

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 11 月 23 日 (23.11.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/197950 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01) **G01N 30/72** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/074966
- (22) 国际申请日: 2017 年 2 月 27 日 (27.02.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610330158.4 2016 年 5 月 18 日 (18.05.2016) CN
- (71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国山东省济南历城区山大南路
27 号, Shandong 250199 (CN)。
- (72) 发明人: 迟连利 (CHI, Lianli); 中国山东省济南
历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

孙晓君 (SUN, Xiaojun); 中国山东省济南历城区
山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。 盛
安然 (SHENG, Anran); 中国山东省济南历城区
山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。 刘欣
悦 (LIU, Xinyue); 中国山东省济南历城区山大
南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

(74) 代理人: 济南金迪知识产权代理有限公司 (JINAN
JINDI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO.,
LTD); 中国山东省济南历城区山大南路
27 号, Shandong 250199 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) **Title:** LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN BASE COMPONENT UNIT DETECTION METHOD USING HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY AND MULTIPLE REACTION MONITORING TANDEM MASS SPECTROMETRY

(54) 发明名称: 一种低分子肝素基本组成单元的亲水相互作用色谱多反应监测二级质谱联用检测方法

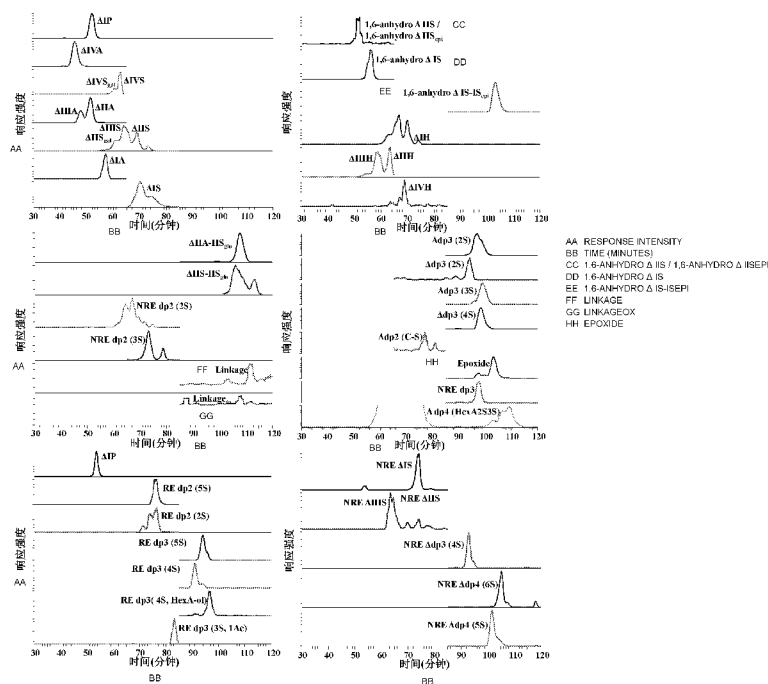


图 1

(57) **Abstract:** A detection method for low molecular weight heparin complete degradation products using hydrophilic interaction chromatography and multiple reaction monitoring tandem mass spectrometry. Identifying the original reducing end and non-reducing end of enoxaparin sodium by means of reducing the reducing end of enoxaparin sodium, and performing hydrolysis using hydrogen peroxide. Performing quantitative analysis on all component units utilizing hydrophilic interaction chromatography and multiple reac-

JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 关于发明人身份(细则4.17(i))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

ction monitoring tandem mass spectrometry, in particular quantifying low-content special structures and characterizing low molecular weight heparin.

(57) 摘要: 一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法。通过对依诺肝素钠的还原端进行还原, 并利用双氧水进行水解的方法对依诺肝素钠的原还原端及非还原端进行鉴定。利用亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱对所有组成单元进行定量分析, 特别是对含量较低的特殊结构进行定量, 对低分子肝素进行表征。

一种低分子肝素基本组成单元的亲水相互作用色谱多反应监测二级质谱联用检测方法

技术领域

本发明涉及一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，属于药物、原料药、原料检测技术领域。

背景技术

肝素及其衍生物低分子肝素是一类糖胺聚糖，具有抗凝血作用，在临床上一直被用作抗凝药物。为了降低肝素所引起的出血、骨质疏松及血小板减少等副作用的风险，并提高其生物利用率，低分子肝素作为新型抗凝血药物被广泛应用。低分子肝素通过酶降解法或化学降解法进行制备，根据工艺的不同，每种低分子肝素有其特殊的结构。依诺肝素钠是通过碱降解肝素苄基酯衍生物得到的一类低分子肝素。其大部分非还原端是经过化学修饰的不饱和结构构成，同时存在来源于原料肝素的饱和的结构及氨基糖，其还原端结构主要为氨基糖，有 15%-25%的还原端为 1,6-内醚结构，并存在少量的糖醛酸结构和连接结构域。达肝素钠是通过亚硝酸降解得到的一类低分子肝素。其主要的非还原端为饱和的糖醛酸结构，主要的还原端为甘露醇结构及少量的连接结构域。除了以上特殊的末端结构，由于工艺造成的主链结构变化，也增加了对低分子肝素组成单元的分析的困难。目前分析肝素的方法有自上而下与自下而上两种策略。对组成单元的分析主要采用自下而上的策略，首先使用肝素酶将低分子肝素降解为组成单元，利用毛细管电泳、高效液相色谱法以及液质联用技术进行分析。上述方法一般仅对 8 种常见二糖和部分特殊结构进行鉴定，不能对所有基本组成单元进行全面的定性定量分析，且不能对低分子肝素，如依诺肝素钠，糖链的原还原端及非还原端进行鉴定。而且对这些含量较低的特殊基本组成单元结构的鉴定对低分子肝素的结构表征是必不可少的。

