

Das massenspektroskopische Fragmentierungsverhalten von Phäophorbiden*

Von

H. Budzikiewicz, F. G. v. d. Haar**, K. Taraz und H. H. Inhoffen

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Köln, dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Braunschweig und dem Institut für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim, Bundesrepublik Deutschland

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 20. Dezember 1973)

Mass Spectra of Pheophorbides

The mass spectrometric fragmentation behaviour of pheophorbides is discussed.

Als Phäophorbide bezeichnet man Derivate des Porphins, bei denen die 7,8-Doppelbindung des Grundkörpers hydriert und C-6 mit C- γ durch eine $\text{CH}_2\text{—CH}_2$ -Brücke verbunden ist („Isocyclischer Ring“). Alle hier untersuchten Verbindungen sind überdies an C-1, C-5 und C-8 mit einer Methylgruppe und an C-7 mit einer Propionsäureestergruppe substituiert.

Bei den bisherigen Untersuchungen von Porphinderivaten wurde entweder das Fragmentierungsverhalten der gesamten Verbindungsklasse diskutiert¹⁻³, so daß den Phäophorbidspektren nur ein entsprechend geringer Raum zur Verfügung stand, oder es lag ein spezielles massenspektrometrisches Problem an, zu dessen Klärung Porphinderivate als Modelle herangezogen wurden^{4, 5}. Eine systematische Untersuchung liegt bisher nicht vor.

1. Thermische und katalytische Umwandlungen vor der Ionisierung. Wegen der geringen Flüchtigkeit vieler Porphinderivate und der damit verbundenen hohen Meßtemperaturen muß insbesondere bei wenig stabilen Verbindungen mit zumindest teilweisen Umwandlungen vor der Ionisierung gerechnet werden. Dies kann zu einer starken

* 33. Mitt. der Reihe „Zur weiteren Kenntnis des Chlorophylls und des Hämins“, 32. Mitt.: H. H. Inhoffen, P. Jäger und R. Mählhof, Ann. Chem. **749**, 109 (1971).

** Derzeitige Anschrift: Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, D-3400 Göttingen, Bundesrepublik Deutschland.

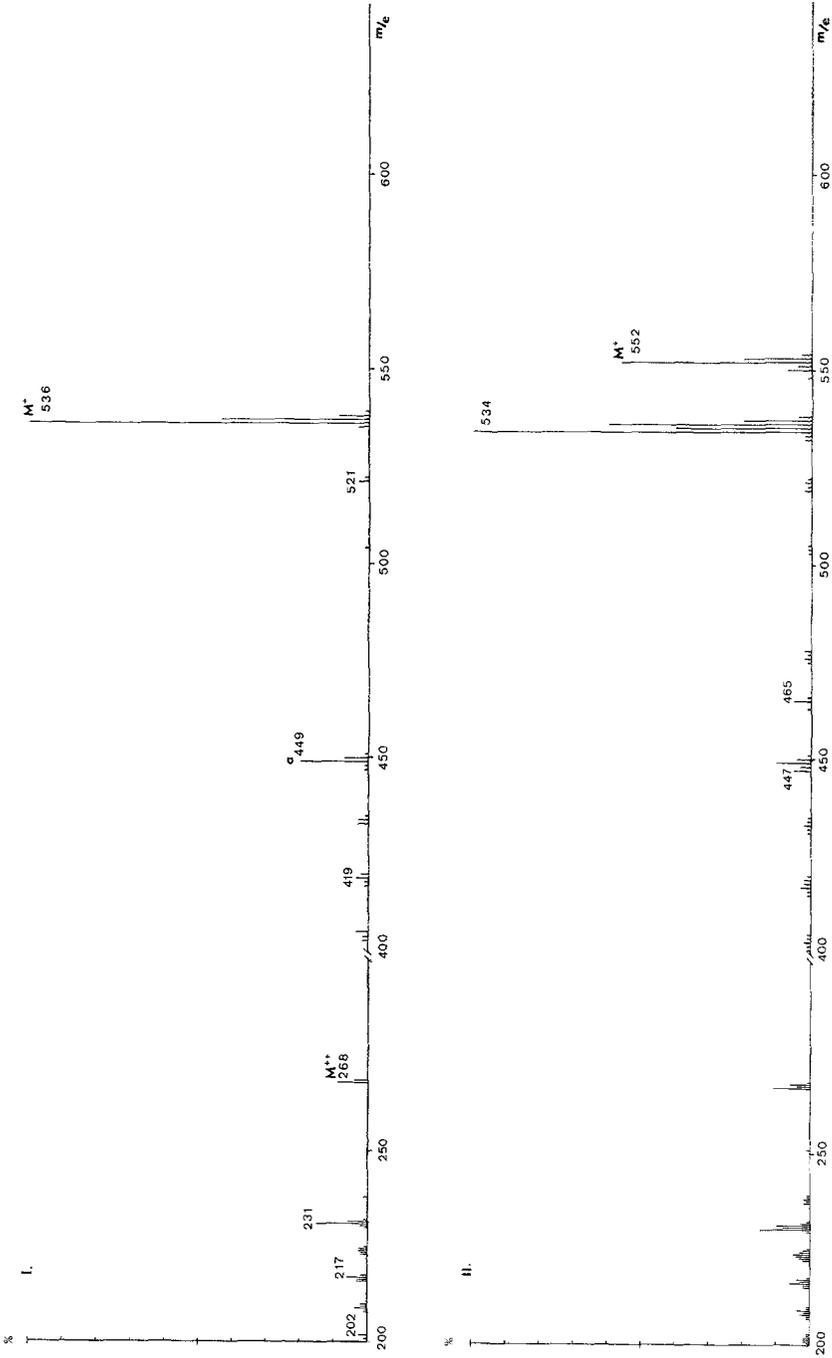


Abb. 1. Massenspektren von 9-Desoxo-mesopyromethylphäophorbid a (I) und von 9-Desoxo-9-hydroxy-mesopyromethylphäophorbid a (II)

