

CHROM. 13,699

## Note

### Gaschromatographische Erfassung von 6-Desoxyhexosen, Pentosen und Hexosen aus herzwirksamen Glykosiden

#### II\*. Gas-Flüssigkeits-Chromatographie an Glaskapillarsäulen\*\*

J. JURENITSCH\*, B. KOPP, I. GABLER-KOLACSEK und W. KUBELKA

*Institut für Pharmakognosie der Universität Wien, Währingerstrasse 25, A-1090 Wien (Österreich)*

(Eingegangen am 8. Januar 1981)

Im Rahmen von Arbeiten zur Konstitutionsbestimmung verschiedener herzwirksamer Glykoside<sup>2–5</sup> hatte sich die Notwendigkeit ergeben, ein einfaches Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von 6-Desoxyhexosen, Hexosen und Pentosen auszuarbeiten. Die Gaschromatographie der pertrimethylsilylierten Zucker an gepackten Säulen erwies sich zu diesem Zweck gut geeignet<sup>1</sup>, wobei allerdings bei einigen Zuckerpaaren eine sichere Zuordnung nur durch Verwendung zweier verschiedener Trennsäulen (OV-101 und OV-17) erreicht werden konnte. Im Hinblick auf eine weitere Vereinfachung stellte sich nun die Frage, ob die bei der Gaschromatographie an Glaskapillarsäulen erzielbare Trennkapazität<sup>6–9</sup> einen Einsatz zweier Trennsysteme erübrigen würde. Um einen Vergleich mit den an gepackten Säulen erreichbaren Ergebnissen zu ermöglichen, untersuchten wir daher das Trennverhalten der 6-Desoxyhexosen, Hexosen und Pentosen sowohl an mit OV-101 als auch an mit OV-17 belegten Dünnschichtglaskapillarsäulen. Daneben versuchten wir durch Einsatz verschiedener Silylierungsreagentien eine Vereinfachung der zur Derivatisierung nötigen Manipulationen zu erzielen.

#### EXPERIMENTELLES

Vergleichssubstanzen: Wie in Lit. 1 angegeben.

Lösungsmittel: Alle verwendeten Lösungsmittel waren p.A. Qualität (Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Gaschromatographie: Gerät Perkin-Elmer F 33 ausgerüstet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Säule 1: Glaskapillare: 24 m × 0.23 mm I.D., Trennfilm: OV-101; Trägergas (N<sub>2</sub>): 0.6 ml/min, Split 1:50; Temperatur: Injektor/Detektor 225°C; Ofen, Programm: 150–240°C, 1°/min; Initialzeit: 20 min; Brenngase: Wasserstoff-Synthetische Luft. Säule 2: Glaskapillare: 24 m × 0.28 mm I.D., Trennfilm: OV-17; Trägergas (N<sub>2</sub>): 0.6 ml/min, Split 1:30; Temperatur: Injektor/Detektor 225°C; Ofen, Programm: 150–200°C, 1°/min, Initialzeit: 20 min; Brenngase: Wasser-

\* I. Mitt.: Lit. 1.

\*\* Teil der Diplomarbeit I.G.-K., Universität Wien, Wien, 1979.

stoff-Synthetische Luft. Integrator Perkin-Elmer M-2; Schreiber Perkin-Elmer 056.

Hydrolyse der Glykoside und Äquilibration der freien Zucker: wie früher beschrieben<sup>1</sup>.

Derivatisierung: Reagens 1: Nach Sweeley *et al.*<sup>10</sup> mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan in wasserfreiem Pyridin<sup>1</sup>. Reagens 2: 0.2 mg Zucker werden mit 100  $\mu$ l Tri-Sil Z (Pierce, Rotterdam, Niederlande) versetzt<sup>11</sup>. Reagens 3: 0.2 mg Zucker werden mit 100  $\mu$ l N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid reinst (Serva, Heidelberg, B.R.D.) versetzt<sup>12</sup>. Reagens 4: 0.2 mg Zucker werden mit 100  $\mu$ l N-Trimethylsilylimidazol reinst (Serva) versetzt. Von diesen Lösungen wurden 0.5–1.5  $\mu$ l injiziert.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zur Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen zogen wir ein Gemisch von Arabinose, Rhamnose und Fucose heran, deren Hauptpeaks bei der Verwendung gepackter Säulen teilweise stark überlappten (Fig. 1). Nach Variation von Gasfluss und Temperaturprogramm konnten wir mit einer OV-101 Glaskapillarsäule bei vergleichbaren Retentionszeiten eine wesentlich bessere Auftrennung erzielen (Fig. 2).

