

3-氨基-9-乙基咔唑衍生化寡糖混合物的高效液相色谱分离 及激光解吸电离飞行时间质谱分析

牟 青, 张 英, 黄琳娟, 王仲孚*

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要 :建立了以 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)为衍生化试剂对寡糖的标记方法。寡糖的还原端与 AEC 的伯氨基反应生成烯胺,再被 NaBH_3CN 还原为二级胺,使得寡糖被 AEC 标记。衍生物通过反相高效液相色谱分离纯化,采用的色谱柱为 Waters Symmetry C18 柱(3.9 mm × 150 mm, 5 μm),乙腈和乙酸铵水溶液(pH 4.5)为流动相,梯度洗脱,在 254 nm 波长处检测,并以基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱进行分析。在此衍生化条件和色谱条件下,葡寡糖衍生物分离良好,并且 AEC 衍生可显著提高葡寡糖的质谱检测灵敏度。该方法适用于寡糖的分离纯化和结构分析,并与生物质谱具有良好的兼容性,表明该方法在微量寡糖链分析方面有广阔的应用前景。

关键词 :高效液相色谱(HPLC);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;3-氨基-9-乙基咔唑;寡糖

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)01-0024-05 栏目类别 :研究论文

Separation and identification of oligosaccharides labeled with 3-amino-9-ethylcarbazole using high performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry

MOU Qing, ZHANG Ying, HUANG Linjuan, WANG Zhongfu*

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education,
Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Life Science College,
Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract : A pre-column derivatization method for the determination of oligosaccharides based on a labeling reagent 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) was proposed. The enamines were generated by the reaction of the reducing ends of oligosaccharides and the primary amines of AEC, and then reduced to secondary amines by NaBH_3CN , making oligosaccharides labeled by AEC. The derivatives were separated by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and then directly analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The HPLC separation was carried out on a Waters Symmetry C18 column (3.9 mm × 150 mm, 5 μm) with a gradient elution (acetonitrile and ammonium acetate as mobile phases at a flow rate of 1 mL/min) and ultraviolet detection at 254 nm. Under the optimized derivatization and HPLC conditions, the derivatized oligosaccharides were separated, and the derivatization with AEC increased the sensitivity of MS detection. The developed method for the analysis of oligosaccharides is satisfactory.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS); 3-amino-9-ethylcarbazole; oligosaccharides

糖类物质在生物体的生命活动中起着重要的作用,其作为信息分子参与受精、发育、分化,维持神经

系统和免疫系统平衡等各个方面;炎症和自身免疫疾病、老化、癌细胞的异常增殖和转换、病原体感染

* 通讯联系人:王仲孚,教授。Tel:(029)88303484, E-mail:wangzhf@nwu.edu.cn.

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)项目(Nos. 2006AA02Z146, 2007AA10Z338 和 2007AA091600).

收稿日期:2008-09-05

等生理和病理过程也都有糖类物质参与^[1-4]。因此如何分离分析微量寡糖链至关重要。高效液相色谱(HPLC)由于快速、灵敏和样品处理简单等特点已成为糖类物质分析的重要工具,但由于糖类物质本身无紫外或荧光吸收,为了提高检测灵敏度,通常需对样品进行柱前衍生使之携带紫外或荧光基团^[5-7],同时又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,便于分离。

目前对糖类物质进行衍生化标记的试剂较多,主要有 2-氨基吡啶、8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)、1-氨基苾-3,6,8-三磺酸(APTS)^[8]、对氨基苯甲酸乙酯(ABEE)^[5]和咔唑-9-乙氧基碳酰肼(CEOC-hydrazide)^[9]等。这些试剂的缺点是衍生化反应流程复杂,一般需要酸催化,反应时间长(4~10 h),甚至可能导致质谱检测灵敏度的降低。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)是分析微量糖链结构的核心技术,它采用软电离方式,可以测定完整的糖链分子质量,同时还可以用源后衰减(PSD)的方法进行序列测定。另外,MALDI-TOF-MS除了能耐少量杂质的存在外,对盐也有一定的耐受性^[10-12]。MALDI-TOF-MS技术具有其他方法不可替代的优势,将会成为糖类物质分析的主要手段。

本文在利用 3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethylcarbazole, AEC)成功分离单糖的基础^[13]上,将 AEC 扩展到寡糖的 MALDI-TOF-MS 分析,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪,2996 光电二极管阵列检测器,Symmetry C18 色谱柱(3.9 mm × 150 mm 5 μm)(Waters 公司),Milli-Q 超纯水系统(Millipore 公司),AXIMA CFR 型 MALDI-TOF-MS 仪(岛津公司),QL-901 振荡器(其林贝尔公司),5415D 离心机(Eppendorf 公司)。

