]</sup> 研究表明, *N*-非取代葡萄糖胺残基

可能影响到生物体对损伤组织的再生应答。在肿瘤发生和转移的相关研究领域, *N*-非取代葡萄糖胺残基同样引起了极大关注。有报道<sup>[23]</sup> 指出, 乳腺癌细胞中存在含高浓度 *N*-非取代葡萄糖胺残基的硫酸乙酰肝素, 抑制了乙酰肝素酶的活性。利用人工化学合成含有 *N*-非取代葡萄糖胺残基的四糖进行体外实验, 发现可以通过抑制乙酰肝素酶的活性从而抑制乳腺癌细胞的转移。因此, 通过建立和表征含 *N*-非取代葡萄糖胺残基的糖库<sup>[24-26]</sup>, 可以为阐明含 *N*-非取代葡萄糖胺残基的糖胺聚糖与蛋白质间的相互作用提供重要的体外实验来源。但由于其含量少, 检测难度大, *N*-非取代葡萄糖胺残基的组分分析和结构表征仍然是一个难题。在天然的肝素/硫酸乙酰肝素或人工合成的衍生物中, 构建 *N*-非取代葡萄糖胺残基的分离和分析方法都具有极大挑战和重要意义, 是更好地理解 *N*-非取代葡萄糖胺残基生物功能的基础。

分析肝素和硫酸乙酰肝素的组分含量时, 通常使用肝素裂解酶酶解产生 12 种肝素/硫酸乙酰肝素二糖, 再对二糖进行分析测定。目前, 分析肝素/硫酸乙酰肝素二糖的方法主要有高效液相色谱法<sup>[11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[27]</sup>、凝胶色谱法<sup>[28]</sup> 和液相色谱-质谱联用法等。其中, 液相色谱-质谱联用法使用的液相色谱包括排阻色谱<sup>[20, 29]</sup>、亲水作用色谱<sup>[30-31]</sup> 和反相离子对色谱<sup>[32-34]</sup> 等。另外, 可利用 2-氨基吡啶酮 (2-aminoacridone, AMAC) 与肝素/硫酸乙酰肝素二糖的还原胺化反应, 结合反相液相色谱-质谱联用技术分析肝素/硫酸乙酰肝素二糖<sup>[35-38]</sup>。

本研究基于反相液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱法 (RP-LC-ESI-IT-TOF MS), 拟采用 AMAC 标记二糖, 建立高分辨、高重现性的定性和定量体系来分析 12 种不同的肝素/硫酸乙酰肝素二糖, 其中包括 4 种低含量的 *N*-非取代二糖。希望能够更好地理解 *N*-非取代葡萄糖胺残基的生理和病理作用。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

液相色谱-电喷雾-离子阱-飞行时间质谱仪: 日本岛津公司产品, 配有 LC-20AD 二元泵、DGU-

20A3R 脱气装置、SIL-20AC 自动进样器、CBM-20A 基本通信模块、PDA 光敏检测器、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器;CT02-50SR 型恒温真空冷冻浓缩仪;德国 Christ 公司产品;ODS-2 HYPERSIL C18 色谱柱(5  $\mu\text{m}$   $\times$  250 mm  $\times$  4.6 mm);美国 Thermo 公司产品。

## 1.2 主要材料与试剂

肝素钠:中国国药集团化学试剂有限公司产品;12 种肝素/硫酸类肝素标准二糖( $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNAc}(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNAc}(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNAc}$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNAc}$ 、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNS}(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNS}$ 、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ 、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+$ 、 $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$ );英国 Iduron 公司产品;肝素裂解酶 I(肝素酶 EC4.2.2.7)、肝素裂解酶 II(无 EC 号)、肝素裂解酶 III(肝素酶 EC4.2.2.8);中国北京 ADHOC 公司产品;乙酸铵、2-氨基吡啶酮、氨基硼氢化钠、乙酸:美国 Sigma-Aldrich 公司产品;甲醇(色谱纯):美国 J. T. Baker 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 含 *N*-非取代葡萄糖胺残基的肝素衍生物的制备** 本实验选择 3 种含 *N*-非取代葡萄糖胺残基的肝素衍生物,制备方法参照文献[26-27],简述如下:1) 将肝素钠溶液通过 H 型阳离子交换树脂,收集流出液,用吡啶中和后,冷冻干燥得肝素吡啶。将肝素吡啶溶于一定比例的二甲亚砜中,反应液透析后冷冻干燥得脱 *N*-硫酸化肝素(2S,6S, $\text{NH}_3^+\text{-HP}$ );2) 将肝素吡啶溶于一定比例的 1-甲基-2 吡咯烷酮中反应,用 NaOH 溶液调至 pH 8~9 后进行透析,反应液冷冻干燥得脱 6,*N*-硫酸化肝素(2S, $\text{NH}_3^+\text{-HP}$ );3) 将脱 6,*N*-硫酸化肝素(2S, $\text{NH}_3^+\text{-HP}$ )溶于 NaOH 溶液中反应,用乙酸中和,透析后冷冻干燥得全脱 2,6,*N*-硫酸化肝素( $\text{NH}_3^+\text{-HP}$ )。

