

Aufnahme und Interpretation von Hochauflösungs- Massenspektren von Naturstoffen während ihrer gaschromatographischen Trennung*^{*, **}

Von

K. Biemann und J. Throck Watson

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 3. Februar 1965)

Eine Methode zur direkten Aufnahme von Massenspektren, mit einer Auflösung von 1:10 000 oder besser, von Naturstoffen während ihrer gaschromatographischen Trennung wird beschrieben. Diese hohe Massenauflösung erlaubt es, die Massen der einzelnen Ionen so genau zu bestimmen, daß man ihre Elementarzusammensetzung daraus berechnen kann. Auf diese Weise erhält man nicht nur die empirische Formel aller Komponenten eines Substanzgemisches an wenigen Mikrogrammen, sondern auch massenspektrometrische Daten für diese Komponenten, die die strukturmäßige Interpretation der Massenspektren wesentlich erleichtern.

Als ein Beispiel sind die Resultate an einem so untersuchten Alkaloidgemisch angeführt, die es ermöglichten, das Vorkommen zweier bisher nicht in dieser Pflanze gefundenen Alkaloide nachzuweisen, wovon eines eine bekannte Verbindung (Eburnamonin) ist, während für die zweite die Struktur eines Methoxyeburnamenins vorgeschlagen ist.

A method is described for the determination of mass spectra (with a resolution of 1:10,000 or better) of natural products during their gas chromatographic separation. This high resolution permits the determination of the mass of the ions with an accuracy sufficient for the calculation of the empirical formulae of all components of a few micrograms of mixture. In addition, such detailed data considerably aid in the interpretation of the mass spectra of the individual components.

* Frau Professor Dr. *Erika Cremer* in Verehrung gewidmet.

** 27. Mitt. der Reihe „Anwendung der Massenspektrometrie auf Strukturprobleme“; 26. Mitt.: *K. Biemann* und *W. McMurray*, *Tetrahedron Letters* [London] **1965**, 647.

As an example, results obtained with an alkaloid extract are discussed. It was possible to recognize the presence of two alkaloids hitherto not found in this plant. One was identified as a known compound (eburnamonine) while for the other one the structure of a methoxyeburnamenin is proposed.

Seit den ersten Anfängen der Gaschromatographie, sowohl der Gas-solid-chromatographie¹ als auch der Gas-liquid-chromatographie², hat diese Methode, besonders die letztere Variante, gewisse Arbeitsgebiete der organischen Chemie geradezu revolutioniert, da es nun möglich geworden war, mit äußerst geringen Substanzmengen zu arbeiten, die außerdem direkt als solche und nicht als sehr verdünnte Lösungen in organischen Lösungsmitteln (z. B. in der gewöhnlichen Flüssigkeits-elutionschromatographie) oder wäßrigen Salzlösungen (wie in der Ionenaustauschchromatographie) anfallen.

Darüber hinaus hat sich der Organiker im Laufe der beiden letzten Jahrzehnte physikalische Methoden sehr zu Nutze gemacht, die die klassischen Strukturbeweise rein chemischer Natur vielfach ersetzt haben. Eine der jüngsten ist die Massenspektrometrie, die, obwohl im Prinzip altbekannt, erst in den letzten Jahren volle Anwendung in der organischen Chemie gefunden hat^{3, 4}.

Aus verschiedenen Gründen ist es wünschenswert, die Massenspektren von organischen Verbindungen, die gaschromatographisch getrennt werden müssen, gleich beim Austritt aus der Kolonne aufzunehmen, ohne die Fraktionen zuerst einzeln aufzufangen und später nacheinander in das Massenspektrometer einzuführen. Abgesehen von der enormen Zeitersparnis, die die Methode der direkten Kupplung mit sich bringt, kann man mit viel weniger Material auskommen und vermeidet die Zersetzung luft- oder feuchtigkeitsempfindlicher Substanzen.

Im Gegensatz zu den anderen spektroskopischen Methoden, die der Organiker heute alltäglich benutzt (UV-, IR- und NMR-Spektroskopie), ist die Massenspektrometrie besonders zur direkten Kupplung mit einem Gaschromatographen geeignet. Erstens, weil sie eine äußerst empfindliche Methode darstellt, für die einige Mikrogramme genügen, und zweitens, weil beide einen gewissen Dampfdruck der zu untersuchenden Verbindung voraussetzen. Solche Kombinationen von Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer wurden verschiedentlich vorgeschlagen und haben

¹ E. Cremer und F. Prior, Z. Elektrochem. **55**, 66 (1951); E. Cremer und R. Müller, *ibid.* **55**, 217 (1951).

