

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

82. JAHRGANG 1970

HEFT 16

SEITE 643—674

Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden

Von Håkan Björndal, Carl Gustav Hellerqvist, Bengt Lindberg und Sigfrid Svensson^[*]

Neue Methylierungsmethoden und die kombinierte Anwendung von Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie zur Analyse der Gemische methylierter Zucker gestatten es, die Methylierungsanalyse von Polysacchariden genauer, schneller und mit weniger Material als bisher durchzuführen.

1. Einleitung

Die Methylierungsanalyse ist eine wichtige Methode zur Strukturuntersuchung von Polysacchariden. Die Methode umfaßt erschöpfende Methylierung des Polysaccharids, Hydrolyse zu einer Mischung methylierter Monosaccharide sowie Trennung, Identifizierung und quantitative Bestimmung dieser Komponenten. Die Lage der glykosidischen Bindungen im Polysaccharid gibt sich im methylierten Monosaccharid durch eine freie Hydroxygruppe zu erkennen. Dieses Vorgehen informiert aber nicht über die gegenseitige Anordnung der Zuckerreste und zeigt auch nicht ihre anomere Natur.

Die völlige Strukturaufklärung eines Polysaccharids erfordert ergänzende Untersuchungen, von denen die folgenden am wichtigsten sind: die partielle Hydrolyse – durch Säuren oder Enzyme – mit anschließender Isolierung und Identifizierung der entstandenen Oligosaccharide sowie die Perjodatoxidation mit ihren Varianten. Im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden zur Strukturaufklärung von Polysacchariden liefert die Methylierungsanalyse quantitative Aussagen^[1].

2. Methylierung von Polysacchariden

2.1. Methylierung nach Haworth und nach Purdie

Durch die Methylierung sollen alle freien Hydroxygruppen im Polysaccharid veräthert werden. Nach der

ursprünglichen Arbeitsweise von Denham und Woodhouse^[2] sowie von Haworth^[3] wurde dies durch mehrere Behandlungen mit Dimethylsulfat und Natriumhydroxid erreicht. Dabei entstand aber oft nur ein partiell methyliertes Produkt, das zur vollständigen Methylierung mehrmals mit Silberoxid in siedendem Methyljodid nach Purdie und Irvine^[4] umgesetzt werden mußte.

Purdies Technik wurde von Kuhn et al.^[5] wesentlich verbessert. Diese Autoren führten die Reaktion im polaren Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid durch. Polysaccharide, die darin löslich sind oder quellen, können direkt methyliert werden. Silberoxid bewirkt jedoch eine oxidative Zersetzung freier oder partiell methylierter Polysaccharide; es werden deshalb Varianten mit Bariumhydroxid^[6] oder Natriumhydroxid^[7] bevorzugt. Mit diesen Basen kann man in Dimethylsulfoxid arbeiten, das ein besseres Lösungsmittel für Polysaccharide ist.

2.2. Methylierung nach Hakomori

Am einfachsten und bequemsten lassen sich Polysaccharide und andere Kohlenhydrate vermutlich nach Hakomori^[8] methylieren. Das Polysaccharid wird mit der starken Base Methylsulfinylmethylnatrium in Dimethylsulfoxid behandelt. Dabei werden

[2] W. S. Denham u. H. Woodhouse, J. chem. Soc. (London) 103, 1735 (1913).

[3] W. N. Haworth, J. chem. Soc. (London) 107, 8 (1915).

[4] T. Purdie u. J. C. Irvine, J. chem. Soc. (London) 83, 1021 (1903).

[5] R. Kuhn, H. Trischmann u. I. Löw, Angew. Chem. 67, 32 (1955).

[6] R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Seeliger, Liebigs Ann. Chem. 611, 236 (1958).

[7] H. C. Srivastava, P. P. Singh, S. N. Harshe u. K. Virk, Tetrahedron Letters 1964, 493.

[8] S. Hakomori, J. Biochemistry (Tokyo) 55, 205 (1964).

[*] Dr. H. Björndal, Dr. C. G. Hellerqvist, Prof. B. Lindberg und Dr. S. Svensson
Kungl. Universitetet i Stockholm
Institutionen för organisk kemi
Stockholm Va, Sandåsgatan 2 (Schweden)
[1] H. O. Bouveng u. B. Lindberg, Advances Carbohydrate Chem. 15, 53 (1960).

die Hydroxygruppen ionisiert; die entstandenen Polyalkoxidionen setzen sich schnell mit Methyljodid um. Eine vollständige Methylierung kann in einem Schritt erreicht werden; die Isolierung des methylierten Polysaccharids ist einfach, und die Methode eignet sich für den Mikro- und den Makro-Maßstab.

Die Base wird durch Zusatz von Natriumhydrid zu Dimethylsulfoxid bereitet^[9]. Lösungen von Methylsulfinylmethylnatrium können auf Vorrat hergestellt werden — im gefrorenen Zustand sind sie mehrere Wochen haltbar — oder das Natriumhydrid kann direkt zu einer Lösung des Polysaccharids in Dimethylsulfoxid gegeben werden^[10]. In beiden Fällen erleichtert eine Ultraschall-Behandlung die Reaktion zwischen Natriumhydrid und Lösungsmittel^[11]. Die Ultraschall-Behandlung fördert auch die Auflösung des Polysaccharids und scheint auch die anschließende Reaktion mit Methyljodid günstig zu beeinflussen. Die Lösung des Methylsulfinylmethylnatriums muß unter Luftausschluß gehandhabt werden. Nach der Methylierung wird die Reaktionsmischung in Wasser gegossen und das vollständig methylierte Polysaccharid durch Dialyse oder Extraktion isoliert. Polysaccharide, die sich nicht in Dimethylsulfoxid lösen oder darin quellen, lassen sich auf diese Weise nicht methylieren. Sie können z. B. zunächst nach *Haworth*^[3] partiell methyliert werden; anschließend wird die Methylierung nach *Hakomori* komplettiert.

Die Ionisierung der Hydroxygruppen des Polysaccharids ist eine verhältnismäßig langsame Reaktion^[8]. Man läßt deshalb das Polysaccharid mehrere Stunden mit der Base stehen, ehe das Methyljodid zugefügt wird. Die Alkoxidionen und das Methyljodid reagieren vermutlich viel schneller miteinander. Ein Teil des Methyljodids wird auch von der Base verbraucht.

Price und *Whiting*^[12] untersuchten die Reaktion von Glycerin mit Methylsulfinylmethylnatrium und fanden, daß nur 1.5 Äquivalente der Base verbraucht werden. Da bekanntlich Kohlenhydrate mit mehreren benachbarten Hydroxygruppen nach *Hakomori* vollständig methyliert werden, tritt vermutlich auch während der Methylierung eine Ionisierung ein, d. h. nachdem Methyljodid zugesetzt wurde.

Ob die Methylierung vollständig war, ist schwierig zu erkennen. Methylierte Polysaccharide sind hygrokopisch; die letzten Reste von Dimethylsulfoxid oder anderen Lösungsmitteln lassen sich nur schwer entfernen. Bei Methoxylanalysen erhält man deshalb oft zu niedrige Werte. Diese Analysen sind ungeeignet, wenn nur einige Milligramm Polysaccharid zur Verfügung standen. Das Fehlen der OH-Absorption zwischen 3400 und 3600 cm⁻¹ ist ein besseres Kriterium; allerdings können Spuren Wasser das Resultat verfälschen.

An sich ist es nicht nötig, den Methylierungsgrad zu bestimmen, da sich eine Untermethylierung bemerkbar macht, wenn die Anteile der methylierten Monosaccharide bestimmt werden. Dabei sollte sich ein vernünftiges Verhältnis von Endgruppen und Verzweigungsstellen ergeben. Selbst die spurenhaften Anwesenheit von Zuckern mit mehr als zwei unmethylierten Hydroxygruppen deutet auf schwere Untermethylierung hin.

