

基于全甲基化及 ESI-Q Exactive-MS 验证黄芪多糖 APS-II 酶解寡糖的结构

郝志强^{1,2,3}, 李虎峰^{1,2,3}, 李 科^{1,2,3,4*}, 乔书玲⁵, 秦雪梅^{1,2,3}, 杜昱光⁴, 李震宇^{1,2,3}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

5. 河北省新乐市农业农村局, 河北 石家庄 050000

摘要: 目的 研究黄芪多糖 APS-II 酶解寡糖结构信息, 为明确黄芪多糖 APS-II 构效关系的关键结构提供依据。方法 制备并使用内切 α -1,4-葡聚糖糖苷水解酶降解了 APS-II, 通过全甲基化衍生化方式对 APS-II 酶解寡糖进行衍生化, 结合 MALDI-TOF-MS 生物质谱以及高分辨质谱仪器 ESI-Q Exactive-MS 对全甲基化 APS-II 酶解寡糖进行结构解析。结果 通过 MALDI-TOF-MS 生物质谱对全甲基化后的 APS-II 酶解寡糖相对分子质量进行分析, 得出全甲基化方法的可行性, 并通过 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱对酶解寡糖聚合度为 2~11 糖中 20 种糖链片段进行解析。结论 通过对全甲基化后的 APS-II 酶解寡糖的结构解析, 明确了糖链含有 $\rightarrow 4,6$ - α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 及 $\rightarrow 2,4$)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 等分支结构, 推测含有该分支结构的糖链和 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式共存的支链结构为 APS-II 发挥免疫活性的关键结构。

关键词: 黄芪多糖; 酶解寡糖; 全甲基化; 裂解规律; 结构解析

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)10-3426-23

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.004

Structure verification of APS-II enzymatic oligosaccharides of *Astragalus* polysaccharides based on permethylation and ESI-Q Exactive-MS

HAO Zhiqiang^{1,2,3}, LI Hufeng^{1,2,3}, LI Ke^{1,2,3,4}, QIAO Shuling⁵, QIN Xuemei^{1,2,3}, DU Yuguang⁴, LI Zhenyu^{1,2,3}

1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Functional Substances of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

4. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

5. Agriculture and Rural Bureau of Xinle City of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To study the structural information of APS-II enzymatic oligosaccharides, so as to explore the relationship between the biological activity and structure of oligosaccharides in APS-II enzymatic oligosaccharides. **Methods** APS-II was prepared and degraded by endo- α -1,4-glucanase hydrolase, and APS-II enzymatic oligosaccharides were derivatized by permethylation, and the structure of permethylated APS-II enzymatic oligosaccharides was analyzed by MALDI-TOF-MS biomass spectrometry and high resolution mass spectrometry ESI-Q Exactive-MS. **Results** The molecular weight of APS-II enzymatic oligosaccharides after permethylation was analyzed by MALDI-TOF-MS biomass spectrometry, and the feasibility of the permethylation method was obtained. The ESI-Q Exactive-MS high resolution mass spectrometry was used to analyze the 20 sugar

收稿日期: 2025-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 国家博士后科学基金资助项目 (2019M650851); 国家重点研发计划 (2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金

作者简介: 郝志强 (1998—), 男, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 17735745790@163.com

***通信作者:** 李 科, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制与品质评价、天然药物研发。E-mail: like@sxu.edu.cn

chain fragments in the enzymatic oligosaccharides with a degree of polymerization of 2—11. **Conclusion** Through the structural analysis of the permethylated APS-II enzymatic oligosaccharides, it was clarified that the sugar chain contained the branch structure of $\rightarrow 4,6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{and}\rightarrow 2,4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$. It is speculated that the sugar chain containing the above branch structure coexisting with the 1 $\rightarrow$ 4 and 1 $\rightarrow$ 6 connection modes are the key structures for APS-II to exert immune activity.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; enzymatic oligosaccharides; permethylation; cleavage pattern; structural analysis

黄芪多糖 (*Astragalus* polysaccharide, APS) 是黄芪中含量最丰富、生物活性最强的一种成分, 具有调节机体免疫功能、改善血糖、抗肿瘤等药理作用^[1-3]。前期研究中发现, 黄芪多糖主要由 APS-I ($> 2 \times 10^6$)、APS-II (1×10^4) 这 2 种不同相对分子质量的黄芪多糖组成, 且 APS-II 活性更强^[4-5]。对使用 α -1,4-葡聚糖内切酶降解后的 APS-II 进行体外活性筛选后发现 10~14 糖活性较 2~9 糖更强, 且活性比降解前更强^[6]。对 APS-II 酶解寡糖进行结构解析后发现 10~14 糖中存在 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式共存的支链结构, 推测 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式共存的支链结构为 APS-II 发挥免疫活性的关键结构^[7]。通过不同的方法对 APS-II 酶解寡糖进行结构解析可以对 APS-II 酶解寡糖的结构序列信息进行验证, 从而明确黄芪多糖发挥免疫活性的物质基础, 为黄芪酶解寡糖的开发利用以及黄芪多糖的质量控制提供依据。因此本研究采用全甲基化衍生方式, 对酶解寡糖衍生化, 同时结合 MALDI-TOF-MS 与 ESI-Q Exactive-MS 对全甲基化糖链进行结构解析。

全甲基化是糖链衍生化的一种重要方式。全甲基化是对糖链进行全甲基化, 水解还原, 乙酰化, 从而形成部分甲基化的糖醇乙酸酯 (PMAAs), 结合 GC-MS 分析对糖苷键进行分析^[8-10]。本课题组前期通过对未衍生化的 APS-II 酶解寡糖进行解析, 得出 APS-II 酶解寡糖中 10~14 糖中存在 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式共存的支链结构。而全甲基化与未衍生化的糖链相比, 离子化产率更高, 更加有利于糖链的裂解, 且全甲基化能够降低糖链极性, 增加其在反向色谱柱中的保留能力, 适用于极性相似的糖链分离解析。因此本研究采用全甲基化的方式对 APS-II 酶解寡糖进行衍生化。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 主要用于生物大分子的质谱解析, 可直接分析混合物。通常只产生分子离子, 与质量一一对应, 能够用于直接反映寡糖片段信息, 具有直观性好, 准确度高且不需要对照品等

优点^[11]。而 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱具有高通量、高灵敏度和低检出限等优点。因此本研究采用 MALDI-TOF-MS 对全甲基化寡糖相对分子质量进行分析从而验证甲基化是否完全。同时结合 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱对全甲基化的 APS-II 酶解寡糖进行结构解析。

为了进一步验证 APS-II 酶解寡糖结构信息, 本研究采用全甲基化对 APS-II 酶解寡糖进行衍生化, 并通过 MALDI-TOF-MS 对全甲基化 APS-II 酶解寡糖进行表征, 验证甲基化是否完全, 并将 MALDI-TOF-MS 中寡糖分子离子峰在 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱中进行分子离子峰的提取以及结构解析, 对酶解寡糖聚合度为 2~11 糖中的 20 种糖链片段进行解析, 丰富了黄芪寡糖库, 对黄芪寡糖及多糖的构效关系研究具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SC-3610 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); ZX-LGJ-18 型普通型冷冻干燥机 (上海知信实验仪器技术有限公司); 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 蒸发光检测器 (安徽皖仪科技股份有限公司); Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱 (美国 Thermo 公司); Q-Exactive-Orbitrap 四极杆轨道阱质谱仪 (美国 Thermo 公司); 基质辅助解析质谱 MALDI-TOF-MS (德国瑞士布鲁克公司); Milli-Q Gradient A 10 超纯水仪 (密理博上海贸易有限公司); GS-NF500 型膜片式切向流膜分离系统 (海颐信生物科技有限公司)。

1.2 药材

仿野生黄芪 (2019 年 5 月于山西浑源产地采集), 山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

1.3 试剂

α -1,4-葡聚糖 2~8 糖标准品 (批号分别为 2019-04、2020-07、2020-09、2021-10、2021-09、2021-03、2021-06, 质量分数均大于 98%), 购自上海惠诚生

物科技有限公司; 色谱级乙腈 (批号 20210429)、质谱级甲酸 (批号 20210621)、质谱级甲醇 (批号 20210701)、质谱级乙腈 (批号 20210401) 均购自上海麦克林生化科技公司。

2 方法与结果

2.1 APS-II 分离制备

根据参考文献方法^[6], 干燥黄芪粉碎后过 100 目筛, 取粉末 15 g, 加入去离子水, 料液比为 1:20, 搅拌均匀, 在 90 °C 下水浴提取 4 h, 每小时搅拌 1 次。真空抽滤后合并滤液, 加入 200 U 木瓜蛋白酶搅拌均匀, 在 45 °C 下水浴 6 h, 然后加热到 90 °C 高温灭活 5 min, 在 3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 mL 加 10% 三氯乙酸水溶液至总体积 200 mL, 冰浴 15 min 后静置 30 min, 离心, 取上清液 100 mL, 加入 900 mL 无水乙醇, 静置过夜。收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 APS。根据文献方法^[12], 将 APS 配制成质量浓度为 5 g/L 溶液, 通过截留相对分子质量为 1×10^4 的超滤膜得到 APS-II 溶液, 冷冻干燥, 即得 APS-II。

2.2 APS-II 的酶解

依据文献中酶解方法^[4], 选用内切 α -1,4-葡聚糖糖苷水解酶对 APS 酶解, 酶浓度为 0.5 U/mL, 将 2 mL APS 溶液与 2 mL α -1,4-葡聚糖糖苷水解酶混合, 60 °C 水浴条件下酶解 90 min。酶解后, 沸水浴 10 min, 使酶溶液失活。离心, 收取清液, 冷冻干燥, 即得黄芪寡糖 APOS。

2.3 葡聚糖 2~8 糖全甲基化

称量葡聚糖 2~8 糖各 1 mg 混合, 加 2 mL 无水 DMSO, 在氩气保护下超声溶解。根据文献中甲基化方法^[13]对其进行甲基化。称量 50 mg NaH 粉末于烧瓶中, 加 5 mL 无水 DMSO, 氮气保护下, 磁力搅拌 1 h (60 °C、500 r/min)。合并以上 2 种液体, 氮气保护下, 超声反应 1 h。冷却后, 注射器抽取 CH_3I 1 mL, 避光逐滴加入红棕色反应液中, 氩气保护下冰浴超声反应 30 min, 重复 3 次。然后再向反应液中缓慢加入 5 mL 去离子水终止甲基化反应。加 5 mL 三氯甲烷萃取, 重复 5 次, 有机相合并; 加 5 mL 蒸馏水萃取, 重复 5 次, 收集有机相。在三氯甲烷相添加无水 Na_2SO_4 进行干燥, 少量棉花滤过后, 滤液用氮气吹干。

2.4 APS-II 寡糖的全甲基化及 MALDI-TOF-MS 分析

2.4.1 APS-II 寡糖的全甲基化

称量 5 mg APS-II 酶

解寡糖混合物糖, 全甲基化方法同“2.3”项。

2.4.2 MALDI-TOF-MS 分析 分别取 1 mL 全甲基化的葡聚糖标品与 APS-II 样品溶液, 分别与等体积的甲醇溶液充分混匀, 取 2 μL 溶液点样于 MTP Anchorchip 384 点的靶板上, 真空抽干。再加 1 μL 质量浓度为 20 g/L 的 DHB 溶液至样品点上, 真空抽干。一级质谱方法参数如下: 离子源 1: 7.5 kV; 离子源 2: 6.75 kV; 反射电压 1: 29.5 kV; 反射电压 2: 13.95 kV。激发光源为 N_2 激光 (337 nm), 相对分子质量检测范围为 m/z 500~3 500。

2.5 基于 ESI-Q Exactive-MS 的全甲基化 APS-II 酶解寡糖结构表征

称取 0.5 mg 样品, 加入 0.5 mL 50% 甲醇水溶解, 过 0.22 μm 滤膜, 利用 UPLC-ESI Q Exactive-MS 进行分析。

2.5.1 色谱条件 Dionex UltiMate 3000 UHPLC, 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 0.1% 甲酸水 (A) 和质谱级乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~2 min; 10%~60% B; 2~18 min; 60%~70% B; 18~20 min, 70%~100% B; 20~30 min, 100% B; 30~35 min, 100%~10% B), 体积流量为 0.2 mL/min, 进样量为 5 μL , 柱温为 40 °C。

2.5.2 质谱条件 Q-Exactive/Focus, 参照文献方法^[14], ESI, 正负离子切换, 扫描模式为 Full Scan/dd- MS^2 , m/z 采集范围为 200~3 000, 喷雾电压为正极 3.5 kV、负极 2.5 kV, 毛细管温度为 320 °C, 加热器温度为 300 °C, 鞘气体积流量为 35 arb, 辅助气体积流量为 10 arb。

3 结果与分析

3.1 全甲基化方法验证

全甲基化葡聚糖 2~8 糖的 MALDI-TOF-MS 表征结果如图 1 所示, 其中 $\text{dp}_2 \sim \text{dp}_8$ 表示聚合度为 2~8 的葡聚糖, 各离子峰的 m/z 分别为 477.201 5、681.299 8、885.399 8、1089.500 1、1293.606 5、1 497.711 3 和 1 701.814 0, 均相差 204.10, 而未衍生化葡聚糖 2~8 标准品相对分子质量分别为 342、504、666、828、990、1 152 和 1 314。

通过对衍生化前后的葡聚糖 2~8 糖的相对分子质量的比较得出, 衍生化前后的葡聚糖 2~8 糖相差的相对分子质量为葡聚糖 2~8 糖中羟基全部转化为甲氧基并加荷 Na^+ 的相对分子质量, 证明全甲基化完全。因此得出本实验的全甲基化方法对寡糖链全

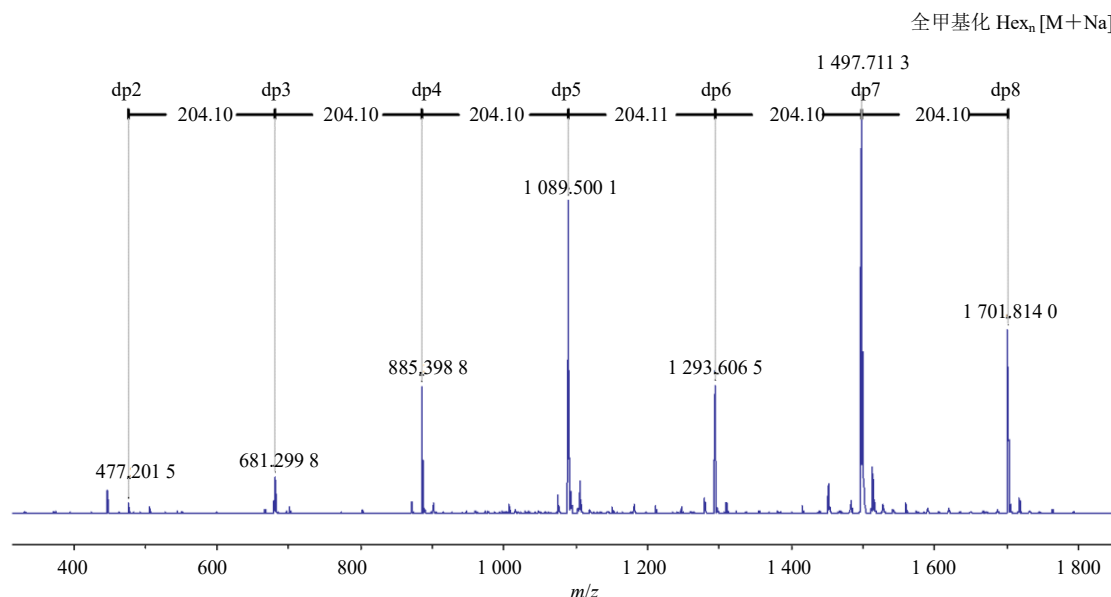


图 1 葡聚糖 2~8 糖 MALDI-TOF-MS 图

Fig. 1 MALDI-TOF-MS diagram of dextran 2—8 sugar

甲基化是可行的, 为后续全甲基化黄芪酶解寡糖的 MALDI-TOF-MS 表征以及 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱解析中分子离子峰的识别提供实验依据。

