



УДК 547.455.06:543.51:577.113.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ В ВИДЕ АЦЕТАТОВ МЕТИЛОКСИМОВ  
МЕТОДОМ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Елькин Ю. Н., Суриц В. В.

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток*

Изучены масс-спектры ацетатов метилоксимов альдоз, дезоксиальдоз, гексозамина, монометиловых эфиров гексоз. Спектры содержат пики молекулярных и осколочных ионов углеродной цепи, которые характеризуют как тип моносахарида, так и положение NHAc- и OMe-заместителей. Проведено сравнение картин спада полиацетоксильной цепи метилоксимов, полиолов и нитрилов и установлена взаимосвязь между типом фрагментации и электронными свойствами заместителя у первого атома углерода.

Биологически важные гликоконъюгаты часто имеют сложный моносахаридный состав, установление которого требует применения метода одновременного определения различных типов моносахаридов. Газожидкостная хроматография — масс-спектрометрия (ГЖХ-МС) обеспечивает надежное определение моносахаридов. Однако эта техника требует предварительной модификации моносахаридов в производные, удовлетворяющие условиям как ГЖХ, так и МС; характер разложения молекулярных ионов ( $M^+$ ) должен отражать структурные особенности моносахарида. Нейтральные альдозы, например, определяют в виде ацетатов полиолов [1].

Присутствие в продуктах расщепления гликоконъюгатов различных типов сахаров усложняет задачу их совместной модификации. В последнее время был предложен ряд ее решений. Так, при определении состава смеси, содержащей альдоновые кислоты, альдозы и полиолы, использовали алкиламины для превращения кислот в N-алкилальдонамиды, а альдоз — в N-алкилгликозамины с последующим ацетилизированием [2]. Сложные смеси сахаров, включающие нейтральные альдозы, аминсахара, мурамовые и улузоновые кислоты, были в один прием превращены в ацетаты метилоксимов [3, 4]. Во всех трех работах для определения моносахаридов использовали технику ГЖХ. В случае использования техники ГЖХ-МС после модификации сахаров и разделения полученных производных необходима их идентификация по масс-спектрам. Однако опыт масс-спектрометрического изучения метилоксимов ограничен их триметилсилиловыми эфирами [5], а также трифторацетатами с химической ионизацией [6]. Сведения о масс-спектрах электронного удара ацетатов метилоксимов касаются амингексоз и ограничены упоминанием трех ионов, включая  $M^+$  [7]. В настоящем сообщении мы приводим результаты изучения масс-спектров электронного удара ацетатов метилоксимов альдоз, дезоксиальдоз, гексозамина, а также монометиловых эфиров гексоз.

Изучены масс-спектры ацетатов метилоксимов D-эритрозы (I), D-ксилозы (II), D-глюкозы (III), D-глицеро-D-глюко-гептозы (VI), D-галактозы (V), D-маннозы (VII), рамнозы (VIII), 2-дезоксирибозы (VIII), 2-OMe-D-глюкозы (IX), 3-OMe-D-глюкозы (X), 4-OMe-D-глюкозы (XI), 6-OMe-D-глюкозы (XII), 2-ацетиамидо-2-дезоксид-глюкозы (XIII). Из перечисленных производных сахаров графики масс-спектров приведены для соединений (II), (VII) и (XIII) — рис. 1—3.

В спектрах изученных ацетатов метилоксимов сахаров присутствуют заметные пики молекулярных ионов и/или аддукт-ионов  $M+H$ . Послед-

ние обусловлены ионно-молекулярными реакциями, так как их выход возрастает с увеличением количества вводимого образца. Разложение иона  $M^+$  метилоксимов происходит по двум направлениям, подобно молекулярным ионам полиолов и нитрилов. По первому направлению разрыв связей углеродной цепи моносахаридов приводит к первичным осколочным ионам размером от одного до  $n-1$  атомов углерода, где  $n$  — число атомов углерода в цепи. По второму направлению ион  $M^+$  и первичные ионы теряют ацетоксильные заместители целиком ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ) или частично ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ) и в комбинациях. Это разложение молекулярного и первичных ионов определяет сложную картину масс-спектров ацетилованных производных моносахаридов. Оба направления разложения характеризуют структурные особенности ацетатов метилоксимов. Масс-спектры этих соединений заметно отличаются от спектров ацетатов полиолов и нитрилов [8, 9]. Метилоксимы стереоизомеров (III), (V), (VI) дают идентичные масс-спектры.

