

离子色谱与质谱联用高灵敏同时分析19种多组寡糖同分异构体

郭藤 高立红 史碧云

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

寡糖, 离子色谱-质谱联用, Orbitrap

摘要

本文建立了针对19种单、双糖离子色谱串联质谱高灵敏定性定量方法。优化后的离子色谱条件: 分析柱为Thermo Scientific Dionex CarboPac PA20 (150*3 mm), 保护柱为Dionex CarboPac PA20 (30*3 mm), 200 mM氢氧化钠-水为淋洗液, 梯度洗脱, 流速0.4 mL/min, 柱温30°C。采用Orbitrap 静电场轨道阱质谱QE Focus进行定性和定量分析, ESI源, 扫描方式为Full Scan-ddMS2。结果表明: 该方法对所有目标物均有很好的保留和峰形, 四组单、双糖同分异构体分离效果理想, 质谱相比传统检测手段具有优异的灵敏度和高选择性, 可以很好的适用于复杂基质中低含量寡糖的分析。

1. 引言

糖类化合物是生命体中最重要的一类生物分子之一, 参与了生命特别是多细胞生命的全部时间和空间过程, 在细胞之间的识别和互相作用、癌症的发生和转移、机体的免疫和免疫抑制、细胞凝集等生物过程中都起着关键作用。随着现代分离分析技术和分子生物学, 特别是细胞生物学的飞速进步, 不断揭示出糖类化合物的各种结构和诸多生物学功能。要了解复杂的生命现象, 就必须对糖的结构和功能有更深入的了解, 糖类化合物的分离分析工作则是糖类结构功能学研究的基础。

糖类化合物的分离分析是糖学研究的热点之一, 同时具有很大的挑战性, 主要是由于糖类化合物结构的“微观不均一性”, 存在大量的位置异构体和差向异构体, 使其分离极其困难。由于寡糖分子的极性非常大, 无论在亲水型还是正向色谱柱, 保留表现都不是很理想, 色谱峰形差强人意, 并且有较多同分异构体存在时, 不能实现较好分离。基于目标物

的化学特征, 离子色谱对糖类物质有很好的保留和分离效果, 相关文献报道已有很多, 一些糖测定标准方法也是使用离子色谱法。相较于传统的检测手段, 质谱具有高灵敏度、高通量和高选择性等优势, 被认为是化合物定量的黄金标准, 也是在糖类物质检测中的重要分析方法之一。

因此离子色谱和质谱联用进行糖类等强极性化合物的分析具有无可比拟的优势, 可以解决诸多难题, 目前尚属于较新的应用技术, 本实验则建立了基于IC-QE Focus有效分离分析19种单、双糖的方法, 为食品科学、生物工程、生物样品中单、双糖的分离分析提供可靠、前沿的分析方法。

2. 实验部分

2.1 仪器和试剂

质谱: Thermo Scientific™ QE Focus (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱: Dionex ICS-5000+型离子色谱仪 (赛默飞世尔科技, 美国);

分析柱: Dionex CarboPac PA20 (150*3 mm, 6 μm);

保护柱: Dionex CarboPac PA20 (30*3 mm, 6 μm);

试剂: 超纯水 (18.2 MΩ·cm), 50%氢氧化钠水溶液, 乙腈 (色谱纯, Fisher Chemical公司, 美国)。

2.2 仪器方法

离子色谱分析条件: 具体见表1;

质谱分析条件: 具体见表2;

表1. 离子色谱分析条件

淋洗液	A: 超纯水 B: 200 mM氢氧化钠水溶液
流速	0.4 mL/min
柱温	25 °C
检测器箱控温	30 °C
进样体积	25 µL
抑制器	Dionex ASRS® 300 2 mm 外接水再生流速2 mL/min

洗脱梯度

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	95.0	5.0
2.0	95.0	5.0
25.0	80.0	20.0
45.0	70.0	30.0
50.0	50.0	50.0
50.1	0.0	80.0
60.0	0.0	80.0
60.1	95.0	5.0
65.0	95	5.0

