

基于高分辨质谱技术的黄芪多糖 APS-II 酶解活性寡糖特征分支位点的研究

刘宇冲^{1,2,3}, 李虎峰^{1,2,3}, 李科^{1,2,3,4*}, 秦雪梅^{1,2,3}, 杜昱光⁴, 李震宇^{1,2,3}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学, 生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西太原 030006; 3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西太原 030006; 4. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘要: 黄芪多糖是黄芪中免疫调节活性最强, 含量最为丰富的物质, 具有抗肿瘤、抗病毒、免疫促进等多种生物活性, 临床应用广泛。前期研究发现黄芪多糖主要由 2 种不同相对分子质量多糖 APS-I (>2 000 kDa)、APS-II (10 kDa) 组成, APS-II (10 kDa) 为黄芪多糖中活性最强组分, 并采用 α -1,4-葡聚糖内切酶将 APS-II 降解为寡糖, 通过体外免疫活性筛选发现 2~9 糖整体免疫活性较低, 而 10~14 糖具有较强的免疫活性, 且活性优于未降解的 APS-II。为了探究 APS-II 降解寡糖发挥免疫活性的关键结构, 本文采用 MALDI-TOF-MS 生物质谱以及高分辨质谱仪器 ESI-Q Exactive-MS 对 APS 酶解寡糖进行解析, 通过对比发现 10~14 糖中存在 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的支链结构, 推测 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的支链结构为 APS-II 发挥免疫活性的关键结构, 为黄芪多糖和寡糖的构效关系研究奠定理论基础。

关键词: APS-II; 酶解; 连接方式; 结构解析; 高分辨质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2108-09

Study on the characteristic branch sites of oligosaccharides of *Astragalus* polysaccharide APS-II enzymolysis based on high resolution mass spectrometry

LIU Yu-chong^{1,2,3}, LI Hu-feng^{1,2,3}, LI Ke^{1,2,3,4*}, QIN Xue-mei^{1,2,3}, DU Yu-guang⁴, LI Zhen-yu^{1,2,3}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China; 4. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: *Astragalus* polysaccharides are the most immunoregulatory active and abundant substances in *Astragalus*, with anti-tumor, anti-viral, and immune-promoting biological activities. They have been widely used in clinical practice. Previous studies have found that *Astragalus* polysaccharides are mainly composed of two different polysaccharides, APS-I (>2 000 kDa) and APS-II (10 kDa), with APS-II (10 kDa) being the most active component of *Astragalus* polysaccharides. We used α -1,4-glucan endo-hydrolysis enzyme to degrade APS-II into oligosaccharides, and screened the immune activity of oligosaccharides *in vitro*. We found that the overall immune

收稿日期: 2023-12-11; 修回日期: 2024-05-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 国家博士后科学基金资助项目 (2019M650851); 国家重点研发计划 (2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省科技创新人才团队专项基金.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7019297, E-mail: like@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1379

activity of 2–9 oligosaccharides was low, while the immune activity of 10–14 oligosaccharides was strong, and the activity was better than that of untreated APS-II. To investigate the key structural features of APS-II oligosaccharides that play a role in immune activity, we used MALDI-TOF-MS biochemical mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry instrument ESI-Q Exactive-MS to analyze the APS enzymatic oligosaccharides. By comparing, we found that 10–14 oligosaccharides contain 1→4 and 1→6 branched structures with coexisting linkages, suggesting that 1→4 and 1→6 linkages in branched structures are key structural features that play a role in the immune activity of APS-II, laying a theoretical foundation for the structure-activity relationship of *Astragalus* polysaccharides and oligosaccharides.

Key words: APS-II; enzymolysis; connection mode; structural analysis; high resolution mass spectrometry

黄芪多糖是黄芪中免疫调节活性最强, 含量最为丰富的物质, 具有抗肿瘤、抗病毒、免疫促进等多种生物活性, 临床应用广泛^[1-3]。本文前期研究中通过 TSK 凝胶色谱分离法进行不同相对分子质量黄芪多糖糖谱表征, 结果表明黄芪多糖主要由 2 种不同相对分子质量多糖 APS-I (>2 000 kDa)、APS-II (10 kDa) 组成, 同时基于相对分子质量分布对 APS-I 和 APS-II 进行体内和体外免疫活性筛选, 发现黄芪多糖中活性最强组分为 APS-II^[4,5]。通过直接对活性多糖 APS-II 进行单糖组成分析和 GC-MS 单糖连接位点分析得出, APS-II 主链基本由 α -D-1,4-葡聚糖组成^[5,6], 但由于多糖相对分子质量大, 具体结构研究困难, 因此本文效仿蛋白质结构的研究方式, 采用自下而上的方法, 将多糖降解为寡糖, 并对其进行分析。

