

Kurt Heyns, Dietrich Müller, Rolf Stute und Hans Paulsen

Massenspektrometrische Untersuchungen, XVIII<sup>1)</sup>

## Gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Bestimmung der permethylierten Furanoside, Pyranoside und Septanoside der D-Galaktose

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg

(Eingegangen am 24. Februar 1967)

Die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie ermöglicht eine schnelle Bestimmung der Ringgröße der Komponenten eines Isomerengemisches, das durch Methylierung von freien Zuckern erhalten wird. Die Permethylierung von D-Galaktose nach Kuhn<sup>2)</sup> liefert neben wenig Pyranosiden bevorzugt Furanoside, jedoch keine Septanoside.

Die Permethylierung freier Zucker führt in der Regel zu einem Gemisch der anomeren Furanoside und Pyranoside. Das Produktverhältnis gibt einen Anhaltspunkt über die Verteilung der im Gleichgewicht stehenden isomeren Formen des freien Zuckers in dem Lösungsmittel, in dem die Methylierung durchgeführt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, daß während der Permethylierung merkliche Verschiebungen der Isomerenanteile erfolgen können. Zur schnellen Analyse derartiger Permethylierungsgemische eignet sich vorzüglich die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Diese Methode erlaubt, wie wir fanden, ein sofortiges Erkennen der Ringgröße des Glykosids, so daß nur die Zuordnung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen verbleibt.

Als Beispiel wird die Methylierungsreaktion von D-Galaktose mit Bariumoxid/Bariumhydroxid und Methyljodid in Dimethylformamid<sup>2)</sup> beschrieben. Bei dieser Reaktion sollen nach Bayer und Widder<sup>3)</sup> neben Furanosiden und Pyranosiden zu 64,2% Septanoside gebildet werden. Dies erschien uns fraglich, da bekannt ist, daß die Septanoside nur durch Synthese aus entsprechend blockierten Verbindungen darstellbar sind<sup>4)</sup> und sich leicht in die stabileren Furanose- und Pyranoseformen umlagern können\*).

Das Gemisch der permethylierten Methyl-galaktoside ließ sich am günstigsten auf Kapillarsäulen mit A) Polydiäthylenglykolsuccinat mit 5% Polyphenyläther OS 124

\*<sup>1)</sup> *Nachtrag b. d. Korr.* (12. 6. 1967): Wie Prof. Dr. E. Bayer nach Kenntnisnahme von dem Manuskript dieser Veröffentlichung am 18. 4. 1967 mitgeteilt hat, schließt er sich nach Wiederholung seiner Versuche mit der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie unseren Feststellungen an.

<sup>1)</sup> XVII. Mitteil.: K. Heyns, G. Kießling und D. Müller, Carbohydrate Res., im Druck.

<sup>2)</sup> R. Kuhn, H. Egge, R. Brossmer, A. Gauhe, P. Kleese, W. Lochinger, E. Röhm, H. Trischmann und D. Tschampel, Angew. Chem. 72, 805 (1960).

<sup>3)</sup> E. Bayer und R. Widder, Liebigs Ann. Chem. 686, 181 (1965).

<sup>4)</sup> F. Micheel und F. Suckfüll, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1957 (1933).

und B) einem Gemisch aus 48 % Carbowax 20 M, 48 % Cyano B und 4 % Polyphenyläther OS 124 als Phase auftrennen. Die relativen Retentionszeiten der anomeren Furanoside, Pyranoside und Septanoside sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Dabei wurde das  $\alpha$ -Furanosid als Bezugssubstanz gewählt. Das  $\beta$ -Septanosid (Nr. 2) ist auf den Säulen A und B leicht zu identifizieren. Das  $\alpha$ -Septanosid (Nr. 6) zeigt auf der Säule A fast die gleiche Retentionszeit wie das  $\alpha$ -Pyranosid (Nr. 5), auf der Säule B tritt es dagegen deutlich abgetrennt als langsamste Komponente auf. Zur massenspektrometrischen Bestimmung der gaschromatographischen Fraktionen wurde das Ende der Kapillarsäule mit dem EC-Einlaß eines CH-4-Massenspektrometers verbunden.