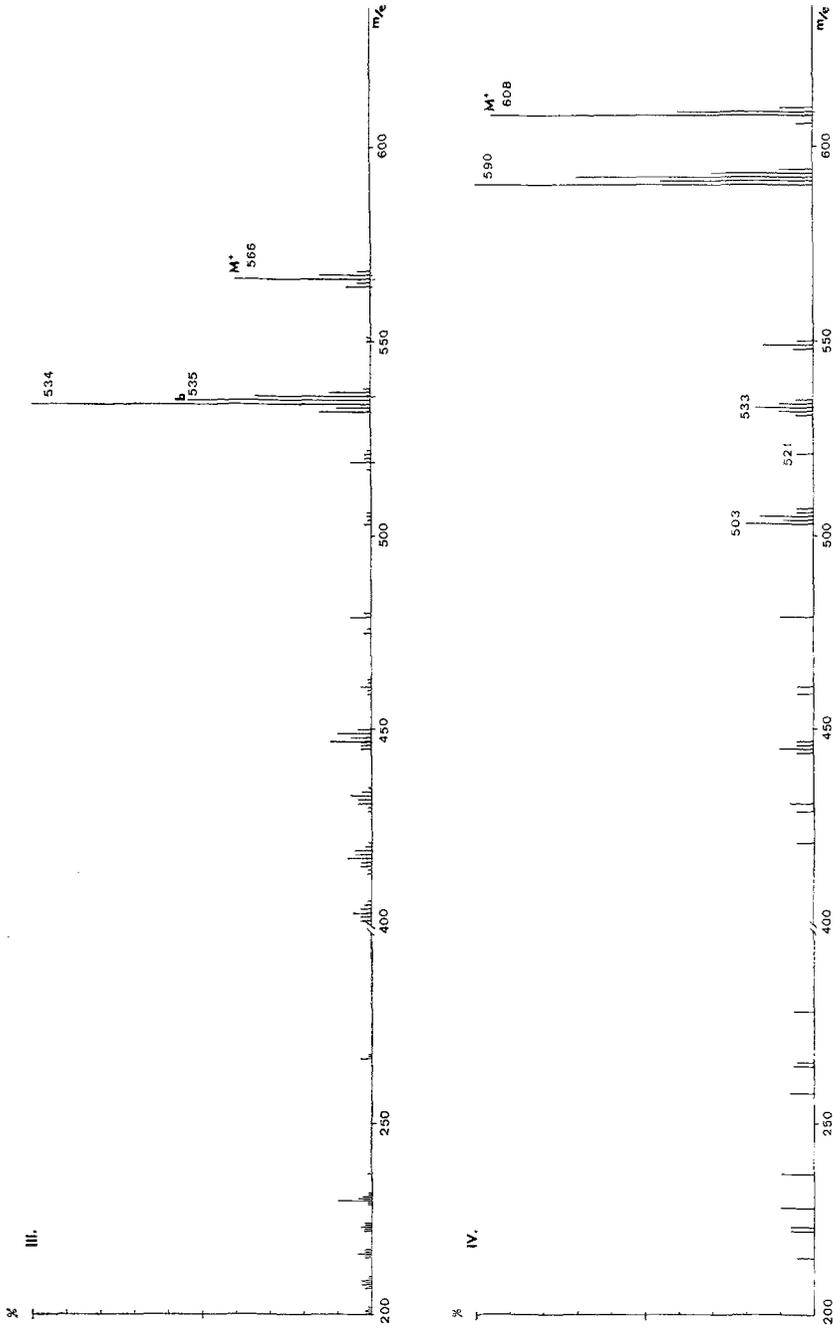


Abb. 2. Massenspektren von 9-Desoxo-9-methoxy-mesopyromethylphäophorbid a (III) und von 9-Desoxo-9-hydroxy-methylphäophorbid a (IV)

ohne Bedeutung (vgl. auch Abschnitt 3), ebenso führt der Abbau der Propionesterseitenkette ($M-\cdot\text{OCH}_3$, $M-\cdot\text{COOCH}_3$) nur zu Ionen geringer Intensität. Konkurrierende Benzylspaltungen ($M-\text{H}\cdot$, $M-\cdot\text{CH}_3$) treten gleichfalls zurück. Ebenso bleibt die Fragmentierung von Acetyl-, Formyl- und Vinylgruppen gegenüber dem Verlust der Propionesterkette von sekundärer Bedeutung. Diesen übertreffen nur der Abbau funktionalisierter Seitenketten^{9, 10} [Verlust von H_2O (Basispeak) bei XI, von CH_2O , $\text{CH}_3\text{O}\cdot$ und CH_3OH (intensivster Fragmentpeak), bei XII (vgl. hierzu Abschnitt 1) sowie die in Abschnitt 2.2. bis 2.4. beschriebenen Prozesse].

2.2. Substitution an C-9. Eine OH-Gruppe [9-Desoxo-9-hydroxy-mesopyromethylphäophorbid a (Epimerengemisch), II] führt zu $M-\text{H}_2\text{O}$ als Basispeak (ob teilweise thermisch?). Wegen „ $M-16$ “ s. Abschnitt 1. Verlust der Propionsäurekette (analog a) ist von M^+ ausgehend etwa 2mal so intensiv wie von $M-\text{H}_2\text{O}$ aus, was für eine wenigstens teilweise elektroneninduzierte H_2O -Eliminierung spricht. Weitere Fragmentierung ist uncharakteristisch.

Bei Einführung einer OCH_3 -Gruppe (9-Desoxo-9-methoxy-mesopyromethylphäophorbid a, Epimerengemisch, III) liegen die Verhältnisse ähnlich: $M-\text{CH}_3\text{OH}$ führt zum Basispeak (daneben etwas $M-\text{CH}_2\text{O}$), wichtigste Benzylspaltung ist Verlust von $\text{CH}_3\text{O}\cdot$ (b).

