

κ -卡拉胶寡糖的反相离子对-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱研究

高洋 陈海敏 徐继林 陈德莹 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 建立反相离子对-超高效液相色谱(RPIP-UPLC) 和电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱(ESI-Q-TOF-MS) 联用技术快速分离鉴定硫酸寡糖的方法。以 20 mmol/L 庚胺(pH 4) 为离子对试剂, 25% 庚胺甲酸盐纯水溶液(A) 和 25% 庚胺甲酸盐甲醇溶液(B) 为梯度洗脱溶剂, κ -卡拉胶寡糖通过 BEH C₁₈ 反相柱分离后, 分别在正、负离子模式下进行四极杆-飞行时间质谱分析。结果表明, 聚合度为 3 ~ 45 的 κ -卡拉胶寡糖在 BEH C₁₈ 柱上得到很好的分离, 从每一个色谱峰对应的质谱图中可以准确获得直至 27 糖的各寡糖结构信息, 均为奇数糖, 与聚丙烯凝胶电泳结果吻合。所得的寡糖断裂规律对卡拉胶寡糖的快速鉴定和结构解析具有重要意义。

关键词 κ -卡拉胶, 反相离子对色谱-超高效液相色谱, 电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱, 聚丙烯凝胶电泳

1 引言

卡拉胶(Carrageenan) 是从红藻(诸如角叉菜、杉藻、麒麟菜) 中提取的水溶性的硫酸多糖^[1], 称为类肝素多糖, 是一种硫酸半乳糖, 均是以 1 β -D 半乳糖和 1 α -D 半乳糖交替连接形成骨架结构, 根据半乳糖中是否含有内醚键以及半乳糖上硫酸基的数量和连接位置不同区分为 7 种类型: κ -、 μ -、 ι -、 θ -、 λ -、 ϵ - 和 ν -。一般常见的卡拉胶为 κ -(A-G4S)、 ι -(A2S-G4S) 和 λ -(D2S6S-G2S) 卡拉胶^[2]。研究发现, 卡拉胶本身具有特殊的医疗作用, 其降解产物卡拉胶寡糖的活性研究也已得到充分的开展, 如抗凝血、抗肿瘤、抗病毒等, 且寡糖的活性优于多糖^[3~7]。

目前, 有关卡拉胶的研究主要集中于其分子结构和生物功能之间的关系^[8]。但是, 由于卡拉胶分子结构单元的不均一性和硫酸基的不稳定性, 很难对糖骨架及其连接的修饰基团进行详细的描述, 给其结构分析带来困难。通过原子快速轰击电离或者²⁵²Cf 等离子体解析肝素寡糖结构已有报道^[9~11], 但这两种方法均发现大量硫酸基的缺失现象。随着软电离技术发展, 电喷雾质谱技术(ESI-MS) 和基质辅助激光解吸质谱技术(MALDI) 被用于硫酸多糖的结构分析, 但是硫酸基很容易被 HSO₄⁻、NaSO₃⁻ 和 NaHSO₄ 取代, 因此, 准确的结构信息很容易丢失^[12]。Aristotelis 等^[13]利用 IP-RPLC/ESIMS 在正离子模式下, 对 κ -卡拉胶寡糖进行分析, 成功地将 κ -卡拉胶寡糖分离, 并得到聚合度 4 ~ 18 的偶数寡糖的 ESI-MS 结构信息。继而, IP-RPLC-ESIMS 的方法被用于肝素寡糖的结构分析^[14]。

本研究以 κ -卡拉胶寡糖为研究对象, 利用反相离子对-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(RPIP-UPLC-Q-TOF-MS) 系统, 进一步优化实验条件, 使聚合度 3 ~ 45 的 κ -卡拉胶寡糖在反相色谱柱上获得成功分离并准确获得聚合度 3 ~ 27 的寡糖的质谱信息, 为硫酸寡糖的进一步研究提供了有效的工具。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ACQUITY 超高效液相色谱分析系统、Q-TOF Premier 高分辨四极杆与飞行时间串联质谱仪、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100mm × 2.1mm, 1.7 μ m)、MassLynx 4.1 数据处理系统(美国 Waters 公司); BG-Power 600 型电泳仪、BG-verMINI 型垂直电泳槽(百晶公司); WD-9405B 脱色摇床(北京六一仪器厂); R-215 旋转蒸发仪(Büchi 公司); FD5508 冷冻干燥仪(SIM 公司); W- θ 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)。