3.2 全甲基化 APS-II 寡糖制备及其 MALDI-TOF-MS 表征

全甲基化寡糖 MALDI-TOF-MS 表征结果见图 2, 其中 dp2~dp18 表示聚合度为 2~18 的 APS-II 酶解寡糖。图中显示主要存在 2 种类型碎片离子, 将其分别称作 A 型和 B 型离子。A 型离子相对分子质量分别为 477.219 3、681.307 3、885.394 3、1 089.518 8、

1 293.647 7、1 497.761 9、1 701.876 2、1 905.979 0、2 110.071 5、2 314.148 9 和 2 518.189 5, 相邻聚合度的全甲基化糖链的相对分子质量之差均为 204, 且 A 型离子的相对分子质量符合己糖链羟基全甲基化后的相对分子质量, 结合上述葡聚糖标准品 2~8 糖 MALDI-TOF-MS 的全甲基化规律, 可以推断 A 型离子为己糖链全甲基化后的 $[M+Na]^+$ 型离子分子, 且全甲基化完全。全甲基化后除主要的 A 型离子还出现了 B 型离子, 其相对分子质量为 839.330 0、1 043.431 8、1 247.571 9、1 451.671 6 和

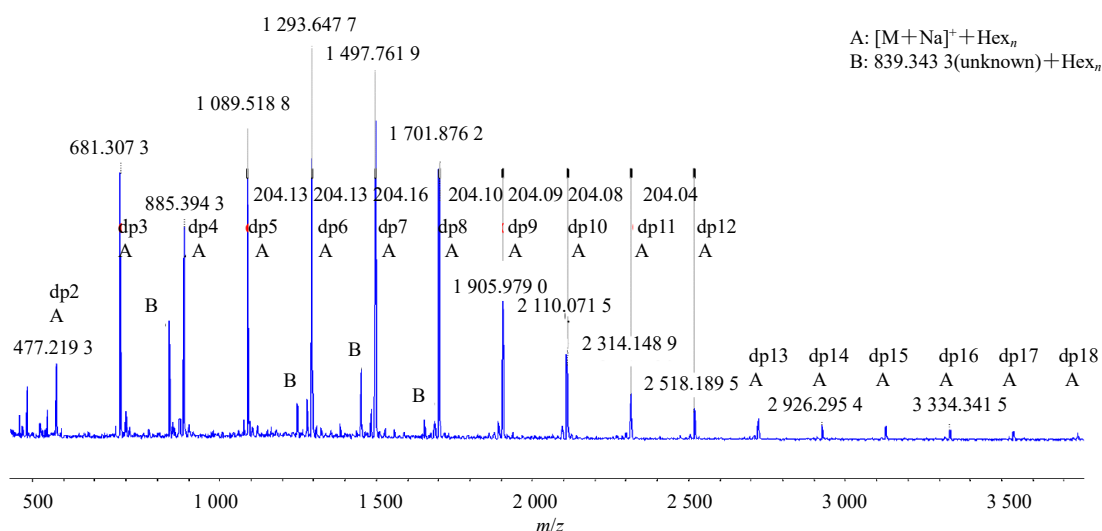


图 2 全甲基化黄芪酶解寡糖 MALDI-TOF-MS 表征

Fig. 2 MALDI-TOF-MS characterization of permethylated enzymatic oligosaccharides of *Astragalus* polysaccharides

1 655.786 3, 相邻聚合度的全甲基化糖链的相对分子质量之差也为 204, 根据相对分子质量分析该离子为非己糖链+己糖链结构构成的 839.343 3 (unknown) +Hex_n。

3.3 基于 ESI-Q Exactive-MS 的全甲基化 APS-II 酶解寡糖结构表征

ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱的总离子流以及提取离子流图如图 3、4 所示。其中 dp2~dp11 表示聚合度为 2~11 的 APS-II 酶解寡糖。2~11 糖二级碎片信息见表 1。根据酶解寡糖 MALDI-TOF-MS 实验结果中 A 型离子的分子离子峰质荷比对总离

子流图进行指认。

通过对酶解多糖进行全甲基化, 并结合 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱表征, 聚合度为 2~11 的寡糖链中共得出 20 种寡糖片段, 其中二糖 1 种, 三糖为 3a 和 3b 2 种, 四糖为 4a 和 4b 2 种, 五糖为 5a 和 5b 2 种, 六糖为 6a 和 6b 2 种, 七糖为 7a 和 7b 2 种, 八糖为 8a、8b 和 8c 3 种, 九糖为 9a、9b 和 9c 3 种, 十糖为 10a 和 10b 2 种, 十一糖 1 种, 根据 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱碎片信息, 对上述 20 种寡糖片段进行结构解析。

3.3.1 二糖 该二糖的 m/z 为 477.230 7, 保留时间

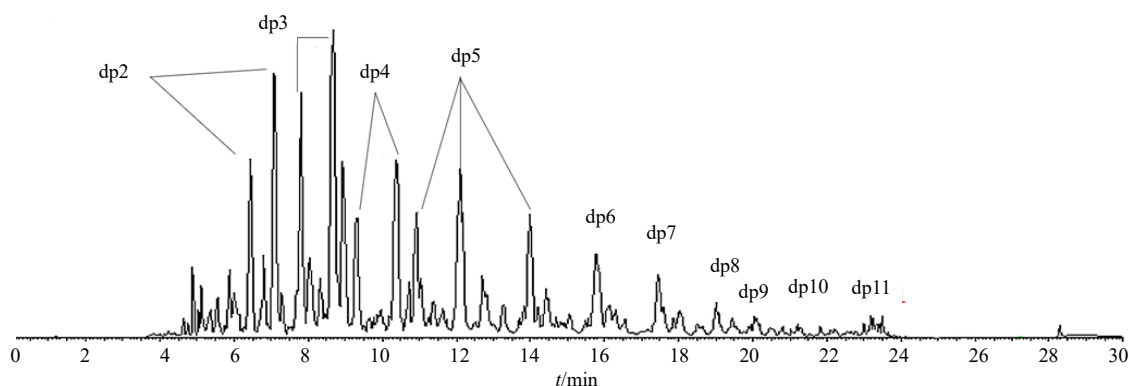


图 3 全甲基化后 APS-II 酶解寡糖 ESI-Q Exactive-MS 总离子流图

Fig. 3 ESI-Q Exactive-MS total ion chromatogram of APS-II enzymatic oligosaccharides after permethylation

为 7.10 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别得到 m/z 为 241.112 5 的 B 型碎片离子和 m/z 为 259.113 9 的 C 型碎片离子, 此外非还原末端发生跨环断链 ^{2,4}A, 得到 m/z 为 316.125 5 (315 同位素) 的符合 1→4 连接方式裂解机理的碎片离子。因此推测该二糖为麦芽糖, 二级质谱图及结构见图 5。

3.3.2 三糖

(1) 3a: 该三糖的 m/z 为 681.329 9, 保留时间为 7.83 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别得到 m/z 为 259.114 9 和 463.215 2 的 C 型碎片离子。此外还原末端发生跨环断链 ^{1,5}X₁, 得到 m/z 为 287.109 9 的符合 1→4 连接方式裂解机理的碎片离子。非还原末端发生跨环断链 ^{0,4}A₃, 得到 m/z 为 506.925 6 的碎片离子, 这一碎片离子不符合 1→4 连接方式, 因此推测该三糖有其他连接方式存在。通过对 1→4 连接方式的 RDA 裂解机理推测, 1→6 连接 RDA 裂解机理主要发生的是 ^{0,4}A 和 ^{3,5}A 跨环断链。因此该三糖存在 1→4 连接和 1→

6 连接, 其结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp-1→6- α -D-Glcp

(2) 3b: 该三糖的 m/z 为 681.330 2, 保留时间为 8.61 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别得到 m/z 为 240.905 7、445.205 9 的 B 型离子碎片和 259.115 7、463.215 0 的 C 型离子碎片, 其中 C 型离子碎片丢失 1 分子甲醇, 得到 m/z 为 27.089 5 和 431.102 5 的碎片离子。此外还原末端发生跨环断链 ^{1,5}X₁, 得到 m/z 为 287.110 9 的符合 1→4 连接方式裂解机理的碎片离子。因此推测该三糖为麦芽三糖, 二级质谱图及结构见图 7。

3.3.3 四糖

(1) 4a: 该四糖的 m/z 为 885.430 1, 保留时间为 10.29 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别得到 m/z 为 445.206 1 的 B 型离子碎片和 259.115 7、463.215 6 和 667.314 6 的 C 型离子碎片, 其中 C₁ 和 C₂ 丢失 1 分子甲醇 (此处 C₁ 表示将 m/z 从小到大排列后的第 1 个 C 型离子碎片, 以此类推), 得到 m/z 为 227.088 9 和 431.185 9

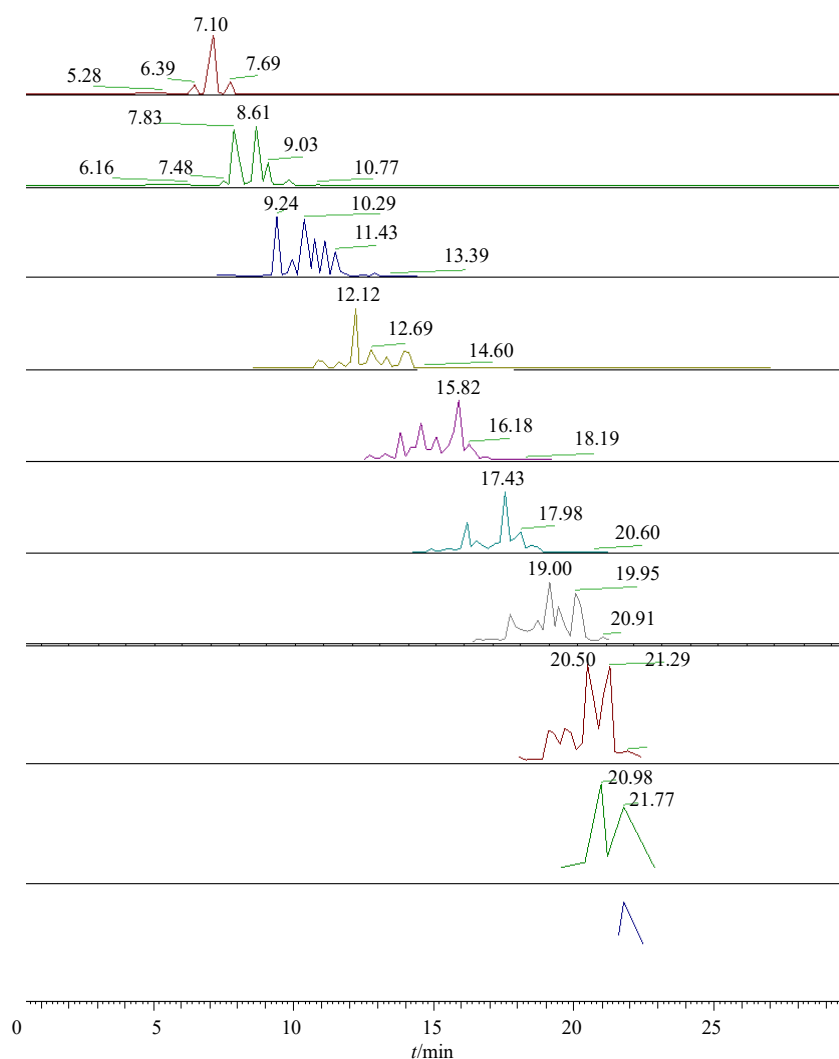


图 4 全甲基化后 APS-II 酶解寡糖提取离子流图

Fig. 4 Extracted ion chromatogram of APS-II enzymatic oligosaccharides after permethylation

表 1 全甲基化 APS-II 酶解寡糖二级碎片信息

Table 1 Secondary fragment information of permethylated APS-II enzymatic oligosaccharides

聚合度	同分异构体	tr/min	分子式		相对分子质量		(+) 主要特征碎片离子 (m/z)
			甲基化前	甲基化后	甲基化前	甲基化后	
2		7.10	C ₂ H ₁₂ O ₁₁	C ₂₀ H ₃₈ O ₁₁	342	477	241.112 5, 259.115 4, 477.230 7
3	3a	7.83	C ₁₈ H ₃₂ O ₆	C ₂₉ H ₅₄ O ₁₆	504	681	259.114 9, 463.215 2, 681.329 9
	3b	8.61					240.905 7, 259.115 7, 445.295 9, 463.215 0, 681.330 2
4	4a	10.19	C ₂₄ H ₂₄ O ₂₁	C ₃₈ H ₇₀ O ₂₁	666	885	259.115 7, 445.206 1, 463.215 6, 667.314 6, 885.430 1
	4b	10.34					259.116 2, 463.215 4, 667.315 8, 885.429 8
5	5a	12.12	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	C ₄₇ H ₈₆ O ₂₆	828	1 089	259.115 4, 463.214 9, 649.308 0, 667.314 6, 853.396 1, 871.413 3, 1 089.529 8
	5b	12.69					259.116 6, 463.214 7, 667.313 9, 871.415 3, 1 089.529 5
6	6a	15.02	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	C ₅₆ H ₁₀₂ O ₃₁	990	1 293	259.114 3, 445.205 5, 463.215 1, 649.302 9, 667.314 6, 853.395 5, 871.414 4, 1 057.489 9, 1 075.512 8, 1 293.630 1
	6b	15.79					259.114 3, 445.205 5, 463.215 1, 649.302 9, 667.314 6, 853.395 5, 871.414 4, 1 075.489 9, 1 293.630 1

表 1 (续)

