



УДК 547.917.577.114.3.577.114.5.577.1088

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ ДЛЯ АНАЛИЗА МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ

© 2003 г. Н. В. Шилова, Н. В. Бовин<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 19.02.2002 г. Принята к печати 03.06.2002 г.

Описаны разнообразные флуорофоры, применяемые для улучшения хроматографического или электрофоретического разделения, увеличения чувствительности детекции в анализе восстанавливающих моно- и олигосахаридов. Рассматриваются также сложные бимодальные метки, несущие кроме флуоресценции дополнительные функции.

*Ключевые слова:* ВЭЖХ; моносахариды, олигосахариды; электрофорез; флуоресценция.

### СОДЕРЖАНИЕ

Введение.

1. Метки, вводимые реакцией восстановительного аминирования.
  2. Метки, вводимые с помощью гидразидов сульфо- и карбоновых кислот.
  3. Другие метки.
  4. Бимодальные метки.
- Заключение.

### ВВЕДЕНИЕ

Углеводные цепи гликопротеинов и гликолипидов выполняют множество разнообразных функций на поверхности клетки – от регулировки гидрофильности белка до высокоспецифических рецепторных взаимодействий [1]. В рамках современной гликобиологии недавно сформулирована еще одна “омика”, а именно гликомика [2], которая ставит два типа задач. Первый – это высокоэффективное определение структуры углеводных цепей гликоконъюгатов, второй – изучение функциональных свойств таких белков, как лектины и гликозилтрансферазы, с помощью углеводных зондов. Поскольку многие из функционально значимых олигосахаридов – углеводных цепей гликопротеинов и гликолипидов – встречаются в исчезающе малых количествах, а их гетерогенность, особенно в гликопротеинах, очень велика, требуются все более совершенные методы их разделения и анализа, превосходящие нынеш-

ние как по чувствительности, так и по селективности, – это справедливо для обоих типов упомянутых выше задач. Одним из наиболее действенных путей повышения чувствительности и, одновременно, улучшения селективности разделения сахаридов является введение в них флуоресцентных заместителей по восстанавливающему концу. Флуоресцентное мечение хорошо сочетается с такими методами разделения сахаридов, как ТСХ, ВЭЖХ, ионообменная жидкостная хроматография, а также с различными вариантами электрофореза, включая капиллярный. В литературе последних лет прослеживается тенденция увеличения разнообразия и сложности используемых флуоресцентных меток. Очевидно, что каждый метод разделения ставит определенные требования к метке, так, например, для электрофоретических подходов нужна заряженная метка, а для ВЭЖХ – гидрофобная. Цель данного обзора – систематизация флуоресцентных меток, используемых для модификации углеводных цепей, с учетом особенностей методов разделения и поставленной общей задачи исследования.

### 1. МЕТКИ, ВВОДИМЫЕ РЕАКЦИЕЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО АМИНИРОВАНИЯ

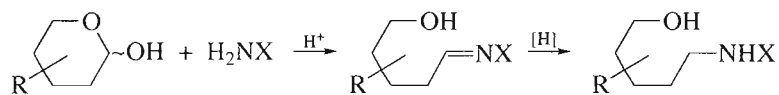
Прежде всего следует отметить, что реальная возможность получить восстанавливающие сахараиды путем выделения из природного образца существует только в случае *N*-цепей гликопротеинов – их отщепляют от полипептидной цепи химически или ферментатически, а также если углеводы присутствуют в объектах в свободном виде (например, олигосахариды молока). Для *O*-цепей гликопротеинов не существует общего метода хи-

Сокращения: КЭ – капиллярный электрофорез; ПАГЭ – полиакриламидный гель-электрофорез; ТСА – трихлоруксусная кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-71-38; факс: (095) 330-55-92; эл. почта: bovin@carb.soibc.ras.ru).

мического отщепления, приводящего к восстанавливающим олигосахаридам с удовлетворительным выходом. Энзиматический подход приложим лишь к нескольким коротким олигосахаридам.

В настоящее время самым распространенным способом введения флуорофора в молекулы углеводов является двухстадийный метод восстановительного аминирования (схема 1), который



R – остаток сахара,  
X – флуоресцентная метка

Схема 1. Реакция восстановительного аминирования сахаридов.

Поскольку природные олигосахариды представляют собой сложные смеси нейтральных и заряженных молекул, а одним из распространенных методов разделения сахаридов является электрофорез, то в качестве флуоресцентных заместителей удобно использовать отрицательно заряженные молекулы. Это, в рамках обсуждаемого метода введения метки, как правило, ароматические аминсульфонокислоты, с помощью которых сахариды разделяют и осуществляют их детекцию по флуоресценции (табл. 1, № 1–3). В целом, при использовании такого типа меток, достигается хорошая степень разделения и высокая (пикомоли) чувствительность. Здесь следует отметить работу [6], в которой для проведения предварительного анализа структуры неизвестных сахаридов, меченных ANTS\*, был разработан метод двумерного картирования. Он заключается в разделении стандартной смеси ранее охарактеризованных флуоресцентномеченных олигосахаридов двумя разными способами (в данном случае ВЭЖХ на колонке с NH<sub>2</sub>-фазой и высокоэффективным ПАГЭ). Далее полученные времена удерживания и/или относительные миграционные индексы наносятся на двумерную “карту”. Затем, после разделения смеси неизвестных сахаридов в тех же условиях путем сравнения полученной картины с картой стандартной смеси, можно сделать выводы о составе смеси и структуре неизвестных олигосахаридов. Восстановительное аминирование сахаридов аминсульфонокислотами характеризуется высокими выходами (до 95% [7]), однако отмечено, что *N*-ацетилгалактозамин и *N*-ацетилглюкозамин реагируют существенно хуже остальных моносахаридов (выходы не более 40% [7]).

В работе [9] был предложен метод анализа *N*-связанных гликанов, основанный на дегликозилировании пикомолярного количества гликопротеинов с последующим флуоресцентным мечени-

основан на восстановлении основания Шиффа, образующегося при взаимодействии альдегидной группы сахара с амином. В качестве восстанавливающего агента чаще всего используют цианборгидрид натрия, поскольку с его помощью можно избирательно восстановить основание Шиффа в присутствии альдегида [3]. Другие восстановители используются реже.

ем образующихся сахаридов APTS и очисткой продуктов на сефадексе G-10, проводимый в 96-луночном планшете. Интересно отметить, что объем реакционной смеси на стадии мечения составлял 1 мкл (табл. 1, № 2); при этом, как утверждают авторы работы [9], степень очистки от непрореагировавшего APTS составляла более 95%, а выходы продуктов – более 70%. Анализ полученного набора меченых олигосахаридов проводился методом высокоэффективного электрофореза с использованием ДНК-секвенатора, который позволяет проводить анализ в пикомолярном диапазоне.

Для изучения активности гликозилтрансфераз авторы работ [10, 11] использовали АГА-производные сахаридов с разделением их методом ПАГЭ (табл. 1, № 3). Этот реагент интересен тем, что его конденсацию с углеводами проводят не в кислых (рН 4.0–5.0), а в нейтральных (рН 6.2) условиях, что обусловлено увеличением растворимости АГА с повышением рН.