化学降解法和酶降解法为降解多糖的常用方法, 相较于化学降解, 酶解法可以对特定糖苷键进行切除, 而且反应易于控制, 酶解过程条件温和, 且无副产物生成, 更有利于寡糖的结构研究^[7-10]。因此前期采用 α -1,4-葡聚糖内切酶将 APS-II 降解为寡糖, 分别为 2~9 糖组分和 10~14 糖组分, 体外免疫活性筛选发现 2~9 糖组分整体免疫活性较低, 而 10~14 糖组分具有较强的免疫活性, 且活性优于 APS-II^[11]。诸多研究表明, 寡糖活性的高低与其结构特征直接相关, 因此揭示 10~14 糖组分与 2~9 糖组分结构差异对于阐明黄芪多糖药效物质基础具有重要意义。

生物质谱法主要用于生物大分子的质谱解析, 可以对混合物进行直接分析。通常只产生分子离子, 与质量一一对应。能够用于直接反映寡糖片段信息, 具有直观性好、准确度高且不需要对照品等优点^[12]。本文前期采用 UPLC-Q-TOF 负离子模式对 APS-II 酶解寡糖进行分析, 得出 2~6 糖均为 α -1,4 连接的线性葡聚糖, 但具有其他连接方式的糖链未能表征^[13], 同时由于 Q-TOF-MS 仪器质量采集范围的限制导致 10 糖以上结构未进行解析, 分支结构不明确, 缺少相关糖链序列结构信息。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 具有分辨率高、灵敏度高、分析速度快、相对分子质量测量范围大等优势, 广泛应用于多糖结构分析。而 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱可对大相对分子质量多糖样品进行定量分析, 同时提供精确的分子质量和结构信息, 具有高通量、高灵敏度和低检出限等优点。通过将 MALDI-TOF-MS 与 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱结合对寡糖进行分析, 可获得更为精确的寡糖结构信息。

基于此, 为了更好地阐明黄芪多糖免疫促进活性的构效关系, 获取更为丰富精确的黄芪寡糖结构信息, 本文采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对 APS-II 酶解寡糖进行分析, 同时结合 ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱对 APS-II 酶解寡糖进行结构解析。本文首次对 APS-II 酶解寡糖中 10 糖以上 (10~14) 糖链进行高分辨质谱分析, 并通过对比其与 2~9 糖的结构, 进一步阐明黄芪多糖发挥免疫活性的关键结构, 以为黄芪多糖和寡糖的构效关系研究提供思路, 为黄芪酶解寡糖的开发利用和黄芪多糖的质量控制研究提供依据。

材料与方法

仪器 ZX-LGJ-18 普通型冷冻干燥机 (上海知信实验仪器技术有限公司); SC-3610 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); CPA225D 分析天平 (德国 Sartorius 公司); RE-52 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪和 Q-Exactive-Orbitrap 四极杆轨道阱质谱仪 (美国 Thermo 公司); 基质辅助解析质谱仪 MALDI-TOF-MS (德国 Bruker 公司); Milli-Q Gradient A 10 超纯水仪 (密理博上海贸易有限公司); GS-NF500 型膜片式切向流膜分离系统 (海颐信生物科技有限公司)。

材料与试剂 仿野生黄芪 (2019 年 5 月于山西浑源产地采集, 山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*)

var. *mongholicus*); 色谱级乙腈、质谱级甲酸、甲醇、乙腈 (美国 Thermo 公司)。

APS-II 分离制备 依据参考文献^[11]方法, 将粉碎后的干燥黄芪后过 100 目筛。称取黄芪细粉大约 15 g, 以 1:20 的料液比加入去离子水后, 搅拌均匀, 在 90 °C 下进行水浴提取 4 h, 提取过程中每 1 h 搅拌 1 次。提取结束后对提取液进行真空抽滤, 并对滤液进行合并。滤液加入 200 U 木瓜蛋白酶, 搅拌均匀, 在 45 °C 下水浴 6 h, 加热到 90 °C 对其进行高温灭活 5 min, 以 3 500 r·min⁻¹ 转速离心 5 min。取 100 mL 上清液加入 10% 三氯乙酸水溶液至总体积为 200 mL, 冰浴 15 min 后静置 30 min 进行离心, 再取 100 mL 上清液, 加入 900 mL 无水乙醇, 静置过夜。收集醇沉液沉淀进行冷冻干燥, 即得黄芪多糖 APS。将 APS 配制成质量浓度为 5 g·L⁻¹ 溶液, 通过分子截留量为 10 kDa 的超滤膜得到 APS-II 溶液, 冷冻干燥, 即得 APS-II。

酶解寡糖的制备 依据文献^[4]中酶解方法, 采用内切 α -1,4-葡聚糖糖苷水解酶按照酶浓度为 0.5 U·mL⁻¹、酶解温度为 60 °C, 酶解时间 90 min 的条件对冷冻干燥后的 APS-II 进行酶解。将 2 mL APS 溶液与 2 mL α -1,4-葡聚糖糖苷水解酶进行混合, 并在 60 °C 水浴条件下降解 90 min。酶解后, 进行沸水浴 10 min, 使酶溶液失活。将溶液进行离心, 并收集上清液, 冷冻干燥, 即得黄芪寡糖 APOS。取黄芪寡糖 APOS 适量, 用去离子水配制成质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ 溶液备用。