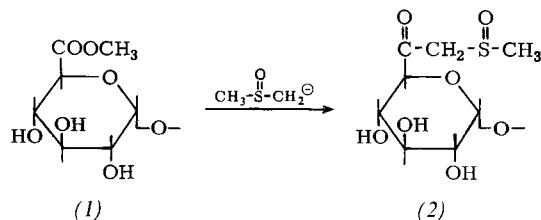
[9] E. J. Corey u. M. Chaykovsky, J. Amer. chem. Soc. 84, 866 (1962).

[10] D. M. W. Anderson u. G. M. Cree, Carbohydrate Res. 2, 162 (1966).

[11] K. Sjöberg, Tetrahedron Letters 1966, 6383.

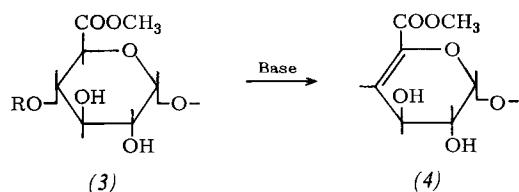
[12] G. G. Price u. M. C. Whiting, Chem. and Ind. 1963, 775.

zung. Eine vollständige Übereinstimmung und quantitative Gewinnung der methylierten Zucker gelingt selten, da sich eine gewisse Entmethylierung während der Hydrolyse und Verluste an flüchtigeren methylierten Zuckern während des Einengens nicht vermeiden lassen.



Die Anwesenheit von Uronsäuregruppen in Polysacchariden kann während der Methylierung zu Komplikationen führen. Ein veresterter Uronsäurerest (1) ist in der Lage, mit dem Methylsulfinylmethylanion ein Methylsulfinylmethyl-keton (2) zu bilden, eine präparativ interessante Reaktion^[13].

Ein veresterter Uronsäurerest (3) kann in diesem stark basischen Medium auch durch β -Eliminierung in einen ungesättigten Rest (4) übergehen. Diese Reaktion überwiegt besonders dann, wenn der ursprüngliche Uronsäurerest (3) an C-4 substituiert war.



Wenn Methyljodid einem Polysaccharid-alkoxidion zugesetzt wird, das Uronsäuregruppen enthält, verlaufen Verätherung und Veresterung sowie die Reaktion der überschüssigen Base mit dem Methyljodid vermutlich schnell; der entstandene Ester ist demnach der starken Base nur kurze Zeit ausgesetzt. Wenn dagegen die Carboxygruppen verestert sind (entweder von Natur aus oder durch vorausgehende Methylierung), stehen diese Uronsäureestergruppen mehrere Stunden in Kontakt mit der starken Base, und die obengenannten Nebenreaktionen können ins Gewicht fallen. Wie *Anderson* et al.^[14] an Polysacchariden mit sauren Gruppen fanden, werden diese erwarteten Nebenreaktionen (β -Eliminierung) nur dann bedeutsam, wenn die Uronsäurereste an C-4 substituiert sind. Warum die Estergruppen nicht stärker mit dem Methylsulfinylmethylanion reagieren, etwa zu Ketonen wie (2), ist nicht genau bekannt. Möglicherweise enthielt die Lösung soviel Natriumhydroxid, daß die Estergruppen verseift waren, ehe sich (2) bilden konnte.

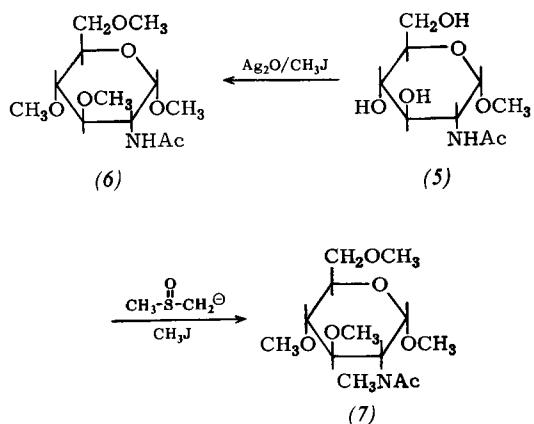
Trotz der Tatsache, daß Polysaccharide mit sauren Gruppen nach *Hakomori* erfolgreich methyliert werden konnten, ist es ratsam, ein untermethyliertes Polysaccharid nicht nochmals zu methylieren, sondern von vorn zu beginnen und zu ver-

[13] E. J. Corey u. M. Chaykovsky, J. Amer. chem. Soc. 87, 1345 (1965).

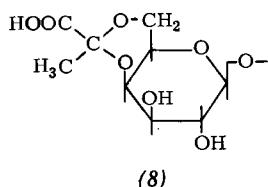
[14] D. M. W. Anderson, I. C. M. Dea, P. A. Maggs u. A. C. Munro, Carbohydrate Res. 5, 489 (1967).

suchen, in einem Schritt eine vollständige Methylierung zu erreichen. Wenn dies nicht gelingt, scheint es sicherer zu sein, die Remethylierung nach anderen Methoden zu versuchen, z.B. nach *Kuhn* et al. [15] mit Methyljodid/Silberoxid.

Die meisten *O*-Acetylgruppen in einem acetylierten Polysaccharid bleiben bei der Methylierung nach *Kuhn* erhalten [15], aber es tritt eine Acetylverschiebung auf. Bei der Methylierung nach *Hakomori* werden die *O*-Acetylgruppen quantitativ durch *O*-Methylgruppen ersetzt. Andere *O*-Acylgruppen dürften ebenso reagieren. Einige Polysaccharide enthalten Sulfat- oder Phosphatestergruppen. Wie derartige Polysaccharide oder Modellsubstanzen dafür sich bei der Methylierung nach *Hakomori* verhalten, ist nicht bekannt. Aminodesoxyzucker – im allgemeinen *N*-acetyliert – kommen häufig in Polysacchariden vor. Wenn Polysaccharide oder andere Kohlenhydrate mit derartigen Gruppen, z.B. Methyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (5), nach *Haworth* oder *Kuhn* methyliert werden, bleibt die Acetamidogruppe wie in (6) erhalten [16]. Bei der Methylierung von (5) nach *Hakomori* entstand das vollständig methyierte *N*-Methylacetamidoderivat (7) [17]. Dieser Unterschied, der möglicherweise allgemeingültig ist, spiegelt die viel stärker basischen Bedingungen wider, unter denen die Methylierung nach *Hakomori* vor sich geht.



Einige Polysaccharide enthalten ketalartig gebundene Brenztraubensäure [z.B. (8)] [18]. Die Acetalisierung der Polysaccharide wurde zur Lokalisierung von Estergruppen verwendet [19]. Wie erwartet sind Ketals- und Acetalgruppen unter den Bedingungen der Methylierung nach *Hakomori* stabil.



[15] H. O. Bouveng, P. J. Garegg u. B. Lindberg, Chem. and Ind. 1958, 1727.

[16] R. W. Jeanloz, Advances Carbohydrate Chem. 13, 189 (1958).

[17] C. G. Hellerqvist, O. Larm u. B. Lindberg, unveröffentlicht.

[18] P. A. J. Gorin, T. Ishikawa, J. F. T. Spencer u. J. H. Sloanecker, Cand. J. Chem. 45, 2005 (1967).

[19] A. N. de Belder u. B. Norrman, Carbohydrate Res. 8, 1 (1968).

3. Hydrolyse vollständig methylierter Polysaccharide

Vollständig methylierte Polysaccharide lösen sich oft nicht in heißen, wässrigen Lösungen. Deshalb werden Methanolysen (mit siedender methanolischer Salzsäure), Formolyse (mit 90-proz. Ameisensäure bei 100 °C) oder Behandlung mit 72-proz. Schwefelsäure (bei Raumtemperatur) gewöhnlich vor der Hydrolyse mit heißer, verdünnter Säure durchgeführt. Auf diese Weise werden Zersetzung und Entmethylierung so gering wie möglich gehalten. Die Behandlung mit Salzsäure, in Wasser oder Methanol, verursacht stärkere Entmethylierung als die Formolyse oder die Behandlung mit 72-proz. Schwefelsäure und anschließende Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure [20].