聚合度	同分异构体	tr/min	分子式		相对分子质量		(+) 主要特征碎片离子 (<i>m/z</i>)
			甲基化前	甲基化后	甲基化前	甲基化后	
7	7a	16.43	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆	C ₆₅ H ₁₁₈ O ₃₆	1 153	1 497	241.140 2, 259.115 5, 445.203 6, 463.414 8, 649.315 4, 667.314 0, 853.398 3, 871.413 5, 1 057.482 9, 1 075.513 8, 1 262.589 5, 1 279.615 6, 1 497.728 8
	7b	17.43					241.105 4, 259.114 7, 445.203 8, 463.214 1, 649.301 8, 667.314 9, 853.396 6, 871.414 8, 1 057.499 9, 1 075.513 6, 1 261.574 3, 1 279.612 3, 1 497.729 4
8	8a	19.00	C ₄₈ H ₈₂ O ₄₁	C ₇₄ H ₁₃₄ O ₄₁	1 314	1 701	241.104 0, 259.115 1, 445.205 2, 463.215 9, 649.301 6, 667.313 8, 853.398 7, 871.413 2, 1 057.493 8, 1 075.512 3, 1 261.595 7, 1 279.614 9, 1 483.714 4, 1 701.831 6
	8b	19.35					241.104 0, 259.115 2, 445.205 2, 463.215 1, 649.301 6, 667.312 7, 853.398 7, 871.414 1, 1 057.493 8, 1 075.512 6, 1 261.609 0, 1 279.614 6, 1 483.711 8, 1 701.831 7
	8c	19.95					241.104 8, 259.115 3, 445.203 3, 463.214 6, 649.300 4, 667.314 3, 853.395 3, 871.414 0, 1 075.513 6, 1 261.595 6, 1 279.614 0, 1 465.695 2, 1 483.712 9, 1 701.831 5
9	9a	19.69	C ₅₄ H ₉₂ O ₄₆	C ₈₃ H ₁₅₀ O ₄₆	1 476	1 905	241.104 6, 259.115 0, 445.204 2, 463.214 9, 649.306 2, 667.314 1, 853.409 4, 871.414 4, 1 057.507 0, 1 075.515 6, 1 261.358 8, 1 279.614 6, 1 465.716 4, 1 483.710 2, 1 687.809 1, 1 905.933 9
	9b	20.50					241.105 2, 259.115 1, 445.204 3, 463.215 3, 649.306 3, 667.314 3, 853.402 6, 871.414 4, 1 057.509 9, 1 075.513 5, 1 261.358 8, 1 279.613 4, 1 483.721 0, 1 687.814 2, 1 905.934 3
	9c	21.29					241.105 2, 259.115 4, 445.208 3, 463.215 3, 649.305 2, 667.314 2, 853.405 9, 871.414 9, 1 075.514 4, 1 261.358 8, 1 279.614 81 465.710 9, 1 483.714 1, 1 669.819 3, 1 905.933 7
10	10a	20.98	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₅₁	C ₉₂ H ₁₆₆ O ₅₁	1 638	2 109	259.115 3, 445.202 6, 463.215 1, 649.303 9, 667.314 8, 853.399 5, 871.413 8, 1 057.502 6, 1 075.521 7, 1 261.609 0, 1 279.615 8, 1 465.7109, 1 483.713 3, 1 687.817 8, 1 891.916 1, 2 110.021 5
	10b	21.77					241.105 0, 259.114 4, 445.208 4, 463.215 1, 649.303 9, 667.314 8, 853.399 5, 871.413 8, 1 057.502 6, 1 075.521 7, 1 261.609 0, 1 279.615 8, 1 465.710 9, 1 483.713 3, 1 669.800 5, 1 687.817 8, 1 873.939 6, 1 891.916 1, 2 110.020 5
11		21.80	C ₆₆ H ₁₁₂ O ₅₆	C ₁₀₁ H ₁₈₂ O ₅₆	1 800	2 313	259.114 5, 445.204 6, 463.214 9, 649.304 4, 667.314 5, 853.400 6, 871.413 6, 1 057.500 6, 1 075.512 0, 1 261.606 9, 1 279.613 5, 1 483.712 7, 1 669.794 3, 1 687.815 3, 1 873.893 6, 1 891.919 0, 2 077.990 2, 2 096.023 7, 2 315.123 5

糖为麦芽四糖，二级质谱图及结构见图 8。

(2) 4b: 该四糖的 *m/z* 为 885.429 8, 保留时间的碎片离子, C₃ 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水, 得到 *m/z* 为 415.196 2 的碎片离子。此外还原末端发生跨

环断链 ^{0,2}X₀, 得到 *m/z* 为 111.044 4 的碎片离子, 发生跨环断链 ^{1,5}X₁、^{1,5}X₂, 得到 *m/z* 为 287.110 9 和 491.209 7 的碎片离子, 非还原末端发生跨环断链 ^{2,4}A₂, 得到 *m/z* 为 315.142 2 的碎片离子。^{1,5}X 和 ^{2,4}A

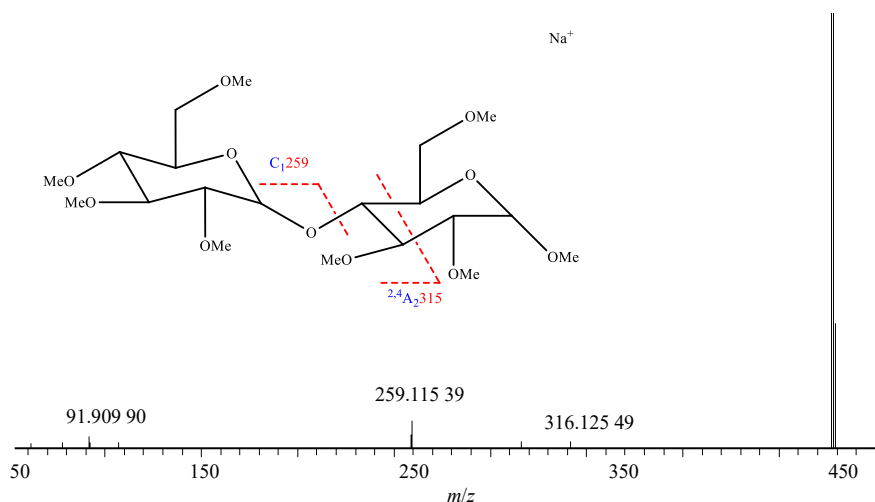


图 5 二糖二级质谱及结构图

Fig. 5 MS/MS spectrum and structure of disaccharide

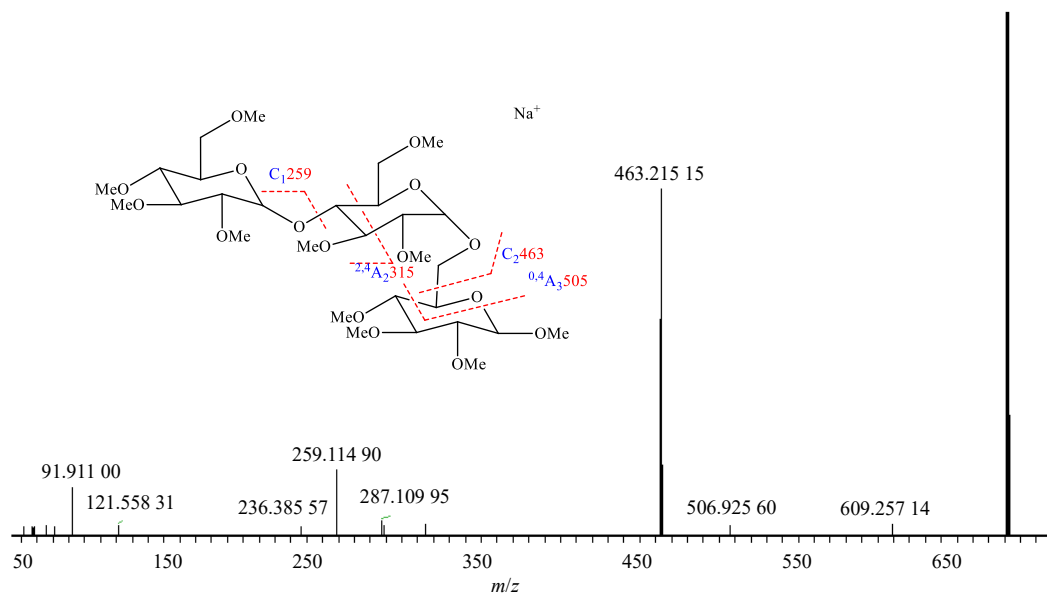


图 6 三糖 (3a) 二级质谱及结构图

Fig. 6 MS/MS and structure of trisaccharide (3a)

均符合 1→4 连接方式的 RDA 裂解机理。推测该四为 10.34 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 得到 m/z 为 259.116 2、463.215 4 和 667.315 8 的 C 型离子碎片, 其中 C_2 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 431.189 5 的离子碎片, 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.199 2 的离子碎片。此外在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_2$, 得到 m/z 为 315.142 2 的符合 1→4 连接方式裂解机理的碎片离子。该四糖产生的 m/z 为 343.160 3 的碎片离子, 不符合 1→4 连接和 1→6 连接的裂解规律。因此根据全甲基化的 RDA 裂解模式推测该碎片离

子是 1→2 连接方式裂解后得到的碎片离子, 1→2 连接的糖苷键的 RDA 裂解机理主要为 $^{3,5}X$ 和 $^{0,4}X$ 裂解。还原端 2 糖异头碳先丢失 1 分子甲醇, 然后发生跨环断链 $^{3,5}X_1$ 形成 m/z 为 343.160 3 的碎片离子。由此可得还原端 2 糖处 C-1 位未连接, 推测该位处连接的糖链被 α -1,4-葡萄糖糖苷水解酶酶解, 且 C-2 位和 C-4 位被连接。综上所述, 还原端 2 糖处 C-2 位为支链位点→2,4)-Glc p -(1→, 支链结构见图 9, 二级质谱图及结构见图 10。

3.3.4 五糖

(1) 5a: 该五糖的 m/z 为 1 089.529 8, 保留时

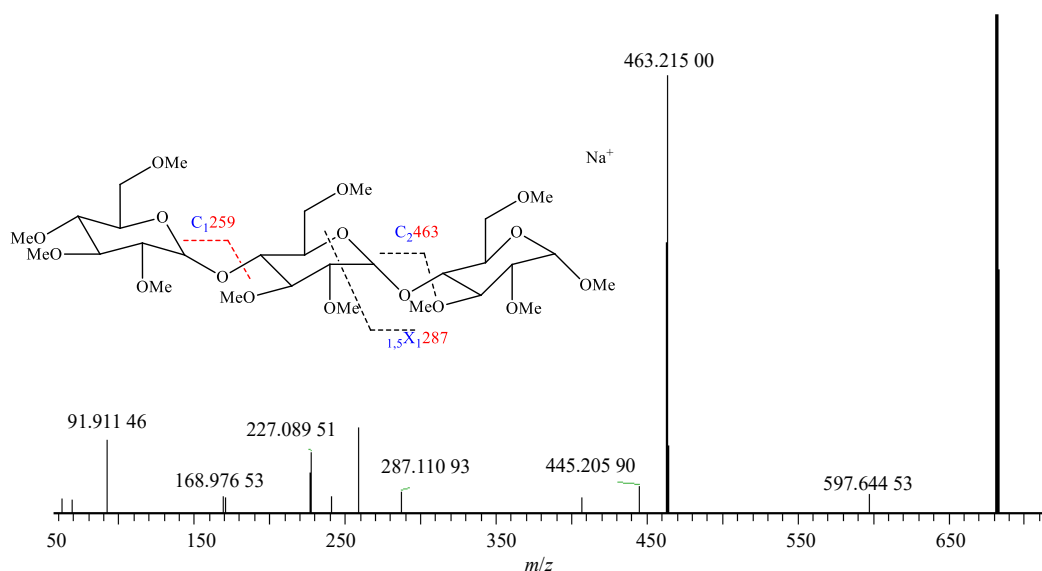


图 7 三糖 (3b) 二级质谱及结构

Fig. 7 MS/MS and structure of trisaccharide (3b)

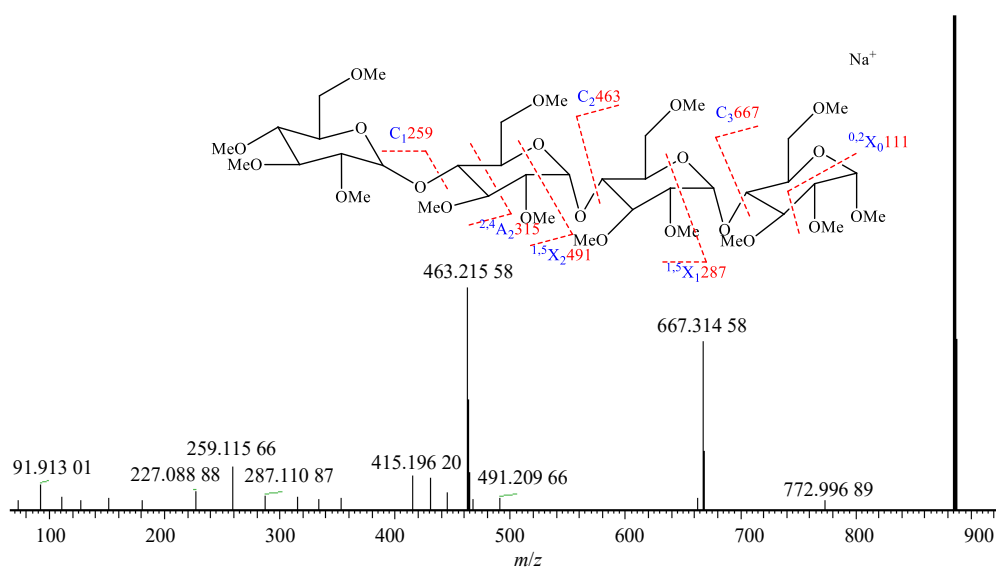


图 8 四糖 (4a) 二级质谱及结构

Fig. 8 MS/MS and structure of tetrasaccharide (4a)

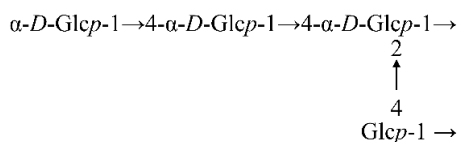


图 9 四糖 (4b) 的结构图

Fig. 9 Structure diagram of tetrasaccharide (4b)

间为 12.12 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别得到 m/z 为 649.308 0 和 853.396 1 的 B 型离子碎片和 259.115 4、463.214 9、

667.314 6 和 871.413 3 的 C 型离子碎片, 其中 $C_1 \sim C_3$ 丢失 1 分子甲醇后分别得到 m/z 为 227.090 1、431.190 9、635.291 6 的碎片离子, C_2 和 C_3 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.196 7 和 619.296 5 的碎片离子。在还原末端发生跨环断链 $^{0.2}X_0$ 和 $^{0.3}X_0$, 得到 m/z 为 111.044 9 和 155.070 3 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{0.4}X_1$ 、 $^{0.4}X_2$ 、 $^{0.4}X_3$, 得到 m/z 为 287.109 7、491.214 3 和 697.715 9 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{2.4}A_3$ 。得到 m/z 为 519 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{3.5}A_3$, 得到 m/z 为

