

Partiell benzylierte Kohlenhydrate, 4¹⁾

Quantifizierung gaschromatographisch nicht getrennter isomerer Kohlenhydrat-Derivate

Jürgen M. Küster, Heinrich Luftmann und Ingolf Dyong*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster,
Orléans-Ring 23, D-4400 Münster

Eingegangen am 30. Oktober 1975

Methyl-2,3- (8) und -2,4-di-*O*-benzyl- (9) bzw. Methyl-2,3,6- (15) und -2,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosid (16) ließen sich gaschromatographisch nicht trennen. Die Zusammensetzung von 8/9- und 15/16-Gemischen läßt sich jedoch durch gekoppelte GC/MS an Hand der Intensitäten „charakteristischer“ Fragmente quantitativ bestimmen ($\pm 5\%$).

Partially Benzylated Carbohydrates, 4¹⁾

Quantitative Determination of Gas Chromatographically Unresolved Isomeric Carbohydrate Derivatives

Methyl 2,3- (8) and 2,4-di-*O*-benzyl- (9) as well as methyl 2,3,6- (15) and 2,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranoside (16) can not be separated by gas liquid chromatography. However, the compositions of 8/9 and 15/16 mixtures can be determined quantitatively ($\pm 5\%$) by combined glc/ms from the intensities of "characteristic" fragments.

Die unterschiedliche Reaktivität sekundärer Hydroxylgruppen in Pyranosen bzw. Pyranosiden und die Abhängigkeit der Alkylierungsmuster von schon vorhandenen Substituenten im Molekül rücken gezielt regioselektive Alkylierungen in den Bereich präparativ brauchbarer Methoden. Über ein Beispiel haben wir kürzlich berichtet¹⁾.

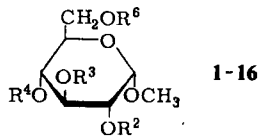
Diesen Reaktionen liegen Vorstellungen zu Grunde, die von Kefurt, Staněk jr., Kefurtova und Járy²⁾ sowie von uns¹⁾ entwickelt wurden: die Reaktivität einer Hydroxylgruppe ist erhöht, wenn sie Donorteil eines intramolekularen H-Brücken-Systems ist, sie ist erniedrigt, wenn sie als Acceptor fungiert. Das O-Atom einer alkylierten Hydroxylgruppe ist nur noch der Acceptor für den Wasserstoff sterisch günstig orientierter OH-Gruppen im Molekül. Deren Reaktivität sollte sich hierdurch erhöhen. Weitere Belege für diese These können durch die partielle Alkylierung von Hexosiden und ihren Mono- und Di-*O*-alkyl-Derivaten erhalten werden. Um z. B. für die partielle Benzylierung des Methyl- α -D-glucopyranosids (1) und seiner Benzyläther geeignete Ausgangsprodukte zur Verfügung zu haben und gaschromatographische Produktanalysen durchzuführen, mußten durch strukturbeweisende Synthesen alle theoretisch möglichen Mono-, Di- und Tri-benzyläther von 1 dargestellt werden³⁾.

¹⁾ 3. Mittel.: J. M. Küster, I. Dyong und D. Schmeer, Chem. Ber. 109, 1253 (1976).

²⁾ K. Kefurt, J. Staněk jr., Z. Kefurtova und J. Járy, Collect. Czech. Chem. Commun. 40, 300 (1975).

³⁾ J. M. Küster und I. Dyong, Liebigs Ann. Chem. 1975, 2179.

Systematische gaschromatographische Untersuchungen an Benzyläthern von Kohlenhydraten sind u. W. bisher noch nicht durchgeführt worden. Wie wir fanden, lassen sich Gemische der trimethylsilylierten Mono-, Di- und Tri-*O*-benzyl-Derivate von 1 bei linearem Temperaturanstieg gut an Trägern trennen, die mit mäßig polaren Phasen schwach belegt sind (1 % OV 17 oder SE 52).



