

Hochauflösungs-Massenspektren von Cephalosporin-C-Derivaten*, **

Von

W. Richter*** und **K. Biemann**

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

Mit 1 Abbildung und 6 Schemata

(Eingegangen am 28. Oktober 1964)

Die Massenspektren von 7-Phenylacetamido- bzw. 7-Phenoxyacetamido-cephalosporansäuremethylester (I und II) wurden aufgenommen und die durch Elektronenbeschuß ausgelöste Fragmentierung dieser Moleküle diskutiert. Genaue Massenbestimmung der einzelnen Bruchstücke erlaubte das Auffinden der jeweiligen Elementarzusammensetzung, was die Interpretation der Spektren trotz der Anwesenheit mehrerer Heteroatome auf eine gesicherte Basis stellt.

The mass spectra of 7-phenylacetamido- and 7-phenoxyacetamido-cephalosporanoic acid methylester (I and II) have been recorded: the fragmentation pattern of these molecules caused by the electron impact is discussed. Precise mass determination of the individual fragment ions permitted the elucidation of the respective molecular formulae, thus putting the interpretation of the spectra onto a sound basis despite the presence of several hetero atoms.

Im Zusammenhang mit einer früher diskutierten massenspektrometrischen Studie von Penicillinderivaten¹ war eine ähnliche Untersuchung N-acylierter 7-Aminocephalosporansäureester von Interesse, Verbindungen, deren Ringstruktur mit dem β -Lactam—Thiazolidingerüst

* Herrn Professor Dr. *H. Bretschneider* zum 60. Geburtstag gewidmet.

** 24. Mitt. der Reihe „Anwendung der Massenspektrometrie auf Strukturprobleme“; 23. Mitt. siehe *H. K. Schnoes* und *K. Biemann*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 5693 (1964).

*** Derzeitige Anschrift: Department of Chemistry, University of California, Berkeley (Cal.), USA.

¹ *W. Richter* und *K. Biemann*, *Mh. Chem.* **95**, 766 (1964).

der Penicilline strukturell und biogenetisch eng verwandt ist. Genaue Massenbestimmung aller in Betracht gezogenen Fragmente war auch hierbei zusätzlich zur Auswertung der konventionellen Spektren erforderlich und wurde durch Aufnahme und Vermessung von Hochauflösungsmassenspektren durchgeführt (Tab. 1)². Als einfache Modellverbindungen des als Begleiter von Penicillin-N auftretenden Antibiotiums Cephalosporin-C standen die zu den untersuchten Penicillinverbindungen völlig analogen Derivate, 7-Phenylacetamido- und 7-Phenoxyacetamido-cephalosporansäuremethylester (I und II), zur Verfügung.

Das Vorhandensein eines wie im Falle der Penicillinester gut ausgeprägten Molekül-Ions *M* gestattet die eindeutige Festlegung bzw. Kontrolle des Molekulargewichts und der Elementarzusammensetzung des jeweiligen Derivates.

Intensitätsmäßig bedeutender ist Ion *A*, das Hauptfragment der höheren Massenregion, das dem Verlust eines $C_2H_3O_2$ -Bruchstückes (59 Masseneinheiten) entspricht. Der gleiche Nominalverlust ist bei

² Die Aufnahme der Massenspektren sowie die genaue Massenbestimmung wurde wie früher¹ beschrieben durchgeführt.