² A. T. James und A. J. P. Martin, *Analyst* **77**, 915 (1952); *Biochem. J.* **50**, 679 (1962).

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

⁴ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. Williams, „Structure Elucidation of Natural Products“, Vol. 1 and 2, Holden-Day, San Francisco 1964.

sich für viele praktische Probleme recht nützlich erwiesen⁵. Sie basierten alle auf der Verwendung konventioneller, einfach-fokussierender, magnetischer Massenspektrometer oder Flugzeit-Spektrometer und benutzten schnelle Lichtschreiber oder ein Oszilloskop, wegen der kurzen Zeitspanne, die für die Aufnahme des Spektrums zur Verfügung steht. Sowohl wegen der relativ geringen Auflösung dieser Instrumente, besonders bei schneller Aufnahme, als auch wegen der Schwierigkeiten beim Überleiten von relativ großen komplizierten Verbindungen vom Gaschromatographen zum Massenspektrometer haben sich diese Arbeiten auf Untersuchungen von Petroleumfraktionen und Aromen beschränkt, alles Verbindungen, deren Molekulargewicht unter 200 liegt und die keine oder nur eine funktionelle Gruppe besitzen. Eine Ausnahme sind die kürzlich veröffentlichten Arbeiten von *Ryhage*⁶, die sich mit der Aufnahme höherer Fettsäureester und von Steroiden beschäftigten, ermöglicht durch eine Reihe von Verfeinerungen des Massenspektrometers und seiner Verbindung mit dem Gaschromatographen.

Während der letzten Jahre haben wir uns hauptsächlich mit der Entwicklung und Anwendung der Hochauflösungs-Massenspektrometrie, vor allem in der Naturstoffchemie, beschäftigt⁷. Die um einige Größenordnungen höhere Genauigkeit der Massenbestimmung erlaubt es, wie *Beynon*⁸ schon gezeigt hat, die Elementarzusammensetzung sowohl des zu untersuchenden Moleküls als auch der durch Elektronenbeschuß erzeugten Bruchstücke zu berechnen. Dies ist natürlich für die Interpretation der Spektren sehr nützlich, besonders wenn man das gesamte Spektrum mit solcher Genauigkeit vermißt, wofür wir kürzlich eine Methodik ausgearbeitet haben⁹.

Im Zuge unserer Arbeiten auf dem Gebiete der Strukturaufklärung von Naturstoffen — wie Aminosäuren, Peptiden, Alkaloiden, Steroiden, Kohlehydraten, Antibiotika usw. — mit Hilfe der Massenspektrometrie bedienen wir uns vielfach der Gaschromatographie, entweder zur Auftrennung von Gemischen oder zur Reinigung von Reaktionsprodukten. Obwohl

⁵ a) *J. C. Holmes* und *F. A. Morrell*, *Appl. Spectr.* **11**, 86 (1957). b) *R. S. Gohlke*, *Anal. Chem.* **31**, 525 (1959). c) *L. P. Lindeman* und *J. L. Annis*, *Anal. Chem.* **32**, 1742 (1960). d) *D. Henneberg*, *Z. anal. Chem.* **183**, 12 (1961). e) *R. S. Gohlke*, *Anal. Chem.* **34**, 1332 (1962). f) *C. Brunnee*, *L. Jenckel* und *K. Kronenberger*, *Z. anal. Chem.* **189**, 50 (1962); **197**, 42 (1963). g) *J. A. Dorsey*, *R. H. Hunt* und *M. J. O'Neal*, *Anal. Chem.* **35**, 511 (1963). h) *W. H. McFadden*, *R. Teranishi*, *D. R. Black* und *J. C. Day*, *J. Food Sci.* **28**, 316 (1963).

⁶ *R. Ryhage*, *Anal. Chem.* **36**, 759 (1964); *J. Lipid Res.* **5**, 245 (1964).

⁷ *K. Biemann*, *J. Pure Appl. Chem.* **9**, 95 (1964).

⁸ *J. H. Beynon*, „*Advances in Mass Spectrometry*“, Vol. 1, p. 328, Pergamon Press Ltd., London 1959.

