

液-质联用技术分析甘露寡糖

张运涛¹, 陶冠军², 王林祥², 谷文英³, 顾谦群¹

(1. 青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003; 2. 江南大学测试中心, 江苏 无锡 214036; 3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要 利用液-质联用技术(LC-ESI-MS)对啤酒酵母甘露聚糖乙酰解产物进行分析。电喷雾离子源为 Na⁺, 利用氨基柱对甘露聚糖乙酰解产物进行分离, 流动相为乙腈-水(70:30, 体积比)。结果表明, 该甘露聚糖的侧链是由甘露糖、甘露二糖、甘露三糖和甘露四糖组成。将该方法用于低聚糖相对分子质量的测定, 结果准确、可靠、快速。

关键词 液相色谱; 电喷雾电离质谱; 联用技术; 甘露寡糖; 啤酒酵母

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2002)04-0364-03

Analysis of Mannigosaccharides by Liquid Chromatography -Electrospray Ionization Mass Spectrometry

ZHANG Yun-tao¹, TAO Guan-jun², WANG Lin-xiang², GU Wen-ying³, GU Qian-qun¹

(1. Institute of Marine Drug and Food, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Analytical Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

3. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Oligosaccharide characterization has been of utmost interest in various areas such as medicine, biochemistry, and food chemistry. These biologically relevant molecules are ideally suited for mass spectrometric investigation, because of the capability of this technique in offering structure and relative molecular mass information. Therefore, liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry(LC-ESI-MS) was applied to characterize the acetylation of mannan from *Saccharomyces cerevisiae*. The electrospray using Na⁺ as adducts proved to be superior to the LC-MS for the determination of mannigosaccharides. LC separation was accomplished by the use of NH₂ column and the elution by acetonitrile-water(70:30, volume ratio). The results showed that mannigosaccharides side chain consisted of mannose, mannobiose, mannotriose and mannotetraose. The method developed is accurate, fast and convenient and can be used to characterize the relative molecular mass of the oligosaccharides.

Key words: liquid chromatography; electrospray ionization mass spectrometry; coupling technique; mannigosaccharide; *Saccharomyces cerevisiae*

碳水化合物除了作为生命的能量物质和结构成分外, 还是重要的信息分子。一切重要的生命活动过程(包括受精、胚胎发育、细胞癌变、病毒感染、细菌感染以及植物生长调节等)都有糖链的参与^[1]。糖的结构同其功能有密切的关系, 要了解糖的功能首先必须对其结构进行分析。经典的化学方法(如高碘酸氧化、Smith 降解)和核磁共振技术等对于解析糖的化学结构很有用, 但这些方法需要一定数量和高纯度的样品, 并且结果的分析不但需要丰富的经验, 而且往往很困难^[2]。近 10 年来, 随着质谱技术的快速发展, 液-质联用技术越来越多地被用于寡

糖的结构测定和研究之中。其主要方式有快原子轰击质谱(FAB-MS)、液态二次离子质谱(LSI-MS)、热喷雾质谱(TSP-MS)、电喷雾质谱(ESP-MS)、离子喷雾质谱(ISP-MS)以及多级质谱(MSⁿ)等^[3]。由于液-质联用技术仅需要微量的样品, 并且短时间内就能给出寡糖的结构和相对分子质量信息, 因此该技术目前已成为糖化学研究者首选的方法之一^[4]。

甘露聚糖是啤酒酵母细胞壁的主要成分之一, 它具有多种生物活性, 如抗肿瘤、抗辐射、抗感染等^[5]。一般甘露聚糖通过共价键的形式同蛋白质连在一起, 因此又称之为甘露聚糖蛋白。其相对分

子质量为20 000~200 000^[6,7],主链为单链,其糖苷键形式为 α -1,6连接;主链甘露糖残基上连有丰富的支链,其糖苷键形式为 α -1,2或 α -1,3连接。对于酵母甘露聚糖来说,选择性乙酰解反应可以特异性地切断主链的 α -1,6-糖苷键,其切断 α -1,6-糖苷键的速度比切断支链的 α -1,2-糖苷键、 α -1,3-糖苷键的速度快^[8]。选用合适的反应条件,即控制反应的酸度、温度和时间可以使甘露聚糖链完全从 α -1,6-糖苷键连接的骨架处断开,生成若干种寡糖侧链^[9]。前人在分析甘露聚糖乙酰解产物时曾采用Bio-P-2,Sephadex G-15等柱色谱方法来分离各种寡糖侧链,再根据所绘制的洗脱曲线确定寡糖支链的组成^[10]。本文则采用目前先进的液-质联用技术,对甘露聚糖乙酰解产物进行分离和检测,取得了比较满意的结果。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Platform LCZ4000 液-质联用仪,Waters 公司生产。