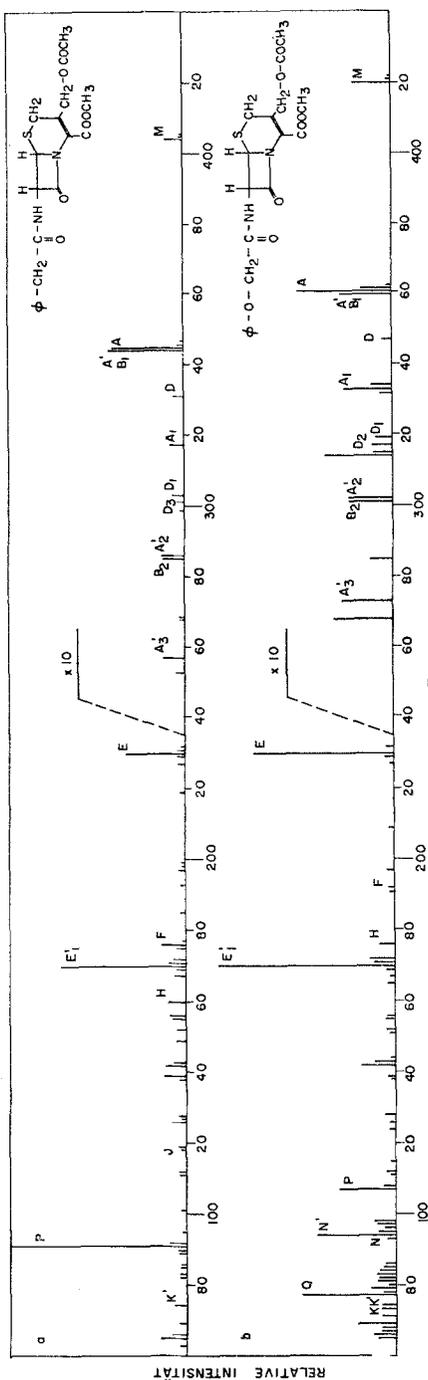


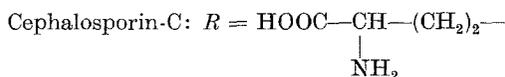
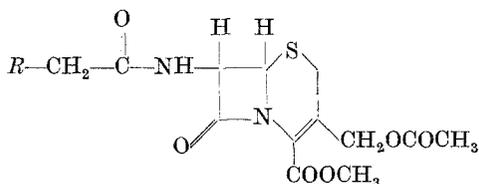
Abb. 1. Massenspektren von (a) 7-Phenylacetamido- und (b) Phenoxyacetamido-cephalosporansäuremethylester

den Penicillinen typisch für die Abspaltung des Carbomethoxyrestes, führt dort jedoch zu einem Fragment von nur geringer Intensität. Eine plausible Erklärung für diese auffällige Diskrepanz bietet die Annahme eines Verlustes der Acetoxygruppe im Falle der Cephalosporine: Die Abspaltung

