

Received: 2005.09.19
Accepted: 2006.01.27
Published: 2006.02.21

Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi

Methods of lipopolysaccharide component derivation in evaluating their structures by chromatographic techniques

Jolanta Lodowska¹, Aleksandra Zięba², Daniel Wolny², Ludmiła Węglarz¹, Zofia Dzierżewicz²

¹ Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Farmaceutyczny Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu

² Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu

Streszczenie

Chorobotwórczość bakterii Gram-ujemnych jest uwarunkowana występowaniem w błonie zewnętrznej przede wszystkim struktury lipidowo-polisacharydowej, zwanej endotoksyną lub lipopolisacharydem (LPS). Jest on zbudowany z trzech różniących się budową chemiczną i funkcjami biologicznymi regionów, tj. części O-swoistej, oligosacharydu rdzeniowego i lipidu A. W oznaczaniu struktury LPS powszechnie wykorzystywana jest technika chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GLC/MS). Profil cukrowy bakteryjnych endotoksyn jest analizowany po uprzedniej derywatywacji komponenty węglowodanowej do octanów alditoli lub częściowo zmetylowanych octanów alditoli, co umożliwia ustalenie także miejsc występowania wiązań glikozydowych w polisacharydowym fragmencie LPS. Chromatograficzna analiza lipidowych składników LPS wymaga także modyfikacji kwasów tłuszczowych do pochodnych estrowych, najczęściej metylowych.

Słowa kluczowe:

endotoksyny • lipopolisacharydy • bakterie Gram-ujemne • lipid A • antygen O

Summary

The pathogenicity of Gram-negative bacteria is mediated mainly by the outer membrane-associated lipid-polysaccharide structure, called endotoxin or lipopolysaccharide (LPS). This structure consists of three parts, O-antigen, core oligosaccharide, and lipid A, which differ in chemical composition and biological properties. Gas-liquid chromatography coupled with mass spectrometry (GLC/MS) is commonly used to determine LPS structure. The carbohydrate profiles of endotoxins are analyzed after derivation to alditol acetates or partially methylated alditol acetates, which enables one to establish the site of glycosidic linkages. The chromatographic analysis of LPS lipid components requires their modification to ester derivatives, most frequently to methyl esters.

Key words:

endotoxin • lipopolysaccharide • Gram-negative bacteria • lipid A • O-antigen

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8758.pdf

Word count: 5558

Tables: –

Figures: 7

References: 106

Adres autorki: dr Jolanta Lodowska, ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec, e-mail: jlodowska@slam.katowice.pl

WPROWADZENIE

Lipopolisacharyd (LPS) stanowi integralny składnik zewnętrznej błony komórkowej osłony bakterii Gram-ujemnych. Spełnia on liczne funkcje o podstawowym znaczeniu dla procesów życiowych tych mikroorganizmów, będąc jednocześnie jednym z ważniejszych czynników ich chorobotwórczości. Te lipidowo-polisacharydowe heteropolimery składają się z trzech podstawowych elementów strukturalnych: lipidu A, oligosacharydu rdzeniowego i O-swoistego łańcucha polisacharydowego, nazywanego antygenem O (ryc. 1). Toksyczność związana jest ze składnikiem lipidowym tej makrocząsteczki, podczas gdy immunogenność warunkuje fragment polisacharydowy. Zestawienie informacji o strukturze lipopolisacharydów oraz ich aktywności metabolicznej umożliwia wybór optymalnych metod zapobiegania i leczenia zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi. Nie bez znaczenia jest także możliwość wykorzystania pozytywnych oddziaływań tych struktur w organizmie, np. indukowania nieswoistej odpowiedzi na zakażenia wirusowe i bakteryjne [43], wywoływania odporności na napromieniowanie, działania nekrotyzującego tkankę nowotworową [6,49,50].

CHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA ENDOTOKSYN

LPS stanowią amfifilowe cząsteczki, w których możemy wyróżnić zakotwiczone w błonie lipid A, połączone z antygenem O poprzez oligosacharydowy rdzeń (ryc. 1). LPS składający się z wymienionych wyżej trzech regionów syntetyzują bakterie gładkie (S-smooth). Szorstkie formy drobnoustrojów (R-rough) wytwarzają lipopolisacharyd pozbawiony O-swoistego łańcucha polisacharydowego (ryc. 1). Istnieją także mutanty zwane głęboko szorstkimi, syntetyzujące LPS o skróconym rdzeniu.

Lipid A stanowi hydrofobową część LPS. W jego strukturze występuje jednak polarny element cukrowy, którym jest najczęściej D-glukozaminylo-D-glukozamina. Ten disacharyd zazwyczaj podstawiony jest w pozycjach 1 i 4' resztami fosforanowymi oraz etanoloaminą lub 4-amino-4-deoksy-L-arabinozą, a w pozycjach 2,3,2',3' hydroksylowymi pochodnymi kwasów tłuszczowych. Z grupą aminową jednostki cukrowej łączy się przeważnie (R)-3-hydroksykwas (najczęściej kwas (R)-3-hydroksytetradekanowy), podczas gdy estrowo wiązane mogą być kwasy o konfiguracji (S)-2- lub (R)-3-hydroksy-. Połączone z glukozaminylowym rdzeniem lipidu A hydroksykwas mogą być także acylowane [102]. Ilość kwasów tłuszczowych występujących w lipidzie A jest podstawą klasyfikacji tych struktur na tzw. heksaacyl lipid A (zawierający 6 reszt kwasów tłuszczowych) obecny u *Escherichia coli* oraz odpowiednio heptaacyl lipid A (7 reszt acylowych) u *Salmonella minnesota*, pentaacyl lipid A [97], a nawet triacyl lipid A zidentyfi-

kowany u *Porphyromonas gingivalis* [53]. Lipid A może być podstawiony kwasami tłuszczowymi symetrycznie lub asymetrycznie. Glukozaminylowy rdzeń może być także połączony z mannopiranozą lub dodatkową jednostką glukozaminową. Disacharydowy komponent lipidu A nie zawsze zawiera glukozaminę. U niektórych bakterii, np. *Pseudomonas diminuta* i *P. vesicularis* składa się on bowiem z dwóch cząsteczek 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (GlcN3N) połączonych wiązaniem β 1-6 glikozydowym [100]. W lipidowym fragmencie endotoksynu *Rhodospseudomonas* zidentyfikowano pojedynczą cząsteczkę GlcN3N [73].

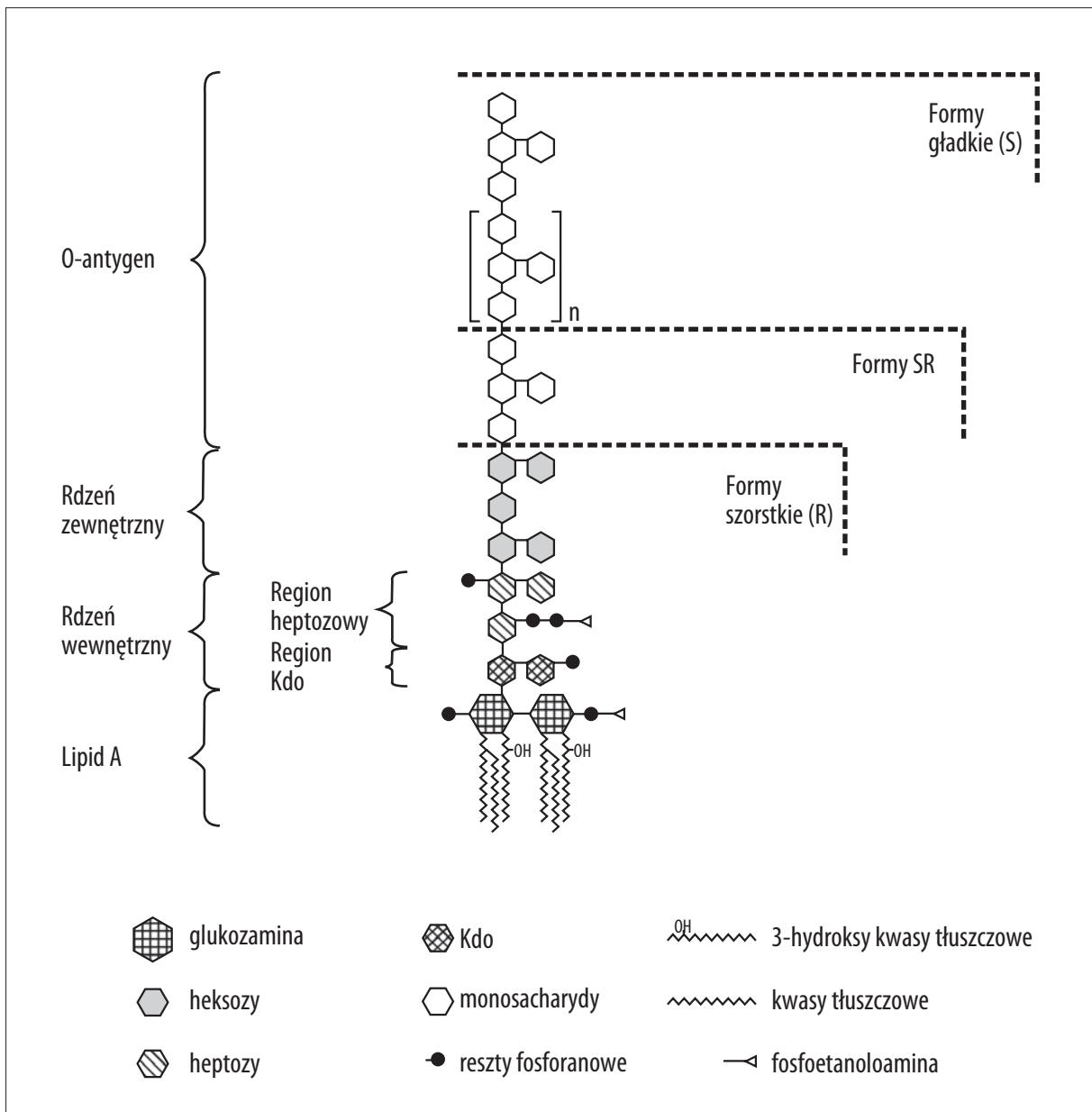
Wspomniana zmienność strukturalna lipidu A nie przeczy jednak tezie, iż jest to najbardziej zachowawczy komponent LPS.

Z lipidem A połączony jest wiązaniem ketozydowym oligosacharydowy rdzeń, w którym można wyróżnić region wewnętrzny zbudowany z 2-3 cząsteczek kwasu 2-keto-3-deoksyoktulozonowego (Kdo) i L-glicero-D-manno-heptoz, oraz część zewnętrzną składającą się z różnych heksoz (ryc. 1). Jednak Łukasiewicz i Ługowski [42] twierdzą, iż powyższy podział jest obecnie „pamiętką historyczną”. Tezę tę potwierdza obecność w regionie heksozowym oligosacharydu rdzeniowego bakterii *Klebsiella pneumoniae* heptoz, a w rdzeniu wewnętrznym glukozy i kwasu galakturonowego [79,84].

Region Kdo, podobnie jak lipid A, stanowi konserwatywny strukturalnie fragment LPS. Przynajmniej jedna cząsteczka tego kwasu lub jego pochodnej, kwasu oktulozonowego, występuje w endotoksynach bakterii Gram-ujemnych. Stosunkowo zachowawczy strukturalnie jest także region heptozowy, chociaż i w tym komponencie LPS u poszczególnych mikroorganizmów występuje różnicowanie jakościowe i ilościowe jednostek cukrowych. Identyfikowano bowiem w tym fragmencie rdzenia nie tylko heptozy, lecz także glukozaminę (*Bordetella pertussis*) [11], glukozę (*Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* 75R) [5, 66], galaktozę i kwas glukuronowy (*Vibrio parahaemolyticus*) [38]. Międzygatunkowe różnicowanie profilu węglowodanowego obejmuje region heksozowy, co jednak nie przeczy tezie o względnym konserwatywności strukturalnym całego oligosacharydu rdzeniowego.

