

# 肝素/硫酸乙酰肝素四糖同分异构体的制备与表征

杜佳燕<sup>1</sup>, 苏晓明<sup>2</sup>, 梁群焘<sup>3</sup>, 邹强<sup>4</sup>, 魏峥<sup>1</sup>

(1. 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;

2. 福州大学化学学院, 福建 福州 350002; 3. 福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350108;

4. 泉州出入境检验检疫局综合技术服务中心, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 肝素/硫酸乙酰肝素(Hep/HS)寡糖结构多样,且与生物学、病理学功能息息相关,表征这些结构对解析它们的功能具有重要意义。本实验以市售猪肠肝素钠为原料,制备了9种肝素四糖,并用二糖组分分析方法结合反相离子对试剂色谱-串联离子阱飞行时间质谱(IPRP-LC/IT-TOF MS)进行结构解析。结果表明:9种肝素四糖中有两组同分异构体,且含己胺离子对试剂的RP-LC/MS能够成功分离肝素寡糖及其同分异构体;采用LC-MS/MS方法可以鉴定其中一组同分异构体的结构。该方法可为HS/Hep寡糖的研究提供标准品,并为解析HS/Hep同分异构体结构提供一种简单有效的方法,进而为更好地理解生物体内HS/Hep结构和生理生化功能的关系提供帮助。

**关键词:** 肝素/硫酸类肝素;四糖;同分异构体;液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)

**中图分类号:** O657.63

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1004-2997(2020)01-0028-11

**doi:** 10.7538/zpxb.2018.0168

## Preparation and Characterization of Heparin/Heparan Sulfate Tetrasaccharide Isomers

DU Jia-yan<sup>1</sup>, SU Xiao-ming<sup>2</sup>, LIANG Qun-tao<sup>3</sup>, ZOU Qiang<sup>4</sup>, WEI Zheng<sup>1</sup>

(1. *Institute of Glycobiology, National Engineering Research Centre of Chemical Fertilizer Catalyst, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;*

2. *College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;*

3. *College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;*

4. *Comprehensive Technical Service Center of Quanzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Quanzhou 362000, China)*

**Abstract:** Heparin (Hep) and heparan sulfate (HS) are complex, sulfated GAGs consist of repeating disaccharide units each composed of a uronic acid, either glucuronate or

收稿日期:2018-12-25;修回日期:2019-03-05

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,生物催化专业。E-mail: 251629322@qq.com

通信作者:梁群焘(1981—),男(汉族),福建龙岩人,讲师,从事糖生物化学研究。E-mail: qtliaang@outlook.com

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:2019-07-13;网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20190711.1039.016.html>

iduronate [the latter sometimes sulfated at C-2, *i. e.* IdoA2S], and a derivative of glucosamine [either *N*-acetylglucosamine, *N*-sulfated glucosamine, or unsubstituted glucosamine] that can be variably *O*-sulfated. Hep/HS has important biological functions in developmental processes, angiogenesis, blood coagulation, cell adhesion, and tumour metastasis. These involve interactions with a wide variety of proteins, *i. e.* enzymes, cytokines, growth factors and extracellular matrix proteins through their specific sequences, patterns or densities of sulfation. Mass spectroscopy is now becoming a much more useful tool for the structural analysis of Hep/HS oligosaccharides because of its high detection sensitivity and molecular specificity. MS/MS of heparin/HS oligosaccharides can produce information-rich glycosidic and cross-ring product ions which can be used to determine the sites of acetylation or sulfation. In particular, LC-MS clearly has the potential now to sequence most oligosaccharides, especially with the recent development of a computational framework for dealing with the complex data generated. In this study, porcine intestines heparin was digested by heparinase I. The obtained crude tetrasaccharides (dp4s) were separated and further purified by strong anion-exchange HPLC and size-exclusion HPLC. The structures of dp4s were then investigated by the combination of disaccharide analysis, reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization ion trap/time-of-flight mass spectrometry (RP-LC/ESI-IT/TOF MS) and a computational simulation method. The results showed that nine tetrasaccharides (dp4s) were obtained, in which two series of dp4s isomer were existed. The dp4 isomers were successfully separated using IPRP-LC/MS system with hexylamine. One series of dp4s contains  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS and  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S) disaccharides, and other ones possess  $\Delta$ HexA-GlcNS(6S) and  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S). Because MS<sup>n</sup> analysis could produce abundant structurally useful fragments, the former dp4 isomers were selected to investigate fragmentation patterns for the further potential structure analysis by MS. MS<sup>2</sup> analysis indicated that one dp4 was  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS-HexA(2S)-GlcNS(6S) which had one glycosidic cleavage Y<sub>1</sub>, two cross-ring cleavages <sup>0,2</sup>A<sub>2</sub> and <sup>0,3</sup>A<sub>2</sub> in the first glucosamine residues (from the non-reducing end) of oligosaccharide. In contrast, the other dp4 was  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S)-HexA(2S)-GlcNS which contained two glycosidic cleavages B<sub>2</sub> and Y<sub>1</sub>, two cross-ring cleavages <sup>1,4</sup>A<sub>2</sub> and <sup>0,3</sup>A<sub>2</sub> in the first glucosamine residues, and a cross-ring cleavages <sup>1,5</sup>X<sub>4</sub> in the first glucuronic acid residues of the oligosaccharide. This study provides a simple and efficient method for identifying the sequences of the Hep/HS oligosaccharide isomers, which might lead to a greater understanding of the biological roles of Hep/HS oligosaccharides in organisms.

