

Hochauflösungs-Massenspektren von Penicillin-Derivaten*,**

Von

W. Richter und K. Biemann

Aus dem Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, Massachusetts, USA.

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 19. März 1964)

Die Massenspektren der Methylester von Penicillin G und Penicillin V, aufgenommen mit einem doppeltfokussierenden Spektrometer, werden diskutiert. Die mit diesem Instrument erzielbare hohe Auflösung ermöglicht die Bestimmung der genauen Masse und dadurch der Elementarzusammensetzung aller gebildeten Fragment-Ionen, was für die Interpretation der Spektren von Molekülen, die viele Heteroatome enthalten, sehr wichtig ist. Die daraus gezogenen Schlußfolgerungen werden für die Interpretation des konventionellen Massenspektrums von 6-Chlorpenicillansäuremethylester benutzt.

In den letzten Jahren ist die Massenspektrometrie eine der wichtigen Methoden der organischen Chemie geworden und hat sich vor allem in der Strukturaufklärung von Naturstoffen vielfach bewährt. Zahlreiche Verbindungsklassen sind bisher massenspektrometrisch untersucht worden, und zusammenfassende Ergebnisse über Lipoide¹, Aminosäuren^{2, 3}, Peptide^{2, 3}, Alkaloide^{4, 5}, Steroide^{5, 6} etc. zeigen die vorteilhafte Anwendung dieser Methode deutlich auf.

* Herrn Professor Dr. *Erich Hayek* zum 60. Geburtstag gewidmet.

** 20. Mitt. der Reihe „Anwendung der Massenspektrometrie auf Strukturprobleme“. 19. Mitt.: *P. Bommer, W. McMurray und K. Biemann*, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 1439 (1964).

¹ *R. Ryhage und E. Stenhagen*, in: *F. W. McLafferty*, (ed.), *Acad. Press*, New York, 1963, p. 399.

² *K. Biemann*, *Chimia* [Basel] **14**, 393 (1960).

³ *K. Biemann*, „*Mass Spectrometry*“, McGraw-Hill, New York, 1962, Kap. 7.

⁴ *Ibid.*, Kap. 8.

⁵ *C. Djerassi*, *Pure Appl. Chem.* **6**, 575 (1963).

⁶ *S. Bergström, R. Ryhage und E. Stenhagen*, *J. Lipid Res.* **1**, 361 (1960).

Alle diese Ergebnisse waren mit mehr oder weniger konventionellen, nämlich einfach-fokussierenden Instrumenten erhalten worden. Geräte dieser Art erlauben die Auftrennung der durch Elektronenbeschuß gebildeten Fragment-Ionen bis zu den sogenannten Nominalmassen, d. h. Bruchstücken mit Massendifferenzen einer vollen Masseneinheit. Dies genügt vielfach für die Interpretierung von Spektren, da die Kenntnis der Nominalmasse meistens die Identifizierung der einzelnen Bruchstücke zuläßt. Für relativ einfache Moleküle zwar recht zuverlässig, sind die so erzielten Ergebnisse bei komplizierteren, viele Heteroatome enthaltenden Strukturen bereits unsicher, und eine Interpretation, gestützt auf Spektren isotoopenmarkierter Analoga oder wenigstens geeignet substituierter Derivate, ist erforderlich. Ein Vorgehen dieser Art ist besonders im ersten Fall kostspielig und natürlich zeitraubend, falls, wie in den meisten Fällen, diese Vergleichsverbindungen zu diesem Zweck erst synthetisiert werden müssen, und ist darüber hinaus nicht frei von Fehlerquellen. Die Einführung neuer Substituenten kann z. B. zur Änderung des Fragmentierungsvorganges führen.

Eine Interpretation von Massenspektren, die mit einem *doppelt*-fokussierenden Gerät, dessen Auflösungsvermögen dasjenige der *einfach*-fokussierenden Instrumente um das ca. 20fache übertrifft, erhalten werden, ist wesentlich sicherer. Wie erstmalig von *J. H. Beynon*^{7, 8} gezeigt werden konnte, läßt sich damit in der Massenbestimmung eine Genauigkeit erreichen, die gestattet, die vollständige Elementarzusammensetzung der einzelnen Fragment-Ionen abzuleiten. Die Kenntnis derselben erlaubt, den durch Elektronenbeschuß ausgelösten Fragmentierungsvorgang des betreffenden Moleküls in viel konkreterer Form vorzuschlagen, als es auf der Basis eines konventionellen Massenspektrums möglich wäre. Darüber hinaus ermöglicht das hohe Auflösungsvermögen die Auftrennung und damit das Erkennen von Fragmenten gleicher Nominalmasse, jedoch verschiedener Elementarzusammensetzung.

