

Institut für Physikalische Chemie

**Untersuchungen zum  
massenspektrometrischen  
Fragmentierungsverhalten von  
Steroiden**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juni 2011

vorgelegt von

Christoph Freudenhammer





Referent: Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer

Korreferent: Prof. Dr. Martin Beyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2011

Zum Druck genehmigt: Kiel, 13. Juli 2011



In der Wissenschaft gleichen wir  
alle nur den Kindern, die am  
Rande des Wissens hier und da  
einen Kiesel aufheben, während  
sich der weite Ozean des  
Unbekannten vor unseren Augen  
erstreckt ...

---

*(Isaac Newton)*



# Kurzzusammenfassung

Die Isolierung und Strukturbestimmung komplexer Naturstoffe wie der Steroide hat die Chemie vor allem in den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts geprägt, seit den 1950er und 1960er Jahren wurde ihr massenspektrometrisches Verhalten näher untersucht, vor allem aufgrund ihrer Präsenz und Wichtigkeit sowohl in den *life sciences* als auch als elementare Pharmazeutika. Die Einführung moderner Ionisierungsmethoden wie der Elektro-Spray-Ionisation (ESI) öffnete neue Wege zur Untersuchung biologischer Proben, während ein detaillierteres Wissen der Fragmentierungspfade solcher Substanzen durch die Fourier-Transform-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie zugänglich wurde, was zu überraschenden Einsichten in das Fragmentierungsverhalten der Estradiol- und Estriolbenzylether führte. Ein ESI-Massenspektrum des protonierten Moleküls zeigt nicht nur den Verlust des benzylichen Restes, sondern auch von bis zu drei Wassermolekülen trotz des benzylichen Schutzes der phenolischen Hydroxylgruppe. Eine nähere Begutachtung des Spektrums ergab zudem die Abspaltung jeweils einer  $C_7H_8$ - und  $C_6H_6$ -Gruppe mit bemerkenswerten Ionenhäufigkeiten.

Daher wurden in dieser Arbeit die ablaufenden Prozesse anhand unterschiedlicher Di- und Trihydroxy-Estratriene, die mit verschiedenen langen un- und gesättigten Resten verethert wurden, und anhand des Estriols bzw. Estradiols sowie einiger strukturverwandter Gestagene und Benzyloxyindole mittels hochauflösender FT-ICR-Massenspektrometrie genauer untersucht. Ziel ist es gewesen, Einsichten in die ablaufenden Reaktionen zu erhalten, die zu Umlagerungen und Fragmentierungen führen. Die zum Wasserverlust aus dem Molekülion führenden Fragmentierungsmechanismen sollten durch die Verwendung diverser Schutzgruppen und massenspektrometrischer Methoden wie der *Collision-induced Dissociation* (CID) oder der *Infrared Multiphoton Dissociation* (IRMPD) verdeutlicht werden. Die erhaltenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen sind mittels adäquater Deuterierung einzelner Ether und einer Protonenaffinitätsbestimmung der Estrogenether nach der *Cooks'schen kinetischen Methode* zur Ermittlung des ursprünglichen Protonierungsortes der Moleküle unter ESI-Bedingungen verifiziert worden.

Es konnte gezeigt werden, dass für dieses Verhalten die vorangehende Veretherung mit einem ungesättigten Rest, der zu einem konjugierten System führt, essentiell ist. Estrogenbenzyl- und -allylether weisen in ihren Spektren den beschriebenen kompletten Verlust von Wasser (zwei bzw. drei Molekülen) auf, während er sowohl bei ungesättigten Methyl-, Ethyl- und Propylethern als auch bei aromatischen Phenethylestrogenethern nicht beobachtet wird. Diese Messergebnisse werden unter Annahme einer konzertierten [3.3]-sigmatropen Claisenumlagerung erklärt, die die protonierte phenolische Hydroxylgruppe freigibt und eine Stabilisierung der am Steroid zurückbleibenden Ladung durch den neuen Substituenten in *o*-Position ermöglicht. Als Alternative kann ein Whelandkomplex, bestehend aus der Benzylgruppe und dem aromatischen Teil des Steroids, in Betracht kommen. Die erwähnten Mechanismen erklären zugleich den beobachteten Verlust von  $C_7H_8$  als Toluol im Falle der Benzylether und den analoger  $C_3H_6$ -Fragmente der Allylether. Das Fragmentierungsmuster ist zudem weitestgehend unabhängig von der verwendeten Methode. Sowohl Collision-Cell-Dissoziation und On-resonance-CID als auch Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation in der ICR-Zelle führen zu sich teilweise ergänzenden, jedoch sich hauptsächlich ähnelnden bis gleichen Befunden. Die Isolierung und Fragmentierung der Gestagene führte zu erwarteten Abspaltungen, die der Benzyloxyindole zeigte den Einfluss von Schutzgruppen in Nachbarposition zur Benzyloxyfunktion.

# Abstract

Steroids had attracted considerable interest in chemistry in the first half of the 20<sup>th</sup> century based on the efforts in biological structure determination made by Adolf Windaus<sup>1</sup> and Heinrich Wieland<sup>2,3</sup> or in conformational analysis<sup>4</sup> by Derek Barton<sup>5</sup> und Odd Hassel.<sup>6</sup> Cholesterol, part of every animal eucaryote, biliary acids, ingredients of *digitalis* as well as other poisons, vitamins or sexual hormones belong to them. Since the 1950s and 1960s Carl Djerassi and coworkers investigated their mass spectrometric behaviour.<sup>7,8</sup> This interest is owed to the importance of this substance class in *life sciences*<sup>9</sup> as well as important pharmaceutical drugs.<sup>10</sup> Beside therapeutic applications steroids have found their way into competitive and popular sports as performance-enhancing substances.

Although the first mass spectrometric investigations of steroids dealt with cation-radicals, chemical ionization mass spectra leading to protonated molecular ions are also known. The emergence of modern ionization methods like electrospray ionization (ESI)<sup>11</sup> and matrix-assisted laser desorption (MALDI)<sup>12</sup> established different alternatives to investigate biological samples and metabolites. A further step into detailed knowledge of the fragmentation mechanisms of such samples has been made possible through the widespread use of ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (ICR-MS).<sup>13</sup> This method does not only allow the measurement of single masses and mass spectra with mass resolving powers far beyond the values obtained on classical sector field-, quadrupole- and time-of-flight-systems but also the trapping of single masses in front of and in the ICR cell leading to detailed fragmentation pathway measurements.

By using these techniques surprising insights into the fragmentation processes of molecules could be obtained. One example is the fragmentation behaviour of 3-benzyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratriene bzw. 3-benzyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene upon the electrospray ionization as shown in scheme 1.1. In its ESI mass spectrum the protonated trioether molecule obviously does not only lose the benzylic moiety but also three water molecules. The third water elimination is unsuspected, since the phenolic

hydroxyl group should be protected benzilylicly. A close inspection of the mass spectrum also reveals the loss of a toluene ( $C_7H_8$ ) and benzene ( $C_6H_6$ ) group. Although these fragmentations are nothing special for ion source reactions and high internal energies of protonated molecular ions, the observation of these reactions is fairly unusual if the protonated molecular ion is isolated either in a storage quadrupole or the cell of a FT-ICR instrument. Furthermore the abundances of the formed fragmentation products are noteworthy.

Therefore, it was decided to investigate these reactions in several other steroids with the same structural motif to gain insights in the limitations and boundaries of the different processes. These varying di- and tri-hydroxy-estratriene ethers with different ether moieties, estradiol and estriol as well as structurally similar gestagens and indoles have been investigated by high resolution mass spectrometry. The fragmentation mechanisms leading to the loss of water molecules from the protonated molecular ion have been rationalized by using protecting groups as well as mass spectrometric means like collision induced dissociation (CID) and infra-red multi photon dissociation (IRMPD). The unexpected observation of an elimination of two water molecules from the protonated estradiol ethers and of three water molecules from the protonated estriol ethers have been discussed with respect to varying reaction mechanisms and rearrangements. Results and conclusions derived from them are obtained by adequate deuterated ethers and proton affinity measurements using *Cooks' kinetic method*<sup>14</sup> as well as by comparisons with different gestagens and indole ethers. In this contribution we report on their ESI mass spectra as well as on their fragmentation behaviour due to the different mass spectrometric means, which are possible on an Bruker Apex Qe ICR instrument equipped with an external 2<sup>nd</sup> generation ESI-MALDI-combi-ion-source.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Einleitung und Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2. Experimentelle Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1. Massenspektrometrie . . . . .	4
2.2. Grundlagen der Elektro-Spray-Ionisation . . . . .	5
2.2.1. ESI-Quellen . . . . .	6
2.2.2. Bildung des Elektro-Sprays und Ionenfreisetzung . . . . .	8
2.3. Grundlagen der Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation . . . . .	12
2.4. Grundlagen der FT-ICR-Massenspektrometrie . . . . .	14
2.4.1. Ungestörte Ionen-Cyclotron-Bewegung . . . . .	14
2.4.2. Anregung und Detektion der Ionen . . . . .	17
2.4.3. Einfluss der Ionenfalle und gestörte Cyclotron-Bewegung . . . . .	20
2.4.4. Tandem-Massenspektrometrie: CID, (IR)MPD . . . . .	24
2.5. Cooks' kinetisches Verfahren zur Bestimmung thermochemischer Werte . . . . .	29
<b>3. Aufbau und Betrieb des FT-ICR-Massenspektrometers</b>	<b>33</b>
<b>4. Chemische Grundlagen: Steroide, Estrogene, Gestagene, Indole</b>	<b>37</b>
4.1. Steroide - Struktur und Vorkommen . . . . .	37
4.2. Estrogene - weibliche Geschlechtshormone I . . . . .	38
4.3. Gestagene - weibliche Geschlechtshormone II . . . . .	40
4.4. Pharmakologische und anabole Wirkung der Steroide . . . . .	42
4.5. Indole . . . . .	43

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
5.1. Einfluss der Probenparameter	49
5.1.1. Lösemittel	49
5.1.2. Konzentration	51
5.2. Einfluss der Geräteparameter	53
5.2.1. Quelltemperatur	53
5.2.2. Stoßzellendruck	56
5.2.3. On-resonance-Pulsenergie und -dauer	57
5.2.4. Gaspulsdauer	60
5.2.5. IR-Pulsenergie und -dauer	63
5.3. Estrogene	76
5.3.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI	76
5.3.2. IRMPD nach pos. ESI	87
5.3.3. ECD nach pos. ESI	93
5.3.4. On-resonance-CID nach neg. ESI	95
5.3.5. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach MALDI	104
5.4. Gestagene	106
5.4.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI	106
5.4.2. IRMPD nach pos. ESI	110
5.4.3. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach neg. ESI	112
5.5. Indole	116
5.5.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI	116
5.5.2. IRMPD nach pos. ESI	119
5.5.3. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach neg. ESI	121
5.6. Protonenaffinitätsbestimmung durch Cooks' kinetische Methode	125
5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen	130
5.7.1. Estrogene	130
5.7.2. Deuterierte Estrogene	145
5.7.3. Gestagene	146
5.7.4. Indole	148
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>152</b>
<b>7. Präparativer Teil</b>	<b>154</b>
7.1. Phenethylether	155
7.1.1. 3-(2-Phenyl)ethoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien	155

7.1.2.	3-(2-Phenyl)ethoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	156
7.2.	Benzoate . . . . .	157
7.2.1.	17 $\beta$ -Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzoat . . . . .	157
7.2.2.	16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzoat . . . . .	158
7.3.	Benzylether . . . . .	159
7.3.1.	3-Benzylloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	159
7.3.2.	3-Benzylloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	160
7.4.	Deuterierte Benzylether . . . . .	161
7.4.1.	3-Benzylloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-d <sub>1</sub> . . . . .	161
7.4.2.	3-Benzylloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-d <sub>2</sub> . . . . .	162
7.5.	Allylether . . . . .	163
7.5.1.	3-Allyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	163
7.5.2.	3-Allyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	164
7.6.	Propylether . . . . .	165
7.6.1.	3-Propoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	165
7.6.2.	3-Propoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	166
7.7.	Ethylether . . . . .	167
7.7.1.	3-Ethoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	167
7.7.2.	3-Ethoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	168
7.8.	Methylether . . . . .	169
7.8.1.	3-Methoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	169
7.8.2.	3-Methoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	170
7.9.	Estrogene . . . . .	171
7.9.1.	3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	171
7.9.2.	3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Trihydroxy-1,3,5(10)-estratrien . . . . .	172
7.10.	Gestagene . . . . .	173
7.10.1.	Pregnandiol . . . . .	173
7.10.2.	Pregnenolon . . . . .	174
7.10.3.	17-Hydroxypregnenolon . . . . .	175
7.10.4.	Dehydroepiandrosteron . . . . .	176
7.10.5.	Corticosteron . . . . .	177
7.11.	Indole . . . . .	178
7.11.1.	5-Benzylloxyindol . . . . .	178
7.11.2.	5-Benzylloxy-6-methoxyindol . . . . .	179
7.11.3.	6-Benzylloxy-5-methoxy-2-carboxyindol . . . . .	180

7.11.4. 5-Benzyl oxyindol-3-essigsäure . . . . .	181
<b>A. Spektren</b>	<b>182</b>
A.1. Phenethylether . . . . .	183
A.1.1. Estradiolphenethylether (1a) . . . . .	183
A.1.2. Estriolphenethylether (1b) . . . . .	184
A.2. Benzoate . . . . .	185
A.2.1. Estradiolbenzoat (2a) . . . . .	185
A.2.2. Estriolbenzoat (2b) . . . . .	187
A.3. Benzylether . . . . .	189
A.3.1. Estradiolbenzylether (3a) . . . . .	189
A.3.2. Estriolbenzylether (3b) . . . . .	193
A.4. Deuterierte Benzylether . . . . .	198
A.5. Allylether . . . . .	199
A.5.1. Estradiolallylether (5a) . . . . .	199
A.5.2. Estriolallylether (5b) . . . . .	202
A.6. Propylether . . . . .	207
A.6.1. Estradiolpropylether (6a) . . . . .	207
A.6.2. Estriolpropylether (6b) . . . . .	210
A.7. Ethylether . . . . .	213
A.7.1. Estradiolethylether (7a) . . . . .	213
A.7.2. Estriolethylether (7b) . . . . .	214
A.8. Methylether . . . . .	216
A.8.1. Estradiolmethylether (8a) . . . . .	216
A.8.2. Estriolmethylether (8b) . . . . .	217
A.9. Pure Estrogene . . . . .	219
A.9.1. Estradiol (9a) . . . . .	219
A.9.2. Estriol (9b) . . . . .	220
A.10. Gestagene . . . . .	223
A.10.1. Pregnandiol (11) . . . . .	223
A.10.2. Pregnenolon (12) . . . . .	225
A.10.3. 17-Hydroxypregnenolon (13) . . . . .	227
A.10.4. Dehydroepiandrosteron (14) . . . . .	229
A.10.5. Corticosteron (15) . . . . .	231

A.11.Indole . . . . .	233
A.11.1. 5-Benzyloxyindol (16) . . . . .	233
A.11.2. 5-Benzyloxy-6-methoxyindol (17) . . . . .	234
A.11.3. 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (18) . . . . .	237
A.11.4. 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (19) . . . . .	239

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>241</b>
-----------------------------	------------

# Abkürzungsverzeichnis

A	Abundance - Ionenhäufigkeit
AD-Wandler	Analog-Digital-Wandler
B-Feld	Magnetfeld
°C	Grad Celsius
CA	Collisional Activation
CAD	Collisionally Activated Dissociation
CC	Collision Cell
CI	Chemical Ionization
CID	Collision-Induced Dissociation
CRM	Charged-Residue Model
cw	continuous wave
Da	Dalton
DHB	Dihydroxybenzoesäure
eV	Elektronenvolt
E	Energie
ECD	Electron Capture Dissociation
E-Feld	Elektrisches Feld
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
F	Kraft
FT-(ICR)-MS	Fourier-Transform-(Ionen-Cyclotron-Resonanz-) Massenspektrometrie/-meter
G	Freie Energie
GB	Gasphasenbasizität
H	Enthalpie
ICR	Ionen-Cyclotron-Resonanz
IEM	Ion Evaporation Model

IR	Infrarot
IRMPD	Infrared Multiphoton Dissociation
i. Vak.	im Vakuum
J	Joule
k	Ratenkonstante / Boltzmannkonstante
K	Gleichgewichtskonstante / Kelvin
L	Liter
LC	Liquid Chromatography
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
m	Masse / Meter
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
mbar	Millibar
MECA	Multiple Excitation for Collisional Activation
min	Minute
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie/-meter
NMR	Kernmagnetresonanz
Pa	Pascal
PA	Protonenaffinität
r	Radius
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Entropie
SORI	Sustained Off-Resonance Irradiation
t	Zeit
T	Temperatur / Tesla
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-Of-Flight MS
UHV	Ultrahochvakuum
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
V	Potential / Volt
VLE	Very Low Energy (CID)

w. E.	willkürliche Einheiten
W	Watt
$\omega$	Kreisfrequenz / Cyclotronfrequenz
z	Ladung



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Fragmente des Estriolbenzylethers . . . . .	2
2.1. ESI-Quelle . . . . .	6
2.2. ESI-Sprayer . . . . .	7
2.3. Bildung des Taylor-Kegels und seine Auflösung . . . . .	9
2.4. Taylor-Kegel . . . . .	9
2.5. ESI-Tropfenteilung . . . . .	10
2.6. MALDI-Prozess . . . . .	12
2.7. Ionen-Cyclotron-Bewegung . . . . .	15
2.8. Anregung und Detektion von Ionen in der ICR-Zelle . . . . .	17
2.9. FT-Detektion und Verarbeitung der Ionensignale . . . . .	20
2.10. ICR-Zelltypen . . . . .	21
2.11. Ionen-Bewegung in der ICR-Zelle . . . . .	22
2.12. Nichtkonventionelle CID-Methoden . . . . .	26
3.1. APEX Qe FT-ICR-MS . . . . .	34
3.2. Aufbau der Combi-II-Quelle . . . . .	35
3.3. Aufbau des APEX Qe MS . . . . .	36
4.1. Steroidgrundgerüst . . . . .	38
4.2. Verschiedene Estrogene . . . . .	39
4.3. Verschiedene Gestagene . . . . .	41
4.4. Dehydroepiandrosteron / Corticosteron . . . . .	41
4.5. Testosteron . . . . .	42
4.6. Verschiedene Indole . . . . .	44
5.1. Originales On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether . . . . .	45
5.2. Sechsringstabilisierung zwischen Etherrest und Steroidgrundgerüst . . . . .	46
5.3. Signalintensitäten in Abhängigkeit vom ESI-Lösemittelgemisch . . . . .	50

5.4. Konzentrationsabhängige Intensitäten der Estriolderivate . . . . .	52
5.5. Konzentrationsabhängige Intensitäten der Estradiolderivate . . . . .	52
5.6. Temperatureinfluss Estradiolbenzylether . . . . .	54
5.7. Temperatureinfluss Estradiolbenzylether . . . . .	55
5.8. Einfluss des Drucks in der Quelle und Stoßzelle auf die Ionenintensität . .	56
5.9. Einfluss der Anregungspulsenergie in der Zelle auf die Ionenintensität . .	58
5.10. Einfluss der Anregungspulsdauer in der Zelle auf die Ionenintensität . . .	59
5.11. Einfluss der Stoßgaspulsdauer in der Zelle auf die Ionenintensität . . . . .	61
5.12. Einfluss der Stoßgaspulsdauer in der Zelle auf die Ionenintensität . . . . .	62
5.13. Leistung des IR-Lasers . . . . .	63
5.14. Einfluss der IR-Laserenergie: Estrogenphenethylether . . . . .	65
5.15. Einfluss der IR-Laserenergie: Estrogenbenzylether . . . . .	66
5.16. Einfluss der IR-Laserenergie: Estrogenbenzoate . . . . .	67
5.17. Einfluss der IR-Laserenergie: Estrogenallylether . . . . .	68
5.18. Einfluss der IR-Laserenergie: Estrogenpropylether . . . . .	69
5.19. Einfluss der IR-Laserpulsdauer: Estrogenphenethylether . . . . .	71
5.20. Einfluss der IR-Laserpulsdauer: Estrogenbenzylether . . . . .	72
5.21. Einfluss der IR-Laserpulsdauer: Estrogenbenzoate . . . . .	73
5.22. Einfluss der IR-Laserpulsdauer: Estrogenallylether . . . . .	74
5.23. Einfluss der IR-Laserpulsdauer: Estrogenpropylether . . . . .	75
5.24. Estriolphenethylether On-res-CID . . . . .	77
5.25. On-resonance-CID-Spektrum von Estradiolbenzylether . . . . .	78
5.26. Collision-Cell-CID-Spektrum von Estriolbenzylether . . . . .	78
5.27. Collision-Cell-CID-Spektrum von Estradiolbenzylether . . . . .	79
5.28. Monodeuterierter Estriolbenzylether On-res-CID . . . . .	80
5.29. Deuterierter Estradiolbenzylether On-res-CID . . . . .	81
5.30. Estradiolbenzoat On-res-CID . . . . .	82
5.31. On-resonance-CID-Spektrum von Estriolallylether . . . . .	84
5.32. On-resonance-CID-Spektrum von Estradiolallylether . . . . .	85
5.33. Collision-Cell-CID-Spektrum von Estradiolallylether . . . . .	85
5.34. Estriolpropylether On-res-CID . . . . .	86
5.35. Estriolbenzylether IRMPD . . . . .	88
5.36. Estriolallylether IRMPD . . . . .	90
5.37. Estriolallylether IRMPD: Wasserverlust . . . . .	91
5.38. Estradiolallylether IRMPD . . . . .	91

5.39. Estradiolbenzylether ECD . . . . .	93
5.40. Estriolbenzylether ECD . . . . .	94
5.41. ECD - Einfluss der Kathodenstromstärke . . . . .	95
5.42. Estradiolbenzylether Übersicht nach neg. ESI . . . . .	96
5.43. Estradiolbenzylether On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	97
5.44. Estradiolbenzylether On-res-CID nach neg. ESI: H <sub>2</sub> -Abspaltung . . . . .	97
5.45. Estradiolbenzylether On-res-CID nach neg. ESI: Wasseraddukt . . . . .	98
5.46. Estriolbenzylether Übersicht nach neg. ESI . . . . .	98
5.47. Estriolbenzylether On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	99
5.48. Estriolbenzylether On-res-CID nach neg. ESI: Wasseraddukt . . . . .	99
5.49. Estriolbenzoat On-res-CID nach neg. ESI: H <sub>2</sub> -Abspaltung . . . . .	100
5.50. Estriolallylether On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	101
5.51. Estriolallylether On-res-CID nach neg. ESI: H <sub>2</sub> -Abspaltung . . . . .	102
5.52. Estriolallyletherdimer On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	103
5.53. Estradiolpropylether On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	103
5.54. Estriolpropylether On-res-CID nach neg. ESI: H <sub>2</sub> -Abspaltung . . . . .	104
5.55. MALDI-Übersichtsspektrum von Estriolbenzylether . . . . .	105
5.56. On-resonance-CID-Spektrum von Estriolbenzylether nach MALDI . . . . .	106
5.57. Pregnan diol Übersicht . . . . .	107
5.58. Pregnenolon On-res-CID . . . . .	107
5.59. 17-Hydroxypregnenolon On-res-CID . . . . .	108
5.60. Dehydroepiandrosteron On-res-CID . . . . .	109
5.61. Corticosteron On-res-CID . . . . .	109
5.62. Pregnenolon IRMPD . . . . .	110
5.63. Dehydroepiandrosteron IRMPD . . . . .	111
5.64. Corticosteron IRMPD . . . . .	112
5.65. Pregnenolon On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	113
5.66. 17-Hydroxypregnenolon Übersicht nach neg. ESI . . . . .	114
5.67. 17-Hydroxypregnenolon On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	114
5.68. Dehydroepiandrosteron On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	115
5.69. Corticosteron On-res-CID nach neg. ESI . . . . .	115
5.70. 5-Benzyl oxyindol On-res-CID . . . . .	116
5.71. 5-Benzyl oxy-6-methoxyindol On-res-CID . . . . .	117
5.72. 5-Benzyl oxy-6-methoxyindol On-res-CID inkl. Na-Addukt . . . . .	118
5.73. 6-Benzyl oxy-5-methoxy-2-carboxyindol On-res-CID . . . . .	118

5.74. 5-Benzylxyindol-3-essigsäure On-res-CID	119
5.75. 5-Benzylxyindol IRMPD	120
5.76. 5-Benzylxy-6-methoxyindol IRMPD	120
5.77. 6-Benzylxy-5-methoxy-2-carboxyindol IRMPD	121
5.78. 5-Benzylxyindol-3-essigsäure IRMPD	122
5.79. 6-Benzylxy-5-methoxy-2-carboxyindol Übersicht nach neg. ESI	123
5.80. 6-Benzylxy-5-methoxy-2-carboxyindol On-res-CID nach neg. ESI	123
5.81. 5-Benzylxyindol-3-essigsäure Übersicht nach neg. ESI	124
5.82. 5-Benzylxyindol-3-essigsäure On-res-CID nach neg. ESI	124
5.83. Cooks' kinetische Methode - Protonenaffinitätsbestimmung	129
5.84. Fragmentierungspfade: Estrogenbenzyl- und -allylether sowie Benzoate	131
5.85. Sechsringstabilisierung zwischen Propylrest und Steroidgrundgerüst	133
5.86. Fragmentierungspfade: Estrogenpropyl-, -ethyl- und -methylether	134
5.87. Mögliche Protonierungsorte	135
5.88. Intramolekulare Protonenübertragung nach Longevialle	137
5.89. Wasserverlust nach Protonierung des 17-Sauerstoffs	138
5.90. Claisen-Umlagerung und Toluol- bzw. Wasserverlust	140
5.91. Benzolverlust	141
5.92. Toluolverlust durch benzylichen Bindungsbruch	143
5.93. Ringöffnungsreaktionen	144
5.94. Prinzipielle Fragmentierungspfade - Deuterierte Ether	146
5.95. Fragmente des Corticosterons	147
5.96. Claisenumlagerung in Indolen	149
Spektrenanhang	182
Estradiolphenethyletherspektren nach pos. ESI	183
Estriolphenethyletherspektren nach pos. ESI	184
Estradiolbenzoatspektren nach pos. ESI	185
Estradiolbenzoatspektren nach neg. ESI	186
Estriolbenzoatspektren nach pos. ESI	187
Estriolbenzoatspektren nach neg. ESI	188
Estradiolbenzyletherspektren nach pos. ESI	189
Estradiolbenzyletherspektren nach neg. ESI	191
Estriolbenzyletherspektren nach pos. ESI	193
Estriolbenzyletherspektren nach neg. ESI	195

Estriolbenzyletherspektren nach MALDI . . . . .	197
Deuterierte Benzylether nach pos. ESI . . . . .	198
Estradiolallyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	199
Estradiolallyletherspektren nach neg. ESI . . . . .	200
Estriolallyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	202
Estriolallyletherspektren nach neg. ESI . . . . .	204
Estradiolpropyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	207
Estradiolpropyletherspektren nach neg. ESI . . . . .	208
Estriolpropyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	210
Estriolpropyletherspektren nach neg. ESI . . . . .	211
Estradiolethyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	213
Estriolethyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	214
Estradiolmethyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	216
Estriolmethyletherspektren nach pos. ESI . . . . .	217
Estradiolspektren nach pos. ESI . . . . .	219
Estriolspektren nach pos. ESI . . . . .	220
Pregnandiol nach pos. ESI . . . . .	223
Pregnandiol nach neg. ESI . . . . .	224
Pregnenolon nach pos. ESI . . . . .	225
Pregnenolon nach neg. ESI . . . . .	226
17-Hydroxypregnenolon nach pos. ESI . . . . .	227
17-Hydroxypregnenolon nach neg. ESI . . . . .	228
Dehydroepiandrosteron nach pos. ESI . . . . .	229
Dehydroepiandrosteron nach neg. ESI . . . . .	230
Corticosteron nach pos. ESI . . . . .	231
Corticosteron nach neg. ESI . . . . .	232
5-Benzyloxyindol nach pos. ESI . . . . .	233
5-Benzyloxyindol nach neg. ESI . . . . .	234
5-Benzyloxy-6-methoxyindol nach pos. ESI . . . . .	234
6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol nach pos. ESI . . . . .	237
6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol nach neg. ESI . . . . .	238
5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach pos. ESI . . . . .	239
5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach neg. ESI . . . . .	240

# Tabellenverzeichnis

5.1. Untersuchte Estrogene und ihre $MH^+$ -Massen. . . . .	47
5.2. Untersuchte Gestagene / Indole und ihre $MH^+$ -Massen. . . . .	48
5.3. Verschiedene Lösemittelgemische für die ESI und ihre prozentuale Zusammensetzung. . . . .	49
5.4. Cooks' kinetische Methode: Verwendete Basen und zwei Referenzsubstanzen, ihre Protonenaffinität und Massen . . . . .	126
7.1. NMR-Abkürzungen. . . . .	154

# 1 Kapitel 1.

---

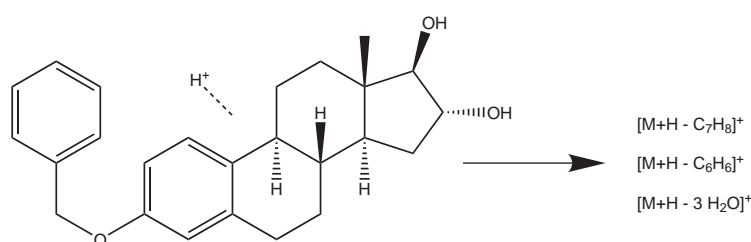
## Einleitung und Motivation

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhundert ist die Chemie vor allem mit der Isolierung und Strukturbestimmung komplexer Naturstoffe mit biologischer und pharmazeutischer Bedeutung beschäftigt gewesen. Hierzu gehörten u. a. die Steroide, zu denen Cholesterin, Bestandteil jeder tierischen Zelle, die Gallensäuren, die Inhaltsstoffe von *Digitalis* aber auch andere Gifte, Vitamine und Sexualhormone gezählt werden. Wie wir heute wissen, beruhen sie alle auf demselben Kohlenstoffgerüst. Organische Chemiker wie Adolf Windaus<sup>1</sup> und Heinrich Wieland<sup>2,3</sup> investierten Jahrzehnte in die Bestimmung der Steroidstruktur mittels rein nasschemischer Untersuchungsmethoden. Ihre Suche gab dem Gebiet der Stereochemie neueste Impulse, u. a. im Erkennen der *cis*- und *trans*-Verknüpfung der beiden Dekaline durch Walter Hückel<sup>15</sup> und der Entwicklung der modernen Konformationsanalyse<sup>4</sup> durch Derek Barton<sup>5</sup> und Odd Hassel.<sup>6</sup> In den 1950er und 1960er Jahren fingen Carl Djerassi<sup>7,8</sup> und Mitarbeiter an, das massenspektrometrische Verhalten der Steroide zu untersuchen, da sich ihre Wichtigkeit in den sogen. *life sciences*<sup>9</sup> und als elementare Pharmazeutika<sup>10</sup> offenbarte. Neben therapeutischen Anwendungen haben Steroide heute ebenso ihren Weg in Breiten- und Leistungssport als leistungssteigernde Mittel gefunden.

