

Gaschromatographie und Massenspektrometrie trifluoracetylierter Kohlenhydrate

Wilfried A. König*, Hermann Bauer, Wolfgang Voelter und Ernst Bayer

Chemisches Institut der Universität Tübingen, D-7400 Tübingen, Auf der Morgenstelle

Eingegangen am 22. Januar 1973

Zucker werden im Mikrogramm-Maßstab in die Per(trifluoracetyl)-(TFA)-Derivate übergeführt, die anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Massenspektren zeichnen sich durch relativ übersichtliche Fragmentierung aus. Eine Unterscheidung von Aldosen und Ketosen sowie von Pyranosen und Furanosen ist durch das Auftreten einiger intensiver Fragment-Ionen im oberen Massenbereich gewährleistet. Die erstaunlich hohe Flüchtigkeit macht die TFA-Derivate besonders gut geeignet für gaschromatographische Untersuchungen. Das Anomerengleichgewicht der Zucker wird bei der Umsetzung zu Trifluoracetylderivaten in den meisten Fällen nicht verändert. Das Fragmentierungsverhalten von trifluoracetylierten Desoxyzuckern, Methylglycosiden und von Disacchariden wird ebenfalls diskutiert.

Gas Chromatography and Mass Spectrometry of Trifluoroacetylated Carbohydrates

The trifluoroacetyl (TFA) derivatives of sugars are synthesized on a microgram scale and subsequently identified by means of gas chromatography and mass spectrometry. The mass spectra show easily interpretable fragmentation pathways. Aldoses and ketoses as well as furanoses and pyranoses can be distinguished by a number of intense fragment ions in the high mass range. The surprisingly high volatility of the TFA derivatives makes them well suited for gas chromatography. In most cases the equilibrium of anomers is not effected by the formation of the TFA derivatives. The fragmentations of the trifluoroacetyl derivatives of deoxysugars, methyl glycosides, and disaccharides upon electron impact are discussed.

Die Identifizierung von Kohlenhydraten ist ein fast alltägliches Problem der analytischen Naturstoffchemie, da Zuckerreste Bestandteile zahlreicher natürlicher *O*- und *N*-Glycoside (Antibiotica, Farbstoffe, Nucleoside) sind. Die Zucker treten in einer großen Vielfalt von Konfigurations- und Konformationsisomeren auf, die sich in ihren chemischen Eigenschaften nur wenig unterscheiden und sich zudem leicht isomerisieren. Diese Eigenschaften erschweren eine sichere Identifizierung.

Die Strukturanalyse wurde bisher meist mit chemischen oder optischen Methoden wie Polarimetrie¹⁾, optischer Rotationsdispersion²⁾ oder Circular dichroismus³⁾

¹⁾ J. Stanec, M. Cerny, J. Kocorek und J. Pacak, *The Monosaccharides*, Academic Press, New York und London 1963.

²⁾ I. Listowsky, G. Avigad und S. Englard, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1765 (1965).

³⁾ W. Voelter, G. Kuhfittig, G. Schneider und E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **734**, 126 (1970).

versucht. Neuerdings lassen sich mit den verschiedenen Methoden der Kernresonanz, z.B. $^1\text{H-NMR}^{4,5)}$, $^{19}\text{F-NMR}^6)$ oder $^{13}\text{C-NMR}^7)$, Konstitution und Konformation der Zucker in Lösung einigermaßen zuverlässig bestimmen.

Auch die Gaschromatographie und Massenspektrometrie sind zur Analytik der Kohlenhydrate mehrfach eingesetzt worden. Es ist dazu nötig, die Zucker in unzerstört verdampfbare Derivate zu überführen. Als erste haben Bayer und Witsch⁸⁾ trimethylsilylierte und Bayer und Widder^{9,10)} permethylierte Kohlenhydrate gaschromatographisch untersucht und dabei verschiedene Konformationsisomere getrennt. Sweeley et al.¹¹⁾ berichteten ausführlich über die Gaschromatographie der Trimethylsilyl-Derivate von Zuckern. Die Problematik der Zuordnung der GC-Peaks zu bestimmten Konformeren und zu den Pyranose- bzw. Furanose-Formen kommt in dieser Arbeit klar zum Ausdruck. Die Anwendung der Massenspektrometrie ermöglicht hingegen in vielen Fällen eine Unterscheidung der verschiedenen Isomeren, wie die Ergebnisse einer eingehenden Untersuchung von Heyns et al.¹²⁾ an permethylierten Kohlenhydraten, von Biemann et al.¹³⁾ an acetylierten und von De Jongh et al.¹⁴⁾ an Trimethylsilyl-Derivaten von Zuckern zeigten.

Zur Herstellung flüchtiger Derivate findet in der Naturstoffanalytik neben der Silylierung die Bildung von Trifluoracetyl(TFA)-Derivaten¹⁵⁻¹⁷⁾ vielfache Anwendung. Auch Zucker lassen sich durch Trifluoracetylierung in die entsprechenden Trifluoracetate überführen.