⁹ *P. Bommer*, *W. J. McMurray* und *K. Biemann*, Twelfth Annu. Confer. Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, June 1964.

wir uns früher wegen der technischen Schwierigkeiten, die die Gaschromatographie komplizierterer Moleküle mit mehreren funktionellen Gruppen und geringem Dampfdruck mit sich bringt, auf das Auffangen einzelner Fraktionen und separate Aufnahme des konventionellen Massenspektrums beschränkten^{10, 11}, haben wir uns in letzter Zeit mit der Ausarbeitung einer direkten Kopplung der Gaschromatographie mit einem hochauflösenden, doppelt fokussierenden Massenspektrometer befaßt.

Die Verwendung eines solchen Instrumentes, besonders wenn es auf dem *Mattauch—Herzog*-Prinzip aufgebaut ist und daher eine Fokusebene besitzt, macht diese direkte Kopplung viel praktischer, da zwei der Hauptschwierigkeiten früherer Systeme wegfallen:

Die Festlegung der Massen, die mit rasch aufgenommenen konventionellen Spektren besonders im hohen Massenbereich schwierig ist (das übliche „Zählen“ ist durch die verringerte Intensität und das meist starke „noise“ weniger verläßlich), ist durch Mitaufnahme eines Eichspektrums, dessen Massen genau bekannt sind und sich von denen der zu untersuchenden Substanzen leicht auftrennen lassen, sehr erleichtert. Da die Verarbeitung der experimentellen Daten (Positionen der Massenspektrenlinien auf einer photographischen Platte) über die genauen Massen (Reproduzierbarkeit in der Größenordnung einer Millimasseneinheit) zur Elementarzusammensetzung der einzelnen Ionen sowieso nur mit Hilfe einer elektronischen Rechenmaschine wirtschaftlich und fehlerfrei durchgeführt werden kann¹², stellt die automatische Subtraktion dieses Massenspektrums (Eichspektrum) nur einen einfachen weiteren Arbeitsgang vor, der kaum mehr als einige Sekunden Rechenzeit benötigt. Etwaige Beiträge der stationären Phase („bleeding“) zum Spektrum werden auf der gleichen Stufe subtrahiert.

Darüber hinaus ist es mit einem solchen Instrument nicht nötig, das Spektrum während der kurzen Zeit des Austretens der Fraktion rasch „durchzufahren“, da das gesamte Spektrum gleichzeitig auf der oben erwähnten photographischen Platte, die in der Fokusebene des Magnetfeldes liegt, aufgenommen wird. Dies eliminiert auch den störenden Einfluß der sich dauernd ändernden Substanzkonzentration, hervorgerufen durch das Aufsteigen und Absinken derselben während des Austritts der Substanz aus der Kolonne.

Eines der wichtigsten Probleme ist jedoch die Notwendigkeit, den relativ hohen Druck (1 Atm.) am Ende der gaschromatographischen Ko-

¹⁰ K. Biemann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 631 (1963).

¹¹ H. K. Schnoes, A. L. Burlingame und K. Biemann, Tetrahedron Letters **1962**, 993.

¹² D. M. Desiderio und K. Biemann, Twelfth Annu. Confer. Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, June 1964.

lonne auf den sehr niederen Druck ($< 10^{-5}$ mm) in der Ionenquelle des Massenspektrometers zu reduzieren. Während dies üblicherweise mit Hilfe von Drosselventilen aus Metall erreicht wird, muß dies beim Arbeiten mit empfindlichen Molekülen von geringer Flüchtigkeit vermieden werden, da Kondensation auf heißen Metalloberflächen sowohl zu thermischer Zersetzung als auch zu Verschlechterung der Trennschärfe führen kann.

Aus diesem Grunde benutzen wir zur Verbindung des Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer eine Röhre aus porösem Glas in einem evakuierbaren Mantel. Eine verbesserte Ausführung der bereits beschriebenen Anordnung¹³ ist in Abb. 1 gezeigt. Die gaschromatographische

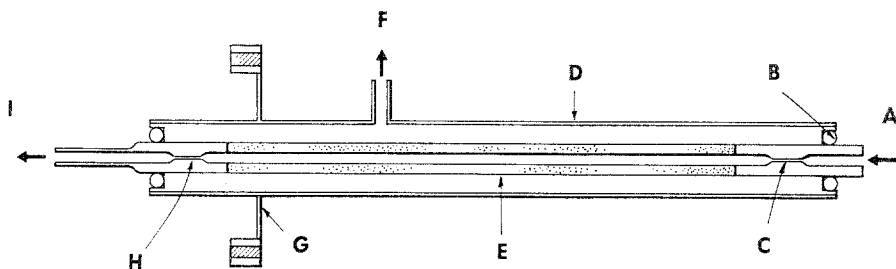


Abb. 1. Verbindung zwischen Gaschromatograph und Massenspektrometer: (A) Verbindung zur Kolonne, (B) Dichtungsring, (C) Verjüngung, (D) Vakuummantel, (E) poröse Glasröhre, (F) zur Pumpe, (G) Flansch, (H) zweite Verjüngung und (I) Eintritt zur Ionenquelle