Tabelle 1

7-Phenylacetamido-cephalosporan-säuremethylester (I)				7-Phenoxyacetamido-cephalosporan-säuremethylester (II)			
Masse (gef.)	Elementar-Zusammensetzung	Δ , mME*	Ion	Masse (gef.)	Elementar-Zusammensetzung	Δ , mME*	
404,1021	$C_{19}H_{20}N_2O_6S$	— 2,2	M	420,0987	$C_{19}H_{20}N_2O_7S$	— 0,4	
376,1088	$C_{18}H_{20}N_2O_5S$	— 0,6	B				
372,1339	$C_{19}H_{20}N_2O_6$	1,7	C	388,1265	$C_{19}H_{20}N_2O_7$	— 0,6	
371,2169	$C_{19}H_{19}N_2O_6$	2,6	C'	387,1172	$C_{19}H_{19}N_2O_7$	— 2,7	
345,0910	$C_{17}H_{17}N_2O_4S$	0,1	A	361,0855	$C_{17}H_{17}N_2O_5S$	— 0,2	
344,1362	$C_{18}H_{20}N_2O_5$	— 1,0	B₁				
344,0847	$C_{17}H_{16}N_2O_4S$	1,6	A'	360,0780	$C_{17}H_{16}N_2O_5S$	0,0	
343,1295	$C_{18}H_{19}N_2O_5$	0,1	B₁'	359,1248	$C_{18}H_{19}N_2O_6$	0,1	
331,0764	$C_{16}H_{15}N_2O_4S$	1,2	D	347,0699	$C_{16}H_{15}N_2O_5S$	— 0,3	
317,0954	$C_{16}H_{17}N_2O_3S$	0,6	A₁	333,0909	$C_{16}H_{17}N_2O_4S$	— 2,9	
303,0811	$C_{15}H_{15}N_2O_3S$	0,7	D₁	319,0768	$C_{15}H_{15}N_2O_4S$	1,5	
301,0642	$C_{15}H_{13}N_2O_3S$	— 0,5	D₂				
286,0771	$C_{15}H_{14}N_2O_2S$	— 0,5	A₂				
285,1255	$C_{16}H_{17}N_2O_3$	1,6	B₂	301,1164	$C_{16}H_{17}N_2O_4$	— 2,4	
257,0752	$C_{14}H_{13}N_2OS$	0,3	A₃	273,0714	$C_{14}H_{13}N_2O_2S$	1,6	
230,0490	$C_9H_{12}NO_4S$	0,3	E	230,0492	$C_9H_{12}NO_4S$	0,5	
229,0414	$C_9H_{11}NO_4S$	0,5	E'	229,0418	$C_9H_{11}NO_4S$	0,9	
227,0493	$C_9H_{11}N_3O_3S$	0,3	A₄				
199,0322	$C_8H_9NO_3S$	1,9	E₂'	199,0293	$C_8H_9NO_3S$	— 1,0	
199,0543	$C_8H_{11}N_2O_2S$	0,2	A₅				
197,0383	$C_8H_9N_2O_2S$	— 0,1	A₆	197,0391	$C_8H_9N_2O_2S$	0,7	
186,0759	$C_8H_{12}NO_4$	— 0,6	G	186,0749	$C_8H_{12}NO_4$	— 1,7	
186,0239	$C_7H_8NO_3S$	1,4	A₇	186,0209	$C_7H_8NO_3S$	— 1,6	
185,0371	$C_7H_9N_2O_2S$	— 1,3	D₃	192,0645	$C_{10}H_{10}NO_3$	— 1,5	
176,0688	$C_{10}H_{10}NO_2$	— 2,4	F				
175,0618	$C_{10}H_9NO_2$	— 1,5	F'	191,0560	$C_{10}H_9NO_3$	— 2,2	
172,0198	$C_7H_8O_3S$	0,4	C₁	172,0221	$C_7H_8O_3S$	2,7	
170,0270	$C_7H_8NO_2S$	— 0,6	E₁'	170,0287	$C_7H_8NO_2S$	1,1	
160,0750	$C_{10}H_{10}NO$	— 1,2	H	176,0711	$C_{10}H_{10}NO_2$	0,0	
126,0557	$C_6H_8NO_2$	0,2	G₁	126,0563	$C_6H_8NO_2$	0,9	
118,0427	C_8H_6O	0,8	J				
91,0546	C_7H_7	— 0,2	P	107,0490	C_7H_7O	— 0,2	
			N	93,0340	C_6H_5O	0,0	
			N'	94,0419	C_6H_6O	0,0	
			Q	77,0384	C_6H_5	— 0,7	
			K	73,0287	$C_3H_5O_2$	— 0,2	
74,0368	$C_3H_6O_2$	— 0,6	K'	74,0368	$C_3H_6O_2$	— 0,6	

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



dieser Gruppe, der die gleiche Elementarzusammensetzung $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ zukommt, liefert ein sicher energetisch sehr begünstigtes, d. h. stark resonanzstabilisiertes Allyl-Ion (**A** in Schema 1).

Zusammen mit **A** tritt ein starker Trabant *M*—60 (**A'**) auf, dessen genaue Massenbestimmung den Verlust der Elemente der Essigsäure anzeigt. Die Intensitätsabhängigkeit der Linie von den Temperaturbedingungen weist jedoch auf thermischen Ursprung hin.

Von größerer Bedeutung ist ein Prozeß, in dem Fragment **A** durch Verlust von CO unter Spaltung des β -Lactamrings zum Tochterfragment **A**₁ führt, gleichfalls eine Parallele zum Zerfall des Penicillinskeletts. Ein analoger Mechanismus wie dort¹ (**A** → **A**₁ in Schema 1) ist naheliegend.

