

Die Massenspektren der *N*-Formyl- α -aminosäure-methylester

VON KURT HEYNS UND HANS-FRIEDRICH GRÜTZMACHER

Aus dem Chemischen Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg
(Z. Naturforsch. 16 b, 293—298 [1961]; eingegangen am 10. März 1961)

Die Massenspektren der Formylaminosäuremethylester oder der aus diesen Verbindungen durch Vakuumdestillation erhaltenen Aminosäure-Derivate werden für Glycin, Alanin, α -Aminobuttersäure, Norvalin, Valin, Norleucin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Prolin, Hydroxyprolin, Serin, Threonin, Glutaminsäure und Asparaginsäure angegeben und diskutiert. Die Massenspektren dieser Verbindungen eignen sich gut zur Identifizierung einer Aminosäure.

Im Zusammenhang mit Versuchen über die präparative Trennung von Aminosäuregemischen durch Destillation der Formylaminosäuremethylester wurden die Massenspektren dieser Verbindungen untersucht. Die ausführlichere Veröffentlichung der Massenspektren der Aminosäureäthylester¹ und anderer Aminosäurederivate veranlaßt uns, über die Ergebnisse zu berichten.

Da sich die Massenspektren der *D*- und *L*-Aminosäuren nicht unterscheiden, sind wir bei der Darstellung der Formylaminosäureester von den *DL*-Aminosäuren ausgegangen. Nur beim Leucin, Prolin und Hydroxyprolin wurden die *L*-Formen eingesetzt. Die Aminosäuren wurden mit methanolischer Salzsäure verestert und durch Erhitzen der Aminosäureester-Hydrochloride mit einer Mischung aus Ameisensäure und Acetanhydrid unter Zusatz von Na-Formiat in die Formylaminosäureester überführt. Zur Reinigung wurde nach Entfernen des überschüssigen Säuregemisches und der gebildeten Salze mehrfach bei ca. 0,1 Torr destilliert. Über die Eigenschaften der Formylaminosäuremethylester wird an anderer Stelle berichtet werden.

Die Massenspektren wurden mit einem CH-4-Gerät der Atlas-Werke, Bremen, mit einer Elektronenenergie von 70 V aufgenommen. Der Einlaßteil des Gerätes wurde auf 150 °C aufgeheizt, die Temperatur der Ionenquelle betrug dann 260 °C. Die Formylaminosäureester wurden mit Hilfe einer elektrisch geheizten Kapillar-Flüssigkeitsschleuse in die Vorratsbehälter des Einlaßteils eingeführt. Der Massendurchlauf und die Registrierung der Ionenströme erfolgte automatisch, die Zeit für die Aufnahme des Massenbereichs von $m/e = 12$ bis $m/e = 200$ betrug dabei etwa 20 Minuten.

Die Massenspektren der untersuchten Formylaminosäuremethylester sind relativ reich an Massen-

peaks, jedoch treten nur wenige der Fragmentationen mit größerer Häufigkeit auf. Zwei Ionen werden von fast allen Formylaminosäureestern gebildet. Das eine mit der Masse *M*-59 (*M* = Molekulargewicht) entsteht durch Abspaltung der Carbomethoxygruppe. Eine gleichartige Spaltung wurde auch bei den freien Aminosäure-methyl-(2) und -äthylestern (1) und den *N*-Acetylaminosäuren gefunden. Bei der Bildung des anderen Ions wird zusätzlich entweder die CO-Gruppe des Formylrestes (*M*-87) oder der ganze Formylrest (*M*-88) abgespalten.

Die Massenspektren der verschiedenen Gruppen von Formylverbindungen zeigen die folgenden Erscheinungen:

1. Monoamino-monocarbonsäuren

Die zu den wichtigsten Ionen führenden Spaltungen sind in Abb. 1 schematisch dargestellt. Nicht angezeigt ist eine Abspaltung der jeweiligen Seiten-

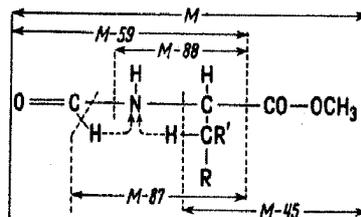


Abb. 1. Schematische Darstellung des Spaltungs-Vorganges.

kette, die zu einem Ion mit der Masse des Formylglycinmethylesters ($M = 117$) führt. Außer bei den Verbindungen des Alanins und des Prolins tritt dieses Ion bei allen Formylaminosäureestern der einfachen Aminosäuren auf, hat aber nur bei einer großen Seitenkette (Leucin und Isoleucin) einige Bedeutung. Ionen, die durch eine weitergehende Spaltung der Seitenkette entstehen, wurden nicht berücksichtigt, da sie wenig charakteristisch sind.