低分子肝素的基本组成单元除 8 种肝素二糖外，还有与抗凝血作用相关的 3-O-硫酸四糖、剥落反应产生的三糖、饱和的非还原端、自由氨基的二糖、半乳糖醛酸二糖、硫酸直接连接于碳原子的二糖和环氧醚结构，以及存在于不同低分子肝素中的特殊结构，如依诺肝素钠中的 1,6-内醚结构及其原非还原端和还原端，达肝素钠中的 2,5-脱水甘露醇结构。已经报道过的方法没有对所有基本组成单元进行鉴定，而对末端修饰结构和特殊结构的分析鉴定对低分子肝素仿制药的研发、生产控制和保障药品安全是必不可少的。依诺肝素钠的非还原端及还原端与经过酶解新生成的末端相同，因此使用原有的策略不能对其进行全面表征。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明提供了一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反

应监测二级质谱联用检测方法；

本发明通过对依诺肝素钠的还原端进行还原，并利用双氧水进行水解的方法对依诺肝素钠的还原端及非还原端进行鉴定。利用亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱对所有组成单元进行定量分析，特别是对含量较低的特殊结构进行定量，对低分子肝素进行表征。

本发明的技术方案为：

一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，步骤如下：

(1) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水，制得醋酸铵浓度为 3~10 mM 的流动相 A；

(2) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水，并加入乙腈，制得流动相 B，流动相 B 中，醋酸铵的浓度为 3~10 mM，乙腈的体积百分比为 90~98%；

(3) 如果需要区分低分子肝素末端结构，则将 10~50 μg 加入内标的低分子肝素酶解产物样品经硼氢化钠还原 10~12h，并使用双氧水进行水解，将加入内标的低分子肝素酶解产物样品的水解产物配置成浓度为 1~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的待测溶液，进入步骤 (4)；如果不需要区分低分子肝素末端结构，则将 10~50 μg 加入内标的低分子肝素酶解产物样品直接配制为浓度为 1~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的待测溶液，进入步骤 (4)；

(4) 对步骤 (3) 得到的待测溶液离心处理，离心后，使用亲水相互作用色谱柱进行分离：流速 0.1~0.5 mL/min，洗脱梯度如下，均为体积百分比：

0~5 min，5%流动相 A，95%流动相 B；5~107 min，5~23%流动相 A，95~77%流动相 B；107~112 min，23~50%流动相 A，77~50%流动相 B；112~125 min，50%流动相 A，50%流动相 B；

(5) 在正离子模式或负离子模式下用多反应监测二级质谱仪进行检测；

所述步骤 (4) 中的质谱采用三重四极杆质谱仪 (TSQ)，设定参数为：正离子模式喷雾电压：+4.0 kV；负离子模式喷雾电压：-3.2 kV；鞘气流：20~30 arb；管状透镜电压： $\pm 50\sim 150\text{V}$ ；碰撞能：20-50。

根据本发明优选的，所述步骤 (3) 中的加入内标的低分子肝素酶解产物样品在 30~60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下真空减压干燥 1~3h。

根据本发明优选的，所述步骤 (4) 中的离心，条件为室温 10000~15000 rpm 离心 5~15min。

进一步优选的，所述步骤 (4) 中的离心，条件为室温 12000 rpm 离心 15min。

本发明的有益效果为：

本发明可以同时检测低分子肝素基本组成单元中除 8 种常见肝素二糖外的所有已报道的末端修饰结构和特殊结构，而且发现了三种新结构，包括还有两个氨基糖的三糖，糖醛酸发生 3-O-硫

酸化的四糖和以糖醛酸作为还原端的三糖,并且可以通过内标同时对所有低分子肝素基本组成单元组分进行相对定量,解决了现有技术中仅能检测 8 种常见肝素二糖及部分特殊结构的问题,对于低分子肝素仿制药的研发、生产控制和保障药品安全具有极大的实用价值。

附图说明

图 1 为实施例 1 中依诺肝素钠标准品酶法降解与还原水解降解基本组成单元的提取离子流图;

图 2 为实施例 1 中依诺肝素钠标准品酶法降解基本组成单元组分 30、31 以及还原水解基本组成单元组分还原端 5 的二级质谱图;

图 2 中, a 为实施例 1 中依诺肝素钠标准品酶法降解基本组成单元组分 30 的二级质谱图;

b 为实施例 1 中依诺肝素钠标准品酶法降解基本组成单元组分 31 的二级质谱图;

c 为实施例 1 中依诺肝素钠标准品酶法还原水解基本组成单元组分还原端 5 的二级质谱图;

图 3 为实施例 2 中达肝素钠标准品酶法降解基本组成单元的提取离子流图。

具体实施方式

下面结合说明书附图和实施例对本发明作进一步限定,但不限于此。

液相色谱仪为 Agilent1100 液相色谱仪,工作站为 ChemStation;质谱为赛默飞 TSQ Quantum Ultra 型三重四极杆质谱,工作站为 Xcalibur。

实施例 1

一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法,步骤如下:

(1) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水,制得醋酸铵浓度为 5 mM 的流动相 A;

(2) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水,并加入乙腈,制得流动相 B,流动相 B 中,醋酸铵的浓度为 5 mM,乙腈的体积百分比为 95%;

(3) 将依诺肝素钠标准品用肝素酶 I、II 和 III (均购自北京艾德豪克国际技术有限公司)在 25℃ 条件下降解 48 h,将加入内标的降解产物用 Millipore 30KDa 的超滤膜过滤后真空减压干燥;

(4) 则将 50 μ g 加入内标的低分子肝素酶解产物样品经硼氢化钠还原 12h,并使用双氧水进行水解,将加入内标的低分子肝素酶解产物样品的水解产物配置成浓度为 10 μ g/ μ L 的待测溶液,进入步骤 (5);

(5) 对步骤 (3) 得到的待测溶液离心处理:离心后,使用填料粒径为 200 Å、色谱柱内径为 2.0 mm、色谱柱长度为 150 mm 的亲水相互作用色谱柱进行分离;流速 0.15mL/min,洗脱梯度如下,均为体积百分比:

0~5min, 5%流动相 A, 95%流动相 B; 5~107 min, 5~23%流动相 A, 95~77%流动相 B; 107~112 min, 23~50%流动相 A, 77~50%流动相 B; 112~125 min, 50%流动相 A, 50%流动相 B;

(6) 使用赛默飞 TSQ Quantum Ultra 型三重四极杆质谱在负离子模式下进行多反应监测, 得到各组分的提取离子流图, 设定参数为: 喷雾电压: -3.2 kV; 鞘气流: 20~30 arb; 管状透镜电压: -75V, 碰撞能: 35。