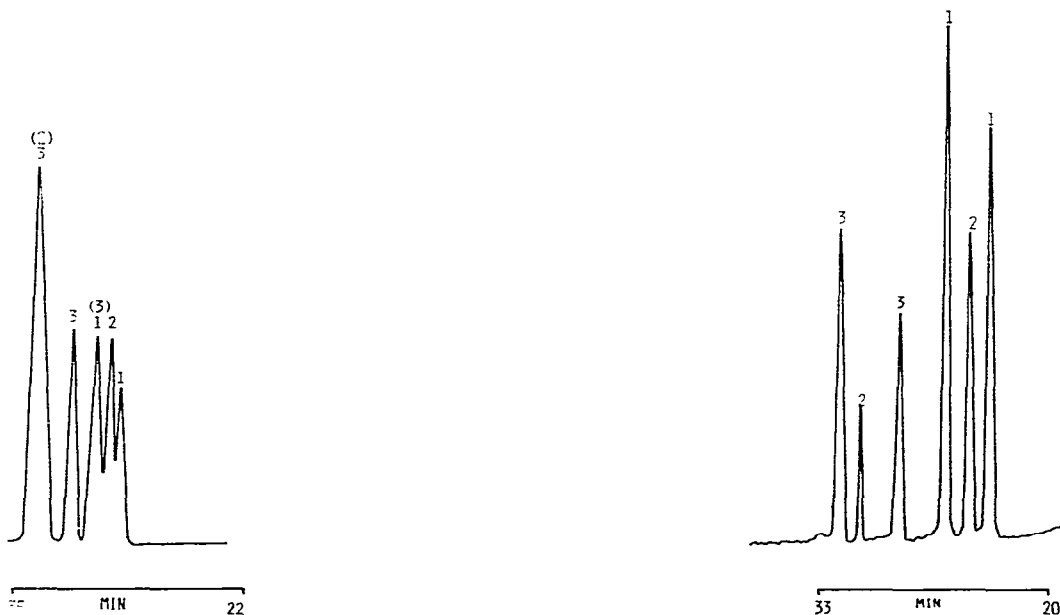


Fig. 1. Gas-Flüssigkeits-Chromatographische Trennung von TMS-Arabinose (1), TMS-Rhamnose (2) und TMS-Fucose (3) an gepackter Säule; Säule: Pyrex 10 ft.  $\times$   $\frac{1}{8}$  in O.D.  $\times$  2 mm I.D.; Trennfilm 1.6% OV-101 auf Chromosorb G (100–120 mesh); Trägergas ( $N_2$ ): 20 ml/min; Temperatur Injektor 230°C, Detektor 240°C; Programm 100–240°C (2°/min).

Fig. 2. Gas-Flüssigkeits-Chromatographische Trennung von TMS-Arabinose (1), TMS-Rhamnose (2) und TMS-Fucose (3) an Glaskapillarsäule; Säule: Glaskapillare 24 m  $\times$  0.23 mm I.D.; Trennfilm: OV-101; Trägergas ( $N_2$ ): 0.6 ml/min. Split 1:50; Temperatur Injektor/Detektor 225°C; Ofen, Programm 150–240°C, 1°/min; Initialzeit 20 min.

Da sich bei dem bisher verwendeten Derivatisierungsverfahren<sup>1,10</sup> durch die bei der Reaktion auftretende Trübung gewisse Nachteile ergeben hatten, überprüften wir nun andere im Handel erhältliche Reagentien auf ihre Eignung: Während "Tri-Sil Z" hinsichtlich der Haltbarkeit der Lösungen nicht zufriedenstellte, verlief die Reaktion mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoacetamid (BSTFA) auch nach 30 min Erwärmen auf 60°C nicht vollständig. Erst die Verwendung von Trimethylsilylimidazol (TSIM) Konzentrat brachte dem früheren Verfahren vergleichbare Ergebnisse, besass jedoch den Vorteil, dass klare Einspritzlösungen erhalten wurden, weshalb wir dieses Reagens bei allen weiteren Untersuchungen verwendeten.

