

Massenspektroskopische Untersuchungen an Glycosylglyceriden

Mass Spectrometric Investigation of Glycosyl Glycerides

H. Budzikiewicz, J. Rullkötter

Institut für Organische Chemie der Universität Köln

und

E. Heinz

Botanisches Institut der Universität Köln

(Z. Naturforsch. **28 c**, 499–504 [1973]; eingegangen am 18. April 1973)

Mass spectrometry, glycosyl glycerides

The mass spectrometric fragmentation behavior of glycosyl glycerides is discussed with special regard to the localisation of the fatty acids present in the molecule and to the applicability for mixture analyses.

Während das massenspektroskopische Fragmentierungsverhalten von Sphingolipiden und verwandten Verbindungen gut untersucht ist¹, liegen über Glycosylglyceride bisher keine Untersuchungen vor. Solche Substanzen finden sich häufig in Bakterien und treten als Hauptkomponenten in den Lipiden grüner Blätter auf. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich Verbindungen mit

gesättigten Fettsäuren benutzt, die halbsynthetisch dargestellt oder durch Hydrierung natürlich vorkommender Verbindungen erhalten worden waren^{2–5}. Die in der Natur vorliegenden Lipide enthalten dagegen einen hohen Anteil verschiedener ungesättigter Fettsäuren. Im folgenden wird über Ergebnisse an dieser Verbindungsklasse berichtet, wobei besonders die Möglichkeit einer massenspektroskopischen Posi-

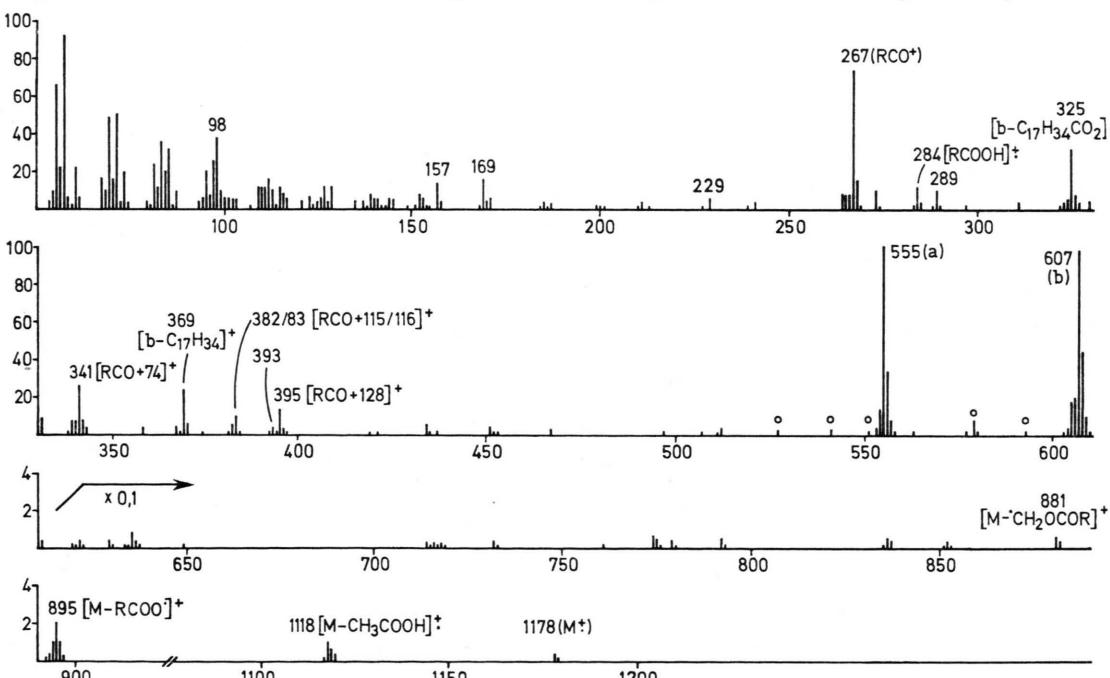


Abb. 1. Massenspektrum von 1,2-Distearoyl-3-(2',3',4'-triacetyl-6'-stearoyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (I). Die mit o gekennzeichneten Peaks stammen vermutlich von einer Beimengung von geringen Mengen Estern niedriger homologer Säuren.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz, Institut für Organische Chemie der Universität Köln, D-5000 Köln 1, Zülpicher Str. 47.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

tionsanalyse von Fettsäuren geprüft wurde, die bisher nur durch Hydrolyse mit Hilfe lipolytischer Enzyme definierter Spezifität möglich war.