MALDI-TOF-MS 分析 取样品溶液 1 mL 加入等体积的甲醇溶液充分混匀, 取 2 μ L 溶液点样于 MTP Anchorchip 384 点的靶板上, 真空抽干。再加 1 μ L 20 g·L⁻¹ 的 DHB 溶液至样品点上, 真空抽干。一级质谱方法参数如下。离子源 1: 7.5 kV; 离子源 2: 6.75 kV; 反射电压 1: 29.5 kV; 反射电压 2: 13.95 kV。激发光源为 N₂ 激光 (337 nm), 分子质量检测范围为 500~3 500。

ESI-Q Exactive-MS 正离子模式下 APS-II 酶解寡糖 2~9 结构表征 UPLC-ESI-Q Exactive-MS 分析色谱柱: Acquity UPLC BEH Amide (10 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈; 洗脱程序为 0~2 min (68%~65% B), 2~14 min (65%~55% B), 14~20 min (55%~53% B), 20~23 min (53% B), 24~25 min (53%~68% B), 25~29 min (68% B); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 样品室温度 4 °C; 进样量 2 μ L。质谱离子源: 采用电喷雾电离源, 正、负离子模式扫描; 鞘气: 241 kPa; 辅助气: 3.3 L·min⁻¹; 吹扫气: 1 L·min⁻¹; 离子源毛细管温度: 325 °C; 毛细管电压: -2 500 V; 全扫描模式的质量范围: m/z 200~3 500。

ESI-Q Exactive-MS 正离子模式下 APS-II 酶解寡糖 10~14 糖结构表征 UPLC-ESI-Q Exactive-MS 分析色谱柱: Acquity UPLC BEH Amide (10 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈; 洗脱程序为 0~2 min (68%~65% B), 2~14 min (65%~55% B), 14~20 min (55%~53% B), 20~23 min (53% B), 24~25 min (53%~68% B), 25~29 min (68% B); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 样品室温度 4 °C; 进样量 2 μ L。质谱离子源: 电喷雾电离源, 正、负离子模式扫描; 鞘气: 241 kPa; 辅助气: 3.3 L·min⁻¹; 吹扫气: 1 L·min⁻¹; 离子源毛细管温度: 325 °C; 毛细管电压: -2 500 V; 全扫描模式的质量范围: m/z 200~3 500。

结果与讨论

1 APS-II 的酶解及其 MALDI-TOF-MS 表征

MALDI-TOF-MS 具有分辨率高、灵敏度高、相对分子质量测量范围大等优势, 而且所产生的质谱图多为单电荷离子碎片, 质谱图中的离子与寡糖的质量有一一对应关系, 可直接反映寡糖相对分子质量。而 ESI-Q Exactive-MS 产生的图谱虽然可获得精确的分子质量和结构信息, 但容易产生多电荷离子, 对解析造成干扰, 因此先采用 MALDI-TOF-MS 对寡糖进行表征, 根据其表征结果对 ESI-Q Exactive-MS 图谱进行快速准确地分析。

APS-II 酶解寡糖 MALDI-TOF-MS 结果如图 1 (DP3 为聚合度为 3 的寡糖, DP4 为聚合度为 4 的寡糖, 以此类推至 DP18), 通过分析可得出, MALDI-TOF-MS 对酶解寡糖表征后主要产生 a、b、c、d、e 共 5 种类型离子。

其中 a 型离子为 $[M+Na]^+$ 分子离子, 相对分子质量分别为 365.204 2、527.226 6、689.251 2、851.290 2、1 013.326 1、1 175.361 9、1 337.397 8、1 499.430 2、1 661.469 8、1 823.512 5、1 985.556 3、2 147.587 8、2 309.608 4、2 471.653 0、2 633.691 2、2 796.788 0、2 957.740 8。通过相对分子质量对比, 可以看出 a 型分子主要为离子相对分子质量相差 162 的一系列离子, 基于此可判断 a 型分子其相差单糖种类为己糖 (Hex), 并反映出 APS-II 酶解寡糖链主要为己糖链 (Hex_n), 且最大聚合度糖链可以达到 18 糖及以上。而 b 型离子主要为 $[M+K]^+$ 的己糖链分子离子, c 型离子为 $[M+Na]^+$ Hex_n 失去一分子水后产生的离子 (Hex_n-18)。d 型离子为 947.226 1 (unknown) + Hex_n 产生的分子离子, 其相对分子质量分别为 947.216 1、1 109.209 4、1 271.308 9、1 433.346 7、1 595.409 2、1 757.429 5、1 919.488 6 等, 通过相对分子质量对比, d 型离子相对分子质量也相差 162, 但 947.216 2 却不属于己糖链相对分子质量系