Um einen Überblick über die an OV-101 Glaskapillarsäulen auftretenden Retentionszeiten, die Anzahl der Anomerenpeaks und deren Flächenverhältnisse zu erhalten, dosierten wir zunächst Lösungen der einzelnen pertrimethylsilylierten Reinsubstanzen, die wir zuvor wie früher beschrieben<sup>1</sup> mit Säure vorbehandelt hatten. Ein Vergleich der Retentionszeiten zeigte, dass sich verschiedene Zucker in nur einem, einige aber in zwei Hauptpeaks überlagern mussten.

Zur Gewinnung präziser Daten spritzten wir anschliessend Gemische von Trimethylsilyl (TMS)-Zuckern ähnlicher Retentionszeit ein und fanden bei den Paaren Ribose-6-Desoxygulose, Ribose-6-Desoxyidose, 6-Desoxyidose-6-Desoxytalose, Ribose-Fucose, 6-Desoxyallose-Fucose, 6-Desoxyallose-6-Desoxytalose, Xylose-Fucose, 6-Desoxyglucose-Altrose, Allose-Talose, Talose-Galaktose, Gulose-Mannose und 6-Desoxyidose-Idose eine Überlappung jeweils eines Hauptpeaks. Nahezu gleiche Retentionszeiten wiesen die Hauptpeaks der Paare Lyxose-6-Desoxygulose und Fucose-6-Desoxytalose auf. Von diesen kritischen Paaren konnten allerdings z.B. 6-Desoxyallose-6-Desoxytalose und Allose-Talose trotz unvollständiger Trennung nebeneinander erfasst werden. Die gefundenen Retentionszeiten und Flächenverhältnisse sind in Fig. 3 ersichtlich. Beispiele für die Trennung von aus jeweils fünf Monosacchariden bestehenden Gemischen zeigen Fig. 4 und 5.

Entsprechende Versuche mit einer OV-17 Glaskapillarsäule ergaben die in Fig. 6 ersichtlichen Daten. Wie bei Verwendung von OV-101 stellten wir auch bei OV-17 Überlagerungen von Hauptpeaks einzelner Zuckerpaare fest, doch lagen die auf OV-

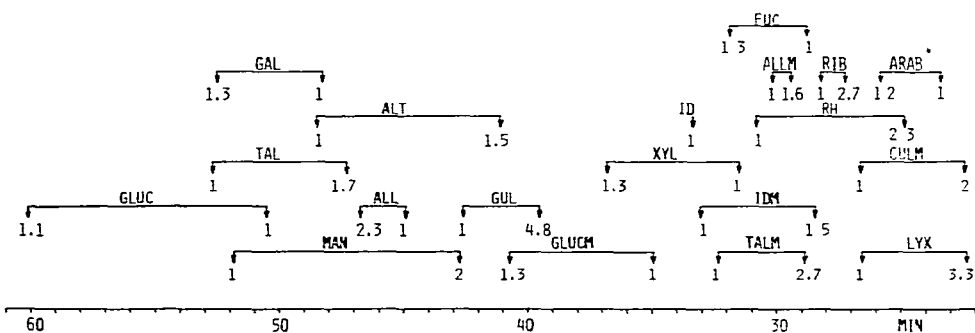


Fig. 3. Retentionszeiten der TMS-Monosaccharide an einer OV-101 Glaskapillarsäule (vgl. Fig. 2) und Peakflächenverhältnisse der anomeren Formen nach Behandlung mit Säure. GULM = 6-Desoxygulose, RIB = Ribose, RH = Rhamnose, ARAB = Arabinose, LYX = Lyxose, ALLM = 6-Desoxyallose, IDM = 6-Desoxyidose, TALM = 6-Desoxytalose, FUC = Fucose, GUL = Gulose, XYL = Xylose, ALT = Altrose, GLUCM = 6-Desoxyglucose, ID = Idose, ALL = Allose, TAL = Talose, GAL = Galaktose, MAN = Mannose, GLUC = Glucose.

