



УДК 547.455.62'118:543.847

**БЫСТРЫЙ МИКРОМЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ  
АНОМЕРОВ ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ  
ПО СКОРОСТИ ИХ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА***Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибачев В. Н.**Институт органической химии Академии наук СССР  
им. Н. Д. Зелинского, Москва*

Предложен высокочувствительный микрометод идентификации  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров гликозилфосфатов (производных *D*-глюкозы, *D*-галактозы, *D*-маннозы и *L*-рамнозы), основанный на определении константы скорости их кислотного гидролиза.

Характерным свойством гликозилфосфатов является лабильность в кислой среде, причем скорость гидролиза этих соединений зависит от конфигурации гликозилфосфатной связи и природы моносахаридного остатка [1]. Величина скорости кислотного гидролиза часто использовалась для характеристики гликозилфосфатов в ранних работах в этой области (обзоры см. [2, 3]). Развитие аналитической химии фосфора, в частности разработка чувствительного метода определения неорганического фосфата, основанного на образовании комплекса фосфориомолибденовой кислоты с малахитовым зеленым в кислой среде [4, 5], позволяет предложить микрометод для определения скорости гидролиза гликозилфосфатов, применяемый для определения аномерной конфигурации этих соединений. Требуемое количество анализируемого вещества (10–15 нмоль) по крайней мере на три порядка меньше, чем в случае решения этой задачи с помощью поляриметрии или ЯМР.

Мы предлагаем для измерения скорости гидролиза гликозилфосфатов проводить реакцию при 37°С в 0,9 н. растворе HCl, содержащем 1% молибдата аммония и 0,03% малахитового зеленого, т. е. в растворе реактива, предлагаемого для определения неорганического фосфата в работе [5], но без добавления детергента. В этих условиях за протеканием реакции удобно следить по изменению поглощения при 660 нм с помощью регистрирующего спектрофотометра. Как показывает опыт, при количествах исследуемого вещества, указанных выше, не происходит значительной агрегации комплекса и выпадения осадка за время полного гидролиза, что позволяет определить предельное значение поглощения раствора достаточно точно.

Была определена скорость гидролиза четырех пар аномеров гликозилфосфатов. Во всех случаях кинетика гидролиза хорошо описывается уравнением реакции первого порядка, определенные графическим методом константы скорости гидролиза (таблица) воспроизводятся с точностью ~2%. Для исследования брали растворы циклогексиламмониевых, триэтиламмониевых, калиевых и кальциевых солей различных гликозилфосфатов; как показали контрольные опыты, в используемых условиях природа катиона не оказывает заметного влияния на скорость реакции.

### Наблюдаемые константы скорости гидролиза гликозилфосфатов

Остаток гексопиранозы	$k \cdot 10^5, \text{с}^{-1}$		$k_{\beta}/k_{\alpha}$
	$\alpha$ -аномер	$\beta$ -аномер	
<i>D</i> -Глюкопираноза	4,1	7,2	1,76
<i>D</i> -Галактопираноза	9,1	12,3	1,34
<i>D</i> -Маннопираноза	3,9	11,2	3,16
<i>L</i> -Рамнопираноза	10,1	27,8	2,75

Как видно из приведенных данных, в применяемых условиях наблюдаются заметные различия в скорости гидролиза  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров гликозилфосфатов: последние гидролизуются быстрее. Даже для наиболее слабо различающихся пар аномеров — производных глюкозы и галактозы — это различие превышает 30% и, таким образом, далеко выходит за пределы экспериментальных ошибок. Заметно и влияние природы остатка моносахарида, качественно соответствующее ранее описанным закономерностям [1]: появление в молекуле аксиальных гидроксильных групп и дезокси-звеньев способствует увеличению скорости гидролиза. Скорости гидролиза  $\alpha$ -фосфатов *D*-глюкозы и *D*-маннозы в условиях опыта приблизительно одинаковы, в то же время  $\beta$ -маннозилфосфат гидролизуеться значительно быстрее  $\beta$ -производного глюкозы.

В количественном отношении наблюдаются некоторые различия между данными, полученными в работе [1] для фосфатов глюкозы, галактозы и маннозы, и результатами наших измерений. Это, очевидно, связано с тем, что мы проводили гидролиз в более кислой среде, чем предыдущие исследователи, и в наших условиях сопряженная кислота гликозилфосфата, для которой влияние структуры субстрата мало исследовано, вносит больший вклад в суммарную скорость процесса, чем нейтральная молекула; возможно также каталитическое влияние других компонентов реакционной смеси (ионов молибдата).

