

# *GC/MS als essentieel hulpmiddel bij de identificatie van complexe koolhydraten in urine*

door J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegenthart (*Organisch Chemisch Laboratorium, Afd. Bio-organische Chemie, Rijksuniversiteit Utrecht, Croesestraat 79, 3522 AD Utrecht*).

Komplexe koolhydraten treft men algemeen aan in de natuur. Als belangrijke vertegenwoordigers kunnen beschouwd worden glycoproteïnen, glycolipiden en (muco)polysacchariden. Glycoproteïnen worden gedefinieerd als eiwitten, waaraan via de functionele groepen in de zijketens van aminozuren als asparagine, serine, threonine en hydroxylysine één of meer covalent gebonden koolhydraatketens voorkomen (1). Voorbeelden zijn serumeiwitten, celmembraanglycoproteïnen, mucinen en collagenen. In glycosphingolipiden is de koolhydraatketen gebonden aan N-acyl-sphingosine (2).

De structuur van sacchariden wordt gedefinieerd door de volgende parameters:

1. aard en aantal van de samenstellende monosacchariden (ook **D** en **L**);
2. volgorde van de monosacchariden;
3. ringgrootte van de monosacchariden, pyranose (**p**) of furanose (**f**);
4. positie van de glycosidische bindingen tussen de monosacchariden ( $1 \rightarrow 1$ ) t/m  $1 \rightarrow 6$ );
5. configuratie van de glycosidische bindingen,  $\alpha$  of  $\beta$ .

Ten behoeve van het structuuronderzoek speelden in het verleden chemische degradaties als (partiële) hydrolyse, perjodaat oxidatie, en alkalische degradatie in combinatie met analyse technieken als papierchromatografie, dunne-laagchromatografie en colorimetrie een overheersende rol. Al snel bleek dat bij enigszins gekompliceerde structuren de beschikbare analyse methoden te weinig informatie opleverden. Sedert de invoering in de koolhydraatchemie van MS al dan niet in combinatie met GC heeft men op het terrein van de structuuropheldering van onbekende mono- en oligo-sacchariden, alsmede van glycoproteïnen, glycolipiden en (muco)polysacchariden grote vooruitgang kunnen boeken. GC/MS maakte ook de ontwikkeling van nieuwe chemische degradaties mogelijk, zoals uronzuurdegradatie,  $\beta$ -ketodegradatie en trifluoracetolyse, welke speciaal geënt zijn op voornoemde techniek.

De laatste jaren staan lysosomale stapelingsziekten als sialidosis, GM<sub>1</sub>-gangliosidosis, GM<sub>2</sub>-gangliosidosis, mannosidosis, fucosidosis en aspartyl-glycosaminurie sterk in de belangstelling. Het in weefsel en urine gestapelde materiaal, i.e. oligosacchariden en/of glycopeptiden, kan afgeleid worden uit de gestoorde afbraak van glycoproteïnen van het zgn. N-acetyllactosamine en/of oligomannoside type (fig 1) (3, 4).

In ziekenhuislaboratoria kan een eerste indicatie voor deze ziekten verkregen worden m.b.v. ééndimensionale dunne-laagchromatografie in niet-voorbewerkte urine (5). Recent verscheen een artikel betreffende deze methode met enige biochemische achtergrondinformatie in Mededelingen NVKC (6). Momenteel wordt veel structuuronderzoek aan de uitgescheiden complexe koolhydraten van patiënten met glycoproteïnosis verricht, o.a. in een samenwerkingsverband van het Biochem. Lab. Universiteit van Lille en het Org. Chem. Lab. Universiteit van Utrecht. Uit deze onderzoeken is gebleken dat GC/MS in combinatie met hoogfrequente <sup>1</sup>H NMR een betrouwbare en efficiënte methode is voor de structuuropheldering van complexe koolhydraten (7).

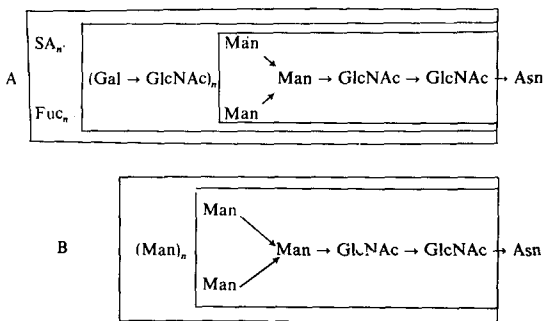


Fig. 1.