Obwohl die ersten massenspektrometrischen Untersuchungen der Steroide sich mit Radikalkationen beschäftigten, sind Massenspektren nach *Chemischer Ionisation* (CI), die zu protonierten Molekülonen führen, ebenso bekannt. Die Einführung moderner Ionisierungsmethoden wie der Elektro-Spray-Ionisation<sup>11</sup> oder der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-Ionisation (MALDI)<sup>12</sup> öffnete neue Wege zur Untersuchung biologischer Proben und Metabolite, während ein detaillierteres Wissen der Fragmentierungs-

## 1. Einleitung und Motivation

pfade solcher Substanzen durch die Fourier-Transform-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie<sup>13</sup> zugänglich wurde. Diese Methode erlaubt nicht nur die Bestimmung einzelner Massen und Spektren mit einem Auflösungsvermögen jenseits klassischer Sektorfeld-, Quadrupol- oder Flugzeit-MS-Systeme, sondern auch die Speicherung von einzelnen Massen vor und in der ICR-Zelle, um damit einzelne Fragmentierungswege aufzuklären. Dies führte zu überraschenden Einsichten in das Fragmentierungsverhalten der Estradiol- und Estriolbenzylether (3-Benzyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien bzw. 3-Benzyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien). Ein ESI-Massenspektrum des protonierten Moleküls, aufgenommen während verschiedener Referenzmessungen zur Installation eines neuen Bruker Apex Qe FT-ICR-Systems in Kiel, zeigt nicht nur den Verlust des benzyllischen Restes, sondern auch von bis zu drei Wassermolekülen (s. Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1.** – Beobachtete Fragmente nach ESI des Estriolbenzylethers.

Die dritte Eliminierung von  $H_2O$  im Falle der Estriolether erschien überraschend, da die phenolische Hydroxylgruppe schließlich (benzyllisch) geschützt sein sollte. Eine nähere Begutachtung des Spektrums ergab zudem die Abspaltung jeweils einer  $C_7H_8$ - und  $C_6H_6$ -Gruppe. Obwohl diese Fragmentierungen nichts Besonderes für Ionenquellenreaktionen mit hohen internen Energien der protonierten Molekülonen sind, ist die Beobachtung solcher Reaktionen isolierter Ionen in einem Speicher-Quadrupol oder einer FT-ICR-Zelle zumindest unüblich. Darüberhinaus erscheinen die Ionenhäufigkeiten der generierten Fragmente bemerkenswert. Daher wurde entschieden, diese Reaktionen anhand der Estrogenbenzylether und verschiedener anderer Steroide mit ähnlichem Strukturmotiv zu untersuchen, um Einsichten in die Limitationen der unterschiedlichen Prozesse zu erhalten. Dazu sind ESI-Massenspektren unterschiedlicher Di- und Trihydroxy-Estratriene, die mit verschiedenen Resten verethert wurden, des Estriols bzw. Estradiols sowie einiger strukturverwandter Gestagene und Indole mittels hochauflösender FT-ICR-Massenspektrometrie untersucht worden. Die zum Wasserverlust aus dem Molekülonen führenden Fragmentierungsmechanismen werden durch die Verwendung diverser Schutzgruppen und massenspektrometrischer Methoden wie der *Collision-induced Dissociation* (CID) oder der *Infrared Multiphoton Dissociation* (IRMPD) verdeutlicht. Der



auftretende simultane Verlust von zwei Wassermolekülen aus den protonierten Estradiol-ethern bzw. von dreien aus den Estriolethern ist mit Hilfe variierender Reaktionsmechanismen und Umlagerungen diskutiert worden. Die erhaltenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen sind mittels adäquater Deuterierung einzelner Ether und einer Protonenaffinitätsbestimmung der Estrogenether nach der *Cooks'schen kinetischen Methode*<sup>14</sup> verifiziert worden.

# 2 Kapitel 2.

---

## Experimentelle Grundlagen

### 2.1. Massenspektrometrie

Obwohl die Entwicklungen massenspektrometrischer Techniken in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts beachtlich waren und sie sich über die Physik hinweg in die Chemie und alsbald auch in die Biologie und die *life sciences* verbreitet haben, sind die Wurzeln der Massenspektrometrie unlängst früher zu finden.

Bereits kurz nach der Wende zum 20. Jahrhundert entwickelte Sir Joseph John Thomson - der Entdecker des Elektrons und Nobelpreisträger von 1906 - einen „Parabol-Spektrographen“. In ihm wurden Ionen durch elektromagnetische Felder auf unterschiedliche Trajektorien gezwungen und mittels photographischer Platten detektiert<sup>16</sup> – einige Jahre nachdem Wien<sup>17</sup> dieses Phänomen zuerst beobachtete. So gelang es erstmals die Isotope  $^{20}\text{Ne}$  und  $^{22}\text{Ne}$  voneinander zu trennen. Einer der Mitarbeiter Thomsons in den Cavendish-Laboratorien in Cambridge, Francis William Aston, führte dessen Anstrengungen fort und konstruierte nach dem Ende des Ersten Weltkrieges das erste Massenspektrometer. Mit dessen Hilfe identifizierte er mehr als 200 der 287 natürlich vorkommenden Isotope und wurde so Nobel-Laureat des Jahres 1922. Gleichzeitig optimierte Arthur Jeffrey Dempster in Chicago die Auflösung der ersten Spektrometer und stellte die erste Elektronenionisations-(EI)-Quelle vor, die gasförmige Probenpartikel mittels eines Elektronenstrahls ionisierte und deren Methode für die Analyse kleiner Moleküle noch heute in vielen Massenspektrometern verwendet wird.<sup>18</sup> Thomson, Aston und Dempster errichteten ein breites Fundament sowohl für das theoretische Verständnis der Massenspektrometrie als auch für ihren instrumentellen Aufbau. Dieses ermöglichte

es nachfolgenden Konstrukteuren, Instrumente zu entwickeln, die die Bedürfnisse von Chemikern, Physikern und Biologen befriedigten, auch wenn dies nahezu sechs Dekaden von Bemühungen nach sich zog. 1946 gelang erstmals eine Massentrennung nach der Geschwindigkeit der Teilchen mit dem *Time-of-Flight*<sup>19</sup>-Massenspektrometer (TOF), das durch Wiley und McLaren<sup>20</sup> zum Reflektron-TOF (ReTOF) weiterentwickelt wurde. Sieben Jahre später entwarf Paul den Quadrupol,<sup>21</sup> der nicht mehr magnetische sondern elektrische Felder verwendete und für den er 1989 den Nobelpreis erhielt, 1974 publizierten Comisarow und Marshall<sup>22,23</sup> das erste Fourier-Transform-Massenspektrometer auf Grundsätzen u. a. von Hipple.<sup>24,25</sup> Gemein ist den verschiedenen Methoden der MS stets die Wechselwirkung von Ionen in der Gasphase mit magnetischen oder elektrischen Feldern, speziell bei deren Beschleunigung oder Ablenkung.

Im Rahmen dieser Arbeit kann weder der Fortschritt der Massenspektrometrie im Detail<sup>26,27,28,29,30</sup> nachvollzogen noch die Fülle ihrer experimentellen Verfahren zur Erzeugung, Analyse und Detektion von Ionen sowie der Kombination mit anderen analytischen Methoden<sup>31</sup> oder die Auswertung von Massenspektren<sup>32</sup> erschöpfend dargestellt werden. Daher soll in den folgenden Abschnitten speziell nur auf die für die vorliegenden Ausführungen relevanten Techniken der Elektro-Spray-Ionisation<sup>11,26,27</sup> und Fourier-Transform-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie<sup>13,33,34,35,36,37,38</sup> sowie die verwendeten experimentellen Methoden eingegangen werden.

## 2.2. Grundlagen der Elektro-Spray-Ionisation

ESI „is a soft ionization technique that accomplishes the transfer of ions from solution to the gas phase. The technique is extremely useful for the analysis of large, non-volatile, chargeable molecules such as proteins and nucleic acid polymers.“ CHRISTIE ENKE<sup>39</sup>

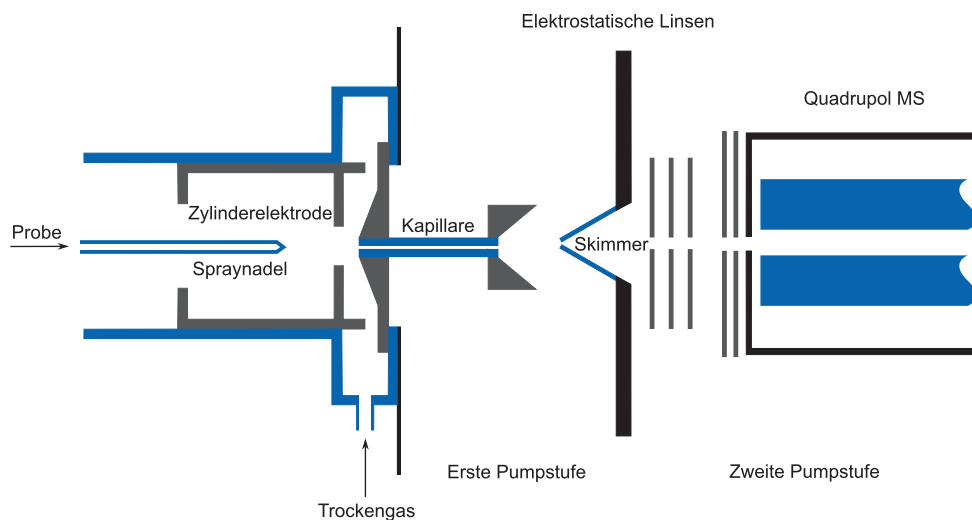
Die Elektro-Spray-Ionisation geht auf von Zeleny<sup>40</sup> und Taylor<sup>41</sup> gefundene Grundsätze und erste von Chapman<sup>42</sup> bzw. Dole<sup>43,44</sup> bereits in den Dreißiger und Sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts durchgeführte Experimente zurück. Dole gelang es jedoch nicht, die von ihm untersuchten hochmolekularen Polystyrole mit den damaligen Massenspektrometern zu detektieren, weshalb die ESI als Ionisationsmethode in der Massenspektrometrie erst in den Achtzigern für größere Biomoleküle wirklich etabliert wurde. Prinzipiell wird in ihr ein gelöster Analyt durch eine Kapillare geleitet und bei niedrigem Atmosphärendruck unter Hochspannung versprüht. Nebeltröpfchen, die nun geladene Teilchen

## 2. Experimentelle Grundlagen

im Überschuss enthalten (positive oder negative), verlieren durch Verdampfung neutrale Lösemittelmoleküle und ihre Oberflächenladung strebt aufgrund des geringer werdenden Tröpfchenradius einem Grenzwert entgegen, der als *Rayleigh Limit*<sup>45</sup> bezeichnet wird. Zu diesem Zeitpunkt werden, unterschiedlich begründet, Ionen freigesetzt, die durch ein Blendensystem in das unter Hochvakuum stehende Massenspektrometer gebracht werden.

### 2.2.1. ESI-Quellen

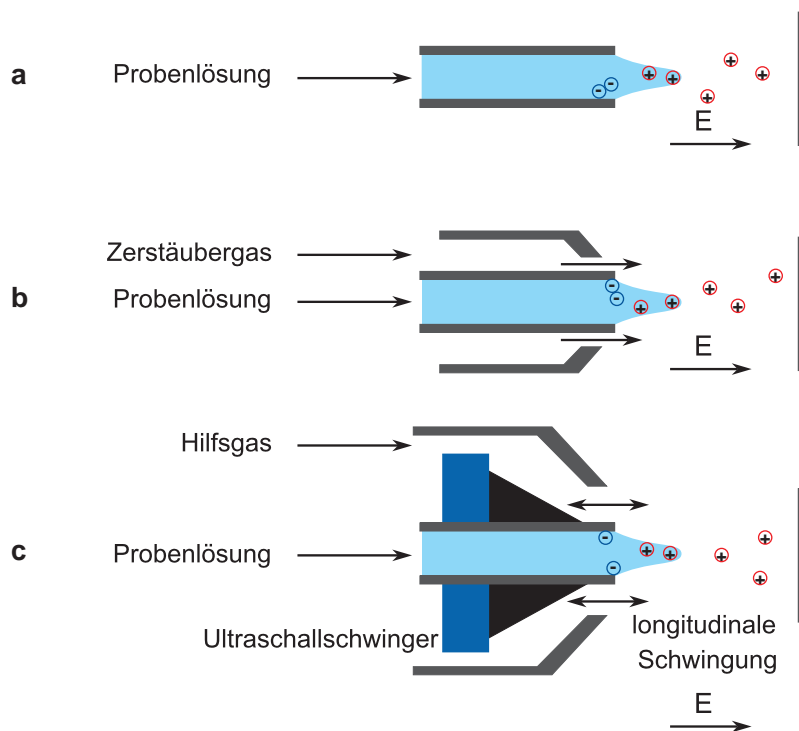
Im Folgenden soll nun grundlegend eine ESI-Quelle beschrieben werden, wie sie auch bereits von John Fenn,<sup>46</sup> dem Chemie-Nobelpreisträger des Jahres 2002, eingesetzt wurde (Abb. 2.1). Eine Lösung des Analyten wird durch eine Spritze mit einer Rate von  $5\text{-}20\ \mu\text{L min}^{-1}$  in die Quellennadel gepumpt, die sich relativ zur umgebenden zylindrischen Elektrode auf einem Potential von 3 bis 4 kV befindet. In einen gegenläufigen Strom trockenen Stickstoffs dehnt sich das vernebelte Aerosol aus, währenddessen eine Wärmeversorgung für die Verdampfung des Lösemittels sorgt.



**Abbildung 2.1.** – Schematische Darstellung einer frühen ESI-Quelle.<sup>46</sup>

Ein kleiner Aerosolanteil durchtritt die Öffnung einer Transferkapillare, die den Bereich unter Atmosphärendruck mit der ersten Pumpstufe bei ca. 100 Pa verbindet. Während ein großer Teil des aus dem Aerosol expandierenden Gases beim Austritt aus der Kapillare abgepumpt wird, passiert ein kleinerer Teil die Blende eines Skimmers in das dahinterliegende Hochvakuum ( $10^{-2}$  Pa). Hier kommt die Desolvatisierung der Ionen

zum Ende und sie werden in den Massenanalysator fokussiert. Angemessene Potentiale an der Kapillare, dem Skimmer oder den dahinterliegenden Linsen sorgen für einen effektiven Transport der Ionen durch die Quelle, während das neutrale Solvensgas unbeeinflusst bleibt. Moderne ESI-Quellen weichen z. T. von dieser klassischen Anordnung ab (Abb. 2.2). Eine beheizte Transferkapillare oder ein beheizter Inertgasgegenstrom erlauben beispielsweise eine effektivere Verdampfung des Lösemittels.



**Abbildung 2.2.** – Variationen eines ESI-Sprayers:<sup>47</sup>  
 (a) klassisches Elektro-Spray  
 (b) pneumatisch unterstützte ESI  
 (c) ESI-Quelle mit Ultraschall-Zerstäuber.

Zur Herstellung eines intensiven kalten Molekularstrahls in die Hochvakuumumgebung kann der Skimmer nach Vorschlägen von Kantrowitz und Grey<sup>48</sup> trichterförmig variiert werden. Die adiabatische Expansion des Gases in der ersten Stufe reduziert dann infolge der Kühlung die Zufallsbewegung der Partikel und ein Teil der thermischen Bewegung wird in direkten Fluss umgewandelt. Alles in allem sorgt ein solcher Aufbau für einen dichter an der Zentralachse der Flugbahn gelegenen Transport der schweren Analyt-enthaltenden Solvenscluster, während die leichteren Lösemittelmoleküle den Strahl verlassen.<sup>44</sup>

## 2. Experimentelle Grundlagen

Der Sprayer selbst kann ebenso modifiziert werden. Der klassische Aufbau stieß rasch an Grenzen bei der Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Ionenquelle, da er weitestgehend auf Einspritzraten von  $1\text{-}20\ \mu\text{L min}^{-1}$  beschränkt ist und stark von der Flüchtigkeit und Polarität des verwendeten Lösemittels abhängt. Daher wurden diverse Variationen, u. a. ein beheizter Sprayer<sup>49</sup> oder die pneumatisch unterstützte ESI,<sup>50</sup> entwickelt. Der Sprayprozess wird hier dadurch unterstützt, dass die Spray-Wolke von einem konzentrischen Fluss an Inertgas (bspw. Stickstoff) umspült wird.<sup>51</sup> Dieses Verfahren erlaubt höhere Durchsatzraten von  $10\text{-}200\ \mu\text{L min}^{-1}$  und reduziert den Einfluss der Oberflächenspannung des Lösemittels. Denn sowohl hohe Oberflächenspannungen als auch Leitfähigkeiten stören den konventionellen ESI-Prozess. Ein Ultraschallzerstäuber, der das Spray mechanisch erzeugt, kann an dieser Stelle Abhilfe schaffen, weist aber das Problem auf, vergleichsweise große Tröpfchen zu verursachen, die wiederum die Ionenbildung und -ausbeute minimieren. Nichtsdestotrotz lassen sich mit einem Ultraschall-Zerstäuber Flussraten von  $50\text{-}1000\ \mu\text{L min}^{-1}$  erzielen, auch erweitert er den Bereich der Zusammensetzung der verwendbaren mobilen Phase stark im Vergleich zur konventionellen ESI. Das Mittel der Wahl wird die Kombination der beiden letztgenannten Methoden sein, sodass die Rolle der Hochspannung nahezu auf die bloße Unterstützung der elektrischen Ladung der Tropfen abnimmt.

### 2.2.2. Bildung des Elektro-Sprays und Ionenfreisetzung

Die Ionenbildung im ESI-Prozess lässt sich in drei Schritte einteilen: Erstens die Bildung des elektrisch geladenen Sprays, zum Zweiten die stetige Minimierung der Tropfengröße und schließlich drittens die Freisetzung der desolvatisierten Ionen. Um zu verstehen, wie ein kontinuierliches Spray gebildet wird, muss die Oberfläche einer Ionen-enthaltenden Flüssigkeit am Ende einer leitfähigen  $100\ \mu\text{m}$  durchmessenden Kapillare betrachtet werden, die sich auf einem Potential von  $3\text{-}4\ \text{kV}$  relativ zur Gegenelektrode befindet. Die Flüssigkeit ist am offenen Kapillarende einem elektrischen Feld von  $10^6\ \text{Vm}^{-1}$  ausgesetzt, das eine Ladungstrennung innerhalb der flüssigen Phase und die Deformation des Meniskus zu einem Kegel zur Folge hat. Dieser wurde zuerst von Geoffrey Taylor beschrieben<sup>41</sup> und ist daher unter der Bezeichnung *Taylorkegel* (*Taylor cone*) bekannt.

Im Detail verformt sich die Oberfläche bei ansteigender Feldstärke zu einem Oval, die stärkere Krümmung bewirkt wiederum eine lokal zunehmende Feldstärke. Beim Erreichen eines bestimmten Wertes wird das Gleichgewicht zwischen Oberflächenspannung

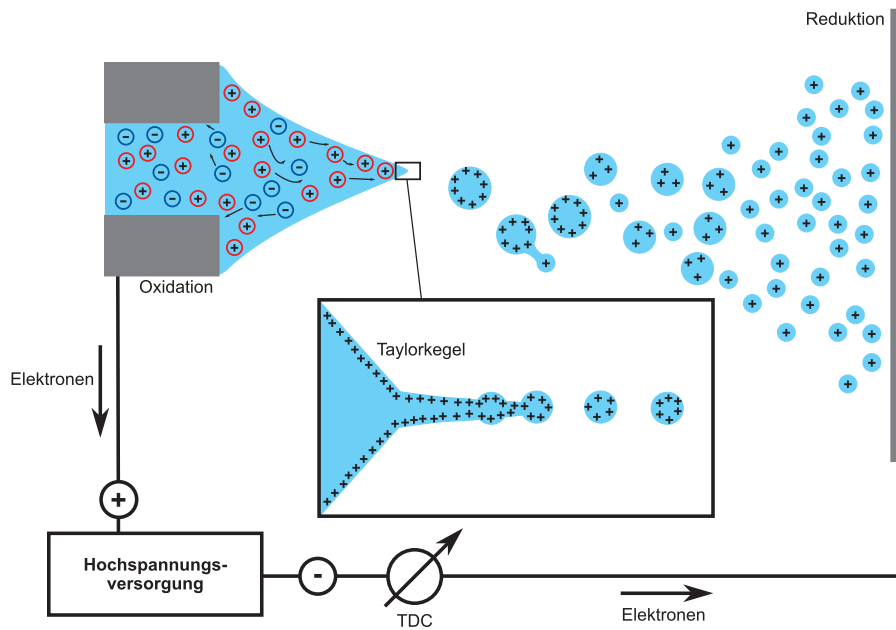


Abbildung 2.3. – Bildung des Taylor-Kegels und seine Auflösung.<sup>52</sup>

und elektrostatischen Kräften unabhängig vom Krümmungsradius, mathematisch kann er auch Null werden. Da in einem realen System eine unendliche Feldstärke nicht möglich ist, bildet sich beim Überschreiten der kritischen elektrischen Feldstärke instantan der *Taylor-Kegel* und beginnt einen feinen Flüssigkeitsstrahl von seiner Spitze in Richtung Gegenelektrode abzusondern.<sup>53</sup>

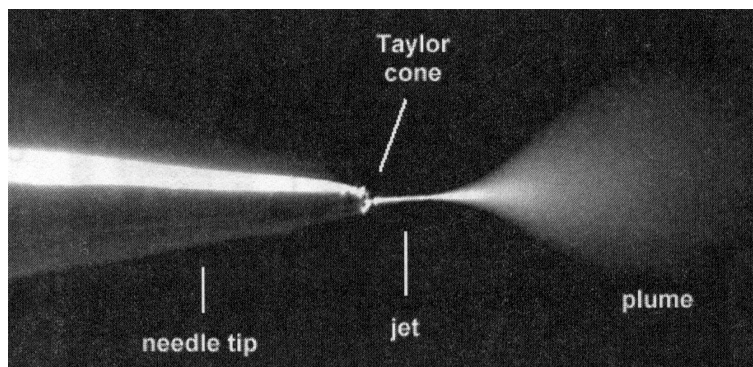
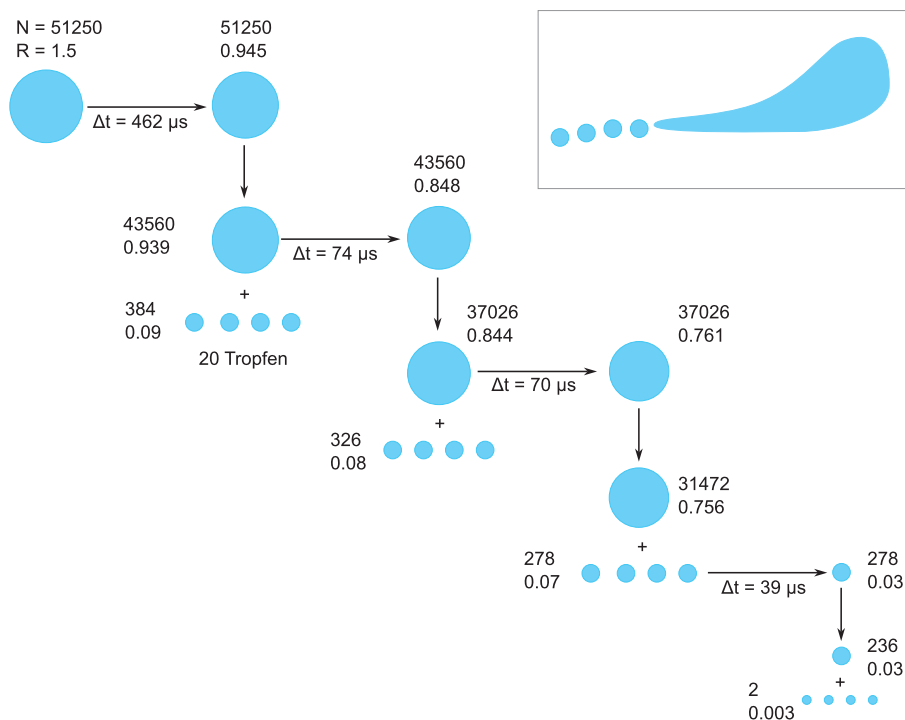


Abbildung 2.4. – Taylor-Kegel.<sup>27</sup>

Dieser Strahl entsteht im Punkt höchster Ladungsdichte - dem Kegeltipfel - und trägt ein Übermaß an Ionen einer bestimmten Ladung mit sich, weshalb er bei längerer Betrachtung nicht stabil bleiben kann und in kleinere Tropfen aufbricht (Abb. 2.3 bzw. 2.4). Diese Tropfen entfernen sich aufgrund der Coulomb'schen Abstoßung voneinander und

## 2. Experimentelle Grundlagen



**Abbildung 2.5.** – Darstellung der Tropfenteilung:<sup>52</sup> Die mittlere Anzahl an Tropfenladungen (N), der Tropfenradius (R in  $\mu\text{m}$ ) und die Zeitskala ( $\Delta t$ ) der Ereignisse sind gekennzeichnet.

generieren so das fein verteilte Spray, das dem Begriff Elektro-Spray zugrunde liegt. Trägt ein Spraytropfen im Mikrometermaßstab einen großen Ladungsüberschuss ( $\sim 10^4$  z) und verdampft Lösemittel, erhöht sich seine Oberflächenladung rapide. Überwiegt nun die elektrostatische Abstoßung am *Rayleigh Limit* die rückhaltende Oberflächenspannung des Tropfen, beginnt er sich in kleinere Einheiten aufzulösen. Ursprünglich wurde angenommen, dass dies explosionsartig (*Coulomb fission* bzw. *explosion*) und wiederholt geschieht. Neuere Arbeiten<sup>52,54</sup> lassen jedoch vermuten, dass die Mikrotropfen nicht explodieren, sondern im Zuge ihrer kaskadenartigen Verkleinerung noch kleinere Tröpfchen von einem deformierten Ende abgeben (Abb. 2.5). Ihr Ablösen kann durch die Verformung der fliegenden Tropfen erklärt werden; letztere sind nicht kreisförmig, sondern erinnern eher an fallenden Regen. Daher ist die Ladungsdichte an ihrer Oberfläche nicht gleichmäßig verteilt. Sie ist in Regionen größerer Krümmung erhöht und erinnert an die Entstehung des Flüssigkeitsstrahls aus dem *Taylorkegel*. Die nachfolgenden Tropfen nehmen dann nur 1-2 % der Masse, jedoch 10-18 % der Ladung des vorausgegangenen Tropfens mit sich.<sup>55</sup> Der gesamte Vorgang dauert weniger als eine Millisekunde wie Blitzphotogramme<sup>54,56</sup> zeigen.

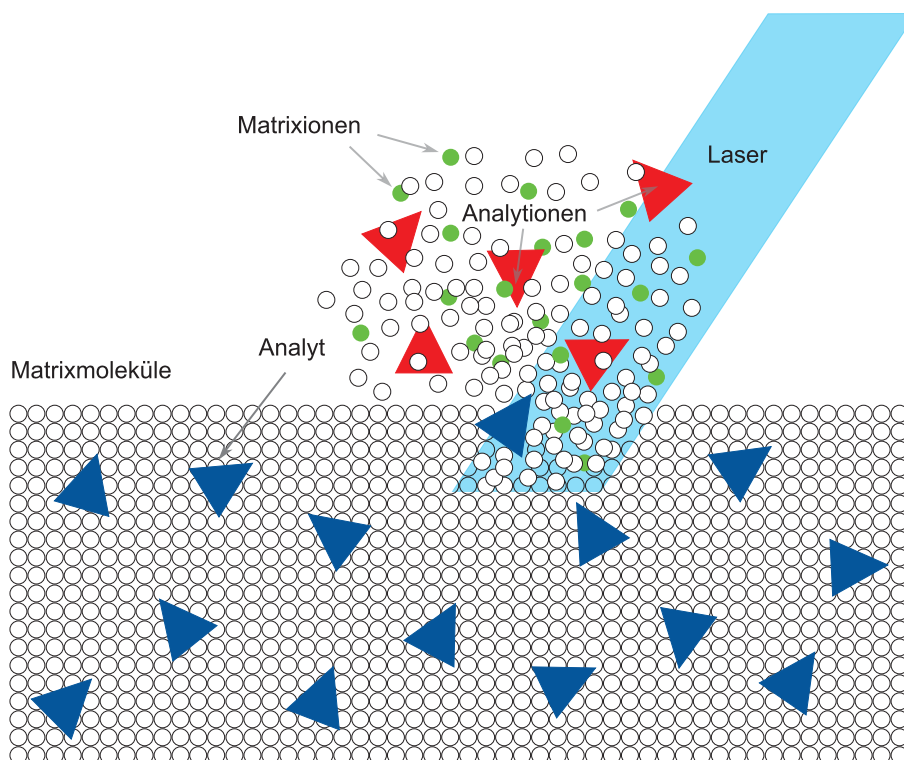


Es stellt sich nun noch die Frage, wie sich die Ionen aus den Tropfen formen. Ein (älteres) Modell der Ionenbildung, das *charged-residue model* (CRM),<sup>43</sup> schlägt eine komplette Desolvatisierung der Ionen durch sukzessiven Verlust aller Solvensmoleküle eines Tropfens vor: Nachdem er in einer Kaskade von Coulomb-Ablösungen so klein geworden ist, dass lediglich noch ein Analytmolekül in ihm enthalten ist, wird seine verbliebene Ladung auf dieses übertragen. Das CRM wird dadurch gestützt, dass selbst große Proteine einfach geladene Ionen bilden können.<sup>57</sup>

Die später publizierte Theorie der Ionenverdampfung (*ion evaporation model* - IEM)<sup>58</sup> beschreibt die Bildung der Ionen dagegen als ihre direkte Verdampfung von der Oberfläche hoch geladener Mikrotropfen. Ionische Solvatationsenergien treten in einem Bereich von 3-6 eV auf. Die thermische Energie der Ionen bei 300 K ist allerdings nur in der Lage, mit 0.03 eV zum Verlassen des Tropfens beizutragen, weshalb das angelegte E-Feld eine größere Rolle spielen sollte. Für die Ionenverdampfung wird ein Feld von  $10^9 \text{ Vm}^{-1}$  benötigt, das einer Tropfengröße von 10 nm entspricht.<sup>59</sup> Prinzipiell beschreibt das IEM gut den Zusammenhang zwischen der Ladungszahl eines Analytmoleküls und dem Bruchteil der Oberfläche des Tropfens, den es bedeckt. Sobald sich der Tropfen verkleinert, bleiben die Analytgröße und die Zahl der Ladungen konstant. Unterdessen nimmt das Areal ab, auf dem sich die Oberflächenladung befindet, die Ladungsdichte nimmt zu und bringt mehr Ladungen in den Bereich eines Analyten.<sup>60,61</sup> Daher zeigen breite und planare Moleküle einen höheren mittleren Ladungszustand als sphärische und die Entfaltung eines Proteins unter identischen ESI-Bedingungen scheint von höheren Ladungszuständen<sup>62,63</sup> begleitet zu werden. Letztere kann z. T. aber auch bisher unzugängliche protonen- oder kationenaaffine Stellen des Proteins freigelegt haben.<sup>64</sup> Ebenso hat die Rate der Tröpfchenverdampfung einen Einfluss auf die Ladungsverteilung eines Proteins. Eine schnellere Verdampfung, hervorgerufen durch höhere Temperaturen oder mehr Trockengas, hat höhere Ladungszustände zur Folge – langsame Verdampfung weniger Ladungen, in Übereinstimmung mit der reduzierten Zeit, die für die Verdampfung eines Ions aus einem schrumpfenden Tropfen verbleibt und der damit verbundenen Ladungsanreicherung auf Tropfen und Ion. Gegen das IEM wird argumentiert, dass die für die Ionenverdampfung notwendige lokale Feldstärke nicht erreicht werden kann, weil sich der Tropfen nach Überschreiten des *Rayleigh Limits* zuvor geteilt hat. Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die Debatte um den Ionenbildungsprozess in der ESI weiter anhält.<sup>55,61,65</sup> Allerdings ist festzuhalten, dass das CRM wohl für große Moleküle stichhaltiger ist, das IEM hingegen die Bildung kleiner Ionen besser beschreibt.

