

文章编号:1005-8737(2001)03-0069-04

琼胶寡糖的 ESI-MS 分析研究

毛文君, 林 洪, 管华诗

(青岛海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

摘 要:首次对6种琼胶寡糖的分子量,采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)进行分析测定。结果表明,琼胶寡糖的ESI-MS谱图非常清晰,能准确判断出琼胶寡糖的分子量。这些寡糖只出现 $[M+Na]^+$ 加成离子,而不出现 $[M+1]^+$ 的准分子离子,且 $[M+Na]^+$ 分子离子峰均特强;同时还出现一系列 $[M+2Na]^+$ 的加成离子。当化合物分子量大于1 000时,则给出双电荷离子;当化合物分子量小于1 000时,则ESI-MS谱出现 $[2M+Na]^+$ 的系列离子。实验结果揭示,所得6种琼胶寡糖的分子量分别为324、630、936、1 242、1 548和1 854。

关键词:琼胶糖降解;琼胶寡糖;分子量测定;电喷雾电离质谱

中图分类号:TS254.1

文献标识码:A

近年来,寡聚糖已成为医药、特定保健品的重要来源。寡聚糖除了具有溶解性强、稳定性高及安全无毒等理化特性外,还具有重要的生理活性。如促进双歧杆菌生长,介导特异识别,调节生命进程,防止龋齿,促进老年人对钙离子的吸收,预防骨质疏松等^[1]。但如何准确确定寡聚糖的分子量,研究其构效关系等则是人们一直关注的问题。据研究,电喷雾电离(ESI)作为一种新颖的电离技术对极性大、难挥发易分解的糖类化合物是一种较为理想的电离方法,可用于较大分子化合物分子量测定。为此,本文首次采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)对琼胶的降解修饰产物—琼胶寡糖的分子量进行测定,为琼胶寡糖的研究提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 琼胶寡糖的制备

取10 g琼胶糖,加入500 ml蒸馏水并加热至99℃摇动使其溶解,冷至40℃加入10 g海螺琼胶酶,于36℃水浴中保温水解15 h,呈浅黄色后,再加

入0.5 g海螺琼胶酶,不断搅拌水解8 h。水解结束后,将酶解液于100℃加热5 min以终止酶解反应,将酶解产物于40℃减压浓缩至100 ml,加入3倍量乙醇,使其产生沉淀,离心(7 000 r/min, 15 min),上清液于40℃减压浓缩,冷冻干燥得寡糖混合物。

1.2 琼胶寡糖的分离纯化

取0.5 g寡糖混合物,加1 ml水溶解后注入Sephadex 30色谱柱(100 cm×1.5 cm),室温以蒸馏水进行洗脱(20 ml/h),以部分收集器收集洗脱液,分别于490 nm测定吸光度,根据洗脱体积对吸光度作图,得到寡糖的分离图谱。根据PC分析结果合并分子量均匀的寡糖,减压浓缩,冻干。

1.3 糖组成分析—PC法

取0.001 mg样品用少量水溶解,用毛细管点样于新华层析滤纸。在展开剂中展开约6~8 h,取出晾干。苯胺—邻苯二甲酸喷雾显色,105℃加热5 min,观察并记录展开剂迁移距离,及染色斑点迁移距离,计算样品的 R_f 值。

1.4 总糖含量的测定—改良的苯酚—硫酸法^[2]

精确称取20 mg D-半乳糖,溶于100 ml重蒸水中。标准液稀释成质量浓度为30、60、90、120、150、190 μg/ml的溶液,取该溶液各0.2 ml置于10

收稿日期:2000-10-13

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金,1999-2001

作者简介:毛文君(1962-),女,副教授,从事海洋多糖化学研究。

ml 试管中,加入 50 g/L 的苯酚溶液 0.4 ml 混匀后,迅速加入 2 ml 浓硫酸,混合均匀后,室温放置 30 min,在波长 490 nm 测定吸光度,空白对照以蒸馏水代替糖溶液。样品在同样条件下测定,对照标准曲线求出总糖含量。

