Pharmazie 29, H. 10—11 (1974)

Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der DDR

D. VOIGT, S. JOHNE und D. GRÖGER

Untersuchungen zur Massenspektrometrie von Mutterkornalkaloiden

1. Einleitung

Bisher sind etwa 50 Mutterkornalkaloide mit dem tetracyclischen Ergolin[5]-Grundgerüst und dem tricyclischen der Chanoclavine bzw. dem Hexahydro-1H-azepin-Gerüst der Clavicipitic acid isoliert und strukturell aufgeklärt worden. Diese sekundären Pflanzenstoffe finden sich vornehmlich in Sklerotien und saprophytischen Kulturen von Claviceps-Arten. Darüber hinaus sind einzelne Vertreter auch in anderen Pilzgattungen, wie etwa Aspergillus, Penicillium und Rhizopus sowie in einzelnen Gattungen der Convolvulaceae nachgewiesen worden [4, 10, 11].

Die erste massenspektrometrische Untersuchung der Ergoline wurde von *Barber* und Mitarb. [1] durchgeführt. Sie beobachteten bei Clavinen (C-10 gesättigt) einen relativ starken Molekülionenpeak und den base peak (b. p.) bei M^+—1. Typische Fragmente mit geringerer Intensität (~ 10% vom b. p.) traten bei m/e 154 und 167 auf. Beim Festuclavin (Ring D gesättigt) zeigte das Molekülion die höchste Intensität. Neben M^+ und m/e 154 traten Spitzen bei m/e 144, 181, 182 und 197 auf. Der Übergang M^+ → m/e 144 ist typisch für diese Verbindung und durch einen metastabilen Peak bei m/e 86,4 angezeigt. Bei Alkaloiden mit einer Doppelbindung in $\Delta^{9.10}$-Stellung trat eine stärkere Fragmentierung auf. Offenbar spielen hier retro-*Diels-Alder*-Prozesse und Ringerweiterungen eine Rolle. Das Ion der Masse m/e 154,0656 ($C_{11}H_8N^+$) ist typisch für alle Ergoline und besitzt wahrscheinlich die Struktur eines Naphthindols. Bei den $\Delta^{9.10}$-Alkaloiden findet sich ein typisches Fragmentpaar m/e 167/168. Dem Fragment m/e 167 wird die hier wiedergegebene Struktur zugeschrieben. Für die Untersuchung der Fragmentierung der Peptidalkaloide empfehlen die Autoren die Aufnahme der Spektren bei 16 eV. Die Hauptintensitäten traten hier bei m/e 154 und m/e 267,1369 ($C_{16}H_{17}N_3O^+$; Lysergsäurerest) auf. Ein weiterer Peak entsprach dem kompletten Peptidteil.

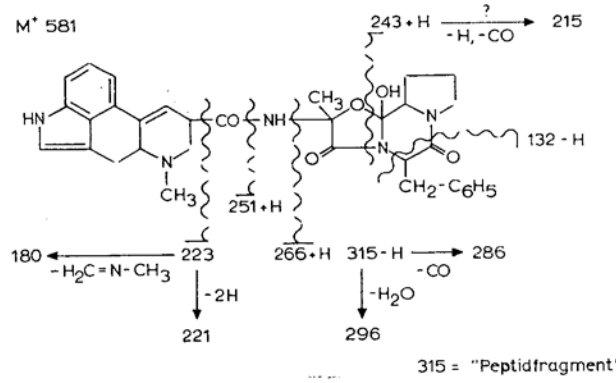
10-Hydroxyelymoclavin, welches als Zwischenprodukt bei der enzymologischen Umwandlung Elymoclavin → Penniclavin auftritt, wurde von *Chan Lin* und Mitarb. [3] massenspektrometrisch untersucht. Prominente Fragmente wurden bei m/e 270 (M^+), 252 (M^+—H_2O), 170, 154, 130 und 101 gefunden. Als ein Hinweis für die Stellung der Hydroxygruppe wurde das Fehlen des intensiven (M^+—1)-Peaks angesehen.

