

Massenspektrometrie organischer Verbindungen an der Universität Bern*

U.P.Schlunegger **, Institut für Organische Chemie der Universität Bern

Abstract

Classical mass spectra of organic compounds contain a lot of blocked information: genetic relationship between ions is hidden. In the passed few years, a novel type of mass spectrometry has been introduced: DADI- (Direct Analysis of Daughter Ions) or MIKE- (Mass analyzed Ion Kinetic Energy) Spectrometry. It enables analytical work like purity control, determination of the position of a substituent in a molecule or mixture analysis. By the method of molecule stripping, amino acid sequencing in oligo peptides may be performed in a very short time.

Der Nichteingeweihte könnte in Versuchung kommen, unter dem Begriff «Massenspektrometrie organischer

Verbindungen» eine einzige, wohldefinierte Messmethode zu verstehen. Bei näherem Zusehen muss man aber feststellen, dass zwar das physikalische Prinzip der Massentrennung in allen diesen Verfahren angewendet wird, dass jedoch grundsätzlich verschiedenartige Analysen durchführbar sind. Ein modernes Massenspektrometer ist nicht mehr nur ein einzelnes Messgerät, sondern kann geradezu ein Laboratorium darstellen. Dies möge im folgenden durch einige Beispiele erhellt werden. In Abb. 1 ist ein Massenspektrometer schematisch dargestellt. Allen Massenspektrometern ist gemeinsam, dass sie eine Ionenquelle (IQ) besitzen, in der die zu analysierende Substanz in die Gasphase überführt und ionisiert wird. Diese Ionen werden anschliessend in einem elektrischen Feld entsprechend der angelegten Spannung V

* Vorgetragen an der Herbsttagung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes, 5. November 1977 in Bern.

** PD Dr. U.P. Schlunegger, Institut für Organische Chemie, Freie Strasse 3, CH-3012 Bern.

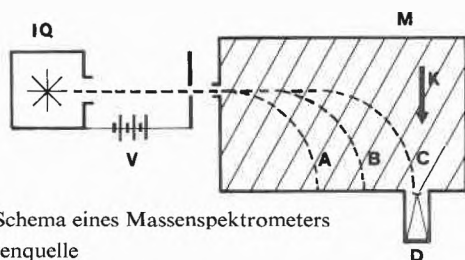


Abb. 1: Schema eines Massenspektrometers

- IQ: Ionenquelle
 V: Beschleunigungsspannung
 K: Ablenkende Kraft
 M: Massenfilter
 D: Detektor
 A, B, C: Ionen verschiedener Masse

beschleunigt und auf eine bestimmte Geschwindigkeit gebracht. Im nachgeschalteten Analysator M bzw. Trennsystem, werden diese Ionen durch die Kraft K entsprechend ihrer Masse aus der ursprünglichen Flugbahn ausgelenkt. Da bei einer bestimmten, auslenkenden Kraft K leichtere Ionen stärker von der Flugrichtung abgebracht werden als schwerere, resultiert eine Massentrennung. Durch kontinuierliches Verändern der auslenkenden Kraft K können sukzessive alle vorhandenen Ionenmassen auf einen Detektor D gebracht und registriert werden. Dadurch entsteht ein sog. Massenspektrum einer Probe (vgl. Abb. 3 und 5). Dieses Prinzip findet sich in allen MS, ungeachtet der Art des Analysators wieder. Von hier aus gehen nun die verschiedenen massenspektrometrischen Methoden ihre eigenen Wege. Es lassen sich drei klassische Hauptstossrichtungen der methodischen und apparativen Entwicklung feststellen. Die angestrebten Ziele waren oder sind:

- a = hohe Reproduzierbarkeit (Genauigkeit) der quantitativen Ionenmenge-Bestimmung
- b = hohe Empfindlichkeit
- c = hohe Massenauflösung

ad a:

Zum Beispiel in Tracer-Experimenten ist eine präzise Bestimmung der Menge einzelner Ionen nötig. Solche Ionen-Verhältnis-Bestimmungen können in Massenspektrometern durchgeführt werden, die speziell auf hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ionenmengen-Bestimmung ausgelegt wurden. Es interessiert in diesem Falle z. B. das Verhältnis der Anzahl Ionen A zur Anzahl Ionen B (Abb. 1). Dieses Verhältnis kann heute mit einem Standardfehler in der Größenordnung von 0,002% oder weniger bestimmt werden. Diese Art der Massenspektrometrie findet Anwendung bei Altersbestimmungen, Aufklärung von Metabolismen, Untersuchung von Reaktionsmechanismen, u. a. m.

ad b:

Für viele qualitative, analytische Anwendungen ist erwünscht, möglichst wenig Ionen nachweisen zu können, d.h. eine möglichst empfindliche Messmethode zur Verfügung zu haben.

