

환원성 올리고당의 화학적 분석법의 개발

홍 선표

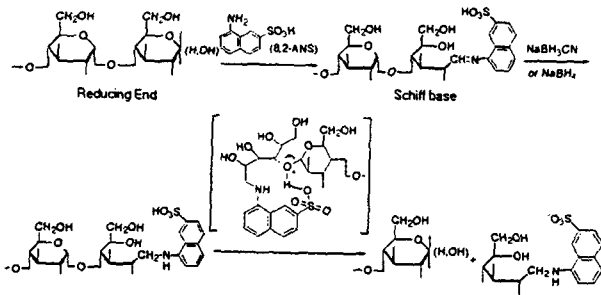
경희대학교, 약학대학

1. 서론

당류(糖類)는 생명을 유지하고 있는 4대성분 중의 하나로서 생체내에서 중요한 역할을 하고 있다. 이 중에서 세포표면에 존재하는 당단백질이나 당지질의 당쇄(糖鎖)는, 세포간의 인식, 정보전달, 세포분화 등에 중요한 역할을 하며 암화(癌化), 암전이(癌轉移), 면역기능, 적혈구의 수명 등에 밀접한 관련이 있다. 그러나, 이처럼 당쇄는 생명유지에 필수적이지만, 생체나 천연물질 중에는 아직 구조가 밝혀지지 않은 당쇄가 상당히 존재하고 있다. 그러므로, 미지의 당쇄구조를 규명하기 위해서 **당의 순차배열분석법**의 개발이 요구되어 왔다.

다당류의 순차배열분석법은 exoglycosidase에 의해 당의 비환원 말단부터 절단하여 가는 **효소법**과 **질량분석법**을 이용하는 방법이 보고되어 있다. 그러나, **효소법**은 유리되어 나오는 당, 그 자체를 검출하기 때문에 감도가 나쁘고 또한 효소에 기질특이성이 있으므로 그 적용성에 제한이 있다. 한편, **질량분석법**은 전처리가 어렵고 고가(高價)라는 단점이 있다. 이 점에 비하여 **화학적 순차배열분석법**은 고감도분석이 가능하며, 전처리가 간단하고 간편성과 범용성의 면에서 크게 기대되어 왔으나, 아직 일반적인 방법이 개발되어 있지 않다. 이것의 이유는, 당에는 반응성이 있는 관능기가 없으므로 **당의 화학적 순차배열분석**을 하기 위해서는 당에 대한 결합능 및 절단능의 관능기를 갖춘 고감도의 빈용시약이 요구되기 때문이다. 그래서 필자는 이러한 조건들을 갖춘 시약인 **8-Amino-2-naphthalenesulfonic acid(8,2-ANS)**에 의한 유도체화가 이 목적에 이용될 수 있다고 생각하였다.

이것의 근거는 (1) 분시약의 아미노기를 매개로 하여 환원성 올리고당의 환원 말단부분에 UV 및 형광표식물질을 붙일 수 있고, (2) 표식물질의 술포산기는 환원 말단부분의 첫번째 글리코시드 결합을 분자내 반응에 의해서 절단해서 표식화된 단당을 유리할 수 있고, (3) HPLC에 적용해서 유리되어진 단당을 결정할 수 있다고 하는 것이다. 이와같은 (1)-(3)의 cycle을 반복함으로써 환원성 올리고당의 화학적 순차배열분석이 가능하다고 추정하였다. **8,2-ANS**에 의한 배열분석의 반응mechanism을 scheme 1에 나타내었다. 본연구에서는 먼저 환원당류의 표식조건에 대하여 검토하고, 이어서 표식환원성 올리고당의 축차배열분석에 있어서의 각각의 조건에 대하여 검토한 후 실제의 검체에 대하여 적용하였다.



