

肝素二糖检测报告

液相方法条件

检测波长：双波长检测 234nm 和 202nm。

色谱柱：月旭 Ultimate XB-SAX (3.0×250mm, 填料粒径 5 μ m)。

流速：0.45ml/min。

柱温：50 $^{\circ}$ C。

进样量：10 μ l。

采集时间：0-60min

流动相梯度：

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	97	3
40	40	60
60	20	80

流动相及样品溶液的配制：

流动相 A 的配制：称取 0.308g 的磷酸二氢钠置于 1000ml 容量瓶中，加入 950ml 的水溶解，使用磷酸调节溶液 pH 至 2.9，最后用水定容至刻度线，使用前用 0.45 或 0.22 μ m 的膜过滤并超声脱气。

流动相 B 的配制：称取 122g 的高氯酸钠置于 1000ml 容量瓶中，加入 950ml 的流动相 A 溶解，使用磷酸调节溶液 pH 至 3.0，最后用流动相 A 定容至刻度线，使用前用 0.45 或 0.22 μ m 的膜过滤并超声脱气。

pH 7.0 磷酸二氢钾缓冲液：称取 68.0mg 的磷酸二氢钾和 100mg 的 BSA 置于 50ml 的烧杯中，加入 30ml 的水溶解，使用氢氧化钾溶液调节溶液 pH 至 7.0，将溶液转移至 50ml 的容量瓶中，使用水定容至刻度线，最后用 0.45 或 0.22 μ m 的膜过滤。

0.5IU/ml 的肝素酶 I、II 和 III 溶液：量取一定体积的肝素酶 I、II 和 III，使用 pH 7.0 磷酸二氢钾缓冲液稀释，使得肝素酶 I、II 和 III 的浓度分别为 0.5IU/ml。

乙酸钙缓冲液：称取 31.6mg 的乙酸钙和 100mg 的 BSA 置于 100ml 的烧杯中，加入 60ml 的水溶解，向溶液中加入 580 μ l 的乙酸，使用 1M 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0，将溶液转移到 100 ml 容量瓶中，用水定容至刻度线，最后用 0.45 或 0.22 μ m 的膜过滤。

二糖标准品混合溶液：按照二糖标准品标识的质量，加适量的水溶解，配成浓度为 2.5mg/ml 的溶液，用移液枪分别量取 10 μ l 的 2.5mg/ml 的溶液混合，即得到二糖标准品混合溶液。本次实验中使用的 13 种二糖标准品见表 1。

20mg/ml 标准品溶液：称取 40mg 的中国药典肝素钠标准品，加入 2ml 的水溶解。该溶液制备 2 个。

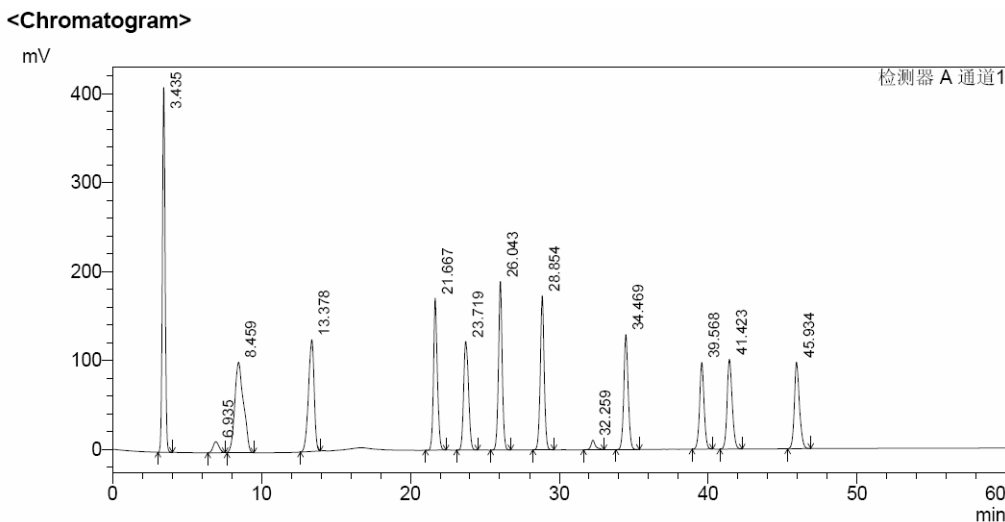
20mg/ml 样品溶液：称取 40mg 的肝素钠样品，加入 2ml 的水溶解。该溶液制备 3 个。