Da die An- und Abwesenheit von Heteroatomen für kleine, jedoch meßbare Massenunterschiede verantwortlich ist (Beispiele dafür können der Tab. 1 entnommen werden), bietet die „Hochauflösungs-Massenspektrometrie“ bedeutende Vorteile bei der Untersuchung von Verbindungen mit vielen und verschiedenen Heteroatomen, wohingegen für das andere Extrem, nämlich für Kohlenwasserstoffe, wenig Gewinn zu erwarten ist, es sei denn für die Differenzierung zwischen C_mH_n und $C_{m+1}H_{n-12}$ (Massenunterschied 0,0939 ME).

⁷ *J. H. Beynon*, „Mass Spectrometry and Its Application to Organic Chemistry“, Elsevier, Amsterdam, 1960.

⁸ *J. H. Beynon*, in: *J. D. Waldron* (ed.), „Advances in Mass Spectrometry“, S. 328—354, Pergamon Press, London, 1959.

Im Zuge einer Untersuchung von Penicillinderivaten, deren Massenspektren mit Hilfe eines einfach-fokussierenden Gerätes aufgenommen worden waren, ließ sich ein Teil der Fragmente ohne Schwierigkeit inter-

Tabelle 1

Penicillin-G-Methylester (I)			Ion	Penicillin-V-Methylester (II)		
Masse (gef.)	Elementar-Zusammens.	Δ mME *		Masse (gef.)	Elementar-Zusammens.	Δ mME *
75,0274	C ₈ H ₇ S	0.6	Q	75,0263	C ₈ H ₇ S	— 0.5
			O	77,0361	C ₆ H ₅	— 0.2
87,0275	C ₄ H ₇ S	0.7	P	87,0261	C ₄ H ₇ S	— 0.7
91,0554	C ₇ H ₇	0.7	L			
			L	107,0493	C ₇ H ₇ O	— 0.4
			N	94,0421	C ₆ H ₆ O	0.2
114,0373	C ₅ H ₈ NS	— 0.4	A ₃	114,0380	C ₅ H ₈ NS	0.2
114,0664	C ₆ H ₁₀ O ₂	— 1.6	D	114,0690	C ₆ H ₁₀ O ₂	0.9
116,0355	C ₄ H ₆ NO ₃	0.8	G	116,0340	C ₄ H ₆ NO ₃	— 0.7
116,0534	C ₅ H ₁₀ NS	0.1	F ₁			
118,0431	C ₈ H ₆ O	1.3	J			
118,0644	C ₈ H ₈ N	— 1.3	K			
128,0704	C ₆ H ₁₀ NO ₂	— 0.7	I ₁	128,0706	C ₆ H ₁₀ NO ₂	— 0.5
142,0331	C ₆ H ₈ NOS	0.5	B ₂	142,0324	C ₆ H ₈ NOS	— 0.2
160,0761	C ₁₀ H ₁₀ NO	— 0.1	F ₂			
			B ₂	176,0685	C ₁₀ H ₁₀ NO ₂	— 2.7
173,0507	C ₇ H ₁₁ NO ₂ S	— 0.3	B ₁	173,0501	C ₇ H ₁₁ NO ₂ S	— 1.0
174,0582	C ₇ H ₁₂ NO ₂ S	— 0.6	B	174,0582	C ₇ H ₁₂ NO ₂ S	— 0.6
175,0627	C ₁₀ H ₉ NO ₂	— 0.5	C			
			C	191,0575	C ₁₀ H ₉ NO ₃	— 0.8
187,0649	C ₈ H ₁₃ NO ₂ S	— 1.8	H ₁	187,0688	C ₈ H ₁₃ NO ₂ S	2.1
187,0870	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O	— 0.1	A ₂			
			A ₂	203,0825	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	0.5
193,0534	C ₁₀ H ₁₁ NOS	— 2.6	I			
			I	209,0525	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂ S	1.5
230,0699	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	— 2.6	H			
234,0940	C ₁₃ H ₁₆ NOS	— 1.2	F			
				250,0897	C ₁₃ H ₁₆ NO ₂ S	— 0.4
261,1053	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ OS	— 0.7	A ₁			
			A ₁	277,1032	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₃ S	2.2
274,0958	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₄	0.5	E			
289,1021	C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₂ S	1.1	A			
			A	305,0971	C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₃ S	1.1
348,1120	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	— 2.3	M			
			M	364,1067	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	— 2.5

* Differenz in Millimasseneinheiten zwischen dem gefundenen Wert (Kolonne 1) und der für die Zusammensetzung (Kolonne 2) berechneten Masse.

pretieren, während andere, nicht unbedeutende Bruchstücke sich einer eindeutigen Zuordnung entzogen. In der Anwendung der Massenspektrometrie auf Probleme der organischen Chemie, in diesem Falle auf die