1.5 离子色谱分析^[3,4]

DIONRX 公司 DX-500 离子色谱仪(GP40 四元梯度泵),ED40 型脉冲安培检测器,金电极,积分仪。柱后加入装置,DIONRX 公司反应器,气压阀,高纯氮。

色谱柱:DIONRX CarboPac PAI(4 mm×250 mm)阴离子分离柱,CarboPacTM Guard(3 mm×25 mm)前置柱;流速 1.0 ml/min;进样量 25 μ l;淋洗液 1: 5% 1 mol/L 醋酸钠,95% 100 mmol/L 氢氧化钠;淋洗液 2: 10% 1 mol/L 醋酸钠,90% 100 mmol/L 氢氧化钠。

1.6 质谱分析

英国 Micromass 质谱公司 Quattro 串联质谱仪,电喷雾电离源为美国 analitic 公司产品,数据系统为英国 Micromass 公司 Masslynx 操作系统。

样品配制:纯化样品加入超滤的光谱纯甲醇,内含 0.1% 的醋酸。经蠕动泵(HARVARDMODEL)直接向 ESI 电离源进样,进样速度 3 μ l/min。

质量校正:用 CsI 标样作静态、动态质量校正表,误差不超过 0.3 μ amu。

2 结果和讨论

2.1 分离纯化

琼胶酶解产物通过 Sephadex 30 凝胶层析柱进行分离纯化,获得 6 种寡糖,分别简称为寡糖 1、寡糖 2、寡糖 3、寡糖 4、寡糖 5 和寡糖 6(图 1)。各寡糖

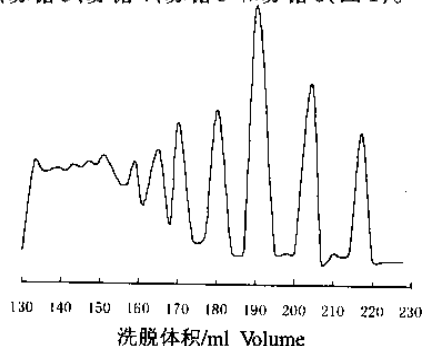


图 1 琼胶寡糖在 Sephadex 30 凝胶柱上的层析结果

Fig.1 Chromatogram of agarose oligosaccharides separated by Superdex 30

纸层析 R_f 结果见表 1,在酸性和碱性两种展开系统中,随分子量的增大, R_f 值逐渐减小,且各个寡糖均显示为 1 个斑点。其离子色谱也显示,各寡糖均呈单一对称色谱峰。凝胶层析和纸层析结果均证明 6 种寡糖为单一化合物。

表 1 琼胶寡糖纸层析 R_f 结果

Table 1 R_f values of agarose oligosaccharides on PC

琼胶寡糖 Agarose oligosaccharides	迁移值 R_f
1	1.11
2	0.87
3	0.65
4	0.41
5	0.30
6	0.18

2.2 ESI-MS 谱图解析

6 种琼胶寡糖的 ESI-MS 谱图见图 2~图 7。它们的 SI-MS 谱图非常清晰,简单,归属容易,能准确判断出化合物的分子量。这些寡糖只出现 $[M+Na]^+$ 加成离子,而不出现 $[M+1]^+$ 的准分子离子,且 $[M+Na]^+$ 分子离子峰均特强;同时还出现一系列 $[M+2Na]^+$ 的加成离子。当化合物分子量大于 1 000 时,则给出双电荷离子;当化合物分子量小于 1 000 时,则 ESI-MS 谱出现 $[2M+Na]^+$ 的系列离子。各寡糖的 ESI-MS 谱图解析结果见表 2。琼胶糖经海螺琼胶酶降解得到寡糖 1~寡糖 6 的分子量分别为 324、630、936、1 242、1 548 和 1 854。