表2. 质谱分析条件

电离方式	正模式、负模式
扫描模式	Full Scan-ddMS2
喷雾电压	3500 V(+)/3000V(-)
毛细管加热温度	320 °C
鞘气流速	45 Arb
辅助气流速	10 Arb
雾化气温度	500 °C
分辨率	70000
扫描范围	100~1500

3. 结果和讨论

3.1 单、双糖离子化方式选择

本实验采用流动注射法来优化质谱条件，即将单、双糖的标准溶液分别通过蠕动泵注入质谱，改变一些关键参数观察其信号和喷雾稳定性，选择最好的参数和离子化方式。由于糖的结构具有多样性和特殊性，其离子化方式也有多种，根据文献报道和初步实验，单、双糖常见的离子化方式有ESI负模式下的[M-H]⁻、[M+COOH]⁻、[M+Cl]⁻以及ESI正模式下的[M+Na]⁺，在糖分析的相关文献中，多数采用[M-H]⁻，其他离子化方式尤其是[M+Na]⁺少有提及，本实验重点考察了不同离子化方式之间的响应区别和流动相组成对离子化效率的影响。

为提高雾化效率，外加一蠕动泵持续的泵入有机相（甲醇/乙腈），通过三通与离子色谱出来的纯水混合，然后进入质谱。实验发现，有机相的成分对[M-H]⁻峰的响应有很大的影响，乙腈响应高于甲醇，乙腈中添加0.1%氨水> 5 mM甲酸铵> 0.1%氨水+5 mM甲酸铵>0.01%甲酸，结果如图1（以双

糖为例）。

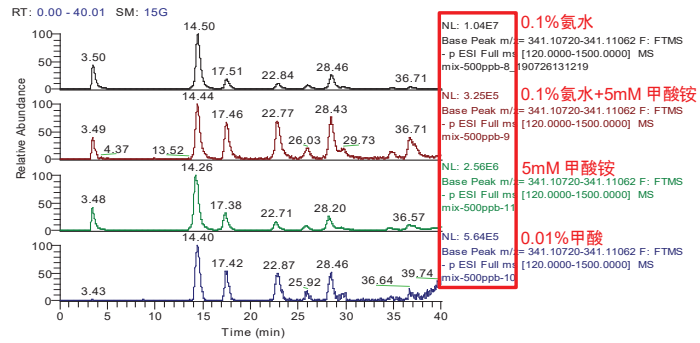


图1.乙腈中添加不同添加剂时[M-H]-峰的响应比较

当使用[M+Cl]⁻为分子离子峰时，乙腈中添加0.1%氨水、5 mM甲酸铵、0.01%甲酸 三者之间的响应相当，添加0.1%氨水+5 mM甲酸铵时响应明显降低，但在同等条件下，使用[M+Cl]⁻为分子离子峰时，响应均明显高于[M-H]⁻峰，结果如图2（以双糖为例）。

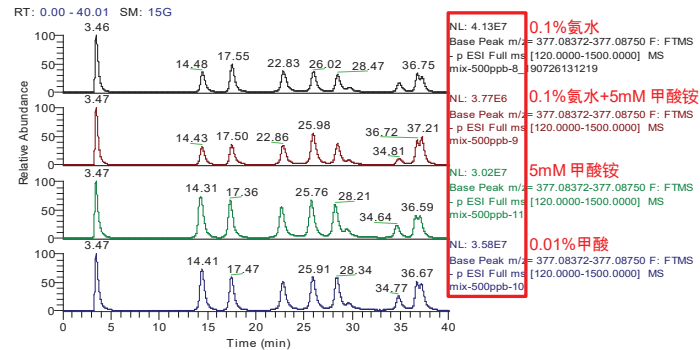


图2.乙腈中添加不同添加剂时[M+Cl]-峰的响应比较

寡糖也可以用[M+COOH]⁻作为分子离子峰，但需要提供甲酸根离子。实验发现，乙腈中添加0.1%氨水+5 mM甲酸铵与添加0.01%甲酸响应相当，提高甲酸浓度理论上可以增强[M+COOH]⁻的响应。只添加5 mM甲酸铵响应很差，添加0.1%氨水+2 mM甲酸铵时，响应提高比较明显，尤其是双糖，结果如图3。