В качестве флуоресцентных меток используются также и нейтральные молекулы. Заметим, что для высокочувствительного разделения олигосахаридов методами ПАГЭ или КЭ сахарид либо должен иметь собственный заряд, либо электрофоретическая буферная система должна содержать борат-ионы [12]. Например, применяют конъюгацию сиаилированных сахаридов, нейраминовой кислоты и нейтральных моно- и олигосахаридов с 2-аминоакридоном с последующим разделением полученных производных методом ПАГЭ [12–14]. По мнению авторов работы [14], в подобранных ими условиях реакции мечения (табл. 1, № 4) не происходит значительного десиаилирования сахаридов.

Авторы работы [15] использовали 5-аминофлуоресцеин и дансилэтилендиамин (табл. 1, № 5, 6) для анализа углеводных цепей гликопротеинов. Применяли их и для анализа сиаловых кислот, в

\* Полные названия меток и реагентов см. в таблицах.

Таблица 1. Метки, вводимые реакцией восстановительного аминирования\*

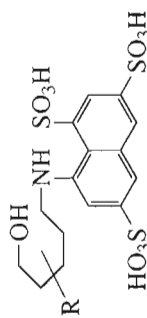
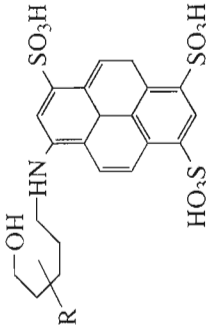
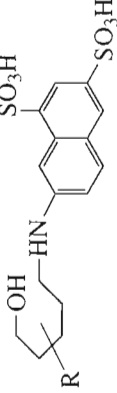
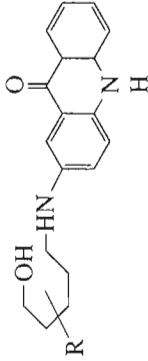
№	Реагент для мечения	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
1	8-Аминонафталин-1,3,6-трисульфонат (ANTS)		353	535	7.2	ПАГЭ + ВЭЖХ (двумерное картирование)	5–10 нмоль сахара + 1 мкмоль метки в 5 мкл смеси АсОН–вода (3 : 17) + 5 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 5 мкл DMSO. 37°C, 15 ч	[4–6]
2	9-Аминопирен-1,4,6-трисульфоновая кислота (APTS)		488	520	19	КЭ	10 нмоль сахара + 200 нмоль метки в 5 мкл 4,2 М АсОН + 4 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 4 мкл THF. 75°C, 1 ч. В случае сиалированных сахаридов – 2 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . 37°C, 15 ч. Гель-фильтрация на биогеле G-10. Выход: >95%	[7]
3	7-Амино-1,3-нафталиндисульфовая кислота (AGA)		250	420	4.2	ПАГЭ	50 нмоль сахара + 200 нмоль метки в 2 мкл 0,9 М растворе лимонной кислоты в DMSO + 1 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 1 мкл THF. 55°C, 2 ч. Выход: количественный	[8]
4	2-Аминоакридон (АМАС)		488	525	5.2	ПАГЭ	1 нмоль углеводов + 1 мкл смеси, содержащей 10 нмоль метки и 0,5 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 1,2 М лимонной кислоте в DMSO. 37°C, 18 ч. Гель-фильтрация на биогеле G-10. Выход: >70%	[9]
							3,5 мкмоль углеводов + 750 мкл 50% метки в воде, pH 6,2 (8,3 в случае сиалированных сахаридов). 80°C, 1 ч. Затем + 16 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . 65°C, 12 ч. Диализ. Выход: 50–80%	[10, 11]
							3,5 мкмоль сахара + 750 мкл 50% метки в воде, pH 6,2–80°C, 2 ч. Затем + 16 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . 70°C, 12 ч. После этого + еще 16 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ и 70°C, 12 ч. Гель-фильтрация на биогеле P2	[12]
							5 нмоль – 5 мкмоль сахара + 0,5 мкмоль метки в 5 мкл смеси АсОН–DMSO (3 : 17) + 5 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 5 мкл воды. 37°C, 15 ч	[12, 13]
						КЭ	1–5 нмоль сахара в воде + 5 мкмоль метки в 5 мкл смеси АсОН–DMSO (3 : 17) + 40 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 10 мкл воды. 90 мин, 90°C	[14]

Таблица 1. Продолжение

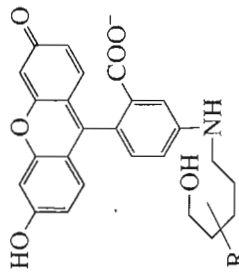

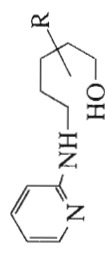
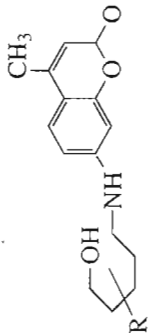
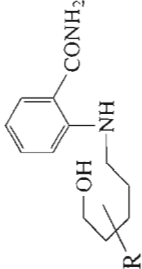
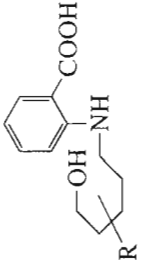
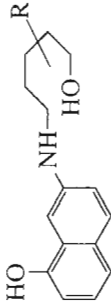
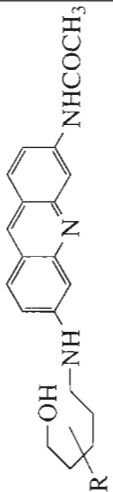
№	Реагент для мечения	Продукт мечения	$\lambda_{\text{ex}}$ , нм	$\lambda_{\text{em}}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
5	5-Амино-флуоресцеин		495	520	80	КЭ	0.5–2.5 мкмоль олигосахаридов + 20 мкмоль метки в этаноле + 200 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в этаноле. 20°C, 15–30 мин. После этого +200 мкмоль $\text{NaBH}_4$ в 0.1 М $\text{NaOH}$ . 20°C, 15–30 мин, потом $\text{AcOH}$ до pH 5.0 и диализ	[15, 16]
6	Дансилэтилен-диамина		340	500	4.6	КЭ	1–10 мкмоль сахара в воде + 0.2 мкмоль метки в 80 мкл метанола, 0.1 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ и $\text{AcOH}$ до 30%. 75°C, 3–7 ч. Очистка на Dowex 50 x 2. Выход: 80–90%	[17, 18]
7	2-Аминопиридин (2-AP)		320	400	4.2	ВЭЖХ	2–25 мкмоль сахара + 0.9 мкмоль метки в 500 мкл метанола + 40 мкл $\text{AcOH}$ . 100°C, 20 мин. Затем +0.3 мкмоль $\text{NaBH}_3\text{CN}$ в 500 мкл метанола. 100°C, 3 ч. Очистка на Diopex 50  ~10 нмоль олигосахаридов + 2.3 мкмоль метки в $\text{AcOH}$ . 60 мин, 90°C. Затем +10 мкл 20%-ого боран-пиридинового комплекса и 80°C, 80 мин. Удаление восстановителя упариванием с метанолом; re-N-ацетилирование	[19]  [20]
							0.05–50 нмоль сахара + 12 мкмоль метки в 10 мкл смеси $\text{AcOH}$ : вода, 1:10 (pH 6.8), 90°C, 1 ч. После этого +70 мкл 1.5% диметилборанового комплекса в смеси вода– $\text{AcOH}$ , 5:8 и 80°C, 35 мин. Гель-фильтрация на TSK-геле	[21, 22]

