

# 系列 $\iota$ -卡拉胶寡糖制备及其电喷雾串联质谱序列分析

杨波, 于广利, 郝翠, 赵峡, 嵇国利, 胡艳南, 王玉峰  
(中国海洋大学医药学院糖科学与糖工程实验室, 青岛 266003)

**摘要** 以  $\iota$ -卡拉胶为原料, 在稀酸条件下进行酸水解得到其寡糖混合物, 采用低压凝胶渗透色谱 (LPGPC) 进行分离纯化, 获得了 10 个寡糖单体. 在利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和高效薄层层析 (HPTLC) 对其纯度进行分析的基础上, 通过红外光谱 (IR)、核磁共振波谱 (NMR) 和电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 对其结构进行表征, 并用电喷雾碰撞诱导串联质谱 (ESI-CID-MS/MS) 对其序列进行分析. 结果表明, 它们分别是还原端为 2-硫酸-3,6-内醚半乳糖 (A2S) 和非还原端为 4-硫酸-半乳糖 (G4S) 的  $\iota$ -卡拉胶二至二十糖. 这些酸法水解制备的寡糖结构新颖, 不同于  $\iota$ -卡拉胶酶法制备的新  $\iota$ -卡拉胶寡糖. 这不仅丰富了海洋寡糖库数据, 也为进一步运用糖生物芯片技术探索其与蛋白之间的相互作用提供了物质基础.

**关键词**  $\iota$ -卡拉胶寡糖; 分离纯化; 电喷雾串联质谱; 序列分析

**中图分类号** O629.1

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2010)02-0303-06

卡拉胶 (Carrageenan) 是一类由半乳糖及其衍生物构成的天然硫酸多糖化合物, 主要有  $\kappa$ -、 $\lambda$ -和  $\iota$ -卡拉胶 3 种类型, 其中  $\iota$ -卡拉胶是由 1,3-连接-4-硫酸- $\beta$ -D-半乳糖 (G4S) 和 1,4-连接-2-硫酸-3,6-内醚- $\alpha$ -D-半乳糖 (A2S) 交替连接而成的线性高分子聚合物<sup>[1]</sup>. 作为一种水溶性天然硫酸多糖, 卡拉胶已被广泛应用于食品、医药和化工等领域<sup>[2]</sup>. 近年来, 卡拉胶寡糖及其衍生物的许多重要生物学功能和生理活性逐渐被人们所认识, 并在抗肿瘤、抗凝血、抗病毒、抗溃疡、抗氧化及免疫调节等方面都显示出良好的应用及开发前景<sup>[3-6]</sup>.

目前, 有关  $\iota$ -卡拉胶寡糖的制备方法主要采用  $\iota$ -卡拉胶酶法, 该法是通过水解卡拉胶分子中的  $\beta$ -1,4 糖苷键制备寡糖, 所得寡糖分子的非还原端为 2-硫酸-3,6-内醚半乳糖 (A2S<sub>non</sub>), 还原端为 4-硫酸-半乳糖 (G4S<sub>re</sub>), 称为新- $\iota$ -卡拉胶寡糖<sup>[7-9]</sup>. 为了深入开展不同结构类型卡拉胶寡糖的结构与活性关系的研究, 采用不同方法制备结构多样的硫酸寡糖, 有利于从分子水平上研究并阐明硫酸寡糖及其衍生物与人类疾病发生、发展的关系及其作用机理, 从而指导海洋寡糖类新药的研究与开发, 因此, 系列  $\iota$ -卡拉胶寡糖单体的制备具有重要意义. 本文采用稀酸降解方法, 通过柱层析分离技术获得了 10 个  $\iota$ -卡拉胶寡糖单体, 并用串联质谱方法对其序列进行分析.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

$\iota$ -卡拉胶 (Type III, *E. cottonii*) 和 NaBH<sub>4</sub> 购自 Sigma 公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 (TEMED) 和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均购自 Bio-Rad 公司; 其它试剂均为国产分析纯. Superdex30 prepgrade 以及 Sephadex G10 凝胶层析色谱柱 (XK 1.6 cm × 60 cm, 瑞典 Pharmacia Biotech 公司); Dowex AG50W-X8 阳离子交换树脂 (H 型, 美国 Bio-Rad 公司); 高效硅胶层析板 (20 cm × 20 cm, 德国 Silica Gel 60 Merck Darmstadt 公司); Micromass Q-Tof 质谱仪 (英国 Waters Manchester 公司);

收稿日期: 2009-03-10.