Dieser Zweig der Massenspektrometrie wurde mit grossem Aufwand auf einen sehr respektablen Stand gebracht.

In Kombination mit der Gaschromatographie wird heute bereits im Bereich von Femtogrammen gearbeitet (10^{-15} g). Ein Femtogramm enthält zwar immer noch einige Millionen Moleküle, doch kann eine solche Menge ohne weiteres in einem Glaskolben, einer Dosierrutsche oder einer GC-Säule an der Oberfläche adsorbiert werden und verloren gehen. Die Grenzen dieser Art der Massenspektrometrie liegen nicht in ihr selbst, sondern in der Probenaufbereitung. Sie hat ein sehr weites Anwendungsgebiet gefunden (Biologie, Medizin, synthetische Chemie, industrielle Analytik, Umweltchemie, etc.).

ad c:

Bei sehr starker Trennung der Ionen, z. B. A und B (in Abb. 1), können feine Massenunterschiede gemessen werden. Die sogenannte «hochauflösende» Massenspektrometrie gestattet die Bestimmung der Elementarzusammensetzung von Ionen aufgrund des Massendefektes der verschiedenen chemischen Elemente. Der Fehler der Massenbestimmung darf für die Praxis 10 ppm nicht überschreiten. Für sichere Resultate ist aber ein Fehler von höchstens 1–2 ppm tolerierbar. Diese Art der Massenspektrometrie gehört heute zur Routine. Sie leistet besonders in Strukturaufklärungen wertvolle Dienste.

Die Entwicklung und Verbreitung der Massenspektrometrie wurde und wird massgeblich durch die Apparatehersteller und die Industrie beeinflusst. Die drei aufgezeigten Arten der Massenspektrometrie fanden ein breites Interesse und vielseitige Anwendung, was wiederum rückwirkend auf die Gerätefabrikanten zu neuen Leistungssteigerungen führte.

Während dieses Ringens um Präzision und Empfindlichkeit vergass man beinahe eine weitere mögliche Anwendung der Massenspektrometrie (MS), die nun seit einigen Jahren neu überdacht und entwickelt wird. Es ist zudem eine Art der MS, die der organischen Chemie viel näher steht als die bereits erwähnten, im Grunde mehr physikalischen Verfahren. Da an unserem Institut an der Entwicklung dieser neuen Art der Massenspektrometrie mitgearbeitet wird, soll sie eingehender beleuchtet werden.

Als Ausgangspunkt diene ein klassisches Massenspektrum einer organischen Verbindung (z. B. Abb. 3 und 5), das durch Elektronenstoss-Ionisierung erzeugt wurde. Bei dieser Ionisierungsart wird nicht nur ionisiert, sondern noch zusätzlich Energie in die Moleküle hineingepumpt. Als Folge davon treten Bindungsbrüche auf, die Moleküle fragmentieren. Jedes Fragment generiert entsprechend seiner Masse ein Signal, dem sogenannten «peak» im Massenspektrum.

Gelegentlich taucht über weite Bereiche bei jeder Massenzahl ein Signal (peak) auf. Alle diese Signale