При обсуждении масс-спектров ациклических производных моносахаридов для обозначения ионов принята номенклатура, в которой первичные ионы углеродной цепи от ее начала обозначили символом А, а от конца цепи — символом В. Количество углеродных атомов в составе таких осколков отражено числом перед символом. Типичная для ацетилованных производных сахаров картина потери от первичных ионов молекул уксусной кислоты (60 а.е.м.), кетена (42 а.е.м.) и их комбинаций отражается индексами у символа иона: нижний — общее число потерянных молекул, верхний — число молекул кетена в том числе. Например, символ  $4B_3^1$  обозначает ион, который включает четыре последних атома углерода моносахаридной цепи и теряет две молекулы уксусной кислоты и одну молекулу кетена. Молекулярный ион, как и первичные осколочные ионы, также теряет этот набор нейтральных молекул. Вся серия этих вторичных ионов с нетронутым скелетом называется ионами молекулярного типа и обозначается символом М с соответствующими индексами справа. Эти ионы не следует путать с исходными молекулярными ионами различных типов по положению заряда и обозначаемых одним символом  $M^+$ . Если  $M^+$  теряет ацетоксильный радикал, то полученному иону присваивается символ Р. Масс-спектры ацетатов метилоксимов обсуждаются на примере пентозы (II) и 6-дезоксигексозы (VII), рассматриваемой как 5-метилпентоза.

Значительное число пиков в спектре соединения (II) (305, 288, 245, 203, 185, 143, 126, 125) обусловлено серией ионов молекулярного типа в результате комбинации потерь от  $M^+$  нейтральных осколков:  $\text{CH}_2\text{CO}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , среди которых наибольшую высоту имеют пики ионов  $M_3^1$  и  $M_4^2$  (рис. 1). В спектре 5-метиланалога (рис. 2) все перечисленные пики смещены на 14 а.е.м. вверх по шкале масс. Значение массовых чисел ионов молекулярной серии показывает, что разложение ацетатов метилоксимов затрагивает все ацетоксильные группы молекулы, пики 125, 126, 143 обусловлены молекулярными ионами, потерявшими все четыре ОАс-группы. Выходы ионов молекулярного типа, потерявших 1—2 нейтральных осколка, незначительны, но среди них ион Р ( $M-59$ ) наибольший. Этот факт замечен и в спектрах соединений с более длинной углеродной цепью: гексозы (III) и гептозы (VI), в спектрах которых совсем нет пиков ионов  $M_1$ . Образование иона Р связано с потерей ОАс-радикала от С3-атома, так как соответствующий пик присутствует в спектрах всех изученных соединений, за исключением перацетата метилоксима 3-ОМе-глюкозы (X). Специфическое строение иона Р является причиной нового направления его разложения: потери  $\text{CHO}^+$  и  $\text{CH}_2\text{OH}$  от  $\text{NOMe}$ -заместителя С1-атома, что приводит к ионам, обозначенным W и Z соответственно. В масс-спектре пентозы они представлены пиками 259 и 256.