(7) 根据步骤 (6) 中获得的各组分提取离子流图中获得的峰面积 A 以及已知浓度 c_{IP} 的内标的峰面积 A_{IP} , 经如下公式计算该组分的浓度 c:

$$c = c_{IP} \times (A/A_{IP})$$

(8) 用步骤 (7) 中得到的对依诺肝素钠样品基本组成单元进行组成成分分析, 酶解基本组成单元各组分含量信息如表 1 所示, 还原水解基本组成单元各组分含量信息如表 2 所示。

表 1

	名称	结构	理论分子量	母离子	电荷数	子离子
1	ΔIS	$\Delta UA2S-GlcNS6S$	576.9713	287.5	-2	138
2	ΔIIS	$\Delta UA-GlcNS6S$	497.0145	247.5	-2	138
3	$\Delta IIIS$	$\Delta UA2S-GlcNS$	497.0145	247.5	-2	138
4	ΔIVS	$\Delta UA-GlcNS$	417.0577	416.0	-1	138,175
5	ΔIA	$\Delta UA2S-GlcNAc6S$	539.0251	268.5	-2	300
6	ΔIIA	$\Delta UA-GlcNAc6S$	459.0683	458.0	-1	157,175
7	$\Delta IIIA$	$\Delta UA2S-GlcNAc$	459.0683	458.0	-1	157,175
8	ΔIVA	$\Delta UA-GlcNAc$	379.1115	378.0	-1	115,175
9	1,6-anhydro ΔIIS	$\Delta UA-GlcNS-1,6-anhydro$	399.0471	398.0	-1	175
	1,6-anhydro ΔIIS_{epi}	$\Delta UA-ManNS-1,6-anhydro$				
10	1,6-anhydro ΔIS	$\Delta UA2-GlcNS-1,6-anhydro$	479.0040	478.0	-1	398
11	1,6-anhydro $\Delta IS-IS_{epi}$	$\Delta UA2S-GlcNS6S-IdoA2S-ManNS-1,6-anhydro$	1055.9753	527.0	-2	406.5
12	$\Delta I-H$	$\Delta UA2S-GlcN6S$	497.0145	496.0	-1	258,416
13	$\Delta II-H$	$\Delta UA2S-GlcN$	417.0577	416.0	-1	157,175
14	$\Delta III-H$	$\Delta UA-GlcN6S$				
15	$\Delta IV-H$	$\Delta UA-GlcN$	337.1009	336.0	-1	115
16	$\Delta IIA-IIS_{glu}$	$\Delta UA-GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S$	1036.0396	517.0	-2	175,458,616
17	$\Delta IIS-IIS_{glu}$	$\Delta UA-GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S$	1073.9859	536.0	-2	416,458
18	NRE dp2 (2S)	$IdoA2S-GlcNS$	515.0251	256.5	-2	138,258
19	NRE dp2 (3S)	$IdoA2S-GlcNS6S$	594.9819	296.5	-2	138
20	Linkage	$\Delta UA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser$	719.2120	358.6	-2	218,337

21	Linkage _{ox}	Δ UA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser _{ox}	690.1855	344.0	-2	189
22	Δ dp3 (2S)	Δ UA-GlcNS6S-HexA	673.0466	335.5	-2	157,339
23	Δ dp3 (2S, 1Ac)	Δ UA-GlcNAc6S-HexA2S	715.0572	356.0	-2	97, 157
24	Δ dp3 (3S)	Δ UA2S-GlcNS6S-HexA	753.0034	375.5	-2	193,314
25	Δ dp3 (4S)	Δ UA2S-GlcNS6S-HexA2S	832.9602	415.5	-2	97,157
26	Δ IVS _{gal}	Δ GalA-GlcNS	417.0577	416.0	-1	138,175
27	Δ IIS _{gal}	Δ GalA-GlcNS6S	497.0145	247.5	-2	138
28	Δ dp2 (C-S)	Δ UA2CS-GlcNS6S	560.9764	279.5	-2	138
29	Epoxide	Δ UA2S-GlcNS6S-GlcA-2,3-anhydro-GlcNS	976.0185	478.0	-2	258
30	NRE dp3	GlcNS6S-HexA2S-GlcNS6S	915.9643	457.0	-2	240,258
31	Δ dp4 (HexA2S3S)	Δ UA-GlcNS-HexA2S3S-GlcNS	994.0290	496.0	-2	258,416

表 2

	名称	结构	理论分子量	母离子	电荷数	子离子
非还原端组成单元						
1	NRE ΔIS	ΔUA2S-GlcNS6S	576.9713	287.5	-2	138
2	NRE ΔIIS	ΔUA-GlcNS6S	497.0145	247.5	-2	138
3	NRE ΔIIIS	ΔUA2S-GlcNS		-2		
4	NRE dp3 (4S)	ΔUA2S-GlcNS6S-HexA2S	832.9602	415.5	-2	157,193,273
5	NRE dp4 (6S)	ΔUA2S-GlcNS6S-HexA2S-GlcNS6S	1153.9427	576.0	-2	415.5
6	NRE dp4 (5S)	ΔUA2S-GlcNS6S-HexA2S-GlcNS	1073.9859	536.0	-2	415.5,375.5
还原端组成单元						
1	RE dp2 (3S)	HexA2S-GlcNS6S-ol	596.9976	297.5	-2	242,260
2	RE dp2 (2S)	HexA-GlcNS6S-ol	517.0407	257.5	-2	242
		HexA2S-GlcNS-ol				
3	RE dp3 (5S)	GlcNS6S-HexA2S-GlcNS6S-ol	917.9800	458.0	-2	242,260
4	RE dp3 (4S)	GlcNS-HexA2S-GlcNS6S-ol	838.0232	418.0	-2	260
5	RE dp3(4S, HexA-ol)	HexA2S-GlcNS6S-HexA2S-ol	852.9865	425.5	-2	257
6	RE dp3 (3S, 1Ac)	GlcNAc6S-HexA2S-GlcINS-ol	800.0769	399.0	-2	260