表 2 琼胶寡糖的 ESI-MS 解析

Table 2 ESI-MS results of the agarose oligosaccharides

离子 Ion	琼胶寡糖 Agarose oligosaccharides					
	1	2	3	4	5	6
$[M+Na]^+$	347	653	960	1 266	1 571	1 877
$[2M+Na]^+$				1 284	1 895	
$[5/2M+Na]^+$			1 599			
$[3M+Na]^+$			1 913			
$[M+2Na]^+$	377					
$[3/2M+Na]^+$				1 886	950	
$[1/2M+Na]^+$				641	796	950
$[5/3M+Na]^+$				2 093		

关于多糖及其衍生物分子量的测定,过去常用的方法有超速离心法、高压电泳法、膜渗透压法、粘度法和光散射法等^[5],但这些方法比较麻烦且误差很大,特别是对于低分子量糖类。70 年代后发展起来的高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)可用于糖类

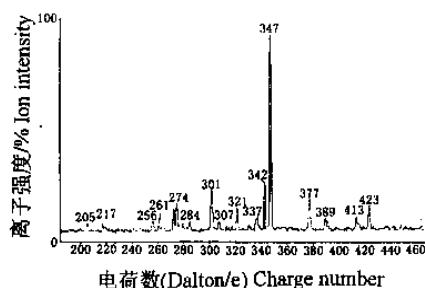


图 2 寡糖 1 的 ESI-MS 谱图

Fig.2 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 1

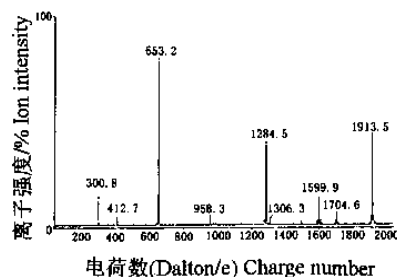


图 3 寡糖 2 的 ESI-MS 谱图

Fig.3 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 2

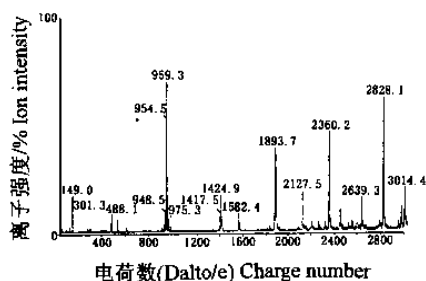


图 4 寡糖 3 的 ESI-MS 谱图

Fig.4 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 3

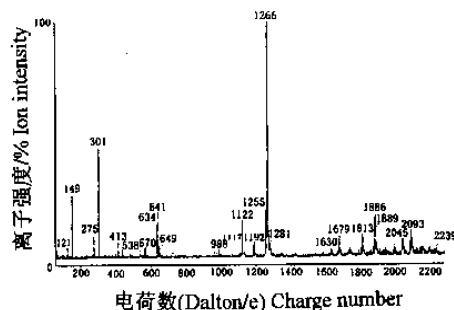


图 5 寡糖 4 的 ESI-MS 谱图

Fig.5 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 4

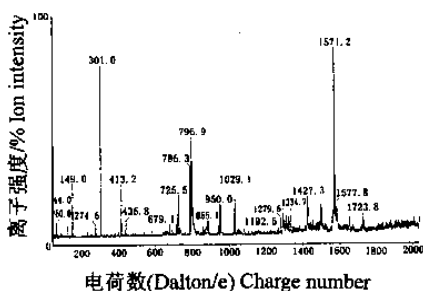


图 6 寡糖 5 的 ESI-MS 谱图

Fig.6 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 5

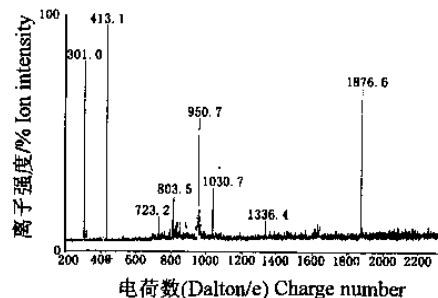


图 7 寡糖 6 的 ESI-MS 谱图

Fig.7 ESI-MS spectrum of oligosaccharide - 6

分子量的测定,其具有快速、高分辨率和重现性好的优点,但由于缺乏特定糖的标准品,使其应用具有一定局限性。质谱是目前寡糖序列分析最重要的方法之一^[6]。由于其灵敏度高,样品用量少,在糖分析中得以广泛应用^[7]。MS 不仅可用于鉴定甲基化分析产物从而确定单糖残基间的连接顺序,而且由于近年来快原子轰击质谱(FAB-MS)、ESI-MS 和基质辅助激光场解析质谱(MALDI-MS)的出现^[8],利用 MS 可以测定糖的分子量和糖链的一级

