

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse neutraler und saurer Oligosaccharide der Frauenmilch als Trimethylsilyläther *

Gas Chromatographic Mass Spectrometric Analysis of Neutral and Acid Oligosaccharides from Human Milk as Their Trimethylsilyl Derivatives

Hubertus von Nicolai, Heinz Egge und Fritz Zilliken

Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 30 c, 451—459 [1975] ; eingegangen am 17. Januar/14. April 1975)

Human Milk Oligosaccharides, Silylation, Gas Chromatography, Mass Spectrometry

Gas chromatography and the 20 eV mass spectra of the human milk oligosaccharides fucosido-galactose, fucosido-lactose, di-fucosido-lactose, 3'-N-acetylneuraminyllactose, 6'-N-acetylneuraminyllactose and of N-acetyllactosamine as pertrimethylsilyl (TMS) ethers are described.

The gas chromatographic separation of the L-fucose containing oligosaccharides was performed on Silicone SE 30. The sialic acid containing sugars were separated on DEXSIL 300.

The correlations between oligosaccharide structures and mass spectrometric fragmentation patterns are discussed.

Bei der Strukturanalyse komplexer Kohlenhydrate haben Gaschromatographie und Massenspektrometrie als Mikromethoden neben den klassischen Methoden der Permethylierung und des schrittweisen enzymatischen Abbaues zunehmend Eingang gefunden. Diese Entwicklung entspricht der Bedeutung von Fucose- und Sialinsäure-haltigen Strukturen als prosthetische Gruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden in Membranen, bei Virus- oder Tumor-Transformation von Zellen, Kontaktinhibition, Zell-Zell-Erkennung und bei Rezeptoren von Neurotransmittern.

Sweeley *et al.*^{1,2} und Karlsson^{3,4} berichteten ausführlich über die massenspektrometrische Analyse von Sialoglycosphingolipiden als Trimethylsilyläther oder als N-Äthyl-permethylläther. Die Massenspektren von Peracetyl-⁵, Permethyl-⁶⁻⁸, Pertrifluoracetyl-⁹ und Pertrimethylsilyl-Derivaten¹⁰⁻¹³ von Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden sind ebenfalls beschrieben. Auch die gaschromatographische Trennung derivatisierter Oligosaccharide und Glykoside bis zu den Pentasacchariden auf hochtemperaturbeständigen stationären Phasen ist wohl dokumentiert^{14,15}. Die bei der Derivatisierung der Oligosaccharide erhaltenen hohen Molekulargewichte stellen jedoch bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse gewisse

Probleme, da für den Massenscan nur ein Bruchteil der Peak-Elutionszeit zur Verfügung steht. In der vorliegenden Arbeit wurde an einigen isomeren und homologen Oligosacchariden in Form von Trimethylsilyl-Derivaten (TMS) untersucht, ob anhand der im Schnellscan erfassbaren Massen zwischen m/e 15—1000 und den GC-Retentionsindices unter Vernachlässigung der ohnehin wenig intensiven höheren Massenzahlen eine eindeutige Identifizierung möglich ist.

Material und Methoden

Isolierung der Oligosaccharide aus Frauenmilch

Entrahmte Frauenmilch wird bei 4 °C mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und nach 12-stündigem Stehen in der Kälte 1 Stunde bei 3000 × g abzentrifugiert.

Der klare gelbliche Überstand wird 3mal 12 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert und die vereinigten Dialysate am Rotationsverdampfer bei 30 °C auf ca. 1/10 des Ausgangsvolumens eingengt. Die konzentrierte Lösung wird portionsweise über eine Sephadex G 10-Säule (70 × 5 cm) entsalzt, wobei gleichzeitig die Hauptmenge der Lactose von den höheren Oligosacchariden abgetrennt wird. Die Oligosaccharid-Fraktion wird durch Anthron-²¹ und Ehrlich-Reagenz²² erkannt und anschließend lyophilisiert.

* Auszugsweise vorgetragen auf der Tagung für Biochemische Analytik, München 1974.

Sonderdruckanforderungen an Professor Dr. Heinz Egge, Institut für Physiologische Chemie der Universität D-5300 Bonn, Nußallee 11.



Die Trennung der neutralen, L-Fucose-enhaltenen Oligosaccharide von den sauren, N-Acetylneuraminsäure-haltigen erfolgt durch Ionenaustauscher-Chromatographie an einer DEAE-Sephadex A 25-Anionenaustauscher-Säule (50×8 cm). Zunächst werden die Fucoside mit 0.05 M Tris-Puffer pH 7,2, dann die Sialoside mittels eines linearen Natriumchlorid-Gradienten (0–0,5 M) im gleichen Puffer eluiert.

Während die neutralen Oligosaccharide nicht weiter aufgetrennt werden, verlassen die Sialoside die Säule in drei Fraktionen, wobei Fraktion I die Pentasaccharide a, b und c, Fraktion II die beiden isomeren 3'- und 6'-Neuraminyl-lactosen, und Fraktion III Di-N-acetylneuraminyl-lacto-N-tetraose enthält.¹⁶

Die weitere Auftrennung, Gewinnung und Identifizierung von Fucosido-lactose und Difuco-lactose sowie der beiden N-Acetyl-neuraminyl-lactosen erfolgt durch präparative Papierchromatographie an Whatman No. 3 in Pyridin/Äthylacetat/Eisessig/Wasser (5/5/1/3) unter Verwendung authentischer Vergleichssubstanzen (Dr. A. Gauhe, Heidelberg).