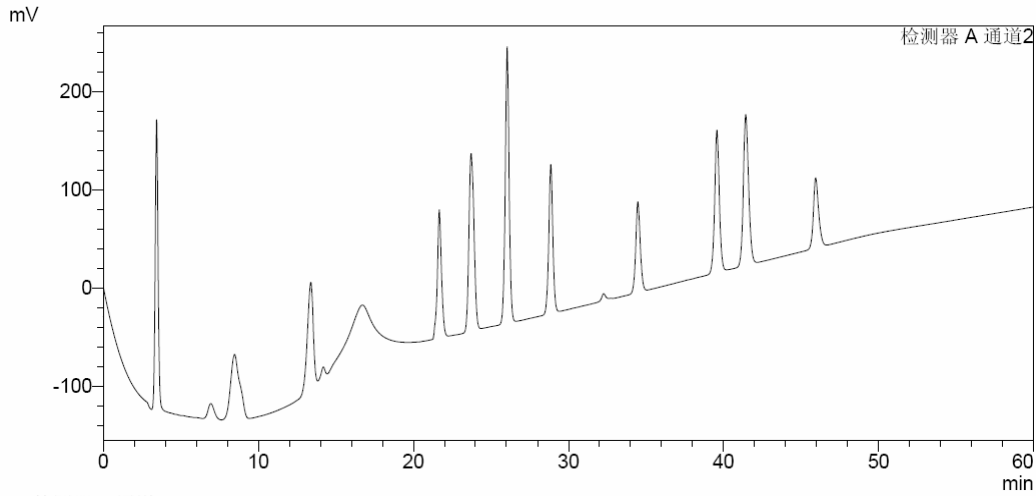
标准溶液：量取 50 μ l 的 20mg/ml 标准品溶液，加入 200 μ l 的乙酸钙缓冲液和 50 μ l 的 0.5IU/ml 的肝素酶 I、II 和 III 溶液混匀，在 25 $^{\circ}$ C 酶解 48h。该溶液制备 2 个。

供试溶液：量取 50 μ l 的 20mg/ml 样品溶液，加入 200 μ l 的乙酸钙缓冲液和 50 μ l 的 0.5IU/ml 的肝素酶 I、II 和 III 溶液混匀，在 25 $^{\circ}$ C 酶解 48h。该溶液制备 3 个。

