

• 研究论文 •

反射模式与线性模式 MALDI-TOF MS 联合分析荔枝果核缩合单宁

周海超* 林益明* 柴纬明 魏淑东 廖蒙蒙

(滨海湿地生态系统教育部重点实验室 厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要 利用不同模式的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析荔枝果核缩合单宁. 在反射模式(Reflectron modes)下, 加速电压 20.0 kV, 反射电压 23.0 kV, 延时取出电压 16.32 kV, 聚焦电压 9.45 kV, 获得缩合单宁的准确结构单元组成和连接方式信息, 其为三聚体至十八聚体组成的 A 型原花青定多聚物. 在线性模式(Linear modes)下, 加速电压 20.0 kV, 延时取出电压 16.25 kV, 聚焦电压 10.0 kV, 检测到十九聚体至二十七聚体的缩合单宁信号, 其更全面获取缩合单宁聚合度的分布信息. 综合两种模式, 荔枝果核缩合单宁是由三聚体至二十七聚体分布的 A 型原花青定多聚物. 探讨了一种联合反射模式与线性模式对植物单宁结构准确分析的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱方法.

关键词 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 反射模式; 线性模式; 荔枝果核; 缩合单宁

Characterization of Condensed Tannins from Litchi Seed by Reflectron Modes and Linear Modes of MALDI-TOF MS

Zhou, Haichao* Lin, Yiming* Chai, Weiming Wei, Shudong Liao, Mengmeng

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Condensed tannins from litchi seed were analyzed using reflectron modes and linear modes of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The reflectron modes (accelerating voltage, 20.0 kV; reflectron voltage, 23.0 kV; delayed extraction voltage, 16.32 kV; lens voltage, 9.45 kV) spectra obtained clear information on basic unit, interflavan linkage and polymerization degree extended from 3-mers to 18-mers. The linear modes (accelerating voltage, 20.0 kV; delayed extraction voltage, 16.25 kV; lens voltage, 10.0 kV) spectra further expanded the detectable polymers up to 27-mers. Litchi seed condensed tannins were A-type procyanidins polymer with as high as 27-mers. In the present study, reflectron modes coupled with linear modes was discussed as a potential method of MALDI-TOF MS in characterization of condensed tannins.

Keywords matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; reflectron mode; linear mode; litchi seed; condensed tannins

缩合单宁(Condensed tannins), 也叫原花色素(Proanthocyanidins), 普遍存在于植物的根、茎、叶、花、果实和树皮中, 主要是由黄烷-3-醇结构单元缩合而成的多酚类化合物^[1~3]. 按结构单元的不同, 缩合单宁主要可以分为表/儿茶素(C/EC)构成的原花青定

(Procyanidins)、表/棓儿茶素(GC/EGC)构成的原翠雀定(Prodelphinidins)和表/阿福豆素(AC/EAC)构成的原天竺葵定(Propelargonidins)^[1,2]. 按连接方式的不同, 有由 C—C 和 C—O—C 两类键相连构成的双链型 A 型原花色素和由 C₄—C₈ 或 C₄—C₆ 连接构成的单链型 B 型原花

* E-mail: zhouhc2010@yahoo.com.cn

Received April 17, 2011; revised July 31, 2011; accepted October 11, 2011.

教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07-0725)和国家自然科学基金(No. 31070522)资助项目.

色素^[1]. 依据聚合度大小可分为单体(Monomeric)、低聚(Oligomeric)和高聚(Polymeric)原花色素^[4]. 因此, 不同的结构单元、连接方式和聚合度的异质性是缩合单宁结构多样性的化学基础. 近年来, 不断有关于植物缩合单宁原花色素生理学和药理学活性的研究报道^[5-7]. 同时, 植物缩合单宁的生态功能引起了不少研究者的关注^[8,9]. 鉴于结构的复杂多样性, 对其结构进行准确地分析成为研究缩合单宁生理活性和生态功能的先决条件.

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是 20 世纪 80 年代末发展起来的一种重要的软离子化质谱技术, 被广泛地应用到生物和材料相关领域的研究中^[5,10,11]. 自 1997 年 Ohnishi-Kameyama 等^[12]将 MALDI-TOF MS 应用于研究植物单宁以来, MALDI-TOF MS 被证实了是一种较为理想的分析多分散植物单宁聚合物的质谱技术^[13-15]. 在近十几年的研究中, 反射模式(Reflectron modes)与线性模式(Linear modes)都被广泛应用于植物缩合单宁的分析^[12-16]. 在 2010 年 Monagas 等^[5]对花生种皮原花色素的研究中, 首次提到这两种模式在分析缩合单宁的优缺点. 这显示出探讨将两种模式结合的 MALDI-TOF 质谱分析方法在植物缩合单宁的研究中具有潜在的应用价值.

