

MALDI-TOF-MS 测定天然白芨多糖相对分子质量的研究

程安媛, 朱照静*, 徐 丹

(重庆医科大学药学院 药剂教研室, 重庆 400016)

摘 要:目的 考察基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)用于检测天然多糖相对分子质量的可行性及条件。方法 以2,5-二羟基苯甲酸(DHB)为基质对精制后的天然白芨多糖(未分级)相对分子质量进行测定。条件采用DHB-白芨多糖为1.5:1,室温液滴自然干燥法;线性正离子谱模式,激光强度:1 500~2 500单位。结果 白芨多糖相对分子质量分布在 $6 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$,其分散性较大。结论 采用DHB与白芨多糖样品比例为1.5:1,直接液滴干燥法效果好,能获得较好的图谱效果。

关键词:白芨多糖;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;基质;相对分子质量

中图分类号:R931.71

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)06-0817-03

Determination of relative molecular weight of polysaccharides

in *Bletilla striata* by MALDI-TOF-MS

CHENG An-yuan, ZHU Zhao-jing, XU Dan

(Pharmacy Faculty of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relative molecular weight of polysaccharides in *Bletilla striata* by matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass (MALDI-TOF-MS). **Methods** 2, 5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) as a matrix was used. By drop drying at room temperature the proportion of the matrix and polysaccharide sample was 1.5 : 1. Baseline mode and laser intensity at 1 500—2 500 units were carried out. **Results** The relative molecular weights of polysaccharides in *B. striata* were $6 \times 10^4 - 3 \times 10^5$, whose distribution rang was wide. **Conclusion** The relative molecular weights of polysaccharides in *B. striata* are obtained by MALDI-TOF-MS technique in the proportion of DHB-polysaccharides in *B. striata* 1.5 : 1, which is valuable for the preparation and good quality by the direct drop drying method.

Key words: polysaccharides in *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass (MALDI-TOF-MS); matrix; relative molecular weight

白芨多糖为兰科植物白芨 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎经提取得到的一种高分子黏性多糖。白芨作为传统的止血药,收敛止血、消肿生肌功能良好,现代研究表明,白芨多糖具有抗溃疡、抗消化道出血、预防肠粘连、人工栓塞、抗肿瘤等广泛的药理作用^[1]。作为植物多糖,白芨多糖具有多分散性,其相对分子质量大小及分布是影响其生物活性的重要因素^[2],准确测定其相对分子质量具有重要的意义。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)简称飞行时间质谱,应用脉冲式激光,是一种通过离子的飞行时间来测定其荷质比的软电离生物质谱技术。MALDI-TOF-MS 适合于混合物及蛋白质等生物大分子的测定,

具有灵敏、快速,对杂质的包容性强,分析质量范围大,较少或基本不产生电离碎片,尤其是能对未衍生化糖类进行直接分析等优点^[3],其测定准确度高达0.1%~0.01%,目前可测定生物大分子的相对分子质量高达 6×10^5 ,远远优于目前常规应用的SDS电泳与高效凝胶色谱技术。自1987年Karas等^[4]首次以MALDI-TOF-MS分析水苏糖以来,已用于游离多糖、环糊精、糖肽、糖脂、糖蛋白、黏多糖、鞘脂等多种糖类化合物的分析。本实验通过基质的选择及测定条件的确定,对白芨多糖相对分子质量及其分布进行测定分析,为天然高分子聚合相对分子质量的测定提供参考,并为进一步的结构分析奠定基础。

1 实验部分

收稿日期:2007-12-16

作者简介:程安媛,女,硕士研究生,研究方向为药物制剂研究。

* 通讯作者 朱照静 Fax: (023)86282002 E-mail: zhaojing6271@yahoo.com.cn

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪[ABI Voyager DE-PRO(USA)]。

1.1.2 试剂:白芨多糖为本实验自制(由白芨块茎水提醇沉并精制所得,未分级);2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、乙腈(色谱纯,美国Sigma公司);标准混合多肽(美国Sigma公司)。