## 2.3. Grundlagen der Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation (MALDI) ist wie die ESI ein weiches Verfahren zur Ionisierung von Molekülen und erwies sich seit seiner Entwicklung in den 1980er Jahren durch Hillenkamp und Karas<sup>12,66,67</sup> als besonders geeignet für die Massenspektrometrie von großen Molekülen und Biopolymeren. Im Gegensatz zur ESI werden dabei die Proben im festen Zustand direkt ins MS eingebracht.



**Abbildung 2.6.** – Der MALDI-Prozess: Die Fokussierung des Lasers auf die Oberfläche der in Matrix vermengten Probe führt zu explosionsartigen Teilchenablösungen, nachfolgend werden in der Gasphase die Probenmoleküle mittels Protonenübertragung durch die Matrix ionisiert.<sup>27</sup>

Der MALDI-Prozess, wie er in Abb. 2.6 gezeigt ist, beruht auf der dichten Vermengung von Analyt und Matrix auf einem Probenträger mit einem 500- bis 5000-fachen molaren Überschuss an Matrix. Sie besteht in der Regel aus kleinen organischen Molekülen (wie z. B. 2,5 Dihydroxybenzoesäure), die bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbieren. Die erfolgreiche Vermengung zwischen Probe und der Matrix scheint essentiell für einen erfolgreichen Laser Desorptions-/Ionisationsablauf zu sein, weshalb auch der Präparation

der Probe und ihrem Auftragen auf den Träger eine besondere Bedeutung zukommt. Anschließend wird im Vakuumbereich einer Ionenquelle die kristalline Oberfläche der vorbereiteten Probe einem intensiven, kurzwelligen Laserpuls ausgesetzt, der meist im UV-Bereich zu einer Anregung der Matrixmoleküle führt, bei aromatischen Matrices ihres  $\pi$ -Elektronensystems oder im funktionalisierten Fall eines  $n$ - $\pi^*$ -Überganges. Schnelle Relaxation und Umverteilung der aufgenommenen Energie ins Kristallgitter führt zu dessen Ausdehnung, gefolgt von der detonationsartigen Verdampfung eines Teils der Kristalle, lange bevor sich ein thermisches Gleichgewicht einstellt. Matrix und Analyt werden so in die Gasphase ablatiert und liegen dort z. T. ionisiert vor, jedoch scheinbar bei solch geringer Energie, dass selbst thermisch labile Makromoleküle wie Proteine diesen Prozess überstehen. Dennoch gilt dies nur für einen limitierten Bereich an Strahlungsleistung im Bereich von  $10^6$  bis  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>.<sup>68</sup> Unterhalb dieses Grenzwertes ist keine Ionenbildung zu beobachten, darüber wird die zu analysierende Substanz zum Großteil zerstört.

Der Ort und der eigentliche Ablauf der Ionenbildung konnten bisher allerdings nicht eindeutig bestimmt werden.<sup>69,70,71</sup> So begünstigt auf der einen Seite eine Erniedrigung des pH-Wertes von Matrix-Analytlösungen die Ionenausbeute von Peptiden und unterstützt das Modell der Desorption von vorgebildeten  $[M+H]^+$ -Ionen. Ähnliche Beobachtungen wurden für Quasi-Molekülionen gemacht, die durch Anhaftung von Kationen, bspw.  $[M+Alkali]^+$ -Ionen im Falle sauerstoffreicher Analyte, entstanden sind. Möglich ist jedoch, dass die Absenkung des pH-Wertes lediglich die Löslichkeit der verwendeten Peptide erhöht hat. Auf der anderen Seite können Gasphasenprozesse nicht ausgeschlossen werden, da die Ionen auch unter den Bedingungen der initial gebildeten Plasmawolke einige hundert Mikrometer über der Probenoberfläche generiert worden sein können. Im Falle von UV-absorbierenden Analyten ist ebenso direkte Photoionisation möglich. Gelegentlich beobachtete Radikationen  $M^{\bullet+}$  und  $M^{\bullet-}$  können nur nach Elektronenaufnahme oder -verlust auftreten und weisen auf Photoionisation, Ladungsaustausch und Elektroneneinfang in der Gasphase hin. Welcher der beschriebenen Prozesse am stärksten zur Ionenbildung beiträgt, ist abhängig von der aktuellen Kombination von Matrix, Analyt sowie vorhandenen Additiven und Verunreinigungen.

## 2.4. Grundlagen der FT-ICR-Massenspektrometrie

Bis zum Jahr 2000 wurden weltweit rund 325 FT-ICR-Massenspektrometer mit einem Gesamtinvestitionsvolumen von 120 Millionen Euro installiert,<sup>13</sup> zuzüglich der Kosten für betreuendes Personal und Betrieb. In den folgenden 5 Jahren hat sich diese Zahl beinahe verdoppelt und im Moment kommen jährlich ca. 80 Geräte hinzu. Dies zeigt, wie bedeutend diese Technik seit ihren Anfängen geworden ist, vor allem Dank ihrer zehnbis hundertfach besseren Massengenauigkeit und -auflösung im Vergleich zu anderen massenspektrometrischen Verfahren.

Das Grundprinzip des Cyclotrons der periodischen Anregung von Ionen, um sie auf größere Flugbahnradien zu beschleunigen, basiert auf Arbeiten von Lawrence und Livingston<sup>72</sup> und wurde mit dem *Omegatron* von Hipple, Sommer und Thomas<sup>24,25</sup> in die Massenspektrometrie eingeführt. Jedoch wurden die Massenspektren bis zur Einführung der Fourier-Transform-Methode in die ICR-MS durch Comisarow und Marshall<sup>22,23</sup> noch durch langsames Durchscannen des magnetischen Feldes, um Ionen eines bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisses nacheinander in Resonanz zu bringen, erhalten.

Da durch simultane Einstrahlung aller Frequenzen des zu beobachtenden Massenbereichs und Breitband-Detektion aller überlagerten Resonanzsignale Messungen in extrem kurzer Zeit (ms) möglich geworden sind, setzte im Folgenden eine sich beschleunigende Verbreitung von FT-ICR-Massenspektrometern in der allgemeinen Analytik ein.

### 2.4.1. Ungestörte Ionen-Cyclotron-Bewegung

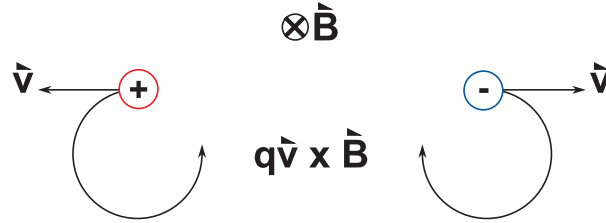
Um die initialen Parameter eines Ions in einer ICR-Zelle bei Raumtemperatur zu beschreiben, sollen folgend einige Grundüberlegungen angestellt werden.

Bewegt sich eine elektrische Ladung  $z$  der Masse  $m$  in einem räumlich konstanten Magnetfeld  $\vec{B} = -k\vec{B}_0$  nicht entlang der Feldlinien, ist sie der Lorentz-Kraft  $\vec{F}_L$  unterworfen, die senkrecht sowohl zu  $\vec{B}$  als auch zur Geschwindigkeitsrichtung  $\vec{v}$  der Ladung wirkt.

$$\vec{F}_L = m \frac{d\vec{v}}{dt} = z\vec{v} \times \vec{B} \quad (2.1)$$

## 2.4. Grundlagen der FT-ICR-Massenspektrometrie

Soll das Magnetfeld  $\vec{B}$  konventionell entgegengesetzt zur  $z$ -Achse, die die ursprüngliche Flugrichtung der Ionen zur Zelle angibt, ausgerichtet sein, die Ladung sich lediglich in der  $x, y$ -Ebene ( $\vec{v}_z = 0$ ) bewegen und durch Kollisionen weder abgebremst noch beschleunigt werden ( $d\vec{v} = 0$ ), rotiert sie auf einer Kreisbahn mit dem Radius  $r$  und der Geschwindigkeit  $v_{xy} = \sqrt{v_x^2 + v_y^2}$  (Abb. 2.7).



**Abbildung 2.7.** – Ionen-Cyclotron-Bewegung: Die Flugbahn eines sich in der Papierebene bewegenden Ions wird durch die Lorentz-Kraft des senkrecht zur Papierebene stehenden Magnetfeldes  $\vec{B}$  auf eine Kreisbahn gezwungen.

Aus Gleichung 2.1 und der Zentrifugalbeschleunigung  $\left| \frac{dv}{dt} \right| = \frac{v_{xy}^2}{r}$  ergibt sich

$$\frac{mv_{xy}^2}{r} = z v_{xy} B_0 \quad (2.2)$$

sowie mit der Winkelgeschwindigkeit  $\omega = \frac{v_{xy}}{r}$  die Kreisfrequenz der ungestörten Cyclotron-Bewegung  $\omega_c$  zu

$$\omega_c = \frac{z B_0}{m} \quad (2.3)$$

bzw.

$$\nu_c = \frac{\omega_c}{2\pi} = \frac{1.535611 \cdot 10^7 B_0}{m/z} \quad (2.4)$$

$$([m] = \text{u}, [z] = \text{e})$$

sodass Ionen eines gleichen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses  $m/z$  unabhängig von ihrer ursprünglichen Geschwindigkeit  $v_{xy}$  dieselbe Umlauffrequenz  $\omega_c$  besitzen. Diese Eigenschaft ist für die Nutzung der ICR als massenspektrometrische Methode elementar, da auf eine genaue Fokussierung der Ionen-Translationsenergie bei der  $m/z$ -Bestimmung verzichtet werden kann.

## 2. Experimentelle Grundlagen

Die Umformung von Gleichung 2.2 führt für den Radius  $r$  der Kreisbahn zu

$$r = \frac{mv_{xy}}{zB_0} = \frac{1.036427 \cdot 10^{-8}(m/z)v_{xy}}{B_0} \quad (2.5)$$

bzw. mit  $\frac{1}{2}mv_{xy}^2 \approx kT$  zu

$$r = \frac{1}{zB_0} \sqrt{2mkT} = \frac{1.336510 \cdot 10^{-6}}{zB_0} \sqrt{mT} \quad (2.6)$$

$$([m] = \text{u}, [z] = \text{e})$$

und für die planare Geschwindigkeitskomponente  $v_{xy}$  zu

$$v_{xy} = \frac{zB_0r}{m} = \frac{9.64853 \cdot 10^7 B_0r}{m/z} \quad (2.7)$$

$$([m] = \text{u}, [z] = \text{e})$$

sowie für die kinetische Energie  $E_{kin}$  eines diese Bahn beschreibenden Ions zu

$$\begin{aligned} E_{kin} &= \frac{1}{2}mv_{xy}^2 = \frac{z^2 B_0^2 r^2}{2m} \\ &= \frac{4.824265 \cdot 10^7 z^2 B_0^2 r^2}{m} \end{aligned} \quad (2.8)$$

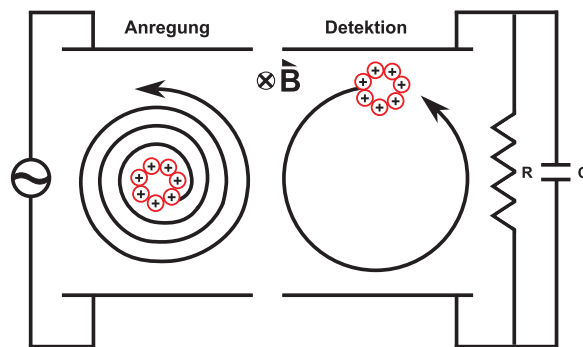
$$([m] = \text{u}, [z] = \text{e}, [E_{kin}] = \text{eV})$$

Demzufolge besitzt ein einfach geladenes Ion der Masse 10000 u bei Raumtemperatur in einem Magnetfeld von 9.4 T einen Cyclotron-Bahnradius von  $\sim 0.25$  mm.

Bei Anregung auf einen Bahnradius von 1 mm entspricht seine Translationsgeschwindigkeit einer kinetischen Energie von 0.426 eV, sodass selbst in einer relativ kleinen Probenkammer Ionen zu hohen Translationsenergien „aufgeheizt“ werden können, die ausreichen, um sie durch Kollision mit Neutralen in der Zelle zu fragmentieren.

### 2.4.2. Anregung und Detektion der Ionen

Eine pure Cyclotron-Bewegung der Ionen in einem Massenspektrometer ist allein von geringem Nutzen, weil sie kein detektierbares elektrisches Signal verursacht. Im Moment der Einspeisung der Ionen in die Zelle oder der dortigen Ionenbildung kann ein Ion seine Cyclotron-Bewegung an jedem Punkt der in Abb. 2.7 gezeigten Kreisbahnen willkürlich beginnen. Die Phasenbeziehung mehrerer Ionen ist damit zufällig. Für ein Ensemble von Ionen ergibt sich, dass im Mittel eine in einer Detektorplatte induzierte Ladung eine gleiche Ladung ausgleicht, die durch ein um  $180^\circ$  phasenverschobenes Ion auf der anderen Seite der Kreisbahn im Detektor erzeugt wird. Die effektive Ladungsdifferenz zwischen beiden Detektorelektroden beträgt Null.



**Abbildung 2.8.** – Anregung und Detektion von Ionen in der ICR-Zelle: Die inkohärente Ionen-Cyclotron-Bewegung (links) wird durch ein Hochfrequenzfeld in eine detektierbare kohärente (rechts) umgewandelt.<sup>37</sup>

Darüberhinaus ist der Cyclotron-Radius thermischer Ionen zu gering, um ein messbares Signal zu erzeugen, selbst wenn alle Ionen eines Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses die gleiche Cyclotron-Phase hätten. Deshalb wird bei nahezu allen Anwendungen in  $x$ -Richtung ein räumlich konstantes elektrisches Feld  $E(t) = E_0 \cos \omega_c t j$  angelegt, das mit oder dicht bei der Cyclotron-Frequenz der Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Wertes oszilliert. Dies ist zum einen nötig, um die Ionen überhaupt kohärent in einen höheren, detektierbaren Bahnorbit zu bringen, zum anderen aber auch, um ihre kinetische Energie insoweit zu steigern, dass Fragmentierungen oder Ionen-Molekül-Reaktionen ermöglicht werden. Sie können gar soweit zu beschleunigt werden, dass ihr Cyclotron-Radius größer als die Abmessungen der Zelle wird, um sie auf diese Weise aus dem Instrument und der Messung zu entfernen.

## 2. Experimentelle Grundlagen

Das Radiofrequenzfeld selbst lässt sich in zwei entgegengesetzte Komponenten  $E_L(t)$  und  $E_R(t)$  aufspalten

$$\begin{aligned} E(t) &= E_L(t) + E_R(t) \\ E_L(t) &= \frac{E_0}{2} \cos \omega t j - \frac{E_0}{2} \sin \omega t i \\ E_R(t) &= \frac{E_0}{2} \cos \omega t j + \frac{E_0}{2} \sin \omega t i \end{aligned} \quad (2.9)$$

Der Anteil  $E_R(t)$  rotiert im selben Sinn wie das betreffende Ion in der  $xy$ -Ebene gegen den Uhr (Abb. 2.8), resonant bei gleicher Frequenz und treibt es so stetig in seiner Bahn an, während die Komponente  $E_L(t)$ , die gegenläufig um  $2\omega_c$  versetzt nicht-resonant rotiert, nach mehreren Zyklen nahezu keinen Einfluss mehr auf die Ionenbeschleunigung besitzt.

Die vom Ion dabei absorbierte Energie  $A(t)$  ergibt sich aus dem Skalarprodukt von Kraft  $F$  und Geschwindigkeit  $v$  zu

$$A(t) = F \cdot v = zE(t) \cdot v_{xy} \quad (2.10)$$

sodass für seinen Post-Exzitations-Radius  $r_{pe}$  nach der Anregungszeit  $t_{exci}$  unter Voraussetzung des räumlich exakt konstanten Feldes

$$r_{pe} = \frac{E_0 t_{exci}}{2B_0} \quad (2.11)$$

und die kinetische Energie des Ions nach Anregung

$$E_{kin-pe} = \frac{z^2 B_0^2 r^2}{2m} = \frac{z^2 E^2 t_{exci}^2}{8m} \quad (2.12)$$

folgen.

Es ist zu ersehen, dass  $r_{pe}$  unabhängig von  $m/z$  ist, alle Ionen eines bestimmten Massebereiches können in denselben ICR-Bahnradius angeregt werden. Eine durch die Anregung hervorgerufene Massendiskriminierung wird bei einheitlichem Feld vermieden. Durch zeitgleiche Einstrahlung verschiedener Cyclotron-Frequenzen  $\omega_c$  ist somit eine massenunabhängige Breitband-Anregung (*broad band excitation*) der Ionen möglich.



## 2.4. Grundlagen der FT-ICR-Massenspektrometrie

Allerdings bewirkt allein das Einschalten eines elektrischen Feldes die Anregung ungewollter Frequenzen, denn das Frequenzspektrum  $E(\nu)$  einer Einfachanregung der Frequenz  $\omega_c = 2\pi\nu_c$  und der Dauer  $t_{exci}$  ist gegeben durch

$$E(\nu) = E_0 \frac{\sin(2\pi\nu_c t_{exci})}{2\pi\nu_c} \quad (2.13)$$

Darum verbreitert schon das Anlegen der Anregungsspannung in der Zeit Null bis  $t_{exci}$  den Spektralbereich der Anregung auf ca.  $1/t_{exci}$   $\text{rads}^{-1}$ , selbst wenn die betrachtete Anregungswelle exakt die Frequenz  $\omega$  besitzt, die von  $\omega_c$  abweicht. Je länger also die zeitliche Dauer des Signals, umso schmaler ist die spektrale Breite der Frequenzdomäne. Demnach vermag eine nicht-resonante Anregung der Frequenz  $\nu$ , sofern sie so kurz andauert, dass

$$\frac{1}{t_{exci}} \geq 2\pi|\nu - \nu_c| \quad (2.14)$$

erfüllt ist, noch immer Ionen der Cyclotronfrequenz  $\omega_c$  zu aktivieren. Dieses Ergebnis definiert also letztlich die Präzision, mit der Ionen über ihre ICR-Frequenzen selektiert werden können. Cyclotronfrequenzen liegen in der Regel im Bereich von Kilo- oder Megahertz und sind damit so hoch, dass auch Anregungen in Sekundenlänge noch ausreichend massenselektiv sind (z. B. 10 ppm für Ionen der Masse 1400 in einem 9.4 T Feld).

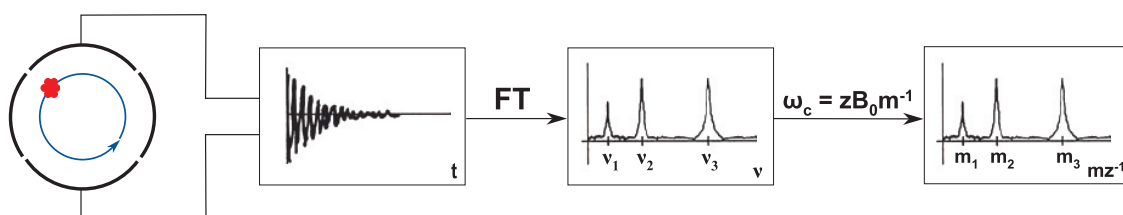
Die Ionen-Detektion erfolgt im einfachsten Fall erneut mit Hilfe zweier paralleler Kondensatorplatten. Die Ladungsdifferenz  $\Delta Z$  in  $y$ -Richtung, die von einem Ionenensemble dabei induziert wird, ergibt sich nach Comisarow und Limbach<sup>73,74</sup> unter der Annahme zweier gegenüberliegender unendlich ausgedehnter leitfähiger Platten im Abstand  $d$  zu

$$\Delta Z = -\frac{2zy}{d} \quad (2.15)$$

Die Stärke des ICR-Signals ist proportional zum induzierten Strom  $\frac{d\Delta Z}{dt} = -2z \frac{dy/dt}{d}$  und damit unabhängig von der Magnetfeldstärke, auch wenn seine Qualität mit steigendem Magnetfeld gravierend zunimmt. Da aber die  $y$ -Geschwindigkeitskomponente  $\frac{dy}{dt}$  linear mit dem Cyclotron-Radius ansteigt (Gl. 2.7), wächst die Signalstärke ebenso linear mit dem Post-Anregungs-Bahndurchmesser und auch der Ionenladung, sodass das ICR-Signal besonders für mehrfach geladene Ionen, wie sie zum Beispiel während der ESI gebildet werden, empfindlich ist. Die Linearität ist hierbei von spezieller Bedeutung, da zum einen die Signalantwort bei jeder Frequenz proportional zur spektralen Größenordnung der Anregung ist. Zum anderen erlaubt sie die Nutzung der schnellen

## 2. Experimentelle Grundlagen

FT-Methode, weil die Fourier-Umwandlung der ICR-Zeitdomäne dasselbe Spektrum erzeugt, wie es die klassische Messung mittels langsamen Durchscannens des gesamten  $m/z$ -Bereiches ergeben hätte.<sup>75</sup> So ist es möglich geworden, nicht nur breitbandig anzuregen, sondern auch zu detektieren, wie es Marshall und Comisarow erstmals 1974 getan haben.<sup>22,23</sup> Signale verschiedener Ionengruppen werden am Detektor überlagert, um einen weiten  $m/z$ -Bereich simultan detektieren zu können, was wiederum zu einer deutlichen Minimierung der benötigten Messzeit und Substanzmenge führt. Das endgültige Signal wird verstärkt, mit einem AD-Wandler aufgezeichnet und digital gespeichert. Eine Fourier Transformation des Transienten führt zu einem Frequenzspektrum, das über die Cyclotrongleichung (Gl. 2.3) in ein Massenspektrum umgewandelt wird (Abb. 2.9).



**Abbildung 2.9.** – FT-Detektion und Verarbeitung der Ionensignale: Das kohärente Ionenensemble induziert einen messbaren Strom an beiden Detektorelektroden. Kollisionen zwischen Ionen und Neutralen sowie Coulomb-Abstoßung zwischen den Ionen führen zu einer Dämpfung des ICR-Signals. Die auf den Transienten angewendete Fourier Umwandlung führt zu einem Frequenzspektrum, das über die Cyclotrongleichung in ein Massenspektrum umgewandelt wird.

Mit einem Detektionslimit von 100 bis 180 Ionen<sup>37,76</sup> ist die FT-ICR-Massenspektrometrie bereits im regulären Betrieb eine äußerst empfindliche Analysemethode. Jedoch sollten sich in der Zelle auch nicht mehr als  $10^5$  Ionen gleichzeitig befinden, da die gegenseitige elektrostatische Abstoßung gleich geladener Ionen eine zu große Ausdehnung des Ensembles zur Folge hat, die wiederum die für den Nachweis essentiell notwendige Phasenbeziehung zerstört.

### 2.4.3. Einfluss der Ionenfalle und gestörte Cyclotron-Bewegung

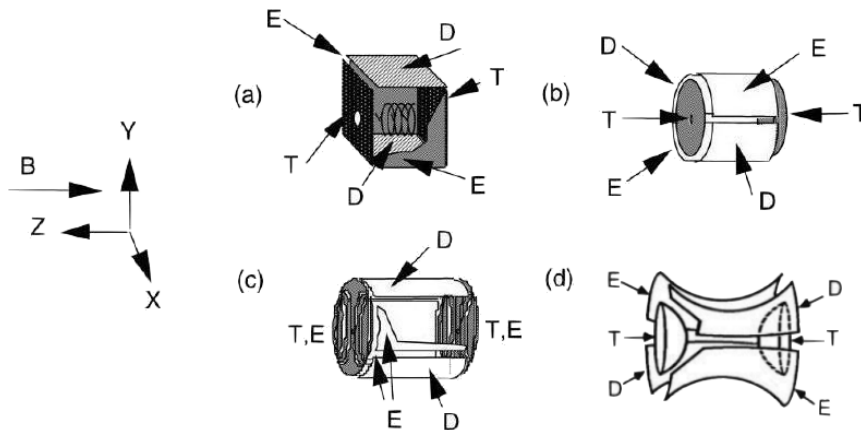
Bis hierher wurde zunächst lediglich ein idealisiertes Ionenverhalten einer scheinbar unendlichen großen Zelle betrachtet. Das statische Magnetfeld  $B$  engt zwar aufgrund der Lorentz-Kraft die Beweglichkeit der Ionen in der  $x$ - und  $y$ -Richtung ein, in  $z$ -Richtung

können sie bis dato allerdings entkommen. Um dies zu verhindern wird in der Regel an zwei sich am Ende der Zelle befindliche Elektroden (*end caps*) ein elektrostatisches Potential im Bereich von 1-2 V angelegt. Da diese wie die Elektroden, die die Ionen anregen und detektieren, endlich Ausmaßes sind, resultieren nicht-lineare elektrische Felder (kleineren Betrages) im Vergleich zu unbeschränkten Kondensatorplatten, die die bisher ungestörte Cyclotron-Bewegung beeinflussen.

Im optimalen Fall eines eindimensionalen, quadratischen Potentials entlang  $z$  würden die Ionen lediglich harmonisch zwischen den Endkappen mit von ihrer  $z$ -Position unabhängiger Frequenz hin- und herschwingen. Im dreidimensionalen Fall sind jedoch auch Potentialbeiträge in  $x^2$  und  $y^2$  zu berücksichtigen,<sup>29,30</sup> die sich radial zu  $z$  gemäß

$$\Phi(r, z) = V_{trap} \left( \gamma + \frac{\alpha}{2a^2} (2z^2 - r^2) \right) \quad (2.16)$$

auswirken. Dabei gibt  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  die radiale Position der Ionen in der  $xy$ -Ebene an,  $a$  ist ein Parameter für die Maße der Zelle und  $\alpha$  bzw.  $\gamma$  sind von der Zellenform (Abb. 2.10) abhängige Konstanten.



**Abbildung 2.10.** – ICR-Zelltypen: (a) kubisch; (b) zylindrisch; (c) „infinity trap“ mit segmentierten end caps; (d) hyperbolisch  
Die Abkürzungen stehen für Anregung (Excitation = E), Detektion (D) und Trapping (T).<sup>37</sup>

Die Trapping- und dipolaren Anregungsfelder scheinen für kubische und zylindrische Zellen vom Grundsatz her weitestgehend identisch zu wirken, während die hyperbolische Variante zwar ein nahezu perfekt lineares Trapping-Potential aufweist, allerdings kein sehr lineares Anregungsfeld. Im Fall der „infinity trap“ wurde die Linearität des Anre-

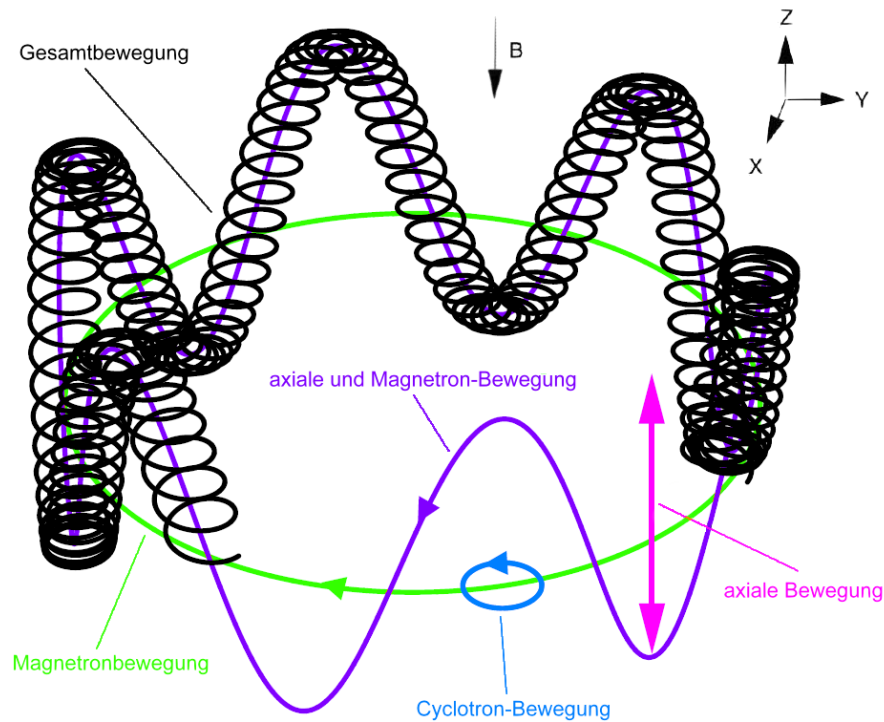
## 2. Experimentelle Grundlagen

gungsfeldes dahingehend optimiert, dass die Endkappen streifenförmig segmentiert mit unterschiedlichen Potentialen versetzt wurden, um so bezüglich der Hochfrequenzanregung als „Spiegel“ zu wirken und den Ionen den Eindruck einer unendlich langen Zelle zu geben.

Gemein ist allen Zellentypen nun ein durch das Trapping-Potential hervorgerufenen Radialfeld, das gemäß

$$F_{rad} = z \cdot E(r) = \frac{zV_{trap}\alpha}{a^2}r \quad (2.17)$$

eine nach außen gerichtete Kraft ausübt, die der nach innen gerichteten Lorentzkraft  $F_L$  entgegenwirkt. Das zu Beginn direkt um das Fallenzentrum rotierende Ionenensemble wird dabei ausgelenkt, sodass es neben der eigentlichen Cyclotron-Kreisbahn einer weiteren folgt, der der Magnetron-Präzession.