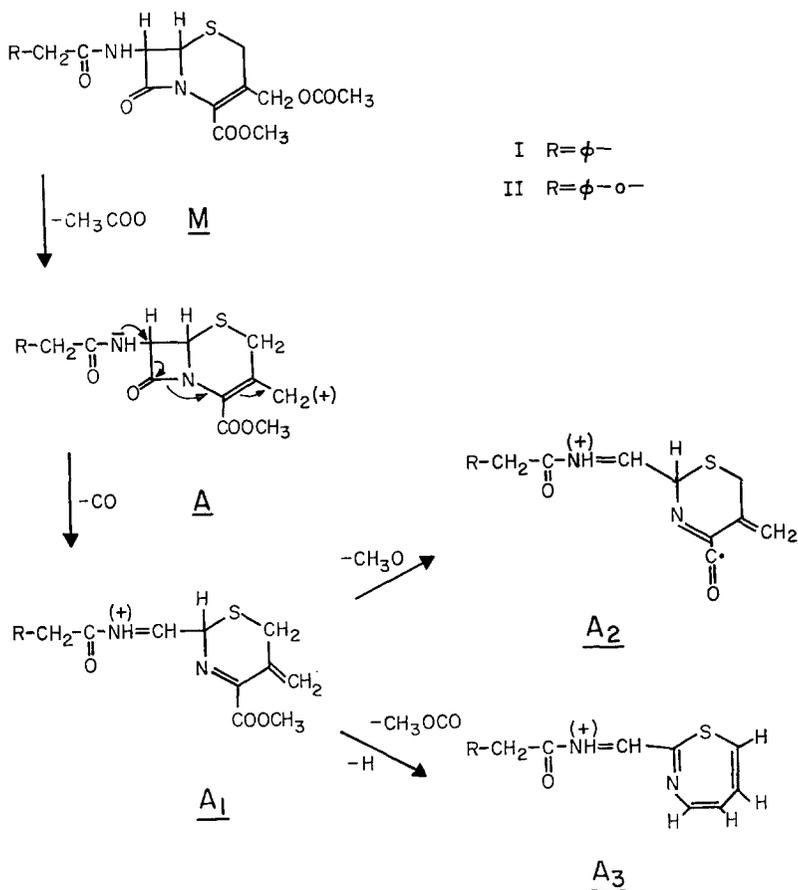
Weitere Zerfallsreaktionen erfassen die Carbomethoxyfunktion und liefern sauerstoffärmere Fragmente, wie **A**₂ und **A**₃, resultierend aus der Abspaltung der Methoxylgruppe bzw. der ganzen Carbomethoxygruppierung einschließlich eines Wasserstoffatoms. Der zweite Vorgang ist möglicherweise, wie formuliert, von einer Ringerweiterung begleitet (Schema 1).

Fragment **A** ist außerdem Ausgangspunkt für einige Zerfallsreaktionen, die zu intensitätsmäßig zwar untergeordneten Bruchstücken wie **A**₄, **A**₅, **A**₆ und **A**₇ führen, welche jedoch mit Rücksicht auf die charakteristischen zu ihrer Entstehung führenden Fragmentierungsreaktionen Erwähnung finden sollen. Eine auffallende Analogie zu den Penicillinsternen tritt z. B. in der Abspaltung des N-Acylrestes als Arylketen auf: Während im Spektrum der Phenylacetamidoverbindung (I) sowohl das Keten **J** als auch das Restfragment (**A**₄) identifizierbar sind, entziehen sich im Falle des Phenoxyderivates (II) beide Ionen dem Nachweis (Schema 2 und Tab. 1). Beim entsprechenden Penicillin-V-ester (Phenoxyverbindung) waren gleichfalls beide Ionen nicht nachweisbar. Fragment **A**₄ besitzt im Verlust von CO (wie **A** → **A**₁) oder Formaldehyd weitere Fragmentierungsmöglichkeiten (zu **A**₅ und **A**₆ führend) und ist daher von geringerer Intensität. Die N-Acyl-Seitenkette tritt ferner im Verband mit 2 C-Atomen des β -Lactamrings (Fragment **H**) auf, gleichfalls analog zu den Penicillinen im Spektrum jeweils beider Verbindungen auftretend. Die Entstehung des Ions **A**₇ mag

mit diesem Spaltungsprozeß verbunden sein, erfordert aber Wanderung eines Wasserstoffs zum Schwefelatom.

