DOI: 10.3724/SP. J. 1096.2011.01798

液相色谱-电喷雾-四级杆-飞行时间质谱法分析琼胶寡糖

许艳婷 王秀娟 苏小玲 徐继林 陈海敏 严小军 陈娟娟 (宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室,宁波 315211)

摘 要 建立超高效液相色谱-电喷雾-四级杆-飞行时间质谱联用技术快速分离鉴定琼胶寡糖的方法。通过 分析比较3种色谱柱(BEH Amide、BEH C₈及 Atlantis T3) 对琼胶寡糖的分离结果发现 ,Amide 色谱柱具有最佳 优势,在无需样品衍生的状态下,可使聚合度介于3~29的琼胶寡糖得以良好分离,分析迅速,灵敏度高。而 衍生后 则是采用 Atlantis T3 柱分离效果最佳 在紫外吸收色谱图上分离状态良好。色谱通过与电喷雾-四级 杆-飞行时间质谱联用,能准确获得每个色谱信号对应的质谱结构信息,谱图清晰、简单,归属容易。

关键词 琼胶寡糖; BEH Amide 色谱柱; 液相色谱; 电喷雾-四级杆-飞行时间质谱

1 引 言

琼胶是海洋中含量极为丰富的多糖。琼胶寡糖是由13联接的β-D-半乳吡喃糖和14联接的36-内醚-α-L-半乳吡喃糖残基,通过反复交替联接而生成的链状中性糖(图1),包括琼寡糖和新琼寡糖^[1]。 ·通常 β-琼胶酶(海洋菌株中分离出的主要琼胶酶)可以裂解琼胶糖的β-1 A 糖苷键 /生成以β-D-半乳糖 为还原性末端和以3 6-内醚- α - ℓ -半乳糖为非还原性末端的新琼寡糖(Neoagaro-oligosaccharides)系列; α -琼 胶酶则裂解琼胶糖的 α-1 3 糖苷键 /生成以 β-D-半乳糖为非还原性未端和以 3 6-内醚-α-L-半乳糖为还原 性末端的琼寡糖(Agaro-oligosaccharides)系列^[2]。研究发现新琼寡糖没有显著的生理活性而琼寡糖则具 有多种活性 且这些活性与寡糖的聚合度(Ddegree of polymerization ,DP) 密切相关 此性质在琼寡糖药物 开发及植物病害防御方面起重要作用^[3]。关于不同聚合度寡糖的制备方法研究已有报道^[4],建立一种

快速、灵敏、稳定的寡糖定性分析方法,实时监控寡 糖水解进程以及实现进一步生化分析尤为重要。

高效液相色谱(HPLC)具有快速、灵敏和样品处 理简单等优点,已成为糖类分析的重要工具。有研 究者采用反相离子对色谱法分析寡糖^[5],但该方法 存在柱稳定时间较长、质谱分析中本底干扰高等不 足;也有研究者采用柱前衍生紫外或荧光检测法,但



琼胶寡糖的结构 图 1 Fig. 1 Structure of agaro-oligosaccharide

样品衍生操作复杂 耗时耗力^[6] 限制了寡糖相关的深入研究。

由于分析方法的局限性,至今还未见分离鉴定琼胶寡糖数超过22的报道[7]。本研究以琼胶寡糖为 研究对象 利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)系统,选用 Amide 色谱柱,在 无需样品衍生的状态下使聚合度介于3~29的琼胶寡糖得以成功分离,并可获得其准确质谱信息,结果 优于对照组采用柱前衍生在反相色谱柱 C。和 T3 上的分析结果。

实验部分 2

2.1 仪器与试剂

ACQUITY 超高效液相色谱分析系统 配置 ACQUITY 自动进样器; Q-TOF Premier 高分辨四极杆与 飞行时间串联质谱仪; Atlantis T3 色谱柱(250 mm × 4.6 mm , 5.0 μm) ,ACQUITY UPLC BEH Amide 色 谱柱(100 mm × 2.1 mm , 1.7 μm) , ACQUITY UPLC BEH C₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm , 1.7 μm); Mass-