**1.3.2 肝素衍生物的肝素酶酶解** 取 20  $\mu\text{g}$  脱 2,6,*N*-硫酸化肝素溶于 30  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L 的乙酸钠缓冲溶液(含 0.1 mmol/L 乙酸钙, pH 7.0)中,加入肝素裂解酶 I、肝素裂解酶 II 和肝素裂解酶 III 各 5 mIU,于 37  $^\circ\text{C}$  酶解 24 h,于 100  $^\circ\text{C}$  水浴 2 min 终止反应。以 10 000 r/min

离心 10 min,取上清液,浓缩至干。脱 6,*N*-硫酸化肝素和脱 *N*-硫酸化肝素均采用上述步骤操作,得到浓缩干燥的酶解产物。

**1.3.3 肝素二糖的 AMAC 标记和标准溶液的配制** 称取 12 种标准肝素/硫酸类肝素二糖各 5  $\mu\text{g}$ ,混合均匀,加入 10  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L 的 AMAC 溶液(AMAC 溶解于乙酸-二甲亚砜(V/V,3:17)),涡旋振荡 20 min。在上述反应溶液中加入 10  $\mu\text{L}$  1.0 mol/L 的氨基硼氢化钠溶液,于 45  $^\circ\text{C}$  反应 4 h<sup>[39]</sup>。最后,用 50%二甲亚砜将上述 AMAC 标记的二糖混合物稀释,分别配制成浓度为 20、22、25、30、40 mg/L 的系列混合标准溶液,用于建立液相色谱-质谱分析的标准曲线。

肝素衍生物的 AMAC 标记:采用上述标准肝素/硫酸类肝素二糖的 AMAC 标记方法对肝素衍生物的干燥样品进行标记,最后用 50%二甲亚砜将 AMAC 标记后的肝素衍生物混合液的浓度稀释到 0.4 mg/L,用于后续的液相色谱-质谱分析。

**1.3.4 RP-LC-ESI-IT-TOF MS 分析 色谱条件:**ODS-2 HYPERSIL C18 色谱柱(5  $\mu\text{m}$   $\times$  250 mm  $\times$  4.6 mm);流动相:A 为乙酸铵溶液(20、40、60、80 mmol/L, pH 5.6),B 为甲醇;线性梯度洗脱程序:0~100 min(2%~20%B),100~120 min(20%~50%B);流速 0.3 mL/min;柱温 45  $^\circ\text{C}$ ;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI)负离子模式;喷雾电压 -3.5 kV;雾化气(氮气)流速 1.50 mL/min;质量扫描范围  $m/z$  200~1 000;检测器电压 1.8 kV;加热模块(BH)和曲形脱溶剂管(CDL)温度 200  $^\circ\text{C}$ 。

标准曲线的建立:测定上述 AMAC 标记后的肝素/硫酸类肝素二糖混合物的系列混合标准溶液,以 AMAC 标记后各二糖的母离子响应峰面积( $y$ )对进样的肝素/硫酸类肝素二糖质量( $x$ )绘制标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离 AMAC 标记的肝素/硫酸类肝素二糖的 RPLC-MS-IT TOF 方法

据文献报道,Acquity UPLC BEH C18 柱<sup>[35]</sup>和 ODS-2 HYPERSIL C18 柱<sup>[38]</sup>已经成

功用于定量分析 heparin/HS 中含量较高的 *N*-取代二糖。Galeotti 等<sup>[37]</sup> 和 Antia 等<sup>[38]</sup> 建立了分析 12 种肝素/硫酸类肝素二糖的方法,但由于 *N*-非取代二糖与其他二糖的保留时间过于接近,该方法无法实现 12 种肝素/硫酸类肝素二糖的基线分离。

12 种 AMAC 标记的肝素/硫酸类肝素标

准二糖的详细信息列于表 1。本研究选择多种反向柱,分别对其进行分离分析,结果表明,使用 ODS-2 HYPERSIL C18 柱分析二糖时,既能够对 8 种常规二糖(*N*-硫酸化二糖和 *N*-乙酰化二糖)实现基线分离,也可以对另外 4 种 *N*-非取代二糖达到基线分离。因此选择 ODS-2 HYPERSIL C18 柱进行下一步实验。