Kolonne ist bei A mit Hilfe eines Stückes Silikongummischlauch gasdicht angeschlossen. Das Trägergas (Helium) tritt durch die kurze, kapillarartige Verjüngung (C) in die poröse Glasröhre (E) ein und wird zum Großteil durch die Poren ($\sim 1 \mu$ Durchmesser) in den Vakuum-Mantel (D) und von dort in eine Rotationspumpe abgepumpt. Der Rest strömt durch die zweite Verjüngung (H) in die Ionenquelle. Auf diese Weise wird nicht nur der Gasdruck auf die richtige Größe reduziert, sondern gleichzeitig eine relative Anreicherung der im Helium verteilten Substanz erzielt, da das erstere bevorzugt durch die poröse Glaswand strömt, während die viel größeren Substanzmoleküle hauptsächlich in die Ionenquelle gelangen. Für Diäthyläther wurde z. B. eine 50fache Anreicherung gemessen.

Abb. 2 zeigt schematisch die gesamte Anordnung. Der Gaschromatograph ist auf die Kolonne selbst mit dem dazugehörigen Heizmantel reduziert und ist durch das oben beschriebene, ebenfalls heizbare Druck-reduziersystem direkt und permanent an das Ionenquellengehäuse angeschlossen. Die üblicherweise verwendete Registrierzelle für den Gaschromatographen ist nicht notwendig und wurde daher weggelassen, weil wir für denselben Zweck (Aufzeichnung des Gaschromatogramms) den Ionenstrahl des Massenspektrometers selbst registrieren. Ein Teil desselben, der

¹³ J. T. Watson und K. Biemann, *Anal. Chem.* **36**, 1135 (1964).

im Ruhezustand aus den Ionen der dauernd aus dem Reservoir (*E*) strömenden Eichsubstanz (Perfluorokerosene, eine vollständig fluoridierte Kohlenstoffkette) sowie Helumionen besteht, wird vor dem Eintreten in das Magnetfeld (*J*) bei (*H*) aufgefangen, verstärkt und registriert.

Wenn nun eine Substanz-Fraktion aus der Kolonne austritt, erhöht sich der Gesamtionenstrom um den Betrag des Substanz-Spektrums und dies zeigt sich am Registriergerät (*I*) als

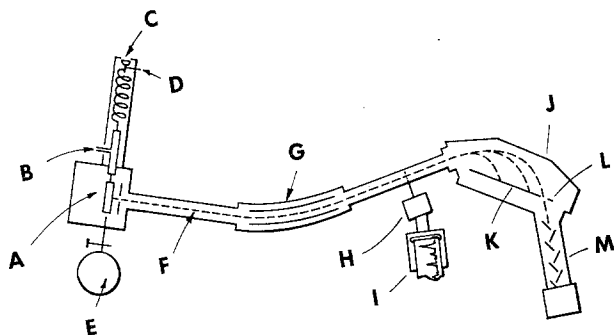


Abb. 2. Schematische Darstellung des Massenspektrometers mit angeschlossener Gaschromatographie. (A) Ionenquelle, (B) Pumpe, (C) Septum zum Einspritzen der Substanz, (D) Heliumzuleitung, (E) Reservoir für Eichsubstanz, (F) Ionenstrahl, (G) Elektrisches Feld, (H) Ionenstrahlregistrierung, (I) Schreiber, (J) Magnetfeld, (K) Photographische Platte, (L) Schlitz und (M) Sekundärelektronenvervielfacher

ein Ansteigen und Absinken der Linie. Im Prinzip ist dies ja einem einfachen, in der Gaschromatographie üblichen Ionisierungs-Detektor recht ähnlich.

Abb. 3 zeigt ein Beispiel eines auf diese Weise erhaltenen Gaschromatogrammes, das im Detail weiter unten diskutiert werden wird. Die vertikalen plötzlichen Ablenkungen des Schreibers werden durch das kurzzeitige Abschalten des Ionenstrahls bedingt, während die Platte (K in Abb. 2) in die nächste Aufnahmestellung geschoben wird — (im ganzen können 30 Spektren, d. h. bis zu 30 Fraktionen, auf eine Platte aufgenommen werden).

