



УДК 547.458:543.51 + 543.544.45

**ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ОЛИГОСАХАРИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ N-АЦЕТИЛГЕКСОЗАМИН
НА ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕМ КОНЦЕ***Зурабян С. Э., Мирзаянова М. Н., Розынов Б. В.,
Садовская В. Л., Хорлин А. Я.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Показано, что хромато-масс-спектрометрия смеси олигосахаридов (в виде метилированных альдитов), содержащих N-ацетилгексозамин на восстанавливающем конце, позволяет определить не только моносахаридную последовательность, но и положение гликозидной связи между аминсахаром и предшествующим ему моносахаридным остатком. Метод применен для анализа смеси олигосахаридов, отщепленных от гликопротеина — муцина из поджелудочных желез свиньи.

В последние годы получили развитие масс-спектрометрические методы анализа структуры коротких олигосахаридов в виде их метилированных [1, 2] или триметилсилилированных (ТМС) альдитов [3]. Метод позволяет надежно устанавливать не только моносахаридную последовательность, но и положение гликозидной связи между альдитом и предшествующим ему моносахаридным остатком.

Наше внимание привлекли олигосахариды, содержащие на восстанавливающем конце остаток N-ацетилгексозаминита, поскольку такие олигосахаридные фрагменты отщепляются от пептидного кода O- и N-гликопротеинов при обработке последнего боргидридом натрия в щелочной среде [4, 5]. Один из таких альдитов, перметилированный N-ацетиллактозаминит (I), был изучен ранее [1]. В настоящем сообщении приводятся данные по ГЖХ- и масс-спектрометрическому анализу изомеров (I) — перметилированных 2-ацетамидо-3-O-β-D-галактопиранозил-2-дезоксид-глюцита (II), 2-ацетамидо-6-O-β-D-галактопиранозил-2-дезоксид-глюцита (III), а также 2-ацетамидо-4-O-(2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-глюцита (IV) и O-α-L-фукопиранозил-(1→2)-O-β-D-галактопиранозил-(1→3)-2-ацетамидо-2-дезоксид-галактита (V).

Для проведения анализа указанных альдитов олигосахаридов методом ГЖХ было изучено хроматографическое поведение соединений (I) — (V) на следующих стационарных фазах: 1,5% OV-17 — Gas-Chrom Q, 2% OV-17 — Supelport, 3% SE-30 — Gas-Chrom HP и 2% SE-30 — Supelport. Наилучшее разделение изомеров (I) — (III), из которых наиболее трудно разделимы (I) и (II), было достигнуто с использованием 2% SE-30. Данные по относительным временам удерживания приведены в табл. 1.

Согласно данным масс-спектров (МС) перметилированных альдитов дисахаридов (табл. 2), пути распада производных дисахаридов (I) — (IV)

Таблица 1

Относительные времена удерживания перметилированных альдитов дисахаридов, содержащих N-ацетилглюкозаминит на восстанавливающем конце (2% SE-30)

Перметилированные альдиты	R _T относительно (I)	Температура, °C
(I) D-Gal (β1→4)-D-GlcNAc-ol	1,00	210
(II) D-Gal (β1→3)-D-GlcNAc-ol	0,92	210
(III) D-Gal (β1→6)-D-GlcNAc-ol	1,15	210
(IV) D-GlcNAc (β1→4)-D-GlcNAc-ol	2,50	230

Таблица 2

Масс-спектры перметилированных альдитов дисахаридов (относительная интенсивность, %)

m/e	Дисахариды и положение гликозидной связи				m/e	Дисахариды и положение гликозидной связи			
	1→4 (I)	1→4 (IV)	1→3 (II)	1→6 (III)		1→4 (I)	1→4 (IV)	1→3 (II)	1→6 (III)
45	41	27	2	27	260	--	54	--	--
71	23	8	6	26	262	--	--	--	1,4*
75	41	5	15	21	276	90	100	100	48
88	100	41	55	100	290	3	4	2	7
89	27	12	8	13	304	--	--	16	4,5
101	88	34	27	63	336	--	--	2	3,6
111	51	5	33	30	337	--	--	--	2,7
115	16	12	13	8	346	--	5	--	--
129	--	42	--	--	348	4	--	1	--
130	61	47	45	48	349	5	--	3	--
142	23	33	4	29	378	--	4	22*	--
174	48*	24	--	34*	381	4*	--	--	--
186	--	10	--	--	390	--	2	--	--
187	90	1	83	38	422	1,6*	4,5	18*	--
218	--	--	--	13*	434	--	--	--	1,8*
219	28	--	28	10	466	15	--	13	0,9
228	--	65	--	--	480	0,8*	--	1*	--
230	--	20	--	--	507	--	3	--	--
248	--	--	--	8*	--	--	--	--	--

* Отмечены пики, характеризующие положение гликозидной связи в изомерных альдитах дисахаридов (I)—(III).