Ergebnisse und Diskussion

1,2-Distearoyl-3-(2',3',4'-triacetyl-6'-stearoyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (**1**) (Abb. 1) soll als Beispiel für das Fragmentierungsverhalten peracetylierter Verbindungen dienen. Allgemein ist zu bemerken, daß eine Reihe von typischen Fragmenten sowohl für peracetylierte Hexosen⁶ als auch für Glyceride⁷ zu erkennen ist.

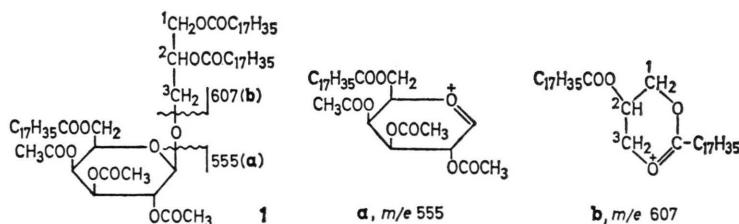
1. M^+ ist von geringer Intensität, aber deutlich erkennbar und von einem oder mehreren Peaks, die dem Verlust von CH_3COOH ($M-60$, $M-120$) entsprechen, begleitet. Die Überprüfung des Molekulargewichtes ist jedoch durch die Summe (**a** + **b** + 16) (s. Formel **1**) leicht möglich.

2. Für den Zuckerteil charakteristische Fragmente (vgl.⁶). Verlust der Glycerinseitenkette führt bei allen Verbindungen, die nur ein Zuckermolekül enthalten, zu einem der intensivsten Fragmenten (**a**), aus dessen Masse sich – bei Kenntnis des Zuckers – die Art der Veresterung in diesem Molekülteil ableiten läßt (es ist im Falle von Fettsäureestern selbstverständlich nur die Kohlenstoffzahl und ggf. der Unsatzzigungsgrad der Summe der veresterten Säuren erkennbar, die hohe Intensität des Ions **a** erlaubt aber bei Vorliegen von Estergemischen innerhalb der eben genannten Grenzen auch eine Analyse nach Art und Menge der gebundenen Fettsäuren). Weiterer Abbau von **a** (entspricht A_1 nach der Nomenklatur von Biemann⁶; diese Be-

zeichnungen werden auch im folgenden angegeben) erfolgt wie bei peracetylierten Aldohexosen beobachtet. Deutlich erkennbar sind m/e 393 (entspr. A_3 , C_{18} -Ester enthalten), 289, 229, 169 (A_3), 157 (C_1) und 98 (B_4). Da die Struktur dieser Ionen gesichert ist, kann man beim Vorliegen unterschiedlicher Acylgruppen im Zuckerrest die möglichen Verknüpfungsstellen weitgehend einengen. Der sterische Bau des Zuckers (Galaktose, Glucose) hat erwartungsgemäß keinen erkennbaren Einfluß auf das Fragmentierungsmuster.

3. Für den Glycerinteil charakteristische Fragmente (vgl.⁷). An Intensität dem Bruchstück **a** vergleichbar ist ein Ion der Masse m/e 607, das durch Spaltung der CH_2-O -Bindung (s. **1**) entstanden ist, dem jedoch die cyclische Struktur **b** zukommt. Aus der Masse von **b** lassen sich unter Beachtung der bei der Diskussion von **a** genannten Einschränkungen Aussagen über die Acylsubstituenten machen (Summe der beiden Säurereste), die durch die weiter unten besprochenen Ionen präzisiert werden können. Auch hier sind qualitative und quantitative Angaben bei Estergemischen möglich (s. u. **6**).