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgt daher einfach bei „Belichtung“ der Platte während des Auftretens einer jeden Fraktion. Wenn wünschenswert, wird ab und zu ein „Leerspektrum“ (z. B. No. 22) zwischen den Fraktionen aufgenommen, das dann nur das Spektrum von Eichsubstanz und allfälligen thermischen Zersetzungsprodukten der stationären Phase zeigt. Andererseits ist es auch empfehlenswert, eine Fraktion in zwei oder mehreren Teilen aufzunehmen, entweder um die Homogenität zu prüfen (in welchem Falle alle Teile das gleiche Spektrum zeigen) oder um Spektren der einzelnen Komponenten einer inhomogenen Fraktion zu erhalten (siehe unten).

Wir haben diese Methode für Gemische von Fettsäuren¹³, Aminosäureestern¹⁴, Steroiden und Alkaloiden¹⁵ benutzt und ein Beispiel aus letzterem Gebiet sei hier als Illustration der Anwendungsmöglichkeiten in der Naturstoffchemie angeführt.

Abb. 3 ist ein Gaschromatogramm, das beim Einspritzen von ca. 1 μ l einer 5–10proz. Lösung eines Alkaloidgemisches erhalten wurde.

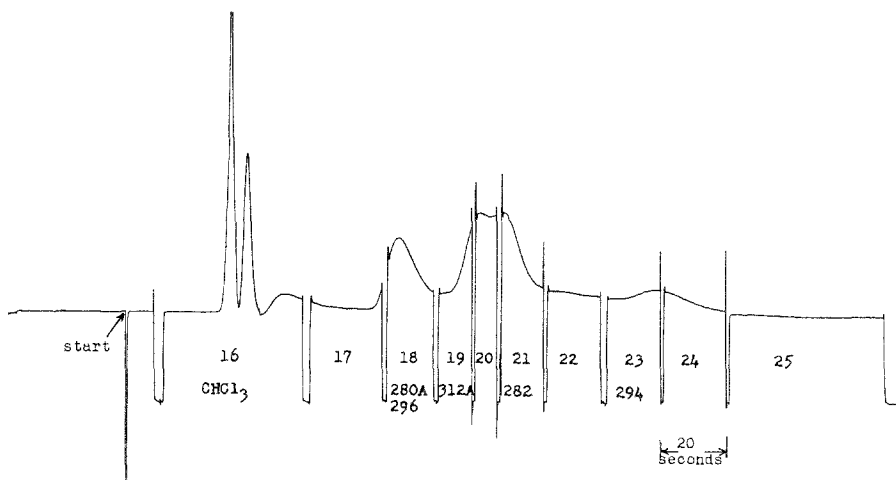


Abb. 3. Gaschromatogramm eines Alkaloidgemisches, erhalten mit dem in Abb. 2 gezeigten System [Kolonne: 3% Silikonpolymer auf „Gas Chrom P“, 270°. Temperatur des Druckreduziertertes (Abb. 1): 265°]

Das Gemisch stellt eine Teilfraktion der Gesamtalkaloide der Rinde von *Aspidosperma quebracho blanco* Schlecht. vor¹⁶. Während des Gaschromatogramms wurden Positionen 16–25 auf der photographischen Platte belichtet und diese Positionen korrespondieren zeitmäßig mit den in gleicher Weise numerierten Strecken der Abszisse in Abb. 3.

Ein vergrößerter Teilausschnitt der Platte in der Region von Masse 275 bis 295 und der Positionen 21–24 wird in Abb. 4 gezeigt (die Gesamtlänge der Platte enthielt in diesem Falle alle Spektren von Masse 12–350; der Bereich kann durch Veränderung des Magnetfeldes beliebig geändert werden). Die Auflösung des Spektrometers betrug in diesem Falle ca. 1:10000. Die Vermessung der Linienpositionen ergab die genaue Masse der Ionen, die für die verschiedenen Linien verantwortlich sind, und weiterhin die Kombination der Elemente, aus denen die einzelnen Ionen aufgebaut sind.

¹⁴ J. T. Watson und K. Biemann, Twelfth Annu. Sympos. Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, June 1964.

¹⁵ J. T. Watson und K. Biemann, Anal. Chem. **37** (1965), im Druck.