Ramstad und Mitarb. [7] ermittelten das Mol.-Gew. des Norsetoclavins durch Massenspektrometrie. Wertvolle Hinweise zur Struktur der bei der Umwandlung von Agroclavin mit Meerrettich-Peroxydase entstandenen Produkte, insbesondere beim 6.8-β-Dimethyl-8α.9α-epoxy-10α-hydroxyergolin wurden massenspektrometrisch erhalten. Das Vorliegen einer Methyloxiranstruktur wurde u. a. auf Grund der Spitzen bei m/e 227 (M^+-43) sowie bei m/e 43 abgeleitet [9].

Das massenspektrometrische Verhalten von Chanoclavin und einigen Derivaten ist von *Voigt* und *Keipert* [12] untersucht worden. Bei Chanoclavin wurde ein charakteristischer Peak bei m/e 183,0922 ($C_{12}H_{11}N_2$) gefunden, dem wahrscheinlich die hier angegebene Struktur zukommt. Die gleiche Arbeitsgruppe [13] untersuchte die Fragmentierung der Dihydrochanoclavine und ihrer Diacetylderivate.

Zur Ermittlung der Mol.-Gew. einfacher Lysergsäurederivate wurde von *Basmadjian* [2] die Massenspektrometrie herangezogen. Mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie wurden ferner die Mol.-Gew. von Chanoclavin-I-aldehyd [6] und Clavicipitic acid [8] bestimmt. Durch die Abspaltung von 44 Masseneinheiten vom (M^+-1)-Ion wurde auf das Vorhandensein einer Carboxylgruppe in der letztgenannten Verbindung geschlossen.