stehen für sich isoliert da und sind Zeugen abgelaufener chemischer Reaktionen. Man weiss nur, dass alle signalisierten Fragmente aus dem Molekül stammen – vorausgesetzt, die untersuchte Substanz sei wirklich chemisch rein gewesen und im Massenspektrometer sei kein Untergrund früherer Analysen eingestreut worden. Ferner ist der Einfluss der Isotopen bekannt und man hat mit überlappenden Fragmentierungsreaktionen, Isomerisierungen, Protonen-Wanderungen etc., zu rechnen. Dem Interpreten steht dann die oft schwierige Aufgabe zu, aufgrund seiner Erfahrung und bekannter Fragmentierungsreaktionen das Peak-Puzzle zu einem plausiblen Ganzen, einem Struktur-Vorschlag, zusammenzufügen. Aber schon dieser Vergleich mit einem Puzzle ist nicht völlig richtig. Beim Puzzle ist nämlich die Lage eines Fragmentes durch seine äussere Form, die Farbe und den Verlauf von Zeichnungskonturen eindeutig gegenüber seinem Nachbarfragment bestimmt. Dies bedeutet, die Herkunft des Einzelfragmentes ist immer aus verschiedenen Kriterien direkt ersichtlich. Nicht so bei den Fragmenten im klassischen Massenspektrum. Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den einzelnen Fragmenten treten nicht so offensichtlich zutage. Abgesehen von einer beschränkten Zahl charakteristischer Schlüsselfragmente zeigt ein klassisches Massenspektrum vorerst nur eine Reihe von Ionen ohne klaren Zusammenhang. In diesem Sinne enthält ein Massenspektrum eine grosse Menge verborgener, «blockierter» Information. Man kann sich nun fragen, warum dies so sei. Die Fragmentierung eines Moleküls, bzw. eines Ions, verläuft nach Schema (1), wobei ein geladenes Teilchen m_1^+ durch Bindungsbruch sich in ein leichteres Folgeion m_2^+ und ein ungeladenes Partikel m_3^0 aufspaltet. Solche

$$m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3^0 \quad (1)$$

Reaktionen laufen – wie wir bereits gesehen haben – in grosser Zahl und mehreren Stufen in der Ionenquelle ab. Die klassische Massenspektrometrie registriert aber nur die geladenen Produkte solcher Reaktionen, also die grosse Zahl der generierten Ionen m_i^+ . Die genetischen Zusammenhänge zwischen den Ionen gehen verloren, weil man nur die Produkte nach abgelaufener Reaktion und nicht die Reaktion selbst analysiert. In den letzten Jahren hat man sich nun dieses Problems angenommen. Heute sind bereits mehrere Massenspektrometer-Typen kommerziell erhältlich, die den Nachweis von ionengenesischen Zusammenhängen ermöglichen. Zur Zeit ist auch die Entwicklung von Zusatzgeräten in Gang gesetzt worden, die den Ausbau alter Geräte für diese neuen Techniken erlauben.

Was muss nun vorgenommen werden, dass Reaktionen von Ionen beobachtet werden können? Die Reaktionsgleichung (1) stellt im Grunde genommen eine Gleichung mit zwei Unbekannten dar, da bei massenspektrometrischen Fragmentierungen grundsätzlich sowohl die Folge-Ionen m_{2i}^+ wie auch die aus dem Vor-

läuferion m_1^+ abgespaltenen Neutralteilchen m_{3i}^0 nicht bekannt sind. Eine Gleichung mit zwei Unbekannten benötigt zu ihrer Lösung bekanntlich eine zweite Gleichung. Dies bedeutet – auf die Massenspektrometrie übertragen –, dass nur eine zweifache Analyse der Ionen zum gewünschten Ziel führen kann. Eine dieser Möglichkeiten ist in der DADI-Massenspektrometrie in unserem Institut realisiert (*Direct Analysis of Daughter Ions*) [1]. Sie basiert auf der Tatsache, dass Fragmentierungen von Ionen nicht nur in der Ionenquelle ablaufen, sondern auch während deren Flug durch das Massenspektrometer. Die DADI-MS betrachtet solche Zerfälle im feldfreien Raum zwischen dem Magnetfeld und dem Energiefilter eines Spektrometers mit inverser Nier-Johnson-Geometrie (Abb. 2).

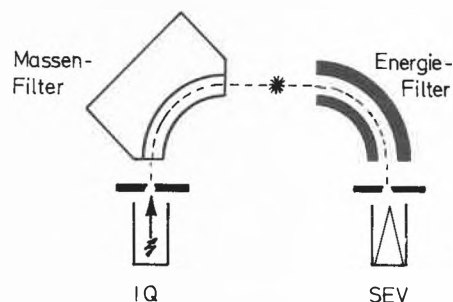
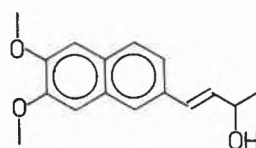


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines DADI-Massenspektrometers (inverse Nier-Johnson-Geometrie).

* «Beobachtungsfenster», durch das die Fragmentgenese verfolgt wird.