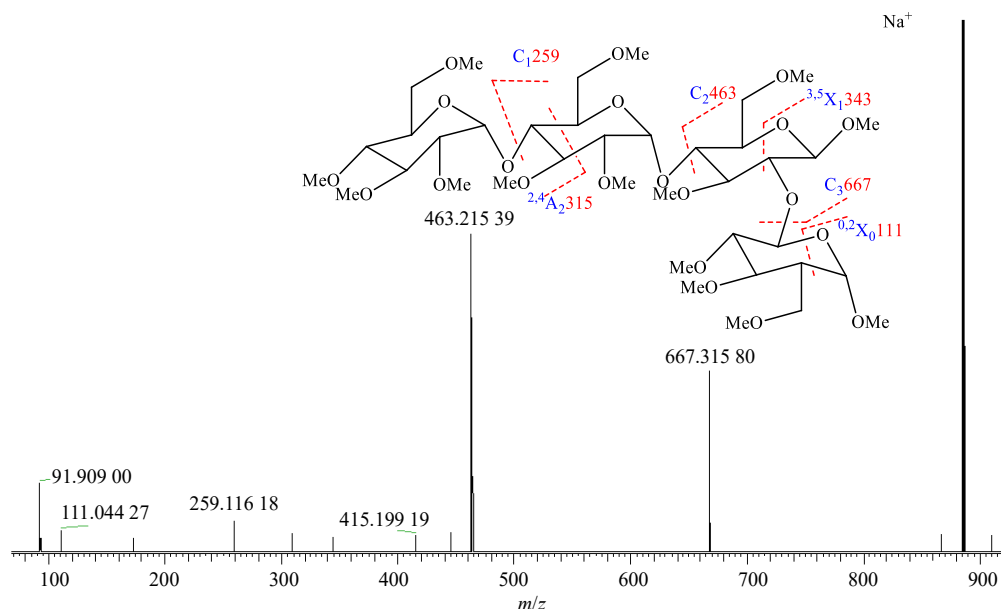


图 10 四糖 (4b) 二级质谱及结构

Fig. 10 MS/MS and structure of tetrasaccharide (4b)

533.257 9 和 737.362 0 的符合 1→4 连接方式裂解机理的碎片离子。因此推测该五糖为麦芽五糖，二级质谱图及结构见图 11。

(2) 5b: 该五糖的 m/z 为 1 089.539 5，保留时间为 12.69 min，分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型，主要发生糖苷键断裂，得到 m/z 为 259.116 6、463.214 7、667.313 9 和 871.415 3 的 C 型离子碎片，其中 C_2 和

C_4 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 431.191 2 和 635.290 4 的碎片离子， C_3 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 617.283 3 的碎片离子。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,2}X_0$ ，得到 m/z 为 111.044 9 的碎片离子。在非还原发生端跨环断链 $^{0,4}A_3$ ，得到 m/z 为 505.232 5 的符合 1→6 连接方式裂解机理的碎片离子。因此推测该五糖为 α -D-Glcp-1→4- α -D-

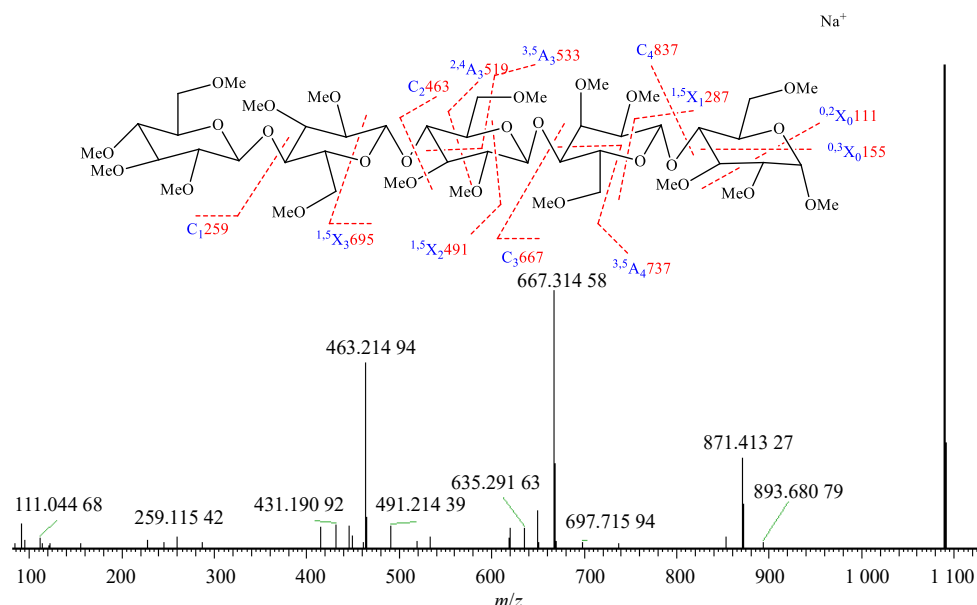


图 11 五糖 (5a) 二级质谱及结构

Fig. 11 MS/MS and structure of pentasaccharide (5a)

Glc-1 $\rightarrow$ 6- α -D-Glc-1 $\rightarrow$ 4- α -D-Glc-1 $\rightarrow$ 4- α -D-Glc-1，
二级质谱图及结构见图 12。

3.3.5 六糖

(1) 6a: 该六糖的 m/z 为 1 293.630 1，保留时间 15.02 min，分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型，主要发生糖苷键断裂，分别产生 m/z 为 445.205 5、649.302 9、853.395 5、1057.4899 的 B 型离子碎片和 259.114 3、463.215 0、667.314 6、871.414 4、1 075.512 8 的 C 型离子碎片，其中 C₁-C₄ 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.088 8、431.188 8、635.289 2、839.379 0 的碎片离子，丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 211.093 7、415.196 7、619.239 0 和 823.384 5 的碎片离子。C₂ 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 413.215 0 碎片，C₃ 丢失 2 分子甲醛产生 m/z 为

607.314 6 的碎片。此外在还原末端有跨环断链 $^{0,2}X_0$ 、 $^{0,3}X_0$ 发生，分别得到 m/z 为 111.044 3 和 155.070 9 的碎片离子，发生跨环断链 $^{1,5}X_1$ 、 $^{1,5}X_2$ 、 $^{1,5}X_3$ ，分别得到 m/z 为 287.108 6、491.208 3 和 695.301 8 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_2$ 、 $^{2,4}A_3$ 、 $^{2,4}A_4$ ，分别得到 m/z 315.141 9、519.240 8 和 723.338 6 的碎片离子，发生跨环断链 $^{3,5}A_3$ 和 $^{3,5}A_4$ ，分别得到 m/z 为 533.256 9 和 737.350 3 的碎片离子，其中 $^{2,4}A$ 和 $^{3,5}A$ 均符合 1 $\rightarrow$ 4 连接方式的 RDA 裂解机理。并且发生跨环断链 $^{0,4}A_6$ ，得到 m/z 为 1 131.532 0 的符合 1 $\rightarrow$ 6 连接裂解机理的碎片离子。因此推测该六糖存在 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式，其结构为 α -D-Glc-1 $\rightarrow$ (4- α -D-Glc-1)₃ $\rightarrow$ 4- α -D-Glc-1 $\rightarrow$ 6- α -D-Glc，二级质谱图及结构见图 13。

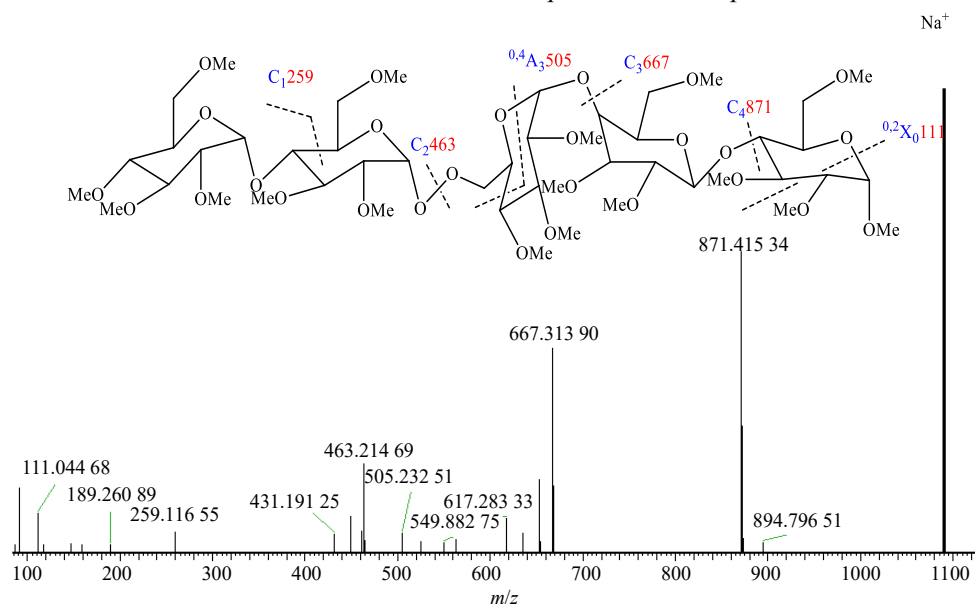


图 12 五糖 (5b) 二级质谱及结构

Fig. 12 MS/MS and structure of pentasaccharide (5b)

(2) 6b: 该六糖的 m/z 为 1 293.630 1，保留时间为 15.79 min，分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型，主要发生糖苷键断裂，分别产生 m/z 为 445.205 5、649.302 9 和 853.395 5 的 B 型离子碎片和 259.114 1、463.213 7、667.316 0、871.413 0 和 1 075.512 7 的 C 型离子碎片，其中 C₁ 和 C₂ 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.089 0 和 431.188 8 的碎片离子，丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 211.094 0 和 415.193 9 的碎片离子。C₂ 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.159 3 的碎片。C₃ 和 C₄ 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 617.278 4 和 821.370 5 碎片。此外，在还原末端发生跨环断链 $^{0,2}X_0$ 和 $^{0,3}X_0$ ，分别得到 m/z 为 111.044 2、

155.069 5 的碎片离子，发生跨环断链 $^{1,5}X_1$ ，得到 m/z 为 287.110 4 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_4$ ，得到 m/z 为 723.338 6 的碎片离子发生跨环断链 $^{3,5}A_3$ 和 $^{3,5}A_5$ ，分别得到 m/z 为 533.259 6 和 942.447 9 的符合 1 $\rightarrow$ 4 连接裂解机理的碎片离子。还发生跨环断链 $^{0,4}A_3$ ，得到 m/z 为 505.222 8 的符合 1 $\rightarrow$ 6 连接裂解机理的碎片离子。因此推测该六糖存在 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式，其结构为 α -D-Glc-1 $\rightarrow$ 4- α -D-Glc-1 $\rightarrow$ 6- α -D-Glc-1 $\rightarrow$ (4- α -D-Glc-1)₂ $\rightarrow$ 4- α -D-Glc-1，二级质谱图及结构见图 14。

3.3.6 七糖

(1) 7a: 该七糖的 m/z 为 1 497.728 7，保留时

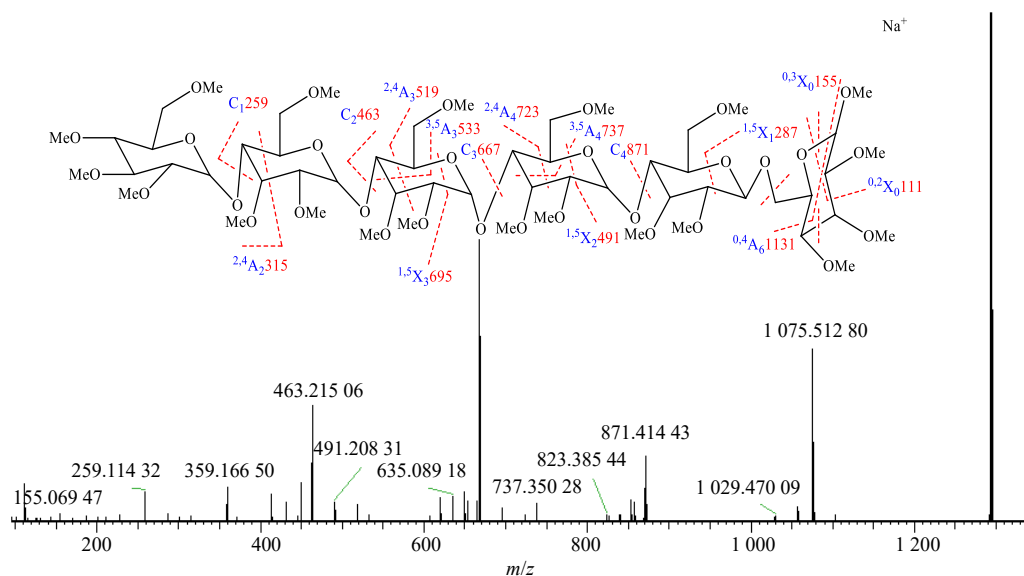


图 13 六糖 (6a) 二级质谱及结构

Fig. 13 MS/MS and structure of hexasaccharide (6a)

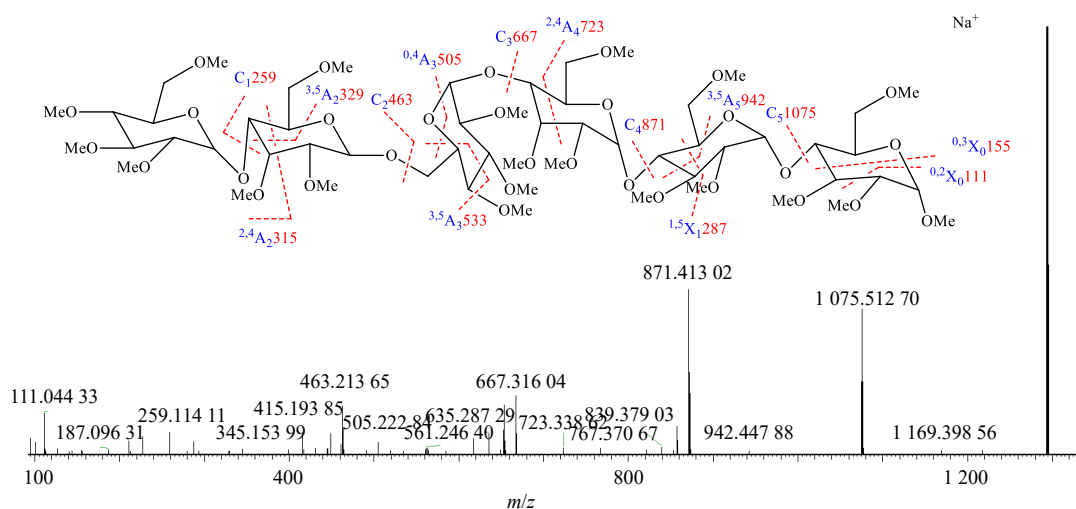


图 14 六糖 (6b) 二级质谱及结构

Fig. 14 MS/MS and structure of hexasaccharide (6b)

间为 16.43 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.140 2、445.203 6、649.315 4、853.398 3、1 057.482 9 和 1 262.589 5 的 B 型离子碎片和 259.114 7、463.214 1、667.314 0、871.413 5、1 075.513 8 和 1 279.615 6 的 C 型离子碎片, 其中 C_1 – C_5 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.089 5、431.188 0、635.291 5、839.384 2 和 1 043.477 9 的碎片离子, C_2 、 C_3 和 C_5 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.192 7、619.299 2 和 1 027.469 9 的碎片离子, C_3 和 C_4 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 617.275 1 和 821.367 5

的碎片离子, C_4 丢失 2 分子甲醛后得到 m/z 为 811.390 4 的碎片离子。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,2}X_0$ 、 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 111.044 2 和 155.069 8 的碎片离子, 在非还原末端有 $^{3,5}A_2$ 、 $^{3,5}A_3$ 、 $^{3,5}A_4$ 发生, 得到 m/z 为 329.157 3、533.256 4 和 737.354 4 的符合 1→6 连接裂解机理的碎片离子, 发生跨环断链 $^{0,4}A_2$ 、 $^{0,4}A_3$ 、 $^{0,4}A_4$ 、 $^{0,4}A_5$ 和 $^{0,4}A_6$, 得到 m/z 为 301.141 1、505.225 7、709.342 3、913.420 8 和 1 117.506 5 的符合 1→6 连接裂解机理的碎片离子。因此推测该七糖为线性 1→6 连接的糖链, 其结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₅→6- α -D-Glcp

