

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 陈娟娟 严小军*

(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 1,3 联接的 β -D-半乳糖和 1,4 联接的 3,6-内醚- α -L-半乳糖残基, 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 -1,4 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-半乳糖为非还原性末端和以 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(Degree 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, 实时监控寡糖水解释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-四级杆-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 C₈ 和 T3 上的分析结果。

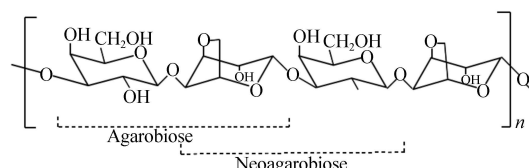


图 1 琼胶寡糖的结构

Fig. 1 Structure of agaro-oligosaccharide

2 实验部分

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 高分辨四级杆与飞行时间串联质谱仪; Atlantis T3 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μ m), ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m), ACQUITY UPLC BEH C₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m); 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 5 h,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 μ L 水和 40 μ L 衍生剂(由 1 mmol α -萘胺、35 mg 硼氰化钠、41 μ L 冰醋酸和 450 μ L 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,混匀后静置分层,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 μ L,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 μ L,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 μ L,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,锥孔反吹氮气 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基团,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)。

对琼胶寡糖进行衍生后,多都选择 C₈柱进行分离^[9]。本实验选择 1.7 μ m 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

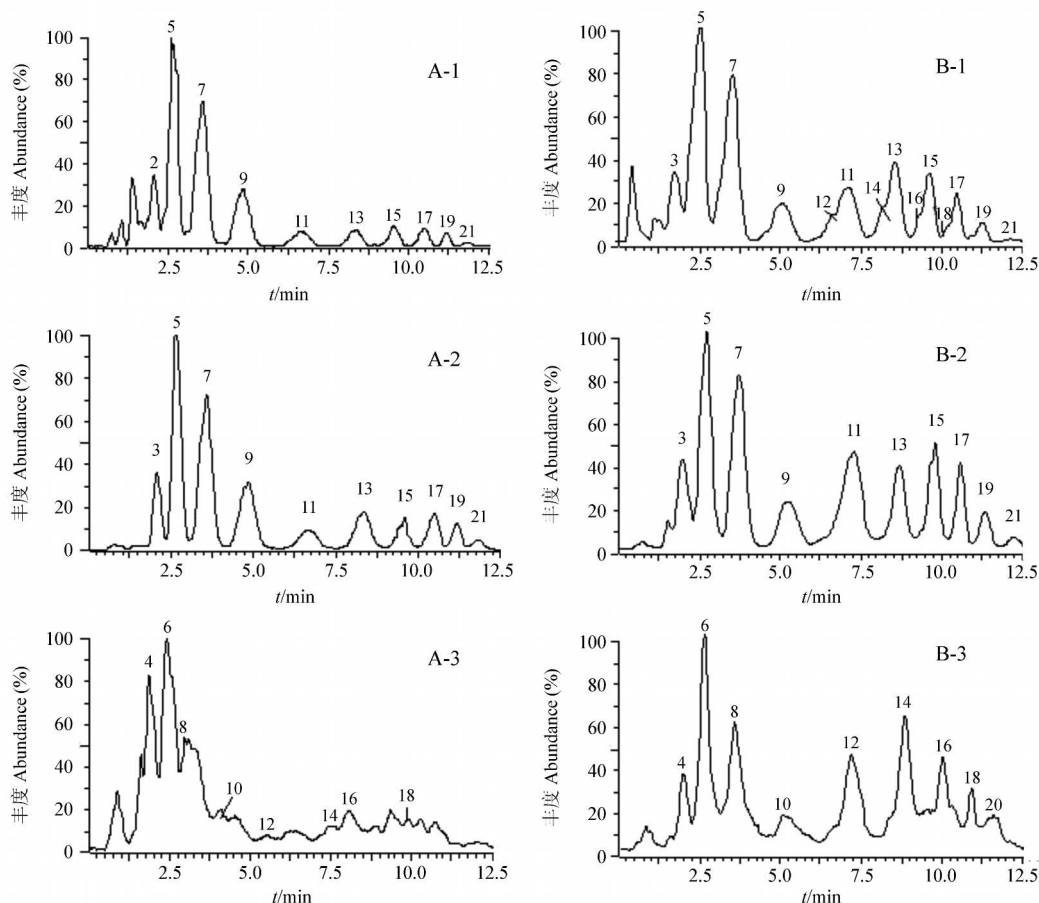


图 2 琼胶寡糖在 Amide 柱上的色谱分离

Fig. 2 Total ion current chromatogram of agar-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 agar-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 separately); B-1: 负离子模式下, 琼胶寡糖的总离子流图(Total ion current chromatogram of agar-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 separately)。