Scheme 1 Derivatization of Oligosaccharides and Successive Cleavage of Reducing End

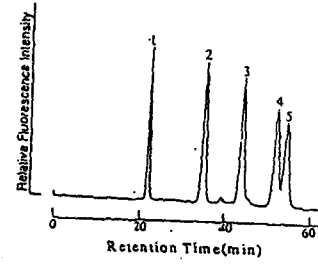


Fig. 1 Elution Profile of Glucose and its Oligomers after Derivatization
 1. 8,2-ANS 2. Glucose-ANS
 3. Maltose-ANS 4. Maltotriose-ANS
 5. Maltotetraose-ANS

2. 8,2-ANS에 의한 환원당의 유도체화

2.1 HPLC조건

TSK gel ODS-80TM 컬럼(입자경 5 μ m, 150x4.6mm i.d.), 형광검출기(Tosoh, Ex. 325nm, Em. 470nm), UV검출기(Tosoh, 254nm) 등으로 장치를 구성하였다. 용리액에는 A액: 10mM sodium phosphate 완충액(pH3.8), B액: 0.5% butanol 함유 10mM sodium phosphate 완충액(pH3.8)을 사용하여, A액과 B액의 비율을 변화시키면서 용리하였다(유속 1.0ml/min).

2.2 결과 및 고찰

2.2.1 환원당에 대한 유도체화시약의 screening

8,2-ANS, 8,1-ANS, 7,1-ANS 등의 시약에 대한 용해도, 당과의 반응성, 컬럼 분리 등의 관점으로부터 각각을 검토한 결과, 8,2-ANS가 모든 점에서 우월하였다. 또한, 당의 ANS 유도체는 Schiff 염기에 의해 분리하는 것도 가능하였으나, 피크형상은 환원체의 것이 양호하였다.

2.2.2 8,2-ANS에 의한 유도체화반응의 최적화

Maltotetraose를 환원당의 모델화합물로 사용하여 유도체화 반응조건을 검토하였다. Schiff 염기의 생성반응에 대하여는 반응온도 104 $^{\circ}$ C, 반응시간 70분, pH 6.8의 조건에서 유도체화가 완료되었다. 한편, Schiff 염기의 환원제로써는 수소화붕산나트륨에 비하여, 시아노수소화붕산나트륨이 높은 반응수율을 얻을 수 있음을 알았다. 후자에 의한 반응은 90 $^{\circ}$ C, 120분에서 완료되었다.

2.2.3 반응생성물의 역상HPLC분리

여러 환원당의 ANS유도체에 대하여 역상HPLC에 의한 분리를 검토하였다. D-Glucose와 그 Oligomer에 대해서는 0.2% butanol함유 10mM sodium phosphate완충액(pH3.8)(Fig.1)을, D-Galactose, D-Mannose 등의 단당류에 대해서는 0.1% butanol함유 10mM sodium phosphate완충액(pH3.8)을 이동상으로 하여 양호하게 분리할 수 있었다.

3. ANS화 환원성 올리고당의 배열분석

3.1 원리 및 방법

ANS화 올리고당의 술폰산기의 proton은 환원말단의 첫번째의 O-glycoside결합을 선택적으로 공격하여 환원 말단의 한 잔기만을 잘라낸다. 본방법은 이러한 ANS화 반응과 절단반응으로 된 cycle을 반복하여, 각 단계에서 절단되어 나오는 ANS화 단당을 HPLC로 분리·동정하여 축차배열을 결정하고자 하는 것이다.

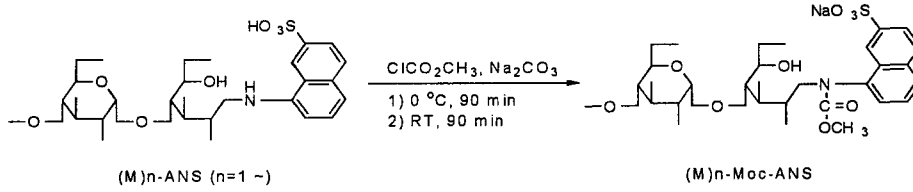
3.2 ANS화 환원성 올리고당의 환원 말단의 첫번째 단계의 절단반응 및 회수

Maltotetraose(M4)를 모델로 하여, 첫번째 단계의 절단반응 및 회수에 대하여 조건검토를 하였다. 절단반응은 40mM M4-ANS를 유기용매 중에서 가열함으로써 행하였다. ANS화M4를 DMSO-1-butanol(5:5, V/V) 혼액 중에서 반응시킨 후 잔존하는 당을 회수, ANS화한 경우에는 M1-ANS에 비하여 M3-ANS가 약 1.7배 많이 검출되었다. 만일 절단반응시에 비선택적인 분해반응이 일어난다면, M1-ANS: M3-ANS의 비는 8:1이 된다고 계산되므로, 이 조건하에서는 비교적 선택적인 절단반응이 일어나고 있다고 생각된다. 그러나 이 경우, 선택성은 좋아졌으나 당의 회수율이 10%이하이며, 다음 단계의 배열분석을 하기가 곤란하다고 생각되었다.

