

DHB+AHB 二元新基体在 MALDI TOF MS 分析葡聚糖中的应用^{*}

张东娣, 周丽华, 邓慧敏
(中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 在基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析中, 使用合适的基体或基体添加剂, 可以改善样品结晶的形状、颗粒大小和分布的均匀性、提高样品分子解吸电离的效率、增强质谱信号、延长样品出峰时间、增加样品出峰的重复性、提高分辨率、扩大质量测定范围, 从而提高分析的灵敏度、谱图质量以及分析的速度和效率。研究结果表明, 与 MALDI-TOF MS 分析葡聚糖的常用一元基体 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)相比, 在 2,5-二羟基苯甲酸中加入 3-氨基-4-羟基苯甲酸(3-amino-4-hydroxybenzoic acid, AHB)组成的 DHB+AHB 二元新基体测定相对分子质量为 10 000、未经进一步分级的高聚合度葡聚糖样品, 不仅能使样品形成均匀的结晶、易于解吸电离; 而且还可使检测的质量范围比用 DHB+HIQ 二元基体有所扩大, 达到 21 000 以上。

关键词: 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS); 葡聚糖; 2,5-二羟基苯甲酸与 3-氨基-4-羟基苯甲酸二元新基体

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2005)01-0057-04

近年来, 随着人们对糖功能认识的深入, 糖类化合物作为具有重大生化意义和药理作用的物质而成为生命科学领域中的又一研究热点。糖的性质与其相对分子质量大小密切相关, 因此糖相对分子质量特别是多糖相对分子质量及其分布的测定, 在糖类化合物的研究和应用中有着重要意义。自 1987 年 Hillenkamp 等^[1]首次以烟酸(nicotinic acid)为基体分析水苏糖(一种植物化学四糖)以来, 基本辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)作为一种“软”电离技术已广泛用于分析游离多糖、环糊精、糖肽、糖脂、糖蛋白、黏多糖、鞘脂等多种糖类化合物。MALDI-TOF MS 分析糖类, 具有灵敏(可检测到 fmol)、快速、对杂质的包容性强、分析质量范围大、尤其是能对未衍生化糖类进行直接分析等优点^[2,3]。

多糖相对分子质量的分散性是影响 MALDI-TOF MS 检测多糖样品中高聚合度多糖分子和导致质谱图高质量区域不出现样品质谱峰的一个主要原因。文献^[2-4,11]报道, DHB 分析多糖重复性好、灵敏度高、信噪比(S/N)高、较少产生与基体相关的低分子离子, 是分析多糖最常用的基体。但 DHB 与样品的混合结晶呈针状, 且由靶点周围向中央结晶, 靶点中央的晶体很少, 导致 MALDI-TOF MS 分

析中要寻找理想的样品出峰点而花费较多的时间。在 DHB 中加入其他合适的化合物组成混合二元基体可以弥补这些不足^[3-5], 提高晶体的均匀性、增强质谱信号、提高分辨率和灵敏度。文献已报道的能与 DHB 组成二元基体的其他化合物有: 1-羟基异喹啉(1-HIQ)^[4]、精胺、阿魏酸(FA)、 α -(L)-岩藻糖(fucose)、5-甲氧基水杨酸(5-MSA)^[3,6]、3-氨基喹啉(3-AQ)^[7]、 NH_4F ^[8]、2-氨基-5-硝基吡啶(ANP)^[9]、2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP)^[10]。加入 DHB 与之形成混合基体的通常是同样能嵌入被分析物晶格、且功能基较少的化合物。混合基体以降低晶格能、形成均一晶体为基准。增强离子化程度, 减少亚稳离子生成, 是混合基体得到良好谱图的主要原因, 其中提高离子化效率是主要原因^[9]。本文报道 2,5-二羟基苯甲酸与 3-氨基-4-羟基苯甲酸(以下简称 DHB+AHB)组成的二元新基体在 MALDI-TOF MS 分析葡聚糖中的应用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

REFLEX III 型 MALDI-TOF MS (德国, Bruker 公司), 氮激光器, 波长 337 nm, 采用延迟引出技术。线性正离子模式检测, 谱图为 300 个激光点单次扫

* 收稿日期: 2004-04-21

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990209)

作者简介: 张东娣(1979年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 邓慧敏; E-mail: ceswuq@zsu.edu.cn

描的累加图, 加速电压 20 kV。

葡聚糖 (Sigma 公司产品, 标示平均相对分子质量为 10 500), DHB、5-MSA、3-AQ、ANP、THAP 和 AHB 为 Sigma Aldrich 公司产品, FA、1-HIQ 为日本东京化成工业株式会社产品, 其它试剂均为分析纯, 使用前未经处理。