По направлению распада углеродной цепи метилоксимы более близки к полиолам, чем к нитрилам — соединениям, родственными метилоксимам. В спектрах последних имеются пики всех осколочных ионов моносахаридной цепи, за исключением самого тяжелого иона типа В, который

должен образовываться разрывом связи C1—C2. Если в продуктах разложения полиолов выходы ионов А- и В-типов одинаковы из-за симметрии молекул, то в случае нитрилов — явная асимметрия, доля ионов В-типа существенно больше, чем доля ионов А-типа [8, 9]. В спектрах нитрилов доминируют пики ионов 2В, а пики ионов 1А и 2А не найдены. Масс-спектры метилоксимов характеризуются пиками доминирующих ионов 2А, а среди ионов В-типа превалируют те из них, которые образуются разрывом C2—C3-связи. В случае пентозы это серия ионов 3В, из которых  $3В_2^+$  дает основной пик 115 в масс-спектре метилоксима (Ii) (рис. 1). В полном ионном токе метилоксимов суммарные доли ионов А и В сопоставимы в отличие от спектра нитрилов. Известна и другая крайность: в продуктах разложения диэтилдитиоацеталей [10] или 4,4-бис(ациламидо)-1-дезоксальдитолов [11] практически нет ионов В, и масс-спектры этих двух представителей ацетилированных ациклических производных моносахаридов состоят в основном из ионов 1А.

Такое резкое изменение в разложении полиацетоксильной цепи при изменении природы заместителя первого атома углерода связано с энергией ионизации этих соединений. Данных об энергии ионизации упомянутых производных моносахаридов нет, но эти характеристики простых молекул, близких по строению к заместителю первого атома углерода, известны (эВ): HCN (13,8),  $CH_3COOH$  (10,0), NO (9,2),  $CH_3SSCH_3$  (8,5) [12]. Энергия ионизации нитрильной группы значительно выше, чем эфирного атома кислорода ацетоксильной группы, а энергия ионизации NO-группы немного ниже. Отсюда в распределении дочерних ионов от иона  $M^+$  метилоксимов по содержанию избыточной энергии доля нитрозильных ионов ( $N^+O$ ) сопоставима с долей оксониевых ионов ( $CO^+Ac$ ). Разрыв углеродной цепи иона  $M^+$  нитрозильного типа приводит к первичным осколочным ионам типа А. При этом наибольший выход имеют двухуглеродные ионы серии 2А (разрыв C2—C3-связи), образование большей части которых протекает с перегруппировкой Мак-Лафферти, как у неацетилированных оксимов альдоз [13]. Доля оксониевых  $M^+$  обуславливает типичные осколки полиацетоксильной цепи — ионы типа В. Но в отличие от полиолов и нитрилов, где наибольший выход имеют ионы 2В, в спектрах метилоксимов наиболее высокие пики ионов этого типа обусловлены теми, которые образуются разрывом C2—C3-связи — от 2В для тетразы до 5В для гептозы. Еще более низкая энергия ионизации дитиоацеталей и диацетамидов приводит к сильной конкуренции за заряд с эфирным атомом кислорода ацетоксила, и как результат имеет разрыв связи C1—C2 с образованием иона 1А.

Таким образом, разница в энергии ионизации эфирного атома кислорода OAc-группы и заместителя C1-атома определяет вид распределения молекулярных ионов по содержанию избыточной энергии, а наибольшая доля  $M^+$  того или иного типа в этом распределении обуславливает доминирующий выход соответствующего типа первичных ионов. Доля  $M^+$  с зарядом на карбонильном атоме кислорода ацетила не зависит от природы заместителя C1-атома, а зависит от числа ацетильных групп в молекуле. Разрыв  $\alpha$ -связи в таких  $M^+$ -ионах приводит к образованию ацетоксониевого иона ( $CH_3CO^+$ ), а соответствующий пик 43, как правило, на порядок выше остальных пиков в масс-спектре. Причиной этого может быть высокое сечение ионизации карбонила и единственное направление разложения этой доли молекулярных ионов —  $\alpha$ -разрыв.