**Abbildung 2.11.** – Typische Bewegung eines Ions in einer ICR-Zelle: In ihr sind drei Eigenbewegungen überlagert, die harmonische Schwingung parallel zur  $z$ -Achse, die schnelle, reduzierte Cyclotronbewegung in der radialen Ebene und die langsamere, ebenfalls in der radialen Ebene ablaufende, azimutale Präzession um das Fallenzentrum, die Magnetronbewegung.

## 2.4. Grundlagen der FT-ICR-Massenspektrometrie

Die Überlagerung aller beschriebenen und von den Ionen durchlaufenen Bewegungen (Cyclotron, Magnetron, axial) ist in Abb. 2.11 dargestellt.

Die Summe der radialen Kräfte ergibt sich somit mit Gl. 2.2 zu

$$F = m\omega^2 r = zB_0\omega r - \frac{zV_{trap}\alpha}{a^2}r \quad (2.18)$$

bzw.

$$\omega^2 - \frac{zB_0\omega}{m} + \frac{zV_{trap}\alpha}{ma^2} = 0 \quad (2.19)$$

woraus zwei neue Umlauffrequenzen anstatt der ursprünglichen „ungestörten“ Cyclotronfrequenz in Abwesenheit des Fallenpotentials folgen, die reduzierte Cyclotronfrequenz  $\omega_{rc}$  und die Magnetronfrequenz  $\omega_m$

$$\begin{aligned} \omega_{rc} &= \frac{\omega_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \\ \omega_m &= \frac{\omega_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \end{aligned} \quad (2.20)$$

Die Fallen-Oszillationsfrequenz  $\omega_z$  beträgt hierin

$$\omega_z = \sqrt{\frac{zV_{trap}\alpha}{ma^2}} \quad (2.21)$$

Da Magnetron- und Fallenfrequenzen normalerweise deutlich kleinere Werte annehmen als die modifizierte Cyclotronfrequenz, werden sie in der Regel nicht detektiert, es sei denn die Ionenfalle ist zur Magnetfeldachse schlecht ausgerichtet oder die Amplitude der Ionenbewegung erreicht die Abmessungen der Zelle.<sup>77</sup>

#### 2.4.4. Tandem-Massenspektrometrie: Collision-Induced Dissociation (MECA, VLE, SORI), (IR)MPD, ECD

Der große Einfluss der FT-ICR-MS als analytische Technik lässt sich nicht nur auf ihre hohe Massenauflösung und Genauigkeit zurückführen, sondern auch auf der Möglichkeit, sie als Tandemmethode einzusetzen. Allgemein beschäftigt sich die Tandem-MS mit massenselektierten Ionen (MS1), die einer weiteren massenspektrometrischen Analyse (MS2) unterworfen werden. So können aus Fragmentierungswegen Rückschlüsse auf die Struktur von Molekülen gezogen oder die Selektivität bzw. Sensitivität einer Methode verbessert werden.

##### Collision-Induced Dissociation

Ionen können vor allem durch Kollisionen mit Atomen oder Molekülen eines neutralen Gases (He, Ar, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) fragmentiert bzw. zuvor energetisch aktiviert werden. Dieser Prozess wird als *Collision-Induced Dissociation* (CID) bezeichnet. Synonym sind *Collisionally Activated Dissociation* (CAD) oder *Collisional Activation* (CA). Auch wenn eine Kollisionskammer, in die das Gas eingespeist wird, im ersten Augenblick nicht zu den Bedingungen des für eine möglichst effektive Ionenflugbahn benötigten Hochvakuums zu passen scheint, sind viele Massenspektrometer mit einer solchen zwischen Ionenquelle und Analysator ausgestattet. Hier wird in der Regel lediglich ein kleineres Volumen bei höherem Druck für die Kollisionen genutzt, durch das der Ionenstrahl tritt, und gegenüber dem Hochvakuum durch verschiedene Pumpstufen abgeschirmt.

Diese Fragmentierungsmethode ist zwar leicht zu verwenden und kann zu nützlichen Strukturinformationen führen, weist jedoch ebenso entscheidende Schwächen auf. Die Methode ist auf der einen Seite ohne vorige Ionenisolierung nicht massenselektiv, sodass ihre Anwendung auf Mischungen ohne eine vorhergehende zeitaufwendige chromatographische Trennung eingeschränkt ist. Andererseits können nur einstufige Fragmentierungen analysiert werden bzw. sind von mehrstufigen nicht zu unterscheiden, da die Ionen die Kammer nur einmal passieren. Mitunter kann der Bereich der Fragmentierung durch das Anlegen größerer Spannungsdifferenzen bei der Beschleunigung der Ionen ausgeweitet werden, doch lässt dies die Herkunft der Fragmentionen (MS2) im Vergleich zu einer mehrstufigen Analyse verschwimmen. Bei der FT-ICR-Massenspektrometrie<sup>78</sup> finden die Fragmentierungen in der Regel direkt in der Analysezelle statt. Damit sind neben einer verbesserten Massenselektivität kontrollierte mehrstufige Dissoziationen (MS<sup>n</sup>) oh-

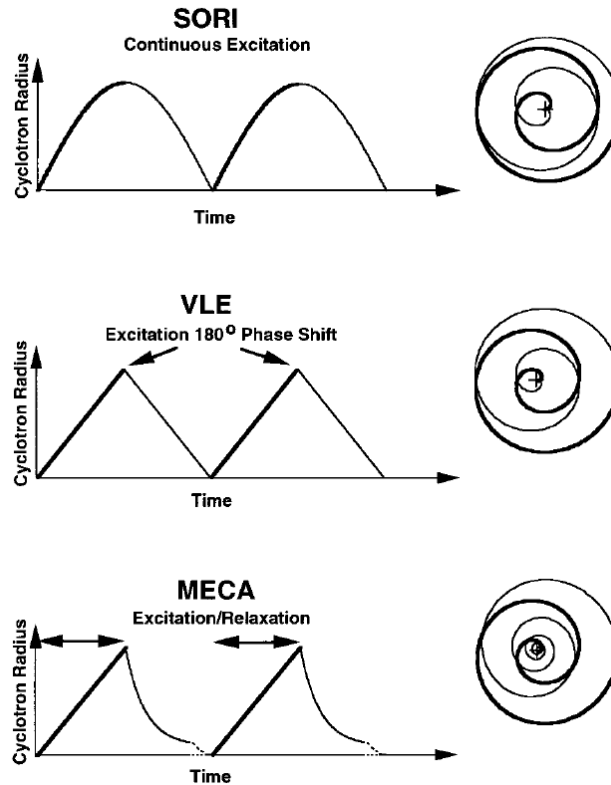
ne zusätzlichen apparativen Aufwand möglich geworden. Alle Vorgängerionen (*precursor ions*) können parallel gespeichert sowie selektiv ausgewählt werden. Sämtliche Folgeionen bleiben erhalten, um hochauflösend detektiert zu werden, im Gegensatz zu Quadrupolfallen, in denen Ionen, die ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von weniger als einem Drittel der Vorläuferionen besitzen, nicht beobachtet werden.<sup>13</sup>

Die Vorgängerionen werden durch Umwandlung von Translations- in interne Energie aktiviert, erstere wird dabei durch resonante Anregung der Cyclotron-Bewegung mit Pulsen unter  $500 \mu\text{s}$  erhöht, um die Ionen später mit einem statischen<sup>79</sup> oder gepulsten<sup>80</sup> Gas kollidieren zu lassen. Da Aktivierung und Detektion der Ionen nicht räumlich, sondern zeitlich voneinander getrennt sind, ist die Methode des gepulsten Gases vorzuziehen, weil sie dem System erlaubt, in einen für eine hohe Auflösung notwendigen Niederdruckzustand zurückzukehren. Allerdings zeigt ebenso diese Aktivierungsvariante einige Nachteile auf: So ist zum einen der Betrag der Translationsenergie bei einfacher Anregung gemäß Gl. 2.8 durch die Magnetfeldstärke und die Abmessungen der ICR-Zelle begrenzt. Zum anderen werden die nachfolgenden Ionen von der  $z$ -Achse entfernt gebildet, was die mögliche Anzahl weiterer MS-Schritte sowie den für die Detektion nutzbaren Post-Anregungsradius  $r_{pe}$  einschränkt und so die Signalstärke und das Auflösungsvermögen beeinträchtigt.<sup>81</sup> Außerdem werden die Ionen im Normalfall durch die Art und Anzahl der Kollisionen<sup>82</sup> unterschiedlich intensiv aktiviert, eine quantitative Fragmentierung der Vorgänger- ist oft nicht ohne eine unmittelbar folgende Dissoziation der Produktionen möglich. Daher ist es von Vorteil, die Ionen nicht konstant zu beschleunigen, um eine CID auszulösen, sondern ihre maximale kinetische Energie zu beschränken, indem sie mit den drei nachfolgend beschriebenen Methoden (MECA, SORI, VLE) wiederholt beschleunigt und abgebremst werden (vgl. Abb. 2.12), jede davon moduliert den ICR-Bahnradius (und so die Cyclotron-Energie) periodisch.

### **Nichtkonventionelle CID: (MECA, VLE, SORI)**

Eine simultane Produktionenbildung näher am Fallenzentrum und somit eine effizientere Dissoziation kann durch die *multiple excitation collisional activation* (MECA)<sup>83</sup> erreicht werden. In ihr werden die Ionen periodisch resonant angeregt, um danach ihrer Cyclotron-Bewegung die Möglichkeit zu geben vor der nächsten Anregung zu relaxieren. Nach niedrig energetischer Anregung tendieren nicht-fragmentierte Vorgängerionen dazu wegen zahlreicher Stöße mit dem Hintergrundgas ins ICR-Zellenzentrum zurückzukehren; sie haben an kinetischer Energie eingeübt. Diese im ersten Versuch nicht fragmentier-

## 2. Experimentelle Grundlagen



**Abbildung 2.12.** – Nichtkonventionelle CID-Methoden:<sup>37</sup> Zeitliche Entwicklung des IC-Radius (links) und Ionen- $xy$ -Trajektorie (rechts) der drei auf Einzel-Frequenzanregung basierenden CID-Techniken. Mit der SORI werden selektierte Ionen alternierend be- und entschleunigt aufgrund des Unterschiedes zwischen Anregungs- und Cyclotron-Frequenz. Die Grundlage für die VLE CID bildet eine resonante Anregung, deren Phase bimodal zwischen  $0^\circ$  und  $180^\circ$  wechselt. Die MECA regt die Ionen an und erlaubt ihnen danach zu relaxieren.

ten Ionen können nun diverse Male wieder angeregt werden, ohne die bereits vorhandenen Produktionen weiter zu aktivieren, bis die finale Spaltung erfolgt ist. Ursprünglich wurde diese Methode eingesetzt, um durch wiederholtes Messen der immer gleichen Ionenpopulation ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen; sie ist zudem mit einer Effizienz von  $\geq 50\%$  deutlich leistungsfähiger als der klassische CID-Zerfall. Die multiplen Anregungen erlauben deutlich geringere Aktivierungsenergien bei gleichbleibend hoher Effizienz und lassen die Produktionen dichter am Zellenzentrum zurück.

Gleichfalls resonant angeregt werden die Ionen beim *very low energy* (VLE) Zerfall. Dieser nutzt den Effekt, dass gerade angeregte Ionen durch einen um  $180^\circ$  phasenverschobenen Puls wieder abgeregt werden können.<sup>84</sup> Die Verwendung der resonanten Anregung



und wiederholter Phasen-Shifts be- und entschleunigt die Ionen zahlreiche Male und erlaubt es ihnen so, schrittweise Energie durch viele niederenergetische Stöße aufzunehmen.<sup>85</sup> Die mittlere kinetische Energie kann so äußerst genau über die Anregungsspannung und die Anzahl der Anregungszyklen zwischen den Deaktivierungen eingestellt werden. Auf diese Weise kann das Hauptproblem der einzelgepulsten CID vermieden werden, dass die kinetische Energie der Ionen innerhalb der ersten Kollisionen ( $\leq 50$  ms) in Schwingungsenergie umgewandelt werden muss, um nicht wieder durch intermolekulare Abkühlungsprozesse verloren zu gehen, und dass die Fragmentationen daher in der Regel einen hohen nicht erwünschten Energieüberschuss beim Zerfall aufweisen. Die Zerfallseffizienz liegt so bei nahezu 60 %.

Als weitere nicht-konventionelle CID-Methode dient die *sustained off-resonance irradiation* (SORI).<sup>86</sup> Sie beruht darauf, dass Ionen im ICR-MS auch z. T. nicht-resonant angeregt werden können, sofern die Frequenz des eingestrahlten Feldes  $\omega_a$  nicht allzu weit entfernt von der Cyclotron-Frequenz  $\omega_c$  der Ionen liegt. Ihre kinetische Energie entspricht dann in Analogie zu Gleichung 2.12

$$E_{kin} = \frac{E^2 \cdot z^2 \cdot \sin^2(\omega_a - \omega_c) \cdot t_{exci}^2}{8m(\omega_a - \omega_c)^2} \quad (2.22)$$

Als Folge hiervon werden die Ionen, wie bei der VLE, alternierend beschleunigt und abgebremst, jedoch periodisch mit dem Unterschied zwischen  $\omega_a$  und  $\omega_c$ <sup>87</sup> während der gesamten Länge des Hochfrequenzpulses, der nun beträchtlich auf Zeiten von  $\geq 500$  ms verlängert werden kann. Dies ermöglicht den Ionen, schrittweise Energie langsam aufzunehmen, ohne die Grenzen der Zelle zu erreichen. Die Verwendung eines leichten Zielmoleküls, auf das die Ionen auftreffen und das die Translationsenergie in interne Energie des Ions umwandelt, sowie eine passende Frequenzdifferenz  $\Delta\omega = \omega_a - \omega_c$  sind für diesen Prozess von Bedeutung. Daraus folgend werden Zerfallsraten eines bestimmten Ions von  $> 90$  % erzielt und meist der energetisch niedrigst gelegene Reaktionspfad während des Zerfalls eingeschlagen, der die Interpretation der erhaltenen Massenspektren vereinfacht.

### **(Infra-Red) Multi-Photon Dissociation**

Ohne Hintergrundgas können Ionen alternativ auch mit Hilfe von Strahlung aktiviert bzw. fragmentiert werden. Sämtliche Techniken hierfür werden durch die vorhergehende Speicherung der Ionen wie im FT-ICR-Massenspektrometer vereinfacht. Als Quelle für die Strahlung kann ein UV-<sup>88</sup> oder IR-Laser<sup>89</sup> dienen, im ersten Fall spricht

## 2. Experimentelle Grundlagen

man von *ultraviolet photodissociation*, im letzteren von *infrared multiphoton dissociation* (IRMPD).<sup>90,91</sup> Die IR-Methode hat weitere Verbreitung gefunden, da die Ionenaktivierung aufgrund der geringeren Strahlungsenergie in kleineren Schritten erfolgt, allerdings werden mehrere Photonen im Einzelprozess benötigt.



Typischerweise wird ein *continuous wave* CO<sub>2</sub>-Laser mit einer Wellenlänge von 10.6  $\mu\text{m}$  und einer Leistung von 25 bis 40 W eingesetzt. Er wird durch ein ZnSe- oder BaF<sub>2</sub>-Fenster direkt in die ICR-Zelle gestrahlt und erzeugt so Fragmentationen, die denen im CID-Prozess entstehenden ähneln. Ein großer Vorteil der Verwendung von IRMPD besteht darin, dass die zur Dissoziation benötigte Energie direkt über die Dauer der Strahlung eingeregelt werden kann. Sie liegt normalerweise in einem Bereich von 5-300 ms. Die Fragmentierung erfolgt zentral im Bereich der  $z$ -Achse der Zelle und umgeht so die Begrenzung weiterer MS-MS-Schritte durch die Zell-Abmessungen. Darüberhinaus muss kein Stoßgas mehr in die Zelle gepulst werden. Die Detektion der Ionen kann so direkt nach ihrer Fragmentierung erfolgen – ohne dass das Gas zwischenzeitlich abgepumpt werden muss. So wird eine Verminderung des Vakuums vermieden, welche eine schlechtere Massenauflösung zur Folge hätte. Die IRMPD erlaubt damit im Vergleich zur SORI-CID eine ungleich schnellere hoch aufgelöste Fragmentationsanalyse bei ähnlichen Dissoziationswegen.

### Electron Capture Dissociation

Die für die Fragmentierung der Vorgängerionen notwendige Energie kann neben der Verwendung von Lasern oder Stoßgasen auch aus der (partiellen) Neutralisation von Ionen mit Elektronen erhalten werden, wie in der *electron capture dissociation* (ECD).<sup>91</sup> Auch diese Methode ist nur auf gespeicherte Ionen anwendbar und sollte in der Regel nicht für lediglich einfach geladene Ionen verwendet werden können, obwohl es hierzu in letzter Zeit durch Zubarev<sup>92</sup> mit Vorarbeiten von Cody<sup>93,94</sup> neue Erkenntnisse gegeben hat. Um die ECD nutzen zu können, darf die Energie 0.2 eV pro Elektron nicht überschreiten, sodass die Elektronen von einem vorsichtig regulierten Heizfilament erzeugt werden, um nach einer Beschleunigungsstrecke axial in die ICR-Zelle eingespeist zu werden. Weil der Querschnitt für den Elektroneneinfang deutlich mit dem Quadrat der Ionenladung wächst<sup>95</sup> ist die ECD besonders geeignet für mehrfach geladene Ionen, wie

sie in der Elektro-Spray-Ionisation (ESI) gebildet werden. Ein Nachteil besteht jedoch in der Energieunschärfe der verwendeten Elektronen. Dennoch hat sich die noch relativ junge Methode schnell verbreitet, da sie i. d. Regel zu CID und IRMPD komplementäre Informationen liefert.<sup>96</sup>

## 2.5. Cooks' kinetisches Verfahren zur Bestimmung thermochemischer Werte

Gasphasenbasizitäten (GB) und Protonenaffinitäten (PA) bieten i. a. Einblicke<sup>14,97,98,99</sup> in die Struktur von Molekülen, deren Stabilität und ihr Brønsted-Säure-Base-Verhalten. Sie sind definiert als die negative Änderung der Freien Energie ( $-\Delta G$ ) bzw. Enthalpie ( $-\Delta H$ ) einer Reaktion



Diese Eigenschaften sind u. a. durch Messung der Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  einer reversiblen Protonentransferreaktion in Abhängigkeit von der Temperatur zugänglich. Die Lage des Gleichgewichts kann durch die Messung der Ratenkonstanten der Hin- ( $k_a$ ) und Rückreaktion ( $k_b$ ) bestimmt werden.



$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_b} \quad (2.26)$$

Die Änderung der Freien Energie  $\Delta G^\circ$  ist dabei gegeben durch

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2.27)$$

Die Differenz der Gasphasen-Säurestärke  $\Delta(\Delta G^\circ_{acid})$  zwischen den Spezies  $B_1H^+$  und  $B_2H^+$  wird durch

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G^\circ_{acid}) &= \Delta G^\circ_{acid}(B_1H^+) - \Delta G^\circ_{acid}(B_2H^+) \\ &\cong \Delta H^\circ_{acid}(B_1H^+) - \Delta H^\circ_{acid}(B_2H^+) \end{aligned} \quad (2.28)$$

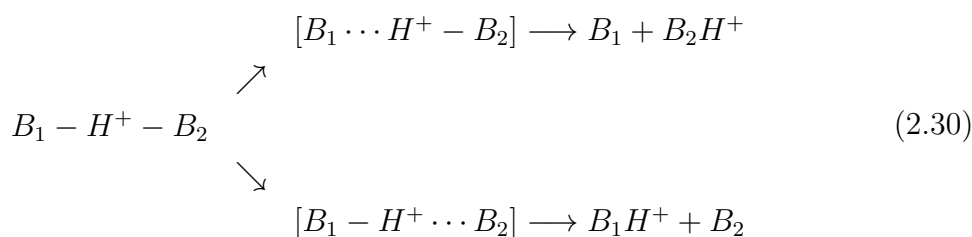
gekennzeichnet. Im Falle von Protonentransferreaktionen ist  $\Delta S^\circ$  nahezu Null und die Änderung der Freien Energie kann mit der Änderung der Enthalpie gleichgesetzt wer-

## 2. Experimentelle Grundlagen

den, um Zugang zu den relativen Protonenaffinitäten zweier Basen zu erhalten. Diese Methode hat sich als extrem nützlich erwiesen, da die meisten der im Moment in der Literatur erscheinenden thermochemischen Daten auf ihr beruhen.<sup>100,101</sup> Kebarle maß mit der Equilibriumsmethode die Azidität starker Säuren,<sup>102</sup> später sind die Protonenaffinitäten organischer Radikalkationen,<sup>103</sup>  $\alpha, \beta$ -ungesättigter Säurederivate<sup>104</sup> und die Gasphasenbasizitäten von  $\alpha, \alpha, \alpha$ -Trifluoracetophenonen<sup>105</sup> bestimmt worden. Ebenso wurden Gasphasenstabilitäten von Phenonium-Ionen über deren relative Bromidionenaffinitäten<sup>106</sup> und Substituenteneffekte auf die Stabilität proton-gebundener Phenolat- und Halogenidanionen<sup>107</sup> untersucht. Die Methode ist allerdings nicht anwendbar bei unreinen oder schlecht verdampfbaren Proben, weshalb oft auch die „ion/molecule-bracketing“-Methode verwendet wird. Das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten eines beispielhaften Protontransfers zwischen einem ausgesuchten Quasimolekülion  $MH^+$  und einer Serie von Referenzbasen zeigt an, ob die Referenz eine höhere bzw. niedrigere Gasphasenbasizität besitzt als die unbekannte Base M. Diese Anordnung basiert auf der Generalisierung, dass thermische Ionen/Molekül-Reaktionen lediglich bei negativen  $\Delta G_{reaction}$  bereitwillig ablaufen.



Eine andere Alternative ist die kinetische Methode zur Bestimmung thermochemischer Größen. Sie beruht allerdings auf extremeren Annahmen der die Dissoziationskinetik betreffenden Faktoren und ist somit eine Grenzmethode, die aber oft Ergebnisse in Fällen liefert, in denen wenig Alternativen zur Verfügung stehen. Generell nutzt sie die Raten konkurrierender Dissoziationen masse-selektierter Clusterionen aus, so zerfällt bspw. das proton-gebundene Dimer  $[B_1 - H^+ - B_2]$  wie in Gl. 2.30 gezeigt.



Das Verhältnis der relativen Fragmentionenhäufigkeiten führt zu den gewünschten thermochemischen Informationen, wie im folgenden erläutert wird.

## 2.5. Cooks' kinetisches Verfahren zur Bestimmung thermochemischer Werte

Die unimolekulare Ratenkonstante  $k_i$  ist gegeben durch die Statistische Ratentheorie<sup>108,109</sup> zu

$$k_i = \frac{kT}{h} \frac{\prod_j Q_{ij}^*}{\prod_j Q_{ij}} \exp\left(\frac{-\epsilon^\circ_i}{RT}\right) \quad (2.31)$$

wobei  $\epsilon^\circ_i$  die Aktivierungsenergie pro mol bei absoluter Temperatur  $T$  darstellt,  $Q^*$  und  $Q$  spiegeln die Zustandssummen des aktivierten Komplexes bzw. der inaktiven Spezies wieder,  $k$  steht für die Boltzmannkonstante,  $h$  für die Planckkonstante und  $i$  und  $j$  bezeichnen die initialen und finalen Zustände. Der Quotient der Zustandssummen  $\frac{\prod_j Q_{ij}^*}{\prod_j Q_{ij}}$  lässt sich vereinfachen zum Verhältnis der Vibrationszustandssummen.<sup>109</sup>

$$k_i = \frac{kT}{h} \frac{\prod_j [1 - \exp(-h\nu_{ij}^*/kT)]^{-1}}{\prod_j [1 - \exp(-h\nu_{ij}/kT)]^{-1}} \exp\left(\frac{-\epsilon^\circ_i}{RT}\right) \quad (2.32)$$

Wie alle nichtlinearen Moleküle mit  $n$  Atomen besitzt das angeregte Molekül  $(3n - 6)$  Schwingungsmoden, der aktivierte Komplex wird mit  $(3n - 7)$  Moden behandelt. Dabei sind zwei Grenzfälle von Bedeutung: Erstens, falls  $kT \gg h\nu$  ist, bspw. bei hohen Temperaturen, kann  $[1 - \exp(-h\nu_{ij}/kT)]^{-1}$  durch  $\frac{kT}{h\nu}$  ersetzt werden, was zu

$$k_i = \frac{kT}{h} \frac{\prod_j \nu_{ij}}{\prod_j \nu_{ij}^*} \exp\left(\frac{-\epsilon^\circ_i}{RT}\right) \quad (2.33)$$

führt. Zweitens, im Falle von  $kT \ll h\nu$ , läuft die Schwingungszustandssumme gegen Eins und wird unabhängig von den Frequenzfaktoren.

$$k_i = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{-\epsilon^\circ_i}{RT}\right) \quad (2.34)$$

Zurückkehrend zum generellen Ansatz gilt für den Quotienten der Ratenkonstanten zweier konkurrierender Reaktionen

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\prod_j [1 - \exp(-h\nu_{1j}^*/kT)]^{-1}}{\prod_j [1 - \exp(-h\nu_{2j}^*/kT)]^{-1}} \exp\left(\frac{\epsilon^\circ_2 - \epsilon^\circ_1}{RT}\right) \quad (2.35)$$

Da sich die zwei jeweiligen Übergangszustände prinzipiell in ihren Schwingungsfrequenzen der verbleibenden Molekül-Proton-Bindung unterscheiden, so  $\nu^*[B_2 \cdots H^+]$  für Reaktion 1 und  $\nu^*[B_1 \cdots H^+]$  für Reaktion 2, folgt

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[1 - \exp(-h\nu^*[B_2 \cdots H^+]/kT)]^{-1}}{[1 - \exp(-h\nu^*[B_1 \cdots H^+]/kT)]^{-1}} \exp\left(\frac{\epsilon^\circ_2 - \epsilon^\circ_1}{RT}\right) \quad (2.36)$$

## 2. Experimentelle Grundlagen

Sobald sich die Frequenzfaktoren  $\nu^*[B_2 \cdots H^+]$  und  $\nu^*[B_1 \cdots H^+]$  gleichen, eine bei  $kT \ll h\nu$  begünstigte Situation, wird der Quotient der Reaktionsratenkonstanten direkt verbunden mit den Gasphasenaziditäten der Spezies  $B_1H$  und  $B_2H$ , d. h.

$$\frac{k_1}{k_2} = \exp\left(\frac{\epsilon^\circ_2 - \epsilon^\circ_1}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\Delta G^\circ_{acid}(B_2^+H) - \Delta G^\circ_{acid}(B_1^+H)}{RT}\right) \quad (2.37)$$

bzw.

$$\ln \frac{k_1}{k_2} = \frac{\Delta(\Delta G^\circ_{acid})}{RT} \quad (2.38)$$

wobei die Substitution  $(\epsilon^\circ_2 - \epsilon^\circ_1) = \Delta(\Delta G^\circ_{acid})$  direkt aus den Definitionen unter Voraussetzung vernachlässigbarer Rückreaktionsbarrieren erfolgt ist. So kann in Abwesenheit anderer Reaktionen das Verhältnis der Ratenkonstanten experimentell durch die Messung der entsprechenden Ionenhäufigkeiten bestimmt werden, es gilt

$$\ln \frac{k_1}{k_2} = \ln \frac{[B_1]}{[B_2]} = \frac{\Delta(\Delta G^\circ_{acid})}{RT} \quad (2.39)$$

bzw.

$$\ln \frac{k_1}{k_2} \approx \frac{\Delta H^\circ_{acid}}{RT} \quad (2.40)$$

Augenscheinlich sind die Annahmen, die diesem Ansatz zugrunde liegen, mit größerer Vorsicht zu behandeln. Die Herleitung beruht auf einer BOLTZMANN-Verteilung der internen Energien eines Moleküls, die nicht repräsentativ für isolierte Ionen ist, und die Frequenzfaktoren sind nicht immer von den kritischen (Aktivierungs-)Energien trennbar. Deswegen verwenden erfolgreiche Anwendungen i. d. R. schwach gebundene Clusterionen, die einer simplen Dissoziationskinetik folgen, und es wurde gezeigt, wie dies die Konsequenzen der Näherungen minimiert.<sup>14</sup> Trotz dieser Vorbehalte ist eine wachsende Zahl erfolgreicher Anwendungen der kinetischen Methode dokumentiert: Anhand von Auftragungen der Produktionshäufigkeitsverhältnisse proton-gebundener Dimere des Typs  $B_1 - H - B_2^-$  gegen bekannte Gasphasenaziditäten, wurde die bis dahin unbekannt Gasphasenazidität von Carbonsäuren und Alkoholen bestimmt.<sup>110</sup> Auf ähnliche Weise wurden die Basizitäten von Nuclein-<sup>111,112</sup> und Aminosäuren<sup>113</sup> abgeschätzt. Ebenso wurde die kinetische Methode bereits auf die Bestimmung von Metal-Ionen-<sup>114</sup> und Elektronenaffinitäten<sup>115</sup> sowie die Unterscheidung isomerer Glykoside<sup>116,117,118</sup> über ihre Alkaliionen-gebundenen Dimere und die Identifizierung der Ionisierungsenergien von Metal-Clustern<sup>119</sup> ausgedehnt.

# 3 Kapitel 3.

---

## Aufbau und Betrieb des FT-ICR-Massenspektrometers

Alle Experimente wurden mit einem FT-ICR Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen) durchgeführt, ausgerüstet mit einem Vakuumwagen und einem Kryomagneten der Stärke 9.4 T (11 cm Bohrung), wie es in Abb. 3.1 gezeigt und in Abb. 3.3 schematisch dargestellt ist. Es lässt sich in vier bedeutende Bereiche unterteilen: in die Ionenquelle, hier eine Combi-II-ESI/MALDI-Version (Abb. 3.2), die Quadrupoleinheit (Qh interface) zur Ionentrennung mit Stoßzelle, eine Ionentransferoptik und den Detektor, eine zylindrische Infinity<sup>TM</sup>-Zelle.