基金项目: 国际科技合作专项基金 (批准号: 2007DFA30980)、国家海洋“八六三”计划专项基金 (批准号: 2007AA09Z445) 和国家自然科学基金 (批准号: 30870506) 资助.

联系人简介: 于广利, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事糖化学和糖生物学研究. E-mail: glyu@ouc.edu.cn

ÅKTA-FPLC 液相色谱仪(瑞典 Pharmacia Biotech 公司); 凝胶成像系统(美国 Syngene 公司); 薄层点样仪(瑞士 Camag 公司); 3000Xi 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); MiniVE 电泳槽(瑞典 Pharmacia 公司).

## 1.2 寡糖的制备及其纯度分析

将  $\iota$ -卡拉胶用 0.1 mol/L  $H_2SO_4$  (10 mg/mL) 于 60 °C 下降解不同时间后, 用 2 mol/L NaOH 水溶液中和. 向水解液中加入等体积的无水乙醇, 于 4 °C 静置过夜, 以 6000 r/min 离心 5 min. 将上清液旋转蒸发浓缩, 经 Sephadex G10 柱脱盐, 收集糖峰组分, 冻干, 得到  $\iota$ -卡拉胶寡糖混合物. 在 ÅKTA-FPLC 纯化系统下用 Superdex30 prepgrade 凝胶层析柱分离纯化, 以 0.3 mol/L  $NH_4HCO_3$  洗脱, 流速为 0.1 mL/min, 示差检测器在线检测, 收集各寡糖组分, 经浓缩及脱盐后冻干.

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析<sup>[10,11]</sup>和高效薄层层析(HPTLC)分析<sup>[12~14]</sup>按文献方法进行.

## 1.3 寡糖的结构分析

寡糖样品的 IR 和 NMR 分析<sup>[15]</sup>: 样品用  $P_2O_5$  干燥 48 h, 取 1~2 mg 样品用 KBr 压片, 测定红外光谱, 扫描范围为 400~4000  $cm^{-1}$ . 寡糖样品经重水溶解和冻干 2 次并用 0.5 mL  $D_2O$  (99.96%) 溶解后, 加入核磁管, 于 25 °C 下以 4,4-二甲基-4-硅代戊磺酸钠(DSS)为内标, 测定并获得  $^{13}C$  NMR 图谱.

质谱分析用  $N_2$  气作为雾化气体, 流速分别为 500 和 25 L/h. 离子源温度和溶剂挥发温度分别为 80 和 150 °C. 将样品溶解在  $CH_3CN/NH_4HCO_3$  (1 mmol/L) 混合液(体积比 1:1)中, 其浓度为 5~10 pmol/L, 进样量 5  $\mu L$ . 微量泵的流动相为  $CH_3CN/NH_4HCO_3$  (1 mmol/L) 混合液(体积比 1:1), 流速为 10  $\mu L/min$ . 锥孔电压维持在 100 eV, 毛细管电压为 3 kV. 在二级质谱分析中, 锥孔电压为 150 eV. 氩气作为碰撞气体, 压力  $1.71 \times 10^5$  Pa, 碰撞能量 25~100 eV. 寡糖的还原方法参见文献[13].