Принимая во внимание чувствительность распределения ионов серии М по содержанию избыточной энергии к локализации заряда, можно ожидать изменений в картине масс-спектров метилоксимов при изменении природы заместителя в полиацетоксильной цепи моносахарида. Такое изменение возникает при переходе к частично метилированным альдозам в анализе продуктов метилирования в виде ацетатов. Присутствие OMe-группы, чье сродство к электрону в два раза ниже, чем у ацетоксила [12], создает дополнительную конкуренцию за заряд. Значительная доля ионов  $M^+$ , имеющих заряд на атоме кислорода OMe-группы, определяет большой выход первичных осколков в результате

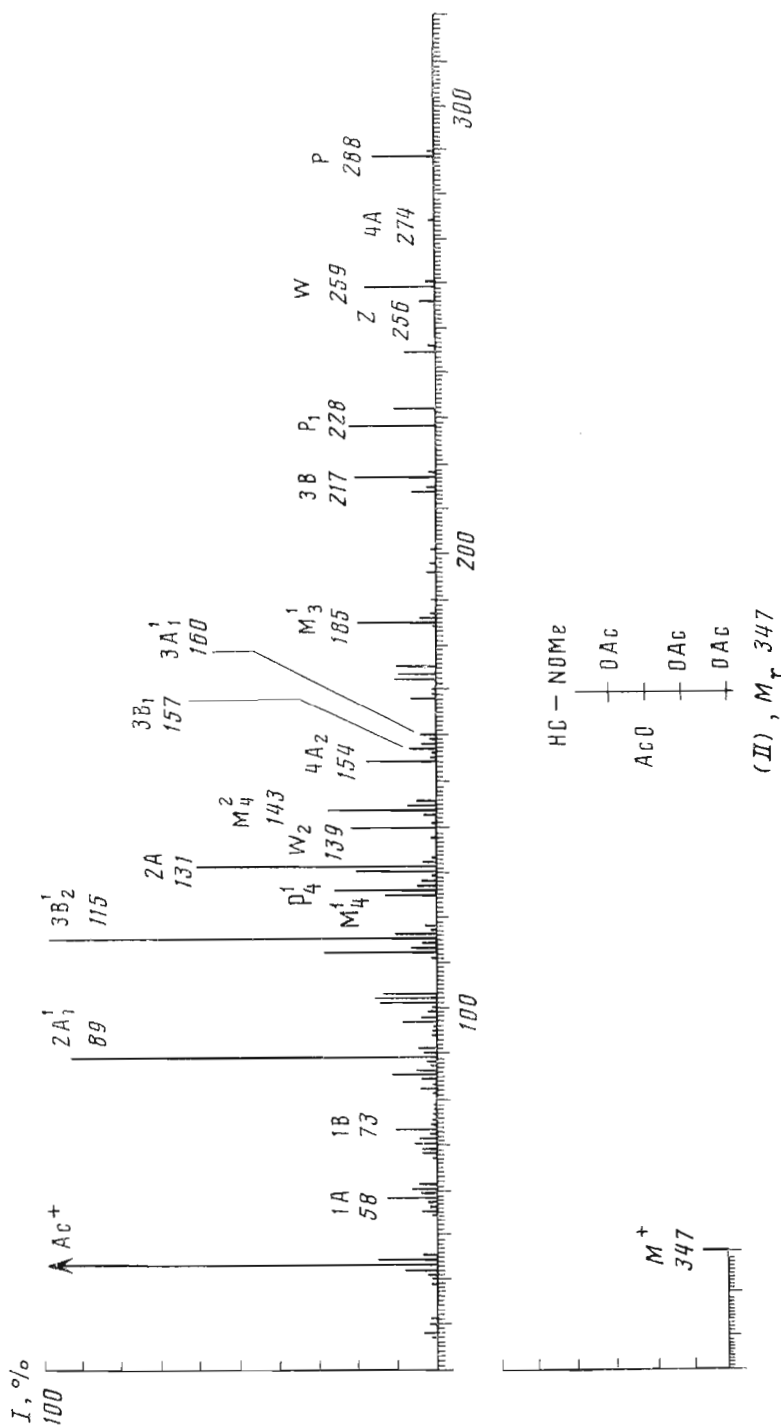


Рис. 1. Масс-спектр ацетата метилоксима D-ксилозы (II)