Schema 1



Schema 2

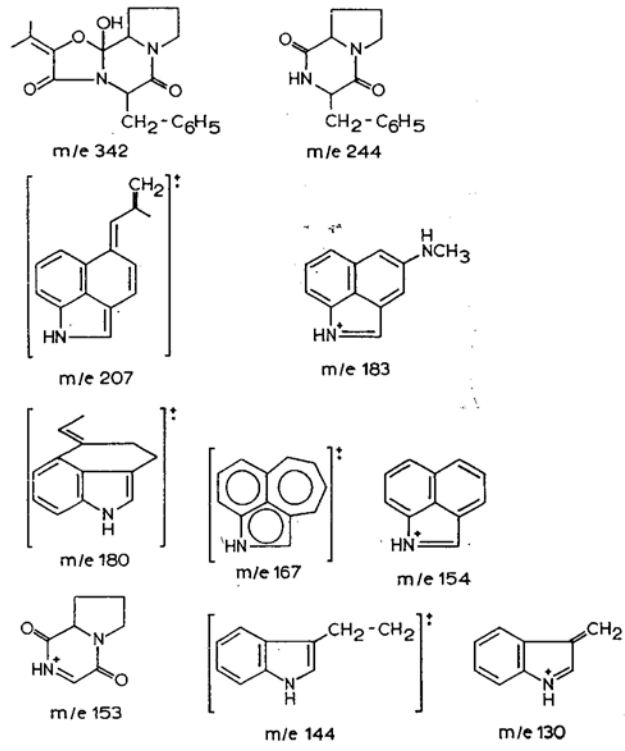


Tabelle 1 Schlüsselfragmente der Kationenspektren von Mutterkornalkaloiden*

Verbindung (Mol.-Gew.)	M M—1	M—CH_3	M—H_2O M—1—H_2O M—CH_3OH		
Agroclavin	*238*	223			
(238)	**237**				
Costaclavin	*241*	225			
(240)	**240**				
	239				
Pyroclavin	*241*	225			
(240)	**240**				
	239				
Elymoclavin	*255*	239			
(254)	**254**	238			
	253	*223*	220		
Chanoclavin-I	*257*		*238*		
(256)	**256**		*237*		
	255				
Chanoclavin-II	*257*		*238*		
(256)	**256**		*237*		
$\Delta^{8,9}$-Lysergsäure	*268*		*250*	**224** (M—CO_2)	
(268)	267		249	*223*	
Lysergsäuremonohydrat			*268*	**224** (M—CO_2—H_2O)	
(286)			250 (M—$2H_2O$)		
Lysergsäuremethylester	*283*	267		*239* (M—43)	
(282)	**282**			*223* (M—CH_3COO)	
	281				
Lysergsäureamid	268			*221* (M—1—$HCONH_2$)	
(267)	**267**				
Ergometrin	*326*		(307)		
(325)	**325**		306 <		

	M M-1	Peptidfragment (vgl. Schema 1)	Lysergsäure-amid	Peptid-CO —CH_3	Phe-Prodiketo-piperazin	M-Peptidfragment (vgl. Schema 1) —CONH	
Ergosin		280 <	**267**			*224*	*250*
(547)							235
Ergocornin		294	267			*224*	
(561)			266				
Ergokryptin		308	267 <			224	
(575)			265				
Ergotamin		314	*267*	286 <	(245)	223 <	
(581)				271 <	*244*		
					(243)		
Ergotaminin	581	*314*	*267*	286	245	*224*	
(581)				270	*244*	*223*	
					243		
Ergocristin		(342)	*267*	*314*	*245*	*224*	*273*
(609)					**244**	*223*	*272*
					243		
Ergocristinin	608 <	*342*	267	314 <	*245*	*223*	*273*
(609)					*244*		*272*
					243		

*Relative Intensität: halbfett: 100 %; kursiv: 50—100 %; normal: 20—50 %; in Klammern: 10—20 %; < : < 10 %

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen zur Biosynthese der Ergotalkaloide in Claviceps wurde eine Reihe von Alkaloiden des Clavin- und Ergotpeptidtyps massenspektrometrisch untersucht. Dabei war es besonders interessant, die bisher durch Elektronenstoßmassenspektrometrie erhaltenen Kationenspektren mit denen von uns erstmals aufgenommenen Anionenspektren (Elektronenanlagerungsspektren) zu vergleichen. Die Kationenspektren (vgl. Tab. 1) der Clavinalkaloide waren im wesentlichen identisch mit den bereits publizierten. Es tritt jeweils mit hoher Intensität (meist als b. p.) ein (M^+-1)- bzw. M^+-Peak auf. In einzelnen Fällen konnte auch ein (M^++1)-Peak beobachtet werden (Costaclavin, Elymoclavin, Ergometrin, Pyroclavin). In Abhängigkeit von der jeweiligen Struktur findet man die bereits bekannten Peaks für die CO_2- bzw. H_2O-Abspaltung. Die Fragmente m/e 130, 144, 154, 167, 181—183, 207—209 traten bei allen Spektren in unterschiedlicher Intensität auf. Sie entstehen durch Fragmentierung des Ergolinsystems. Der Molekülionen-Peak des Lysergsäuremonohydrats war nicht nachweisbar, dafür erscheint ein (M^+—H_2O)-Peak. Wie bereits berichtet wurde [1], besitzen die Ergotalkaloide vom Peptidtyp bei Anwendung der Elektronenstoßmassenspektrometrie die Tendenz zu einer Spaltung der Lysergsäure-Peptid-Bindung. Bei unseren Untersuchungen konnten wir nur bei Ergocristinin einen (M^+—1)-Peak bei m/e 608 und bei Ergotaminin einen M^+-Peak bei m/e 581 nachweisen. Typisch für Phenylalanin enthaltende Peptidalkaloide scheinen Bruchstücke bei m/e 244 (Diketopiperazin) sowie bei m/e 131 zu sein. Das letztgenannte Fragment könnte durch Abspaltung von C_6H_5—$(CH_2)_2$—CO (vgl. Schema 1) entstehen. Auf Grund der massenspektrometrischen Befunde möchten wir für die untersuchten Alkaloide die am Beispiel des Ergotamins formulierten Fragmentierungsmöglichkeiten vorschlagen (Schema 1). Eine definitive Strukturzuordnung treffen zu wollen, erscheint infolge Fehlens geeignet markierter Verbindungen verfrüht, da es meistens mehrere strukturelle Möglichkeiten gibt.