Heterogennością budowy charakteryzuje się natomiast, połączony z regionem zewnętrznym rdzenia, antygen O. Ten homo- lub heterooligosacharyd jest zbudowany z powtarzających się podjednostek, w skład których najczęściej wchodzi 2-6 reszt cukrowych, rzadziej 7 lub 8, połączonych liniowo bądź w sposób rozgałęziony [74]. Dotychczas w tych strukturach zidentyfikowano kilkadziesiąt różnych monosacharydów, m.in. 2-amino-2,6-dideoksygalaktozę





Ryc. 1. Schemat budowy LPS w różnych form bakterii

(*Proteus penneri* 16) [95], kwas N-acetylmuraminowy (*Proteus penneri* 62) [80], kwas N-acetylneuraminowy (*Salmonella enterica* serovar Toucra O48, *Hafnia alvei* PCM 2386, *Escherichia coli* O104) [22,23], 2-acetimidyno-2,6-dideoksy-L-galaktozę (*Yersinia ruckeri* serotyp 01) [7]. Zależnie od profilu węglowodanowego antygen O może mieć charakter obojętny, jak zazwyczaj u *Salmonella*, kwaśny lub zasadowy, jak najczęściej u *Escherichia coli* [20,44]. W tych zróżnicowanych strukturalnie komponentach LPS występuje często D-glukoza, D-mannoza, D-galaktoza oraz deoksycukry - L-fukoza oraz D- i L-ramnoza. Antygeny O *Enterobacteriaceae* mogą zawierać także 3,6-dideoksyheksozy. Częstymi składowymi łańcuchów O-swoistych są również aminocukry występujące w postaci piranozowej, na ogół N-acetylowane, np. D-glukozamina, D-mannozamina, D-galaktozamina, N-acetylo-D-glukozamina, N-acetylo-D-galaktozamina [40].

Funkcje biologiczne bakteryjnych endotoksyn

Bakterie Gram-ujemne są wszechobecne w środowisku naturalnym. Stanowią znaczną część flory jelitowej zwierząt i człowieka. Już od chwili narodzin makroorganizmy kontaktując się z bakteryjnymi strukturami poli- i oligosacharydowymi prawdopodobnie rozwijają i utrzymują prawidłową funkcję układu immunologicznego. Pojawienie się w krwiobiegu gospodarza namnażających się, czy też martwych bakterii lub nawet fragmentów ich ścian komórkowych jest rozpoznawane przez system odpornościowy, który wywołuje wewnątrzustrojową reakcję zapalną. Jednak dopiero uwolnienie lipopolisacharydu z powierzchni błony zewnętrznej drobnoustroju do krwiobiegu gospodarza umożliwia ujawnienie jego aktywności biologicznej, za którą odpowiedzialny jest lipid A. Aktywuje on makrofagi i monocyty, komórki śródłonka i mięśni gładkich, a w mniejszym

stopniu także inne komórki, co prowadzi do wytwarzania i uwalniania przez nie mediatorów: prostaglandyn, leukotrienów, TNF- α , interleukin (IL-1, -6, -8, -10). Niewielkie ich nagromadzenie wpływa korzystnie na makroorganizm, indukując odporność na zakażenie [43], działając adiuwantowo [2,105] i nekrotyzując wobec tkanki nowotworowej [6,17,96]. Wysokie stężenie wymienionych cytokin prowadzi do wielokierunkowego, toksycznego oddziaływania na organizm ludzki lub zwierzęcy. Następuje wzrost temperatury ciała, obniżenie ciśnienia krwi, aktywacja składowych układu dopełniacza, rozsiane wewnątrznaczyniowe wykrzepianie krwi, nekroza komórek szpiku kostnego, leukopenia z następującą leukocytozą, hiperglikemia, nadciśnienie płucne [44]. Następstwem tych oddziaływań u ludzi może być wystąpienie objawów posocznicy i wstrząsu septycznego, który często prowadzi do zgonu.

Część cukrowa nie wykazuje właściwości endotoksycznych, ale moduluje aktywność lipidu A [42]. Polisacharyd O-swoisty, jako najbardziej wysunięty na zewnątrz komórki składnik LPS, oddziałuje ze środowiskiem zewnętrznym oraz zainfekowanym makroorganizmem. Ten komponent endotoksyn może spełniać rolę adhezyny, warunkując zdolność przylegania bakterii Gram-ujemnych do podłoża. Ma to znaczenie w przypadku atakowania nabłonków przez drobnoustroje, np. uropatogenne szczepy *Proteus sp.* W wielocukrze O znajdują się także receptory wirusów bakteryjnych. Sugeruje się więc, że bakteriofagi nie tylko wiążą się swoiście do określonych podjednostek antygeny O, ale także rozpoznają jego charakterystyczną konformację przestrzenną [75].

Analiza struktury lipopolisacharydów bakteryjnych

Poznanie struktury LPS wymaga zbadania składu chemicznego zarówno komponenty lipidowej, jak i sacharydowej. W lipidzie A wskazane jest ustalenie rodzaju budującej go jednostki aminocukrowej, typu i liczby kwasów tłuszczowych wraz ze sposobem ich połączenia w badanej strukturze oraz zweryfikowanie tezy o występowaniu innych komponentów w tym fragmencie LPS, np. grup fosforanowych lub etanolaminy. Określenie struktury fragmentu węglowodanowego wymaga oznaczenia składu chemicznego, typu i anomerii wiązań, konformacji i konformacji składników monocukrowych.

Niezwykle użyteczne we wstępnych badaniach strukturalnych bakteryjnych endotoksyn są techniki chromatograficzne, a szczególnie chromatografia gazowo-cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas. Chęć jej zastosowania wymusza jednak przeprowadzenie wielu procedur, których celem jest rozdzielenie poszczególnych komponentów strukturalnych i derywatyżacja budujących je elementów (kwasów tłuszczowych i węglowodanów) do pochodnych bardziej lotnych niż struktury pierwotne.

Techniki chromatograficzne dostarczając informacji o poszczególnych składnikach LPS tworzą podstawę do kontynuowania badań strukturalnych tych makrocząstek z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

CHROMATOGRAFIA GAZOWO-CIECZOWA W ANALIZIE CUKRÓW

Chromatografia gazowo-cieczowa jest techniką stosowaną w ustalaniu profilu węglowodanowego LPS, położenia

wiązań glikozydowych, a po częściowej, selektywnej hydrolizie dostarczającą względnie pełnej informacji o strukturze wyjściowego polisacharydu. Stosując chiralne fazy stacjonarne lub derywatyżując cukier zawierający centrum chiralne, można również określić tą techniką konfigurację absolutną monosacharydów [10].

Analizując profil węglowodanowy części rdzeniowej i łańcucha O-antygenowego należy oddzielić składnik polisacharydowy od lipidu A stosując łagodną hydrolizę wiązania ketozydowego pomiędzy nieredukującą cząsteczką glukozaminy a Kdo w rdzeniu wewnętrznym. Proces ten można przeprowadzić 1 [8,52] lub 2% [57,60,78,94] wodnym roztworem kwasu octowego, w temperaturze 100°C przez 1–5 godzin [1,14,24].

Derywatyżacja cukrów jako metoda umożliwiająca zanalizowanie struktury fragmentu polisacharydowego endotoksyn techniką chromatografii gazowo-cieczowej

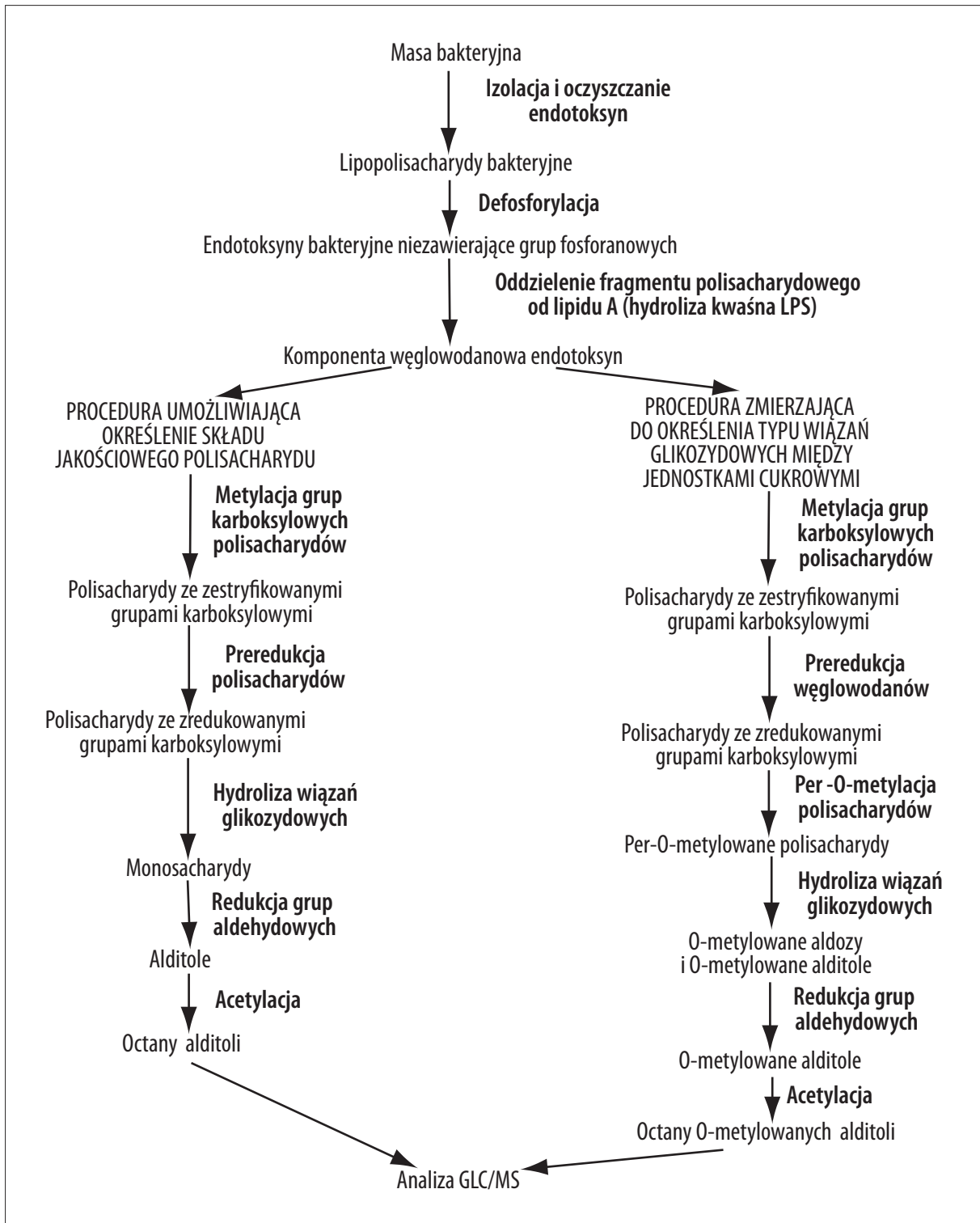
Ze względu na liczne grupy polarne węglowodany są stosunkowo mało lotne, a więc w celu zanalizowania ich struktury techniką chromatografii gazowo-cieczowej należy przeprowadzić je w odpowiednie pochodne o niższej temperaturze parowania. Reakcje derywatyżacji obejmują grupy hydroksylowe, aminowe, karboksylowe i aldehydowe węglowodanów [10]. Chcąc ustalić wspomnianą techniką analityczną profil węglowodanowy komponenty polisacharydowej modyfikuje się te struktury najczęściej do octanów alditoli. Dodatkowych informacji o położeniu wiązań glikozydowych dostarcza derywatyżacja komponenty cukrowej endotoksyn bakteryjnych do częściowo zmetylowanych octanów alditoli. Na rycinie 2 przedstawiono proponowaną procedurę modyfikacji struktury LPS do wspomnianych pochodnych węglowodanowych składników analizowanych heteropolimerów.

Modyfikacja cukrów do octanów alditoli

Analizy profilu węglowodanowego polisacharydowej składowej LPS techniką chromatografii gazowo-cieczowej (GLC) wymaga derywatyżacji tych struktur do octanów alditoli. Procedura ta powinna więc obejmować rozszczepienie wiązań glikozydowych zachodzące w obecności kwasu lub enzymu. Uwolnione cukry należy zredukować tetrahydroboranem sodu celem uzyskania alditoli, które następnie powinny być zacytylowane.