Die Art der gebundenen Säuren läßt sich – zumindest (wegen der geringeren Intensität der entsprechenden Peaks) bei einheitlichen Substanzen – aus den Ionen RCO^+ (m/e 267), $[RCOOH]^{+·}$ (m/e 284) (diese beiden Ionen können auch aus dem Zuckerteil stammen, vgl. **a**), $[RCO + 74]^+$ (m/e 341), $[RCO + 115/116]^+$ (m/e 382/383) und $[RCO + 128]^+$ (m/e 395) sowie den bei Glyceriden bisher nicht identifizierten Fragmenten $[b-C_{17}H_{34}CO_2]^+$ (m/e 325) und $[b-C_{17}H_{34}]^+$ (m/e 369) ableiten.



$[M-RCOO']^+$ (m/e 895) ist deutlich zu erkennen, von geringerer Intensität (und daher bei Gemischen schwer zu identifizieren) ist das für die Identifizierung der terminalen (C-1) Estergruppierung wichtige Ion $[M-CH_2OCOR]^+$ (m/e 881). Sein Auffinden wird jedoch dadurch erleichtert, daß sich seine Masse aus M^+ und der veresterten Säure (s. o.)

berechnen läßt, und es stets von dem um 14 u schwereren intensiveren Ion $[M-RCOO']^+$ begleitet sein muß (vgl. 5).

1,2-Dipalmitoyl-3-(peracetyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (**2**) (Abb. 2) und *1-Stearoyl-2-acetyl-3-(peracetyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin* (**3**). Die Spektren dieser beiden Verbindungen bestätigen die

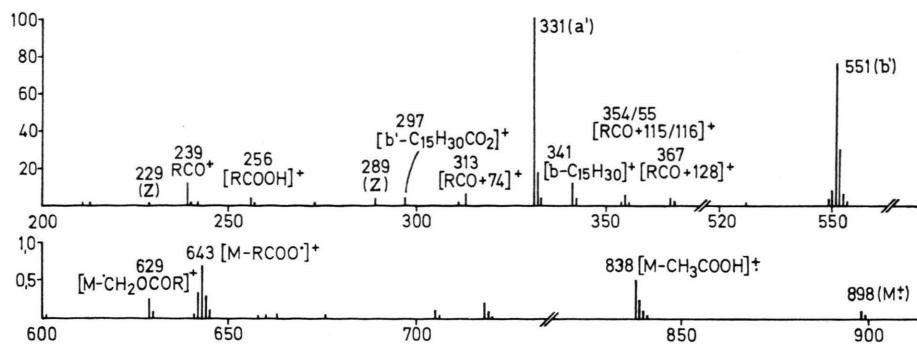
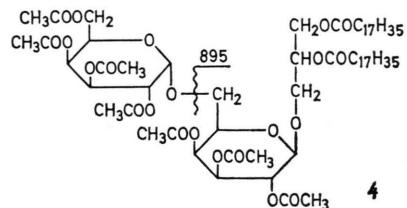
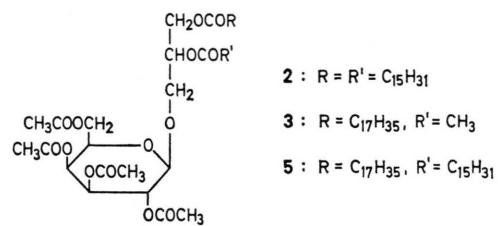


Abb. 2. Massenspektrum von 1,2-Dipalmitoyl-3-(peracetyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (2). Die aus dem Zuckerteil stammenden Ionen sind durch Z gekennzeichnet.

bei **1** getroffenen Zuordnungen. Besonders hervorzuheben ist nur die geringe Intensität von RCO^+ bei den Verbindungen, deren Zuckerrest nicht gleichfalls eine langkettige Fettsäure enthält. In Abb. 2 sind die **a** und **b** analogen Fragmente mit **a'** und **b'**, die vom Zuckerteil stammenden Ionen mit Z bezeichnet.

zerfällt analog **2**. Eines Kommentars bedürfen nur die sehr geringe Intensität von M^+ sowie des α -Spaltproduktes **c** (m/e 619), während **a'** (m/e 331) stark hervortritt. Ein Fragment der Masse m/e 895 scheint durch Verlust eines Zuckerrestes (s. Formel **4**) entstanden zu sein.