при электронном ударе в целом аналогичны фрагментации соответствующих производных, состоящих из нейтральных моносахаридов [1], с той лишь разницей, что отличительным признаком МС дисахаридов, содержащих N-ацетилглюкозаминит, является присутствие в них иона с *m/e* 130, образующегося при разрыве связи C₍₂₎—C₍₃₎ альдитной части молекулы. Наличие N-метилацетамидной группы в альдитной части существенно упрощает интерпретацию МС, так как вносит в молекулу элемент асимметрии, вследствие чего для анализа не требуется получения дейтерированных по C₍₁₎ производных альдитов в отличие от альдитов нейтральных дисахаридов. МС соединений (I) — (IV) не содержат пиков молекулярных ионов, однако о величине молекулярного веса этих соединений можно судить по наличию в МС пиков ионов невозстанавливающей и альдитной частей молекулы с *m/e* 219 (*m/e* 260 для (IV)) и 276 соответственно.

Основные распады соединений (I) — (IV) протекают путем разрыва связей С—С альдитной части молекулы (схемы 1—4) с образованием характерных ионов (*M* — 45)⁺, (*M* — 89)⁺, (*M* — 130)⁺ и (*M* — 133)⁺, дальнейший распад которых изображен на схемах 1 и 4. В случае ди-N-ацетилхитобиита (IV) строение всех указанных на схеме 4 ионов подтверждено МС высокого разрешения.

Схема 1

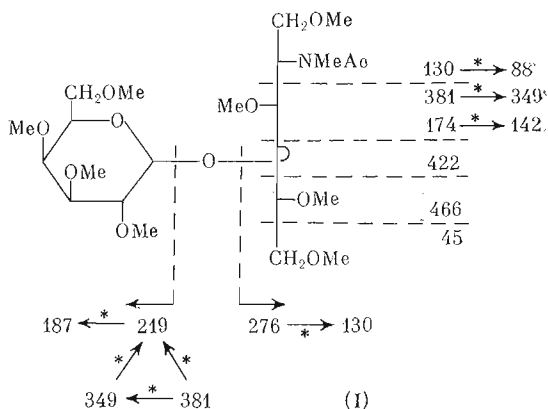
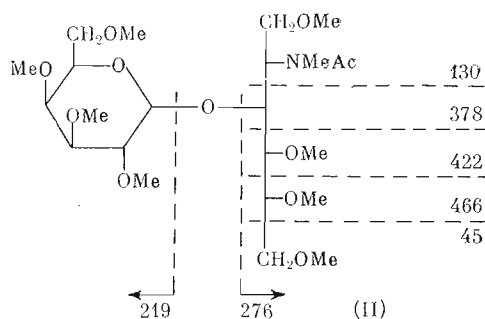


Схема 2



Следует отметить, что по МС изомерных альдитов дисахаридов (I) — (III) однозначно определяется положение гликозидной связи. Так, для (1 → 4)-связи (табл. 2) характерно наличие в МС пика иона с m/e 381 ($M - 130$), который образуется при разрыве связи $C_{(2)} - C_{(3)}$ альдитной части молекулы с локализацией заряда на остатке, не содержащем атома азота. Присутствие в спектре пика иона с m/e 174 (схемы 1 и 3) является отличительным признаком изомеров с (1 → 4)- и (1 → 6)-связями, так как в МС изомера с (1 → 3)-связью этот ион полностью отсутствует. С другой стороны, лишь в МС (1 → 3)-связанного дисахаридов (II) присутствует пик иона с m/e 378 ($M - 133$).

В спектре изомера (III) с (1 → 6)-связью пики ионов в области, близкой к молекулярному иону, имеют очень низкую интенсивность. Однако МС содержит существенные пики ионов с m/e 219 и 276, характеризующие обе половины молекулы, а присутствие ионов с m/e 174 и 218 отличает его как от изомера с (1 → 3)-связью, так и от изомера с (1 → 4)-связью (табл. 2). В МС (1 → 6)-связанного дисахаридов можно наблюдать характерный дублет различных по происхождению ионов с m/e 218 и 219 (схема 3).