荔枝果实含有丰富的缩合单宁. Roux 等^[17]最早报道了荔枝(*Litchi chinensis* cv. Kwai Mi)果皮含有高达 22 聚体的 A 型原花色素. 但是, 由于 Roux 等^[17]是利用 ESI 质谱进行分析, 原花色素, 特别是高聚原花色素在 ESI 过程中发生多重离子化, 且产生大量的碎片峰, 这使得获得的 ESI 质谱图极为复杂, 难以正确获得准确的结构信息. 因此, 本研究以荔枝(*Litchi chinensis* cv. Lanzhu)果核缩合单宁为研究对象, 分析其在反射模式和线性模式下的 MALDI-TOF 图谱特征, 探讨联合此两种模式对植物缩合单宁进行“全面”准确分析的 MALDI-TOF 质谱方法.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及样品

Bruker Reflex III 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国, Bruker 公司); SHZ-IIIIB 循环水真空泵(上海, 上海仪表供销公司); SENCO 旋转蒸发器(上海, 上海申科科技有限公司); DS-1 高速组织捣碎机(上海, 上海标本模型厂); FD-1 冷冻干燥机(北京, 北京德天佑科技发展有限公司). Amberlite IRP-64 离子交换树脂、氯化钠(纯度 99.999%)和 2,5-二羟基苯甲酸(美国, Sigma 公司); 样品纯化所用色谱填料是 Sephadex LH-20(美国, Amersham 公司); 实验所用丙酮、甲醇、正己烷和乙酸

乙酯均为分析纯(上海, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水均为二次去离子水. 兰竹荔枝(*Litchi chinensis* cv. Lanzhu)果核.

1.2 样品处理

兰竹荔枝, 2010 年 7 月份购买于厦门大学附近水果市场, 果实去掉果壳与果肉后, 果核用蒸馏水清洗后置于组织捣碎机中用 70%丙酮溶液捣碎搅拌提取, 并过滤. 提取液在 40 °C 水浴下旋转减压蒸发除去丙酮. 含有缩合单宁的水相先后用正己烷、乙酸乙酯萃取去除脂类物质及小分子酚类后, 将水相冻干获得荔枝果核缩合单宁粗提物. 粗提物用少量 50%甲醇溶液溶解后上 Sephadex LH-20 凝胶柱纯化得到荔枝果核缩合单宁纯化物^[13]. 纯化得到的样品冻干后进行不同模式的 MALDI-TOF 质谱分析.

1.3 样品分析

荔枝果核缩合单宁纯化样品前处理参考文献[11], 并略有改变: 2,5-二羟基苯甲酸为基质(30%丙酮溶液, 10 mg/mL); 兰竹荔枝果核缩合单宁纯化物待测样(30%丙酮溶液, 10 mg/mL); 基质和样品均用 Amberlite IRP-64 离子交换树脂进行去离子处理 3 次. 去离子后的样品溶液与氯化钠(水溶液, 2.0 mg/mL)以 1:1 (V/V, 体积比)充分混合, 混合液随后立即与去离子后的基质溶液以 1:3 (V/V, 体积比)的比例充分混合, 并取 1.5 μ L 在靶上点样. 室温条件下挥发干溶剂进行 MALDI-TOF 质谱分析.

MALDI-TOF 质谱仪器参数如下: (1)在反射模式下, 氮激光波长 337 nm, 激光脉冲宽度 3 ns, 加速电压 20.0 kV, 反射电压 23.0 kV, 延时取出电压 16.32 kV, 聚焦电压 9.45 kV; (2)在线性模式下, 氮激光波长 337 nm, 激光脉冲宽度 3 ns, 加速电压 20.0 kV, 延时取出电压 16.25 kV, 聚焦电压 10.0 kV. 外标均为 Angiotensin II (1046.5 Da), Bombesin (1619.8 Da), ACTHclip18~39 (2465.2 Da)和 Somatostatin 28 (3147.47 Da).