Tab. 1. Relat. Retentionszeiten ( $\alpha$ -Furanosid = 1) der Methyl-tetra-*O*-methyl-*D*-galaktoside für Säule A (25-m-Kapillarsäule mit Polydiäthylenglykolsuccinat mit 5 % Polyphenyläther OS 124, 1 ccm Helium/Min., 190°) und Säule B (25-m-Kapillarsäule mit 48 % Carbowax 20 M, 48 % Cyano B und 4 % Polyphenyläther OS 124, 1,1 ccm Stickstoff/Min., 160°). Prozentuale Zusammensetzung des direkten Permethylierungsproduktes der *D*-Galaktose

Nr.	Substanz	relat. Retention		Anteil %
		A	B	
1	Bande 1 *)	0.593	0.514	3.1
2	Methyl-2.3.4.5-tetra- <i>O</i> -methyl- $\beta$ - <i>D</i> -galaktoseptanosid <sup>4)</sup>	0.693	0.626	
3	Methyl-2.3.4.6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\beta$ - <i>D</i> -galaktopyranosid	0.788	0.759	4.1
4	Methyl-2.3.5.6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\beta$ - <i>D</i> -galaktofuranosid <sup>5)</sup>	0.936	0.935	19.3
5	Methyl-2.3.4.6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ - <i>D</i> -galaktopyranosid <sup>6)</sup>	0.962	0.924	6.4
6	Methyl-2.3.4.5-tetra- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ - <i>D</i> -galaktoseptanosid <sup>4)</sup>	0.969	1.06	
7	Methyl-2.3.5.6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ - <i>D</i> -galaktofuranosid	1.00	1.00	67.1

Die Massenspektren der permethylierten Monosaccharide sind relativ einfach. Zur Unterscheidung genügt die Prüfung einiger charakteristischer Massenzahlen im Massenbereich 70—170. Die Registrierzeit wird dadurch erheblich verkürzt und die Reproduzierbarkeit der Massenspektren bei direkter Einspeisung der Substanzen aus dem Gaschromatographen verbessert. Aus der Gegenüberstellung der Spektren des  $\alpha$ -Galaktofuranosids<sup>7)</sup> (Abbild. 1), des  $\alpha$ -Galaktopyranosids<sup>7)</sup> (Abbild. 2) und des  $\alpha$ -Galaktoseptanosids (Abbild. 3) sind die Unterschiede in den Fragmentierungsreaktionen der Aldohexosen verschiedener Ringgröße zu erkennen. Die Massenspektren der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isomeren einer Ringform unterscheiden sich nur gering in der Intensität, nicht jedoch in der Massenzahl der einzelnen Peaks. Tab. 2 enthält die charakteristischen Massenzahlen und relativen Intensitäten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Furanoside, -Pyranoside und -Septanoside, die eine eindeutige Zuordnung ermöglichen.