Описанные выше основные пути фрагментации альдитов дисахаридов характерны и для альдита трисахаридов (V) (рис. 1), выделенного из смеси восстановленных олигосахаридов, образующихся при обработке десалированного муцина поджелудочных желез свиной боргидридом натрия в щелочной среде [6]. Пик молекулярного иона (m/e 685) имеет крайне низкую интенсивность; наиболее характерные ионы в области, близкой к молекулярному иону, аналогичные соответствующим ионам в МС дисахаридов с (1 → 3)-связью (II), наблюдаются при m/e 640 ($M - 45$)⁺, 596

Схема 3

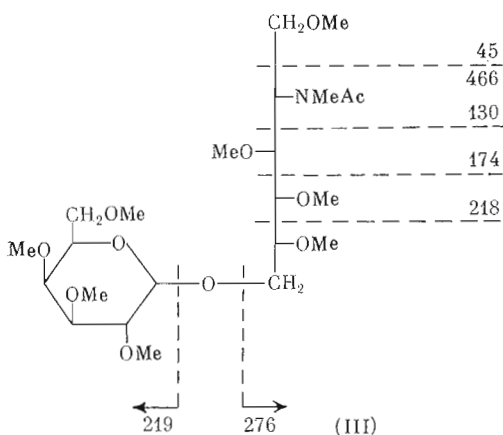
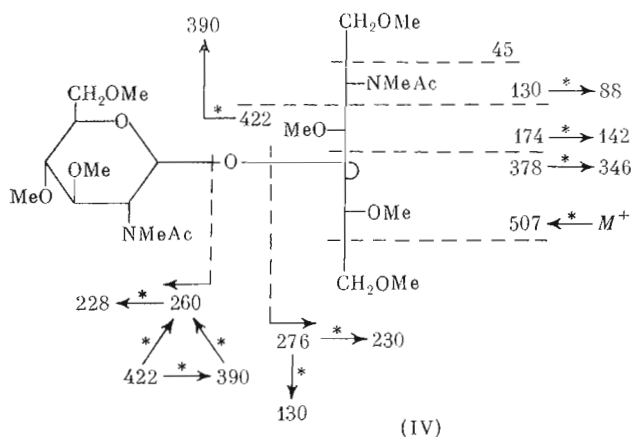


Схема 4



$(M - 89)^+$ и $552 (M - 133)^+$. Последний является характерным признаком (1 → 3)-гликозидной связи между N-ацетилгексозамином и предшествующим ему остатком дисахарида.

В МС трисахарида (V) также отчетливо прослеживается последовательность моносахаридных остатков. Концевая фукоза характеризуется ионами с m/e 189 и 157, фукозил-галактозилный остаток — двумя парами ионов с m/e 409, 378 и 393, 361, а ион с m/e 480 образуется в результате потери молекулярным ионом остатка фукозы. Положение гликозидной связи между остатками фукозы и галактозы подтверждено идентификацией 1,2,5-три-О-ацетил-3,4,6-три-О-метил-D-галактита в смеси метилированных ацетатов полиолов, образующихся при анализе (V) методом метилирования [7, 8].

Как отмечалось выше, при обработке гликопротеинов, содержащих О-гликозидносвязанные олигосахаридные цепи, боргидридом натрия в щелочной среде образуется смесь олигосахаридов, содержащих на восстанавливаемом конце остаток N-ацетилгексозамина. Смеси альдитов моно-, ди- и трисахаридов с успехом анализируются методом комбинирования ГЖХ и масс-спектрометрии при использовании стационарной фазы SE-30 в интервале температур 150—300°. На рис. 2 приведена хроматограмма смеси метилированных олигосахаридов, полученных из десилированного муцина подчелюстных желез свиньи.