Hydrolizę wiązań glikozydowych można prowadzić w środowisku kwasu trifluoroctowego (TFA), solnego lub siarkowego (VI). Ten ostatni katalizator kwasowy powoduje znaczną dekompozycję struktur węglowodanowych, zwłaszcza ksylozy i mannozy. Na niekorzyść tego kwasu świadczą także problemy analityczne związane z usunięciem go ze środowiska po hydrolizie [9]. Wielu badaczy [19,37,57,59,61] składu cukrowego LPS prowadzi rozszczepianie wiązań glikozydowych 2M roztworem TFA. Zapewnia on bowiem względną stabilność struktury cukrów obojętnych [9], podczas gdy kwas solny wymaga prowadzenia procesu przy znacznym ograniczeniu dostępu powietrza, powodującego dekompozycję jednostek monosacharydowych [9]. W środowisku kwaśnym kwasy uronowe ulegają częściowej dekarboksylacji, a N-ace-





Ryc. 2. Schemat postępowania analitycznego pozwalającego ustalić profil węglowodanowy i położenie wiązań glikozydowych między jednostkami cukrowymi w LPS

tylowane aminocukry deacetylacji. W tych warunkach na degradację w większym stopniu narażone są aldopentozy i deoksycukry niż aldoheksozy [9].

Najczęściej zalecaną [9,98] procedurą usuwania roztworu kwasu solnego po hydrolizie wiązań glikozydowych

jest wytrącanie go w postaci nierozpuszczalnego chlorku srebra, a następnie odwirowanie w celu separacji tej soli. Natomiast znacznie mniej kłopotliwe jest usunięcie z układu reakcyjnego stosunkowo lotnego kwasu trifluorooctowego, który odparowuje się w strumieniu azotu. Inną zaletę stosowania do hydrolizy wiązań glikozydowych kwasu

trifluorooctowego zauważa Biermann [9], opisując metody analizy struktury węglowodanów. Powołując się na badania prowadzone przez Griggsa i wsp. [25] stwierdził, iż odzysk węglowodanów po 3 godzinnej hydrolizie mucyny 3M roztworem HCl prowadzonej w temperaturze 100°C wynosi odpowiednio 76%, 76,6%, 84,3%, 82,5%, 87,7% wyjściowej ilości fukozy, mannozy, galaktozy, N-acetyloglukozaminy i N-acetylogalaktozaminy. Natomiast Honda i wsp. [33] hydrolizując oligosacharydy 2M roztworem TFA przez 6 godzin w temperaturze 100°C uzyskali 93% wyjściowej ilości glukozaminy, 94% ksylozy, 95% glukozy, 97% galaktozaminy i 98% fukozy.

Przed hydrolitycznym rozszczepianiem wiązań glikozydowych w środowisku kwaśnym należy zestryfikować, a następnie zredukować grupy karboksylowe kwasów uronowych wchodzących w skład LPS. Jako czynnik redukujący grupy karboksylowe stosuje się najczęściej tetrahydroboran sodu lub tetradeuteroboran sodu, dzięki któremu powstają pochodne znakowane deuterem, co umożliwia odróżnienie ich od innych cukrów.

Kolejnym etapem derywatywacji polisacharydowej komponenty LPS do octanów alditoli jest redukcja grup aldehydowych do hydroksylowych uwolnionych cukrów obojętnych. Także w tym przypadku jako czynnik redukujący można stosować tetrahydroboran sodu lub tetradeuteroboran sodu, celem znakowania deuterem pierwszorzędowych atomów węgla występujących pierwotnie w postaci ugrupowań aldehydowych. Podczas takiej reakcji powstaje wiązanie C-H (lub C-D), dla którego źródłem wodoru (deuteru) jest anion wodorkowy (deuterkowy) stosowanego odczynnika. Jednak w przeciwieństwie do redukcji grup karboksylowych w tym przypadku atom węgla ulega podstawieniu tylko przez jeden atom wodoru (deuteru). Tym samym zachodzi selektywne znakowanie atomu węgla pierwotnego ugrupowania aldehydowego. Mechanizm redukcji grupy karbonylowej tetrahydroboranem sodu polega na nukleofilowej addycji wodorku do grupy karbonylowej. Czterokrotne powtórzenie tej addycji wytwarza sole zawierające aniony tetraalkoksyboranowe, które hydroлизованne są do alkoholi.



Praktyka wskazuje, iż redukcja ugrupowania aldehydowego zachodzi najefektywniej, gdy jest prowadzona w temperaturze 4°C (w lodówce) przez całą noc (około 12 godz.). Powyższe warunki czasowo-temperaturowe prowadzenia tego procesu stosowane są przez wielu badaczy struktury bakteryjnych endotoksyn [65,76], aczkolwiek niektórzy [56,61] preferują znacznie krótszy czas redukcji (1–6 godz.) prowadzonej jednak w wyższych temperaturach (np. 20°C). Fox i wsp. [20,21] twierdzą, że redukcja grup aldehydowych tetrahydroboranem sodu powoduje otrzymanie z dwóch różnych cukrów identycznego alditolu, np. z D-glukozy i L-gulozy powstaje D-glucitol. Ponadto otrzymane D-alditole nie mogą być oddzielone od L-alditoli bez chiralnej fazy stacjonarnej lub przeprowadzenia ich w chiralne pochodne.

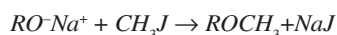
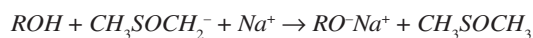
Proces acetylacji otrzymanych alditoli może być przeprowadzany bezwodnikiem kwasu octowego w obecności

ści N-metyloimidazolu, pirydyny lub octanu sodu, jako katalizatorów procesu [20,21,23]. Zastosowanie N-metyloimidazolu oraz pirydyny sprzyja powstawaniu produktów ubocznych, które powstają w wyniku reakcji wspomnianych katalizatorów z bezwodnikiem octowym [21]. Te negatywne procesy zachodzą w większym stopniu, gdy acetylacja alditoli w obecności N-metyloimidazolu prowadzona jest w wyższych temperaturach [98]. Fox i wsp. [21] twierdzą, iż piki chromatograficzne powstałych artefaktów mogą interferować z oznaczanymi pochodnymi alditoli utrudniając prawidłową interpretację rozdziału chromatograficznego. Problem ten może być zminimalizowany przez przeprowadzenie po acetytacji ekstrakcji octanów alditoli układem woda: heksan (1:1, v:v). Wielu badaczy [23,103] struktury kompleksów lipidowo-polisacharydowych preferuje pirydynę jako katalizator wspomnianego procesu, stosując równoobjętościowy stosunek powyższego związku i bezwodnika octowego. Nieco mniej chętnie, jako katalizator acetytacji alditoli, stosowany jest octan sodu, mimo iż charakteryzuje się znacznie mniejszą toksycznością niż pirydyna, co eliminuje narażenie analityka na pracę z nieobojętnym dla zdrowia odczynnikiem. Fox i wsp. [21] zwracają ponadto uwagę na najlepszą efektywność acetytacji alditoli prowadzonej w obecności octanu sodu, co być może jest konsekwencją minimalizacji tworzenia produktów ubocznych, będących przyczyną mniejszej wydajności procesu głównego.

Derywatywacja jednostek węglowodanowych do częściowo zmetylowanych octanów alditoli

Celem określenia typu wiązań glikozydowych między jednostkami cukrowymi w oligosacharydach wykorzystywana jest analiza metylacyjna, która polega na syntezie eterów w wyniku metylacji wolnych grup hydroksylowych cukrów w warunkach gwarantujących zachowanie nienaruszonych wiązań glikozydowych. Otrzymuje się w ten sposób per-O-metylowane oligosacharydy, które po hydrolitycznym rozszczepieniu wiązań glikozydowych przekształcają się w częściowo zmetylowane monosacharydy. Związki te w wyniku redukcji do eterów metylowych alditoli i acetytacji tworzą częściowo zmetylowane octany alditoli. Interpretacja rozdziałów chromatograficznych mieszaniny tych pochodnych pozwala ustalić pozycję wiązań glikozydowych między monomerami w oligo- lub polisacharydach. Taka możliwość wynika z faktu otrzymania, w wyniku opisanej procedury derywatywacyjnej, pochodnej, w której ugrupowania hydroksylowe, zaangażowane w tworzenie wiązań glikozydowych polisacharydu, występują w postaci zacetylowanej.

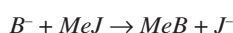
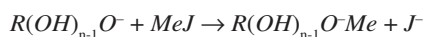
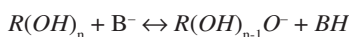
Metylacja oligosacharydu jest przeprowadzana zazwyczaj metodą Hakomori [28]. W procedurze tej wykorzystywany jest anion metylosulfinylometylowy, który katalizuje powstanie jonu alkoksylanowego, reagującego następnie z jodkiem metylu [28].



Phillips i Fraser [62] proponują zastosowanie KH i DMSO jako źródła jonu metylosulfinylometylowego.



Alternatywną metodą derywatywacji węglowodanów do eterów metylowych jest procedura Ciucanu i Kerek [15]. Badacze Ci zakładają, że jon alkoksylanowy powstaje nie w wyniku działania jonu metylenowego, lecz anionu hydroksylowego lub wodorowego. Źródłem tych jonów jest wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu lub wodorek sodu w dimetylosulfotlenku, N,N-dimetyloamidzie kwasu mrówkowego lub N,N-dimetyloamidzie kwasu octowego.



gdzie B^- : NaOH, KOH, NaH [15]

Ciucanu i Kerek [15] uzyskali największą efektywność wspomnianego procesu, gdy prowadzili go w obecności 20 mg wodorotlenku sodu, 300–500 μ l dimetylosulfotlenku i 100 μ l jodku metylu na 4–5 mg cukru. Warunkiem koniecznym derywatywacji ugrupowań hydroksylowych węglowodanów do eterów metylowych jest bezwodne środowisko reakcji. Problem stanowi także wprowadzenie do układu reakcyjnego określonej ilości sproszkowanego, suchego wodorotlenku sodu, który jak wiadomo jest związkiem higroskopijnym. Powyższe problemy można rozwiązać wprowadzając naważony i wysuszony w strumieniu azotu wodorotlenek sodu w pastylkach do określonej ilości DMSO (tak, aby stężenie NaOH w DMSO wynosiło 40 mg/ml), a następnie rozdrabniając go w tym rozpuszczalniku przez rozcieranie przy ciągłym przedmuchiwanu układu strumieniem azotu. Tak przygotowaną zawiesinę wodorotlenku sodu w dimetylosulfotlenku można przechowywać w lodówce, dopóki nie stwierdzimy zmiany jej zapachu lub barwy.

Niemalym kłopotem jest także usunięcie z układu reakcyjnego DMSO i nadmiaru jodku metylu po derywatywacji węglowodanów. Dane literaturowe sugerują różnorodne sposoby rozwiązania tego problemu, począwszy od odprowadzania w strumieniu gazu obojętnego [90], a następnie dosuszeniu próby przez całą noc w ekzykatorze nad pięciotlenkiem fosforu, pod zmniejszonym ciśnieniem [40]; przez odmywanie dimetylosulfotlenku i wodorotlenku sodu znacznym nadmiarem wody w stosunku do układu wyjściowego (10:1), jak proponuje Ciucanu i Kerek [15]; a skończywszy na wykorzystaniu techniki ekstrakcji do fazy stałej [104].

Inne strategie derywatywacji grup funkcyjnych cukrów

Derywatywacja grupy hydroksylowej

Oprócz opisanych wyżej metod metylacji grup hydroksylowych cukrów [15,28], Prehm [64] zaproponował szczególnie przydatną dla wrażliwych na środowisko alkaliczne jednostek węglowodanowych, łagodną procedurę, wykorzystującą jako czynnik metylujący trifluorometylosiarczan metylu w obecności trimetylofosforanu. Ten sposób derywatywacji wykorzystywany jest więc przez wielu bada-

czy struktury bakteryjnych endotoksyn do zweryfikowania obecności Kdo lub kwasu sialowego [22,77]. Ohno i wsp. [54] sugerują użycie jako czynnika metylującego diazometanu w obecności siliakazelu jako katalizatora.

Biermann [10] twierdzi, iż wspomniane grupy funkcyjne cukrów można także poddać trifluoroacetylacji, stosując bezwodnik trifluoroctowy lub silylacji heksametylo-disilazaniem lub trimetylochloresilanem w pirydynie. Nie zalecanym reagentem stosowanym do silylowania jednostek cukrowych jest bis-(trimetylosililo)-acetamid (BSA) ze względu na możliwość anomeryzacji.