1.2 溶液与样品配制:将乙腈-双蒸水按1:1的比例混合制成饱和溶液作为溶剂待用;将基质和样品分别溶于上述混合溶剂,配成浓度为100 pmol/ μ L的溶液,分别取上清液为A和B。将1.5 μ L A液与1 μ L B液混合均匀,取0.5 μ L点样;标准混合多肽以A稀释,取0.5 μ L点样;室温自然干燥后,将点样板放入离子源中进行测定;最低有效浓度为10 pmol/ μ L。

1.3 实验参数:线性正离子谱模式, N_2 激光源,波长337 nm,真空度 8×10^{-8} Torr,离子源加速电压25 kV,脉冲速度3 nm,延迟时间1 700 ns,叠加100, Grid: 93%, Guidewire: 0.3%, 激光强度:1 500~2 500单位。

2 结果与讨论

在测定中基质的选择及样品的制备方法对获得理想的质谱图非常关键,因此本实验对基质的选择、样品的制备、检测方式以及参数对测定的影响进行探讨。

2.1 基质的选择及样品的制备对测定的影响:在MALDI-TOF-MS测定大分子物质相对分子质量的研究中发现,最初用于蛋白质分析的基质DHB分析多糖重复性好、灵敏度和信噪比较高,较少产生基质相关的低分子离子,适用于分析多糖^[5]。基质的作用是稀释样品、吸收激光能量及解离样品。基质与样品的晶体形态、样品与基质比率等对谱图质量都有影

响^[6]。MALDI-TOF-MS测定大分子物质的相对分子质量过程中,按其相对分子质量从小到大依次进行检测,大量较小离子因飞行速度快而先行达到检测器并使其饱和,会削弱检测器对较大离子的检测能力,明显影响大分子物质测定结果的准确性,因此在白芨多糖的精制过程中进行了透析(截留相对分子质量为 1.2×10^4)处理,除去较小分子物质,从而减少对多糖测定的影响。样品制备时采用自然液滴干燥法,基质与样品的比例针对所测的多糖的相对分子质量大的原因适当增加了基质比例,采用DHB-样品为1.5:1测定,在传递能量的过程中使电离产生的碎片减少,能较理想的解离形成 $[M+H]^+$ 。

2.2 检测方式及参数对测定结果的影响^[7,8]:MALDI-TOF-MS在检测方式上有线式和反射式两种,反射式测定模式受低分子的影响较大,其主要用于测定相对分子质量较小的聚糖,针对白芨多糖相对分子质量大,采用线性模式测定。这样样品所受电离产生的碎片较少,产生的分子离子稳定,并能最大程度地电离产生所需要的分子离子峰。

由于糖类不易离子化,所要测定的多糖相对分子质量大,因此采用的激光强度在1 500~2 500单位,使多糖更容易形成 $[M+H]^+$ 。

2.3 测定结果:白芨多糖是由甘露糖和葡萄糖以4:1比例聚合而成^[9]。在设定条件下,所测得的样品 m/z 在 $6 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 分散分布。从图1的3个图可以看出,白芨多糖相对分子质量大,分散性大,在 $1.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 区间峰较明显,可测定的最高相对分子质量为298 863。测定结果表明由甘露糖和葡萄糖组成的白芨多糖聚合度 n 在70~330,测定结果为绝对值,测定精度为0.1%。如需进一步确定其结构组成,则需要对多糖进行进一步分级化处理。

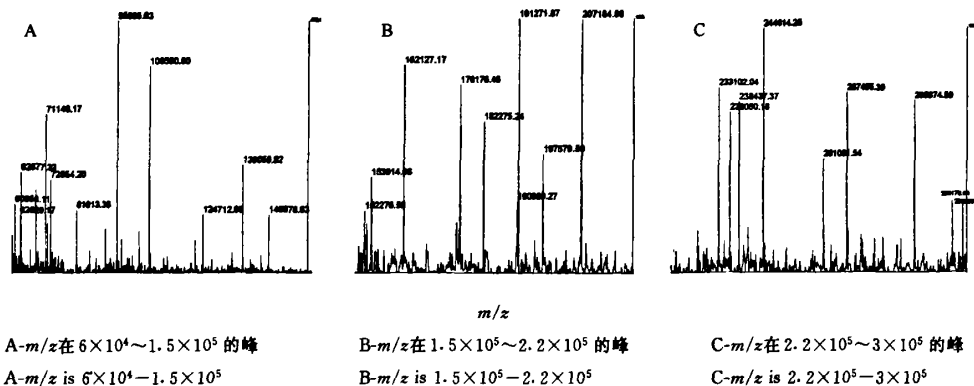


图1 白芨多糖相对分子质量测定的部分质谱图

Fig. 1 Mass spectrogram of relative molecular weight for polysaccharides in *B. striata* by MALDI-TOF-MS