注：“ Δ UA”表示不饱和糖醛酸，“Hex”表示糖醛酸，“GlcA”表示葡萄糖醛酸，“IdoA”表示艾杜糖醛酸，“GlcN”表示葡萄糖胺，“Ac”表示乙酰基团，“S”表示硫酸基团，“NS”表示 N-硫酸基

团,“NRE”非还原端,“RE”还原端,“-ol”糖醇。

依诺肝素钠酶解基本单元的质谱分析提取离子流图如图 1,依诺肝素钠还原水解基本单元的质谱分析提取离子流图如图 2,通过本方法成功检测到依诺肝素钠标准品基本组成单元中除 8 种常见二糖以外的所有可能基本组成单元。

实施例 2

一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法,步骤如下:

(1) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水,制得醋酸铵浓度为 5 mM 的流动相 A;

(2) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水,并加入乙腈,制得流动相 B,流动相 B 中,醋酸铵的浓度为 5 mM,乙腈的体积百分比为 95%;

(3) 将达肝素钠标准品用肝素酶 I、II 和 III(均购自北京艾德豪克国际技术有限公司)在 25℃条件下降解 48 h,将加入内标的降解产物用 Millipore 30KDa 的超滤膜过滤后真空减压干燥;

(4) 将 50 ug 达肝素钠完全酶解样品配制成浓度为 10 µg/µL 的待测溶液;

(5) 对步骤(4)得到的待测溶液离心处理:离心后,使用填料粒径为 200 Å、色谱柱内径为 2.0 mm、色谱柱长度为 150 mm 的亲水相互作用色谱柱进行分离;流速为 0.15mL/min,洗脱梯度如下,均为体积百分比:

0~5min, 5%流动相 A, 95%流动相 B; 5~107 min, 5~23%流动相 A, 95~77%流动相 B; 107~112 min, 23~50%流动相 A, 77~50%流动相 B; 112~125 min, 50%流动相 A, 50%流动相 B;

(6) 使用赛默飞 TSQ Quantum Ultra 型三重四极杆质谱在负离子模式下进行多反应监测,得到各组分的提取离子流图,设定参数为:喷雾电压: -3.2 kV;鞘气流: 20~30 arb;管状透镜电压: -75V,碰撞能: 35。

(7) 根据步骤(6)中获得的各组分提取离子流图中获得的峰面积 A 以及已知浓度 c_p 的内标的峰面积 A_p ,经如下公式计算该组分的浓度 c:

$$c=c_p \times (A/A_p)$$

(8) 用步骤(7)中得到的对依诺肝素钠样品基本组成单元进行组成成分分析,酶解基本组成单元各组分含量信息如表 3 所示。

表 3

	名称	结构	理论分子量	母离子	电荷数	子离子
1	ΔIS	ΔUA2S-GlcNS6S	576.9713	287.5	-2	138
2	ΔIIS	ΔUA-GlcNS6S	497.0145	247.5	-2	138
3	ΔIIIS	ΔUA2S-GlcNS	497.0145	247.5	-2	138

4	Δ IVS	Δ UA-GlcNS	417.0577	416.0	-1	138,175
5	Δ IA	Δ UA2S-GlcNAc6S	539.0251	268.5	-2	300
6	Δ IIA	Δ UA-GlcNAc6S	459.0683	458.0	-1	157,175
7	Δ IIIA	Δ UA2S-GlcNAc	459.0683	458.0	-1	157,175
8	Δ IVA	Δ UA-GlcNAc	379.1115	378.0	-1	115,175
9	Δ dp2 (1OS) RE	Δ UA-Mnt6S	402.0468	401	-1	243,285
10	Δ dp2 (2OS) RE	Δ UA2S-Mnt6S	482.0036	481	-1	243
11	Δ dp4 (1NS) RE	Δ UA-GlcNS-UA-Mnt	739.1477	368.5	-2	175,339
12	Δ dp4 (2OS,1NS) RE	Δ UA2S-GlcNS-UA-Mnt6S	899.0613	448.5	-2	243,255,339
13	Δ dp4 (3OS,1NS) RE	Δ UA2S-GlcNS-UA2S-Mnt6S	979.0182	488.5	-2	243,339
14	Δ dp4 (4OS,1NS) RE	Δ UA2S-GlcNS6S-UA2S-Mnt6S	1058.9750	528.5	-2	157,409
15	Δ I-H	Δ UA2S-GlcN6S	497.0145	496.0	-1	258,416
16	Δ II-H	Δ UA2S-GlcN	417.0577	416.0	-1	157,175
17	Δ III-H	Δ UA-GlcN6S	417.0577	416.0	-1	157,175
18	Δ IV-H	Δ UA-GlcN	337.1009	336.0	-1	115
19	Δ IIA-IIS _{glu}	Δ UA-GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S	1036.0396	517.0	-2	175,458,616
20	Δ IIS-IIS _{glu}	Δ UA-GlcNS6S-GlcA-GlcNS3S6S	1073.9859	536.0	-2	416,458
21	NRE dp2 (2S)	IdoA2S-GlcNS	515.0251	256.5	-2	138,258
22	NRE dp2 (3S)	IdoA2S-GlcNS6S	594.9819	296.5	-2	138
23	Linkage	Δ UA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser	719.2120	358.6	-2	218,337
24	Linkage _{ox}	Δ UA-Gal-Gal-Xyl-O-Ser _{ox}	690.1855	344.0	-2	189
25	Δ dp3 (2S)	Δ UA-GlcNS6S-HexA	673.0466	335.5	-2	157,339
26	Δ dp3 (2S, 1Ac)	Δ UA-GlcNAc6S-HexA2S	715.0572	356.0	-2	97, 157
27	Δ dp3 (3S)	Δ UA2S-GlcNS6S-HexA	753.0034	375.5	-2	193,314
28	Δ dp3 (4S)	Δ UA2S-GlcNS6S-HexA2S	832.9602	415.5	-2	97,157
29	Δ IVS _{gal}	Δ GalA-GlcNS	417.0577	416.0	-1	138,175
30	Δ IIS _{gal}	Δ GalA-GlcNS6S	497.0145	247.5	-2	138
31	Δ dp2 (C-S)	Δ UA2CS-GlcNS6S	560.9764	279.5	-2	138
32	Epoxide	Δ UA2S-GlcNS6S-GlcA-2,3-anhydro-GlcNS	976.0185	478.0	-2	258
33	NRE dp3	GlcNS6S-HexA2S-GlcNS6S	915.9643	457.0	-2	240,258
34	Δ dp4 (HexA2S3S)	Δ UA-GlcNS-HexA2S3S-GlcNS	994.0290	496.0	-2	258,416