Таблица 1. Окончание

№	Реагент для мечения	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, M^{-1} \text{ см}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
8	7-Амино-4-метилкумарин (АМС)		365	440	18	ТСХ	1 нмоль сахаридов + 3 мкмоль метки в метаноле, с 4% АсОН 2 ч, 40°C. +5 нмоль NaBH <sub>3</sub> CN в 50 мкл метанола. 40°C, 18 ч. Очистка на АГ501. Выходы: >20%; в препаративном синтезе – 50–60%	[25]
9	2-Аминобензамид (2-АВ)		356	450	–	ВЭЖХ	10 нмоль сахаридов + 0.7 нмоль метки в 50 мкл смеси DMF–вода, рН 6.2 (АсОН) 1 : 1, 40°C, 4 ч, затем + 1 мкмоль NaBH <sub>3</sub> CN в 2 мкл метанола и 40°C, 1 сут. Выход: ~95%	[26, 27]
10	2-Аминоантраиловая кислота (2-АА)		330	420	–	Гель-фильтрация, ПАГЭ	25–500 пмоль сахараида + 0.75 мкмоль метки в смеси DMSO–АсОН (30 : 1) + 5 мкмоль NaBH <sub>3</sub> CN в том же растворителе. 60–65°C, 2 ч. Очистка на целлюлозном диске. Выходы: до 89%	[28–30]
11	7-Амино-1-нафтол		240	>320	5.9	ВЭЖХ	2.5 мкмоль углеводов + 12.5 мкмоль метки в 50 мкл DMSO. 105°C, 30 мин. Затем + 77 мкмоль NaBH <sub>3</sub> CN в 50 мкл метанола, содержащего 10% АсОН. 105°C, 2.5 ч. Выходы: более 90%	[31]
12	3-(Ацетиламино)-6-аминоакридин (АА-Ас)		442	525	–	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС	10 нмоль сахараида + 500 нмоль метки в 20 мкл смеси DMSO–АсОН (17 : 3) и +0.1 мкмоль NaBH <sub>3</sub> CN в 10 мкл того же растворителя. 80°C, 30 мин или 70°C, 2 ч.	[32]

\* Величины молярного поглощения – согласно [33].

которых предварительно генерировали альдегидную группу по реакции окисления  $\alpha$ -диольной группировки Neu5Ac периодатом. Отмечено, что углеводные производные дансилэтилендиамина (алифатического амина) более стабильны по сравнению с производными 5-аминофлуоресцеина (ароматического амина), а степень мечения выше, и объясняют это тем, что для более полного протекания реакции с ароматическими аминами, требуется большее время реакции, чем с алифатическими [15]. Помимо анализа олигосахаридного состава, 5-аминофлуоресцеиновые производные углеводов широко используются для изучения активности гликозидаз с использованием ПАГЭ. Скорость отщепления углеводных остатков контролируют по скорости увеличения интенсивности полосы высвобождаемого в ходе реакции флуоресцеина [16].

Для разделения и анализа нейтральных олигосахаридов с различной степенью полимеризации методом КЭ иногда применяют 2-аминопиридин [17, 18].

Следует отметить, что ПАГЭ и КЭ чаще всего используют как методы разделения/детекции при изучении активности гликозидаз с использованием флуоресцентномеченых моно-, ди-, три- и тетрасахаридов, а также для разделения смесей олигосахаридов, выделенных из природных объектов. Однако есть работы, в которых разработаны чувствительные методики и для установления моносакхаридного состава олигосахаридов указанными методами [8, 18].

Большое количество работ посвящены разделению и анализу 2-аминопиридиновых производных сахаридов с использованием метода ВЭЖХ (табл. 1, № 7). Условия введения 2-АР в молекулу олигосахаридов значительно разнятся от работы к работе: меняется восстановитель, продолжительность и температура реакции, соотношение реагентов [17–24]. Почти во всех работах рекомендуется очистка продукта от избытка исходных реагентов, что не всегда удобно, особенно при анализе микроколичеств вещества. В виде 2-АР-производных проанализировано огромное количество олигосахаридов, выделенных из природных источников [21]. Было охарактеризовано много новых нейтральных и сиалоолигосахаридов; разработаны методы не только двумерного [22, 23], но и трехмерного картирования аминокридиноновых производных олигосахаридов [24]. В качестве независимых методов для двумерного картирования в работе [22] использовали разделение высокоэффективным КЭ и ВЭЖХ на  $C_{18}$ -фазе. В работе [23] разделение осуществляли ВЭЖХ на двух разных колонках – с фазой  $C_{18}$  и аминокридиноновой. Двумерное картирование позволяет разделить нейтральные сахариды, а также определить их размер. Трехмерное картирование про-

водят на трех колонках:  $C_{18}$ ,  $NH_2$  и DEAE [23]; колонка с DEAE-фазой позволяет легко отделить сиалосодержащие олигосахариды и определить степень сиалилирования каждого из них, что существенно расширяет возможности метода.

В работе [25] представлены первые попытки использования АМС (табл. 1, № 8) для флуоресцентного мечения углеводов. Авторы показали, что по чувствительности эта метка сравнима с радиоактивным мечением, а также, что квантовый выход флуоресценции соответствующих углеводных производных существенно выше, чем у 2-АР-производных [25]. Однако методика мечения не была оптимизирована, и выходы меченых сахаридов не превышали 60%. В продолжение этой работы, А.Я. Хорлин и др. [26] подобрали оптимальные условия мечения с помощью АМС и достигли высоких выходов меченых продуктов. Это позволило использовать АМС-метку не только для высокочувствительного определения моносакхаридного состава углеводных цепей гликопротеинов методом ВЭЖХ [26], но и для выделения и характеристики новых олигосахаридов [27].

Используют также мечение производными анилина – 2-АВ и 2-АА (табл. 1, № 9, 10). Методики введения метки схожи, причем, как утверждают авторы работы [28], в ходе реакции не наблюдается заметного десилилирования и дефукозилирования, а выходы меченых продуктов высоки. 2-АВ-метка больше подходит для анализа олигосахаридов методами ВЭЖХ [28–30] и масс-спектрометрии [28], в то время как для 2-АА-производных предпочтительнее электрофорез, так как 2-АА отрицательно заряжена [28].

Авторы работы [31] провели сравнение свойств 2-аминопиридина и 7-амино-1-нафтола в качестве метки (табл. 1, № 11). Показано, что восстановительное аминирование маннозных олигомеров 7-амино-1-нафтолом проходит существенно лучше, так как образующееся основание Шиффа полностью восстанавливается цианборгидридом натрия, в случае 2-АР восстановление основания Шиффа проходит не полностью (условия реакции приведены в работе [19]). Кроме того, интенсивность флуоресценции аминаонафтольных производных в 8 раз выше, чем аминокридиноновых, что дает производным 7-амино-1-нафтола преимущество при ВЭЖХ-анализе микроколичеств олигосахаридов [31].

Предложенный в работе [32] АА-Ас, по мнению авторов, является хорошей альтернативой изученному ранее АМАС. АА-Ас реагирует с олигосахаридами в мягких условиях (табл. 1, № 12), образуя устойчивые производные; обладает удвоенным по сравнению с АМАС квантовым выходом флуоресценции [32]. Кроме того, АА-Ас подходит как для ВЭЖХ, так и для электрофореза, а

также для масс-спектрометрического способа идентификации.