¹ K. BIEMAN, *Chimia* [Zürich] 14, 393 [1960].

² C. O. ANDERSON, *Acta chem. scand.* 12, 1353 [1958].

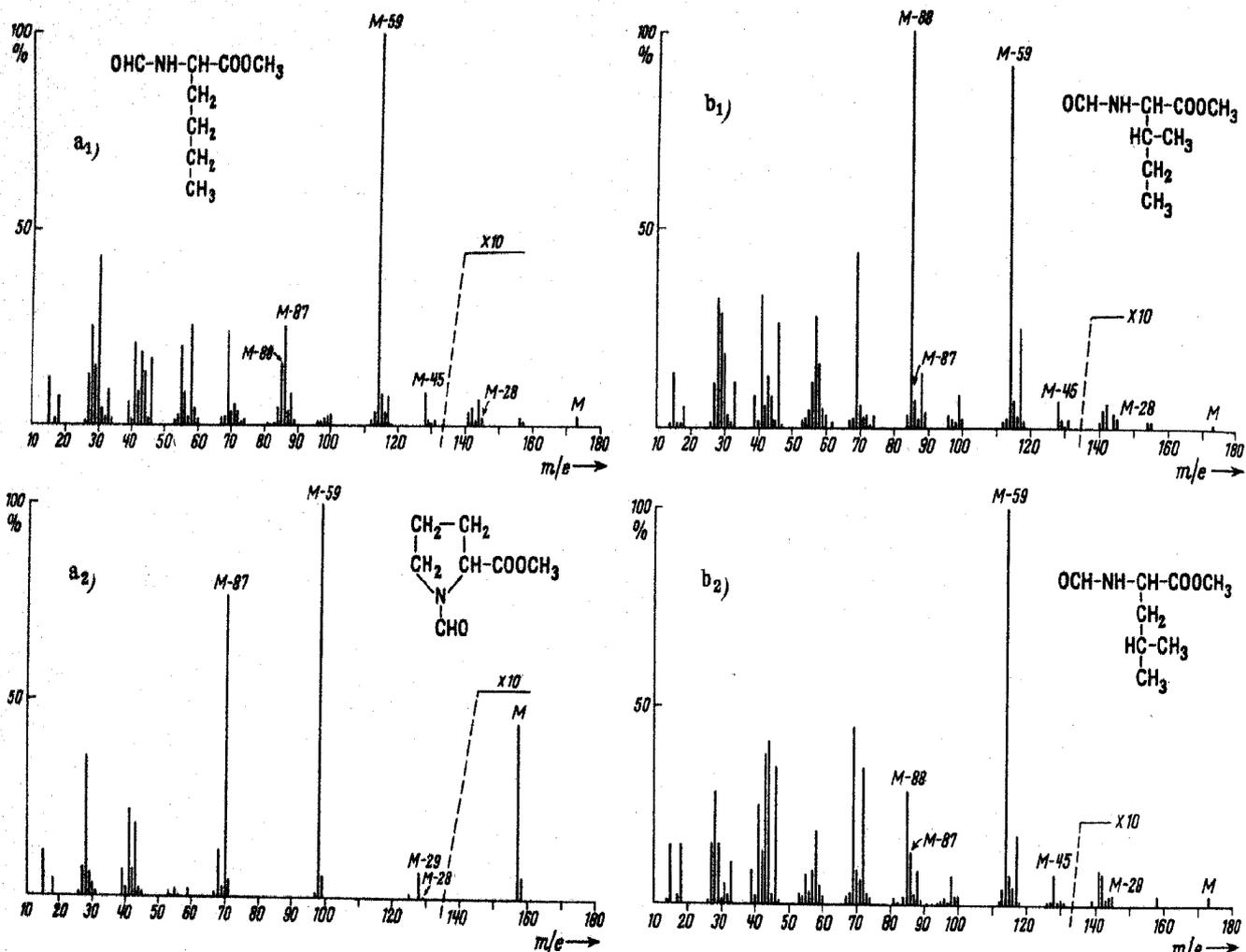


Abb. 2 a. a₁) N-Formyl-norleucin-methylester;
a₂) N-Formyl-prolin-methylester.