注：“ Δ UA”表示不饱和糖醛酸，“Hex”表示糖醛酸，“GlcA”表示葡萄糖醛酸，“IdoA”表示艾杜糖醛酸，“GlcN”表示葡萄糖胺，“Ac”表示乙酰基团，“S”表示硫酸基团，“NS”表示 N-硫酸基团，“NRE”非还原端，“RE”还原端，“-ol”糖醇。

达肝素钠酶解基本单元的质谱分析提取离子流图如图 3，通过本方法成功检测到达肝素钠标准品基本组成单元中除 8 种常见二糖以外的所有可能基本组成单元。

权利要求书

1、一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，其特征在于，步骤如下：

(1) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水，制得醋酸铵浓度为 3~10 mM 的流动相 A；

(2) 将醋酸铵试剂溶解于去离子水，并加入乙腈，制得流动相 B，流动相 B 中，醋酸铵的浓度为 3~10 mM，乙腈的体积百分比为 90~98%；

(3) 如果需要区分低分子肝素末端结构，则将 10~50 μg 加入内标的低分子肝素酶解产物样品经硼氢化钠还原 10~12h，并使用双氧水进行水解，将加入内标的低分子肝素酶解产物样品的水解产物配置成浓度为 1~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的待测溶液，进入步骤 (4)；如果不需要区分低分子肝素末端结构，则将 10~50 μg 加入内标的低分子肝素酶解产物样品直接配制为浓度为 1~10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的待测溶液，进入步骤 (4)；

(4) 对步骤 (3) 得到的待测溶液离心处理，离心后，使用亲水相互作用色谱柱进行分离：流速 0.1~0.5 mL/min，洗脱梯度如下，均为体积百分比：

0~5 min，5%流动相 A，95%流动相 B；5~107 min，5~23%流动相 A，95~77%流动相 B；107~112 min，23~50%流动相 A，77~50%流动相 B；112~125 min，50%流动相 A，50%流动相 B；

(5) 在正离子模式或负离子模式下用多反应监测二级质谱仪进行检测；

所述步骤 (4) 中的质谱采用三重四极杆质谱仪 (TSQ)，设定参数为：正离子模式喷雾电压：+4.0 kV；负离子模式喷雾电压：-3.2 kV；鞘气流：20~30 arb；管状透镜电压： $\pm 50\sim 150\text{V}$ ；碰撞能：20-50。

2、根据权利要求 1 所述的一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，其特征在于，所述步骤 (3) 中的加入内标的低分子肝素酶解产物样品在 30~60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下真空减压干燥 1~3h。

3、根据权利要求 1 所述的一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，其特征在于，所述步骤 (4) 中的离心，条件为室温 10000~15000 rpm 离心 5~15min。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的一种低分子肝素完全降解产物的亲水相互作用色谱与多反应监测二级质谱联用检测方法，其特征在于，所述步骤 (4) 中的离心，条件为室温 12000 rpm 离心 15min。