Das Fragment $M - 60$, dem bereits oben die Abspaltung eines Moleküls Essigsäure zugeordnet wurde, erweist sich bei hoher Auflösung als ein

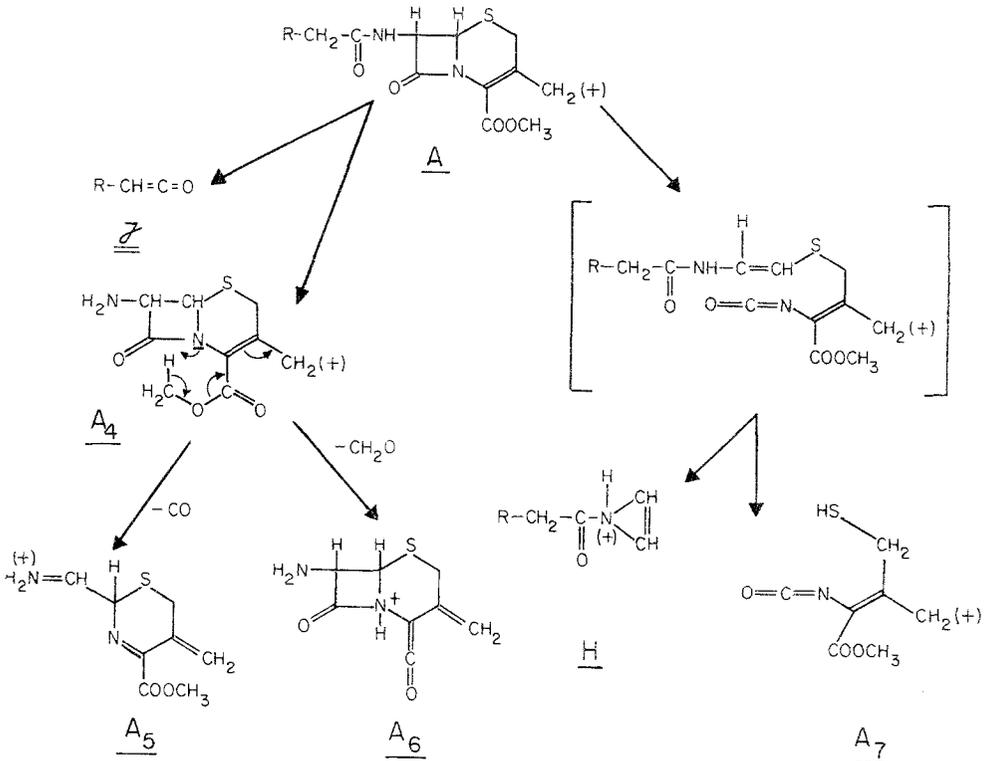
SCHEMA I



Dublett, dessen zweite Komponente (B_1) dem Verlust von $\text{CO} + \text{S}$ gleichkommt (Schema 3). Die Reihenfolge des Verlustes der beiden letzteren Partikel kann nicht entschieden werden, da beide der möglichen Zwischenstufen, $M - \text{CO}$ (B) und $M - \text{S}$ (C), auftreten und entsprechende metastabile peaks fehlen. Obwohl sich beide Fragmente auf Grund ihrer zu geringen Intensität nicht vom üblichen Untergrund der konventionellen

Spektren abheben, können sie im Hochauflösungsspektrum leicht anhand ihrer genauen Masse und Elementarzusammensetzung (Tab. 1) mit Sicherheit identifiziert werden. Durch einen weiteren Verlust von 59 Masseneinheiten, etwa eines Acetatradikals, läßt sich Ion B_2 von B_1 ableiten und