²⁰¹⁰⁻¹²⁻²⁴ 收稿; 2011-06-29 接受

本文系教育部长江学者与创新团队项目(No. IRT0734)、浙江省公益性项目(No. 2010C32021)、教育部博士点基金(No. 200816460002) 资助

E-mail: yanxiaojun@ nbu. edu. cn

Lynx 4.1 数据处理系统,以上均为美国 Water 公司产品; R-215 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); FD5508 冷冻干燥仪(美国 SIM 公司); W-0 系列恒温水浴锅、S-212 系列恒速搅拌器(上海申顺公司); 超纯水系 统(法国Millipore 公司)。

琼脂(福建泉州市泉港化工厂);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);超纯水由超纯水系统制备。

2.2 琼胶寡糖制备与衍生

琼胶寡糖制备:称取适量琼胶,用0.1 mol/L HCl 配制成1.5%反应溶液,以400~500 r/min 的速度 充分搅拌,在50℃降解5h,用1 mol/L NaOH 中和,旋转蒸发浓缩,冷冻干燥,备用。

琼胶寡糖衍生:称取1 mg 琼胶寡糖样品于聚四氟乙烯垫片的螺旋盖试管中 加入10 μL 水和40 μL 衍生剂(由1 mmol α-萘胺、35 mg 硼氰氢化钠、41 μL 冰醋酸和450 μL 甲醇混合配制而成) 在80 ℃反 应30 min 后,冷却至室温,加入水和氯仿各1 mL 混均后静置分层,取水相层进行液-质分析。

2.3 色谱与质谱条件

ACQUITY UPLC BEH Amide 柱色谱条件: 柱温 50 ℃ 流动相 A 为 0.1% 氨水-乙腈溶液、B 为水-甲 醇(2:1,*V/V*) 溶液。洗脱梯度: 0 ~ 5 min 40% B; 5 ~ 10 min 40% ~ 50% B; 10 ~ 15 min 50% B; 15 ~ 20 min 50% ~ 5% B; 保持 5 min。进样量 5 μL 流速 0.25 mL/min。

ACQUITY UPLC BEH C₈ 柱色谱条件: 柱温 35 ℃ 流动相 A 为水、B 为甲醇。洗脱梯度: 0~1 min, 5%~35% B; 1~6 min ,35% B; 6~10 min ,35%~100% B; 10~15 min ,100% B。进样量 5 µL ,流速 0.35 mL/min ,同时开启紫外检测器 检测波长 243 nm。

Atlantis T3 柱色谱条件: 柱温 35 ℃ 流动相 A 为水、B 为甲醇。梯度洗脱: 0 ~ 3 min ,10% ~ 20% B; 3 ~ 35 min ,20% ~ 80% B; 35 ~ 36 min ,80% ~ 100% B; 36 ~ 46 min , 100% B。进样量 5 µL ,流速 0.20 mL/min ,同时开启紫外检测器 检测波长 243 nm。

质谱条件:采用电喷雾电离(ESI)源,分别在正、负离子电离模式下进行质谱分析。TOF离子飞行 方式采用 V模式。离子源温度120 ℃ 脱溶剂温度350 ℃ 脱溶剂氮气流速800 L/h, 推孔反吹氮气50, 碰撞室能量6 V 四极杆扫描范围 *m/z*100 ~ 3000。仪器在使用前用甲酸钠进行质量线性校正,使用 0.5 mg/L 亮脑啡肽作为外标物对目标离子进行精确质量锁定。采用正离子电离模式时,毛细管电离电 压 2.8 kV 取样锥孔电压 30 V;采用负离子电离模式时,毛细管电离电压 2.5 kV 取样锥孔电压 25 V。