质谱图及结构见图 15。

(2) 7b: 该七糖的 m/z 为 1 497.729 3, 保留时间为 17.43 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 241.105 4、445.203 8、649.301 8、853.396 6、1 057.482 9 和 1 262.589 5 的 B 型离子碎片和 259.115 5、463.414 8、667.314 0、871.413 5、1 075.513 6、1 279.612 3 的 C 型离子碎片, 其中 C_1 - C_6 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.088 7、431.188 5、635.287 3、839.379 2、1 043.481 2 和 1 247.582 4 的碎片离子, C_2 和 C_4 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.192 4 和 823.381 9 的碎片离子, C_4 丢失 2 分子甲醛后得到 m/z 为 811.388 2 的碎片, C_2 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.161 5 的碎片, 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.178 5 的碎片。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,2}X_0$ 和 $^{0,3}X_0$, 分别得到 m/z 为 111.044 2 和 155.070 0 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{1,5}X_1$ 、 $^{1,5}X_2$ 、 $^{1,5}X_3$ 、 $^{1,5}X_4$ 、 $^{1,5}X_5$, 得到 m/z 为 287.110 4、491.208 2、695.310 2、723.476 5、927.435 6 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_3$ 、 $^{2,4}A_4$ 、 $^{2,4}A_5$, 分别得到 m/z 为 519.240 5、723.476 5 和 927.435 6 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{3,5}A_3$ 和 $^{3,5}A_4$, 得到 m/z 为 533.256 4 和 737.360 8 的碎片离子。 $^{1,5}X$ 、 $^{2,4}A$ 和 $^{3,5}A$ 均符合 1 $\rightarrow$ 4

连接方式的 RDA 裂解机理。因此推测该七糖为线性 1 $\rightarrow$ 4 连接的糖链, 其结构为 α -D-Glcp-1 $\rightarrow$ (4- α -D-Glcp-1) $_5$ $\rightarrow$ 4- α -D-Glcp, 二级质谱图及结构见图 16。

3.3.7 八糖

(1) 8a: 该八糖的 m/z 为 1 701.831 6, 保留时间为 19.00 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.104 0、445.205 2、649.301 6、853.398 7、1 057.493 8 和 1 261.595 7 的 B 型离子碎片和 259.115 1、463.215 9、667.313 8、871.413 2、1 075.512 3、1 279.614 9 和 1 483.714 4 的 C 型离子碎片, 其中 C_1 - C_5 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.088 8、431.188 5、635.286 6、839.390 0 和 1 043.495 6 的碎片离子, C_2 - C_5 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.194 2、619.295 5、823.395 2 和 1 027.492 4 的碎片离子, C_5 丢失 2 分子甲醛后得到 m/z 为 1 015.508 1 的碎片, C_2 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.163 5 的碎片, 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.177 5 的碎片。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 155.070 0 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{1,5}X_1$ 、 $^{1,5}X_2$ 、 $^{1,5}X_3$ 、 $^{1,5}X_4$ 、 $^{1,5}X_5$, 得到 m/z 为 287.110 2、491.210 4、695.317 3、899.413 5 和 1 103.510 1 的碎片离子, 在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_2$ 、 $^{2,4}A_3$ 、

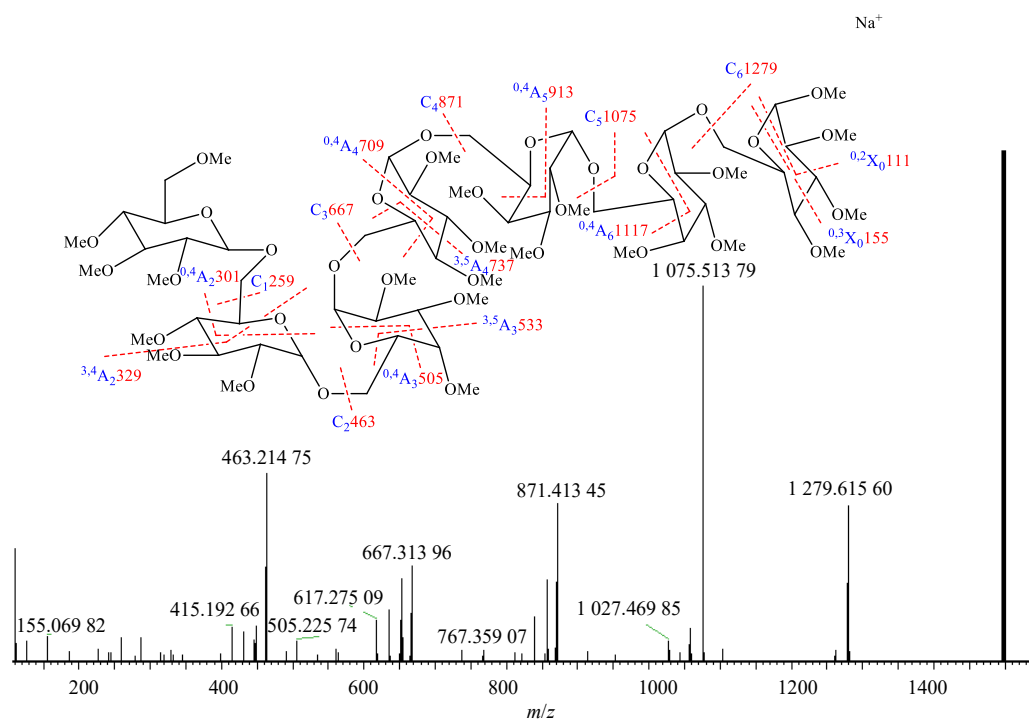


图 15 七糖 (7a) 二级质谱及结构

Fig. 15 MS/MS and structure of heptasaccharide (7a)

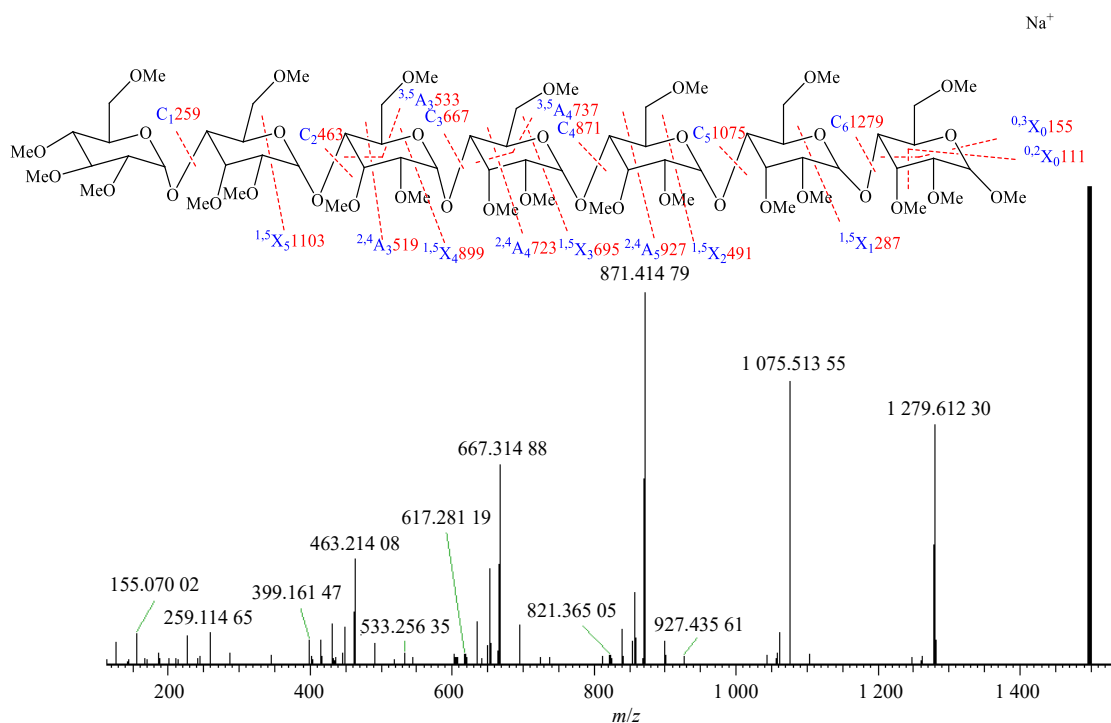


图 16 七糖 (7b) 二级质谱及结构

Fig. 16 MS/MS and structure of heptasaccharide (7b)

$^{2,4}A_4$, 得到 m/z 为 315.140 2、519.239 1 和 723.344 4 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{3,5}A_3$, 得到 m/z 为 533.257 3 的碎片离子, $^{1,5}X$ 、 $^{2,4}A$ 和 $^{3,5}A$ 均符合 1→4 连接方式的 RDA 裂解机理。因此推测该八糖为线

性 1→4 连接的糖链, 其结构为 α -D-Glcp-1→(4- α -D-Glcp-1)₆→4- α -D-Glcp

(2) 8b: 该八糖的 m/z 为 1 701.831 7, 保留时间为 19.35 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生

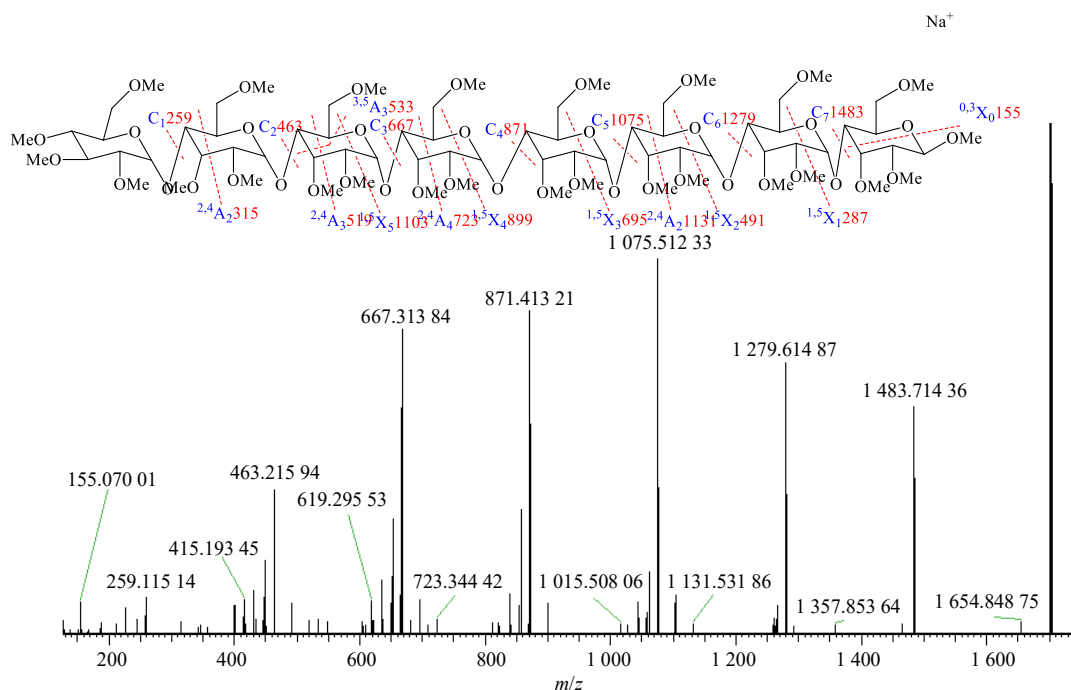


图 17 八糖 (8a) 二级质谱及结构

Fig. 17 MS/MS and structure of octasaccharide (8a)

糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.104 0、445.205 2、649.301 6、853.398 7、1 057.493 8 和 1 261.609 0 的 B 型离子碎片和 259.115 2、463.215 1、667.312 7、871.414 1、1 075.512 6、1 279.614 9 和 1 483.711 8 的 C 型离子碎片。其中 C₁-C₆ 丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.088 8、431.189 0、635.291 6、839.396 6、1 043.491 6 和 1 248.556 0 的碎片离子, C₁、C₂、C₃、C₄ 和 C₆ 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 211.094 3、415.194 2、619.296 6、823.395 2 和 1 231.599 6 的碎片离子, C₄ 和 C₅ 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 821.378 4 和 1 025.485 4 碎片, C₂ 和 C₅ 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.179 4 和 1 013.480 1 的碎片离子。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 155.069 5

的碎片离子, 在非还原末端有跨环断链 $^{3,5}A_2$ 、 $^{3,5}A_3$ 和 $^{3,5}A_4$ 发生, 得到 m/z 为 329.156 7、533.260 1 和 737.362 8 的碎片离子, $^{3,5}A$ 跨环断链符合 1→4 和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理。此外, 还有跨环断链 $^{0,4}A_2$ 、 $^{0,4}A_3$ 、 $^{0,4}A_4$ 、 $^{0,4}A_5$ 、 $^{0,4}A_6$ 、 $^{0,4}A_7$ 、 $^{0,4}A_7$ 发生, 产生 m/z 为 301.126 2、505.227 0、709.326 4、913.000 0、1 117.517 3、1 321.627 9 和 1 525.719 6 的符合 1→6 连接裂解方式的碎片离子。因此推测该八糖为线性 1→6 连接的糖链, 其结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₆→6- α -D-Glcp, 二级质谱图及结构见图 18。

(3) 8c: 该八糖的 m/z 为 1 701.831 5, 保留时间为 19.95 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.104 8、445.203 3、649.300 4、853.395 3、1 261.595 6 和 1 465.695 2 的 B

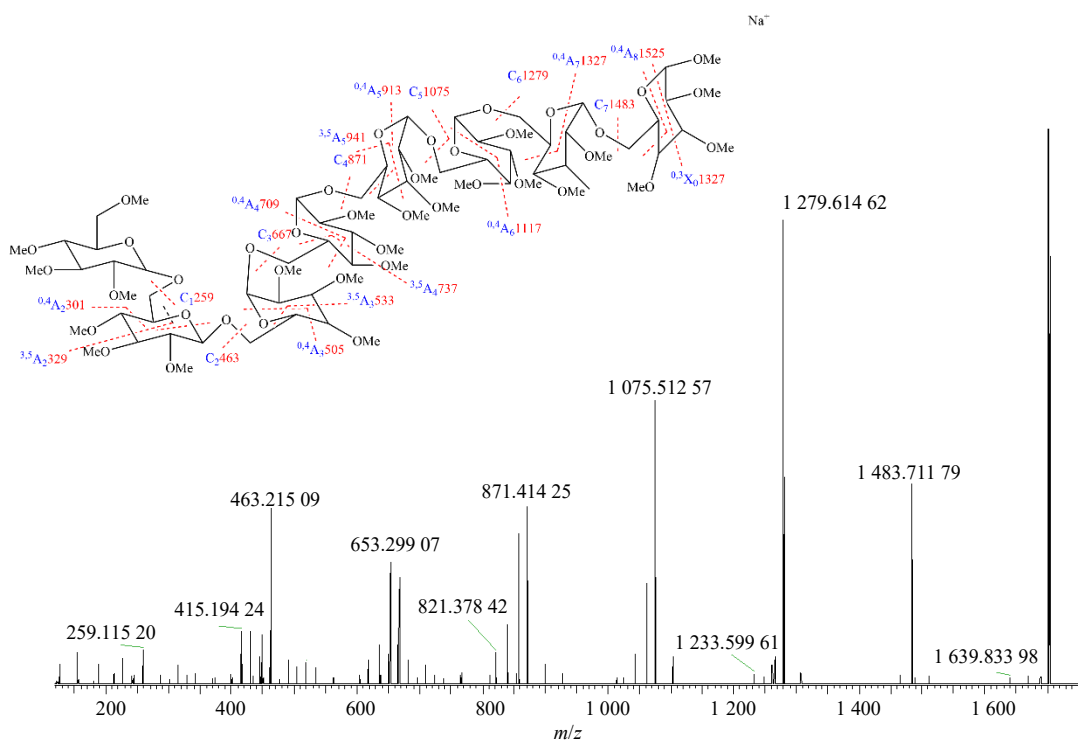


图 18 八糖 (8b) 二级质谱及结构

Fig. 18 MS/MS and structure of octasaccharide (8b)