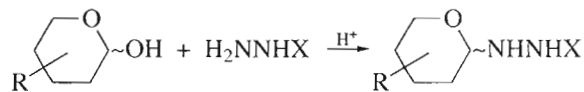
Поскольку метод восстановительного аминирования на сегодняшний день – самый распространенный метод мечения сахаридов, то несомненный интерес представляет вопрос: какая же из используемых меток является наиболее удачной для целей структурного анализа олигосахаридов? Систематическое экспериментальное сравнение сразу нескольких меток в литературе отсутствует. Как правило, сравнивают только два типа производных. Мы попытаемся на основании разрозненных данных сделать некоторое обобщение, рассматривая следующие критерии: флуоресцентные свойства, способность к разделению сложных смесей соответствующих производных олигосахаридов методом ВЭЖХ, выходы при мечении, а также легкость отделения избытка реагента и стабильность меченого продукта.

Наиболее популярный 2-АР, как ни парадоксально, далек от идеальной метки. Так, его молярное поглощение в 5 раз ниже, чем у АМС, и в 20 раз, чем у 5-аминофлуоресцеина [33]; кроме того, незначительная гидрофобность 2-АР-метки не лучшим образом способствует разделению сложных смесей олигосахаридов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Популярность 2-АР-метки можно объяснить легкостью отделения реагента от меченых олигосахаридов (это облегчает последующее хранение и разделение), а также тем, что она была применена одной из первых и далее использовалась традиционно, а многие производные сейчас коммерчески доступны как хроматографические стандарты. С другой стороны, производные 5-аминофлуоресцеина, рекордные по интенсивности флуоресценции и удачные в смысле разделения сложных олигосахаридов, оказались нестабильными. Наиболее гидрофобные метки, такие, как АМАС, приходится вводить в DMSO, что методически неудобно. Общим недостатком всех реагентов, вводимых восстановительным аминированием, является низкий выход при мечении 2-амино-2-дезоксахаридов.

По-видимому, оптимальной из описанных меток является АМС, хотя и она далека от идеальной.

## 2. МЕТКИ, ВВОДИМЫЕ С ПОМОЩЬЮ ГИДРАЗИДОВ СУЛЬФО- И КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Взаимодействие углеводов с гидразидами сульфо- и карбонных кислот катализируется кислотами и протекает по следующей схеме (схема 2):

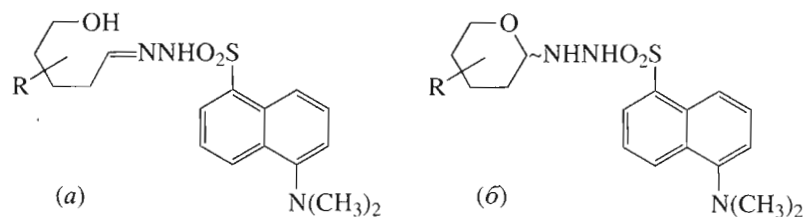


R – остаток сахара,  
X – остаток флуоресцентной карбоновой или сульфокислоты

**Схема 2.** Реакция взаимодействия углеводов с гидразидами сульфо- и карбонных кислот.

В ходе реакции образуется относительно устойчивый циклический *N*-гликозид, не требующий дополнительного восстановления.

В работах [34–38] использовали Dns-NHNH<sub>2</sub> (дансилгидразин) (табл. 2, № 1). Введение дансилгидразина в молекулу углевода осуществляется в одну стадию. Условия реакции от работы к работе варьируются незначительно: несколько изменяется соотношение углеводов–Dns-NHNH<sub>2</sub>, меняется растворитель. В то же время температура, время проведения реакции и pH реакционной смеси практически не изменяются и, что существенно, почти во всех работах не требуется дополнительного выделения углеводов производных после проведения реакции, так как при разделении они легко отделяемы от исходного реагента. Выходы меченых производных достигают 79% [37]. Авторы [39] показали, что дансилгидразин в нескольких равновесных формах (схема 3): в ациклической форме основания Шиффа (а) и двух аномерных циклических формах с преобладанием β-*N*-пиранозиды (б).



**Схема 3.** Равновесные формы углеводов производных дансилгидразина.

Нужно отметить, что дансилпроизводные могут храниться в виде разбавленных растворов при –20°C в течение 2–3 недель.

Условия синтеза производных DABS-NHNH<sub>2</sub> (УФ-метка, не флуоресцирует) [39, 40] сходны с

условиями введения Dns-NHNH<sub>2</sub>, за исключением того, что время проведения реакции увеличивается, а pH реакционной смеси несколько ниже (табл. 2, № 2); также отмечается устойчивость получаемых производных (неделя при 4°C [37]).

Таблица 2. Метки, вводимые с помощью гидразидов сульфо- и карбоновых кислот

№	Реагент для метчения	Продукт метчения	$\lambda_{\text{ex}}$ , нм	$\lambda_{\text{em}}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
1	Дансилгидразин (Dns-NHNH <sub>2</sub> )		350	540	4.4	КЭ	18 нмоль сахара в 18 мкл 25 мМ раствора Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> + TFA (2% в реакции) + 180 нмоль метки в 80 мкл этанола. 68°C, 15–18 мин [34]	
2	4- <i>N,N</i> -Диметиламино-4'-азобензол-сульфонилгидразид (DABS-NHNH <sub>2</sub> )		УФ-метка, $\lambda_{\text{max}} = 425$ нм			ТСХ, ВЭЖХ	10–300 нмоль углеводов + 6 мкмоль метки в 100 мкл этанола + TCA в этаноле до 1%. 80°C, 10 мин либо 65°C, 20 мин, очистка пропусканием через C <sub>18</sub> -картридж. Выходы: до 79% [35–37]	
3	9-Флуоренил-метоксикарбонилгидразин (Fmoc-гидразин)		270	320	33.0	ВЭЖХ	0.7 мкмоль сахаридов в 100 мкл 1% водного раствора TCA + 7 мкмоль метки в 50 мкл ацетонитрила. 65°C, 20 мин [38]	
							1–50 нмоль сахара в 1 мл этанола, содержащем 0.1% АсОН + 3 мкмоль метки в 1 мл этанола. 50°C, 120 мин [35] либо 60°C, 60 мин [38] [39, 40]	
							5 пмоль – 50 нмоль сахаридов в 10 мкл этанола + 1 мкмоль метки в 100 мкл ацетонитрила + 110 мкл этанола, содержащего 0.5% АсОН. 65°C, 3 ч. Выходы: до 82% [41, 42]	
							2 нмоль сахара в 10 мкл воды + 2 мкмоль метки в 200 мкл ацетонитрила, pH 4.6 (NaOH и HCOOH). 65°C, 3–16 ч. Выходы: >90% [43]	



Следует отметить, что квантовые выходы флуоресценции дансильных производных углеводов в водных растворах существенно ниже, чем в органических растворителях [40], а квантовый выход флуоресценции производного *N*-ацетилглюкозамина на 72% ниже, чем для глюкозы [39]. Но, несмотря на это, чувствительность флуоресцентного детектирования дансильных производных при использовании ВЭЖХ достигает пикомольного уровня.

Ряд работ посвящен Fmoc-гидразиновым производным (табл. 2, № 3) [41–43]. Отмечаются высокие выходы образующихся производных (свыше 90% [42]) и стабильность (по крайней мере, 1 мес. при 5°C в темноте [42]). Следует отметить, что исследование проводилось исключительно на нейтральных моно- и дисахаридах. Данные по GlcNAc и GalNAc отсутствуют.