## 2 结果与讨论

### 2.1 寡糖的稀酸降解

将  $\iota$ -卡拉胶用 0.1 mol/L  $H_2SO_4$  于 60 °C 酸水解 1~5 h, 每间隔一定时间取少量样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测其水解程度. 结果表明, 随着降解时间的延长,  $\iota$ -卡拉胶多糖逐渐减少, 3 h 后有大量寡糖出现且条带清晰; 降解 5 h 后, 多糖虽然全部水解但寡糖条带模糊, 表明生成的寡糖被进一步降解成次级产物. 故寡糖的最佳水解条件为 0.1 mol/L  $H_2SO_4$  于 60 °C 下水解 3 h, 多糖质量分数以 0.5%~2% 为宜. 此外, 水解液经 50% 乙醇分级后, 可以有效地将未降解的大分子多糖经离心去除. 上清液经减压浓缩后, 使用 Sephadex G10 柱脱盐,  $\iota$ -卡拉胶寡糖混合物收率为 65%.

### 2.2 寡糖的分离纯化及其纯度分析

采用 ÅKTA-FPLC 纯化系统, 用 Superdex30 prepgrade 凝胶柱分离, 并用示差检测器在线检测, 其分离纯化图见图 1. 结果表明, 寡糖混合物得到较好的分离, 按分子量从大到小分离成 10 个寡糖组分, 分别记为 IC1~IC10. 由于  $\iota$ -卡拉胶寡糖含有较多的硫酸根, 因此选择 0.3 mol/L  $NH_4HCO_3$  为流动相, 该洗脱液具有弱碱性和良好的挥发性, 适合于酸性寡糖的分离, 洗脱液中铵盐经多次减压浓缩即可被有效去除, 不仅简化了寡糖脱盐步骤, 也有利于寡糖质谱分析<sup>[16]</sup>.

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)即可用于分析多糖和寡糖的分子量及其分布, 也是一种监控多糖水解反应进程的优良方法<sup>[10,17,18]</sup>. 在 PAGE 分析中发现, 阿利辛蓝可与含有 3 个以上硫酸根的寡糖结合而显色, 而对低硫酸化度的寡糖则不能被染色. 图 2(A)表明, 组分 IC2~IC8 的纯度较高, IC1 不能被染色, 需要采用其它显色方法. 参照文献[12~14]方法, 本文用高效薄层色谱法(HPTLC)对分离的  $\iota$ -卡拉胶寡糖进行了分析, 表明其用苯胺-二苯胺试剂显色灵敏度较高, 且组分

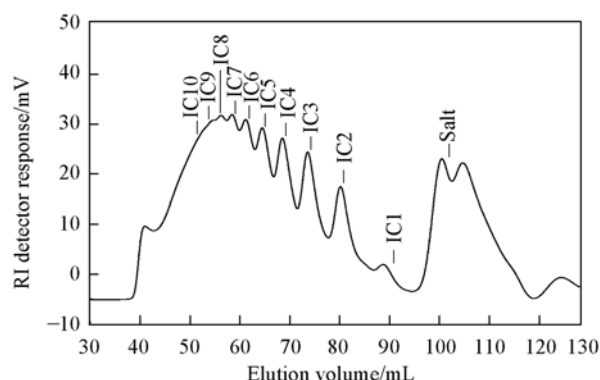


Fig. 1 Gel filtration chromatography of  $\iota$ -carrageenan oligosaccharides on Superdex 30 column

IC1 ~ IC5 [图 2(B)] 能被较好地分离, 聚合度大于 IC6 的寡糖不能被分离. 因此, 两种方法配合使用可以满足不同聚合度和不同硫酸化度寡糖分析的要求.

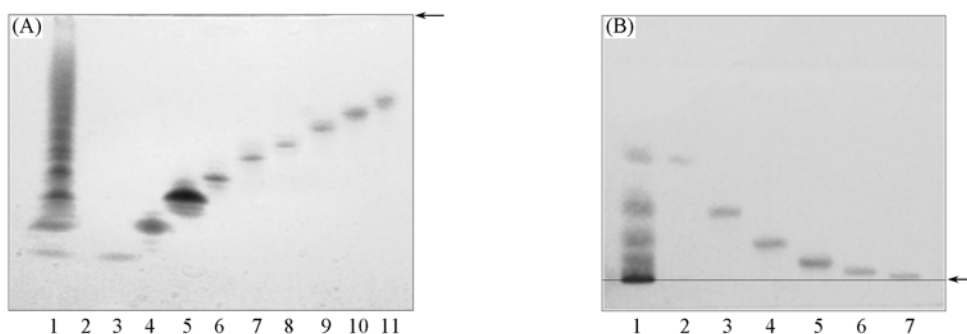


Fig. 2 Analysis of  $\iota$ -carrageenan oligosaccharides by PAGE(A) and HPTLC(B)

Lane 1: hydrolysate of  $\iota$ -carrageenan obtained from mild acid hydrolysis; lane 2—11: the oligosaccharide fractions IC1—IC10.