型离子碎片和 m/z 为 259.115 3、463.214 6、667.314 3、871.414 0、1 075.513 6、1 279.614 9、1 483.712 9 等 C 型或 Z 型离子碎片。其中 m/z 为 259.115 3、463.214 6、667.314 3、871.414 0、1 075.513 6 的 C 型或 Z 型碎片丢失 1 分子甲醇后得到 m/z 为 227.088 9、431.186 6、635.288 3、839.391 9、1 043.493 9 的碎片离子, m/z 为 463.214 6、667.314 3、871.414 0、1 483.712 9 的 C 型或 Z 型碎片丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到

m/z 为 415.192 8、619.291 2、823.395 2 和 1 435.710 7 的碎片离子。 m/z 为 667.314 3 的 C 型或 Z 型碎片丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 617.281 1 碎片, 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛产生 m/z 为 605.282 1 的碎片离子。此外在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 155.070 1 的碎片离子, 在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}A_3$, 得到 m/z 为 519.241 6 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{0,4}A_3$, 得到 m/z 为

505.225 3 的碎片离子, 根据全甲基化 RDA 裂解机理可知, $^{2,4}A$ 和 $^{0,4}A$ 分别为 1→4 连接和 1→6 连接的特征跨环断链方式, 由此可见 $^{2,4}A_3$ 和 $^{0,4}A_3$ 为 2 条不同糖链上的跨环断链, 即为 $^{2,4}A_{3\alpha}$ 和 $^{0,4}A_{3\alpha}$, 即该八糖有支链存在。 m/z 为 1 103.512 9 和 1 307.614 4 的碎片离子是由 $^{1,5}X_{1\alpha}$, $^{1,5}X_{2\alpha}$ 跨环断链产生, m/z 为 329.156 7 和 533.262 2 的碎片离子由 1→4 连接或者 1→6 连接的 $^{3,5}A_{2\alpha}$, $^{3,5}A_{3\alpha}$ 跨环断链产生, m/z 为 737.362 8 的碎片离子由 $^{3,5}A_{4\alpha}$ 跨环断链产生, $^{3,5}A$ 跨环断链符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理。此外, 还发生了 $^{0,4}A_{4\alpha}$ 跨环断链,

得到 m/z 为 709.326 4 的符合 1→6 连接裂解机理的碎片离子。因此推测该八糖存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 且存在支链, 分支位点为还原末端→4,6)-Glc p -(1→, 其结构见图 19, 其二级质谱图及结构见图 20。

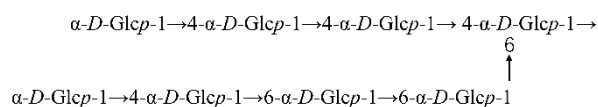


图 19 八糖 (8c) 结构图

Fig. 19 Structure diagram of octasaccharide (8c)

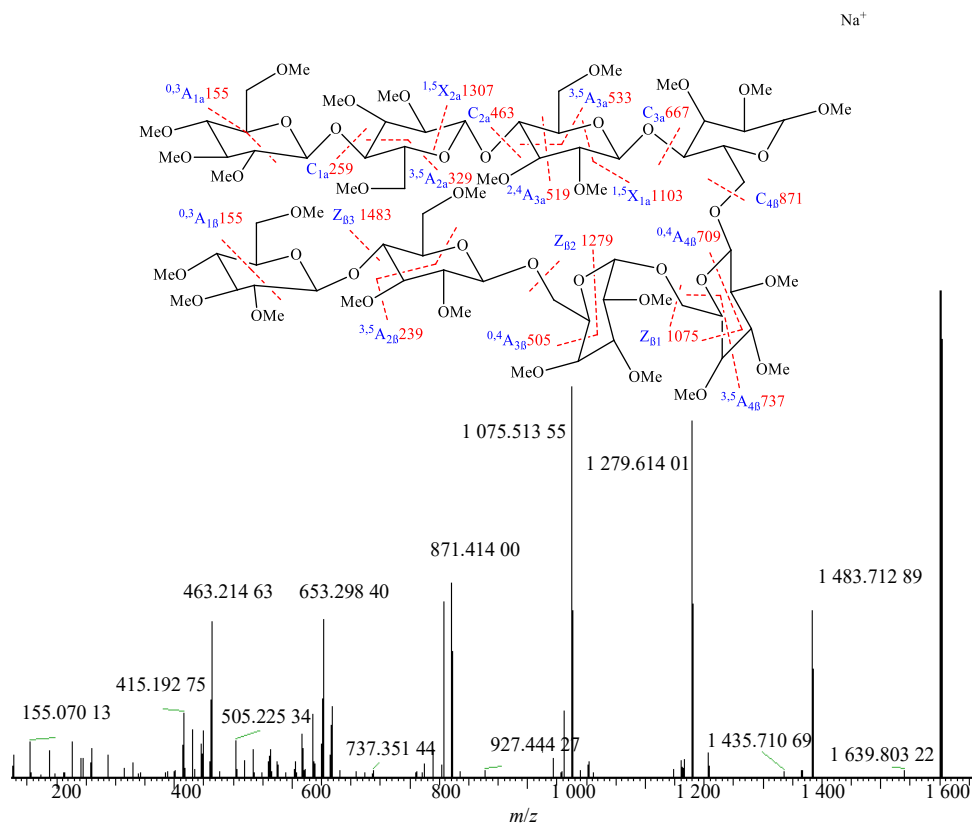


图 20 八糖 (8c) 二级质谱及结构

Fig. 20 MS/MS and structure of octasaccharide (8c)

3.3.8 九糖

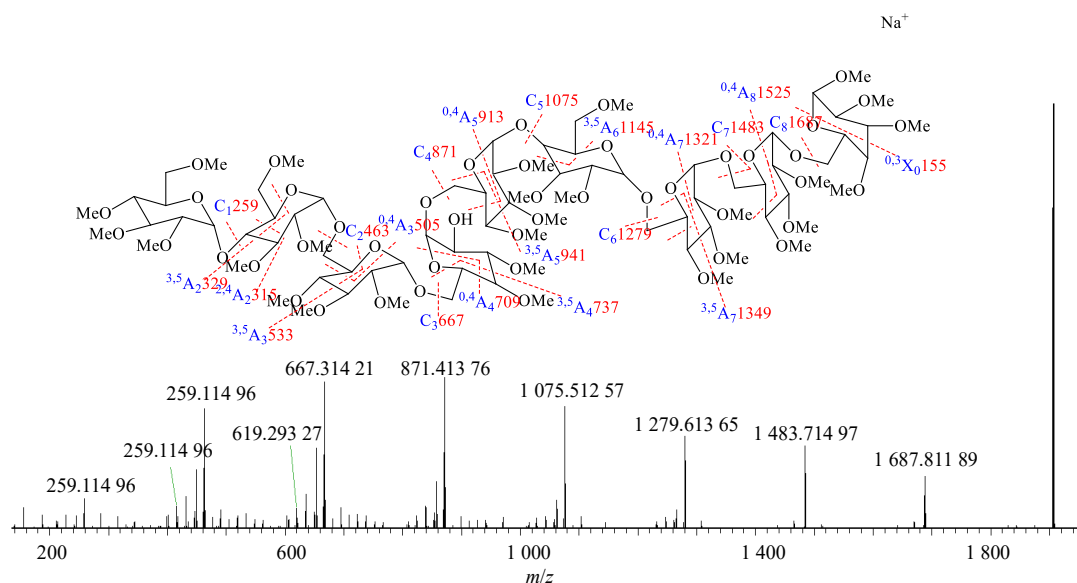
(1) 9a: 该九糖的 m/z 为 1 905.933 9, 保留时间为 19.69 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.104 6、445.204 2、649.306 2、853.409 4、1 057.507 0、1 261.358 8 和 1 465.716 4 的 B 型离子碎片以及 m/z 为 259.115 0、463.214 9、667.314 1、871.414 4、1 075.515 6、1 279.614 6、1 483.710 2 和 1 687.809 1 的 C 型离子碎片。 C_1 - C_7 丢失 1 分子甲醇产生 m/z 为 227.088 1、

431.188 6、635.287 7、839.388 8、1 043.482 1、1 247.583 9、1 451.694 1 的碎片离子, C_1 - C_4 、 C_7 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 211.241 3、415.193 5、619.295 5、823.390 3 和 1 435.689 5 的碎片离子, C_2 - C_5 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.180 0、605.278 3、809.376 3 和 1 013.478 6 的碎片离子, C_2 、 C_3 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.164 3 和 603.263 2 的碎片离子, C_4 丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 821.377 8 碎片。此

外在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 155.070 3 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{2,4}A_2$, 得到 m/z 为 315.141 7 的符合 1→4 连接裂解机理的碎片离子, 发生跨环断链 $^{3,5}A_3$ 、 $^{3,5}A_3$ 、 $^{3,5}A_4$ 、 $^{3,5}A_5$ 、 $^{3,5}A_6$ 和 $^{3,5}A_7$, 得到 m/z 为 329.156 7、533.262 9、737.348 0、941.457 0、1 145.546 9 和 1 349.658 0 的碎片离子, 符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理。此外, 还发生跨环断链 $^{0,4}A_3$ 、 $^{0,4}A_4$ 、 $^{0,4}A_5$ 、 $^{0,4}A_7$ 和

$^{0,4}A_8$, 得到 m/z 为 505.224 3、709.326 1、913.430 3、1 321.629 2 和 1 525.521 4 的符合 1→6 连接裂解机理的碎片离子, 非还原末端 2 糖和 6 糖处并未产生 1→6 连接特征碎片, 推测为 1→4 连接, 因此该九糖存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 其结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₃→4- α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₃, 二级质谱图及结构见图 21。

(2) 9b: 该九糖的 m/z 为 1 905.934 3, 保留时



和 941.450 3 的符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理的碎片离子。同时发生跨环断链^{0,4}A₃, 得到 *m/z* 为 505.225 3 的碎片离子, 表明 α 支链非还原末端 3 糖处 C-6 位被连接。综上所述该九

糖存在 1→6, 1→4 和 1→2 连接, 该九糖支链结构见图 22, 二级质谱图及结构见图 23。

(3) 9c: 该九糖的 *m/z* 为 1 905.933 7, 保留时间为 21.29 min, 分子离子峰为 [M+Na]⁺ 型, 主要

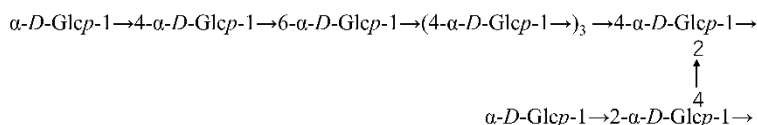


图 22 九糖 (9b) 结构图

Fig. 22 Structure diagram of nonasaccharide (9b)

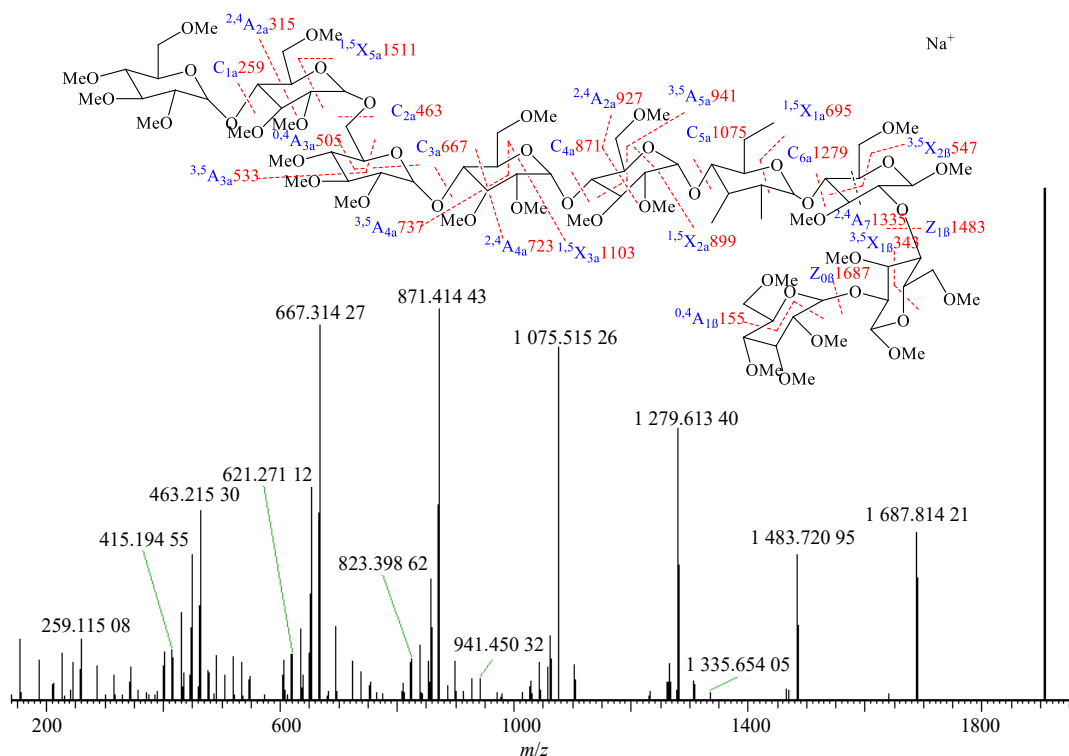


图 23 九糖 (9b) 二级质谱及结构

Fig. 23 MS/MS and structure of nonasaccharide (9b)

发生糖苷键断裂, 分别产生 *m/z* 为 241.105 2、445.208 3、649.305 2、853.405 9、1 261.358 8、1 465.710 9 和 1 669.819 3 的 B 型离子碎片以及 *m/z* 为 259.115 4、463.215 3、667.314 2、871.414 9、1 075.514 4、1 279.614 8 和 1 483.714 1 等 C 型或 Z 型离子碎片。其中 *m/z* 为 259.115 4、463.215 3、667.314 2、871.414 9、1 075.514 4 和 1 279.614 8 的 C 型或 Z 型碎片丢失 1 分子甲醇后得到 *m/z* 为 227.088 7、431.188 0、635.288 6、839.389 3、1 043.493 7 和 1 247.590 3 的碎片离子, *m/z* 为 463.215 3、667.314 2、871.414 9、1 075.514 4 和 1 483.714 1 的 C 型或 Z 型碎片丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 *m/z* 为 415.194 3、

