



УДК 577.455'233.1'814.1.057:577.336

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ УГЛЕВОДОВ
В СТРУКТУРНОМ АНАЛИЗЕ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ.
N-(4-МЕТИЛКУМАРИН-7-ИЛ)ГЛИКАМИНЫ: СИНТЕЗ,
ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
В УГЛЕВОДНОМ АНАЛИЗЕ

*Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В.,
Мирзаянова М. Н.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен метод анализа углеводного состава гликоконьюгатов, включающий превращение образующихся при гидролизе моносахаридов в N-(4-метилкумарин-7-ил)гликамины (АМК-сахара), разделение их ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой и последующее количественное определение флуориметрически. Заведомые образцы АМК сахаров (глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы, 2-дезоксиглюкозы, 2-дезоксигалактозы, 2,5-ангидроманнозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилманнозамина) синтезированы восстановительным N-алкилированием 7-амино-4-метилкумарина (АМК) перечисленными моносахаридами в присутствии цианоборгидрида натрия. Они практически не различались по своим спектральным характеристикам: $\epsilon_{365} 19 \pm 1 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\lambda_{\text{погл}}^{\text{макс}} / \lambda_{\text{исп}}^{\text{макс}} 365/440 \text{ (нм)}$ (в спирте), квантовый выход флуоресценции 0,9. Предельная чувствительность детекции АМК-сахаров при ТСХ 1 пмоль, а при ВЭЖХ — 0,05 пмоль (проточный флуориметр). Приведена методика определения моносахаридного состава 1—0,05 нмоль гликопротеина, гликопептида или олигосахарида, использующая превращение моносахаридов в АМК-сахара.

Развитие высокочувствительных методов структурного анализа углеводов является актуальной задачей химии и биохимии гликоконьюгатов. В частности, очевидна ее важность для структурных исследований гликопротеинов, поскольку современные методы определения первичной структуры белкового компонента на порядки превышают по своей чувствительности методы структурного анализа их углеводной части. Миниатюризация методов структурного анализа углеводов, основанных на деструкции, требует повышения чувствительности методов качественного и количественного определения моно- и олигосахаридов и (или) их производных. Обычно чувствительность детектирования сахаров не превышает наномольный уровень. Введение хромофорной, флуоресцентной или радиоактивной меток повышает ее до уровня 10^{-12} — 10^{-15} моль.

К настоящему времени предложено несколько хромогенных и флуоресцентных меток. Производные гликаминов, содержащие хромогенную группировку, были получены восстановительным алкилированием сахарами ацилина, *n*-аминоацетофенона, этилового эфира *n*-аминобензойной кислоты [1], 4-амино-4'-диметиламиноазобензола [2]. Они использованы для анализа углеводов с помощью ВЭЖХ [1, 2]. Введение флуорогенной метки, однако, предпочтительнее, так как она существенно повышает чувствительность детекции. Описано определение моносахаридов с помощью ТСХ в виде их дансилгидразидов; чувствительность метода 1—2 нмоль [3]. Серия работ японских авторов посвящена превращению восстанавливающих углеводов в N-(α -пиридил)гликамины. Производные этого типа использованы при изучении моносахаридного состава и строения гликопротеинов и гликопептидов [4—14], при определении молекулярных масс олиго- и полисахаридов [15—17], при идентификации фрагментов азотистокислотного дезаминирования углеводных цепей гликопротеинов и протеогликанов [5]. Предельная чувствительность детектирования таких

флуоресцентномеченых производных при ВЭЖХ составляла $\sim 0,1$ пмоль, что сопоставимо с радиоизотопными методами анализа.

7-Амино-4-метилкумарин (АМК) был использован для получения флуоресцентномеченых производных олигосахаридов хитина [18], однако невысокие выходы продуктов реакции и недостаточная характеристика соединений не позволяли оценить перспективность такого типа производных для углеводного анализа. В данном сообщении нами показаны преимущества АМК-метки по сравнению с α -аминопиридиновой. В частности, достигнутые нами высокие выходы превращения сахаров в N-(4-метилкумарин-7-ил)гликамины (АМК-сахара) и высокий квантовый выход флуоресценции последних позволили существенно повысить чувствительность углеводного анализа.