**Key words:** heparin/heparan sulfate; tetrasacchrides; isomers; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

肝素(Hep)和硫酸乙酰肝素(HS)是糖胺聚糖家族中一类复杂的高度硫酸化粘多糖。研究发现,Hep/HS利用自身的结构特异性和序列,可与许多活性蛋白质相互作用,调控许多重要的生物功能,如细胞粘附<sup>[1-2]</sup>、细胞生长和增

殖<sup>[3-4]</sup>、抗凝<sup>[5-6]</sup>、炎症<sup>[7]</sup>、神经发育和再生<sup>[8]</sup>等。它们的生物学意义使 Hep/HS 成为新型药物(如抗肿瘤抗病毒药物等)开发的重要靶标。

肝素是由己糖醛酸(HexA)和 *D*-葡糖胺(GlcN)残基重复的二糖单元,通过 1-4 糖苷键

连接在一起形成具有一系列链长(多分散性)的线性多糖链<sup>[9]</sup>。己糖醛酸可以是 *D*-葡萄糖醛酸或 *L*-艾杜糖醛酸,而葡萄糖胺可以是 *N*-乙酰化或 *N*-磺酸化。肝素的分子质量在 3~40 kDa 之间,平均分子质量为 15 kDa(一条链大约有 45 个单糖)<sup>[10]</sup>。已知 HS 种类在其二糖组成方面比高度硫酸化的肝素在结构上更不均匀。对 HS 链组织的详细分析表明,各种二糖成分不是随机分布的,其链中含有 3 种不同硫酸化程度的区域,即高硫酸化区域(S-domain)、低硫酸化区域(NA/NS domain)和无硫区域(NA domain)<sup>[11-12]</sup>。NA 结构域主要是由未修饰的片段,即  $\Delta\text{UA-GlcNAc}$  二糖组成;而 S-结构域是高度硫酸化区域,主要由  $\Delta\text{UA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$  和  $\Delta\text{UA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  二糖组成;NA/NS 结构域主要是 S-和 NA-结构域之间的过渡结构域<sup>[13]</sup>,即存在 *N*-乙酰化和 *N*-硫酸化二糖的交替。S-和 NA/NS-结构域中硫酸化模式的变化决定了其与多种蛋白质相互作用的特异性,这些蛋白质影响着多种重要的生物学功能<sup>[12]</sup>。

肝素酶解法和化学裂解法已被用来分析肝素的结构,通过降解肝素长链为二糖或寡糖,随后采用专门的分析仪器和技术进行分析<sup>[14-15]</sup>,但该方法仅提供二糖组分信息。限制结构表征的障碍主要归因于 Hep/HS 的化学异质性和结构复杂性。核磁共振(NMR)波谱法是 Hep/HS 结构解析的最有效工具之一<sup>[16-18]</sup>,它可以提供单糖组成,糖苷键和硫酸化模式等有价值的结构信息,但需要大量且纯度高的样品,达不到微量分析的要求。质谱法具有检测灵敏度高,能够准确测定物质的分子质量等优点,现已成为分析 Hep/HS 寡糖结构的有力工具<sup>[19-20]</sup>。与其他检测分析和鉴定 Hep/HS 寡糖技术相比,质谱法具有样品用量低(皮摩尔)、分析时间短(几分钟)等优点。随着电喷雾电离(ESI)<sup>[14]</sup>和基质辅助激光解吸/电离(MALDI)<sup>[14]</sup>等软电离方法的发展,MS 已越来越多地应用于 Hep/HS 寡糖的表征。强阴离子交换色谱(SAX-HPLC)分离机制是基于电荷密度差异<sup>[21-22]</sup>,是分离 Hep/HS 寡糖的理想选择,但由于使用高浓度非挥发性物质作为流动相,SAX-HPLC 难以直接串联 MS。其他适用于在线 ESI-MS 分析的色谱技术包括尺寸排阻色

谱(SEC)<sup>[23]</sup>、亲水作用色谱(HILIC)<sup>[24]</sup>和离子对反相色谱(IPRP)<sup>[25-28]</sup>。

离子对反相色谱(IPRP-LC)与 MS 联用是分析 Hep/HS 寡糖很有应用前景的技术。在传统反相色谱柱上(例如 C18),流动相中加入具有疏水烷基链的胺类离子对试剂,IPRP-LC 能根据 Hep/HS 寡糖的大小、硫酸化含量和寡糖异构化程度<sup>[25-26,29-30]</sup>对其进行分离检测。

多级质谱( $\text{MS}^n$ )分析 Hep/HS 能获得丰富的糖苷键断裂以及环内裂解的碎片信息,通过这些信息可推断寡糖的二糖序列组成<sup>[31]</sup>,也可用来确定硫酸化和乙酰化的作用位点,并依此判断寡糖的一级序列结构<sup>[32]</sup>。目前已有报道根据离子碎片信息,初步探讨 12 种 HS 二糖<sup>[33]</sup>以及含 *N*-非取代葡萄糖胺残基( $\text{GlcNH}_3^+$ )肝素四糖<sup>[34]</sup>和六糖<sup>[35]</sup>的 MS/MS 裂解规律。近年来,特别是运用计算机算法处理复杂质谱数据以来<sup>[36-37]</sup>,LC-MS/MS 对 Hep/HS 寡糖测序成为可能。LC-MS/MS 也可结合化学修饰方法对复杂 HS 四糖同分异构体进行结构系列测定<sup>[38]</sup>。

本实验拟以市售肝素钠为原料,制备 9 种肝素四糖,并用二糖组分分析法和高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法(LC/IT-TOF MS)对其结构进行分析,并利用多级质谱法确定肝素四糖同分异构体的结构序列。希望能为 HS/Hep 寡糖的研究提供标准品,为解析 HS/Hep 同分异构体结构提供一种简单有效的方法,进而为更好地理解生物体内 HS/Hep 结构和生理生化功能的关系提供帮助。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

色谱柱:ProPac<sup>®</sup> PA-1(分析柱 4.0 mm×250 mm,保护柱 4.0 mm×50 mm);ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 柱(2.1 mm×150 mm×1.7  $\mu\text{m}$ )。

LC/IT-TOF MS:日本岛津公司产品,配有二元泵(LC-20AD)、脱气装置(DGU-20A3)、自动进样系统(SIL-20AC)、光敏二极管阵列(PDA)、检测器( SPD-M20A)、基本通信模块(CBM-20A)和柱温箱(CTO-20AC);1200 型高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司产品;Milli-Q

synthesis 超纯水机:美国 Millipore 公司产品; BT224S 型电子分析天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司产品;DK-S24 型电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品;CT02-50SR 恒温真空冷冻浓缩仪、ALPHA 1-4 Ld-plus 真空冷冻干燥机:德国 Christ 公司产品;3K15 型台式离心机:德国 Sigma 公司产品;SHZ-D 循环水式真空泵:巩义市予华仪器产品;SG-5400A 磁力搅拌器:上海硕光电子产品;PB-10 pH 计:德国 Sartorius 公司产品。