619.291 1、823.379 5、1 027.498 1 和 1 435.710 9 的碎片离子。*m/z* 为 667.314 2 和 871.414 9 等 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 *m/z* 为 617.277 2 和 821.379 5 的碎片, *m/z* 为 667.314 2、1 279.614 8 的 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 *m/z* 为 605.277 7 和 1 217.559 1 的碎片离子。此外, 该九糖既发生了跨环断链^{2,4}A₃和^{2,4}A₄, 得到 *m/z* 为 519.242 4 和 723.347 4 的碎片离子, 也发生了跨环断链^{0,4}A₃和^{0,4}A₄, 得到 *m/z* 为 505.226 4 和 709.328 6 的碎片离子, 根据全甲基化 RDA 裂解机理可知^{2,4}A 和^{0,4}A 分别为 1→4 连接和 1→6 连接的特征跨环断链方式, 因此推测该九

糖有支链存在, $^{2,4}\text{A3}$ 、 $^{2,4}\text{A4}$ 和 $^{0,4}\text{A3}$ 、 $^{0,4}\text{A4}$ 为 2 条不同糖链上的跨环断链, 即为 $^{2,4}\text{A3}_\alpha$ 、 $^{2,4}\text{A4}_\alpha$ 和 $^{0,4}\text{A3}_\alpha$ 、 $^{0,4}\text{A4}_\alpha$ 。在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}\text{X0}$, 得到 m/z 为 155.070 1 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{1,5}\text{X1}_\alpha$ 、 $^{1,5}\text{X2}_\alpha$ 和 $^{1,5}\text{X3}_\alpha$, 得到 m/z 为 1103.519 9、1307.596 9、1511.720 7 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断裂 $^{3,5}\text{A2}_\alpha$ 、 $^{3,5}\text{A3}_\alpha$ 和 $^{3,5}\text{A4}_\alpha$, 得到 m/z 为 329.157 7、533.258 5 和 737.358 8 的碎片离子。推测该九糖存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 且存在支链, 分支位点为还原末端→4,6)-Glc_p-(1→, 其结构见图 24, 其二级质谱图及结

构见图 25。

3.3.9 十糖

(1) 10a: 该十糖的 m/z 为 2110.0215, 保留时间为 20.98 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要

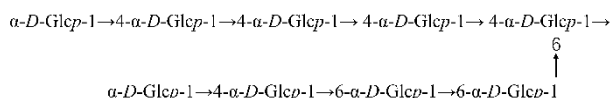


图 24 九糖 (9c) 结构图

Fig. 24 Structure diagram of nonasaccharide (9c)

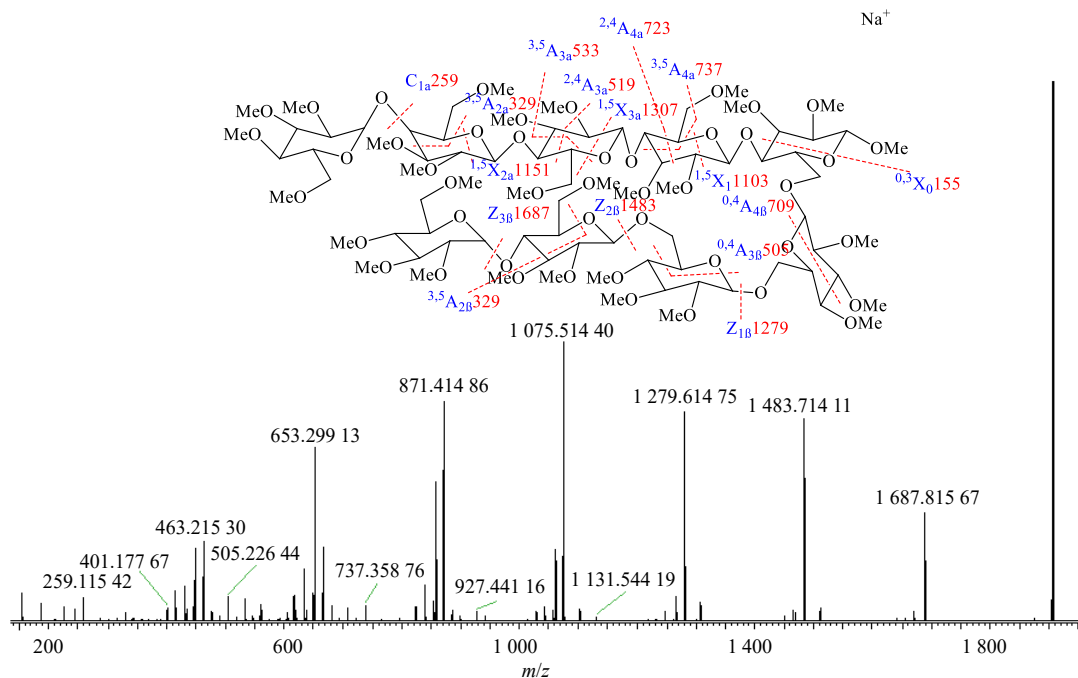


图 25 九糖 (9c) 二级质谱及结构

Fig. 25 MS/MS and structure of nonasaccharide (9c)

发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 445.202 6、649.303 9、853.399 5、1 057.502 6、1 261.609 0 和 1 465.7109 的 B 型离子碎片和 m/z 为 259.115 3、463.215 1、667.314 8、871.413 8、1 075.521 7、1 279.615 8、1 483.713 3、1 687.817 8 和 1 891.916 1 的 C 型离子碎片。其中 C_1 - C_7 丢失 1 分子甲醇得到 m/z 为 227.088 9、431.188 1、635.287 8、839.389 2、1 043.491 0、1 247.602 2 和 1 451.684 3 的碎片离子, C_2 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.176 7 的碎片离子, C_2 、 C_3 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.194 2 和 619.293 1 的碎片离子, 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.164 3 和 603.260 0 的碎片离子。此外, 在还原末端发生跨环断链 $^{0.3}X_0$, 得到 m/z 为 155.070 0 的碎片离子, 发

生跨环断链 $^{1,5}\text{X}_3$ 、 $^{1,5}\text{X}_4$ 、 $^{1,5}\text{X}_5$, 得到 m/z 为 491.210 8、695.313 3 和 899.411 2 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{2,4}\text{A}_2$ 、 $^{2,4}\text{A}_6$ 和 $^{2,4}\text{A}_7$, 得到 m/z 为 315.140 5、1 131.541 4 和 1 335.654 1 的符合 1→4 连接方式的特征碎片离子, 发生跨环断链 $^{3,5}\text{A}_2$ 、 $^{3,5}\text{A}_3$ 、 $^{3,5}\text{A}_4$ 、 $^{3,5}\text{A}_5$ 、 $^{3,5}\text{A}_6$ 、 $^{3,5}\text{A}_7$ 、 $^{3,5}\text{A}_8$ 和 $^{3,5}\text{A}_9$, 得到 m/z 为 329.158 3、533.260 0、737.355 3、941.450 7、1 145.535 2、1 349.641 0、1 553.753 4 和 1 757.863 0 的符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理的碎片离子。还发生跨环断链 $^{0,4}\text{A}_3$ 、 $^{0,4}\text{A}_4$ 、 $^{0,4}\text{A}_5$ 、 $^{0,4}\text{A}_9$, 得到 m/z 为 505.227 1、709.321 3、913.415 7、1 757.863 0 的符合 1→6 连接方式特征的碎片离子。非还原端 2、5、6、7 糖和 8 糖处未见 1→6 连接特征碎片, 推测为 1→4 连接, 推测该十糖存在 1→4

和 1→6 两种连接方式, 其结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp)₃→(6- α -D-

Glcp-1)₂, 二级质谱图及结构见图 26。

(2) 10b: 该十糖的 m/z 为 2110.020 5, 保留时

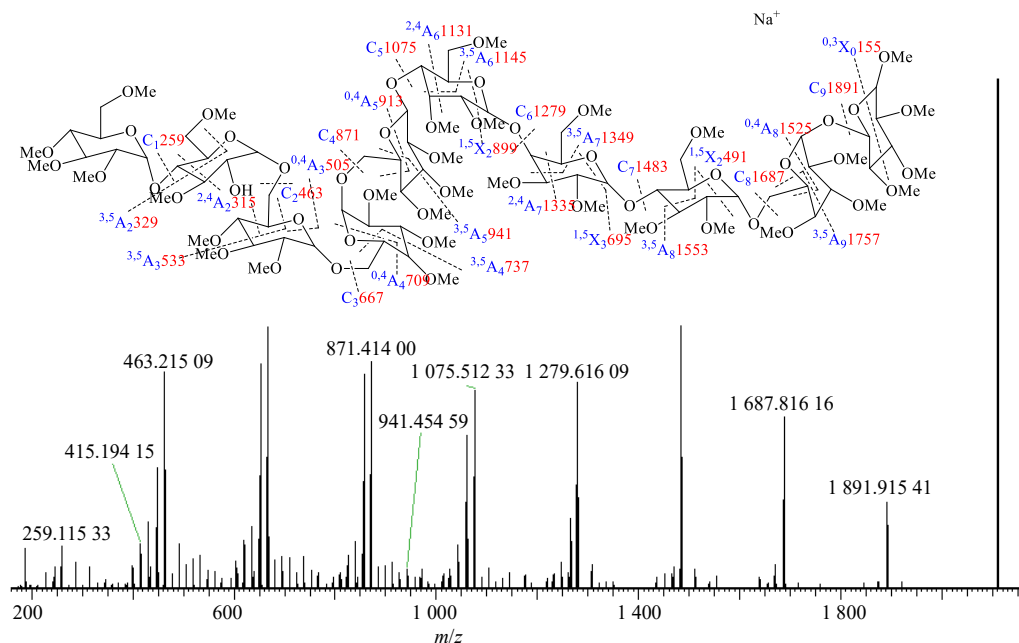


图 26 十糖 (10a) 二级质谱及结构

Fig. 26 MS/MS and structure of deca-saccharide (10a)

间为 21.27 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 主要发生糖苷键断裂, 分别产生 m/z 为 241.105 0、445.208 4、649.303 9、853.399 5、1 057.502 6、1 261.609 0、1 465.710 9、1 669.800 5 和 1 873.939 6 的 B 型离子碎片以及 m/z 为 259.114 4、463.215 1、667.314 8、871.413 8、1 075.521 7、1 279.615 8、1 483.713 3、1 687.817 8 和 1 891.916 1 的 C 型或 Z 型离子碎片。其中 m/z 为 259.114 4、463.215 1、667.314 8、871.413 8、1 075.521 7、1 279.615 8 和 1 483.713 3 的 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醇产生 m/z 为 227.088 9、431.189 5、635.287 8、839.389 2、1 043.491 0、1 247.602 2 和 1 451.684 3 的碎片离子, m/z 为 463.215 1、667.314 8、871.413 8、1 075.521 7、1 483.713 3 和 1 687.817 8 的 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醛和 1 分子水, 得到 m/z 为 415.194 2、619.293 1、823.392 2、1 027.481 1、1 435.027 9、1 639.774 2 的碎片离子, 其中 m/z 为 667.314 8 和 1 075.521 7 的 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醇和 1 分子水后得到 m/z 为 617.278 8 和 1 025.472 8 的碎片, m/z 为 463.215 1、667.314 8 和 1 891.916 1 的 C 型或 Z 型离子碎片丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 401.1799 0、605.275 3 和 1 829.870 7 的碎片离子, m/z 为 463.215 1 和 667.314 8 的 C 型

或 Z 型离子碎片丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.162 3 和 603.260 0 的碎片离子。此外, 该十糖既发生了跨环断链 $^{2,4}A_2$ 、 $^{2,4}A_3$ 和 $^{2,4}A_4$, 得到 m/z 为 315.140 5、519.239 9 和 723.340 2 的碎片离子, 也发生了跨环断链 $^{0,4}A_3$ 、 $^{0,4}A_4$ 和 $^{0,4}A_5$, 得到 505.225 7、709.321 3 和 913.415 7 的碎片离子, 根据全甲基化 RDA 裂解机理可知, $^{2,4}A$ 和 $^{0,4}A$ 分别为 1→4 连接和 1→6 连接的特征跨环断链方式, 因此推测该十糖有支链存在, $^{2,4}A_2$ 、 $^{2,4}A_3$ 、 $^{2,4}A_4$ 和 $^{0,4}A_3$, $^{0,4}A_4$ 和 $^{0,4}A_5$ 为 2 条不同糖链上的跨环断链, 即为 $^{2,4}A_{2\alpha}$ 、 $^{2,4}A_{3\alpha}$ 、 $^{2,4}A_{4\alpha}$ 和 $^{0,4}A_{3\alpha}$, $^{0,4}A_{4\alpha}$ 、 $^{0,4}A_{5\alpha}$ 。在还原末端发生跨环断链 $^{0,3}X_0$, 得到 m/z 为 155.070 2 的碎片离子, 发生跨环断链 $^{1,5}X_{1\alpha}$ 、 $^{1,5}X_{2\alpha}$ 、 $^{1,5}X_{3\alpha}$ 和 $^{1,5}X_{4\alpha}$, 得到 m/z 为 1 103.502 1、1 307.603 9、1 511.706 2 和 1 715.809 0 的碎片离子。在非还原末端发生跨环断链 $^{1,5}A_{1\alpha}$ 、 $^{1,5}A_{2\alpha}$ 和 $^{1,5}A_{3\alpha}$, 得到 m/z 为 287.110 0、491.208 3 和 695.313 3 的碎片离子。 $^{3,5}A$ 跨环断链符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理, 因此 m/z 为 329.157 0、533.256 5 和 737.355 3 的碎片离子由 1→4 连接或者 1→6 连接的 $^{3,5}A_{2\alpha}$ 、 $^{3,5}A_{3\alpha}$ 和 $^{3,5}A_{4\alpha}$ 跨环断链产生。推测该十糖存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 且存在支链, 分支位点为还原末端→4,6)-Glcp-(1→, 其结构如图 27 所示, 二级质

该十一糖的 m/z 为 2 315.123 5, 保留时间为

21.80 min, 分子离子峰为 $[M+Na]^+$ 型, 发生的主要断裂为糖苷键断裂, 发生的主要断裂为糖苷键的断裂, 分别产生 m/z 为 445.204 6、649.304 4、853.400 6、

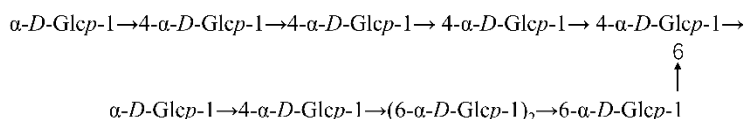


Fig. 27 Structure diagram of decasaccharide (10b)

