

УДК 542.91:547.455

ХИМИЯ

В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ, О. С. НОВИКОВА,  
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

ДЕГРАДАЦИЯ МЕТИЛАМИДА О-(2-АЦЕТАМИДО-3-О-  
(2-АЦЕТАМИДО-2-ДЕЗОКСИ-β-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)-  
2-ДЕЗОКСИ-β-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)-  
N-КАРБОБЕНЗОКСИ- L-СЕРИНА

Углеводные цепи гликопротеинов, содержащие О-гликозидную углевод-пептидную связь, легко отщепляются от пептидного скелета под действием щелочи <sup>(1)</sup>. В тех случаях, когда в углеводных цепях имеются 1→3-связи, они деградируют далее <sup>(2)</sup>, что делает невозможным выделение неструктурированных углеводных цепей. Для того чтобы ограничить распад углеводных цепей, было предложено <sup>(3, 4)</sup> проводить щелочную деструкцию в присутствии  $\text{NaBH}_4$ , который, восстанавливая концевой моносахарид, препятствует углеводной цепи.

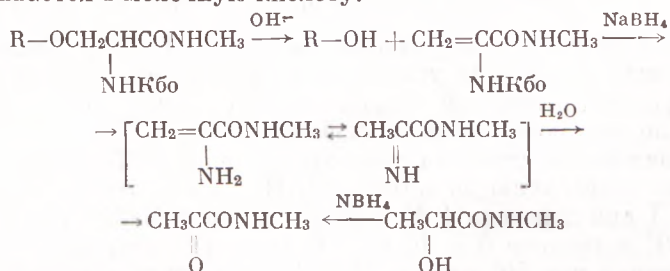
Авторами <sup>(3)</sup> использовалась 0,2 N NaOH + 0,1 M  $\text{NaBH}_4$ , однако было показано, что скорость деградации и в этом случае значительно выше скорости восстановления углеводных цепей. Позднее Карлсон с сотр. предложили понизить концентрацию щелочи до 0,05 N, повысив одновременно концентрацию  $\text{NaBH}_4$  до 1 M. В результате изучения распада гликопротеинов в этих условиях авторы <sup>(5, 6)</sup> считают, что в этом случае деградация углеводных цепей протекает в незначительной степени. Однако количественные данные об интенсивности деструкции углеводных цепей при деградации гликопротеинов в этих условиях в литературе отсутствуют.

В качестве модельных соединений использовались только дисахариды, содержащие 3-замещенный N-ацетилгексозамин, и данные по их распаду неоднозначны и противоречивы <sup>(6, 7)</sup>.

Нами исследован процесс щелочной деградации биозида серина, содержащего два остатка глюкозамина, соединенных 1→3-связью — метиламид-О-[2-ацетамидо-3-О-(2-ацетамидо-2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозил]-N-карбобензоксиг-L-серина (I) <sup>(8)</sup>, близко моделирующий узел связи гликопротеинов типа ГВК.

Распад I изучался в двух вариантах — под действием 1 M  $\text{NaBH}_4$  в 0,05 N растворе NaOH и в 1 M растворе  $\text{NaBH}_4$  без добавления щелочи. К 0,5 мл водного раствора вещества с концентрацией 0,7 мг/мл добавляли 38 мг  $\text{NaBH}_4$  и 0,5 мл 0,1 N раствора NaOH. Во втором варианте щелочь не добавлялась. Раствор выдерживался при 50° в течение 6 и 16 час. Охлажденный раствор нейтрализовали 4 N HCl, упаривали досуха, прибавляли 2 мл 4 N HCl и гидролизовали 16 час. при 100°. В гидролизате определяли количество глюкозамина, глюкозаминита и серина. При обработке ГВК в обоих вариантах гладко проходил разрыв О-гликозидной связи углеводов — аминокислота, который полностью заканчивался за 4 часа. Исследование реакционной смеси показало, что серин при этом полностью исчезает, превращаясь в молочную кислоту с количественным выходом, при этом не наблюдалось образования даже следов аланина. Молочная кислота определялась по методу <sup>(9)</sup>. Как известно, при деградации ГВК и поджелудочных муцинов щелочью с небольшой добавкой  $\text{NaBH}_4$ , образующиеся остатки аминокриловой кислоты восстанавливаются в остатки

