

**Massenspektrometrische Methode zur Bestimmung der
¹³C-Einbaurate und -position in Äpfelsäure
bei der CO₂-Aufnahme von CAM-Pflanzen**

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs

genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur Robert Koob

aus Bensheim

Berichterstatter:	Professor Dr. J. J. Veith
Mitberichterstatter:	Professor Dr. H. J. Lindner
Tag der Einreichung:	31.07.2000
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2000

Darmstadt 2000

D 17

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. J. J. Veith
in der Zeit von August 1995 bis Juli 2000
am Institut für Organische Chemie
der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt.

Verzeichnis der Abkürzungen und Variablen

CAM:	Crassulaceen-Säuremetabolismus (crassulacean acid metabolism)
m/z :	Masse-zu-Ladungsverhältnis
IR-MS:	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (isotope ratio mass spectrometry)
ID-MS:	Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (isotope dilution mass spectrometry)
GC:	Gaschromatographie
MS:	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
GC-MS:	Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung
GC-C-MS:	Gas chromatography combustion mass spectrometry
EI:	Elektronenstoß-Ionisation (electron impact)
CI:	Chemische Ionisation (chemical ionisation)
FD:	Felddesorption (field desorption)
FAB:	Fast atom bombardment
ESI:	Elektrospray-Ionisation (electrospray ionisation)
MALDI:	Matrix-assisted laser desorption/ionisation
TIC:	Totalionenstrom (total ion current)
rel. Int.	Relative Intensität
CID:	Stoßaktivierter Zerfall (collision-induced dissociation)
STAW:	Standardabweichung
MSTFA:	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid
BSA:	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
TMS:	Trimethylsilyl
TMS-Äpfelsäure:	Tris(trimethylsilyl)äpfelsäure
SEV:	Sekundärelektronen-Vervielfacher
RT:	Raumtemperatur
LM:	Lösungsmittel
Ether:	Diethylether
t_R :	Retentionszeit

- Unmarkierte Äpfelsäure: Äpfelsäure mit der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente.
- Markierte Äpfelsäure: Äpfelsäure, die positionsspezifisch markiert wurde.
- Biologisch markierte Äpfelsäure: Äpfelsäure, die im Pflanzen-Experiment mit $^{13}\text{CO}_2$ markiert wurde.

Definition verwendeter Variablen

Zur Beschreibung der relativen PRozentualen Konzentrationsanteile der s-fach positionsspezifisch markierten Äpfelsäuren einer Mischung ($\Sigma = 100\%$) wurde folgende Kennzeichnung gewählt:

PRsfach

- | | |
|---------|--|
| PR0fach | Prozentuale Konzentration unmarkierter Äpfelsäure |
| PR1fach | Prozentuale Konzentration 1-fach markierter Äpfelsäure |
| PR2fach | Prozentuale Konzentration 2-fach markierter Äpfelsäure |
| PR3fach | Prozentuale Konzentration 3-fach markierter Äpfelsäure |
| PR4fach | Prozentuale Konzentration 4-fach markierter Äpfelsäure |

Die Äpfelsäuren werden hierbei noch nach den Positionen der Markierung untergliedert:

PRp

- | | |
|------|---|
| PR0 | Prozentuale Konzentration unmarkierter Äpfelsäure (= PR0fach) |
| PR1 | Prozentuale Konzentration der [1- ^{13}C]Äpfelsäure |
| PR2 | Prozentuale Konzentration der [2- ^{13}C]Äpfelsäure |
| PR3 | Prozentuale Konzentration der [3- ^{13}C]Äpfelsäure |
| PR4 | Prozentuale Konzentration der [4- ^{13}C]Äpfelsäure |
| PR12 | Prozentuale Konzentration der [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |
| PR13 | Prozentuale Konzentration der [1,3- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |
| PR14 | Prozentuale Konzentration der [1,4- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |
| PR23 | Prozentuale Konzentration der [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |
| PR24 | Prozentuale Konzentration der [2,4- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |
| PR34 | Prozentuale Konzentration der [3,4- $^{13}\text{C}_2$]Äpfelsäure |

PR123	Prozentuale Konzentration der [1,2,3- ¹³ C ₃]Äpfelsäure
PR124	Prozentuale Konzentration der [1,2,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure
PR134	Prozentuale Konzentration der [1,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure
PR234	Prozentuale Konzentration der [2,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure
PR1234	Prozentuale Konzentration der [1,2,3,4- ¹³ C ₄]Äpfelsäure