2.4 讨论:多糖类物质极性高、难挥发、热不稳定,还具有相对分子质量分布发散的性质,其质谱表征比较困难,而MALDI-TOF-MS灵敏、快速,对杂质的包容性强、分析的质量范围大,能够对糖类尤其是非衍生化糖进行直接分析。近年来,MALDI-TOF-MS的发展已使糖类物质的分析达到一个新的水平。以MALDI-TOF-MS测定多糖聚合物的相对分子质量与传统方法的凝胶渗透色谱和黏滞法等方法相比的优点是:(1)相对分子质量的测定时不依赖于标准样品或Mark-Houwink常数;(2)它可以给出绝对分子质量,而不是相对值;(3)它是对聚合物全部分子质量分布的测定,而不是只给一个平均值;(4)每一个多聚体的相对分子质量可以测定,可获得分子结构的信息;(5)样品用量少,耗时短(15 min以内)等。

此外对相对分子质量很大的多糖样品使用单一基质时,由于基质与被分析物之间的相互作用太强而不能得到理想的质谱信号时,混合基质的使用可以弥补这一不足^[10~12]。随着分析技术的发展,MALDI-TOF-MS与HPLC、GC-MS等方法的联用以及MALDI-TOF-MS对糖类物质研究分析的不断深入,MALDI-TOF-MS对糖类的分析将取得更大的进展^[13]。

参考文献:

- [1] 郑虎占,董泽宏. 中药现代研究与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.
- [2] Zhang L N, Li X L, Xu X J, et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight and conformation of lentinan[J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(8): 1515-1521.
- [3] Harvey D J, Bateman R H, Bordoli R S, et al. Ionisation and fragmentation of complex glycans with a quadrupole time-of-flight mass spectrometer fitted with a matrix-assisted laser desorption/ionisation ion source[J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2000, 14(22): 2135-2142.
- [4] Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds[J]. *Int J Mass Spectr*, 1987, 78: 53-68.
- [5] 邓慧敏,张珍英,查庆民,等. MALDI-TOF-MS测定高聚合度葡萄糖及不同基体在测定中的作用比较[J]. 高等学校化学学报,2003,24: 996-999.
- [6] 陈海霞,高文远. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在糖类化合物研究中的应用[J]. 质谱学报,2005,26(2): 108-114.
- [7] Danis P O, Karr D E, Simonsick W J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry characterization of poly (butyl-methacrylate) synthesized by group-transfer polymerization[J]. *Macromolecules*, 1995, 28: 1229-1232.
- [8] Dey M, Castoro J A, Wilkins C L. Determination of molecular weight distributions of polymers by MALDI-FT-MS[J]. *Anal Chem*, 1995, 67(9): 1575-1579.
- [9] 宋立人,洪 恂,丁续亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 上册. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [10] Sottani C, Fiorentino M, Minoia C, et al. Matrix performance, in matrix-assisted laser desorption/ionization for molecular weight determination in sialyl and non-sialyl oligosaccharide proteins[J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 1997, 11(8): 907-913.
- [11] Roethlisberger P, Iida-Tanaka N, Hollemeyer K, et al. Unique poly (glycerophosphate) lipoteichoic acid and the glycolipids of a *Streptococcus* sp. closely related to *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(17): 5520-5530.
- [12] Nigou J, Gilliron M, Brando T, et al. Structural definition of arabinomannans from *Mycobacterium bovis* BCG[J]. *Glycocon*, 1999, 16(6): 257-264.
- [13] Harvey D J, Naven T J, Kuster B, et al. Use of aconventional point detector to record matrix-assisted laser desorption/ionization spectra from a magnetic sector instrument[J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 1995, 9(15): 1556-1561.