Einige methylierte Zucker, z.B. eine Tri-*O*-methylpentose, sind ziemlich flüchtig und gehen beim Einengen des Hydrolysats zum Teil verloren. Derartige Verluste lassen sich vermeiden, wenn man das Polysaccharid methanolysiert und die Mischung der Methylglykoside durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie analysiert, ohne daß vorher neutralisiert oder eingeeengt wird [21].

Manche Glykosidbindungen sind gegenüber saurer Hydrolyse recht beständig; die vollständige Hydrolyse kann hier von Zersetzung des Zuckers begleitet sein. Ein Beispiel ist die Uronosylbindung. Um die Hydrolyse zu erleichtern, können die Uronsäurereste zuerst zu neutralen Zuckerresten reduziert werden. 2-Acetamido-2-desoxy-glykoside sind nicht besonders schwierig zu hydrolysieren. Wenn aber gleichzeitig die Amidbindung hydrolysiert wird, erhält man 2-Amino-2-desoxy-glykoside, welche bei der Hydrolyse extrem beständig sind. Eine systematische Untersuchung der Hydrolyse methylierter Polysaccharide mit 2-Acetamido-2-desoxy-zuckerresten scheint noch auszustecken. Möglicherweise können sie durch Acetolyse vollständig in Monosaccharide zerlegt werden.

4. Trennung von Gemischen methylierter Zucker

4.1. Methylglykoside methylierter Zucker

Die methylierten Zucker, die sich bei der Hydrolyse methylierter Polysaccharide bilden, wurden ursprünglich durch fraktionierende Destillation und später durch Papier- oder Säulenchromatographie getrennt. Diese Methoden werden immer noch angewendet, wenn genügend Material für eine eindeutige Identifizierung isoliert werden soll. Für die analytische Trennung wird derzeit die Gas-Flüssigkeits-Chromatographie vorgezogen. Die methylierten Zucker als solche können mit dieser Methode aber nicht getrennt werden, sondern müssen in stabilere Derivate überführt werden, i. a. die Methylglykoside.

[20] P. J. Garegg u. B. Lindberg, Acta chem. scand. 14, 871 (1960).

[21] G. O. Aspinall, J. chem. Soc. (London) 1963, 1676.

Jeder methylierte Zucker gibt ein oder zwei Paare anomerer Glykoside, je nachdem, ob C-4 oder C-5 oder beide Positionen unsubstituiert sind. Diese Tatsache kann die Identifizierung in Mischungen aus wenigen Komponenten erleichtern. In komplizierter zusammengesetzten Mischungen ist die große Zahl der Signale ein Nachteil, denn die quantitative Bestimmung wird schwieriger. Die besten Trennungen bei der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie gelangen an polaren Kolonnen, die z.B. Tetramethylsuccinat und Polyphenyläther enthielten. Aspinall^[21] bestimmte die Retentionszeiten für die Methylglykoside einer Reihe methylierter Zucker, bezogen auf die Retentionszeit von Methyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-β-D-glucosid (T-Werte).

4.2. Aldit-acetate methylierter Zucker

Durch Reduktion zu den Zuckeralkoholen (Alditen) entsteht aus jedem methylierten Zucker ein einziges Derivat. Diese isomeren Aldit-Derivate (z.B. Acetate) ließen sich aber an den üblichen Säulen nicht so gut wie die Derivate der isomeren Methylglykoside trennen. Dies gelang erst an einer neuen Phase für die Gas-Flüssigkeits-Chromatographie, ECNSS-M (ein Nitril-silicon-Polyester-Copolymeres^[*]).

Wir verwenden diese Technik seit mehreren Jahren; Tabelle 1 zeigt Beispiele^[22]. Für die wenigen Komponenten, die an ECNSS-M nicht getrennt werden, können andere Säulen herangezogen werden (Ta-

Tabelle 1. Retentionszeiten (T-Werte) partiell methylierter Zucker in Form ihrer Aldit-acetate, bezogen auf 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucit. Die Säulen enthielten ECNSS-M (3%) auf Chromosorb Q, 100–120 mesh, und waren i. a. 2 m lang mit Innendurchmessern von 4 mm.

Stellung von CH ₃	Stammzucker [a]										
	Ara	Rib	Xyl	Gal	Glc	Man	Fuc	Rha	Abe	Par	Tyy
2				8.1	7.9		1.67	1.52			
3			2.92	11.1	9.6		2.05	1.94			
4								1.72			
2,3			1.54	5.68	5.39		1.18	0.98			
2,4	1.40			6.35	5.10	5.44	1.12		0.32	0.34	0.29
2,5	1.10			3.70							
2,6				3.65	3.83	3.35					
3,4	1.38		1.54	6.93		5.37		0.92			
3,5		0.77	1.08	6.35							
3,6				4.35	4.40						
4,6				3.64	4.02	3.29					
2,3,4	0.73		0.68	3.41	2.49	2.48	0.65	0.46			
2,3,5	0.48	0.40		3.28			0.62				
2,3,6				2.42	2.50	2.20					
2,4,6				2.28	1.95	2.09					
2,5,6				2.25							
3,4,6				2.50	1.98	1.95					
2,3,4,6				1.25	1.00	1.00					
2,3,5,6				1.15							

[a] Ara = Arabinose, Rib = Ribose, Xyl = Xylose, Gal = Galaktose, Glc = Glucose, Man = Mannose, Fuc = Fucose, Rha = Rhamnose, Abe = Abequose (3,6-Didesoxy-D-xylo-hexose), Par = Paratose (3,6-Didesoxy-D-ribo-hexose), Tyy = Tyvelose (3,6-Didesoxy-D-arabino-hexose).

[*] Hersteller: Applied Science Laboratories, Inc., P. O. Box 140, State College, Pa. (USA).

[22] H. Björndal, B. Lindberg u. S. Svensson, Acta chem. scand. 21, 1801 (1967).

belle 2). Kürzlich sind ECNSS-M-Scot-Säulen auf den Markt gekommen, die noch weit bessere Trennungen als die gepackten Säulen ermöglichen.

Tabelle 2. Retentionszeiten (T-Werte) partiell methylierter Zucker in Form ihrer Aldit-acetate. Standard und Säulenmaße wie in Tabelle 1. Säule gefüllt mit OS 138 [a].

Aldit-acetat von	T
3,4-Di-O-methyl-L-rhamnose	0.80
2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose	0.86
2,3,4-Tri-O-methyl-D-mannose	1.93
2,3,6-Tri-O-methyl-D-galaktose	1.74
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	1.00
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-mannose	1.06

[a] OS 138 besteht aus Polyphenyläther.

Hersteller: Applied Science Laboratories, Inc., P. O. Box 140, State College, Pa. (USA).

Die Reproduzierbarkeit der T-Werte ist gut -- im allgemeinen 1% oder besser – wenn zwei interne Standards mit stark unterschiedlichen Retentionszeiten verwendet und die T-Werte durch Interpolation bestimmt werden. Dies gilt auch für verschiedene Kolonnen und verschiedene Temperaturen. Partiell methylierte Aldit-acetate werden vorzugsweise bei 160 bis 200 °C, vollständig acetylierte Aldite bei 200–220 °C getrennt. Der optimale Temperaturbereich hängt von der Konzentration der ECNSS-M-Phase auf dem Träger ab. Da diese Phase beim Gebrauch ausläuft, sollte man die Temperatur entsprechend senken. Scot-Säulen werden bei etwas tieferen Temperaturen eingesetzt.