2 结果与讨论

荔枝果核缩合单宁在去离子处理后, 引入 Na^+ 作为阳离子化试剂, 采用不同模式 MALDI-TOF MS 进行分析, 得到清晰的反射模式图谱(图 1)和线性模式图谱(图 2). 对比分析两者及各自放大的四聚体图谱(图 3), 可以得到如下结论.

2.1 反射模式的 MALDI-TOF 质谱分析

解析反射模式图谱(图 1), 并参考文献[18, 19], 建立方程式: $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 2 + 288a + 304b + 272c - 2d + 23$,

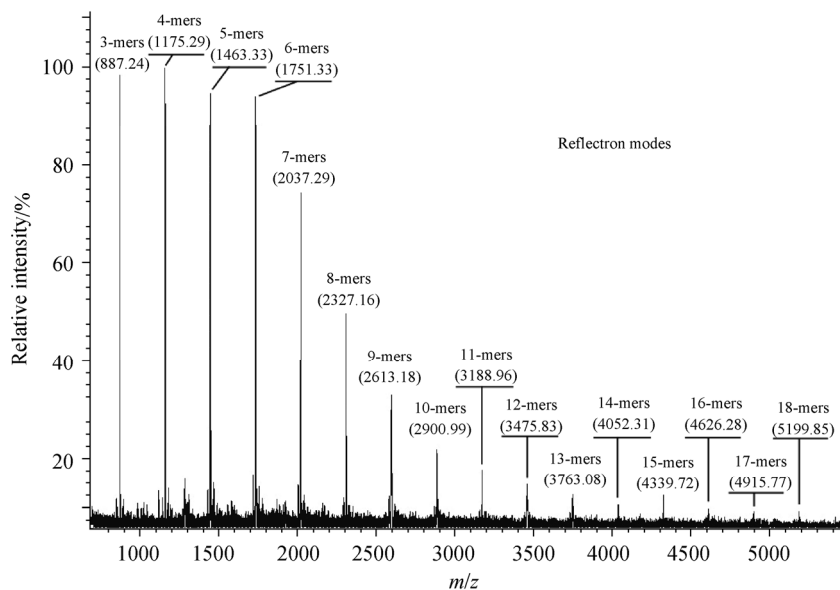


图1 反射模式下荔枝果核缩合单宁质谱图($[M+Na]^+$)

Figure 1 MALDI-TOF spectra ($[M+Na]^+$) of condensed tannins from litchi seed in reflectron modes

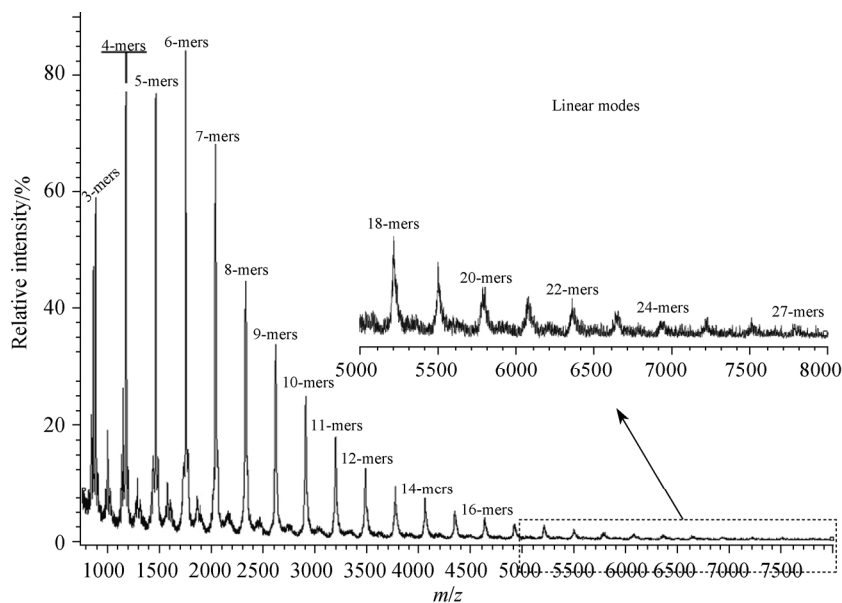


图2 线性模式下荔枝果核缩合单宁质谱图($[M+Na]^+$)

Figure 2 MALDI-TOF spectra ($[M+Na]^+$) of condensed tannins from litchi seed in linear modes

