

糖结构与质谱分析*

方一第

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

[摘要] 本文对糖结构研究的重要性、作者等人近年来用化学衍生和快原子轰击质谱相结合的方法区分自然界常见的11种单糖的立体异构体、14个寡糖中单糖的立体异构体和连接方式以及用于6对葡萄糖甙和半乳糖甙的区分作一简单的介绍。文章还介绍了寡糖和多糖的甲基化分析方法,从气相色谱的保留时间和质谱谱图判断单糖的组成和连接位置。

关键词: 糖结构 立体异构体 连接位置 化学衍生 质谱

糖和糖的复合物在生物体中所起的重要作用已越来越为人们所认识。糖脂、糖肽、糖蛋白在生命过程中的功能已被近二十年来大量研究所证明。糖蛋白和糖脂中的寡糖(几个至十几个单糖)链的特定糖基可作为细胞识别的信号。中草药中大量的有效成份糖甙类化合物,如人参、三七、黄酮和皂甙等;具有药理活性的多糖六十年代以后也已引起人们极大的兴趣,这些多糖能够调节免疫功能,如人参多糖、黄芪多糖;能抗肿瘤,如香菇多糖、茯苓多糖、猪苓多糖等;有些还能抗感染、降血糖、降血脂;肝素多糖除抗凝血外,尚有抗血栓、抗粥样动脉硬化、抗病毒等活性。

对糖的生理过程的理解是与它的结构知识密切相关的,所以糖的结构研究就直接影响着生命科学中前沿学科的发展。但糖的结构是相当复杂的:立体异构体(一个单糖若含有4个不对称碳便有 $2^4=16$ 个立体异构体),单糖之间的连接位置(1-1、1-2、1-3、1-4、1-6连接),还有 α 、 β 构型的苷链。3个不同的氨基酸或碱基可生成6种不同的多肽或短链核酸,而3个不同的单糖则可组成1056个不同结构的寡糖。对糖结构测定方法的建立和研究与多肽、蛋白相比相差还是较远的。

在糖结构研究的诸多方法中,质谱被认为是一个重要的不可缺少的手段,灵敏度高,信息直观,特别是80年代出现的快原子轰击质谱(FABMS)^[1]或二次离子质谱(SIMS),使极性高、难挥发、热不稳定的糖及其复合物的直接分析成为可能,只需要用pmol~nmol的样品量便能得到寡糖的下列信息:(1)分子量;(2)序列信息;(3)糖复合物中糖基化位置;(4)直链和有支链寡糖的鉴别;(5)特定情况下糖链的连接点。

在多糖结构的描述中,用于多糖中单糖的连接位置测定的甲基化分析方法,也必需用

1994年7月20日收

* 国家自然科学基金资助项目、第6届全国F四级质谱学术会议交流论文

GC/MS 来进行定性和定量。

尽管 FABMS(或 SIMS)能直接用于糖及其复合物的分析,但还区分不了糖的立体异构体。我们采用化学衍生和 FABMS 相结合的方法,可以用来区分立体异构体以及寡糖中单糖的连接位置^[2-4],也曾采用甲基化分析方法测定植物生长调节剂—月光花素甲中糖的连接位置^[5]。

1 糖及其复合物中糖的立体异构体及寡糖中单糖连接位置的质谱分析方法

利用正丁基硼酸[n-BuB(OH)₂]对自然界常见的 11 种单糖-核糖(1)、来苏糖(2)、木糖(3)、阿拉伯糖(4)、鼠李糖(5)、岩藻糖(6)、葡萄糖(7)、甘露糖(8)、半乳糖(9)、果糖(10)、山梨糖(11)进行衍生化反应,通过 FAB 谱图差别区分单糖的立体异构体。同时还对 12 个葡萄糖甙和半乳糖甙的正丁基硼酸的衍生化反应产物进行 FABMS 分析,通过谱图的差别,有效地区分了葡萄糖甙和半乳糖甙。