	R ²	R ³	R ⁴	R ⁶		R ²	R ³	R ⁴	R ⁶
1	H	H	H	H	9	Bzl	H	Bzl	H
2	H	Bzl	H	H	10	H	Bzl	H	Bzl
3	H	H	Bzl	H	11	H	H	Bzl	Bzl
4	Bzl	H	H	H	12	Bzl	H	H	Bzl
5	H	H	H	Bzl	13	Bzl	Bzl	Bzl	H
6	Allyl	Allyl	>CH-C ₆ H ₅		14	H	Bzl	Bzl	Bzl
7	H	Bzl	Bzl	H	15	Bzl	Bzl	H	Bzl
8	Bzl	Bzl	H	H	16	Bzl	H	Bzl	Bzl

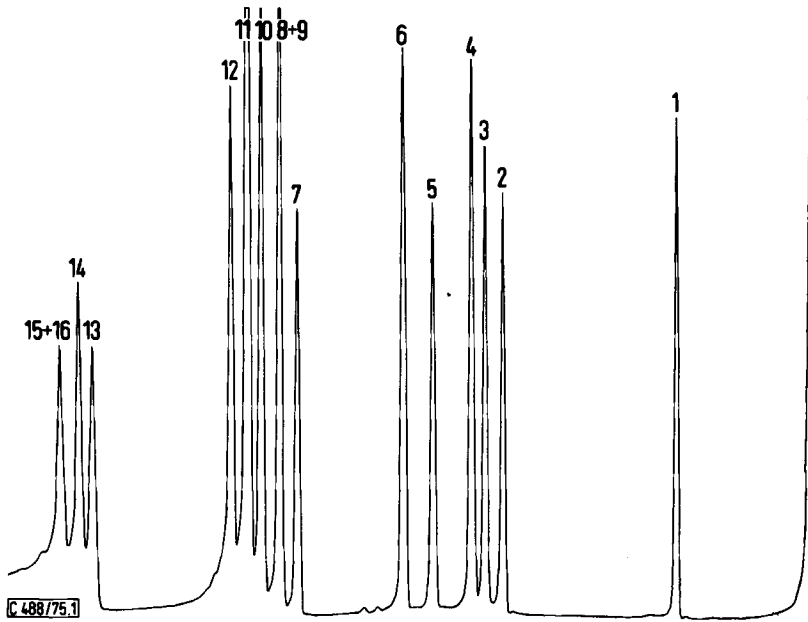


Abb. 1. GC aller Methyl-mono-, -di- und -tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranoside als Trimethylsilyl-Derivate (Testgemisch). Trennung an 2 m 1 % OV 17 auf Chromosorb G/AWDMCS. Temperaturprogramm: 140–290°C, 1.25°C/min

Tab. 1. Rel. Retentionszeiten (t_R) und Korrekturfaktoren (f_i) aller Methyl-mono-, -di- und -tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranoside (als TMS-Derivate), bezogen auf Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (6) als Standard

α -D-glucopyranosid	t_R	f_i
Methyl- (1)	0.33	2.5
Methyl-3- <i>O</i> -benzyl- (2)	0.75	2.1
Methyl-4- <i>O</i> -benzyl- (3)	0.80	1.9
Methyl-2- <i>O</i> -benzyl- (4)	0.83	2.2
Methyl-6- <i>O</i> -benzyl- (5)	0.93	1.9
Methyl-2,3-di- <i>O</i> -allyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden- (6) ^{a)}	1.00	1.9
Methyl-3,4-di- <i>O</i> -benzyl- (7)	1.23	1.2
Methyl-2,3-di- <i>O</i> -benzyl- (8)	1.30	1.4
Methyl-2,4-di- <i>O</i> -benzyl- (9)	1.30	1.2
Methyl-3,6-di- <i>O</i> -benzyl- (10)	1.34	1.0
Methyl-4,6-di- <i>O</i> -benzyl- (11)	1.38	1.6
Methyl-2,6-di- <i>O</i> -benzyl- (12)	1.42	1.8
Methyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -benzyl- (13)	1.75	0.24
Methyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -benzyl- (14)	1.79	0.40
Methyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -benzyl- (15)	1.83	0.35
Methyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -benzyl- (16)	1.83	0.32

^{a)} Bruttoretentionszeit des Standards 6: 68 min.