到基线分离。质谱信号峰的分离效果更差(图 4A-2)。

而用 $5.0\ \mu\text{m}$ 粒径柱材料的 T3 柱分离效果明显优于 C_8 , 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 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰, 故可根据各寡糖 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 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 $25\ ^\circ\text{C}$ 室温条件下, 一般需在 12 h 内完成实验^[8], 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

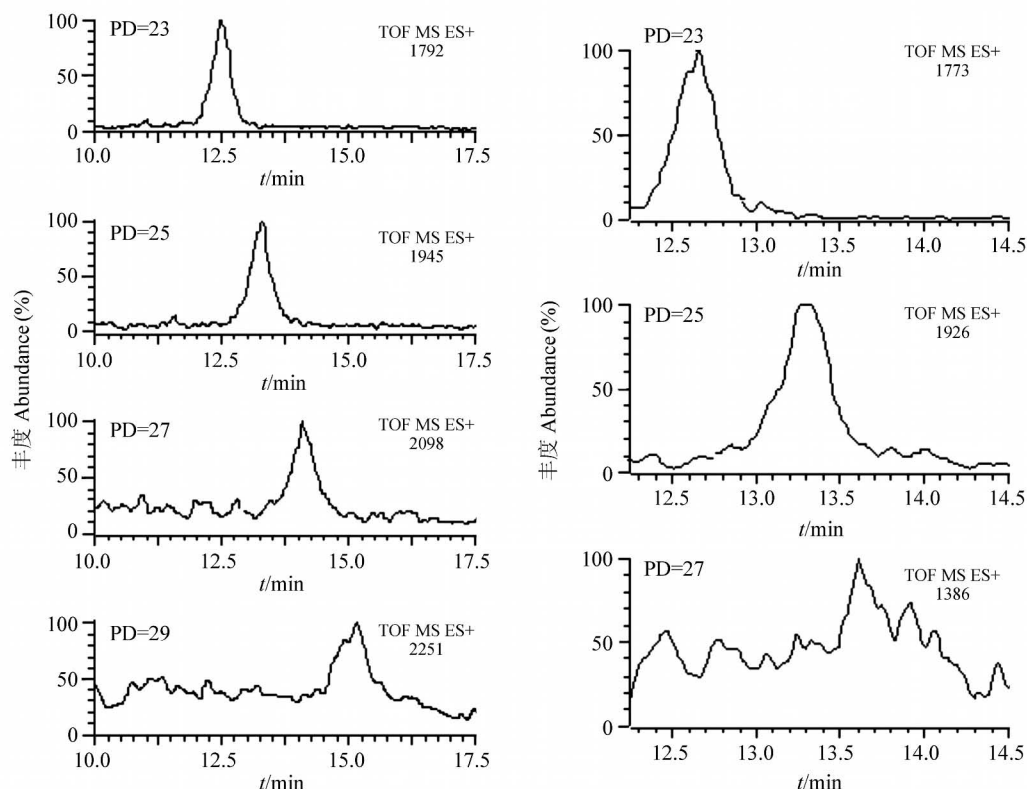


图 3 提取离子色谱流中可观察到的琼胶寡糖

Fig. 3 The agar-oligosaccharides observed in extracted ion current chromatogram

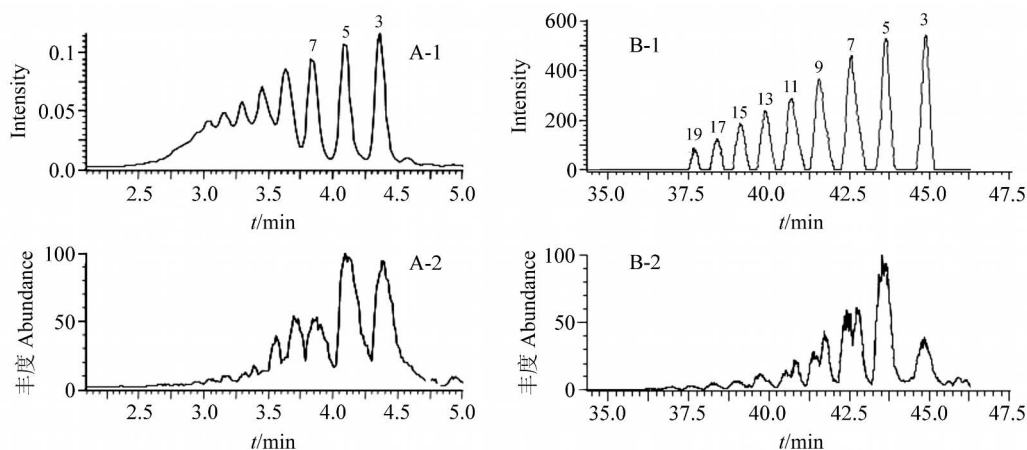


图 4 琼胶寡糖在反相柱上的色谱分离

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

注(Note): A. 负离子模式下,运用 C_8 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 C_8 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