The arrow indicates the origin.

### 2.3 寡糖的结构特征及其序列分析

通过红外光谱(IR)能够确定硫酸酯基的多少及其取代位置<sup>[19,20]</sup>, 由IR谱可知, 1227  $\text{cm}^{-1}$ 强吸收峰为 S=O 伸缩振动峰, 847 和 801  $\text{cm}^{-1}$ 处的强吸收峰分别为 G4S 和 A2S 中 C4—O—S 和 C2—O—S 的特征吸收; 927  $\text{cm}^{-1}$  为 A2S 中 C3—O—C6 醚键特征吸收, 1036 ~ 1072  $\text{cm}^{-1}$  为吡喃半乳糖 C1—O—C5 醚键特征吸收, 表明各寡糖均具有  $\iota$ -卡拉胶的结构特征.

微量硫酸寡糖的结构分析一直是本领域研究的难点, 随着各种软电离技术的发展, 使高极性、难挥发且热不稳定的糖及其缀合物的分析成为可能<sup>[21~23]</sup>. 特别是近年来电喷雾离子化碰撞诱导解离串联质谱(ESI-CID-MS/MS)技术的出现, 促进了寡糖结构分析技术的进步<sup>[15,24]</sup>. ESI-MS 具有正离子和负离子两种检测模式, 对酸性糖类物质(如含有唾液酸和硫酸基的寡糖)多以负离子模式来检测. 另外, 分析前在样品溶液中加入少量  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  或  $\text{NH}_4\text{Ac}$  可提高检测灵敏度. 由于  $\iota$ -卡拉胶寡糖含有多个硫酸根, 在高灵敏度负离子模式下, 寡糖以钠盐形式存在, 不仅能提高分子离子峰的丰度和减少硫酸根的脱落, 而且能产生多电荷碎片离子, 有利于寡糖序列分析<sup>[15]</sup>. 经计算, 组分 IC1 ~ IC10 的分子量分别为 528.4, 1038.7, 1549.1, 2059.4, 2569.8, 3080.2, 3590.5, 4100.8, 4611.2 和 5121.6, 其数值与  $\iota$ -卡拉胶二糖、四糖、六糖、八糖、十糖、十二糖、十四糖、十六糖、十八糖和二十糖钠盐的理论分子量相符(表 1). 此外, 从表 1 质谱数据还可以看出, 寡糖中硫酸基太多, 易造成软电离过程中硫酸基的脱落, 如八 ~ 十六糖中均有不同程度的脱硫酸基现象.

Table 1 Negative-ion ESI-MS of  $\iota$ -carrageenan oligosaccharide fragments obtained from mild acid hydrolysis and sequences of IC1—IC10