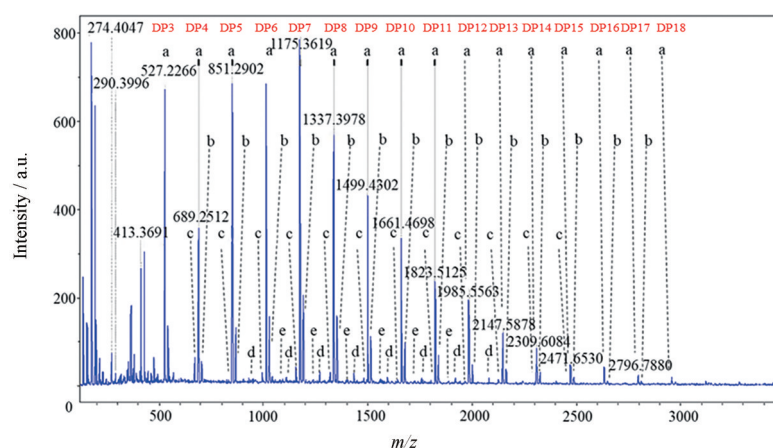


Figure 1 MALDI-TOF-MS diagram of APS-II enzymatic oligosaccharide. APS: *Astragalus* polysaccharide

列,因此 APS-II酶解产生了非己糖链的寡糖结构。e型离子与d型离子相似为 $1\ 079.721\ 3\ (\text{unknown}) + \text{Hex}_n$ 由非己糖链+己糖链结构构成。相对分子质量为 $1\ 079.721\ 3$ 、 $1\ 241.301\ 8$ 、 $1\ 403.356\ 2$ 、 $1\ 565.334\ 4$ 等相差 162 的分子离子。通过分析发现, e型离子与d型离子相差了 132 的相对分子质量, 而该相对分子质量为戊糖形成糖苷键脱水后的相对分子质量, 因此可推测 e型系列糖链中存在戊糖。

2 ESI-Q Exactive-MS 正离子模式下 APS-II酶解寡糖 2~9 结构表征

ESI-Q Exactive-MS 高分辨质谱可对大相对分子质量多糖样品进行定量分析, 同时提供精确的相对分子质量和结构信息, 具有高通量、高灵敏度和低检出限等优点。根据上述 APS-II酶解寡糖 MALDI-TOF-MS 表征结果, 获得寡糖相对分子质量信息, 通过 ESI-Q Exactive-MS 对 a 型离子中 2~9 进行结构表征, 总离子流如图 2, 2~9 糖二级碎片信息见表 1。

2 糖分子离子峰为 $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 型, m/z 为 365.105 7, 主要断裂方式为糖苷键断裂, 并产生 C 型 203.053 4 碎片离子, 同时分子离子脱水会形成 347.095 4 碎片离

子, 除此之外还会发生 $^{0.2}\text{A}_2$ 跨环断裂形成 305.083 8 碎片离子, 主要产生质量数为 60 的中性丢失, 根据 1→4 连接葡聚糖裂解规律研究和参考文献^[14], 该 2 糖符合 1→4 连接的跨环裂解规律, 推测 2 糖为麦芽糖。

3 糖主要断裂形式为糖苷键断裂, 并产生 C 型 203.053 3、365.106 2 碎片离子和 B 型 185.040 6、347.095 1 碎片离子, 除此之外还发生 $^{0.2}\text{A}_2$ 跨环断裂形成 467.140 2 碎片离子, 符合 1→4 连接的跨环裂解规律。推测该 3 糖为麦芽三糖。

4 糖主要发生糖苷键断裂, 并产生 C 型 203.053 2、365.106 0、527.160 1 碎片离子和 B 型 347.053 2、509.150 5 碎片离子, 此外发生 $^{0.2}\text{A}_3$ 跨环断裂形成 467.135 7 碎片离子, 符合 1→4 连接的跨环裂解规律。推测该 4 糖为麦芽四糖。

5 糖主要发生糖苷键断裂, 并产生 C 型 365.105 7、527.158 1、689.211 9 碎片离子和 B 型 347.094 5、509.148 2、671.202 5 碎片离子, 除此之外发生 $^{0.2}\text{A}_3$ 跨环断裂形成 467.137 4 碎片离子, 发生 $^{0.2}\text{A}_2$ 跨环断裂 (305) 后结合一分子水形成 323.433 1 碎片离子, 符合 1→4 连接的跨环裂解规律。推测该 5 糖为麦芽五糖。

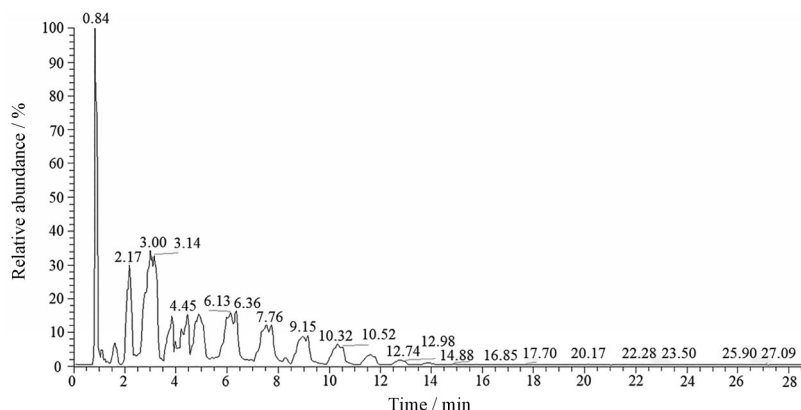


Figure 2 APS-II enzymatic oligosaccharide ESI-Q Exactive-MS positive ion mode total ion current