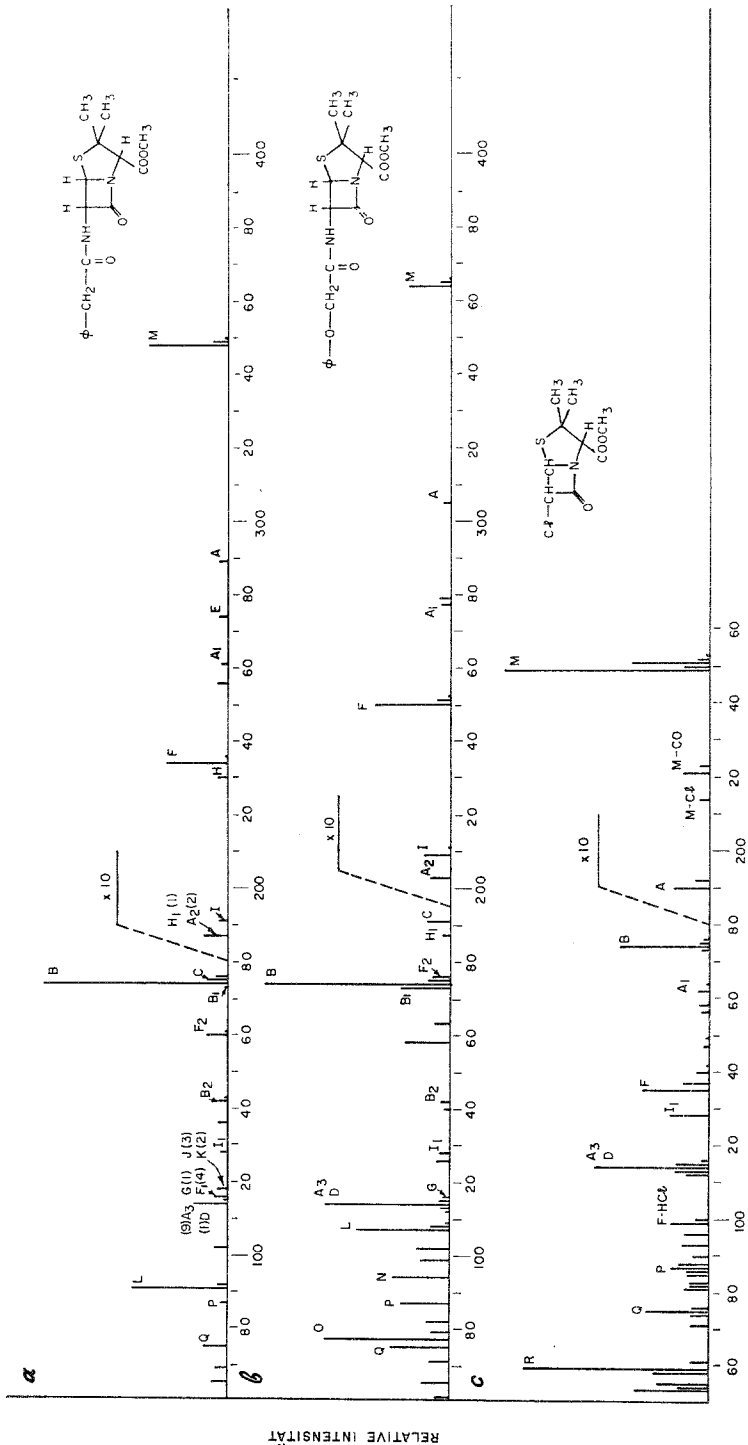
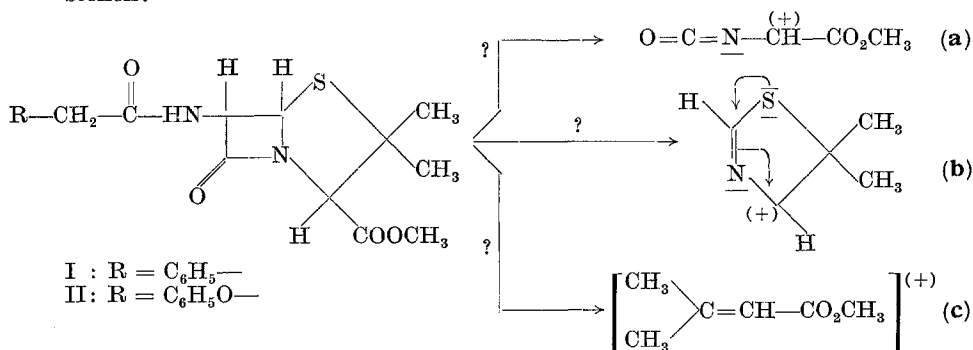


Abb. 1. Massenspektren von (a) Penicillin-G-Methylester (I); (b) Penicillin-V-Methylester (II); (c) 6-Chlorpenicillinsäure-methylester (III)

Strukturaufklärung neuer Penicillinderivate oder die Bestimmung schwerer Isotope im Penicillinmolekül ohne vorangehenden chemischen Abbau, ist jedoch die Festlegung der Identität aller gebildeten und das Spektrum konstituierenden Fragmente von größter Bedeutung.