Zur Analyse wählt man mit dem «Massenfilter» – in unserem Falle ein Magnetfeld – die interessierende Ionenart aus und lässt sie in den feldfreien Raum (Pos. *) einfliegen. Alle andern, in der Ionenquelle IQ generierten Ionen, werden dabei an die Apparatewände ausgelenkt und dort neutralisiert. Allein die so ausgewählte Ionenart wird beobachtet und deren Schicksal verfolgt. Dies geschieht durch Bestimmen der direkten Folge-Ionen m_{2i}^+ im nachgeschalteten Energiefilter. Da bei dieser Art der Massenspektrometrie nur noch ausgewählte Ionen analysiert werden, sind die resultierenden DADI-Massenspektren sehr einfach und in der Folge relativ leicht zu interpretieren. Dies sei an einem einfachen Beispiel demonstriert.

Durch Synthese [2] wurde eine kleine Menge von 2,3-Dimethoxy-6-[2-butenol(3)]-naphthalin(I) erhalten.



Das klassische Massenspektrum (Abb. 3) zeigte wie erwartet ein Molekül-Ion bei m/e 258. Die Fragmente liessen sich nicht alle ohne weiteres erklären, insbesondere nicht der peak bei m/e 188. Dieses Signal entspricht nämlich dem normalen Dimethoxy-naphthalin.

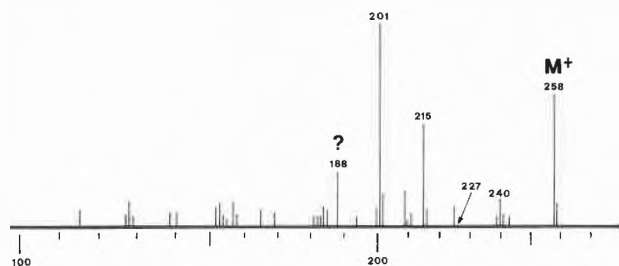


Abb. 3: Klassisches Massenspektrum von I mit interessierendem Signal bei m/e 188.

Es stellte sich uns die Frage, ob der peak m/e 188 aus I oder aus einer Kontamination mit Dimethoxynaphthalin herstamme. Das DADI-Spektrum (Abb. 4) des Molekül-Ions von I ergab uns indessen den Beweis, dass m/e 188 direkt aus I durch Abspaltung der Butenol-Seitenkette mit gleichzeitiger Übertragung eines Protons auf das aromatische System gebildet wird. Von einer Verunreinigung der Probe durch Dimethoxynaphthalin kann hier das Signal bei m/e 188 nicht stammen, da nur Ionen der Masse 258 das Massensfilter passieren können und mit DADI analysiert werden.

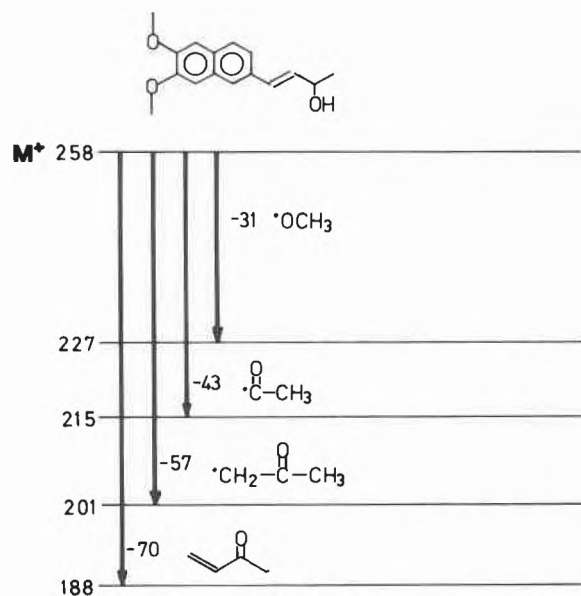
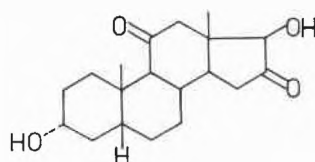


Abb. 4: Mit DADI gemessene Ionen-Genesen aus dem Molekül-Ion von I (m/e 258). I verliert u. a. die gesamte Butenol-Seitenkette mit Ausnahme eines Protons.