3-氨基-9-乙基咔唑、D-葡萄糖(D-glucose, Glc)、乳糖(lactose, Lac)、硼氢氰化钠(NaBH₃CN, 纯度为 95%)和葡寡糖混合物(maltodextrin)均购自 Sigma Chemical 公司,冰醋酸、乙酸铵均为天津第三化学试剂厂产品,乙腈、甲醇均为分析纯。

1.2 色谱条件

流动相:A 相为 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(pH 4.5),B 相为乙腈;梯度洗脱程序:0→90 min,90% A→75% A;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温 25 °C;紫外检测波长 254 nm。

1.3 质谱条件

正离子检测模式,N₂ 激光波长为 337 nm,能量为 80 keV,所用基质为 10 g/L 2,5-二羟基苯甲酸水溶液(DHB),并用标准混合肽作质量校正。

1.4 衍生化标记

取 200 μL 0.05 mol/L 葡萄糖和乳糖混合溶液,加入 200 μL 0.4 mol/L AEC 甲醇溶液和 200 μL 0.4 mol/L NaBH₃CN 水溶液,最后加入 40 μL 冰醋酸,混匀后于 70 °C 下反应 60 min。冷却至室温后,加入 500 μL 水和 1.5 mL 氯仿萃取 3 次,保留水相。样品用水稀释 20 倍后进行 HPLC 分析。取 500 μL 衍生溶液真空干燥,残余物中加入 500 μL 水溶解,然后进行 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 分析。

取两份等量的葡寡糖,一份按上述步骤衍生化后进行 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 分析,另一份不经衍生化直接进行 MALDI-TOF-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 寡糖的 HPLC 分析

2.1.1 HPLC 分析模式

3-氨基-9-乙基咔唑与糖类物质的反应机理如图 1 所示。伯胺与糖的还原端反应首先生成不稳定的烯胺,在还原剂的作用下,又被还原生成稳定的二级胺^[12]。

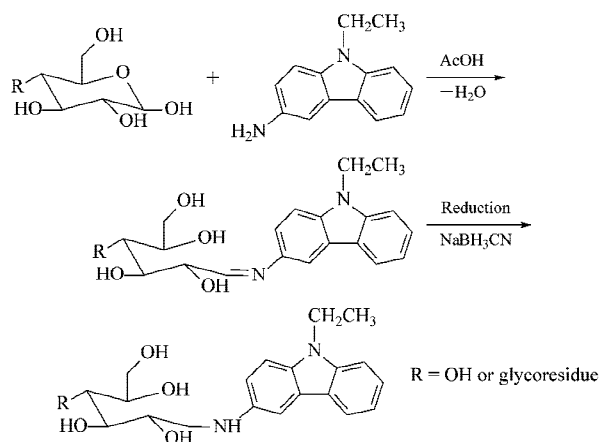


图 1 寡糖与衍生化试剂 AEC 的反应机理

Fig. 1 Labeling reaction mechanism of oligosaccharide with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)

以葡萄糖、乳糖混合物为样品按前述“1.4”和“1.2”节方法进行标记和色谱分离(见图 2),并依此条件对寡糖进行分离和分析。

2.1.2 寡糖的 HPLC 分析

以葡萄糖和乳糖的色谱分离条件对葡寡糖混合物的衍生物进行 HPLC 分析,结果如图 3 所示。由图 3 可看到 16 个色谱峰均得到了基线分离,这些峰为聚合度 1 到 16 的葡寡糖。这说明 AEC 不仅与单

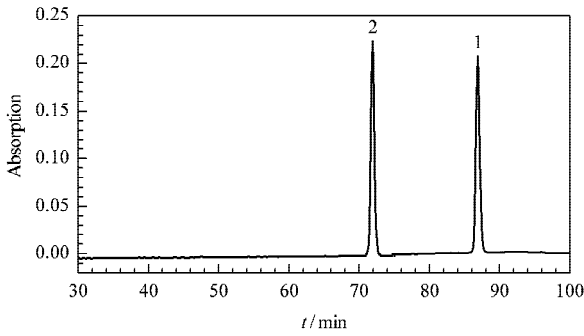


图 2 葡萄糖和乳糖混合物的 AEC 衍生物的 HPLC 谱图
 Fig. 2 HPLC chromatogram of the AEC derivatives of glucose and lactose mixture

Conditions : Symmetry C18 column (3.9 mm × 150 mm , 5 μm) ; mobile phase A , 0.1 mol/L CH₃COONH₄(pH 4.5) ; mobile phase B , CH₃CN ; gradient elution program : 0 → 90 min , 90% A → 75% A ; flow rate , 1 mL/min ; detection wavelength , 254 nm ; injection volume , 10 μL.