1.2 样品和基体的配制及进样操作

将葡聚糖样品用二次蒸馏水配制成 10 mg/mL 的溶液。一元基体 DHB、ANP、3-AQ、1-HIQ、FA、5-MSA、THAP 和 AHB 用二次蒸馏水配制成饱和溶液。二元基体由上述一元基体按不同体积比配制而成。其中, DHB 分别与 ANP、3-AQ、1-HIQ、FA、THAP 和 AHB 按体积比为 3/1 配制, DHB 与 5-MSA 分别按体积比为 3/1、9/1 配制。将 1 μ L 基体溶液与 1 μ L 样品溶液混合均匀后, 取 0.5 μ L 混合液滴加到样品台上, 于 24 $^{\circ}$ C 下干燥后, 将样品台放进离子源中进行测定。

2 结果与讨论

2.1 DHB+AHB 配比的选择

以 10 mg/mL 的葡聚糖样品水溶液在相同的实验条件下考察了 DHB、AHB 的饱和水溶液分别按体积比为 20:1 ~ 1:20 混合配成的 16 种不同比例二元基体的解吸电离效果。结果表明, 基体配比的不同对样品检测的质量范围有明显影响。DHB:AHB < 1:10 时没有明显的样品离子峰; DHB:AHB = 1:10 时开始出现样品离子峰, 采用不同配比的 DHB+AHB 混合二元基体测定葡聚糖所检测的质量范围。即

DHB/AHB 体积比为 1/8, 1/4, 1/2, 1/1, 2/1, 3/1, 5/1, 8/1, 10/1, 15/1 时, 检测质量范围分别为 6 000, 9 000, 10 000, 14 000, 19 000, 21 000, 18 000, 16 000, 15 000 和 13 000。

由结果可知, 随着 DHB 比例的增加, 所检测到的质量范围经历了由小到大再到小的抛物线变化过程。DHB/AHB 体积比为 3/1 时, 检测的质量范围最大, 达 21 000。本课题组曾用 DHB+1-HIQ 二元基体对相同的葡聚糖样品进行 MALDI-TOF MS 分析, 检测的质量范围为 18 000^[4]。相比之下, 采用 DHB+AHB 二元新基体使检测的质量范围 m/z 扩大了约 3 000。DHB/AHB 体积比值不同时, 样品的结晶状况也不尽相同: 比值介于 1/20 ~ 1/6 时为细粉末状结晶, 比值介于 20/1 ~ 10/1 时为棒状结晶, 比值介于 1/6 ~ 10/1 时为沙粒状结晶。随着 DHB 比例增加, 样品出峰的难易程度和谱峰强度也出现了一个由难到易再到难和由弱到强再到弱的过程。

同样, 也是在 DHB/AHB 为 3/1 时, 样品最易出峰且峰强度最高。

在相同的实验条件下, 以 DHB/AHB 体积比为 3/1 的二元混合基体考察了从 0.01 ~ 100 mg/mL 的 16 种不同浓度葡聚糖样品水溶液的解吸电离效果。实验表明, 样品浓度对检测到的样品质量范围亦有影响。随着样品浓度的递增, 出峰难易程度、谱峰强度及所能检测的质量范围基本上也经历了抛物线形状的变化过程。葡聚糖样品浓度为 10 mg/mL 时, 谱峰强度和所检测到的质量范围最大。

2.2 葡聚糖的 MALDI-TOF MS 谱图

图 1 谱线 a 和 b 分别是以 DHB 和 DHB+AHB 为基体的葡聚糖 (浓度为 10 mg/mL) 的 MALDI-TOF MS 谱图。由图可见, 采用 DHB+AHB 二元基体比采用 DHB 一元基体能够检测到质量更大的分子离子。 m/z 21 000 附近的质谱信号虽然相对较弱, 但通过峰形和相邻峰的质荷比差仍可确认为葡聚糖的分子离子峰。图 1b 右上方的几个小图为不同质量段的扩大图。可以看出在葡聚糖的 MALDI-TOF MS 谱图中呈现一系列由不同聚合度分子链产生的分子离子峰, 主峰之间质量差为 162, 与葡萄糖的残基质量一致。实验发现, 低质量多糖分子离子出峰容易且峰强度大, 这种情况能对检测器产生饱和效应, 影响对葡聚糖样品中高质量分子离子的检测, 为减轻这种影响, 图 1 测定中使用了离子偏转器以阻止小分子量分子离子进入检测器, 偏转值为 2 500。Krause 等^[11]认为 DHB 的基体作用主要在于其分子中的苯环上存在 2 个对位羟基 (2, 5 位), 其中 2 位羟基又与羧基相邻, 易发生分子内氢转移。从图 1a (检测相对分子质量达 16 000) 所显示的谱峰强度和检测质量范围来看, DHB 单独作基体测定的结果也比较理想, 但 DHB 与样品的结晶为长针状结晶, 且出峰的重复性较差。在 DHB 中加入 AHB 使基体与样品的结晶改善为均匀的沙粒状结晶后, 样品出峰变得容易且不同样品点之间的出峰差异也大大降低, 谱图重现性好、质谱峰强度增加、灵敏度提高。