Algemene structuren van de koolhydraatketens van glycoproteïnen van het N-acetylglucosamine (A) en oligomannoside (B) type.

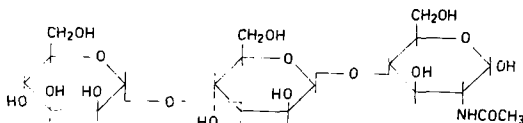


Fig. 2.

Struktuur van het mannosidosis trisaccharide.

Als voorbeeld zal de struktuuropheldering van één van de meest eenvoudige oligosacchariden, het mannosidosis trisaccharide  $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Man-p-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc (fig. 2), nader uitgewerkt worden:

A. Bepaling van de monosaccharide samenstelling m.b.v. GC (-MS). Komplexe koolhydraten worden m.b.v. methanol-HCl gesplitst, waarbij methylglycosiden van de samenstellende monosacchariden ontstaan. Elk van de monosacchariden geeft aanleiding tot een anomeer glycosiden mengsel, een voor het monosaccharide specifieke verhouding van de  $\alpha$ -P,  $\beta$ -P,  $\alpha$ -f en  $\beta$ -f vormen (8). T.b.v. de GC-analyse worden de overige hydroxyl functies getrimethylsilyleerd. Voor het mannosidosis-saccharide wordt de volgende verhouding gevonden: mannose: N-acetylglucosamine = 2:1. Gebruikmakend van getrimethylsilyleerde (-)-2-butylglycosiden van de samenstellende monosacchariden en capillaire GC kan tevens de absolute configuratie vastgesteld worden (9). Het mannosidosis saccharide is opgebouwd uit D-mannose en N-acetyl-D-glucosamine.

B. Bepaling van de reducerende eenheid van het saccharide. Oligosacchariden worden m.b.v. NaBH<sub>4</sub> omgezet in de corresponderende oligosaccharide-alditolen; het reducerende monosaccharide wordt een suikeralkohol. I.v.m. later GC/MS onderzoek wordt meestal NaBD<sub>4</sub> gebruikt, waarbij het C-1 atoom gelabeld wordt (-CHO  $\rightarrow$  -CHDOH).

Splitting met methanol-HCl gevolgd door GC-analyse (zie A) laat zien dat N-acetylglucosamine omgezet is in N-acetylglucosaminitol. De verhouding mannose: N-acetylglucosaminitol bedraagt 2:1. Het mannosidosis-saccharide is dus een trisaccharide met N-acetyl-glucosamine als reducerende eenheid.

C. Permethyleringsanalyse van het trisaccharide-alditol. Het saccharide, gereduceerd met NaBD<sub>4</sub> (zie B), wordt gepermethyleerd met CH<sub>3</sub>J

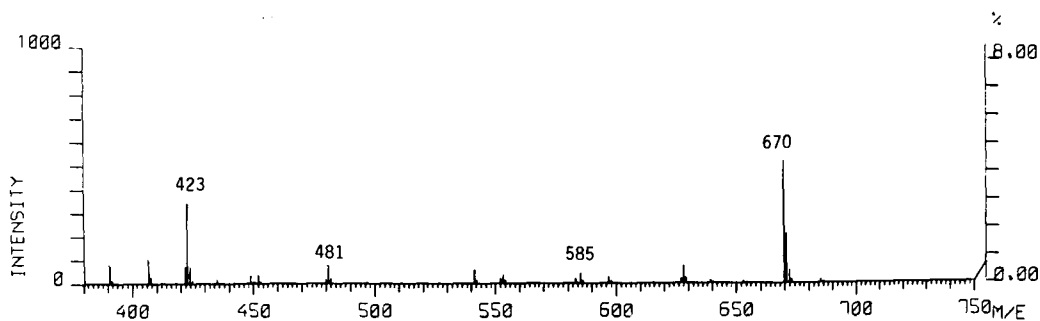
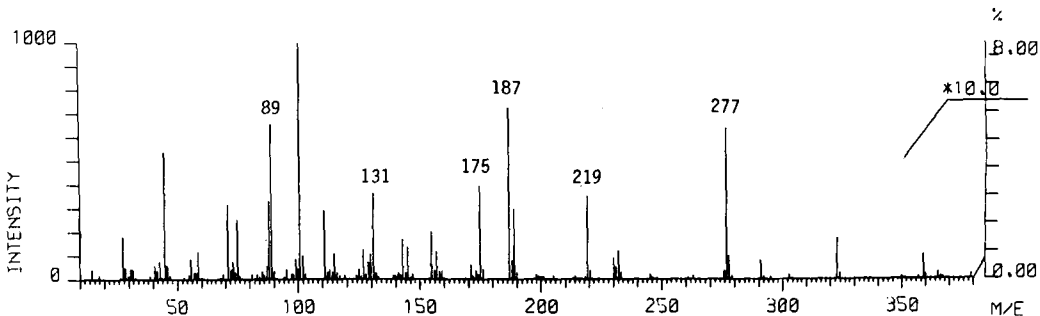
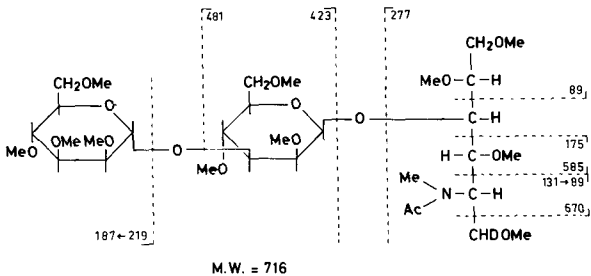