谱图及数据

图 1：13 种肝素二糖标准品





1 检测器 A 通道1/234nm
2 检测器 A 通道2/202nm

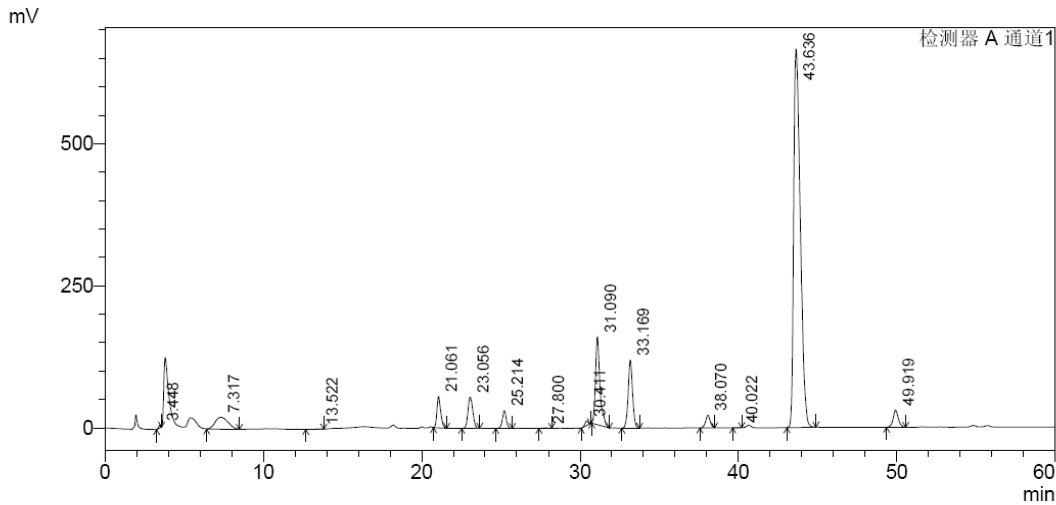
峰表

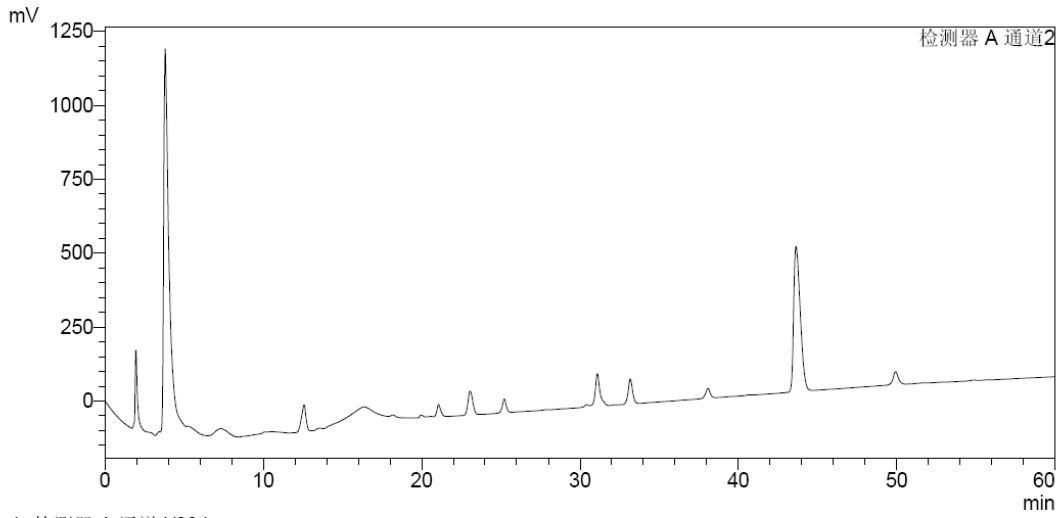
检测器 A Ch1 234nm

名称	保留时间	面积	高度	面积 %	高度 %
△IVh	3.435	5273417	410412	15.057	23.556
△IVa	6.935	353952	12428	1.011	0.713
△IIh	8.459	4184019	101904	11.946	5.849
△IIIh	13.378	3339582	125523	9.535	7.205
△IVs	21.667	3035648	170790	8.668	9.803
△IIa	23.719	2801430	122089	7.999	7.008
△IIIa	26.043	3279207	189532	9.363	10.879
△Ih	28.854	3164931	173392	9.037	9.952
△IIs	32.259	227891	10739	0.651	0.616
△IIIs	34.469	2632259	129393	7.516	7.427
△Ia	39.568	2031737	97480	5.801	5.595
△Ip	41.423	2394327	101153	6.836	5.806
△Is	45.934	2304935	97411	6.581	5.591
		35023335	1742248	100.000	100.000