аланина (<sup>10</sup>). В нашем случае даже после гидрирования реакционной смеси над Pd/BaSO<sub>4</sub> (раствор 1 мг/мл вещества в 50% спирте, содержащем 1 мг Pd/BaSO<sub>4</sub>, гидрировали 4 час.) не обнаружилось и следов производных аланина, хотя в контрольном опыте при гидрировании метиламида N-карбобензоксиминоакриловой кислоты он превращался в соответствующее производное аланина с количественным выходом. Контрольный опыт с метиламидом N-карбобензокси-L-серина показал, что при обработке этого соединения в условиях деградации соединения I в течение 6 час. карбобензокси-группа отщепляется. Очевидно, при деградации I в присутствии большого количества NaBH<sub>4</sub> карбобензокси-группа также отщепляется, а образующийся метиламид аминокриловой кислоты распадается с образованием пировиноградной кислоты, которая далее восстанавливается в молочную кислоту:



Следует также отметить, что при обработке соединения I элиминирование производного серина, по-видимому, предшествует отщеплению карбобензоксигруппы, так как в противном случае возникновение свободной аминогруппы на остатке серина препятствовало бы процессу элиминирования<sup>(11)</sup>.

Для определения характера и степени распада углеводной части I реакционная смесь исследовалась хроматографией на бумаге (система *n*-бутанол — пиридин — вода 6:4:3) и после кислотного гидролиза (4*N* HCl, 100°, 16 час.) с помощью анализатора аминокислот типа 6020A (ЧССР). Хроматография на бумаге реакционной смеси показала, что при этом образуются два вещества, одно из которых — N-ацетилглюкозаминит (II), а второе — 2-ацетамидо-3-О-(2-ацетамидо-2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозил)-2-дезоксиг-D-глюкозаминит (III). Вещество III было выделено препаративной хроматографией на бумаге — гидролиз дал соотношение глюкозамин: глюкозаминит 1,0:1,08. Соединение III является продуктом восстановления дисахарида, образующегося при элиминировании его с остатка производного серина, в то время как II может образоваться в результате деградации дисахарида, содержащего 1→3-связь за счет восстановления NaBH<sub>4</sub> концевой незамещенной N-ацетилглюкозамина. Это подтверждается тем, что при обработке в описанных выше условиях метиламид хитобиозида N-карбобензоксиг-L-серина (<sup>12</sup>), который содержит 1→4-связанные остатки N-ацетилгексозамина, свободный N-ацетилглюкозаминит не образуется, а дисахарид полностью восстанавливается. Таким образом, образование свободного N-ацетилглюкозаминита может служить признаком и мерой деградации дисахаридной цепи в I. Для оценки степени деградации I, реакционная смесь после обработки подвергалась кислотному гидролизу; при этом III распадался на эквимолекулярные количества глюкозамина и глюкозаминита. Количество глюкозамина при этом должно соответствовать количеству восстановленного дисахарида III. Соотношение глюкозаминит/глюкозамин указывало на избыточное количество глюкозаминита, образующегося за счет деградации, и служило непосредственной мерой деградации дисахарида. Полученные данные приведены в табл. 1, из которой видно, что при обработке I в условиях (<sup>3</sup>) (0,05*N* NaOH+1*M* NaBH<sub>4</sub>), общий выход продуктов реакции составляет 78—82%, причем соотношение глюкозаминит/глюкозамин и выход глюкозами-

Распад I при обработке 0,05 N NaOH + 1 M NaBH<sub>4</sub> и 1 M NaBH<sub>4</sub> при 50°  
(мкмол. веществ из ммол. I после кислотного гидролиза)