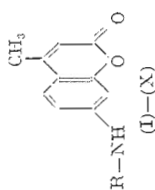
Синтез АМК-сахаров. Заведомые образцы АМК-сахаров (I)–(X) (табл. 1) синтезированы нами в препаративном масштабе N-алкилированием АМК восстанавливающими моносахаридами в описанных ранее условиях [18] с небольшими модификациями последних. Реакцию проводили в 1,3% растворе уксусной кислоты в метаноле при 40–45°С с применением двукратных избытков АМК и цианоборгидрида натрия. В синтез были взяты типичные для гликоконъюгатов моносахариды: глюкоза, галактоза, манноза, фукоза, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин*. Кроме того, были взяты N-ацетилманнозамин, 2-дезоксиглюкоза, 2-дезоксигалактоза и 2,5-ангидроманноза. Названные сахара являются главными продуктами азотистокислотного дезаминирования соответственно 2-амино-2-дезоксиглюцитолола, 2-амино-2-дезоксигалактитола и 2-амино-2-дезоксиглюкозы. Синтез и характеристика АМК-ManNAc (VII) позволили прямым сравнением показать, что получение АМК-производного N-ацетилглюкозамина не сопровождается эимеризацией и побочным образованием АМК-ManNAc. Выходы синтезированных АМК-сахаров после их очистки составляли $\sim 50\%$ в случае аминсахаров, 70–80% в случае нейтральных гексов и 80–90% для фукозы. Таким образом, выбранные условия (см. «Экспериментальную часть») нельзя считать удовлетворительными для аналитических целей, хотя они и позволили получить соединения в количествах, достаточных для их полной характеристики.

Синтезированные АМК-сахара были очищены хроматографией на силикагеле и биогеле Р-2. Они были индивидуальны по данным ТСХ в различных системах растворителей, а также в условиях ВЭЖХ на аминофазной, октальной и октадецильной колонках (табл. 1). Результаты элементного анализа (углерод, водород, азот) соответствовали вычисленным значениям для этих соединений. В спектрах ¹H-ЯМР гликаминов (I)–(X) присутствовали сигналы, отвечающие группировкам остатка аминокумарина: 5,92 м. д. (синглеты, НЗ), 2,52 м. д. (синглеты, СН₃), 7,44 и 6,60 м. д. (дублеты, J_{5,6}=J_{6,5}=8,7 Гц, Н5 и Н6), 6,6–6,7 м. д. (триплеты, N–H). Кроме того, в спектре АМК-Fuc (IV) присутствовал сигнал при 1,10 м. д. (дублет, J_{6',5'} 6,5 Гц, СН₃), а в спектрах АМК-N-ацетиламиносахаров – сигналы в области 1,83 м. д. (синглеты, $\text{CH}_3-\overset{\text{N}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$).

Поскольку АМК-производные могут найти применение в структурном анализе олигосахаридов, мы специально изучили поведение АМК-моносахаридов в условиях кислотного гидролиза гликозидных связей. При действии 2 М соляной кислоты при 100°С в течение 2–4 ч и 4 н. соляной кислоты в течение 4 ч АМК-производные нейтральных сахаров практически не изменялись; об этом свидетельствовали результаты анализа с помощью ТСХ и ВЭЖХ. В последнем случае с помощью флуориметрии было показано, что количество взятого в опыт АМК-сахара не изменялось, по крайней мере значительно, после кислотных обработок. АМК-производные аминсахаров подвергались N-деацетилированию, степень которого зависела от жесткости условий обработки. Ре-N-ацетилирование уксусным ангидридом

* Получение АМК-производных спаловых кислот требует отдельного исследования.

Хроматографические характеристики N-(4-метилкумарин-7-ил) гликаминов – АМК-сахаров (I) – (X) *



Шифр	R—	R _{AMK-Glc} , TСХ на силикагеле в системах						ВЭЖХ, τ, мин (τ _{отп}) ^{**}		
		A	B	B	B	Г	Д	Е	Ж	
АМК-Glc (I)		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	14,95 (0,890)	12,86 (0,865)	16,12 (0,831)	
АМК-Gal (II)		0,93	1,00	1,36	1,18	1,45	18,45 (1,098)	13,90 (0,935)	17,02 (0,877)	
АМК-Man (III)		1,36	1,60	1,75	1,45	1,45	16,50 (0,983)	14,09 (0,948)	17,78 (0,916)	
АМК-Fuc (IV)		3,21	2,90	1,80	1,65	1,65	6,90 (0,411)	17,61 (1,184)	22,12 (1,140)	
АМК-GlcNAc (V)		1,64	1,95	1,45	1,08	1,08	14,69 (0,875)	15,77 (1,061)	20,68 (1,066)	

Таблица 1 (окончание)

