

高效阴离子交换-脉冲安培法分析藻酸双酯钠的单糖组成和比例

王悦^{1,2}, 陈欣桐^{1,2}, 李振华¹, 宋玉娟^{1,2}, 范慧红^{1,2*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要: 藻酸双酯钠为类肝素药物, 临床上主要用于治疗缺血性心、脑血管疾病, 本研究建立藻酸双酯钠的单糖组成和单糖比例测定方法。通过正交分析的方法确定了样品前处理最佳反应条件, 样品经过三氟乙酸水解, 氢氧化钠溶液中和, 采用高效阴离子交换-脉冲安培检测法, 使用 CarboPac®PA20 阴离子交换柱分离, 流动相采用 200 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液和 1 mol·L⁻¹ 醋酸钠溶液梯度洗脱, 采用脉冲安培检测器, 金工作电极, Ag/AgCl 参比电极进行检测。对方法的线性、准确度和精密度进行了考察, 结果表明该方法具有简单、专属、灵敏、应用范围广等特点。对不同企业藻酸双酯钠原料药进行了测定, 能够准确测定藻酸双酯钠单糖组成, 为藻酸双酯钠的结构鉴定提供单糖信息。

关键词: 阴离子交换; 脉冲安培法; 糖组成; 藻酸双酯钠; 甘露糖醛酸; 古罗糖醛酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2346-06

Analysis of monosaccharide composition and monosaccharide ratio in propylene glycol alginate sodium sulphate drugs by high performance anion exchange chromatography -pulsed amperometric detection

WANG Yue^{1,2}, CHEN Xin-tong^{1,2}, LI Zhen-hua¹, SONG Yu-juan^{1,2}, FAN Hui-hong^{1,2*}

(1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China)

Abstract: The paper aims to establish the method to determine the monosaccharide composition and monosaccharide ratio in propylene glycol alginate sodium sulphate (PSS). Samples were hydrolyzed with trifluoroacetic acid, neutralized with sodium hydroxide solution after the reaction conditions for sample pretreatment were optimized via orthogonal analysis. A high performance anion exchange chromatography (HPAEC) coupled with pulsed amperometric detector (PAD) was performed on a CarboPac®PA20, using 200 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide solution and 1 mol·L⁻¹ sodium acetate solution as mobile phase. The established HPAEC-PAD method was validated by testing the linear relationship, precision and accuracy, and showed exclusive, sensitive, rapid and wide use. The monosaccharide composition of PSS from different manufacture can be accurately determined with great significance for the structural identification of PSS.

Key words: anion exchange chromatography; pulsed amperometric detection; monosaccharide composition; propylene glycol alginate sodium sulphate; mannuronic acid; guluronic acid

藻酸双酯钠 (propylene glycol alginate sodium sul-

fate, PSS, 图1) 是以海带提取物褐藻酸钠为原料, 经丙酯化和磺化等结构修饰步骤得到的一种海洋低分子硫酸多糖化合物, 其糖链具有较强聚阴离子性质, 为类肝素药物, 临床上主要用于缺血性心、脑血管疾病的治疗^[1,2]。

藻酸双酯钠的化学名称是褐藻酸丙二醇酯硫酸酯钠盐, 分子骨架由 β -D-甘露糖醛酸 (D-mannuronic acid,

收稿日期: 2021-04-19; 修回日期: 2021-06-25.

基金项目: 国家重大新药创制课题资助项目 (2015ZX09303001); 海洋药物国家重点实验室开放性课题资助项目 (LMDBKF201806).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-53851585, E-mail: shenghuayaoshi@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0569

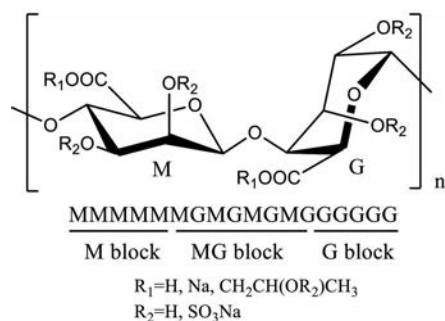


Figure 1 The general structure of propylene glycol alginate sodium sulphate (PSS)