Abb. 2 b. b₁) N-Formyl-isoleucin-methylester;
b₂) N-Formyl-leucin-methylester.

Die auf das häufigste Ion (Haupt-Ion) = 100 bezogene Intensität der einzelnen Ionen geben Tab. 1 und Abb. 2 wieder.

Das Molekülion M (parent peak) lässt sich in allen Fällen beobachten, seine Intensität ist jedoch gering. Auch andere Ionen, die durch eine Abspaltung kleiner Molekülteile wie H₂O (M-18), CO (M-28), HCO (M-29) oder -OCH₃ (M-31) entstehen, treten im allgemeinen nur mit geringen Intensitäten auf. Eine Ausnahme sind die Ester des Formylglycins, bei denen M-28 stärker hervortritt, und der Formyl-

prolinester, dessen Formylgruppe häufiger abgespalten wird (M-29). Ein Zerfall des Formylamino-säureesters in Formamid und ein ungesättigtes Esterion der Masse M-45 tritt dagegen bei Aminosäure-Derivaten dieser Gruppe stärker auf, mit Ausnahme der Prolinverbindung, bei der wegen der Ringstruktur diese Reaktion nicht möglich ist. Beim Formylphenylalaninmethylester ist dieses Esterion das am stärksten gebildete Bruchstück, da der entstehende Zimtsäureester besonders stabil ist.

Das Haupt-Ion der übrigen Formylamino-säure-

Ion	Gly*	Gly	Ala	Amb	Nval	Val	Nleu	Leu	Ileu	Pro	Phe
M	0,30	0,36	1,16	2,00	0,61	0,10	0,23	0,27	0,1	4,46	1,65
M-28	10,3	24,0	2,9	2,6	0,9	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	0
M-29	0,7	0,5	0,2	4,0	0,5	0,6	0,7	0,2	0,4	6,6	0,1
M-31	1,3	5,8	1,7	1,0	1,1	0,8	0,5	0,8	0,6	0	0,4
M-45	7,8	5,0	2,3	9,6	9,9	14,5	8,1	7,8	6,6	0,5	100
M-59	61,2 ¹	60,0	100	100	100	100	100	100	90,9	100	8,5
M-87	100 ¹	100	91,8	61,1	24,2	3,0	25,3	13,4	7,0	76,3	0
M-88	—	18,7	6,9	3,1	3,0	2,0	15,8	29,0	100	2,9	22,6
117	—	—	0	2,6	7,3	6,4	7,7	17,5	25,0	0	6,5

Tab. 1. Relative Häufigkeit der Ionen. * Formylglycinäthylester. ¹ M-73, M-101.

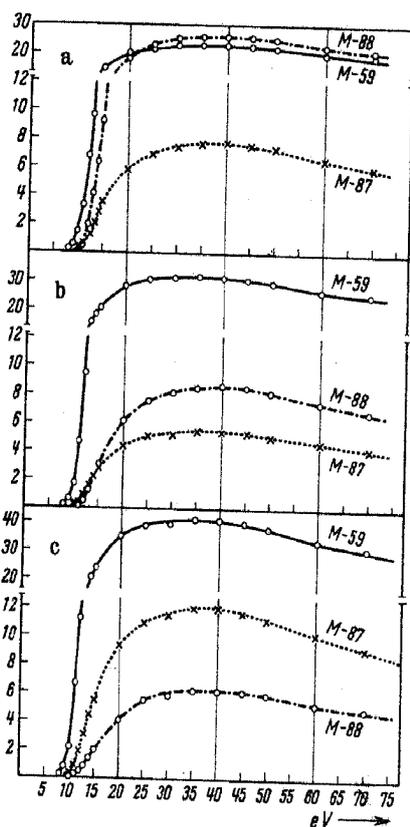


Abb. 3. a) *N*-Formyl-isoleucin-methylester; b) *N*-Formyl-leucin-methylester; c) *N*-Formyl-norleucin-methylester.

methylester wird dagegen von einem der drei eingangs erwähnten Ionen M-59, M-87 oder M-88 gebildet. Appearance-Potentialmessungen und die Ionenausbeutekurven (Abb. 3) zeigen, daß die Elektronenspannung einen großen Einfluß darauf hat, welches dieser Ionen am stärksten hervortritt. Mit Ausnahme der Glycinverbindung, bei der das Ion M-87 immer am stärksten vertreten ist, wird bei niedrigen Elektronenspannungen das Ion M-59, das durch Abspaltung der Carbomethoxygruppe entsteht, am häufigsten gebildet. Es folgen das Ion M-87 (Abspaltung der Carbomethoxy- und der Formyl-CO-Gruppe) und als letztes das Ion M-88 (Abspaltung der Carbomethoxy- und Formylgruppe).