Zur Kennzeichnung der s-fach markierten Äpfelsäuren, die in 1-Position eine Markierung tragen oder nicht, wurden folgende Variablen eingeführt:

PR1f1m	<u>P</u> rozentuale Konzentration <u>1</u> -f <u>a</u> ch markierter Äpfelsäuren, die in <u>1</u> -Position markiert sind. = PR1
PR1fn1m	<u>P</u> rozentuale Konzentration <u>1</u> -f <u>a</u> ch markierter Äpfelsäuren, die <u>n</u> icht in <u>1</u> -Position markiert sind. = PR2 + PR3 + PR4

Entsprechend:

PR2f1m	= PR12 + PR13 + PR14
PR2fn1m	= PR23 + PR24 + PR34
PR3f1m	= PR123 + PR134 + PR124
PR3fn1m	= PR234

Die relative Intensität eines Ions bei $m/z = m$ ist folgendermaßen gekennzeichnet:

$$\text{Int}(m)$$

Die Intensitätsverhältnisse (R) der Produkt-Ionen B und C des Vorläufer-Ions A sind wie folgt definiert:

$$R(m_B, m_C)_{m_A} = \text{Int}(m_B) / \text{Int}(m_C)$$

Im Text sind arabische Zahlen in eckigen Klammern Literaturhinweise, z. B. [56].

Nummern von Verbindungen sind fett gedruckt. Ionen sind durch fett gedruckte Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Variablen

Inhaltsverzeichnis

A Theoretischer Teil

1	Einleitung	1
1.1	CAM-Pflanzen	1
1.2	Methoden zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen	3
2	Problemstellung.....	6
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Sektorfeld-Massenspektrometer.....	7
3.2	Ionenfallen-Massenspektrometer	7
3.2.1	Die Ionenfalle als Massenanalysator.....	10
3.2.1.1	Mass-selective instability scan.....	10
3.2.1.2	Resonant ejection	11
3.2.1.3	Tandem-Massenspektrometrie in Ionenfallen.....	12
4	Ergebnisse und Diskussion.....	14
4.1	Derivatisierung der Äpfelsäure (1)	14
4.2	Fragmentierungsreaktionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1).....	15
4.2.1	Isotopenmarkierungen der Äpfelsäure (1).....	17
4.2.2	Isotopenmarkierungen im Derivatisierungsreagenz	19
4.2.3	Summenformeln der Fragment-Ionen.....	20
4.2.4	Metastabile Ionen.....	21
4.2.5	Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1).....	21
4.3	Isotopen-Einbauratenbestimmung aus Massenspektren	23
4.3.1	Das Massenspektrum zur ¹³ C-Einbauratenbestimmung in Äpfelsäure (1)	27

4.3.2	Untersuchung verschiedener Mischungen	28
4.3.3	Berechnung positionsspezifischer Konzentrationsanteile	34
4.3.4	Ergebnisse zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung aus Massenspektren	38
4.4	Tandem-Massenspektrometrie zur Bestimmung der positionsspezifischen ^{13}C -Einbauraten in Äpfelsäure (1)	39
4.4.1	Auswahl geeigneter Vorläufer-Ionen.....	39
4.4.2	Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen-Signale	44
4.4.3	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 1-fach markierten Äpfelsäuren	50
4.4.3.1	Vorläufer-Ion b (m/z 336).....	50
4.4.3.2	Vorläufer-Ion d (m/z 308) und c (m/z 234).....	51
4.4.4	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 2-fach markierten Äpfelsäuren.....	52
4.4.4.1	Vorläufer-Ion b (m/z 337).....	52
4.4.4.2	Vorläufer-Ion d (m/z 308) und c (m/z 234).....	53
4.4.4.3	Vorläufer-Ionen d (m/z 309) und c (m/z 235)	54
4.4.5	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 3-fach markierten Äpfelsäuren.....	54
4.4.5.1	Vorläufer-Ionen b (m/z 338).....	54
4.4.5.2	Vorläufer-Ionen d (m/z 310) und c (m/z 236).....	55
4.4.6	Untersuchung verschiedener Mischungen.....	55
4.4.7	Berücksichtigung des natürlichen Isotopengehalts.....	60
4.4.7.1	Zusammensetzung der Vorläufer-Ionen	61
4.4.7.2	Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W	66
4.4.7.3	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung aus korrigierten Intensitätsverhältnissen der Produkt-Ionen.....	71
4.5	Bestimmung der ^{13}C -Einbaurate und -position in Äpfelsäure (1)	74
4.5.1	Bestimmung der Konzentrationsanteile s-fach markierter Äpfelsäuren.....	75
4.5.2	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 1-fach markierten Äpfelsäuren	75
4.5.3	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 2-fach markierten Äpfelsäuren	76