In diesem Falle wurde nur eine DADI-Analyse des Molekül-Ions benötigt. Es ist aber auch möglich, verschiedene konsekutive Fragmentierungen oder ganze Fragmentierungs-Sequenzen zu messen. Am folgenden Beispiel sei dies dargelegt: In biologischem Material finden sich oft Verbindungen, die nach ihrer elementaren Zusammensetzung und nach dem chromatographischen Verhalten Androstane mit vier Sauerstoffatomen sind. Zur Bestimmung der Lage der Sauerstoffatome im Molekül ist es wichtig zu wissen, nach welchen Prinzipien die Moleküle im Massenspektrometer



II

fragmentieren. In diesem Zusammenhang stellte sich konkret die Frage, wie der intensive peak bei m/e 122 im Massenspektrum des 3 α , 17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-11,16-dions (II) entsteht (Abb. 5).

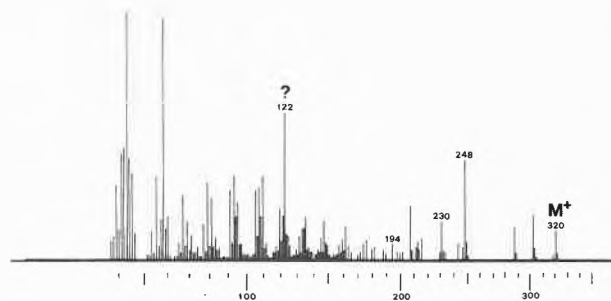


Abb. 5: Klassisches Massenspektrum von II.

Die Massenfnebestimmung ergab für dieses Fragment die Summenformel $C_8H_{10}O$. Welcher der vier möglichen Sauerstoffe ist darin enthalten? Die DADI-Analyse brachte hier den Nachweis, dass es sich bei m/e 122 um den sauerstoffhaltigen Ring C des untersuchten Moleküls handelt (Abb. 6). Das Fragment m/e 122 wird auf zwei Routen gebildet, nämlich einmal durch den konsekutiven Verlust des D-Ringes, von Wasser aus dem A-Ring und des restlichen AB-Ring-

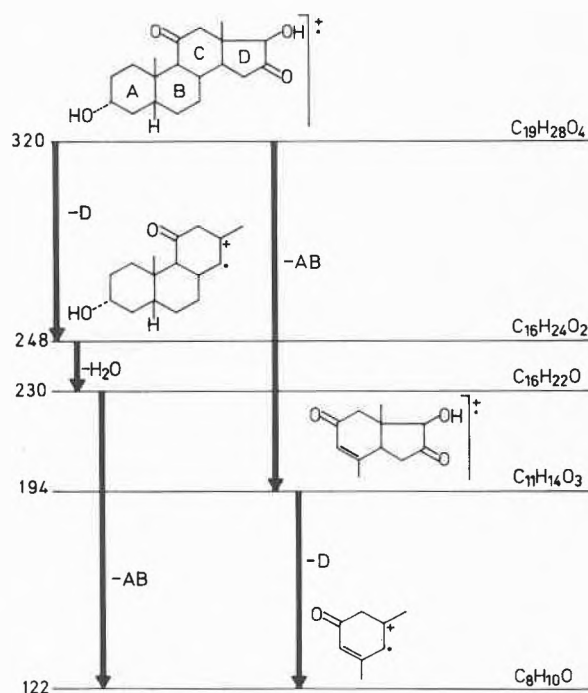
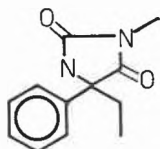


Abb. 6: Genese des Ions m/e 122 auf zwei Routen aus II.

systems. Im zweiten Bildungsweg verliert das Molekül zunächst das AB-Ringsystem zu m/e 194 und dann den Ring D [3].

Dieses Beispiel zeigt eindrücklich, wie leicht sich eine Fragmentgenese abklären lässt. Dabei ist potentiell auch die Möglichkeit vorhanden, die Lage von interessierenden Substituenten zu bestimmen und so einen weiteren Beitrag zur Strukturaufklärung zu leisten. Das folgende Beispiel möge dies erhellen:

Mesantoin (III) wurde einem Hunde verabreicht und die entstandenen Urin-Metabolite analysiert [4]. Dabei stellte sich heraus, dass ein Metabolit einen Sauerstoff mehr enthielt als die Ausgangsverbindung III, d. h., dass eine Hydroxylierung *in vivo* stattgefunden hatte.