### 3. ДРУГИЕ МЕТКИ

В работе [44] для мечения всех присутствующих в образце углеводных остатков по восстанавливающему концу использовали 2-аминотиофенол (табл. 3, № 1). Разработанный подход применяли как качественную реакцию на углеводы в образце, видимо, поэтому авторы остановились на стадии основания Шиффа, не проводя его восстановления.

Для флуоресцентного мечения аминопроизводных сахаридов, также без проведения реакции восстановления, использовали *o*-формилбензойную кислоту [45, 46]. Реакция протекает быстро, поэтому ее применяют в ВЭЖХ для постколоночного мечения разделенных углеводов (табл. 3, № 2).

В работе [47] авторы предлагают новую флуоресцентную метку – Glu-EDANS (табл. 3, № 3). Glu-EDANS вводится по восстанавливающему концу олигосахарида с образованием циклического производного пироглутаминовой кислоты. Реакция проводится в две стадии, требует дополнительных реагентов на стадии циклизации и характеризуется низким (44%) выходом. Кроме того, образующиеся продукты представляют собой смесь аномеров. Работа [47] также интересна тем, что, помимо Glu-EDANS, в эту же молекулу сахара по аминогруппе не восстанавливающего аминосахаридного остатка вводят дополнительную группу в качестве тушителя флуоресценции, такая структура субстрата предложена для изучения активности эндогликозидгидролазы методом ВЭЖХ. Степень гидролиза субстрата определяют по увеличению флуоресценции реакционной смеси вследствие уменьшения степени тушения.

Следует отметить, что введение флуорофора по аминогруппе аминосахаридов также достаточно распространено. Так, в работе [48] гексозамины метили при помощи дансилхлорида (табл. 3, № 4).

Для избирательного мечения аминосахаридов использовали также PDFAc [49] и флуорескамин

[49–51]. Реакция флуоресцентного мечения проходит быстро, условия ее протекания простые (табл. 3, № 5, 6), поэтому она рекомендуется для постколоночной модификации сахаридов в ВЭЖХ. Помимо аминосахаридов, с помощью флуорескамина можно метить и гликозилгидразины [51] (табл. 3, № 7). Следует отметить, что PDFAc и флуорескамин удобны тем, что флуоресценцией обладает только конечный продукт взаимодействия с аминосоединением. Помимо этого, авторы работы [49] провели сравнение свойств этих двух флуорофоров. Оказалось, что производные PDFAc имеют большую устойчивость к тушению флуоресценции по сравнению с флуорескаминами как в кислых, так и в основных условиях (PDFAc-производные в кислой среде теряют 80% интенсивности флуоресценции только через 24 ч, в то время как флуорескаминные уже через 2 ч).

Помимо аминосахаридов, для мечения используют аминоальдитолы, которые получают обработкой олигосахаридов ацетатом аммония в присутствии цианборгидрида натрия. Наиболее часто используемой в этих случаях меткой является СВQCA [52, 53]. Реакция протекает количественно в присутствии цианид-иона (табл. 3, № 7). Следует отметить очень высокую чувствительность обнаружения меченого сахара при использовании КЭ –  $75 \times 10^{-20}$  моль [53]. Такая высокая чувствительность объясняется авторами [53], во-первых, высокой интенсивностью флуоресценции СВQCA, а во-вторых, использованием метода КЭ. Однако к такому низкому пределу обнаружения следует относиться с осторожностью, поскольку эти результаты получены в идеальных условиях модельного эксперимента, которые, как правило, далеки от реальных.

Работа авторов [54] посвящена флуоресцентному мечению 1-*N*-метил-аминоальдитолов с использованием NBD-F. Реакция мечения этим реагентом проходит быстро, в мягких условиях и с хорошими выходами (табл. 3, № 8), но предыдущая стадия – восстановительное *N*-метилирование – требует инертной атмосферы и сухих растворителей, что не очень удобно. Однако, как отмечают авторы, *N*-метилированные производные лучше взаимодействуют с NBD-F [54], чем неметилированные аминоальдитолы.

Для флуоресцентного мечения β-гликозил-аминов, получаемых при обработке сахаридов насыщенным раствором гидрокарбоната аммония, была предложена 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота (табл. 3, № 9). В ходе реакции мечения образуется соответствующий амид с выходом около 90%. Авторы работы [55] отмечают, что интенсивность флуоресценции полученного производного кумариновой кислоты при нейтральных pH примерно в 10 раз выше, чем у 2-амино-

Таблица 3. Другие флуоресцентные метки, используемые в анализе углеводов

№	Реагент для мечения	Форма модифицируемого сахара	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, M^{-1} cm^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
1	2-Аминогидроксибензол			340	470	-	Без разделения	0–5 ммоль сахара в 0.5 мл воды + ~16 мкмоль метки в 0.2 мл воды + 0.5 мл 30% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 150°C, 15 мин	[44]
2	<i>o</i> -Формилбензойная кислота			340	455	-	ВЭЖХ (постколлонная модификация)	85–650 ммоль аминоксахаридов после разделения пропустили через реакторную петлю (30 см), нагретую до 50°C. Элюент: боратный буферный раствор, содержащий 0.08% метки	[45, 46]
3	$\alpha$ -L-Глутамил-5-(2-аминоэтил)амино-1-нафталинсульфонат (Glu-EDANS)			340	490	5.9	ВЭЖХ-МС	0.05 ммоль сахара + 0.1 ммоль метки + 0.2 ммоль имидзола в 0.9 мл DMSO, 60°C, 20 ч. Затем + 0.2 ммоль имидзола и + 0.11 ммоль ВОР*, 60°C, 30 мин. Осаждали CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Выход: 44% (смесь аномеров)	[47]
4	5-Диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид (дансилхлорид, Dns-Cl)			340	500	3.9	ТСХ, ПАГЭ	100 ммоль аминоксахарида в 200 мкл 0.5 М NaHCO <sub>3</sub> + 10 мкмоль метки в 1 мл ацетона, 20°C, 4 ч. Выходы: 33–92%	[48]