Die numerischen Werte für f_i ⁴⁾ zeigen, daß quantitative Bestimmungen selbst bei isomeren Kohlenhydrat-benzyläthern mit erheblichen Fehlern behaftet sind, wenn ohne einen Standard gearbeitet wird.

Trotz zahlreich geänderter Gerätebedingungen und trotz Verwendung verschiedener stationärer Phasen ist es nicht gelungen, die isomeren Methyl-2,3- (8) und -2,4-di-*O*-benzyl- (9) bzw. Methyl-2,3,6- (15) und -2,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranoside (16) zu trennen. *Heyns, Sperling und Grützmacher*⁵⁾ haben gefunden, daß auch die 2,3,6- und 2,4,6-Trimethyläther des Methyl- α -D-glucopyranosids (1) praktisch gleiche Retentionszeiten besitzen.

Wir haben daher nach einem Verfahren gesucht, das eine möglichst genaue Bestimmung der Isomerenanteile zuläßt, aus denen sich ein GC-Signal zusammensetzt, und sind von der bekannten Beobachtung ausgegangen, daß die absolute Intensität massenspektrometrischer Peaks von der Konzentration der Probe in der Ionenquelle abhängt⁶⁾. Das Verhältnis von zwei gaschromatographisch nicht getrennten Komponenten sollte daher aus den relativen Intensitäten ihrer Fragmente ermittelt werden können.

Ein im Ansatz verwandtes Verfahren fanden wir von *Sweeley, Elliott, Fries und Ryhage*⁷⁾ beschrieben, die durch kombinierte GC/MS-Untersuchungen gaschromatographisch nicht oder nur

⁴⁾ Ber. nach $f_i = \frac{F_i \cdot G_{St}}{F_{St} \cdot G_i}$ mit F_i = Fläche des GC-Peaks i , G_i = Einwaage an i , F_{St} = Fläche des Standard-GC-Peaks und G_{St} = Einwaage an Standard.

⁵⁾ *K. Heyns, K. R. Sperling und H. F. Grützmacher*, Carbohydr. Res. 9, 79 (1969).

⁶⁾ *H. Kienitz* (Herausgeber), Massenspektrometrie, S. 297, Verlag Chemie, Weinheim 1968.

⁷⁾ *C. C. Sweeley, W. H. Elliott, I. Fries und R. Ryhage*, Anal. Chem. 38, 1549 (1966).

unvollständig trennbare Glucose und [D₂]Glucose bzw. Epiandrosteron und Dehydroepiandrosteron als TMS-Derivate quantitativ bestimmt haben. Ähnlich wurde schon früher von *Lindeman* und *Annis*⁸⁾ die Zusammensetzung von Kohlenwasserstoffgemischen untersucht, und *Sjöquist* und *Änggård*⁹⁾ bestimmten durch GC/MS-Messungen eine einzelne Komponente (4-Hydroxy-3-methoxy-phenylessigsäure) in Proben biologischen Ursprungs, wobei die deuterium-markierte Carbonsäure als innerer Standard diente.

Diese Methoden beruhen mit einer Ausnahme⁹⁾ auf der Auswertung spezifischer Fragmente, die jeweils in den MS der anderen Komponenten nicht auftreten. Wie im folgenden gezeigt wird, ist diese Einschränkung, die insbesondere bei Strukturisomeren schwer zu realisieren ist, keine notwendige Voraussetzung¹⁰⁾.