表 1 列出了本文考察 DHB 分别与 ANP、3-AQ、1-HIQ、FA、5-MSA、THAP、AHB 组成的二元基体与葡聚糖样品的结晶情况及测定结果。表中数据显示, 基体与样品结晶的状况与检测的质量范围无明显的对应关系。如 ANP 加入物虽没能改善 DHB 的结晶状况但检测质量范围基本上与 DHB 一致; 而 3-AQ 加入物虽然在一定程度上改善了 DHB 的结晶状况, 但检测的质量范围却比单独使用 DHB 大大降低。AHB 首次用于 MALDI-TOF MS 分析是作由糖

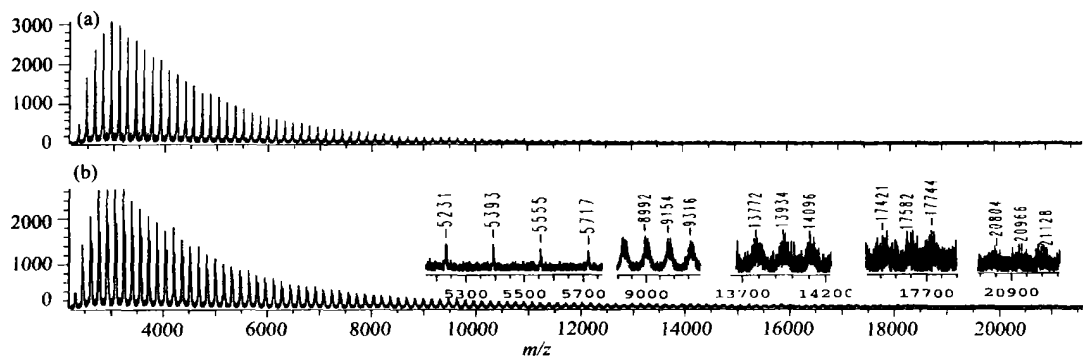


Fig 1 葡聚糖 MALDI-TOF MS 谱图基体

Fig 1 MALDI-TOF MS mass spectra of dextran

Matrixes: (a) DHB; (b) DHB+AHB (体积比 3:1)

表 1 含 DHB 的二元基体测定葡聚糖的结果¹⁾

Tah 1 Results of the dextran deteminated by
binary matrix containing DHB

DHB 加入物	结晶状况	相对分子质量范围
DHB	— —	16 000
ANP	— —	17 000
3-AQ	+ —	6 000
1-HIQ	+	18 000
FA	+	19 000
THAP	++	17 500
5-MSA	++	18 000
AHB	++	21 000

1) ++, +, —, — 分别为很好, 好, 一般, 差

蛋白水解得到的一种 N 链寡聚糖^[12]的基体, 采用 AHB 单独分析葡聚糖时得不到样品离子峰。另外, DHB+5 MSA 二元基体体积比为 3/1、9/1 时所检测葡聚糖相对分子质量范围分别为 18 000、15 000。

图 2 为图 1b 的部分放大图。谱峰和数据显示, 在强度最大的一组离子峰 (m/z : 2 959.9, 3 122.2, 3 284.2, 3 446.7, 3 609.0) 之间的质量差为 162, 符合一个葡聚糖残基单元的质量。在主峰的右侧, 对应的存在着一组质量增大了 16 的离子峰 (m/z : 2 976.3, 3 138.7, 3 299.6, 3 463.0, 3 624.5)。可推测, 这两组离子峰应分别为葡聚糖样品加 Na ($[M+Na]^+$) 和加 K ($[M+K]^+$) 的系列离子峰, 形成加 Na 和加 K 的分子离子峰是糖类 MALDI-TOF MS 谱图的鲜明特征。此外, 在 $[M+Na]^+$ 系列主峰的左边还有一组与其质量相差 18 的系列离子峰 (m/z : 2 492.1, 3 104.3, 3 266.4, 3 428.0, 3 593.1), 这组峰是环状葡聚糖的质谱峰, 文献 [4] 对此也曾有报道。