Vilkas et al.¹⁸⁾ haben gezeigt, daß die TFA-Derivate der Zucker wesentlich flüchtiger sind als die Trimethylsilyl-Derivate. Dennoch hat die Trifluoracetylierung von Zuckern für analytische Zwecke bisher keine allgemeine Anwendung gefunden, denn die gebräuchlichen Reaktionsbedingungen führen, ähnlich wie bei der Permethylierung, zu Verlagerungen der Isomerisierungs-gleichgewichte. Verwendet man

-
- 4) A. F. Casy, *PMR Spectroscopy in Medicinal and Biological Chemistry*, Academic Press, London und New York 1971.
 - 5) S. J. Angyal, *Angew. Chem.* **81**, 172 (1969); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **8**, 157 (1969).
 - 6) W. Voelter, G. Jung und E. Breitmaier, *Chim. Ther.* **7**, 29 (1972).
 - 7) E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C NMR Spectroscopy, Applications to Organic Chemistry, Verlag Chemie, Weinheim, im Druck.
 - 8) H. G. Witsch, Dissertation, Univ. Tübingen 1961.
 - 9) E. Bayer und R. Widder, *Liebigs Ann. Chem.* **686**, 181 (1965).
 - 10) E. Bayer und R. Widder, *Liebigs Ann. Chem.* **686**, 197 (1965).
 - 11) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).
 - 12) K. Heyns, H. F. Grützmaier, H. Scharmann und D. Müller, *Fortschr. Chem. Forsch.* **5**, 448 (1966).
 - 13) K. Biemann, D. C. De Jongh und H. K. Schnoes, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1763 (1963).
 - 14) D. C. De Jongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hanesian, M. Bieber, G. Dawson und C. C. Sweeley, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1728 (1969).
 - 15) F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. Kun Sun, *Z. Naturforsch.* **20B**, 1169 (1965).
 - 16) W. A. König, L. C. Smith, P. F. Crain und J. A. McCloskey, *Biochemistry* **10**, 3968 (1971).
 - 17) W. A. König, K. Zech, R. Uhmman und W. Voelter, *Chem. Ber.* **105**, 262 (1972).
 - 18) M. Vilkas, Hiu-I-Jan, G. Boussac und M. C. Bonnard, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 1441.

z. B. eine Mischung von Dichlormethan und Trifluoracetanhydrid für die Umsetzung von Galactose, so erhält man im Gaschromatogramm vier Peaks, die sich auf Grund ihrer Massenspektren den Pyranose- und Furanose-Formen zuordnen lassen (Abb. 1).

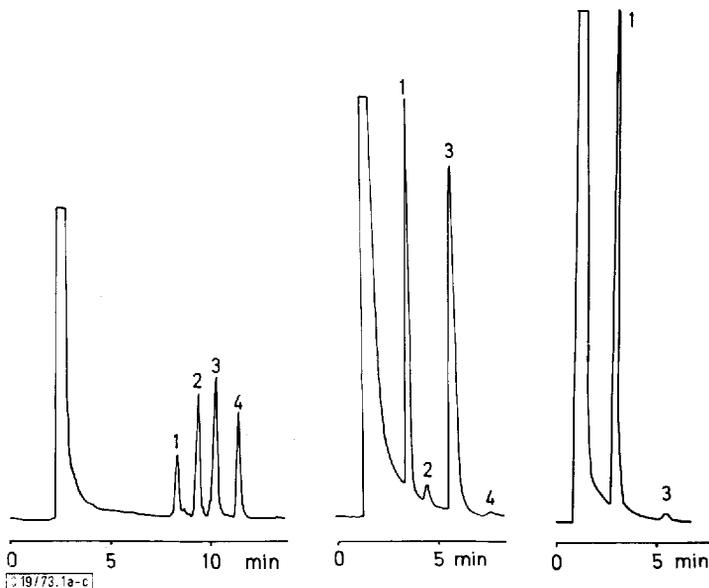


Abb. 1a. Gaschromatogramm von TFA-Galactose. Säule: 2 m, Glas, 10% Dexsil 300 auf Supelcoport 80–100 mesh, 65°C, Temperaturprogramm 4°C/min. Derivatbildung ohne Pyridin

1 und 3 = Pyranoside, 2 und 4 = Furanoside

Abb. 1b. Gaschromatogramm von TFA-Galactose. Säule: wie Abb. 1a, 115°C isotherm. Derivatbildung mit Pyridin-Zusatz

Abb. 1c. Gaschromatogramm von TFA-Galactose. Säule: wie Abb. 1a, 120°C isotherm. Derivatbildung mit fester Galactose unter Pyridin-Zusatz

Es ist aus Untersuchungen mittels anderer Methoden bekannt⁵⁾, daß Galactose in fester Form nicht diese Zusammensetzung hat. Folglich muß angenommen werden, daß die Reaktionsbedingungen bei der Trifluoracetylierung zu einer Isomerisierung führen.

Es ist uns gelungen, durch Verwendung einer geeigneten Mischung von Trifluoracetanhydrid, Dichlormethan und Pyridin eine schonende Derivatisierungsmethode im Mikrogramm-Maßstab zu erhalten, die in den untersuchten Fällen das vorhandene Isomerengleichgewicht entweder überhaupt nicht oder nur unwesentlich verändert. Dies läßt sich bei der Untersuchung fester Zucker (Abb. 1c) oder von Zuckerlösungen nachweisen, die sich im Mutarotationsgleichgewicht befinden (Abb. 1b). Die hier gefundenen prozentualen Gleichgewichtsanteile für die verschiedenen Anomeren stimmen weitgehend mit den Werten überein, die mit anderen Methoden ermittelt wurden (Tab. 1). Es wird hier untersucht, inwieweit es möglich ist, durch kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie von Zucker-Trifluoracetylderivaten die Struktur und Ringgröße von Kohlenhydraten zu identifizieren.