1,2-Distearoyl-3-[peracetyl-6'-O-(α -D-galaktopyranosyl)- β -D-galaktopyranosyl]-glycerin (4) (Abb. 3)

1-Stearoyl-2-palmitoyl-3-(peracetyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (5) (Abb. 4) zeigt ein enstpre-

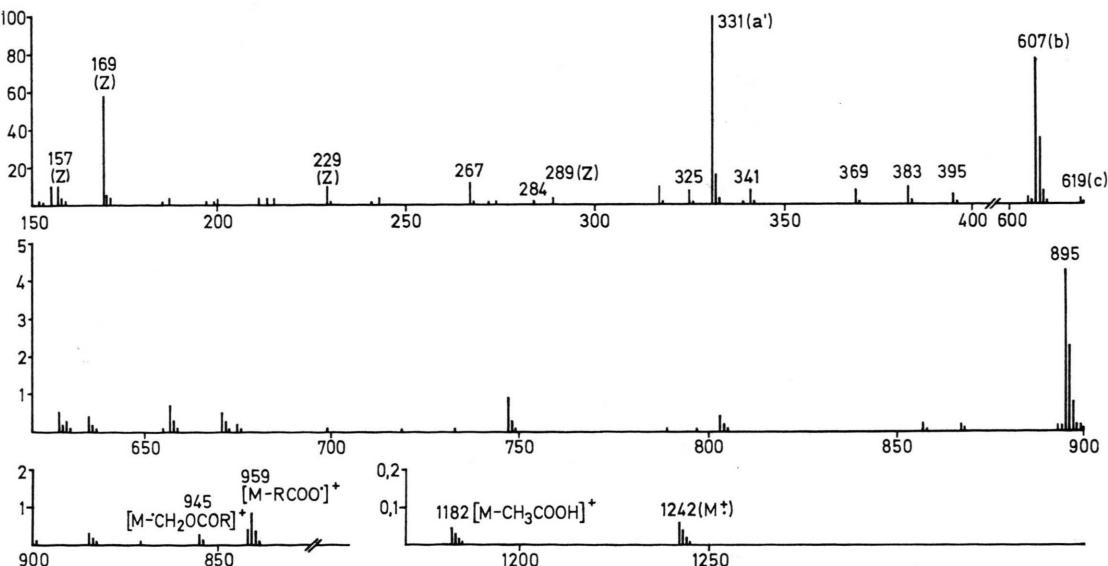


Abb. 3. Massenspektrum von 1,2-Distearoyl-3-[peracetyl-6'-O-(α -D-galaktopyranosyl)- β -D-galaktopyranosyl]-glycerin (4). Bezuglich der Ionen m/e 267, 284, 325, 341, 369, 383 und 395 s. Abb. 1. Die aus dem Zuckerteil stammenden Ionen sind durch Z gekennzeichnet.

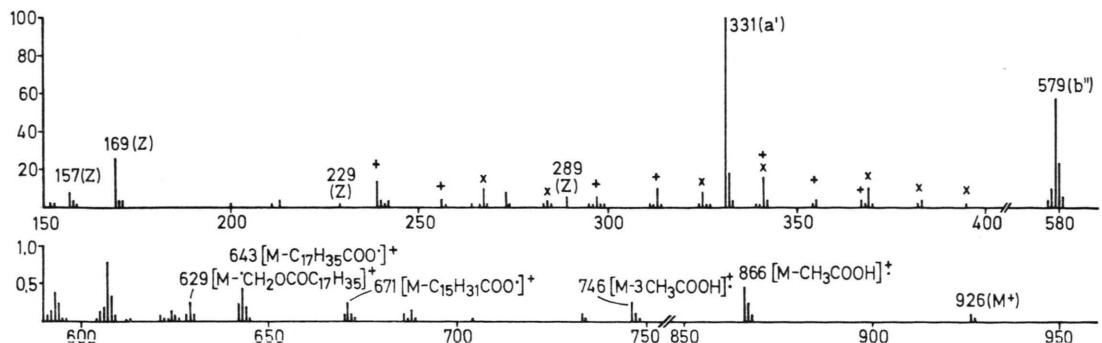


Abb. 4. Massenspektrum von 1-Stearoyl-2-palmitoyl-3-(peracetyl- β -D-galaktopyranosyl)-glycerin (5). Die mit x bezeichneten Ionen entsprechen der Reihe C₁₇H₃₅CO⁺ usw. (s. Abb. 1), die mit + bezeichneten der Reihe C₁₅H₃₁CO⁺ (s. Abb. 2). Z bezeichnet die Ionen aus dem Zuckerrest.