2.3. 9-Hydroxy-10-methoxycarbonyl-Verbindungen. Das Spektrum von 9-Desoxo-9-hydroxy-methylphäophorbid a (z. B. IV) wird beherrscht von H_2O -Abspaltung (eine einfache Korrelation der Intensität von M^+ und $[M-\text{H}_2\text{O}]^+$ mit der Orientierung der Substituenten an C-9 und C-10 ist nicht möglich), sowie von „ $M-16$ “ (s. Abschnitt 1.1). Verlust der Seitenkette von C-7 ($M-87$) ausgehend von M^+ , $M-18$ und „ $M-16$ “ ist erkennbar, ebenso Abspaltung der Methoxycarbonylgruppe von C-10 ($M-59$, $M-16-59$, etwas $M-18-59$, bevorzugt $M-18-58$, was für die Ausbildung einer 9,10-Doppelbindung beim Verlust von H_2O spricht). Im Bereich zwischen m/e 400 und 500 ragen einzelne Peaks aus Peakgruppen etwas heraus, lassen sich jedoch nicht eindeutig zuordnen.

Die Spektren der C-9, C-10-stereoisomeren 9-Desoxo-9-hydroxy-10-methoxymethylphäophorbide a (z. B. V), sowie deren d_7 -Derivate (10-Methoxy, 7-Methylester, δ) zeigen starke Abhängigkeit von den Aufnahmebedingungen (insbesondere die Ionen $M-16$, $M-\text{CH}_2\text{O}$, $M-\text{CH}_3\text{OH}$, $M-16-\text{CH}_2\text{O}$, $M-16-\text{CH}_3\text{OH}$, $M-16-\text{COOCH}_3$, $M-90$ und $M-105$, was auf thermische Prozesse hindeutet. Als Beispiel wurde ein Spektrum ausgewählt, in dem diese Ionen möglichst geringe Intensität haben). Von Bedeutung erscheint, daß $M-\text{H}_2\text{O}$, $M-\cdot\text{OCH}_3$ (C-10) und $M-87$ (C-7-Kette) von nur geringer Intensität sind. $M-\cdot\text{COOCH}_3$ (C-10) tritt klar hervor. Dieses Fragment kann

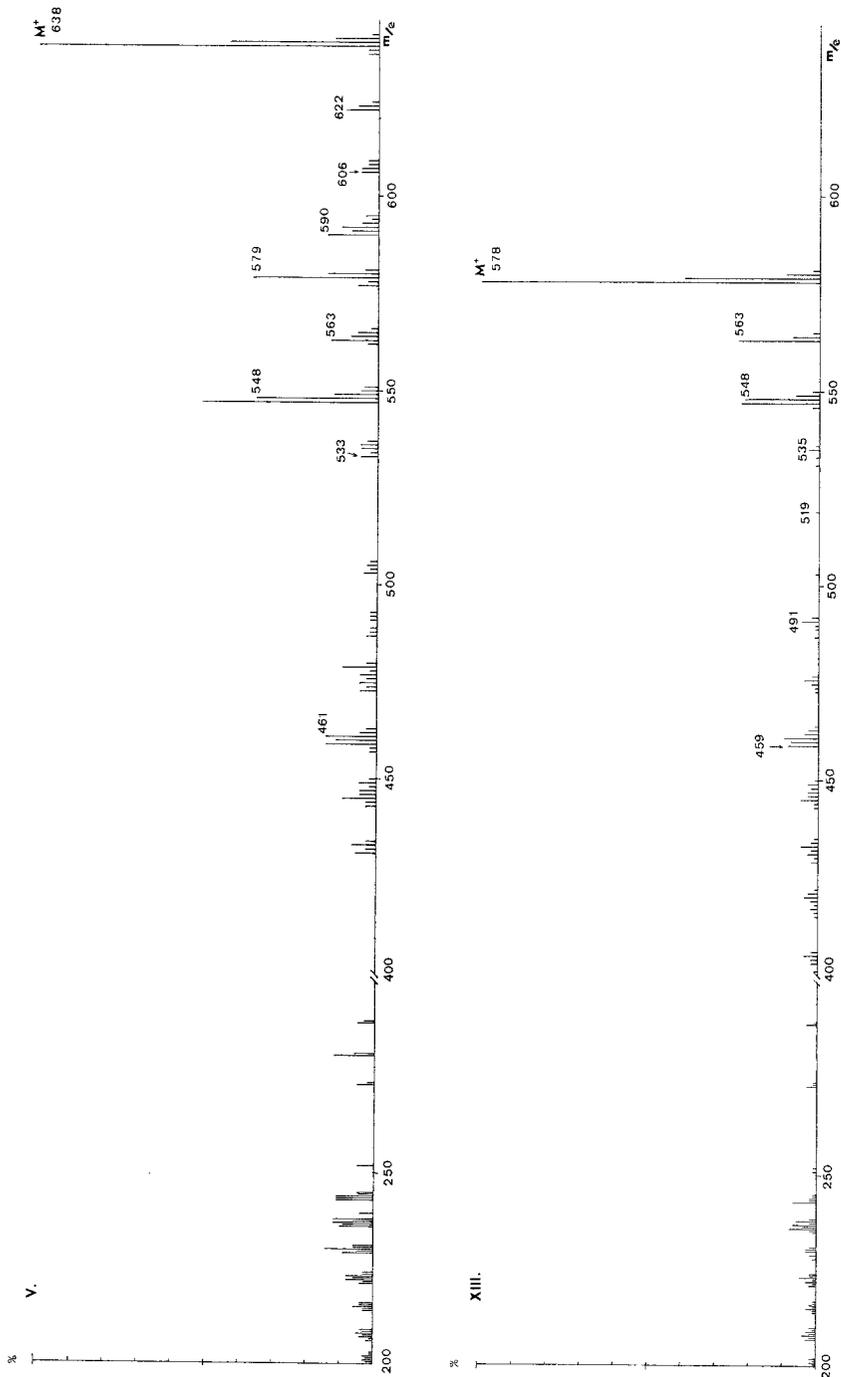
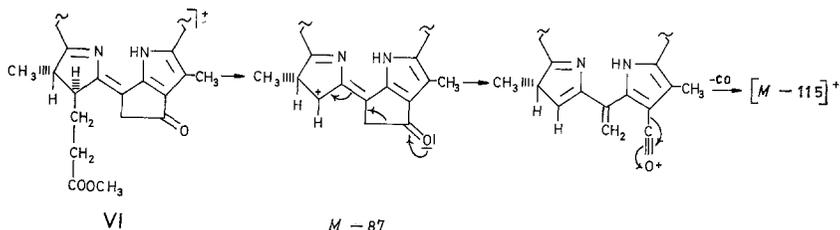