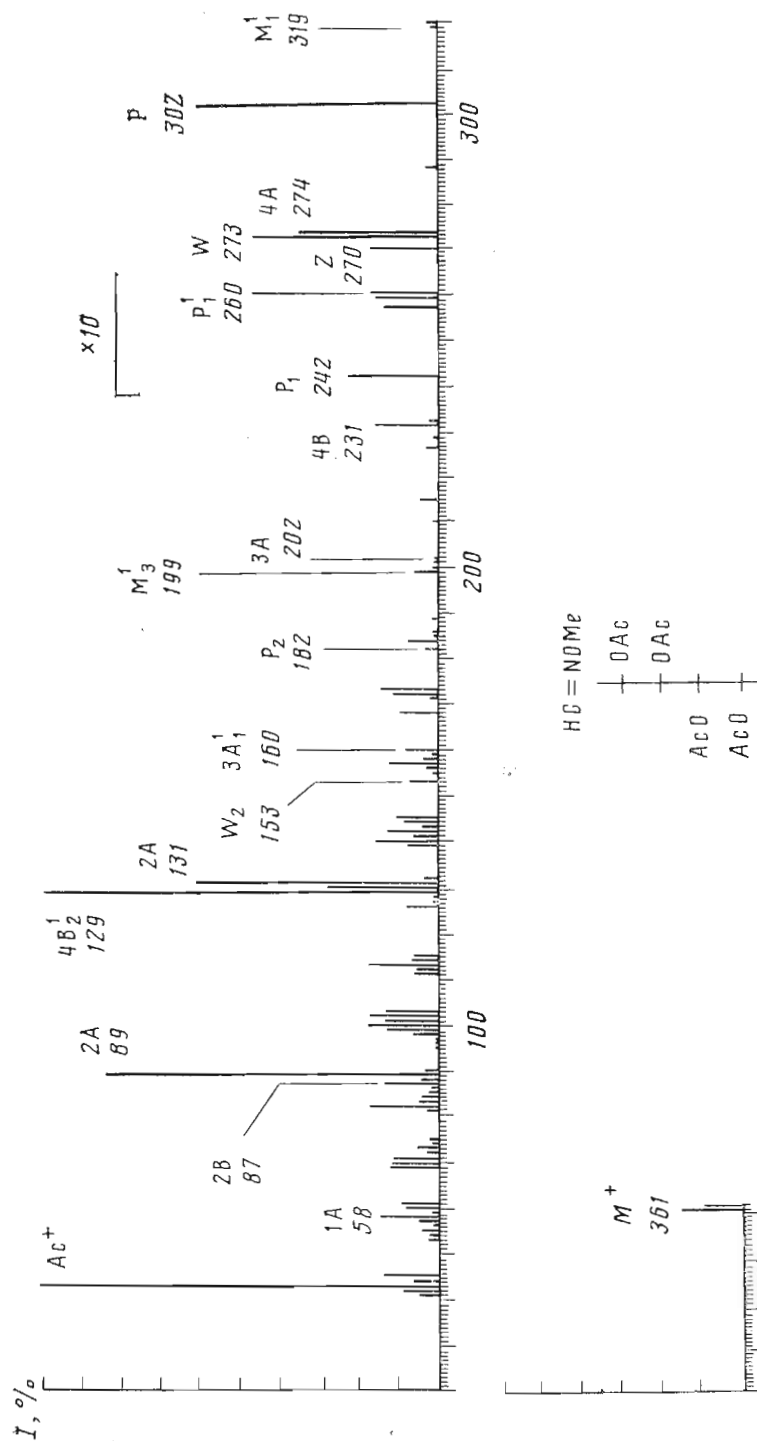


Рис. 2. Масс-спектр ацетата метилоксима рамнозы (VII)