## 1.2 主要材料与试剂

肝素钠:国药集团化学试剂有限公司产品;12 种硫酸类肝素二糖标样:英国 Iduron 公司产品;聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel P-10 (fine grade):英国 Bio-Rad 公司产品;碳酸氢铵(分析纯)、肝素酶 I、肝素酶 II、肝素酶 III (10 UN from *Flavobacterium heparinum*):均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品;0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜:天津市津腾实验设备有限公司产品;MWCO 500 透析膜:上海索莱宝生物技术有限公司产品;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、氯化钙、醋酸钠、醋酸钙和醋酸、甲酸铵和氯化钠:均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品;无水乙醇(分析纯):上海三鹰化学试剂有限公司产品;36%(HCl 分析纯):汕头市西陇化工厂产品;96%牛血清蛋白:上海 Aladdin 生化科技股份有限公司产品;乙腈、己胺、甲酸胺:均为分析纯,上海三鹰化学试剂有限公司产品。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 肝素四糖的制备与纯化** 肝素四糖(dp4)的制备参考文献[39],主要由 3 个步骤组成:1) 利用肝素酶 I 酶解肝素钠(Hep),并用 Bio-Gel P-10 分离 Hep 酶解产物,收集肝素 dp4 对应的洗脱峰,获得 dp4 混合物;2) 用强阴离子交换高效液相色谱(SAX-HPLC)分析分离 dp4 混合物,并收集各个 dp4 对应的色谱峰,将收集到的肝素 dp4 装入截留分子质量为 500 Da 的透析膜于超纯水中透析 3 天,冷冻干燥得到肝素 dp4 样品;3) 用尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)进一步分析纯化肝素 dp4 样品,分别收集 dp4 对应的色谱峰,于 55  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中放置 72 h 挥发  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,获得各肝素 dp4 纯样。

**1.3.2 SAX-HPLC 分析** 强阴离子分析柱

ProPac PA-1(4.0 mm $\times$ 250 mm);流动相 A 为超纯水(用 HCl 调至 pH 3.5),流动相 B 为 2 mol/L NaCl(用 HCl 调至 pH 3.5);线性梯度洗脱:2.1~7.1 min(0~0.8 mol/L NaCl),7.1~47.1 min(0.8~1.5 mol/L NaCl);流速 1 mL/min;柱温为室温;UV 232 nm 检测。

**1.3.3 SEC-HPLC 分析** Superdex<sup>TM</sup> Peptide 10/300 GL 尺寸排阻色谱柱;流动相为 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ;流速 0.4 mL/min;柱温为室温;UV 232 nm 检测。

**1.3.4 肝素四糖的二糖组分分析** 取 5  $\mu\text{g}$  肝素 dp4 纯品,分别加入 1 mIU 肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III,于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 24 h,完全酶解。反应体系为 50  $\mu\text{L}$  醋酸钠缓冲液(0.1 mol/L 醋酸钠、0.1 mmol/L 醋酸钙和 100 mg/L 牛血清蛋白,pH 7.0),100  $^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min 终止反应,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。酶解产物用反相离子对试剂(IPRP) LC/IT-TOF MS 分析,通过比对检测图谱和标样二糖图谱确定二糖组分。根据它们对应的经过校正的提取离子流(EIC)峰面积比较计算各二糖组分的相对百分含量,具体方法参考文献[40]。简单地说,IPRP-LC/MS 分析硫酸类肝素标样二糖,比较对应的 EIC 峰面积,计算得到每个标样二糖的校正因子。计算实际样品的二糖组分相对百分含量时,二糖 EIC 峰面积要先乘以对应的校正因子,以忽略质谱离子化效率和硫酸根丢失造成的系统误差。

**1.3.5 LC/IT-TOF MS 分析** 色谱条件:ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm $\times$ 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相:A 为 Milli-Q 水,B 为 80%乙腈,均含有 30 mmol/L 己胺,用甲酸调至 pH 8.86;流速 0.1 mL/min;上样量 10  $\mu\text{L}$ ;柱温 45  $^{\circ}\text{C}$ ;检测器为光电二极管阵列;检测波长 190~800 nm。二糖线性梯度洗脱条件:0~30.0 min(2%~15%B),30.0~50.0 min(15%~25%B),50.0~60.0 min(25%~65%B),60.0~70.0 min(65%B);四糖线性梯度洗脱条件:0.1~2.1 min(2%~30%B),2.1~60 min(30%~45%B),60~63 min(45%~100%B),63~70 min(100%B)。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),负离子模式;质量扫描范围  $m/z$  200~1 500;喷雾

气体为氮气,流速 1.5 L/min;曲形脱溶剂管(curved desolvation line, CDL)和加热模块(Heat Block)温度设置为 100 °C;锥孔电压设置为一 3.5 kV;检测电压 1.68 kV;IT 和 TOF 真空范围分别为  $1.9 \times 10^{-2}$  Pa 和  $1.6 \times 10^{-4}$  Pa。

**1.3.6 肝素四糖 LC-MS/MS 条件** 色谱条件:流动相 A 为 Milli-Q 水, B 为乙腈;洗脱程序:0.1~3.0 min(2% B), 3.0~14 min(2%~100% B), 14~22 min(100% B)。其他色谱条件同 1.3.5 节。

MS/MS 条件:设置质谱系统自动选择强度高于  $10^5$  的产物离子作为 MS<sup>2</sup> 分析的母离子;CDL 和 Heat Block 温度设置为 200 °C;碰撞气体为氩气;碰撞诱导解离(CID)的碰撞能量设置为 50%,离子累积时间设为 100 ms;其他质谱参数同 1.3.5 节。手动匹配解析二级谱图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肝素四糖的分析