Im System halten zwei Vorpumpen und vier Turbomolekularpumpen sieben unterschiedliche Vakuumbereiche aufrecht, vom Atmosphärendruck der Quelle bishin zum Ultrahochvakuum (UHV)  $< 10^{-9}$  mbar, das nötig ist, um den Analysator zu betreiben. Die zu untersuchenden Ionen werden in der Spray-Kammer mit Hilfe von Zerstäuber- und Trockengas, in beiden Fällen Stickstoff, vom umgebenden Lösemittel getrennt und über eine Glaskapillare in das erste Vakuumsegment bei ca. 1 mbar geleitet. Dort treten sie über einen Skimmer in den Funnel ein und werden durch Hochfrequenz- und Gleichspannungen sowie einen weiteren Skimmer zu einem definierten Ionenstrahl fokussiert, der im ESI-Modus anschließend den mobilen Hexapol passiert. Alternativ können an dieser Stelle im MALDI-Modus die Ionen erzeugt werden. Sie werden abgebremst, bevor sie eine weitere Kühlung in der nächsten Vakuumstufe ( $10^{-4}$  mbar) des Quellenhexapols (storage hexapole) erfahren, in dem sie eine bestimmte Zeit lang akkumuliert werden können. Anschließend werden sie in den masseselektiven Quadrupol ( $10^{-6}$  mbar) eingespeist, der die Auswahl eines gewünschten Massenbereiches (1 bis 6000 Da) um einen

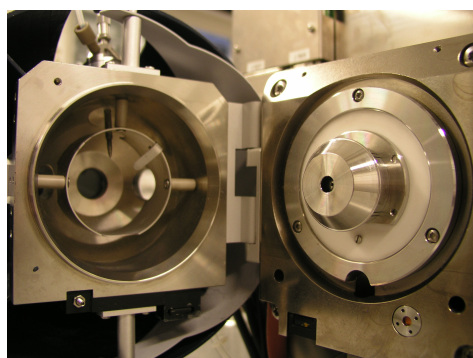
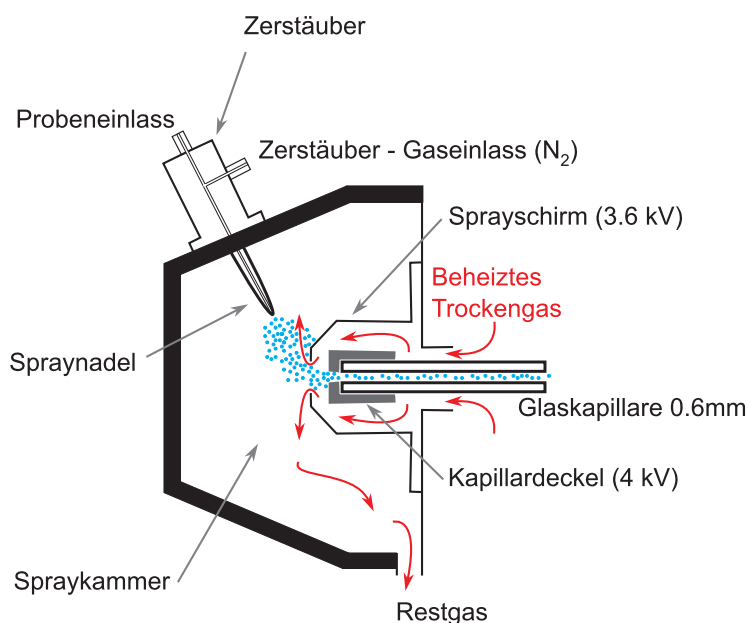
### 3. Aufbau und Betrieb des FT-ICR-Massenspektrometers



**Abbildung 3.1.** – Blick auf das genutzte FT-ICR Massenspektrometer APEX Qe von der Anwenderseite: Vor dem Magneten ist der Vakuumbwagen mit dem UHV-Einlasssystem, den Kontrollanzeigen und der Ionenquelle zu erkennen.

gegebenen  $m/z$ -Wert vor der Kollisionszelle erlaubt. Letztere ermöglicht unter erhöhtem Argon-Druck ( $10^{-2}$  mbar) bei Interesse die Speicherung und Fragmentierung der selektierten Ionen. Deren Fragmente werden dann aus der Zelle ausgestoßen und in der Iontentransferoptik zum Detektor hin bis auf 3 kV beschleunigt, um die inhomogenen Streufelder des Magneten zu überwinden. Auf diesem Weg wird der Ionenstrahl durch je zwei Sets von vertikalen und horizontalen Ablenkplatten gesteuert und für die spezielle Anordnung des Instrumentes korrigiert sowie nach Durchqueren des *Beam Valves*, das den UHV-Bereich abschirmt, in den Analysator fokussiert, eine 6 cm lange zylindrische Infinity-Zelle gleichen Durchmessers. In ihr werden die Ionen radial durch das starke magnetische Feld und axial durch Trapping-Elektroden auf jeder der Zellenseiten eingedämmt. Der Potentialgradient der Infinity-Zelle senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Ionen wandelt dabei zusätzlich Translationsenergie der Ionen in Cyclotronbewegung um und erhöht so die Falleneffektivität bei geringeren Trapping-Potentialen, was als *Caravatti-Methode*<sup>122</sup> bezeichnet wird. In der Zelle selbst können noch weitere Fragmentierungen erzwungen werden, so mittels IRMPD durch Einstrahlen eines  $\text{CO}_2$ -Lasers ( $\lambda = 10.6 \mu\text{m}$ ), ECD durch den Einfang von Elektronen oder (SORI-)CID unter Verwendung eines Pulsgases, das über das UHV-Inlet-System eingespeist wird. Der Strom, den



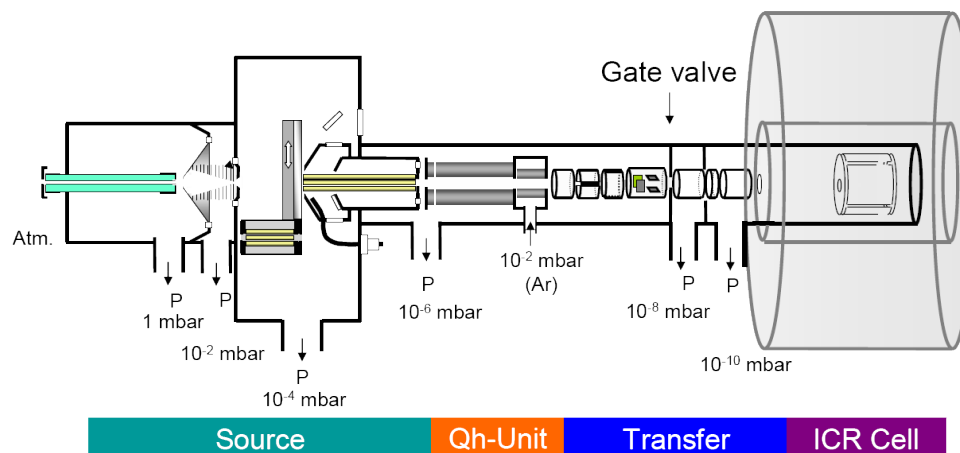


**Abbildung 3.2.** – Combi-II-ESI-Quelle: Oben ist der schematische Aufbau der Quelle im Profilschnitt, <sup>120</sup> unten ein Blick auf die geöffnete Spraykammer dargestellt (links die Nadel, rechts Sprayschirm und Kapillardeckel).

die nach Hochfrequenz-Anregung kohärent rotierenden Ionenensembles in den vorhandenen Detektorplatten induzieren, wird als Signal verstärkt, aufgezeichnet und über die Akquisitionskonsole an den Messrechner gesendet, der das gesamte System mittels der Software ApexControl 2.0 überwacht und steuert. Mit ihr wurden die Massenspektren aufgenommen und unter Verwendung des Herstellerkalibriersatzes (LHRH [*luteinizing hormone-releasing hormone*] oder Angiotensin) kalibriert, anschließend mit Bruker DataAnalysis 3.4 analysiert und mit Origin 7.5 graphisch dargestellt.

Die Analyten wurden in der Regel in einer Mischung aus Acetonitril, Methanol, Wasser (9:9:2 vol, 0.2 % Ameisensäure) gelöst und anschließend als positive Ionen nachgewiesen. Zur Präparation von negativen Ionen wurde eine 50:50-Mischung aus Methanol und Was-

### 3. Aufbau und Betrieb des FT-ICR-Massenspektrometers



**Abbildung 3.3.** – Schematischer Aufbau des FT-ICR Massenspektrometers APEX Qe.<sup>121</sup>

ser mit einem Ammoniumhydrogencarbonatanteil von 0.2 % als Lösemittel verwendet. In beiden Fällen wurde eine Analyt-Konzentration von 1 nmol  $\mu\text{L}^{-1}$  eingestellt. Mittels einer Spritzenpumpe sind im Mittel 120  $\mu\text{L h}^{-1}$  Probenlösung in das System injiziert und zur Messung der Massenspektren verwendet worden. Die Kapillarspannung betrug im positiven ESI-Modus 4500 V (ESI negativ 4000 V), die Heiztemperatur 240 °C. Die Isolierung erfolgte in der Zelle mit einer Anregungsenergie von 5 % (w.E.) (Apex Software 2.0, Bruker), die CID überwiegend bei Energien zwischen 0.6 und 0.8 % mit Argon 5.0 (Messer Griesheim) als Stoßgas. IRMPD Spektren wurden i. d. R. mit Energien zwischen 20 und 35 % und einer Pulslänge von 0.15 s aufgezeichnet.

# 4 Kapitel 4. Chemische Grundlagen: Steroide, Estrogene, Gestagene, Indole

---

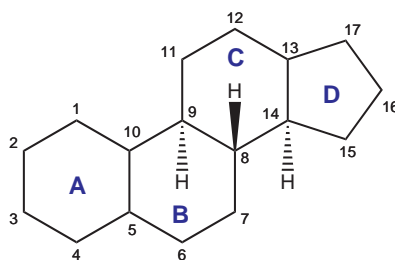
Im folgenden Abschnitt sollen die chemischen Klassen und Strukturen der untersuchten Substanzen dargestellt sowie auf die besondere biologische und pharmakologische Bedeutung der Estrogene, Gestagene und Indole eingegangen werden.

## 4.1. Steroide - Struktur und Vorkommen

Steroide<sup>123,10</sup> sind Substanzen, die auf dem Cholesterin-Ringsystem basieren und die sich in der Anzahl, Erscheinung und Position funktioneller Gruppen, der Anzahl und Lage von ungesättigten Bindungen, in der Zahl von Methylgruppen, ihrer Alkylkette und der Bindungskonfiguration unterscheiden lassen. Sie lassen sich wegen ihrer starren Molekülgeometrie relativ leicht kristallisieren und sind so auch zu ihrem Namen gekommen (gr. *steros* = fest). Mit anderen Molekülen können sie definierte Aggregate bilden oder führen zu oligomeren Einschlussverbindungen in Lösung, mit Proteinen bilden sie spezifische Komplexe, was besonders für ihre hormonelle Wirkung relevant ist. In Natur und Umwelt sind sie in pflanzlichen und tierischen Organismen häufig vertreten, beispielsweise als Gallensäuren, herzaktive Glykoside (*Digitalis*), Sapogenine, als Steroidalkaloide, Gifte, Vitamine der D-Reihe oder männliche bzw. weibliche Sexualhormone (Androgene und Estrogene).

#### 4. Chemische Grundlagen: Steroide, Estrogene, Gestagene, Indole

Die Struktur der Steroide kann auf das Steran bzw. Gonan (Abb. 4.1) zurückgeführt werden, ein hydriertes 1,2-Cyclopentanophenanthren-System, das in der Regel zusätzlich noch zwei anguläre Methylgruppen (C-18, C-19) an C-13 bzw. C-10 und eine Alkylkette an C-17 aufweist. Die spezielle Bezifferung des Ringsystems beruht auf der Notwendigkeit, vor dem Abschluss der Strukturaufklärung C-Atomen einer falschen Formel zugeordnete Zahlen mit möglichst wenigen Veränderungen auf die korrekte zu übertragen. (Lediglich die Ziffern 7 und 12 wurden gewechselt.) Die Ringe werden mit A, B, C und D gekennzeichnet; das nicht in der Natur vorkommende Gonan besitzt jeweils eine *trans*-Verknüpfung zwischen den Ringen B und C bzw. C und D, das entsprechende Steran beliebige Stereochemie. Natürliche Steroide sind zwischen A und B entweder *cis*- oder



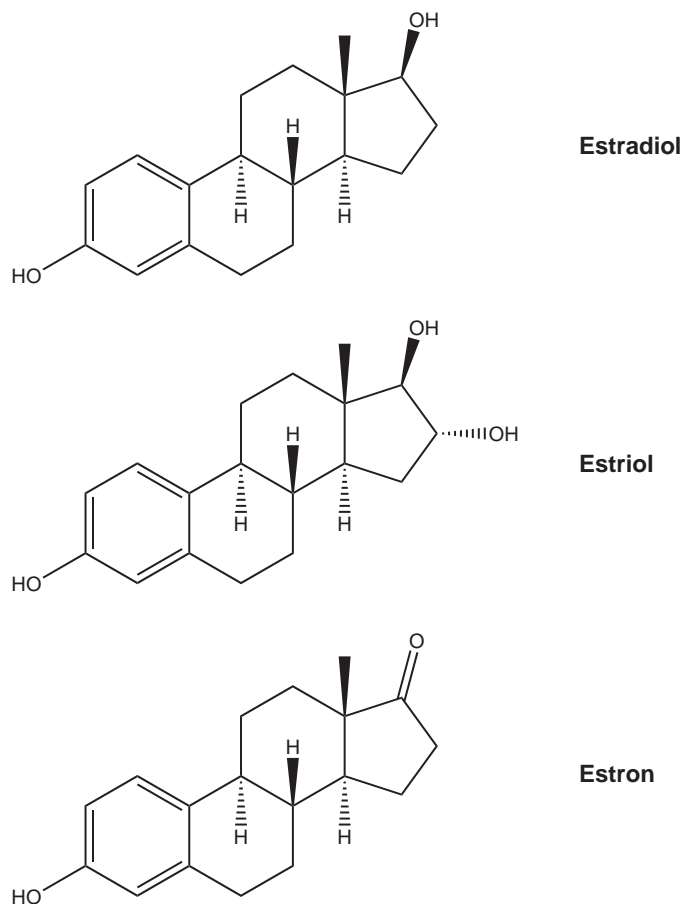
**Abbildung 4.1.** – Grundgerüst der Steroide: Beim Steran liegt beliebige Stereochemie vor, beim Gonan sind die Ringe B/C und C/D *trans*-konfiguriert.

*trans*-, zwischen B und C stets *trans*-verknüpft, während die *trans*-Verknüpfung zwischen den Ringen C und D die Regel zu sein scheint, von der jedoch auch Ausnahmen existieren. Als Bezug für die Benennung der Isomere dient hier die Stellung der Methylgruppe an C-13, die sich in natürlichen Steroiden genau wie der Alkylrest an C-17 prinzipiell im Halbraum oberhalb der Ringebene befindet. Substituenten oberhalb dieser Ebene werden zudem als  $\beta$ -ständig, unterhalb als  $\alpha$ -ständig charakterisiert.

## 4.2. Estrogene - weibliche Geschlechtshormone I

Estrogene,<sup>9,124,125</sup> früher bekannt als Östrogene (lat. *oestrus* = Raserei bzw. Brunft), sind neben den Gestagenen die wichtigsten weiblichen Sexualhormone. Sie werden vorrangig in den Ovarien und zum geringen Teil in der Nebennierenrinde produziert und zeichnen für die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane sowie z. T. für die Regulation des weiblichen Menstruationszyklus verantwortlich. Zudem stimulieren sie die Lipidsynthese und die Ausschüttung nicht-geschlechtsspezifischer Hormone. Im menschlichen Körper

sind die Estrogene Estradiol und Estron sowie als Stoffwechselprodukt mit geringerer Wirkung Estriol anzutreffen (Abb. 4.2). Wichtige Eigenschaften ihrer Struktur sind der aromatische Ring A, woraus die Nichtanwesenheit der Methylgruppe an C-10 folgt, sowie die phenolische Hydroxylgruppe an C-3.



**Abbildung 4.2.** – Die Estrogene 17 $\beta$ -Estradiol, Estriol und Estron.

Estradiol als wirksamster Vertreter der Stoffgruppe löst i. d. R. in der ersten Phase der Menstruation die Proliferation der Uterus-Schleimhaut aus, wird in der Schwangerschaft dagegen neben den Eierstöcken auch in der Plazenta gebildet und bewirkt später gemeinsam mit dem Peptidhormon Relaxin die Erweiterung des Geburtskanals. Medizinisch wird Estradiol zur Behandlung von Menstruations- und klimakterischen Beschwerden eingesetzt. Am bekanntesten ist die Verwendung eines nach Einführung einer Ethinylgruppe in 17 $\alpha$ -Position erhaltenen Derivates in Ovulationshemmern („Antibabypille“). Nach der Menopause wird Estradiol ebenso in der Brustkrebs- und Osteoporose-Therapie genutzt. Dabei scheint die Wirkung der Estrogene jedoch nicht allzu spezifisch

#### 4. Chemische Grundlagen: Steroide, Estrogene, Gestagene, Indole

zu sein, als Bedingung für eine estrogene Wirkung genügt in der Regel das Vorhandensein zweier OH-Gruppen in einem bestimmten Abstand zueinander im Wirkstoff, sodass z. T. auch nicht-steroidale Verbindungen in der Hormonbehandlung eingesetzt werden. Estrogene haben zusätzlich Einfluss auf die Kurz- und Langzeitaktivität des Gehirns, klinische Untersuchungen weisen auf eine Korrelation zwischen erhöhter Hirnleistung und dem Estrogen-Blutspiegel hin. Ein Problem bleibt allerdings die ungewollte estrogenähnliche, anti-androgene Wirkung von zahlreichen Naturstoffen und endokrinen Disruptoren<sup>126,127</sup> wie Phenolen, Pestiziden, Fungiziden oder Herbiziden, die in die Umwelt und Nahrungskette gelangen und so zu Schädigungen der menschlichen Gesundheit oder Veränderungen des tierischen Reproduktionsverhaltens führen können.

### 4.3. Gestagene - weibliche Geschlechtshormone II

Gestagene<sup>9,125</sup> sind die zweite Gruppe der weiblichen Geschlechtshormone, die während der Schwangerschaft gebildet werden und einen weiteren Eisprung verhindern. Progesteron und Pregnenolon (Abb. 4.3) wirken als die Gestagene, die die Uterusschleimhaut für die Aufnahme eines befruchteten Eies vorbereiten und deren Abstoßung verhindern.

Progesteron als wichtigstes Schwangerschaftshormon wird nach der Ovulation vom *Corpus luteum*, dem Gelbkörper – ein Carotin-beeinhaltendes Gewebe, das sich nach dem Eisprung bildet und bis zu seiner Rückbildung zwei Wochen später arbeitet –, abgesondert, weshalb es auch als Gelbkörperhormon bezeichnet wird. Progesteron wird klinisch zur Verhütung einer Fehlgeburt und zur Regulation von Zyklusstörungen eingesetzt. Ebenso wie die Estrogene kann es chemisch modifiziert Bestandteil von Ovulationshemmern sein und findet Anwendung in der tierischen Reproduktion (zur Zyklussynchronisation in der Tierhaltung oder zur Auslösung der Brunst).

Pregnenolon bildet sich biosynthetisch aus Cholesterin<sup>123</sup> und bildet eine Vorstufe des Progesterons und der Androgene. Über das 17-Hydroxypregnenolon wird aus ihm ebenso das am häufigsten im Menschen vorkommende Steroidhormon Dehydroepiandrosteron (Abb. 4.4) gebildet. Progesteron kann durch zweifache Hydroxylierung zum Corticosteron umgeformt oder hepatisch zum Pregnandiol abgebaut werden, das als Glucuronid im weiblichen Urin quantifiziert wird, um Rückschlüsse auf eine drohende Fehlgeburt zu ziehen.

4.3. Gestagene - weibliche Geschlechtshormone II

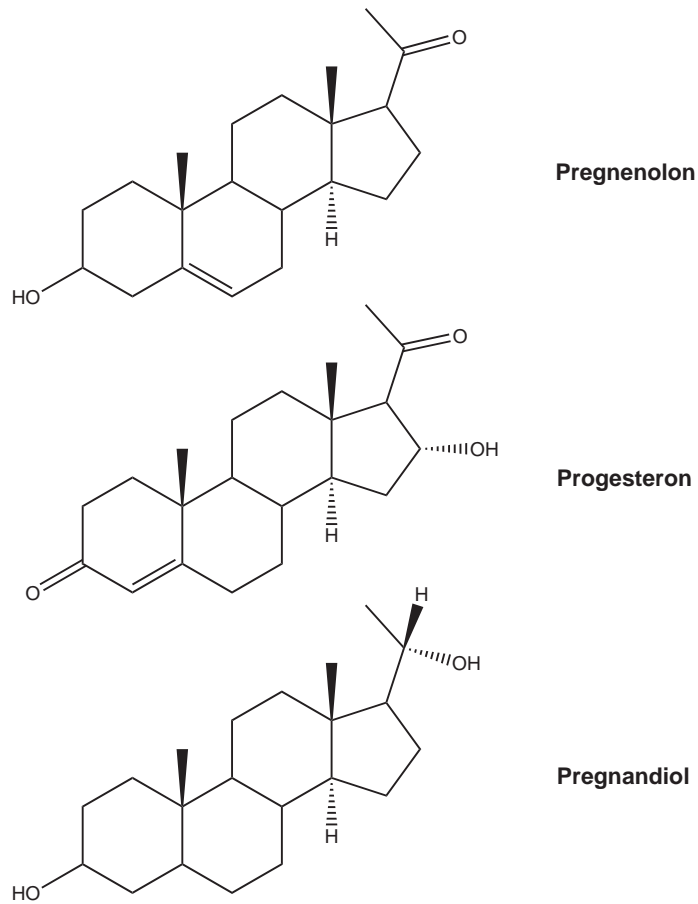


Abbildung 4.3. – Die Gestagene Pregnenolon, Progesteron und Pregnandiol.

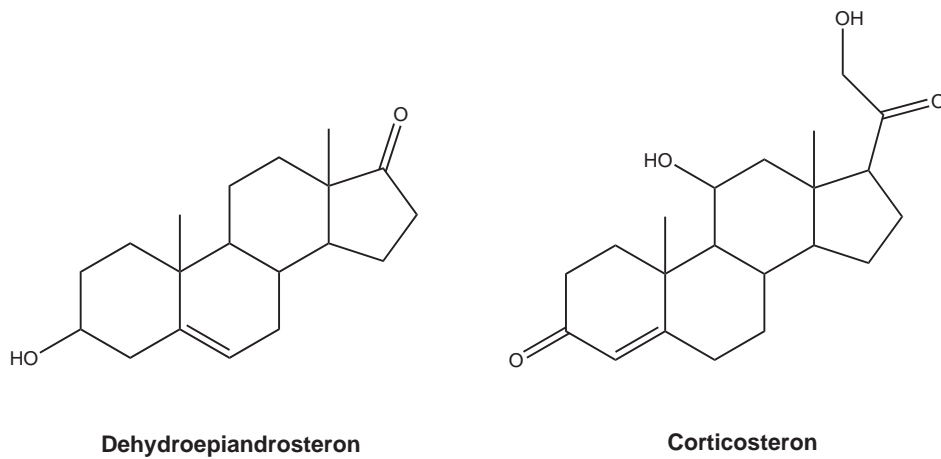


Abbildung 4.4. – Dehydroepiandrosteron und Corticosteron.

## 4.4. Pharmakologische und anabole Wirkung der Steroide

Evidente biologische und pharmakologische Bedeutung haben nicht nur die weiblichen Steroidhormone, sondern ebenso die männlichen, besonders aktuell in Zeiten des immer stärker kommerzialisierten Leistungs- und Freizeitsportes. Testosteronderivate werden als anabole Steroide immer wieder zur Leistungssteigerung eingenommen, aufgrund ihres positiven Einflusses auf die Proteinsynthese der Zellen und das vermehrte Zellwachstum von Muskelzellen. Sie begünstigen das Knochenwachstum und ihre Heilung, stimulieren das Knochenmark zur erhöhten Bildung von roten Blutkörperchen und minimieren die Lipideinlagerung in Muskelfasern, obwohl sie den Appetit steigern. Nachteilig sind allerdings dosisabhängige Effekte, wie die in der Regel mit der Einnahme verbundene Veränderung des Cholesterinspiegels und eine Erhöhung des Blutdrucks, sowie ein verstärktes Auftreten von kardio-vaskulären Leiden, u. a. einer krankhaften Vergrößerung des Herzens, Arrhythmien oder des plötzlichen Herztodes.

Interessant scheinen die geschlechtsspezifischen Wirkungen der steroiden Anabolika zu sein. Allgemein bekannt ist deren androgene Wirkung bei weiblichen Sportlern, von verstärktem Haarwuchs bishin zur Vertiefung der Stimmlage. Jedoch können sie auf Männer auch indirekte estrogenere Auswirkungen wie die Gynäkomastie, eine Brustgewebsbildung, haben, die normalerweise durch überhöhte Estrogenwerte im Blut hervorgerufen wird. Eine Erklärung hierfür kann die durch strukturelle Gemeinsamkeiten bedingte (vgl. Abb. 4.5 und Abb. 4.2) relativ einfache Umwandlung von Testosteron in Estrogen durch das Enzym Aromatase sein.<sup>128</sup>

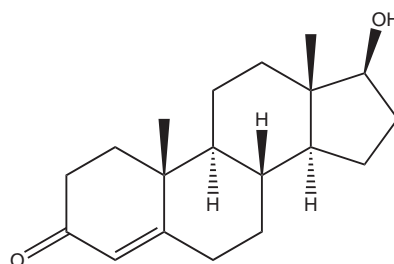


Abbildung 4.5. – Das Androgen Testosteron.

Hieraus lässt sich u. U. auf einen möglichen Nachweis für die Einnahme von androgenen Steroiden über den Estrogengehalt im menschlichen Körper schließen. Denn



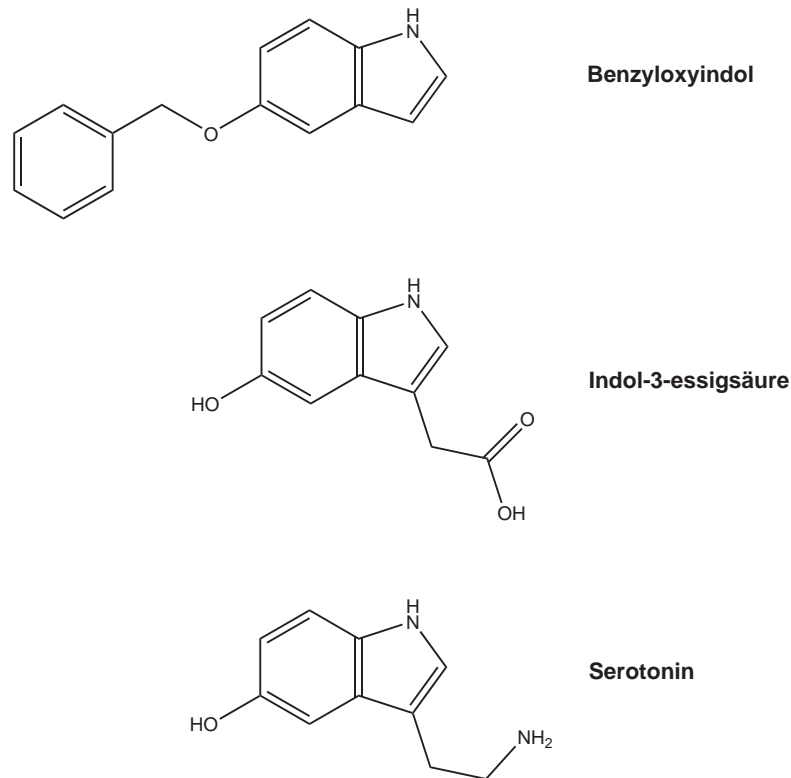
schon in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden Steroide zur Leistungsoptimierung in Disziplinen verwendet, die Kraft, Schnelligkeit und Muskelmasse verlangten. Sie verbreiteten sich so schnell, dass sie 1974 durch die medizinische Kommission des Internationalen Olympischen Komitees auf die Dopingliste gesetzt wurden. Bei den Spielen von Montreal 1976 gehörten 11 von 12 gefundenen verbotenen Substanzen ihrer Kategorie an. Da damals exogen zugeführtes Testosteron noch nicht von endogenem differenziert werden konnte, wurde in der Folge vermehrt reines Testosteron eingesetzt anstatt seiner Abkömmlinge, um die verbesserten Nachweismethoden zu unterlaufen. Später gelang durch die Einführung des Quotienten Testosteron / Epitestosteron auch der Nachweis des reinen Testosterondopings. Untersuchungen hatten ergeben,<sup>129</sup> dass im Normalfall das Verhältnis von endogenem Testosteron zu seinem (zeitgleich endogen produzierten) Epimeren Epitestosteron Werte von 0.8 bis 1.5 annimmt, während exogen zugeführtes Testosteron diese Relation deutlich erhöht. Als Alternative hierzu kann in Zukunft ggf. die Untersuchung der Estrogenwerte herangezogen werden.

## 4.5. Indole

Die Synthese und Reaktivität verschiedener Indolderivate<sup>125,130,131</sup> beschäftigt die Forschung seit mehr als einem Jahrhundert. Während die von Baeyer<sup>132</sup> publizierte Darstellung des Indols 1866 als die erste gilt, ist die *Fischer'sche Indolsynthese*<sup>133</sup> aus dem Jahre 1883 die bis heute vielseitigste Methode hierfür. Auf Baeyer lässt sich jedoch die Bezeichnung „Ind-ol“ als eine Vermengung der Worte Indigo und Oleum zurückführen, da die Substanz durch Behandlung des natürlichen Färbungsindigos mit Schwefelsäure / schwefeliger Anhydridmischung gewonnen wurde.

Obwohl Indol im Jasminblüten- und Goldlacköl, aber auch in den Blüten der falschen Akazie und im Aronstab enthalten ist, wird es kommerziell hauptsächlich aus Kohlentee gewonnen. Es besteht auch die Möglichkeit der industriellen Synthese aus Ausgangsmaterialien wie Anilin und Ethylenglykol,<sup>134</sup> *N*-Ethylanilin<sup>135</sup> oder 2-Ethylanilin.<sup>136</sup> Tausende einzelner Indolderivate werden jährlich in der chemischen Literatur veröffentlicht. Der Hauptgrund für dieses nachhaltige Interesse ist die große Weite ihrer biologischen Aktivität.<sup>137</sup> Der Indolring ist Bestandteil der Aminosäure Tryptophan; deren Metabolite sind u. a. sowohl in der pflanzlichen als auch tierischen Biochemie von essentieller Bedeutung. Indol-3-essigsäure wirkt als pflanzliches Wachstumshormon<sup>138</sup> und Serotonin (3-(2-Aminoethyl)-5-hydroxyindol) ist einer der Schlüssel-Neurotransmitter<sup>139</sup> in Lebe-

#### 4. Chemische Grundlagen: Steroide, Estrogene, Gestagene, Indole



**Abbildung 4.6.** – Indole mit biologischer Aktivität: Benzylloxyindol, Indol-3-essigsäure und Serotonin.

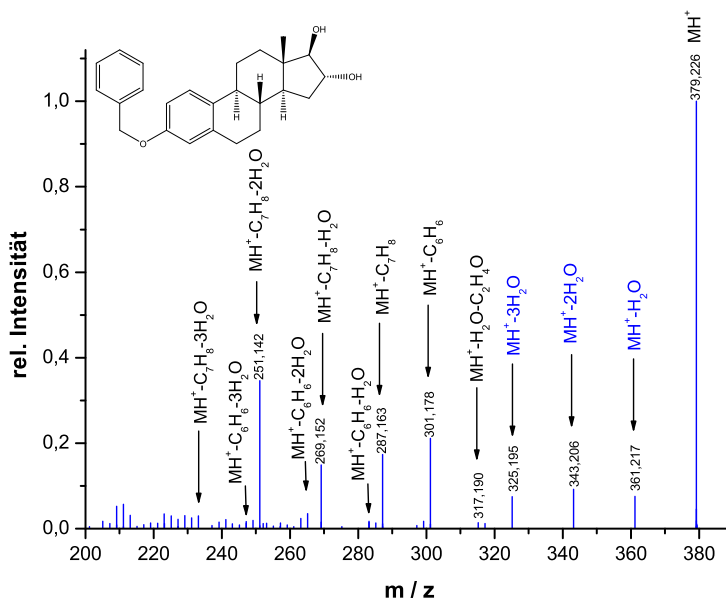
wesen. Die Suche nach spezifischen A- und Antagonisten der Indol-Rezeptoren wurde von der pharmazeutischen Chemie lange Zeit angestrebt. Ebenso viele Naturstoffe wie Alkaloide,<sup>140</sup> Pilzmetabolite<sup>141</sup> oder Biomoleküle mariner Organismen<sup>142</sup> sind durch Indolsubstrukturen gekennzeichnet. Zu den Indolen mit pharmazeutischer bzw. klinischer Wirkung gehören beispielsweise Indomethacin,<sup>143</sup> eines der ersten nicht-steroidischen entzündungshemmenden Mittel, und Sumatriptan,<sup>144</sup> das zur Behandlung von Migräne genutzt wird.