Tab. 1. Gleichgewichtskonzentration verschiedener Zucker in wäßriger Lösung

Zucker	GC-MS der TFA-Derivate				Andere Methoden			
	% α -Pyr.	% β -Pyr.	% α -Fur.	% β -Fur.	% α -Pyr.	% β -Pyr.	% α -Fur.	% β -Fur.
Ribose	22.2	56.0	10.5	11.3	20 ⁵⁾ 19 20 ^{a)}	56 ⁵⁾ 59 20 ^{a)}	6 ⁵⁾ 7 20 ^{a)}	18 ⁵⁾ 15 20 ^{a)}
Arabinose	50.7	42.0	3.3	4.0	63 ⁵⁾ 65 21 ^{a)}	34 ⁵⁾ 31 21 ^{a)}	ca. 3 ⁵⁾ ca. 42 ¹⁾ ^{a)}	
Xylose	40.8	59.2	—	—	33 ⁵⁾ 31 21 ^{a)}	67 ⁵⁾ 69 ⁵⁾	—	—
Lyxose	75.0	25.0	—	—	71 ⁵⁾	29 ⁵⁾	—	—
Glucose	37.6	62.4	—	—	36 ⁵⁾ 37.5 7. a)	64 ⁵⁾ 62.5 7. a)	—	—
Mannose	73.8	26.2	—	—	67 ⁵⁾ 72 11)	33 ⁵⁾ 28 11)	—	—
Galactose	36.2	60.6	2.1	1.1	31.9 11)	62.6 11)	5.4 11)	
Talose	82.1		17.9		83.8 11) 40 ⁵⁾ 43.5 19. a)	16.2 11) 29 ⁵⁾ 25 9. a)	20 ⁵⁾ 21 19. a)	11 ⁵⁾ 10.5 19. a)
Allose	14.0	80.0	2.35	3.54	18 ⁵⁾	70 ⁵⁾	5 ⁵⁾	7 ⁵⁾
Altrose	16.1	50.3	22.3	11.3	27 ⁵⁾	40 ⁵⁾	20 ⁵⁾	13 ⁵⁾
Guluse	24.5	75.5	—	—	22 ⁵⁾	78	—	—

a) Diese Daten wurden von Puls-Fourier-Transform-¹³C-NMR-Spektren bestimmt. Da die Peakintensitäten jedoch durch Overhauser-Effekte beeinflusst werden, können stärkere Abweichungen zwischen den Peakflächenverhältnissen und den tatsächlich vorhandenen Gleichgewichtsverhältnissen möglich sein.

Aldopentosen

Bei der Umsetzung von D-Ribose aus wäßriger Lösung wurde das in Abb. 2 dargestellte Gaschromatogramm erhalten.

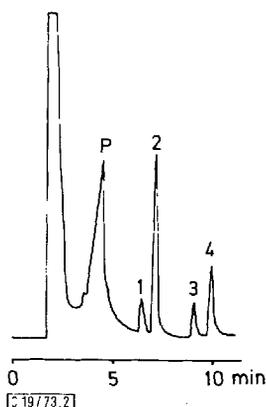


Abb. 2. Gaschromatogramm von TFA-Ribose. Säule: 3 m, Glas, 3% OV 17 auf Chromosorb WAW 80–100 mesh, 70°C, Temperaturprogramm 4°C/min. Derivatbildung mit Pyridinzusatz.

P — Pyridintrifluoracetat, 1 und 3 — Furanoside, 2 und 4 — Pyranoside

19) W. Voelter und E. Breitmaier, Organic Magnetic Resonance, im Druck.

20) E. Breitmaier, G. Jung und W. Voelter, Chimia 26, 136 (1972).

21) E. Breitmaier und W. Voelter, Tetrahedron 29, 227 (1973).

Die Massenspektren der Peaks 1 und 3 bzw. 2 und 4 stimmen jeweils überein, wenn man von kleinen Intensitätsunterschieden absieht.

In Abb. 3 sind die Spektren von Peak 1 und 2 dargestellt.

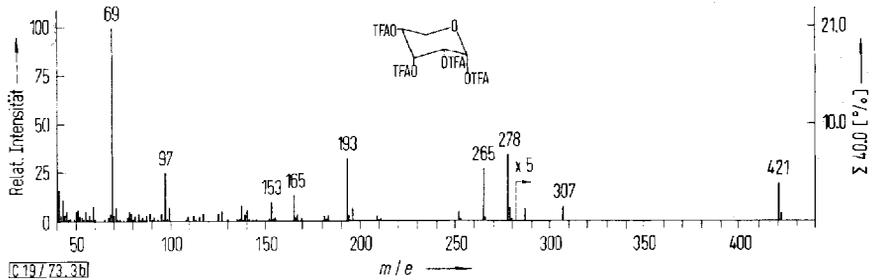
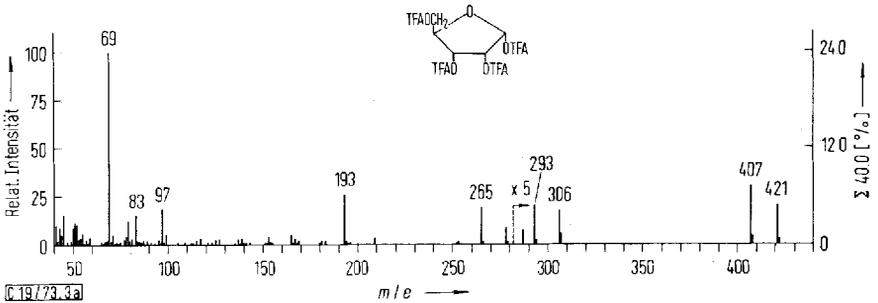


Abb. 3a. Massenspektrum von Peak 1 in Abb. 2 (TFA-Ribofuranosid). LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Abb. 3b. Massenspektrum von Peak 2 in Abb. 2 (TFA-Ribopyranosid). LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

In Tab. 2 und 3 wird eine Interpretation der verschiedenen Fragment-Ionen angegeben.