Die chromatographisch einheitlichen Oligosaccharide werden eluiert, über eine kleine Sephadex G 10-Säule von Laufmittelresten befreit und lyophilisiert.

Fucosido-galactose wird aus den höheren Fucosiden durch partielle alkalische Hydrolyse gewonnen¹⁷.

Silylierung

1–2 mg Oligosaccharid werden mehrere Stunden über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Dann werden 500 μ l trockenes Pyridin, 20 μ l Trimethylchlorsilan und 200 μ l N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) zugegeben und im Wasserbad bei 80 °C ca. 2 min erwärmt, bis alles gelöst ist.

Die klare gelbe Lösung wird in eine spitz zulaufende Ampulle überführt und im Rotationsverdampfer auf ca. 50 μ l eingengt. Die so konzentrierte Lösung enthält kaum noch Pyridin und kann direkt in den GC injiziert werden.

Gaschromatographie

Neben der Kombination Gaschromatographie–Massenspektrometer LKB 9000 wurde ein Perkin-Elmer 900 Gaschromatograph mit Doppel-FID verwendet. Die Trennung der isomeren 3'- und 6'-N-Acetylneuraminyl-lactosen erfolgte an einer Stahlsäule V4A ($2,0 \times 1/8$ in. I.D., kompensiert), belegt mit 3% DEXSIL 300 auf Chromosorb G HP 80/100. Säulentemperatur 320 °C. Injektor- und Detektor-Temperatur 400 °C. Trägergas Stickstoff (30 ml/min), Verstärker-Abschwächung 2×100 .

Die Fucoside wurden auf einer Stahlsäule V4A ($3,6 \text{ m} \times 1/3$ in. I.D. kompensiert) mit 5% Siliconöl SE 30 auf Chromosorb G-AWDCMS 60/80 chromatographiert. Säulentemperatur 300–340 °C, Injektor- und Detektor-Temperatur 400 °C. Trägergas Stickstoff (30 ml/min). Verstärker-Abschwächung 4×100 .

Massenspektrometrische Bedingungen

Separatortemperatur: 300 °C, Ionenquellentemperatur: 250–280 °C; Fallenstrom: 60 μ A; Ionisierungsspannung: 20 eV; Beschleunigungsspannung: 3,5 kV; Magnetscan bei Kopplung mit GC: 15–30 sec im Massenbereich von m/e 30–1000; bei Verwendung des DI-Einlaß-Systems 60–300 sec. Für die Analyse im Direkteinlaß-System wurden von den Silylierungsgemischen Mengen entsprechend 50–100 μ g Oligosaccharid in die Probenhalter pipettiert, über P_2O_5 /KOH bei langsamer Verminderung des Druckes auf 10^{-4} Torr und langsamer Steigerung der Temperatur auf 50 °C (nur bei Tri- und Tetrasacchariden) getrocknet.

Ergebnisse und Diskussion

Auch mit den modernen Mikromethoden der Gaschromatographie und Massenspektrometrie sieht sich der Analytiker bei komplexen Kohlenhydraten vor Probleme gestellt, die nur mit der Kombination beider Methoden befriedigend zu lösen sind. Wegen der zahlreichen Konfigurations-, Konformations- und Mutarotations-Isomeren und den vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten sind die Zucker mit einem der beiden Verfahren allein nicht immer eindeutig zu identifizieren. Mit der Gaschromatographie lassen sich zwar einzelne Zucker, ihre α - und β -Anomeren, sowie pyranoside und furanoside Strukturen von einander trennen, das Gaschromatogramm wird jedoch bei komplexen Gemischen sehr unübersichtlich und die Zuordnung der einzelnen Peaks schwierig.

Abb. 1 zeigt das Gaschromatogramm der TMS-Fucosido-galactose. Eine Aussage, welcher Peak das α -Anomere, das β -Anomere oder die Furanosid-Form darstellt, ist aufgrund der Retentionsdaten allein nicht möglich.

Wie noch gezeigt wird, liefert das Massenspektrum zwar Informationen über die Verknüpfung der Monosaccharid-Bausteine, es gestattet jedoch keine Unterscheidung stereoisomerer Verbindungen. Die Kombination beider Methoden ermöglicht es, jeden

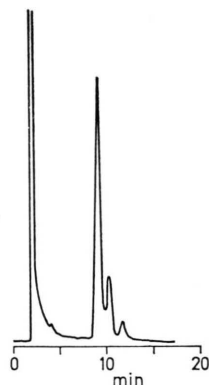


Abb. 1. Gaschromatogramm von TMS-Fucosido-galactose. Alle 3 Peaks zeigen im Massenspektrum den gleichen Molekülpeak M 838. Eine Zuordnung zur α,β -pyranosiden der furanosiden Form anhand der MS-Spektren wurden nicht getroffen. Säule: 3,6 m, V4A Stahl, 5% SE 30 auf Chromosorb G-AWDMCS, 60–80 mesh, 300 °C isotherm, Detektor: FID.