2009-04-03 收稿; 2009-06-13 接受

本文系教育部长江学者与创新团队项目(No. IRT0734)、国家自然科学基金(No. 30800860) 资助项目

* E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

κ -卡拉胶(80 目 绿宝泉州生化有限公司); Sephadex G10(Pharmacia 公司); κ -卡拉胶寡糖标准品、质谱级甲醇、色谱纯甲酸、庚胺试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司); 纯水由超纯水系统制备。

2.2 κ -卡拉胶寡糖制备

将分级后的 κ -卡拉胶用 0.2 mol/L HCl 配制成 1% 反应溶液 在 60 °C 下降解 30 min ,同时用搅拌器以 400 ~ 500 r/min 的速度充分搅拌 ,降解液用 1mol/L NaOH 中和至 pH 7.0。降解液经 Sephadex G10 脱盐后 浓缩冻干备用。

2.3 色谱与质谱条件

ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ,自动进样 5 μ L ,柱温 45 °C。20 mmol/L 庚胺离子对试剂(pH 4 , 0.283 mL 甲酸-0.745 mL 庚胺 ,用水稀释至 250 mL) 流动相为 25% 庚胺甲酸盐水溶液(A) 和 25% 庚胺甲酸盐甲醇溶液(B) ,流速 0.35 mL/min ,洗脱梯度为: B 在 1 min 内从初始 25% 升至 50% ,3 min 内升至 65% ,12 min 内升至 80% ,0.5 min 内升至 100% 维持 3.5min ,再在 0.5 min 内降至 25% ,平衡 4.5 min。

电喷雾电离(ESI) 源温度 120 °C ,脱溶剂温度 250 °C ,脱溶剂氮气流速 400 L/h ,锥孔反吹氮气。四极杆扫描范围 m/z 300 ~ 4000。TOF 离子飞行方式采用 V 模式。使用亮脑啡肽作为外标物对目标离子进行精确质量锁定。负离子电离模式 ,毛细管电离电压 2.5 kV ,取样锥孔电压 40 V ,碰撞室能量 5 V; 正离子模式时 ,毛细管电离电压 2.8 kV ,取样锥孔电压 45 eV ,碰撞室能量 5 eV。

2.4 聚丙烯凝胶电泳(PAGE)

在 Tris-硼酸-EDTA 电泳系统下 ,对文献 [15] 的方法进行改进 ,将胶浓度提高到 25% ,恒流 20 mA ,室温下电泳 180 min。阿利辛兰染色后 ,若条带不清晰用银染方法复染。

3 结果与讨论

3.1 κ -卡拉胶寡糖的超高效液相色谱分离

采用庚胺甲酸盐水溶液和庚胺甲酸盐的甲醇溶液梯度洗脱 ,洗脱全程庚胺的浓度一直保持恒定。不同聚合度 κ -卡拉胶降解寡糖在 BEH C_{18} 柱上得到良好分离(图 2) ,且以两糖单位聚合度增加的寡糖色谱信号随着保留时间增加而依次出现。在正离子模式下可观察到最小聚合度为 3 糖(κ -3) 、最大聚合度为 27 糖(κ -27) 的色谱信号; 而在负离子模式 ,可观察到最大聚合度达 45 糖(κ -45) 的色谱信号。可见 ,负离子模式比正离子模式的图谱的峰型更加清晰、杂质峰少且灵敏度更高。