Fraction	Found major ion <sup>a</sup>	Pseudomolecular ion (charge)	Calculated $M_r$ (Na form)	Theoretical $M_r$ (Na form)	DP <sup>b</sup>	Sequence
IC1	505.2	$[\text{M} - \text{Na}]^-$	528.2	528.4	2	G4S-A2S <sup>c</sup>
IC2	496.3	$[\text{M} - 2\text{Na}]^{2-}$	1038.6	1038.7	4	G4S-[A2S-G4S] <sub>1</sub> -A2S
IC3	493.4	$[\text{M} - 3\text{Na}]^{3-}$	1549.2	1549.1	6	G4S-[A2S-G4S] <sub>2</sub> -A2S
IC4	466.4	$[\text{M} - 4\text{Na} - \text{SO}_3\text{Na} + \text{H}]^{4-}$	2059.6	2059.4	8	G4S-[A2S-G4S] <sub>3</sub> -A2S
IC5	594.0	$[\text{M} - 4\text{Na} - \text{SO}_3\text{Na} + \text{H}]^{4-}$	2570.0	2569.8	10	G4S-[A2S-G4S] <sub>4</sub> -A2S
IC6	572.7	$[\text{M} - 5\text{Na} - \text{SO}_3\text{Na} + \text{H}]^{5-}$	3080.5	3080.2	12	G4S-[A2S-G4S] <sub>5</sub> -A2S
IC7	541.5	$[\text{M} - 6\text{Na} - 2\text{SO}_3\text{Na} + 2\text{H}]^{6-}$	3590.9	3590.5	14	G4S-[A2S-G4S] <sub>6</sub> -A2S
IC8	533.7	$[\text{M} - 7\text{Na} - 2\text{SO}_3\text{Na} + 2\text{H}]^{7-}$	4100.9	4100.9	16	G4S-[A2S-G4S] <sub>7</sub> -A2S
IC9	528.0	$[\text{M} - 8\text{Na} - 2\text{SO}_3\text{Na} + 2\text{H}]^{8-}$	4611.9	4611.2	18	G4S-[A2S-G4S] <sub>8</sub> -A2S
IC10	512.1	$[\text{M} - 9\text{Na} - 3\text{SO}_3\text{Na} + 3\text{H}]^{9-}$	5121.9	5121.6	20	G4S-[A2S-G4S] <sub>9</sub> -A2S

a. Found major ions; major ion detected; other ions with different charge states and sodiated ion species were all with much lower intensity and therefore not listed; b. degree of polymerization; c. G4S: 1,3- $\beta$ -D-4-sulfated-galactopyranose; A2S: 1,4- $\alpha$ -D-2-sulfated-3,6-anhydro-galactopyranose.

由于  $\text{NaBH}_4$  可将寡糖还原端的半缩醛还原为相应的糖醇, 因此, 在  $\text{NaBH}_4$  还原后的寡糖醇二级

质谱中,来自还原端断裂的碎片(命名为X, Y和Z型离子)均增加2个质量数,而对于来自非还原端断裂的碎片(命名为A, B和C型离子),其数值不变,该技术能对来自还原端以及非还原端的糖残基碎片离子进行归属,并确定寡糖的序列<sup>[15]</sup>. 利用该技术,我们将二至六糖还原为糖醇,通过比较还原前后寡糖ESI-CID-MS/MS数据,确定其序列. 以 $\iota$ -卡拉胶四糖为例,对寡糖序列解析过程进行说明. 对比 $\iota$ -卡拉胶四糖[图3(A)]和其糖醇[图3(B)]的二级质谱图可知,在图3(B)中出现了 $m/z$  243, 489和507碎片离子,它们分别是来自 $m/z$  241, 487和505得到的糖醇碎片离子,说明243, 489和507碎片离子分别是来自还原端 $Y_1$ ,  $Z_2$ 和 $Y_2$ , 以此表明 $\iota$ -卡拉胶四糖的非还原端为G4S, 还原端为A2S, 其序列为G4S-A2S-G4S-A2S. 采用同样的技术,确定了其二糖和六糖的序列分别为G4S-A2S和G4S-A2S-G4S-A2S-G4S-A2S. 从表1数据可知,不同聚合度寡糖之间相差的质量数为510,而 $m/z$  510即为[A2S-G4S]二糖重复单元质量数,故所得寡糖的序列通式为G4S-[A2S-G4S]<sub>n</sub>-A2S( $n=0\sim 9$ ).