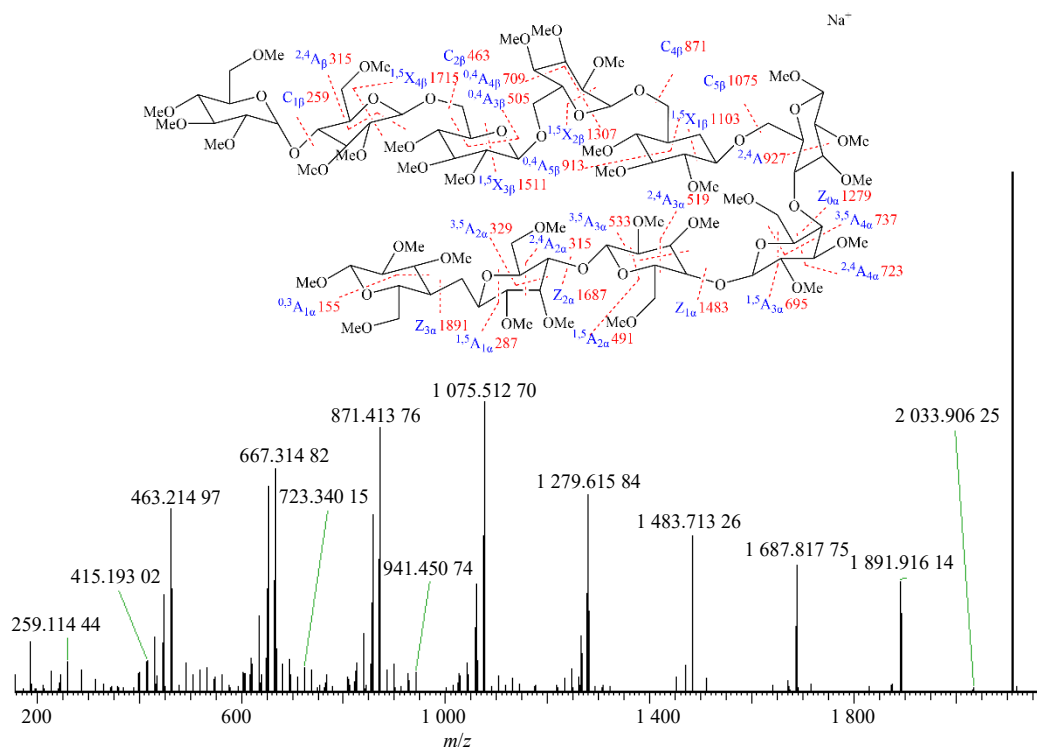


Fig. 28 MS/MS and structure of deca-saccharide (10b)

1 057.500 6、1 261.606 9、1 669.794 3、1 873.893 6 和 2 077.990 2 的 B 型离子碎片和 m/z 为 259.114 5、463.2149、667.3145、871.4136、1075.5120、1279.6135、1 483.712 7、1 687.815 3、1 891.919 0 和 2 096.023 7 的 C 型离子碎片, 其中 C₁-C₇ 丢失 1 分子甲醇产生 m/z 为 227.088 5、431.188 4、635.288 1、839.385 7、1 043.491 3、1 247.596 8 和 1 451.673 5 的碎片离子, C₂-C₅ 丢失 1 分子甲醛和 1 分子水后得到 m/z 为 415.194 0、619.293 2、823.393 7 和 1 027.493 7 的碎片离子, C₅ 丢失 1 分子甲醇和 1 分子甲醛后得到 m/z 为 1 013.472 3 的碎片离子, C₂-C₄ 丢失 2 分子甲醇后得到 m/z 为 399.161 7、603.263 1 和 807.365 5 的碎片离子。此外, 在还原末端发生跨环断链 $^{15}\text{X}_3$ 、

$^{1,5}\text{X}_4$ 、 $^{1,5}\text{X}_5$ 、 $^{1,5}\text{X}_6$ 和 $^{1,5}\text{X}_7$, 得到 m/z 为 491.212 3、695.305 1、899.408 5、1 103.504 0 和 1 307.697 1 的碎片离子。在还原末端发生了跨环断链 $^{2,4}\text{A}_2$ 、 $^{2,4}\text{A}_8$ 、 $^{2,4}\text{A}_9$, 得到 m/z 为 315.140 6、1 539.240 8 和 1 743.810 3 的符合 1→4 连接方式的碎片离子, 发生跨环断链 $^{3,5}\text{A}_2$ 、 $^{3,5}\text{A}_3$ 、 $^{3,5}\text{A}_4$ 、 $^{3,5}\text{A}_5$ 、 $^{3,5}\text{A}_6$ 、 $^{3,5}\text{A}_7$ 、 $^{3,5}\text{A}_8$ 和 $^{3,5}\text{A}_9$, 得到 m/z 为 329.156 7、533.258 1、737.350 0、941.448 4、1 145.549 0、1 349.641 0、1 553.753 4 和 1 757.863 0 的符合 1→4 连接和 1→6 连接方式的 RDA 裂解机理的碎片离子, 还发生了跨环断链 $^{0,4}\text{A}_3$ 、 $^{0,4}\text{A}_4$ 、 $^{0,4}\text{A}_5$ 、 $^{0,4}\text{A}_6$ 、 $^{0,4}\text{A}_7$, 得到 m/z 为 505.225 7、709.322 5、913.414 9、1 075.512 0 和 1 279.613 5 的符合 1→6 连接方式的碎片离子。非还原末端 2、8、9 糖未发现 1→6 连接

特征碎片, 推测为 1→4 连接, 推测非还原端 10 糖, 11 糖处为 1→6 连接, 该十一糖存在 1→4 和 1→6 两种连接方式, 其结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₅→(4- α -D-Glcp)₂→(6- α -D-Glcp-1)₂, 二级

质谱图及结构见图 29。

4 讨论

α -葡聚糖的免疫刺激特性受到的关注较少, 但最近有研究发现含有→4,6)- α -D-Glcp-(1→分支结构

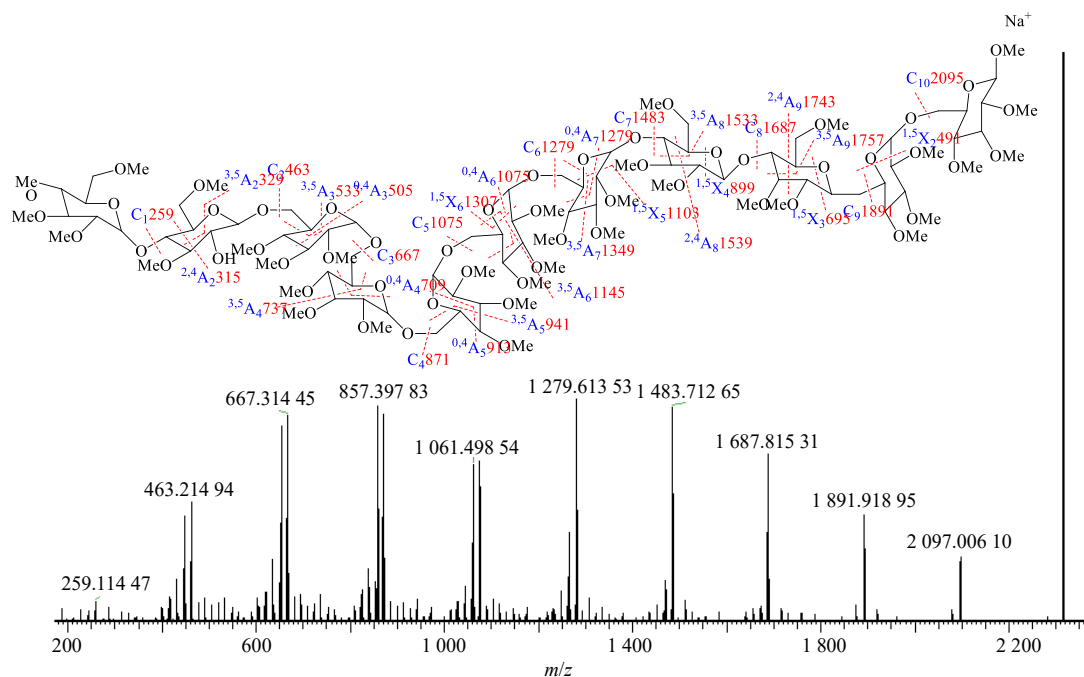


图 29 十一糖二级质谱及结构

Fig. 29 MS/MS and structure of undecanose

的 α -葡聚糖具有免疫调节活性^[15], 本研究中含有→4,6)- α -D-Glcp-(1→分支结构的糖链中, 主链为 α -1→4 连接的葡聚糖, 在还原末端→4)- α -D-Glcp-(1→的 6 位存在 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的分支结构。而该分支结构则可能是由于 α -1,4-葡聚糖内切酶将还原末端→4)- α -D-Glcp-(1→上原本存在的 1→4 连接的葡聚糖酶解而得到, 从而成末端分支。在含有→2,4)- α -D-Glcp-(1→分支结构的糖链中, 主链为 1→4 连接或者 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的葡聚糖链, 在还原末端→4)- α -D-Glcp-(1→的 2 位存在 1→2 连接的分支结构。在课题组前期研究中已表明 APS-II 酶解组分 P4 (10~18 糖) 的活性与 C-2 和 C-6 支化程度密切相关^[13], 推测含→4,6)- α -D-Glcp-(1→及→2,4)- α -D-Glcp-(1→的糖链和 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的支链结构为 APS-II 发挥免疫活性的关键结构。除主要的 A 型离子外, 全甲基化后还出现了 B 型离子, 推测该离子为非己糖链+己糖链结构构成 839.343 3 (unknown)+Hex_n。结合课题组前期 APS-II 单糖组成研究^[16]推断相对分子质量为 839.343 3 的组成可能为 2 分子鼠李糖, 1 分

子葡萄糖、1 分子己糖醛酸: Rha2GalAGlc。根据课题组前期的研究^[1], APS-II 酶解寡糖主要由葡萄糖和半乳糖等己糖构成, 本研究首次在 APS-II 酶解寡糖鉴定出了非己糖结构, 下一步还需对 B 型离子进行进一步研究。

质谱技术的应用对糖链的解析提供了很大的帮助。电子轰击质谱 (EI-MS) 的离子碎片信息丰富, 离子裂解理论成熟, 但是其离子化的方式能量高, 难以检测相对分子质量较大或稳定性差的试样, 且需要加热气化后进行离子化, 难以直接用于难挥发的糖类化合物的分析。目前, EI-MS 主要用于气质联用分析多糖^[17]。液质联用技术将液相和质谱相结合, 既体现了液相色谱的高分离性能, 又体现了质谱强大的鉴别能力, 在分析检测方面具有突出的优势^[18]。ESI-MS 具有高通量、高灵敏度、低检出限、用时短等优点, 可以对多糖的相对分子质量、结构均一性、序列、连接位点等进行测定, 在多糖结构解析中具有显著的优势

黄芪寡糖的生物活性广泛, 应用潜力大, 而黄芪寡糖的生物活性取决于其结构组成, 根据本课题

组前期研究^[19], 黄芪多糖 APS-II 酶解寡糖在免疫调节方面, 聚合度 10~18 糖均表现出最强活性。结合结构解析结果可知, 相较于低聚合度寡糖, 10~18 糖结构中存在更多的支链结构, 表明糖链 C-2 和 C-6 位存在支链的 α -D-1,4-连接葡聚糖结构具有较强的免疫活性。本课题组前期研究^[20]中将 APOS 分离得到 6 个寡糖片段, 通过结构解析发现 APOS-5 和 APOS-6 的主链糖环存在更复杂的多支链结构, 而平均相对分子质量较大的组分 APOS-4.5.6 比 APOS-1.2.3 的免疫调节活性更强。

为进一步验证 APS-II 酶解寡糖的结构序列信息, 本实验采用全甲基化的方式, 对 APS-II 酶解寡糖进行衍生化, 并结合高分辨质谱对全甲基化糖链进行结构解析, 探究了全甲基化黄芪酶解寡糖的裂解规律, 对聚合度为 2~11 中的 20 种糖链进行解析, 明确了糖链含有 $\rightarrow 4,6$ - α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 2,4$)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 分支结构。推测含有 $\rightarrow 4,6$ - α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow 2,4$)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 分支结构的糖链和 1 $\rightarrow$ 4 和 1 $\rightarrow$ 6 两种连接方式共存的支链结构为 APS-II 发挥免疫活性的关键。该研究阐明了黄芪多糖发挥免疫活性的物质基础, 为黄芪多糖和寡糖的构效关系研究奠定了基础, 同时也为黄芪酶解寡糖的开发利用和黄芪多糖的质量控制研究提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵雪莲, 赵文晓, 段晨晨, 等. 黄芪多糖化学表征与免疫性调节关系的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(3): 108-112.
- [2] 陈思羽, 唐思梦, 王颖, 等. 黄芪多糖对 2 型糖尿病模型大鼠餐后 1 h 血糖的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(4): 396-401.
- [3] 虞跃跃, 俞瑶帅, 汪钦宇, 等. 黄芪多糖免疫调节和抗肿瘤作用机制研究新进展 [J]. 世界中医药, 2023, 18(20): 2998-3003.
- [4] Li K, Cui L J, Cao Y X, *et al.* UHPLC Q-exactive MS-based serum metabolomics to explore the effect mechanisms of immunological activity of *Astragalus* polysaccharides with different molecular weights [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 595692.
- [5] Li K, Cao Y X, Jiao S M, *et al.* Structural characterization and immune activity screening of polysaccharides with different molecular weights from *Astragali Radix* [J].

Front Pharmacol, 2020, 11: 582091.

- [6] 李科, 崔连杰, 李晓霞, 等. 黄芪活性多糖 APS-II 酶解方法的建立及其降解寡糖的免疫活性研究 [J]. 药理学学报, 2021, 56(7): 1936-1944.
- [7] 刘宇冲, 李虎峰, 李科, 等. 基于高分辨质谱技术的黄芪多糖 APS-II 酶解活性寡糖特征分支位点的研究 [J]. 药理学学报, 59(7): 2108-2116.
- [8] Sims I M, Carnachan S M, Bell T J, *et al.* Methylation analysis of polysaccharides: Technical advice [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 188: 1-7.
- [9] Pettolino F A, Walsh C, Fincher G B, *et al.* Determining the polysaccharide composition of plant cell walls [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(9): 1590-1607.
- [10] 董群, 方积年. 寡糖及多糖甲基化方法的发展及现状 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2): 60-65.
- [11] Jin Y R, Oh M J, Yuk H J, *et al.* Novel analysis procedure for red ginseng polysaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(5): 539-545.
- [12] Li R, Chen W C, Wang W P, *et al.* Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(4): 738-742.
- [13] Li K, Li X Q, Li G X, *et al.* Relationship between the structure and immune activity of components from the active polysaccharides APS-II of *Astragali Radix* by enzymolysis of endo α -1,4-glucanase [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 839635.
- [14] Dang S S, Jia X L, Song P, *et al.* Inhibitory effect of emodin and *Astragalus* polysaccharide on the replication of HBV [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(45): 5669-5673.
- [15] Zhang X R, Qi C H, Guo Y, *et al.* Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 149: 186-206.
- [16] 李虎峰. 黄芪活性多糖 APS-II 及其 α -1,4 葡聚糖内切酶降解寡糖的结构解析 [D]. 太原: 山西大学, 2023.
- [17] 刘芳, 赵声兰, 陈朝银. 质谱解析多糖结构的方法学进展 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1612-1617.
- [18] 冯媛媛, 田治, 尹利辉, 等. 液质联用分析技术中的基质效应 [J]. 中国新药杂志, 2024, 33(10): 1009-1020.
- [19] 崔连杰. 黄芪活性多糖 APS-II 免疫调控机制及其酶解寡糖片段的结构和活性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [20] 石丽霞. 黄芪活性多糖 APS-II 三氟乙酸降解寡糖片段的免疫活性筛选与结构初探 [D]. 太原: 山西大学, 2021.

[责任编辑 王文倩]