Zunächst werden die Massenspektren der durch GC nicht zu trennenden reinen Verbindungen aufgenommen und aus diesen Fragmente ausgewählt, die im Spektrum der jeweils anderen Komponente zwar auch auftreten, aber in ihrer Intensität möglichst stark verschieden sind. Die Differenz zwischen den Massenzahlen der „charakteristischen“ Fragmente zweier Komponenten sollte möglichst gering sein, da die Spektren bei kleinen Massenbereichen durch einen Magnet-Scan in kürzeren zeitlichen Abständen registriert werden können.

Diese Voraussetzungen sind praktisch immer gegeben, und für die TMS-Derivate der isomeren Methyl-2,3- (**8**) und -2,4-di-*O*-benzyl- (**9**) bzw. Methyl-2,3,6- (**15**) und -2,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-glucopyranoside (**16**) werden sie durch die folgenden Fragmentpaare erfüllt (Tab. 2).

Tab. 2. Absolute Intensitäten charakteristischer Fragmentpaare bei isomeren Benzyläthern des Methyl- α -D-glucopyranosids (**1**) (TMS-Derivate)

- α -D-glucopyranosid	Absol. Intensitäten (mm)			
	<i>m/e</i> = 157	<i>m/e</i> = 159	<i>m/e</i> = 169	<i>m/e</i> = 171
Methyl-2,3-di- <i>O</i> -benzyl- (8)	32.0	9.5	9.3	23.3
Methyl-2,4-di- <i>O</i> -benzyl- (9)	13.5	50.1	107.0	15.0
		<i>m/e</i> = 222	<i>m/e</i> = 235	
Methyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -benzyl- (15)		1.6	20.7	
Methyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -benzyl- (16)		25.7	5.5	

Solange bei der gaschromatographischen Trennung der Benzyläther **2–16** die Isomeren **8, 9** und **15, 16** im Gasstrom auftreten, werden durch ein an den Chromatographen angeschlossenes Massenspektrometer automatisch und in konstanten Zeitintervallen Spektren (ca. 15/min) registriert, die den Massenbereich der interessierenden charakteristischen Ionen überstreichen (cyclic scanning). Aus den Massenspektren werden die absol. Intensitäten der Fragmentpaare abgelesen und gegen die Zeit, repräsentiert durch die Spektrnummer, aufgetragen.

⁸⁾ L. P. Lindeman und J. L. Annis, Anal. Chem. **32**, 1742 (1960).

⁹⁾ B. Sjöquist und E. Änggård, Anal. Chem. **44**, 2297 (1972).

¹⁰⁾ In Lit.⁹⁾ wird die GC/MS-Untersuchung von nicht getrenntem 3- und 4-Methylheptan beschrieben. Zur quantitativen Bestimmung werden charakteristische Fragmente ausgewertet, die auch im MS des jeweiligen Isomeren mit ca. 5–10% auftreten. Es werden Korrekturen erwähnt aber nicht beschrieben.