Шифр	R—	R-AMK-Glc, ТСХ на силикагеле в системах						ВЭЖХ, τ, мин (τ ₀ тн) ^{**}		
		А	Б	В	Г	Д	Е	Ж		
AMK-GalNAc (VI)		1,63	1,55	1,04	1,80	18,48 (1,101)	17,23 (1,159)	22,89 (1,180)		
AMK-ManNAc (VII)		—	—	—	—	16,79 (1,000)	14,87 (1,000)	19,40 (1,000)		
AMK-2dGlc (VIII)		3,02	2,05	—	1,90	—	20,95 (1,400)	—		
AMK-2dGal (IX)		—	—	—	2,15	8,18 (0,487)	23,71 (1,594)	—		
AMK-2,5-anhydro-Man (X)		4,14	3,05	1,70	—	4,93 (0,294)	20,62 (1,387)	—		

* Условие ТСХ и ВЭЖХ см. в «Экспериментальной части». Прочерк означает отсутствие экспериментальных данных.
 ** τ₀тн — время удерживания относительно AMK-ManNAc.

в метаноле в присутствии пиридина затрагивало только аминокгруппу сахара и приводило к исходным АМК-производным аминсахаров, количества которых, по данным ВЭЖХ, практически не отличались от взятых в эксперимент. Таким образом, полученные в этой серии экспериментов результаты позволяют заключить, что введение флуоресцентной АМК-метки в олигосахариды может быть с успехом использовано при изучении их структуры.

Спектральная характеристика АМК-сахаров. Спектры поглощения соединений (I)–(X) снимали в спиртовых и водных растворах в интервале рН 3–8. Спектры АМК-сахаров практически не различались. Все соединения имели максимум поглощения при 365 нм, который не зависел ни от растворителя, ни от рН. В интервале концентраций 1–30 мкМ зависимость оптического поглощения от концентраций соединения была линейной; вычисленные коэффициенты молярного поглощения [19] соединений (I)–(X) приведены в табл. 2. Видно, что они близки. Для всех соединений можно принять значение ϵ_{365} равным $19 \pm 1 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, которое может быть использовано при количественном определении АМК-сахаров.

Спектры флуоресценции АМК-сахаров также не различались между собой. В спиртовых растворах все соединения имели максимум поглощения при 365 нм и максимум испускания при 440 нм, АМК — при 430 нм. Максимумы испускания не зависели от рН в интервале 3–8, но положение их сдвигалось до 450–455 нм в водных растворах. Для всех соединений (I)–(X) квантовый выход флуоресценции, определенный по методу [20], составил $\sim 0,9$. Высокие значения квантового выхода флуоресценции АМК-сахаров и их молярного коэффициента поглощения указывали на возможность достижения высокой чувствительности детекции флуориметрическим методом.

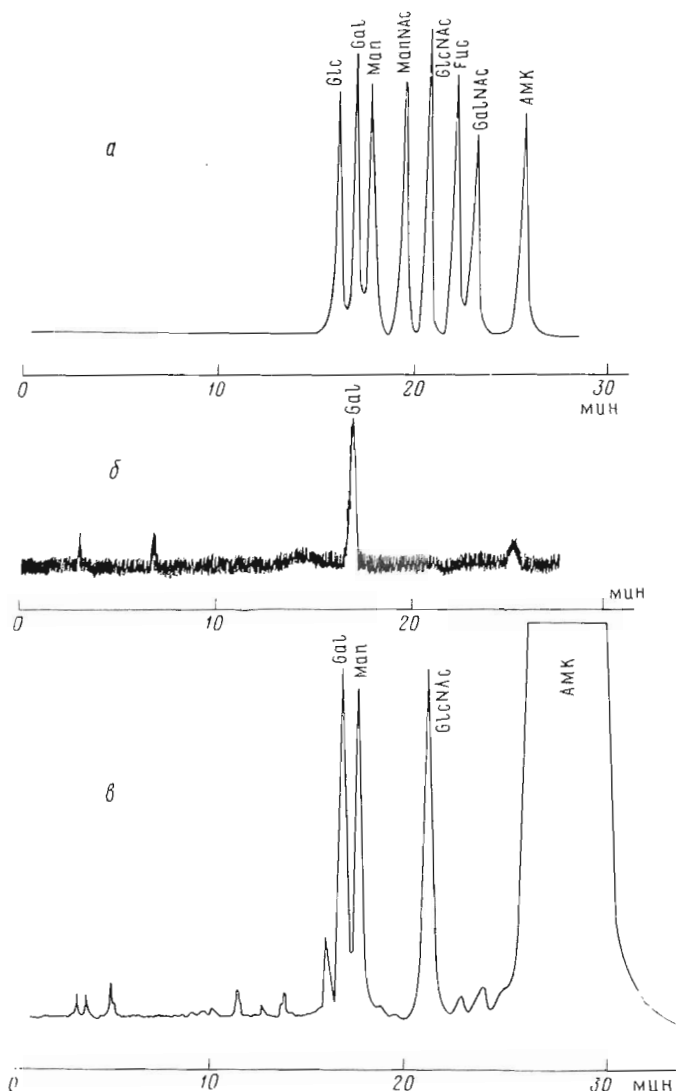
Полученные характеристики АМК-сахаров показали, что эти соединения с успехом могут быть использованы в углеводном анализе. Поэтому нами была проведена оптимизация условий превращения моносахаридов в их АМК-производные. С этой целью изучено влияние на выход АМК-сахаров рН среды, температуры, соотношения моносахарида, АМК и NaCNBH_3 , порядок смешения реагентов. Во всех случаях чистота АМК-сахаров (отсутствие побочных продуктов) и их выходы определялись с помощью ВЭЖХ с последующим количественным определением целевых АМК-производных с помощью проточного флуориметра. В качестве растворителей испытаны метанол, диметилформамид; рН среды создавалось добавлением определенного количества уксусной кислоты. Использование метанола дало лучшие результаты. Оптимум рН реакции лежал в интервале 5,0–6,0. Для достижения хороших выходов требовалась температура не ниже 40 и не выше 80°С. Во всех случаях был необходим большой из-