¹⁶ Wie früher beschrieben¹⁰ extrahiert, jedoch nur in wenigen Fraktionen an Aluminiumoxid vorgetrennt. Wir danken Herrn H. K. Schnoes für diese Fraktion.

Als Standardmassen wurden in diesem Gebiet die Ionen C_6F_{11} und C_7F_{11} gewählt. Das Dublett bei Masse 281 ist erwähnenswert, da es nicht nur den großen Vorteil der hohen Auflösung zeigt, welche es erlaubt, Fremdstoffe leicht zu erkennen, sondern auch die Herkunft der zweiten Linie (Masse: Gef. 281,0524, Zusammensetzung: $C_7H_{21}O_4^{28}Si_4$, ber. 281,0518) andeutet, die in diesem Falle von der stationären Phase der gaschromatographischen Kolonne herrührt, wie aus dem hohen Siliciumgehalt un schwer hervorgeht.

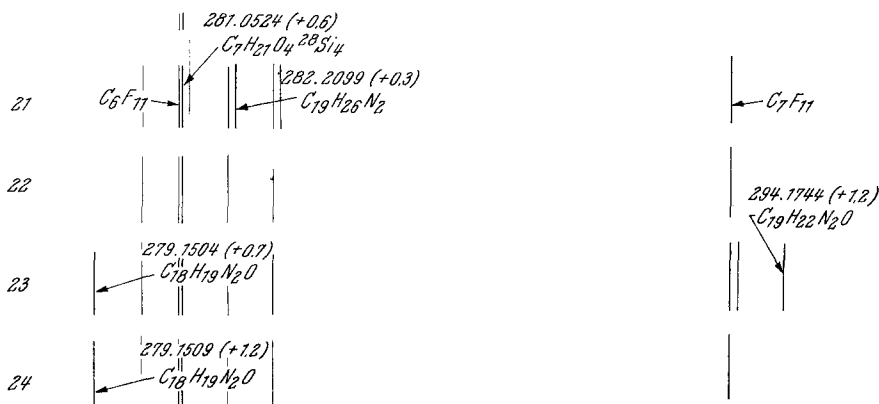


Abb. 4. Vergrößerung (Länge der Linien: 1 mm) eines Teiles der Platte, die die Massenspektren des Gaschromatogrammes der Abb. 3 enthält. Die Zahlen der Ordinate entsprechen den Zahlen der Abszisse von Abb. 3 (siehe Text). Diese Abbildung ist aus drucktechnischen Gründen eine graphische Wiedergabe der Originalphotographie

Von größerem Interesse sind jedoch jene Ionen, deren genaue Masse auf das Vorhandensein von C, H, N und O hinweist und die daher den zu untersuchenden Alkaloiden angehören. Die in Abb. 4 angeführten Zahlen stellen einige der aus der Linienposition errechneten Massen dar, während die in Klammern beigefügte Zahl die Differenz (in Millimasseneinheiten) zwischen dieser Masse und der für die damit im Einklang stehenden Elementkombination berechneten Masse darstellt. Wie ersichtlich, ist die Genauigkeit von derselben Größenordnung wie wenn die Spektren unter idealeren Bedingungen (stationäre Substanzeinführung) aufgenommen worden wären.

Auf Grund des Massenspektrums der Fraktion 18 konnte geschlossen werden, daß es sich hauptsächlich um 1,2-Dehydroaspidospermidin¹⁰ handelt. Das Spektrum No. 19 zeigte eine Verbindung der Molekularzusammensetzung $C_{20}H_{28}N_2O$ (Molgew.: gef. 312, 2205, ber. 312, 2201) und alle Fragmente, die von Deacetylaspidospermin¹⁰ gebildet werden. Spektrum No. 20 enthielt alle diese Linien in wesentlich geringerer Intensität, während nun auch eine Verbindung der Zusammensetzung $C_{19}H_{26}N_2$ erscheint, die in der nächsten Aufnahme (No. 21) die Hauptkomponente ist

und deutlich als Quebrachamin¹⁷ identifiziert wurde (charakteristische Fragmentionen $C_7H_{12}N$, $C_8H_{14-16}N$, $C_9H_{16}N$, $C_{10}H_{9-10}N$, $C_{11}H_{10-11}N$). Wie aus Abb. 4 hervorgeht, ist der Beitrag von Deacetylaspidospermin, das eine intensive Linie¹⁰ bei Masse 284 hat ($C_{18}H_{24}N_2O$) fast völlig verschwunden, eine Tatsache, die zeigt, wie vorteilhaft es ist, gaschromatographisch nicht gut getrennte Fraktionen in mehreren aufeinanderfolgenden Spektren aufzunehmen.