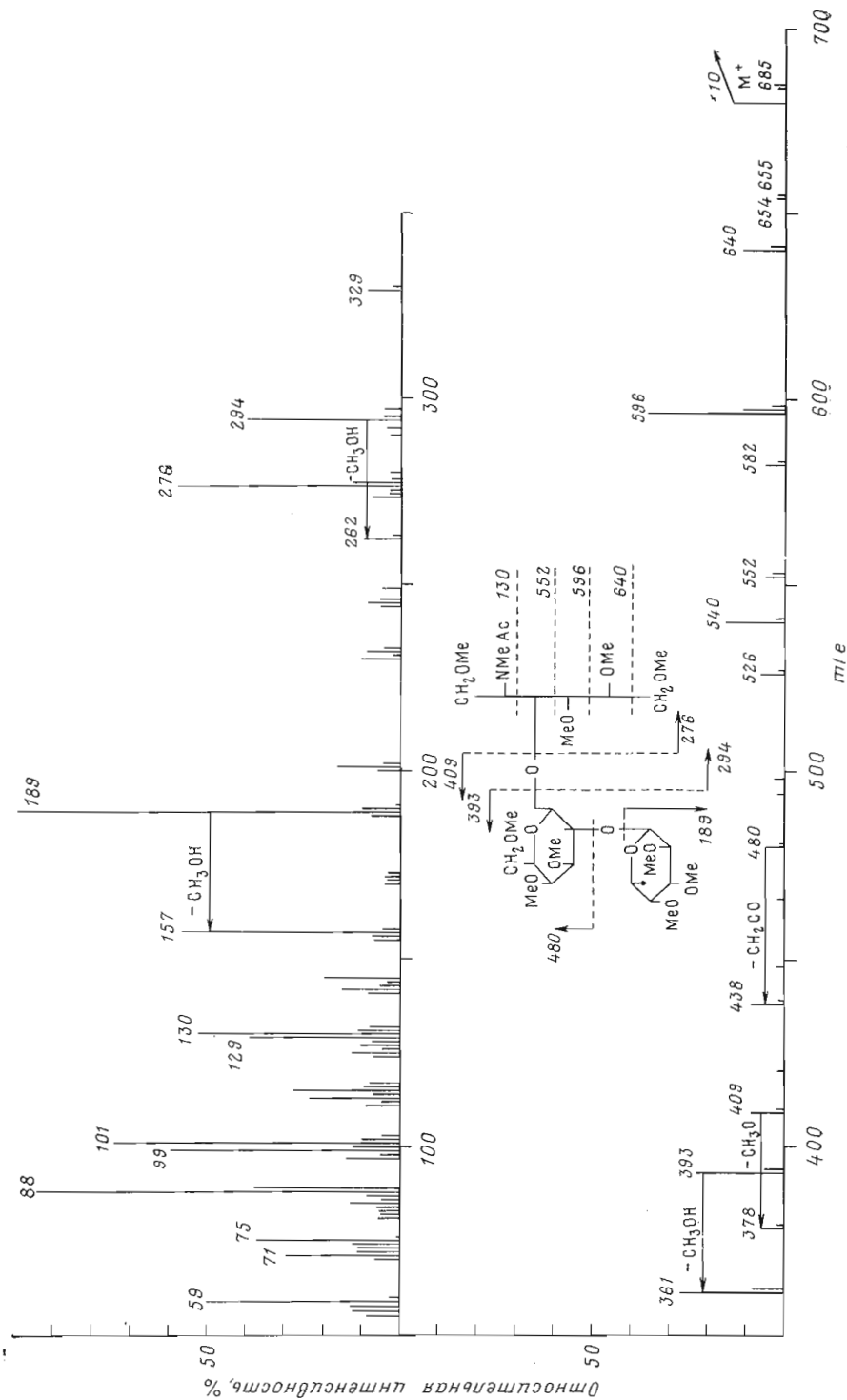
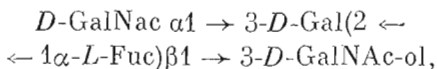


Рис. 1. Масс-спектр трисахарид (V)

Трисахарид (V) элюируется в этих условиях при 300°; в области дисахаридов содержится лишь один пик, МС которого полностью идентичен спектру дисахарида (II). Тетрасахарид с последовательностью



присутствующий в муцине [6], не обнаруживается вовсе, хотя, как известно [9], перметилированные альдиты олигосахаридов нейтральных сахаров (вплоть до пентасахаридов) могут быть анализированы с помощью ГЖХ. Тот факт, что нам не удалось обнаружить вышеупомянутый тетрасахарид в условиях ГЖХ, объясняется, по-видимому, наличием в ожидаемом тетрасахариде дополнительного звена аминосахара, что существенно увеличивает время удерживания (ср. времена удерживания *N*-ацетиллактозаминита и его изомеров (I) — (III) с ди-*N*-ацетилхитобиитом (IV), табл. 1). Очевидно, что для анализа тетрасахаридов с двумя и более остатками аминосахаров методом ГЖХ требуются дополнительные исследования по подбору условий.