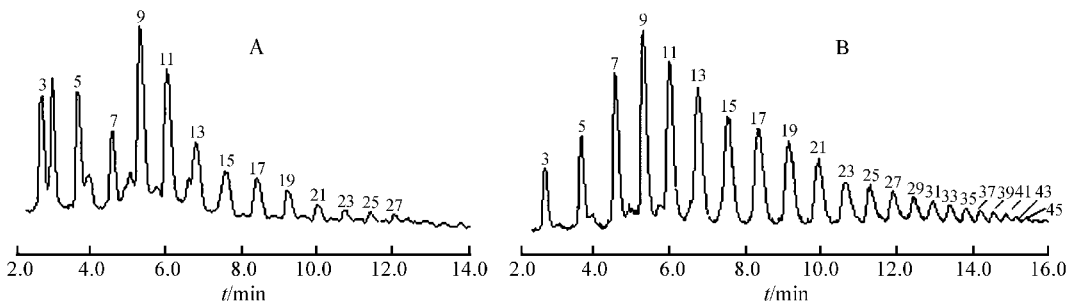


图 1 κ -卡拉胶寡糖分别在正离子模式(A) 和负离子模式(B) 下的总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram of oligo- κ -carrageenan with positive model(A) and negative model(B)

* 峰顶上的数字表示卡拉胶聚合度(Numbers above the peaks represent oligo- κ -carrageenan of the monosaccharide unit) 。

根据离子对色谱原理^[16] ,洗脱液中加入庚胺使本来带电荷的极性物质(κ -卡拉胶寡糖) 转化为带有疏水特征的中性分子 ,从而在 C_{18} 反相色谱上保留能力明显增强。由于分子的疏水性与待测分子结合的离子对试剂的数量成正比 ,因此 ,随着寡糖聚合度增加 ,结合到寡糖分子上离子对试剂数量也增加 ,其疏水性随之增加。超高效液相色谱(UPLC) 显著提高了样品的分离度和检测速度 ,可以对连续聚合度的寡糖进行完整的分离 ,峰形坚挺、清晰。在已有的报道中 ,正离子模式下 ,只可以分离得到最大聚合度的寡糖为 κ -18^[13] ;负离子模式下 ,得到的最大寡糖为 κ -12 ,均为偶数糖^[17]。本研究通过优化实验条件 ,显著提高了寡糖的分离度和检测灵敏度。

3.2 寡糖的质谱特征

采用电喷雾电离(ESI)源对样品进行高分辨质谱分析。在正、负离子两种模式下,均可以得到从 κ -3 到 κ -27 的清晰质谱数据,与 κ -卡拉胶所给出的理想结构相符合,且均为奇数糖(表 1)。

表 1 κ -卡拉胶寡糖在正负两种模式下的质谱数据Table 1 Ions identified for the oligo- κ -carrageenans in the positive and negative ion-mode ESIMS