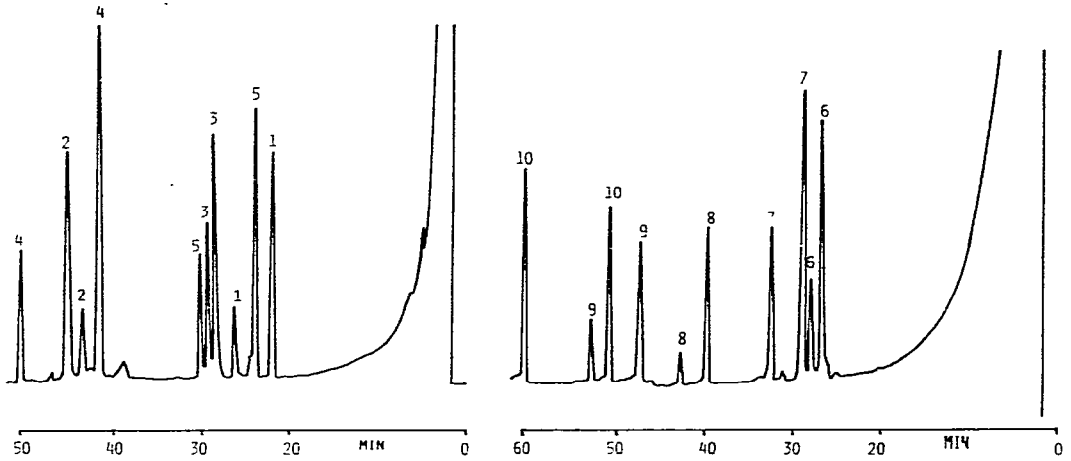


Fig. 4. Gas-Flüssigkeits-Chromatographische Trennung von TMS-Lyxose (1), TMS-Allose (2), TMS-6-Desoxyallose (3), TMS-Mannose (4) und TMS-Rhamnose (5) an einer OV-101 Glaskapillarsäule; Trennbedingungen wie in Fig. 2.

Fig. 5. Gas-Flüssigkeits-Chromatographische Trennung von TMS-Ribose (6), TMS-6-Desoxytalose (7), TMS-Gulose (8), TMS-Talose (9) und TMS-Glucose (10) an einer OV-101 Glaskapillarsäule; Trennbedingungen wie in Fig. 2.

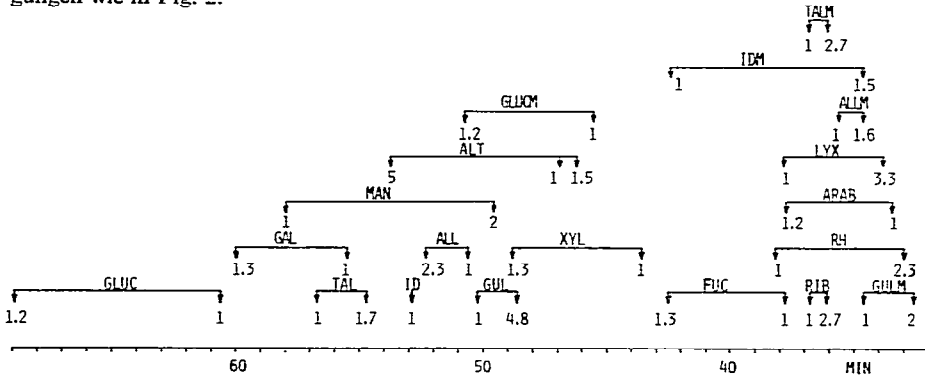


Fig. 6. Retentionszeiten der TMS-Monosaccharide an einer OV-17 Glaskapillarsäule und Peakflächenverhältnisse der anomeren Formen nach Behandlung mit Säure. Glaskapillare 24 m × 0.28 mm I.D., Trennfilm OV-17; Trägergas (N<sub>2</sub>) 0.6 ml/min, Split 1:30; Temperatur Injektor/Detektor 225°C; Ofen, Programm 150–200°C, 1°/min; Initialzeit 20 min. Abkürzungen vgl. Fig. 3.

101 gefundenen kritischen Paare nunmehr soweit getrennt vor, dass eine sichere Identifizierung möglich wurde. Für Analysen unbekannter Proben empfiehlt es sich, zunächst an OV-101 zu trennen und in Zweifelsfällen, das heisst bei Vorliegen der aufgezeigten kritischen Paare, eine zusätzliche Bestimmung an OV-17 durchzuführen. Bei der Untersuchung herzwirksamer Glykoside führt normalerweise allein die Verwendung von OV-101 zu raschen und sicheren Ergebnissen, da dieser Glykosidtyp erfahrungsgemäss maximal drei verschiedene Monosaccharid-Bausteine enthält.