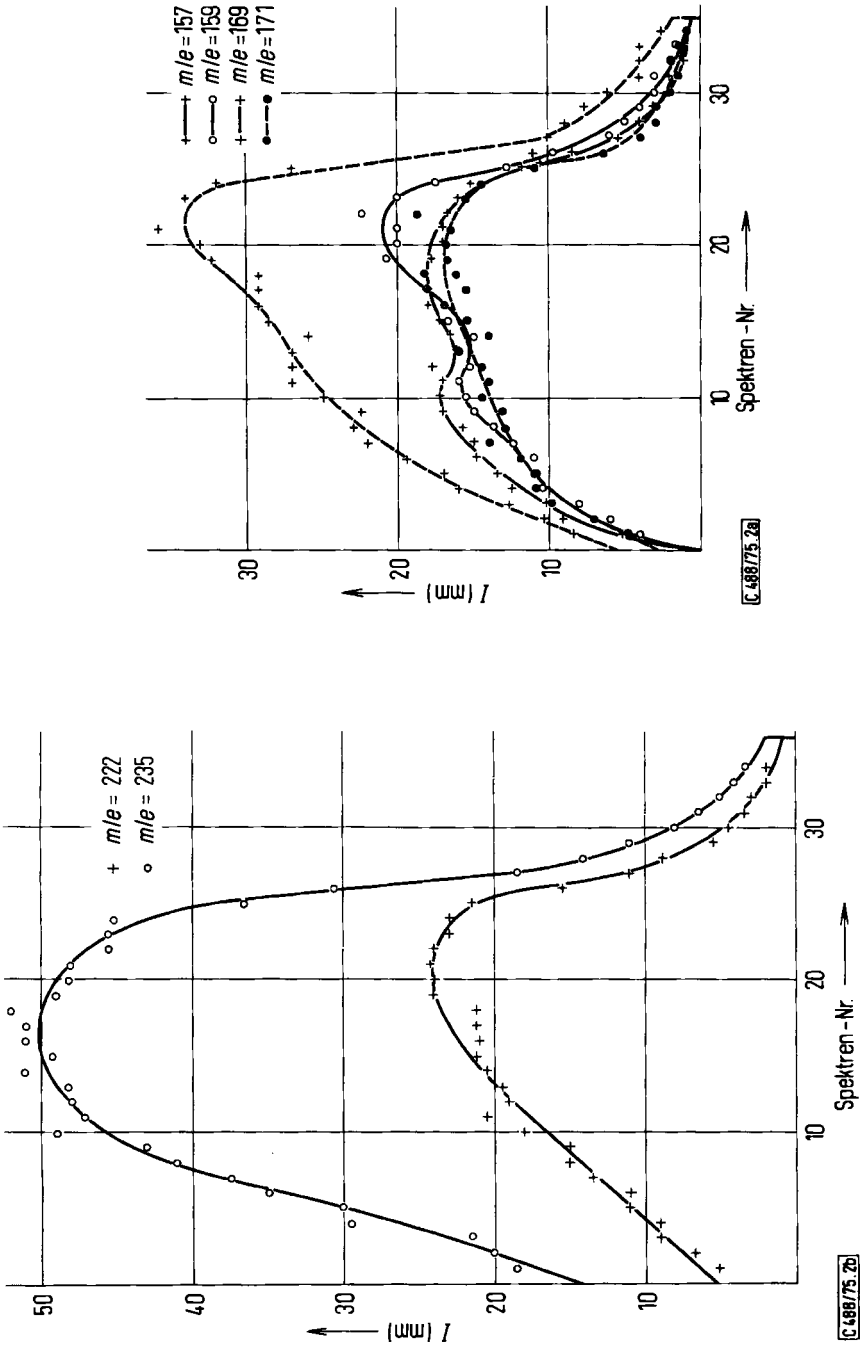


Abb. 2. Intensitäten charakteristischer Fragmentpaare (mm) in Abhängigkeit von der Zeit (Spektrennummer), a): Di-O-benzyl-glucoside 8, 9; b): Tri-O-benzyl-glucoside 15, 16

Durch Integration der Kurven im Intensitäts-Zeit-Diagramm erhält man zwei Flächen, z. B. in Abb. 2a) $F(157)$ und $F(159)$. Da das für ein Isomeres jeweils charakteristische Fragment mit geringerer Intensität auch im Spektrum des zweiten Isomeren auftritt, also z. B. $F(157)$ durch Flächenanteile aus der Fragmentierung des 2,3- (F_8) und des 2,4-Di-*O*-benzyl-Isomeren (F_9^*) resultiert, muß durch eine Ausgleichsrechnung bestimmt werden, wie groß der Flächenanteil F_8 an $F(157)$ bzw. F_9 an $F(159)$ ist. Das Verhältnis dieser „reduzierten“ Flächen ist ein Maß für die Zusammensetzung des gemeinsamen GC-Signals aus den Isomeren **8** und **9**.