Table 1 Fragment information of 2–9 sugars in APS-II enzymatic hydrolysis by MS/MS. DP: Degree of polymerization

DP	t_R /min	Molecular formula	Theoretical value of relative molecular mass	Fragment ions/ m/z (M+Na ⁺)
2	2.17	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.296 5	203.053 4, 219.059 1, 269.657 9, 305.083 8, 347.095 4, 365.105 7
3	3.04	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.437 1	185.040 6, 203.053 3, 347.095 1, 365.106 2, 425.203 7, 467.140 2, 527.158 9
4	3.87	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666.577 7	185.042 8, 203.053 2, 268.599 6, 347.053 2, 365.106 0, 467.135 7, 509.150 5, 527.160 1, 689.212 2
5	4.90	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	828.718 3	185.042 8, 229.494 2, 268.599 6, 323.433 1, 347.094 5, 365.105 7, 467.137 4, 509.148 2, 527.158 1, 671.202 5, 689.211 9, 851.264 1
6	6.25	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁	990.858 9	185.043 2, 203.053 7, 263.064 4, 325.113 2, 347.095 3, 365.105 1, 467.141 7, 483.514 1, 509.148 2, 527.158 5, 671.201 9, 689.210 6, 791.246 3, 833.256 1, 851.265 3, 839.280 1, 953.312 5, 1 013.317 2
7	7.88	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₆	1 152.999 5	185.028 6, 203.039 0, 227.040 8, 245.051 2, 275.062 3, 287.060 4, 305.071 8, 365.105 6, 407.105 1, 467.136 3, 509.147 3, 527.157 7, 569.155 2, 629.185 8, 671.199 3, 689.211 4, 731.210 1, 791.240 4, 833.254 2, 851.263 4, 893.363 3, 908.774 5, 953.281 3, 995.288 7, 1 013.317 4, 1 055.318 3, 1 072.371 2, 1 115.331 3, 1 175.370 2
8	9.14	C ₄₈ H ₈₂ O ₄₁	1 315.140 1	185.042 6, 219.018 1, 245.051 6, 263.060 2, 272.065 7, 325.113 8, 347.095 1, 365.103 8, 407.106 5, 467.137 3, 509.147 8, 527.158 6, 569.131 5, 629.189 2, 671.200 6, 689.211 6, 731.213 6, 791.251 8, 833.251 9, 851.264 7, 893.286 1, 953.286 1, 1 013.317 3, 1 055.316 3, 1 115.331 2, 1 175.370 7, 1 217.366 7, 1 277.389 5, 1 337.425 3
9	10.51	C ₅₄ H ₉₂ O ₄₆	1 477.280 7	185.043 1, 191.039 2, 203.052 6, 325.113 7, 347.095 2, 365.106 4, 407.111 2, 467.140 5, 509.148 2, 527.158 8, 569.169 9, 629.193 7, 689.211 9, 731.317 2, 759.219 7, 791.238 2, 833.253 1, 851.264 5, 953.293 8, 995.304 8, 1 013.317 0, 1 055.317 2, 1 115.335 1, 1 157.357 0, 1 175.369 5, 1 217.373 0, 1 277.370 2, 1 319.404 2, 1 337.423 3, 1 379.390 1, 1 439.431 1, 1 499.477 1

6糖主要断裂形式为糖苷键断裂,并产生C型203.053 7、365.105 1、527.158 5、689.210 6、851.265 3碎片离子和B型185.043 2、347.095 3、509.148 2、671.201 9、833.256 1碎片离子,除此之外发生了^{0,2}A₃、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆跨环断裂形成467.141 7、791.246 3、953.312 5碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,符合1→4连接的跨环裂解规律,同时还发生了^{0,4}A₆跨环断裂形成839.280 1碎片,该碎片离子符合1→6连接裂解规律,因此还原末端糖C-6位被连接。推测该结构为 α -D-Glcp-1→(4- α -D-Glcp-1)₄→6- α -D-Glcp。

7糖主要发生糖苷键断裂,并产生C型203.039 0、365.105 6、527.157 7、689.211 4、851.263 4、1 013.317 4碎片离子和B型185.028 6、509.147 3、671.199 3、833.254 2碎片离子,此外发生^{0,2}A₂、^{0,2}A₃、^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇跨环断裂形成305.071 8、467.136 3、791.240 4、953.281 3、1 115.331 3碎片离子,产生质量数为60的中性丢失,同时还发生^{0,4}A₂、^{0,4}A₃、^{0,4}A₄、^{0,4}A₅、^{0,4}A₆、^{0,4}A₇跨环断裂形成245.051 2、407.105 1、569.155 2、731.210 1、893.363 3、1 055.318 3系列碎片离子,产生了质量数为60和120的中性丢失,符合1→6连接裂解规律,因此推测该7糖为线性的1→6连接葡聚糖,推测该结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₅→6- α -D-Glcp。