SCHEMA 2



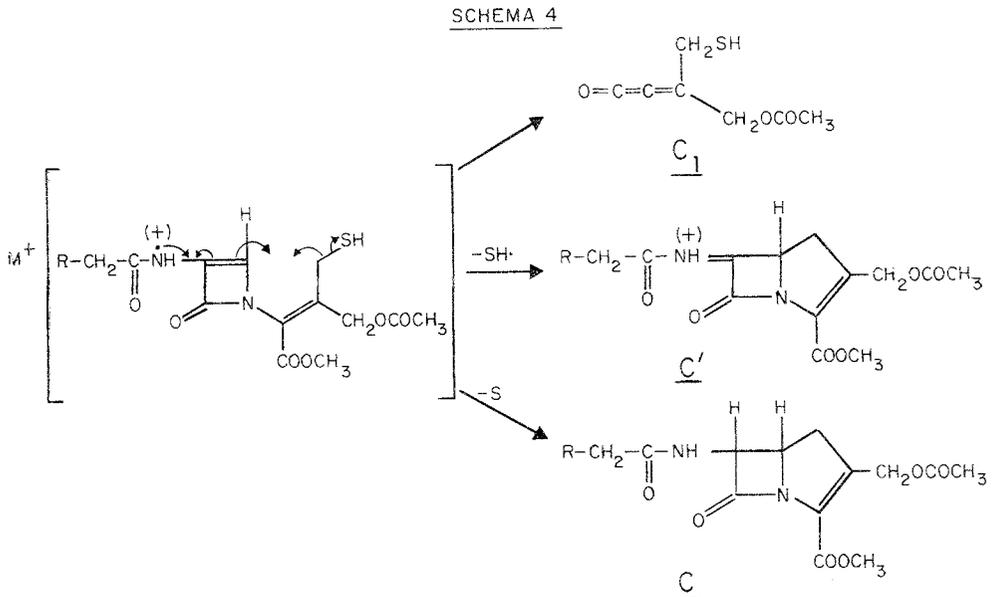
kann als Cyclopropanabkömmling oder ebenso gut als Methylenpyrrolin dargestellt werden³.

Das bereits erwähnte Fragment C besitzt einen wasserstoffärmeren Begleiter C', für den eine mögliche Bildungsweise in Schema 4 formuliert ist.

³ Es sei auch an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß „Strukturen“ dieser Art lediglich als Formalstrukturen betrachtet werden sollten, da es sich um Partikel im angeregten Zustand handelt (siehe *K. Biemann*, „Mass Spectrometry“, MacGraw-Hill Book Company, Inc., New York 1962, S. 71). Eine Differenzierung zwischen Drei- und Fünfring (wie oben) ist daher irrelevant.

und D_3 bieten Abspaltungsreaktionen von CO, Formaldehyd bzw. Arylketen (J) jeweils plausible Erklärungen.

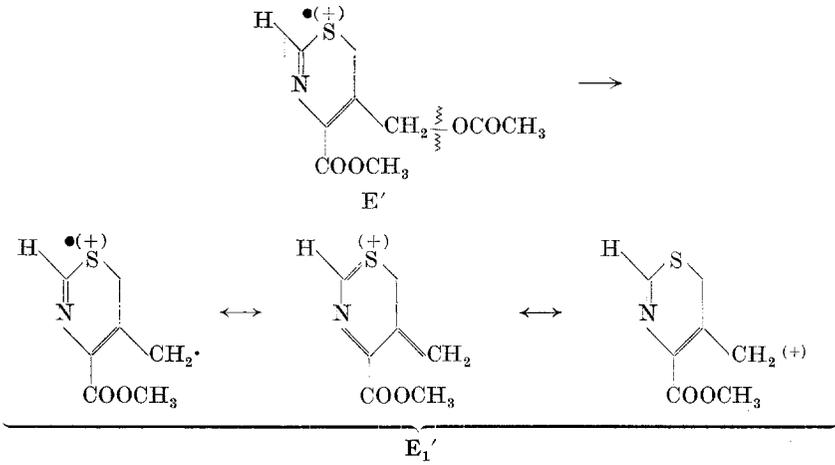
Die im folgenden noch zu diskutierenden Fragmentierungsreaktionen (Schema 6) sind verantwortlich für das Auftreten der beiden im Spektrum dominierenden Fragmente 230 und 170 (E und E_1'). Sie sind äußerst charakteristische Hauptfragmente und das hervorstechende Merkmal der Spektren aller bisher untersuchten Cephalosporansäuremethylester, auch



solcher mit komplizierteren N-Acylresten, die in anderem Zusammenhang von Interesse waren. Beide Fragmente entstammen dem Sechsring des Moleküls und können wiederum in analoger Weise einer bereits bei den Penicillinen vorgefundenen Spaltreaktion zugeordnet werden. Fragment 230 (E) würde damit gemeinsam mit seinem wasserstoffärmeren Begleiter E' aus einem Bruch des β -Lactamrings resultieren, bei dem die Aminoketene F und F' gleichfalls als positiv geladene Bruchstücke anfallen. Das im Vergleich zur protonierten Form, dem Immonium-Ion E , sicher labilere Imin-Ion E' kann sehr wohl durch Abspaltung des Acetoxyrestes als Ion E_1' einen energetisch günstigen Endzustand erreichen.