Aldit-acetate mit beliebig vielen oder ohne Methylgruppen können an der gleichen Säule getrennt werden. Eine Untermethylierung (s. Abschnitt 2) wird dabei leicht entdeckt. Die partiell methylierten Aldit-acetate von Acetamido-desoxy-hexosen haben auf ECNSS-M-Säulen hohe Retentionszeiten, sind aber noch nicht systematisch untersucht worden.

Für die quantitative Gas-Flüssigkeits-Chromatographie ist es im allgemeinen nötig, die Empfindlichkeit für die zu bestimmenden Komponenten zu ermitteln. Dies scheint bei den partiell methylierten Aldit-acetaten nicht nötig zu sein, wenn man in Glaskolonnen und mit Flammenionisationsdetektoren arbeitet. Die Annahme, daß die molare Empfindlichkeit für alle diese Komponenten gleich ist, stimmt vermutlich mindestens auf ±5%, wie die Resultate mehrerer Methylierungsanalysen von Oligo- und Polysacchariden zeigen. Die Fehler aufgrund dieser Annahme sind vermutlich kleiner als die Fehler aufgrund von Zersetzung während der Hydrolyse und von Verlusten während des Einengens.

5. Charakterisierung der methylierten Zucker

5.1. Kristalline Derivate

In äußerst einfallsreichen und zeitraubenden Arbeiten sind die Methyläther der in der Natur vorkommenden Zucker synthetisiert worden, wie sie zu Vergleichszwecken bei der Methylierungsanalyse benötigt wurden (Tabellen der kristallinen Methyläther der natürlichen Zucker s.^[23]). Bei der klassischen Methylier-

[23] R. L. Whistler, Methods Carbohydrate Chem. 5, 298 (1965).

rungsanalyse wird jeder methylierte Zucker isoliert, in kristalline Derivate überführt und, wenn möglich, mit authentischem Material verglichen.

5.2. Charakterisierung durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie

Bei einfachen Polysacchariden mag es genügen, die durch Methylierungsanalyse erhaltenen methylierten Zucker gas-flüssigkeits-chromatographisch zu identifizieren. Dieser Nachweis, der durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie mit anderen Säulen, durch andere chromatographische Verfahren oder durch Elektrophorese bestätigt werden kann, ist natürlich nicht endgültig. Bei kompliziert zusammengesetzten Polysacchariden kann es unmöglich oder zu riskant sein, die bei der Methylierungsanalyse erhaltenen Verbindungen ausschließlich chromatographisch zu identifizieren.

5.3. Charakterisierung durch Massenspektrometrie

5.3.1. Glykoside

Die Massenspektrometrie hat sich in jüngerer Zeit zu einem wichtigen Hilfsmittel der organischen Chemie entwickelt. Mehrere Arbeitsgruppen haben die Massenspektren von Kohlenhydraten studiert [24]. Heyns et al. nahmen die Massenspektren vollständig methylierter Glykoside auf [25], während Kochekov et al. [26] und Samuelson et al. [27] sich mit denen der Trimethylsilylderivate partiell methylierter Glykoside befassten. Diese Studien und die kombinierte Anwendung von Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie, wobei die Komponenten aus der Chromatographiesäule direkt in die Ionisationskammer des Massenspektrometers gelangen, haben neue Möglichkeiten für qualitative und quantitative Analysen von Gemischen methylierter Zucker geschaffen.

5.3.2. Aldit-acetate methylierter Zucker

Die Massenspektrometrie partiell methylierter Aldit-acetate ist in unserem Laboratorium untersucht worden [28]. Die Fragmentierung von Aldit-acetaten, z.B. D-Glucit-hexaacetat (9), lässt sich nach Chizhov et al. [29] leicht interpretieren. Die stärksten Massenlinien entsprechen den Ionen, die von primären Spaltungen des Moleküls zwischen benachbarten Kohlenstoffatomen der Kette sowie der Eliminierung von Essigsäure ($m/e = 60$) oder Keten ($m/e = 42$) aus diesen Frag-

[24] N. K. Kochetkov u. O. S. Chizhov, Advances Carbohydrate Chem. 21, 39 (1966).

[25] W. Heyns u. H. Scharmann, Liebigs Ann. Chem. 667, 183 (1963).

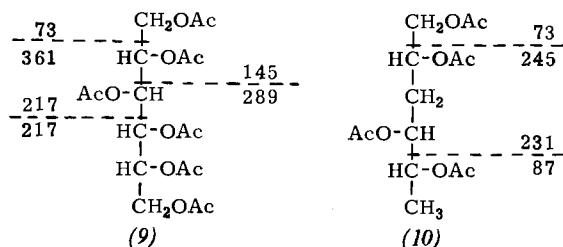
[26] O. S. Chizhov, N. V. Moldotsov u. N. K. Kochetkov, Carbohydrate Res. 4, 273 (1967).

[27] G. Pettersson, O. Samuelson, K. Anjou u. E. von Sydow, Acta chem. scand., 21, 1251 (1967).

[28] H. Björndal, B. Lindberg u. S. Svensson, Carbohydrate Res. 5, 43 (1967).

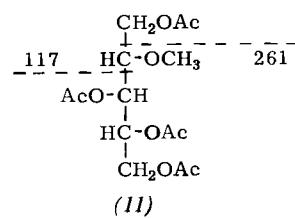
[29] O. S. Chizhov, L. S. Golovkina u. N. S. Wulfson, Izvest. Akad. Nauk SSSR. Otd. chim. Nauk 1966, 1915.

menten herrühren. Die Intensität der Massenlinien nimmt mit zunehmendem Molekulargewicht der Fragmente ab. Eine Desoxy-Gruppierung verhindert die Spaltung der benachbarten Bindung, wie sich am Abequittetraacetat (10) zeigen lässt, das vom natürlichen Zucker Abequose (3,6-Didesoxy-D-*xylo*-hexose) abgeleitet ist. Die Massenspektren der isomeren Alditocetate, die zwar die gleiche Struktur, aber verschiedene Konfiguration haben, sind praktisch ununterscheidbar. Das gleiche gilt für einige Glykoside^[24] und andere stereoisomere Substanzen.



Eine systematische Untersuchung der Massenspektren partiell methylierter Aldit-acetate gestattete folgende Verallgemeinerungen:

1. Derivate mit dem gleichen Substitutionsmuster (z.B. 2,3,4,6-Tetra-O-methylderivate von Hexiten) geben sehr ähnliche und für dieses Substitutionsmuster typische Massenspektren. Die relativen Intensitäten der Massenlinien können sich bei Stereoisomeren etwas unterscheiden, gestatten aber keine eindeutige Identifizierung.
 2. Die Basislinie des Massenspektrums ist meistens $m/e = 43$ ($\text{CH}_3\text{C}^{\oplus}\text{O}$).
 3. Die primär gebildeten Fragmente entstehen durch Spaltung zwischen den Kohlenstoffatomen der Kette. Die Spaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom ist vor der Spaltung zwischen zwei acetoxylierten Kohlenstoffatomen bevorzugt. Das Fragment mit der Methoxygruppe trägt die positive Ladung. Das Aldit-acetat der 2-O-Methyl-D-xylose (11) zerfällt demnach primär in nur zwei Hauptfragmente.



4. Bei Molekülen mit zwei benachbarten methoxylierten Kohlenstoffatomen, z.B. bei den Aldit-acetaten der 2,3,6-Tri-*O*-methyl-d-glucose (12) und der 2,3,4-Tri-*O*-methyl-L-fucose (13), ist die Spaltung zwischen diesen Atomen vor der Spaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom bevorzugt. Beide Fragmente, die bei dieser Spaltung entstehen, lassen sich als positive Ionen nachweisen. Eine wichtige Ausnahme sind die 1,2-Di-*O*-methylaldit-Derivate wie das Aldit-acetat der 2,3,5,6-Tetra-*O*-methyl-d-galaktose (14), bei denen immer das pri-

märe Fragment m/e = 89 zu einer starken Massenlinie führt.