Derywatywacja grupy karboksylowej

W powszechnej praktyce laboratoryjnej derywatywując karboksylowe pochodne cukrów stosuje się redukcję grup karboksylowych tetrahydroboranem sodu. Proces ten powinien być jednak poprzedzony derywatywacją wspomnianych ugrupowań, bowiem tetrahydroboran sodu jest stosunkowo słabym czynnikiem redukującym. Niektórzy badacze [19] poprzedzają redukcję estryfikacją grup karboksylowych. Inni [88] redukując tetrahydroboranem sodu grupy karboksylowe aktywują je karbodiimidem. Severn i wsp. [79] zastosowali natomiast tetraborodeuterek litu w tetrahydrofuranie, jako silniejszy czynnik redukujący. Lehrfeld [39] zmodyfikował grupy karboksylowe kwasów aldonowych N-propyloaminą, otrzymując N-propyloaldonoamidy. Biermann [10] proponuje także silylowanie wspomnianych ugrupowań, choć utworzone wiązanie estrowe jest szczególnie wrażliwe na hydrolizę.

Derywatywacja grupy aldehydowej

W preparatyce analitycznej cukrów grupy aldehydowe lub ketonowe są najczęściej redukowane tetrahydroboranem sodu do alditoli. W celu umożliwienia analizy jednostek węglowodanowych techniką GLC ich grupy aldehydowe mogą być także modyfikowane chlorowodorciem hydroksyloaminy do oksymów, a następnie nitryli lub O-metylową pochodną hydroksyloaminy w O-metylooksymy, po czym acetylowane [10].

Rozszczepianie wiązań glikozydowych

Analiza składu monosacharydowego cukrów złożonych techniką GLC wymaga – oprócz wyizolowania i oczyszczenia – lizy wiązań glikozydowych. Najczęściej, jak już wspomniano, stosuje się hydrolizę prowadzoną w obecności kwasu siarkowego, solnego lub trifluoroctowego.

Wiązania glikozydowe mogą być także rozszczepiane w bezwodnym metanolu w obecności chlorowodoru jako katalizatora. Otrzymuje się złożoną mieszaninę metylowych glikozydów monosacharydów. Niektóre acetylowane aminocukry mogą w czasie tego procesu ulec N-deacetylacji. Podczas metanolizy należy utrzymywać warunki bezwodne, ponieważ obecność śladowych ilości wody powoduje powstanie złożonej mieszaniny glikozydów oraz wolnych form cukrów [9].

Znacznie rzadziej przeprowadza się formylolizę i acetolizę oligo- i polisacharydów. Mają one zastosowanie szczególnie w przypadku słabo rozpuszczalnych w wodzie metylowa-

nych polisacharydów. Procedura ta obejmuje rozpuszczenie ich w 90% kwasie mrówkowym i 2 godzinną inkubację w 100°C celem rozbitcia wiązań glikozydowych. Acetoliza jest prowadzona w mieszaninie bezwodnika octowego, kwasu octowego i kwasu siarkowego w stosunku objętościowym 10:10:1 [9].

Sposoby pokonywania problemów analitycznych związanych z obecnością w bakteryjnych lipopolisacharydach mało stabilnych struktur węglowodanowych

Część wewnętrzna rdzenia endotoksyny zawiera rzadko spotykane cząsteczki cukrów, a wśród nich kwas 2-keto-3-deoksyoctulozonowy (Kdo), który łączy oligosacharyd endotoksyny z lipidem A. Stąd też w przypadku analizy Kdo strategia analityczna musi uwzględniać niewielką stabilność nie tylko wiązań ketozydowych, ale również grupy ketonowej, która zostaje uwolniona w wyniku łagodnej hydrolizy [86,87]. Tak więc w pierwszym etapie postępowania należy przeprowadzać redukcję grupy ketonowej do hydroksylowej w słabo alkalicznym środowisku zawierającym tetrahydroboran lub tetradeutero-boran sodu. Tak przygotowane pochodne Kdo, metyluje się w obecności jodku metylu, co powoduje przekształcenie ich w etery metylowe ze zmetylowaną grupą karboksylową. Po czym należy powtórzyć redukcję pierwotnego ugrupowania karboksylowego, które po estryfikacji jest bardziej wrażliwe na działanie tetrahydroboranu sodu. W wyniku przeprowadzonej w następnym etapie hydrolizy wiązań glikozydowych, otrzymuje się częściowo zmetylowane pochodne 3-deoksyoctitolu, których wolne grupy hydroksylowe, a więc uczestniczące w tworzeniu wiązań z innymi cukrami, należy zacetylować, a powstające w wyniku tej procedury częściowo zmetylowane octany 3-deoksyoctitolu zanalizować chromatograficznie, ustalając na podstawie zarejestrowanych widm masowych ich strukturę.

W strukturach cukrowych LPS występują również aminocukry, których grupa aminowa jest na ogół zacetylowana. W wyniku hydrolizy wiązań glikozydowych następuje częściowa N-deacetylacja. Z tego powodu reszty aminocukrów poddaje się ponownej N-acetylacji. Proces ten prowadzony jest bezwodnikiem octowym w obecności nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu, w temperaturze pokojowej przez 30 min. Holst i wsp. [32] proponują, aby powstający – w wyniku procedury derywatywizacyjnej cukrów, octan sodu usuwać z układu reakcyjnego na kationicie – Dowex 50WX2-400.

Niemalym problemem analitycznym w ustaleniu struktury bakteryjnych endotoksyn jest także dekarboksylacja grup kwasowych cukrów, która może nastąpić w wyniku hydrolizy oligosacharydów [9]. W celu rozwiązania powyższego problemu przeprowadza się estryfikację ugrupowania karboksylowego węglowodanów.

Spektrometria mas w analizie węglowodanów

Informacje o sekwencji polimeru mogą być uzyskane dzięki połączeniu powszechnie stosowanych metod analizy chemicznej (metylacji i specyficznych degradacji) ze spektrometrią mas. W tych technikach badana substancja jest

jonizowana strumieniem elektronów, jonów, cząsteczek, lub atomów, co powoduje powstanie tzw. jonów pseudo-molekularnych, ulegających następnie rozpadowi do jonów o mniejszych masach. Ich analiza jest przydatna w identyfikacji struktury badanej substancji [48].

Spektrometria mas z jonizacją strumieniem elektronów (Electron Impact – EI), w połączeniu z analizą metylacyjną pozwala ustalić skład monosacharydowy badanego cukru złożonego. Do zalet tej metody jonizacji zalicza się stosunkowo prostą konstrukcję komory jonizacyjnej oraz łatwość kontrolowania strumienia elektronów poprzez zmianę prądu katody oraz potencjału między nią a anodą. Konieczna jest jednak derywatywizacja polarnych substancji organicznych, do których należą m.in. cukry, w bardziej lotne pochodne. Jonizacja tego typu powoduje znaczną fragmentację cząsteczki badanego związku, czego rezultatem jest otrzymywanie w widmie masowym pasma nie tylko jonu molekularnego, ale także jonów powstałych podczas jego rozpadu masowego.

W analizie natywnych i modyfikowanych oligosacharydów wykorzystuje się technikę FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry). W tej technice badany układ rozpuszczony w ciekłej matrycy, którą może być glicerol [63], tioglicerol [55,63], alkohol m-nitrobenzylowy [48], bombardowany jest strumieniem rozprędzonych atomów ksenonu [51,55] lub jonów cezu [48, 63]. W wyniku jonizacji powstają jony dodatnie – (M+H)⁺ przez uprotonowanie cząsteczki lub (M+kation)⁺ przez przyłączenie kationów Na⁺, K⁺ i innych. Mogą powstać także jony ujemne – głównie są to (M-H)⁻, ale także (M+anion)⁻. Faza gazowa jest wytwarzana bez konieczności wcześniejszego przeprowadzenia substancji w lotne pochodne [48]. W przypadku badania złożonych struktur cukrowych, jakimi są polisacharydy bakteryjne, przeprowadza się je w oligosacharydy przez łagodną hydrolizę lub specyficzne degradacje. Permetylacja i peracetylacja, ukierunkowując fragmentację, zwiększa czułość metody. Utlenianie nadjodanem struktur cukrowych w połączeniu z metylacją pozwala ustalić miejsca rozgałęzień łańcucha polisacharydowego [48].

W analizie cukrów stosuje się także układ MS/MS (Tandem Mass Spectrometry), który składa się z dwóch sprzężonych ze sobą spektrometrów mas. Technika ta pozwala na analizę wybranego jonu molekularnego [31,48], lub mieszanin bez konieczności ich wcześniejszego rozdzielenia na kolumnie chromatograficznej [31].

W ostatnich latach jedną z ważniejszych technik w analizie makrocząsteczek biologicznych stała się MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight). Jony molekularne są wytwarzane przez krótki impuls światła laserowego, a następnie kierowane do detektora. Sposobem detekcji jest zwykle pomiar czasu przelotu jonów od źródła do detektora (time-of-flight) [48]. Ważnym elementem analizy MALDI jest dobranie odpowiedniej matrycy, w przypadku wielocukrów stosuje się kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy [48,52,63,68]. W analizie MALDI należy usunąć z bakteryjnych struktur cukrowych podstawniki fosforanowe i fosfoetanolaminę, ponieważ nie są one odróżniane od N-acetylowanych heksoz. Do tego celu używa się 48% wodnego roztworu HF [34].



Chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GLC/MS)

Chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas stanowi technikę o dużym znaczeniu w analizie jakościowej i ilościowej materiału cukrowego [48].

Podstawą w zrozumieniu struktury wielocukru jest określenie z jakich monosacharydów się składa i jak są one połączone. Najczęściej stosowaną metodą, pozwalającą ustalić tego typu informacje, jest analiza GLC/MS częściowo zmetylowanych octanów alditoli.

Pozycje grup O-metylowych i O-acetylowych są określane na podstawie widm fragmentacyjnych otrzymanych w analizie GLC/MS. Najczęściej jonizacja składników badanego układu zachodzi pod wpływem strumienia elektronów (EI). Istnieje kilka reguł fragmentacji zmetylowanych octanów alditoli. Pierwszorzędowe jony powstają podczas rozpadu wiązań między atomami węgla alditoli. Ładunek zwykle pozostaje przy fragmencie z grupą metoksyłową połączoną z atomem węgla przy rozbijaniu wiązania. Najczęściej dochodzi do rozpadu wiązania pomiędzy atomami węgla z grupami metoksyłowymi, a rzadziej gdy wiązaniem połączone są atomy węgla, z których jeden podstawiony jest grupą metoksyłową, a drugi acetoksyłową. Najrzadziej dotyczy to wiązania między sąsiadującymi atomami węgla, przy których występują grupy acetoksyłowe [13]. Jony drugorzędowe powstają przez eliminację z jonów pierwszorzędowych kwasu octowego, metanolu, formaldehydu lub ketenu, przy czym preferowana jest utrata podstawnika występującego przy węglu β względem atomu węgla, na którym jest umiejscowiony ładunek. Jeśli alditol był znakowany na węglu C-1 atomem deuteru, to fragment zawierający go ma parzystą wartość stosunku m/z, podczas gdy dla jonu, w którym nie jest on obecny, m/z jest nieparzyste [4,31,48,104].

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOLOGRAFIA CIECZOWA JAKO TECHNIKA ANALIZY PRZYDATNA W OCENIE PROFILU WĘGLOWODANOWEGO LPS

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest techniką umożliwiającą analizę ilościową i jakościową, a także rozdział mono- i oligosacharydów. Jest często stosowana do oczyszczania oligo- i polisacharydów, analizowanych następnie techniką GLC. Poza tym – w połączeniu z GLC – znajduje zastosowanie w charakteryzowaniu węglowodanów złożonych [46].

W celu rozdzielenia cukrów techniką HPLC stosuje się różne fazy stacjonarne, np. żel krzemionkowy, który bazuje na oddziaływaniach polarnych ze składnikami mieszaniny. W HPLC z odwróconymi fazami rozdział składników badanego układu bazuje na niepolarnych oddziaływaniach rozdzielanych substancji z hydrofobowymi łańcuchami bocznymi związanymi z żelazem krzemionkowym lub usieciowanym polistyrenem. Fazą stacjonarną wypełniającą kolumnę może być także wymiennicz jonowy [46].

W analizie HPLC niezbędne jest dobranie odpowiedniego detektora. Często stosuje się detektor refraktometryczny. Jednak cechuje go stosunkowo niewielka czułość i niemożność wykorzystania elucji gradientowej. W celu zastosowa-

nia detekcji spektrofotometrycznej należy zmodyfikować strukturę rozdzielanych cukrów przez wytworzenie ugrupowania chromoforowego warunkującego detekcję tych związków [46]. Jako znaczniki stosuje się związki aryloaminowe, takie jak 2-aminobenzamid, kwas antranilowy (kwas 2-aminobenzoowy), 2-aminopirydynę, ester etylowy kwasu p-aminobenzoowego [3,29]. Związkami tymi znakuje się cukry na końcach redukujących tworząc zasady Schiffa, które następnie ulegają redukcji NaCNBH_3 do stabilnego strukturalnie produktu (ryc. 3) [3,29]. Anumula [3] rekomenduje detektor fluorescencyjny jako najwłaściwszy w ilościowej analizie tak otrzymanych pochodnych cukrów. McGinnis i wsp. [46] wspominają także o możliwości wykorzystania w oznaczeniu cukrów techniką HPLC detektora amperometrycznego oraz spektrometru mas.