Tab. 2. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen bei Furanosiden der Aldopentosen

m/e	Fragment-Ion	Exakte Masse		Fehler ^{b)}
		ber.	gef.	
421	M - TFAO ^{a)}	420.9970	420.9976	0.6
407	M - TFAO-CH ₂	406.9806	406.9813	0.7
306	M - 2 TFAOH	305.9962	305.9968	0.6
293	M - (TFAO-CH ₂ + TFAOH)			
287	M - (2 TFAOH + F)			
278	M - (TFAOH + TFAO-CH=O)	278.0013	278.0014	0.1
265	TFAO-CH=CH-CH=OTFA	264.9935	264.9919	-1.6
253	TFAO=CH-CH ₂ -OTFA	252.9935	252.9922	-1.3
237	M - (2 TFAOH + CF ₃)			
209	M - (2 TFAOH + TFA)			
193	M - (2 TFAOH + TFAO)	193.0112	193.0124	1.2

^{a)} Auf eine Lokalisierung der positiven Ladung wird verzichtet.

^{b)} Abweichung in Millimasseneinheiten.

Tab. 3. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen bei Pyranosiden der Aldopentosen

m/e	Fragment-Ion
421	M - TFAO
307	M - (TFAO + TFAOH)
287	M - (2 TFAOH + F)
278	M - (TFAOH + TFAO - CH=O)
265	TFAO - CH=CH - CH=OTFA
252	TFAO - CH - CH - OTFA
209	M - (2 TFAOH + TFA)
193	M - (2 TFAOH + TFAO)

Die Massenspektren der TFA-Derivate von Zuckern zeigen meist keine Molekülpeaks oder solche von sehr geringer Intensität. Die Hauptbruchstücke lassen sich wie bei den TFA-Derivaten der Nucleoside^{16,17)} durch sukzessive Abspaltung von Trifluoressigsäure oder Teilen der TFA-Gruppen erklären. Der Hauptunterschied zwischen den Massenspektren in Abb. 3 besteht in den Fragment-Ionen der Massen 407 und 293, die beide auf der Abspaltung des exocyclischen C-5-Restes beruhen (TFAO - CH₂). Diese Abspaltung ist nur bei den Furanoseformen der Zucker möglich. Der Übergang von m/e 407 nach m/e 293 unter Abspaltung eines Trifluoressigsäure-Moleküls ist durch ein Übergangssignal $m^* = 211.5$ belegt. Ein weiterer Unterschied besteht in dem Auftreten eines Fragment-Ions bei m/e 253 bei der Furanoseform, während bei der Pyranoseform ein Bruchstück der Masse 252 auftritt (siehe Tab. 2 und 3). Das Ion m/e 253 enthält vermutlich das C-Atom 5. Die Interpretation der Fragment-Ionen wird durch die Bestimmung der exakten Massenwerte mittels Hochauflösungsmassenspektrometrie bestätigt (siehe Tab. 2).

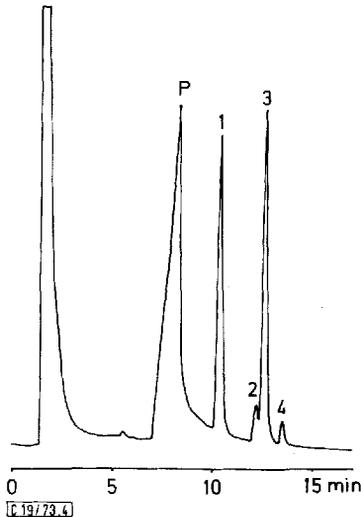


Abb. 4. Gaschromatogramm von TFA-Arabinose. Säule: wie Abb. 1a. 60°C. Temperaturprogramm 4°C/min. Derivatbildung mit Pyridinzusatz.

P = Pyridintrifluoacetat, 1 und 3 = Pyranoside, 2 und 4 = Furanoside

Eine Unterscheidung der anomeren α - und β -Pyranoseper(trifluoracetate) bzw. α - und β -Furanoseper(trifluoracetate) ist zwar gaschromatographisch, nicht aber mit Hilfe der Massenspektren möglich.

Das Gaschromatogramm (Abb. 4) der TFA-Derivate von L-Arabinose (aus wäßriger Lösung) zeigt, daß die Pyranoseformen (Peak 1 und 3) gegenüber den Furanoseformen (Peak 2 und 4) stark überwiegen.

Xylose und Lyxose treten in wäßriger Lösung nur als α - und β -Pyranoside auf, wie die Massenspektren eindeutig erkennen lassen. Aus den Peakflächen im Gaschromatogramm erhält man die Gleichgewichtszusammensetzung (Tab. 1).

Aldohexosen

Die Reaktionsgemische der Hexosen mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan ohne Pyridinzusatz ergeben im Gaschromatogramm meist ein Gemisch von 3–4 Formen (siehe Abb. 1a). Die Zahl der Peaks verringert sich bei Zugabe von wenig Pyridin zur Trifluoracetylierung und bei Verwendung fester Zucker auf einen Hauptpeak. Interessant war auch hier die Untersuchung von Zuckern, die nach dem Eindampfen aus wäßriger Lösung in die TFA-Derivate übergeführt wurden. Die Massenspektren zeigen, daß bei Glucose, Galactose, Mannose und Gulose Gemische von α - und β -Pyranosiden vorliegen (Tab. 1), während bei Allose, Altrose und Talose auch Furanoseformen auftreten.

Die Massenspektren der Furanose- und Pyranoseper(trifluoracetate) unterscheiden sich eindeutig, wie die Abb. 5 sowie die Tab. 4 und 5 zeigen.