4.5.4	Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 3-fach markierten Äpfelsäuren	76
4.5.5	Untersuchung verschiedener Mischungen	78
4.6	Biologische Proben	82
4.6.1	^{13}C -Gesamteinbauraten	82
4.6.2	1-fach markierte Äpfelsäuren	83
4.6.3	2-fach markierte Äpfelsäuren	84
4.6.4	3-fach markierte Äpfelsäuren	84
5	Zusammenfassung	89
6	Synthese isopenmarkierter Äpfelsäuren	91
6.1	$[1-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[1-^{13}\text{C}]1$), $[2-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[2-^{13}\text{C}]1$), $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,4-^{13}\text{C}_2]1$), $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Äpfelsäure ($[1,3,4-^{13}\text{C}_3]1$)	91
6.2	$[3-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[3-^{13}\text{C}]1$).....	93
6.3	$[4-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[4-^{13}\text{C}]1$).....	94
6.4	$[3-^2\text{D}]$ Äpfelsäure ($[3-^2\text{D}]1$).....	95
6.5	$[2-^2\text{D}]$ Äpfelsäure ($[2-^2\text{D}]1$)	95
7	Interpretation des Massenspektrums der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)	96
7.1	Zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung geeignete Fragment-Ionen.....	96
7.1.1	Bildung des Fragment-Ions b (m/z 335)	96
7.1.2	Bildung des Fragment-Ions g (m/z 319)	96
7.1.3	Bildung des Fragment-Ions d (m/z 307)	98
7.1.4	Bildung des Fragment-Ions e (m/z 265).....	99
7.1.5	Bildung des Fragment-Ions f (m/z 263)	99
7.1.6	Bildung des Fragment-Ions h (m/z 245)	100
7.1.7	Bildung des Fragment-Ions c (m/z 233).....	101
7.1.8	Bildung des Fragment-Ions i (m/z 191)	102
7.1.9	Bildung des Fragment-Ions j (m/z 189).....	103
7.2	Zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung nicht geeignete Fragment-Ionen.....	103
7.2.1	Das Molekül-Ion a (m/z 350).....	103

7.2.2	Die Fragment-Ionen bei m/z 221, 149, 147 und 73	103
7.2.2.1	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 221	104
7.2.2.2	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 147 und 149	104
7.2.2.3	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 73	106
7.2.3	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 260	106
7.2.4	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 217	107
7.2.5	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 175	109
7.2.6	Bildung des Fragment-Ions bei m/z 101	110
8	Berechnung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren	111
8.1	Vorläufer-Ion b (m/z 336).....	111
8.1.1	Fragmentierung des Ions b (m/z 336) nach d (m/z 307 und m/z 308).....	111
8.1.2	Fragmentierung des Ions d (m/z 308) nach e (m/z 263 und m/z 264)	113
8.1.3	Fragmentierung des Ions d (m/z 308) nach f (m/z 265 und m/z 266).....	113
8.2	Vorläufer-Ion b (m/z 337).....	115
8.3	Vorläufer-Ion b (m/z 338).....	118
8.4	Vorläufer-Ion d (m/z 308).....	121
8.5	Vorläufer-Ion c (m/z 234)	123
9	Automatisierung der ^{13}C-Einbauratenberechnung	125
B	Experimenteller Teil	128
1	Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1).....	129
2	Synthese isotopenmarkierter Äpfelsäuren	130
2.1	[1- ^{13}C]Äpfelsäure ([1- ^{13}C] 1).....	130
2.1.1	Formylessigester-Natriumsalz (8).....	130
2.1.2	3-[^{13}C]Cyano-3-hydroxypropansäureethylester ([4- ^{13}C] 9).....	130
2.1.3	[1- ^{13}C]Äpfelsäure ([1- ^{13}C] 1).....	130
2.2	[2- ^{13}C]Äpfelsäure ([2- ^{13}C] 1).....	131