Таблица 3. Продолжение

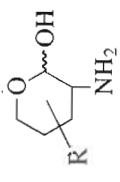
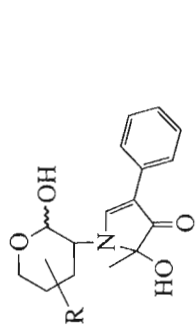
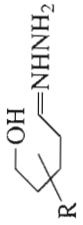
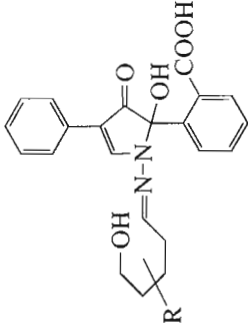
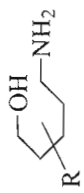
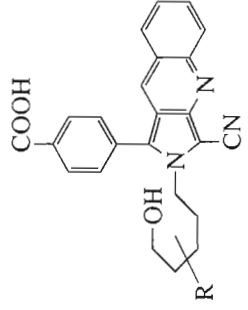
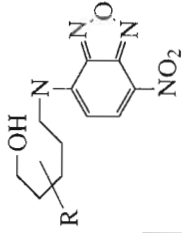
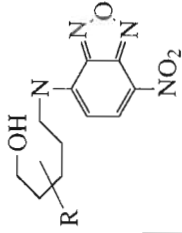
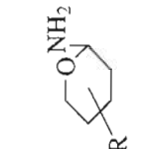
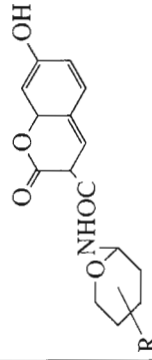
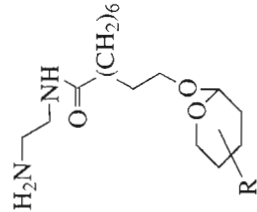
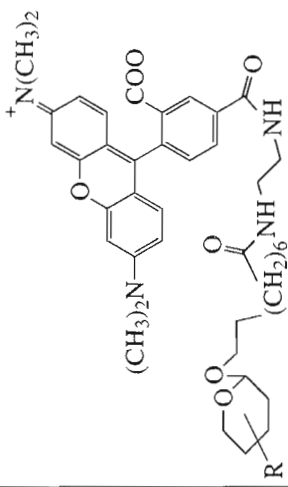
№	Реагент для мечения	Форма модифицируемого сахара	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
5	2-Метил-3-оксо-4-фенил-2,3-дигидрофуран-2-илацетат (PDFAc)			352	>470	-	ВЭЖХ, КЭ	10 пмоль аминоксахарида в фосфатном буферном растворе рН 8-9 + 1 нмоль метки в DMSO. 20°C, 1 ч (или 50°C, 5 мин)	[49]
6	Флуорескамин			400	490	7.8	Без разделения	10 нмоль гликозилгидразинов + 1 мл 100 мМ фосфатного буферного раствора, рН 7.4 и 200 мкл 40 мМ боратного буферного раствора, рН 9.4 + 3.6 мкмоль метки в 1 мл диоксана	[50, 51]
7	3-(4-Карбоксибензоил)-2-формилхинолин (СВQСА)			457	552	-	КЭ	1-1000 пмоль аминокальдитолов + 200-400 нмоль цианида калия в 10-20 мкл воды + 50-100 нмоль метки в 5-10 мкл метанола. 20°C, 1 ч  0.01-100 нмоль аминокальдитолов + 6.2 ммоль метки и цианида калия в 100 мМ фосфатном буферном растворе, рН 8.0. 20°C, 5 ч в темном месте. Выходы: 26-100%	[52]  [53]

Таблица 3. Окончание

№	Реагент для мечения	Форма модифицируемого сахара	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, M^{-1} cm^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
8	7-Нитро-4-фтор-2,1,3-бензоксадиол (NBD-F)			488	520	8.0	КЭ	1 пмоль-1 мкмоль <i>N</i> -метил-аминоальдитолов в 5 мкл 200 мМ боратного буферного раствора, pH 8.0 + 1.5 мкмоль метки в этаноле. 70°C, 5 мин	[54]
9	7-Гидроксикумарин-3-карбоновая кислота			330	450	29.0	ВЭЖХ	22.8 мкмоль $\beta$ -глицозиламина в 50 мкл DMFA + 22.8 мкмоль метки в 50 мкл DMFA + 22.8 мкмоль 1-типроксигензотриазола в 50 мкл DMFA + 22.8 мкмоль НВТУ** в 200 мкл DMFA и +68.4 мкмоль $iPr_2EtN$ . 20°C, 2 ч. Очистка на TSK-геле. Выходы: 80-90%	[55]
10	Сукцинимидат 5-карбок-си- <i>N,N</i> -тетраметилродами-на (SI-TMR)			543	580	92.0	КЭ	1-5 мкмоль амина в 0.185 мМ $NaHCO_3$ , pH 8.5 + 10 мкмоль метки в 0.25 мл DMF. 20°C, 4 ч. Очистка на DEAE-A25, затем на $C_{18}$ -картридже. Выход: 70%	[56-58]

\* ВОР – (бензотриазол-1-илокси)-трис(диметиламино)фосфонийгексафторфосфонат.

\*\* НВТУ – гексафторфосфат *O*-бензотриазол-1-ил-*N,N,N',N'*-тетраметилуруния.

пиридинового производного (ср. табл. 1, № 7) и практически не зависит от растворителя, что выгодно отличает ее от 2-АР-производных. Однако для количественного образования меченого продукта требуется существенное количество веществ (ВОР, НВТУ), способствующих образованию амида, очистка от которых обязательна.

Для изучения гликозилтрансфераз методом КЭ в качестве субстрата часто используют спейсерированные углеводы с терминальной аминогруппой, флуоресцентномеченые SI-TMR [56–58]. SI-TMR применяется в виде активированного сукцинимидного эфира. Реакция протекает с хорошими выходами (до 70%), однако требуется дополнительная очистка образующегося продукта (табл. 3, № 10). Сочетание КЭ с лазерной детекцией флуоресценции приводит к очень высокой чувствительности определения SI-TMR-меченых сахаридов – вплоть до 50–100 молекул [57, 58]. Объем пробы составлял 10–20 пл. Очевидно, что к таким результатам модельного эксперимента, далекого от реальных условий практического определения активности гликозилтрансфераз, следует относиться с осторожностью, как это было отмечено выше в случае с СВҚСА.

#### 4. БИМОДАЛЬНЫЕ МЕТКИ

Стандартные флуоресцентные производные неудобны для функциональных исследований углеводсвязывающих белков, поэтому для таких целей был предложен ряд флуоресцентных меток, имеющих два функциональных фрагмента, т.е. бимодальных меток. Это, во-первых, химически реакционноспособная группа (амины, гидразиды, активированные эфиры и т.д.), и во-вторых, биотин или фотореактивная группа. Ряд работ посвящен бимодальной метке ВАР (табл. 4, № 1), имеющей в своем составе реакционноспособную аминогруппу и остаток биотина [59, 60]. Биотиновый фрагмент метки дает возможность использовать индивидуальные меченые олигосахариды (после разделения в виде авидиновых или стрептавидиновых комплексов) для изучения специфичности лектинов [59, 60]. В то же время ВАР можно использовать и для установления моносахаридного состава олигосахаридов методом ВЭЖХ [59].

Бимодальные метки, имеющие гидразидную группу, представлены в табл. 4, № 2, 3, 4. Фотореактивную метку AzNS-NHNH<sub>2</sub> [61] авторы использовали для изучения активного центра лектинов (табл. 4, № 2). После фотолиза, в ходе которого метка начинает флуоресцировать, и последующего ферментативного расщепления лектина фотомеченые пептиды можно детектировать по флуоресценции. Для изучения лектинов предложены также биотинилированные метки – ВНАН (№ 3, [60]) и ВРН (№ 4, [62]). Авторы отмечают простоту, с которой проходит мечение

сахаридов, а также то, что *N*-гликозид образуется строго в β-конфигурации. Поскольку природные *N*-цепи существуют в β-*N*-гликозидной форме, то такой стереохимический результат дает неоспоримое преимущество при изучении специфичности лектинов. В работе [60] было проведено сравнение свойств ВАР- и ВНАН-меченых сахаридов в связывании с лектинами: в то время как гидразидные производные были активны, некоторые из ВАР-производных вообще не проявили биологической активности, что еще раз подчеркивает выгоду использования гидразидных производных углеводов. Кроме того, отмечается хорошая устойчивость образующихся β-*N*-гликозидов в нейтральной [62] и даже в слабокислой среде [60]. Однако в кислой среде вероятность перехода в ациклическую форму существенно выше и поэтому рекомендуется нейтрализовать кислоту, служащую катализатором, при длительном хранении (очищенные ВНАН-производные стабильны в течение года при –20°С [60]).