**Значения массовых чисел ионов, характеризующих положение  
ОМе-группы в остатках монометилвых эфиров ацетатов  
метилоксимов гексоз**

| Тип иона             | Положение ОМе-группы (соединение) |                   |                           |                           |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | C6<br>(XII)                       | C4<br>(XI)        | C3<br>(X)                 | C2<br>(IX)                |
| 1A                   | 58                                | 58                | —                         | —                         |
| 4B                   | 261, 159, 117, 99                 | 261, 159, 117, 99 | 261, 201, 159,<br>141, 99 | 289, 187, 145,<br>127, 85 |
| 2A                   | 131, 130, 89                      | 131, 130, 89      | —                         | 103, 102, 72              |
| 3B                   | —                                 | 189, 129, 97      | —                         | —                         |
| 3A                   | —                                 | —                 | 174, 132                  | —                         |
| 2B                   | —                                 | —                 | —                         | —                         |
| 4A                   | +                                 | 246, 186, 126     | —                         | —                         |
| 1B                   | 45                                | —                 | —                         | —                         |
| 5A                   | +                                 | +                 | —                         | —                         |
| P, 332               | +                                 | +                 | —                         | +                         |
| W, 303               | +                                 | +                 | —                         | +                         |
| Z, 300               | +                                 | +                 | —                         | +                         |
| M <sup>+</sup> , 391 | +                                 | +                 | —                         | +                         |
| M+H, 392             | —                                 | —                 | +                         | +                         |

$\alpha$ -разрыва углеродной цепи. Это обстоятельство и объясняет уменьшение числа пиков первичных ионов и увеличение их высоты в масс-спектрах метиловых эфиров полиолов и нитрилов. Аналогичная картина обнаружена при переходе от метилоксима глюкозы к метилоксимам ее метиловых эфиров (IX)–(XII), за тем исключением, когда NОМе-группа успешно конкурирует за заряд с ОМе-группой при определенных расстояниях между ними.

Основные данные из масс-спектров ацетатов метилоксимов монометилвых эфиров гексоз сведены в таблицу. Приведены массовые числа ионов, которым в спектрах соответствуют пики наибольшей интенсивности. Присутствие в спектре невысоких пиков первичных ионов и ионов молекулярного типа отмечено знаком «+». Спектр метилоксима ацетата 6-ОМе-эфира (XII) отличается от спектра неметилованного аналога (III) смещением к меньшим массам на 28 а.е.м. пиков ионов молекулярного типа и иона 1B. Вместе с появлением пика  $m/z$  45 высокой интенсивности (ион 1B) эти данные однозначно определяют положение ОМе-группы. Спектр 4-ОМе-эфира (XI) характеризуется высокими пиками ионов 3B и 4A, которые образуются разрывом  $\alpha$ -связи к O<sup>+</sup>Ме-группе. Особое положение в ряду монометилвых эфиров занимает 3-ОМе-производное (X). Наиболее слабая в метилоксимах связь C2–C3 оказывается в  $\alpha$ -положении к атому кислорода, несущему заряд, и разрывается поэтому с высокой скоростью. Результирующие ионы 4B составляют для соединения (X) более 80% полного ионного тока. Разрыв альтернативной  $\alpha$ -связи (C3–C4) приводит к образованию иона 3A, который дает в спектре заметные пики 174 и 132, что еще раз указывает на положение ОМе-группы. Отсутствие ОАс-группы при C3-атоме является причиной того, что при распаде 3-ОМе-эфира (X) не образуются ионы молекулярного типа: P, W, Z. Расположенные рядом две группы NОМе и ОМе с низкой по сравнению с ОАс-группой энергией ионизации определяют доминирующий выход ионов 2A, которые в спектре 2-ОМе-эфира (IX) дают высокие пики 103, 102, 72. Локализация заряда на эфирных атомах кислорода ОАс-групп обуславливает образование ионов 4B, которые дают в спектре заметные пики 289, 187, 145, 127.