Таблица 2

Спектральные характеристики АМК-сахаров (I)–(X)

Соединение	УФ-спектр. ϵ_{365} , $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	Флуоресценция *		
		$\lambda_{\text{погл}}$	$\lambda_{\text{исп}}$	Квантовый выход. Q
		нм		
АМК	19 500	355	430	0,90
АМК-Glc (I)	20 000	365	440	0,86
АМК-Gal (II)	18 000	365	440	0,88
АМК-Man (III)	19 800	365	440	0,89
АМК-Fuc (IV)	18 700	365	440	0,90
АМК-GlcNAc (V)	19 900	366	440	0,91
АМК-GalNAc (VI)	20 000	365	440	0,90
АМК-ManNAc (VII)	17 200	366	440	0,90
АМК-2dGlc (VIII)	20 200	365	440	0,90
АМК-2dGal (IX)	20 000	364	440	0,91
АМК-anhydro-Man (X)	16 200	365	440	0,88

* Спиртовой раствор.



Разделение АМК-сахаров на колонке Ultrasphere ODS (условия Ж): скорость элюции 0,75 мл/мин, давление 100 ат: а — стандартная смесь АМК-сахаров (I)–(VII) (по 2–5 пмоль каждого), б — АМК-Gal (II) (0,05 пмоль), в — АМК-сахара, полученные при гидролизе гликопептида $(\text{GalGlcNAc})_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asp}$ (XI) (5 пмоль) (см. табл. 4)

быток АМК и цианоборгидрида, причем тем больший, чем меньшее количество сахара бралось в реакцию. Так, для превращения 50–100 нмоль моносахарида был достаточен 2–4-кратный избыток реагентов, в то время как для 50 пмоль — не менее чем 10-кратный.

Выходы целевых АМК-сахаров заметно повышались при предварительной инкубации моносахарида с АМК без восстановителя. Оптимальными условиями преинкубации было: температура 80°С, время — 2 ч. Последующее восстановление оснований Шиффа или гликозиламинов осуществлялось избытком цианоборгидрида при 40°С в течение 18–24 ч. Однако при работе с малыми количествами сахаров преинкубация с АМК усложняла процедуру аналитического определения моносахаридов. Поэтому в аналитической методике нами использовался большой (600–700-кратный) избыток реагентов и температура реакции 40°С, что давало хорошие результаты.

При оптимизации условий мы специально изучили также факторы, влияющие на образование побочных продуктов. Оказалось, что существенную роль играет удаление из среды кислорода и проведение реакции в атмосфере инертного газа (азот). Последнее особенно важно при работе с

малыми количествами сахаров. На основании полученных таким образом результатов нами предложен микрометод получения АМК-сахаров (см. «Экспериментальную часть»), который давал не менее 90% выхода целевого продукта.

Хроматография АМК-сахаров. Для разделения АМК-сахаров использовались ТСХ и ВЭЖХ. С помощью ТСХ на силикагеле удавалось получить удовлетворительные результаты; они суммированы в табл. 1. Минимальные количества АМК-сахаров, видимые при облучении УФ-светом, составляли ~1 пмоль.