M) 和 α -L-古罗糖醛酸 (*L*-guluronic acid, G) 通过 1→4 糖苷键连接而成^[3], 在一个褐藻酸钠分子中, 两种糖醛酸单体无序排列, 某一个糖链片段可能是只含有 M 或 G 的连续嵌段, 也可能是由 MG 交替连接构成嵌段共聚物, 不同来源的海藻酸或褐藻酸钠 (如巨藻、海带等), 其 G 和 M 的比例有所不同。M 和 G 的结构只有 C5 位置上的羟基位置不同, 但聚合后的糖链空间构象差异很大, 因此 M、G 比例不同的样品, 理化和药效性质有很大差异, 高 G 的样品糖链刚性较强, 且具有较高的出血风险, 因此需对产品的单糖比例加以控制^[3,4]。此外, 测定单糖组成以及 M 和 G 的比例有助于对藻酸双酯钠样品的结构确证及鉴别, 还可以在一定程度间接显示不同厂家产品起始物料的种属差别, 该方法的建立对类似品种结构分析也有借鉴意义。

高效阴离子交换-脉冲安培法可直接对几乎所有单糖和大部分寡糖、低聚糖等进行分析, 与液相色谱、毛细管电泳、气相色谱法相比, 该方法解决了梯度洗脱条件在示差折光或低波长紫外检测器中应用的困难, 而且具有无需衍生化处理、灵敏度高、不使用有毒、有机溶剂的优点, 对糖的检出限可达到 pmol 级。方法采用适当的水解方式将糖链进行降解, 在强碱性流动相 (pH > 12) 中, 水解后的糖醛酸形成氧负离子进行阴离子交换, 根据羟基在金电极表面发生氧化还原反应产生的电流大小实现糖的检测^[5]。

本研究建立了三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 水解糖链, HPAEC-PAD 法测定藻酸双酯钠单糖组成和比例的方法, 该方法可对藻酸双酯钠进行特异性鉴别, 还可以通过 M、G 的比值评估藻酸双酯钠起始物料质量的稳定性, 在一定程度上保证产品的质量和药效稳定。

材料与方法

材料 本实验所用样品包括不同生产企业的藻酸双酯钠原料药 13 批 (其中厂家 T 生产样品 1 批, 样品编号 T1; 厂家 W 生产样品 4 批, 样品编号 Q4-1、W2-1z、

W2-2、M3-2; 厂家 D 生产样品 4 批, 编号 H-5、J6-1、HN-Y3、WZT-7; 厂家 Q 生产样品 4 批, 编号 Y20-4、HN-Y5、Q7-1P、BD2-3)。

仪器与试剂 ICS3000 型离子色谱仪 (美国戴安公司), 配有溶液组织器 EO, 单四元梯度泵 SP (带脱气装置), 色谱箱组合 DC, 电化学检测器 ED, 自动加样器 AS, 色谱工作站 chromeleon 6.80 SP1, 11250-RT 型氮吹仪 (美国 OA 公司)。

M 对照品 (河北百灵威科技有限公司, 98.0%, 批号 L5C0T05), G 对照品 (河北百灵威科技有限公司, 98.0%, 批号 LMC0R64)。50% 氢氧化钠溶液 (美国 Akfa Aesar 公司), 醋酸钠 (美国 Dionex 公司), TFA (美国 Sigma 公司), 氢氧化钠 (国药集团, 分析纯)。

色谱条件 色谱柱: Carbopac PA20 (3 mm×150 mm, 6 μm); 保护柱: Carbopac PA20G (3 mm×50 mm, 6 μm); 淋洗液: A 为去离子水、B 为 200 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液、C 为 1 mol·L⁻¹ 醋酸钠溶液, 梯度洗脱: 0~10 min (70% A, 10% B, 20% C), 10.1~25 min (60% B, 40% C), 25.1~30 min (70% A, 10% B, 20% C); 流速为 0.45 mL·min⁻¹; 脉冲安培检测器, 金工作电极, Ag/AgCl 参比电极, 四电位波形^[6]; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

糖醛酸对照品溶液的制备 分别取 M、G 对照品, 配制成糖醛酸混标溶液 (1 mg·mL⁻¹), 取 0.5、1、2、5 和 8 mL 分别置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制得浓度为 0.005、0.01、0.02、0.05 和 0.08 mg·mL⁻¹ 糖醛酸混标溶液线性系列溶液。

供试品溶液的制备 取藻酸双酯钠原料药, 精密称定, 加水制得约含藻酸双酯钠 1 mg·mL⁻¹ 溶液; 加入适量的酸溶液加热彻底水解糖链, 取出后氮吹 10 min; 用 20% 氢氧化钠溶液中和至弱碱性后全部转移至 25 mL 量瓶中, 加水定容, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 4 h 内完成进样。