又进一步对 9 个双糖(纤维二糖、麦芽糖、乳糖、龙胆二糖、密二糖、黑曲霉糖、海藻糖、蔗糖、异麦芽糖);4 个三糖(潘糖、麦芽三糖、松三糖、棉子糖)和 1 个四糖(水苏糖)进行研究,结果可以区分寡糖中单糖的立体异构体和连接方式。

1.1 实验方法

单糖与寡糖样品为生化试剂,糖甙化合物为合成或天然产物。正丁基硼酸为 Sigma 公司产品。无水吡啶为市售分析纯,经固体 NaOH 回流干燥、蒸馏而得。二甲基亚砜为市售分析纯,经固体 Ca(OH)₂ 回流干燥、减压蒸馏而得。

FAB 谱的测定:单糖样品各 0.02mmol,分别溶于 50μL 无水吡啶中,将 0.5μL 的样品溶液涂于约 1μL 甘油的样品靶上,送入离子源,测 FAB 谱。

单糖与正丁基硼酸的衍生反应及其 FAB 谱的测定:取 1-11 样品各 0.02mmol,分别溶于 70μL 无水吡啶中,在其中加入 0.1mmol 正丁基硼酸,60℃水浴加热反应 10min,反应液 4μL 与约 2μL 甘油混合,将约 1.5μL 的混合液涂于样品靶上,重复测定 FAB 谱数次。

对于 12 个糖甙化合物,取样品 0.02mmol,加 80μL 无水吡啶和 20μL DMSO(加 DMSO 是为了增加样品的溶解度),在各溶液中加入 0.1mmol 正丁基硼酸,沸水浴加热反应 10min。

寡糖以水为溶剂,配制 100nmol/μL 的溶液和 800nmol/μL 的正丁基硼酸吡啶溶液。选用四聚乙二醇为底物,得到最好的特征谱图。最佳的寡糖与正丁基硼酸反应摩尔比双糖为 1:8,三糖和四糖为 1:12。

质谱在国产的带有标准 KYQ 快原子枪的 KYKY Zhp-5A 双聚焦高分辨质谱计上测定。加速电压为 6kV,Ar 能量为 7keV,枪监测电流为 1mA。每个样品重复进样数次,在相同条件下得到各峰相对强度基本不变的谱图。

1.2 结果与讨论

1.2.1 不经过衍生的五碳糖(1-4),分子量 150;脱氧六碳糖(5,6),分子量 164;六碳糖(7-11),分子量 180 的 FAB 谱图三组分别没有什么差别。经过衍生后的 11 种单糖的 FAB 谱图有着显著的差别,主要数据列于表 1。表中 $A = \text{单糖} + n\text{BuB}(\text{OH})_2 - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}$, $A' =$

$A-H_2O$, $A''=A-2H_2O$, $B=\text{单糖}+2n-BuB(OH)_2-4H_2O+H$, $B'=B-H_2O$, $B''=B-2H_2O$, $C=\text{甘油}$ 。脱氧六碳糖(5,6)衍生物的 FAB 谱图示于图 2。6 对葡萄糖甙和半乳糖甙经过衍生后,通过 FABMS 谱图的特征可加以区分。葡萄糖甙与正丁基硼酸结合所生成的信息弱,半乳糖甙的信息强,因为半乳糖甙比葡萄糖甙更容易和正丁基硼酸相结合。

1.2.2 寡糖中单糖的连接位置和异构体

1.2.2.1 连接位置

连接位置不同的双糖,经正丁基硼酸衍生后,谱图显现了差别。

如海藻糖(trehalose $Glc^1-1'Glc$)、黑曲霉糖(nigerose $Glc^1-3'Glc$)、麦芽糖(maltose $Glc^1-4'Glc$)、异麦芽糖(isomaltose $Glc^1-6'Glc$)、谱图示于图 3,不同连接方式不但具有不同强度的离子系列,同时产生不同的特征离子。对于三糖、麦芽三糖(maltotriose $Glc^1-4'Glc^1-4'Glc$)、潘糖(panose $Glc^1-3'Glc^1-4'Glc$)与正丁基硼酸反应后的谱图也表现出差别,如图 4 所示。