表 1 肝素/硫酸类肝素二糖的结构和 AMAC 标记后的相对分子质量

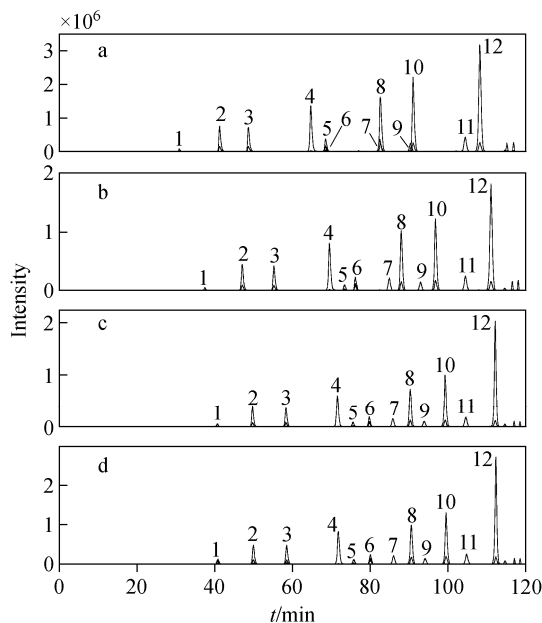
Table 1 Structures of heparin/HS disaccharides and relative molecular mass of AMAC-labeled disaccharides

肝素/硫酸类肝素二糖 Heparin/Heparan sulfate disaccharides	R <sub>2</sub>	Y	R <sub>6</sub>	AMAC 标记的二糖的理论相对分子质量 Relative molecular mass of AMAC-labeled disaccharides	母离子 Parent ions ( <i>m/z</i> )
ΔHexA(2S)-GlcNS(6S)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	771.0557	770.0485
ΔHexA-GlcNS(6S)	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	691.0989	690.0916
ΔHexA(2S)-GlcNS	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	691.0989	690.0916
ΔHexA-GlcNS	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	611.1421	610.1348
ΔHexA(2S)-GlcNAc(6S)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ac	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	733.1095	732.1022
ΔHexA-GlcNAc(6S)	H	Ac	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	653.1532	652.1454
ΔHexA(2S)-GlcNAc	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ac	H	653.1532	652.1454
ΔHexA-GlcNAc	H	Ac	H	573.1959	572.1886
ΔHexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	691.0989	690.0916
ΔHexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	H	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	611.1421	610.1348
ΔHexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	611.1421	610.1348
ΔHexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	H	H	H	531.1853	530.178

首先,分别使用 20、40、60 和 80 mmol/L 的乙酸铵溶液(pH 5.6)作为分离检测的流动相体系,考察乙酸铵浓度对 12 种肝素/硫酸类肝素二糖分离效率的影响,结果示于图 1。结果表明,当乙酸铵浓度为 20 mmol/L 时,ΔHexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S) 和 ΔHexA(2S)-GlcNAc(6S)、ΔHexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S) 和 ΔHexA-GlcNAc(6S)、ΔHexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup> 和 ΔHexA(2S)-GlcNAc 这 3 对含有相同亚硫酸根个数的二糖在提取离子流色谱图中的出峰位置基本一致,糖峰重叠,无法分开。当乙酸铵浓度为 40 mmol/L 时,12 种二糖都能实现基线分离,且峰形较窄,分离效果良好。与图 1a 相比,其保留时间明显增加。在 *N*-硫酸化二糖中,首先被洗脱出来的二糖为 ΔHexA(2S)-GlcNS(6S),然后为含有 2 个亚硫酸根的 ΔHexA-GlcNS(6S) 与 ΔHexA(2S)-GlcNS,最后为 ΔHexA-GlcNS。这可

能是因为 ΔHexA(2S)-GlcNS(6S) 的疏水性最弱<sup>[38]</sup>。同样,在 *N*-乙酰化和 *N*-非取代二糖中,首先被洗脱出来的分别是 ΔHexA(2S)-GlcNAc(6S) 和 ΔHexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)。当流动相 A 中乙酸铵溶液浓度进一步提高时,分离效果和保留时间几乎不受影响(图 1c 和 1d)。在质谱分析过程中,使用的流动相盐浓度越低,对质谱的损伤越小。因此,在保证 12 种肝素/硫酸类肝素二糖具有良好分离效果的情况下,选择 40 mmol/L 作为乙酸铵的最佳分离浓度,尽可能降低对仪器的损伤。

基于该分离方法实现了 12 种二糖的基线分离,不仅可以在液相色谱-质谱联用中使用各二糖各自的 *m/z* 分离和分析 AMAC 标记的肝素/硫酸类肝素二糖,还可以在常规液相色谱中利用二糖特征的紫外吸收检测或 AMAC 的荧光吸收检测完成定性分析。



注:图 a、b、c、d 中流动相 A 中乙酸铵的浓度分别为 20、40、60 和 80 mmol/L;1.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$ ; 2.  $\Delta\text{HexA-GlcNS}(6\text{S})$ ;3.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$ ; 4.  $\Delta\text{HexA-GlcNS}$ ;5.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ ; 6.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNAc}(6\text{S})$ ;7.  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ ; 8.  $\Delta\text{HexA-GlcNAc}(6\text{S})$ ;9.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+$ ; 10.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNAc}$ ;11.  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$ ; 12.  $\Delta\text{HexA-GlcNAc}$ ;含有 2 个或 3 个亚硫酸基团的二糖峰下有重叠峰,为质谱离子源上的亚硫酸根丢失