寡糖 Oligosaccharide (A-G4S)	正离子模式 Positive model	质荷比 m/z	负离子模式 Negative model	质荷比 m/z
三糖 Trisaccharide κ -3	$[(A-G4S)_3G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_4 - H_2O]^+$	1168	$[(A-G4S)_3G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_4 - H_2O]^-$	936
	$[(A-G4S)_3G4S + (C_7H_{15}NH_3)_3]^+$	992		
	$[(A-G4S)_3G4S-SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_2 + H_2O]^+$	797	$[(A-G4S)_3G4S-SO_3 + H_2O]^-$	565
五糖 Pentasaccharide κ -5	$[(A-G4S)_5G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_5 - H_2O]^+$	1669	$[(A-G4S)_5G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_5 - H_2O]^-$	1437
	$[(A-G4S)_5G4S + (C_7H_{15}NH_3)_4]^+$	1493	$[(A-G4S)_5G4S + (C_7H_{15}NH_3)_4]^-$	1261
	$[(A-G4S)_5G4S + (C_7H_{15}NH_3)_3 + Na]^+$	1400		
	$[(A-G4S)_5G4S + (C_7H_{15}NH_3)_2 + 2Na]^+$	1307		
七糖 Heptasaccharide κ -7	$[(A-G4S)_7G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_7 - H_2O]^+$	2171	$[(A-G4S)_7G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_7 - H_2O]^-$	1938
	$[(A-G4S)_7G4S + (C_7H_{15}NH_3)_6]^+$	1994	$[(A-G4S)_7G4S + (C_7H_{15}NH_3)_6]^-$	1762
	$[(A-G4S)_7G4S + (C_7H_{15}NH_3)_5 + Na]^+$	1901		
	$[(A-G4S)_7G4S + (C_7H_{15}NH_3)_4]^{2+}$	1056		
	$[(A-G4S)_7G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_3 - H_2O]^{2+}$	1144		
			$[(A-G4S)_7G4S - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_3]^{2-}$	725
			$[(A-G4S)_7G4S - 2SO_3]^{2-}$	628
九糖 Nonasaccharide κ -9	$[(A-G4S)_9G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_9 - H_2O]^+$	2673	$[(A-G4S)_9G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_9 - H_2O]^-$	2440
	$[(A-G4S)_9G4S + (C_7H_{15}NH_3)_8]^+$	2497	$[(A-G4S)_9G4S + (C_7H_{15}NH_3)_8]^-$	2264
	$[(A-G4S)_9G4S + (C_7H_{15}NH_3)_7 + Na]^+$	2403		
	$[(A-G4S)_9G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_6 - H_2O]^{2+}$	1394		
	$[(A-G4S)_9G4S + (C_7H_{15}NH_3)_5]^{2+}$	1306		
			$[(A-G4S)_9G4S - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_5]^{2-}$	976
十一糖 Hendesaccharide κ -11	$[(A-G4S)_{11}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{11} - H_2O]^{2+}$	1645	$[(A-G4S)_{11}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{11} - H_2O]^{2-}$	1412
	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{10}]^{2+}$	1557	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{10}]^{2-}$	1324
	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_9 + Na]^{2+}$	1511		
			$[(A-G4S)_{11}G4S - 2SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_9]^{2-}$	1129
			$[(A-G4S)_{11}G4S - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_8]^{2-}$	878
十三糖 Tridesaccharide κ -13	$[(A-G4S)_{13}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{13} - H_2O]^{2+}$	1896	$[(A-G4S)_{13}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{13} - H_2O]^{2-}$	1664
	$[(A-G4S)_{13}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{12}]^{2+}$	1808	$[(A-G4S)_{13}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{12}]^{2-}$	1576
	$[(A-G4S)_{13}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{11} + Na]^{2+}$	1761		
十五糖 Pentadesaccharide κ -15	$[(A-G4S)_{15}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{15} - H_2O]^{2+}$	2147	$[(A-G4S)_{15}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{15} - H_2O]^{2-}$	1914
	$[(A-G4S)_{15}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{14}]^{2+}$	2058	$[(A-G4S)_{15}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{14}]^{2-}$	1826
	$[(A-G4S)_{15}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{13} + Na]^{2+}$	2012		
			$[(A-G4S)_{15}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{13} + 2Na + H_2O]^{3-}$	1123
十七糖 Heptadesaccharide κ -17	$[(A-G4S)_{17}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{17} - H_2O]^{2+}$	2398	$[(A-G4S)_{17}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{17} - H_2O]^{2-}$	2165
	$[(A-G4S)_{17}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{16}]^{2+}$	2309	$[(A-G4S)_{17}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{16}]^{2-}$	2077
	$[(A-G4S)_{17}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{15} + Na]^{2+}$	2263		
十九糖 Nonadesaccharide κ -19	$[(A-G4S)_{19}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{19} - H_2O]^{2+}$	2648	$[(A-G4S)_{19}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{19} - H_2O]^{2-}$	2416
	$[(A-G4S)_{19}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{18}]^{2+}$	2560	$[(A-G4S)_{19}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{18}]^{2-}$	2328
	$[(A-G4S)_{19}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{17}]^{3+}$	1745		
			$[(A-G4S)_{19}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{17} + Na]^{3-}$	1484
	$[(A-G4S)_{19}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{14} - H_2O]^{3+}$	1804		

续表 1(Continued to Table 1)