3 结果与讨论

3.1 琼胶寡糖的高效液相色谱分离

未经衍生的琼胶寡糖采用 BEH Amide 柱梯度洗脱(图2)。寡糖按聚合度由低到高依次在 BEH Amide 柱上得到最佳分离。在总离子流色谱图中正负离子模式下均可以观察到最大聚合度为 21 的色 谱信号,而根据寡糖质谱学特征,用提取离子色谱流的方式,在正离子模式下,最高可以观察到二十九糖;在负离子模式下,最高可以观察到二十七糖(图3)。以两糖单位聚合度增加的寡糖主峰色谱信号随 保留时间延长而依次出现,主要出峰时间位于 2~17 min。在负离子模式下,总离子流色谱图中从十一 糖到十九糖峰的前沿均可见一个小峰,其为 DP +1 的偶数糖峰;在正离子模式下,由于灵敏度较低,偶数糖信号不明显。

为了克服糖类物质检测灵敏度低、极性大,在反相柱上不易保留的难题,多采用样品柱前衍生方法^[8],使之携带紫外或荧光基团,可提高检测灵敏度,还可使糖链分子携带疏水集团,降低糖链的极性, 使之在反相色谱柱上的保留增强。为比较此方法与直接用 Amide 柱分离方法,采用 α-萘胺(α-NA)柱 前衍生后进行反相色谱分离,衍生后不同聚合度的琼胶寡糖在反相柱上出峰次序与在 Amide 柱上相反 (图4)。

对琼寡糖进行衍生后,多都选择 C₈柱进行分离^[7]。本实验选择 1.7 μm 粒径柱材料的 BEH C₈柱进 行分离,主要出峰时间在 3~5 min。在紫外吸收光谱图上,三糖和五糖可得到较好分离,从七糖到十七 糖分离欠佳,十七糖之后观察不到独立紫外吸收色谱峰(图4A-1),而且绝大多数紫外吸收峰都无法达





Fig. 2 Total ion current chromatogram of agaro-oligosaccharides separated by Amide chromatographic column A-1. 正离子模式下 琼胶寡糖的总离子流图(Total ion current chromatogram of agaro-oligosaccharides in positive mode); A-2, A-3. 奇数糖、偶数糖的提取离子流图(A-2, A-3 were extracted ion current chromatogram of odd and even sugars separate-ly); B-1: 负离子模式下 琼胶寡糖的总离子流图(Total ion current chromatogram of agaro-oligosaccharides in negative mode); B-2 B-3: 奇数糖、偶数糖的提取离子流图(B-2, B-3 were extracted ion current chromatogram of odd and even sugars separate-ly) 。

到基线分离。质谱信号峰的分离效果更差(图 4A-2)。

而用 5.0 µm 粒径柱材料的 T3 柱分离效果明显优于 C₈,但琼胶糖出峰时间主要在 36-45 min,耗时 较长。色谱图中可以观察到明显的从三糖到十九糖的紫外吸收峰(图 4B-1),而且基本达到基线分离, 但十三糖之后质谱信号灵敏度较低(图 4B-2)。由于紫外吸收强度只跟样品中琼寡糖衍生上去的 α -萘 胺量成正比,而每一分子的琼寡糖只衍生一个分子的 α -萘胺,所以样品中各聚合度寡糖相对于总寡糖 的紫外相对强度即可表示各寡糖相对总寡糖的量,从而可以利用此方法对样品中的寡糖组成进行相对 定量分析。在本实验中,相邻的偶数与奇数糖在紫外检测中的响应信号基本完全重叠,一个色谱峰中包 含了相邻偶数与奇数糖的信号,由于在正离子模式下各寡糖衍生物质谱峰信号基本均是 [M + H]⁺峰, 故可根据各寡糖 [M + H]⁺提取离子信号的相对高低计算出重叠峰中相邻偶数与奇数糖的比例,从而实 现所有寡糖的相对组成的定量分析。寡糖衍生物很不稳定,在 25 ℃室温条件下,一般需在 12 h 内完成 实验^[9],否则信号强度将明显减弱,这也是利用该方法进行寡糖研究的最大局限。