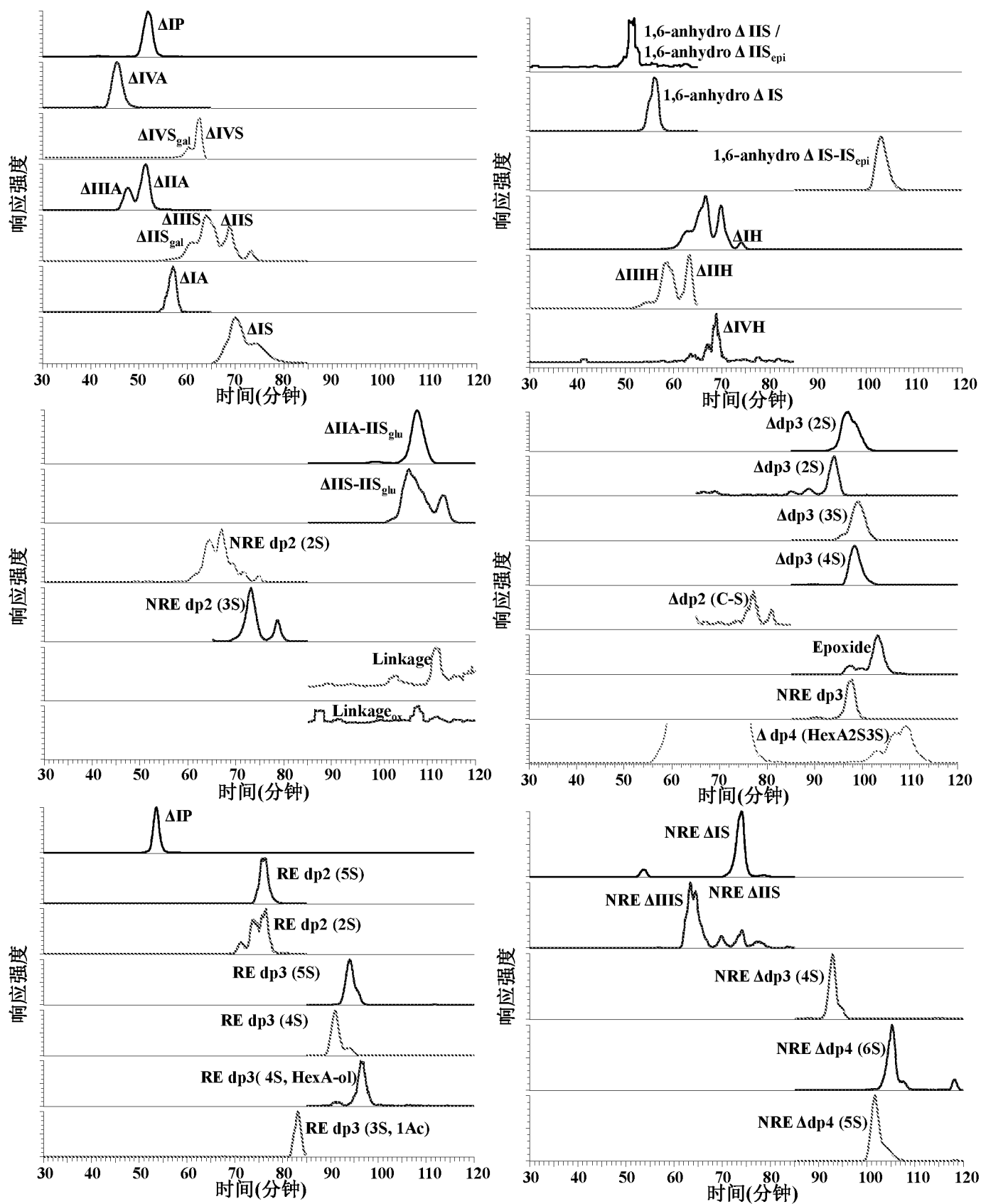
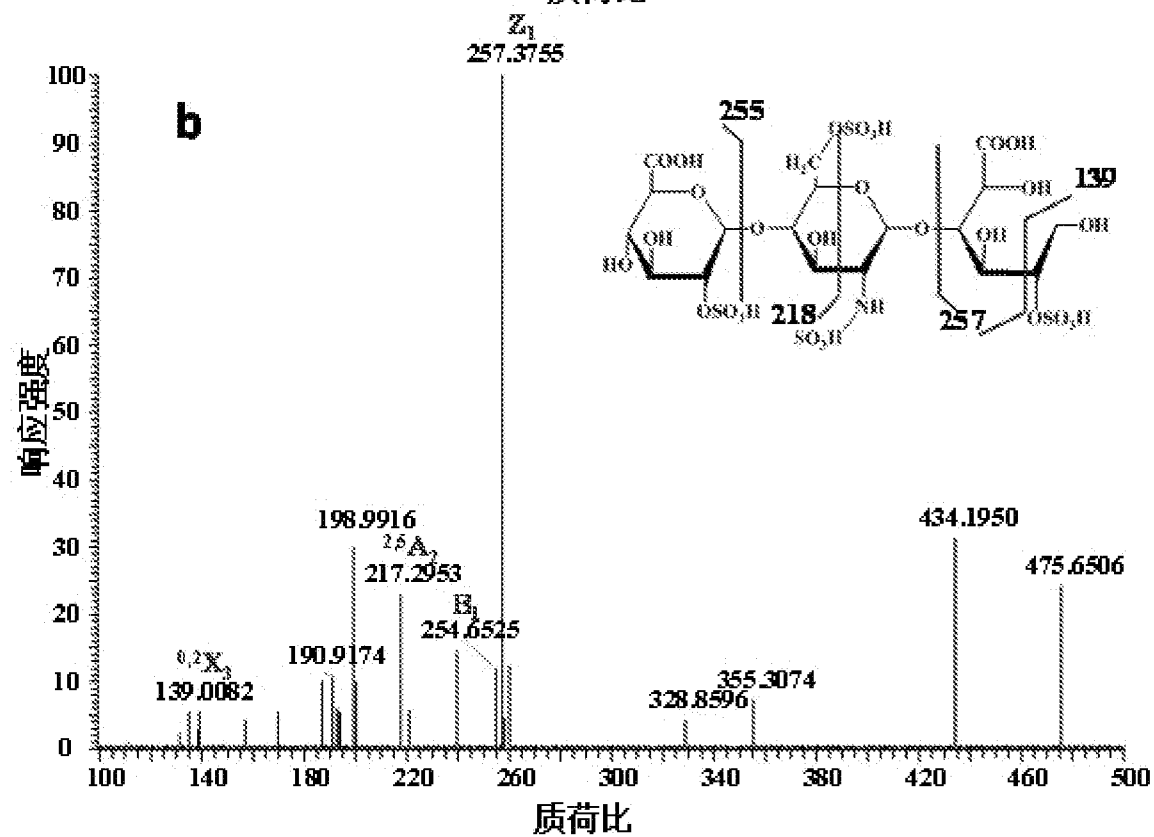
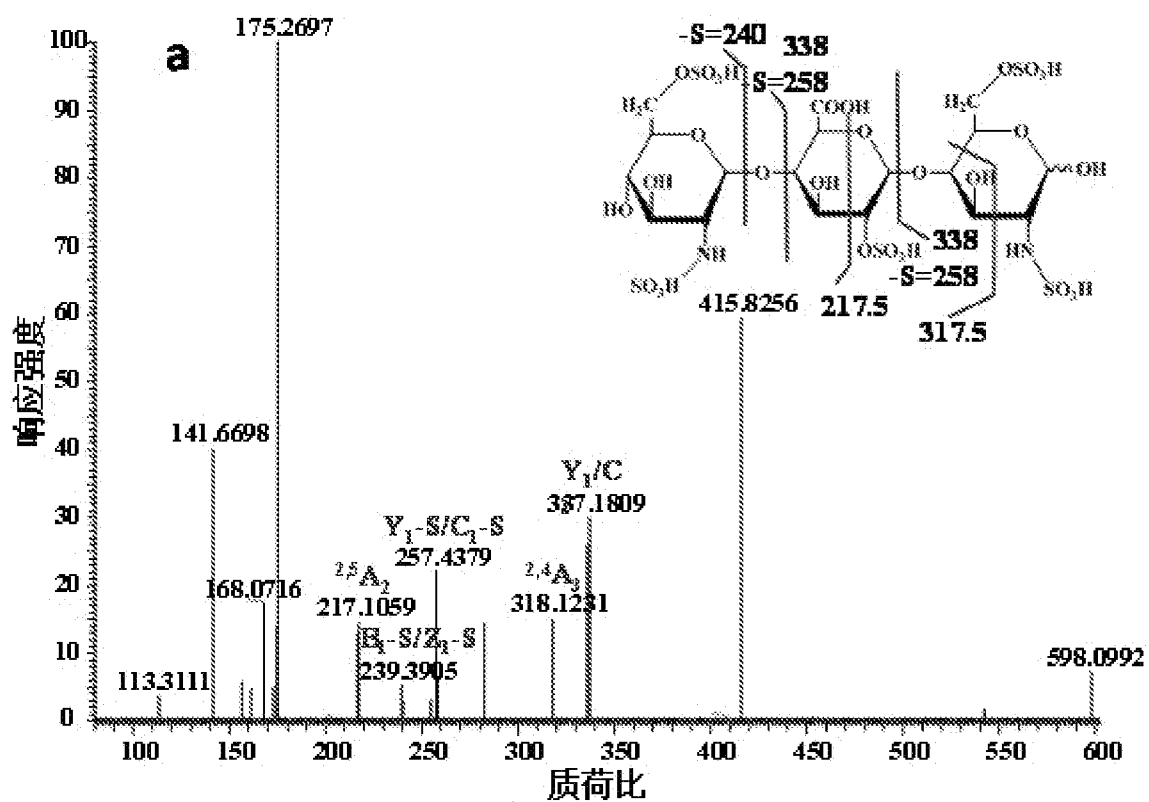