Когда настоящее исследование было уже завершено, появилось сообщение по масс-спектрометрическому анализу дисахаридов с *N*-ацетилгексозамином на восстанавливающем конце в виде ТМС-производных [10]. Сопоставляя данные работы [10] с полученными нами результатами, следует отметить, что ТМС-производные менее пригодны для анализа олигосахаридов по сравнению с их метилированными аналогами по ряду причин.

Во-первых, времена удерживания ТМС-производных дисахаридов примерно в 5—6 раз превышают таковые для метилированных производных, что делает, по-видимому, невозможным анализ трисахаридов, содержащих аминосахара, не говоря о более высших олигосахаридах. Во-вторых, ТМС-производные изомерных дисахаридов с (1 → 3)- и (1 → 4)-связями практически не разрешаются методом ГЖХ. В-третьих, МС (1 → 3)-, (1 → 4)- и (1 → 6)-связанных дисахаридов в виде ТМС-альдитов не являются строго специфичными для каждого изомера. Отмечаются некоторые трудности интерпретации МС, связанные с существенным возрастанием молекулярного веса и протеканием побочных перегруппировочных процессов, а отнесение МС осуществляется лишь по разнице в соотношении интенсивностей некоторых пиков спектра.

Таким образом, перметилированные олигосахариды, содержащие *N*-ацетилгексозаминит на восстанавливающем конце, являются удобными производными для определения методом масс-спектрометрии положения гликозидной связи между альдитом и предыдущим моносахаридным остатком. Комбинирование этого метода с методом ГЖХ позволяет решать такую задачу на смеси олигосахаридов.

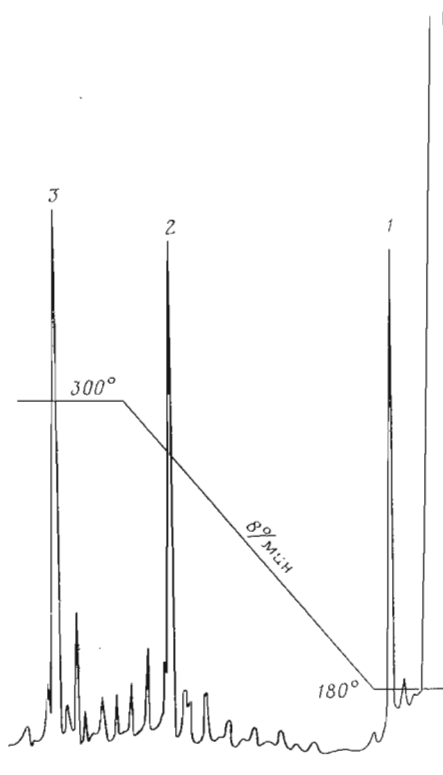


Рис. 2. Хроматограмма перметилированных альдитов, отщепленных от десиглированного муцина из поджелудочных желез свиньи: *D*-GalNac-ol (1), *D*-Gal(β1 → 3)-*D*-GalNac-ol (2), *L*-Fuc(α1 → 2)-*D*-Gal(β1 → 3)GalNac-ol (V) (3)

Экспериментальная часть

Использовались синтетические образцы 2-ацетиамидо-4-О-β-D-галактопиранозил-2-дезоксид-глюкозы (I) (N-ацетиллактозамина) [11, 12], 2-ацетиамидо-3-О-β-D-галактопиранозил-2-дезоксид-глюкозы (II) [13] и 2-ацетиамидо-6-О-β-D-галактопиранозил-2-дезоксид-глюкозы (III) (последний получен каталитическим гидрированием соответствующего α-бензилгликозида [11, 14]). 2-Ацетиамидо-4-О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксид-глюкоза (ди-N-ацетилхитобиоза) (IV) получена частичным ацетилизмом хитина с последующим О-деацетилизмом [15]. Дисахариды восстанавливали боргидридом натрия, как описано ранее [3].