В работе [63] использовали бимодальную метку PFBAB. Взаимодействие сахаридов с PFBAB осуществляли без стадии восстановления (табл. 4, № 5), при этом с высокими выходами образовывалось циклическое производное (*N*-пиранозид). Помимо флуоресценции, эта метка обладает свойствами электронной ловушки. Это создает дополнительные преимущества при анализе сахаридов методом ВЭЖХ с использованием масс-спектрометрической детекции (с химической ионизацией отрицательно заряженными ионами) и позволяет достичь фемтомолярного уровня определения [63].

Для введения фотореактивной флуоресцентной метки в молекулу 2-амино-2-дезоксигалактозы использовали AzNS-Cl [64]. Реакция мечения проходит в мягких условиях и характеризуется хорошими выходами (табл. 4, № 6). AzNS-производное 2-амино-2-дезоксигалактозы имело такую же активность при изучении лектинов, что и сама 2-амино-2-дезоксигалактоза. Кроме того, следует отметить, что AzNS-производное начинает флуоресцировать только после проведения фотолиза. Наличие фотореактивной азидной группы позволило авторам идентифицировать пептиды активного центра лектина.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молярные коэффициенты поглощения обсуждаемых меток лежат в интервале  $3.9 \times 10^3$ – $92 \times 10^3$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>, а длины волн возбуждения и эмиссии практически перекрывают весь диапазон – от УФ- до видимой области ( $\lambda_{ex}$ : от 240 до 543 нм,  $\lambda_{em}$ : от 320 до 580 нм). То есть имеется возможность выбрать метку как с заданной длиной волны возбуждения, так и с необходимой интенсивностью флуоресценции.

Таблица 4. Бимодальные метки

№	Реагент для мечения	Форма модифицируемого сахара	Продукт мечения	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, M^{-1} cm^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
1	2-Амино-6-биотинилламинодопириндин (ВАР)			345	400	—	ВЭЖХ, ТСХ	100 нмоль олигосахаридов + 3 мкмоль метки в 10 мкл смеси пиридин-АсОН, 2 : 1, 80°C, 1 ч. Затем + 21 мкмоль диметиламиноборана в 10 мкл того же растворителя. 80°C, 1 ч	[59]
2	1-Азидо-5-нафталинсульфонилгидразид (AzNS-NHNH <sub>2</sub> )			360	480	—	ВЭЖХ	2 ммоль углеводов в 5 мл воды + 1 ммоль метки в смеси диоксан-этанол-10% TSA (25 : 70 : 5), 50°C, 3 ч. Очистка на C <sub>18</sub> -силикагеле	[61]
3	N-Биотинил-3-(1-нафтил)-L-аланилгидразид (BNAH)			УФ-метка, $\lambda_{max} = 275$ нм	—	—	ВЭЖХ, ТСХ	100 нмоль олигосахаридов + 500 нмоль метки в 25 мкл смеси метанол-вода-АсОН, 74 : 8 : 8, 60°C, 5 ч	[59]

Таблица 4. Окончание

№	Реагент для мечения	Форма модифицируемого сахара	Продукт мечения	$\lambda_{\text{ex}}$ , нм	$\lambda_{\text{em}}$ , нм	$(\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Метод разделения	Методика введения метки, выходы меченых производных (если указано)	Литература
4	4-(Биотинамидо)фенилacetилгидразид (ВРН)			УФ-метка, $\lambda_{\text{max}} = 252 \text{ нм}$	-	-	ВЭЖХ	1 нмоль олигосахарида в 10 мкл воды + 3 нмоль метки в 10 мкл 30% ацетонитрила. 90°C, 1 ч. Выходы: более 70%	[62]
5	4-Амино-пентафторбензилбензоат (PFBAВ)			296	350	-	ВЭЖХ-МС	80 нмоль олигосахаридов в смеси метанол-АсОН 1 : 1 + 0.9 мкмоль метки в том же растворителе, 65°C, 20 мин. Выходы: 65-90%	[63]
6	1-Азидо-5-нафталинсульфонилхлорид (AzNS-Cl)			360	480	-	Электрофорез, ВЭЖХ	2.78 ммоль сахара в 20 мл 50% ацетона в 0.2 М карбонате натрия (рН 9.5) + 1.87 ммоль метки в 10 мл ацетона. 20°C, 2 ч. Выход: до 74%	[64]

Кроме того, на основании приведенных данных можно заключить, что гидразиды карбоновых и сульфокислот с химической точки зрения имеют два преимущества перед другими метками: во-первых, условия проведения реакции более практичны, а результаты стабильнее (в частности, выходы одинаковы как для нейтральных, так и для 2-амино-2-дезоксисахаридов); во-вторых, в меченых производных сохраняется пиранозный цикл восстанавливающего звена и  $\beta$ -конфигурация гликозидной связи, что принципиально для последующего использования этих веществ в исследовании углевод-белкового взаимодействия. В то же время такие производные продемонстрировали стабильность, достаточную не только для их разделения и детекции, но и последующего изучения специфичности углеводсвязывающих белков. Таким образом, гидразиды кислот являются, по-видимому, наиболее удачными производными для дальнейшего развития высокочувствительных методов структурного анализа сложных углеводов. Химия присоединения гидразидов к углеводам, т.е. условия реакции, выходы и т.п., практически не зависят от природы реагента, и это позволяет выбрать флуоресцирующую молекулу в  $X-NHNH_2$  в соответствии с особенностями данной конкретной задачи – от структурного анализа олигосахаридов до фото-реактивного мечения белков.

В то же время следует отметить перспективность подхода, объединяющего в себе разделение и идентификацию сложных олигосахаридов (в том числе их библиотек) с их последующим использованием для изучения углеводсвязывающих белков. Миниатюризация методов изучения углевод-белкового взаимодействия приближает их по чувствительности к методам структурного анализа флуоресцентномеченых олигосахаридов. Это открывает возможность такой методической связки, когда пул олигосахаридов (например, отщепленных от доступного в небольшом количестве гликопротеина) флуоресцентно метят, меченые цепи разделяют и идентифицируют, а затем используют для характеристики специфичного к данному гликопротеину лектина в растворе (например, методом поляризации флуоресценции). Наконец, если метка имеет бимодальную природу, то олигосахарид может быть присоединен к полимерной матрице, а полученный мультивалентный зонд использован для изучения лектинов клетки методом проточной цитофлуориметрии.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н. Ю.Г. Молотковскому и м.н.с. В.В. Насонову за участие в обсуждении данной статьи.