图 1



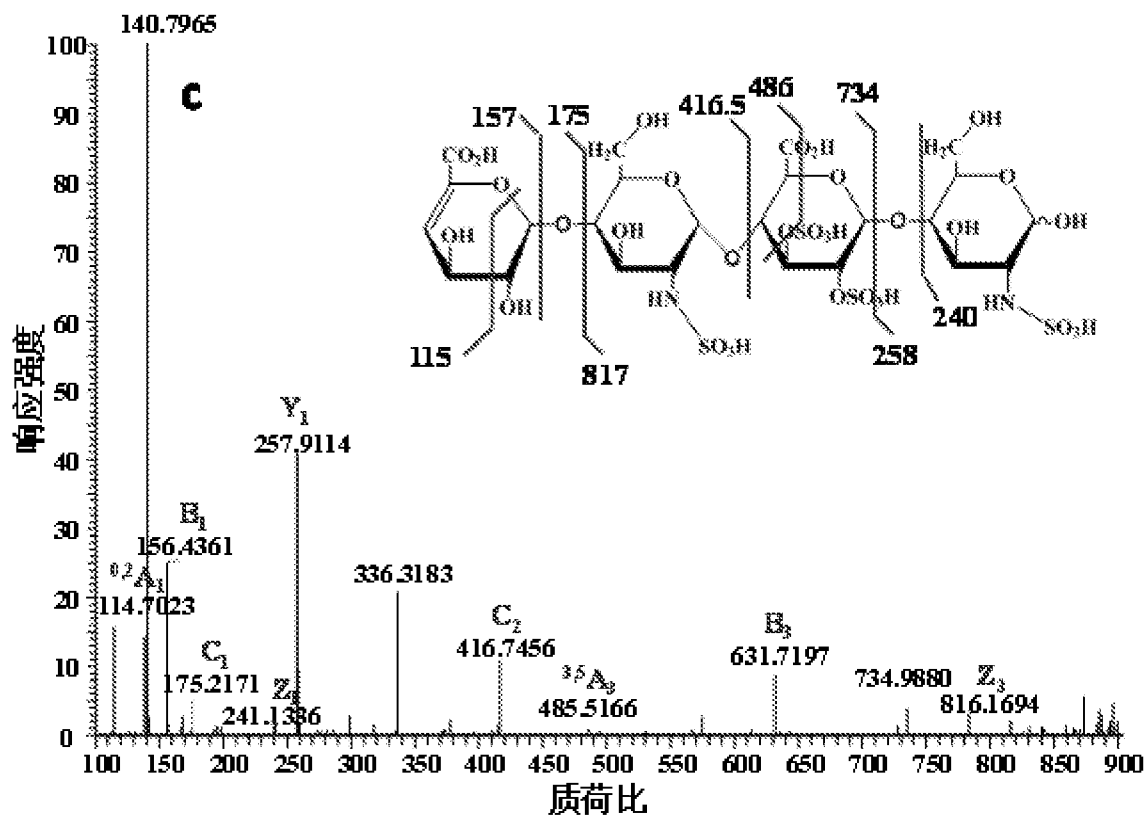


图 2

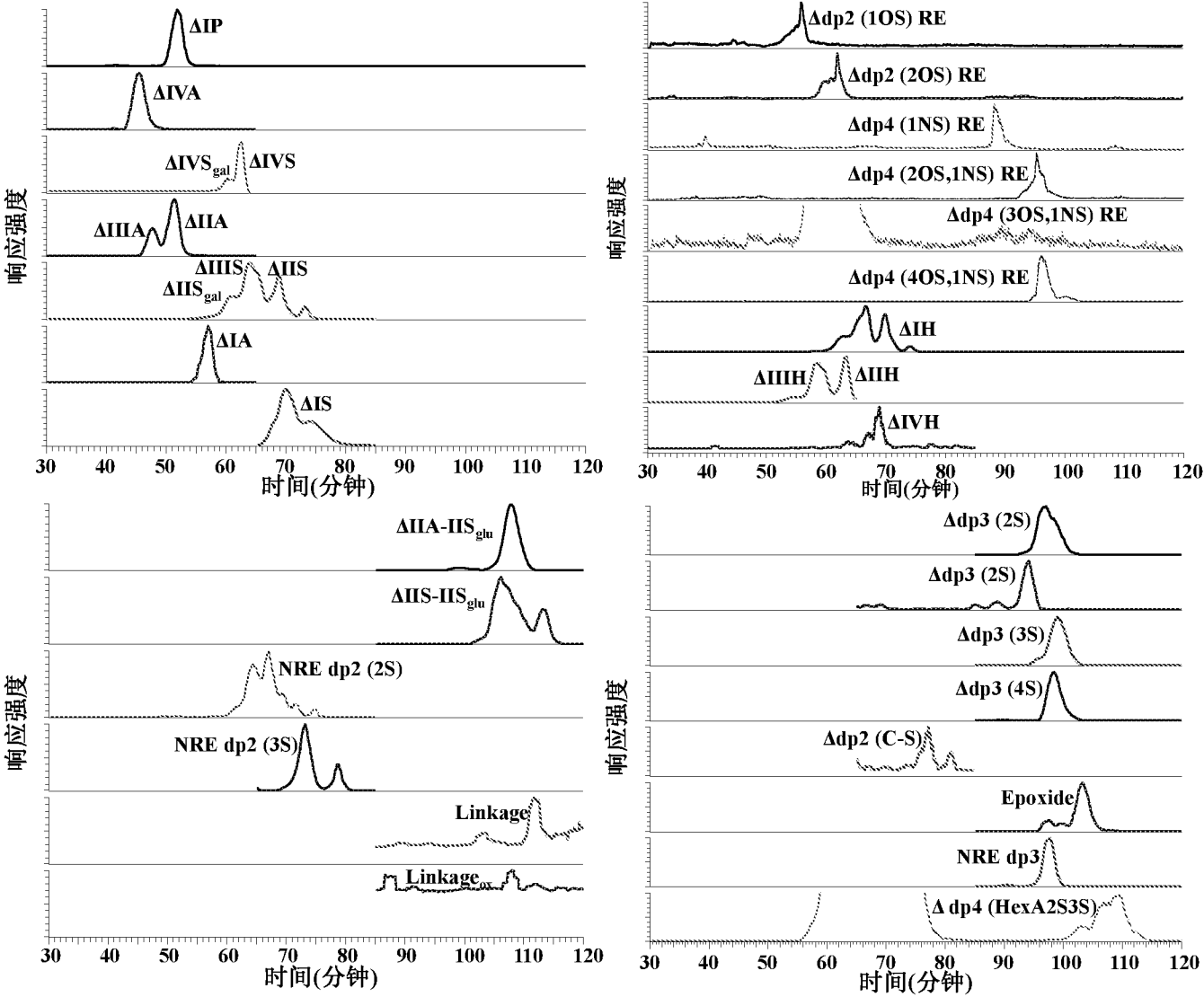


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/074966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/02 (2006. 01) i; G01N 30/72 (2006. 01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, CNTXT, VEN: floating phase, ammonium acetate, ammonium acetic acid, acetonitrile, SHANDONG UNIVERSITY, heparin, ammonium, acetate, acetonitrile, hydrophilic, mass spectrometer, chromatogram

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106018597 A (SHANDONG UNIVERSITY) 12 October 2016 (12.10.2016) claims 1-4, description, paragraphs [0004]-[0063]	1-4
Y	WANG, Zhongjie, "LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR COMPOSITIONAL ANALYSIS OF LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS" CMFD, Medical and health album, no. 11, 15 November 2014 (15.11.2014), ISSN: 1674024, pages 1-45	1-4
Y	CN 103675144 A (OCEAN UNIVERSITY OF CHINA) 26 March 2014 (26.03.2014) description, paragraph [0097]	1-4
Y	CN 103630647 A (SHANDONG UNIVERSITY) 12 March 2014 (12.03.2014) claims 1-3, description, paragraphs [0004]-[0062]	1-4
A	EP 2642288 A1 (ISTITUTO DI RICERCH E CHIMICHE E BIOCHIMICHE G R0NZONI) 25 September 2013 (25.09.2013) the whole document	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 23 May 2017	Date of mailing of the international search report 31 May 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer DAI, Chong Telephone No. (86-10) 62085646

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/074966

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011129857 A1 (MSDX INC.) 02 June 2011 (02.06.2011) the whole document	1-4
A	CN 103060404 A (QINGDAO YABO BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 April 2013 (24.04.2013) the whole document	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/074966

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106018597 A	12 October 2016	None	
CN 103675144 A	26 March 2014	CN 103675144 B	17 June 2015