寡糖 Oligosaccharide (A-G4S)	正离子模式 Positive model	质荷比 <i>m/z</i>	负离子模式 Negative model	质荷比 <i>m/z</i>
二十一糖 Heneicosaccharide κ -21	$[(A-G4S)_{10}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{14} - H_2O]^2+$	2899	$[(A-G4S)_{10}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{10} - H_2O]^2-$	2667
	$[(A-G4S)_{10}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{13}]^2+$	2811	$[(A-G4S)_{10}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_9]^2-$	2578
	$[(A-G4S)_{10}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{12} + Na]^2+$	2764		
	$[(A-G4S)_{10}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{15} - H_2O]^3+$	1971		
	$[(A-G4S)_{10}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{14}]^3+$	1912		
二十三糖 Tricosaccharide κ -23	$[(A-G4S)_{11}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{15} - H_2O]^2+$	3149		
	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{14}]^2+$	3061		
	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{13} + Na]^2+$	3015		
	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{15}]^3+$	2080	$[(A-G4S)_{11}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_9]^3-$	1848
	$[(A-G4S)_{11}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{16} - H_2O]^3+$	2138	$[(A-G4S)_{11}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{10} - H_2O]^3-$	1906
二十五糖 Pentacosaccharide κ -25	$[(A-G4S)_{12}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{16} - H_2O]^2+$	3400		
	$[(A-G4S)_{12}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{15}]^2+$	3313		
	$[(A-G4S)_{12}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{16}]^3+$	2247	$[(A-G4S)_{12}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{10}]^3-$	2014
	$[(A-G4S)_{12}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{17} - H_2O]^3+$	2306	$[(A-G4S)_{12}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{11} - H_2O]^3-$	2073
二十七糖 Heptacosaccharide κ -27	$[(A-G4S)_{13}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{18} - H_2O]^3+$	2473	$[(A-G4S)_{13}G4S + SO_3 + (C_7H_{15}NH_3)_{12} - H_2O]^3-$	2241
	$[(A-G4S)_{13}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{17}]^3+$	2414	$[(A-G4S)_{13}G4S + (C_7H_{15}NH_3)_{11}]^3-$	2182

* 庚胺(Heptylamine($C_7H_{15}NH_3$)⁺, 16. 14) 。

所有寡糖的质谱信息都加合有庚胺分子, 这是由于寡糖的硫酸基能够与庚胺分子相连形成离子对, 在离子化过程中这种连接并不断裂。在正离子模式下, 从 κ -3 到 κ -5 单电荷分子离子为基峰(图 2), 从 κ -7 出现双电荷分子离子, 但是单电荷离子仍然为基峰, 从 κ -9 到 κ -17 以双电荷分子离子为基峰(图 3), κ -19 开始出现三电荷分子离子, 从 κ -21 到 κ -27 则以三电荷分子离子为基峰(图 4)。可见, 随着聚合度的增加, 很容易出现多电荷分子离子。在负离子模式下, κ -5 就出现双电荷分子离子峰, κ -17 出现三电荷分子离子峰, 并且出现很多庚胺离子未取代 Na^+ 的分子离子峰, 说明在负离子模式下, 庚胺与硫酸基的结合不如正离子模式强。另外, 虽然负离子模式下可观察到最大聚合度达 45 糖(κ -45) 的色谱信号(图 1), 但在所采用的色谱质谱条件下, 只能得到小于 κ -27 的清晰结构信息。随着聚合度增加, 分子离子峰信号逐渐减弱, 而其它碎片离子数大增(图 3 和图 4), 这是由于聚合度越高寡糖离子对分子离子的稳定性越低, 而且随着梯度洗脱过程中有机溶剂甲醇浓度的增加, 寡糖分子的离子化程度逐渐减弱。