糖链水解条件考察^[7-9] 以 M、G 糖醛酸峰面积、未水解完全糖峰面积为考察指标, 对糖链的水解方式进行考察。取供试品溶液适量, 按单因素实验分别考察硫酸溶液 (0.3 和 0.5 mol·L⁻¹) 和 TFA 溶液、反应温度 (100、120 和 140 °C)、TFA 溶液浓度 (2、4 和 6 mol·L⁻¹)、水解时间 (30、60 和 90 min) 对糖链水解效果的影响。

在单因素实验基础上, 选取反应温度 (A)、酸溶液浓度 (B)、水解时间 (C) 以及 $V_{\text{样品溶液}} : V_{\text{酸溶液}}$ 体积比 (D) 4 个因素, 每个因素取两个水平。A: 120 和 140 °C; B: 4 和 6 mol·L⁻¹; C: 30 和 60 min; D: $V_{\text{样品溶液}} : V_{\text{酸溶液}} = 3 : 1.5$ 和 3 : 3, 按正交表 L₁₆ (2¹⁵) (表 1) 进行实验组合, 并考察 4 个因素的全一级交互作用。

准确度考察 取已知 M、G 比例供试品溶液 3 mL,

Table 1 $L_{16}(2^{15})$ orthogonal experimental design of hydrolysis conditions of propylene glycol alginate sodium sulphate (PSS). A: Temperature; B: Acid solution concentration; C: Time; D: Volume ratio of sample solution and acid solution

Experiment No.	Column											Combination
	A	B	AB	C	AC	BC	D	AD	BD	CD		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	A1B1C1D1
2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	A1B1C1D2
3	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	A1B1C2D1
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	A1B1C2D2
5	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	A1B2C1D1
6	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	A1B2C1D2
7	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	A1B2C2D1
8	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	A1B2C2D2
9	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	A2B1C1D1
10	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	A2B1C1D2
11	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	A2B1C2D1
12	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	A2B1C2D2
13	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	A2B2C1D1
14	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	A2B2C1D2
15	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	A2B2C2D1
16	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	A2B2C2D2

平行9份。按照最佳水解条件将供试品溶液水解、氮吹、中和至弱碱性后,分别按照待测样品M、G含量的80%、100%和120%加入3个浓度水平的糖醛酸对照品溶液,每个浓度平行制备3份,同时计算原料药中两种糖醛酸的回收率。

精密度考察 取对照品溶液($0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $5 \mu\text{L}$,注入离子色谱仪,记录色谱图,连续进样6针。计算G和M峰面积 (peak area, A) 的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

线性范围考察 取糖醛酸混标溶液线性系列溶液 0.005 、 0.01 、 0.02 、 0.05 和 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别进样,考察方法对M、G两种糖醛酸的测定线性范围。

结果

1 糖链水解条件单因素考察

1.1 水解方式 分别考察了TFA、硫酸溶液对糖链的水解情况,对比不同水解用酸的色谱图后发现,和硫酸水解效果相比,TFA作为水解用酸时样品色谱图中未水解完全的寡糖峰较少,得到的G和M峰面积更大,在一定程度上说明水解更为完全(图2);此外,硫酸水解后的样品色谱图中会出现多个杂质峰,峰面积随着水解时间的延长显著增大,推测与硫酸具有的强氧化性有关。高浓度硫酸根对于离子色谱的分离系统会造成一定的干扰,进样前应尽量去除,和TFA相比,前处理的步骤比较复杂,因此选用TFA作为水解用酸更加简便。

1.2 水解温度 采用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 溶液分别在 100 、 120 和 $140 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度条件下水解 60 min , M、G 峰面积在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 达到最大值后下降,可见温度对水解产生了较大的影响,温度较低时水解不完全,而温度过高会破坏

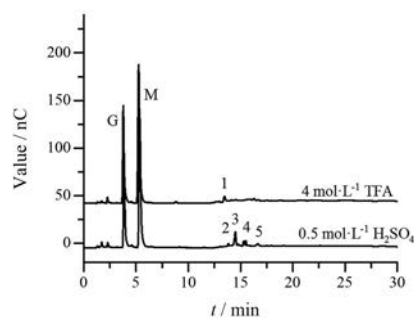


Figure 2 High performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) chromatograms of PSS hydrolyzed by different acid solutions (factory code: Q; sample code: HN-Y5). 1-3: Degradation impurities; 4 and 5: Incompletely hydrolyzed oligosaccharides