Tab. I. Retentionszeiten und Kovats-Indices der untersuchten TMS-Oligosaccharide.

Substanz	Säulen-temperatur [°C]	Reten-tionszeit Haupt-peak [min]	Kovats-Index	Stationäre Phase
Fucosido-galactose	300	9	2640 2710 2745	SE 30
Fucosido-lactose	320	22	3565	
Difucosido-lactose	340	33	4255	
N-Acetyl-lactosamin	300	10	2780 2950	
6'-N-Acetyl-neuraminyl-lactose	320	11	3675	Desil 300
3'-N-Acetyl-neuraminyl-lactose	320	15	3830	

einzelnen Peak massenspektrometrisch optimal zu erfassen, wobei Fehlinterpretationen, etwa bei gleichzeitiger Anwesenheit pyranosider und furanosider Formen in der Probe vermieden werden. Die der Massenspektrometrie vorgeschaltete Gaschromatographie bietet zudem den Vorteil, daß Lösungsmittelreste und Derivatisierungsreagentien die Analyse nicht beeinflussen können, weil sie im Vergleich zu den Zuckern sehr viel kürzere Retentionszeiten haben.

Wie die Kovats-Indices zeigen, liegen die Grenzen für die Gaschromatographie von höheren Oligo-

sacchariden in den langen Retentionszeiten bzw. in den erforderlichen hohen Säulentemperaturen. Dabei treten vor allem bei den N-Acetylneuraminsäure-Verbindungen nach längerem Verweilen auf der Säule Zersetzungserscheinungen auf, so daß man gezwungen ist, die Säulentemperatur bzw. den Trägergasdruck auf Kosten der Trennleistung zu erhöhen. Eine vollständige Trennung der beiden isomeren N-Acetylneuraminyl-lactosen konnte nicht erreicht werden (Abb. 2).

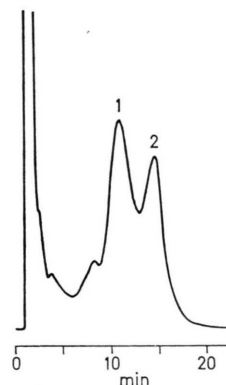


Abb. 2. Gaschromatogramm von TMS-N-Acetylneuraminyl-lactosen. Säule: 2 m, V4A Stahl, 3% DEXSIL 300 auf Chromosorb G-HP, 80–100 mesh, 320 °C isotherm, Detektor: FID. 1 N-Acetylneuraminyl-(α , 2 \rightarrow 3)-lactose; 2 N-Acetylneuraminyl (α , 2 \rightarrow 6)-lactose.

Die Brauchbarkeit der Gaschromatographie zur Auftrennung von derivatisierten Oligosacchariden dürfte damit bei den Pentaosen oder Hexaosen ihre Grenze finden.

Die Massenspektren persilylierter Oligosaccharide zeigen eine Reihe von Fragmentgruppen (10, 12), von denen im wesentlichen vier für die Interpretation und Analyse der Struktur entscheidend sind. Dies soll am Beispiel der Fucosido-galactose gezeigt werden (Abb. 3).

1. Durch Abspaltung einer CH_3 -Gruppe werden $M-15 = m/e$ 815 und durch nachfolgende Abspaltung von Trimethylsilanol (90 Daltons) die Massen m/e 725 und m/e 635 erhalten.

2. Die Spaltung an der glykosidischen Bindung unter Eliminierung des Sauerstoffs liefert m/e 451 für den Hexosylrest und m/e 363 für den Fucosylrest. Die entsprechenden Fragmente nach Verlust von Trimethylsilanol werden durch m/e 361 bzw. 273 angezeigt.