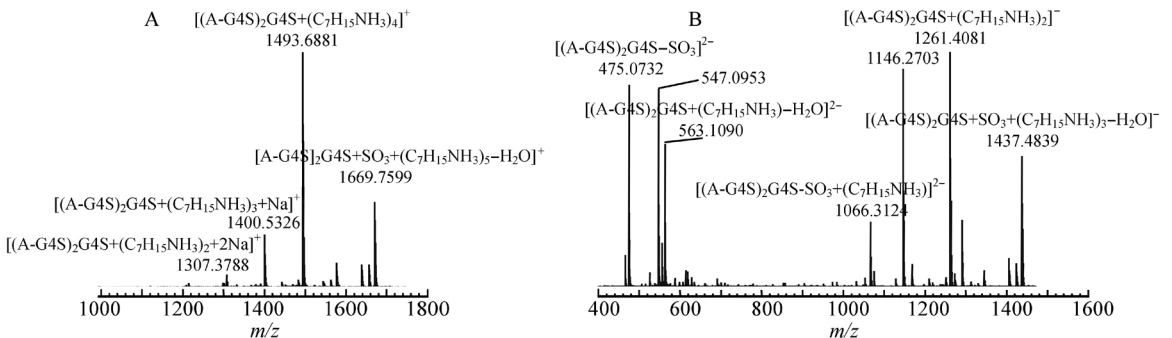


图 2 五糖(κ -5) 正离子模式(A) 和负离子模式(B) 质谱图

Fig. 2 ESIMS spectra of pentasaccharide (κ -5) with positive model(A) and negative model(B)

3.3 κ -卡拉胶寡糖的聚丙烯凝胶(PAGE)电泳

本研究分离得到的 κ -卡拉胶寡糖均为奇数糖, 这与文献 [13] 偶数糖的结果不一致。为了进一步证明本条件下降解后的寡糖的聚合度的奇偶数, 利用 PAGE 方法将 κ -卡拉胶寡糖(κ -CO) 进行电泳分析, 并以 κ -卡拉胶标准 8 糖(κ -8) 和标准 12 糖(κ -12) 为参照(见图 5)。在此条件下 κ -12 有明显的条带, 而 κ -8 没有条带, 降解物在此电泳条件下能够清晰看到 κ -9, κ -11, κ -13, κ -15, κ -17 及 κ -19 的条带, 也均

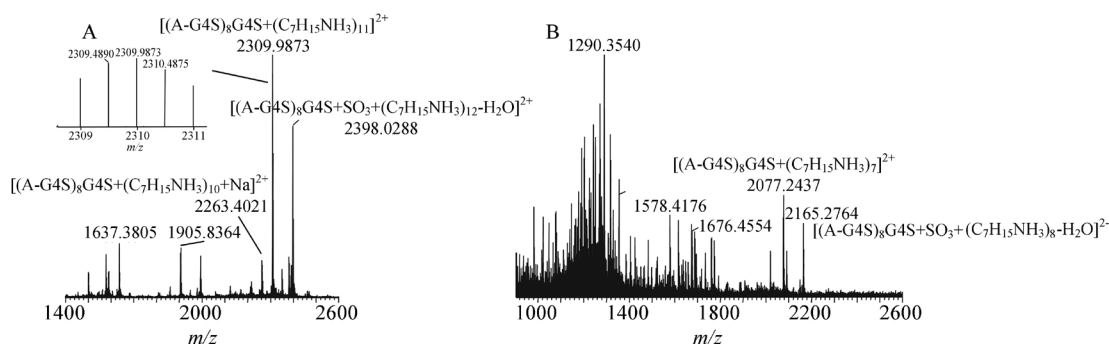


图 3 十七糖 (κ -17) 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 的质谱图
 Fig. 3 ESIMS spectra of heptadesaccharide (κ -17) with Positive model(A) and negative model(B)