CN 103630647 A	12 March 2014	CN 103630647 B	03 June 2015
EP 2642288 A1	25 September 2013	WO 2013139478 A1	26 September 2013
US 2011129857 A1	02 June 2011	WO 2011066460 A1	03 June 2011
		EP 2504699 A1	03 October 2012
		CA 2781664 A1	03 June 2011
CN 103060404 A	24 April 2013	CN 103060404 B	23 July 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/074966

A. 主题的分类 G01N 30/02 (2006.01) i; G01N 30/72 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNABS, CNKI, CNTXT, VEN, 肝素, 流动相, 醋酸铵, 乙酸铵, 乙腈, 质谱, 色谱, 亲水, 山东大学, heparin, ammonium, acetate, acetonitrile, hydrophilic, mass spectrometer, chromatogram		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106018597 A (山东大学) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 权利要求1-4, 说明书第[0004]-[0063]段	1-4
Y	王章杰. "一种低分子量肝素完全降解产物的色谱质谱联用检测方法" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生专辑, 第11期, 2014年 11月 15日 (2014 - 11 - 15), ISSN: 1674-024, 第1-45页	1-4
Y	CN 103675144 A (中国海洋大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 说明书第[0097]段	1-4
Y	CN 103630647 A (山东大学) 2014年 3月 12日 (2014 - 03 - 12) 权利要求1-3, 说明书第[0004]-[0062]段	1-4
A	EP 2642288 A1 (ISTITUTO DI RICERCHE CHIMICHE E BIOCHIMICHE G RONZONI) 2013 年 9月 25日 (2013 - 09 - 25) 全文	1-4
A	US 2011129857 A1 (MSDX INC) 2011年 6月 2日 (2011 - 06 - 02) 全文	1-4
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 5月 23日		2017年 5月 31日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10) 62019451		戴翀 电话号码 (86-10) 62085646

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103060404 A (青岛亚博生物科技有限公司) 2013年 4月 24日 (2013 - 04 - 24) 全文	1-4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/074966

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106018597	A	2016年 10月 12日	无	
CN	103675144	A	2014年 3月 26日	CN	103675144 B 2015年 6月 17日
CN	103630647	A	2014年 3月 12日	CN	103630647 B 2015年 6月 3日
EP	2642288	A1	2013年 9月 25日	WO	2013139478 A1 2013年 9月 26日
US	2011129857	A1	2011年 6月 2日	WO	2011066460 A1 2011年 6月 3日
				EP	2504699 A1 2012年 10月 3日
				CA	2781664 A1 2011年 6月 3日
CN	103060404	A	2013年 4月 24日	CN	103060404 B 2014年 7月 23日