Abb. 3. Massenspektren von 9-Desoxo-9-hydroxy-10-methoxy-methylphäophorbid a (V) und von 10-Methoxy-pyromethylphäophorbid a (XIII)

weiter CH_3OH ($M-91$) verlieren (m^*). In den markierten Verbindungen wird entsprechend ein Ion bei $M-94$ beobachtet, demzufolge beide Substituenten von C-10 abgespalten sein müssen. Ob dieser an sich ungewöhnliche Prozeß unter Nachbarngruppenbeteiligung (C-9—OH) verläuft, ist ungeklärt. $M-177$ und $M-179$ ($M-183$ und 185 bei den markierten Verbindungen) scheinen durch weiteren Zerfall (breiter, nicht eindeutig zuzuordnender m^*) von $M-91$ durch Verlust der C-7-Kette $\pm 1 \text{ H}$ zu entstehen. Klare Intensitätsunterschiede, die auf unterschiedlichen sterischen Bau zurückzuführen sind, lassen sich nicht erkennen.

2.4. 9-Oxo-Verbindungen. Als Beispiel diene das Spektrum von Pyromethylphäophorbid a (VI). Das wichtigste Fragment entsteht durch Verlust der C-7-Kette ($M-87$). Das so gebildete Ion kann weiter CO verlieren ($M-115$, $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_4$). Die Tatsache, daß M^+ selbst kein CO verliert, legt den folgenden Mechanismus nahe:



Von sekundärer Bedeutung sind $M-\cdot\text{CH}_3$, $M-\cdot\text{OCH}_3$, $M-\text{COOCH}_2$ und $\cdot\text{COOCH}_3$ sowie $M-102$ ($\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$, $M-87-\cdot\text{CH}_3$), $M-103$ ($\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}$, $M-87-\cdot\text{CH}_3-\text{H}$), $M-117$ ($\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}$, $M-87-2 \cdot\text{CH}_3$ und $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_4$, $M-87-\text{CO}-2 \cdot\text{H}$) und $M-131$ ($\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_4$, $M-87-\text{CO}-\cdot\text{CH}_3-\text{H}$). Ein Einfluß von Äthyl-, Formyl- und Acetylgruppen an C-2 und C-4 (Mesopyromethylphäophorbid a, VII, Pyromethylphäophorbid b, VIII, 2-Desvinyl-2-acetyl-, IX, und 2-Desvinyl-4-desäthyl-2,4-diacetyl-pyromethylphäophorbid a, X) ist praktisch nicht feststellbar. Einführung einer OH-Gruppe in die C-4-Seitenkette (2-Desvinyl-2-acetyl-4'-hydroxypyromethylphäophorbid a, XI) führt zu intensiven $M-16$ - (55%) und $M-18$ -Ionen (100%); die für VI beschriebene Fragmentierung geht von diesen ebenso wie von M^+ aus. Analoges wird bei Anwesenheit einer Methoxygruppe (2-Desvinyl-2-acetyl-4'-methoxy-pyromethylphäophorbid a, XII) beobachtet [Verlust von CH_2O , $M-30$ (80%), und CH_3OH , $M-32$ (75%) und davon wie von M^+ ausgehende Fragmentierung]. Zusätzlich ist $M-31$ ($\cdot\text{OCH}_3$) erwartungsgemäß intensiver als bei VI (15%).

Eine Alkoxygruppe an C-10 (die stereoisomeren 10-Methoxypro-

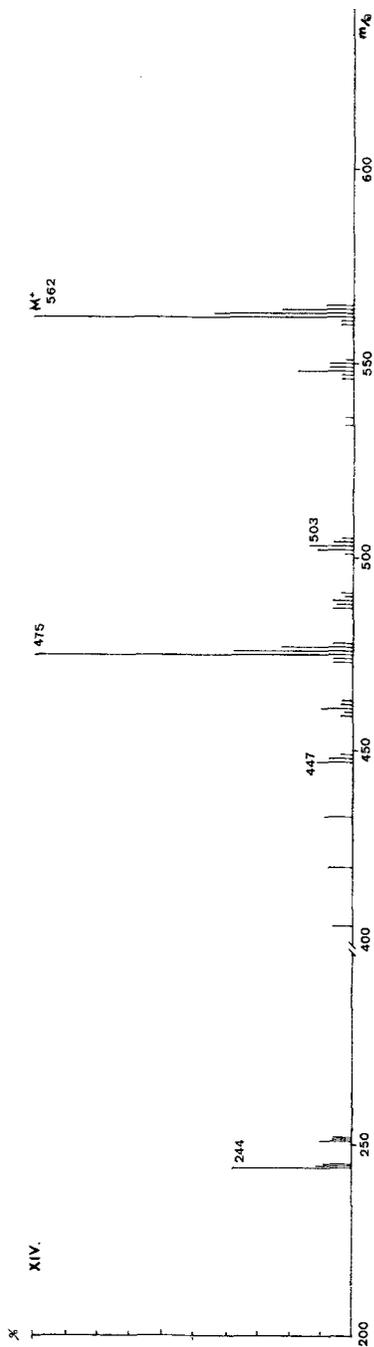
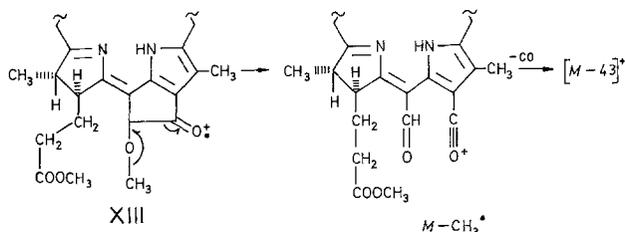