Условия	Время, час	Серия	Глюкозамин А	Глюкозаминит Б	Б/А	Распад, %	А + Б (%)
1 M NaBH <sub>4</sub> + + 0,05 N NaOH	0	0,1035	0,206	0		0	
	6	0	0,071	0,098	1,38	31	0,169 (82)
	0	0,093	0,185	0			
	16	0	0,062	0,083	1,34	33	0,145 (78)
1 M NaBH <sub>4</sub>	0	0,1008	0,21	0		0	
	6	0	0,094	0,105	1,13	10	0,199 (94,8)
	16	0	0,09	0,104	1,16	15	0,194 (92,5)

на указывают на то, что деградация достигает 31–33%. Таким образом, вопреки данным (<sup>5</sup>), в этих условиях не происходит избирательного расщепления углевод-пептидной связи, и углеводные цепи, содержащие 1→3-связи, подвергаются значительной деструкции.

Для исследования строения углеводных цепей ГВК крайне желательно свести их деградацию до минимума. В связи с этим мы исследовали деградацию I при действии 1 M водного раствора NaBH<sub>4</sub> без добавки щелочи при 50° в течение 6 и 16 час. Водные 1 M растворы NaBH<sub>4</sub> через 1 час нагревания при 50° имеют pH 10,85, а к концу реакции, т. е. через 16 час., 11,45. Результаты распада в этих условиях приведены в табл. 1. Как видно, при этом общий выход продуктов реакции составляет 94%, а соотношение глюкозаминит/глюкозамин указывает на то, что деградация дисахарида составляет 10–15%. Хотя условия деструкции О-гликозидной связи гликопептидов еще неидеальны, уменьшение степени деструкции до 10–15% делают их гораздо удобнее, чем существующие методы.

Предварительные опыты, проведенные на ГВК из слизистой свиных желудков, подтверждают сказанное. При обработке ГВК раствором 0,05 N NaOH+1 M NaBH<sub>4</sub> при 50° в течение 16 час. распад углеводных цепей составляет ~30%, тогда как при обработке ГВК 1 M раствором NaBH<sub>4</sub> без добавки щелочи в тех же условиях распад составляет ~10%. Следует иметь в виду, что элиминирование углеводных цепей с пептидного скелета протекает в этом случае с меньшей скоростью. Выделенные в результате этого олигосахариды исследуются нами в настоящее время.

Институт органической химии  
им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
27 XII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya, S. G. Kara-Murza, Carbohydr. Res., v. 3, 403 (1967).
- <sup>2</sup> R. L. Whistler, Y. N. Be Muller, Advances Carbohydr. Chem., v. 13, 289 (1958).
- <sup>3</sup> K. O. Lloyd, E. A. Kabat, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 16, 385 (1964).
- <sup>4</sup> K. Tanaka, W. Pigman, J. Biol. Chem., v. 240, 1487 (1965).
- <sup>5</sup> R. N. Iyer, D. M. Carlson, Arch. Biochem. and Biophys., v. 142, 101 (1971).
- <sup>6</sup> B. Anderson, L. Rovis, E. A. Kabat, Arch. Biochem. and Biophys., v. 148, 304 (1972).
- <sup>7</sup> D. M. Carlson, R. M. Iyer, J. Mayo, In: Blood and Tissue Antigens, N. Y., 1970, p. 229.
- <sup>8</sup> Н. К. Кочетков, В. А. Деревицкая, О. С. Новикова, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 179.
- <sup>9</sup> В. С. Асагуани, Новые методы биохимической фотометрии, М., 1965, стр. 332.
- <sup>10</sup> K. Tanaka, M. Bertalini, W. Pigman, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 16, 404 (1964).
- <sup>11</sup> V. A. Derevitskaya, M. G. Vafinz, N. K. Kochetkov, Carbohydr. Res., v. 3, 377 (1967).
- <sup>12</sup> В. А. Деревицкая, Л. М. Лихошерстов и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2246.