肝素钠是广泛使用的抗凝血药,经过肝素酶 I 酶解后,在己糖醛酸非还原端 C4 和 C5 位置会生成 1 个不饱和双键。以 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  为流动相, Bio Gel P-10 可以把不同聚合度的肝素寡糖分开,得到的肝素四糖(dp4)用 ProPac 柱和 SAX-HPLC 方法进一步分离纯化,其色谱图示于图 1。结果表明, dp4 有 3 个主峰和 6 个小峰,分别命名为 dp4A、dp4B、dp4C 和 dp4-1、dp4-2、dp4-3、dp4-4、dp4-5、dp4-6。SAX-HPLC 分析方法表明:通常样品带的电荷越多,在 ProPac 柱上的保留时间越长<sup>[35]</sup>。dp4C 具有最长的保留时间,表明其可能含有最多的亚硫酸基团。

二糖组分分析表明, dp4C 只含有  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$ , 表明 dp4C 含有 2 个高硫的二糖, 其结构为  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})\text{-HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$ 。其他 dp4s 二糖组分分析同样使用肝素酶 I、肝素酶 II 和肝素酶 III 完全酶解, 酶解产物用 LC/IT-TOF MS 分析, 根据相对应的 EIC 面积计算它们的相对百分含量。dp4A 和 dp4B 的酶解产物 LC/MS 的 EIC 图示于图 2。可以看出, dp4A 和 dp4B 都含有二糖  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$ , 出峰时间为

63.2 min。不同的是, dp4A 含有  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$ (出峰时间 54.1 min), 而 dp4B 含有  $\Delta\text{HexA}\text{-GlcNS}(6\text{S})$ (出峰时间 53.5 min), 它们的二糖组成相对百分含量列于表 1。从二糖组分结果可以看出, dp4-4 和 dp4A 的主要组成一样, 是由  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$  和  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  组成, 且二糖的相对百分含量相似, 大约为 40%~50%, 但在 SAX-HPLC 中的洗脱时间不一致, 说明它们是同分异构体。

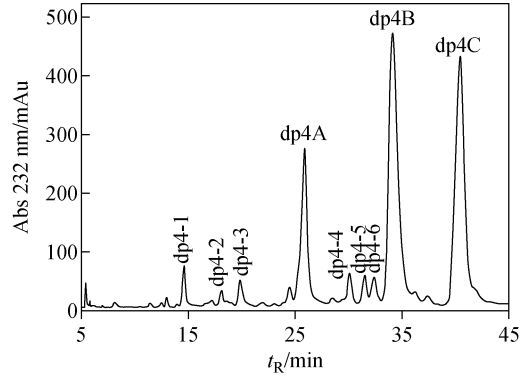


图 1 经 Bio Gel P-10 分离后的肝素四糖 SAX-HPLC 的分离色谱图

Fig. 1 Separation chromatography of heparin dp4 fraction obtained from Bio Gel P-10 by SAX-HPLC

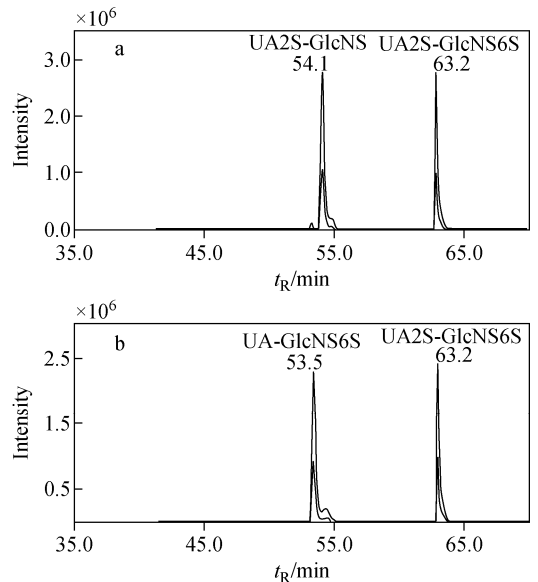


图 2 dp4A(a) 和 dp4B(b) 的 LC/MS-IT-TOF 提取离子流图

Fig. 2 LC/MS-IT-TOF extracted ion chromatograms of dp4A (a) and dp4B (b)

表 1 肝素 dp4 寡糖的二糖组成

Table 1 Disaccharide compositions of heparin dp4s oligosaccharides

二糖结构 Disaccharide structures	二糖含量 Disaccharide composition/%								
	dp4-1	dp4-2	dp4-3	dp4A	dp4-4	dp4-5	dp4-6	dp4B	dp4C
$\Delta$ HexA-GlcNS(6S)	27.6	46.2	42.5	2.6	4.0	59.2	56.5	58.1	0
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNS	62.6	28.0	31.2	52.7	53.1	4.4	5.0	4.6	0
$\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S)	9.8	25.8	26.3	44.7	42.9	36.4	38.5	37.3	100

同样, dp4-5、dp4-6 和 dp4B 也是同分异构体, 主要由  $\Delta$ HexA-GlcNS(6S) 和  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S) 组成。dp4-1、dp4-2 和 dp4-3 的二糖组分分析结果表明, 它们含有  $\Delta$ HexA-GlcNS(6S)、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS 和  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S), 二糖相对百分含量从约 10% 到 60% 不等。为进一步分析确定它们的结构组成, 将其用 SEC-HPLC 分析纯化后进行 IPRP-LC/IT-TOF MS 分析。

## 2.2 IPRP-LC/IT-TOF MS 分析

IPRP-LC/MS 法可以有效地分析分离肝素寡糖。Catalin 等<sup>[41]</sup> 运用线性 and 支链脂肪族胺, 包括戊胺、己胺、三丁胺等准确地测量了肝素寡糖的分子质量。本课题组用己胺离子对试剂, 采用 IPRP-LC/MS 法成功地分离了 12 个硫酸类肝素标样二糖, 并对牛肾、猪动脉和人类血清的 HS 二糖组分进行定量分析<sup>[40]</sup>。本实验借助于 30 mmol/L 己胺和 BEH C18 反向柱, 采用 IPRP-LC/MS 法分别对 SAX-HPLC 分离收集的 3 个主峰(dp4A、dp4B 和 dp4C) 和 6 个小峰(dp4-1、dp4-2、dp4-3、dp4-4、dp4-5、dp4-6) 做进一步结构分析。结果表明, 它们都带 2 个负电荷且  $m/z$  数值相近, 均检测到系列亚硫酸基团的丢失。代表性的 dp4-1、dp4-3、dp4-5 和 dp4-6 总离子流图示于图 3。