不同连接位置的糖,羟基的相对位置有所变化,造成正丁基硼酸进攻的难易程度不同,使平衡体系产物离子的比例有所差别,因而所生成的特征离子和系列离子强度比产生差异。

1.2.2.2 立体异构体

经过正丁基硼酸衍生后,不同立体异构体的双糖谱图也显现了明显的差别。

纤维二糖(cellobiose $Glc^1-4'Glc$)和乳糖(lactose $Glc^1-4'Gal$),乳糖上有明显的 $m/z347$ 和 $m/z329$ 特征离子,纤维二糖则没有,两者谱图上离子的相对强度也有所不同。

密二糖(melibiose $Glc^6-1'Gal$)和异麦芽糖(isomaltose $Glc^1-6'Glc$)一对具有相同连接位置,不同立体结构的双糖在谱图上也有明显的差别,密二糖的谱图上有 $m/z317$ 特征离子。

1.2.2.3 三糖和四糖的衍生产物的 NFABMS 图上 $m/z287$ 、 $m/z449$ 、 $m/z611\cdots$ 系列离子的出现可判断糖是否为 1-4、1-6 连接,端基为 1-6 连接的半乳糖的寡糖有 $m/z317$ 特征离子;端基含果糖的寡糖衍生物的 NFABMS 上有 $m/z155$ 特征离子。

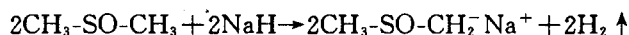
2 甲基化分析方法

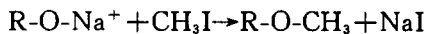
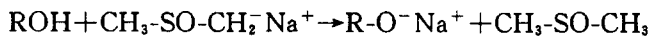
甲基化分析方法是寡糖、多糖及其复合物中糖结构分析的重要方法。可用来判断单糖的组成和连接位置。

分析步骤是先将多糖(或配糖体中的糖部分)中各单糖残基的游离羟基转化为甲氧基,进而酸水解成各种甲基化单糖,然后还原成相应的阿尔迪醇,再乙酰化,得到部分甲基化部分乙酰化的单糖醇,GC/MS 分析,从 GC 的保留时间和所得的质谱谱图,与标准物相对照,可以判断糖的组成及其连接位置。

甲基化反应多采用 Hakomori 于 1964 年建立的方法^[6],此后不断有所改进。八十年代后则更多采用较方便的 Ciucanu 和 Kerek 提出的方法^[7]。

2.1 Hakomori 法是用二甲基亚磺酰阴离子的方法将糖羟基转化为醇钠,再进一步与碘甲烷反应生成甲醚。反应方程式如下:





实验方法如下:

样品: 植物生长调节剂一月光花素甲经 HPLC 分离制备, 有效成份命名 DC-2b, 真空干燥 20 小时, 分析纯 CH_3I , CH_3SOCH_3 经重蒸。

DC-2b 样品 6mg, 加 0.2mL $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 充 N_2 保护, 在超声波发生器中处理 30min 以帮助溶解, 在 N_2 保护下加入 0.2mL $\text{CH}_3\text{SOCH}_2^-$, 电磁搅拌 10hr 左右, 在水浴冷却条件下, 逐滴加入 CH_3I 约 0.2mL, 充 N_2 保护, 室温下电磁搅拌 10hr 左右。反应完毕后, 加 CHCl_3 约 0.5mL 并用蒸馏水洗 CHCl_3 相 4 至 5 次, 然后用 20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 洗 CHCl_3 相以除去碘, 再用蒸馏水洗 CHCl_3 相 5 次以除去 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 。最后用 N_2 吹干 CHCl_3 相, 得到糖浆状黄色甲基化产物。

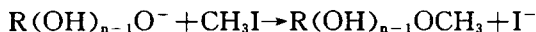
全甲基化产物的水解: 加 1mL 2N CF_3COOH 至甲基化产物中, 充 N_2 保护, 封管。在烘箱中恒温 100°C 2hr, 冷却至室温, 用 N_2 吹干。