III

Nun interessierte, in welchem Teil der Molekel ein Sauerstoff eingebaut worden war. Prinzipiell ist ein Sauerstoff-Einbau im Heterozyklus (Pos. a) (Abb. 7) in der Äthylseitenkette (Pos. b) oder im aromatischen Teil (Pos. c) denkbar. Die DADI-Analyse beantwortete diese Frage.

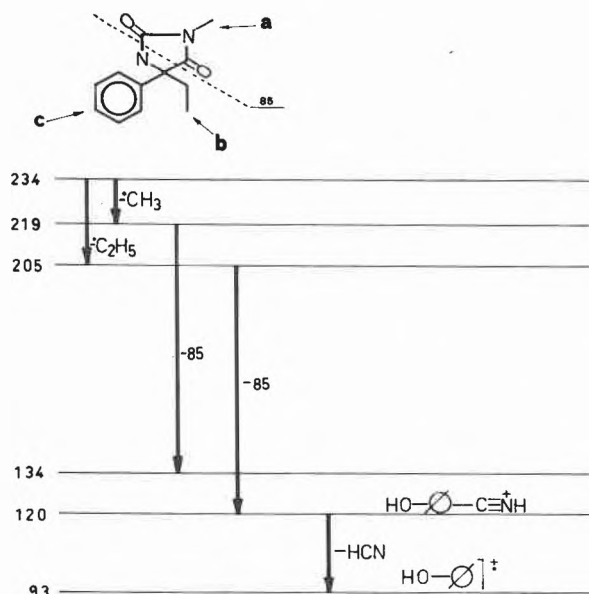
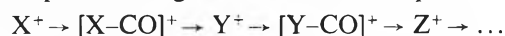


Abb. 7: Mit DADI nachgewiesene Fragmentierung von III. Der zusätzliche Sauerstoff kann sich nicht in den Positionen a oder b befinden. Der Aromat muss hydroxyliert worden sein.

Aus dem Molekül-Ion bei m/e 234 lässt sich der Verlust einer Methylgruppe (15 Masse-Einheiten μ) und anschliessend von 85 μ beobachten. Da 85 μ aus dem nicht hydroxylierten Heterozyklus leicht absplittbar sind, dürfte der gesuchte Sauerstoff in einem anderen Teil des Moleküls eingebaut sein. Ein zweiter mit DADI festgestellter Fragmentierungszug zeigt die Abspaltung von 29 μ (Äthyl-Radikal) und anschlies-

send wiederum von 85 μ . Dadurch wird erhellt, dass der Sauerstoff weder in der Äthylseitenkette, noch im Heterozyklus lokalisiert sein kann. Wenn unsere Folgerung aus diesen Daten – der Aromat sei hydroxyliert – stimmt, müsste das Fragment m/e 120 ein protoniertes Nitrilium-Ion sein und in einem nächsten Schritt HCN verlieren. Die DADI-Analyse zeigte diesen Übergang (m/e 120 \rightarrow 93), womit auch der gesuchte Sauerstoff im Mesantoin-Metaboliten lokalisiert war. Dieses und das vorangegangene Beispiel zeigen, wie mit der DADI-MS der Abbau eines Moleküls beobachtet und verfolgt werden kann. Die Idee dieses «Molekül-Strippings» lässt sich nun weiterspinnen, auch in die Praxis umsetzen und zwar bei Oligomeren. Im Falle von Oligomeren wiederholt sich in der Molekel definitionsgemäss ein Grundstrukturelement periodisch. Eine parallel dazu verlaufende Periodizität der massenspektrometrischen Fragmentierung ist demzufolge zu erwarten. Gelingt es einen solchen Fragmentierungszug messend zu verfolgen, lässt sich eine Analyse der Baustein-Sequenz durchführen. Dies ist bei Oligopeptiden der Fall und soll hier näher erläutert werden [1, 5, 6]. Es ist wohlbekannt, dass Peptide nach Elektronenstoss-Ionisation beidseits der Carbonylgruppen brechen können (Abb. 8). Daher sind im Massenspektrometer Ionen des Typus X, Y, Z ... zu beobachten. Diese Ionen sind je aus einer unterschiedlichen Zahl von Aminfragmenten des Typs A, B, C ... und Carbonylgruppen (CO) zusammengesetzt. Die Aminfragmente A, B, C ... unterscheiden sich voneinander nur durch die verschiedenen, die Aminosäure charakterisierenden Seitenketten $R_1, R_2, R_3 \dots$. Diese Aminfragmente geben uns daher Auskunft über die Art der vorhandenen Aminosäuren. Die Aminosäure-Sequenz ist folglich aus der Ionensequenz



abzulesen.