Die letzte Fraktion dieses Gaschromatogrammes (Abb. 3) war trotz ihrer geringen Menge vorsichtshalber in zwei Teilen aufgenommen worden (No. 23 und No. 24 in Abb. 3 und 4). Es zeigte sich, wie auch aus Abb. 4 ersichtlich, daß die erste Hälfte dieser Fraktion ein anderes Spektrum liefert als die zweite, wie z. B. aus der Anwesenheit einer starken Linie bei Masse 294 in Spektrum No. 23 und aus ihrer Abwesenheit in No. 24 hervorgeht. Die Elementarzusammensetzung der Ionen in diesen beiden Spektren deuten darauf hin, daß es sich hier um zwei Alkaloide handelt, die sich bisher der Charakterisierung in diesem Alkaloidgemisch entzogen hatten. Die Vermessung der Spektren im Bereich von Masse 105—350 ergab die gesamten Daten für diese beiden Teilfraktionen und sind für No. 24 als Beispiel in Fig. 5 in Form einer „Element-Map“ wiedergegeben. Diese von der elektronischen Rechenmaschine völlig automatisch gelieferte Anordnung der Daten erleichtert die Interpretierung von Hochauflösungs-Massenspektren nach Richtlinien, die an anderer Stelle eingehender ausgeführt wurden^{7, 18}. Von dieser Anordnung ist es ersichtlich, daß die Molekularzusammensetzung der Substanz $C_{20}H_{24}N_2O$ beträgt (Molgew.: gef. 308,1893, ber. 308,1889), da die letzte Zahlengruppe in der Serie mit der größten Anzahl von Heteroatomen (N_2O) 20/24 beträgt, d. h. 20 Kohlenstoffe und 24 Wasserstoffe. Die folgende einstellige Zahl ist wieder die Differenz zwischen gefundener und berechneter Masse (in Millimasseneinheiten), während die Anzahl der Sternchen die Intensität (logarithmisch) anzeigt.

Das Vorhandensein von intensiven Linien für die Ionen $C_{18}H_{19}N_2O$ und $C_{16}H_{16}NO$ zeigt, daß die Verbindung eine Äthylgruppe enthält und den alicyclischen Stickstoff leicht mit vier Kohlenstoffen und acht Wasserstoffen verliert. Darüber hinaus geht aus dem geringen Wasserstoffgehalt des Ions $C_{15}H_{13}NO$ hervor, daß das Sauerstoffatom mit dem aromatischen Teil des Moleküls verbunden ist und nicht an seiner alicyclischen Peripherie sitzt. Schon die Elementarzusammensetzung des Moleküls selbst, sowie die der obengenannten Fragmente, schließen die Anwesenheit eines Aspidospermins oder eines Aspidospermatin-Analogen (die Hauptvertreter der in dieser Rinde vorkommenden Alkaloide) aus, deuten aber auf ein Deri-

¹⁷ K. Biemann und G. Spiteller, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 4578 (1962).

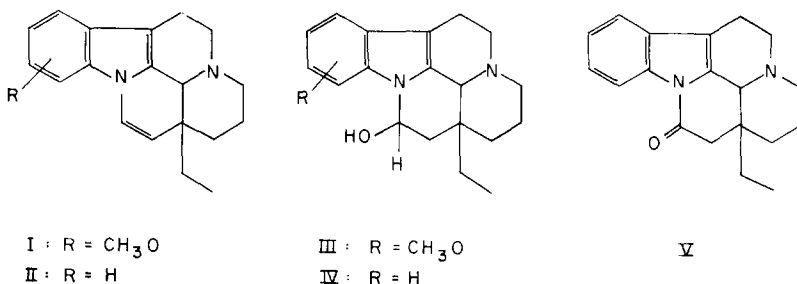
¹⁸ K. Biemann, P. Bommer und D. M. Desiderio, Tetrahedron Letters **1964**, 1725.

vat des Eburnamenins hin, eines Alkaloids, das wir auch aus dieser Rinde extrahiert hatten. Die Verbindung von Molgew. 308 sollte demnach ein im Benzolring methoxyliertes Eburnamenin der Struktur I* sein. Wie früher festgestellt, geht Eburnamin (IV) unter den Bedingungen der Gaschromatographie in Eburnamenin (II) über und es läßt sich daher bis jetzt nicht entscheiden, ob im ursprünglichen Extrakt I oder III vorgelegen hat.