兴安白头翁根茎的化学成分研究

孙 辉¹,李 茜¹,叶文才^{1,2*},赵守训¹,姚新生²

(1. 中国药科大学 天然药物化学教研室,江苏 南京 210009; 2. 暨南大学 中药及天然药物研究所,广东 广州 510630)

摘要:目的 研究毛茛科兴安白头翁 *Pulsatilla dahurica* 根茎的化学成分。方法 采用硅胶和Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、高效液相制备色谱对兴安白头翁化学成分进行分离,通过理化性质和波谱方法鉴定其结构。结果 从兴安白头翁根茎中分离得到11个化合物,分别是常春藤皂苷元28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(I)、3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷元28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(II)、ciwujianoside C₃(III)、3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷元28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(IV)、3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷元28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖酯苷(V)、3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 2)[β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷元28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -

MALDI-TOF-MS测定天然白芨多糖相对分子质量的研究

作者: 程安媛, 朱照静, 徐丹, CHENG An-yuan, ZHU Zhao-jing, XU Dan
作者单位: 重庆医科大学药学院, 药剂教研室, 重庆, 400016
刊名: 中草药 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(6)
被引用次数: 1次

参考文献(13条)

1. 郑虎占, 董泽宏 中药现代研究与应用 1997
2. Zhang L N, Li X L, Xu X J Correlation between antitumor activity, molecular weight and conformation of lentinan[外文期刊] 2005(08)
3. Harvey D J, Bateman R H, Bordoli R S Ionisation and fragmentation of complex glycans with a quadrupole time-of-flight mass spectrometer fitted with a matrix-assisted laser desorption/ionisation source[外文期刊] 2000(22)
4. Karas M, Bachmann D, Bahr U Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds [外文期刊] 1987
5. 邓慧敏, 张珍英, 查庆民 MALDI-TOF-MS测定高聚合度葡聚糖及不同基体在测定中的作用比较[期刊论文]-高等学校化学学报 2003(6)
6. 陈海霞, 高文远 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在糖类化合物研究中的应用[期刊论文]-质谱学报 2005(02)
7. Danis P O, Karr D E, Simonsick W J Matrix-assisted laser desorption aonization time-of-flight mass spectrometry characterization of poly (butyl-methacrylate) synthesized by group-transfer polymerization[外文期刊] 1995(4)
8. Dey M, Castoro J A, Wilkins C L Determination of molecular weight distributions of polymers by MALDI-FT-MS[外文期刊] 1995(09)
9. 宋立人, 洪恂, 丁续亮 现代中药学大辞典 2001
10. Sottani C, Fiorentino M, Minoia C Matrix performance, in matrix-assisted laser desorption/ionization for molecular weight determination in sialyl and non-sialyl oligosaccharide proteins[外文期刊] 1997(08)
11. Roethlisberger P, Iida-Tanaka N, Hollemeyer K Unique poly (glycerophosphate) lipoteichoic acid and the glycolipids of a Streptococcus sp. closely related to Streptococcus pneumoniae[外文期刊] 2000(17)
12. Nigou J, Gilliron M, Brando T Structural definition of arabinomannans from Mycobacterium bovis BCG 1999(06)
13. Harvey D J, Naven T J, Kuster B Use of aconventional point detector to record matrix-assisted laser desorption/ionization spectra from a magnetic sector instrument[外文期刊] 1995(15)

本文读者也读过(3条)

1. 何美玉, 陈辉 合成高分子的定量分析[期刊论文]-质谱学报2004, 25(z1)
2. 陈海霞, 高文远, CHEN Hai-xia, GAO Wen-yuan 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在糖类化合物研究中的应用[期刊论文]-质谱学报2005, 26(2)

3. [赵镇文](#), [熊蕾](#), [王振鹏](#), [辛斌](#), [胡伟华](#), [熊少祥](#), [Zhao Zhen-wen](#), [Xiong Lei](#), [Wang Zhen-Peng](#), [Xin Bin](#), [Hu Wei-Hua](#), [Xiong Shao-Xiang](#) [壳聚糖的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析](#)[期刊论文]-[分析化学](#)2007, 35(7)

引证文献(1条)

1. [王晓敏](#), [吴明开](#), [罗晓青](#) [珍稀药用兰科植物白及的研究现状与展望](#)[期刊论文]-[贵州农业科学](#) 2011(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200806006.aspx