Bei den Anionenspektren der Clavine und der Ergotalkaloide vom Peptidtyp (Tab. 2), erscheint in den

Tabelle 2 Schlüsselfragmente der Anionenspektren von Mutterkornalkaloiden*

Verbindung (Mol.-Gew.)	M-1 M-2	(M, M-1, M-2) $-H_2O$, CH_3OH, CH_3	
Agroclavin	**237**		*221*
(238)			*207* (M—2—NCH_3)
Costaclavin	*239*		212
(240)			
Pyroclavin	239		*212*
(240)			
Elymoclavin	*253*	*222*	*232*
(254)			218
Chanoclavin-I	**255**	*237*	(225) (M—1—$NHCH_3$
(256)		224	oder M—CH_2OH)
Chanoclavin-II	255	*237*	(225) (M—1—$NHCH_3$
(256)		224	oder M—CH_2OH)
$\Delta^{8,9}$-Lysergsäure	267 <	*249*	*234*
(268)	266	248	(220)
Lysergsäuremonohydrat		*268*	*238* (M—H_2O—$NHCH_3$)
(286)		*266*	237
		(248)	*223* (M—H_2O, —COOH)
Lysergsäuremethylester	*281*	*248*	*238* (M—1—43)
(282)	*280*		237
			223 (M—CH_3COO)
			222 (M—CH_3COOH)
			(194)
Lysergsäureamid	*267*	*248*	222 (M—$HCONH_2$)
(267)	*266*	*247*	
	265		
Ergometrin	*324*	(284)	
(325)	*323*		

	M	Peptidfragment (vgl. Schema 1)	Lysergsäureamid	(Lysergyl-) —CH_3
Ergosin	547	**280**	(266)	237
(547)			(265)	236
Ergocornin	561	**295**	*266*	236
(561)			*265*	
Ergokryptin	575	*309*		
(575)		*308*	(265)	236
Ergotamin		*314*		
(581)				
Ergotaminin	581 <	*314*	(266)	236 <
(581)				
Ergocristin	(609)	*342*	*266*	*236*
(609)				
Ergocristinin		**342**	(266)	(236)
(609)				

* Bezeichnung der Intensitäten vgl. Tab. 1

Tabelle 3 Hochaufgelöste Peaks im MS von Ergotamin

m/e	Gef.	Ber.	Summenformel
314	314,1268	,1266	$C_{17}H_{18}N_2O_4$
296	296,1165	,1161	$C_{17}H_{16}N_2O_3$
286	286,1330	,1317	$C_{16}H_{18}N_2O_3$
271	271,1093	,1083	$C_{15}H_{15}N_2O_3$
267	267,1369	,1372	$C_{16}H_{17}N_3O$
244	244,1216	,1212	$C_{14}H_{16}N_2O_2$
223	223,1236	,1235	$C_{15}H_{15}N_2$
221	221,1076	,1079	$C_{15}H_{13}N_2$
215	215,1182	,1184	$C_{13}H_{15}N_2O$
215	215,0943	,0946	$C_{13}H_{13}NO_2$
180	180,0812	,0813	$C_{13}H_{10}N$
167	167,0733	,0735	$C_{12}H_9N$
153	153,0664	,0664	$C_7H_9N_2O_2$
131	131,0498	,0497	C_9H_7O
125	125,0721	,0715	$C_6H_9N_2O$