3. Die dritte Serie von Fragmenten entsteht durch die Fragmentierung eines endständigen Ringsystems

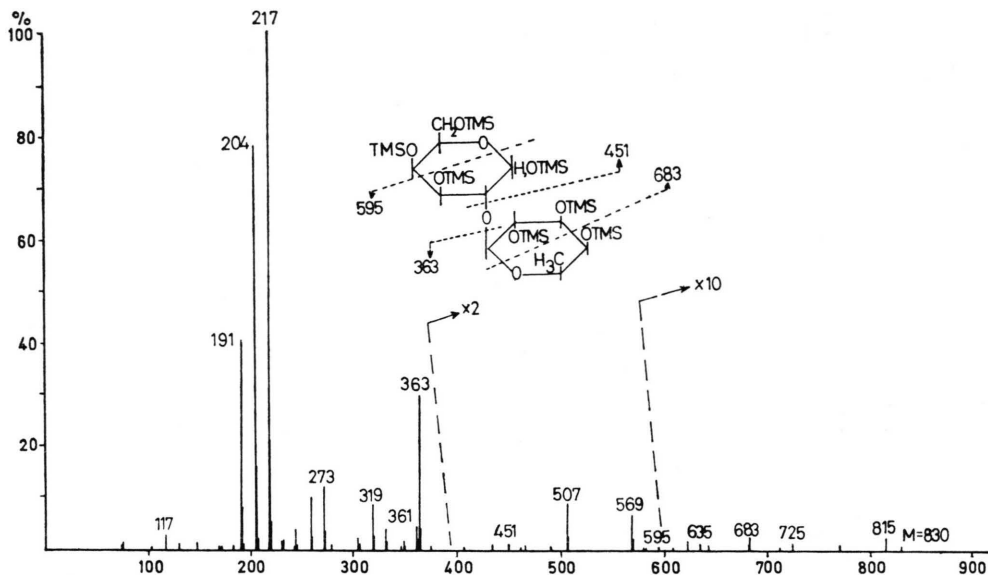


Abb. 3. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- α -L-fucopyranosyl-(1-2)-D-galaktose, TMS-2'-Fucosido-galaktose.

unter Erhaltung des oder der anderen Ringsysteme und der glykosidischen Bildung. Im Beispiel der Fucosido-galactose führt die Spaltung des Pyranose-ringes der Fucose unter Verlust von C₂ bis C₆ zu m/e 569, bei gleichzeitiger Umlagerung ähnlich wie bei Dihexosiden.

Verlust von C₄ bis C₆ liefert in der in Abb. 3 angedeuteten Weise m/e 683.

Bei der TMS-Fucosido-lactose ist $M^+ = 1208$ im Schnellscan nicht erfaßt worden. Als von M^+ abgeleitetes Ion ist m/e 1103 zu betrachten, das durch Abspaltung von Trimethylsilanol (HOTMS) und einer CH₃-Gruppe entsteht ($M-105$).

2. Spaltung der glykosidischen Bindungen führt bei diesem Trisaccharid, das aus drei verschiedenen Bausteinen besteht, zu zwei Disaccharidbruchstück-

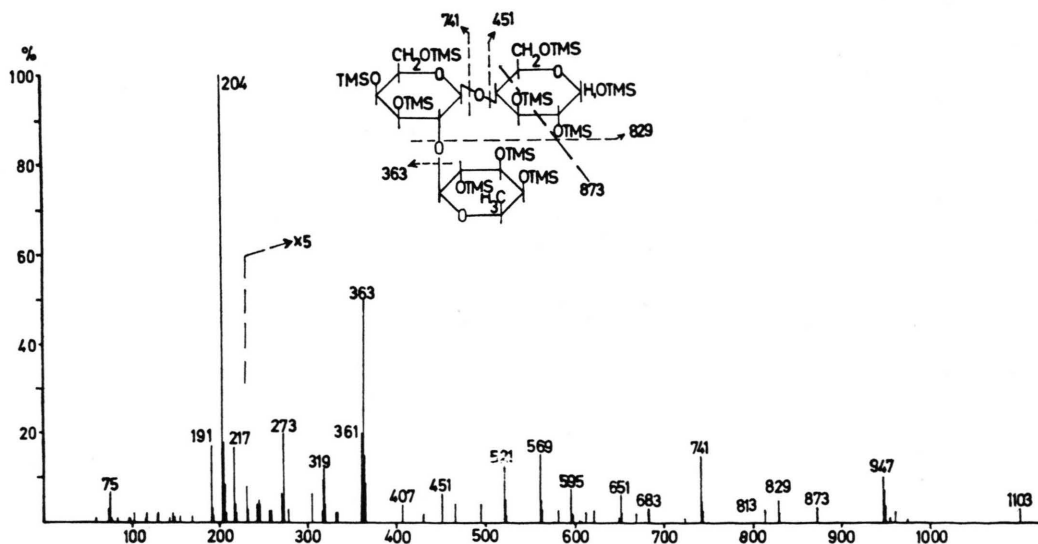


Abb. 4. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- α -L-fucopyranosyl-(1-2)-O- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glucose, TMS-2'-Fucosido-lactose.

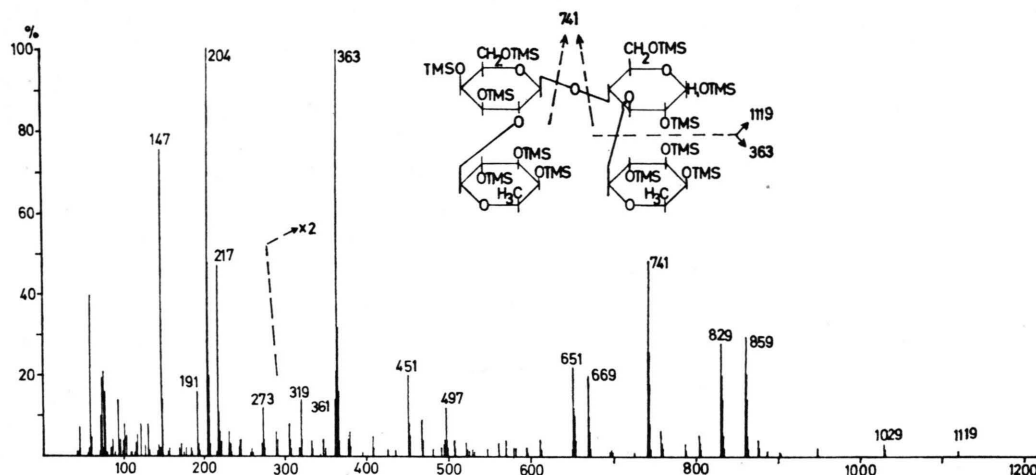


Abb. 5. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[O- α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-D-glucose, TMS-3,2'-difucosido-lactose.

ken: m/e 829 für den Dihexosid-Anteil und m/e 741 für den Fucosylhexosid-Anteil; m/e 813 = 829 - CH₃, m/e 651 = 741 - HOTMS. Fucose und Glucose werden durch m/e 451 und m/e 363 bzw. die Folgeprodukte m/e 361 und m/e 273 repräsentiert.