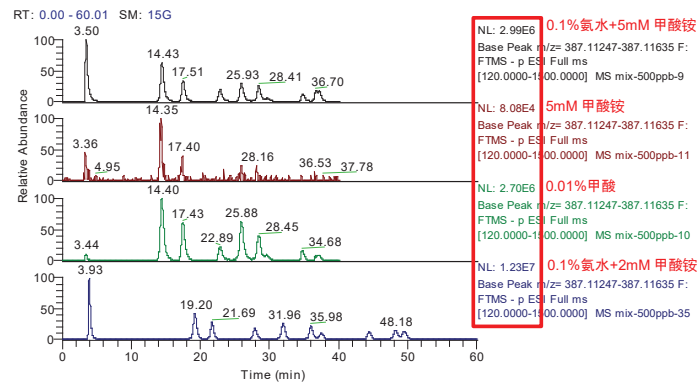


图3.乙腈中添加不同添加剂时[M+COOH]-峰的响应比较

实验发现，寡糖在[M+Na]⁺时也有很好的响应，在各自最优的条件下综合比较四种离子化方式母离子的响应，[M+Na]⁺ > [M-H]⁻ > [M+COOH]⁻，乙腈中添加0.1%氨水时[M-Cl]⁻与[M+Na]⁺响应相当，但[M+Na]⁺峰不需要额外泵入乙腈，使实验过程更加简单，因此选择[M+Na]⁺作为分子离子峰。

3.2 质谱参数的优化

另外，为获得最佳的信号强度和稳定性，对质谱的主要参数进行了优化。实验发现，鞘气和辅助气的流速在合理设定范围内变化时对信号影响不明显，故选择常用参数鞘气40Arb和辅助气10Arb。考虑到离子色谱出来的纯水直接进入质谱，提高脱溶剂温度有利于增加雾化效率提高信号强度，实际实验结果与该推断一致，故脱溶剂温度为500℃。毛细传输管温度一定程度上可以辅助提高雾化效果，降低干扰，实验发现该温度在270℃~350℃时对[M+Na]⁺影响不大，最终选择320℃，但使用[M-H]⁻和[M+COOH]⁻时，随着温度升高信号有一定下降，最终选择270℃。

3.3 色谱条件的优化

将所有同分异构体分离并获得良好的较窄的峰形是该分析方法的关键和难点，因此重点考察了色谱柱、流速和梯度的影响。实验比较了Dionex CarboPac PA20 (150*3 mm, 6 μm)常规色谱柱和Dionex CarboPac PA20 -fast (100*2 mm, 4 μm)快速分析色谱柱，结果表明二者各有优劣。前者在兼容质谱的低流速下峰形较宽，分离度差些，但后者在流速大于0.35 mL/min时容易压力过高，因此最终选择Dionex CarboPac PA20 (150*3 mm, 6 μm)色谱柱完成本实验。为获得良好的峰形和完全区分同分异构体，对流速和梯度又进行了专门优化，实验结果表明：流速为0.3 mL/min时峰较宽，流速为0.5 mL/min时反压高，增大流速有利于改善峰形，但抑制器后端管路和检测器所产生的反压也会随之增大，不利于抑制器的使用寿命。因此综合考虑采用0.4 mL/min流速，与质谱兼容的同时也有利于抑制器的维护，并且经过调整梯度改善了麦芽糖和昆布二糖的分离效果，最终所有单、双糖均获得里较满意的峰形和灵敏度，所有同分异构体也可以区分，结果如图4。色谱柱Dionex CarboPac PA20 -fast (100*2 mm, 4 μm)更兼容质谱检测器，分析速度快，易获得较窄的峰形，后续需要针对该色谱柱调整色谱条件。