Abb. 4. Massenspektrum von 10-Oxopyromethylphäophorbid a (XIV)

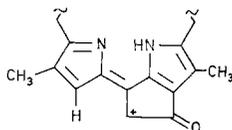
methylphäophorbide a und b, z. B. XIII) dominiert das Fragmentierungsverhalten: die intensivsten Fragmente sind durch $M-CH_2O$, $M-CH_3O^+$, $M-CH_3OH$ (mit unterschiedlicher Intensität, thermisch?) und $M-\cdot CH_3$, dessen unerwartet hohe Intensität die folgende Bildungsweise nahelegt (vgl. unten):



Das so gebildete Ion kann noch CO abspalten ($M-43$). $M-59$ ($COOCH_3$) und 87 (C-7-Kette) ist deutlich erkennbar, letzteres verliert anschließend noch CH_3OH ($M-119$). Von Interesse ist, daß die durch die Äthergruppe bedingten Spaltungsreaktionen stärker ausgeprägt sind, wenn die Methoxyl- und die Esterseitenkette sich auf der gleichen Seite des Ringes befinden (sterische Behinderung).

Die zweite Ketogruppe in 10-Oxo-pyromethylphäophorbid a (XIV) beeinflußt das Fragmentierungsmuster kaum: $M-59$ ($COOCH_3$) $M-87$ (C-7-Seitenkette) sowie weiterer Verlust von CO ($M-115$) entspricht den Beobachtungen bei VI.

Methylphäophorbid a (XV; die Verbindung der b-Reihe fragmentiert analog; bezüglich $M-32$ und $M-58$, s. Abschnitt 1.2.): Wie bei allen am isocyclischen Ring höher substituierten Verbindungen bestimmt Fragmentierung in diesem Molekülteil den Zerfall. Verlust der C-7-Kette für sich allein ($M-87$, $C_{32}H_{31}N_4O_3$) tritt stark zurück (daneben $M-87-32$). Bedeutend intensiver ist der Verlust der C-10-Carbomethoxygruppe ($M-59$), (vgl. I) sowie eine kombinierte Zerfallsreaktion ($m^*!$), die zu $M-147$ ($C_{30}H_{27}N_4O$) führt:



Derartige Reaktionen, bei denen mehrere Substituenten zusammen verloren werden, sind typisch für hochsubstituierte Porphinderivate,

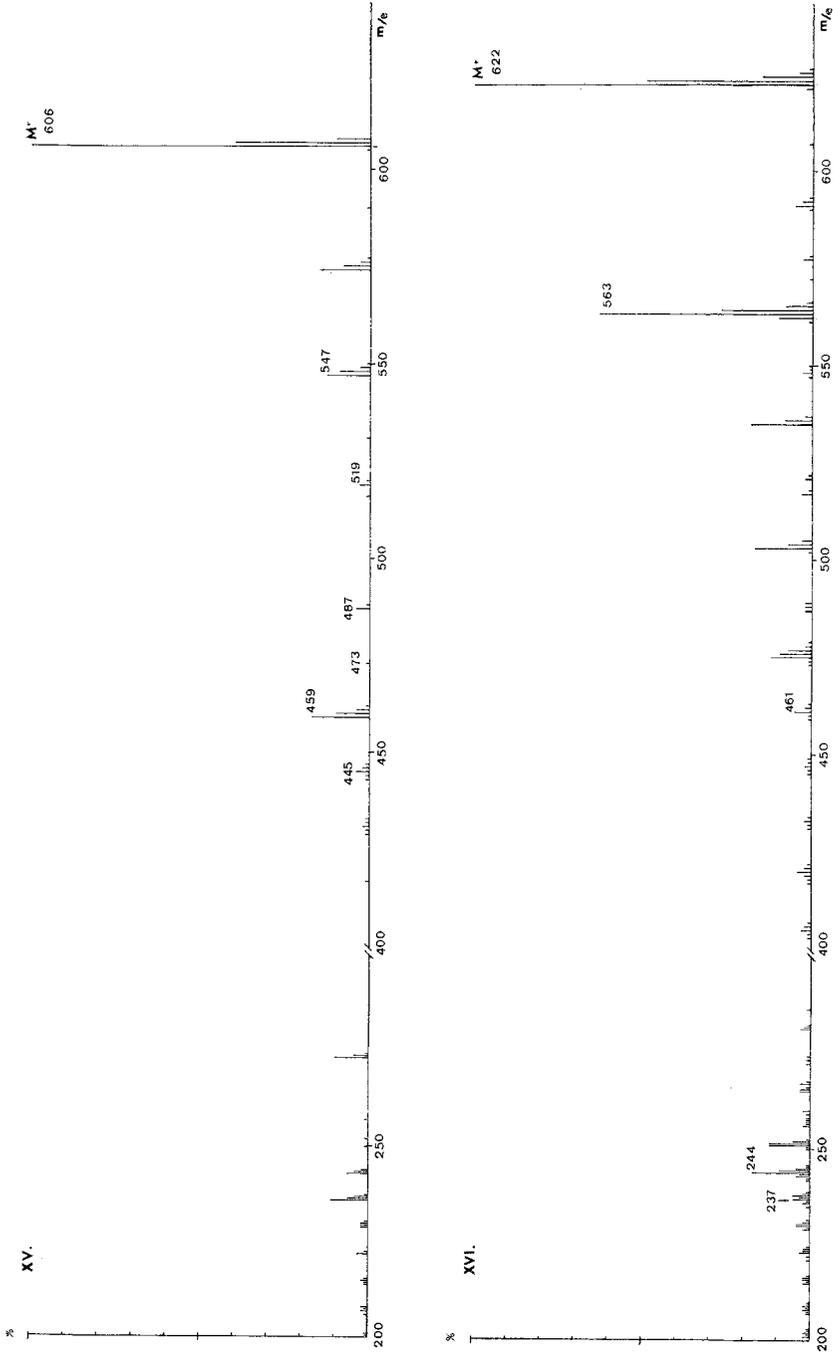
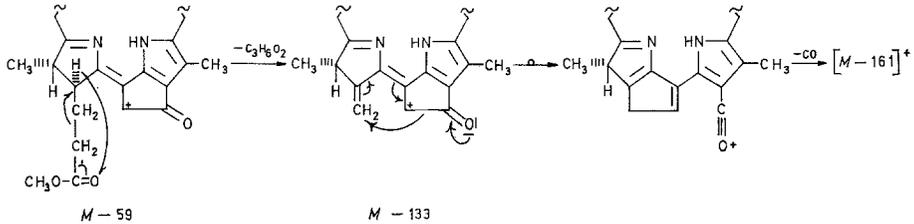