Tab. 4. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen bei Furanosiden der Aldohexosen

<i>m/e</i>	Fragment-Ion
547	M – TFAO
433	M – (TFAO – TFAOH)
432	M – 2 TFAOH
413	M – (2 TFAOH + F)
407	M – (TFAO – CH ₂ – CH – OTFA)
379	M – (TFAO – CH ₂ – CH – OTFA + CO)
319	M – (2 TFAOH + TFAO)
305	M – (2 TFAOH + TFAO – CH ₂)
293	M – (TFAO – CH ₂ – CH – OTFA + TFAOH)
265	M – (TFAO – CH ₂ – CH – OTFA + CO + TFAOH)
253	TFAO = CH – CH ₂ – OTFA

Besonders auffallend ist in beiden Fällen die Abspaltung der exocyclischen Reste und die daraus resultierenden Sekundär-Fragmente. Bei den Pyranosen erhält man durch Verlust des CH₂ – OTFA-Restes ein intensives Fragment der Masse 533, das bei den Furanosen nicht oder nur mit ganz schwacher Intensität auftritt. Entsprechend wird bei den Furanoseper(trifluoracetaten) der Rest TFAO – CH₂ – CH – OTFA abgespalten, was zu dem auch bei den Furanosiden der Pentosen auftretenden Ion bei

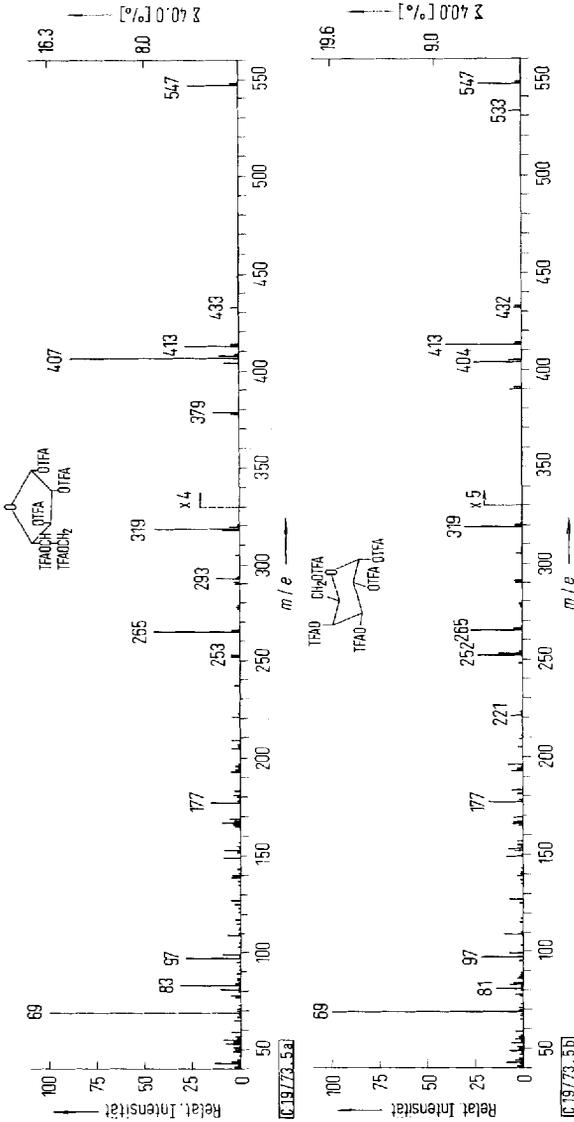


Abb. 5a. Massenspektrum von TFA- α -Galactofuranose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Abb. 5b. Massenspektrum von TFA- α -Galactopyranose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

m/e 407 führt. Dieses Bruchstück zerfällt auch hier weiter nach m/e 293, wobei ein Molekül Trifluoressigsäure abgespalten wird ($m^* = 211.4$). Charakteristisch für Pyranoseper(trifluoracetate) ist dagegen ein Ion der Masse 404, das aus dem Molekül-Ion durch Abspaltung eines Moleküls Trifluoressigsäure und, nach Ringöffnung zwischen C-1 und C-2, durch Verlust des das C-Atom 1 und den Ring-Sauerstoff enthaltenden Bruchstückes TFAO-CH=O entsteht. Aus m/e 404 entsteht durch Eliminierung eines weiteren Trifluoressigsäure-Moleküls das Ion m/e 290 (Übergangssignal bei $m^* = 208.3$). Das Ion der Masse 390 [M-(TFAOH + TFAO-CH₂-CH=O)]

Tab. 5. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen bei Pyranosiden der Aldohexosen

<i>m/e</i>	Fragment-Ion
641	M - F
563	M - TFA
547	M - TFAO
533	M - TFAO-CH ₂
433	M - (TFAO + TFAOH)
432	M - 2 TFAOH
419	M - (TFAO-CH ₂ + TFAOH)
413	M - (2 TFAOH + F)
404	M - (TFAOH + TFAO-CH=O)
390	M - (TFAOH + TFAO-CH ₂ -CH=O)
319	M - (2 TFAOH + TFAO)
305	M - (2 TFAOH + TFAO-CH ₂)
290	M - (2 TFAOH + TFAO-CH=O)
277	M - (TFAOH + TFAO-CH ₂ + TFAO-CH=O)
265	TFAO-CH=CH-CH=OTFA
252	TFAO-CH-CH-OTFA

entsteht offenbar analog zu *m/e* 404 nach Ringöffnung zwischen C-4 und C-5. Furanoseper(trifluoracetate) weisen ein Fragment *m/e* 379 auf, das wahrscheinlich durch Verlust von TFAO-CH₂-CH-OTFA und CO zustandekommt. Wie bei den Pentosen ist das Ion *m/e* 253 (TFAO-CH₂-CH=OTFA) charakteristisch für den Fünfring.

Methyl-glycoside der Hexosen

Ähnlich wie die TFA-Derivate der Zucker selbst verhalten sich auch die entsprechenden TFA-Methyl-glycoside (Abb. 6).

Besonders charakteristisch ist dabei die Fragmentierung von *m/e* 465 (M - TFAO) zu *m/e* 405 (Übergangssignal bei *m** = 353). Es handelt sich dabei um eine ähnliche wie die bei den Hexopyranoseper(trifluoracetaten) zu *m/e* 404 führende Spaltung und Ringöffnung zwischen C-1 und C-2, wobei das Fragment CH₃O-CH=O abgespalten wird. Aus dem Ion der Masse 405 entsteht durch weitere Eliminierung von Trifluoressigsäure *m/e* 291 (*m** = 210).

