

AEC柱前衍生-高压液相色谱-质谱联用法 分析混合植物浓缩液中多糖

胡焯敏¹, 李丹¹, 高新开², 陈骁熠^{3*}, 姚松君², 王家骥³, 龙凤²

(1. 广州市宜健医学科技发展有限公司, 广州 510663;

2. 无限极(中国)有限公司, 广州 510623; 3. 广州医学院, 广州 510182)

摘要: **目的** 建立多糖的高压液相色谱串联质谱检测方法, 以提高多糖检测的特异性和准确性。**方法** 以 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)为柱前衍生试剂, 反相 C₁₈ 色谱柱为分离柱, 乙腈和乙酸铵水溶液为流动相, 在波长 254 nm 处, 用 LC-MS/MS 同时分析植物及其提取物中多糖。**结果** AEC 对多糖的衍生效果好, 无副产物产生; 经过衍生化反应的多糖在高压液相色谱中得到了很好的分离; 并用质谱仪对其相对分子量和结构进行了确定。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度和准确度高, 样品的污染和损失风险低, 在植物多糖的结构分析、构效关系等研究上具有重要应用意义。

关键词: 3-氨基-9-乙基咔唑; LC-MS/MS; 植物多糖; 还原性

Qualitative analysis of polysaccharide in the plant concentrate by HPLC-MS/MS with pre-column derivatization using 3-amino-9-ethylcarbazole

HU Ye-Min¹, LI Dan¹, GAO Xin-Kai², CHEN Xiao-Yi^{3*}, YAO Song-Jun², WANG Jia-Ji³, LONG Feng²

(1. Guangzhou Yi-Jian Biomedical Technology Development Co., Ltd., Guangzhou 510663, China;

2. Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510623, China;

3. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

ABSTRACT: Objective In order to improve the detection specificity and accuracy of polysaccharide, a high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed for detection of polysaccharides in plants concentrate. **Methods** Samples were derivatized using 3-amino-9-ethylcarbazole, separated by reverse phase C₁₈ column using acetonitrile and ammonium acetate aqueous solution as mobile phase and detected by LC-MS/MS under the wavelength of 254 nm. **Results** 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) was good for the derivatization of polysaccharides, without side products and the polysaccharide molecules with the derived group were separated by mass spectrometry to determine the relative molecular weight and structure. **Conclusion** the method is simple, sensitive and accurate and has lower risk of pollution and loss. It has significance for structure analysis, structure-activity relationship of the plant polysaccharide.

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B020310012)

Fund: Supported by the Guangdong Provincial Science and Technology Program(2011B020310012)

*通讯作者: 陈骁熠, 教授, 主要研究方向为功能因子、营养毒理、功能食品研制等。E-mail: wchenxy1@yahoo.com.cn

*Corresponding author: CHEN Xiao-Yi, Professor, Guangzhou Medical College, No.16-712, Dongfeng West Road, Yuexiu District, Canton 510182, China. E-mail: wchenxy1@yahoo.com.cn

KEY WORDS: 3-amino-9-ethylcarbazole; high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); plant polysaccharide; reductibility

1 引言

糖类物质广泛存在于自然界中,其中植物多糖包括淀粉、纤维素、葡聚糖(如香菇多糖)、果聚糖、树胶、粘液质、粘胶脂(如琼脂)等。随着科技的进步,植物多糖的多种生物活性逐渐被人们认知,如植物多糖具有免疫调节活性,抗肿瘤活性,可以防治糖尿病,促进胃溃疡愈合和修复,抗辐射、降血脂等^[1-4]。多糖因此成为近年来天然药物的研究热点之一,而多糖结构信息分析的研究则具有极其重要的意义。

目前广泛采用的多糖检测方法是蒽酮-硫酸法或苯酚-硫酸法,方法的原理是硫酸与样品相互作用后,将样品中多糖水解成单糖,单糖脱水生成糠醛衍生物后再与苯酚或蒽酮缩合成有色化合物,在适当的波长下通过比色法进行含量测定^[5]。这两种方法均使用葡萄糖为标准品进行定量,若酸水解程度不完全则会产生无法被检测定量的寡聚糖,导致检测结果偏低,此外方法受样品颜色影响大^[6],操作繁琐,耗时长,所得结果为样品中总糖含量,未能对所检糖类物质进行结构分析,特异性差。