Aus diesem Grunde haben wir zusätzlich zu den konventionellen Massenspektren des Penicillin-G- bzw. -V-Methylesters die entsprechenden Spektren mit einem hochauflösenden Gerät aufgenommen. Das Prinzip des dazu benützten Instrumentes sowie die Methode der genauen Massenbestimmung ist von dem von *Beynon*^{7, 8} und *Craig*⁹ verwendeten Gerät und deren Meßtechnik sehr verschieden und findet sich im exper. Teil kurz beschrieben. In beiden Fällen sind die erhaltenen Daten von gleicher Art, nämlich die Massen der Fragment-Ionen mit einer Genauigkeit in der Größenordnung einer Millimasseneinheit (mME). Die jeweiligen Differenzen zwischen den ermittelten Werten und den für die in Frage kommende Elementarzusammensetzung berechneten Massen ist in Tab. 1 (Kolonne 3 und 7) angeführt.

Die Möglichkeit einer eindeutigen Interpretierung von Fragmenten an Hand der mit dem hochauflösenden Massenspektrometer erhaltenen Werte sei an einigen Beispielen gezeigt. Ein Fragment-Ion der Nominalmasse 114 könnte in sehr verschiedener Weise von einem beliebigen Penicillin-Methylester gebildet werden und folgende Bruchstücke vorstellen:



Da der Säurerest R—CH₂—CO— in keinem dieser drei Fragmente auftritt, läßt der Vergleich von Penicillin-G-Methylester (I) mit Penicillin-V-Methylester (II) keine Differenzierung zwischen den drei Möglichkeiten zu. Die Annahme, Prozeß (a) sei für das Auftreten der Masse 114 verantwortlich, wäre besonders naheliegend, da er, mit umgekehrter Ladungsverteilung zum Fragment F führend (M—114, Schema 2), sich tatsächlich abspielt, wie aus beiden Spektren eindeutig ersichtlich ist (siehe Tab. 1 und Fig. 1). Werden jedoch die Spektren mit einer Auf-

⁹ R. D. Craig, B. N. Green und J. D. Waldron, *Chimia* [Aarau] **17**, 33 (1963).

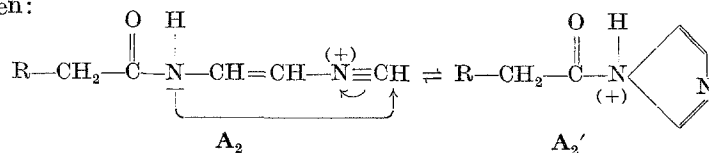
lösung 1:20000 aufgenommen, so zeigt sich, daß Masse 114 ein Dublett ist. Die Messung der genauen Massen beider Komponenten ergibt die Werte 114,0373 und 114,0664 (Penicillin-G-Methylester) bzw. 114,0380 und 114,0690 (Penicillin-V-Methylester). Diese Werte entsprechen der Elementarzusammensetzung C_5H_8NS (Masse ber.* 114,0377) und $C_6H_{10}O_2$ (Masse ber. 114,0680). Das Intensitätsverhältnis der beiden Linien (9:1) zeigt, daß Prozeß (b) den Hauptbeitrag zur Masse 114 liefert, während Prozeß (c) eine untergeordnete Rolle spielt. Die Abwesenheit einer dritten Komponente, dem Fragment-Ion $C_4H_4NO_3$ (Masse ber. 114,0191) entsprechend, zeigt, daß Prozeß (a) nicht von Bedeutung ist.

Im Spektrum des Penicillin-G-Methylesters (I, Fig. 1a) tritt bei Masse 187 ein weiteres Dublett auf, dessen Komponenten die Zusammensetzung $C_8H_{13}NO_2S$ und $C_{11}H_{11}N_2O$ haben und in den folgenden Formelschemen als H_1 und A_2 bezeichnet werden. Das letztere Fragment enthält die Säuregruppe und findet sich demzufolge im Spektrum des Penicillin-V-Methylesters (II, Fig. 1b) als Masse 203 wieder, verschoben um die Massendifferenz eines Sauerstoffatoms. Die verbleibende $C_8H_{13}NO_2S$ -Komponente ist in der Linie der Masse 187,0688 erkennbar und schließt eine unvollständige Verschiebung von H_1 aus.

Wie bereits hieraus ersichtlich, gibt die Anwesenheit dreier verschiedener Heteroatome im Penicillingerüst zur Bildung einer Vielfalt prinzipiell möglicher Fragmente bei der gleichen Nominalmasse Anlaß. Das tatsächliche Auftreten der einzelnen Fragmente kann jedoch mit Hilfe genauer Massenbestimmungen eindeutig festgestellt werden.

Die Interpretation der Fragmentierung von I und II anhand der Spektren (Fig. 1a und 1b) ist in Schema 1—3 wiedergegeben und sei im Folgenden kurz erläutert:

Das deutlich erkennbare Molekül-Ion M läßt sich für eine Bestimmung des Molekulargewichtes und der Elementarzusammensetzung des jeweiligen Penicillinesters, jedenfalls solcher mit einem aromatischen Rest R in der Acyl-Seitenkette, benützen. Der Verlust der Estergruppe (Schema 1, Spaltung längs c) führt zum Fragment höchster Masse, A_1 , das weiterhin unter Verlust von CO und Thioacetone die Bruchstücke A_1 und A_2 liefert. Das letztere kann sowohl, wie formuliert, als protoniertes Isonitril, als auch in cyclischer Form als Imidazolium-Ion A_2' aufgefaßt werden:



* Der Berechnung der theoretischen Massen wurden folgende Atomgewichte zugrundegelegt: ^1H : 1,007825, ^{12}C : 12,000000, ^{14}N : 14,00307, ^{16}O : 15,994915 und ^{32}S : 31,972074.