Wie bereits bei der Gaschromatographie an gepackten Säulen<sup>1</sup> festgestellt, liessen sich erwartungsgemäss auch die Peakflächenverhältnisse als Zuordnungskriterien heranziehen. Es ist jedoch hervorzuheben, dass wir bei den Analysen an Glaskapillarsäulen teilweise abweichende Verhältniswerte fanden, was zum grossen Teil auf das neue Silylierungsverfahren zurückgeführt werden muss. Da vergleichende Analy-

sen an gepackten und Kapillarsäulen ebenfalls Schwankungen der Flächenverteilung aufzeigten, kann auch ein Einfluss des Probenteilers nicht ausgeschlossen werden. Die in Fig. 3 und 6 angegebenen Flächenverhältnisse müssen daher als Richtwerte betrachtet werden, welche sich allerdings bei strikter Einhaltung der Hydrolyse- bzw. Äquilibrierbedingungen gut reproduzieren lassen.

Auch in quantitativer Hinsicht gab die Analyse unter Verwendung von Glaskapillarsäulen zufriedenstellende Ergebnisse. Eichanalysen mit Monosaccharidgemischen bekannter Zusammensetzung führten zu Korrekturfaktoren, die mit den an gepackten Säulen ermittelten<sup>1</sup> gut korrelierten. Nachdem die Faktoren der Hexosen, Pentosen und 6-Desoxyhexosen nur um  $\pm 10\%$  (relativ) differierten, liessen sich näherungsweise auch die Flächenverhältnisse für die Bestimmung der Mol-Verhältnisse heranziehen.

Sowohl bei Verwendung von gepackten als auch von Glaskapillarsäulen ist somit eine sichere Identifizierung der einzelnen Zucker möglich; dies bringt gegenüber den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren<sup>14</sup> einen deutlichen Zeitgewinn. Hinsichtlich der Trennkapazität zeigten sich die Kapillarsäulen den gepackten überlegen, wodurch bei komplexen Gemischen leichter interpretierbare Chromatogramme erhalten wurden. Es ist jedoch anzumerken, dass auch bei Anwendung von Kapillarsäulen bei manchen Analysen zwei unterschiedliche stationäre Phasen (OV-101 und OV-17) eingesetzt werden müssen, um die geforderte Analysensicherheit zu gewährleisten. Dennoch können beide Verfahren (Chromatographie an gepackten Säulen oder an Glaskapillarsäulen) im Rahmen der Strukturaufklärung herzwirksamer Glykoside mit Erfolg verwendet werden; im Einzelfall wird die Wahl in Abhängigkeit vom speziellen Trennproblem und vorhandenen technischen Möglichkeiten zu treffen sein.

#### DANK

Für die Überlassung von Vergleichssubstanzen danken wir Herrn Professor Dr. T. Reichstein, Basel, Schweiz auf das herzlichste. Die verwendeten gaschromatographischen Einheiten wurden durch Mittel der Österreichischen Apothekerkammer bzw. aus Sondermitteln des Österreichischen Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung finanziert.

#### LITERATUR

- 1 B. Kopp, J. Jurenitsch und W. Kubelka, *J. Chromatogr.*, 210 (1981) 291.
- 2 B. Kopp und W. Kubelka, in Vorbereitung.
- 3 B. Kopp und W. Kubelka, in Vorbereitung.
- 4 J. B. S. Park, *Dissertation*, Universität Wien, Wien, 1978.
- 5 U. Baumann, *Dissertation*, Universität Wien, Wien, in Vorbereitung.
- 6 G. A. Janauer und P. Englmaier, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 539.
- 7 E. Cerma, B. Staucher und M. Chimentì, *Univ. Studi Trieste, Fac. Econ. Commer., Ist. Mercerol.*, 40 (1968) 15; zit. nach *C.A.* 72 (1970) 131159.
- 8 G. J. Gerwig, J. P. Kamerling und J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, 77 (1979) 1.
- 9 G. Eklund, B. Josefsson und C. Roos, *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 575.
- 10 C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 11 D. G. Pritchard und C. W. Todd, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 133.
- 12 D. A. Craven und C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 414.
- 13 A. E. Pierce, *Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1968.
- 14 H. Kaufmann, P. Mühlradt und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta.* 50 (1967) 2287.