将分离技术与质谱法相结合是分离方法中的一项突破性进展^[7],质谱因其独特的选择性、灵敏度、相对分子量及结构信息等优点,逐渐成为糖链结构分析的核心技术。由于多糖在紫外区没有吸收,所以需将其进行衍生,让待检多糖结合可在紫外波长下有吸收的稳定基团。但目前常用的伯氨基衍生化方法反应过程复杂,耗时长,需要酸催化,且会引起质谱灵敏度降低^[8]。基于还原氨化反应机制,本研究选取3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethylcarbazole, AEC)为衍生试剂,对多糖进行衍生化,并成功应用HPLC对多糖进行分离,然后用质谱对多糖结构进行分析,相对于常规方法而言,本方法的操作简单,能对样品中多糖进行特异分析,分析效率和准确度高。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

混合植物浓缩液,由无限极(中国)有限公司提供。

葡萄糖标准品(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司);标准混合多糖 DXT1K Mw1200(美国 Dextran Standard 公司);3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、氰基硼氢化钠(阿拉丁试剂(上海)有限公司);色谱纯乙腈(安徽时联公司);氯仿、乙酸铵、冰醋酸(广州化学试剂厂)。

2.2 仪器

API2000质谱仪(美国AB Science公司);高压液相色谱(1200)-紫外检测器(美国安捷伦公司);冷冻高速离心机(湘仪仪器公司);恒温水浴箱、氮吹仪(诺基仪器公司);超纯水系统(富勒姆公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 混合植物浓缩液样品前处理

固体试样:将试样与超纯水按 10 mg: 1 mL 混合,充分摇匀,制成待检样液^[9]。

液体试样:将试样充分混匀后得到待检样液。

2.3.2 试样的衍生化处理

将待检样液充分摇匀,取 200 μ L 于 15 mL EP 管中,依次加入 200 μ L 0.04 mol/L AEC 的甲醇溶液,200 μ L 0.2 mol/L 氰基硼氢化钠溶液,60 μ L 冰醋酸,充分摇匀后于 70 $^{\circ}$ C 水浴加热 1 h,取出冷却至室温,加入 500 μ L 的超纯水,充分摇匀后加入 1.5 mL 的氯仿,振荡摇匀,以 5000 r/min 转速离心 5 min,取出静置,吸取上层水相于另一干净的 EP 管中,用 1.5 mL 氯仿重复洗涤 2 次。洗涤干净的水相过 0.45 μ m 的滤膜,10 倍稀释后进行液相和质谱分析^[10]。

2.4 HPLC 条件

流动相: (A)0.1 mol/L 0.45 μ m 水相滤膜过滤的乙酸铵水溶液: (B)纯乙腈=70:30 (v/v);色谱柱为 Waters C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流速: 0.4 mL/min;柱温为 40 $^{\circ}$ C;进样量为 5~20 μ L;紫外检测波长(UV): 254 nm;

2.5 质谱分析条件

用氮气(N₂)作为雾化气体;ESI(+)离子源;扫描模式为正离子 Q1 全扫描;离子扫描范围为 m/z 350 ~ 1500。

3 结果与讨论

3.1 样品衍生化和 HPLC 分离

本实验选用 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)为衍生化试剂, 对试样进行柱前衍生。AEC 与糖类物质的反应机制如图 1 所示。该反应原理是糖类物质的还原端在酸性条件下与 AEC 的伯氨基反应生成烯胺, 然后在氰基硼氢化钠(NaBH_3CN)的还原作用下生成稳定的二级胺, 从而使糖类物质被 AEC 标记。

按 2.3 节所述的方法对葡萄糖标准品和混合多糖 DXT1K Mw1200 进行 AEC 衍生, 所得衍生物经 HPLC 分离分析, 结果如图 2、图 3 所示。从图 2 可以看出葡萄糖标准品衍生物的色谱峰相互对称, 没出现拖尾现象, 这说明葡萄糖与 AEC 的反应专一, 无副产物产生; 从图 3 可看到不同聚合度的混合多糖得到了很好地分离, 说明 AEC 衍生化过程使样品的极性发生改变, 衍生产物的疏水性增强, 使糖在反相 HPLC 下的分离变得更加容易, 无需专用的糖分离柱, 在一般的反相 C_{18} 柱上即可获得满意的分离效果。此外还说明 AEC 不仅可与单糖及二糖进行衍生反应, 同时也可与聚合度较大的多糖发生衍生反应^[11]。