3.2 寡糖的质谱特征

采用电喷雾电离(ESI) 源对未经衍生的样品进行高分辨质谱分析。在正、负离子模式下,分别可以 得到聚合度 3~29 和 3~27 的奇数糖清晰质谱信号(表1),相邻偶数糖的质谱学规律类似,但信号较弱。

未经衍生的琼胶寡糖 ESI-MS 谱图清晰、简单 归属容易,能准确判断出化合物的分子量。在正离子



图 3 提取离子色谱流中可观察到的琼胶寡糖

Fig. 3 Theagaro-oligosaccharides observed in extracted ion current chromatogram





Fig. 4 Total ion current chromatogram of agaro-oligosaccharides separated by reversed-phase chromatographic columns

注(Note): A. 负离子模式下,运用 C₈ 柱分离得到的紫外吸收图(A-1)及 TIC 图(A-2) (The ultraviolet spectra (A-1) and total ion current chromatogram (A-2) separated by C₈ in negative mode); B. 负离子模式下, 运用 T3 柱分离得到的 AU 图(B-1)及 TIC 图(B-2) (The ultraviolet spectra (B-1) and total ion current chromatogram (B-2) separated by T3 in negative mode)。峰顶上的数字表示琼胶寡糖聚合度(The numbers above the peak represent oligo-K-carageenan of monosaccharide unit)。

模式下,从三糖到九糖,单电荷分子离子为基峰(图5A-1);十一糖开始出现双电荷分子离子,但单电荷 分子离子仍然是基峰;从十三糖到二十七糖,以双电荷分子离子为基峰,十五糖起出现三电荷离子 (图5B-1),二十九糖则以三电荷分子离子为基峰;另外,三糖到七糖还出现了2M系列的离子,三糖中

1802

甚至还有 $[3M + NH_4]^+$ 。可见 随着聚合度的增加 寡糖很容易出现多电荷分子离子。这些分子离子峰均以 $[M + nNH_4]^{n+}$ 信号丰度最高, $[M + nNa]^{n+}$ 次之, $[M + nH]^{n+}$ 信号最低。

表1 琼胶寡糖在正负两种模式下的质谱数据(m/z)

Table 1 Ions identified for the agaro-oligosaccharides in both positive and negative ion-mode ESIMS(m/z)

模式 Ion mode	Ions	寡糖聚合度 Degree of polymerization for oligosaccharides							
		3	5	7	9	11	13	15	17
ESI +	$[3M + NH_4]^+$	1476.7							
	[2M + Na] ⁺	995.3	1607.5	2219.8					
	$[2M + NH_4]^+$	990.3	1602.6	2214.9					
	[2M + H] ⁺	973.4							
	[M + Na] ⁺	509.1	815.2	1121.3	1427.5	1733.7	2039.9	2345.6	2652.0
	$[M + NH_4]^+$	504.2*	810.3*	1116.4*	1422.5*	1728.7*	2034.9	2340.8	2647.0
	[M + H] ⁺	487.2	793.3	1099.4	1405.4	1711.5			
	$[M - H_2O + H]^+$	469.1	775.3	1081.4	1387.4				
	$[M + 2NH_4]^{2+}$					873.5	1026.6*	1179.7*	1333.2*
	$[M + 2H]^{2+}$					856.0	1009.1	1162.1	1315.2
	$[M + 3NH_4]^{3+}$							792.3	894.6
	$[M + 3H]^{3+}$							775.2	
ESI –	[3M – H] [–]	1457.6							
	[2M – H] [–]	971.3	1583.7	2195.9					
	[M – H] [–]	485.1*	791.3*	1097.4*	1403.6*	1709.9	2015.8	2321.1	2628.0
	$[M - 2H]^{2}$				701.4	855.5*	1007.6*	1160.7*	1313.4*
	$[M - 3H]^{3}$								875.6
模式 Ion mode	Ions	寡糖聚合度 Degree of polymerization for oligosaccharides							
		19	21	23	25	27	29		
ESI +	$[M + 2NH_4]^{2+}$	1485.8*	1638.8*	1792.3*	1945.4*	2098.4*	2251.5		
	$[M + 2H]^{2+}$	1468.3	1621.8						
	$[M + 3 NH_4]^{3+}$	997.0	1098.7	1200.7	1303.0	1405.1	1507.2*		
ESI –	$[M - 2H]^{2}$	1466.5*	1619*	1773.0*	1926.1	2079.3			
	$[M - 3H]^{3}$	977.7	1079.6	1182.0	1284.1*	1386.2*			