Fig. 3.  
70 eV massaspektrum van het permethyl trisaccharide-alditol-D<sub>1</sub>.

(OH→OCH<sub>3</sub>; NH-COCH<sub>3</sub>→N(CH<sub>3</sub>)-COCH<sub>3</sub>; COOH→COOCH<sub>3</sub>) en vervolgens met EI/MS onderzocht (in GC/MS analyses wordt ook vaak CD<sub>3</sub>J gebruikt). In het algemeen kunnen mono- t/m tetra-sacchariden met GC/MS geanalyseerd worden. Voor hogere oligosacchariden wordt de direkte inlaat methode (probe) gebruikt. GC/MS is dus mogelijk voor het intacte mannosidosis molecuul. Fig. 3 toont het massaspektrum van het permethyl trisaccharide-alditol-D<sub>1</sub>, waaruit afgeleid kan worden dat de sequentie van de samenstellende monosacchariden Hex→Hex→HexNac-ol is. MS zonder pattern-recognition techniek is niet gevoelig genoeg om onderscheid te kunnen maken tussen stereoisomere monosacchariden aangezien slechts kleine verschillen in de fragmentatiepatronen (piekintensiteiten) aanwezig zijn. Voor de naamgeving van de monosacchariden wordt dan ook gebruik gemaakt van de suikeranalyse: hexose = mannose; N-acetylhexosamine = N-acetylglucosamine. Het massaspektrum van het intacte molecuul bevat, naast de reeds genoemde sequentie-informatie, tevens aanwijzingen dat de twee mannose-