meisten Fällen der (M^-—1)-Peak mit hoher Intensität. Bei $\Delta^{8,9}$-Lysergsäure, Lysergsäuremethylester, Lysergsäureamid und Ergometrin fanden wir außerdem einen (M^-—2)-Peak; Lysergsäureamid ergab weiterhin einen M^--Peak. Das Lysergsäuremonohydrat spaltet Wasser ab und zeigt Spitzen bei m/e 268 bzw. 266. Strukturbedingt treten bei den untersuchten Verbindungen H_2O-, CH_3OH- sowie COOH-, CH_2OH- bzw. CH_3CO-Abspaltungen auf. Für die Anionenspektren sind Peaks bei m/e 154, 166 und 209 für diese Strukturtypen charakteristisch. Bei Ergotamin und Ergocristinin gelang es nicht, das Molekülion oder (M^-—1)- bzw.. (M^-—2)-Peaks nachzuweisen. Trotzdem möchten wir auf die Möglichkeit, mit Hilfe der Elektronenanlagerungsmassenspektrometrie die Molekülionenpeaks der anderen untersuchten Alkaloide vom Peptidtyp zu ermitteln, besonders hinweisen. Es ist bemerkenswert, daß in den Anionenspektren bei den von uns untersuchten Verbindungen in einigen Fällen die gleichen Massenzahlen wie in den Kationenspektren auftreten.

Das Vorhandensein eines identischen Fragmentierungsmechanismus bei beiden Aufnahmetechniken wäre ungewöhnlich; eine Interpretation sollte erst nach Vorliegen weiteren Spektrenmaterials erfolgen.

3. Experimenteller Teil

Die Aufnahme der Kationen- und Anionenspektren erfolgte mit den Massenspektrographen des Forschungsinstituts Manfred von Ardenne, Dresden.

Die Substanz (0,1—1 mg) wurde in eine Glaskapillare überführt, deren Außendurchmesser 2 mm beträgt. Ein 10—15 mm langes

Stück der Kapillare mit der Probe wurde in die Bohrung eines elektrisch heizbaren Metallblockes eingesteckt, über eine Vakuumschleuse in die Ionenquelle eingebracht und auf die erforderliche Verdampfungstemperatur T_V erhitzt. In Abhängigkeit von T_V, der Belichtungszeit t_E und anderen Parametern wurde nacheinander eine Serie von Spektren auf einer Photoplatte (*ORWO* UV 2- oder *Ilford* Q 2-Typ) vom Format 6,5 × 18 cm registriert. Zwischen den Expositionen kann das Massenspektrum auf dem Fluoreszenzschirm eines Ionenbildwandlers beobachtet werden. Die photographisch aufgenommenen Spektren wurden mikrophotometrisch registriert.

Die Untersuchungen zur hochauflösenden Massenspektrometrie wurden vom Physiko-chemischen Zentrum des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin-Buch, durchgeführt (Gerät MS 902 S der *Fa. AEI*, Manchester, England). Dabei wurden für das Ergotamin die in Tab. 3 wiedergegebenen Werte erhalten. Einige Fragmente sind in Schema 2 formuliert.

Literatur

1 *Barber, M., J. A. Weisbach, B. Douglas* und *G. O. Dudek*, Chem. and Ind. 1965, 1072
2 *Basmadjian, G. B.*, Thesis, Purdue University, Lafayette (USA) 1970
3 *Chan Lin, W.-N., E. Ramstad* und *E. H. Taylor*, Lloydia 30, 1 (1967)
4 *Gröger, D.*, Microbial Toxins, Vol. 8, S. 321, Academic Pr. New York und London 1972
5 *Jacobs, W. A.*, und *R. G. Gould jr.*, J. biol. Chemistry 120, 1 (1937)
6 *Naidoo, B., J. M. Cassady, G. E. Blair* und *H. G. Floss*, Chem. Commun. 1970, 471
7 *Ramstad, E., W.-N. Chan Lin, H. R. Shough, K. J. Golding, R. P. Parikh* und *E. H. Taylor*, Lloydia 30, 441 (1967)
8 *Robbers, J. E.*, und *H. G. Floss*, Tetrahedron Letters [London] 1969, 1857
9 *Shough, H. R.*, und *E. H. Taylor*, Lloydia 32, 315 (1969)
10 *Thomas, R.*, und *R. A. Bassett*, Progr. Phytochemistry 1, (1972)
11 *Voigt, R.*, Pharmazie 23, 285, 353, 419 (1968)
12 *Voigt, R.*, und *S. Keipert*, ibid. 25, 54 (1970)
13 *Voigt, R.*, und *P. Zier*, ibid. 26, 494 (1971)