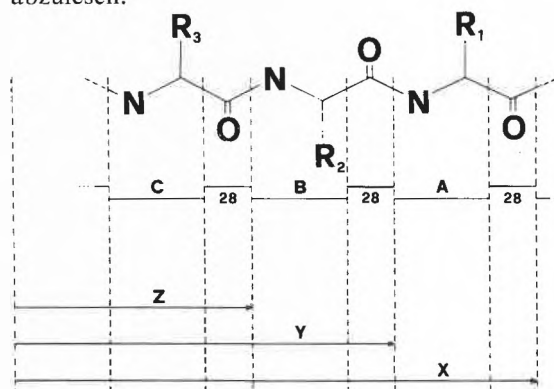


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines Peptides mit sequenzcharakteristischen Ionen X, Y, Z.

Leider ist dieser leicht verständliche Fragmentierungszug in klassischen Massenspektren in der Regel durch eine Vielzahl weiterer, konkurrierender Fragmentierungszüge überlagert (z. B. Abspaltungen vor Seitenketten, Umlagerungen etc.). Die entsprechenden klas-

sischen Massenspektren sind daher auch nicht immer leicht zu interpretieren.

Hier bringt die DADI-MS die prinzipiell neue Möglichkeit, dem sequenzcharakteristischen Fragmentierungszug $X^+ \rightarrow [X-CO]^+ \rightarrow Y^+ \rightarrow [X-CO]^+ \dots$ selektiv zu folgen – oder anders ausgedrückt, die Genese von sequenzcharakteristischen Ionen konsekutiv zu vermessen. Ein solches Ionenstripping führt zu einer erfolgreichen Aminosäure-Sequenzanalyse in Oligopeptiden. Dies sei am Beispiel des Tripeptides N-Acetyl-leu-ala-val-methylester erläutert. Die Startpartien der DADI-Spektren der konsekutiven Ionengenerationen sind in Abb. 9 wiedergegeben.

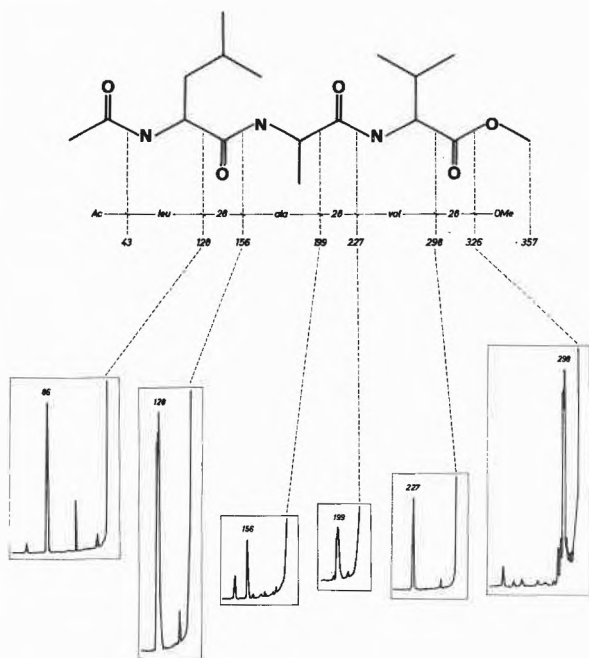


Abb. 9: Fragmentierung von N-Acetyl-leu-ala-val-methylester mit Startpartien der korrespondierenden DADI-Spektren.

Die sequenzcharakteristischen Signale sind leicht zu erkennen. Wichtig ist bei einer solchen Analyse, dass man das Prinzip $X^+ \rightarrow [X-CO]^+ \rightarrow Y^+ \text{ etc.}$ nicht vergisst. D. h., nach der Abspaltung des Aminfragmentes $A = [X-28] \rightarrow [Y]$ (Abb. 8) muss eine CO-Abspaltung auftreten. In diesem Sinne stellt der CO-Verlust (28 mu) eine Quitung dafür dar, dass die Messung einer Aminosäure-Sequenz folgt. Basierend auf dieser Erkenntnis wird daher die Analyse von N-Acetyltri-peptid-Methylester einem Schema folgen, das in Abb. 10 wiedergegeben ist. Der Schluss der Analyse wird bei so geschützten Peptiden durch die Abspaltung von Keten aus der N-terminalen Acetyl-Schutzgruppe angezeigt [6].