Mit zunehmender Elektronenspannung beobachtet man eine interessante Strukturabhängigkeit in der Reihenfolge dieser Ionen. Während bei den Derivaten der anderen Aminosäuren auch bei höheren Elektronenspannungen das Ion M-59 immer am häufigsten gebildet wird, tritt bei dem Formylisoleucinester oberhalb einer Elektronenspannung von 22 V das Ion M-88 noch stärker hervor.

Von den Formylverbindungen der Aminosäureestern mit gerader aliphatischer Seitenkette und des Prolinesters wird immer das Ion M-87 häufiger gebildet als M-88, wobei die Intensität mit der Kettenlänge abnimmt. Bei einer verzweigten Seitenkette in der Aminosäure ist jedoch schon bei einer Elektronenspannung wenige Volt oberhalb des Appearance-Potentials die Intensität des Ions M-88 größer, das bei hohen Elektronenspannungen beim Isoleucin ja sogar das häufigste Ion ist. Der Formylvalinmethylester scheint diese Regel zu durchbrechen, in diesem Fall entsteht jedoch mit 60,4% rel. Häufigkeit ein Ion durch gleichzeitige Abspaltung der Carbomethoxygruppe und einer Methylgruppe der Seitenkette (M-74), das beim Leucin und Isoleucin nur wenig in Erscheinung tritt. Mit Hilfe dieser Ionen können die Isomeren Norvalin, Valin und Norleucin, Leucin, Isoleucin gut unterschieden werden.

2. Hydroxyaminosäuren

Von den 4 Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Tyrosin konnten nur die ersten 3 untersucht werden, da der Formyltyrosinester zu wenig flüchtig war. Die Elementaranalyse der bei der Darstellung der Formylverbindungen der anderen Hydroxyaminosäuren erhaltenen Destillate zeigte, daß beim Hydroxyprolin die *O,N*-Bisformylverbindung entstanden war. Beim Serin und Threonin spaltet sich jedoch bei der Destillation aus den Bisformylverbindungen Ameisensäure oder aus den *N*-Formylverbindungen Wasser ab, so daß man die Methylester der *N*-Formylacrylsäure bzw. *N*-Formylcrotonsäure erhält.

Die Neigung von *N*-Acyl- α -aminosäuren mit einer α - oder β -OH-Gruppe, in die entsprechenden α,β -ungesättigten acylierten Aminosäuren überzugehen, ist schon wiederholt beobachtet worden³⁻⁵. Mit diesen Säuren isomer sind die acylierten gesättigten Iminosäuren. Die chemischen Eigenschaften, so die glatte Polymerisation durch Zusatz von Benzoylperoxyd zu einer Benzollösung des *N*-Formylacrylsäureesters, sprechen jedoch für die Struktur einer ungesättigten Aminosäure.

Die im Massenspektrum des Bisformylhydroxyprolinmethylesters auftretenden Ionen lassen sich zu 3 Gruppen zusammenfassen, die sich jeweils von der Bisformylverbindung ($M=201$), der Mono-

³ W. SHIVE u. G. W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. 68, 117 [1946].

⁴ M. BERGMANN u. K. GRAFE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 187, 187 [1930].

⁵ F. WEYGAND, B. KOLB, A. PROX, M. A. TILAK u. J. TOMIDA, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 38 [1960].