Близкие электронные свойства ОМе- и NНАс-групп определяют идентичность спектров 2-ОМе-эфира (IX) и 2-ацетамидного производного (XIII), за тем исключением, что в спектре последнего пики ионов молекулярного типа и иона 2A смещены на 27 а.е.м. в сторону больших масс и нет пиков ионов W и Z (рис. 3). Ацетат метилоксима глюкозамина (XIII), таким образом, можно определить по масс-спектру благодаря вы-

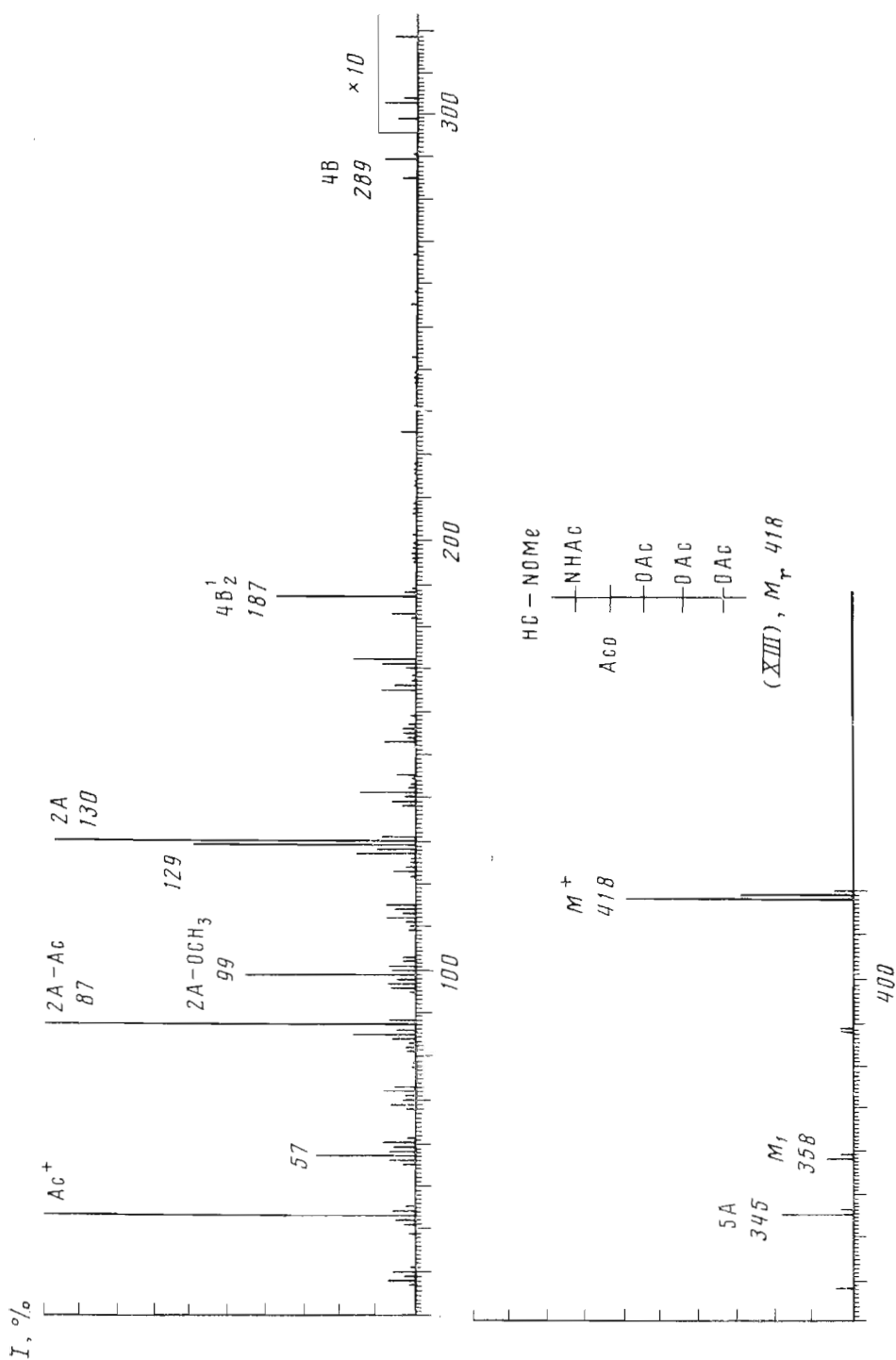


Рис. 3. Масс-спектр ацетата метилоксима 2-ацетамидо-2-дезоксип-D-глюкозы (XIII)

соким пикам иона 2A: 130, 129, 99, 87, 57 и пику 418 молекулярного иона.