Ketohexosen

Ketohexoseper(trifluoracetate) unterscheiden sich in ihren Massenspektren (Abb. 7, Tab. 6) eindeutig von den Per(trifluoracetaten) der Aldohexosen.

Für die Ketoform kennzeichnend ist ein Fragment-Ion der Masse 505, das aus *m/e* 533 (M - TFAO-CH₂) durch Abspaltung von 28 Masseneinheiten, vermutlich von CO, entsteht (*m** = 478) und bei den Aldohexosen völlig fehlt. Auffallend

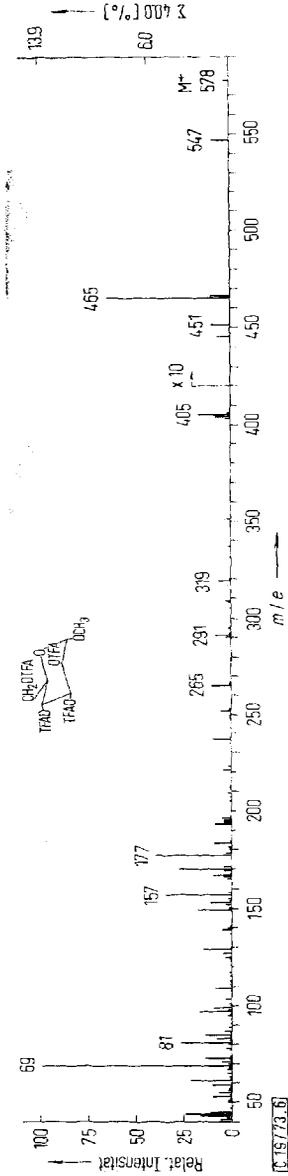


Abb. 6. Massenspektrum von TFA- α -Methyl-mannose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

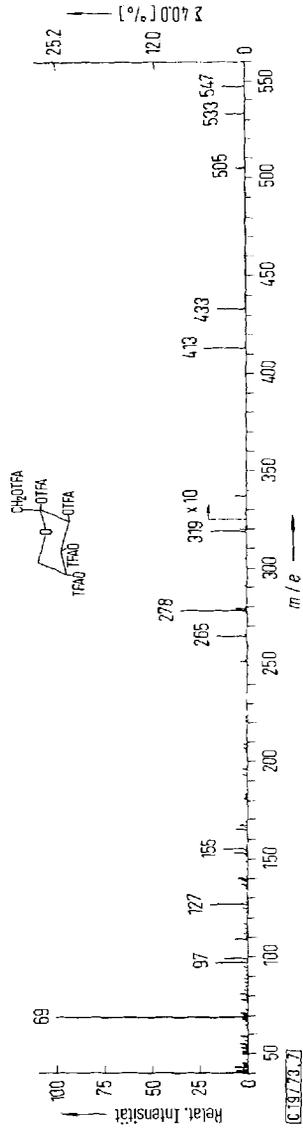


Abb. 7. Massenspektrum von TFA- α -Fructopyranose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

intensiv ist das Ion bei m/e 278, das sicherlich analog zum Ion bei m/e 404 bei den Per(trifluoracetaten) der Aldohecopyranosen durch Eliminierung eines Moleküle Trifluoressigsäure, Ringöffnung zwischen C-1 und C-2 und Abspaltung des substituierten C-2-Restes entsteht. Bei der Umsetzung von fester Fructose, Sorbose und Tagatose treten praktisch nur die Pyranoside auf. Bei der Reaktion von fester Fructose

Tab. 6. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen bei Ketohexopyranosen

<i>m/e</i>	Fragment-Ion
641	M - F
591	M - CF ₃
547	M - TFAO
533	M - TFAO - CH ₂
528	M - (TFAO + F)
505	M - (TFAO - CH ₂ + CO)
433	M - (TFAO + TFAOH)
432	M - 2 TFAOH
419	M - (TFAO - CH ₂ + TFAOH)
413	M - (2 TFAOH + F)
319	M - (2 TFAOH + TFAO)
305	M - (2 TFAOH + TFAO - CH ₂)
278	M - (TFAOH + TFAO - CH ₂ + TFAO + CO)

und Sorbose ohne Pyridinzusatz können auch in kleinen Mengen Furanosid-Formen nachgewiesen werden, deren Massenspektren sich von den Pyranosiden deutlich unterscheiden.

6-Desoxyhexosen

Die Massenspektren der TFA-Derivate von α-L-Rhamnose (Abb. 8), α-L-Fucose und α-D-Chinovose unterscheiden sich nur durch geringfügige Intensitätsunterschiede.

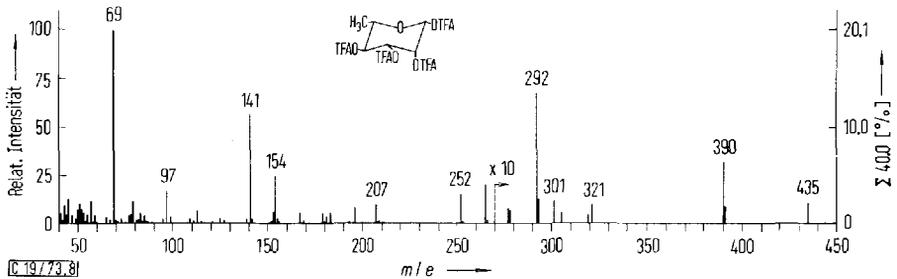


Abb. 8. Massenspektrum von TFA-α-L-Rhamnose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Intensive Fragment-Ionen im oberen Massenbereich treten auf bei *m/e* 435 (M - TFAO), *m/e* 390 M - (TFAOH + CH₃CH=O) und *m/e* 292 M - (TFAOH + TFAO - CH=O), wobei bevorzugt Ringöffnung zwischen C-1 und C-2 bzw. C-4 und C-5 auftritt. Das Fehlen eines Fragments M - TFAO - CH₂ spricht eindeutig dafür, daß die obigen Zucker in der Pyranoseform vorliegen.