# 5 Kapitel 5.

## Ergebnisse

### Generelles Verfahren

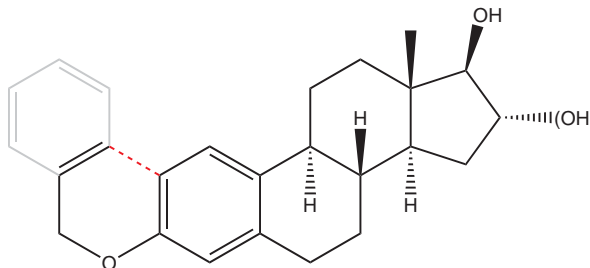
Im Zuge der Geräteinstallation des FT-ICR-MS Apex Qe in Kiel sind im Oktober 2006 verschiedene Spektren aufgenommen worden, darunter ein On-resonance-CID-Spektrum (Abb. 5.1) des 3-Benzylethers von Estriol (3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Trihydroxy-1,3,5(10)-estratrien).



**Abbildung 5.1.** – On-resonance-CID-Spektrum von Estriolbenzylether: Erkennbar sind die drei Wasserabspaltungen bei  $m/z$  361.217, 343.206 und 325.195 sowie die Abspaltung von C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> bzw. C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> bei 301.178 und 287.163 Da.

## 5. Ergebnisse

Dieses zeigt ausgehend vom  $MH^+$ -Peak bei  $m/z$  379.226 mehrere Wasserabspaltungen bei 361.217 ( $MH^+ - H_2O$ ), 343.206 ( $MH^+ - 2H_2O$ ) und 325.195 Da ( $MH^+ - 3H_2O$ ) sowie weitere Fragmentierungen im niedrigeren Massenbereich. Zumindest die dritte  $H_2O$ -Abspaltung unter weiterem Masseerhalt erschien recht ungewöhnlich und war zuvor nicht vermutet worden, da die phenolische Hydroxylgruppe im Ether benzylich geschützt ist. Ebenso sind die  $C_7H_8$ - bzw.  $C_6H_6$ -Abspaltungen von Interesse (Signale bei  $m/z$  287.163 bzw. 301.178) gewesen, da sie sich radikal von den allseits bekannten Phenyl- und Tropyliumionen-Fragmenten durch ein zusätzliches Wasserstoffatom unterscheiden.

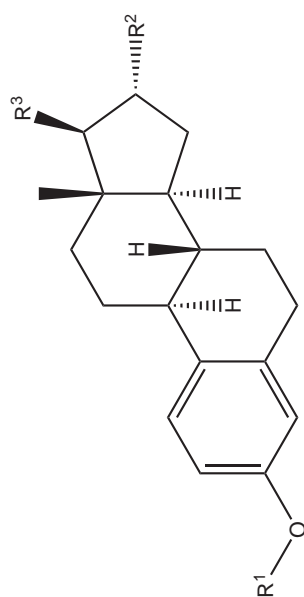


**Abbildung 5.2.** – Sechsringstabilisierung zwischen Etherrest und Steroidgrundgerüst.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden, auf welchen strukturellen Gegebenheiten die besagten Fragmentierungen bzw. die Wassereliminierung basieren und wie ggf. auftretende Umlagerungen im Molekül aussehen, vorausgesetzt, die Benzylgruppe verbleibt am Molekül. Die vorangegangene Diplomarbeit<sup>145</sup> deutete dabei schon auf einige Erkenntnisse, wie den Ablauf einer Claisen-Umlagerung<sup>146</sup> hin. Um zu ermitteln, welche Strukturelemente wie im Molekül wandern, sind folgende zwei Ansätze denkbar gewesen. Zunächst konnten isotopenmarkierte Ether analysiert werden, was später bei den Benzylethern mittels Deuterierung geschehen ist. Zum anderen konnten ausgehend von möglichen Umgruppierungen über einen von Steroidgrundgerüst und Benzylrest gebildeten stabilisierten Sechsring (vgl. Abb. 5.2) Modellsubstanzen mit unterschiedlich langem Alkylrest und Struktureigenschaften synthetisiert und untersucht werden.

Auf letztgenannte Methode wurde zunächst das Augenmerk gerichtet, auf die Isotopenmarkierungen wurde später zurückgegriffen. Es wurden als Modellsubstanzen der Estriolphenethylether (**1b**), der einen Siebenring bilden kann, das Benzoat (**2b**) und die Benzyl- (**3b**) und -propylether (**6b**) (Sechsring), die Estriolethyl- (**7b**) (Fünfring) und -methylether (**8b**) (Vierring), aber auch der Allylether (**5b**), der einen Sechsring mit Doppelbindung bildet und dadurch dem Benzylether verwandter ist als das Propylderivat dargestellt (s. Kapitel 7), mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert und anschlie-

**Tabelle 5.1.** – Untersuchte Estrogene und ihre MH<sup>+</sup>-Massen.



	<b>Substanz</b>		<b>MH<sup>+</sup> / m/z</b>
R <sup>1</sup> =C <sub>8</sub> H <sub>9</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(1a) 377.25
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(2a) 377.21
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(3a) 363.23
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OD	(4a) 364.24
R <sup>1</sup> =C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(5a) 313.22
R <sup>1</sup> =C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(6a) 315.23
R <sup>1</sup> =C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(7a) 301.22
R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub>	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(8a) 287.20
R <sup>1</sup> =H	R <sup>2</sup> =H	R <sup>3</sup> =OH	(9a) 273.18
R <sup>1</sup> =C <sub>8</sub> H <sub>9</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(1b) 393.25
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(2b) 393.21
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(3b) 379.23
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =OD	R <sup>3</sup> =OD	(4b) 381.24
R <sup>1</sup> =C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OD	(4c) 380.23
R <sup>1</sup> =C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(5b) 329.21
R <sup>1</sup> =C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(6b) 331.23
R <sup>1</sup> =C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(7b) 317.21
R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub>	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(8b) 303.20
R <sup>1</sup> =H	R <sup>2</sup> =OH	R <sup>3</sup> =OH	(9b) 289.18

## 5. Ergebnisse

ßend im FT-MS vermessen. Die entsprechenden Phenylether waren synthetisch nicht zugänglich. Ebenso wurden zur Kontrolle die äquivalenten Ether des Estradiols (3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien) (**1a** - **9a**) generiert (bzw. in einem Fall erworben) und identifiziert.

Die hieraus erhaltenen Erkenntnisse wurden mit denen verschiedener Pregnanderivate [Pregnanolol (**11**), Pregnenolon (**12**), 17-Hydroxy-Pregnenolon (**13**), Corticosteron (**15**)], der Estrogenvorstufe Dehydroepiandrosteron (**14**) sowie unterschiedlicher Benzyloxy-Indole [5-Benzyloxy-indol (**16**), 5-Benzyloxy-6-methoxy-indol (**17**), 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (**18**), 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (**19**)] verglichen. Um Aussagen über entsprechende Protonenaffinitäten der an den Umlagerungen beteiligten funktionellen Gruppen treffen zu können, wurden sie mit Hilfe von *Cooks' kinetischer Methode*<sup>14</sup> durch Dimerisierung mit unterschiedlichen Chinolinderivaten eingegrenzt, um abzuschätzen, wo die Moleküle zunächst protoniert werden (s. Abb. 5.87).

Alle verwendeten Substanzen sind mit den Massen ihrer protonierten Molekülonen in den Tab. 5.1 und 5.2 zusammengefasst.

**Tabelle 5.2.** – Untersuchte Gestagene / Indole und ihre MH<sup>+</sup>-Massen.

Substanz		MH <sup>+</sup> / <i>m/z</i>
Pregnanolol	( <b>11</b> )	321.29
Pregnenolon	( <b>12</b> )	317.25
17-Hydroxypregnenolon	( <b>13</b> )	333.24
Dehydroepiandrosteron	( <b>14</b> )	289.22
Corticosteron	( <b>15</b> )	347.22
5-Benzyloxyindol	( <b>16</b> )	224.11
5-Benzyloxy-6-methoxyindol	( <b>17</b> )	254.12
6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol	( <b>18</b> )	298.11
5-Benzyloxy-3-essigsäure	( <b>19</b> )	282.12

### Vorbereitende Überlegungen

Eine generelle Beschränkung für den Vergleich struktureller Informationen von durch Elektro-Spray-Ionisation gebildeten Biomolekülonen sind die oft unterschiedlichen Quellenbedingungen (wie z. B. die Solvenszusammensetzung, Kapillartemperatur, Potentiale, Druck oder Druckstufendifferenzen). Quellenparameter, die die Ionenbildung steuern,

beeinflussen ebenso die Konformation der Gasphasenionen. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Ionen ein gewisses Mass an „Erinnerung“ in der Gasphase<sup>147,148,149,150,151</sup> bewahren, so ist u. a. bekannt, dass pH,<sup>63</sup> die Solvenszusammensetzung<sup>62</sup> und Temperatur<sup>152,153,154</sup> sich auf die Verteilung der Ladungszustände der ESI-Ionen auswirken, weshalb im folgenden entsprechende Kenndaten für die Untersuchung der oben genannten Biomoleküle erörtert werden sollen.

## 5.1. Einfluss der Probenparameter

### 5.1.1. Lösemittel

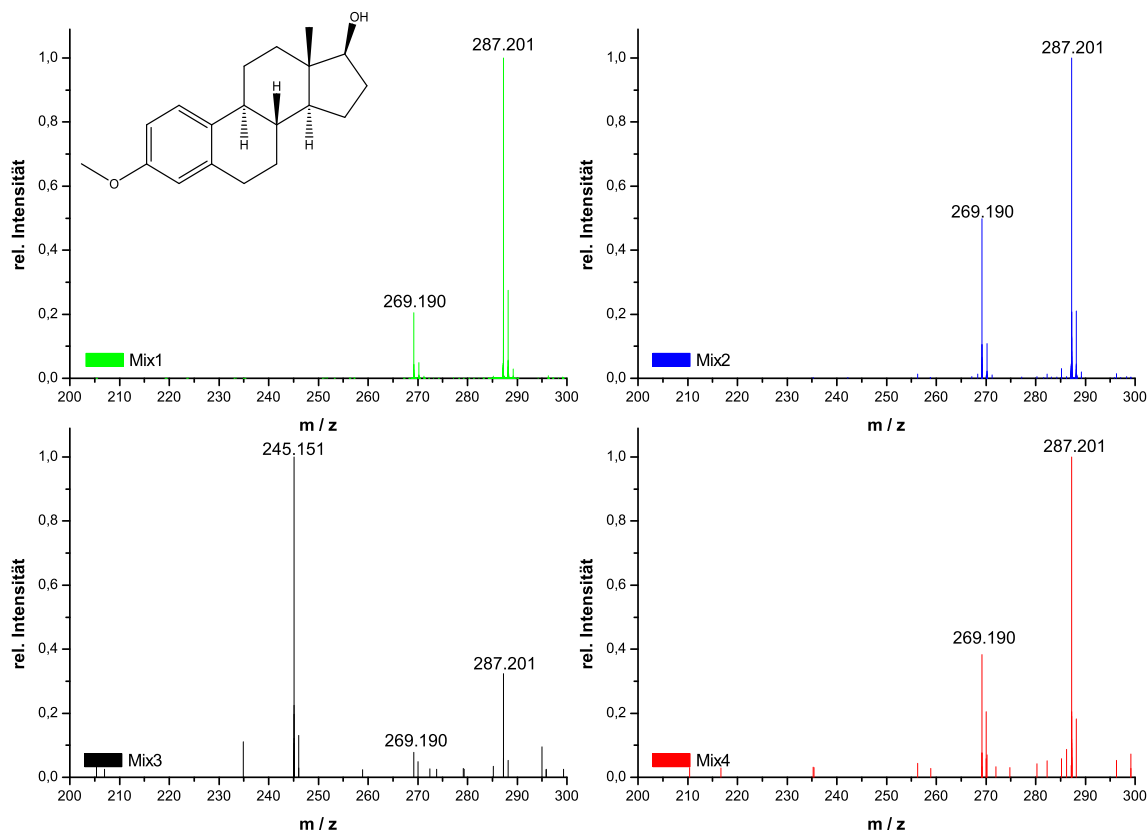
Vor Durchführung einer Untersuchung von Fragmentierungsmechanismen ist es notwendig, ein reproduzierbares Messprotokoll zu entwickeln. Deshalb wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene mehr oder weniger protische Lösungsmittelgemische, bestehend aus Wasser, Methanol, Acetonitril, Ameisensäure, Ethanol, Chloroform oder Dichlormethan, für die Nutzung der Elektro-Spray-Ionisation getestet, zunächst die Mischungen Mix 1-4, deren Zusammensetzung in Tabelle 5.3 dargestellt ist.

**Tabelle 5.3.** – Verschiedene Lösemittelgemische für die ESI und ihre prozentuale Zusammensetzung.

%	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	HCOOH	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	EtOH
Mix 1	33.27	33.27	33.27	0.20	-	-	-
Mix 2	-	49.90	49.90	0.20	-	-	-
Mix 3	-	-	-	-	66.67	-	33.30
Mix 4	-	-	50.00	-	-	50.00	-
Mix 5	9.80	45.00	45.00	0.20	-	-	-

Die Notwendigkeit dieses Messprotokolls ergibt sich aus Abb. 5.3, dort sind abhängig von der Polarität des Lösungsmittels unterschiedliche relative Ionenhäufigkeiten der Fragmente gezeigt. Die Zugabe von Säure scheint für den ESI-Prozess essentiell, ebenso wie das ausreichende Vorhandensein von protischen Lösemitteln, da die Intensitäten der Gemische 1 und 2 die der Mischungen 3 und 4 um den Faktor 100 bzw. 10 in Bezug auf die absolute Ionenausbeute übertreffen, bei ansonsten konstanten Messparametern. Zudem hat die Lösemittelpolarität einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.3.** – Signalintensitäten in Abhängigkeit vom ESI-Lösemittelgemisch: Estradiolmethylether in M 1 (MeOH, H<sub>2</sub>O, AcCN, HCOOH; grün), M 2 (MeOH, AcCN, HCOOH; blau), M 3 (CHCl<sub>3</sub>, EtOH; schwarz) und M 4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcCN; rot).

sowohl der protonierten Molekülonen als auch der verschiedenen Fragmente. Werden Lösemittelgemische erhöhter Polarität verwendet und sind protische Substanzen anwesend, wird das protonierte Estradiolmethyletherion bei 287.201 Da mit hoher Intensität beobachtet, während das Fragment der Masse 269.190 Da (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) mit unterschiedlicher Häufigkeit auftritt. Dieses Verhalten ändert sich, sofern Lösungsmittel niedrigerer Polarität genutzt werden. Die Anwendung einer Mischung aus Chloroform und Ethanol (Mix 3) führt zum Erscheinen eines bis dahin im ESI-Spektrum noch nicht beobachteten Signals bei 245.079 Da (wahrscheinlich der Abspaltung von Propen). Eine weitere Polaritätserhöhung durch die Nutzung von Dichlormethan und Acetonitril (Mix 4) stellt das ursprüngliche Massenspektrum wieder her. Jedoch kann dieses Verhalten durch die Bedingungen am Quellenskimmer (relativ einfach) gedeutet werden. Im Falle von Solventen niedrigerer Polarität und wenig protischen Beimengungen verbunden mit einer ge-



ringeren Wärmeleitfähigkeit des Chloroforms<sup>155</sup> treten lokal höhere Potenziale und Temperaturen auf, die Sekundärionisierung durch freie Elektronen und weitere Fragmente und weniger intensive Molekülionen zur Folge haben können. Zusätzlich kann auch über die unterschiedlichen Verdampfungsenthalpien der Lösemittel<sup>156</sup> ( $\text{H}_2\text{O} = 40.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\text{MeOH} = 37.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN} = 33.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\text{EtOH} = 42.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3 = 29.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 28.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) argumentiert werden. Im Falle der aprotischen Solventien sind sie deutlich abgesenkt. So können im Falle einer kühlenden Verdampfung u. U. nur geringe Energiemengen lokal abgeführt werden.

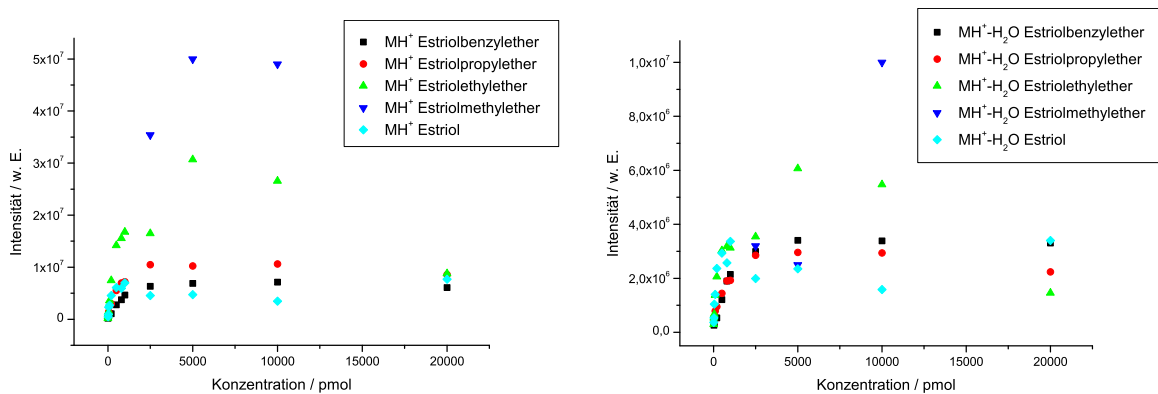
Neben der Polarität des Solvens und der Menge des protischen Anteils muss auch die Löslichkeit des Analyten betrachtet werden. Bei großen Mengen protischer Bestandteile in der lösenden Mischung zeigen die meisten Steroidether eine geringe Löslichkeit, so löste sich schon der Diolmethylether (**8a**) recht schlecht im wässrigen Mix 1, das Estriol (**9b**) selbst dagegen nicht gut in der aprotischen Mischung 4. Dies führte zur Entwicklung des später im positiven ESI-Modus zumeist verwendeten Mix 5 mit einem gesenkten Wasseranteil, das aus je 45 % Methanol und Acetonitril sowie 9.8 % Wasser und 0.2 % Ameisensäure bestand. Im negativen Betrieb führte eine 1:1-Mischung von Methanol und Wasser mit einem 0.2 %igen Anteil Ammoniumhydrogencarbonat zu guten Ergebnissen.

### 5.1.2. Konzentration

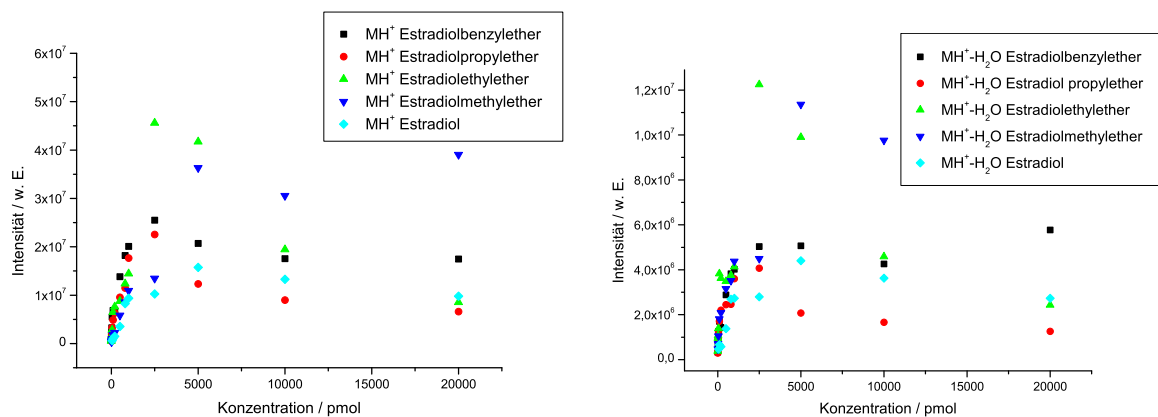
Zweitens ist die Frage zu beantworten, wie die Signalintensität von der Konzentration der Modellsubstanzen abhängt, dazu wurden mit dem Lösemittelgemisch fünf Konzentrationsreihen der Estradiol- und Estriolether mit jeweils dreizehn Werten im Bereich von  $5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$  bis  $20 \text{ nmol } \mu\text{L}^{-1}$  erstellt und vermessen. Es liegt auf der Hand, dass die Konzentration keinen Einfluss auf die Stabilität und das Fragmentierungsverhalten der Probe haben sollte.

Die Intensitäten der betrachteten  $\text{MH}^+$ - und  $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ -Signale der Estriol- und Estradiolderivate sind in den Abb. 5.4 und 5.5 gegen die Steroidkonzentration graphisch aufgetragen. Die Kurven vergleichend, zeigt sich ein gleiches Verhalten für alle Substanzen unterhalb einer Konzentration von  $800 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ . In diesem Bereich ist bei allen untersuchten Proben eine lineare Zunahme der Signalintensität mit der Änderung der Konzentration zu erkennen. Oberhalb dieser Konzentration ist die Signalintensität nicht vorhersagbar, geht aber ab  $2500 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1} = 2.5 \text{ nmol } \mu\text{L}^{-1}$  in Sättigung über. Estriol- und Estradiolether verhalten sich einheitlich. Gleiches wird auch für die Fragmentionen beobachtet, die Intensitäten der  $[\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}]^-$  sind dabei jedoch stets geringer als die

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.4.** – Konzentrationsabhängige Intensitäten der  $\text{MH}^+$ - und  $\text{MH}^+\text{-H}_2\text{O}$ -Signale der Estriolderivate.



**Abbildung 5.5.** – Konzentrationsabhängige Intensitäten der  $\text{MH}^+$ - und  $\text{MH}^+\text{-H}_2\text{O}$ -Signale der Estradiolderivate.

der  $[\text{MH}]^+$ -Signale. Angemerkt werden soll die größere Streuung der Daten verschiedener Substanzen bei hohen Konzentrationen und ein leichter Abfall der Signalstärke, der ggf. auf konzentrationsabhängige Ablagerungen im heißen Sprayer und einen geringeren Durchfluss an Probenlösung zurückzuführen ist. Um eine optimale und zuverlässige Basis für die Messung unterschiedlicher Substanzen und ihren Vergleich zu erhalten, wurden die nachfolgenden Massenspektren in der Regel mit einer Konzentration von  $1 \text{ nmol } \mu\text{L}^{-1}$  gemessen, auch um zu garantieren, dass die beobachteten Reaktionen von den zugrunde liegenden ionischen Fragmentierungsmechanismen und nicht von anderen Effekten ausgelöst werden.

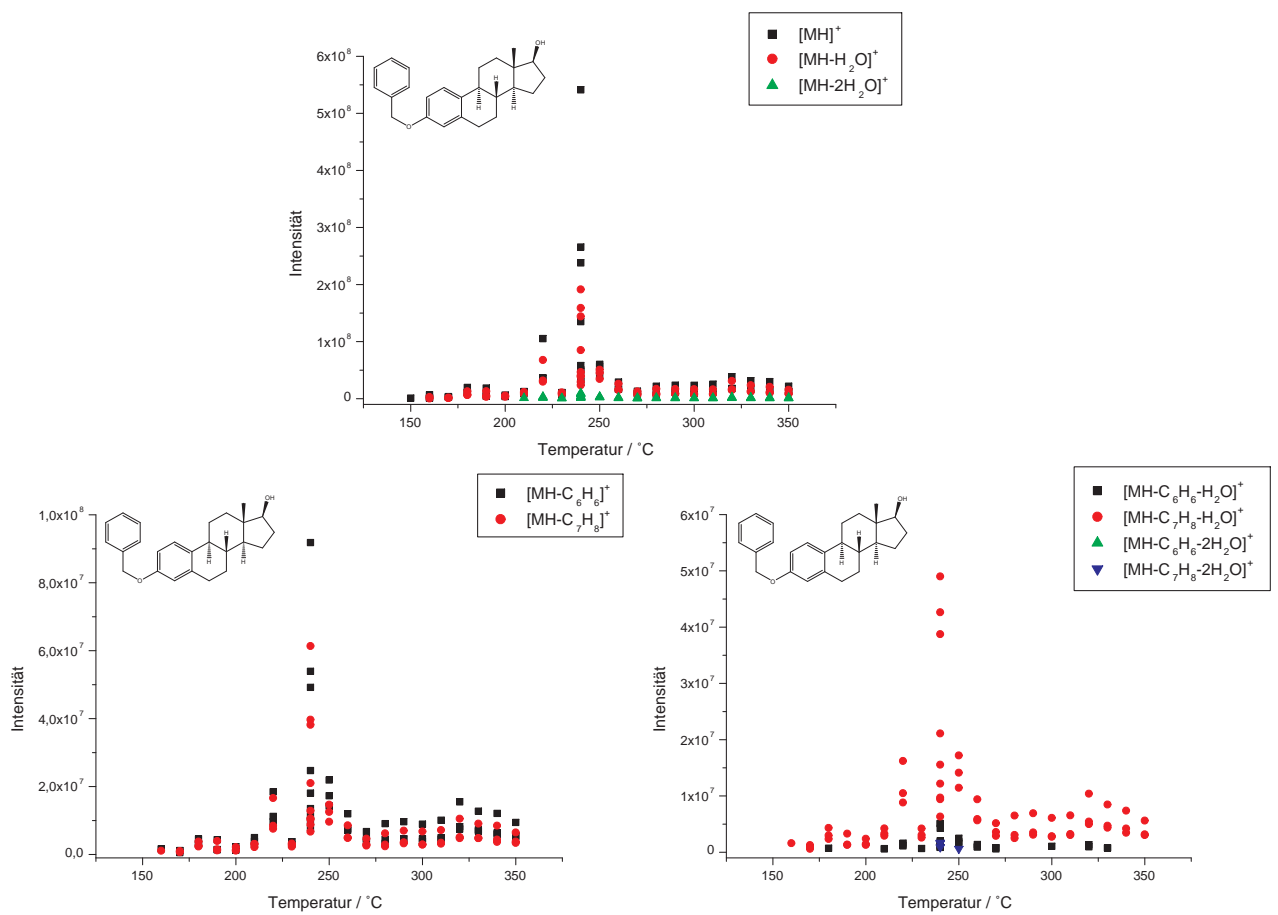
## 5.2. Einfluss der Geräteparameter

Im nächsten Abschnitt wird der Einfluss unterschiedlicher Geräteparameter auf den Ionenbildungsprozess, die Ionenausbeute und -häufigkeit diskutiert, angefangen von der Quelltemperatur, über den Druck in Quelle und Stoßzelle bishin zu Zellenmerkmalen wie Anregungspulsenergie oder -zeit bei der On-resonance-CID. Ebenso die Wirkung von IR-Pulsenergie und -zeit der IRMPD soll diskutiert werden. Vermessen wurden dazu die Benzylether (**3**) des Estradiols und Estriols (vgl. Abb. 5.25 und 5.1).

### 5.2.1. Quelltemperatur

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Ionenhäufigkeit von der Temperatur des Trockengases und der Quelle mittels Messung der Estrogenbenzylether (**3**) in einem Bereich von 150 bis 350 °C bestimmt. Der Gasstrom betrug dabei 4 L min<sup>-1</sup>. Estradiol- und Estriolether zeigen ein ähnliches Verhalten. Aufgrund der deutlicheren Darstellung sind die absoluten und relativen Ionenintensitäten des Estradioletherquasimoleküls und verschiedener Fragmente in den Abb. 5.6 und 5.7 aufgetragen. Zu erkennen ist im unteren Temperaturbereich eine geringere Ionisierung des Analyten bishin zu 220 °C unter 2·10<sup>7</sup> w. E., die im folgenden bis zu einem Maximum bei 240 °C auf 5.5·10<sup>8</sup> w. E. beim Quasimolekül zunimmt, um danach bis zu 350 °C wieder rapide abzufallen. Ein kleines lokales Maximum findet sich im Bereich um 320 °C. Die beobachteten Fragmente des Benzyloxyestradiols (**3a**) zeigen im gesamten Abschnitt das gleiche Intensitätsverhalten, lediglich in geringeren Größenordnungen. Mit höheren Temperaturen ist ein steter Anstieg der Fragmentierung zu erkennen. Dies wird ebenfalls aus der Auftragung der relativen Intensitäten der Fragmente im Vergleich zum Quasimolekül - besonders der [MH-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>- bzw. [MH-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>-Ionen - trotz der großen Streuung ersichtlich, der die relativen Intensitäten einzelner Fragmente (z. B. [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> oder [MH-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) bei mehreren Messungen unterliegen. Generell scheint bei einer Temperatur von ungefähr 240 °C ein Optimum vorzuliegen. Dabei verdampft das Solvens schnell genug, um den Analyten konzentriert freizusetzen, und dennoch einen ausreichenden Ladungsübertrag von seinen protischen Bestandteilen zuzulassen. Dementsprechend wurde die Quelle für weitere in dieser Arbeit durchgeführte Messungen stets bei dieser Temperatur betrieben.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.6.** – Einfluss der Quellentemperatur auf die Ionenintensität von Estradiolbenzylether.