Weiterhin führt die Spaltung des β -Lactamrings in Ion **A** zu dem gut resonanzstabilisierten Thiazolinyli-Ion **A**₃. Das in diesem Falle als neutrales Bruchstück zu erwartende Amino-keten tritt als Resultat des gleichen, jedoch mit umgekehrter Ladungsverteilung verlaufenden Prozesses als Fragment **C** auf, kann aber auch, wie formuliert, direkt vom Molekular-Ion **M** (Spaltung längs **a**) gebildet werden.

Das in beiden Spektren häufigste Bruchstück **B** läßt sich gleichfalls der Spaltung des Vierrings längs **a** unter Bildung eines sehr gut stabilisierten Thiazolidinium-Ions zuschreiben, wozu allerdings die Wanderung eines Wasserstoffatoms erforderlich ist. Die Ursache dieser Wasserstoffverschiebung ist in der bevorzugten Ausbildung eines Immonium-Ions gegenüber einem elektronärmeren Imin-Ion (Septett am N oder S) zu suchen, und entspricht als Analogiefall der Eliminierung von NH_4^+ bei Aminen, H_3O^+ bei Alkoholen und $\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$ bei O-Acetaten¹⁰. Abspaltung von Methanol aus der Estergruppe führt zu Bruchstück **B**₂, das als Keten formuliert wurde, obgleich die Beteiligung eines Wasserstoffatoms aus einer der beiden Methylgruppen anstelle des Wasserstoffatoms am C-3 nicht ausgeschlossen ist. Über eine gegenüber der 1,2- bevorzugte 1,4-Eliminierung von H_2O aus Alkoholen wurde kürzlich berichtet¹¹.

Die endgültige Zuordnung der Masse 174 zu Fragment **B** ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{S}$) ist auch mit Hilfe des Hochauflösungsspektrums nicht ganz einfach, da eine weitere Möglichkeit, nämlich Verlust eines Wasserstoffatoms vom Aminoketen **C** in Betracht gezogen werden muß. Die für diese Alternative, ein Ion $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_2$, berechnete Masse 174,0555 ist nur um 3,3 mME leichter als die für das Ion **B** berechnete, und eine Auflösung von 1:53 000 wäre nötig, um beide Fragmente aufzutrennen. Im Gegensatz zu allen übrigen in Tab. 1 angeführten Massenbestimmungen, die Einzelmessungen wiedergeben, wurde in diesem Fall die Linie wiederholt vermessen, um die Genauigkeit der Bestimmung zu erhöhen. Der in der Tabelle angeführte Mittelwert entspricht sehr gut der Zusammensetzung von **B** ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{S}$) und schließt eine nennenswerte Beteiligung von $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_2$ aus.

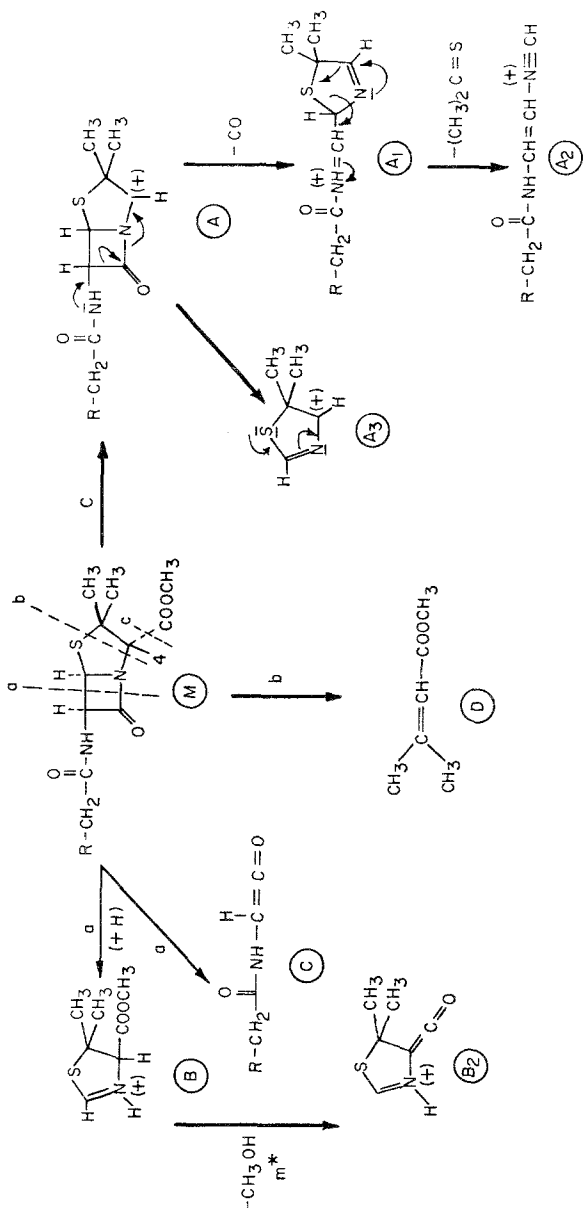
Spaltung des Thiazolidinrings längs **b** liefert das bei der Diskussion des Dubletts der Masse 114 schon erwähnte Dimethylacrylester-Ion **D**.