Данная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 01-04-48672).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varki A. // *Glycobiology*. 1993. V. 3. P. 97–130.
2. <http://glycomics.scripps.edu>.
3. Borch R.F. et al. // *J. Am. Chem.* 1971. V. 93. P. 2897–2904.
4. Jackson P. // *Biochem. J.* 1990. V. 270. P. 705–713.
5. Jackson P., Williams G.R. // *Electrophoresis*. 1991. V. 12. P. 94–96.
6. Quintero O., Montesino R., Cremata J.A. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 256. P. 23–32.
7. Chen F.-T. A., Evangelista R.A. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. P. 273–280.
8. Chen F.-T. A., Dobashi T.S., Evangelista R.A. // *Glycobiology*. 1998. V. 8. P. 1045–1052.
9. Callewaert N., Geysens S., Molemans F., Contreras R. // *Glycobiology*. 2001. V. 11. P. 275–281.
10. Lee K.B., Desai U.R., Palcic M.M., Hindsgaul O., Linhardt R.J. // *Anal. Biochem.* 1992. V. 205. P. 108–114.
11. Lee K.-B., Al-Hakim A., Loganathan D., Linhardt R.J. // *Carbohydr. Res.* 1991. V. 214. P. 55–168.
12. Jackson P. // *Method Enzymol.* 1994. V. 230. P. 250–253.
13. Jackson P. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 196. P. 238–244.
14. Camilleri P., Harland G.B., Okafo G. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. P. 115–122.
15. Ingham K.C., Brew S.A. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1981. V. 670. P. 181–189.
16. Graig D., Arriaga E.A., Banks P., Zhang Y., Renborg A., Palcic M.M., Dovichi N.J. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 226. P. 147–153.
17. Hase S., Hara S., Matsushima Y. // *J. Biochem.* 1979. V. 85. P. 217–220.
18. Nishabeh W., Rassi Z.E. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 600. P. 279.
19. Reinhold V.N., Coles E., Carr S.A. // *J. Carbohydr. Chem.* 1983. V. 2. P. 1–18.
20. Iwase H., Ishii-Karakasa I., Urata T., Saito T., Hotta K. // *Anal. Biochem.* 1990. V. 188. P. 200–202.
21. Hase S. // *Methods. Mol. Biol.* 1993. V. 14. P. 69–80.
22. Suzuki S., Kakehi K., Honda S. // *Anal. Biochem.* 1992. V. 205. P. 227–236.
23. Takahashi N., Wada Y., Awaya J., Kurono M., Tomiya N. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 208. P. 96–109.
24. Takahashi N. // *J. Chromatography. A.* 1996. V. 720. P. 217–225.
25. Prakash C., Vijay I.K. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 128. P. 41–46.
26. Хорлин А.Я., Мирзаянова М.Н. // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. С. 1203–1212.
27. Шиян С.Д., Насонов В.В., Маркин В.А., Белянчиков И.М. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. С. 1197–1207.
28. Bigge J.C., Patel T.P., Bruce J.A., Goulding P.N., Charles S.M., Parekh R. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. P. 229–238.
29. Chen Y.-J., Wing D.R., Guile G.R., Dwek R.A., Harvey D.J., Zamze S. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 251. P. 691–703.
30. Townsend R.R., Lipniunas P.H., Bigge C., Ventom A., Parekh R. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239. P. 200–207.



31. Coles E., Reinhold V.N., Carr S.A. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 1–11.
32. Charlwood J., Birrell H., Grible A., Burdes V., Tolson D., Camilleri P. // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 1453–1461.
33. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals / Ed. R.P. Haugland. 6<sup>th</sup> ed. // Molecular Probe. 1995. 680 p.
34. Perez S.A., Colon L.A. // Electrophoresis. 1996. V. 17. P. 352–358.
35. Avigad G. // J. Chromatogr. 1977. V. 139. P. 343–347.
36. Eggert F.M., Jones M. // J. Chromatogr. 1985. V. 333. P. 123–131.
37. Muramoto K., Goto R., Kamiya H. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 435–442.
38. Mopper K., Johnson L. // J. Chromatogr. 1983. V. 256. P. 27–38.
39. Hull S.R., Turco S.J. // Anal. Biochem. 1985. V. 146. P. 143–149.
40. Lin J.-K., Wu S.-S. // Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 1320–1326.
41. Zhang R.-E., Cao Y.-L., Hearn M.W. // Anal. Biochem. 1991. V. 195. P. 160–167.
42. Yuh Y.-S., Chen J.-L., Chiang C.-H. // J. Pharm. Biomed. Anal. 1998. V. 16. P. 1059–1066.
43. Rooyackers D.R., van Eijk H.M.H., Deutz N.E.P. // J. Chromatography. A. 1996. V. 730. P. 99–105.
44. Zhu J.-K., Nothnagel E.A. // Anal. Biochem. 1991. V. 195. P. 101–104.
45. Perini F., Sadow J.B., Hixson C.V. // Anal. Biochem. 1979. V. 94. P. 431–439.
46. Perini F., Peters B.P. // Anal. Biochem. 1982. V. 123. P. 357–363.
47. Cottaz S., Brasme B., Driguez H. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 5593–5600.
48. Schulzke J.-D., Tauber R., Reutter W. // Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1988. V. 369. P. 957–964.
49. Chen P., Novotny M.V. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 2806–2811.
50. Osswald W.F., McDonald R.E., Niedz R.P., Shapiro J.P., Mayer R.T.F. // Anal. Biochem. 1992. V. 204. P. 40–46.
51. Chen F., Liu Y., Lu J., Hwang K.J., Lee V.H.L. // Life Sci. 1992. V. 50. P. 651–659.
52. Zhang Y., Arriaga A., Diedrich P., Hindsgaul O., Dovichi N.J. // J. Chromatography. A. 1995. V. 716. P. 221–229.
53. Liu J., Shiota O., Weisler D., Novotny M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 2302–2306.
54. Honda S., Okeda J., Iwanaga H., Kawakami S., Taga A., Suzuki S., Imai K. // Anal. Biochem. 2000. V. 286. P. 99–111.
55. Higai K., Masuda D., Matsuzawa Y., Satoh T., Matsumoto K. // Biol. Pharm. Bull. 1999. V. 22. P. 333–338.
56. Zhang Y., Lee X., Dovichi N.J., Compston C.A., Palcic M.M., Diedrich P., Hindsgaul O. // Anal. Biochem. 1995. V. 227. P. 368–376.
57. Lee X., Zhang Y., Dovichi N.J., Compston C.A., Palcic M.M., Beever R.J., Hindsgaul O. // J. Chromatography. A. 1997. V. 781. P. 515–522.
58. Lee X.C., Tan W., Scaman C.H., Szpacenko A., Arriaga E., Zhang Y., Dovichi N.J., Hindsgaul O., Palcic M.M. // Glycobiology. 1999. V. 9. P. 219–225.
59. Toomre D.K., Varki A. // Glycobiology. 1994. V. 4. P. 653–663.
60. Leteux C., Childs R.A., Chai W., Stoll M.S., Kogelberg H., Feizi T. // Glycobiology. 1998. V. 8. P. 227–236.
61. Muramoto K., Yamauchi F., Kamiya H. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. P. 1013–1017.
62. Shinohara Y., Sota H., Gotoh M., Hasebe M., Tosu M., Nakao J., Hasegawa Y., Shiga M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 2573–2579.
63. Caesar J.P., Jr., Sheeley D.B., Reinhold V.N. // Anal. Biochem. 1990. V. 191. P. 247–252.
64. Muramoto K., Kamiya H. // Dev. Comp. Immunol. 1992. V. 16. P. 1–8.

## Fluorescent Labels for the Analysis of Mono- and Oligosaccharides

N. V. Shilova and N. V. Bovin<sup>#</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 330-7138; fax: +7 (095) 330-5592; e-mail: bovin@carb.siobc.ras.ru  
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Various fluorophores used for improving the chromatographic and electrophoretic separation and the detection sensitivity in the analysis of reducing mono- and oligosaccharides are described. Complex bimodal labels that, in addition to fluorescent moieties, bear some additional functional groups are also discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* electrophoresis, fluorescence, HPLC, monosaccharides, oligosaccharides