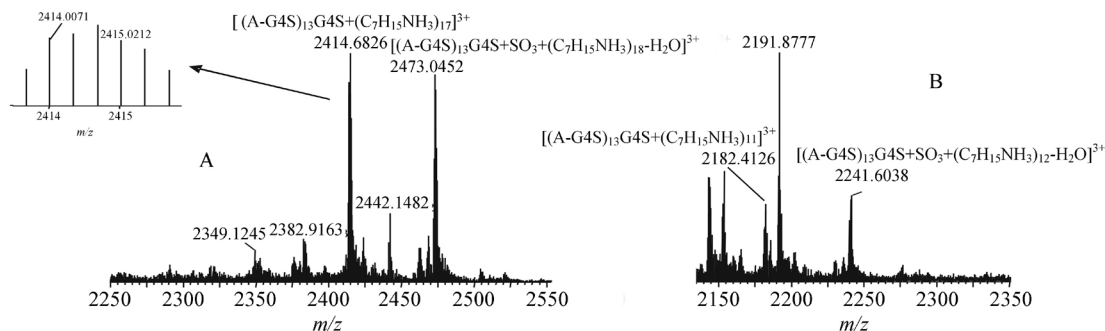


图 4 二十七糖 (κ -27) 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 的质谱图
 Fig. 4 ESIMS spectra of heptacosasaccharide (κ -27) with positive model(A) and negative model(B)

为奇数糖。

电泳与质谱学方法相结合有利于分析寡糖结构: 一方面,对于检测内容较多的反相液质分析系统而言,实验过程中需要不断地更换溶剂和清洗系统,此时电泳方法也可以作为常规的快速测定寡糖聚合度的方法;另一方面,电泳方法只能检测到一定范围聚合度的寡糖信号,而且无法对寡糖结构进行解析,但通过优化液质系统的分析条件,液质分析方法可检测到聚合度更高的寡糖信号,并能对寡糖的结构进行详细解析。

3.4 卡拉胶寡糖的质谱规律

由于硫酸基的不稳定性,比较高的锥孔电压会造成分子离子源内裂解断裂,而形成较复杂的质谱图,对质谱峰的判断和快速鉴定不利。但是锥孔电压太低会造成灵敏度降低。因此,对各寡糖主要峰的归属以及质谱的裂解规律进行解析,对 κ -卡拉胶寡糖的快速鉴定具有重要的意义。通过对分离得到的 13 种 κ -卡拉胶寡糖 (κ -3 到 κ -27) 的主要峰进行质谱解析可发现,卡拉胶寡糖庚胺离子对源内裂解后的质谱碎片间存在着特有的质/荷比差(表 2),这些差值可以为卡拉胶寡糖的结构鉴定提供定性依据。

表 2 卡拉胶质谱断裂规律质量差值

Table 2 Fragmentations rule of carrageenan for ESIMS

差值 Quality difference	质谱规律 Characteristic fragmentation pattern
75	116 - 23 - 18 庚胺离子未取代 Na^+ , 且有脱水发生 $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+$ do not replace Na^+ , and lose H_2O
93	116 - 23 庚胺离子未取代 Na^+ 造成 $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+$ do not replace Na^+
176	116 + 80 - 18 - 2 质谱峰加合一个 $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$ 基团后脱掉 H_2O 和 2H^+ Add $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$, lose H_2O and 2H^+
195	116 + 80 - 1 质谱峰脱去一个 $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$ 基团后加 H^+ Lose $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$, and add H^+
213	195 + 18 质谱峰脱去一个 $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$ 基团后加 H^+ , 再脱去 H_2O Lose $[\text{SO}_3 - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3]$, add H^+ , then lose H_2O