Нами опробовано несколько условий разделения АМК-сахаров с помощью ВЭЖХ; полученные результаты суммированы в табл. 1. Хроматография на колонке Zorbax NH₂ (условия Д) давала удовлетворительное разделение внутри групп нейтральных сахаров и аminosахаров. Однако в этих условиях не удалось добиться разделения пар производных нейтрального сахара и аminosахара одинаковой конфигурации (см. табл. 1, Д). На колонке Zorbax C₈ (условия Е) не удалось достичь разделения пар АМК-Gal и АМК-Man, АМК-Fuc и АМК-GalNAc. Хорошие результаты дало разделение на колонке Ultrasphere ODS (условия Ж, рисунок а). Эти условия ВЭЖХ использовались в аналитической методике определения моносахаридов (см. «Экспериментальную часть»). Далее нам удалось показать, что температура по-разному влияет на подвижность АМК-сахаров (табл. 3). Этот факт представляется существенным, поскольку он открывает еще одну возможность быстро оптимизировать условия хроматографического разделения анализируемой смеси.

В серии экспериментов определена предельная чувствительность детектирования АМК-производных. На рисунке б приведена хроматограмма 0,05 пмоль АМК-Gal. Видно, что это количество образца уверенно детектируется при ВЭЖХ.

Ранее в работе [14] был специально предпринят поиск оптимальных условий гидролиза гликопептидов. Найденные авторами оптимальные условия гидролиза (смесью 2 М HCl – 2 М трифторуксусная кислота) были

Таблица 3

Влияние температуры на времена удерживания АМК-сахаров при ВЭЖХ *

Соединение	20° С		26° С		32° С		37° С	
	τ, мин	τ _{отн}	τ, мин	τ _{отн}	τ, мин	τ _{отн}	τ, мин	τ _{отн}
АМК-Glc	16,82	1,000	16,12	1,000	13,92	1,000	12,19	1,000
АМК-Gal	17,80	1,058	17,02	1,056	14,62	1,050	12,73	1,044
АМК-Man	18,60	1,106	17,78	1,103	15,24	1,095	13,25	1,087
АМК-ManNAc	20,32	1,207	19,40	1,203	16,54	1,188	14,33	1,178
АМК-GlcNAc	21,74	1,293	20,68	1,287	17,44	1,253	14,97	1,228
АМК-Fuc	23,12	1,375	22,12	1,372	19,00	1,365	16,55	1,358
АМК-GalNAc	24,22	1,512	22,98	1,426	19,10	1,380	16,55	1,358
АМК	26,78	1,592	25,66	1,592	22,18	1,593	19,45	1,596

* Условия Ж (см. в «Экспериментальной части»), τ_{отн} — время удерживания относительно АМК-Glc.

Таблица 4

Определение моносахаридного состава гликопептида (Gal-GlcNAc)₃Man₂GlcNAc₂Asn методами ГЖХ и ВЭЖХ

Метод	Тип производного	Количество анализируемого образца	Моносахаридный состав, моль/моль Man		
			Gal	Man	GlcNAc
ГЖХ	Триметилсилиловые эфиры метилгликозидов	100 пмоль	2,9	3,0	4,4
ВЭЖХ	АМК-сахара	100 пмоль	2,9	3,0	4,3
	Вычислено		3	3	5

опробованы нами и показали хорошие результаты. В дальнейшем они использовались в аналитической методике определения моносахаридов в виде их АМК-производных (см. «Экспериментальную часть»).

Разработанная таким образом методика количественного и качественного определения моносахаридов в виде их АМК-производных была опробована нами при определении моносахаридного состава гликопептида $(\text{GalGlcNAc})_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ (XI) (рисунок в), полученного в результате гидролиза асиалофетуина проназой как описано в работе [24]. Параллельно моносахаридный состав этого гликопептида определяли с помощью ГЖХ триметилсилиловых эфиров метилгликозидов [22]. Из табл. 4 видно, что оба метода дают хорошо согласующиеся результаты, близкие к теоретическим. Однако чувствительность описываемого в данной работе метода на 2,5–3 порядка выше.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что превращение сахаров в их АМК-производные и последующий их анализ с помощью ВЭЖХ позволяют с высокой чувствительностью анализировать моносахаридный состав гликоконъюгатов.