5. Sekundäre Fragmente entstehen aus den primären durch ein- oder mehrmalige Abspaltung von Essigsäure ($m/e = 60$), Keten ($m/e = 42$), Methanol ($m/e =$

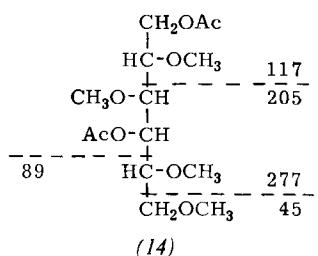
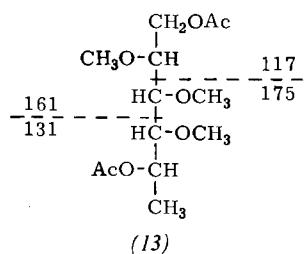
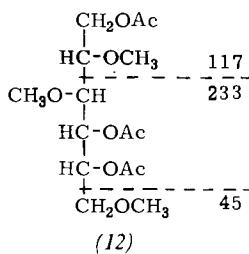


Tabelle 3. Primärfragmente [a] in den Massenspektren partiell methylierter Zucker in Form ihrer Aldit-acetate.

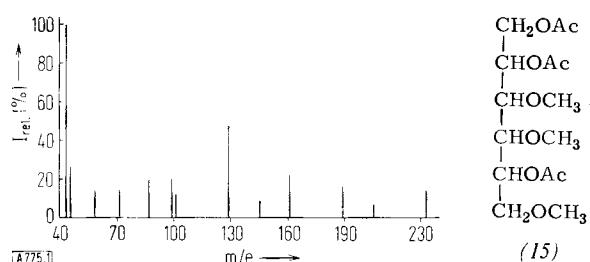


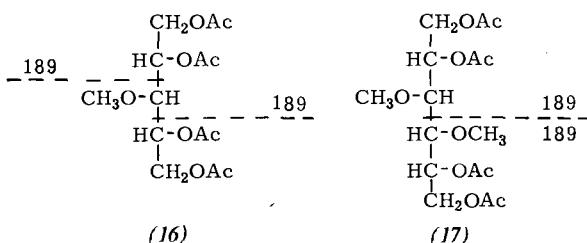
Abb. 1. Massenspektrum eines 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methylhexits (15).

Die wichtigsten Primärfragmente einiger partiell methylierter Aldit-acetate sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Es ist demnach möglich, das Substitutionsmuster partiell methylierter Aldit-acetate massenspektrometrisch festzustellen, und zwar entweder durch Vergleich des Spektrums mit dem einer authentischen Substanz oder durch Analyse entsprechend den Punkten 1 bis 5.

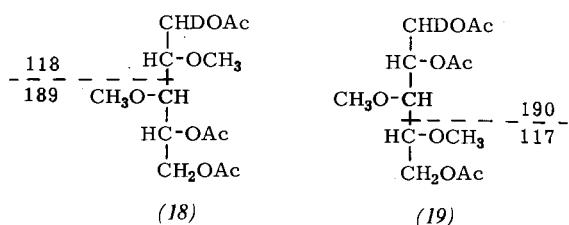
Stellung von CH ₃	m/e													
	45	59	89	117	131	161	175	189	203	205	217	233	261	305
Pentosen														
2 (4)				x									x	
3					x				x					
2,3 (3,4)					x				x					
2,4					x									
2,5	x			x								x	x	
3,5	x				x	x		x						
2,3,4				x										
2,3,5	x			x		x								
Hexosen														
2 (5)					x									
3 (4)									x				x	
6	x									x				
2,3				x									x	
2,4 (3,5)				x				x						
2,5				x										
2,6	x			x										
3,4								x						
3,6	x							x				x		
4,6	x						x						x	
5,6	x		x				x							x
2,3,4				x		x			x				x	
2,3,5				x								x		
2,3,6	x			x								x		
2,4,6	x			x		x					x			
2,5,6	x		x	x									x	
3,4,6	x					x			x					
2,3,4,6	x		x	x		x					x			
2,3,5,6	x		x	x						x				
6-Desoxyhexosen														
2				x										
3					x						x			
4						x			x	x				
2,3				x						x			x	
2,4				x	x								x	
3,4					x			x						
2,3,4	x			x	x		x							
2,3,5	x		x	x			x							
3,6-Didesoxyhexosen											x			
2				x										
2,4			x	x			x	x						

[a] Primärfragmente mit höheren Massenzahlen als $m/e = 261$, die durch Spaltung zwischen Kohlenstoffatomen mit einer Methoxy- und einer Acetoxygruppe entstehen, sind im Massenspektrum wenig intensiv und wurden hier nicht berücksichtigt.

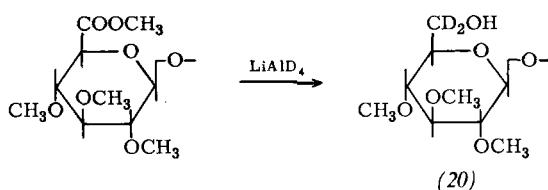
Es gibt zwei Aldit-acetate, die trotz verschiedener Struktur gleiche Spektren haben, nämlich die Derivate der 3-*O*-Methylpentosen, z. B. (16), und der 3,4-Di-*O*-methylhexosen, z. B. (17). Das ist nicht überraschend, da beide Typen von Verbindungen das gleiche Primärfragment liefern ($m/e = 189$). Die Acetate der Mono-*O*-methylpentite und der Di-*O*-methylhexite haben aber sehr verschiedene T-Werte, so daß keine Verwechslungsgefahr besteht.



Einige Paare methylierter Zucker, z.B. eine 2-O-Methyl- und eine 4-O-Methylpentose oder eine 3-O-Methyl- und eine 4-O-Methylhexose, geben bei der Reduktion Aldite mit dem gleichen Substitutionsmuster, wie Tabelle 3 zeigt. Die erhaltenen Aldite können sogar – wie bei den Mannosederivaten – identisch sein, oder man erhält – wie bei den Galaktosederivaten – Enantiomorphe; in beiden Fällen ist keine Trennung durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie möglich. Die durch die Reduktion verlorengehende Information kann aber erhalten bleiben, wenn man mit Natriumtetradeuterioborat reduziert. Die Vorteile dieses Vorgehens zeigt das Beispiel der Aldit-acetate der 2,3- und 3,4-Di-O-methyl-d-xylose (18) bzw. (19), welche, obwohl sie sich gas-flüssigkeits-chromatographisch nicht unterscheiden lassen, verschiedene Massenspektren geben.



Die Uronsäurereste der Polysaccharide werden vor oder nach der Methylierung zu neutralen Zuckerresten reduziert. Wenn man dazu eine Deuteriumverbindung benutzt, lässt sich der erhaltene neutrale Zuckerrest, z.B. (20), massenspektrometrisch leicht von anderen Zuckerresten im gleichen Molekül unterscheiden.



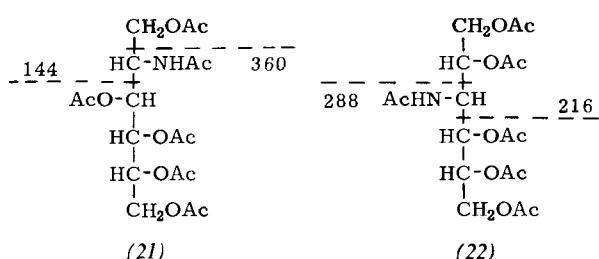
Diese Markierungstechnik wurde während der Methylierungsanalyse eines aus Pilzen erhaltenen Glucurono-

glucans angewendet^[30]. Die Massenspektrometrie zeigte, daß einer der Zucker, 2,3,4-Tri-*O*-methyl-D-glucose, sowohl von den Glucose- als auch von den Glucuronsäureresten abgeleitet war. Aus der Intensität der zugehörigen Massenlinien ließen sich sogar die ungefähren Anteile ermitteln.