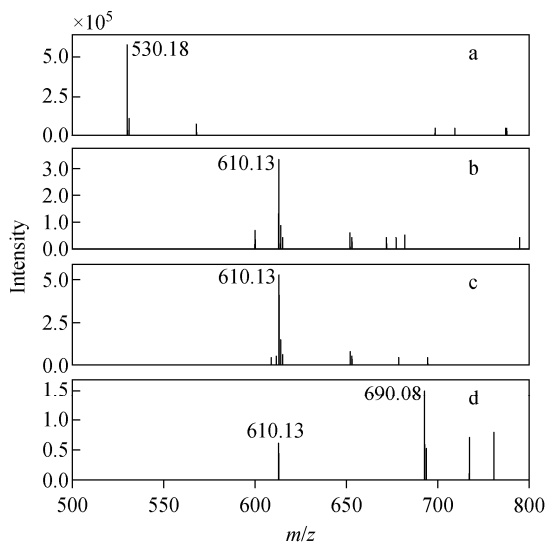
图 1 乙酸铵浓度对肝素/硫酸类肝素二糖在色谱分离中的影响

Fig. 1 Influence of the concentration of ammonium acetate on the LC separation of heparin/HS disaccharides

检测器电压、加热模块和曲形脱溶剂管温度在 AMAC 标记的肝素/硫酸类肝素二糖的检测灵敏度上也起着关键性作用。因此,实验对这些参数进行了系列调控。结果表明,检测电压过低会导致二糖的灵敏度下降。当电压为 1.6 kV 时,无法检测到  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  二糖;当电压为 1.7 kV 时, $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  的检测灵敏度只有电压为 1.8 kV 时的 8%。经实验优化,选择 1.8 kV 为最佳检测电压。此外,加热模块和曲形脱溶剂管温度升高,二糖的检测灵敏度也会提高。当温度从 100 °C 提高至 200 °C 时,二糖在质谱中的检测灵敏度提高了 81%~100%。因此,在后续分析 AMAC 标记的肝素/硫酸类肝素二糖的实

验中,选择检测电压为 1.8 kV,加热模块和曲形脱溶剂管的温度为 200 °C。

上述质谱分析中,均采用负离子模式,每种 *N*-非取代二糖的质谱图示于图 2。由图 2 可见, $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$  二糖产生碎片离子  $m/z$  530.18; $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+$  和  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+(6\text{S})$  属于同分异构体,均出现了碎片离子  $m/z$  610.13; $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+(6\text{S})$  产生了碎片离子  $m/z$  690.08,在  $m/z$  610.130 处的小峰可能是含有单个亚硫酸基团的 *N*-非取代二糖( $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+$  或  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ ),这是由于  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+(6\text{S})$  在 MS 离子源中脱掉 1 个亚硫酸根所致。



注:a.  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$ ;b.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+$ ; c.  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ ;d.  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNH}_3^+(6\text{S})$ ;

这些二糖分别对应图 1b 中的 11、9、7、5 二糖峰

图 2 AMAC 标记的 *N*-非取代硫酸类肝素二糖的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of AMAC-labeled *N*-unsubstituted HS disaccharides

## 2.2 肝素/硫酸类肝素标准二糖的定量分析

每个二糖在质谱中具有不同的离子化效率,含有 2 个或 3 个亚硫酸基团的二糖,在 MS 离子源中会丢失亚硫酸根。因此,为了校正每个二糖的离子化效率和在质谱离子源上由亚硫酸根丢失引起的质量偏差,采用 2.1 节中优化的 RP-LC-ESI-IT-TOF MS 分析方法对 AMAC 标记后的肝素/硫酸类肝素二糖混合物的系列

混合标准溶液进行分析。以 AMAC 标记后的肝素/硫酸类肝素二糖各自的母离子响应峰面积( $y$ )对相应的质量( $x$ , 200~400 ng)做线性回归, 标准曲线示于图 3, 线性方程和相关系数列于表 2。从表 2 的相关系数  $R^2$  可以发现, 除  $\Delta\text{HexA-GlcNS}$  (6S)、 $\Delta\text{HexA}$  (2S)-GlcNS 和  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$  的  $R^2$  为 0.98 以外, 其余二糖的  $R^2$  均不小于 0.99, 呈现良好的线性关系。以 10 倍信噪比  $S/N$  确定定量限,  $\Delta\text{HexA}$  (2S)-GlcNS(6S) 的定量限为 170 ng,  $\Delta\text{HexA}$  (2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup> 和  $\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$  的定量限为 50 ng, 其余二糖的定量限均小于 50 ng。