3.4 方法灵敏度

将母液逐级稀释获得系列浓度的标准溶液，用优化得到的最终方法在QE Focus上进行分析，结果表明所有单、双糖定量限均≤0.5 ppb，结果如图4。

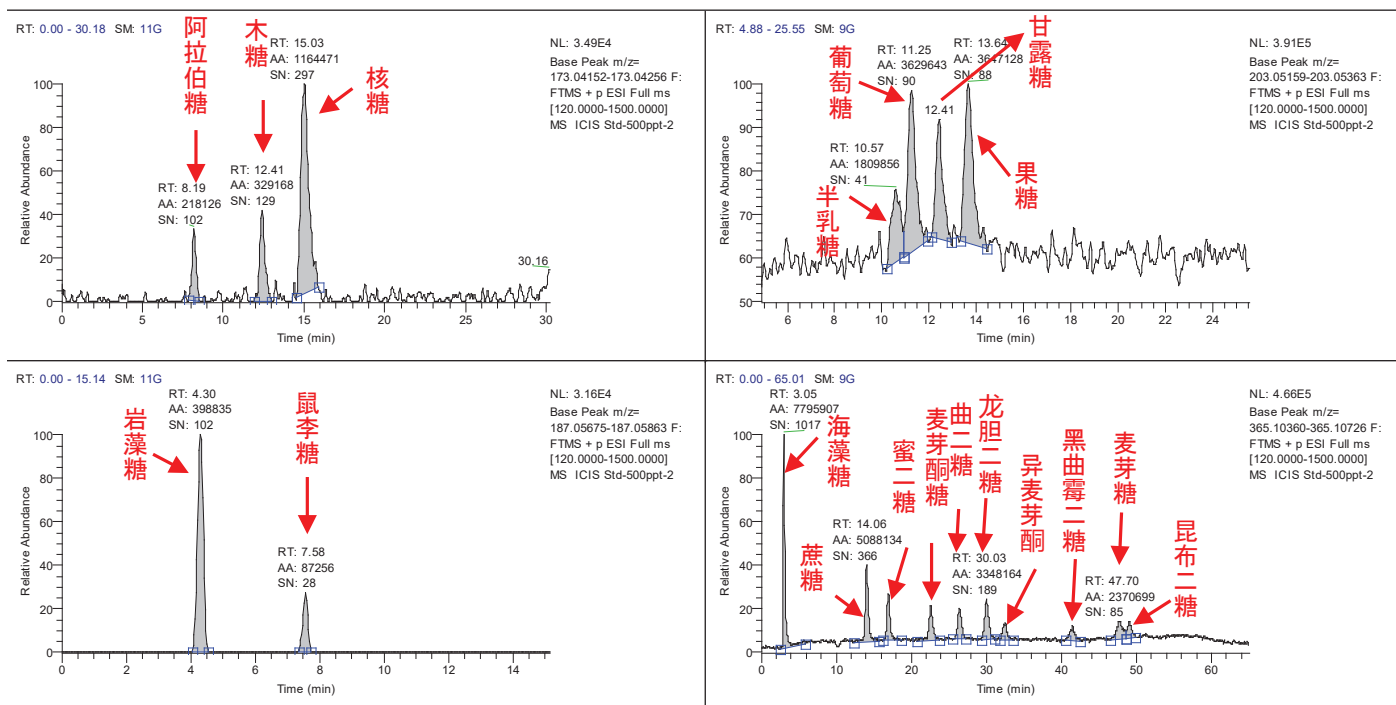


图4. 19种4组同分异构体单、双糖在0.5 ppb时的提取离子图

4. 结论

本实验开发了离子色谱-质谱联用测定寡糖的方法，在各自最优的条件下综合比较四种离子化方式母离子的响应， $[M+Na]^+$ 具有较好的响应且 $[M+Na]^+$ 峰不需要额外泵入乙腈，使实验过程更加简单。在优化的色谱条件下，所有目标物都获得了很好的保留和峰形，各组同分异构体也都能有效分离，满足定性要求，同时具有非常好的灵敏度，所有单、双糖定量限均 ≤ 0.5 ppb。

离子色谱在糖类物质的研究中应用非常广泛，氢氧化钠淋洗液在经过抑制器后，其中的钠离子被交换到废液中，进入质谱的流动相为纯水，与质谱具有很好的兼容性，同时质谱相比其他检测手段具有优异的灵敏度和重现性，定性能力强，因此离子色谱质谱联用技术具有很好的应用前景，已较多的应用于食品安全、环境、生物工程、代谢组学等领域，主要用于分析强极性农兽残、阴阳离子、有机酸、寡糖等。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
S C I E N T I F I C