甚至还有 $[M + NH_4]^+$ 。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 agar-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 +	$[M + NH_4]^+$	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 -	$[M - H]^-$	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						
	$[M + 3NH_4]^{3+}$	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 $[M - nH]^{n-}$ (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 [8,10],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。

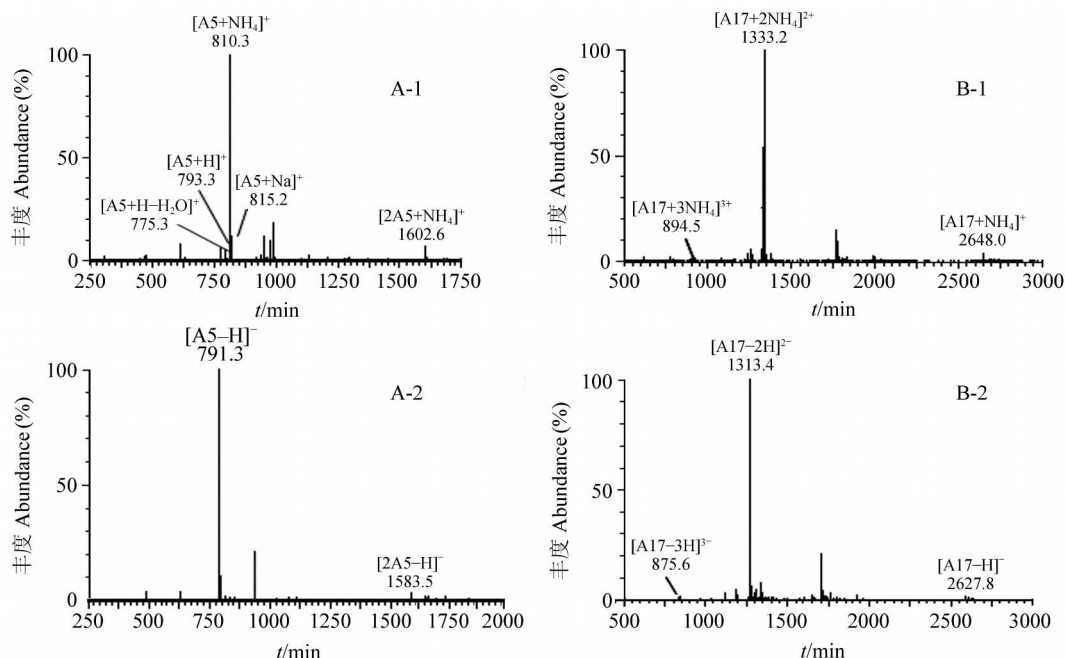


图 5 琼胶五糖(A5) 与十七糖(A17) 在正、负离子模式下的质谱图

Fig. 5 ESI-MS spectras of pentasaccharide (A5) and heptadesaccharidein (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)

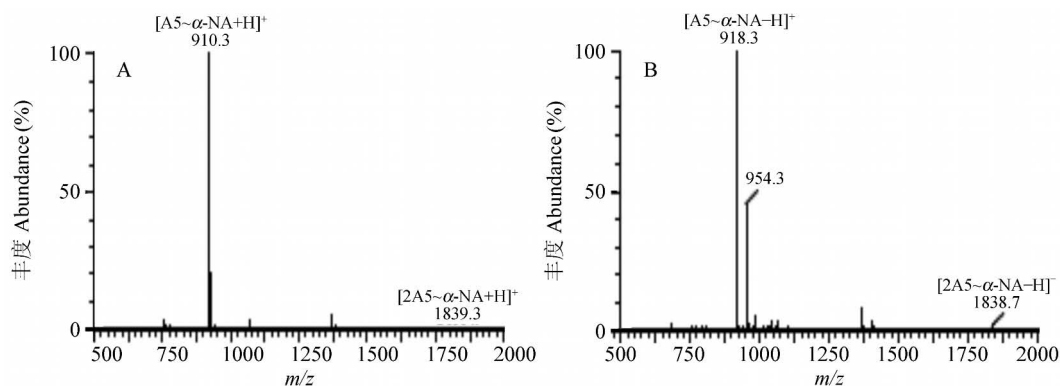


图 6 琼胶五糖经 α -萘胺衍生后的质谱图

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 ~ 265
- 2 Karlsson A, Singh S K. *Carbohydrate Polymers*, **1999**, 38(1) : 7 ~ 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 Zhengzhou 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 Journal*(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