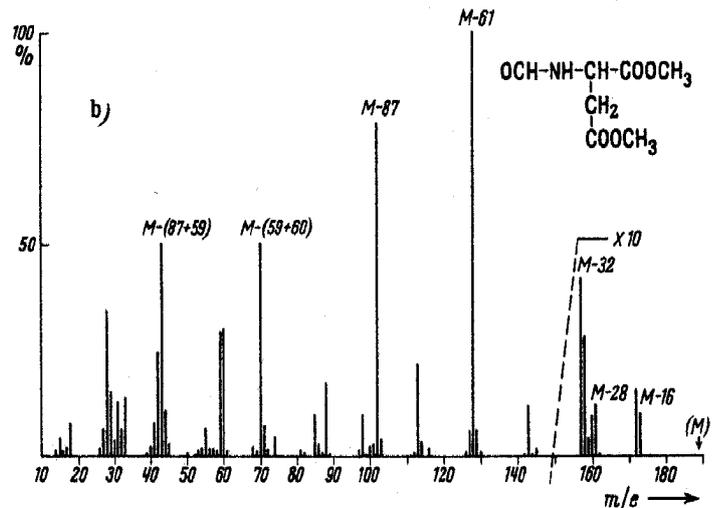
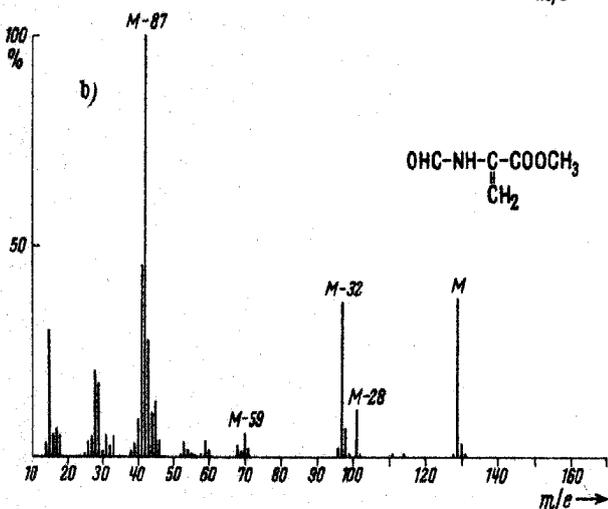
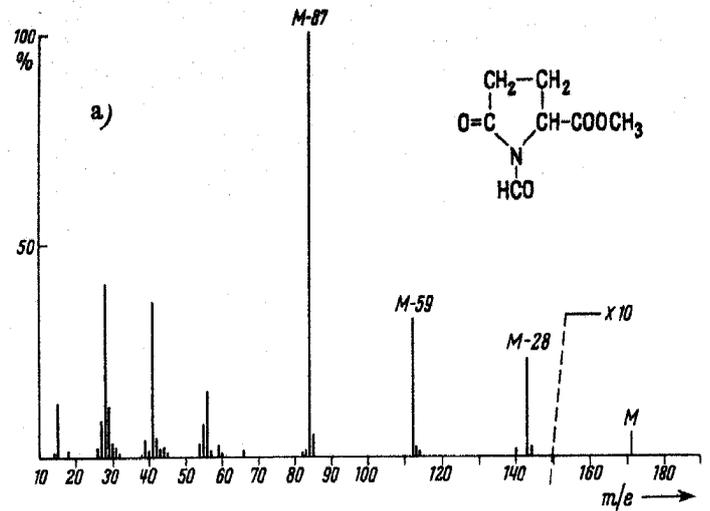
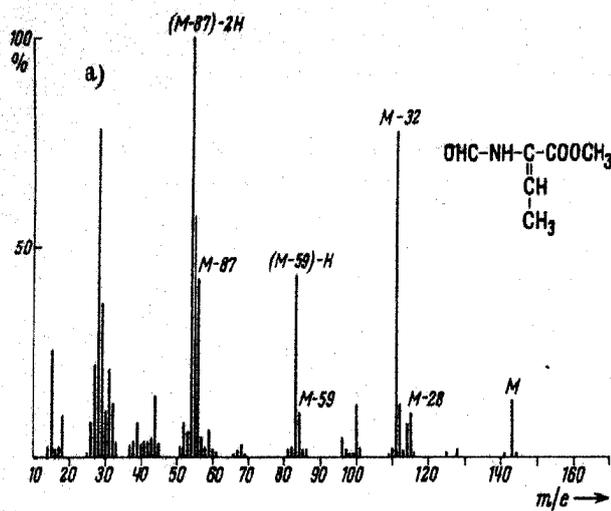


Abb. 5. a) *N*-Formyl- α -amino-crotonsäure-methylester (Threonin);
b) *N*-Formyl- α -amino-acrylsäure-methylester (Serin).

Abb. 6. a) *N*-Formyl-pyrrolidon-1-carbonsäure-methylester (Glutaminsäure);
b) *N*-Formyl-asparaginsäure-dimethylester.