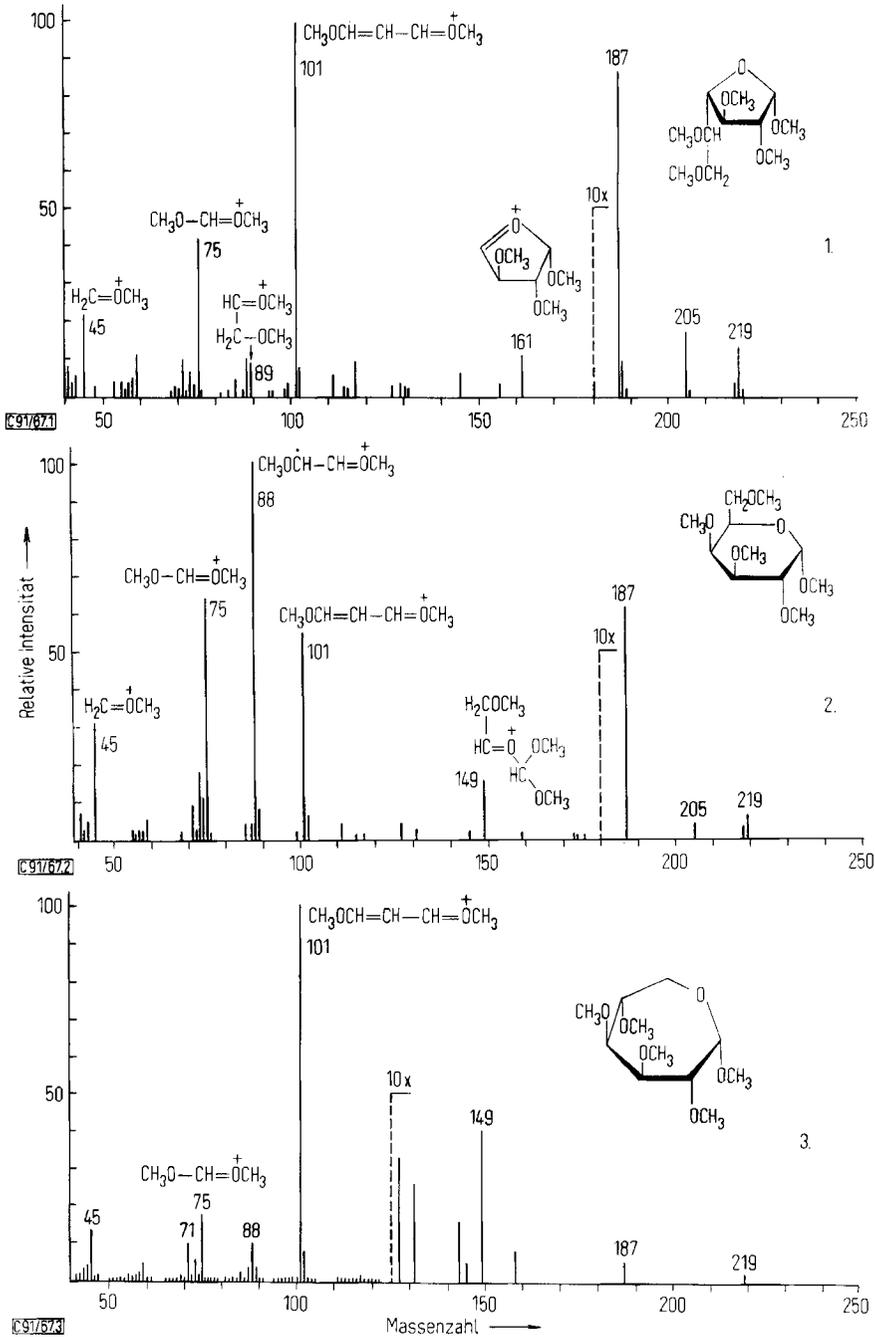
\*) Diese Bande soll nach Bayer und Widder<sup>3)</sup> die 2.3.4.5.6-Penta-*O*-methyl-*al*-galaktose darstellen. Nach einer Untersuchung von Anet<sup>8)</sup> hat die *al*-Galaktose eine dem  $\alpha$ -Furanosid vergleichbare Retentionszeit und die Substanz Nr. 1 soll die 2.4.5.6-Tetra-*O*-methyl-3-desoxy-*D*-erythro-*trans*- $\Delta^2$ -hexenose sein.

<sup>5)</sup> H. Zinner, Chem. Ber. **84**, 780 (1951).

<sup>6)</sup> F. Micheel und O. Littmann, Liebigs Ann. Chem. **466**, 115 (1928).

<sup>7)</sup> K. Heyns, H. F. Grützner, H. Scharmann und D. Müller, Fortschr. chem. Forsch. V, Heft 3, 448 (1966).

<sup>8)</sup> E. F. L. J. Anet, Carbohydrate Res. **3**, 251 (1966).



Abbild. 1—3. Massenspektren von 1. Methyl-2,3,5,6-tetra-O-methyl- $\alpha$ -D-galactofuranosid, 2. Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid und 3. Methyl-2,3,4,5-tetra-O-methyl- $\alpha$ -D-galaktoseptanosid

Tab. 2. Charakteristische Massenzahlen und relative Intensitäten der Methyl-tetra-*O*-methyl-*D*-galaktoside

MZ	-Galaktofuranosid		-Galaktopyranosid		-Galaktoseptanosid	
	$\alpha$ - %	$\beta$ - %	$\alpha$ - %	$\beta$ - %	$\alpha$ - %	$\beta$ - %
75	42	60	64	68	18	21
88	10	9	100	100	10	15
89	9	14	8	8	4	4
101	100	100	55	64	100	100
149			15	11	4	6
161	11	21				

Die Festlegung der Anomeren einer Ringform erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit mit jeweils einer synthetisierten reinen Vergleichssubstanz. Die beiden Septanoside wurden nach *Micheel* und *Suckfüll*<sup>4)</sup> dargestellt. Aus einem  $\alpha$ -/ $\beta$ -Gemisch des Pentaacetats der *D*-Galaktoseptanose erhielten wir ein permethyliertes Produkt, das 88% des  $\alpha$ -Septanosids und 12% der  $\beta$ -Form enthielt. Das  $\alpha$ -Septanosid wurde gaschromatographisch abgetrennt und das Massenspektrum direkt aufgenommen.