其中, m/z 2 是两个末端 H, a~d 分别代表 C/EC(m/z 288), GC/EGC(m/z 304), AC/EAC(m/z 272)和 A 型连接在聚合物分子中的个数, m/z 23 是 Na^+ 的相对原子质量. 将本实验测得数据与由公式推导的理论数据比较发现, 两者基本吻合. 其中, 相差 1~2 Da 是由同位素造成的(表 1). 因此, 从反射模式质谱图推断得到兰竹荔枝果核缩合单宁是从三聚体(m/z 887.24)到十八聚体(m/z 5199.85)分布的多聚物, 主要离子峰为三至七聚体, 每一聚体内的聚合物都存在由于结构单元的不同或结构单元间连接方

式不同而产生的差异, 其中最强的离子峰序列固定地相差 288 Da, 说明兰竹荔枝果核缩合单宁的主要结构单元为 C/EC, 即原花青定(Procyanidin). 另外, 从放大的四聚体图(图 3a)分别观测到, 比最高离子峰(m/z 1175.29)少 16 Da 的离子峰 m/z 1159.29 和多 16 Da 的离子峰 m/z 1191.34, 这说明了组成兰竹荔枝果核缩合单宁的结构单元还有 AC/EAC 和 GC/EGC, 但其离子峰较弱, 在聚合物中所占比例较小. 同时, 图 1 和表 1 中未观测到与最高离子峰相差 152 Da (一个倍酰基的分子量)和 162

表 1 反射模式下基质辅助激光解吸附飞行时间质谱分析兰竹荔枝果核缩合单宁的结构组成

Table 1 The composition of condensed tannins from litchi (*Litchi chinensis* cv. Lanzhu) seed was analyzed by MALDI-TOF MS in reflectron modes

Polymerization degree	Calculated mass	Observed mass	Composition of condensed tannins
3-mers	871	871.22	2 (C/EC)+1 (AC/EAC)+1 (A-type linkage)
	887	887.24	3 (C/EC)+1 (A-type linkage)
4-mers	1159	1159.29	3 (C/EC)+1 (AC/EAC)+1 (A-type linkage)
	1173	1173.29	4 (C/EC)+2 (A-type linkage)
	1175	1175.29	4 (C/EC)+1 (A-type linkage)
	1191	1191.34	3 (C/EC)+1 (GC/EGC)+1 (A-type linkage)
5-mers	1447	1447.35	4(C/EC)+1 (AC/EAC)+1 (A-type linkage)
	1461	1461.34	5 (C/EC)+2 (A-type linkage)
	1463	1463.33	5 (C/EC)+1 (A-type linkage)
	1479	1479.41	4 (C/EC)+1 (GC/EGC)+1 (A-type linkage)
6-mers	1735	1735.35	5 (C/EC)+1 (AC/EAC)+1 (A-type linkage)
	1751	1751.33	6 (C/EC)+1 (A-type linkage)
	1767	1767.51	5 (C/EC)+1 (GC/EGC)+1 (A-type linkage)
	1783	1783.55	4 (C/EC)+2 (GC/EGC)+1 (A-type linkage)
7-mers	2035	2035.28	7 (C/EC)+3 (A-type linkage)
	2037	2037.29	7 (C/EC)+2 (A-type linkage)
8-mers	2325	2323.15	8 (C/EC)+2 (A-type linkage)
	2327	2327.16	8 (C/EC)+1 (A-type linkage)
9-mers	2613	2613.18	9 (C/EC)+2 (A-type linkage)
10-mers	2899	2900.99	10 (C/EC)+3 (A-type linkage)
11-mers	3187	3188.96	11 (C/EC)+3 (A-type linkage)
12-mers	3475	3475.83	12 (C/EC)+3 (A-type linkage)
13-mers	3763	3763.08	13 (C/EC)+3 (A-type linkage)
14-mers	4051	4052.31	14 (C/EC)+3 (A-type linkage)
15-mers	4339	4339.72	15 (C/EC)+3 (A-type linkage)
16-mers	4625	4626.28	16 (C/EC)+4 (A-type linkage)
17-mers	4915	4915.77	17 (C/EC)+3 (A-type linkage)
18-mers	5199	5199.85	18 (C/EC)+5 (A-type linkage)

Da (一个葡萄糖糖基的分子量)的离子峰. 因此, 各结构单元并未发生酰基化和糖基化^[16,18].