无水吡啶、醋酸酐、碳酸氢钠、无水硫酸钠、浓硫酸、无水甲醇、甲醇钠、三氯甲烷、甲苯、盐酸均为国产分析纯。乙腈为色谱纯。

1.2 分析条件

1.2.1 HPLC 条件

色谱柱: μ Bondapak NH₂,孔径为12.5 nm,粒度为10 μ m,3.9 mm i.d.×300 mm;柱温:30℃;流动相:乙腈-水(70:30,体积比)溶液;流速:1 mL/min;进样量:10 μ L。

1.2.2 质谱条件

电喷雾电离(ESI);正离子模式[M+Na]⁺;毛细管电压3.5 kV;脱溶温度:280℃;源温:120℃;离子能量10.5 eV;倍增器电压:650 V;第一锥孔电压45 V;第二锥孔电压5 V;氮气流量3.6 L/h。

1.3 样品处理

甘露聚糖选择性乙酰解^[8]:称取经 Sepharose CL-6B 纯化的甘露聚糖 50 mg,置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 5 mL 吡啶及 5 mL 乙酸酐,密封,烘箱中加热,于 100℃ 下保持 24 h。用氮气流吹至浓浆状,加入甲苯,混匀,再吹干。反复多次,直至把吡啶完全驱赶掉。再加入 5 mL 冰醋酸和 0.5 mL 浓硫酸,轻轻摇匀,使固形物完全溶解。将该烧瓶置于 40℃ 水浴中,保温 12 h。再加入 10 mL 吡啶,终止乙酰解反应,用氮气流吹干,加入 5 mL 三氯甲烷和 3 mL 水,振荡摇匀,移入离心管。离心(3 000 r/min×5 min),吸去上层水。依次用 5 mL 水、3 mL 1

mol/L 盐酸、3 mL 1 mol/L NaHCO₃ 和水洗涤三氯甲烷层。用无水 Na₂SO₄ 除去三氯甲烷层的水分,滤液用氮气吹干。

脱乙酰:在上述滤液的氮气吹干样中加入 3 mL 无水甲醇和 1 mL 0.5 mol/L 甲醇钠溶液,摇匀,室温下放置 30 min。用氮气流吹干,即为甘露聚糖乙酰解产物。

称取甘露聚糖乙酰解产物 2 mg,用 5 mL 流动相溶解,经有机膜过滤,滤液即可用于液-质联用分析。

2 结果与讨论

2.1 结果

图 1 为甘露寡糖选择离子色谱图。

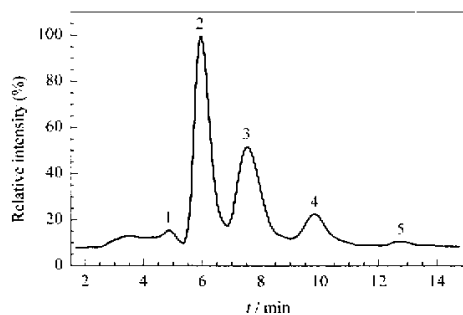


图 1 甘露寡糖选择离子色谱图

Fig. 1 Selected ion chromatogram for manniglosaccharides

Peaks are described in Fig. 2.

由图 1 可知,甘露聚糖乙酰解产物由 5 个组分组成。这 5 个组分的选择离子质谱结果见图 2。

Na⁺的质量数为 23,甘露糖的相对分子质量为 180,甘露糖带上一个 Na⁺后,其质量数为 203。因此,1 号峰代表甘露糖。同理可推知:2 号峰代表甘露二糖,3 号峰代表甘露三糖,4 号峰代表甘露四糖,5 号峰代表甘露五糖。由于选择性乙酰解得到的寡糖实际上包含一个主链上的甘露糖残基,因此,可推断甘露聚糖侧链分别由甘露单糖、甘露二糖、甘露三糖和甘露四糖组成,并且侧链的长度以一个甘露糖基、两个甘露糖基为主,其次是 3 个甘露糖基,4 个甘露糖基只占很小部分。

2.2 讨论

低聚糖聚合度及其相对分子质量是解析糖链结构所必需的。FAB-MS 和 LSI-MS 可以测定完整寡糖的相对分子质量,但需对样品进行衍生化处理,各碎片离子的质谱图比较复杂,不利于未知物的鉴定。LC-MS 采用 ESI 接口方式具有很大的优点。ESI 是一种非常软的电离方式,可以很方便地用于强极性、难挥发性化合物的离子化,是用质谱进行大分子