*:基峰离子(The base peak ion)。

在负离子模式下,九糖就开始出现双电荷分子离子,十一糖起以双电荷分子离子为基峰,十七糖起 出现三电荷离子,二十五糖起以三电荷分子离子为基峰,形成的均为去质子准分子离子峰[M – nH]^{*-} (图5A-2,B-2)。在所采用的色谱质谱条件下,可以得到小于二十七糖的清晰结构信息。琼胶寡糖容 易出现多电荷分子离子以及容易产生加钠峰的质谱规律与文献[10]的结果基本一致,但该文献中6种 寡糖(偶数糖,聚合度为2~12)均未发现[M+H]⁺的准分子离子峰。

衍生后琼胶寡糖正、负离子模式下分别出现 $[M + nH]^{n+}$, $[M - nH]^{n-}$ 的准分子离子基峰(图 6), 同样容易出现多电荷分子离子及 2M 乃至 3M 系列离子,与未衍生寡糖的质谱规律类似。

测定多糖及其衍生物的分子量,常用方法有超速离心法、高压电泳法、膜渗透压法、粘度法和光散射 法等,这些方法对于低分子量糖类误差很大。质谱凭借其灵敏度高,样品用量少的优点,在糖类分析中 得以广泛应用。样品的挥发性和热稳定性不同,采用不同的电离方式会得到不同的结果。在糖类化合 物的结构分析中,快原子轰击质谱(FAB-MS)曾发挥重要作用,它能够提供分子量信息的准分子离子峰 和化合物结构信息的碎片峰,但测试所用样品量多,基质干扰大,并且只能产生单电荷离子,因此不适用 于分析分子量超过分析器质量范围的分子。电喷雾电离(ESI)作为一种新颖的电离技术,对大分子化 合物分子量测定有了重要突破。它采用软电离方式,可以测定完整的糖链分子质量,得到的分子离子通 常带有多个电荷,将质谱分子量检测范围增加。本实验证明,ESI-MS 能准确判断出琼胶寡糖的分子量, 其图谱简单,归属容易。

文献报道中,分离鉴定的琼胶寡糖多为偶数糖^[4,10],而本实验结果则表明琼胶降解产物中奇数糖与 偶数糖并存,并且以奇数糖为主。由此可见,琼胶寡糖水解具有多样性及复杂性的特点,建立一种灵敏、 稳定的寡糖定性分析方法显得尤为重要。



图 5 琼胶五糖(A5) 与十七糖(A17) 在正、负离子模式下的质谱图

Fig. 5 ESI-MS spectras of pentasaccharide (A5) and heptadesaccharide in (A17) positive and negative mode A. 五糖在正离子模式(A-1) 与负离子模式(A-2) 下的质谱图(ESI-MS spectra of pentasaccharide in positive (A-1) and (A-2) negative mode); B. 十七糖在正离子模式(B-1) 与负离子模式(B-2) 下的质谱图(ESI-MS spectra of heptadesaccharide in positive (B-1) and (B-2) negative mode)



图 6 琼胶五糖经 α-萘胺衍生后的质谱图

Fig. 6 ESI-MS spectra of pentasaccharide-α-naphthylamine derivative A. 正离子模式(Positive mode); B. 负离子模式(Negative mode)。