植物缩合单宁结构单元间连接方式的不同是结构多样性的另一特征^[2]. A 型缩合单宁比 B 型缩合单宁的形成多消耗了 2 个 H, 当聚合度不变时, A 型连接聚合物的相对原子质量比 B 型连接聚合物小 $2n$ Da, 这表现在所观测到的一系列差值为 2 Da 的对应离子峰序列, 由图 3A 和表 1 可见, A 型连接键(A-type linkage)普遍存在于不同聚合物中, 且其数目随聚合度的增加而增加. 由已测定的分子量推断, 十八聚体具有不少于 5 个的 A 型连接键. 综合分析可得兰竹荔枝果核缩合单宁是由不同聚合度组成的 A 型原花青定多聚物.

2.2 线性模式的 MALDI-TOF 质谱分析

在比较反射模式图谱的基础上, 从线性模式图谱可清晰观测到反射模式下未能检测到的高聚体: 十九聚体至二十七聚体(图 2). 这说明线性模式在测定高聚体缩合单宁具有更高的灵敏性, 且能获得更完整的不同聚合度缩合单宁的分布信息. 在已报道的利用 MALDI-TOF 质谱分析植物缩合单宁的研究中, 除了文献[20]利用柱色谱分段处理后检测到大豆皮具有三十聚体的高聚原花色苷外, 大部分的植物缩合单宁聚合度都小于十五聚体^[16]. 本研究显示, 兰竹荔枝果核缩合单宁具有较高的聚合度.

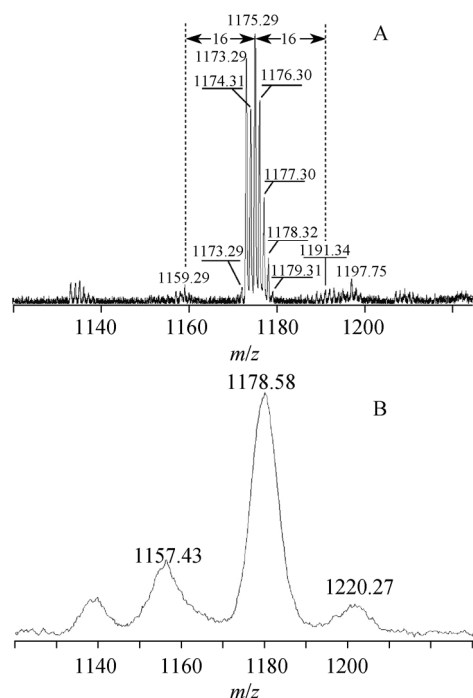


图3 反射模式(A)与线性模式(B)下荔枝果核四聚体缩合单宁质谱图($[M+Na]^+$)

Figure 3 MALDI-TOF spectra ($[M+Na]^+$) of 4-mers condensed tannins from litchi seed in reflectron (A) and linear (B) modes

2.3 反射模式与线性模式的比较及其在缩合单宁结构分析的应用

早期的 MALDI 技术使大量的基质和样品分子迅速解吸, 速度、能量都比较分散, 从而降低了质谱分辨率^[16]. 随后采用的脉冲激光、离子镜、反射模式、延迟取出及聚焦技术都显著地提高了分辨率^[16,21]. 本研究在改进后的 MALDI-TOF 质谱技术基础上, 比较分析了反射模式和线性模式下缩合单宁质谱图的特征.

在反射模式下, 样品分子离子在加速电压的作用下, 飞行至管道末端再受到反射电压的作用进入反射场. 在进入反射场前, 即在飞行管道末端的延迟电场补偿了分子离子的初始空间和能量分布^[5], 待离子达到零动能状态后, 再次受到反方向电压的作用运动至反射检测器, 其飞行距离比线性模式长. 由此, 反射模式提高了质谱分辨率, 特别是分子量在 4000 Da 以下的聚合物^[5]. 这一结果与我们利用反射模式得到的荔枝果核缩合单宁质谱特征吻合(图 1). 然而, 十九至二十七聚体的聚合物仅在线性模式下观测得到(图 2), 这可能是由于高聚物在反射模式中更易于发生裂解或形成并丢失中性小分子化合物(如: NH_3 , H_2O , CO_2)^[22,23], 相反地, 线性模式下, 离子未经过反射作用及较短的飞行距离可能更好地“保护”大分子的高聚物, 但其形成的分子离子峰较宽, 分辨率较低, 无法分辨同位素峰, 甚至分子量相

差 2 Da 的 A 型连接键信号(图 3).