水解产物的还原: 水解产物加入 0.05N 0.3mL NaOH , 再加 5mg NaBH_4 , 室温下反应 8~10hr, 加冰醋酸 10 滴, 吹干, 加 CH_3OH 1mL, 再滴冰醋酸吹干, 重复三次。再加 1mL CH_3OH 吹干, 重复三次。

还原产物乙酰化: 将还原产物加 0.2mL 重蒸过的乙酸酐, 充 N_2 保护, 封管, 100°C 加热 2hr, 冷却后加甲苯 1mL, 用 N_2 吹干, 重复两次, 加 CHCl_3 , 蒸馏水洗 CHCl_3 相三次, 用 N_2 吹干 CHCl_3 , 得到棕黄色产物。

2.2 Ciucanu 和 Kerek 的方法是将多糖样品溶解在 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 中, 加入 NaOH 粉末和碘甲烷, 混合物在密封瓶中 25°C 搅拌 6min 即可, 方法简单, 重复性好。

反应方程式:



.....



具体做法: 真空干燥的 DC-2b 样品 5mg, 加 0.5mL $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 使样品溶解, 充 N_2 保护, 加入干燥研碎的 NaOH 20mg 和 0.2mL CH_3I , 充 N_2 保护, 在密闭管内电磁搅拌 6min, 反应完毕后, 加 CHCl_3 , 蒸馏水洗 CHCl_3 相 4 次, 加无水 Na_2SO_4 干燥 2hr, 转移 CHCl_3 相, N_2 吹干, 得到甲基化产物。继之, 水解、还原、乙酰化与 (2.1) 相同。

所得部分甲基化部分乙酰化的单糖醇用 CHCl_3 稀释后进行 GC/MS 分析。仪器为 Finnigan 4500 GC/MS。毛细管柱 OV225 ($28\text{m} \times 0.25\text{mm i.d.}$), He 为载气, 柱温为