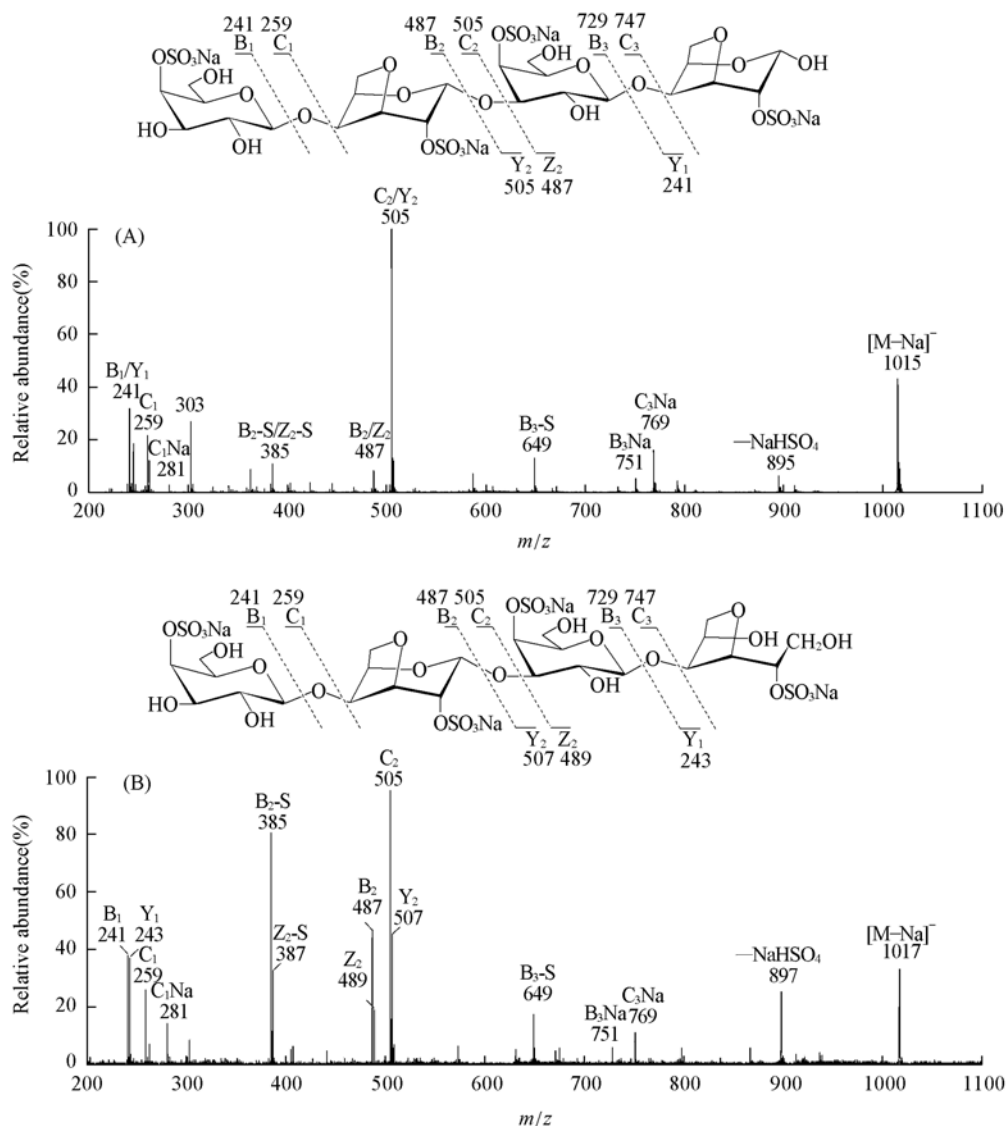


Fig. 3 Negative-ion ESI-CID-MS/MS product-ion spectra of  $\iota$ -carra-tetrasaccharide IC2

(A)  $\iota$ -Carra-tetrasaccharide; (B)  $\iota$ -carra-tetrasaccharide alditol reduced by  $\text{NaBH}_4$ .

从一级和二级质谱数据可以确定各寡糖的分子量及其寡糖序列,糖残基之间的 $\alpha$ 和 $\beta$ 构型可以采用NMR技术确定. 根据 $\iota$ -卡拉胶四糖 $^{13}\text{C}$  NMR(图4)并结合文献<sup>[19]</sup>,确定 $\delta$  102.0为G4S<sub>nr</sub> C1 $\beta$ ,  $\delta$  101.8为G4S<sub>re</sub> C1 $\beta$ ,  $\delta$  91.7为A2S<sub>nr</sub> C1 $\alpha$ 信号,  $\delta$  91.6为A2S<sub>re</sub> C1 $\alpha$ 信号,其它碳信号归属见表2.