1. Glc-AEC ; 2. Lac-AEC.

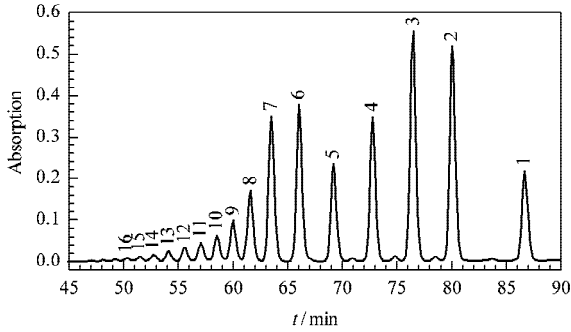


图 3 葡寡糖混合物的 AEC 衍生物的 HPLC 谱图
 Fig. 3 HPLC chromatogram of the AEC derivatives of maltodextrins

HPLC conditions are the same as in Fig. 2.

The peaks of 1 - 16 presents the maltodextrins with 1 - 16 degrees of polymerization.

糖及二糖产生衍生化 , 同时可与聚合度较大的寡糖进行衍生。由于衍生化后糖类物质的疏水性增强 , 在反相 HPLC 分离模式下糖的分离更为容易 , 且无需专用的糖分析柱 , 在 C18 色谱柱上即可得到好的分离 , 因此本文建立的方法在寡糖的分析中有着较大的应用潜力。

2.1.3 寡糖的 HPLC 分离收集

在 HPLC 分离 AEC 衍生的葡寡糖混合物时进行分步收集。从 30 min 开始 , 按 1 min 间隔 , 将流出液收集于若干编号的小试管中 , 冷冻干燥后 , 随机抽取 36 ~ 37 , 39 ~ 40 , 41 ~ 42 , 49 ~ 50 min 内收集的样品 , 溶于 10 μL 水中作质谱分析。

2.2 寡糖衍生物的 MALDI-TOF-MS 分析

2.2.1 葡萄糖和乳糖 AEC 衍生物的 MALDI-TOF-MS 分析

葡萄糖和乳糖的 AEC 衍生物的质谱分析如图

4 所示。衍生物在糖的还原端增加了 1 分子的 AEC (相对分子质量增加 210) , 因此 m/z 375.52 和 m/z 537.66 应分别归属于葡萄糖和乳糖 AEC 衍生物的 $[M + H]^+$ 。 m/z 210.15 归属于 AEC 的分子离子峰。同时质谱没有检测到未被 AEC 标记的葡萄糖和乳糖的分子离子峰 , 表明在该生化条件下 , 糖类物质与 AEC 反应完全。

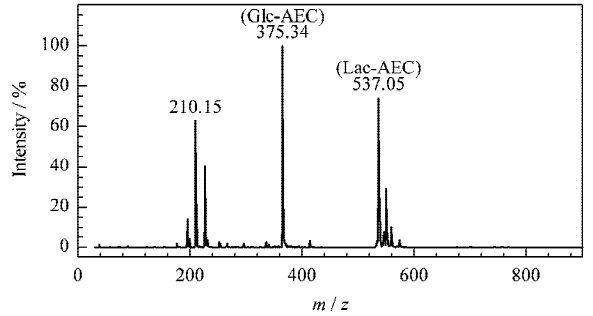


图 4 葡萄糖和乳糖 AEC 衍生物正离子检测模式的 MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 4 MALDI-TOF-MS spectrum of AEC derivatives of glucose and lactose in positive ion mode

Conditions : nitrogen laser wavelength , 337 nm ; ionization energy , 80 keV ; matrix , 10 g/L of 2 , 5-dihydroxybenzoic acid.