dp4-1 的 TIC 图示于图 3a, 图中有 1 个主要的峰(保留时间 20.6 min) 和 2 个小峰(保留时间 20.2、23.8 min)。主峰对应的质谱图示于图 4a, 其中  $m/z$  535.985 为含 5 个亚硫酸根的肝素 dp4(dp4 + 5S) 分子离子  $[M-2H]^{2-}$  (理论值  $m/z$  535.986);  $m/z$  586.541 为 dp4 + 5S 加合 1 个己胺的分子离子  $[M+C_6H_{15}N-2H]^{2-}$  (理论值  $m/z$  586.543); 还检测到了 dp4 + 5S 丢失硫酸根分子离子峰, 即  $m/z$  496.009  $[M-SO_3-2H]^{2-}$ 、 $m/z$  456.028

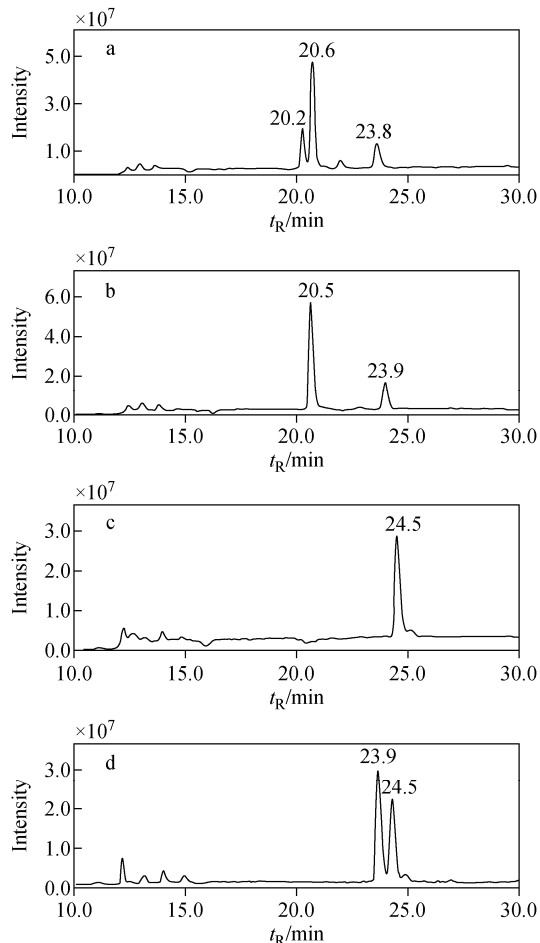


图 3 dp4-1(a)、dp4-3(b)、dp4-5(c) 和 dp4-6(d) 的 LC/MS-IT-TOF 总离子流图

Fig. 3 LC/MS-IT-TOF total ion chromatograms of dp4-1 (a), dp4-3 (b), dp4-5 (c) and dp4-6 (d)

$[M-2SO_3-2H]^{2-}$  和  $m/z$  416.050  $[M-3SO_3-2H]^{2-}$ 。另外,  $m/z$  555.460 ( $z=2$ ) 和同时含 1 个乙酰基、5 个亚硫酸基团的肝素四糖(dp4 + Ac + 5S) 的理论值相近, 即  $m/z$  556.091 ( $z=2$ )。以上分析表明, dp4-1 主要是由 5 个亚硫酸根的肝素 dp4(dp4 + 5S) 组成, 结构示于图 4b。保留时间 20.2 min 小峰检测到

的分子离子峰与保留时间 20.6 min 的一致,说明 dp4-1 里可能含有 dp4+5S 的同分异构体。另外,保留时间 23.8 min 小峰检测到的分子离子峰  $m/z$  583.944、544.988、505.012(图 5)分别与肝素六糖含 2 个亚硫酸根(dp6+2S)、含 1 个亚硫酸根(dp6+S)和不含亚硫酸根(dp6)的理论值一致,结果列于表 2; $m/z$  595.549( $z=2$ )为

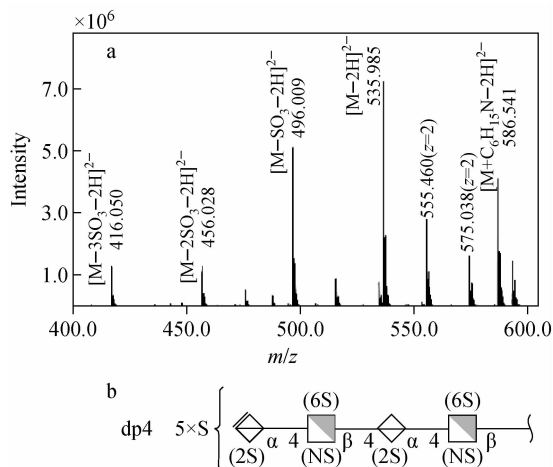


图 4 图 3a 20.6 min 峰对应的质谱图(a)和含有 5 个亚硫酸根肝素四糖的结构图(b)

Fig. 4 MS spectrum of dp4-1 in total ion chromatograms peak labeled with 20.6 min in Fig. 3a (a) and the structure of heparin tetrasaccharide with five sulfate groups (b)

dp6+S 加合 1 个己胺的分子离子 $[M+C_6H_{15}N-2H]^{2-}$ (理论值  $m/z$  595.552);另外  $m/z$  565.967 ( $z=2$ )与同时含 1 个乙酰基、1 个亚硫酸基团的肝素六糖(dp6+Ac+S)的理论值  $m/z$  565.628 ( $z=2$ )相似; $m/z$  604.780( $z=2$ )与 dp6+Ac+2S 的理论值  $m/z$  605.606 2( $z=2$ )相近。表明 dp4-1 里混有少量肝素 dp6,可能是 Bio Gel P-10 分离收集肝素 dp4s 时混入了少量的 dp6s。