图 2: 15 种肝素钠标准品

<Chromatogram>





1 检测器 A 通道1/234nm
2 检测器 A 通道2/202nm

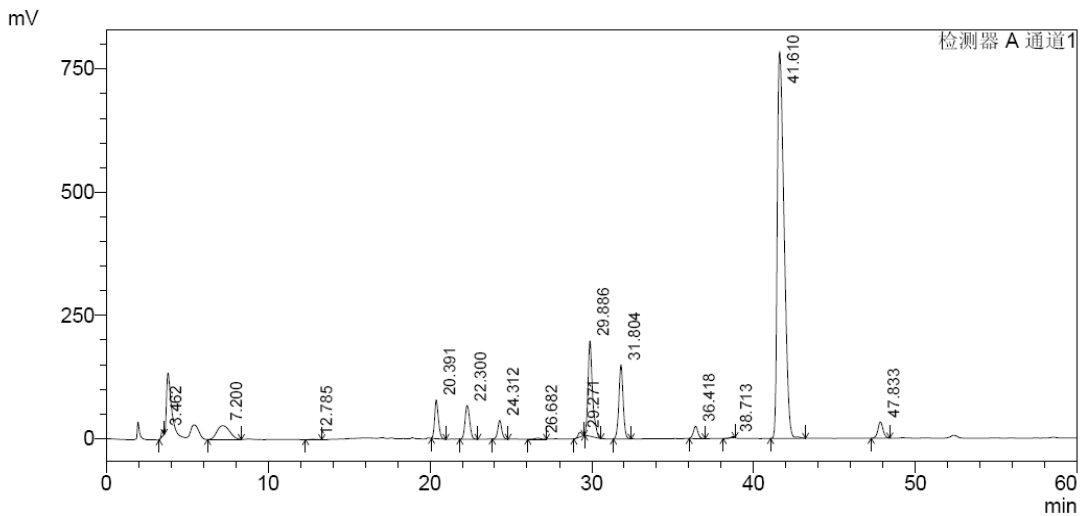
峰表

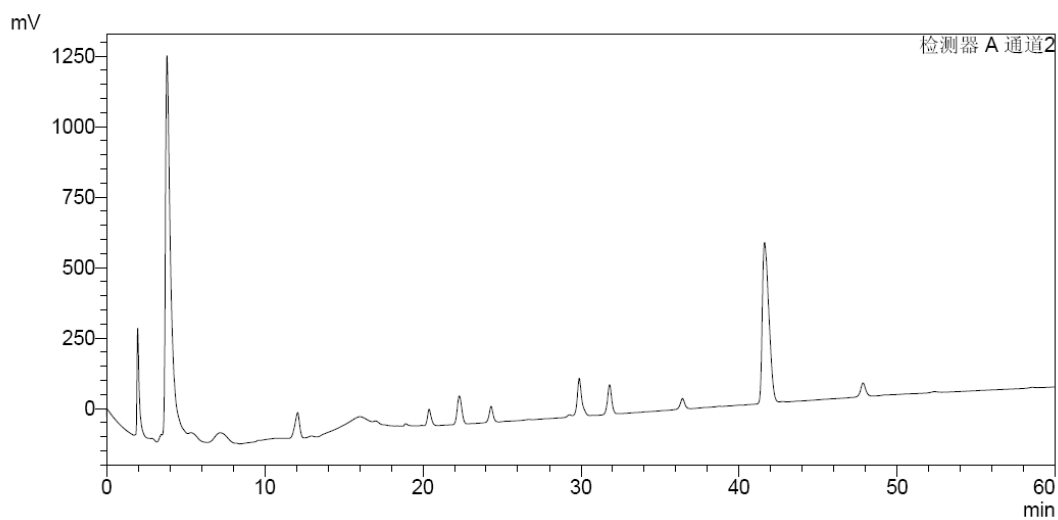
检测器 A Ch1 234nm

名称	保留时间	面积	高度	面积 %	高度 %
△IVh	3.448	35476	4888	0.119	0.418
△IVa	7.317	1203865	20926	4.027	1.789
3	13.522	8846	398	0.030	0.034
△IVs	21.061	919340	55337	3.076	4.730
△IIa	23.056	1159225	54501	3.878	4.658
△IIIa	25.214	540336	31366	1.808	2.681
△Ih	27.800	16917	922	0.057	0.079
△IIsgal	30.411	110009	7952	0.368	0.680
△IIs	31.090	3033720	154749	10.149	13.227
△IIIs	33.169	2320299	120135	7.762	10.268
△Ia	38.070	449192	22267	1.503	1.903
△Ip	40.022	4768	337	0.016	0.029
△IIa-IVsgal+△Is	43.636	19396404	666056	64.890	56.930
△IIa-IIsglu	49.919	692977	30119	2.318	2.574
		29891373	1169952	100.000	100.000

图 3 肝素钠样品

<Chromatogram>





1 检测器 A 通道1/234nm
2 检测器 A 通道2/202nm

峰表

检测器 A Ch1 234nm

名称	保留时间	面积	高度	面积 %	高度 %
△IVh	3.462	100780	13579	0.281	0.950
△IVa	7.200	1540970	28054	4.304	1.963
3	12.785	26032	937	0.073	0.066
△IVs	20.391	1272083	78512	3.553	5.493
△IIa	22.300	1366211	68422	3.816	4.787
△IIIa	24.312	656743	38430	1.834	2.689
△Ih	26.682	51251	2315	0.143	0.162
△IIsgal	29.271	138446	9404	0.387	0.658
△IIs	29.886	3703363	193233	10.343	13.519
△IIIs	31.804	2780332	150615	7.765	10.537
△Ia	36.418	502380	25385	1.403	1.776
△Ip	38.713	19831	2237	0.055	0.157
△IIa-IVsgal+△Is	41.610	22920327	784989	64.013	54.919
△IIa-IIsglu	47.833	727235	33240	2.031	2.326
		35805983	1429352	100.000	100.000