水解得到的单糖组分,因此采用 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 作为水解温度。

1.3 酸溶液浓度 在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度水平下分别以 2 、 4 和 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 反应 60 min , 结果显示 G 峰面积基本保持不变, M 峰面积在 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 条件下达到最大值后趋于稳定,可见水解所用酸溶液浓度对水解效果影响较小。但是 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 不能充分将糖链水解完全,考虑到在水解完全的情况下尽量选用温和的水解条件以保护单糖醛酸,因此初步确定采用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 溶液进行水解。

1.4 水解时间 在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度水平下采用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA 分别水解 30 、 60 和 90 min , M、G 峰面积在 60 min 时达到峰值并下降,初步确定 60 min 为最佳水解时间。

2 4因素2水平水解条件正交实验考察

按G和M峰面积进行方差分析(表2、3)可知,各因素影响大小排序为温度 \times 时间 $>$ 浓度 \times 时间 $>$ 温度 \times 浓度 $>$ 温度 \times 体积比,选择峰面积最大的交互作用作

Table 2 $L_{16}(2^{15})$ orthogonal experimental results of hydrolysis conditions of PSS

Experiment number	Combination	Peak area	
		G	M
1	A1B1C1D1	5.113	9.248
2	A1B1C1D2	5.023	9.754
3	A1B1C2D1	14.449	24.586
4	A1B1C2D2	14.329	24.623
5	A1B2C1D1	7.998	14.366
6	A1B2C1D2	8.957	15.376
7	A1B2C2D1	13.372	22.735
8	A1B2C2D2	12.757	25.164
9	A2B1C1D1	12.602	21.731
10	A2B1C1D2	12.882	22.988
11	A2B1C2D1	10.885	25.633
12	A2B1C2D2	6.107	20.045
13	A2B2C1D1	13.302	29.965
14	A2B2C1D2	9.761	21.765
15	A2B2C2D1	5.539	18.822
16	A2B2C2D2	2.735	16.272

为优选条件, 确定G峰面积达到最大时的水解条件为120 °C、4 mol·L⁻¹、60 min, 体积比为3:3。

3 方法学考察

3.1 准确度 在80%、100%和120%加标水平下, G的回收率在88%~102%内 ($n=9$, RSD = 6.1%); M的回收率在98%~105%内 ($n=9$, RSD = 3.8%)。在剧烈水解条件下, 糖醛酸不稳定, 因此本次回收率实验中, 没有在样品的水解步骤前加入糖醛酸标样, 而且和M相比, G在酸溶液中更加不稳定, 因此G的回收率略低于M。

3.2 精密度 计算连续进样6针的G和M峰面积的RSD分别为1.89%和0.93%。

3.3 专属性 糖混标溶液(0.02 mg·mL⁻¹)的色谱图中M、G的分离度大于20, 分离度满足要求。

3.4 线性范围 分别以G和M的峰面积A为纵坐标, 对照品溶液的质量浓度c (mg·mL⁻¹)为横坐标绘制标准曲线, G线性方程为 $A = 865.17c + 0.4732$, R^2 为0.9998, M的线性方程为 $A = 984.64c - 0.1758$, R^2 为

Table 3 The orthogonal experiment variance analysis of the influence of four hydrolysis conditions on the area of M and G peaks (^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{***} $P < 0.001$)

Source of variation	G					M				
	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
A	4.188	1	4.188	3.522	0.119	0.5575	1	61.502	11.142	0.021 [*]
B	3.035	1	3.035	2.553	0.171	4.5734	1	2.144	0.388	0.560
C	1.286	1	1.286	1.081	0.346	1.7289	1	66.781	12.098	0.018 [*]
D	7.168	1	7.168	6.028	0.058	0.9477	1	7.698	1.395	0.291
AB	14.648	1	14.648	12.319	0.017 [*]	0.7662	1	10.567	1.914	0.225
AC	163.199	1	163.199	137.249	<0.001 ^{***}	127.0766	1	256.338	46.440	0.001 ^{***}
BC	15.532	1	15.532	13.063	0.015 [*]	5.9486	1	54.929	9.951	0.025 [*]
AD	7.530	1	7.530	6.333	0.053	2.4590	1	22.709	4.114	0.098
BD	0.105	1	0.105	0.088	0.779	5.7834	1	0.775	0.140	0.723
CD	2.194	1	2.194	1.845	0.232	0.0002	1	0.004	0.001	0.980
Error	5.945	5	1.189							
Total variation	224.831	15								