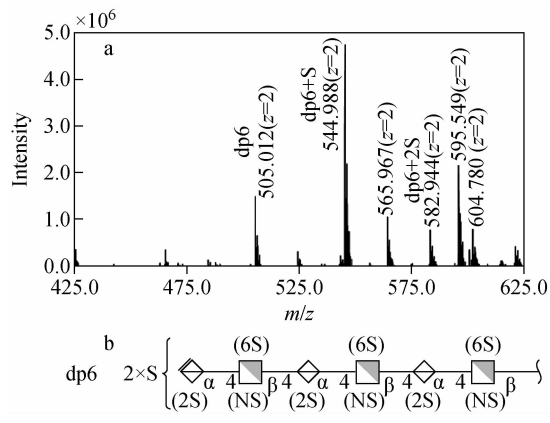


图 5 图 3a 23.8 min 峰对应的质谱图(a)和含有 2 个亚硫酸根肝素六糖的结构(b)

Fig. 5 MS spectrum of dp4-1 in total ion chromatograms peak labeled with 23.8 min in Fig. 3a (a) and the structure of heparin hexasaccharide with two sulfate groups (b)

表 2 肝素 dp4-1 图谱中出现的主要分子离子峰

Table 2 Major molecular ions that appeared in the MS spectrum of dp4-1

肝素寡糖 Heparin oligosaccharides	分子式 Molecular formula	检测到的离子 Major ions observed	理论值 Calculated value( $m/z$ )	检测值 Observed value( $m/z$ )	相对误差 Error
dp4	$C_{24}H_{38}N_2O_{35}S_5$	$[M-3SO_3-2H]^{2-}$	416.036	416.050	-0.014
		$[M-2SO_3-2H]^{2-}$	456.028	456.028	0.000
		$[M-SO_3-2H]^{2-}$	496.007	496.009	-0.002
		$[M-2H]^{2-}$	535.986	535.985	0.001
dp6	$C_{36}H_{57}N_3O_{30}$	$[M+C_6H_{15}N-2H]^{2-}$	586.543	586.541	0.002
		$[M-2H]^{2-}$	504.644	505.012	-0.368
		$[M-2H]^{2-}$	544.623	544.988	-0.365
		$[M+C_6H_{15}N-2H]^{2-}$	595.552	595.549	0.003
	$C_{36}H_{57}N_3O_{36}S_2$	$[M-2H]^{2-}$	584.601	583.944	0.657

dp4-3 的 TIC 图示于图 3b, 有 2 个峰。主峰(保留时间 20.5 min)和 dp4-1(保留时间 20.6 min)检测到的分子离子峰一致, 表明 dp4-3 主要是由 5 个亚硫酸根的肝素 dp4(dp4+5S)组成。小峰(保留时间 23.9 min)的质谱数据与 dp4-1(保留时间 23.8 min)一致, 表明 dp4-3 里也混有少量 dp6s。

dp4-5 的 TIC 有 1 个主峰(保留时间 24.5 min), 示于图 3c。dp4-4、dp4A 和 dp4B 的 TIC 图与 dp4-5 相似, 都有 1 个主峰, 且出峰时间相似。而 dp4-6 有明显的 2 个峰, 保留时间为 23.9、24.5 min, 示于图 3d。它们检测到的离子峰都与肝素 dp4+5S 的理论值一致, 并且没有检测到 dp6 的分子离子峰, 表明 dp4-4、dp4-5、dp4-6、dp4A 和 dp4B 主要是由含 5 个亚硫酸根的肝素 dp4(dp4+5S)组成; dp4-6 组分本身可能含有 2 个 dp4+5S 同分异构体。这些与二糖组分的分析结果一致, 即 dp4-4 和 dp4A 都含有 5 个亚硫酸根, 互为同分异构体, 主要由  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$  和  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  组成; dp4-5、dp4-6 和 dp4B 互为同分异构体, 主要由  $\Delta\text{HexA}\text{-GlcNS}(6\text{S})$  和  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  组成。为进一步解析这些同分异构体的结构, 继续用 MS/MS 方法分析这些样品。

### 2.3 MS/MS 分析肝素四糖同分异构体

采用串联质谱法分析 Hep/HS 的结构, 能提供丰富的糖苷键断裂以及环内裂解的碎片信息, 这些信息可以确定硫酸化和乙酰化的作用位点<sup>[32]</sup>, 确定区分同分异构体<sup>[38]</sup>。本实验采用 MS/MS 法分析同分异构体 dp4A 和 dp4-4。MS/MS 产物离子的表述采用 Domon 和 Costello 命名规则<sup>[42]</sup>。

二糖组分和 LC/MS 分析表明, dp4A 和 dp4-4 是由  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}$  和  $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\text{-GlcNS}(6\text{S})$  组成的同分异构体。采用 LC-MS/MS 法分析相同浓度的 dp4A 和 dp4-4, 进样量 10  $\mu\text{L}$ (约 1.30  $\mu\text{g}$ ), 自动选择离子峰强度大于  $10^5$  的产物离子为母离子做 MS/MS 分析, 比较 CID 碰撞能量为 50% 和 80% 的结果。结果表明, 不同母离子 CID 50% 和 80% 产生的碎片离子数目不同, 但检测到的离子  $m/z$  数值和带电情况相似。

dp4A 和 dp4-4 代表性的母离子  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$  ( $m/z$  356.995, 理论值  $m/z$  356.991) 在整个分析时间段的 MS/MS 结果分别示于图 6、图 7, 均检测到了糖苷键断裂产生的碎片离子  $[\text{Y}_1\text{-H}]^-$ , 即 dp4A 的  $m/z$  337.045 (理论值  $m/z$  336.985) (图 6a) 和 dp4-4 的  $m/z$

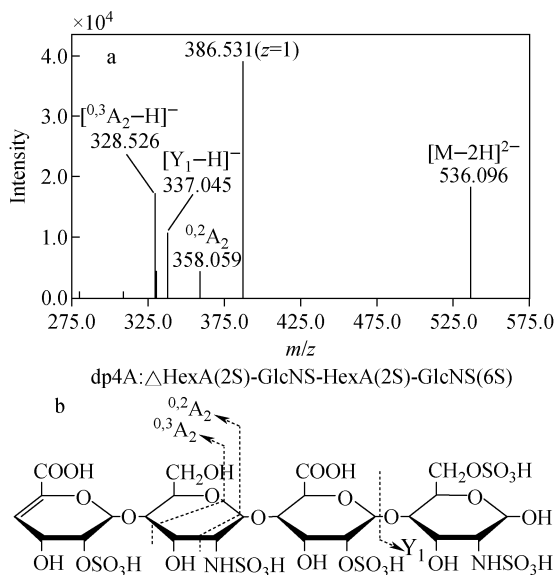


图 6 dp4A 的 MS/MS 图(a)及结构(b)