Die Spaltung der nichtreduzierenden Fucose liefert m/e 947, das dem Ion Persilyl-lactosyl-O⁺ = CH - OTMS (Lac-O⁺ = CH - OTMS) entspricht. Damit erscheint die Verknüpfung der Fucose mit der Galactose gesichert.

Die Abwesenheit von m/e 583 schließt eine (1 \rightarrow 6)-Verknüpfung der beiden Hexosen aus. Die Entscheidung über eine (1 \rightarrow 2)-, (1 \rightarrow 3)- oder (1 \rightarrow 4)-Bindung kann schon anhand der Relation m/e 204/ m/e 217 zugunsten der (1 \rightarrow 4)-Bindung getroffen werden. Eine Entscheidung über andere Intensitätsquotienten scheint bei dem jetzigen Stand der Kenntnisse noch verfrüht (Abb. 4 und 5).

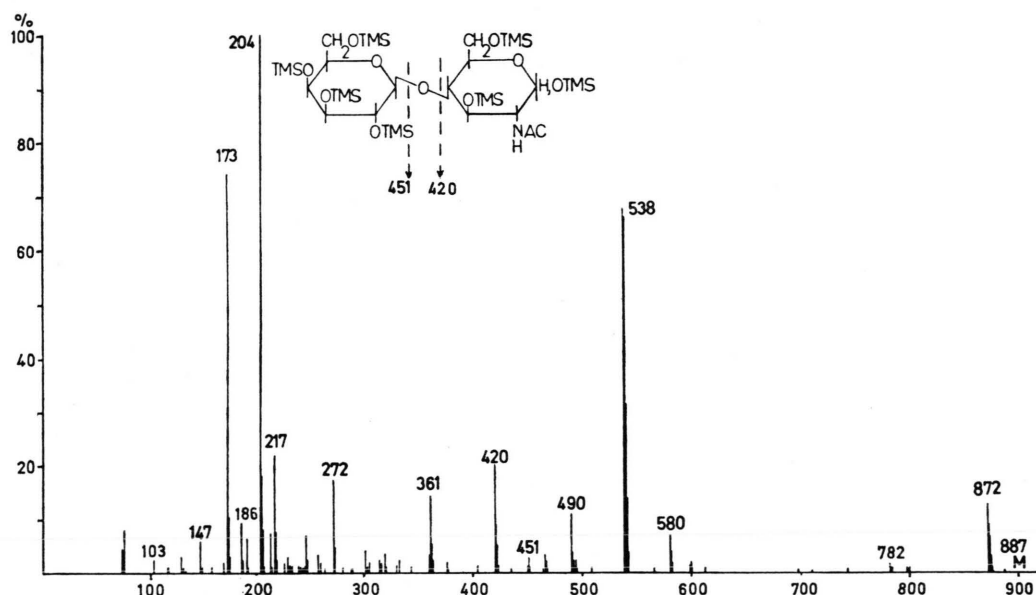


Abb. 6. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-N-acetylglucosamin, TMS-lactosamin.

Das Massenspektrum der TMS-Difucosido-lactose zeigt gewisse Analogien zu dem der TMS-Fucosido-lactose, jedoch mit einigen wesentlichen Unterschieden.

Der quasi symmetrische Aufbau des Moleküls führt zu einer bevorzugten Spaltung an der mittleren glykosidischen Bindung mit dem sehr intensiven Ion m/e 741. Die Abspaltung eines Fucosylrestes ergibt m/e 1119 und 1029 (–HOTMS). Von den im höheren Massenbereich auftretenden Fragmenten, die im Schnellscan nicht mehr zu erfassen sind, ist m/e 1263 zu nennen, entsprechend m/e 973 bei der Fucosido-lactose oder m/e 683 bei Dihexosiden.

Die Substitution der reduzierenden Glucose zeigt sich am Fehlen von m/e 569, wofür das um 290 Masseneinheiten größere m/e 859, Fuc-Glc-O⁺ = CH–OTMS, auftritt. Die Höhe der Spitze bei m/e 829 spricht gegen die Anwesenheit eines Dihexosylrestes, da dieses Fragment bei allen von uns untersuchten Trisacchariden nur ca. 1% vom Basispeak betrug. Wahrscheinlicher ist eine Anlagerung von TMS (73 Masseneinheiten) an einen TMS-Fucosylhexosyl-Rest, analog zu den bei Poly-OTMS-Fettsäurederivaten beobachteten Umlagerungsprodukten. Das bei der weiteren Fragmentierung von m/e 741 zu erwartende Bruchstück m/e 741 – 363 = m/e 378 kann in gleicher Weise m/e 451 liefern.