2.2.2 葡寡糖混合物 AEC 衍生物的 MALDI-TOF-MS 分析

对未衍生和衍生的葡寡糖混合物的质谱分析结果如图 5 和图 6 所示。经 AEC 衍生后可容易地检测到聚合度 1 ~ 30 的葡寡糖衍生物的分子离子峰 , 主要为 $[M + Na]^+$ 离子峰。图 6 中带 * 的峰为衍生物的 $[M + Na]^+$ 离子峰 , 主峰之间相对分子质量相差 162 , 与葡萄糖残基的相对分子质量一致 ; 无 * 标记的峰为衍生物的 $[M + H]^+$ 离子峰 , 主峰之间相对分子质量的差值与葡萄糖残基一致。未经 AEC 衍生的葡寡糖只能检测到聚合度 2 ~ 12 的寡糖的分子离子峰。

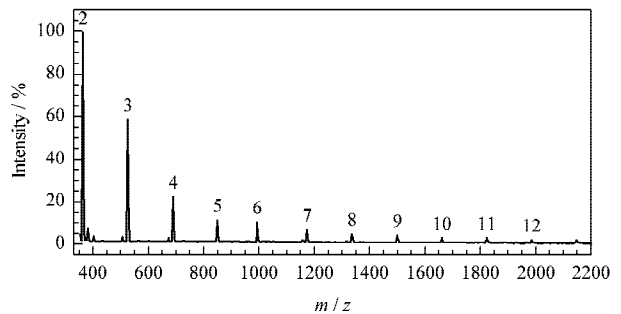


图 5 葡寡糖混合物正离子检测模式的 MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 5 MALDI-TOF-MS spectrum of maltodextrins mixture in positive ion mode

MS conditions are the same as in Fig. 4.

The peaks of 2 - 12 presents the maltodextrins with 2 - 12 degrees of polymerization. The peaks expressed as $[M + Na]^+$.

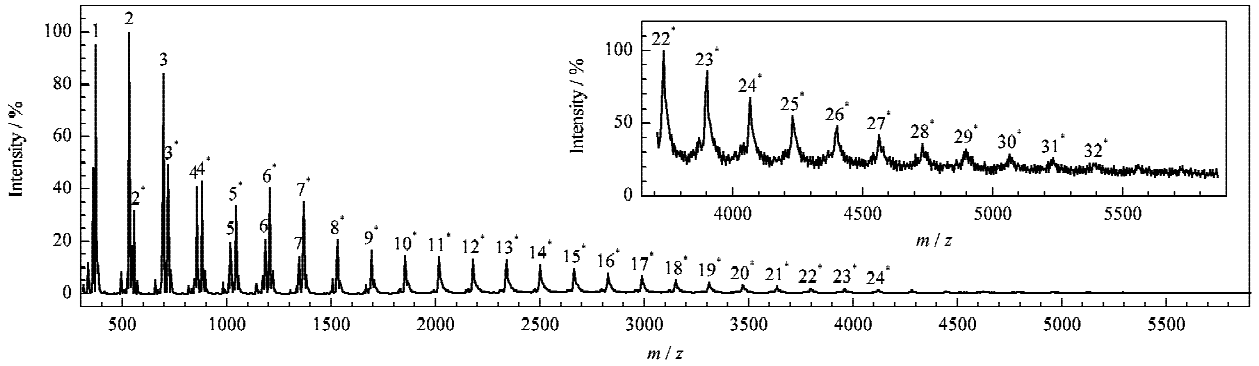


图 6 葡寡糖混合物 AEC 衍生物正离子检测模式的 MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 6 MALDI-TOF-MS spectrum of AEC derivatives of maltodextrins in positive ion mode

MS conditions are the same as in Fig. 4.

The peaks of 1 - 32 presents the maltodextrins with 1 - 32 degrees of polymerization. The peaks with * expressed as $[M + Na]^+$.

对比经 AEC 衍生和未经 AEC 衍生的葡寡糖的质谱分析结果可知,其检测灵敏度有明显的差异。经 AEC 衍生的葡寡糖可以检测到 30 个左右的峰,而未经衍生的样品只能检测到约 11 个信号峰,表明 AEC 能显著地提高葡寡糖的质谱检测灵敏度。这是由于 AEC 标记后的寡糖更容易离子化,使得衍生物的检测信号增强。

2.2.3 葡寡糖衍生物的 HPLC 分离产物的 MALDI-TOF-MS 分析

对“2.1.3”节收集的 36 ~ 37, 39 ~ 40, 41 ~ 42,

49 ~ 50 min 的馏分进行质谱分析,结果如图 7 所示。图 7 中 m/z 1855.60 和 1693.29 分别为葡聚十糖和葡聚九糖衍生物的 $[M + Na]^+$ 离子峰, m/z 1347.11、1185.12 和 537.69 分别为葡聚七糖、葡聚六糖和葡聚二糖衍生物的 $[M + H]^+$ 离子峰。通过对 HPLC 分离后所得馏分的质谱分析表明,利用 HPLC 可实现样品中微量组分的分离纯化,并可结合质谱分析对样品进行鉴定和结构分析。建立的方法可用于生物样品中寡糖链的分离和结构解析研究。