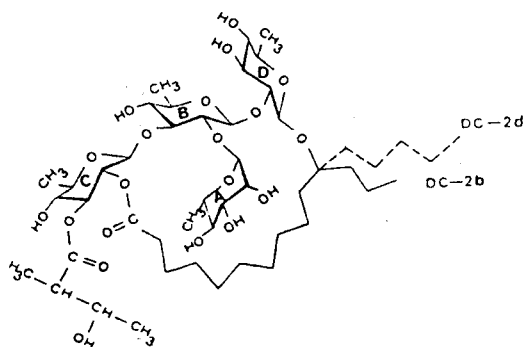


图 1 糖部分结构

A = 鼠李糖; B=C=D = 奎诺糖

180℃,程序升温 5℃/min 至 260℃,质谱计离子源温度 250℃,电子能量 70eV。

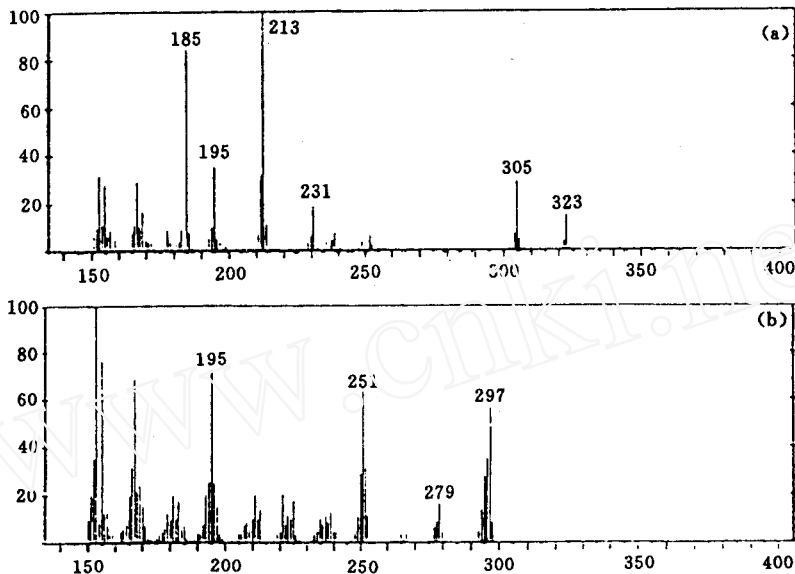


图 2 脱氧六碳糖的正丁基硼酸衍生物的特征离子及其可能的结构
a. 鼠李糖 b. 岩藻糖

GC/MS 分析所得到质谱图与标准谱图^[8]相对照,表明存在 1,5-二-O-乙酰基-6-去氧-2,3,4-三-O-甲基己糖醇 (C-1 为连接位置)、1,2,5-三-O-乙酰基-6-去氧-3,4-二-O-甲基己糖醇(C-1、C-2 为连接位置)和 1,2,3,5-四-O-乙酰基-6-去氧-4-O-甲基己糖醇(C-1、C-2 和 C-3 为连接位置)。结果与 NMR 所得数据相一致。糖部分结构如图 1 所示,DC-2b 和 DC-2d 为月光花素甲中两个同系物组份,分子结构相差 1 个-CH₂-CH₂-。

表 1 11 种单糖正丁基硼酸酯衍生物在 FAB 质谱中的特征离子及其可能的结构

单糖	分子量	单糖正丁基硼酸酯衍生物的特征离子 m/z (相对强度)											衍生物可能的 主要结构	
		A	A'	A''	A+G	A'+G'	B	B'	B''	(B-H)-CH ₂ OH	(B-H)-CH ₂ CHOH	(B-H)-CH ₂ (OH)CHOH		C
1	150	—	199 (100)	181 (13.1)	—	291 (7.1)	—	—	—	—	—	—	—	1P 1H 1H' ^[10]
2	150	—	199 (100)	181 (36.6)	—	291 (9.3)	283 (7.2)	—	—	—	—	—	—	2P 2P'
3	150	—	—	181 (57.4)	—	—	283 (57.4)	265 (11.9)	—	—	—	—	—	3P ^[8]
4	150	—	—	181 (64)	—	—	283 (24)	265 (12)	—	251 (60)	—	—	—	4H ^[8]
5	164	231 (19.5)	213 (100)	195 (35.5)	323 (14.5)	305 (29)	—	—	—	—	—	—	—	5P
6	164	—	—	195 (72.7)	—	—	297 (56.4)	279 (16.4)	—	—	251 (63.6)	—	—	6H ^[9]
7	180	—	229 (31.8)	211 (18.9)	—	—	313 (10.4)	295 (20.3)	—	—	—	—	379 (5.3)	7P ^[9] 7P'
8	180	247 (25)	229 (37.5)	211 (45.7)	—	—	—	295 (20.3)	—	—	—	—	—	8P 8P' ^[10]
9	180	—	—	211 (53.1)	—	—	313 (52.3)	295 (85)	277 (32.3)	—	—	251 (34.6)	379 (75.3)	9H ^[10]
10	180	—	—	211 (37.5)	—	—	313 (29.7)	295 (90.3)	277 (15.8)	281 (48.6)	—	—	379 (26.4)	10H ^[9]
11	180	247 (30)	229 (100)	211 (54.8)	—	—	313 (11.9)	295 (50.2)	277 (7.2)	—	—	—	379 (5.1)	11P 11P'