Муцин из подчелюстных желез свиньи получили по методу [16]. Десиамирование муцина проводили 0,1 н. H₂SO₄ при 80°, контроль за полнотой отщепления сиаловых кислот осуществляли методом ГЖХ по отсутствию сиаловых кислот в метанолизате обработанного таким образом гликопротеина. Десиамированный муцин обрабатывали 0,05 М КОН и 1,0 М боргидридом натрия в течение 15 ч при 45°, как описано в работе [6]. Смесь подкисляли уксусной кислотой и пропускали через колонку с даэксом-50 × 8 (H⁺), освобождаясь от катионов и белка. Элюат упаривали и остаток многократно отгоняли с метанолом. Полученную смесь альдитов олигосахаридов хроматографировали на колонке с силикагелем (100—160 мкм), элюируя продукты смесью этилацетат — метанол — ацетонитрил — вода (7 : 7 : 1 : 1). Фракции, содержащие О-α-*L*-фукопиранозил-(1 → 2)-О-β-D-галактопиранозил-(1 → 3)-2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-галактит (V) вышаривали и кристаллизацией остатка из MeOH получили продукт с т. пл. 264—265°.

Метилирование альдитов дисахаридов и трисахаридов осуществляли по методу Хакомори [1,9,17].

Метилированные альдиты олигосахаридов анализировали методом ГЖХ на хроматографе Varian 2700 с использованием стеклянных насыпных колонок (2 мм × 2 м) с 2% SE-30 — Supelcoport (100—120 меш), 3% SE-30 — Gas-Chrom HP (100—120 меш), 1,5% OV-17 — Gas-Chrom Q (80—100 меш) и 2% OV-17 — Supelcoport (100—120 меш) при температурах: 210° — для смеси (I) — (III), 230° — для смеси (I) и (IV) и в программированном режиме от 180 до 300° (8°/мин) — для смеси олигосахаридов из муцина. Масс-спектры низкого разрешения соединений (I) — (V) получены на хроматографе — масс-спектрометре LKB-9000 в режиме хроматографирования, указанном выше. Точные замеры массовых чисел ионов в МС соединений (IV) и (V), а также данные по метастабильным переходам (методом метастабильной дефокусировки) получены с помощью масс-спектрометра Varian MAT CH-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kärkkäinen J. (1970) Carbohydr. Res., 14, 27—33.
2. Kärkkäinen J. (1971) Carbohydr. Res., 17, 11—18.
3. Kärkkäinen J. (1969) Carbohydr. Res., 11 247—256.
4. Gottschalk A. (1972) in Glycoproteins (Gottschalk A., ed.), p. 470—476, Elsevier, Amsterdam.
5. Lee Y. C., Scocca J. R. (1972) J. Biol. Chem., 247, 5753—5758.
6. Carlson D. M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 616—626.
7. Björndall H., Hellerquist C. G., Lindberg B., Svensson S. (1970) Angew. Chem. Intern. Ed., 9, 610—619.
8. Lundsten J., Svensson S., Öckerman P. A. (1978) Carbohydr. Res., in press.
9. Stellner K., Saito H., Hakomori S. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 155, 464—472.
10. Finne J., Mononen J., Kärkkäinen J. (1977) Biomed. Mass Spectrometry, 4, 281—283.
11. Khorlin A. Ya., Nesmeyanov V. A., Zurabyan S. E. (1975) Carbohydr. Res., 43, 69—77.
12. Зурабян С. Э., Лопанцева Е. Н., Хорлин А. Я. (1973) Докл. АН СССР, 210, 1216—1219.

13. Flowers H. M., Jeanloz R. W. (1963) *J. Org. Chem.*, **28**, 1377—1379.
14. Nesmeyanov V. A., Zurabyan S. E., Khorlin A. Ya. (1973) *Tetrahedron Lett.*, 3213—3216.
15. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M. (1958) *J. Chem. Soc.*, 2218—2227.
16. Katzman R. L., Eylar E. H. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **117**, 623—637.
17. Hakomori S. (1964) *J. Biochem.*, **55**, 205—208.

Поступила в редакцию
6.IV.1978

**GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY—MASS SPECTROMETRY
OF OLIGOSACCHARIDES CONTAINING N-ACETYLHEXOSAMINE
AS A REDUCING MOIETY**

ZURABYAN S. E., MIRZAYANOVA M. N., ROSYNOV B. V.,
SADOVSKAYA V. L., KHORLIN A. Ya.

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

It is shown that GLC-MS of oligosaccharide mixtures (as methylated alditols) having N-acetylhexosamine at the reducing end permits to establish not only the monosaccharide sequence, but also the position of glycosidic linkage between the amino sugar and preceding monosaccharide residue. The method was applied to analysis of the mixture of oligosaccharides splitted off porcine submaxillary mucin.