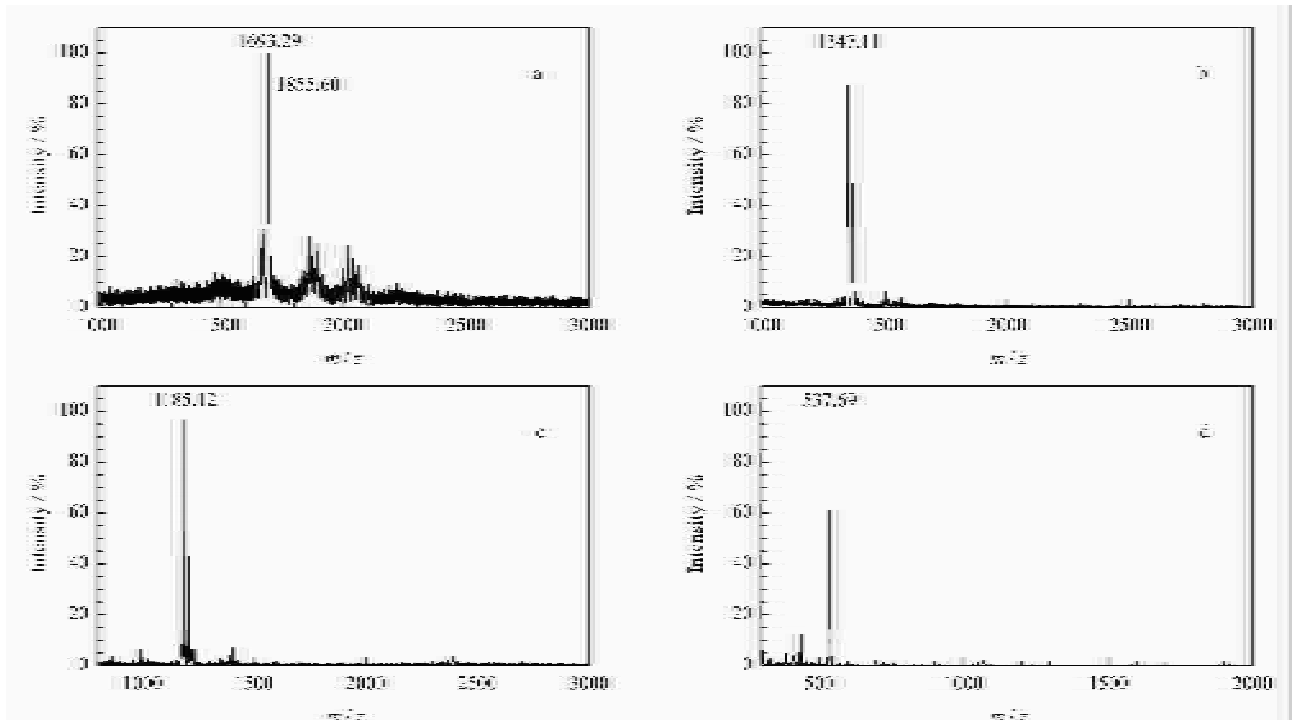


图 7 图 3 中部分馏分的正离子模式的 MALDI-TOF-MS 谱图

Fig. 7 MALDI-TOF-MS spectra of the parts of eluate in Fig. 3 in positive ion mode

MS conditions are the same as in Fig. 4.

a. the eluate collected in 36 - 37 min, molecular ions expressed as $[M + Na]^+$; b. the eluate collected in 39 - 40 min, molecular ions expressed as $[M + H]^+$; c. the eluate collected in 41 - 42 min, molecular ions expressed as $[M + H]^+$; d. the eluate collected in 49 - 50 min, molecular ions expressed as $[M + H]^+$.