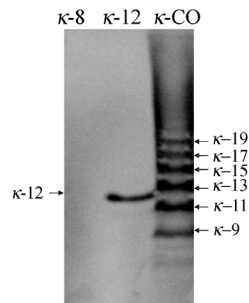


图 5 κ -卡拉胶寡糖 PAGE 分析
 Fig. 5 PAGE analysis of oligo- κ -carrageenan

References

- 1 Ji Ming-Hou(纪明侯) . *Seaweed Chemistry*(海藻化学) . Beijing(北京) : Science Press(科学出版社) ,1997: 117 ~ 182
- 2 Hu Yang-Qin(胡亚芹) , Zhu Mei(竺美) . *Transactions of Oceanology*(海洋湖沼通报) ,2005 ,1: 94 ~ 102
- 3 Gefei Z , Hua X , Wenxu S , Yueping S , Zhien L , Zuhong X. *Pharmacological Research* ,2006 ,53: 129 ~ 134
- 4 Luescher-Mattli M. *Curr Med Chem-Anti-infect Ag.* ,2003 ,2: 219 ~ 225
- 5 Haimin C , Xiaojun Y , Lin J , Feng W , Weifeng X. *J. Agric. Food Chem.* ,2007 ,55: 6910 ~ 6917
- 6 Mi Ting-Yan(宓婷艳) , Yan Xiao-Jun(严小军) , Chen Hai-Min(陈海敏) , Lin Jin(林晶) , Wang Feng(王峰) , Xu Wei-Feng(徐炜峰) . *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报) ,2008 ,43(5) : 474 ~ 479
- 7 Huamao Y , Weiwei Z , Xuegang L , Xiaoxia L , Ning L , Xuelu G , Jinming S. *Carbohydrate Research* ,2005 ,340: 685 ~ 692
- 8 Fred van de Velde. *Food Hydrocolloids* ,2008 ,22: 727 ~ 734
- 9 Rice K G , Kim Y S , Grant A C , Merchant Z M , Linhardt R J. *Anal. Biochem.* ,1985 ,150(2) : 325 ~ 331
- 10 Reinhd V N , Carr S A , Green B N , Maurice P , Jean C , Pierre S. *Carbohydrate Research* ,1987 ,161(2) : 305 ~ 313
- 11 McNeal C J , Macfarlane R D. *J. Am. Chem. Soc.* ,1986 ,108(9) : 2132 ~ 2139
- 12 Jennifer T A , Fabian M D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* ,2006 ,17: 96 ~ 103
- 13 Aristotelis A , Patrick F , William H , Michel L. *Carbohydrate Research* ,2004 ,339: 1301 ~ 1309
- 14 Jens H , Peter R , Lene H R. *Carbohydrate Research* ,2006 ,341: 382 ~ 387
- 15 Lü Zhi-Hua(吕志华) , Zhao Xia(赵峡) , Yu Guang-Li(于广利) , Wang Yuan-Hong(王远红) , Xu Jia-Min(徐家敏) . *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*(中国生化药物杂志) ,2002 ,23(1) : 17 ~ 18
- 16 Da Shi-Lu(达世禄) . *Introduction to Chromatography*(色谱学导论) . Wuhan(武汉) : Wuhan University Press(武汉大学出版社) ,1988: 380 ~ 395
- 17 Yuko F , Marina C , Hiroshi N , Alberto S C , Rosa E , Marla C M. *Carbohydrate Research* ,2002 ,337: 1553 ~ 1562

Analysis of Oligo- κ -carrageenan by Reversed Phase Ion-pair Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry

GAO Yang , CHEN Hai-Min , XU Li-Lin , CHEN De-Ying , YAN Xiao-Jun*

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology , Ministry of Education , Ningbo University , Ningbo 315211)

Abstract A method was developed to elucidate the structures of sulfated oligosaccharides through establishment of an effective reversed phase ion pair ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization time of flight mass spectrometry(RPIP-UPLC-ESI-TOF-MS) . Heptylamine (20 mmol/L , pH 4) has been selected as the ion-pairing agent. κ -Carrageenan oligosaccharides have been separated on BEH C₁₈ column using MeOH/H₂O with 25% heptylammonium formate as eluent in linear gradient mode. Mass spectra were obtained by ESI-Q-TOF-MS in both positive and negative modes. κ -Carrageenan oligosaccharides were well separated up to pentatetrasaccharide , and ESIMS analysis for κ -carrageenan oligosaccharides up to heptacosaccharide. The results showed that all acid hydrolyzed κ -carrageenan oligosaccharides were odd sugars , which was further confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) . The characteristic fragmentation pattern of ion-pair oligosaccharides in mass spectra can be applied for rapid structure identification.

Keywords κ -Carrageenan , reversed phased ion-pair chromatography , ultra performance liquid chromatography , time of flight-mass spectrometry , polyacrylamide gel electrophoresis

(Received 3 April 2009; accepted 13 June 2009)