Wie die Erfahrung zeigte, funktioniert diese Art der Sequenzanalyse nicht nur in reinen Oligopeptiden, sondern auch in verunreinigten Proben. Die DADI-Massenspektrometrie filtert eben alle nicht interessierenden Ionen aus und analysiert nur die ausgewählte Ionenart. Damit ist uns auch ein potentieller Weg der Gemischanalyse aufgezeigt, der tatsächlich mit der

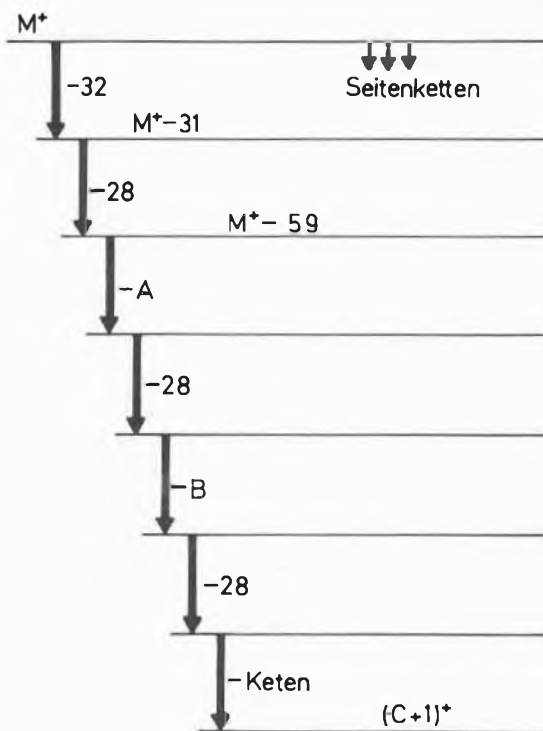


Abb. 10: Schematisches DADI-Messprogramm an einem N-Acetyl-tripeptid-methylester.

DADI-Massenspektrometrie auch beschriftet werden kann. Und zwar funktioniert dies nicht nur bei Gemischen verschieden grosser Moleküle, sondern sogar bei Isomeren-Gemischen. Als Beispiel seien Gemische von Oligo-Peptiden gleicher Aminosäure-Zusammensetzung, aber verschiedener Aminosäure-Sequenz erwähnt. Obschon die Molekül-Ionen dieser Oligopeptide die genau gleiche Masse aufweisen, lassen sich mit der DADI-MS die unterschiedlichen Sequenzen detektieren und verfolgen [5]. Diese neue Art der Aminosäuresequenzanalyse steht noch am Anfang ihrer Entwicklung. Trotzdem lässt sich bereits heute abschätzen, dass sie potentiell zumindest bezüglich des Zeitbedarfes den verbreitetsten nass-chemischen Methoden überlegen ist. Der Probenbedarf bewegt sich heute noch in der Grössenordnung der üblichen Sequenzanalysen. Computerisierte Datenerfassung und Auswertung, sowie verbesserte Messtechniken (z. B. «linked scans» [7]) werden Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Analysen vergrössern und dadurch mithelfen, eine Lücke in der Werkzeugkiste des Peptidsynthetikers und des Biochemikers zu schliessen.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekte Nr. 2386.75 und 2.758-77, für die Unterstützung dieser Arbeiten.

Literatur

- 1 U. P. Schlunegger: *Angew. Chem.* 87 (1975) 731.
- 2 W. Wiegrebe, U. P. Schlunegger, F. Perrollaz und P. Riedl: *Arch. Pharm.*, im Druck.

- 3 *U. P. Schlunegger* in *H. Richter* und *G. Spiteller*: *Monatsh. Chem.* 107 (1976) 459.
- 4 *A. Küpfer*, *U. P. Schlunegger* und *J. Bircher*: in Vorbereitung.
- 5 *U. P. Schlunegger*, *P. Hirter* und *H. von Felten*: *Helv.* 59 (1976) 406.
- 6 *U. P. Schlunegger* und *P. Hirter*: *Israel J. of Chemistry*, im Druck.
- 7 *R. K. Boyd* und *J. H. Beynon*: *Org. Mass Spectrometry* 12 (1977) 163.