由上述质谱和碳谱数据可见,所制备的各种寡糖为 $\iota$ -卡拉胶寡糖. 虽然稀酸降解 $\iota$ -卡拉胶获得的寡糖也均为偶数,但寡糖分子的非还原端均为G4S,还原端均为A2S,其结构与酶法制得的 $\iota$ -卡拉胶偶

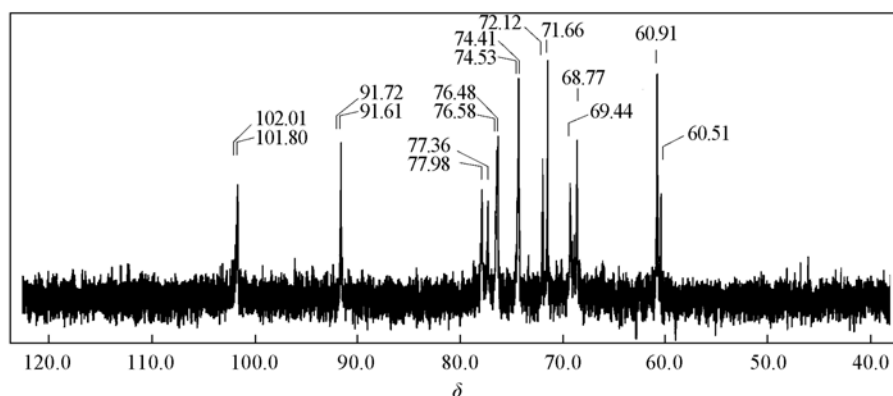


Fig. 4  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of  $\iota$ -carra-tetrasaccharide IC2

Table 2 Chemical shift ( $\delta$ ) assignment of  $\iota$ -carra-tetrasaccharide IC2

Residue	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
G4S <sub>nre</sub> <sup>a</sup>	102.01	69.44	72.12	71.57	74.53	60.91
A2S <sub>nre</sub>	91.73	74.41	77.35	77.98	76.58	68.77
G4S <sub>re</sub> <sup>b</sup>	101.81	69.44	76.48	71.66	74.53	60.52
A2S <sub>re</sub>	91.61	74.41	77.36	77.98	76.58	68.77

*a.* nre; non-reducing end; *b.* re; reducing end.

数寡糖结构明显不同。稀酸降解获得偶数寡糖方法条件温和,成本较酶法低,所得寡糖结构新颖,这不仅丰富了海洋寡糖库数据,也为进一步运用糖生物芯片技术探索硫酸寡糖与蛋白之间的相互作用提供物质基础。