References

- 1 Lahaye M , Yaphe W. Carbohydr. Res. , 1989 , $190(\,1)$: $249 \sim 265$
- 2 Karlsson A , Singh S K. Carbohydrate Polymers , 1999 , 38(1): $7 \sim \! 15$
- 3 Weinberger F, Richard C, Kloareg B, Kashman Y, Hoppe H G, Friedlander M. J. Phycol., 2001, 37(3): 418~426
- 4 CHEN Hai-Min, YAN Xiao-Jun, ZHENG Li, ZHANG Wei-Wei(陈海敏, 严小军, 郑立, 张伟伟). Journal of Zhengzou Institute of Technology(郑州工程学院学报), 2003, 24(3): 41~44
- 5 MU Qing, ZHANG Ying, HUANG Lin-Juan, WANG Zhong-Fu(牟青, 张英, 黄琳娟, 王仲孚). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2009, 27(1): 24~28
- 6 WANG Wei-Tong, CHEN Qi-Juan, CHAI Wen-Gang(王维通,陈琪娟,柴文刚). Chinese Biochemical Jornal(生物化学 杂志), 1988, 4(2): 116~123
- 7 Chen H M , Zheng L , Lin W , Yan X J. Talanta , 2004 , 64(3): 773 ~777

- 8 Royle L , Mattu T S , Hart E , Langridge J I , Merry A H , Murphy N , Harvry D J , Dwek R A , Rudd P M. Analy-tical Biochemistry , 2002 , 304(1): 70~90
- 9 CHEN Hai-Min(陈海敏), The Hydrolysis, Labeling Analysis, Structure Elucidation and Bioaetivity Research of Agarobiose Oligopolymers(琼二糖寡聚体特效降解、标记分析、结构特征与生物活性的研究), Qingdao(青岛): Institute of oceanology, Chinese academy of sciences(中国科学院海洋研究所), 2004
- 10 MAO Wen-Jun, LIN Hong, GUAN Hua-Shi(毛文君,林洪,管华诗). Journal of Fishery Sciences of China(中国水产科学), 2001, 8(3): 69~72

Analysis of Agaro-oligosaccharide by Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry

XU Yan-Ting , WANG Xiu-Juan , SU Xiao-Ling , XU Ji-Lin , CHEN Hai-Min , CHEN Juan-Juan , YAN Xiao-Jun^{*} (Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ministry of Education, Ningbo 315211)

Abstract A method was developed to isolate and identify agaro-oligosaccharides by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS). In the experiment, three chromatographic columns (BEH Amide, BEH C₈ and Atlantis T3) were used to isolate agaro-oligosacchrides. It was found that the BEH Amide had excellent isolation effect. Agarobiose oligomers with degree of polymerization (DP) ranging from 3 to 29 could be isolated rapidly and sensitively, and no derivatization procedure was needed. However, after derived with α -naphthylamine, agarobiose oligomers could be separated better by Atlantis T3 column, and a perfect AU spectrum was obtained. When combined liquid chromatography with ESI-Q-TOF-MS, accurate structure information of each chromatogram peak was obtained, the spectra were clear and the molecular weight of those oligosacchandes could be assigned easily. **Keywords** Agaro-oligosaccharides; Amide chromatogram column; Liquid chromatography; Electrospray ion-ization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry

(Received 24 December 2010; accepted 29 June 2011)

沃特世科技(上海)有限公司成都分公司成立

为推进西南地区市场的拓展、更快地响应并服务西南地区客户 沃特世科技(上海)有限公司于 2011 年 8 月在成都 设立了新的分公司 这是沃特世公司(Waters[®])继上海总部、北京、广州分公司之后在中国大陆成立的第三家分公司 这 也意味着沃特世公司对中国及西南地区的长期承诺及投资信心。

作为为全球最大的液相色谱、质谱及相关产品专业生产厂家之一,沃特世公司在成都设立分公司,将进一步加大对 西南地区客户和合作伙伴的支持力度、提升当地的售后服务水平,更能让沃特世更好地融入当地市场、了解本土需求,以 便更好地帮助客户解决他们面临的困难和挑战。此外,成都周边地区也可便捷地得到沃特世的技术服务。

成都分公司位于成都市新光华街7号航天科技大厦1803室,电话:028-65545999,传真:028-65545998。