8糖与7糖结构相似,主要发生了糖苷键断裂,并产生C型365.103 8、527.158 6、689.211 6、851.264 7、1 013.317 3、1 175.370 7碎片离子和B型185.042 6、509.147 8、671.200 6、833.251 9碎片离子,除此之外发生了^{0,2}A₃、^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇、^{0,2}A₈的跨环断裂形成

467.137 3、629.189 2、791.251 8、953.286 1、1 115.331 2、1 277.389 5碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,同时还发生^{0,2}A₃、^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇、^{0,2}A₈跨环断裂形成245.051 6、407.106 5、569.131 5、731.213 6、893.286 1、1 055.316 3、1 217.366 7系列碎片离子,产生了质量数为60和120的中性丢失,符合1→6连接的裂解规律,因此推测该8糖为线性的1→6连接葡聚糖,推测该结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₆→6- α -D-Glcp。

9糖主要断裂形式为糖苷键断裂,并产生C型203.052 6、365.106 4、527.158 8、689.211 9、851.264 5、1 013.317 0、1 175.369 5、1 337.423 3碎片离子和B型185.043 1、347.095 2、509.148 2、833.253 1、995.304 8、1 157.357 0、1 319.404 2碎片离子,此外发生了^{0,2}A₂、^{0,2}A₃、^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇、^{0,2}A₈跨环断裂形成325.113 7、467.140 5、629.193 7、791.238 2、953.293 8、1 115.335 1、1 277.370 2、1 439.431 1碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,同时还发生^{0,4}A₃、^{0,4}A₄、^{0,4}A₅、^{0,4}A₇、^{0,4}A₈跨环断裂,并形成407.111 2、569.169 9、731.317 2、1 055.317 2、1 217.373 0、1 379.390 1系列碎片离子,产生了质量数为120的中性丢失,符合1→6连接裂解规律。通过分析发现,其跨环断裂仅产生了^{0,2}A₂和^{0,2}A₆丢失60的二级碎片离子,但是并未产生^{0,4}A₂和^{0,4}A₆丢失120的碎片离子,由此可得出这两个糖的C-4位被连接,连接方式为1→4连接。因此推测该9糖为线性1→4连接和1→6连接方式共存的葡聚糖,并推测该结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₃→4- α -D-

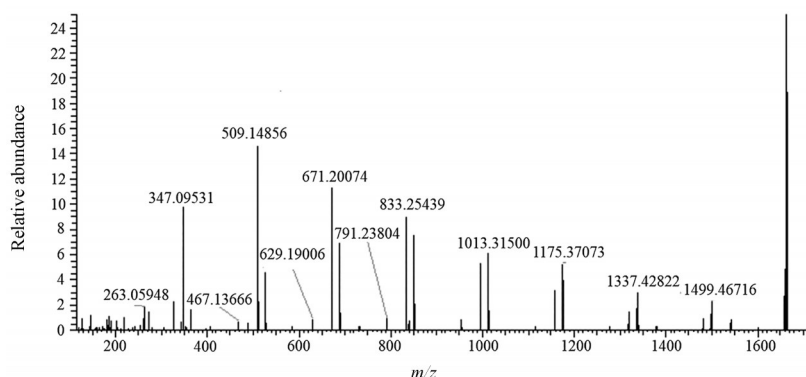


Figure 3 MS/MS spectrum of APS-II enzymatic hydrolysis of decasaccharide

和^{0,4}A₉丢失120的碎片离子,由此可得出这两个糖的C-4位被连接,连接方式为1→4连接。基于此推测该11糖为线性1→4连接和1→6连接方式共存的葡聚糖,推测该结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₅→(4- α -D-Glcp)₂。

12糖主要发生了糖苷键断裂,并产生C型203.0528、365.1057、527.1599、689.2125、851.2646、1013.3180、1175.3730、1337.4130、1499.4880、1661.5240、1823.5910碎片离子和B型185.0420、347.0953、509.1486、671.2013、833.2540、995.3095、1157.3600、1481.4621、1643.5350、1805.5910碎片离子,除此之外还发生了^{0,2}A₂、^{0,2}A₃、^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇、^{0,2}A₈、^{0,2}A₉、^{0,2}A₁₀、^{0,2}A₁₁、^{0,2}A₁₂跨环断裂形成305.0852、467.1384、629.1932、791.2460、953.3029、1115.3506、1277.4080、1440.4880碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,同时^{0,4}A₃、^{0,4}A₄、^{0,4}A₅、^{0,4}A₆、^{0,4}A₇、^{0,4}A₁₂的跨环断裂形成了407.1137、569.1712、731.2263、1055.3250、1217.3730、1379.3900系列碎片离子,产生了质量数为120的中性丢失,符合1→6连接裂解规律。通过分析发现,跨环断裂产生了^{0,2}A₂、^{0,2}A₈、^{0,2}A₉、^{0,2}A₁₀、^{0,2}A₁₁丢失质量数为60的二级碎片,但并未产生^{0,2}A₂、^{0,4}A₈、^{0,4}A₉、^{0,4}A₁₀、^{0,4}A₁₁丢失质量数为120的碎片离子,由此可得出这5个糖的C-4位被连接,连接方式为1→4连接。因此推测该12糖为线性1→4连接和1→6连接方式共存的葡聚糖,推测该结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₅→(4- α -D-Glcp-1)₄→6- α -D-Glcp-1。