2-Desoxyentosen

Als Beispiel dieser Verbindungsklasse sind in Abb. 9 die Massenspektren von 2-Desoxyribosepyranose und 2-Desoxyribofuranose dargestellt.

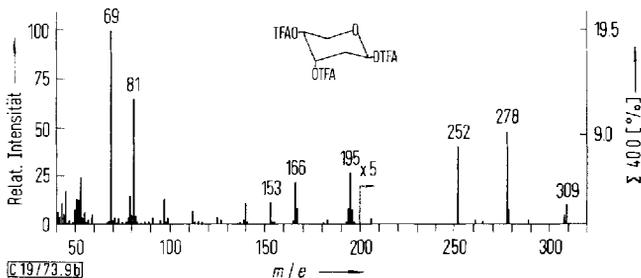
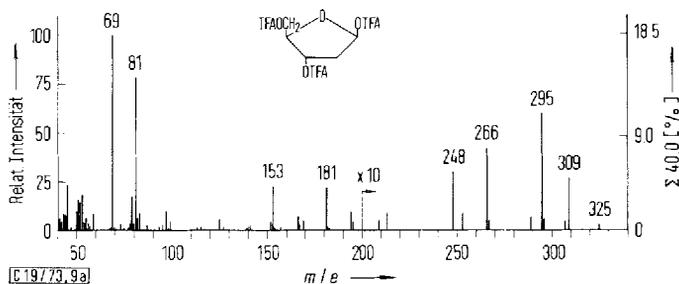


Abb. 9a. Massenspektrum von TFA-Desoxyribofuranose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Abb. 9b. Massenspektrum von TFA-Desoxyribofuranose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Beide Formen lassen sich zu etwa gleichen Teilen bei der Umsetzung von fester Desoxyribose im Gaschromatogramm nachweisen. Im Massenspektrum der Pyranose-Form sind besonders das Ion m/e 278, das $M - (\text{TFAOH} + \text{CH}_2=\text{O})$ entspricht, und das Ion m/e 252, welches das Bruchstück $\text{TFAO}-\text{CH}-\text{CH}-\text{OTFA}$ darstellt, hervorzuheben. Charakteristisch für die Furanoseform sind die Fragmente m/e 295 ($M - \text{TFAO}-\text{CH}_2$), das daraus durch Abspaltung von TFAOH entstehende m/e 181 und m/e 266 ($M - \text{TFAO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$), die mit relativ hoher Intensität erscheinen. Bei beiden Formen treten die Ionen m/e 325 ($M - \text{TFA}$) und m/e 309 ($M - \text{TFAO}$) auf.

Disaccharide

Auch von Disacchariden lassen sich vollständig trifluoracetylierte Derivate in ausgezeichneten Ausbeuten herstellen. Dabei konnte im Gaschromatogramm keine Spur von Monomeren, die durch Hydrolyse entstehen könnten, entdeckt werden. An einer 3 m langen Glassäule, gepackt mit 3% OV 17 auf Chromosorb WAW, werden die meisten Disaccharid-Derivate zwischen 135 und 160°C eluiert. Die Massenspektren lassen erstaunlicherweise in vielen Fällen den Molekülpeak bei der Masse 1110 erkennen. Die Fragmentierung ist sehr ähnlich wie bei den Monomeren. Die meisten Ionen resultieren aus der Abspaltung von Trifluoressigsäure oder des Trifluoracetylrestes. In Abb. 10 ist als Beispiel das Spektrum der Lactose dargestellt; die Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen ist in Tab. 7 angegeben.

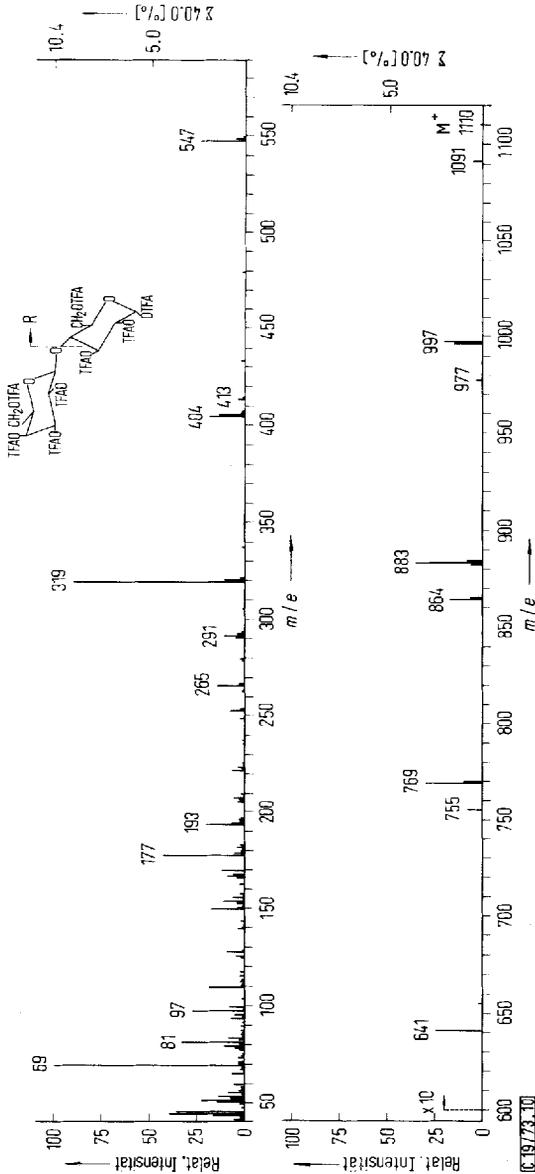


Abb. 10. Massenspektrum von TFA-Lactose. LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer, 70 eV