表 2 AMAC 标记的 12 种二糖的线性方程

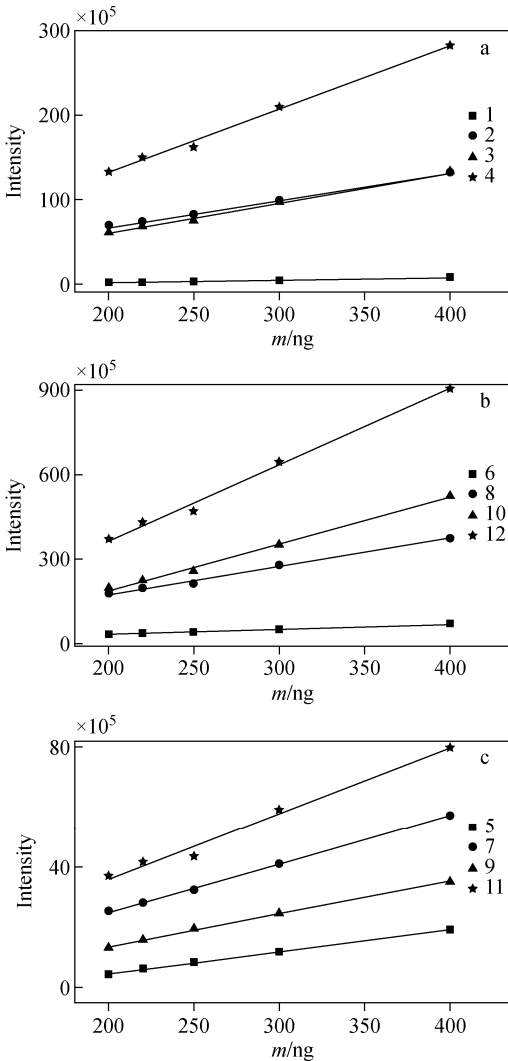
Table 2 Linear equations of 12 AMAC-labeled disaccharides

肝素/硫酸类肝素二糖 Heparin/Heparan sulfate disaccharides	线性方程 Linear equations	相关系数 Correlation coefficients ( $R^2$ )
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNS(6S)	$y=0.031x-4.997$	0.990
$\Delta\text{HexA-GlcNS}$ (6S)	$y=0.322x+1.742$	0.983
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNS	$y=0.352x-9.485$	0.986
$\Delta\text{HexA-GlcNS}$	$y=0.750x-17.658$	0.992
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNAc(6S)	$y=0.192x-6.539$	0.992
$\Delta\text{HexA-GlcNAc}$ (6S)	$y=1.008x-28.920$	0.990
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNAc	$y=1.654x-144.152$	0.992
$\Delta\text{Hex-GlcNAc}$	$y=2.715x-178.106$	0.993
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	$y=0.072x-9.549$	0.999
$\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$ (6S)	$y=0.160x-7.267$	0.998
$\Delta\text{HexA}$ (2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	$y=0.108x-8.027$	0.997
$\Delta\text{HexA-GlcNH}_3^+$	$y=0.219x-7.717$	0.983

为评估该方法的准确度和精密度, 采用已知组分的 AMAC 标记的二糖混合物进行验证。结合各二糖的线性方程, 通过 3 组平行实验重复测量得到各二糖的含量, 列于表 3。结果表明, 利用本方法得到的混合物中每种二糖的组分含量与实际组分含量基本一致。因此, 对含有  $N$ -非取代二糖的肝素/硫酸类肝素二糖组分进行定性和相对定量分析时, 采用 AMAC 标记与 RPLC-MS-IT-TOF MS 相结合的方法具有高分辨、高重现性。

### 2.3 肝素衍生物样品的二糖分析

含  $N$ -非取代葡萄糖胺残基的硫酸类肝素具有多种生化功能, 特别是其抗肿瘤活性的研究越来越受到关注<sup>[23]</sup>。因此, 在天然的肝素/硫酸类肝素或人工合成的衍生物中, 定性与定量检测  $N$ -非取代二糖均具有重要意义。本实验室已制备出多种  $N$ -非取代肝素衍生物, 选择脱  $N$ -硫酸化肝素 (2S, 6S, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)、脱 6,  $N$ -硫酸化肝素 (2S, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP) 和全脱 2, 6,  $N$ -硫酸化肝素 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP) 作为测试样品, 采用本研究建立的分析方法对以上 3 种测试样品的  $N$ -非取代二糖组分进行定性和相对定量分析。每种  $N$ -非取代肝素衍生物均取两



注: a.  $N$ -硫酸化二糖; b.  $N$ -乙酰化二糖;

c.  $N$ -非取代二糖; 各二糖序号标识同图 1

图 3 AMAC 标记的 12 种二糖的标准曲线

Fig. 3 Curves of 12 AMAC-labeled disaccharides

份进行平行实验,用肝素裂解酶 I、II 和 III 的混合物完全酶解后进行 AMAC 标记,然后进行 RPLC-MS-IT-TOF MS 分析。三种 *N*-非取代肝素衍生物的提取离子流色谱图示于图 4。通过表 2 的线性方程计算得到样品中每个二糖的组分含量,列于表 4。