Mit den „Fragmentflächen“

$$F(157) = F_8 + F_9^* \quad \text{und} \quad F(159) = F_9 + F_8^*$$

und den Intensitätsverhältnissen

$$V_8^I = I_8^*/I_8 \quad \text{sowie} \quad V_9^I = I_9^*/I_9,$$

die aus den Spektren der reinen Isomeren **8** und **9** bestimmt werden, folgt:

$$F(157) = F_8 + V_9^I \cdot F_9 \quad \text{und} \quad F(159) = F_9 + V_8^I \cdot F_8.$$

Mit diesen Beziehungen ergibt sich für den Flächenanteil im Intensitäts-Zeit-Diagramm, Abb. 2a), der aus der Fragmentierung von **8** zu $m/e = 157$ resultiert:

$$F_8 = \frac{F(157) - V_9^I \cdot F(159)}{1 - V_8^I \cdot V_9^I}$$

und für den Anteil aus der Fragmentierung von **9** zu $m/e = 159$:

$$F_9 = \frac{F(159) - V_8^I \cdot F(157)}{1 - V_8^I \cdot V_9^I}.$$

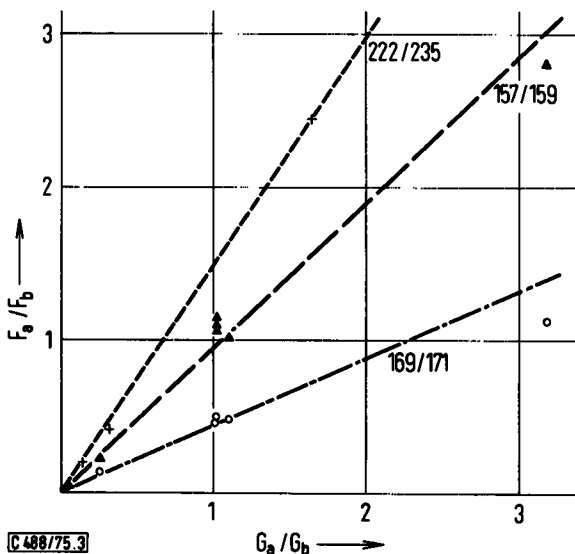


Abb. 3. Verhältnisse der reduzierten Flächen F_8/F_9 bzw. F_{157}/F_{159} in Abhängigkeit von den Gewichtsverhältnissen G_8/G_9 bzw. G_{157}/G_{159}

In Abb. 3 sind die Verhältnisse der „reduzierten“ Flächen F_8/F_9 bzw. F_{15}/F_{16} gegen die Gewichtsverhältnisse in bekannten Lösungen von **8** und **9** bzw. **15** und **16** aufgetragen. Den resultierenden Geraden können nach GC/MS-Messung und Ausgleichsrechnung die Zusammensetzungen unter den GC-Peaks der nicht getrennten Isomeren **8** und **9** bzw. **15** und **16** in unbekanntem Proben unter Berücksichtigung der Korrekturfaktoren f_i direkt entnommen werden.

Die gute Reproduzierbarkeit ($\pm 3\%$) bei der Bestimmung der „Fragmentflächen“ ergibt sich aus einer Mehrfachbestimmung des Flächenverhältnisses F_8/F_9 bei einem Gewichtsverhältnis $G_8/G_9 \approx 1$. Die Gewichtsverhältnisse G_8/G_9 , die aus den Fragmentpaaren $m/e = 157, 159$ und $m/e = 169, 171$ über die Eichgeraden in Abb. 3 ermittelt wurden, weichen nur um $\pm 5\%$ voneinander ab.

Die Schultern in den Kurven der Intensitäts-Zeit-Diagramme (Abb. 2a)) weisen darauf hin, daß die Isomeren **8** und **9** am Anfang und Ende des Peaks in geringem Umfang angereichert worden sind, während die Tribenzyläther **15** und **16** vollständig ungetrennt bleiben (Abb. 2b)). Auch durch Kapillarsäulenchromatographie an 20 m OV 225 wurden **8** und **9** nur teilweise getrennt ($\beta^{11} = 0.65$). Bei **15** und **16** gelang erwartungsgemäß auch unter diesen Bedingungen keine Trennung.