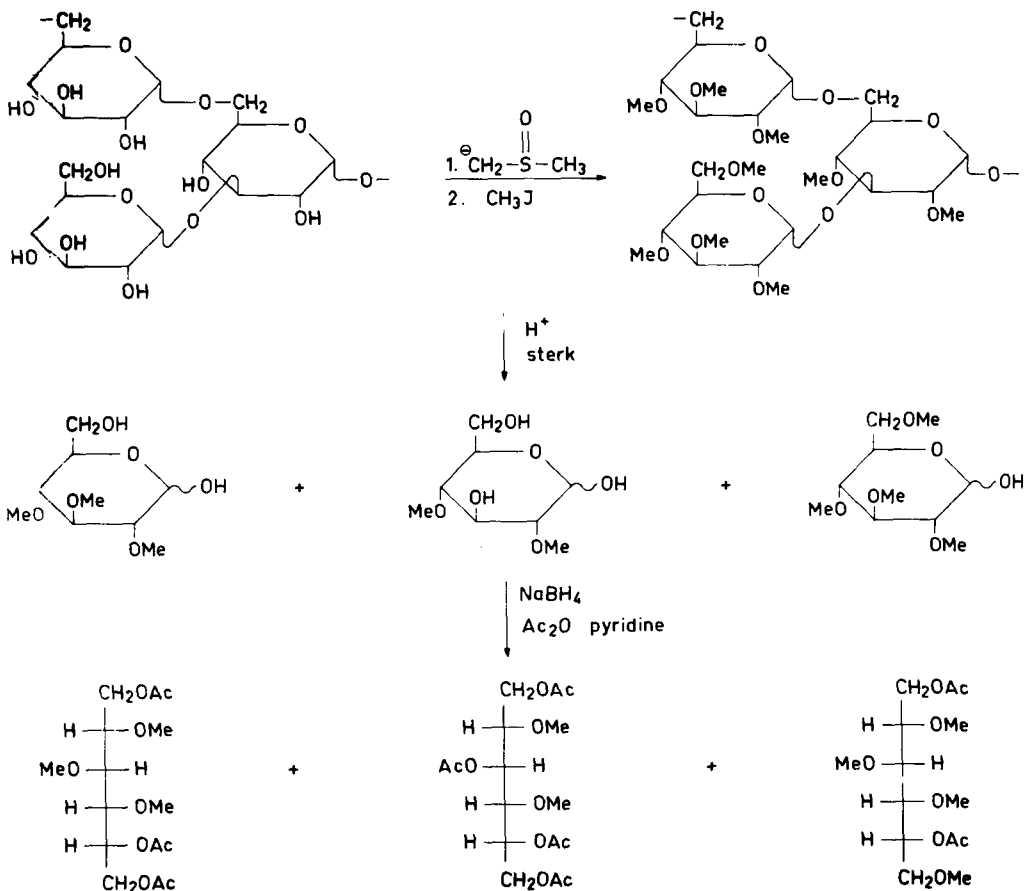


Fig. 4.  
 Algemeen opwerkschema t.b.v. de bepaling van het type glycosidische binding in oligosacchariden (permethyleringsanalyse/alditol acetaat methode).

residuen (1→3) gebonden voorkomen, terwijl de koppeling aan N-acetylglucosaminitol via een (1→4) glycosidische binding verloopt. De gegevens betreffende het type binding kunnen echter niet altijd uit het massaspectrum afgeleid worden, terwijl ze bovendien soms vals-positief zijn. Een betere benadering van deze problematiek is de GC/MS analyse na chemische afbraak. Het algemene afbraakschema voor een willekeurig saccharide-stuk is weergegeven in fig. 4. Na permethylering wordt het molecuul gehydrolyseerd. De gevormde partiël gemethyleerde monosacchariden worden na neutralisering gereduceerd met  $\text{NaBH}_4$  of  $\text{NaBD}_4$ . Tenslotte wordt het mengsel van partiël gemethyleerde alditolen behandeld met azijnzuuranhydride t.b.v. de derivatisering van de vrijgemaakte OH groepen (en re-N-acetylering aminofunctie) en geanalyseerd m.b.v. GC/MS (10). De partiël gemethyleerde alditol-acetaten geven aanleiding tot zeer specifieke massaspectra, waaruit direct de posities van de aanwezige O-acetyl en O-methyl groepen afgeleid kunnen worden. De naamgeving van de stereoisomere monosacchariden geschiedt

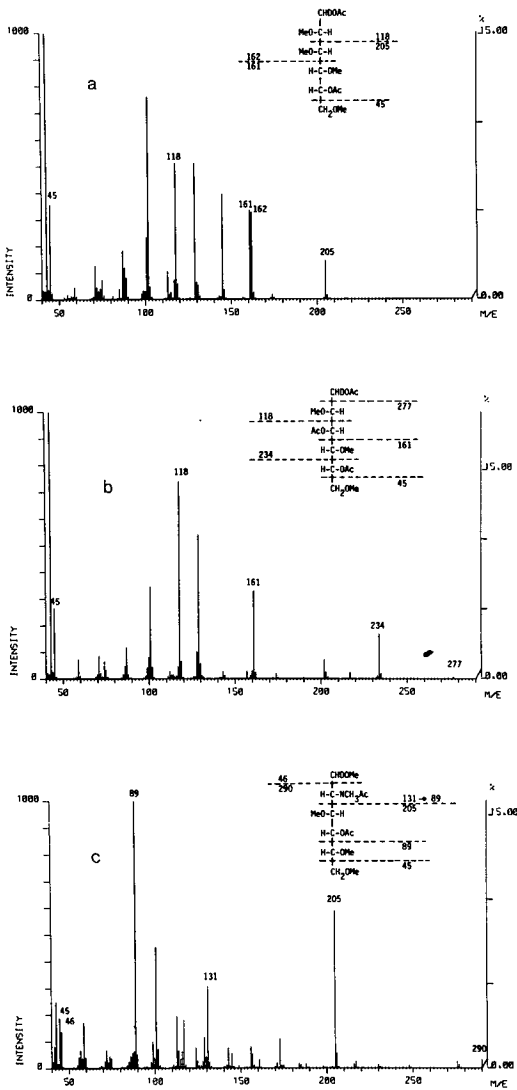


Fig. 5.