3.3 ANS화 환원성 올리고당의 아미노기를 methoxy carbonyl(Moc)화에 의하여 보호하는 방법

전항에서 말한 것처럼 ANS화 올리고당을 직접분석에 적용하는 방법으로는 만족할 수 있는 결과를 얻지 못 하였다. 그 원인으로는, 유도체 중의 술폰산기가 분자내에 공존하는 제2아미노기와의 사이에서 쌍성이온(Zwitter ion)을 형성하여 술폰산기의 proton이 glycoside결합을 절단하는 데 충분한 역할을 할 수 없기 때문이다. 따라서 methyl chloroformate에 의하여 ANS화 환원성 올리고당의 아미

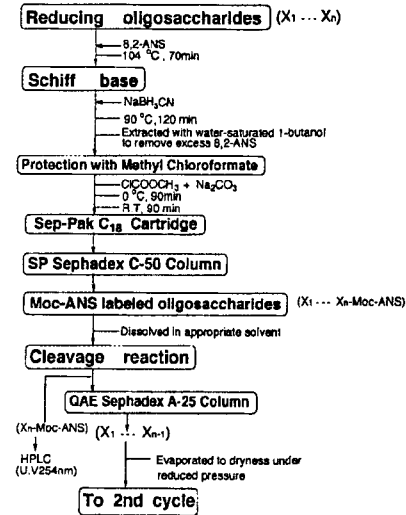
노기를 Moc화하여 아미노기의 proton화를 억제함으로써 술포산기의 반응성을 높이는 방법에 대하여 검토하였다(Scheme 2).



Scheme 2. Derivatization of ANS Labeled Oligosaccharides with Methyl Chloroformate

단, Moc화함으로써 유도체의 형광은 매우 약하여 지므로 이 경우에는 UV검출기를 사용한 Scheme 3에 나타난 실험조작을 사용하여 Moc화M3(40mM)를 각종비율의 1-butanol-DMSO(8:2-4:6, V/V)중에서 90°C, 90분간 가열하고, 첫단계제의 절단반응율과 잔존하는 당의 회수율을 구하였다. 그 결과, Moc화M1-ANS의 생성을 및 M2-ANS의 회수율로서 각각 12.9-45.1% 및 4.4-26.9%를 얻을 수 있었다. 이들 결과는 ANS화올리고당을 직접 절단반응에 적용할 때보다 훨씬 향상되어서 Moc화가 유용성이 있음을 알 수 있었으나, 축차배열분석을 하기에는 환원 말단 첫번째 잔기의 label화당의 생성 및 잔존하는 당의 회수율 등에 아직 개선의 여지가 있다고 생각되었다.

따라서 술포산기의 proton에 의한 glycoside결합의 절단반응이 분자내에서만 선택적으로 일어나도록, 절단반응시의 Moc화ANS당의 농도를 아주 낮게 설정하는 방법을 검토하였다. 또, 반응용매 중 1-butanol대신 dioxane을 사용하였다. 이는 dioxane이 1-butanol보다 저극성이기 때문이며, 목적으로 하는 분자내 절단반응에 적격이라고 생각하였기 때문이다. 또한, Moc화 하지 않은 ANS화 환원성 올리고당의 절단반응에서 dioxane을 사용하면, 아미노기와 당의 결합부분이 분해되는 문제점이 있었으나, Moc화시킨 ANS화 환원성 올리고당의 절단반응에서는 dioxane을 사용하여도 문제점 없이 매우 안정하였다. M3-Moc-ANS의 농도를 0.9mM, dioxane-DMSO(6:4, V/V)용액, 반응온도 100°C, 반응시간을 90분으로 하여, 절단반응율, 회수율 등을 검토한 결과, 절단반응율 24%, 회수율 54.7%이며, 이때의 M1-ANS:M2-ANS의 비율은 1:1.9이었다. 이로써 전보다 회수율과 선택적 반응율이 매우 좋아졌다는 것을 알았다. 다음에 M3-Moc-ANS의 농도를 더욱 희석하여 45µM로 하여, 절단반응을 100°C, 13시간한 경우, 절단반응율은 30%이며, 이 경우, M1-ANS:M2-ANS의 비율은 6:1이었다. 이 절단반