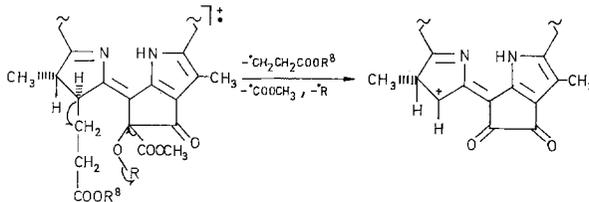
Abb. 5. Massenspektren von Methylphäophorbid a (XV) und von 10 ξ -Hydroxy-methylphäophorbid a (XVI)

bei denen die Substituenten sterisch in Wechselwirkung treten können⁴. Von geringerer Intensität ist $M-161$ (90% $C_{29}H_{25}N_4O$, $M-87$ — $COOCH_3$ — CH_3 , 10% $C_{30}H_{29}N_4$, $M-CH_3COOCH_3$ — $COOCH_3$ — CO):



Das Fragmentierungsmuster von 10 ξ -Hydroxymethylphäophorbid a (XVI) entspricht qualitativ dem von XV, nur ist erwartungsgemäß der Verlust der C-10-Methoxycarbonylgruppe ($M-59$), da jetzt von einem quartären C-Atom ausgehend, viel ausgeprägter (50% rel. Int.) Abspaltung von H_2O tritt nicht auf.

Die Spektren der C-10-epimeren 10-Methoxymesomethylphäophorbide der a- und der b-Reihe¹¹ (z. B. XVII) unterscheiden sich praktisch nicht. Sie werden beherrscht von $M-59$ (Basispeak) und $M-161$ (vgl. oben), daneben etwas $M-32$ (s. XV), $M-87$ fehlt praktisch. Über die Genese von $M-161$ geben die Massenspektren von 10-Methoxyäthylphäophorbid a (z. B. XVIII) und 10-Äthoxymethylphäophorbid a (z. B. XIX; die Spektren der Epimeren unterscheiden sich wieder praktisch kaum) Auskunft, da in beiden Fällen nun $M-175$ beobachtet wird. Eine mögliche Formulierung wäre:



Infolge der durch Einführung der sperrigen Isopropoxygruppe bedingten größeren Spannung im Bereich des isocyclischen Ringes weicht das Fragmentierungsverhalten der epimeren 10-Isopropoxymethylphäophorbide a (z. B. XX) von dem der bisher besprochenen Verbindungen ab: Von Bedeutung ist nur eine Sequenz, die mit der Abspaltung von $C_3H_7^+$ beginnt. Da eine derartige Spaltung eines Äthers

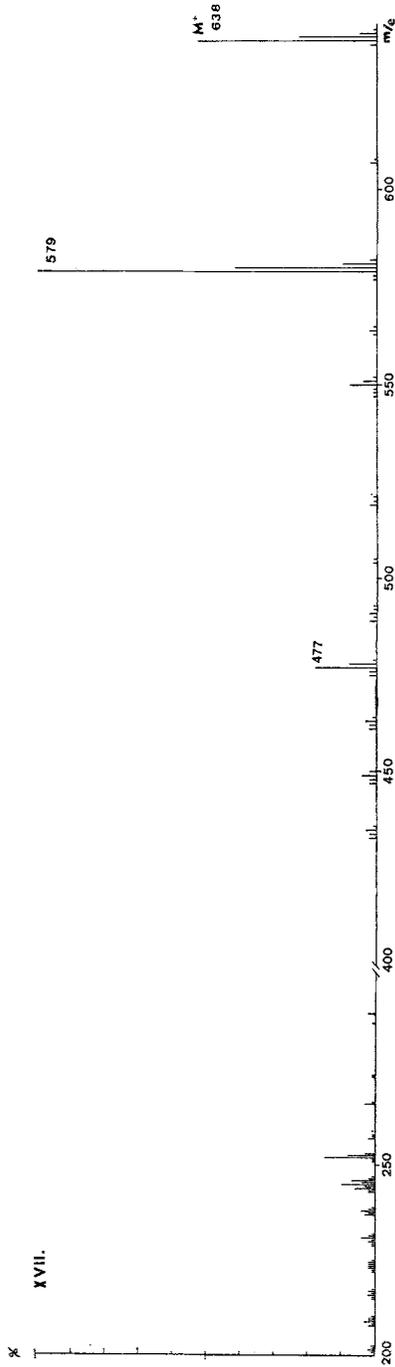
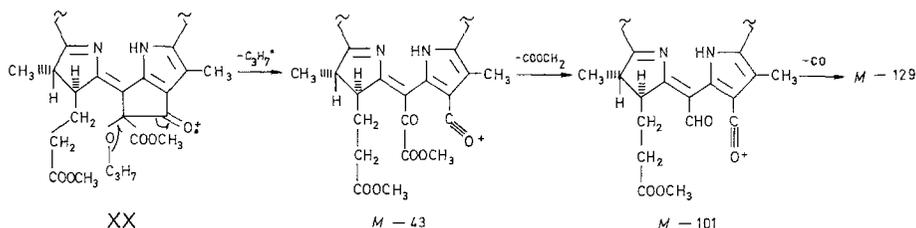