Экспериментальная часть

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Beckman Acta-M VI; спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре Hitachi MPF-3, при определении квантовых выходов — на спектрофлуориметре Aminco SPF-1000 CS; квантовый выход измеряли относительно стандарта (сернокислый хинин, $\lambda_{\text{всв}} 455 \text{ нм}$, $Q 0,55$) по описанному методу [20]. Спектры $^1\text{H-NMR}$ (δ , м.д.) сняты на приборе Varian CS-300 (300 МГц) в $\text{DMSO-}d_6$ с тетраметилсилиолом в качестве стандарта.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель L 40–100 мкм (Chemapol, СССР), гель-хроматографию осуществляли на биоэле P-2, 100–200 меш (Bio-Rad, США), ТСХ — на силикагельных пластинках DC — Alufolien Kieselgel 60, Art. 5553 (Merck) в системах растворителей хлороформ — метанол, 3:1 (А), хлороформ — метанол — ацетон, 1:1:1 (Б), *n*-бутанол — изопропанол — вода, 3:5:4 (В), *n*-бутанол, насыщенный водой (Г). Обнаружение зон осуществляли облучением УФ-светом, опрыскиванием 5% серной кислотой в метаноле с последующим прогреванием при 150°С.

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Du Pont 8800, снабженном точным флуориметром FS 970 (Shoeffel) и интегратором Du Pont SP 4100, на аналитических колонках (4,6×250 мм) Zorbax NH₂ (Du Pont) в смеси ацетонитрил — вода (20:1) при 20°С (условия Д) Zorbax C₈ (Du Pont) в смеси метанол — вода (3:1) при 20°С (условия Е) и Ultrasphere ODS (Altex) в 17,5% водном этаноле, содержащем 0,1% трифторуксусной кислоты, рН 2,5–2,6, при 26°С (условия Ж).

ГЖХ осуществляли как описано ранее [22].

Растворители и жидкие реактивы. Использовался свежеприготовленный трихлорэтиленат (кварцевая посуда). Метанол очищали перегонкой с последующим абсолютированием перегонкой над метанолом магния. Этанол (технический) абсолютировали перегонкой над оксидом кальция. Пиридин очищали двукратной перегонкой сначала над гидроксидом натрия, затем над оксидом бария. Ацетонитрил для ВЭЖХ — коммерческий препарат (Merck, ФРГ). Уксусную кислоту очищали вымораживанием (ледяная вода) с последующей перегонкой, уксусный ангидрид — однократной перегонкой, трифторуксусную кислоту — перегонкой в посуде из боросиликатного стекла коммерческого реактива марки ч. Соляную кислоту марки ос. ч. дополнительно очищали перегонкой в посуде из боросиликатного стекла.

Моносахариды: *D*-галактоза, *D*-глюкоза, *D*-манноза, *L*-фукоза, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин (Sigma, США), 2-дезоксид-*D*-галактоза и 2-дезоксид-*D*-глюкоза (Chemapol, СССР) использовались без дополнительной очистки.

2,5-Ангидро-*D*-манноза получена: а) из солянокислого глюкозамина действием азотистой кислоты и очищена как описано [23]; б) синтезирована из бензил-2-ацетамидо-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозидов путем *N*-дезацетилирования гидразином с последующим дезаминированием как описано [24].

7-Амино-4-метилкумарин (АМК) синтезировали из *m*-аминофенола согласно [25], очищали двукратной кристаллизацией из изопропанола с последующей кристаллизацией из метанола, т. пл. 230°С; хроматографически чистый (ВЭЖХ, условия Д–Ж). Без заметных изменений хранится в темной плотно закрытой склянке в течение длительного времени.

N-(4-Метилкумарин-7-ил)гликамина (АМК-сахара, I–X). 100 мкмоль моносахарида и 200 мкмоль АМК растворяли в 3 мл 1,3% раствора уксусной кислоты в метаноле, выдерживали 2 ч при 40°С, добавляли 13 мг (200 мкмоль) NaCNBH_3 и выдерживали 18–20 ч при 40°С. Затем добавляли 3 мл уксусной кислоты, упаривали в вакууме, борную кислоту удаляли упариванием в вакууме с метанолом (3×3 мл). Остаток хроматогра-

фирировали на силикагеле, колонка (3,5×22 см) уравновешена в смеси хлороформ — метанол (3:1). АМК элюировали смесью хлороформ — метанол (3:1), АМК-сахар — смесью хлороформ — метанол (2:1). Зоны АМК и АМК-сахаров обнаруживали на колонке при облучении УФ-светом. Дополнительно АМК-сахара очищали хроматографией на биогеле Р-2, элюируя водой; элюаты, содержащие АМК-сахар, упаривали до небольшого объема и лиофилизировали. Полученные в результате светло-желтые порошки сушили в вакууме над пятиокисью фосфора, после чего их анализировали и исследовали спектральными методами. Выходы АМК-сахаров составляли 70—80% для нейтральных гексоз, 50—55% для аминсахаров и 80—90% для фукозы. Вещества хорошо растворимы в воде, метаноле, длительное время (более года) хранились без заметного разложения в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора при 4° С. АМК-сахара практически не изменялись в течение длительного времени (~ год) в метанольном растворе при 4° С.