In allen Fällen, in denen gaschromatographische Trennmethode versagen, bietet das geschilderte GC/MS-Verfahren eine relativ wenig aufwendige Alternative, die allgemein anwendbar sein dürfte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Mittel, die bei dieser Arbeit verwendet wurden.

Experimenteller Teil

Gaschromatographie: Nach Zuwaage von Methyl-2,3-di-O-allyl-4,6-O-benzylden- α -D-glucopyranosid (**6**) als Standard, werden die Gemische aus **1** und den Benzyläthern **2**–**16**³⁾ (gesamt: ca. 300 mg) in 2 ml absol. Pyridin mit 1 ml Hexamethyldisilazan und 2 ml Chlortrimethylsilan versetzt. Nach 30 min bei Raumtemp. und 5 min bei 50°C wird eingedampft. Die Rückstände werden in 3 ml absol. Cyclohexan aufgenommen, die Lösungen filtriert und die Filtrate erneut eingedampft. Nach Lösen in 1.0 ml absol. Cyclohexan werden Anteile von 0.4–0.8 μ l gaschromatographisch untersucht.

Gaschromatograph: Doppelsäulengerät F 7 (Perkin-Elmer). Trennung an Metallsäulen (2 m \times 3 mm i. D.). Stationäre Phase: 1% OV 17 auf Chromosorb G/AWDMCS (80–100 mesh). Trägergas: 40 ml N₂/min. Injektor: 240°C. Detektor (FID): 300°C. Säulenofen: 140–290°C; Temperaturanstieg: 1.25°C/min.

GC/MS-Untersuchungen: Einfach fokussierendes Massenspektrometer mit angekoppeltem Gaschromatographen (Varian MAT 111). Trennung an Glassäulen (1.7 m \times 2 mm i. D.). Stationäre Phase: 4% OV 17 auf Chromosorb W/AWDMGS (100–120 mesh). Trägergas: 20 ml He/min. Injektor, He-Separator und Einlaßleitung: 270°C. Elektronenstoßdetektor: 20 eV. Säulenofen: 180–300°C; Temperaturanstieg: 2°C/min. Die Massenspektren werden während der gesamten Elutionszeit der nicht getrennten Isomerenpaare in Intervallen von 4 s aufgenommen. Durchlaufgeschwindigkeit: 100 Masseneinheiten/s. Ionenquelle: 80 eV. Registrierung auf UV-empfindlichem Papier.

¹¹⁾ E. Leibnitz und H. G. Struppe, Handbuch der Gaschromatographie, S. 112, Verlag Chemie, Weinheim 1970.

Kapillarsäulen-Gaschromatographie: Gaschromatograph: Typ 1400 (Varian). Trennung an Glassäulen (20 m × 0.25 mm i. D.). Zur Wandbelegung wird die Trennsäule aus Sodaglas mit trockenem HCl-Gas 3 h bei 350 °C angeätzt und die stationäre Phase nach der dynamischen Methode durch eine Lösung von 10 % OV 225 in Dichlormethan aufgebracht¹²⁾. Bodenzahl: 40 000 (gemessen an Dimethylphenol). Trägergas: 0.5 ml N₂/min. Probeneingabe durch „splitless injection“¹³⁾. Injektor: 250 °C. Detektor (FID): 250 °C. Säulenofen: 1. Phase isotherm (150 °C); anschließend linearer Anstieg bis 200 °C: 10 °C/min und von 200–240 °C: 1 °C/min.

¹²⁾ M. Novotný und A. Zlatkis, *Chromatogr. Rev.* **14**, 1 (1971).

¹³⁾ K. Grob und G. Grob, *Chromatographia* **5**, 3 (1972).