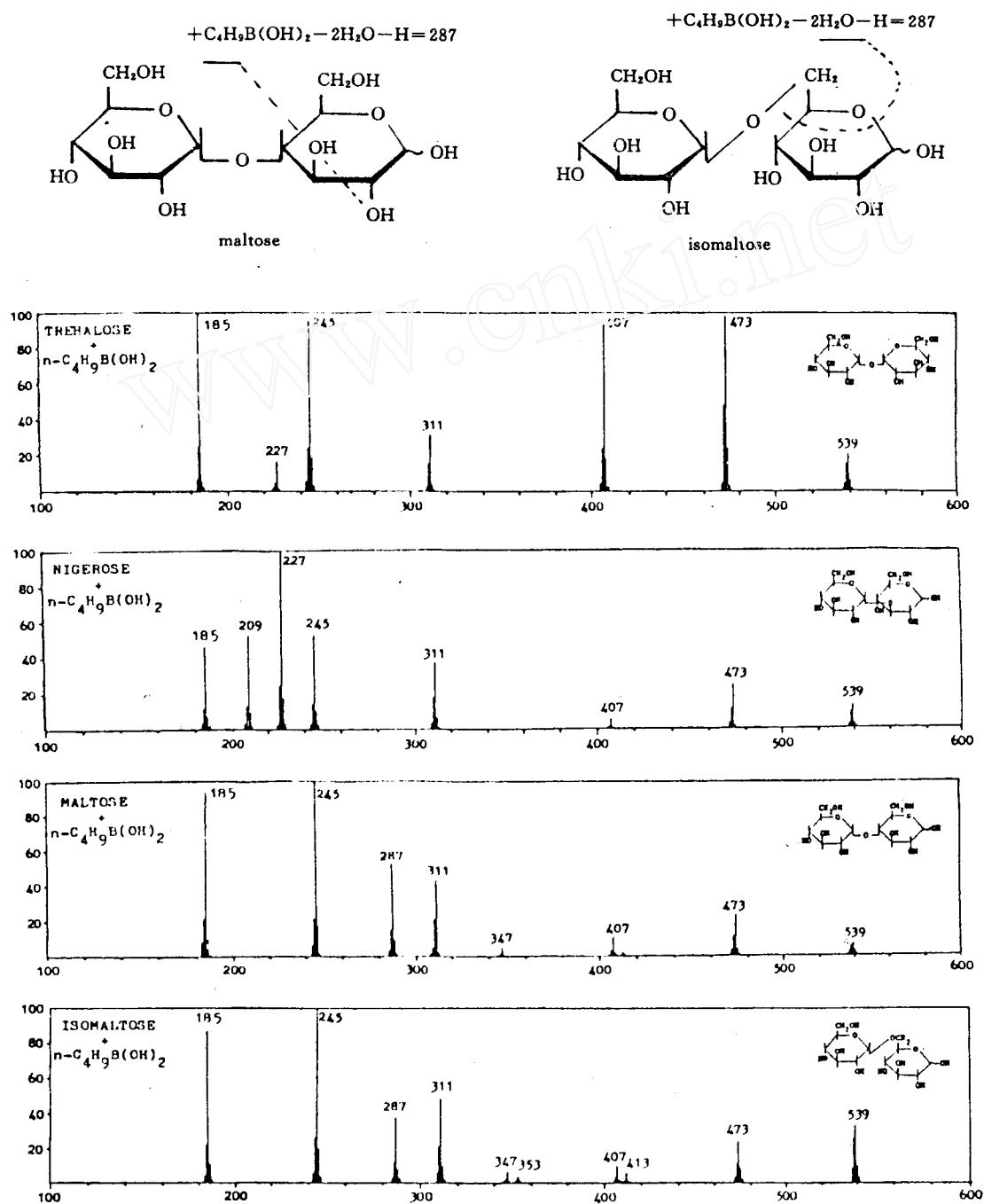


图3 trehalose(1-1)、nigerose(1-3)、maltose(1-4)、isomaltose(1-6)