Гликопептид (GalGlcNAc)₃Man₃GlcNAc₂Asn (XI) получали из фетуина фетальной сыворотки телянка (Calbiochem) после десалирования 0,05 М Н₂SO₄ (80° С, 1 ч), исчерпывающего проназного гидролиза и выделения гель-хроматографией соответственно [24].

Определение моносахаридного состава (аналитическая процедура)

Гидролиз [14]. 1—0,05 нмоль анализируемого образца олигосахарида, гликопротеина или гликопептида в растворе (в воде или водном спирте) помещали в ампулу (свежеприготовленная из боросиликатного стекла) объемом ~100 мкл, добавляли 0,5—0,025 нмоль N-ацетилманнозамина (водный раствор, внутренний стандарт). Содержимое ампулы упаривали при 20° С в вакууме. К остатку добавляли 25 мкл 4 М трифторуксусной кислоты и 25 мкл 4 М НСl. Полученный раствор замораживали жидким азотом, ампулу вакуумировали, заполняли азотом и размораживали; процедуру повторяли 3—4 раза, после чего ампулу вакуумировали (30—50 мм рт. ст.) и отпаивали. Полученную запаянную ампулу выдерживали 6—7 ч при 100° С, затем охлаждали до 20° С, вскрывали, содержимое упаривали в вакууме при 20° С. Остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора и гидроокисью калия в течение ночи.

Ре-N-ацетилирование [26]. Содержимое ампулы растворяли в 50 мкл абс. MeOH, добавляли 1 мкл пиридина и 5 мкл уксусного ангидрида. Через 20 мин смесь упаривали в вакууме при 20° С и остаток сушили в вакууме над пятиокисью фосфора.

Превращение в АМК-сахара. К высушенному в ампуле остатку добавляли 30 мкл (660 пмоль) насыщенного раствора АМК в 0,06% растворе уксусной кислоты в метаноле и 20 мкл 0,32 М NaCNBH₃ в метаноле. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом, заполняли ампулу азотом как описано выше, запаивали, выдерживали 18 ч при 40° С, затем охлаждали до 20° С, вскрывали, добавляли 10 мкл уксусной кислоты и упаривали досуха в вакууме при 20° С. Борную кислоту удаляли 2—3-кратным упариванием с метанолом в вакууме при 20° С. К остатку добавляли 30 мкл воды, осторожно встряхивали, нерастворившийся осадок АМК отделяли центрифугированием. Из надосадочной жидкости отбирали аликвоту (0,5—5 мкл) для анализа ВЭЖХ (условия Ж, табл. 1).

Количественное определение моносахаридов в анализируемом образце. Параллельно с анализируемым образцом описанным выше обработкам (гидролиз, ре-N-ацетилирование и превращение в АМК-сахара) подвергали смесь моносахаридов, содержащую глюкозу, галактозу, маннозу, фукозу, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилманнозамин (по 0,1 нмоль каждого). Из результатов ВЭЖХ стандартной смеси* (условия Ж) определяли пересчетные коэффициенты k_x для каждого

* Использовалась программа интегратора для обсчета по методу внутреннего стандарта.

моносахарида (X) по соотношению $k_x = \frac{S'_{\text{ManNAc}}}{S'_x}$,

где S'_{ManNAc} — площадь пика АМК-ManNAc, S'_x — площадь пика АМК-X.

Из результатов ВЭЖХ * анализируемого образца определяли содержания каждого моносахарида по формуле