2.2.1	[3- ¹³ C]Formylessigester-Natriumsalz ([3- ¹³ C] 8).....	131
2.2.2	3-Cyano-3-hydroxy-[3- ¹³ C]propansäureethylester ([3- ¹³ C] 9).....	131
2.2.3	[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C] 1).....	131
2.3	[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂] 1).....	132
2.3.1	[1- ¹³ C]Essigsäureethylester ([1- ¹³ C] 7)	132
2.3.2	[1- ¹³ C]Formylessigester-Natriumsalz [1- ¹³ C] 8	132
2.3.3	3-[¹³ C]Cyano-3-hydroxy-[1- ¹³ C]propansäureethylester ([1,4- ¹³ C ₂] 9).....	132
2.3.4	[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂] 1).....	132
2.4	[1,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([1,2,3- ¹³ C ₃] 1).....	133
2.4.1	[1,2- ¹³ C ₂]Essigsäureethylester ([1,2- ¹³ C ₂] 7)	133
2.4.2	[1,2- ¹³ C ₂]Formylessigester-Natriumsalz [1,2- ¹³ C ₂] 8	133
2.4.3	3-[¹³ C]Cyano-3-hydroxy-[1,2- ¹³ C ₂]propansäureethylester ([1,2,4- ¹³ C ₃] 9)	133
2.4.4	[1,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([1,3,4- ¹³ C ₃] 1).....	134
2.5	[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C] 1).....	134
2.5.1	[3- ¹³ C]Oxalessigsäurediethylester-Natriumsalz (13)	134
2.5.2	[3- ¹³ C]Äpfelsäurediethylester (14)	134
2.5.3	[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C] 1).....	135
2.6	[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C] 1).....	135
2.6.1	3-Chlor-2-hydroxypropansäure (16).....	135
2.6.2	3-[¹³ C]Cyano-2-hydroxypropansäure (17).....	136
2.6.3	[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C] 1).....	136
2.7	[2-D]Äpfelsäure ([2-D] 1)	137
2.8	[3-D ₂]Äpfelsäure [[3-D ₂] 1).....	137
3	Massenspektren der [D₂₇]TMS-Derivate	138
4	Hochauflösungsmessungen	140
4.1	Hochauflösungsmessungen der TMS-derivatisierten Äpfelsäure (TMS- 1).....	140
4.2	Hochauflösungsmessungen der [D ₂₇]TMS-derivatisierten Äpfelsäure ([D ₂₇]TMS- 1).....	141

5	Massenspektren metastabiler Ionen.....	141
6	Äpfelsäuremischungen	145
7	¹³C-Einbauratenbestimmung.....	146
7.1	Mischung A.....	146
7.2	Mischung B.....	147
7.3	Mischung C.....	147
7.4	Mischung D.....	147
7.5	Mischung E.....	148
7.6	Mischung F.....	148
7.7	Mischung G.....	148
7.8	Mischung H.....	150
7.9	Mischung I.....	150
7.10	Mischung J.....	151
7.11	Mischung K.....	152
7.12	Mischung L.....	154
7.13	Mischung M.....	154
7.14	Mischung N.....	155
7.15	Mischung O.....	155
7.16	Mischung P.....	156
7.17	Mischung Q.....	157
7.18	Mischung R.....	158
7.19	Mischung S.....	159
7.20	MS/MS-Referenzmessungen unmarkierter TMS-Äpfelsäure (TMS-1)	160
8	Biologische Proben.....	161
8.1	Clusia minor I.....	161
8.2	Clusia minor II.....	161
8.3	Clusia minor III.....	163
8.4	Kalanchoe pinnata I.....	164
8.5	Kalanchoe pinnata II.....	165

9	Produkt-Ionen-Spektren	167
----------	-------------------------------------	------------

	Literaturverzeichnis.....	174
--	----------------------------------	------------

Anhang

I	Massenspektren isotopenmarkierter TMS-Äpfelsäuren
II	Verschiebung der Ionensignale isotopenmarkierter TMS-Äpfelsäuren
III	¹³ C-Einbauratenbestimmung der Mischungen C bis H und K über Massenspektren
IV	Produkt-Ionen-Spektren
V	Natürliche Häufigkeit der Isotopomere charakteristischer Fragment-Ionen unmarkierter und positionsspezifisch markierter TMS-Äpfelsäuren
VI	Korrektur der Intensitätsverhältnisse

Danksagung

Abriß des Lebens- und Bildungsganges

Eidesstattliche Erklärung