ALKALOID GLC					
CH	CHO	CHN	CHNO	CHN2	CHN2O
110		7/12 0*			
115 9/ 7 1**					
124		8/14 1*****			
130		9/ 8 1*			
145		10/11-2*			
167		12/ 9 0*			
180		13/10-1*			
223			15/13 0*		
238			16/16 1*****		
254	19/10 2*				
279					18/19 1*****
308					20/24 0*****

Abb. 5. „Element-Map“ des Spektrums Nr. 24 (Abb. 3 und 4). Für die Erläuterung siehe Text

Die exakte Stellung der aromatischen Methoxygruppe kann aus einem Massenspektrum nicht abgeleitet werden, und ihre Sicherstellung würde ein gutes UV- oder NMR-Spektrum verlangen. Dies würde jedoch in Anbetracht der so geringen Menge (siehe Abb. 3) eine sehr oft zu wieder-



holende gaschromatographische Trennung verlangen, wozu weder die Zeit noch die Substanzmenge vorhanden war. Ein UV-Spektrum einer Fraktion, in der die Verbindung C₂₀H₂₄N₂O stark angereichert war, steht mit der vorgeschlagenen Struktur im Einklang, war aber nicht detailliert genug, um eine Entscheidung bezüglich der Stellung der Methoxygruppe zuzulassen. In Analogie zum 11-Methoxyvincamin¹⁹ schlagen wir Position 11 als die biogenetisch wahrscheinlichste vor.

* In Formelbild I ist der rechte obere Sechsring ebenso geschlossen wie in Formel III und V zu denken (Red.)

¹⁹ M. Plat, D. D. Manh, J. LeMen, M.-M. Janot, H. Budzikiewicz, J. M. Wilson, L. J. Durham und C. Djerassi, Bull. Soc. Chim. France 1962, 1082.

Die Linie der Masse 124 ($C_8H_{14}N$) wäre etwas irreführend, aber eine Verfolgung dieser Linie über alle Spektren dieses Chromatogrammes zeigt, daß sie überall mehr oder weniger stark vertreten ist, was darauf zurückzuführen ist, daß dieses Fragment in allen Aspidosperminderivaten außerordentlich ausgeprägt ist und daher schon sehr geringe Mengen, von einer Nachbarfraktion verschleppt, zu einer deutlichen Linie führen. Ihre relative Intensität ist jedoch viel zu gering, um der Hauptkomponente in No. 24 versehentlich eine aspidosperminartige Struktur zuzuordnen.

Auf Grund ähnlicher Resultate in Spektrum No. 23 kommt man zu dem Schluß, daß es ein Gemisch von I mit Eburnamonin (V, $C_{19}H_{22}N_2O$) vorstellt.

Obwohl es sich bei den obigen Resultaten nicht um im klassischen Sinne bewiesene Strukturbestimmungen oder Identifizierungen handelt, macht die Interpretation der angeführten Daten ihre Richtigkeit doch sehr wahrscheinlich.

Der erhebliche Fortschritt, den die in dieser Arbeit beschriebene Methodik zuläßt, ist wohl am besten dargestellt, wenn man bedenkt, daß diese Strukturvorschläge auf der Interpretation von nur zwei Massenspektren beruhen, die innerhalb einiger Sekunden aufgenommen wurden, und daß für dieses Experiment nicht mehr als 0,1 mg Alkaloidgemisch verwendet wurde, in dem die beiden fraglichen Verbindungen stark in der Minorität waren. Noch vor kurzem war es uns auch im Zuge einer viel eingehenderen Untersuchung der Alkaloide von *Aspidosperma quebracho blanco*¹⁰ (unter Verwendung der Gaschromatographie zur Auftrennung und Aufnahme der konventionellen Massenspektren der aufgefangenen Fraktionen) nicht möglich, diese beiden Komponenten zu identifizieren, obwohl die Anwesenheit von Verbindungen mit Molekulargewicht 294 und 308 erkannt worden war.

Diese Arbeit wurde durch ein Public Health Service Grant (GM-09352) der National Institutes of Health (USA) und durch ein Research Grant der National Science Foundation (G-21037) unterstützt. Wir danken dem MIT Computer-Center für die Ausführung der Rechenvorgänge.