IDENTYFIKACJA TECHNIKĄ CHROMATOLOGRAFII GAZOWEJ KWASÓW TŁUSZCZOWYCH BĘDĄCYCH SKŁADNIKAMI BAKTERYJNYCH ENDOTOKSYN

W lipidzie A bakterii Gram-ujemnych kwasy tłuszczowe połączone są z aminocukrem zarówno wiązaniem amidowym, jak i estrowym. W strukturach endotoksyn bakteryjnych występują także kwasy tłuszczowe związane estrowo z hydroksykwasami. To zróżnicowanie sposobu połączenia lipidowych elementów w LPS znacznie utrudnia ich uwalnianie z tych struktur. Należy więc prowadzić lizę wiązań łączących kwasy tłuszczowe w endotoksynach stosując zróżnicowane czynniki uwalniające i środowiskowe (warunki kwasowo-zasadowe). Na rycinie 4 przedstawiono schemat postępowania analitycznego zmierzający do ustalenia typu i sposobu połączenia kwasów tłuszczowych w lipidzie A.

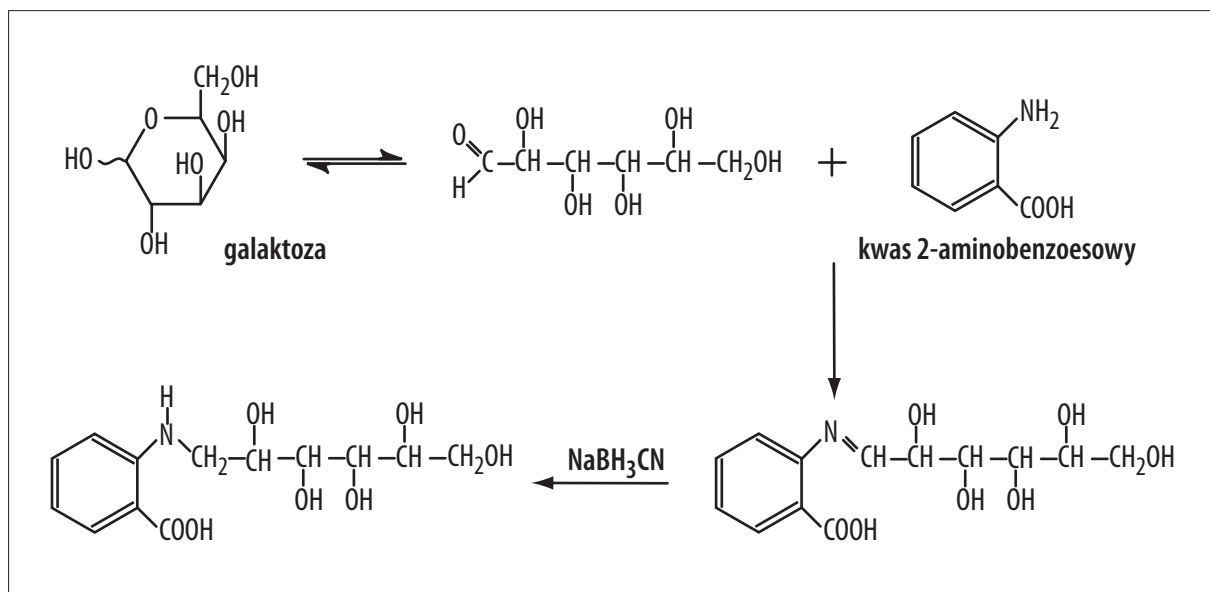
Metody uwalniania całkowitej puli kwasów tłuszczowych ze struktur lipopolisacharydowych

Całkowitą pulę kwasów tłuszczowych można uwolnić z LPS poprzez hydrolizę zachodzącą w obecności kwasu lub zasady.

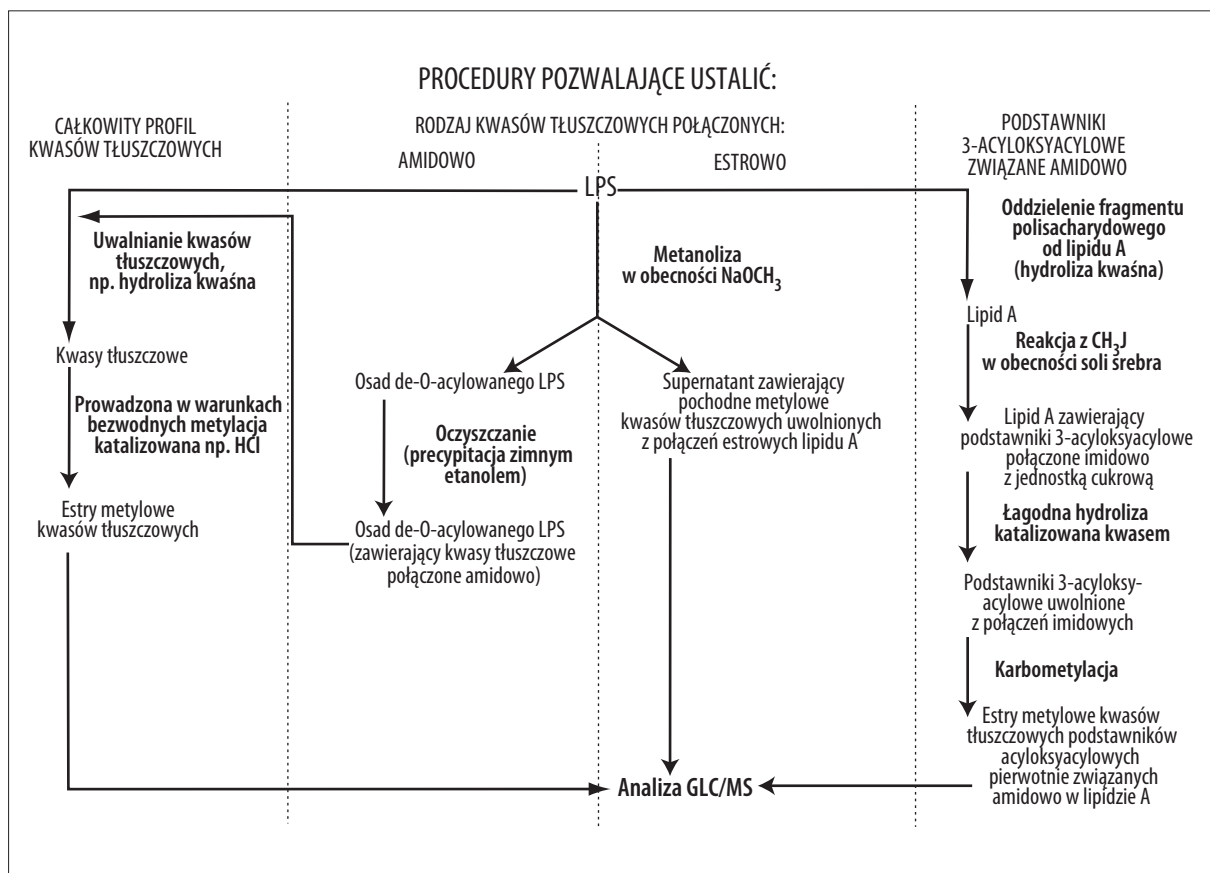
W warunkach kwaśnych lizie ulegają zarówno wiązania amidowe, jak i estrowe. Dochodzi jednak wówczas do częściowej dehydratacji 3-hydroksykwasów, co sprzyja tworzeniu produktów ubocznych, np. polimerów 3-hydroksykwasów i pochodnych 3-acyloksyacylowych [27,99].

Hydroliza alkaliczna zachodząca zarówno w obecności silnych (NaOH, KOH), jak i słabych (NH_4OH i hydrazyny) wodorotlenków także umożliwia odłączenie kwasów tłuszczowych związanych zarówno amidowo, jak i estrowo. Niestety, w środowisku tym w następstwie β -eliminacji [70] powstają znaczne ilości α,β -nienasyconych kwasów tłuszczowych i niewielka pula izomerów β,γ [72]. Ponadto, powstałe nienasycone kwasy tłuszczowe nie są w tych warunkach środowiskowych całkowicie uwalniane z lipidu A.

Zatem, uwzględniając specyfikę powyższych środowisk, w których są uwalniane lipopolisacharydowe kwasy tłuszczowe Haeffner i wsp. [27] zalecają stosowanie wstępnej hydrolizy kwaśnej i wtórnej alkalicznej. W warunkach zasadowych dochodzi bowiem do rozkładu powstałych w niskim pH związków polimerowych i pochodnych 3-acylok-



Ryc. 3. Schemat reakcji tworzenia ugrupowania chromoforowego w węglowodanach w obecności kwasu antranilowego [3]



Ryc. 4. Schemat strategii analitycznej umożliwiającej ustalenie typu kwasów tłuszczowych i sposobu ich połączenia w lipidzie A bakterii Gram-ujemnych

syacylowych. Natomiast pewną niedogodnością w tym przypadku może być konieczność karbometylacji wolnych kwasów tłuszczowych w celu umożliwienia analizy tych struktur techniką GLC/MS. Z tego powodu Wollenweber i Rietschel [102] rekomendują katalizowaną kwasem hydrolizę LPS, a następnie transestryfikację prowadzoną

w obecności kwasu. Procedura ta umożliwia konwersję uwolnionych kwasów tłuszczowych oraz produktów ubocznych powstających podczas wstępnego etapu zachodzącego w obecności kwasu (polimerów i pochodnych 3-acyloksyacylowych) bezpośrednio w estry metylole kwasów tłuszczowych.



Reakcja transestryfikacji jako metoda uwalniania i estryfikacji lipopolisacharydowych kwasów tłuszczowych

Estry metylowe kwasów tłuszczowych mogą być otrzymane bezpośrednio w wyniku kwaśnej metanolizy lipopolisacharydu. Katalizatorem tego procesu mogą być zarówno kwasy Lewisa (BCl_3 , BF_3), jak i Brönsteda (HCl , H_2SO_4). Jednak prowadzenie tej reakcji w obecności trójchlorku boru powoduje tylko częściowe uwolnienie związanych amidowo kwasów tłuszczowych. Nie obserwuje się tego przy zastosowaniu 14% metanolowego roztworu trójfluorku boru (BF_3), który przeprowadza w estry metylowe kwasy tłuszczowe połączone w lipidzie A zarówno estrowo, jak i amidowo. Podczas katalizowanej za pomocą BF_3 metanolizy mogą powstawać 3-metoksykwasy będące produktami ubocznymi.

Katalizowana chlorowodem (HCl) metanoliza, mimo iż nie uwalnia ilościowo kwasów tłuszczowych związanych amidowo, może być wykorzystana w celu oznaczenia związanych w ten sposób 3-ketokwasów, które w roztworze wodnym o niskim pH, ulegają dekarboksylacji. Te komponenty bakteryjnych endotoksyn identyfikuje się prowadząc derywatyzację tych struktur metanolowym roztworem HCl z pominięciem wstępnego etapu hydrolizy kwaśnej.

Reakcja LPS z metanolowym roztworem HCl , poprzedzona hydrolizą w obecności tego samego kwasu, uwalnia ilościowo kwasy tłuszczowe związane zarówno estrowo, jak i amidowo, minimalizując jednocześnie tworzenie się produktów ubocznych. Dalszy etap estryfikacji nie jest konieczny. Procedura ta jest rekomendowana przez Wollenwebera i Rietschela [102] w celu ustalania całkowitego profilu kwasów tłuszczowych bakteryjnych endotoksyn.