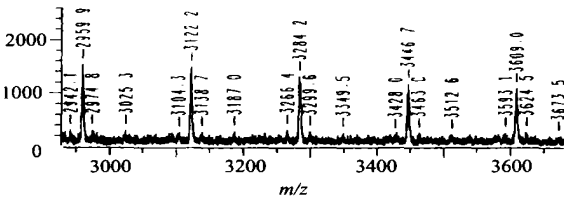


图 2 图 1b 的部分放大图

Fig 2 Partly enlarged of spectrum line in Fig 1 (b)

3 结 论

DHB+AHB 新二元基体是测定葡聚糖的有效基体, 用于直接分析未经分级的高聚合度 ($n > 100$) 葡聚糖, 可检测到 m/z 达 21 000 以上的样品分子离子, 得到葡聚糖样品的相对分子质量和相对分子质量分布等多种信息。

参考文献:

[1] KARAS M, BACHMANN D, BAHR U. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds[J]. Int J Mass Spectrom, 1987, 78(1-2): 53-68.

[2] HARVERY 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 ion source[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(22): 2135-2142.

[3] HARVERY D J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates[J]. Int J Mass Spectrom, 2003, 226(1): 1-35.

[4] 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[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(6): 996-999.

[5] MAMYRIN B A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements and prospects)[J]. Int J Mass Spectrom, 2001, 206(3): 251-266.

[6] GUSEV A I, WILKINSON W R, PROCTOR A. Improvement of signal reproducibility and matrix/ comatrix effects in MALDI analysis[J] . Anal Chem, 1995, 67(6): 1034—1041.

[7] CHANT W D, TANG K Y. Analysis of a bioactive β -(13) polysaccharide (Curdlan) using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J] . Rapid Commun Mass Spectrum, 2003, 17(9): 887—896.

[8] CHAN P K, CHANT W D. Effect of sample preparation methods on the analysis of dispersed polysaccharides by matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry[J] . Rapid Commun Mass Spectrum, 2000, 14(19): 1841—1847.

[9] GIBSON B W, ENCSRROM J J, JOHN C M. Characterization of bacterial lipooligosaccharides by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J] . J Am Soc Mass Spectrum, 1997, 8(6): 645—658.

[10] HARVEY D J, HUNTER A P. Use of a conventional point detector to record matrix-assisted laser desorption/ionization spectra from a magnetic sector instrument[J] . Rapid Commun Mass Spectrum, 1998, 12(22): 1721—1726.

[11] KRAUSE J, STOECKLI M, SCHLUNEGGER U P. Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry[J] . Rapid Commun Mass Spectrum, 1996, 10(15): 1927—1933.

[12] MOCK K K, DAVY M, COTTRELL J S. The analysis of underivatized oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry[J] . Biochem Biophys Res Commun, 1991, 177(2): 644—651.

Determination of High Polymerization Degree Dextran by Matrix-assisted Laser Desorption ionization Time of flight Mass Spectrometry with a Novel Binary Matrix — 2, 5 Dihydroxybenzoic Acid/3-Amino-4-Hydroxybenzoic Acid)

ZHANG Dong di, ZHOU Li hua, DENG Hui min

(Instrumental Analysis & Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using a novel binary matrix — 2, 5 dihydroxybenzoic acid/ 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (DHB+AHB), a dextran sample with a high polymerization degree ($n > 100$) without being further fractionated was directly determined by the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, and the molecular weight of the dextran up to more than 21 000 has been detected. The novel binay matrix was also compared with eight binary matrixes which have been reported before. The results showed that the larger mass range could be obtained and the dextran molecules were desorbed and ionized more efficiently and the reproducibility of spectra was enhanced when a novel binary matrix—DHB+AHB was used, also the resolution of spectra was increased.

Key words: MALDI TOF MS; dextran; 2, 5 dihydroxybenzoic acid/ 3-amino-4-hydroxybenzoic acid binary matrix

(上接第 56 页)

Identification of Glibenclamide in Traditional Chinese Medicines by High-performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

YAO Jun hua, ZHOU Li hua, ZHANG Dong di, ZHA Qing min

(Instrumentation Analysis & Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC MS/MS) was developed for the identification of glibenclamide added in Chinese traditional medicines. HPLC separation was carried out on a BDS C8 column (4.6 mm×150 mm, 5 μ m) using an isocratic mobile phase (CH₃OH/CH₃CN/0.1% HAc 55:15:30) in less than 15 min. HPLC MS and HPLC MS/MS were performed on an ion trap instrument in both positive and negative ionization mode. This method is simple, rapid, sensitive and reliable, and has been successfully applied to identify glibenclamide in three antidiabetic Chinese traditional medicines.

Key words: high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry; glibenclamide; Chinese traditional medicines