Die Massenspektren von N-Acetylhexosamin-haltigen Disacchariden sowie deren gaschromatographische Trennung in Form ihrer TMS-Alditol-Derivate ist beschrieben worden^{18, 19}. Im MS-Spektrum des

TMS-Acetylactosamins ist neben dem Molekülion $M^+ = 887$ $M-15 = 872$ besonders häufig, ebenso wie die Fragmente $M-90$ und $M-15-90$. Typisch für die Spektren von TMS-Disacchariden, bei denen der Aminozucker am reduzierenden Ende steht, ist die hohe Spitze bei m/e 538, die dem Fragment TMSO – CH = O⁺ – GlcNAc entspricht¹⁸. Die Spaltung an der glykosidischen Bindung führt zu m/e 451 bzw. m/e 420.

Die Intensität der Spitze bei m/e 173 zeigt an, daß die Position 3 des Aminozuckers nicht durch die Hexose substituiert ist. Wie von Kamerling *et al.*¹⁸ gezeigt wurde, tritt das bei Aldosyl-dihexosiden mit (1 → 6)-Verknüpfung typische Fragment m/e 583 bei Aldosyl-N-acetyl-hexosaminyl-disacchariden nicht auf.

Somit kann die Entscheidung über eine (1 → 4)- oder eine (1 → 6)-Bindung nur aus der Relation der Intensitäten von m/e 538 – vom reduzierenden Ende herstammend – und m/e 539 – vom nicht reduzierenden Ende herstammend – getroffen werden²⁰.

Die Fragmente m/e 580, m/e 490 und m/e 414 sind bisher noch nicht in MS-Spektren von TMS-N-Acetylhexosamin-haltigen Disacchariden beschrieben worden. Da sich der Quotient der Intensitäten von m/e 538 und m/e 580 über das Peak-Elutionsprofil hinweg gemessen nicht veränderte, könnten diese Fragmente höchstens von einer Beimengung gleicher Retention herrühren.

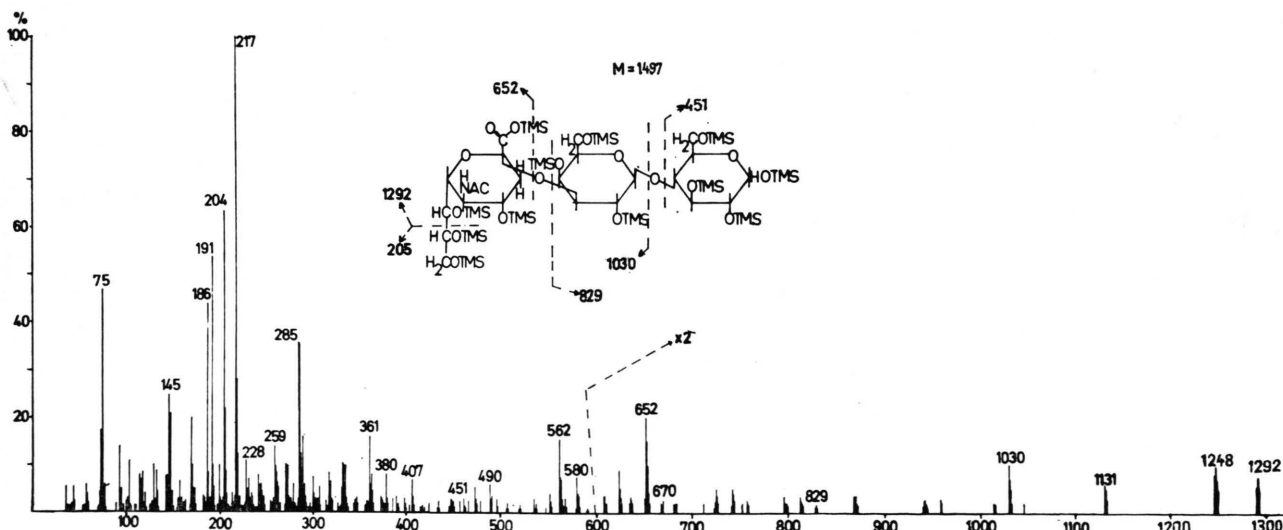


Abb. 7. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- α -N-acetylneuraminyl-(2–3)-O- β -D-galaktopyranosyl-(1–4)-D-glucose, TMS-3'-N-Acetylneuraminyl-lactose.

Tab. II. Partielle Massenspektren der TMS-Oligosaccharide. Isotopenpeaks wurden nicht aufgelistet.