Reakcja karbometylacji uwolnionych z LPS kwasów tłuszczowych

Estryfikację kwasów tłuszczowych uwolnionych ze struktur lipopolisacharydowych można prowadzić nie tylko metanolowym roztworem kwasu (HCl , H_2SO_4 , BCl_3 , BF_3), lecz także metanolem i $\text{N,N}'$ -dicykloheksylokarbodiimidem [18] lub diazometanem [58,89], który powoduje szybką i całkowitą metylację tych związków. Niestety i ta metoda derywatywacji lipidowych komponentów endotoksyn nie jest pozbawiona pewnych niedogodności analitycznych. W reakcji z diazometanem α,β -nienasycone kwasy tłuszczowe tworzą pochodne pirazolinowe [91], które nie są wykrywane techniką GLC/MS [102]. Dlatego w celu identyfikacji nienasyconych kwasów tłuszczowych w LPS należy zastosować inne czynniki estryfikujące te struktury, np. metanolowy roztwór chlorowodoru. Wollenweber i Rietschel [102] twierdzą także, iż w reakcji 3-hydroksykwasy z diazometanem powstają 3-metoksyłowe pochodne, lecz ilość tych artefaktów jest stosunkowo niewielka i wynosi około 1%.

Uwalnianie ze struktur lipopolisacharydowych związanych estrowo kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe związane w LPS estrowo mogą być uwolnione poprzez łagodną hydrazynolizę [47], kontrolowaną hy-

droksyloaminolizę [70,81] lub hydrolizę alkaliczną prowadzoną w obecności metanolowego roztworu wodorotlenku sodu [82], czy też metanolanu sodu (NaOCH_3). Pewną alternatywą w uwalnianiu tych związków jest także kolumnowa transestryfikacja prowadzona w obecności wodorotlenku (*m*-trifluorometylofenylo) trimetyloamonowego [93]. Wielu badaczy lipidowej struktury bakteryjnych endotoksyn preferuje transestryfikację metanolanem sodu, prowadzącą bezpośrednio do powstania estrów metylowych [26,67,92]. Metolan sodu indukuje β -eliminację powodującą tworzenie wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych z połączeń z grupami hydroksylowymi 3-hydroksykwasy z związanymi pierwotnie estrowo z jednostką cukrową lipidu A. Drugim produktem tej reakcji są estry metylowe α,β -nienasyconych kwasów tłuszczowych przyłączonych pierwotnie do aminocukrowego rdzenia. Następnym nukleofilowego ataku jonów H_3CO^- na te związki są powstające prawie ilościowo [102] estry metylowe 3-metoksyacylu (ryc. 5).

Powstałe w wyniku β -eliminacji wolne kwasy tłuszczowe, związane pierwotnie estrowo z grupami hydroksylowymi hydroksykwasy, przed analizą chromatograficzną poddaje się karbometylacji lub oznacza w postaci niezestryfikowanej z zastosowaniem odpowiedniej kolumny chromatograficznej [70].

Uwalnianie z LPS kwasów tłuszczowych związanych amidowo

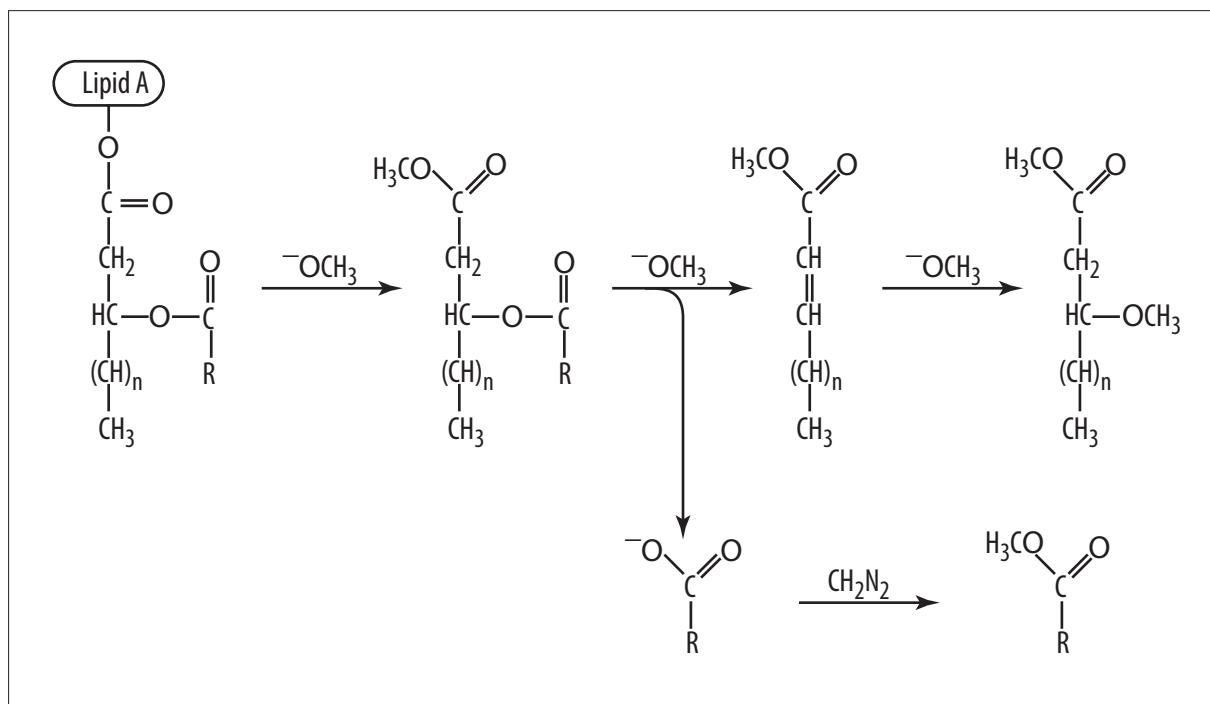
W wyniku reakcji LPS z metanolowym roztworem NaOCH_3 wytrąca się osad, zawierający de-O-acylowany LPS ze związanymi amidowo z cukrowym rdzeniem kwasami tłuszczowymi. Te struktury chemiczne można uwolnić w reakcji hydrolizy kwaśnej.

W inicjowanej przez NaOCH_3 reakcji β -eliminacji zachodzi jedynie częściowe uwalnianie kwasów tłuszczowych połączonych przez grupę hydroksylową amidowo związanych w lipidzie A hydroksykwasy. W konsekwencji z rdzeniową jednostką cukrową lipidu A nadal połączone są wiązaniem amidowym podstawniki 3-acyloksyacylowe. W de-O-acylowanym LPS obecne są pewne ilości α,β -nienasyconych kwasów związanych z grupą aminową cukru i w związku z tym niereagujących na atak nukleofilowy jonu H_3CO^- . Wspomniane struktury nie są uwalniane ilościowo podczas konwencjonalnych procedur hydrolizy lub po zastosowaniu metod pośrednich, takich jak utlenianie $\text{MnO}_4^-/\text{IO}_4^-$ lub redukcja deuterem [101].

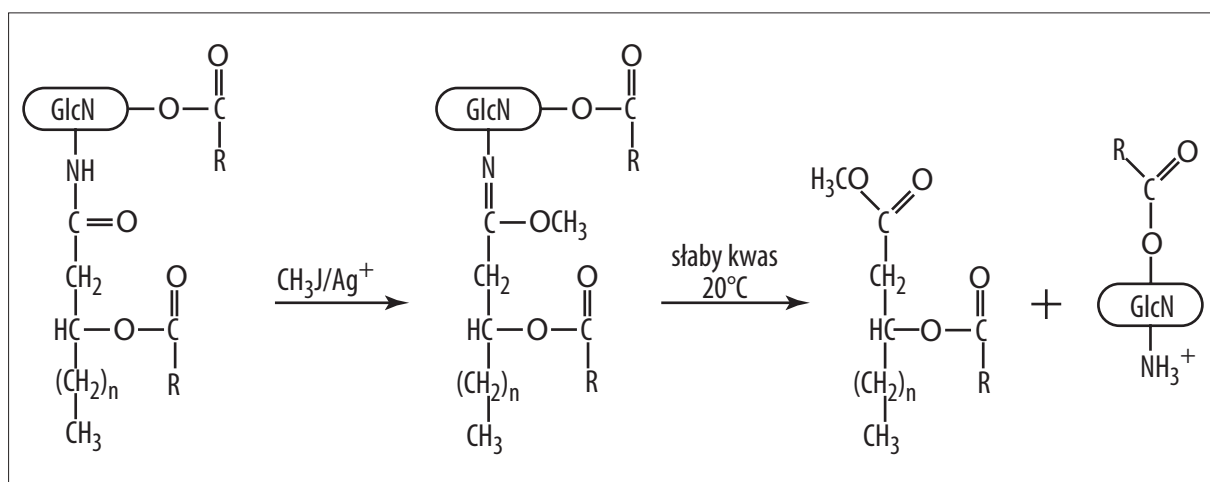
Związane amidowo z LPS 3-hydroksyłowe pochodne kwasów tłuszczowych można także oznaczyć bezpośrednio techniką GLC/MS [30], bądź po kontrolowanej degradacji glukozaminy [12].

Uwalnianie z LPS podstawników 3-acyloksyacylowych

Wiele endotoksyn zawiera amidowo i estrowo związane ugrupowania 3-acyloksyacylowe [70,101]. Te podstawniki związane estrowo identyfikuje się oznaczając 3-metoksykwasy tłuszczowe powstałe po reakcji LPS z NaOCH_3 . Możliwe jest także uwolnienie tych kwasów tłuszczowych przez krótkotrwałą hydrolizę alkaliczną (0,25 M NaOH , 4 min, 56°C) [70] i bezpośrednią analizę tych struktur techniką chromatografii gazowej.



Ryc. 5. Modyfikacje chemiczne grup 3-acyloksyacylowych związanych estrowo w lipidzie A [102]



Ryc. 6. Schemat reakcji wybiórczego uwalniania reszt 3-acyloksyacylowych związanych amidowo w lipidzie A [102]

Podstawniki 3-acyloksyacylowe związane amidowo w LPS można otrzymać w stanie wolnym przez przekształcenie wiązania amidowego, w nietrwałym w niskim pH, wiązania amidowego w reakcji z jodkiem metylu w obecności tlenku srebra (ryc. 6). Nawet śladowe ilości wody mogą uwalniać niewielkie ilości związanych estrowo podstawników 3-acyloksyacylowych. Zatem, żeby odróżnić tego typu struktury związane estrowo i amidowo należy powtórzyć procedurę zarówno w obecności jak i przy braku czynnika metylującego (jodku metylu).

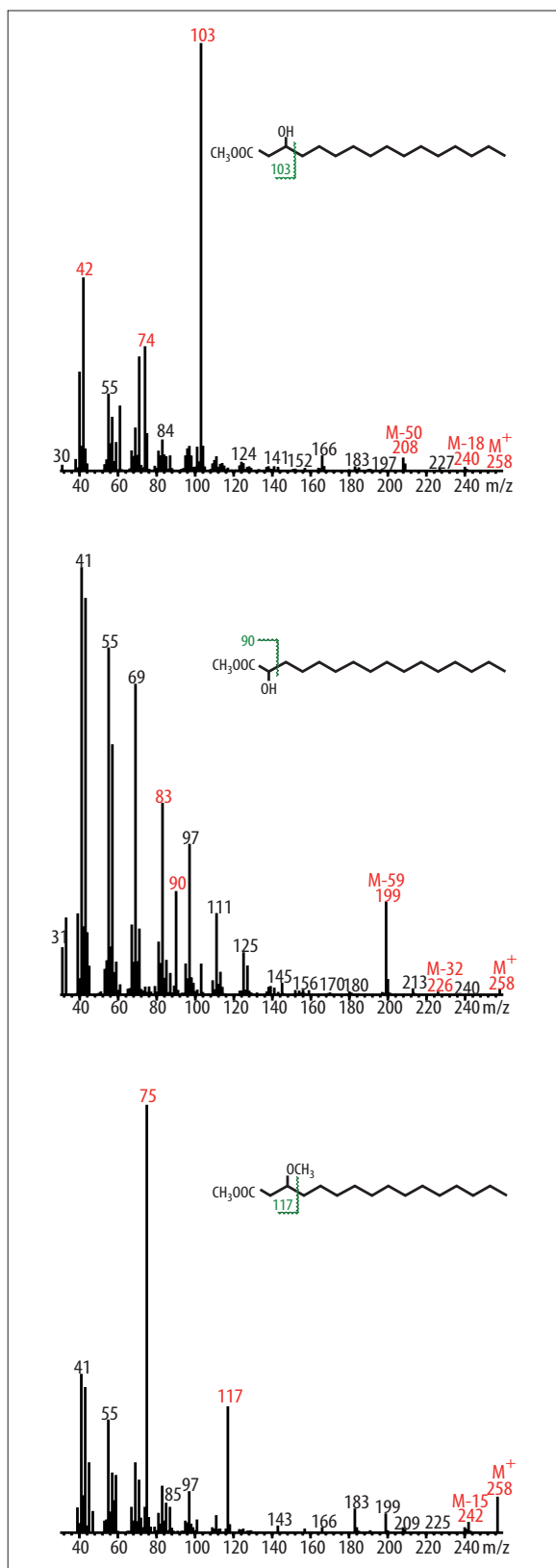
Stereochemiczna analiza kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe zawierające grupy hydroksylowe przy 2 lub 3 atomie węgla występują w postaci izomerów optycznych, czyli diastereoizomerów. Mogą być więc iden-

tyfikowane poprzez pomiar stopnia skręcalności właściwej [69,70]. Niestety jest to kłopotliwe postępowanie analityczne ze względu na niewielkie ilości oznaczanych kwasów tłuszczowych pochodzenia lipopolisacharydowego. Opracowana przez Karlssona i Paschera [35] analiza techniką chromatografii gazowo-cieczowej diastereoizomerów będących pochodnymi bakteryjnych hydroksykwasów pozwala na wstępne rozdzielenie 2- i 3-hydroksyacyli. Kryterium tej separacji jest długość łańcucha węglowego i konfiguracja otrzymanych w wyniku procedury L-feniloetyloamidów (R)- lub (S)-2- bądź 3-metoksykwasów [69,71].