Fig. 6 MS/MS spectrum (a) and structure (b) of dp4A

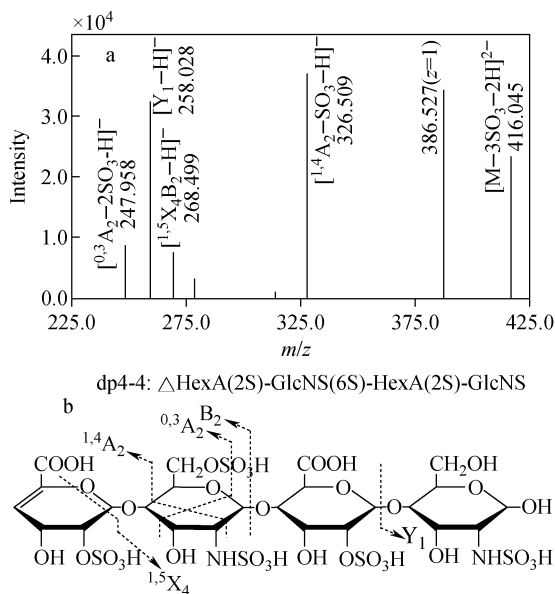


图 7 dp4-4 的 MS/MS 图(a)及结构(b)

Fig. 7 MS/MS spectrum (a) and structure (b) of dp4-4

258.028(理论值  $m/z$  258.036)(图 7a)。同时检测到了环内裂解生成的碎片离子: dp4A 的  $m/z$  328.526 与碎片离子  $[^{0.3}A_2 - H]^-$  (理论值  $m/z$  328.042) 对应,  $m/z$  358.059 与碎片  $^{0.2}A_2$  (理论值  $m/z$  358.276) 对应; 同样, dp4-4 的  $m/z$  247.958、268.499、326.509 分别对应碎片  $[^{0.3}A_2 - 2SO_3 - H]^-$  (理论值  $m/z$  248.053)、 $[^{1.5}X_4B_2 - H]^-$  (理论值  $m/z$  268.021)、 $[^{1.4}A_2 - SO_3 - H]^-$  (理论值  $m/z$  326.026)。

综上所述,通过 MS/MS 碎片离子可以判断同分异构体 dp4A 和 dp4-4 的结构序列分别为  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS-HexA(2S)-GlcNS(6S) 和  $\Delta$ HexA(2S)-GlcNS(6S)-HexA(2S)-GlcNS, 示于图 6b、图 7b。

### 3 结论

以市售猪肠肝素钠为原料,制备系列 HS/Hep 四糖同分异构体,并用二糖组分分析方法结合多级质谱成功地鉴定了其中一组 HS/Hep 四糖同分异构体的结构序列。该结果对今后 HS/Hep 寡糖的研究具有重要意义,可为解析 HS/Hep 同分异构体的结构提供一种简单有效的方法,进而为更好地理解生物体内 HS/Hep 结构和生理生化功能的关系提供帮助。另外,IPRP-LC/IT-TOF MS 对系列 HS/Hep 四糖同分异构体分析检测结果表明,含己胺离子对试剂的 RP-LC/MS 能够成功地分离肝素寡糖及其同分异构体,这可为分离检测复杂的 HS/Hep 寡糖同分异构体提供帮助。

### 参考文献:

[1] LINDAHL U, LIDHOLT K, SPILLMANN D, KJELLÉN L. More to "heparin" than anticoagulation[J]. *Thromb Res*, 1994, 75(1): 1-32.

[2] GALLAGHER J T. Heparan sulphate: a heparin in miniature[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, (207): 347-360.

[3] CASTELLOT J J, Jr HOOVER R L, HARPER P A, KARNOVSKY M J. Heparin and glomerular epithelial cell-secreted heparin-like species inhibit mesangial-cell proliferation[J]. *Am J Pathol*, 1985, 120(3): 427-435.

[4] PERRIMON N, BERNFIELD M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental

processes[J]. *Nature*, 2000, 404(6 779): 725-728.

- [5] MARCUM J, McKENNEY J, GALLI S, JACKMAN R, ROSENBERG R. Anticoagulant-like active heparin-like molecules from mast cell-deficient mice[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1986, 250(5): H879-H888.
- [6] ODUAH E I, LINHARDT R J, SHARFSTEIN S T. Heparin: past, present, and future[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2016, 9(3): 38-39.
- [7] YOUNG E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds[J]. *Thrombosis Research*, 2008, 122(6): 743-752.
- [8] JOUNG Y K, JIN W B, PARK K D. Controlled release of heparin-binding growth factors using heparin-containing particulate systems for tissue regeneration[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2008, 5(11): 1 173-1 184.
- [9] RABENSTEIN D L. Heparin and heparan sulfate: structure and function[J]. *Cheminform*, 2002, 19(3): 312-331.
- [10] LANE D A, ULF L. Heparin: chemical and biological properties, clinical applications[J]. *Thymus*, 1990, 7(3): 137-150.
- [11] SCHMIDT A, YOSHIDA K, BUDDECKE E. The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(27): 19 242-19 247.
- [12] GALLAGHER J, LYON M. Heparan sulfate: molecular structure and interactions with growth factors and morphogens[M]. NEW YORK BASEL: Marcel Dekker, Inc., 2000: 27-60.
- [13] TURNBULL J E, GALLAGHER J. Distribution of iduronate 2-sulphate residues in heparan sulphate. Evidence for an ordered polymeric structure[J]. *Biochemical Journal*, 1991, 273(3): 553-559.
- [14] ZAIA J. Glycosaminoglycan glycomics using mass spectrometry[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(4): 885-892.
- [15] VENKATARAMAN G, SHRIVER Z, RAMAN R, SASISEKHARAN R. Sequencing complex polysaccharides[J]. *Science*, 1999, 286(5 439): 537-542.
- [16] PERVIN A, GALLO C, JANDIK K A, HAN X