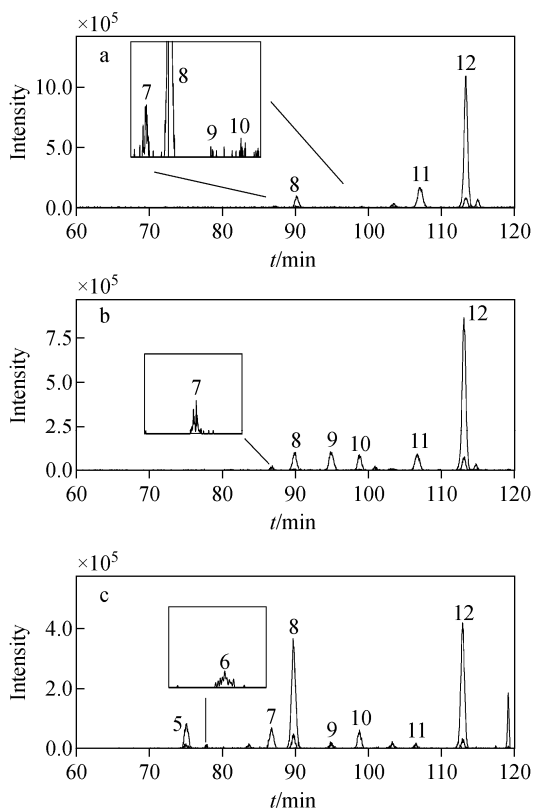
表 3 已知组分的 AMAC 标记的二糖混合物的相对定量分析

Table 3 Relative quantification analysis of AMAC-labeled disaccharide mixtures containing known composition of disaccharides

肝素/硫酸类肝素二糖 Heparin/Heparan sulfate disaccharides	已知的组分含量 Known composition/%	计算的组分含量 Calculated composition/%
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S)	8.33	$8.91 \pm 1.06$
$\Delta$ HexA-GlcNS(6S)	8.33	$8.25 \pm 0.83$
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNS	8.33	$8.14 \pm 0.34$
$\Delta$ HexA-GlcNS	8.33	$8.36 \pm 0.38$
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNAc(6S)	8.33	$8.40 \pm 0.36$
$\Delta$ HexA-GlcNAc(6S)	8.33	$8.48 \pm 0.41$
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNAc	8.33	$8.37 \pm 0.41$
$\Delta$ Hex-GlcNAc	8.33	$8.37 \pm 0.32$
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	8.33	$8.06 \pm 0.89$
$\Delta$ HexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	8.33	$8.17 \pm 0.32$
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8.33	$8.32 \pm 0.44$
$\Delta$ HexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	8.33	$8.19 \pm 0.04$

市售肝素样品中只含有 4 种 *N*-硫酸化二糖和 4 种 *N*-乙酰化二糖。在本实验选取的 3 种 *N*-非取代肝素衍生物中,检测到 4 种 *N*-乙酰化二糖( $\Delta$ HexA(2S)-GlcNAc(6S)、 $\Delta$ HexA-GlcNAc(6S)、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcNAc 和  $\Delta$ HexA-GlcNAc)和 4 种 *N*-非取代二糖( $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)、 $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>和  $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>),但是没有检测到  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S)、 $\Delta$ HexA-GlcNS(6S)、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS 和  $\Delta$ HexA-GlcNS 这几种 *N*-硫酸化二糖。表明利用各种脱硫酸化反应已成功将 *N*-硫酸化基团转化为 *N*-非取代基团。

在脱 *N*-硫酸化肝素(2S,6S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)中含量最丰富的二糖为  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S),占



注: a. 全脱 2,6,*N*-硫酸化肝素(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP);  
b. 脱 6,*N*-硫酸化肝素(2S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP);  
c. 脱 *N*-硫酸化肝素(2S,6S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP);  
二糖序号标识同图 1

图 4 AMAC 标记的 *N*-非取代肝素衍生物二糖的提取离子流色谱图  
Fig. 4 Extracted ion chromatograms of AMAC-labeled disaccharides of *N*-unsubstituted heparin-derivative

二糖总量的 39.70%;其余 3 种 *N*-非取代二糖  $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>和  $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>的组分含量分别为 14.91%、9.98%和 3.80%。4 种 *N*-非取代二糖的组分差异较大。脱 6,*N*-硫酸化肝素(2S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)中  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>占总糖量的 41.90%, $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>为 19.28%, $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)为 6.24%,没有检测到  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>(6S)。全脱 2,6,*N*-硫酸化肝素(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)中最丰富的二糖是  $\Delta$ HexA-GlcNH<sub>3</sub><sup>+</sup>,占二糖总量的 42.50%。脱 *N*-硫酸化肝素(2S,6S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)、脱 6,*N*-硫酸化肝素(2S,NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)和全脱 2,6,*N*-硫酸化肝素(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-HP)中 *N*-非取代二糖的总产率分别高达 60.51%、67.43%和 68.39%。

表 4 3 种 *N*-非取代肝素衍生物的二糖组分分析Table 4 Disaccharide composition analysis of 3 *N*-unsubstituted heparin-derivative