W lipidzie A mogą występować mononienasycone kwasy tłuszczowe. Chcąc więc określić strukturę tego komponentu należy ustalić położenie wiązania podwójnego w węgło-





Ryc. 7. Widma masowe przykładowych pochodnych metylowych kwasów tłuszczowych (ester metylowy kwasu 3-hydroksytetradekanowego, ester metylowy kwasu 2-hydroksytetradekanowego i ester metylowy kwasu 3-metoksytetradekanowego) wraz z zaznaczeniem charakterystycznych jonów masowych otrzymanych w spektrometrze mas w wyniku jonizacji strumieniem elektronów o standardowej energii 70 eV

wodorowym łańcuchu tych związków. W tym celu można przeprowadzić derywatyzację kwasów do pochodnych pikolinowych [83,106]. Mayer i wsp. [45] wykorzystali disulfid dimetylu (DMDS) w celu określenia nie tylko pozycji wiązania podwójnego, lecz także jego izomerii *cis/trans*. Metoda ta niestety nie jest przydatna w oznaczaniu położenia wiązań podwójnych w kwasach tłuszczowych zawierających dodatkowe grupy funkcyjne [45].

Inne metody modyfikacji struktury 3-hydroksykwasów

Derywatywacja 3-hydroksykwasów tłuszczowych może obejmować acetylację, trifluoroacetylację, trimetylosililację, butylodimetylosililację, O-metylację z udziałem eterowego roztworu BF_3 i diazometanu lub jodku metylu w obecności tlenku srebra [102].

Reakcjami charakterystycznymi dla 3-hydroksykwasów są: redukcja estrów metylowych i konwersja do acetonidów, dehydratacja wolnych hydroksykwasów pod wpływem bezwodnika kwasu octowego, tribromku fosforu i t-butanolanu potasu lub stężonego kwasu siarkowego. Powstałe α,β -nienasycone kwasy tłuszczowe ulegają przekształceniu w estry pikolinylowe, bądź są redukowane do kwasów nasyconych lub utleniane do kwasów krótszych o 2 atomy węgla od wyjściowych [102]. Powszechnie stosowaną metodą derywatywacji grup hydroksylowych jest sililacja, bądź trimetylosililacja hydroksykwasów, mająca na celu zwiększenie lotności analitów oraz minimalizację oddziaływań grup polarnych tych związków, co w konsekwencji gwarantuje uzyskanie miarodajnych wyników ilościowych. W badaniach struktury lipopolisacharydowych kwasów tłuszczowych jako czynnik sililujący stosowany jest najczęściej N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (BSTFA) [16,36,85].

Techniki chromatograficzne w analizie profilu lipidowego bakteryjnych endotoksyn

Identyfikację pochodnych estrowych kwasów tłuszczowych przeprowadza się na podstawie analizy porównawczej ich czasów retencji z danymi tabelarycznymi, które otrzymano dla wzorców analizowanych w analogicznych warunkach. Przy zastosowaniu spektrometrii mas z jonizacją pochodnych kwasów tłuszczowych strumieniem elektronów o energii 70 eV następuje fragmentacja analitu na kationy o określonych wartościach masy do ładunku (m/z) (ryc. 7).

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abul-Milh M., Paradis S.E., Dubreuil J.D., Jacques M.: Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 4983-4987
- [2] Alving C.R.: Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology*, 1993; 187: 430-446
- [3] Anumula K.R.: Highly sensitive pre-column derivatization procedures for quantitative determination of monosaccharides, sialic acids, and amino sugar alcohols of glycoproteins by reversed phase high-performance liquid chromatography. W: *Techniques in glycobiology*, red.: Townsend R.R., Hotchkiss A.T. Marcel Dekker Inc., New York 1997, 349-357
- [4] Aspinall G.O.: Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. W: *The polysaccharides*, t.1, red.: Aspinall G.O. Academic Press, New York 1982, 35-131
- [5] Aspinall G.O., McDonald A.G., Raju T.S., Pang H., Moran A.P., Penner J.L.: Chemical structure of the core regions of *Campylobacter jejuni* serotypes O:1, O:4, O:23, and O:36 lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 213: 1017-1027
- [6] Berendt M.J., North R.J., Kirstein D.P.: The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. Requirement for a pre-existing state of concomitant anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.*, 1978; 148: 1560-1569
- [7] Beynon L.M., Richards J.C., Perry M.B.: The structure of the lipopolysaccharide O antigen from *Yersinia ruckeri* serotype O1. *Carbohydr. Res.*, 1994; 256: 303-317
- [8] Bhat U.R., Forsberg L.S., Carlson R.W.: Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli lipopolysaccharide. Unique nonphosphorylated lipid A containing 2-amino-2-deoxyglucuronate, galacturonate, and glucosamine. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 14402-14410
- [9] Biermann C.J.: Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. W: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, red.: Biermann C.J., McGinnis G.D. CRC Press Inc., Florida 1989, 27-42
- [10] Biermann C.J.: Introduction to analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography (GLC). W: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, red.: Biermann C.J., McGinnis G.D. CRC Press Inc., Florida 1989, 1-18
- [11] Caroff M., Chaby R., Karibian D., Perry J., Deprun C., Szabo L.: Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 1121-1128
- [12] Caroff M., Szabo L.: Identification of 2-amino-6-O-(2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-glucose as a major constituent of the hydrophobic region of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydr. Res.*, 1983; 114: 95-102
- [13] Carpita N.C., Shea E.M.: Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. W: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, red.: Biermann C.J., McGinnis G.D. CRC Press Inc., Florida 1989, 157-216
- [14] Carrion M., Bhat U.R., Reuhs B., Carlson R.W.: Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 1725-1731
- [15] Ciucanu I., Kerek F.: A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 1984; 131: 209-217
- [16] Edlund A., Nichols P.D., Roffey R., White D.C.: Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio species*. *J. Lipid Res.*, 1985; 26: 982-988
- [17] Engelhardt R., Mackensen A., Galanos C., Andreesen R.: Biological response to intravenously administered endotoxin in patients with advanced cancer. *J. Biol. Response. Mod.*, 1990; 9: 480-491
- [18] Felder E., Tiepolo U., Mengassini A.: Method for the esterification of carboxylic acids in gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr.*, 1973; 82: 291-296
- [19] Forsberg L.S., Bhat U.R., Carlson R.W.: Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-1 fucose. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 18851-18863
- [20] Fox A., Gilbert J., Morgan S.L.: Profiling and detection of bacterial carbohydrates. W: *Analytical microbiology Methods: chromatography and mass spectrometry*, red.: Fox A., Morgan S.L., Larson L., Odham G. Plenum Press, New York 1990, 71-87
- [21] Fox A., Morgan S.L., Gilbert J.: Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). W: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, red.: Biermann C.J., McGinnis G.D. CRC Press Inc., Florida 1989, 87-118
- [22] Gamian A., Jones C., Lipinski T., Korzeniowska-Kowal A., Ravenscroft N.: Structure of the sialic acid-containing O-specific polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Toucra O48 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 3160-3167
- [23] Gamian A., Kenne L.: Analysis of 7-substituted sialic acid in some enterobacterial lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 1508-1513
- [24] Gamian A., Kenne L., Mieszala M., Ulrich J., Defaye J.: Structure of the *Escherichia coli* O24 and O56 O-specific sialic-acid-containing polysaccharides and linkage of these structures to the core region in lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1994; 225: 1211-1220
- [25] Griggs L.J., Post A., White E.R., Finkelstein J.A., Moeckel W.E., Holden K.G., Zarembko J.E., Weisbach J.A.: Identification and quantitation of alditol acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 1971; 43: 369-381
- [26] Gudlavalleti S.K., Forsberg L.S.: Structural characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide. Demonstration that the distal amide-linked acyloxyacyl residue containing the long chain fatty acid is conserved in *Rhizobium* and *Sinorhizobium* sp. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 3957-3968
- [27] Haeflner N., Chaby R., Szabo L.: Identification of 2-methyl-3-hydroxydecanoic and 2-methyl-3-hydroxytridecanoic acids in the 'lipid X' fraction of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Eur. J. Biochem.*, 1977; 77: 535-544
- [28] Hakomori S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.*, 1964; 55: 205-208
- [29] Hardy M.R.: Glycan labelling with fluorophores 2-aminobenzamide and anthranilic acid. W: *Techniques in glycobiology*, red.: Townsend R.R., Hotchkiss A.T. Marcel Dekker Inc., New York 1997, 349-357
- [30] Helander I.M., Lindner B., Brade H., Altmann K., Lindberg A.A., Rietschel E.T., Zähringer U.: Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. *Eur. J. Biochem.*, 1988; 177: 483-492
- [31] Hoffman E., Charette J., Stroobant V.: Spektrometria mas. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998
- [32] Holst O., Broer W., Thomas-Oates J.E., Mamat U., Brade H.: Structural analysis of two oligosaccharide biphosphates isolated from the lipopolysaccharide of a recombinant strain of *Escherichia coli* F515 (Re chemotype) expressing the genus-specific epitope of *Chlamydia* lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 214: 703-710
- [33] Honda S., Suzuki S., Kakehi K., Honda A., Takai T.: Analysis of the monosaccharide compositions of total non-dialyzable urinary glycoconjugates by the dithioacetal method. *J. Chromatogr.*, 1981; 226: 341-350
- [34] John C.M., Schneider H., Griffiss J.M.: *Neisseria gonorrhoeae* that infect men have lipooligosaccharides with terminal N-acetylglucosamine repeats. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1017-1025
- [35] Karlsson K.A., Pascher I.: Resolution and chromatographic configuration analysis of 2-hydroxy fatty acids. *Chem. Phys. Lip.*, 1974; 12: 65-74
- [36] Kerger B.D., Nichols P.D., Antworth C.P., Sand W., Bock E., Cox J.C., Langworthy T.A., White D.C.: Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus spp.*: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1986; 38: 67-77
- [37] Knirel Y.A., Kocharova N.A., Hynes S.O., Widmalm G., Andersen L.P., Jansson P.E., Moran A.P.: Structural studies on lipopolysaccharides of serologically non-typable strains of *Helicobacter pylori*, AF1 and 007, expressing Lewis antigenic determinants. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 266: 123-131
- [38] Kondo S., Zähringer U., Seydel U., Sinnwell V., Hisatsune K., Rietschel E.T.: Chemical structure of the carbohydrate backbone of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O12 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 200: 689-698