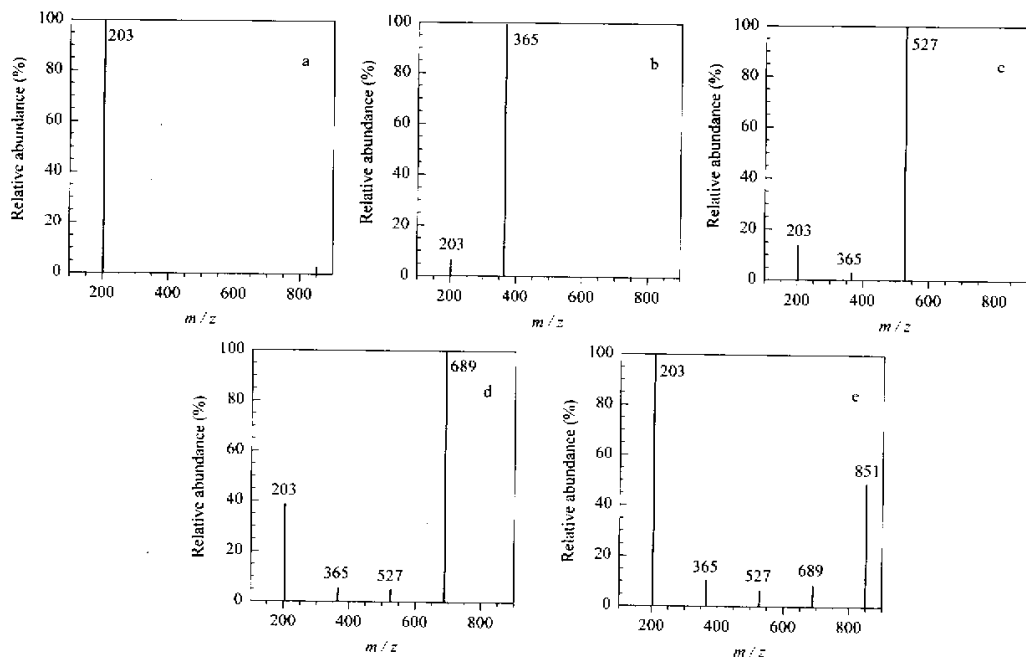


图 2 甘露寡糖选择离子质谱图

Fig. 2 Positive ion mass spectra of the peaks appearing in Fig. 1

a. mannos(Peak 1); b. mannbiose(Peak 2); c. mannotrios(Peak 3); d. mannotetraos(Peak 4); e. mannopentaos(Peak 5).

化合物相对分子质量测定的一个重大突破。通常的电离方式如 EI 法, 根本无法得到糖的分子离子峰, ESI 电离方式的出现使这一问题迎刃而解。本研究表明, 利用 LC-MS 采用选择离子方法可以快速、直接地给出待测样品各糖组分的相对分子质量, 这要比其他方法简单并准确得多。另外, ESI 方式下样品用量极少, 不易污染离子源, 灵敏度高, 它的检测限可达 $10^{-15} \text{ g} \sim 10^{-12} \text{ g}$ 。特别是采用选择离子方法, 可以很好地排除非糖分子离子的干扰, 使图谱的解析变得简单而直观。

3 结论

LC-ESI-MS 联用技术是一种快速灵敏的分析技术。本研究将它成功地用于甘露寡糖混合物各糖组分相对分子质量的测定, 获得了比较满意的结果。有关寡糖负离子质谱, 以及聚合度为 10 以上糖化合物的 LC-ESI-MS 的情况将有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Sharon N, Lis H. *Scientific American*, 1993, 268(1): 74
- [2] Desaire H, Leary J A. *Anal Chem*, 1999, 71(19): 1997
- [3] Careri M, Mangia A, Musci M. *J Chromatogr A*, 1998, 749(1+2): 263
- [4] Geyer H, Geyer R. *Acta Anat*, 1998, 161(1-4): 18
- [5] Matsumoto T, Takanohashi M, Okubo Y. *Carbohydr Res*, 1980, 83: 363
- [6] Cawley T N, Ballou C E. *J Bacteriol*, 1972, 111: 690
- [7] Eddy A A, Longton J. *J Inst Brew*, 1969, 75: 7
- [8] ZHANG Wei-jie. *Biological Technology of Glycoconjugate*. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1994. 455
张惟杰. *糖复合物生化研究技术*. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 455
- [9] Ballou C E. *J Biol Chem*, 1970, 231: 197
- [10] Kobayashi H, Shibata N, Watanabe M, *et al.* *Carbohydr Res*, 1992, 231: 317