13糖主要断裂形式为糖苷键断裂,并产生完整C型碎片离子365.1061、527.1589、689.2111、851.2647、1013.3117、1175.3600、1337.4180、1499.4820、1661.5390、1823.5730、1985.6360和B型185.0424、347.0950、509.1483、671.2012、833.2547、1157.3600、1319.4070、1643.5090碎片离子,除此之外发生了^{0,2}A₃、

^{0,2}A₄、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₇、^{0,2}A₈、^{0,2}A₉、^{0,2}A₁₃跨环断裂形成467.1366、629.1948、791.2460、953.2910、1115.3420、1277.4020、1439.4590碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,同时还发生^{0,4}A₂、^{0,4}A₃、^{0,4}A₅、^{0,4}A₆、^{0,4}A₇跨环断裂形成245.0513、407.1090、731.2283、893.2747、1055.3290系列碎片离子,产生了质量数为120的中性丢失,符合1→6连接的裂解规律。通过分析发现,跨环断裂仅产生了^{0,2}A₄、^{0,2}A₈、^{0,2}A₉、^{0,2}A₁₃丢失质量数为60的二级碎片,但并未产生^{0,4}A₄、^{0,4}A₈、^{0,4}A₉、^{0,4}A₁₃丢失120的碎片离子,由此可得出这4个糖的C-4位被连接,连接方式为1→4连接。由于寡糖的制备过程中采取了 α -1,4葡聚糖糖苷水解酶进行酶解,具有一定的专一性,根据上述实验结果判断出寡糖中存在2~5糖的线性葡聚糖,因此推测在具有更大相对分子量或聚合度的糖链中存在2~5糖的结构才能被降解出该糖链,推测该13糖还原末端5个糖为1→4连接的葡聚糖糖链,13糖为线性1→4连接和1→6连接方式共存的葡聚糖,推测其结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₂→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp-1)₆。

14糖主要发生糖苷键断裂,并产生了C型365.1044、527.1616、689.2141、851.2628、1013.3170、1175.3660、1337.4230、1499.4800、1661.5180、1823.5770、1986.6530、2309.7370碎片离子和B型185.0428、347.0955、509.1481、833.2551、995.3063、1157.3599、1319.4043、1481.4690、1643.5280、1805.5980碎片离子,除此之外发生^{0,2}A₂、^{0,2}A₃、^{0,2}A₅、^{0,2}A₆、^{0,2}A₈跨环断裂形成304.8853、487.1661、629.1896、791.2487、953.2936、1277.3980碎片离子,产生了质量数为60的中性丢失,同时还发生^{0,4}A₆和^{0,4}A₈跨环断裂形成886.3618、1220.3810系列碎片离子,产生了质量数为120的中性丢失,符合1→6连接裂解规律,表明这两个糖6位被连接,通过分析上述实验结果发现7~13糖中均存在3个1→6连接相连接的片段,因此推测

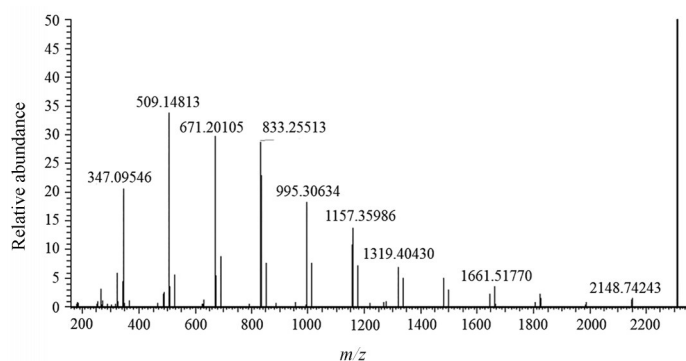


Figure 4 MS/MS spectrum of APS-II enzymatic hydrolysis of tetradecacose

该糖链中非还原端 9 糖位置处 C-6 位被连接, 还原末端 6 个糖为 1→4 连接方式。推测该 14 糖为线性 1→4 连接和 1→6 连接方式共存的葡聚糖, 推测该结构为 α -D-Glcp-1→(4- α -D-Glcp-1)₄→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp-1)₆。二级质谱图见图 4。