- J, LINHARDT R J. Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides[J]. *Glycobiology*, 1995, 5(1): 83-95.
- [17] YANG H O, GUNAY N S, TOIDA T, KUBERAN B, YU G, KIM Y S, LINHARDT R J. Preparation and structural determination of dermatan sulfate-derived oligosaccharides[J]. *Glycobiology*, 2000, 10(10): 1 033-1 039.
- [18] MIKHAILOV D, LINHARDT R J, MAYO K H. NMR solution conformation of heparin-derived hexasaccharide[J]. *Biochem J*, 1997, 328 (Pt 1): 51-61.
- [19] HUANG R, LIU J, SHARP J S. An approach for separation and complete structural sequencing of heparin/heparan sulfate-like oligosaccharides [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(12): 5 787-5 795.
- [20] WOLFF J J, CHI L, LINHARDT R J, AMSTER I J. Distinguishing glucuronic from iduronic acid in glycosaminoglycan tetrasaccharides by using electron detachment dissociation[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(5): 2 015-2 022.
- [21] IMANARI T, TOIDA T, KOSHIISHI I, TOYODA H. High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 720 (1/2): 275-293.
- [22] RICE K G, KIM Y S, GRANT A C, MERCHANT Z M, LINHARDT R J. High-performance liquid chromatographic separation of heparin-derived oligosaccharides[J]. *Anal Biochem*, 1985, 150(2): 325-331.
- [23] HENRIKSEN J, RINGBORG L H, ROEPSTORFF P. On-line size-exclusion chromatography/mass spectrometry of low molecular mass heparin[J]. *J Mass Spectrom*, 2004, 39(11): 1 305-1 312.
- [24] NAIMY H, LEYMARIE N, BOWMAN M J, ZAIA J. Characterization of heparin oligosaccharides binding specifically to antithrombin III using mass spectrometry[J]. *Biochemistry*, 2008, 47 (10): 3 155-3 161.
- [25] KUBERAN B, LECH M, ZHANG L, WU Z L, BEELER D L, ROSENBERG R D. Analysis of heparan sulfate oligosaccharides with ion pair-reverse phase capillary high performance liquid chromatography-microelectrospray ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(29): 8 707-8 718.
- [26] THANAWIROON C, RICE K G, TOIDA T, LINHARDT R J. Liquid chromatography/mass spectrometry sequencing approach for highly sulfated heparin-derived oligosaccharides[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2 608-2 615.
- [27] HENRIKSEN J, ROEPSTORFF P, RINGBORG L H. Ion-pairing reversed-phased chromatography/mass spectrometry of heparin[J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(3): 382-387.
- [28] KORIR A K, LIMTIACO J F, GUTIERREZ S M, LARIVE C K. Ultrapformance ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry for compositional profiling and quantification of heparin and heparan sulfate[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(4): 1 297-1 306.
- [29] LAWRENCE R, KUBERAN B, LECH M, BEELER D L, ROSENBERG R D. Mapping critical biological motifs and biosynthetic pathways of heparan sulfate[J]. *Glycobiology*, 2004, 14(5): 467-479.
- [30] KAILEMIA M J, RUHAAK L R, LEBRILLA C B, AMSTER I J. Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(1): 196-212.
- [31] ZAIA J. Mass spectrometry of oligosaccharides [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2004, 23(3): 161-227.
- [32] SHI X, HUANG Y, MAO Y, NAIMY H, ZAIA J. Tandem mass spectrometry of heparan sulfate negative ions: sulfate loss patterns and chemical modification methods for improvement of product ion profiles[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23(9): 1 498-1 511.
- [33] 林江慧, 张建伟, 张惠芳, 高建平, 魏峥. 硫酸类肝素二糖的质谱裂解规律探析[J]. *质谱学报*, 2015, 36(2): 111-119.
- LIN Jianghui, ZHANG Jianwei, ZHANG Hui-fang, GAO Jianping, WEI Zheng. Study on the fragmentation patterns of heparan sulfate disaccharides by ESI-MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2015, 36(2): 111-119 (in Chinese).
- [34] 梁群焘, 魏峥. 含 N-非取代葡糖胺残基肝素四糖的制备与表征[J]. *质谱学报*, 2016, 37(6): 492-503.

- LIANG Quntao, WEI Zheng. Preparation and characterization of heparin tetrasaccharide with *N*-unsubstituted glucosamine residues[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2016, 37(6): 492-503(in Chinese).
- [35] LIANG Q T, DU J Y, FU Q, LIN J H, WEI Z. Preparation and characterization of heparin hexasaccharide library with *N*-unsubstituted glucosamine residues[J]. Glycoconj J, 2015, 32(8): 643-653.
- [36] HU H, HUANG Y, MAO Y, YU X, XU Y, LIU J, ZONG C, BOONS G J, LIN C, XIA YU, ZAIA J. A computational framework for heparan sulfate sequencing using high-resolution tandem mass spectra[J]. Molecular Cellular Proteomics, 2014, 13(9): 2 490-2 502.
- [37] WANG Z, ZHANG T, XIE S, LIU X, LI H, LINHARDT R J, CHI L. Sequencing the oligosaccharide pool in the low molecular weight heparin dalteparin with offline HPLC and ESI-MS/MS[J]. Carbohydrate polymers, 2018, 183: 81-90.
- [38] LIANG Q, CHOPRA P, BOONS G J, SHARP J S. Improved de novo sequencing of heparin/heparan sulfate oligosaccharides by propionylation of sites of sulfation[J]. Carbohydr Res, 2018, 465: 16-21.
- [39] 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 J, 2011, 28(8/9): 525-535.
- [40] 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]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1 028: 71-76.
- [41] DONEANU C E, CHEN W, GEBLER J C. Analysis of oligosaccharides derived from heparin by ion-pair reversed-phase chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2009, 81(9): 3 485-3 499.
- [42] DOMON B, COSTELLO C E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates[J]. Glycoconjugate J, 1988, 5(4): 397-409.