chend komplexeres Fragmentierungsmuster, da die Reihen der Fettsäurefragmente doppelt (um 28 u. gegeneinander verschoben) auftreten. Wichtig ist, daß nur die C-1-Estergruppierung die bei **1** beschriebenen Ionen [M-RCOO']⁺ (*m/e* 643) und [M-CH₂OCOR]⁺ (*m/e* 629) (weniger intensiv) ergibt, während von der C-2-Estergruppierung ausgehend nur [M-R'COO']⁺ (*m/e* 671) beobachtet wird. Auf diese Weise ist – zumindest bei Reinsubstanzen – eine Lokalisierung der Estergruppe möglich. (Achtung! Auch Verbindungen, die an C-6' eine Estergruppierung mit einer langkettigen Fettsäure tragen, dürften diese Fragmente geben; eine Überprüfung war mangels geeigneter Substanzen jedoch nicht möglich.)

1,2-Di-acyl-3-(peracetyl-6-desoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-glycerin-methylester (**6**) aus *Sinapis*⁵, das im Glycerinteil mit Palmitin- und Stearinsäure verestert ist, liefert das in Abb. 5 wiedergegebene Spektrum. Das Fragmentierungsverhalten folgt den bereits besprochenen Beispielen (s. Abb. 5), erlaubt jedoch eine Demonstration, wie weit aus dem Massenspektrum Mengen und Verteilung der Fettsäuren abgeleitet werden können⁸. Die Intensitäten der RCO⁺-Ionen (*m/e* 249 und 267) ermöglichen keine Bestimmung des Mengenverhältnisses der beiden veresterten Säuren, da dieser Massenbereich von zu vielen anderen Ionen überlagert ist. Eindeutig ist jedoch die Region, die die typischen Fragmente des Glycerinteils **e** – **h** (analog **b**) enthält (im folgen-

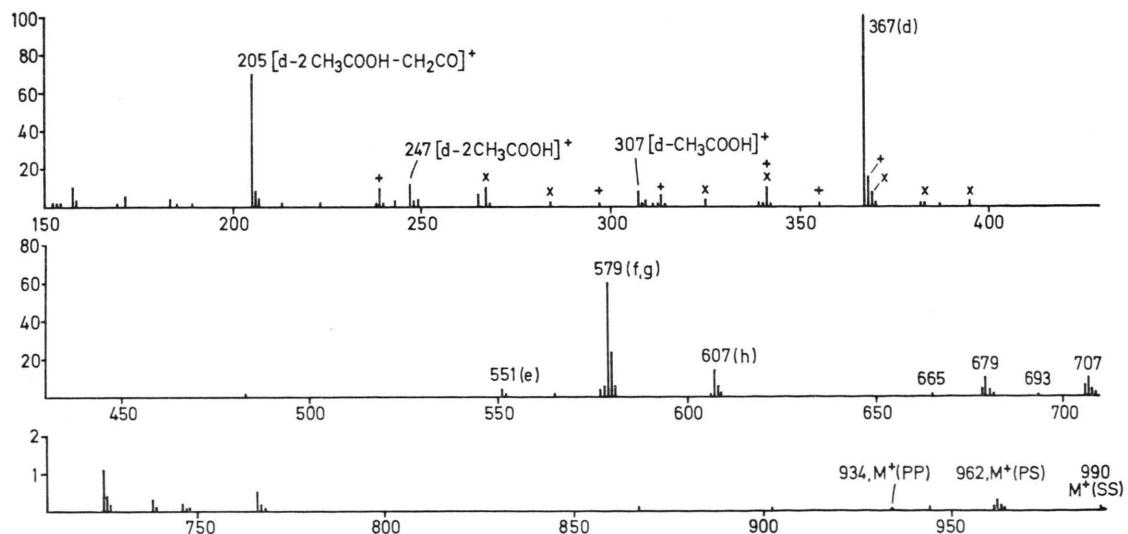
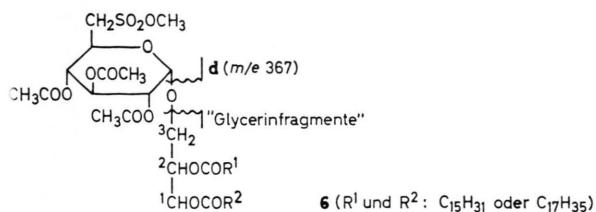
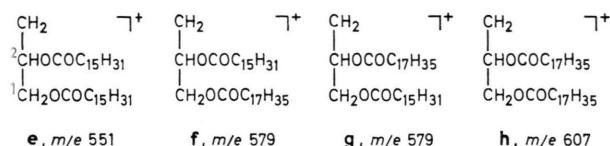