Чувствительность и быстрота идентификации гликозилфосфатов с помощью разработанного нами метода позволяют рекомендовать его для решения целого ряда задач. В частности, он весьма удобен для анализа фракций при хроматографическом разделении смеси аномеров гликозилфосфатов. Используя соответствующие модельные соединения, с помощью этого метода можно надежно идентифицировать аномеры известных и вновь получаемых гликозилфосфатов.

### Экспериментальная часть

В работе использованы продажные препараты  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозилфосфата (Reanal, ВНР) и  $\alpha$ -*D*-галактопиранозилфосфата (Sigma, США). Остальные гликозилфосфаты получены по описанным методикам:  $\beta$ -*D*-глюкопиранозилфосфат [6],  $\beta$ -*D*-галактопиранозилфосфат [6],  $\alpha$ -*D*-маннопиранозилфосфат [7],  $\beta$ -*D*-маннопиранозилфосфат [8],  $\alpha$ -*L*-рамнопиранозилфосфат [9] и  $\beta$ -*L*-рамнопиранозилфосфат [10].

*Приготовление реактива для определения фосфора (модификация методики [5]).* В полиэтиленовом сосуде смешивали 60 мл 0,045% раствора малахитового зеленого в воде и 20 мл раствора 2,8 г молибдата аммония в смеси 20 мл конц. HCl и 46 мл воды, перемешивали 30 мин и фильтровали через бумажный фильтр. Реактив хранили в холодильнике.

*Определение кислотолабильного фосфата в гликозилфосфатах.* К аликвоте анализируемого раствора в воде или подходящем низкокипящем растворителе (до 0,2 мл) прибавляли 0,2 мл 1 н. серной кислоты, нагревали 15 мин на кипящей водяной бане, после охлаждения добавляли 2 мл реактива, встряхивали и измеряли поглощение при 660 нм относительно кюветы

ты сравнения, содержащей смесь 2 мл реактива и 0,2 мл 1 н. серной кислоты, а в случае водного раствора анализируемого вещества — соответствующее количество воды. Калибровочный график, построенный по раствору  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , линейен в пределах 0—1,8 мкг фосфора.

*Исследование кинетики кислотного гидролиза гликозилфосфатов.* Реактив (2 мл) термостатировали в кюветах спектрофотометра при 37° С, вносили туда же 5—30 мкл водного раствора гликозилфосфата (0,3—0,5 мкг фосфора), встряхивали и измеряли поглощение при 660 нм в течение 30—90 мин с интервалом между измерениями 2—5 мин (спектрофотометр Unicam SP-8000, Англия). Для определения константы скорости гидролиза строили зависимость  $\ln(D_\infty - D)$  от времени.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. O'Connor J. V., Barker R. (1979) *Carbohydr. Res.*, **73**, 227—234.
2. Leloir L. F., Cardini C. E. (1957) in: *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds), vol. 3, pp. 840—850, Acad. Press, N. Y.
3. Кусов Ю. Ю., Шибяев В. Н. (1971) *Успехи биол. химии*, **12**, 182—219.
4. Itaya K., Ui M. (1966) *Clin. chim. acta*, **14**, 361—366.
5. Hess H. H., Derr J. E. (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 607—613.
6. Данилов Л. Л., Волкова Л. В., Евстигнеева Р. П. (1977) *Ж. общ. химии*, **47**, 2137—2139.
7. Perchemliges P., Osawa T., Davidson E. A. (1967) *Carbohydr. Res.*, **3**, 463—477.
8. Prihar H. S., Behrman E. J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 997—1002.
9. Chatterjee A. K., MacDonald D. L. (1968) *Carbohydr. Res.*, **6**, 253—259.
10. Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Кочетков Н. К. (1974) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1852—1855.

Поступила в редакцию  
18.X.1979

#### A FAST MICROMETHOD FOR IDENTIFICATION OF GLYCOSYL PHOSPHATE ANOMERS BASED ON MEASUREMENT OF THE RATE OF THEIR ACID-CATALYZED HYDROLYSIS

DANILOV L. L., UTKINA N. S., SHIBAEV V. N.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the U.S.S.R. Moscow*

A procedure is developed for fast and sensitive identification of glycosyl phosphate anomers based on spectrophotometric measurement of the rate of release of inorganic phosphate from these compounds with molybdate-malachite green reagent at 37°. The anomers of *D*-glucosyl, *D*-galactosyl, *D*-mannosyl and *L*-rhamnosyl phosphates were identified on 10-15 nmole scale.