肝素/硫酸类肝素二糖 Heparin/Heparan sulfate disaccharides	组分 Composition/%		
	全脱 2,6, <i>N</i> -硫酸化肝素 (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -HP)	脱 6, <i>N</i> -硫酸化肝素 (2S,NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -HP)	脱 <i>N</i> -硫酸化肝素 (2S,6S,NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -HP)
ΔHexA(2S)-GlcNS(6S)	0.00	0.00	0.00
ΔHexA-GlcNS(6S)	0.00	0.00	0.00
ΔHexA(2S)-GlcNS	0.00	0.00	0.00
ΔHexA-GlcNS	0.00	0.00	0.00
ΔHexA(2S)-GlcNAc(6S)	0.00	0.00	39.70
ΔHexA-GlcNAc(6S)	0.00	0.00	2.99
ΔHexA(2S)-GlcNAc	6.96	6.24	14.91
ΔHex-GlcNAc	6.69	5.91	12.26
ΔHexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	11.06	41.90	9.98
ΔHexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (6S)	10.15	9.85	7.31
ΔHexA(2S)-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	42.50	19.28	3.80
ΔHexA-GlcNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	22.64	16.82	9.05
C-2 位氧硫酸化二糖	21.21	51.75	59.98
C-6 位氧硫酸化二糖	13.65	12.16	69.86
<i>N</i> -硫酸化二糖	0.00	0.00	0.00
<i>N</i> -乙酰化二糖	39.49	32.57	31.61
<i>N</i> -非取代二糖	60.51	67.43	68.39

以上结果表明,该方法适用于分析 *N*-非取代二糖存在较大差异的人工合成的肝素衍生物。

### 3 结论

本研究将 AMAC 标记与 RPLC-MS-IT-TOF MS 结合,为肝素/硫酸类肝素二糖分析提供了良好的分离和相对定量效果,能够在同一系统内分离和分析 12 种肝素/硫酸类肝素二糖,尤其适用于分析少量 *N*-非取代二糖。在肝素衍生物中,不同的 *N*-非取代二糖的含量明显不同。该方法可以定性、定量分析生物样品中含有的 *N*-非取代葡萄糖胺的二糖,为进一步研究 *N*-非取代葡萄糖胺的结构与功能提供了可行的检测方法,有助于更好地理解 *N*-非取代葡萄糖胺残基在人类健康与疾病管理中的重要作用。

### 参考文献:

[1] COUCHMAN J R. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? [J].

Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4(12): 926-937.

- [2] PERRIMON N, BERNFIELD M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes[J]. Nature, 2000, 404(6 779): 725-728.
- [3] HERING T M, BELLER J A, CALULOT C M, CENTERS A, SNOW D M. Proteoglycans of reactive rat cortical astrocyte cultures: abundance of *N*-unsubstituted glucosamine-enriched heparan sulfate[J]. Matrix Biology, 2015, 41: 8-18.
- [4] WADE A, ROBINSON A E, ENGLER J R, PETRITSCH C, JAMES C D, PHILLIPS J J. Proteoglycans and their roles in brain cancer[J]. Febs Journal, 2013, 280(10): 2 399-2 417.
- [5] KHURANA A, BELEFORD D, HE X P, CHIEN J, SHRIDHAR V. Role of heparan sulfatases in ovarian and breast cancer[J]. American Journal of Cancer Research, 2013, 3(1): 34-45.
- [6] BELTING M. Glycosaminoglycans in cancer treatment[J]. Thrombosis Research, 2014, 133 (Suppl 2): S95-S101.