Abb. 5. Massenspektrum von 1,2-Diacyl-3-(peracetyl-6-desoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-glycerin-methylester (6). Bezuglich der mit x und + bezeichneten Ionen s. Abb. 4.

den der Übersichtlichkeit halber offenkettig dargestellt):



"Glycerinfragmente"



Die gemessenen Peakintensitäten sind für **e** 3,2%, für **f + g** 79,4% und für **h** 17,4%. (Die auf gaschromatographischem Wege⁵ erhaltenen Werte sind 3%, 78,5% und 18%.) Daraus läßt sich das Mengenverhältnis $C_{15}H_{31}COOH$ zu $C_{17}H_{35}COOH$ folgender-

maßen berechnen:

$$\frac{[C_{15}H_{31}COOH]}{[C_{17}H_{35}COOH]} = \frac{2e + f + g}{f + g + 2h} = \frac{43}{57},$$

was mit den durch Gaschromatographie der Methyl-ester erhaltenen Werten (39,5 und 60,5%) recht gut übereinstimmt.

Durch Verlust von CH_2OCOR wird aus den Molekülionen entsprechend den Kombinationen **e** und **f** $m/e 665$ und aus **g** und **h** $m/e 693$ erhalten (Intensitätsverhältnis $\sim 10 : 5$). Daraus läßt sich nach

$$\frac{e + f}{(79,4 - f) + h} = \frac{67}{33}$$

der prozentuale Anteil der vier Kombinationen **e**, **f**, **g** und **h** zu 3,2, 64,0, 15,4 und 17,4 berechnen (durch Kombination von enzymatischer Hydrolyse und Gaschromatographie von Derivaten intakter Sulfolipide waren die Werte 3, 54, 26 und 17% errechnet worden⁵). Es ergibt sich somit, daß Palmitinsäure, die auch schon vor der Hydrierung der Sulfolipide als solche vorlag und in Triglyceriden