0.9997, 表明M和G在0.005~0.08 mg·mL⁻¹浓度内线性关系良好。

3.5 样品溶液稳定性 供试品溶液在分别放置0、1、2、3、4、5和12 h后进样分析, 考察完成前处理后的供试品溶液的放置稳定性, 结果显示样品溶液在4 h内稳定, 12 h后峰面积明显下降, 因此应在制备完成后4 h内完成进样分析。

4 样品测定

4个厂家生产的藻酸双酯钠原料共13批样品的测定结果(表4)显示, 受试样品M/G比值均大于1.5, 但Q企业和W企业的部分样品M/G均在2.0以上, T企业和D企业样品的M/G比值均在1.5~1.7之间, 提示不同原料药生产企业的M/G比值有一定差别。

Table 4 The M/G ratio results of PSS samples

No.	Sample	Factory code	Sample code	M/G ratio
1	PSS API	T	T-1	1.67
2	PSS API	W	Q4-1	1.95
3	PSS API	W	W2-1z	2.23
4	PSS API	W	W2-2	2.38
5	PSS API	W	M3-2	1.57
6	PSS API	D	H-5	1.55
7	PSS API	D	J6-1	1.64
8	PSS API	D	HN-Y3	1.57
9	PSS API	D	WZT-7	1.73
10	PSS API	Q	Y20-4	2.54
11	PSS API	Q	HN-Y5	2.24
12	PSS API	Q	Q7-1P	2.26
13	PSS API	Q	BD2-3	2.13

讨论

藻酸双酯钠是我国首个自主研发的海洋多糖一类新药, 在临床上有着广泛的应用, 对该产品的二次开发以及以褐藻胶为母体结构的其他药物研发也是目前的研究热点之一。对其结构进行准确的测定和表征是更好地研究其药理活性、稳定工艺和产品质量的基础。

多糖的降解方法主要包括物理降解法(超声波和

辐射降解)、化学降解法(酸、碱、氧化、自由基降解等)和生物降解法(酶法)等,每种降解方式的原理、降解强度、作用位点和产物结构都不相同,应根据不同的目的选择适用的降解方式。其中酸降解法操作简便、速度快、对糖链水解效果较为彻底,而且能够保持糖环本身的结构特点,比较适用于藻酸双酯钠单糖组成的分析,但酸性多糖糖链的降解难度要大于中性糖,因此对降解条件的控制要求更高。之前有研究表明TFA会使G糖醛酸降解^[7],推荐使用稀硫酸溶液对藻酸双酯钠糖链进行降解。本文对比了TFA溶液和稀硫酸溶液的降解效果以及G糖峰面积的变化,发现在适当的水解条件下,可以最大程度保护单糖不被破坏,两种酸溶液的水解效果基本相当。但是采用具有强氧化性的硫酸溶液降解时,会产生较多杂质峰,而且使用离子色谱进行分析时,硫酸根会对测定产生较大的影响,需要尽量除尽硫酸根的干扰。而TFA可采用氮吹的方式将其除尽,处理较为简便,因此推荐使用TFA进行水解。

单糖化合物在阴离子交换柱上的洗脱顺序依次为氨基糖、中性糖、酸性糖,因此对于糖醛酸的分析,需要在保证分离效果的前提下加大洗脱强度。寡糖和多聚糖在阴离子交换柱上的保留行为主要与分子大小(聚合度)和形状(连接位置和构型)有关,藻酸双酯钠水解不完全的寡糖色谱峰在M、G后面被洗脱,随着水解强度的增加,寡糖峰面积逐渐下降,因此除了考察M、G峰面积外,水解不完全的糖峰个数、面积(图2)也是作为水解程度的辅助判断因素。

液相色谱、气相色谱是分离单糖、低聚糖等常用的分离技术^[10,11],通常需将样品进行柱前衍生化处理,产生疏水性、紫外吸收或挥发性化合物后进行检测。对于基体复杂,前处理步骤较多的样品来说,会有多种因素影响衍生化效果,衍生物的稳定性也会影响测定结果,并且检测器的非选择性容易造成测定误差。高效阴离子交换-脉冲安培法可用于糖类的直接分离测定,该方法具有不用衍生、灵敏度高、准确度高、不使用有机溶剂的优点^[12-15]。