3 结论

高效液相色谱与质谱相结合已经成为糖链结构解析的强有力手段,质谱的优点是检测灵敏度高,在确定糖链及其糖肽的相对分子质量、糖链及肽链的顺序及连接位点等结构信息方面具有独特之处^[14]。本文采用衍生化试剂 AEC 对寡糖进行柱前衍生化,建立了 AEC 衍生寡糖的 HPLC 分离分析方法,在此 HPLC 分析条件下,可以对标记的寡糖链进行样品分离纯化,结合质谱手段为糖链的分离分析及结构确定奠定了基础。该方法在微量生物寡糖链的分离和结构解析中具有一定的应用价值。

参考文献:

[1] DeMarco M L , Woods R J. *Glycobiology* , 2008 , 18(6) : 426
 [2] Merry C L R , Ward C M. *Development* , 2008 , 135(8) : 1 389
 [3] Jigami Y. *Biosci Biotechnol Biochem* , 2008 , 72(3) : 637
 [4] Oppenheimer S B , Alvarez M , Nnoli J. *Acta Histochem* ,

2008 , 110(1) : 6
 [5] Wang Z F , He J Y , Wei Y H , et al. *Chinese Journal of Organic Chemistry* (王仲孚 , 贺建宇 , 尉亚辉 , 等. 有机化学) , 2006 , 26(5) : 592
 [6] Lin X , Wang Z F , Huang L J , et al. *Chemical Journal of Chinese University* (林雪 , 王仲孚 , 黄琳娟 , 等. 高等学校化学学报) , 2006 , 27(8) : 1 456
 [7] Wang Z F , Zhang Y , Lin X , et al. *Acta Chimica Sinica* (王仲孚 , 张英 , 林雪 , 等. 化学学报) , 2007 , 65(23) : 2 761
 [8] Hyun J A , Andreas H F , Carlito B L. *J Chromatogr A* , 2003 , 1 004 : 121
 [9] Zhang L , Zhang X , You J M , et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (张琳 , 张曦 , 尤进茂 , 等. 分析化学) , 2004 , 32(8) : 1 002
 [10] Li Y M. *Analysis and Testing Technology and Instruments* (李永民. 分析测试技术与仪器) , 2002 , 8(3) : 131
 [11] Garrels J I , McLaughlin C S , Warner J R , et al. *Electrophoresis* , 1997 , 18(8) : 1 347
 [12] Ogorzalek L R , Mitchell C , Stevenson T I , et al. *Electrophoresis* , 1997 , 18(7) : 382
 [13] Zhang Y , Huang L J , Wang Z F. *Chinese Journal of Chemistry* , 2007 , 25 : 1 522
 [14] Anne D , Howard R M. *Science* , 2001 , 291 : 2 351

欢迎订阅 欢迎投稿

《质谱学报》

国内刊号 : CN 11-2979/TH
 邮发代号 : 82-349

国际标准刊号 : ISSN 1004-2997
 国外发行代号 : Q 1717

《质谱学报》(双月刊)是经国家科委批准,由北京中科科仪技术发展有限责任公司和中国物理学会质谱分会共同主办,中国原子能科学研究院承办的学术期刊,中国科学院《核心期刊》之一。

本刊的宗旨是刊登物理、化学、生物化学、材料化学、核科学、地球科学、生命科学等基础学科中质谱法的新理论、新方法、新技术及其在各领域的应用研究成果;介绍质谱学及其相关技术在上述前沿课题研究中的最新进展;反映质谱技术广泛应用于农业、石油、地质、药物、化工、临床医学、生物工程、原子能、同位素分析、环境监测、食品质检、材料分析、公安司法、军事部门等国民经济多领域的研究成果。本刊栏目设置有“研究报告”、“研究简报”、“综述”、“讲座”、“技术交流”、“实用信息”等。读者对象主要为从事分析化学研究和测试的科技人员及大中专院校师生。

本刊先后被美国《化学文摘,CA》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国科学引文数据库》、《中国科技论文数据库》、《中国生物学文摘》和《中国生物学文献数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》、《中国期刊全文数据库(CJFD)》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国无机分析化学文摘》、《方正 Apabi 电子期刊》等收录,并已入网“万方数据-数字化期刊群”。本刊介绍网址 <http://www.jcmss.com.cn>。

本刊国内外公开发行。大 16 开,单价:10.00 元/册,全年 60 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。

银行汇款:

账号:02000266090088002-52

开户行:工商银行北京房山支行二六六分理处

户名:中国原子能科学研究院

邮局汇款:北京 275 信箱 65 分箱《质谱学报》编辑部,邮编 102413。

汇款时请写明汇款用途:订阅《质谱学报》杂志。

联系电话:010-69357734;E-mail:jcmss401@163.com;网址:<http://www.jcmss.com.cn>