- [39] Lehrfeld J.: Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and aldoses. *Anal. Chem.*, 1985; 57: 346–348
- [40] Levery S.B., Hakomori S.: Microscale methylation analysis of glycolipids using capillary gas chromatography-chemical ionization mass fragmentography with selected ion monitoring. *Methods Enzymol.*, 1987; 138: 13–25
- [41] Lindberg B.: Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1990; 48: 279–318
- [42] Łukasiewicz J., Ługowski C.: Biologiczna aktywność lipopolisacharydu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 33–53
- [43] Margherita S.S., Friedman H.: Induction of nonspecific resistance by endotoxin in unresponsive mice. *J. Bacteriol.*, 1965; 89: 277–280
- [44] Markiewicz Z.: *Struktura i funkcja osłon bakteryjnych*. PWN, Warszawa 1993
- [45] Mayer H., Merkofer T., Warth C., Weckesser J.: Position and configuration of double bonds of lipid A-associated monounsaturated fatty acids of Proteobacteria and *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *J. Endotoxin Res.*, 1996; 3: 345–352
- [46] McGinnis G.D., Laver M.L., Biermann C.J.: High-performance liquid chromatography (HPLC) of carbohydrates. W: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, red.: Biermann C.J., McGinnis G.D. CRC Press Inc., Florida 1989, 19–26
- [47] Muhlradt P.F., Wray V., Lehmann V.: A ³¹P-nuclear-magnetic-resonance study of the phosphate groups in lipopolysaccharide and lipid A from *Salmonella*. *Eur. J. Biochem.*, 1977; 81: 193–203
- [48] Niedziela T., Jachymek W., Ługowski Cz.: Endotoksyny bakteryjne – metody analizy strukturalnej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1996; 50: 419–429
- [49] Nowicki A., Ostrowska G., Wiktor-Jędrzejczak W.: Lipopolisacharydy bakteryjne (Pyrogen-Standart) w zastosowaniu do nieswoistego pobudzenia układu odpornościowego u chorych z zaawansowanymi nowotworami złośliwymi. *Badanie I fazy*. Nowotwory, 1994; 44: 1–5
- [50] Nowicki A., Szwech P., Wiktor-Jędrzejczak W.: Lipopolisacharyd *Escherichia coli* Kroeger 08 w leczeniu zaawansowanych nowotworów złośliwych u człowieka. *Badanie fazy II*. Nowotwory, 1994; 44: 192–199
- [51] Oates J.E., Dell A., Fukuda M., Fukuda M.N.: A rapid mass-spectrometric procedure for probing the non-reducing structures of lactosaminoglycan-containing glycoconjugates. *Carbohydr. Res.*, 1985; 141: 149–152
- [52] Oertelt C., Lindner B., Skurnik M., Holst O.: Isolation and structural characterization of an R-form lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 554–564
- [53] Ogawa T.: Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett.*, 1993; 332: 197–201
- [54] Ohno K., Nishiyama H., Nagase H.: A mild methylation of alcohols with diazomethane catalyzed by silica gel. *Tetrahedron Letters*, 1979; 20: 4405–4406
- [55] Olsthoorn M.M., Petersen B.O., Duus J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Bock K., Holst O.: The structure of the linkage between the O-specific polysaccharide and the core region of the lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revisited. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 2014–2027
- [56] Olsthoorn M.M., Petersen B.O., Schlecht S., Haverkamp J., Bock K., Thomas-Oates J.E., Holst O.: Identification of a novel core type in *Salmonella lipopolysaccharide*. Complete structural analysis of the core region of the lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* sv. Arizonae O62. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 3817–3829
- [57] Ovod V.V., Zdorovenko E.L., Shashkov A.S., Kocharova N.A., Knirel Y.A.: Structure of the O polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. ribicola NCPPB 1010. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 2372–2379
- [58] Pace-Asciak C.R.: One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis. *J. Lipid Res.*, 1989; 30: 451–454
- [59] Pantophlet R., Haseley S.R., Vinogradov E.V., Brade L., Holst O., Brade H.: Chemical and antigenic structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharides from two *Acinetobacter haemolyticus* strains differing only in the anomeric configuration of one glycosyl residue in their O-antigens. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 263: 587–595
- [60] Perepelov A.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Rozalski A., Knirel Y.A.: Structure of a glycerol teichoic acid-like O-specific polysaccharide of *Proteus vulgaris* O12. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 788–793
- [61] Perry M.B., MacLean L.L.: Structural identification of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Yersinia enterocolitica* serotype O:28. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 2567–2572
- [62] Phillips L.R., Fraser B.A.: Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr. Res.*, 1981; 90: 149–152
- [63] Phillips N.J., Miller T.J., Engstrom J.J., Melaugh W., McLaughlin R., Apicella M.A., Gibson B.W.: Characterization of chimeric lipopolysaccharides from *Escherichia coli* strain JM109 transformed with lipopolysaccharide synthesis genes (lsg) from *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4747–4758
- [64] Pehm P.: Methylation of carbohydrates by methyl trifluoromethanesulfonate in trimethyl phosphate. *Carbohydr. Res.*, 1980; 78: 372–374
- [65] Pritchard D.G., Renner B.P., Furner R.L., Huang D.H., Krishna N.R.: Structure of the group G streptococcal polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 1988; 173: 255–262
- [66] Radziejewska-Lebrecht J., Shashkov A.S., Stroobant V., Wartenberg K., Warth C., Mayer H.: The inner core region of *Yersinia enterocolitica* Ye75R (O:3) lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1994; 221: 343–351
- [67] Rahman M.M., Gu X.X., Tsai C.M., Kolli V.S., Carlson R.W.: The structural heterogeneity of the lipooligosaccharide (LOS) expressed by pathogenic non-typeable *Haemophilus influenzae* strain NTHi 9274. *Glycobiology*, 1999; 9: 1371–1380
- [68] Rahman M.M., Guard-Petter J., Carlson R.W.: A virulent isolate of *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella typhi*-like lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 2126–2131
- [69] Rietschel E.T.: Absolute configuration of 3-hydroxy fatty acids present in lipopolysaccharides from various bacterial groups. *Eur. J. Biochem.*, 1976; 64: 423–428
- [70] Rietschel E.T., Gottert H., Luderitz O., Westphal O.: Nature and linkage of the fatty acids present in the lipid A component of *Salmonella* lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1972; 28: 166–173
- [71] Rietschel E.T., Luderitz O., Volk W.A.: Nature, type of linkage, and absolute configuration of (hydroxy) fatty acids in lipopolysaccharides from *Xanthomonas sinensis* and related strains. *J. Bacteriol.*, 1975; 122: 1180–1188
- [72] Rooney S.A., Goldfine H., Sweeley C.C.: The identification of trans-2-tetradecenoic acid in hydrolysates of lipid A from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972; 270: 289–295
- [73] Roppel J., Mayer H.: Identification of 2,3-diamino-2,3-dideoxyhexose in the lipid A component of lipopolysaccharides of *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodopseudomonas palustris*. *Carbohydr. Res.*, 1975; 40: 31–40
- [74] Różalski A.: Lipopolisacharyd (LPS) bakterii gram-ujemnych – struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. I. Struktura chemiczna i właściwości fizyko-chemiczne lipopolisacharydów. *Post. Mikrobiol.*, 1995; 37: 289–315
- [75] Różalski A.: Lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych – struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. II. Budowa chemiczna a funkcja biologiczna. *Post. Mikrobiol.*, 1995; 37: 317–337
- [76] Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Mayer H.: Identification of 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid in the core region of lipopolysaccharides from *Rhizobiaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991; 68: 337–343
- [77] Rybka J., Zielińska-Kuźniarz K., Korzeniowska-Kowal A., Sondej A., Gamian A.: Substitution pattern of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid in bacterial lipopolysaccharides investigated by methylation analysis of whole LPS. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 2679–2686
- [78] Sadovskaya I., Brisson J.R., Thibault P., Richards J.C., Lam J.S., Altman E.: Structural characterization of the outer core and the O-chain linkage region of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 1640–1650
- [79] Severn W.B., Kelly R.F., Richards J.C., Whitfield Ch.: Structure of the core oligosaccharide in serotype O8 lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 1731–1741
- [80] Sidorczyk Z., Swierzko A., Zych K., Paramonov N.A., Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Knirel Y.A.: Structure of the O-specific polysaccharide chain and serological characterization of the *Proteus penneri* 62 lipopolysaccharide compared with the lipopolysaccharides of the *P. penneri* strains. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1996; 44: 179–185
- [81] Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A.: Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.*, 2002; 43: 2188–2195

- [82] Silipo A., Lanzetta R., Garozzo D., Lo Cantore P., Iacobellis N.S., Molinaro A., Parrilli M., Evidente A.: Structural determination of lipid A of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas reactans*. A pathogen of cultivated mushrooms. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 2498–2505
- [83] Strittmatter W., Weckesser J., Salimath P.V., Galanos C.: Nontoxic lipopolysaccharide from *Rhodospseudomonas sphaeroides* ATCC 17023. *J. Bacteriol.*, 1983; 155: 153–158
- [84] Süsskind M., Brade L., Brade H., Holst O.: Identification of a novel heptoglycan of α -2-linked D-glycero-D-manno-heptopyranose. Chemical and antigenic structure of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae* ssp. pneumoniae rough strain R20 (O1-K20-). *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 7006–7017
- [85] Szponar B., Krasnik L., Hryniewiecki T., Gamian A., Larsson L.: Distribution of 3-hydroxy fatty acids in tissues after intraperitoneal injection of endotoxin. *Clin. Chem.*, 2003; 49: 1149–1153
- [86] Tacken A., Brade H., Unger F.M., Charon D.: G.L.C.-M.S. of partially methylated and acetylated derivatives of 3-deoxyoctitols. *Carbohydr. Res.*, 1986; 149: 263–277
- [87] Tacken A., Rietschel E.T., Brade H.: Methylation analysis of the heptose/3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid region (inner core) of the lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* rough mutants. *Carbohydr. Res.*, 1986; 149: 279–291
- [88] Taylor R.L., Conrad H.E.: Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry.*, 1972; 11: 1383–1388
- [89] Thoen C.O., Karlson A.G., Ellefson R.D.: Comparison by gas-liquid chromatography of the fatty acids of *Mycobacterium avium* and some other nonphotochromogenic mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, 1971; 22: 560–563
- [90] Thomsson K.A., Karlsson N.G., Karlsson H., Hansson G.C.: Analysis of permethylated glycoprotein oligosaccharide fractions by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *W: Techniques in glycobiology*, red.: Townsend R.R., Hotchkiss A.T. Marcel Dekker Inc., New York 1997, 335–347
- [91] Tserng K., Kliegman R.M., Miettinen E., Kalhan S.C.: A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *J. Lip. Res.*, 1981; 22: 852–858
- [92] Tzeng Y.L., Datta A., Kolli V.K., Carlson R.W., Stephens D.S.: Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 2379–2388
- [93] Van Kuijk F.J., Thomas D.W., Konopelski J.P., Dratz E.A.: Transesterification of phospholipids or triglycerides to fatty acid benzyl esters with simultaneous methylation of free fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Lip. Res.*, 1986; 27: 452–456
- [94] Vinogradov E., Perry M.B.: Structural analysis of the core region of lipopolysaccharides from *Proteus mirabilis* serotypes O6, O48 and O57. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 2439–2446
- [95] Vinogradov E.V., Sidorczyk Z., Swierzko A., Rozalski A., Daeva E.D., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Kochetkov N.K.: The structure of the O-specific polysaccharide chain of *Proteus penneri* strain 16 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1991; 197: 93–103
- [96] Vosika G.J., Barr C., Gilbertson D.: Phase-I study of intravenous modified lipid A. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1984; 18: 107–112
- [97] Weintraub A., Zähringer U., Wollenweber H.W., Seydel V., Rietschel E.T.: Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1989; 183: 425–431
- [98] Whiton R.S., Lau P., Morgan S.L., Gilbert J., Fox A.: Modifications in the alditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J. Chromatogr.*, 1985; 347: 109–120
- [99] Wilkinson S.G.: Artifacts produced by acidic hydrolysis of lipids containing 3-hydroxyalkanoic acids. *J. Lipid. Res.*, 1974; 15: 181–182
- [100] Wilkinson S.G., Taylor D.P.: Occurrence of 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose in lipid A from lipopolysaccharides of *Pseudomonas diminuta*. *J. Gen. Microbiol.*, 1978; 109: 367–370
- [101] Wollenweber H.W., Broady K.W., Luderitz O., Rietschel E.T.: The chemical structure of lipid A. Demonstration of amide-linked 3-acyloxyacyl residues in *Salmonella minnesota* Re polysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 1982; 124: 191–198
- [102] Wollenweber H.W., Rietschel E.T.: Analysis of lipopolysaccharide (lipid A) fatty acids. *J. Microbiol. Meth.*, 1990; 11: 195–211
- [103] York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P.: 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.*, 1985; 138: 109–126
- [104] York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P.: Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Meth. Enzymol.*, 1985; 118: 3–41
- [105] Yoshino S., Sasatomi E., Ohsawa M.: Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology*, 2000; 99: 607–614
- [106] Zähringer U., Lindner B., Rietschel E.T.: Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecules. *W: Endotoxin in Health and Disease*, red.: Brade H., Opal S.M., Vogel S.N., Morrison D.C. Marcel Dekker Inc., New York 1999, 93–114