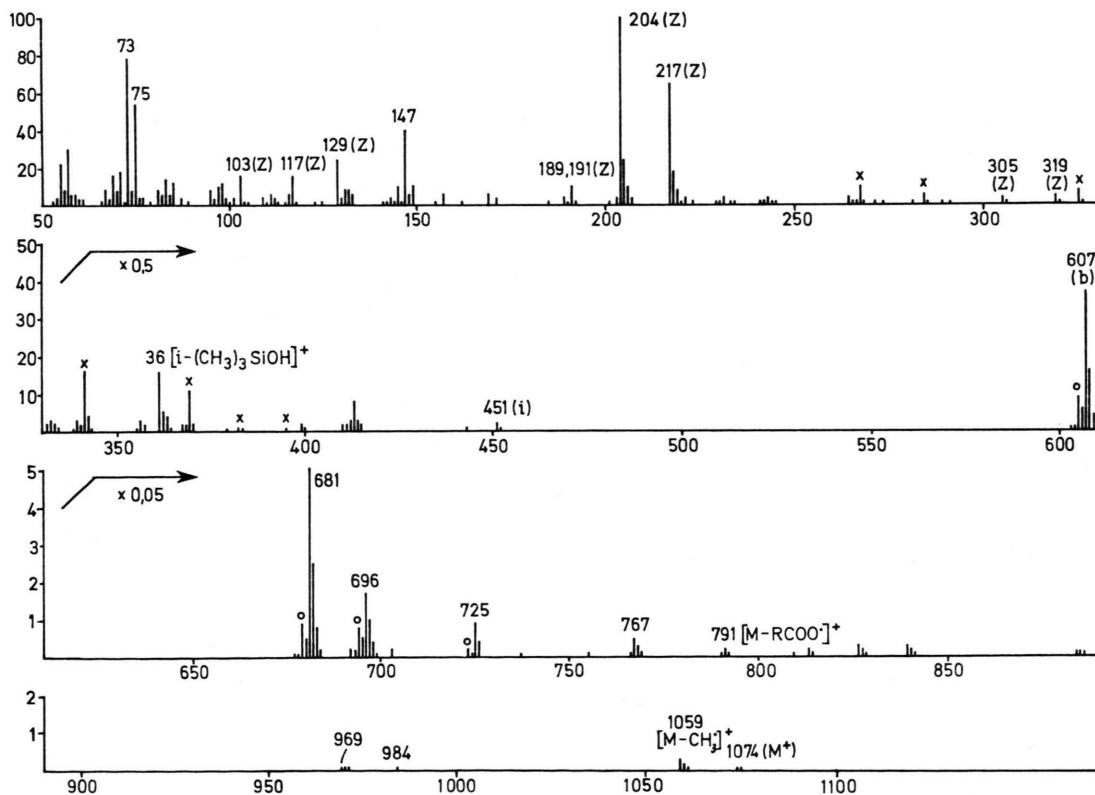


Abb. 6. Massenspektrum von 1,2-Distearoyl-3-(β -D-pertrimethylsilyl-galaktopyranosyl)-glycerin (7). Bezüglich der mit \times bezeichneten Ionen s. Abb. 4, Z bezeichnet die Ionen aus dem Zuckerteil, die mit \circ gekennzeichneten Peaks stammen wahrscheinlich von einer Beimengung von ungesättigtem Material.

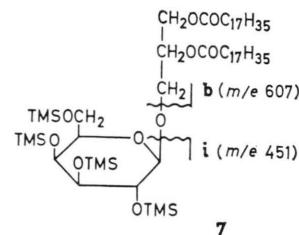
und Phosphatiden fast ausschließlich mit C-1 verestert ist, zu 78% an C-2 und zu 22% an C-1 lokalisiert ist. Damit ist zugleich ein unabhängiger Beweis für die Positionsspezifität der Hydrolyse durch die Lipase aus *Rhizopus delemar*⁹ erbracht, nach der 69% der Palmitinsäure an C-2 gefunden wurden. Wegen der geringen Peakintensität von m/e 665 und 693 und der damit verbundenen weniger genauen Intensitätsmessung sind naturgemäß die auf massenspektroskopischem Wege erhaltenen Werte nur als Näherungswerte zu betrachten. Im ganzen zeigt sich jedoch, daß die massenspektroskopisch erhaltenen Daten eine gute Kontrolle für die Analyse auf enzymatischem Wege bieten.

1.2-Distearoyl-3-(β -D-pertrimethylsilyl-galaktopyranosyl)-glycerin (7) (Abb. 6) diene als Beispiel eines silylierten Derivates. Verwendung dieser Verbindung gegenüber den bisher besprochenen Peracetaten ist, was die Strukturanalyse betrifft, eher nachteilig. M^+ (neben $M\cdot CH_3$, $M\cdot (CH_3)_3SiOH$, $M\cdot CH_3 - (CH_3)_3SiOH$) ist erkennbar, und aus dem Isotopenmuster kann die Zahl der TMS-Gruppen im Molekül (das gleiche gilt für die Fragmentionen) abgeleitet werden. Der Glycerinteil (**b**) (m/e 607) ist eines der wichtigsten Fragmente und die mit RCO^+ beginnende Reihe (gekennzeichnet durch x) ist gut erkennbar. $[M\cdot RCO]^+$ (m/e 791) tritt auf, während das diagnostisch wichtige $[M\cdot CH_2OCOR]^+$ (m/e 777) praktisch fehlt.