$$Q_x = Q_{\text{ManNAc}} \cdot k_x \frac{S_x}{S_{\text{ManNAc}}},$$

где Q_x — количество определяемого моносахарида (нмоль), Q_{ManNAc} — количество N-ацетилманнозамина, взятого в качестве внутреннего стандарта (нмоль), S_x — площадь пика АМК-X на хроматограмме анализируемого образца, S_{ManNAc} — площадь пика внутреннего стандарта (АМК-ManNAc).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang W. T., Le Donne, Jr., N. C., Ackerman B., Sweely C. C. *Anal. Biochem.*, 1984, v. 141, № 2, p. 366–381.
2. Rosenfelder G., Morgelin M., Chang J.-Y., Schonenberger C. A., Braun D. G., Towbin H. *Anal. Biochem.*, 1985, v. 147, № 1, p. 156–165.
3. Awigad G. J. *Chromatogr.*, 1977, v. 139, № 2, p. 343–347.
4. Hase S., Hara S., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, № 1, p. 217–220.
5. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 85, № 4, p. 989–994.
6. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, v. 85, № 4, p. 995–1002.
7. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1981, v. 90, № 2, p. 407–419.
8. Hase S., Okawa K., Ikenaka T. *J. Biochem.*, 1982, v. 91, № 2, p. 735–737.
9. Hase S., Fujimura K., Kano M., Ikenaka T. *J. Biochem.*, 1982, v. 92, № 1, p. 265–270.
10. Omichi K., Ikenaka T. *J. Chromatogr.*, 1982, v. 230, № 2, p. 415–419.
11. Omichi K., Ikenaka T. *J. Biochem.*, 1983, v. 93, № 4, p. 1055–1060.
12. Hase S., Ibuki T., Ikenaka T. *J. Biochem.*, 1984, v. 95, № 1, p. 197–203.
13. Omichi K., Ikenaka T. *J. Chromatogr.*, 1984, v. 336, № 2, p. 368–373.
14. Jakemoto H., Hase S., Ikenaka T. *Anal. Biochem.*, 1985, v. 145, № 2, p. 245–250.
15. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 85, № 1, p. 257–263.
16. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. *J. Biochem.*, 1981, v. 90, № 5, p. 1275–1279.
17. Masashi K., Zensaku Y. *J. Biochem.*, 1982, v. 92, № 1, p. 295–303.
18. Prakash C., Vijay I. K. *Anal. Biochem.*, 1983, v. 128, № 1, p. 41–46.
19. Вест В. В. кн.: Применение спектроскопии в химии/Ред. Вест В. М.: Мир, 1959.
20. Юденфренд С. В. кн.: Флуоресцентный анализ в биологии и медицине/Ред. Мейсель М. Н., Варшавский Я. М. М.: Мир, 1965, с. 26–29.
21. Finne J., Krusius T. *Meth. Enzymol.*, 1982, v. 83, p. 269–277.
22. Александра Т. В., Мурзалинова М. Н., Шилян С. Д., Хорлин А. Я. *Биохимия*, 1984, т. 49, № 1, с. 93.
23. Horton D., Philips K. D. In: *Methods in Carbohydr. Chem./Eds Whistler R. L., BeMiller J. H. N. Y.—L.: Acad. Press, 1976, v. VII, p. 68–70.*
24. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. *Carbohydr. Res.*, 1973, v. 29, № 2.
25. Zimmerman M., Yurewicz E., Patel C. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 70, № 1, p. 258–262.
26. Kozulic B., Ries B., Mildner P. *Anal. Biochem.*, 1979, v. 94, № 1, p. 36–39.

Поступила в редакцию 17.11.1986

FLUORESCENT DERIVATIVES OF CARBOHYDRATES IN STRUCTURAL STUDIES OF GLYCOCONJUGATES. N-(4-METHYLCOUMARIN-7-YL)GLYCAMINES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND USE IN CARBOHYDRATE ANALYSIS

KHORLIN A. Ya., SHIYAN S. D., MARKIN V. A., NASONOV V. V., MIRZAYANOVA M. N.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A method for determining the monosaccharide composition of glycoconjugates is proposed that involves derivatization of the monosaccharides released on acid hydrolysis into N-(4-methylcoumarin-7-yl)glycamines (AMC-sugars) and their subsequent analysis by reverse-phase HPLC with fluorimetric quantitation. The authentic AMC-sugars were prepared by reductive N-alkylation of 7-amino-4-methylcoumarin with the following monosaccharides in the presence of NaCNBH_3 : D-Glc, D-Gal, D-Man, L-Fuc, D-GlcNAc, D-GalNAc, D-ManNAc, 2-deoxy-D-Glc, 2-deoxy-D-Gal, and 2,5-anhydro-D-Man. These AMC-sugars were shown to have practically the same spectral characteristics: $\epsilon_{365} 19 \pm 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} 365/440 \text{ nm}$ (EtOH), the quantum yield of fluorescence about 0,9. The detection level of AMC-sugars was found to be up to 1 pmole on TLC and 0,05 pmole in HPLC analyses. A procedure was described for the monosaccharide analysis of 0,05–1,0 nmoles of glycoproteins, glycopeptides or oligosaccharides involving hydrolysis with 2 N HCl – 2 N TFA, derivatization and HPLC analysis.