褐藻中所含褐藻胶在生物合成过程中其M单糖随着成熟而逐渐部分地在分子水平上转变成G,其在分子中转变的量和位置等依海藻的种类、生态环境、季节有明显的变化,而且海藻不同组织部位的M/G比值也不同^[16]。此外,褐藻胶糖链聚M、聚G嵌段的理化性质、对酸碱的敏感度,溶解性等也不相同。受试各原料药生产企业的M/G比值有所差异,提示各生产企业所用原材料或生产工艺有所区别,但同一生产企业的产品结果比较稳定,说明当原材料和生产工艺确定,M/G比值是可以控制在一个稳定的范围内的。藻酸双酯钠

单糖组成与药理活性直接相关,有报道称高G含量与临床出血倾向直接相关,因此应该在原料药质量标准中对M/G比例进行相应的控制。本文方法可实现对藻酸双酯钠原料药以及起始物料褐藻酸盐的单糖组成检测,使企业可以更加注意原材料的选择和生产工艺。保证药品的临床效果,减少不良反应发生。

作者贡献:王悦负责实验设计和实施、结果分析、文章构思和撰写工作;陈欣桐负责实验的实施和数据的整理工作;李振华负责部分实验实施工作;宋玉娟负责材料的收集和整理;范慧红负责文章的审核。

利益冲突:本文研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Xue YT, Li S, Liu WJ, et al. The mechanisms of sulfated polysaccharide drug of propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS) on bleeding side effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 194: 365-374.
- [2] Ma H, Qiu PJ, Xin M, et al. Structure-activity relationship of propylene glycol alginate sodium sulfate derivatives for blockade of selectins binding to tumor cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 210: 225-233.
- [3] Xin M, Ren L, Sun Y, et al. Anticoagulant and antithrombotic activities of low-molecular-weight propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS) [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 114: 33-40.
- [4] Xue YT, Ren L, Li S, et al. Study on quality control of sulfated polysaccharide drug, propyleneglycol alginate sodium sulfate (PSS) [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 330-337.
- [5] Wang Y, Fan HH. Quality control strategies and research progress in quality control technology of polysaccharide biochemical drugs [J]. *Chin Pharm J (中国药杂志)*, 2021, 56: 8-12.
- [6] Li J, Song YJ, Han CX, et al. Quantification of free sugars in glycopeptide drugs by high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection [J]. *Chin Pharm J (中国药杂志)*, 2015, 50: 1547-1552.
- [7] Wu J, Zhao X, Ren L, et al. Determination of M/G ratio of propylene glycol alginate sodium sulfate by HPLC with pre-column derivatization [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 104: 23-28.
- [8] Cao YX, Li K, Qin XM, et al. Comparative study on different areas of Astragali Radix based on oligosaccharides characteristic map and immunological activity evaluation of partial acid hydrolyzed [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 5598-5606.
- [9] Zhao D, Nie B, Song K, et al. Determination of mono saccharide in Radix Puerariae polysaccharide by ion chromatography [J]. *Chin J Anal Lab (分析实验室)*, 2017, 36: 745-749.
- [10] Zhang YH, Zhou W, Li B. Determination of sugar alcohols sweeteners in sugar-free food by derivatization capillary gas chromatography [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2013, 41:

- 911-916.
- [11] Shi LX, Li K, Qin XM, et al. Identification of different *Bupleurum* varieties based on carbohydrate-specific chromatograms [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2020, 55: 2968-2975.
- [12] Liang LN, Zhang P, Cai YQ, et al. High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection for simultaneous determination of monosaccharides and uronic acids [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34: 1371-1374.
- [13] Rocklin RD, Clarke AP, Weitzhandler M. Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrates *via* a new quadruple-potential waveform [J]. *Anal Chem*, 1998, 70: 1496-1501.
- [14] Mou SF, Liu KN, Ding XJ. *Ion Chromatography Method and Application* (离子色谱法方法及应用) [M]. 2nd Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 76-79.
- [15] Rocklin RD, Pohl CA. Determination of carbohydrates by ion exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. *J Liq Chromatogr*, 1983, 6: 1577-1590.
- [16] Ji MH. *Seaweed Chemistry* (海藻化学) [M]. Beijing: Science Press, 1997: 235-239.