3 结论

综上所述, 利用不同模式的 MALDI-TOF 质谱分析荔枝果核缩合单宁结构信息, 具有反射模式分辨率高而线性模式灵敏度高的特点. 这一结果与利用 MALDI-TOF 质谱分析其他聚合物得到的结果相似. 因此, 我们提出联合两种测定模式能为“全面”快速地分析植物缩合单宁结构信息提供一个简便、准确的方法. 在同一次样品前处理下, 先采用反射模式获取缩合单宁结构单元、连接方式及取代基等相关信息. 然后, 将质谱仪器参数调至线性模式, 补充采集线性模式下缩合单宁不同聚合度聚合物的分布信息, 特别是高聚体缩合单宁的分布信息. 这一方法特别适合应用于待测样品量大, 重复数多的植物生态学研究.

References

- Sun, D.-W. *Vegetable Tannins*, Chinese Forestry Press, Beijing, 1992, pp. 3~133 (in Chinese). (孙达旺, 植物单宁化学, 中国林业出版社, 北京, 1992, pp. 3~133.)
- Shi, B.; Di, Y. *Plant Polyphenols*, Science Press, Beijing, 2000, pp. 5~17 (in Chinese). (石碧, 狄莹, 植物多酚, 科学出版社, 北京, 2000, pp. 5~17.)
- Song, L.-J.; Di, Y.; Shi, B. *Prog. Chem.* 2000, 12, 16 (in Chinese). (宋立江, 狄莹, 石碧, 化学进展, 2000, 12, 16.)
- Gu, L. W.; Kelm, M.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Cunningham, D.; Vannozzi, S.; Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4852.
- Monagas, M.; Quintanilla-López, J. E.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Lebrón-Aguilar, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 51, 358.
- Serrano, J.; Puupponen-Pimia, R.; Dauer, A.; Aura, A. M.; Saura-Calixto, F. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, S310.
- Dixon, R. A.; Xie, D. Y.; Sharma, S. B. *New Phytol.* 2005, 165, 9.
- Lin, Y. M.; Liu, X. W.; Zhang, H.; Fan, H. Q.; Lin, G. H. *Plant Soil* 2010, 326, 469.
- Coulis, M.; Hattenschwiler, S.; Rapior, S.; Coq, S. *Soil Biol. Biochem.* 2009, 41, 2573.
- Zhou, Y.; Song, F.-R.; Liu, S.-Y.; Li, X.-G. *Acta Chim. Sinica* 1998, 56, 298 (in Chinese). (周雨, 宋凤瑞, 刘淑莹, 李向高, 化学学报, 1998, 56, 298.)
- Xiong, S.-X.; Xin, B.; Wang, G.-H.; Liu, G.-Y. *Acta Chim. Sinica* 2000, 58, 700 (in Chinese). (熊少祥, 辛斌, 王光辉, 刘国詮, 化学学报, 2000, 58,

- 700.)
- 12 Ohnishi-kameyama, M.; Yanagida, A.; Kanda, T.; Nagata, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 31.
- 13 Xiang, P.; Lin, Y.-M.; Lin, P.; Xiang, C. *Chin. J. Anal. Chem.* **2006**, *34*, 1019.
- 14 Zhou, H.-C.; Wei, S.-D.; Li, M.; Lin, Y.-M. *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38*, 1492 (in Chinese).
(周海超, 魏淑东, 李敏, 林益明, 分析化学, **2010**, *38*, 1492.)
- 15 Li, C. M.; Leverage, R.; Trombley, J. D.; Xu, S. F.; Yang, J.; Tian, Y.; Reed, J. D.; Hagerman, A. E. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9033.
- 16 Krueger, C. G.; Dopke, N.; Treichel, P.; Folts, J.; Reed, J. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1663.
- 17 Roux, E. L.; Doco, T.; Sarni-Manchado, P.; Lozano, Y.; Cheynier, V. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1251.
- 18 Krueger, C. G.; Vestling, M. M.; Reed, J. D. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(3), 538.
- 19 Yang, Y.; Chien, M. J. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(9), 3990.
- 20 Takahata, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Furuta, S.; Takahashi, M.; Suda, I. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5843.
- 21 Xu, Y.-W.; Lu, H.-J.; Yang, P.-Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 455 (in Chinese).
(许亚伟, 陆豪杰, 杨芑原, 分析化学, **2007**, *35*, 455.)
- 22 Behrens, A.; Maie, N.; Knicker, H.; Kögel-Knabner, I. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1159.
- 23 Wang, B. H.; Dreisewerd, K.; Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 393.

(A1104171 Cheng, F.)