Die Anwesenheit einer α -Aminoestergruppierung gibt zu einigen Spaltprozessen Anlaß, die für einfache Ester dieser Art charakteristisch sind^{2, 3}. Einer davon, der Verlust der Estergruppe (Spaltung längs **c**), wurde bereits erwähnt und ist durch Bildung eines Carbonium-Ions (stabilisiert durch das freie Elektronenpaar am benachbarten Stickstoff-

¹⁰ Eine allgemeine Zusammenfassung der Fragmentierungsvorgänge organischer Moleküle im Massenspektrometer ist in³, hauptsächlich Kap. 3, zu finden.

¹¹ W. Benz und K. Biemann, J. Amer. Chem. Soc. **86**, Juli-Heft (1964).

SCHEMA I



atom) begünstigt. Eine ähnliche Situation ergibt die Spaltung der C-2—C-3-Bindung, wie in Schema 2 angedeutet. Das so gebildete Radikal-Ion, das noch die gleiche Masse wie **M** besitzt, kann einerseits durch Verlust eines neutralen Bruchstückes, Thioacetone, zu Fragment **E**, andererseits durch Eliminierung eines Isocyanat-Esterradikals $\text{OCNCHCO}_2\text{CH}_3$ zu Fragment **F** führen. Anschließende Abspaltung zweier neutraler Partikel, wie substituiertes Keten bzw. Thioacetone, liefert Fragment **F**₁ und **F**₂.

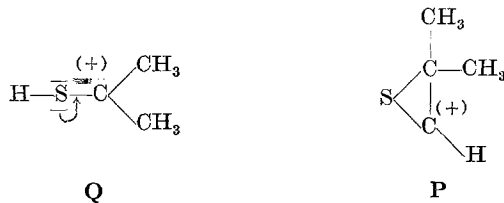
Der eben erwähnte Verlust des Ketens R—CHCO vom intakten Molekül-Ion aus führt zum Bruchstück **H**, wobei bemerkenswert ist, daß dieser Vorgang im Falle des Phenoxyacetyl-Derivats **II** viel weniger ausgeprägt ist. (Geringe Intensität von **H** und Abwesenheit von **J**.) Das Bruchstück **H** kann durch Verlust von HNCO in das Fragment **H**₁ übergehen.

Eliminierungsprozesse im Bereich des Thiazolidinringes liefern einige der kleinen Spaltstücke. Wasserstoffwanderung vom γ -Kohlenstoff eines Esters ist ein in Massenspektren häufig beobachteter Vorgang und führt hier zu einer Aufspaltung des Fünfringes. Sprengung der N-4—C-5- und C-6—C-7-Bindungen und Wanderung eines weiteren Wasserstoffes unter Bildung eines Ammonium- (oder Oxonium-) Ions ergibt das Fragment **G**. Die zweite Wasserstoffwanderung ist ebenfalls analog zu der oben angeführten Eliminierung von NH_4^+ etc. Das Fragment **G** hat zwar die gleiche Nominalmasse (116) wie **F**₁, ist aber im Hochauflösungsspektrum davon völlig abgetrennt. Der Massenunterschied beträgt immerhin 18,6 mME.

Eine andere Spaltungsmöglichkeit, nämlich die Eliminierung von —SH unter Bildung eines Acrylestere, ist in der Bildung des Ions **I** realisiert.

Die Identität der vielen kleineren Bruchstücke ist durch genaue Massenbestimmung, die eindeutig deren Elementarzusammensetzung ergibt, sichergestellt. Ihre Bildung ist trivial und rechtfertigt keine ausführliche Diskussion