Eingegangen am 28. November 1973

Dr. D. Voigt
Dr. sc. S. Johne
Prof. Dr. D. Gröger
DDR — 401 Halle/Saale
Postfach 250

Pharmazie 29, H. 10—11 (19[illegible]

Forschungsabteilung 1 des VEB Arzneimittelwerk Dresden
und Bereich Pharmazie der Sektion Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin

W. MAYER, S. ERBE,
G. WOLF und
R. VOIGT

Beiträge zur Analytik und Stabilität einiger pharmazeutisch interessanter 1.4-Benzodiazepine

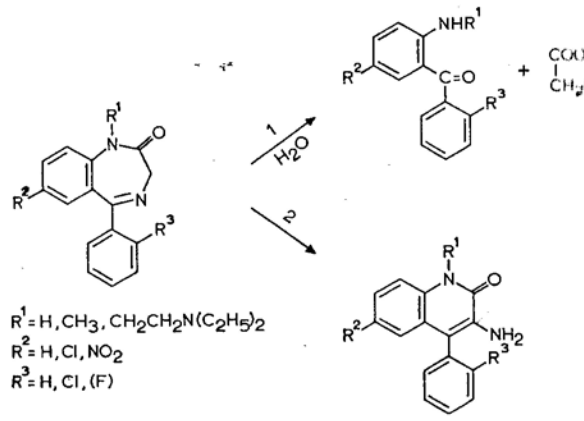
2. Mitteilung[1]: Ringverengung bei Nordiazepam und Clonazepam. pH-Abhängigkeit der hydrolytischen Spaltung des Diazepams Faustan®) und Anwendung kinetischer Methoden zur Ermittlung des Stabilitätsverhaltens von Diazepam in Ampullenlösungen

Die an Diazepam (Faustan®) und Nitrazepam (Radedorm®) unter Verengung des heterocyclischen 7-Ringes eintretende Bildung isomerer Chinolonderivate wird auch bei Nordiazepam und Clonazepam beobachtet. Für Diazepam, dessen Zubereitungen Bedeutung in Psychiatrie, Gynäkologie und Chirurgie erlangten, wird die pH-Abhängigkeit der hydrolytischen Spaltung ermittelt. Kinetische Untersuchungen an wasserhaltigen Ampullenlösungen des Diazepams ermöglichen zuverlässige Stabilitätsvoraussagen für die Lagerung.

1. Einleitung

An den 1.4-Benzodiazepinen Diazepam (I) und Nitrazepam (II) war von *Mayer, Erbe* und *Voigt* [10] in Gegenwart kleiner Mengen an Wasser auch in Zubereitungen wie Tabletten und Ampullenlösungen neben der hydrolytischen Spaltung zu den entsprechenden Benzophenonderivaten 5-Chlor-2-methylaminobenzophenon (III) und

Schema



2-Amino-5-nitrobenzophenon (IV) die Bildung der isomeren Chinolonderivate 3-Amino-6-chlor-1.2-dihydro-methyl-4-phenylchinolon-(2) (V) und 3-Amino-1.2-hydro-6-nitro-4-phenylchinolon-(2) (VI) beobachtet werden.

[1] 1. Mitt.: Pharmazie 27, 32 (1972)