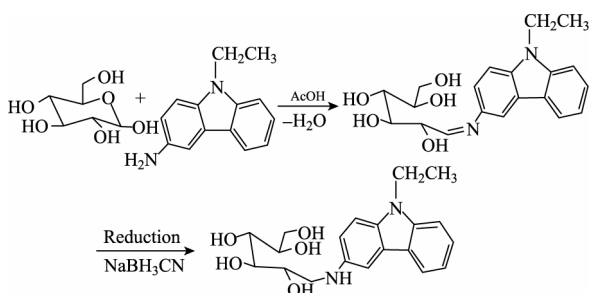


图 1 葡萄糖(Glu)与 AEC 的反应原理

Fig. 1 Reaction principle of glucose with 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)

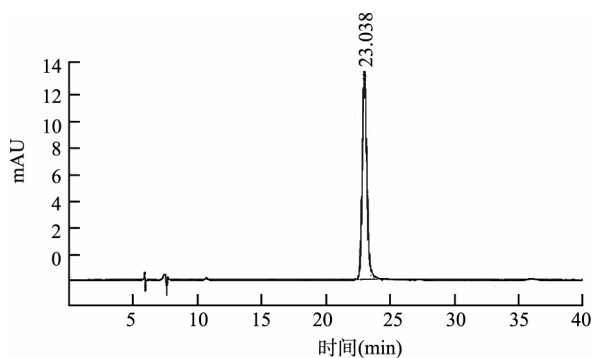


图 2 葡萄糖标准品衍生物的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of the AEC derivative of Glu

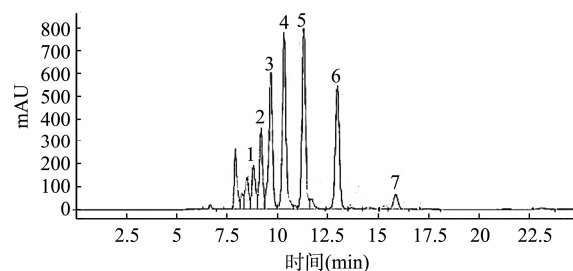


图 3 标准混合多糖 DXT1K Mw1200 AEC 衍生物的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of the AEC derivative of poly-saccharide mixture DXT1K Mw1200

(1.十一聚糖; 2.十聚糖; 3.九聚糖; 4.八聚糖; 5.七聚糖; 6.六聚糖; 7.三聚糖)

3.2 标准葡萄糖和混合多糖分析

AEC 衍生后的葡萄糖和混合多糖 DXT1K Mw1200 进行 HPLC 分析后, 直接进行 LC-MS/MS 分离分析, 结果见图 4 及图 5。两图中分子离子峰皆为正离子峰, 图 4 是葡萄糖标准品衍生物的质谱离子峰, AEC 的分子量为 211, 信号最强的分子离子峰为 m/z 375.0, 正好与 1 mol 葡萄糖结合一分子 AEC 脱去 1 mol 水分子后被还原加上 2 个氢离子的分子量相同, 经解析得知其为葡萄糖标准品衍生物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 分子离子峰。

高聚合度的多糖在 LC-MS/MS 分析中主要碎片方式呈 162 递减排列, 经分析确认为逐渐丢失 m/z 为 162 的糖基团。图 5 是从标准混合多糖 DXT1K Mw1200 AEC 衍生物的质谱全扫描图中提取的聚合度为 1 到 11 的多糖离子碎片峰, 从图 5 中可以看出混合多糖 DXT1K Mw1200 中含有 11、10、9、8、7、6、3 碳的聚合多糖, m/z 值分别为 1995、1833、1671、1509、1347、1185、699, 且保留时间与液相的检测结果相互对应。