Während die Massenspektren der α - und β -Formen der Disaccharide annähernd identisch sind, konnten deutliche Unterschiede zwischen Disacchariden mit 1,4- bzw. 1,6-Verknüpfung festgestellt werden. Es treten ebenfalls klare Unterschiede zwischen Disacchariden auf, die nur aus Aldosen und solchen, die aus Aldosen und Ketosen (z.B. Saccharose) zusammengesetzt sind. Die genaue Untersuchung der Disaccharide ist noch nicht abgeschlossen.

Tab. 7. Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen beim TFA-Derivat von Lactose

<i>m/e</i>	Fragment-Ion
1110	M ⁺
1091	M - F
997	M - TFAO
996	M - TFAOH
977	M - (TFAOH + F)
883	M - (TFAOH + TFAO)
864	M - (TFAOH + TFAO + F)
769	M - (2 TFAOH + TFAO)
755	M - (2 TFAOH + TFAO-CH ₂)
655	M - (3 TFAOH + TFAO)
641	M - (3 TFAOH + TFAO-CH ₂)
547	M - RO (R siehe Abb. 10)
433	M - (RO + TFAOH)
413	M - (ROH + TFAOH + F)
405	M - (RO + TFAO-CH=O)
404	M - (ROH + TFAO-CH=O)
319	433 - TFAOH
291	405 - TFAOH

Gaschromatographische Retentionszeiten

Die isomeren Aldopentosen bzw. Aldoheptosen weisen in ihren Massenspektren nur geringe Intensitätsunterschiede auf, die nicht in allen Fällen zur Unterscheidung ausreichen. Die Spektren von Glucose und Mannose sind einander so ähnlich, daß eine Zuordnung nicht möglich ist. Hier kann eine Identifizierung auf Grund der unterschiedlichen gaschromatographischen Retentionszeiten erfolgen. Die Massenspektren von Xylose und den übrigen Aldopentosen unterscheiden sich dagegen sehr stark in den relativen Intensitäten ihrer Fragment-Ionen, so daß eine Zuordnung auf Grund der Massenspektren bei Vergleich mit Standard-Verbindungen möglich erscheint.

Über den Zusammenhang zwischen Retentionszeiten und Molekülstruktur lassen sich keine allgemeinen Aussagen machen. Gewöhnlich werden von den vier möglichen Formen die α -Pyranosen vor den β -Pyranosen, die Furanosen nach der jeweiligen Pyranoseform eluiert. Ausgenommen davon sind Ribose, Arabinose und Allose, bei denen die β -Pyranose vor der α -Pyranose erscheint.

Die Zuordnung erfolgte durch Untersuchung von TFA-Derivaten fester Zucker, die durch NMR-spektroskopische Untersuchung als einheitliche α - oder β -Anomere bestimmt wurden und die entsprechend im Gaschromatogramm nur einen Peak ergaben.

Für die gaschromatographische Trennung eignen sich am besten Säulen von mindestens 3 m Länge bei Verwendung von 3% OV 17 oder SE 30 auf Chromosorb WAW.

Das in der Reaktionsmischung vorliegende Pyridinium-trifluoressigsäure zerfällt beim Einspritzen der Lösung in den Gaschromatographen in Pyridin und Trifluoressigsäure. Das Pyridin wird nach den leichtflüchtigen Lösungsmittel-Komponenten des Reaktionsgemisches relativ spät und als ungewöhnlich breiter Peak eluiert (Pyrolyseprodukt), der bei zu kurzen Säulen (≤ 3 m) gelegentlich mit leichtflüchtigen Zuckerkomponenten überlappt.

Experimenteller Teil

Mutarotation: Etwa 100 μg des festen Zuckers wurden bei 20°C in 200 μl bidest. Wasser 36 h stehengelassen. Nach Abziehen des Wassers im Vakuum-Exsikkator über P_2O_5 wurde der Rückstand zum TFA-Derivat umgesetzt.

Derivatbildung: Die TFA-Derivate wurden durch Reaktion von ca. 100 μg Zucker in 65 μl Dichlormethan, 30 μl Trifluoressigsäure und 5 μl Pyridin (3 h, 20°C) erhalten. Die Reaktionsmischung wurde direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie: Es wurde ein LKB 9000 Kombinationsgerät benutzt. Zur Trennung dienten eine Glas-Säule, gefüllt mit 3% OV 17 auf Chromosorb WAW, eine 3 m lange Stahl-Säule mit 3% SE 30 auf Chromosorb WAW und eine 2 m lange Glas-Säule mit 10% Dexsil 300 auf Supelcoport. Trägergas: 20 ml He/min .

Die Massenspektren wurden bei 70 eV Ionisierungsenergie, 250°C Ionenquellentemperatur und 3.5 KV Beschleunigungs-Spannung aufgenommen.

Die Peakflächen der Gaschromatogramme wurden durch Ausschneiden der Peaks und anschließende Wägung bestimmt.

Hochauflösungsmassenspektrometrie: Die Hochauflösungsmassenspektren wurden an einem CEC 21-110B Massenspektrometer bei einer Auflösung von ca. 20000 aufgenommen. Die Proben wurden durch das Direkteinlaß-System zugeführt und bei 70 eV und 170°C Ionenquellentemperatur untersucht. Die Registrierung der Massenspektren erfolgte photographisch auf Photoplaten (Ilford Q2).

[19/73]