<i>m/e</i> M=	Relative Intensität						Fragmente
	I 830	II 1208	III 1498	IV 887	V 1497	VI 1487	
1292					4	3	1497–205
1263			0,2				1498–235 TMSO–CH=C(OTMS)–CH= ⁺ O=R
1249					5	3	
1175						1	
1131					3	1	
1119			1				1498–TMS-fucosyl
1103		1					1208–CH ₃ –TMSOH
1092			3				
1030					5	2	1497–TMS-hexosyl-16
973		0,1					TMSO–CH=C(OTMS)CH= ⁺ O-Glc-Fuc
947		3	1				
941					1		
887				M 0,5			TMS-Lactosamin
873		1					1208–335
869					2		
859			15				TMS-Fuc-Glc– ⁺ O=CH–OTMS
830	M 0,03						
829		1	14		1	2	TMS-Dihexosyl ⁺ –
803			3				
798				1	3	1	
797				1 M-90	1	1	
784						2	TMS-N-acetylneuraminyl–O–CH ₂ – ⁺ OTMS
782				2			887–15–90
742					3	1	
741		3	24				TMS-Fuc-Gl ⁺
683	0,2	1			1	4	TMS–CH=C(OTMS)–CH=O ⁺ –Glc
669		0,5	10				
653					8	7	
652				2	10	5	TMS-N-acetylneuraminyl ⁺ – (V und VI)
651		1	11				
636					2	2	
624					4	4	
611			2				
595		2			1	1	
569	4	3	2		3	2	TMSO–CH=O ⁺ –Gl
562					16	22	652–90
552					4	2	
539				66			Ref. 20
538				67			
536					3	1	653–117 (O=C–OTMS) ⁺
521		3			2	6	
508				1	2	1	
497			6		3	1	
490					6	2	
474					6	4	
467	1	1	5	3	2	1	TMS-Gl-O ⁺
451	1	2	10	3	3	3	TMS-Gl ⁺
446					2	2	
435	0,5	0,5	1	1	2	2	540–15–90
420				20			TMS-Glc-NAc ⁺
407	0,5	1	3		7	1	
399					3	2	
379			3		3	8	
373					4	4	
363	30	10	50				TMS-Fuc ⁺
361	3	4	7	15	14	16	451–90
347	0,5		2		3	2	
332	4	1	2	3	10	4	
319	9	3	7	4	6	4	
305	2	1	4	2	3	3	
300					7	5	
289			3	1	16	5	

m/e M=	I	II	III	IV	V	VI	Fragmente
	830	1208	1498	887	1497	1487	
286					36	22	
273	12	4	12	5	10	3	363–90
272		1	3	18	10	5	
259	10	1	2	1	14	4	
245	4	1	4				
231	2	2	6	2	7	2	
217	100	17	47	22	100	53	TMSO–CH=CH–C ⁺ H–OTMS
205					22	24	TMSO–CH ₂ –C ⁺ H–OTMS
204	78	100	100	100	64	100	TMSO–CH=CH–OTMS ⁺
191	47	17	16		54	49	TMSO–CH=OTMS ⁺
186				10	44	10	TMS–CH=CH–C ⁺ H–NH–Ac
173				74	5	1	TMSO–CH=CH–NH–Ac ⁺

I, TMS-Fuc-Gal; II, TMS-Fuc-lactose; III, TMS-Difuc-lactose; IV, TMS-NAc-lactosamin; V, TMS-3'-N-Acetylneuraminyl-lactose; VI, TMS-6'-N-Acetylneuraminyl-lactose; Gl, Glykose-Einheit.

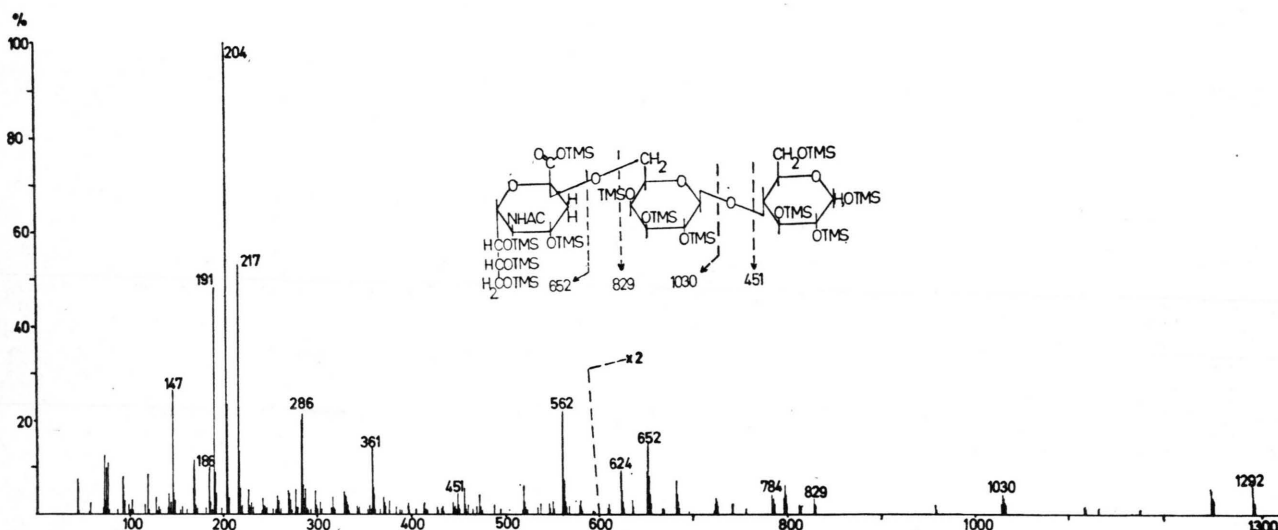


Abb. 8. 20 eV Massenspektrum der Pertrimethylsilyl-O- α -N-acetylneuraminyl-(2→6)-O- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-D-glucose, TMS-6'-N-Acetylneuraminyl-lactose.