Отсутствие на C2-атоме в метилоксиме 2-дезоксирибозы (VIII) группы, обладающей индуктивным эффектом, обеспечивает повышенную прочность C1—C2- и C2—C3-связей углеродной цепи моносахарида. В результате электронного удара подавляющая доля ионного тока для соединения (VIII) приходится на ионы молекулярного типа:  $M^+ + H$ ,  $M_1$ ,  $M_2^+$ ,  $M_2$ ,  $M_3^+$ ,  $P$ ,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $W$ ,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $Z$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2^+$ , среди которых ион  $M_3^+$  дает основной пик  $m/z$  127 в масс-спектре. Осколочные ионы углеродной цепи представлены ионами обоих типов, но большую долю составляют ионы A-типа:  $4A_1^+$ ,  $3A$ ,  $4A_2^+$ ,  $3A_1^+$ , среди которых два последних имеют наибольшую интенсивность. Ионы типа B представлены в масс-спектре пиками ионов 2B и 1B.

Таким образом, масс-спектры ацетатов метилоксимов альдоз, дезоксиальдоз и аминсахаров характеристичны и позволяют идентифицировать их в сложных смесях с помощью техники хроматомасс-спектрометрии.

### Экспериментальная часть

Масс-спектры записаны на приборе LKB-9000 с вводом образцов через колонки (0,4×200 см), заполненные 1,5% НПГС на хроматоне N-AW-DMCS (100–120 меш) или 3% QF-1 на Supelcoport (100–120 меш). Температура источника ионов, сепаратора и испарителя поддерживалась равной 250°С, колонки — от 150 до 230°С с программированием 5 град/мин, расход гелия 30 мл/мин, ионизирующее напряжение 70 В. Ацетаты метилоксимов получены способом, описанным в работах [4, 7].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Loonngren J. Chem. Commun., Stockholm Univ., 1976, p. 8.
2. Lehrfeld J. Anal. Chem., 1984, v. 56, № 11, p. 1803–1806.
3. Guerrant G. O., Moss C. W. Anal. Chem., 1984, v. 56, № 4, p. 633–638.
4. Neeser J.-R., Scheizer T. F. Anal. Biochem., 1984, v. 142, № 1, p. 58–67.
5. Laine R. A., Sweely C. C. Carbohydr. Res., 1973, v. 27, p. 199–213.
6. Schweer H. J. Chromatogr., 1982, v. 236, № 1, p. 355–368.
7. McWinney T. P. Carbohydr. Res., 1979, v. 75, p. C21–C23.
8. Головкина Л. С., Чижов О. С., Вульфсон Н. С. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1963, с. 1915–1925.
9. Szafraniek J., Pfaffenberger C. D., Horning E. C. Carbohydr. Res., 1974, v. 38, p. 97–105.
10. De Jongh D. C. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 15, p. 3149–3157.
11. Matulewicz M. C., Cerezo A. S. Org. Mass Spectrom., 1979, v. 14, № 11, p. 593–595.
12. Rosenstock H. M., Draxl K., Steiner B. W., Herron J. T. Energetics of Gaseous Ions, J. Physical and Chemical Reference Data, v. 6, Supplement 1, 1977.
13. Finch P., Merchant Z. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1975, p. 1682–1686.

Поступила в редакцию  
24.VI.1985

### IDENTIFICATION OF SUGARS AS O-METHYL OXIME ACETATES BY MASS SPECTROMETRY

ELKIN Yu. N., SURITZ V. B.

*Pacific Bioorganic Chemistry Institute, Far East Scientific Centre,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Mass spectra of aldoses, O-monomethyl aldoses, deoxyaldoses, and hexosamine as O-methyl oxime acetates have been studied. The major fragmentation pathways are discussed in terms of influence of the C1-substituent electronproperties on decomposition of molecular ions. The spectra are useful in verifying type of monosaccharides, position of deoxy and methoxy groups in the carbon chain.