Die letzte Spalte der Tab. 1 gibt die ermittelte Zusammensetzung des durch Methylierung mit Methyljodid/BaO, Ba(OH)<sub>2</sub>/Dimethylformamid erhaltenen Galaktosidgemisches an. Die größte Bande mit 67.1% besteht praktisch nur aus dem  $\alpha$ -Furanosid, das durch präparative Gaschromatographie in reiner Form gewonnen wurde. Septanoside ließen sich in derartigen Gemischen nicht nachweisen. Bei einem Versuch, das Galaktoseptanosepentaacetat nach *Kuhn* und Mitarbb.<sup>2)</sup> direkt zu permethylieren, erhielten wir als Hauptprodukt ebenfalls das  $\alpha$ -Furanosid (53%), außerdem  $\beta$ -Furanosid (18%),  $\alpha$ -Pyranosid (13%) und  $\beta$ -Pyranosid (4%). Die Ausbeute an  $\alpha$ -Septanosid betrug 12%, von der  $\beta$ -Form wurden nur 0.3% gefunden. Dieser Versuch zeigt die Tendenz des Siebenringes, in die stabileren Furanose- oder Pyranoseformen überzugehen. Bei unblockierten Aldohexosen dürften Septanoseformen daher keinen nennenswerten Anteil besitzen.

Herrn *K. Fechner* danken wir für die gewissenhafte Mitarbeit bei diesen Untersuchungen.

Dem *Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung* danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

## Beschreibung der Versuche

**Gaschromatographische Trennungen:** Die analytischen Trennungen wurden mit einem PE F 6-Gaschromatographen vorgenommen. Säule A: 25-m-Kapillarsäule, Polydiäthylenglykolsuccinat mit 5% Polyphenyläther OS 124, 1 ccm Helium/Min., 190°, Temperatur des Einspeisblocks 270°. Säule B: 25-m-Kapillarsäule, 48% Carbowax 20 M, 48% Cyano B und 4% Polyphenyläther OS 124, 1.1 ccm Stickstoff/Min., 160°, Temperatur des Einspeisblocks 270°.

Die präparativen Trennungen wurden mit einem F+M-Gerät Typ 770 durchgeführt. Es wurde eine 8'  $\times$  3/4"-Säule mit 20% Polydiäthylenglykolsuccinat (LAC 728) auf Diaport W (30–60 mesh) verwendet. 600 ccm Helium/Min., 150°.

Die Massenspektren wurden mit einem CH-4-Massenspektrometer der MAT Bremen aufgenommen. Die Einspeisung der Proben erfolgte über ein Glaskapillarsystem EC. Die Elektronenenergie betrug 70 eV, die Ionenquellentemperatur 110°. Es wurde ein SEV-System verwendet. Die Registrierung erfolgte mit einem UV-Schnellschreiber. Die Zykluszeit für 100 Masseneinheiten war 2 Sekunden.

*Gemisch der Methyl-tetra-O-methyl-D-galaktoside:* 10.2 g *D*-Galaktose wurden in 300 ccm Dimethylformamid gelöst, 60 ccm *Methyljodid* zugegeben und unter starkem Rühren 60 g *BaO* und 2.5 g *Ba(OH)*<sub>2</sub> eingetragen. Nach Einsetzen der Reaktion wurde 1 Stde. bei 50°, anschließend 4 Stdn. bei 20° gerührt, dann nach Verdünnen mit 600 ccm *CHCl*<sub>3</sub> 2 mal mit je 300 ccm Wasser ausgeschüttelt und die wäßr. Phase mit 70 ccm *CHCl*<sub>3</sub> extrahiert. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden nach Trocknen über *Na*<sub>2</sub>*SO*<sub>4</sub> i. Vak. eingeengt und der Rückstand i. Ölpumpenvak. destilliert. Sdp.<sub>0.15</sub> 91–95°. Ausb. 8.5 g (60%).  $[\alpha]_{D}^{25}$ : +80.5° (*c* = 1 in Äthanol).

[91/67]