Die Ionen 681, 696, 725 und 767 enthalten den Glycerinteil und Teile des Zuckerrestes, da Frag-

mente mit denselben Massen-Differenzen zu **b** (bzw. dem analogen Spaltprodukt) in allen Spektren von Substanzen, deren Zuckerteil pertrimethylsilyliert ist, auftreten *.

Weniger charakteristisch ist der Zuckerteil selbst, obwohl die daraus stammenden Fragmente durch das Isotopenmuster des Si leicht erkennbar sind. Das bei Acetyldegradaten wichtige durch α -Spaltung entstandene Ion **i** (m/e 451) besitzt nur geringe Intensität, etwas ausgeprägter ist $[i\cdot (CH_3)_3SiOH]^+$ (m/e 361). Die für pertrimethylsilylierte Aldopyranosen charakteristischen Fragmente¹⁰ sind in Abb. 6 durch Z gekennzeichnet. Im unteren Massenbereich erscheinen die typischen Ionen¹¹ trimethylsilylierter Verbindungen bei m/e 73, 75 und 147.



7

Die Spektren wurden mit Hilfe des Gerätes 731 der Fa. Varian MAT (100 eV, Direkteinlaß) gemessen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir für die Zurverfügungstellung dieses Massenspektrometers bestens danken, dem Fonds der Chemie in gleicher Weise für finanzielle Unterstützung.

* Diese Ionen ($M\cdot 393$, 378, 349 und 307) werden z. Tl. auch bei anderen im Zuckerrest pertrimethylsilylierten Verbindungen beobachtet, z. B. bei Disacchariden ($M\cdot 349$ durch TMSO-Wanderung¹², Disaccharid-Alditolen¹³ ($M\cdot 349$ und $M\cdot 307$) und Cerebrsoiden¹⁴ ($M\cdot 393$, $M\cdot 349$).

¹ Siehe z. B. G. Odham u. E. Stenhammar, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, (Hrsg. G. R. Waller), S. 229, Wiley-Interscience, New York 1972.

² E. Heinz u. A. P. Tulloch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 493 [1969].

³ E. Heinz, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **231**, 537 [1971].

⁴ O. M. R. A. Heisig u. E. Heinz, Phytochemistry **11**, 815 [1972].

⁵ A. P. Tulloch, E. Heinz u. W. Fischer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **354**, 879 [1973].

⁶ K. Biemann, D. C. De Jongh u. K. H. Schnoes, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1763 [1963].

⁷ Siehe W. M. Lauer, A. J. Aasen, G. Graff u. R. T. Holman, Lipids **5**, 861 [1970]; A. J. Aasen, W. M. Lauer u. R. T. Holman, *ibid.* **5**, 869 [1970]; K. K. Sun u. R. T. Holman,

J. Amer. Oil Chemists' Soc. **45**, 810 [1968]; sowie in diesen Artikeln, in Ref. 1 und in C. Litchfield, Analysis of Triglycerides, S. 206, Academic Press, London 1972, zitierte Arbeiten.

⁸ Für eine Analyse sowohl im Zucker- als auch im Glycerinteil unterschiedlich acylierter Verbindungen s. C. Critchley u. E. Heinz, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam], im Druck.

⁹ W. Fischer, E. Heinz u. M. Zens, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **354**, 1115 [1973].

¹⁰ D. C. De Jongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson u. C. C. Sweely, J. Amer. chem. Soc. **91**, 1728 [1969].

¹¹ H. Budzikiewicz, C. Djerassi u. D. H. Williams, Mass Spectrometry of Organic Compounds, S. 471, Holden Day, San Francisco 1967.

¹² N. K. Kochetkov, O. S. Chizhov u. N. V. Molodtsov, Tetrahedron **24**, 5587 [1968].

¹³ J. Kärkkäinen, Carbohydrate Res. **11**, 247 [1969].

¹⁴ K. Samuelsson u. B. Samuelsson, Biochim. biophys. Res. Commun. **37**, 15 [1969].