Wenn ein Polysaccharid nur einen Zucker jeder Klasse enthält, z.B. eine Pentose und eine Hexose, kann der methylierte Zucker durch Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden. Ist das Polysaccharid dagegen aus mehreren Zuckern einer Klasse zusammengesetzt, z.B. aus zwei oder mehr Hexosen, so gelingt die eindeutige Identifizierung der methylierten Zucker nur dann, wenn die T-Werte ihrer Aldit-acetate sich genügend unterscheiden. Im allgemeinen lassen sich dafür geeignete Chromatographiesäulen finden. Wenn der T-Wert einer in der Mischung vermuteten Verbindung nicht bekannt ist, kann er schnell bestimmt werden: Man methyliert ein geeignetes Zuckerderivat partiell, wandelt das Reaktionsprodukt in das Aldit-acetat um und charakterisiert es durch kombinierte Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie. Verbindungen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster, die chromatographisch nicht trennbar sind, geben ein für ein Gemisch charakteristisches Massenspektrum. Wenn die Trennung dieser Verbindungen auch nicht durch andere Säulen oder bei anderen Temperaturen erreicht werden kann, lassen sich ihre Anteile immer noch halbquantitativ aus dem Massenspektrum abschätzen.

5.3.3. Aldit-acetate von Aminozuckern

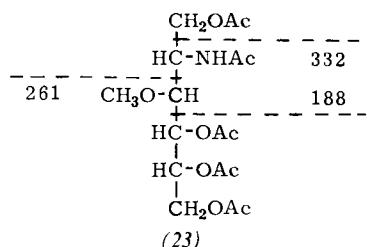
Die kombinierte Anwendung der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie auf die Aldit-acetate von Aminozuckern ist noch nicht systematisch studiert worden. Vorläufige Untersuchungen zeigten, daß diese Verbindungen viel längere Retentionszeiten als die entsprechenden neutralen Zucker haben. Bei den unmethylierten Verbindungen, z. B. (21) und (22), beginnt die Fragmentierung an der Acetamidogruppe. Durch Eliminierung von Essigsäure, Acetamid oder Keten entstehen sekundäre aus den primären Fragmenten.



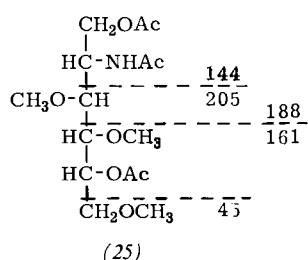
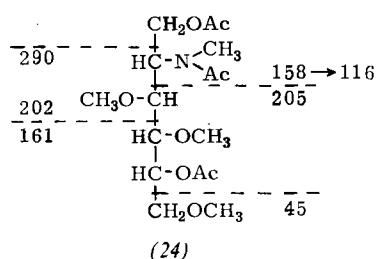
Wenn eine Methoxy- und eine Acetamidogruppe benachbart sind, wie in (23), findet die Spaltung vorzugsweise zwischen den Kohlenstoffatomen statt, die diese Gruppen tragen. Die positive Ladung geht fast ausschließlich auf das Fragment mit der Methoxy-

[30] H. Björndal u. B. Lindberg, Carbohydrate Res. 12, 29 (1970).

gruppe über. Es wird jedoch auch eine Spaltung zwischen C-1 und C-2 sowie zwischen C-3 und C-4 beobachtet.



Wie in Abschnitt 2 erwähnt, lassen sich Acetamido-gruppen zwar nach der Vorschrift von *Hakomori* [etwa zu (24)], aber nicht nach anderen Vorschriften methylieren [siehe (25)]. Alle erhaltenen Aldit-acetate mit Acetamidogruppen haben ähnliche Massenspektren.



Ein wichtiger Unterschied ist allerdings, daß im Massenspektrum von (25) das primäre Fragment ($m/e = 144$) mit C-1 und C-2 nur eine schwache Massenlinie verursacht, während es im Massenspektrum von (24) als stärkstes primäres Fragment auftritt ($m/e = 158$). Das sekundäre Fragment mit $m/e = 116$, das aus dem primären durch Abspaltung von Keten entsteht, liefert die stärkste Massenlinie – sogar noch stärker als $\text{CH}_3\text{C}^{\oplus}\text{O}$ ($m/e = 43$).

Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, daß sich die Kombination von Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie auch für die Methylierungsanalyse von Amino-desoxy-zuckern eignet.

6. Anwendungsbeispiele

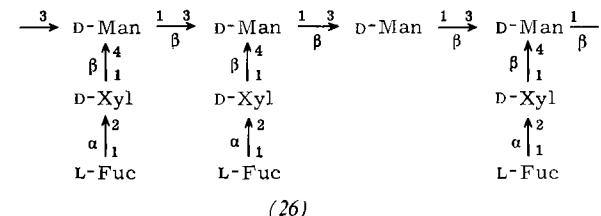
6.1. Methylierungsanalyse eines Fuco-xylo-mannans aus Pilzen^[31]

Ein Fuco-xylo-mannan aus dem Pilz *Polyporus pinicola* (Fr.) gab bei der sauren Hydrolyse L-Fucose, D-Xylose und D-Mannose im Verhältnis 0.8 : 0.7 : 1. Das Polysaccharid wurde methyliert und hydrolysiert. Anschließend wurden die methylierten Zucker in ihre Aldit-acetate überführt und gas-flüssigkeits-chromatographisch untersucht (Tabelle 4, dort I). Ein Teil des Polysaccharids wurde außerdem mit 0.05 M Schwefelsäure bei 100 °C 1.5 Std. hydrolysiert. Durch diese Behandlung ließen sich fast alle L-fucosidischen Bindungen spalten. Das restliche, polymere Material wurde der Methylierungsanalyse unterworfen (Tabelle 4, dort II). Das fast völlige Verschwinden der 3,4-Di-O-methyl-xylose und das völlige Fehlen der 2,3,4-Tri-O-methyl-xylose zeigen, daß die L-Fucosereste an C-2 der D-Xylose gebunden sind.

Tabelle 4. Retentionszeiten (T-Werte) partiell methylierter Zucker in Form ihrer Aldit-acetate aus dem Hydrolysat des methylierten Fuco-xylo-mannans (I) und des vorher partiell abgebauten und anschließend methylierten Fuco-xylo-mannans (II). Die T-Werte sind bei 175 °C gemessen; Standard und Säule wie in Tabelle 1.

Aldit-acetat von	T	I (Mol-%)	II (Mol-%)
2,3,4-Tri-O-methyl-L-fucose	0.65	30.2	—
2,3,4-Tri-O-methyl-D-xylose	0.68	—	38.8
3,4-Di-O-methyl-D-xylose	1.54	29.5	3.4
2,4,6-Tri-O-methyl-D-mannose	2.10	9.7	19.4
2,6-Di-O-methyl-D-mannose	3.35	30.6	38.4

Aufgrund dieser und anderer Untersuchungen wurde die Struktur (26) für das Polysaccharid vorgeschlagen.



6.2. Methylierungsanalyse des Lipopolysaccharids aus *Salmonella typhi*^[32]

Lipopolysaccharide aus gram-negativen Bakterien bestehen aus einem Lipoidanteil, den „O-spezifischen“ Seitenketten, die aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten zusammengesetzt sind, und aus einem Kern-Polysaccharid, das das Lipoid mit den O-spezifischen Seitenketten verbindet.