结构。在糖链的质谱分析中,最主要的是采用合适的电离方式。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测试中,FAB 方法发挥了重要作用,但 FAB 方法在测试中样品用量多,基质干扰大,难于气化的天然糖甙类化合物很难得到稳定重复的质谱图。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一个重要突破。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。

参考文献:

- [1] 杜昱光,白雪芳.寡聚糖类物质生理活性的研究[J].中国生化药物杂志,1997,18(8):268-271.
- [2] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药理学杂志,1996,31(9):550-553.
- [3] Paskach J, Lieker H P, Reilly P J, et al. High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions[J]. Carbohydrate Research, 1991, 215:1-14.
- [4] Riel J V, Olieman C. Selectivity control in anion-exchange chromatographic determination of saccharides in dairy products using pulsed amperometric detection[J]. Carbohydrate Research, 1991, 215:39-46.
- [5] 方积年.多糖的研究现状[J].药学报,1986,21(12):944-950.
- [6] Coates M L, Wilkins C L. Laser-desorption fourier transform mass spectra of polysaccharides[J]. Anal Chem, 1987, 59:197-200.
- [7] Domon B, Costello C E. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry[J]. Biochemistry, 1988, 27:1534-1543.
- [8] Angel A S, Lindh F, Nilsson B. Determination of binding positions in oligosaccharides and glycosphingolipids by fast-atom-bombardment mass spectrometry[J]. Carbohydrate Research, 1987, 168:13-15.

ESI - MS spectroscopy investigation of agarose-oligosaccharides

MAO Wen-jun, LIN Hong, GUAN Hua-shi

(Marine Drugs & Foods Institute, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: The agarose was digested by agarase enzyme, and 6 kinds of agarose-oligosaccharides were obtained. Using ESI - MS to analyze them, the spectra was very clear and the molecular weight of those oligosaccharides could be accurately determined to be 324, 630, 936, 1 242, 1 548 and 1 854, respectively. The ESI - MS spectra indicated the presence of stronger addition ion $[M + Na]^+$ and the absence of quasi-molecular ion $[M + 1]^+$. At the same time, there were addition ion $[M + 2Na]^+$ in the ESI - MS spectra. The ESI - MS spectra showed double charge ion when the molecular weight of oligomers was more than 1 000 and the series ion $[2M + Na]^+$ when the molecular weight less than 1 000. The 6 oligosaccharides were bio-, tetra-, hexa-, octa-, deca- and dodeca-saccharide, respectively.

Key words: agarase degradation; agarase - oligosaccharides; molecular weight determination; ESI - MS

欢迎订阅 2002 年《现代渔业信息》

《现代渔业信息》杂志系农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政渔港监督管理局等 45 个单位协办的供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合性信息刊物。报道的主要内容侧重于国外渔业生产、水产科学技术新动态、新工艺、新材料和新方法等信息;同时报道国内渔业生产、科技及教育等方面进展动态。

本刊为月刊,国际标准刊号:ISSN 1004-8340

国内统一刊号:CN31-1465/S,邮发代号:4-625,国内发行:上海市邮政局报刊发行局。

每期定价 4.00 元(包括邮费),全年 12 期,共计 48.00 元。请读者到当地邮局办理订阅。若当地邮局订阅不便,可直接与《现代渔业信息》编辑部发行部联系办理订阅。开户银行:工商银行杨树浦桥分理处,帐号:1001222309026400731,户名:东海水产研究所。

杂志社地址:上海市军工路 300 号 邮政编码:200090 广告、发行部联系人:徐吟梅

电话:021-65684690-8046;021-65682889