- [7] KEISUKE K, TAKASHI K, HIROKO H, UEDA R, MASU M, KIMATA K, NAKATO H. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila*FGF signaling[J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 174(6): 773-778.
- [8] KREUGER J, SPILLMANN D, LI J P, LINDAHL U. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity[J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 174(3): 323-327.
- [9] POMIN V H, MULLOY B. Current structural biology of the heparin interactome[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 34: 17-25.
- [10] TSAI C T, ZULUETA M, HUNG S C. Synthetic heparin and heparan sulfate: probes in defining biological functions[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40: 152-159.
- [11] WEI Z, LYON M, GALLAGHER J T. Distinct substrate specificities of bacterial heparinases against *N*-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(16): 15 742.
- [12] ESKO J D, LINDAHL U. Molecular diversity of heparan sulfate[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, 108(2): 169-173.
- [13] ESKO J D, SELLECK S B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71(1): 435-471.
- [14] CASU B, LINDAHL U. Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate[J]. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*, 2001, 57: 159-206.
- [15] TOIDA T, YOSHIDA H, TOYODA H. Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 322 (2): 499-506.
- [16] WESTLING C, LINDAHL U. Location of *N*-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(51): 49 247-49 255.
- [17] REES M D, PATTISON D I, DAVIES M J. Oxidation of heparan sulphate by hypochlorite: role of *N*-chloro derivatives and dichloramine-dependent fragmentation[J]. *Biochemical Journal*, 2005, 391(1): 125-134.
- [18] SHI X, ZAIA J. Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(18): 11 806-11 814.
- [19] CHENG F, SVENSSON G, FRANSSON L A, MANI K. Non-conserved, *S*-nitrosylated cysteines in glypican-1 react with *N*-unsubstituted glucosamines in heparan sulfate and catalyze deaminative cleavage[J]. *Glycobiology*, 2012, 22 (11): 1 480.
- [20] SHUKLA D, LIU J, BLAIKLOCK P, SHWORAK N W, BAI X M, ESKO J D, COHEN G H, EISENBERG R J, ROSENBERG R D, SPEAR P G. A novel role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry[J]. *Cell*, 1999, 99(1): 13.
- [21] LIU J, SHRIVER Z, POPE R M, THORP S C, DUNCAN M B, COPELAND R J, RASKA C S, YOSHIDA K, EISENBERG R J, COHEN G, LINHARDT R J, SASISEKHARAN R. Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(36): 33 456-33 467.
- [22] LIU J, SHRIVER Z, BLAIKLOCK P, YOSHIDA K, SASISEKHARAN R, ROSENBERG R D. Heparan sulfate *D*-glucosaminyl 3-*O*-sulfo-transferase-3A sulfates *N*-unsubstituted glucosamine residues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(53): 38 155.
- [23] NADANAKA S, PURUNOMO E, TAKEDA N, TAMURA J, KITAGAWA H. Heparan sulfate containing unsubstituted glucosamine residues: biosynthesis and heparanase-inhibitory activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(22): 15 231-15 243.
- [24] WEI Z, DEAKIN J A, BLAUM B S, UHRIN D, GALLAGHER J T, LYON M. Preparation of heparin/heparan sulfate oligosaccharides with internal *N*-unsubstituted glucosamine residues for functional studies[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2011, 28(8/9): 525-535.
- [25] LIANG Q T, XIAO X M, LIN J H, WEI Z. A new sequencing approach for *N*-unsubstituted heparin/heparan sulfate oligosaccharides[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(7): 714.
- [26] LIANG Q T, JIA Y D, FU Q, WEI Z. Preparation and characterization of heparin hexasaccharide library with *N*-unsubstituted glucosamine

- residues[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2015, 32(8): 643-653.
- [27] HITCHCOCK A M, BOWMAN M J, STAPLES G O, ZAIA J. Improved workup for glycosaminoglycan disaccharide analysis using ce with lif detection[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(22): 4 538-4 548.
- [28] CHUANG W L, MCALLISTER H, RABENSTEIN L. Chromatographic methods for product-profile analysis and isolation of oligosaccharides produced by heparinase-catalyzed depolymerization of heparin[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 932(1): 65-74.
- [29] SHAO C, SHI X F, WHITE M, HUANG Y, HARTSHORN K, ZAIA J. Comparative glycomics of leukocyte glycosaminoglycans[J]. *Febs Journal*, 2013, 280(10): 2 447-2 461.
- [30] LI G Y, CAI C, LI L Y, FU L, CHANG Y Q, ZHANG F M, TOIDA T, XUE C H, LINHARDT R J. A new method to detect contaminants in heparin using radical depolymerization and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 326-330.
- [31] GILL V L, AICH U, RAO S, POHL C, ZAIA J. Disaccharide analysis of glycosaminoglycans using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(2): 1 138-1 145.
- [32] HIGASHI K, OKAMOTO Y, MUKUNO A, WAKAI J, HOSOYAMA S, LINHARDT R J, TOIDA T. Functional chondroitin sulfate from *Enterococcus faecalis* containing a 3-O-sulfo glucuronic acid residue[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 134: 557-565.
- [33] YANG B, WEYERS A, BAIK J Y, STERNER E, SHARFSTEIN S, MOUSAD S A, ZHANG F M, DORDICK J S, LINHARDT R J. Ultra-performance ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for heparin disaccharide analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 415(1): 59-66.
- [34] DU J Y, CHEN L R, LIU S, LIN J H, LIANG Q T, LYON M, WEI Z. Ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for the structural analysis of N-unsubstituted heparin/heparan sulfate[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1 028: 71-76.
- [35] YANG B, CHANG Y, WEYERS A M, STERNER E, LINHARDT R J. Disaccharide analysis of glycosaminoglycan mixtures by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1 225(1): 91-98.
- [36] WANG Z J, LI D Y, SUN X J, BAI X, JIN L, CHI L L. Liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry for compositional analysis of low molecular weight heparins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 451(1): 35-41.
- [37] GALEOTTI F, VOLPI N. Online reverse phase-high-performance liquid chromatography-fluorescence detection-electrospray ionization-mass spectrometry separation and characterization of heparan sulfate, heparin, and low-molecular weight-heparin disaccharides derivatized with 2-Amin [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(17): 6 770.
- [38] ANTIA I U, YAGNIK D R, MUNOZ L P, SHAH A J, HILLS F A. Heparan sulfate disaccharide measurement from biological samples using pre-column derivatization, UPLC-MS and single ion monitoring[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 530: 17-30.
- [39] 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.