70 eV masspektra van partiëel gemethyleerde alditol acetaten

- 1,5-di-0-acetyl-2,3,4,6-tetra-0-methyl-mannitol-D<sub>1</sub>
- 1,3,5-tri-0-acetyl-2,4,6-tri-0-methyl-mannitol-D<sub>1</sub>
- 4-mono-0-acetyl-1,3,5,6-tetra-0-methyl-2-N-methyl-acetamido-2-deoxy-glucitol-D<sub>1</sub>

m.b.v. de GC-retentietijden van de partiëel gemethyleerde alditol-acetaten. Al deze gegevens worden gebruikt t.b.v. de terugredenering, de structuuranalyse van het oorspronkelijk molecuul. Het mannosidosis permethyl trisaccharide-alditol-D<sub>1</sub> wordt volgens voornoemd schema opgewerkt (reductie met NaBD<sub>4</sub>) en geanalyseerd. De masspektra van de drie alditolen zijn afgebeeld in fig. 5. Uit deze masspektra volgt ondubbelzinnig dat het

saccharide een eindstandige hexose-eenheid (Fig. 5a; GC-analyse : mannose-eenheid), een (1→3) gesubstitueerde hexose-eenheid (Fig. 5b; GC-analyse : mannose-eenheid) en een (1→4) gesubstitueerde N-acetylhexosaminitol-eenheid (Fig. 5c; GC-analyse : N-acetylglucosaminitol) bezit. Uit de spektra van fig. 5a en b volgt tevens dat de mannose-eenheden in de pyranose-vorm voorkomen (C-5 atoom draagt O-acetyl groep). De permethyleringsanalyse levert dus als resultaat: Manp-(1→3)-Manp-(1→4)-GlcNAc.

D. Bepaling van de configuratie van de glycosidische bindingen. Alhoewel MS van referentieverbindingen heeft aangetoond dat er kleine massaspektrometrische verschillen zijn tussen  $\alpha$  (1→x) en  $\beta$  (1→x) glycosidische bindingen in molekulen met verder dezelfde monosaccharide samenstelling, is de methode voor nieuwe verbindingen niet toepasbaar. Bruikbaar zijn wel de splitsingen met exoglycosidasen en hoogfrequente  $^1\text{H}$  NMR (chemische verschuivingen en koppelingskonstanten van protonen aan C-1 atomen). Het uiteindelijk resultaat wordt (fig 2):  $\alpha$  -D-Manp-(1→3)- $\beta$ -D-Manp-(1→4)-D-GlcNAc.

Concluderend kan gesteld worden dat in het structuuronderzoek van complexe koolhydraten, GC/MS een essentieel hulpmiddel is, waarbij tevens goed gekozen derivatiseringstechnieken en isotooplabele van groot belang zijn. Tot slot. I.v.m. vals-positieven gedurende de TLC-screening op glycoproteïnosis is goed aanvullend onderzoek als enzymbepalingen in fibroblast en leucocyt en structuurchemie van belang voor een juiste diagnose van het ziektebeeld. De verkregen gegevens kunnen tevens van belang zijn voor prenataal onderzoek.

#### Literatuur

1. R. G. Spiro, Ann. Rev. Biochem., 39, (1970) 732.
2. B. A. Macher en C. C. Sweeley, Meth. Enzymology, 50 C, (1978) 236.
3. J. Montreuil, Pure Appl. Chem., 42, (1975) 431.
4. G. Strecker in J.-P. Farriaux (Ed.), Les Oligosaccharidosis, (1977) 13.
5. R. Humbel, Helv. Paediat. Acta, 30, (1975) 191.
6. M. Duran, H. Fabery de Jonge, J. P. Kamerling en S. K. Wadman, Mededelingen Ned. Ver. Klin. Chem., 3, (1978) 311.
7. L. Dorland, dissertatie Universiteit van Utrecht (1979).
8. J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. G. Vliegthart en J. R. Clamp, Biochem. J., 151, (1975) 491.
9. G. J. Gerwig, J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart, Carbohydr. Res., 62, (1978) 349.
10. P.-E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg en J. Lönngren, Chem. Comm. Univ. Stockholm, 8, (1976).