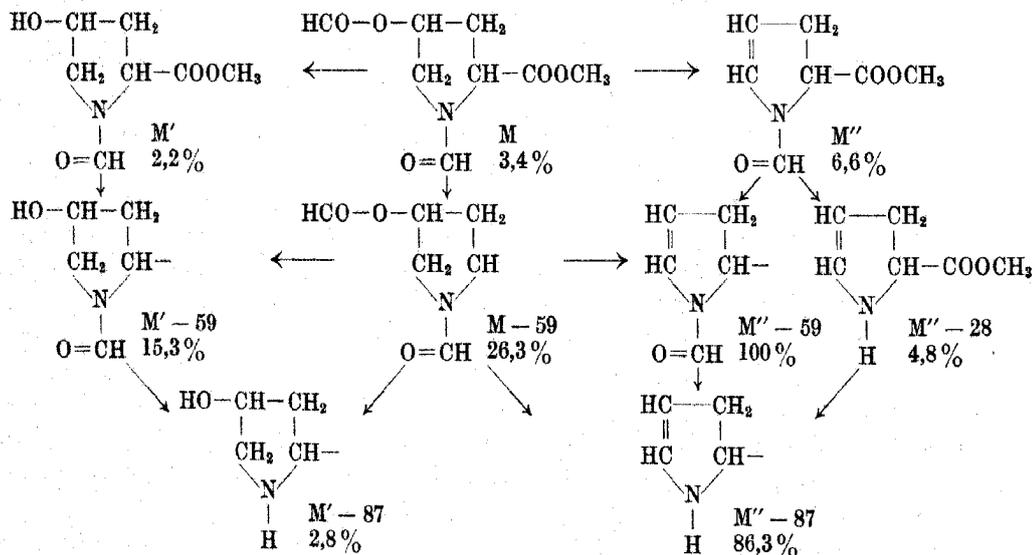


Abb. 4. Fragmentation des *O,N*-Bisformylhydroxyprolinmethylesters (schematisch).

formylverbindung ($M' = 173$) und der Monofor-
mylester eines Dehydroprolinmethylesters
($M'' = 155$) ableiten (Abb. 4). Dabei bleibt unklar,
ob die beiden letzten Verbindungen durch eine Pyro-

lyse (Ionenquellentemperatur ca. 260°C) oder
durch Elektronenstoß aus der Bisformylverbindung
entstehen. Die Fragmentationen der einzelnen Grup-
pen entstehen durch die gleichen Spaltungen wie die

des Prolins. Die vom Dehydroprolin ausgehende Reihe stellt dabei mit M'' -59 und M'' -87 die beiden intensivsten Ionen.

Bei den von Serin und Threonin (Abb. 5) abgeleiteten Derivaten sind die Verhältnisse einfacher, da hier von vornherein die ungesättigten Monoformyl-Verbindungen vorliegen. Da diese Moleküle durch ein ausgedehntes System von konjugierten Doppelbindungen stabilisiert werden, tritt das Molekülion beim Formylaminoacrylsäureester mit 37,9% rel. Häufigkeit und beim Formylaminocrotonsäureester mit 13,6% rel. Häufigkeit stark hervor. Auch bei diesen Verbindungen entstehen die häufigeren Ionen durch die üblichen Spaltungsreaktionen. Die Bedeutung des Ions M-59 tritt allerdings stark zurück. Da es sich hier um ungesättigte Säuren handelt, unterbleibt die bei den gesättigten Aminosäuren beobachtete Abspaltung von Formamid unter Bildung des Ions M-45. Statt dessen ist die Intensität des Ions M-32 (Abspaltung von CH_3OH) gegenüber den gesättigten Verbindungen stark erhöht. Bei dem Formylaminoacrylsäureester ist das Hauption M-87. Bei der Crotonsäureverbindung werden jedoch noch zusätzlich 2 H-Atome abgespalten, so daß das Ion M-89 am stärksten auftritt. Offensichtlich können sich die Fragmentationen dieser Verbindung wegen der zusätzlichen Methylgruppe der Seitenkette unter Verschiebung der Doppelbindung und Abspaltung von einem oder zwei H-Atomen stabilisieren. So tritt auch ein Ion M-60 (= M-59-H) mit 43,3% rel. Häufigkeit auf, das sonst bei den bisher besprochenen Verbindungen nur wenig gebildet wird.