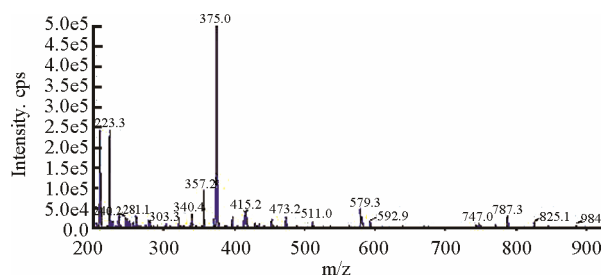


图 4 葡萄糖标准品衍生物的质谱离子峰图

Fig. 4 Mass spectra of glucose-AEC derivative

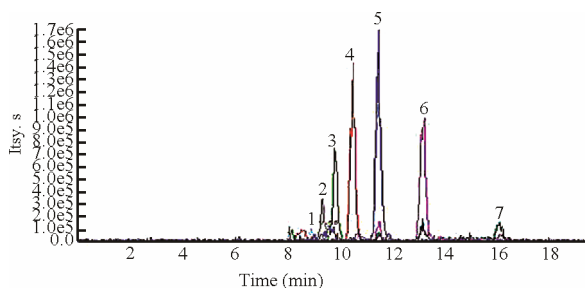


图5 标准混合多糖 DXT1K Mw1200 AEC 衍生物的质谱离子提取图谱

Fig. 5 Mass spectra of polysaccharide mixture DXT1K Mw1200-AEC derivative

(1.十一聚糖; 2.十聚糖; 3.九聚糖; 4.八聚糖; 5.七聚糖; 6.六聚糖; 7.三聚糖)

此方法不需对试样进行脱盐处理, 不但可以减少样品的损失, 而且检测信号很强, 质谱检测灵敏度高, 可准确对试样中多糖类物质进行定性检测。

3.3 混合植物浓缩液中活性多糖分析

将混合植物提取液充分摇匀, 按 2.3 节所述的方法进行柱前衍生处理, 所得试样溶液无需进行脱盐处理, 直接进行 LC-MS/MS 分离分析, 结果见图 6, 保留时间为 10.84 min 时, 分析得出样品中含有四聚糖, 三聚糖, 二聚糖, 单糖醛酸。糖醛酸相对于相同糖聚合物, 保留时间更长, 结合 GPC 标准品(见图 5), 判断此处为九聚糖醛酸; 保留时间为 12.09 min 时, 分析样品中多糖峰含有四聚糖, 三聚糖, 二聚糖, 单糖, 结合图 5 的保留时间, 判断为七聚糖; 在七聚糖后, 六聚糖含量少, 在 13 min 到 19 min, 广泛分布着戊聚糖, 四聚糖, 三聚糖, 二聚糖, 其中三聚糖含量最高。

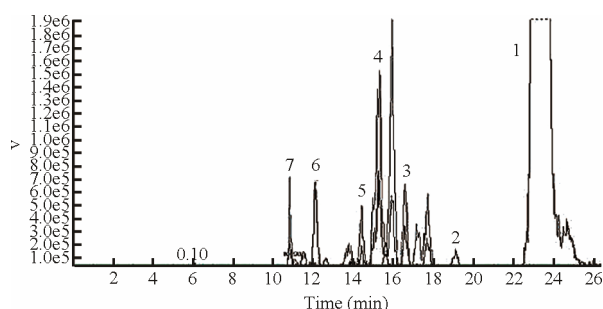


图6 混合植物提取液 AEC 衍生物的质谱离子提取图谱

Fig. 6 Mass spectra ion extraction patterns of the AEC derivatives of mixing plant extract

(1.葡萄糖; 2.戊糖; 3.二聚糖; 4.三聚糖; 5.四聚糖; 6.七聚糖; 7.九聚糖醛酸)