其中 10 糖结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp)₃→(6- α -D-Glcp-1)₂, 11 糖结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₅→(4- α -D-Glcp)₂→(6- α -D-Glcp-1)₂, 12 糖结构为 α -D-Glcp-1→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₅→(4- α -D-Glcp-1)₄→6- α -D-Glcp-1, 13 糖结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₂→4- α -D-Glcp→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp-1)₆, 14 糖结构为 α -D-Glcp-1→(4- α -D-Glcp-1)₄→(6- α -D-Glcp-1)₃→(4- α -D-Glcp-1)₆。其中 10~14 糖共有结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₃→4- α -D-Glcp-1。

基于此, 相较于 2~8 糖中只存在 1→4 或 1→6 连接方式的糖链结构, 在 10~14 糖中均出现了 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的分支结构。推测 1→4 和 1→6 连接共存的葡聚糖链可能为 APS-II 中发挥免疫促进活性的关键结构。

结论

本文在 APS-II 酶解寡糖负离子模式解析结果^[13]前期研究基础上, 采用正离子模式对黄芪活性多糖 APS-II 酶解寡糖进行高分辨质谱解析, 首次对 APS-II 酶解寡糖中 10 糖以上 (10~14) 糖链进行结构解析并与 2~9 糖结构进行对比, 得出 10~14 糖共有结构为 α -D-Glcp-1→(6- α -D-Glcp-1)₃→4- α -D-Glcp-1。相比于 2~9 糖, 10~14 糖中均为 1→4 和 1→6 两种连接方式共存的糖链。目前有部分研究表明 1→4 和 1→6 连接的葡聚糖糖链可激活免疫系统发挥免疫应答^[13,15]。基于此, 本文推测 APS-II 寡糖中 1→4 和 1→6 连接共存的糖链可能为 APS-II 中发挥免疫活性的关键结构, 该研究结果可为后续黄芪寡糖及多糖构效关系的研究奠定理论基础和

提供技术支撑。

作者贡献: 刘宇冲和李虎峰负责文中实验方案设计; 李虎峰负责实验实施、数据收集、结果分析等工作, 刘宇冲和李虎峰负责文章撰写等工作; 李科负责提供文章思路, 在文章写作方面进行指导和修改; 秦雪梅、杜昱光和李震宇对整个实验内容给予监督, 并对文章进行修改完善。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Li Q, Hu J, Gao B, et al. Advances on immunoregulation effect of *Astragalus* polysaccharides [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 199-206.
- [2] Morten L, Anette W, Rune L, et al. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis* [J]. J Med Food, 2008, 11: 313-322.
- [3] Jiang C, Tang C, Qiang Y, et al. Immunoregulation effect of *Astragalus* polysaccharides [J]. Food Sci (食品科学), 2020, 34: 327-332.
- [4] Li K, Cui LJ, Cao YX, et al. UHPLC Q-Exactive MS-based serum metabolomics to explore the effect mechanisms of immunological activity of *Astragalus* polysaccharides with different molecular weights [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 595692.
- [5] Li K, Cao YX, Jiao SM, et al. Structural characterization and immune activity screening of polysaccharides with different molecular weights from *Astragalus Radix* [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 582091.
- [6] Li K, Li XQ, Li GX, et al. Radix by enzymolysis of endo α -1,4-glucanase relationship between the structure and immune activity of components from the active polysaccharides APS-II of *Astragalus* [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 839635.
- [7] Li Q. Preparation of Apple Oligosaccharides, Structural Identification and Antitumor Activity (苹果多糖的制备、结构鉴定及抗肿瘤活性) [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2013.
- [8] Miu YQ, Gu GP, Wu GR, et al. Research progress on hydrolysis

- of plant polysaccharides and their products [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2005, 02: 4-7.
- [9] Li D, Song Y, Wu M, et al. Review on the hydrolysis of plant polysaccharides and the structure of hydrolysate [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2013, 39: 165-170.
- [10] Li P, Li WY, Cao W, et al. EI candy and its derivative molecular ion ESI-MSN broken behavior preliminary research [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2015, 30: 433-436.
- [11] Li K, Cui LJ, Li XX, et al. Establishment of enzymatic hydrolysis method of active *Astragalus* polysaccharides APS- II and study on the immune activity of oligosaccharides after its degradation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1936-1944.
- [12] Wang S, Chen C, Guan M, et al. Terminal epitope-dependent branch preference of siglecs toward N-glycans [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 645999.
- [13] Cui LJ. *Astragalus* Active Polysaccharide APS- II . Immune Regulation Mechanism and Structure and Activity of Enzymatic Hydrolyzable Oligosaccharide Fragments (黄芪活性多糖APS-II 免疫调控机制及其酶解寡糖片段的结构和活性研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [14] Wang Z. Preliminary Studies on Derivatived Oligosaccharide Molecular Ions Fragmentation Pattern in ESI-MSⁿ Analysis (ESI-MSⁿ 分析中衍生寡糖分子离子裂解模式的初步研究) [D]. Xi'an: Northwest University, 2011.
- [15] He BL, Zheng QW, Guo LQ, et al. Structural characterization and immune-enhancing activity of a novel high-molecular-weight polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 145: 11-20.