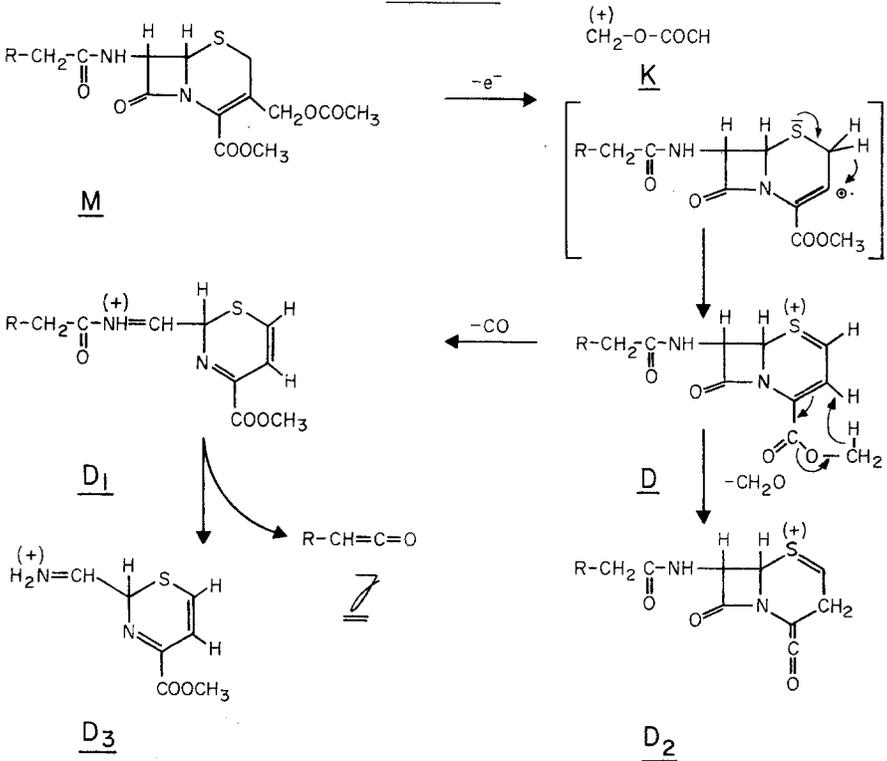
Der genetische Zusammenhang der Bruchstücke E und E_1' gibt sich in einem gut ausgeprägten metastabilen peak der Masse 126,5 (ber. 126,1) zu erkennen.

Die meisten der kleineren Fragmente unterhalb Masse 170 haben bereits durch weitgehenden Zerfall viel Typisches der Gesamtstruktur ver-



loren und eine Zuordnung zu Zerfallsfamilien oder konkreten Fragmentstrukturen wäre trotz feststellbarer Elementarzusammensetzung kaum von

SCHEMA 5



Die oben dargelegte Interpretation der Massenspektren zweier verschieden substituierter Cephalosporansäureester sollte sowohl für die massenspektrometrische Identifizierung von bekannten Verbindungen dieses Typs als auch für die Strukturermittlung neuer Derivate von Nutzen sein. Infolge der Anwesenheit dreier verschiedener Heteroatome in größerer Anzahl ($-\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ bzw. $-\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$) und des Vorherrschens der Heteroatome in den meisten der charakteristischen Fragmente kommt der genauen Massenbestimmung mit Hilfe der Hochauflösungs-Massenspektrometrie besondere Bedeutung zu. Die eindeutige Zuordnung einer bestimmten Elementarzusammensetzung zu einem gegebenen Fragment, dessen Nominalmasse mehrere Möglichkeiten dafür offenläßt, ist dadurch gewährleistet, womit eine der Hauptfehlerquellen der Interpretation in konventioneller Massenspektrometrie wegfällt.

Herrn Dr. *R. B. Morin* (Eli Lilly & Co., Indianapolis) danken wir für die freundliche Überlassung der bearbeiteten Verbindungen, Herrn Dr. *P. Bommer* für die Aufnahme der Hochauflösungsspektren und Frau Mag. pharm. *U. S. 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.