4 结 论

液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术集液相色谱对复杂基体化合物的高分离能力和质谱独特的选择性、灵敏度、相对分子量及结构信息于一体的优点, 对糖链的确定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检测具有独特优势。本研究以 AEC 为衍生试剂, 对待检试样进行柱前衍生, 建立了 AEC 衍生多糖的 HPLC 分离分析方法, 在优化的 HPLC 分析条件下, 结合质谱检测手段为糖链的分离分析及结构确定奠定了基础。该方法对植物及其提取物中多糖链的分离和结构解析具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 严金龙, 吕志敏. 植物多糖的提取分离和应用[J]. 化工科技市场, 2004, (11): 41-44.
Yan JL, Lv ZM. Extraction, Isolation and Application of Polysaccharides from Plants [J]. Chem Technol Market, 2004, (11): 41-44.
- [2] 赵国华, 陈宗道, 阚建全, 等. 活性多糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 45-48.
Zhao GH, Chen ZD, Kan JQ, *et al.* Studies on polysaccharides with biological activity [J]. Food Ferment Ind, 2001, 27(7): 45-48.
- [3] 张晓静, 刘会东. 植物多糖提取分离及药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(8): 495-496.
Zhang XJ, Liu HD. Research progress in extraction separation and pharmacological effects of plant polysaccharides [J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2003, 14(8): 495-496.
- [4] 杨洪彩, 张月明, 邹红云. 植物多糖药效研究进展[J]. 地方病通报, 2004, 19(2): 88-90.
Yang HC, Zhang YM, Zhou HY. Research progress of drug effect of plant polysaccharide [J]. Endem Dis Bull, 2004, 19(2): 88-90.
- [5] 陈旋, 张翼, 张剑波. 植物多糖的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(13): 1000-1004.
Chen X, Zhang Y, Zhang JB. Advances in research on the Plant Polysaccharides [J]. Chin J New Drug, 2007, 16(13): 1000-1004.
- [6] 刘婷, 周光明. 多糖的提取和分析方法[J]. 化工时刊, 2008, 22(3): 66-70.
Liu T, Zhou GM. Extraction and Analytical method of Polysaccharides [J]. Chem Ind Times, 2008, 22(3): 66-70.
- [7] 李蓉, 梁恒. 生物质谱-蛋白质研究的关键技术[J]. 化学通报, 2002, 11: 748-750.
Li R, Liang H. Bio-Mass Spectrometry-the Key Technique for

- the Proteome Research [J]. Chin J Chem, 2002, 11: 748-750.
- [8] 梁亚丽, 张彦玲, 何颖娜. 糖类化合物分离分析方法进展[J]. 河北化工, 2006, 29(6): 42-44.
- Liang YL, Zhang YL, He YN. Progress in the Methods of Separation and Analysis of Sugar [J]. Hebei Chem, 2006, 29(6): 42-44.
- [9] 孙玉姣, 王承建, 耿腾飞, 等. κ -卡拉胶寡 AEC 柱前衍生物的 LC-ESI-MS/MSⁿ 分离分析[J]. 化学学报, 2011, 69(14): 1697-1704.
- Sun YJ, Wang CJ, Geng TF, *et al.* Analysis of κ -Carrageenan Oligosaccharides by LC-ESI-MS/MSⁿ with 3-Amino-9-ethylcarbazole Derivatization [J]. Acta Chim Sinica, 2011, 69(14): 1697-1704.
- [10] 郭文, 张英, 黄琳娟, 等. 高效液相色谱-质谱联用法分析 3-氨基-9-乙基咔唑柱前衍生化壳寡糖[J]. 色谱, 2010, 28: 776.
- Guo W, Zhang Y, Huang LJ, *et al.* High performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry analysis of chitooligosaccharides by pre-column derivatization with 3-amino-9-ethylcarbazole [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28: 776.
- [11] 牟青, 张英, 黄琳娟, 等. 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[J]. 色谱, 2009, 27(1): 24-28.
- Mu Q, Zhang Y, Huang LJ, *et al.* 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 [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(1): 24-28.
- (责任编辑: 赵静)

作者简介



胡烨敏, 学士, 助理工程师, 主要研究方向为食品化学检验。

E-mail: yemi1213@126.com



陈晓熠, 教授, 主要研究方向为功能因子、营养毒理、功能食品研制等。

E-mail: wchenxy1@yahoo.com.cn

“食品添加剂”专题约稿

《食品安全质量检测学报》感谢各位专家的大力支持! 本刊自 2010 年 1 月创刊以来, 得到本领域专家及管理部門的充分肯定, 在国内食品安全与质量研究领域的影响越来越大, 并在 2013 年 1 月被美国《化学文摘》(CA) 数据库、英国国际农业与生物科学研究中心 (CABI) 收录。

近年来, 食品安全得到了国家越来越多的重视, 但我国的食品安全问题仍较严重。2011 年出现的“染色”馒头、“瘦肉精”、“特仑苏”牛奶 OMP 物质等多个食品安全事件, 引起了公众对食品安全问题的恐慌。鉴于此, 学报特别策划了“食品添加剂”专题, 围绕不良食品添加剂的检测、食品添加剂的滥用、误用等问题展开讨论, 计划在 2013 年下半年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2013 年 6 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部