Das Lipopolysaccharid aus *Salmonella typhi* enthält D-Glucose, D-Galaktose, D-Mannose, L-Rhamnose und Tyvelose (3,6-Didesoxy-D-arabino-hexose) in den Seitenketten und D-Glucose, D-Galaktose, 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose und eine Heptose im Kern-Polysaccharid. Einige der Zuckerreste tragen zusätzlich O-Acetylgruppen.

Die Aldit-acetate der methylierten Zucker, die aus dem vollständig methylierten Lipopolysaccharid erhalten wurden, gaben ein kompliziertes Gas-Flüssigkeits-Chromatogramm. Das Material, das Anfang, Maximum und Ende der starken chromatographischen Signale sowie das Maximum der schwachen Signale bildete, wurde der Massenspektrometrie zugeführt. Dabei ergab sich, daß die chromatographischen Signale B und D jeweils von zwei Verbindungen hervorgerufen wurden. Die Verbindungen im Signal B konnten später auf einer Polyphenyläthersäule (OS-138) getrennt werden, und die das Signal D bewirkenden Verbindungen ließen sich auf der ECNSS-M-Säule bei tieferer Temperatur trennen. Aus den Massenspektren und den T-Werten gelang es, zwölf methylierte Zucker und ihre Anteile festzustellen (Tabelle 5, dort I). Kleine Mengen methylierter Heptosen, die ebenfalls anwesend sein sollten, entzogen sich dem Nachweis. Auf methylierte Derivate der 2-Acetamido-2-desoxy-glucose, die hohe T-Werte haben, wurde nicht geprüft.

[32] C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme u. A. A. Lindberg, Acta chem. scand. 23, 1588 (1969).

Tabelle 5. Retentionszeiten (T-Werte) partiell methylierter Zucker in Form ihrer Aldit-acetate aus dem Hydrolysat des methylierten Lipopolysaccharids (I) und des vorher partiell abgebauten und anschließend methylierten Lipopolysaccharids aus *Salmonella typhi* (II). Standard und Säule wie in Tabelle 1.

Aldit-acetat von	Signal	T	I (Mol-%) [a]	II (Mol-%) [a]
2,4-Di-O-methyl-tyvelose	A	0.29	8.0	
2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose	B	0.98	20.0	
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose	B ^I	1.00	13.5	10.4
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-galaktose	C	1.25	0.8	2.0
3,4,6-Tri-O-methyl-D-mannose		1.95		22.6
2,4,6-Tri-O-methyl-D-mannose	D	2.08	0.8	
3,4,6-Tri-O-methyl-D-glucose	D	2.11	2.1	
2,4,6-Tri-O-methyl-D-galaktose	E	2.28	8.2	7.0
2,3,6-Tri-O-methyl-D-galaktose		2.42		
3,4,6-Tri-O-methyl-D-galaktose	F	2.50	0.5	
4,6-Di-O-methyl-D-mannose	G	3.29	24.5	
2,6-Di-O-methyl-D-galaktose	H	3.62	16.5	10.5
3,6-Di-O-methyl-D-galaktose	I	4.30	0.8	
2,4-Di-O-methyl-D-glucose	K	5.10	1.0	
2,4-Di-O-methyl-D-galaktose	L	6.35	—	

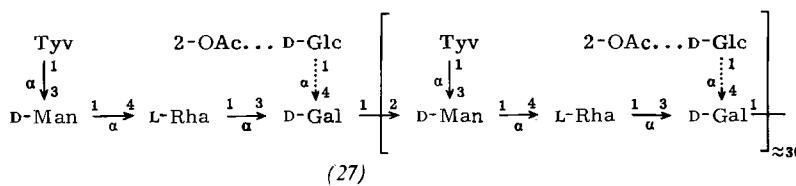
[a] Da während der Methylierungsanalyse eine beträchtliche Menge 2,4-Di-O-methyltyvelose verlorengegangen sind die Anteile der methylierten Zuckern auf den Anteil der 2,3-Di-O-methyl-L-rhamnose bezogen, der vermutlich dem Anteil der L-Rhamnose im Lipopolysaccharid entspricht.

Die Ergebnisse der Zuckeranalyse und der Methylierungsanalyse stimmen gut überein, mit Ausnahme der Werte für Tyvelose. Offenbar ging eine beträchtliche Menge 2,4-Di-O-methyltyvelose und ihrer Derivate beim Einengen der Lösungen verloren.

Ein Teil des Lipopolysaccharids wurde unter milden Bedingungen sauer hydrolysiert. Dabei öffneten sich alle tyvelosidischen und ein Teil der L-rhamnosidischen Bindungen. Das restliche polymere und oligomere Material wurde der Methylierungsanalyse unterworfen (Tabelle 5, dort II). Das Ergebnis, daß die 4,6-Di-O-methyl-D-mannose vollständig durch 3,4,6-Tri-O-methyl-D-mannose ersetzt war, zeigte, daß die Tyvelosereste an C-3 der D-Mannose gebunden waren. Auf diese Art ergab sich auch, daß die L-Rhamnosereste an C-3 der D-Galaktose gebunden waren.

Die bei der Methylierungsanalyse des ursprünglichen Lipopolysaccharids in untergeordneten Mengen erhaltenen Verbindungen stammen alle aus dem Kern-Polysaccharid, mit Ausnahme von 2,4,6-Tri-O-methyl-D-mannose. Die Anwesenheit dieses Zuckers und größerer Mengen 4,6-Di-O-methyl-D-mannose zeigt, daß das nicht-reduzierende Ende der „O-spezifischen“ Seitenketten ein 3-O-Tyvelosyl-D-mannoserest ist und gestattet eine Schätzung der Anzahl sich wiederholender Zucker („repeating units“) in der Kette.

Diese und andere Untersuchungen ermöglichten es, für die O-spezifischen Seitenketten des Lipopolysaccharids die Struktur (27) vorzuschlagen (die punktierten Linien sollen andeuten, daß nur ein Teil der Zuckerreste substituiert ist).

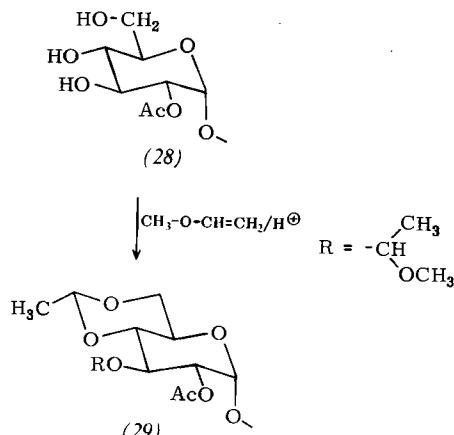


6.3. Lokalisierung von O-Acetylgruppen im Polysaccharid

Mehrere Polysaccharide enthalten O-Acetylgruppen, die man früher nur schwierig lokalisieren konnte. Das Problem kann durch eine modifizierte Methylierungsanalyse nach *de Belder* und *Norrmann*^[19] gelöst werden. Zunächst werden alle freien Hydroxygruppen durch Reaktion mit Methylvinyläther und einem sauren Katalysator in Dimethylsulfoxid in Acetale

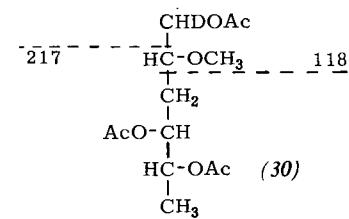
überführt. Das Polymere mit den Acetalgruppen wird vorgezugsweise durch Gelfiltration an Sephadex LH 20 in Aceton isoliert. Danach kann es entweder direkt nach *Hakomori* methyliert werden — wobei die O-Acetylgruppen verlorengehen — oder zuerst entacetyliert und dann methyliert werden. Die saure Hydrolyse führt zu einer Mischung von Zuckern und partiell methylierten Zuckern. Die Acetylgruppen sind jetzt in Methoxygruppen umgewandelt.