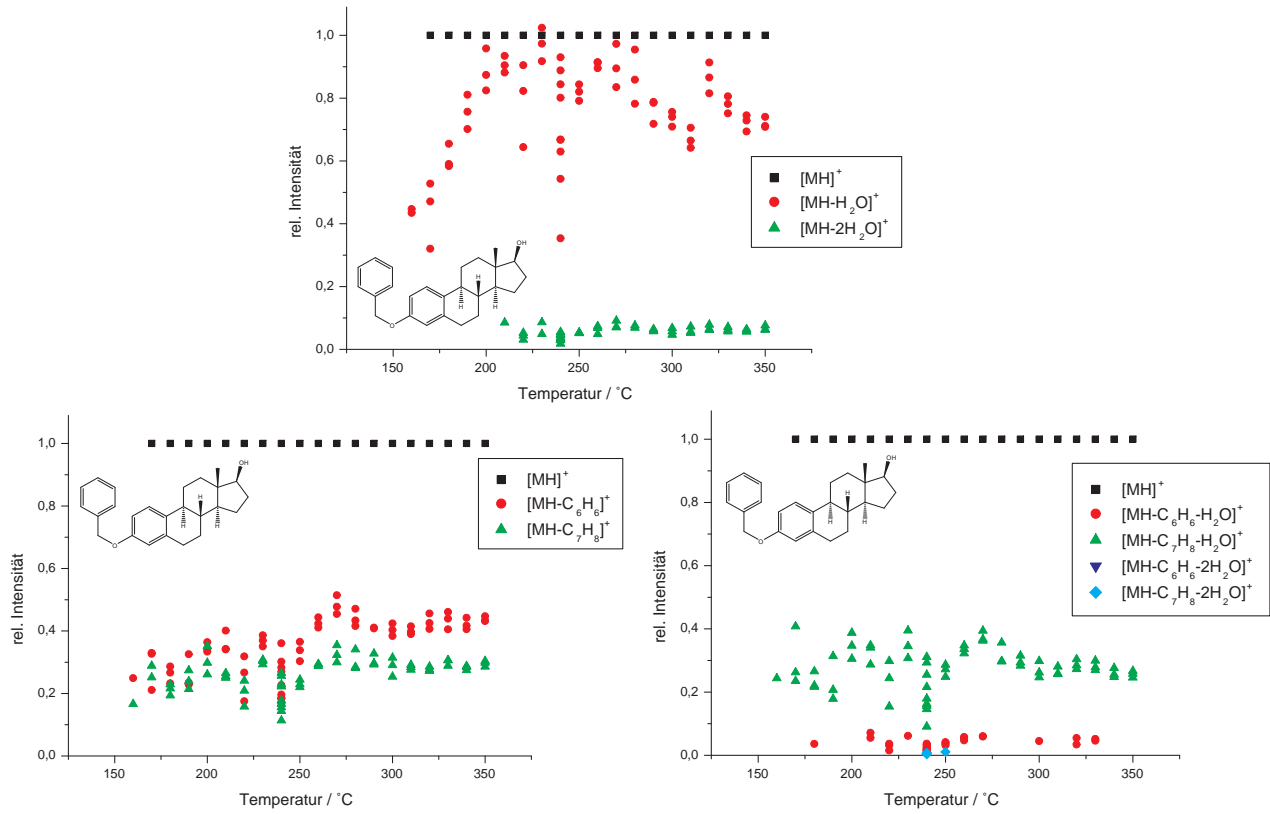
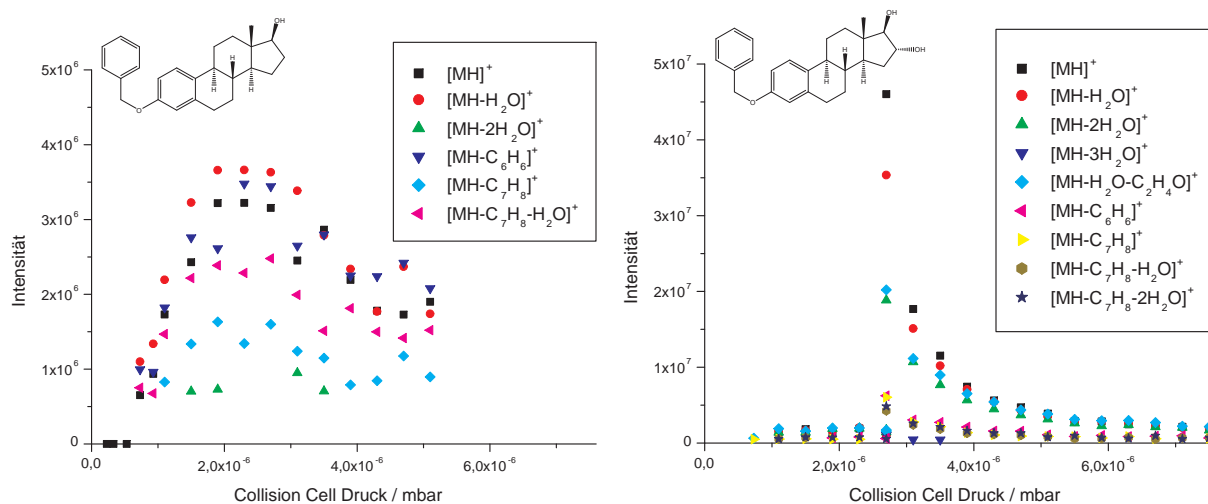


Abbildung 5.7. – Einfluss der Quelltemperatur auf die relative Ionenintensität von Estradiolbenzylether.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.8.** – Einfluss des Drucks in der Quelle und Stoßzelle auf die Ionenintensität von Estradiol- und Estriolbenzylether.

### 5.2.2. Stoßzellendruck

Nach Erzeugung der Ionen und Verlassen der Quelle passieren sie die Kollisionszelle am Ende des Quadrupolmassenfilters. Deshalb ist es von Interesse, wie sich der darin befindliche Druck auf die finale Detektion der Ionen auswirkt. Bei gleichbleibenden restlichen Parametern wurde der Druck in der Stoßzelle im Bereich von  $0,2$  bis  $7,5 \cdot 10^{-6}$  mbar variiert und die Intensität der gemessenen Estradiol- bzw. Estriolbenzyletherionen und -fragmente in Abb. 5.8 aufgetragen. Im Falle des Benzyloxyestradiols (**3a**, linke Bildseite) zeigen sowohl das Quasimolekülion als auch die Fragmente der ersten Wasser- und Benzolabspaltung eine Verteilung: Im niedrigen Druckbereich bis  $0,5 \cdot 10^{-6}$  mbar werden keine Ionen durch die Zelle transferiert. Danach steigt ihre Intensität bishin zu einem Maximum bei  $2,2 \cdot 10^{-6}$  mbar an, um danach wieder stetig bis  $5,2 \cdot 10^{-6}$  mbar abzufallen, die Intensitäten der  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8]^+$ -,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-\text{H}_2\text{O}]^+$  und  $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ -Ionen verlaufen analog, jedoch etwas flacher.

Die rechts im Bild abgebildete Übersicht der Estrioletherintensitäten zeigt ein deutlich schmaleres Maximum im Bereich von  $2,8 \cdot 10^{-6}$  mbar. Das Quasimolekülion sowie die Ionen nach Abspaltung von einem oder zwei Wasserneutralen bzw. einem Wasser- und einer  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ -Einheit weisen dabei auffällig höhere Intensitäten auf als die Signale der anderen Fragmente. Die Verläufe steigen generell erst bei größeren Drücken an und fallen ab  $3,2 \cdot 10^{-6}$  mbar fast exponentiell wieder ab. Gemeinhin ist solch ein schwacher Intensitätsverlauf im niedrigeren Druckbereich dadurch zu erklären, dass die erzeugten Ionen nach dem Quadrupol noch nicht ausreichend kollimiert die Stoßzelle passieren

und dadurch nur beschränkt in die folgende Transferoptik eingespeist werden können. In den höheren Druckbereichen über  $4.0 \cdot 10^{-6}$  mbar sind sie aufgrund der nun erhöhten Teilchendichte nicht mehr so häufig in der Lage, die Kollisionskammer zu durchqueren. Dies führte dazu, dass für die später aufgenommenen Spektren i. d. R. ein Druck zwischen  $2.0$  und  $3.0 \cdot 10^{-6}$  mbar, meist  $2.5 \cdot 10^{-6}$  mbar in der Zelle eingestellt wurde.

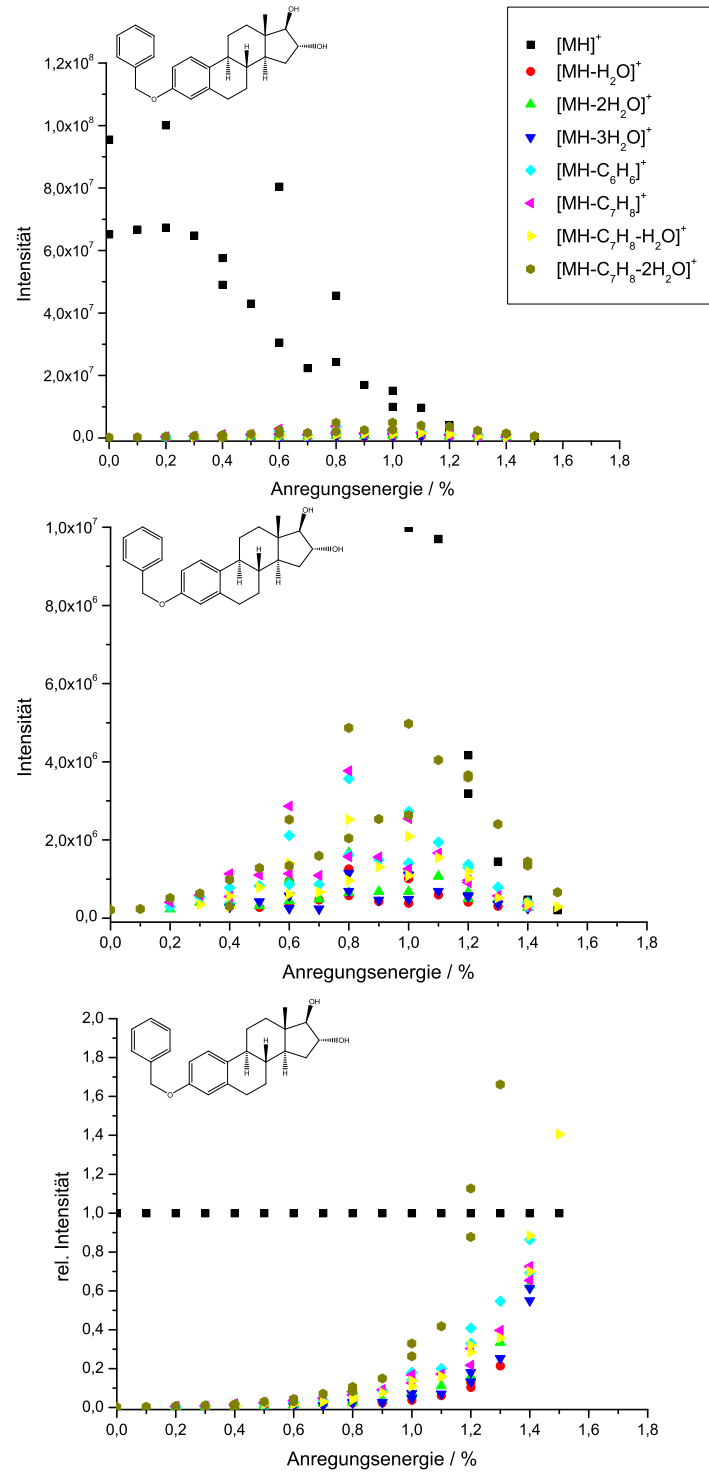
### 5.2.3. On-resonance-Pulsenergie und -dauer

Als weitere Parameter, die sich auf die Detektion der Ionensignale auswirken, wurden die Energie und Dauer des Anregungspulses bei der On-resonance-CID identifiziert. Bei konstanter Anregungspulsdauer von  $400 \mu\text{s}$  wurden zunächst die Intensitätsverläufe der Estrogenether (**3**) im Bereich von  $0.0$  bis  $1.5$  % w. E. gegen die Anregungsenergie gemessen. Aufgetragen ist in Abb. 5.9 das Estriolbenzylethersignal.

Ersichtlich ist hier bei steigender Anregungsenergie ein steter Abfall des Molekülionensignals, das sich ab  $0.9$  % der Abzisse asymptotisch annähert. Gleichzeitig steigt die Signalintensität der drei ursprünglichen Wasserabspaltungen ( $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ) schwach an, bleibt über einen weiten Bereich konstant, um gegen Ende leicht wieder abzufallen. Stärker ist die zu- und abnehmende Verteilung der Signale nach Verlust des aromatischen Restes ( $[\text{MH}-\text{C}_6\text{H}_6]^+$ ,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8]^+$ ) zu erkennen, die von der Intensität her noch von den darauf folgenden Wassereliminierungen ( $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ) - besonders der zweiten - übertroffen wird. Mit zunehmender Anregung nehmen die in der Zelle kreisenden Ionen also stetig Energie auf, in weiten Bereichen können sie so nach dem Zusammentreffen mit dem Kollisionsgas fragmentiert werden. Bei zu hohen Anregungsenergien werden sie jedoch aus der Zelle herausskatapultiert. Dies ist ebenso aus der Auftragung der relativen Intensitäten (Abb. 5.9 unten) erkennbar. Die steigende Anregungsenergie führt trotz absolutem Abfall der Ionenhäufigkeiten zu steigenden relativen Intensitäten der Fragmente, noch leicht bishin zu  $0.6$  % und immer stärker ab  $0.8$  bis  $0.9$  %. Die Fragmente der sekundären Wasserabspaltungsreihe dominieren hier erneut gegenüber denen nach Eliminierung von Toluol und denen des primären Wasserverlustes. Aufgrund der guten und konstanten Fragmentierungsrate, wurden die nachfolgenden Spektren i. d. R. mit Anregungsenergien zwischen  $0.8$  und  $1.0$  % aufgenommen.

Ebenfalls untersucht wurde die Signalstärke bei stabiler Anregungsenergie ( $0.9$  %) und variierender Pulsdauer von  $0$  bis  $600 \mu\text{s}$ . Sie ist in Abb. 5.10 dargestellt, links im Bild sind die absoluten Intensitätsverläufe der Estradiol- (**3a**, oben) und Estriolbenzyl-

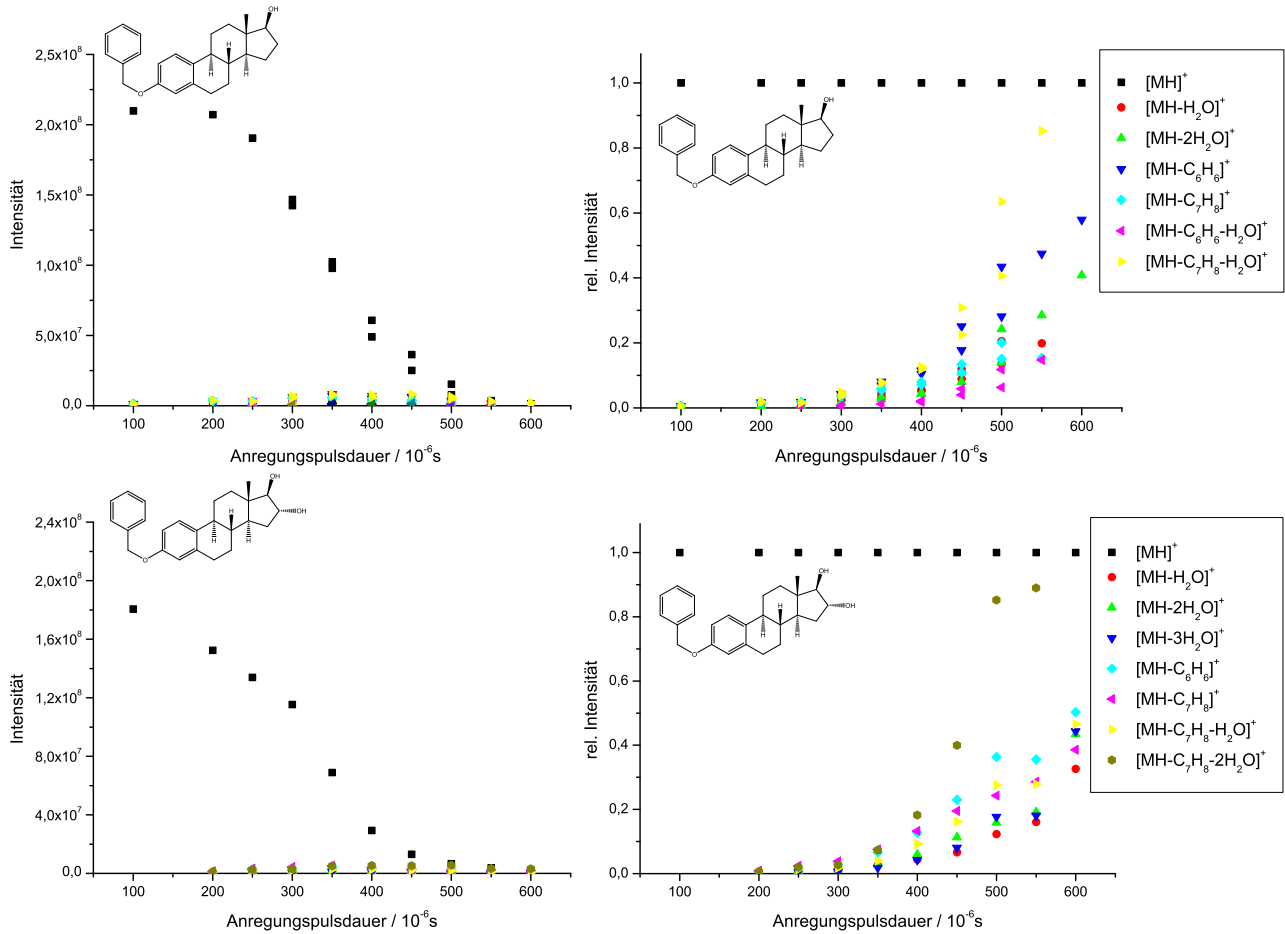
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.9.** – Einfluss der Anregungspulsenergie in der Zelle auf die Ionenintensität von Estriolbenzylether: Mittig ist der untere Abschnitt aus obigem Teil vergrößert dargestellt. Unten ist der Einfluss der Anregungspulsenergie auf die relative Ionenintensität gezeigt.



## 5.2. Einfluss der Geräteparameter



**Abbildung 5.10.** – Einfluss der Anregungspulsdauer in der Zelle auf die absolute (linke Spalte) und relative (rechte Spalte) Ionenintensität von Estradiol (oben) und Estradiolbenzylether (unten).

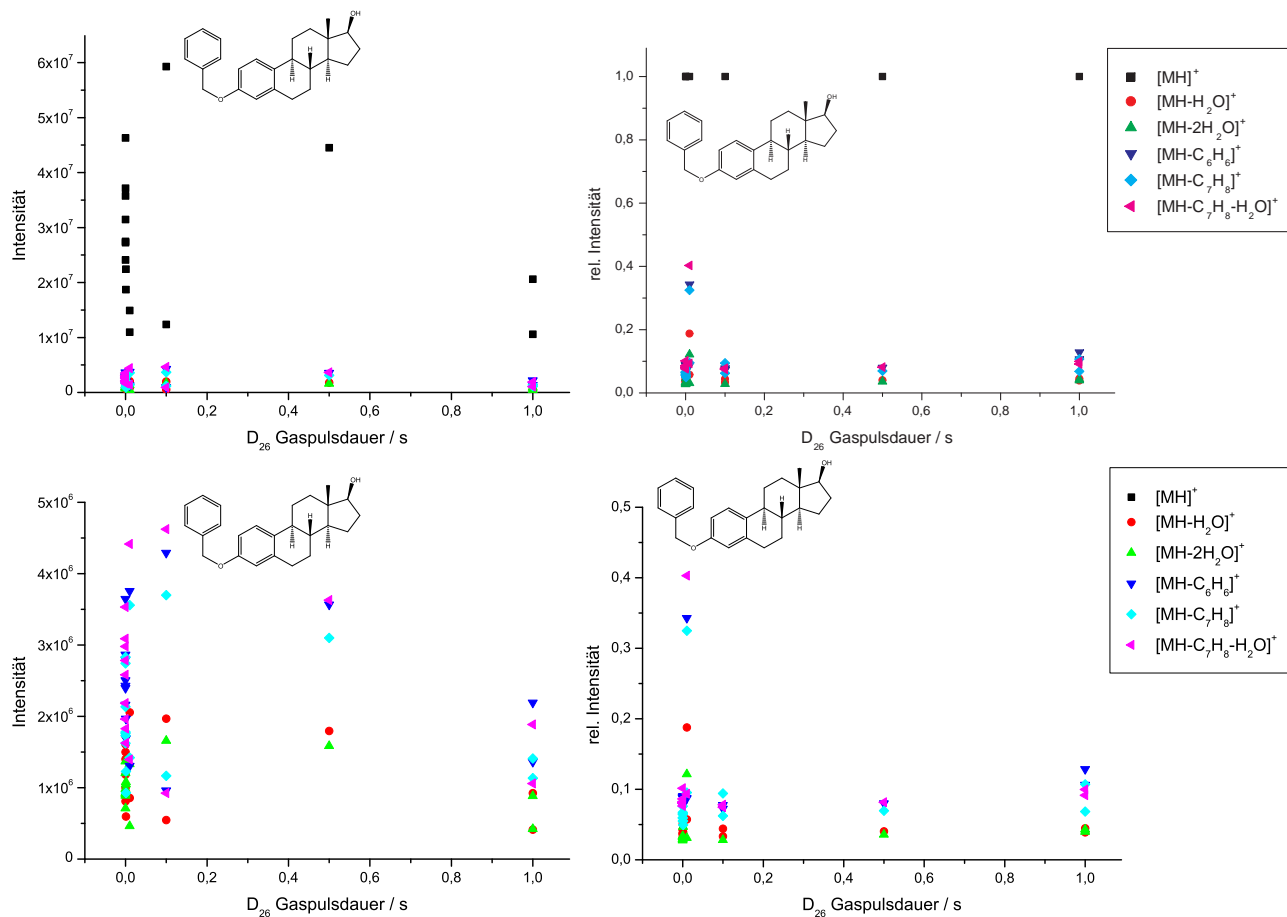
## 5. Ergebnisse

ether (**3b**, unten) zu sehen, rechts entsprechend die relativen. Zu erkennen ist erneut ein gleichmäßiger Abfall der absoluten Quasimolekülionenintensität ausgehend von  $1.8$  bis  $2.1 \cdot 10^8$  w. E., der sich ab  $350 \mu\text{s}$  verlangsamt und dessen Werte sich bis zu  $600 \mu\text{s}$  asymptotisch der Abzisse nähern. Deutlich schwächer ist darunter bei beiden Estrogenbenzylethern die Verteilung der absoluten Intensitäten der einzelnen Fragmente mit einem Maximum bei ca.  $400 \mu\text{s}$  zu erkennen. Sie wird wiederum von den zweiten Serien des Wasserverlustes dominiert, besonders denen nach Verlust des Toluols:  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-\text{H}_2\text{O}]^+$  beim Diol,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-2\text{H}_2\text{O}]^+$  im Falle des Triols. Die erste  $\text{H}_2\text{O}$ -Eliminierung weist kleinere Intensitätswerte vergleichbar denen der aromatischen Reste auf. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in der Darstellung der relativen Intensitäten auf der rechten Seite wider. Äußerst geringe Häufigkeiten zeigen die Fragmente der ursprünglichen Wassereliminierung ( $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ), ebenso wie der Wasserverlust nach der Abspaltung von  $\text{C}_6\text{H}_6$ . Darüber im mittleren Bereich und damit stärker ausgeprägt zeigen sich die Fragmente, die durch den Verlust von  $\text{C}_6\text{H}_6$  und  $\text{C}_7\text{H}_8$  gebildet worden sind, erstere dabei intensiver als letztere. Nicht nur die sukzessive Steigerung der Anregungsenergie, sondern auch der Pulsdauer führt also zu einer verstärkten Aufnahme von kinetischer Energie der kreisenden Ionen, die grundlegend für ihre Fragmentierung nach Aufprall auf das Stoßgas ist und z. T. auch zu einer geringeren absoluten Detektion aufgrund zu hoher Bahnradien führt. Generell lässt sich bei rund  $350 \mu\text{s}$ , besser noch bei ca.  $400 \mu\text{s}$  Pulsdauer eine relativ gute Fragmentierung mit vergleichbaren Einzelfragmentintensitäten bei ausreichender absoluter Detektierbarkeit erkennen, weshalb letztere Pulslänge i. d. R. allen weiteren On-resonance-Spektren zugrunde liegt.

### 5.2.4. Gaspulsdauer

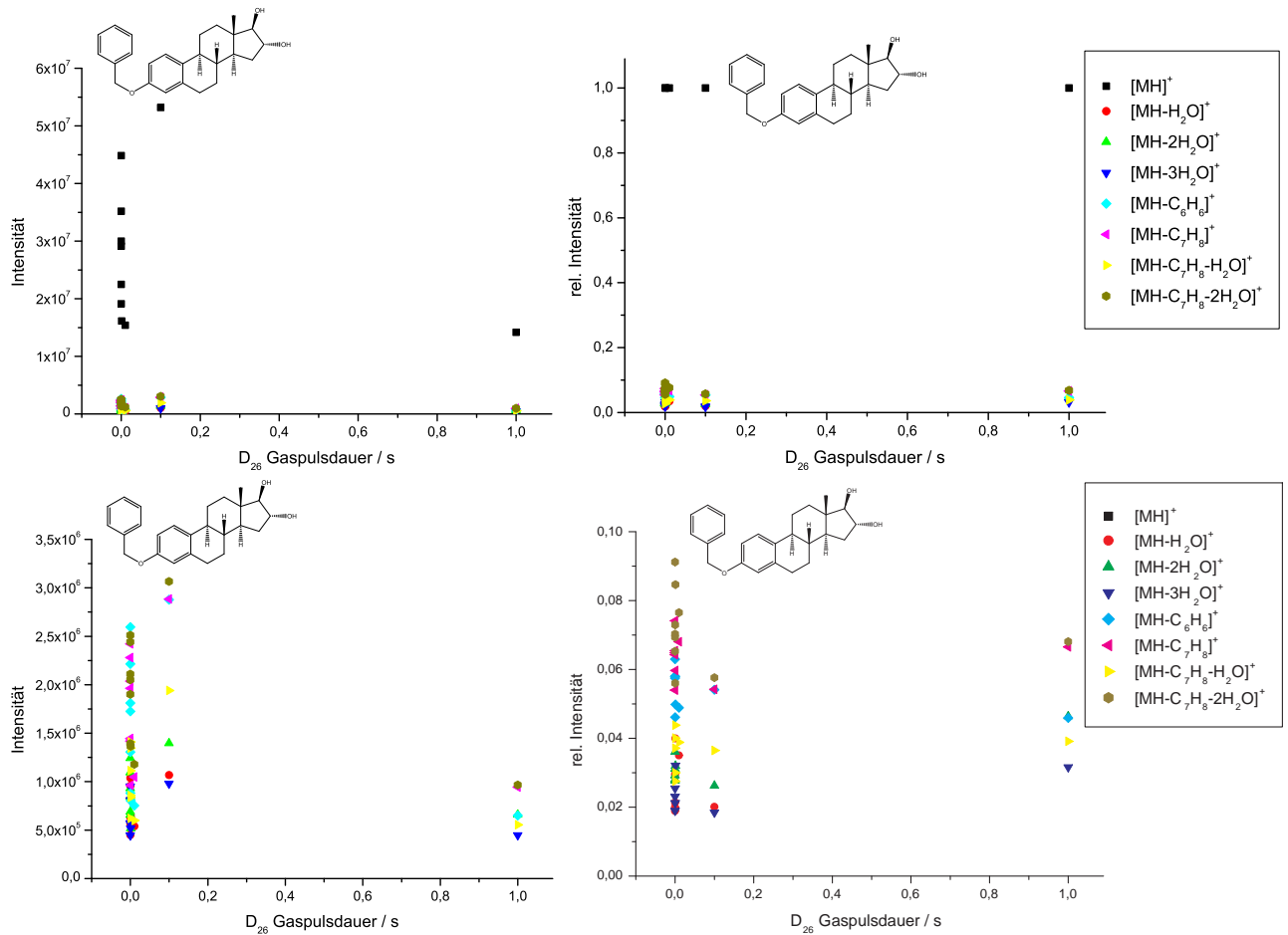
Sicherlich wird die Menge des zur Kollision benutzten Stoßgases die Häufigkeit bzw. Art und Weise der Detektion der zu untersuchenden Quasimolekülionen und der daraus resultierenden Fragmente beeinflussen. Diese Menge wurde über unterschiedliche Gaszuführungsdauern gesteuert. Nachfolgend sind die entsprechenden Estradiol- (Abb. 5.11) und Estriolbenzylether-Ionenintensitäten (Abb. 5.12) gegen die Länge des Gaspulses (Parameter  $D_{26}$  in der Instrumentensoftware) in Zeitbereichen von  $0.1 \mu\text{s}$  bishin zu  $1 \text{ s}$  aufgetragen. Beiden Intensitätsverläufen ist gemein, dass sich die gravierendsten Veränderungen während kurzer Pulszeiten bishin zu  $10 \text{ ms}$  ergeben; abgesehen von vereinzelt Ausreißern nimmt die Intensität des Quasimolekülionensignal sowohl beim Estradiol- (**3a**) als auch Estriolbenzylether (**3b**) im Bereich bis zu  $1 \text{ ms}$  rapide ab, um ab

## 5.2. Einfluss der Geräteparameter



**Abbildung 5.11.** – Einfluss der Stoßgaspulsdauer in der Zelle auf die absolute (links) und relative (rechts) Ionenintensität von Estradiolbenzylether. Unten sind jeweils Ausschnitte aus obigen Auftraggungen vergrößert dargestellt.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.12.** – Einfluss der Stoßgaspulsdauer in der Zelle auf die absolute (links) und relative (rechts) Ionenintensität von Estradiolbenzylether. Unten sind jeweils Ausschnitte aus obigen Auftragsungen vergrößert dargestellt.

ca. 10 ms deutlich langsamer zu fallen. Schwächer ausgeprägt sind stets die Signale der einzelnen Fragmente, die trotz einiger Streuung mit längeren Pulszeiten ebenso geringer werden. Die nachrangigen Wasserverluste nach Eliminierung des Etherrestes ( $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ) dominieren erneut, während die Wasserverluste ( $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{MH}-3\text{H}_2\text{O}]^+$ ) nur wenig intensiv zu erkennen sind und von den separaten Abspaltungen des Etherrestes ( $[\text{MH}-\text{C}_6\text{H}_6]^+$ ,  $[\text{MH}-\text{C}_7\text{H}_8]^+$ ) übertroffen werden. Die relativen Intensitäten der Fragmente im Vergleich zu den entsprechenden Quasimolekülonen  $\text{MH}^+$  scheinen nach einem minimalen Anstieg bei kleinsten Pulsdauern im folgenden über weite Bereiche unter Berücksichtigung von Ausreißern nahezu konstant zu bleiben. Anscheinend hat die Dauer des zugeführten Gaspulses ab ungefähr 10 bis 100 ms keinen Einfluss auf die Fragmentationbildung. Die Zelle ist nach dieser Dauer mit ausreichend Gas gefüllt, das als Stoßpartner für die angeregten Ionen fungieren kann, eine weitere Druckerhöhung ist nicht mehr notwendig. Daher wurden gewöhnlich alle weiteren On-resonance-Spektren mit einer Gaspulsdauer von 100 ms generiert.