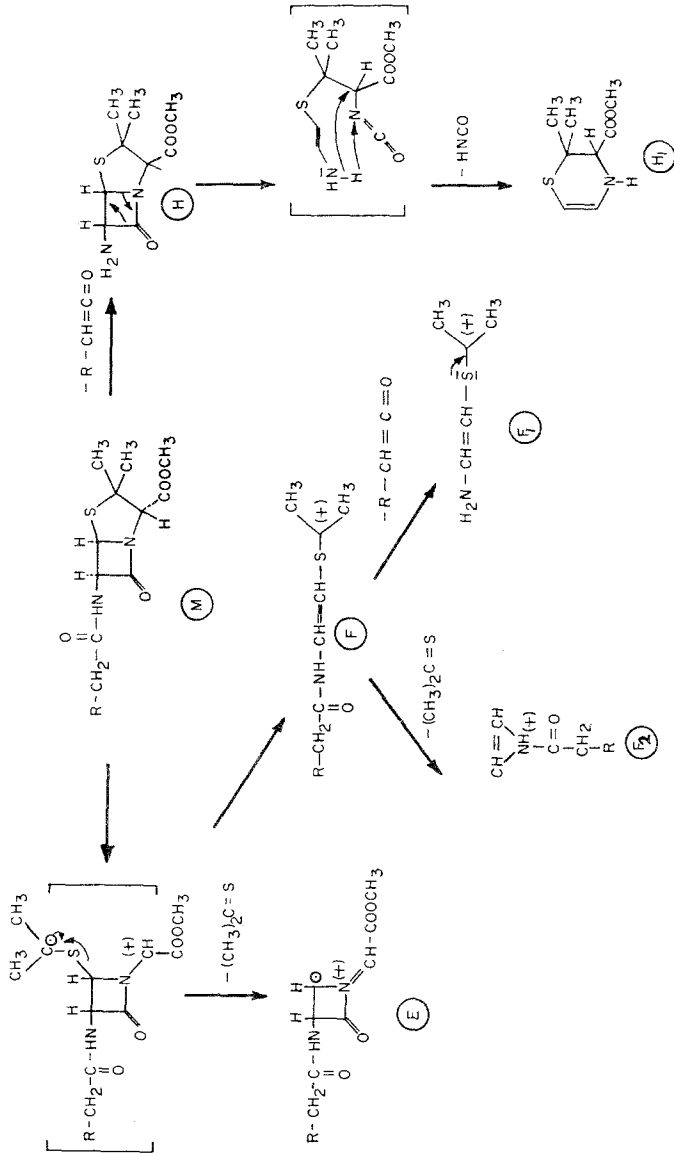
Die Fragmente **Q** und **P** finden sich in beiden Spektren:



Ein wesentlicher Unterschied ist in der Abspaltung der Gruppe **R** bemerkbar. Während die $\text{C}_6\text{H}_5\text{—C}$ -Bindung im Penicillin-G-Methylester kaum gebrochen wird, führt die Spaltung der $\text{C}_6\text{H}_5\text{—O}$ -Bindung im Penicillin-

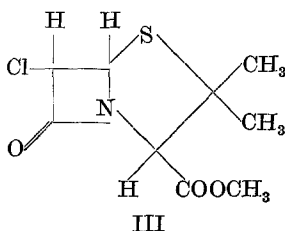
V-Ester zu einem beträchtlichen Fragment O. Das Umgekehrte gilt für die Spaltung der nächstfolgenden Bindung, die in I zu einem Tropylium-

SCHEMA 2



Ion (C_7H_7) führt, während in II die analoge O—C-Spaltung unter Wasserstoffwanderung ein Phenol-Ion ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}^+$) liefert, da positiver Sauerstoff mit einem Elektronensextett ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^+$) energetisch viel ungünstiger ist.

Wie aus obiger Diskussion eindeutig hervorgeht, sind alle Bezirke des Penicillin-Grundgerüsts im Massenspektrum (Fig 1a und 1b) vertreten, weshalb sich Spektren dieser Art für die Charakterisierung neuer Derivate sehr wohl eignen. Ist die Deutung aller Fragmente mit Hilfe des Hochauflösungsspektrums einmal durchgeführt, genügt zur Interpretierung zusätzlicher Spektren das geringere Auflösungsvermögen der konventionellen Geräte, wie am folgenden Beispiel des 6-Chlorpenicillansäuremethylesters (III) kurz gezeigt werden soll:



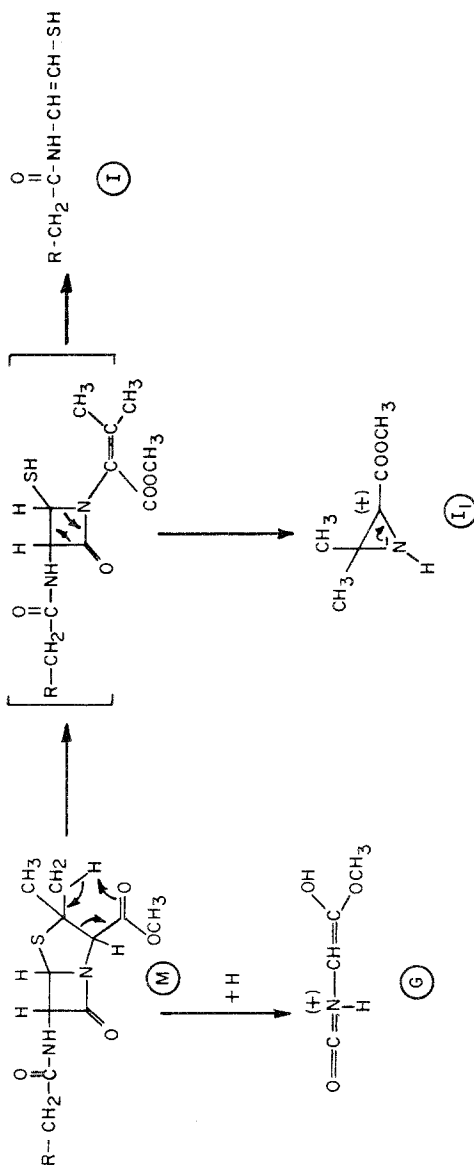
Das Massenspektrum von III (Fig 1c) weist wie die voranstehend beschriebenen Penicilline deutlich ein Molekular-Ion **M** auf. Im Dublettcharakter desselben mit einem Massenunterschied von 2 ME und der typischen relativen Intensität 3:1 (dem natürlichen Isotopenverhältnis $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl}$ entsprechend) gibt sich die Anwesenheit eines Chloratoms im Molekül eindeutig zu erkennen. Dasselbe folgt aus dem Auftreten eines Fragments der Masse 214, eines Singletts, das demzufolge den Verlust des Halogenatoms anzeigt (Differenz von 35 bzw. 37 ME vom Chlordublett des Molekül-Ions).

Die Fragmente der Masse 174, 114 und 221 berechtigen zur Annahme eines unveränderten Penicillinskeletts in III. Da Fragment 174 den halogenfreien Thiazolidinring repräsentiert (Fragment **B** in den Spektren von I und II), verbleibt als Position des Chloratoms lediglich C-6. Das Argument erfährt weitere Bestätigung durch das Auftreten der Bruchstücke **A**₃ und **D** (Singlett bei Masse 114), die sich, wie oben gezeigt, vom Fünfring ableiten. Das dritte Fragment, Masse 221, entspricht dem Verlust von CO vom intakten Molekül-Ion und gibt einen Hinweis auf das Vorliegen einer Carbonylfunktion in einer Ringstruktur, in diesem Falle dem β -Lactamring. Der analoge Vorgang ist in der Fragmentierung von I und II zwar nicht von Bedeutung, doch ist zu berücksichtigen, daß infolge der komplizierteren Struktur hier zahlreiche andere Spaltungsmöglichkeiten offenstehen.

Das typische Chlordublett des Fragmentes **F** (Masse 134/136) erlaubt eine zusätzliche Fixierung des Chloratoms am C-6, da alle übrigen Atome desselben bereits in den Bruchstücken **B** und **A**₃ enthalten sind. Deren

Singlettcharakter und die bezüglich der Spektren von I und II unveränderten Massen schließen die Anwesenheit von Chlor in beiden Fällen aus.

SCHEMA 3



Das Vorliegen einer Methylestergruppierung folgt letztlich aus den Fragmenten A (M—59) und R (COOCH₃, Masse 59).

Herrn Dr. *R. B. Morin* (Eli Lilly & Co., Indianapolis) danken wir für die Überlassung der Penicillin-Derivate, Herrn Dr. *P. Bommer* für die Aufnahme der Hochauflösungsspektren und Frau Mag. pharm. *U. Richter* für deren Vermessung. Diese Arbeit wurde durch Public Health Service Research Grants (GM-09352 und GM-05472) des National Institute of Health (USA) und ein Research Grant (G 21037) der National Science Foundation (USA) unterstützt.

Experimenteller Teil

Die konventionellen Massenspektren wurden mit einem CEC 21-103C Massenspektrometer aufgenommen. Die Präparate wurden durch eine Vakuumschleuse direkt in die Ionenquelle eingeführt und bei 30° (III) bzw. 60° (I und II) verdampft. Die verwendete Elektronenenergie betrug 70 eV, die Ionisierungsstromstärke 50 μ A.

Die Hochauflösungsspektren wurden mit einem doppelt-fokussierenden Massenspektrometer vom Mattauch—Herzog-Typ (CEC 21—110) aufgenommen. Die Einführung der Präparate und Ionisierungsbedingungen waren die gleichen wie oben angegeben, mit dem Unterschied, daß gleichzeitig mit dem Präparat Perfluorkerosin (eine hochmolekulare Fluorkohlenstoffverbindung) als Massenstandard in die Ionenquelle eingeführt wurde. Die Spektren wurden auf einer photographischen Platte, die in der Fokusebene des Instrumentes liegt, aufgenommen. Genaue Messung der Distanzen zwischen den Standardlinien und denjenigen der zu untersuchenden Verbindung erlaubt die Bestimmung der genauen Massen der Fragmente. Die Meßtechnik wurde bereits anderswo eingehender diskutiert¹².

¹² *K. Biemann*, 11th Annual Symposium in Mass Spectrometry, San Francisco, May 1963, p. 235. *P. Bommer*, *W. McMurray* und *K. Biemann*, 12th Annual Symposium in Mass Spectrometry, Montreal (Canada), June 1964; *D. Desiderio* und *K. Biemann*, *ibid.*