Die Reaktion zwischen Kohlenhydraten und Methylvinyläther liefert acyclische Acetale, bei günstigen sterischen Verhältnissen aber auch cyclische Acetale^[33], z.B. (28) → (29).



(28) ist der terminale O-acetylierte α -D-Glucopyranoserest, der im Lipopolysaccharid aus *S. typhi* (27) gefunden wurde.

Das Lipopolysaccharid von *S. typhimurium* 395 MS enthält Abequose (3,6-Didesoxy-D-xylo-hexose) statt Tyvelose, aber sonst die gleichen Zucker wie das Lipopolysaccharid aus *S. typhi*. Man findet ebenfalls die immunologisch signifikanten O-Acetylgruppen. Nach der Acetalisierung, Methylierung und Hydrolyse wurden die Zucker mit Natriumtetradeuterioborat reduziert und acetyliert^[34]. Die Gas-Flüssigkeits-Chromatographie dieses Gemisches zeigte, daß praktisch keine Abequose vorhanden war; die einzige neue Verbindung, die in der Mischung der Aldit-acetate aus dem ursprünglichen Lipopolysaccharid nicht enthalten war, hatte eine kürzere Retentionszeit als Abequit-acetat. Die T-Werte methylierter Abequosederivate standen nicht zur Verfügung; die neue Verbindung konnte aber aus ihrem Massenspektrum als Aldit-acetat der 2-O-Methyl-abequose (30) identifiziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß nur C-2 des Abequoserestes und keine weiteren Zucker der Seitenkette acetyliert sind.



7. Zusammenfassung

Kürzlich wurden in unserem Laboratorium Methylierungsanalysen von Polysacchariden aus Holz^[35, 36], Pilzen^[30, 31, 37–40], Flechten^[41] und Bakterien^[32, 34, 42]

[33] M. L. Wolfrom, A. Beattie u. S. S. Bhattacharjee, J. org. Chemistry 33, 1067 (1968).

[34] C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme u. A. A. Lindberg, Carbohydrate Res. 8, 43 (1968).

[35] P. J. Garegg u. M. Han, Svensk Papperstidn. 1968, 331.

ausgeführt. Die Polysaccharide wurden nach *Hakomori* methyliert; zur qualitativen und quantitativen Analyse der methylierten Zucker diente die Kombination von Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie. Diese Methode hat folgende Vorteile:

1. Sie ist genauer als früher angewendete Methoden. So ist es jetzt möglich, die Anteile von Nebenbestandteilen zu bestimmen, die wichtig für die Gesamtstruktur sein können.
2. Es wird nur wenig Material benötigt. Es ist zweckmäßig, von 2 bis 10 mg Polysaccharid auszugehen,

- [36] *M. Han u. B. Swan*, Svensk Papperstidn. 1968, 552.
[37] *K. Axelsson, H. Björndal u. K.-E. Eriksson*, Acta chem. scand. 22, 1363 (1968).
[38] *H. Björndal u. B. Lindberg*, Carbohydrate Res. 10, 79 (1969).
[39] *H. Björndal u. B. Wågström*, Acta chem. scand. 23, 1560 (1969).
[40] *K. Axelsson u. H. Björndal*, Acta chem. scand. 23, 1815 (1969).
[41] *C. G. Hellerqvist, B. Lindberg u. K. Samuelsson*, Acta chem. scand. 22, 2736 (1968).
[42] *C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, T. Holme u. A. A. Lindberg*, Carbohydrate Res. 9, 237 (1969).

aber bereits 0,5 mg genügen. Das kann bei biologisch aktiven Verbindungen ein entscheidender Vorteil sein.

3. Die Methode ist schneller als die älteren Methoden. Eine komplette Methylierungsanalyse kann in einer Woche fertiggestellt werden.
 4. Es werden nicht unbedingt Vergleichssubstanzen benötigt. Wenn ein neuer methylierter Zucker erhalten wird, kann er viel leichter als früher identifiziert werden.
 5. Die Schnelligkeit und die Genauigkeit der Methode regen zu zusätzlichen Methylierungsanalysen chemisch modifizierter Polysaccharide an, um ergänzende Informationen zur Struktur zu erlangen.
- Aufgrund der beträchtlichen Vorteile der beschriebenen Methode oder verwandter Methoden, die auf der Kombination von Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie beruhen, werden wahrscheinlich die klassischen Methoden der Methylierungsanalyse von Polysacchariden und anderen Kohlenhydraten weitgehend verdrängt werden.

Eingegangen am 20. Oktober 1969 [A 775]

Solvatisierte und stabilisierte Elektronen bei strahlenchemischen Prozessen

Von Klaus Eiben^[*]

Gegenüber den in Metall-Ammoniak-Lösungen existierenden solvatisierten Elektronen sind in Wasser gelöste Elektronen außerordentlich instabil und deshalb lange Zeit unbeachtet geblieben. Ihre Entdeckung bei der Radiolyse von Wasser hat einen Anstoß zur Untersuchung der Chemie dieses einfachsten Radikals gegeben. Die strahlenchemische Erzeugung solvatisierter Elektronen hat sich als eine besonders geeignete Methode erwiesen, um ihre zum Teil diffusionskontrolliert ablaufenden Reduktionsreaktionen mit vielen Partnern qualitativ und quantitativ zu erforschen. In einigen Fällen ist es gelungen, die dabei entstehenden kurzlebigen Reaktionsprodukte (Radikalanionen) optisch und ESR-spektroskopisch zu identifizieren. Die Ähnlichkeit der physikalischen und chemischen Eigenschaften von in Lösung solvatisierten und in fester Phase stabilisierten Elektronen zwingt zu der Schlussfolgerung, daß beide Spezies identisch sind.

1. Einleitung

Erste Vermutungen über das Auftreten von hydratisierten Elektronen als kurzlebige Zwischenprodukte bei der strahlenchemischen Zersetzung (Radiolyse) des Wassers wurden 1952 veröffentlicht^[1]. Auf einer Diskussionstagung machte bald darauf *Platzman*^[2] einige Voraussagen über die physikalischen Eigenschaften hydratisierter Elektronen, wobei er von Vorstellungen über die damals schon 90 Jahre bekannten

tiefblauen Lösungen von Elektronen in Ammoniak^[3] ausging. In den folgenden Jahren wurde die Existenz hydratisierter Elektronen verschiedentlich indirekt nachgewiesen^[4-7]. Ein direkter Nachweis gelang 1962 durch die Zuordnung der blauen Farbe, die in bestrahlten, glasig eingefrorenen Natronlaugelösungen^[8,9] sowie wenig später auch im flüssigen Was-

[3] *W. Weyl*, Ann. Physik 197, 601 (1863).

[4] *E. Hayon u. J. J. Weiss*, Proc. 2nd Int. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy (Geneve) 29, 80 (1958).

[5] *N. F. Barr u. A. O. Allen*, J. Phys. Chem. 63, 928 (1959).

[6] *G. Czapski u. H. Schwarz*, J. Phys. Chem. 66, 471 (1962).

[7] *E. Collinson, F. S. Dainton, D. R. Smith u. S. Tazuke*, Proc. chem. Soc. (London) 1962, 149.

[8] *D. Schulte-Frohlinde u. K. Eiben*, Z. Naturforsch. 17a, 445 (1962).

[9] *J. Jortner u. B. Sharf*, J. Phys. Chem. 66, 108 (1962).

[*] Dr. K. Eiben
Institut für Strahlenchemie des Kernforschungszentrums
75 Karlsruhe, Postfach 3640

[1] *G. Stein*, Discussions Faraday Soc. 12, 227 (1952).

[2] *R. L. Platzman* in: Basic Mechanisms in Radiobiology. Natl. Res. Council (U.S.), Publ. 305, 34 (1953).