Scheme 3 Procedure for Sequence Analysis of Reducing Oligosaccharides

응으로부터 생긴 것은 거의 M1-Moc-ANS이므로 절단반응이 이상적으로 일어나고 있음을 알았다. 회수한 당 중에서 M2-ANS의 회수율은 49%이며, 이 경우의 M1-ANS:M2-ANS의 비율은 1:6이상이었다. 이 경우는 회수율도 양호하며, 거의 M2-ANS만이 회수되는 점으로부터, 거의 이상적으로 선택적 절단반응이 일어나고 있다고 말할 수 있다. 그러나, 반응시간이 긴 것이 단점이었다. M3-Moc-ANS의 농도를 45 μ M, dioxane-DMSO(7:3, V/V), 반응시간을 30분으로 하고, 110-140°C의 온도범위에서 절단반응을, 회수율을 검토한 결과, 120°C까지는 반응율이 낮으나, 130°C에서는 절단반응율 29%, 회수율 83%로 되었다. 회수한 당을 ANS화 하였을 때 M1-ANS:M2-ANS는 1:1이었다. 한편, 140°C에서는 절단반응율 75%, 회수율 54.7%이며, 회수한 당을 ANS화한 경우의 M1-ANS:M2-ANS의 비는 1:2.1이었다. 절단반응율, 회수율이 매우 향상된 것으로 밝혀져 Moc화의 유용성이 증명되었다. 이상의 검토로부터, 반응의 선택성을 우선하는 경우에는 100°C정도의 비교적 낮은 온도에서 장기간 반응하는 것이 유리한 반면, 절단반응율, 회수율을 우선으로 한다면, 고온, 단시간, 예를들어, 140°C, 30분과 같은 조건이 유리하다는 것을 알았다.

3.4 다른 환원성 올리고당의 응용

Lactose [Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glu], 4-O-D-Galactopyranosyl-D-Galactopyranose [Gal- α (1 \rightarrow 4)-Gal], 4'-Galactosyllactose [Gal- β (1 \rightarrow 4)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Glu]에 대하여 Moc-ANS체의 농도를 dioxane-DMSO(7:3, V/V)중 45 μ M로 하고, 절단반응을 140°C, 30분간 하는 것으로 하여 배열분석을 시도하였다.

3.4.1 결과 및 고찰

각 cycle에서 환원 말단측의 첫번째 잔기에 해당하는 ANS화 당당을 검출할 수 있는 점으로부터 본방법에 의한 배열분석이 가능하다고 생각할 수 있었다. 앞으로는 이 방법을 이용해서 천연물질내에 존재하는 배당체 중의 당쇄부분의 배열분석이 가능하다고 사료된다. Figure2에 Lactose의 각 cycle에 있어서의 chromatogram을 나타내었다.

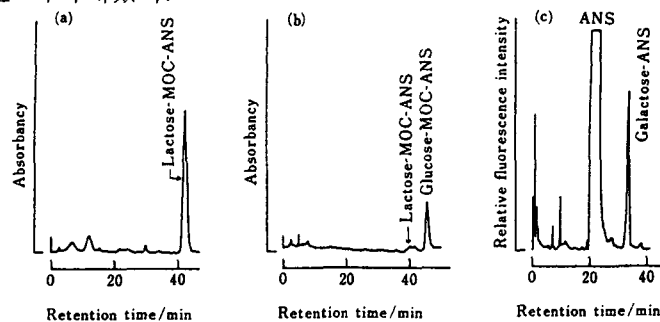


Fig. 2 Sequential analysis of lactose. (a) Lactose-MOC-ANS before the cleavage reaction in the 1st cycle. (b) The cleavage reaction mixture of lactose-MOC-ANS in the 1st cycle. (c) ANS derivatization product in the 2nd cycle.