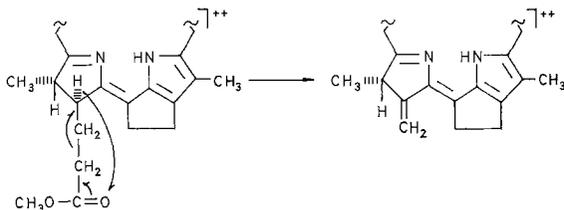
Abb. 6. Massenspektrum von 10-Methoxy-mesomethylphäophorbid a (XVII)

sonst nicht beobachtet wird, geht diesem Prozeß sicher Spaltung der gespannten C-9/C-10-Bindung voraus:



Es handelt sich hier um ein interessantes Beispiel dafür, wie bei Vorliegen mehrerer ähnlich labiler Bindungen an sich geringfügige strukturelle Veränderungen (hier Ersatz einer Äthoxy- durch eine Isopropoxygruppe) das Fragmentierungsmuster vollkommen verändern können.

3. Fragmentierung im doppelt geladenen Bereich ist weitgehend durch die Abspaltung geradelektronischer Teilchen gekennzeichnet. Der wichtigste Prozeß hierbei ist der Verlust der C-7-Kette durch *McLafferty*-Umlagerung ($M-74$, $C_{31}H_{34}N_4^{++}$ bei I), ein Prozeß, der im einfach geladenen Bereich nur in Kombination mit Radikalabspaltungen beobachtet wird (s. z. B. $M-161$ bei XVI):



Der weitere Abbau wurde bei I durch Massenmessungen gesichert: $[M-102]^{++}$ ($C_{29}H_{30}N_4$, $M-74-C_2H_4$), $[M-118]^{++}$ ($C_{28}H_{26}N_4$, $M-74-C_3H_8$), $[M-132]^{++}$ ($C_{27}H_{24}N_4$), doch sind diese Ionen, ähnlich wie die Sekundärfragmentierung im einfach geladenen Bereich, in Peakgruppen eingebettet und daher nicht sehr charakteristisch.

Der Verlust leicht abspaltbarer Gruppen mit gerader Elektronenzahl (H_2O , CH_3OH) wird auch im doppelt geladenen Bereich sowohl für sich allein als auch in Kombination mit den oben angeführten Fragmenten beobachtet. Bei höher substituierten Verbindungen treten wieder Kombinationsabspaltungen hervor, die z. T. von hoher Intensität und daher für bestimmte Gruppierungen charakteristisch sein können. Als Beispiel diene XVI: $M-120$ ($C_{32}H_{30}N_4O$, $2 \cdot COOCH_3 + 2 \cdot H$),

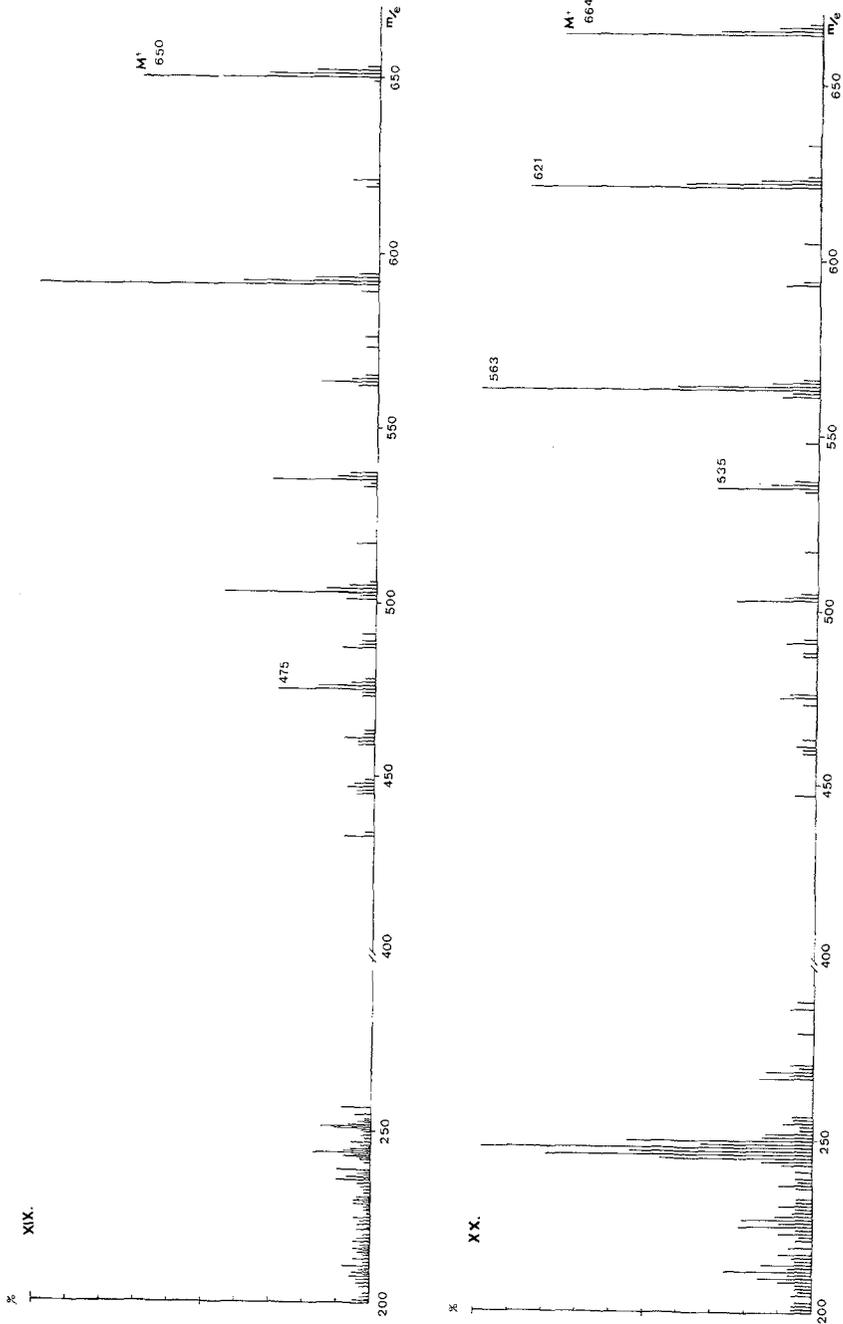
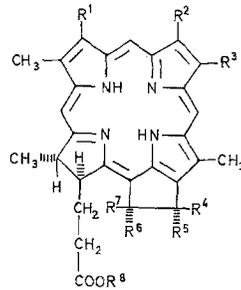