3. Monoamino-dicarbonensäuren

Während man bei der Destillation des Reaktionsansatzes der Asparaginsäure den Formylasparaginsäuredimethylester isolieren kann, entsteht bei der Glutaminsäure quantitativ der Formylpyrolidon-1-carbonsäuremethylester. Im Massenspektrum dieser Verbindung (Abb. 6) bleibt bei den wichtigsten Ionen die Struktur des Pyrolidon-Ringes erhalten. Dabei entstehen die Fragmentationen auf dem üblichen Wege: Abspaltung der Formyl-CO-Gruppe (M-28, 22,8%), Abspaltung der Methoxygruppe (M-31, 1,7%), Abspaltung der Carbomethoxygruppe (M-59, 32,4%) und Abspaltung der Formyl-CO- und Carbomethoxy-Gruppe (M-87, 100%). Daneben treten noch zwei Ionen der Masse 56 und 41 stark hervor, bei denen der Pyrolidonring zerstört

ist. Während im Massenspektrum des Formylpyrolidoncarbonsäureesters das Molekülion immer auftritt, kann es beim Formylasparaginsäuredimethylester nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Das Massenspektrum des Asparaginsäure-Derivates ist jedoch sehr reich an Fragmentationen, deren Bildungsmechanismus aber nicht geklärt werden konnte. Das schwerste, sicher nachzuweisende Ion hat die Masse 173 (M minus CH_4). Von den Ionen, die unter Berücksichtigung der 2. Carbomethoxygruppe in Analogie zu den übrigen Aminosäure-Derivaten zu erwarten wären, treten nur M-32 (4,2%), M-87 (78,1%) und M-87-59 (50,6%) häufiger auf. Weder das Ion M-59 noch das Ion M-2·59 werden mit größerer Intensität gebildet, dafür aber Ionen M-61 und M-59-60 mit 100% bzw. 50,6% rel. Häufigkeit.

Die Formylderivate der Methylester der basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Tryptophan konnten massenspektrometrisch nicht untersucht werden, da sie nicht unzersetzt flüchtig waren und auch keine definierten Zersetzungsprodukte bildeten. Von dem Cystein-Derivat wurde erwartet, daß es in Analogie zur Serinverbindung bei der Destillation Formylacrylsäuremethylester bilden würde. Es entstanden jedoch nur verharzte Produkte.

Wie die Besprechung der Massenspektren der Formylaminosäuremethylester gezeigt hat, übt die Struktur einer Aminosäure einen charakteristischen Einfluß auf das Spektrum ihres Derivates aus. Dabei ist diese Strukturabhängigkeit der Massenspektren bei den Formylaminosäuremethylestern offensichtlich noch größer als bei den freien Aminosäureestern. Die Identifizierung und Strukturaufklärung von Aminosäuren ist daher auf Grund dieser Massenspektren gut möglich. Es muß allerdings vorausgesetzt werden, daß die Formylaminosäureester hinreichend flüchtig sind oder definierte Zersetzungsprodukte bilden, wie die Derivate des Serins und Threonins. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Vor allem liegt der Siedepunkt der Formylpeptidester in den meisten Fällen zu hoch, so daß diese Verbindungen nicht mehr bei 150 °C in die Vorratsbehälter des Massenspektrometers verdampft werden können.

Wir haben auch untersucht, ob sich mit Hilfe der Formylaminosäuremethylester eine massenspektrometrische Analyse von Aminosäuregemischen durchführen läßt. Im Vergleich zur Bestimmung über die freien Aminosäureäthylester⁶ müssen hier jedoch vor der eigentlichen Analyse zwei Reaktionen quan-

titativ durchgeführt werden: die Veresterung und die Formylierung. Unsere Versuche ergaben dann auch, daß zwar die Zusammensetzung der aus den Reaktionsansätzen erhaltenen Destillate sehr einfach und genau bestimmt werden kann, bei der Destillation aber besonders bei den multifunktionellen

Aminosäuren bedeutende Verluste auftreten können. Diese Verluste treten auch dann auf, wenn die Formylaminosäuremethylester direkt aus dem Reaktionsansatz in das Massenspektrometer destilliert werden.

Dem Bundesministerium für Atomenergie und Wasserwirtschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

⁶ K. BIEMAN u. W. VETTER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 93 [1960].