正丁基硼酸衍生物的 NFAB 谱图

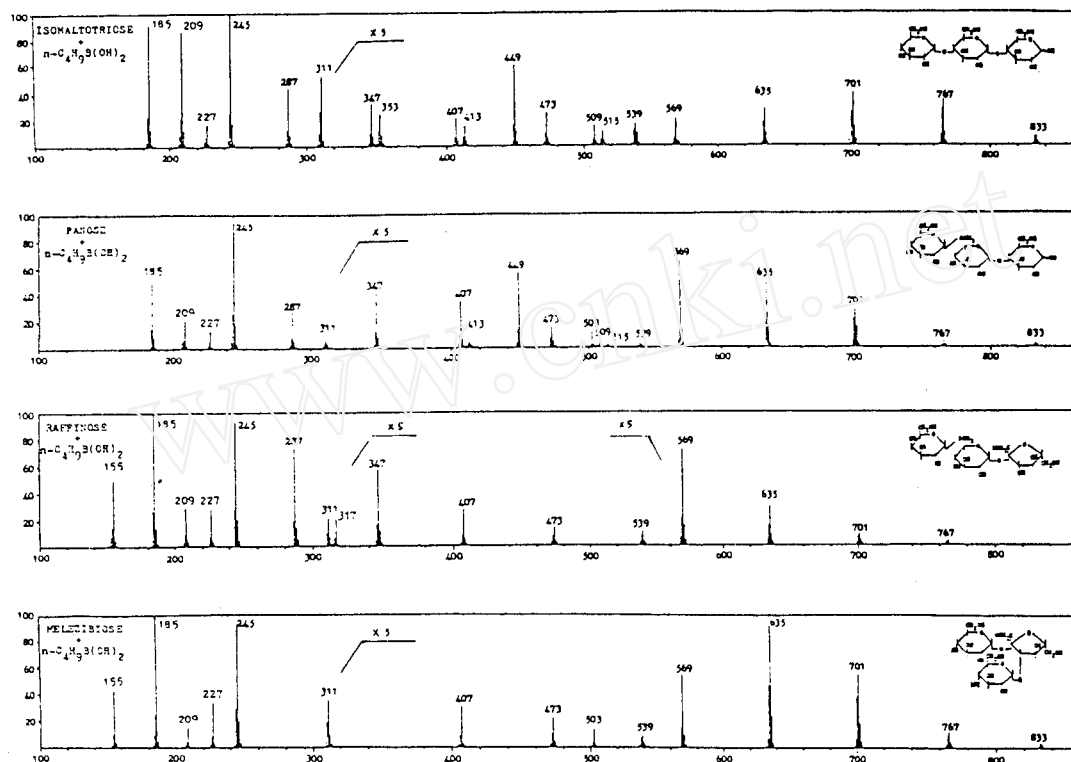


图4 异麦芽三糖(isomaltotriose)、潘糖(panose)、棉子糖(raffinose)、松三糖(melezibiose)正丁基硼酸衍生物的 NFAB 谱图

致谢:本工作得到王光辉、康致泉教授的支持和帮助,在此表示深切谢意。

参 考 文 献

- 1 Barber M, Bordoli R S, Sedgwick R D *et al.* J Chem Soc Chem Commun, 1981,7:325
- 2 严琳,方一苇. 化学学报,1988,46:1001
- 3 方一苇,严琳,梁曦云. 药学报,1988,23:895
- 4 Yan Lin, Fang Yiwei. Chinese Journal of Chem, 1993,11:53
- 5 Fang Yiwei, Chai Wengang, Chen Suming *et al.* Carbohydrate Research, 1993,245:259
- 6 Hakomori S I. J Biochem(Tokyo), 1964,55:205
- 7 Ciucanu I, Kerek F. Carbohydrate Research, 1984, 131:209
- 8 Founet B, Strecker G, Leroy Y *et al.* Anal Biochem, 1981, 116:489

Structure of Saccharides and their Mass Spectrometric Analysis

Fang Yiwei

(Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Received 1994-07-20

Abstract

In this paper, the research work on structure elucidation of saccharides including identification of stereoisomers of eleven monosaccharides, differentiation of six glucosides and six galactosides, and analysis of linkage positions and isomers of monosaccharide units in fourteen oligosaccharides by fast atom bombardment mass spectrometry (FABMS) in combination with the stereoselective derivatization with substituted boric acid, $\text{RH}(\text{OH})_2$ are reported. The analysis method for methylation of sugars and identification of the components and linkage types by retention times of gas chromatograph and mass spectra are reported too.

Key Words: structure of saccharides, stereoisomer, linkage position, chemical derivatization, mass spectrometry.