Abb. 7. Massenspektren von 10-Äthoxy-methylphäophorbid a (XIX) und von 10-Isopropoxy-methylphäophorbid a (XX)



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
I	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	H	H	H	H	CH ₃
II	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	H, OH		H	H	CH ₃
III	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	H, OCH ₃		H	H	CH ₃
IV	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	OH	H	H	COOCH ₃	CH ₃
V	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	H	OH	OCH ₃	COOCH ₃	CH ₃
VI	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		H	H	CH ₃
VII	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		H	H	CH ₃
VIII	C ₂ H ₃	CHO	C ₂ H ₅	=O		H	H	CH ₃
IX	CH ₃ CO	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		H	H	CH ₃
X	CH ₃ CO	CH ₃	CH ₃ CO	=O		H	H	CH ₃
XI	CH ₃ CO	CH ₃	CH ₃ CHOH	=O		H	H	CH ₃
XII	CH ₃ CO	CH ₃	CH ₃ CH(OCH ₃)	=O		H	H	CH ₃
XIII	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		H	OCH ₃	CH ₃
XIV	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		=O		CH ₃
XV	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		COOCH ₃	H	CH ₃
XVI	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		OH, COOCH ₃		CH ₃
XVII	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		COOCH ₂	OCH ₃	CH ₃
XVIII	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		COOCH ₃	OCH ₃	C ₂ H ₅
XIX	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		COOCH ₃	OC ₂ H ₅	CH ₃
XX	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	=O		COOCH ₃	OCH(CH ₃) ₂	CH ₃

M-134 (C₃₁H₂₈N₄O, ·CH₂COOCH₃ + ·COOCH₃ + 2 ·H), *M*-148 (C₃₀H₂₆N₄O, ·(CH₂)₂COOCH₃ + ·COOCH₃ + 2 ·H), *M*-148 (C₃₁H₃₀N₄, 2 ·COOCH₃ + 2 ·H + CO; bei XVIII um 14 u verschoben, was die Abspaltung der C-7-Seitenkette bestätigt).

Zusammenfassung: Wie bei anderen Porphinderivaten erfolgt auch hier Bruchstückbildung praktisch nur durch Abbau der Seitenketten bzw. des isocyclischen Ringes, wobei sowohl im einfach wie auch im doppelt geladenen Bereich bevorzugt geradelektronische Ionen gebildet werden. Bei hochsubstituierten Verbindungen, bei denen die einzelnen Gruppen sterisch miteinander in Wechselwirkung treten können, kann es zu charakteristischen multiplen Fragmentierungsreaktionen kommen. Die Spektren von stereoisomeren Verbindungen unterscheiden sich im allgemeinen kaum.

Der Stiftung Volkswagenwerk möchten wir für die Mittel zur Anschaffung des MS-9 Massenspektrometers, der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung m. b. H., in deren Laboratorien die meisten der hier diskutierten Spektren gemessen worden sind, für die gewährte Arbeitsmöglichkeit bestens danken.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät MS-9 der Firma AEI, Manchester, mit direktem Einlaßsystem gemessen. Die Quellentemperatur betrug zwischen 220 und 260°, die Ionisierungsenergie 70 eV und die Beschleunigungsspannung 8 kV.

Literatur

- ¹ A. H. Jackson, G. W. Kenner, K. M. Smith, R. T. Aplin, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *Tetrahedron* **21**, 2913 (1965).
- ² D. R. Hoffman, *J. Org. Chem.* **30**, 3512 (1965).
- ³ F. G. v. d. Haar, Dissertation Technische Hochschule Braunschweig, 1966.
- ⁴ H. Budzikiewicz, F. G. v. d. Haar und H. H. Inhoffen, *Ann. Chem.* **701**, 23 (1967).
- ⁵ H. Budzikiewicz und F. G. v. d. Haar, *Org. Mass Spectrom.* **1**, 323 (1968).
- ⁶ H. Budzikiewicz, *Croat. chem. acta* **42**, 567 (1970).
- ⁷ H. Budzikiewicz und S. E. Drewes, *Ann. Chem.* **716**, 222 (1968).
- ⁸ H. Budzikiewicz, *Adv. in Mass Spectrom.* **4**, 313 (1968).
- ⁹ H. H. Inhoffen, P. Jäger, R. Mähllhop und C.-D. Mengler, *Ann. Chem.* **704**, 188 (1967).
- ¹⁰ C.-D. Mengler, Dissertation Techn. Hochsch. Braunschweig, 1966.
- ¹¹ H. Wolf, H. Brockmann, jr., H. Biere und H. H. Inhoffen, *Ann. Chem.* **704**, 208 (1967).

Prof. Dr. H. Budzikiewicz
Institut für Organische Chemie
Universität Köln
Zülpicher Straße 47
D-5000 Köln I
Bundesrepublik Deutschland