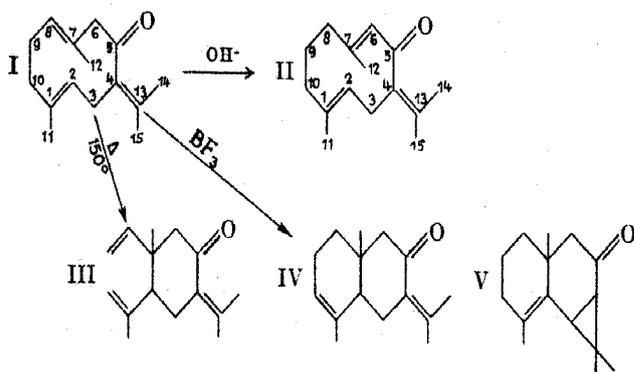
Zur Struktur des Germacrons und Isogermacrons

Von G. OHLOFF und E. G. HOFFMANN

Aus der Abteilung Strahlenchemie und den physikalisch-optischen Laboratorien des Max-Planck-Institutes für Kohlenforschung Mülheim-Ruhr (Z. Naturforschg. **16 b**, 298–300 [1961]; eingegangen am 28. Februar 1961)

Es werden die differentiellen und integralen Spektren der magnetischen Protonenresonanz von Germacron und Isogermacron aufgenommen und zugeordnet. Damit gelingt es, die Strukturen von Germacron und Isogermacron endgültig sicherzustellen.

Durch die Ermittlung der Struktur des Pyrogermacrons (III)^{1–3} ist die endgültige Aufklärung der Konstitution des Germacrons möglich geworden. Als Vorstufe der Pyrolyse wurde seinerzeit eine Zwischenverbindung der Struktur I² angenommen, einer Struktur, die dann von SORM und Mitarbb.³ für das Germacron selbst postuliert wurde. Da BATES und GALE^{4,5} im NMR-Spektrum oberhalb von 8,59 ppm⁶ keine Signale mehr fanden (wie man für direkt am Dreiring gebundene Protonen erwarten sollte), schlossen sie die Maalienon-Struktur V² für das Germacron aus.



Nunmehr ist es uns gelungen, das NMR-Spektrum des Germacrons gemäß Struktur I vollständig zuzuordnen. Nur auf der Basis der Formel I ist auch eine Deutung des Verlaufs der säurekatalysierten Isomerisation von Germacron (I) zum Seleninon (IV)⁷ und die Aufklärung der Konstitution II des durch basische Katalysatoren erhältlichen Isogermacrons⁸ möglich.

Isogermacron vom Schmp. 51–52° gewinnt man am einfachsten und in 85-proz. Ausbeute durch 1-stdg. Erhitzen von I in *n*/2-äthanolischer KOH. Die bei 180° unter N₂ thermisch stabile Verbindung ließ sich im Gegensatz zu I quantitativ oximieren. Nach dem UV-Spektrum ($\lambda_{\max 1}$ 252 m μ , $\epsilon = 3870$; $\lambda_{\max 2}$ 206 m μ , $\epsilon = 13\,800$) liegt im Isogermacron ein α,β -ungesättigtes Keton mit einer Isopropyliden-Gruppe⁹ vor. Die im IR-Spektrum sichtbare C=O-Valenzschwingung bei 1660 cm⁻¹ und eine starke C=C-Valenzschwingung bei 1612 mit der Schulter bei 1633 cm⁻¹ weisen auf ein gekreuztes Dienon-

¹ G. OHLOFF, *Angew. Chem.* **71**, 162 [1959].

² G. OHLOFF, H. FARNOW, W. PHILLIP u. G. SCHADE, *Liebigs Ann. Chem.* **625**, 206 [1959]. Vgl. dort Formel XXXI.

³ V. HEROUT, M. HORAK, B. SCHNEIDER u. F. SORM, *Chem. and Ind.* **1959**, 1089.

⁴ R. B. BATES u. D. M. GALE, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 5749 [1960].

⁵ In diesem Zusammenhang sei Herrn Prof. Dr. G. BÜCHI für interessante Hinweise gedankt.

⁶ Chemische Verschiebung bezogen auf (CH₃)₄Si als inneren Standard in der τ -Skala nach G. V. D. TIERS, *J. phys. Chem.* **62**, 1151 [1958].

⁷ Für das Cyclisationsprodukt des Germacrons mit BF₃-Ätherat in Benzol bei 50 °C wurde die Struktur IV gefunden. Über die Strukturaufklärung dieses Seleninons IV werden wir an anderer Stelle berichten.

⁸ I. OGNANOV, D. IVANOV, V. HEROUT, M. HORAK, J. PLIVA u. F. SORM, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **23**, 2033 [1958].

⁹ Vom gekreuzt konjugierten Dienon II wird lediglich ein Teilchromophor gemessen. Nach dem Kalottenmodell ist nur die Isopropylidenketon-Gruppierung planar, während die Doppelbindung in 6-Stellung stark abgewinkelt erscheint.