Da bei N-Acetylhaltigen Oligosacchariden abhängig von der Methode der Silylierung bis zu 10% N-Acetyl-N-Silyl-Verbindung erhalten werden, erkennbar an $M+72$ usw., kann die Herkunft dieser Fragmente von solchen am Stickstoff doppelt substituierten Derivaten nicht ausgeschlossen werden. Die 70 eV-Massenspektren der persilylierten Methylester von 3'- und 6'-N-Acetylneuraminyl-lactose sind vor kurzem beschrieben worden¹⁰. Wie die Abb. 7, 8 und die Tab. II zeigen, unterscheiden sich die 20 eV-Spektren der Persilylverbindungen wesentlich nur in zwei Punkten. Alle Fragmente, in denen die Carboxylgruppe der Sialinsäure enthalten ist, liegen um 58 Masseneinheiten höher als beim Methylester. Die relative Intensität der höheren Massen ist bei den 20 eV-Spektren größer als bei den

70 eV-Spektren. Schlüsselion für die (2→6)-Verknüpfung der Sialinsäure in der 6'-N-Acetylneuraminyl-lactose ist m/e 784, das dem Fragment Sialyl–O–CH₂–CH=OTMS entspricht. Ebenfalls von diagnostischem Wert sind die Spitzen bei m/e 186; m/e 205 für C₈–C₉ der Sialinsäure und die Relation m/e 204 zu m/e 217.

Neben dem Isotopenpeak von m/e 652 tritt bei der 6'-Verbindung noch ein Fragment m/e 653 mit höherer Intensität auf. Während bei dem TMS-Methylester dieser Verbindung die analoge m/e 595 als TMSO–CH=CH–CH⁺–O–Glc gedeutet wurde, kann hier dieser Schluß nicht gezogen werden. Die relative Intensität von m/e 595 ist bei beiden der TMS-Verbindungen $\leq 1\%$.

Wir danken Frau Dr. A. Gauhe und Frau Dr. C. S. Rose herzlich für die Vergleichssubstanzen. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- ¹ C. C. Sweeley u. G. Dawson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 6 [1969].
- ² G. Dawson u. C. C. Sweeley, *J. Lipid. Res.* **12**, 56 [1971].
- ³ K. A. Karlsson, *FEBS Letters* **32**, 317 [1973].
- ³ K. A. Karlsson, *Biochemistry* **13**, 3643 [1974].
- ⁵ H. Björndal, C. G. Hellerquist, B. Lindberg u. S. Svensson, *Angew. Chem.* **82**, 643 [1970].
- ⁶ K. Biemann, D. C. de Jongh u. H. K. Schnoes, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 1763 [1963].
- ⁷ N. V. Kochetkov u. O. S. Chizhov, *Advan. Carbohydrate Chem.* **21**, 39 [1966].
- ⁸ K. Heyns, H. F. Grützner, H. Scharmann u. D. Müller, *Fortschr. Chem. Forsch.* **5**, 448 [1966].
- ⁹ W. A. König, H. Bauer, W. Voelter u. E. Bayer, *Chem. Ber.* **106**, 1905 [1973].
- ¹⁰ N. K. Kochetkov, O. S. Chizhov u. N. V. Mododtsov, *Tetrahedron* **24**, 5587 [1968].
- ¹¹ D. C. de Jongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hanessian, M. Bieber, G. Dawson u. C. C. Sweeley, *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 1728 [1969].
- ¹² D. P. Kamerling, J. F. O. Vliegenhart u. J. Vink, *Carbohydr. Res.* **33**, 297 [1974].
- ¹³ H. Egge, H. v. Nicolai u. F. Zilliken, *FEBS-Letters* **39**, 341 [1974].
- ¹⁴ T. Bhatti, R. E. Chambers u. J. R. Clamp, *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 339 [1970].
- ¹⁵ M. Ohashi u. T. Yamakawa, *J. Lipid. Res.* **14**, 698 [1973].
- ¹⁶ H. Wiegandt u. H. Egge, *Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe* **28**, 404 [1970].
- ¹⁷ R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Gauhe, *Liebigs Ann. Chem.* **611**, 242 [1958].
- ¹⁸ J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenhart, J. Vink u. J. J. de Ridder, *Tetrahedron* **27**, 4749 [1971].
- ¹⁹ J. Kärkäinen, *Carbohydr. Res.* **11**, 247 [1969].
- ²⁰ J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenhart, J. Vink u. J. J. de Ridder, *Tetrahedron* **27**, 4275 [1971].
- ²¹ R. Shields u. W. Burnett, *Arch. Chem.* **32**, 885 [1960].
- ²² I. Werner u. L. Odin, *Acta Soc. Med. Ups.* **57**, 230 [1952].