感谢英国帝国理工学院医学院糖科学实验室 Chai W. 博士在寡糖质谱分析中提供的指导和帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Clingman A. L., Num J. R., Stephen A. M. J. Chem. Soc. [J], 1957: 197—203
- [2] De Ruiter G. A., Rudolph B. Trends Food Sci. Technol. [J], 1997, **8**: 389—395
- [3] Carlucci M. J., Scolaro L. A., Nosedà M. D., et al. Antiviral. Res. [J], 2004, **64**(2): 137—141
- [4] Damonte E. B., Matulewicz M. C., Cerezo A. S. Curr. Med. Chem. [J], 2004, **11**(18): 2399—2419
- [5] Buck C. B., Thompson C. D., Roberts J. N., et al. PLoS Pathog. [J], 2006, **2**(7): 671—680
- [6] Roberts J. N., Buck C. B., Thompson C. D., et al. Nat. Med. [J], 2007, **13**(7): 857—861
- [7] Barbeyron T., Michel G., Potin P., et al. J. Biol. Chem. [J], 2000, **275**(45): 35499—35505
- [8] Michel G., Chantalat L., Fanchon E., et al. J. Biol. Chem. [J], 2001, **276**(43): 40202—40209
- [9] Michel G., Helbert W., Kahn R., et al. J. Mol. Biol. [J], 2003, **334**(3): 421—433
- [10] Yu G., Guan H., Ioanovicu A. S., et al. Carbohydr. Res. [J], 2002, **337**(5): 433—440
- [11] Zhang Z., Xie J., Zhang F., et al. Anal. Biochem. [J], 2007, **371**(1): 118—120
- [12] ZHANG Zhen-Qing(张真庆), YU Guang-Li(于广利), ZHAO Xia(赵峡), et al. Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2005, **33**(12): 1750—1752
- [13] Yu G., Zhao X., Yang B., et al. Anal. Chem. [J], 2006, **78**(24): 8499—8505
- [14] ZHAO Xia(赵峡), FU Hai-Ning(付海宁), YU Guang-Li(于广利), et al. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(7): 1344—1348
- [15] LIU Bin(刘斌), WANG Chang-Yun(王长云), ZHANG Hong-Rong(张洪荣), et al. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(3): 485—487
- [16] ZHANG Zhen-Qing(张真庆), YU Guang-Li(于广利), ZHAO Xia(赵峡), et al. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(1): 71—74
- [17] Pereira L., Sousa A., Coelho H., et al. Biomol. Eng. [J], 2003, **20**(4—6): 223—228
- [18] Tojo E., Prado J. Carbohydr. Res. [J], 2003, **338**(12): 1309—1312
- [19] Chai W., Piskarev V., Lawson A. M. Anal. Chem. [J], 2001, **73**(3): 651—657
- [20] Chai W., Luo J., Lim C. K., et al. Anal. Chem. [J], 1998, **70**(10): 2060—2066

- [21] Antonopoulos A. , Favetta P. , Helbert W. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2005 , **77**(13) : 4125—4136
- [22] Aguilan J. T. , Dayrit F. M. , Zhang J. , *et al.* . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2006 , **17**(1) : 96—103
- [23] Zhang Z. , Yu G. , Zhao X. , *et al.* . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J] , 2006 , **17**(4) : 621—630
- [24] van de Velde F. , Pereira L. , Rollema H. S. . Carbohydr. Res. [J] , 2004 , **339**(13) : 2309—2313

## Preparation of Series $\iota$ -Carrageenan Oligosaccharides and Sequence Determination by Negative-ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry

YANG Bo, YU Guang-Li\* , HAO Cui, ZHAO Xia, JI Guo-Li, HU Yan-Nan, WANG Yu-Feng  
(Laboratory of Glycoscience and Glycoengineering, School of Medicine and Pharmacy,  
Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract** Ten oligosaccharides were separated from  $\iota$ -carrageenan mild acid hydrolysate with low pressure gel permeation chromatography (LPGPC). Based on the purity analysis of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and high performance thin layer chromatography (HPTLC), the structures of those oligosaccharides were determined by infrared spectrum (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and electrospray mass spectrometry (ESI-MS). Their sequences were confirmed as  $\iota$ -carrageenan disaccharide to eicosasaccharide with 4-linked-2-*O*-sulfated- $\alpha$ -D-3,6-anhydrogalactose (A2S) at the reducing and 3-linked-4-*O*-sulfated- $\beta$ -D-galactopyranose (G4S) at the non-reducing terminus by electrospray collision-induced dissociation mass spectrometry (ESI-CID-MS/MS). The results show that the structural feature of these  $\iota$ -carr-oligosaccharides from mild acid hydrolysis is completely different from those neo- $\iota$ -carr-oligosaccharides prepared by  $\iota$ -carrageenase digestion. All these  $\iota$ -carrageenan derived oligosaccharides enrich marine carbohydrate library. More importantly, they provide the foundation for the preparation of the oligosaccharide-chip and the investigation on the interaction between oligosaccharide and protein.

**Keywords**  $\iota$ -Carrageenan oligosaccharide; Separation and purification; ESI-CID-MS/MS; Sequence analysis  
(Ed. : H, J, Z)