### 5.2.5. IR-Pulsenergie und -dauer

Bevor nun der Einfluss der IR-Pulsenergie und -dauer auf den Ionenbildungs- und Fragmentierungsprozess erörtert werden soll, war es notwendig, die abstrakte Laserleistung in Prozent %, die sich über das Datenaquiseprogramm ApexControl 2.0 steuern lässt, mit absoluten Werten in Einklang zu bringen.

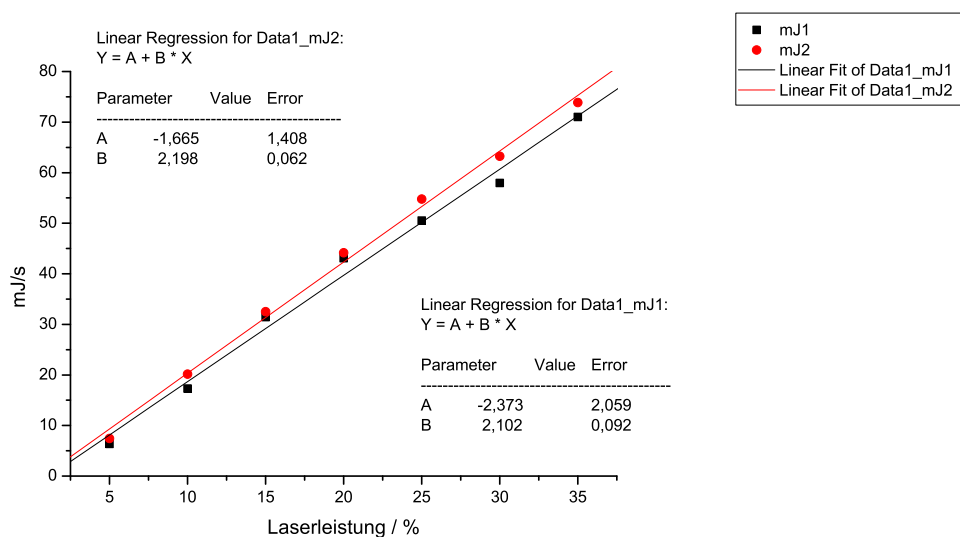


Abbildung 5.13. – Abhängigkeit zwischen relativer und absoluter IR-Laserleistung.

## 5. Ergebnisse

Dazu wurde sie zweimal unter sonst unveränderten Bedingungen variiert und mit der vor der Zelle ankommenden absoluten Leistung, die mit einem ED-500-Joulemeter der Firma Gentec Electro Optics Inc. bestimmt worden ist, in Abb. 5.13 korreliert. Gemittelt ergibt sich für einen justierten Wert von 20 % eine Leistung von  $40.98 \text{ mJ s}^{-1} = 40.98 \text{ mW}$ . Das wiederum entspricht bei einer IR-Wellenlänge von  $10.6 \mu\text{m}$  rund  $2.2 \cdot 10^{19}$  Photonen, die in die Zelle pro Sekunde eingestrahlt werden. Generell wurden Intensitätsverläufe aller Estrogenether und Estrogene mit Ausnahme der deuterierten gegen die IR-Pulsenergie und -dauer aufgenommen, im folgenden soll sich jedoch auf die Darstellung der der Estrogenphenethyl- (**1**), -benzyl- (**2**), allyl- (**5**) und -propylether (**6**) sowie der Benzoate (**2**) beschränkt werden, da sie jeweils für eine langkettige Stabilisierung (Siebenring), eine mittlerer Länge (Sechsring) und eine kürzere (Fünfring) Stabilisierung zwischen Steroid und Etherrest stehen.

### IR-Pulsenergie

Trivialerweise kann bei einer Erhöhung der Energie, die den Molekülen in der Gasphase zur Fragmentierung hier in Form von Strahlung zur Verfügung gestellt wird, davon ausgegangen werden, dass die Intensität des Quasimoleküls abnimmt, weil die Fragmentationen häufiger gebildet werden. Tatsächlich wird dieses auch beobachtet, wie im Falle der Phenethylether in Abb. 5.14 zu erkennen ist. Die absolute Signalstärke der  $\text{MH}^+$ -Ionen bei einer nachfolgend konstanten Laserpulsdauer von 150 ms fällt im Bereich von 0 bis 100 % Energie exponentiell ab. Sie ist beim Estradiolether (**1a**) bei ca. 15 % auf die Hälfte sowie bei 35 % auf ein Viertel der ursprünglichen abgesunken, im Falle des Estriolethers (**1b**) fällt sie noch rapider, auf den halben Wert bei 12 % Energie und auf den geviertelten bei 25%.

Die absolute Intensität der Fragmentationen bleibt links im Bild beinahe konstant, durchläuft aber bei rund 35 % Energie ein schwaches Maximum, wobei die Abspaltung von  $\text{C}_6\text{H}_6$  deutlicher hervortritt als die anderen Fragmente. Relativ betrachtet steigen die Intensitäten der Fragmente leicht und stetig an, die des letztgenannten gravierend. Im Gegensatz dazu durchlaufen die Bruchstücke des Trioleters **1b** eine offensichtliche maximale absolute Intensität bei ca. 20 %. Hier wird das Fragmentierungsmuster durch die zweite Wassereliminierung aus dem  $\text{MH}^+$ -Ion und die nach Abspaltung des aromatischen Restes dominiert, die Signale des  $\text{C}_6\text{H}_6$ -Verlustes folgen darunter. Die verbleibenden Fragmentmoleküle nehmen in Relation zum Muttermolekül ebenfalls deutlich zu, um allerdings bei höheren Energien im Bereich von 55 bis 60 % wieder abzunehmen.

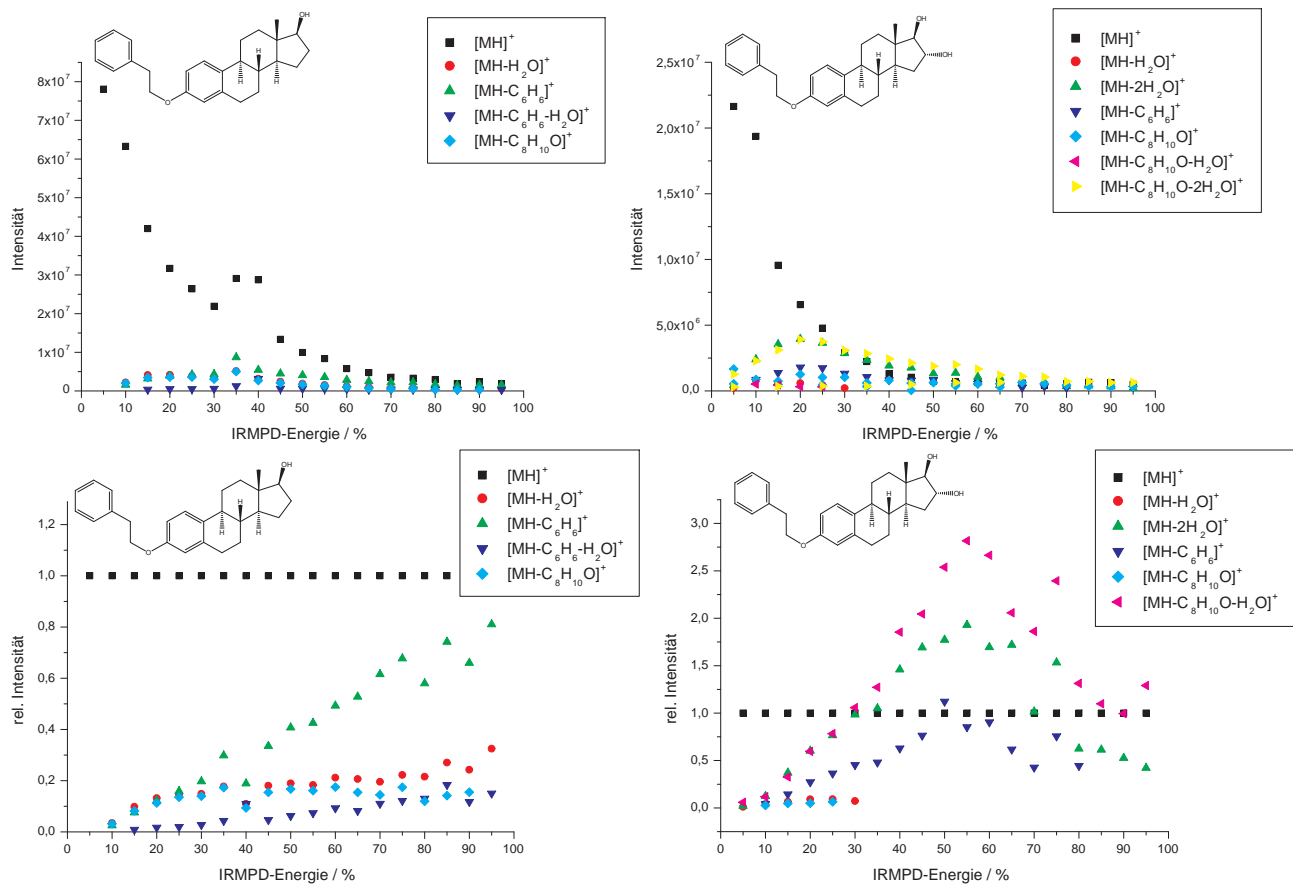
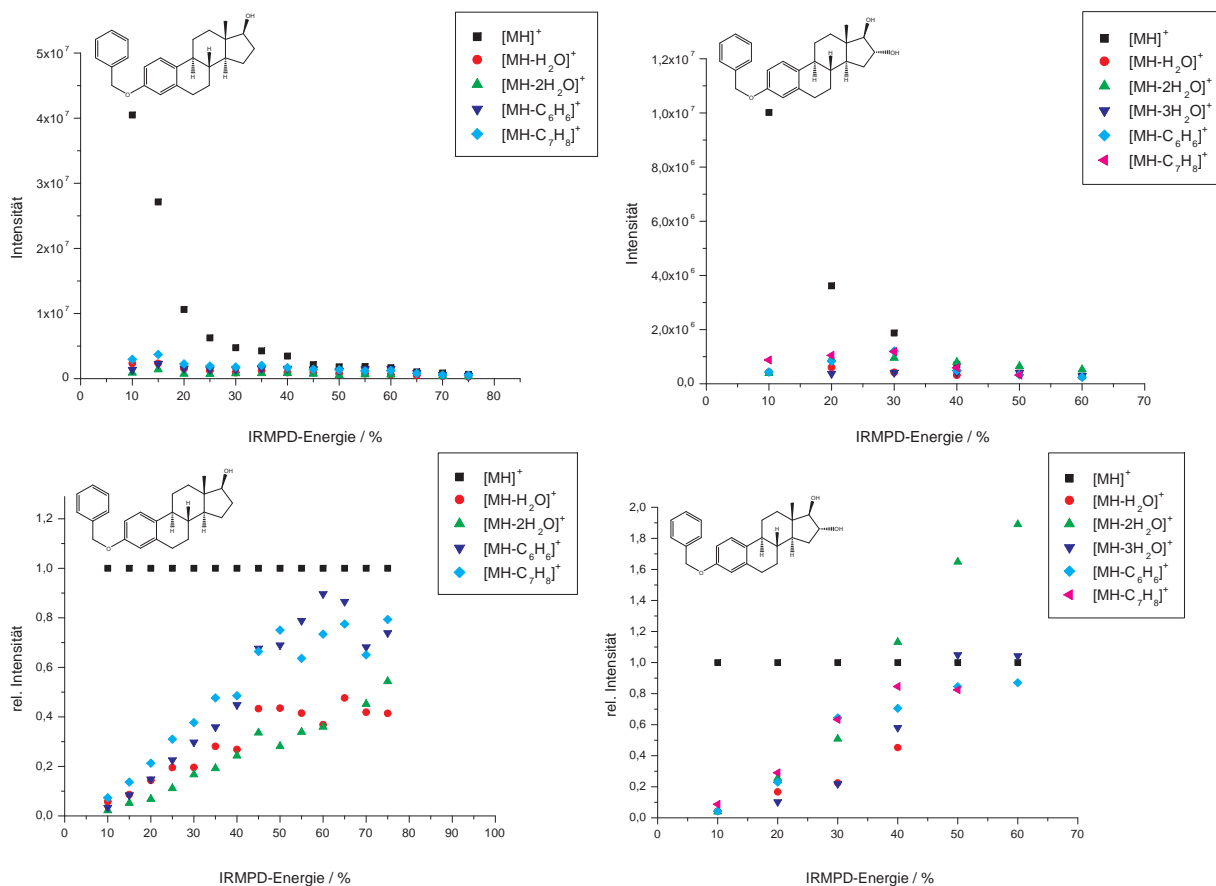


Abbildung 5.14. – Einfluss der IR-Laserenergie auf die absolute (oben) und relative (unten) Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolphenethylethers (rechts).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.15.** – Einfluss der IR-Laserenergie auf die absolute (oben) und relative (unten) Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolbenzylethers (rechts).

Anscheinend treten hier verhältnismäßig früh weitere Fragmentierungen zu noch kleineren Ionen auf, da die primär entstandenen Fragmente nach der IRMPD im Gegensatz zur On-resonance-CID noch in der Lage sind, weitere Energie zu absorbieren.

Die in Abb. 5.15 dargestellten Intensitätsverläufe der Estrogenbenzylether (**3**) gleichen stark dem des Diolphenethylethers (**1a**). Die absoluten Quasimolekülionenhäufigkeiten sinken zunehmend mit höherer Energie und erreichen bei  $15$  % ihren halben Wert. Mit geringerer Häufigkeit sind die Fragmentionen zu erkennen. Sie werden beherrscht von denen nach Eliminierung der aromatischen Reste ( $[MH-C_6H_6]^+$ ,  $[MH-C_7H_8]^+$ ), gefolgt von denen der Wassereliminierungen. Gleiches ist ebenso deutlich sichtbar in der relativen Darstellung unten. Interessant ist, dass die Häufigkeit des  $[MH-2H_2O]^+$ -Estrioletherions die der anderen beiden Wasserverluste über den gesamten Energiebereich übertrifft, während beim Diolether zunächst anscheinend eher  $[MH-H_2O]^+$ -Ionen gebildet werden und erst ab  $65$  % Energie von den erstgenannten verdrängt werden.



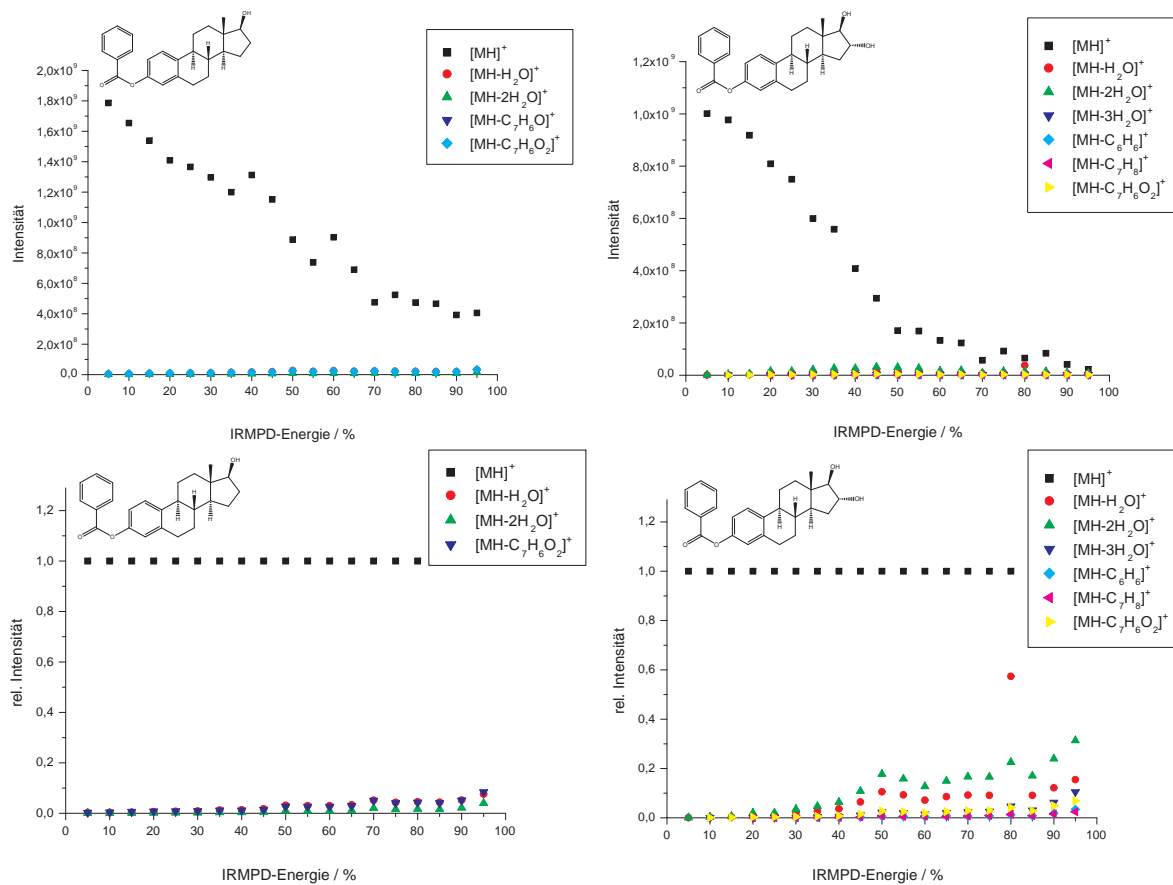
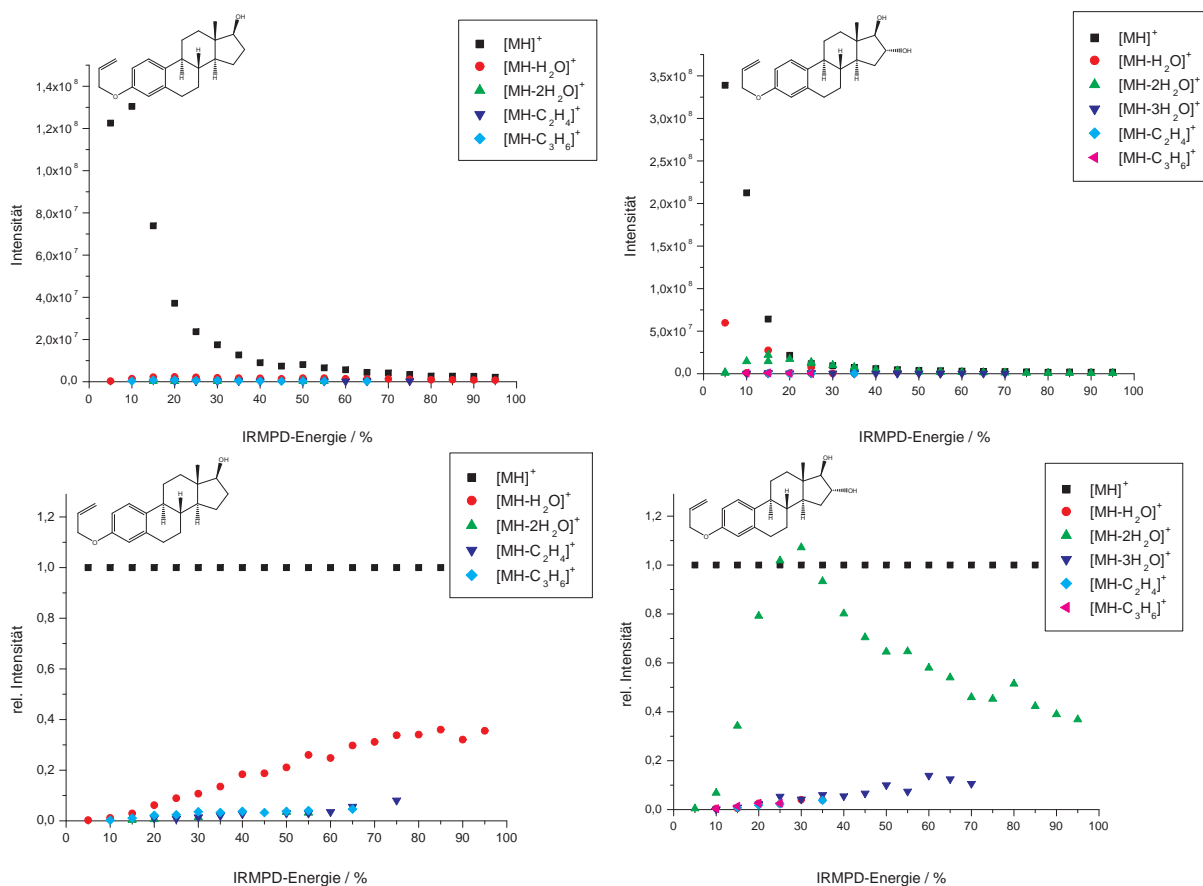


Abbildung 5.16. – Einfluss der IR-Laserenergie auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estradiolbenzoats (rechts).

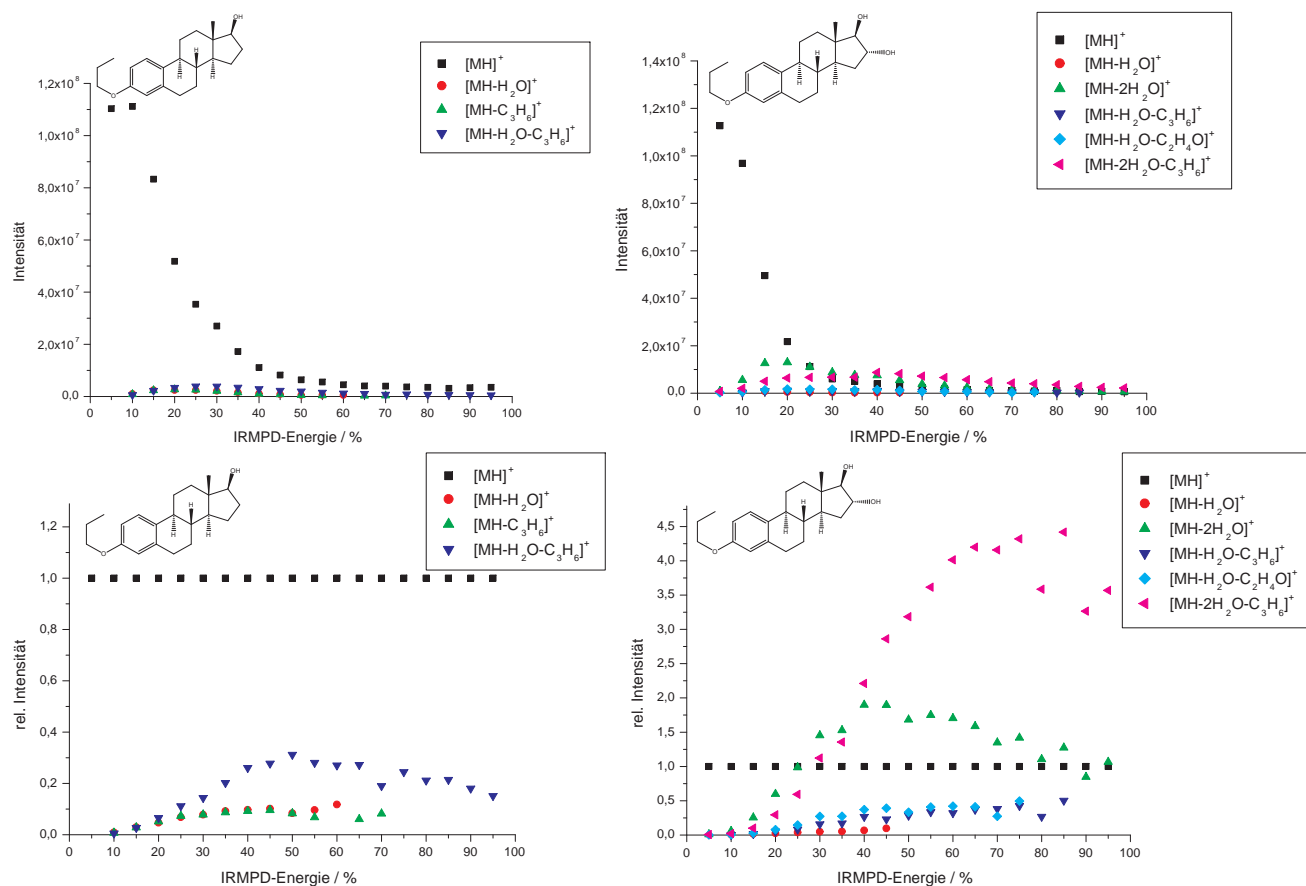
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.17.** – Einfluss der IR-Laserenergie auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolallyl ethers (rechts)

Schwerer und erst mit höheren Energien zu dissoziieren sind die Benzoate (**2**) der Estrogenether (Abb. 5.16), deren Halbwertsenergien  $E_{1/2}$  liegen bei 50 % bzw. 40 % Pulsenergie. Trotz hoher IRMPD-Energien treten Fragmente nur mit geringer Häufigkeit auf – gut sichtbar auch in den relativen Auftragungen unten. Das Benzoat des Estradiols (**2a**) wird überhaupt kaum fragmentiert, das des Estriols (**2b**) deutlicher und mit niedrigerer Energie (Anstieg ab ca. 45 %). Die vorletzt mögliche Wassereliminierung tritt erkennbar hervor. Beim Estradiolether tauchen die  $[MH-H_2O]^+$ -Ionen so häufig auf wie die nach Abspaltung von Benzoesäure ( $[MH-C_7H_6O_2]^+$ ), der Estriolether generiert mehr  $[MH-2H_2O]^+$ -Bruchstücke als  $[MH-H_2O]^+$ - und  $[MH-3H_2O]^+$ -Ionen zusammengenommen. Der Verlust von Benzoesäure sowie von  $C_6H_6$  treten dabei in den Hintergrund. Fragiler als die Benzoate verhalten sich die Estrogenallylether (**5**), deren Fragmentierung bei Bestrahlung in Abb. 5.17 gezeigt wird. Auf die Hälfte seiner Intensität ist das Quasimolekül des Allyloxyestradiols (**5a**) bei 15 % Pulsenergie gefallen, das des Estriolethers (**5b**) bereits bei 10 %, also in der Größenordnung der Estrogenbenzylether.

## 5.2. Einfluss der Geräteparameter



**Abbildung 5.18.** – Einfluss der IR-Laserenergie auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolpropylethers (rechts).

In der relativen Auftragung zeigt sich links die Dominanz der Fragmente der ersten Wasserabspaltung ( $[MH-H_2O]^+$ ), rechts der zweiten ( $[MH-2H_2O]^+$ ), während alle andere Fragmente weniger häufig vorliegen und mit zunehmender Energie leicht und stetig zunehmen. Der Intensitätsverlauf des Estriolether- $[MH-2H_2O]^+$ -Ions durchläuft bei 15 % Energie ein Maximum und erreicht relativ betrachtet zwischen 25 und 30 % knapp sogar die Häufigkeit des Quasimoleküls. Die dritte Wasserabspaltung ist hier noch zu beobachten.

Übergehend zu den Estrogenpropylethern (**6**, Abb. 5.18) wird offensichtlich, dass die unerwartet aufgetretene  $H_2O$ -Eliminierung aus dem veretherten aromatischen System nicht mehr auftaucht,  $[MH-2H_2O]^+$ -Ionen im Falle des Estradiolethers (**6a**) sowie  $[MH-3H_2O]^+$ -Ionen beim Propoxyestriol (**6b**) sind nicht zu erkennen. Die  $MH^+$ -Signalintensitäten halbieren sich erneut bei rund 15 %, während die absoluten Fragmentintensitäten von der letztmöglichen Wasserabspaltung (links  $[MH-H_2O]^+$ , rechts

## 5. Ergebnisse

[MH-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) und stärker noch von der letzten H<sub>2</sub>O-Eliminierung nach Verlust des Restes (links [MH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, rechts [MH-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) beherrscht werden. Interessanterweise steigen letztgenannte in der relativen Auftragung des Estriolethers (**6b**) stark an und überlagern sogar die Häufigkeit des Quasimoleküliions deutlich, um schließlich gegen Ende erneut abzufallen. Dieses Verhalten erinnert stark an das der eingehend beschriebenen Estrogenphenethylether (**1**) (Abb. 5.14) und weniger an das der Allylether (**5**).

### IR-Pulsdauer

Nach dem Einfluss der Laserstrahlenergie auf den Fragmentierungsprozess in der Zelle soll nun die Wirkung der Laserpulsdauer besprochen werden. Die im Folgenden gezeigten Intensitätsverläufe sind bei einer Laserenergie von 35 % aufgenommen worden. Hierbei wurde die IR-Pulsdauer in einem Bereich von 0 bis 2000 ms variiert. Lange Pulsdauern entsprechen dabei höheren Energien: Bestimmt man den Energieeintrag in die Zelle mit einer Bestrahlungsdauer von 150 ms bei 15 % zu 4.49 mJ, entspricht dies bei der folgend konstant gehaltenen Energie von 35 % einer Pulsdauer von 62 ms.

In Abb. 5.19 wird zunächst die Abhängigkeit der Estrogenphenethylether-Signalintensitäten von der Pulsdauer des IR-Lasers aufgezeigt. Erkennbar ist ein vergleichsweise schneller Abfall der Quasimolekülionenintensität bis auf die Hälfte bei einer Bestrahlungsdauer von ungefähr 100 ms. Bei genauerer Betrachtung passt dies zum Bild aus Abb. 5.14, da ein ähnlich großer Gesamtenergieeintrag an dieser Stelle vorliegt. Die absoluten Fragmentionenintensitäten scheinen weitestgehend konstant zu bleiben, wobei sie erneut von den Signalen der Abspaltung des aromatischen Restes ([MH-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, [MH-C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O]<sup>+</sup>) beherrscht werden, letztere fällt nach kurzen Pulszeiten leicht ab. Relativ steigen beide Intensitätsverläufe stetig an, der nach einem C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-Verlust deutlich stärker als der der C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O-Eliminierung, deren Werte sich auf dem Niveau der Wasserabspaltung des Estradiolphenethylethers befinden. Rechts in der Darstellung des Estriolphenethylethers (**1b**) überwiegt erneut die zweite Wasserabspaltung ([MH-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) – eine dritte ist nicht zu beobachten – sowie die Wassereliminierung nach Verlust des aromatischen Restes ([MH-C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O]<sup>+</sup>). Die Intensitäten beider Fragmente steigen ebenso in der relativen Darstellung im Vergleich zum MH<sup>+</sup>-Ion rapide an, gefolgt von der des reinen C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O-Verlustes.

Im Falle der Estrogenbenzylether (**3**) in Abb. 5.20 dominieren bei variierender Pulsdauer wiederholt die Fragmentintensitäten der vorletzt möglichen Wassereliminierung

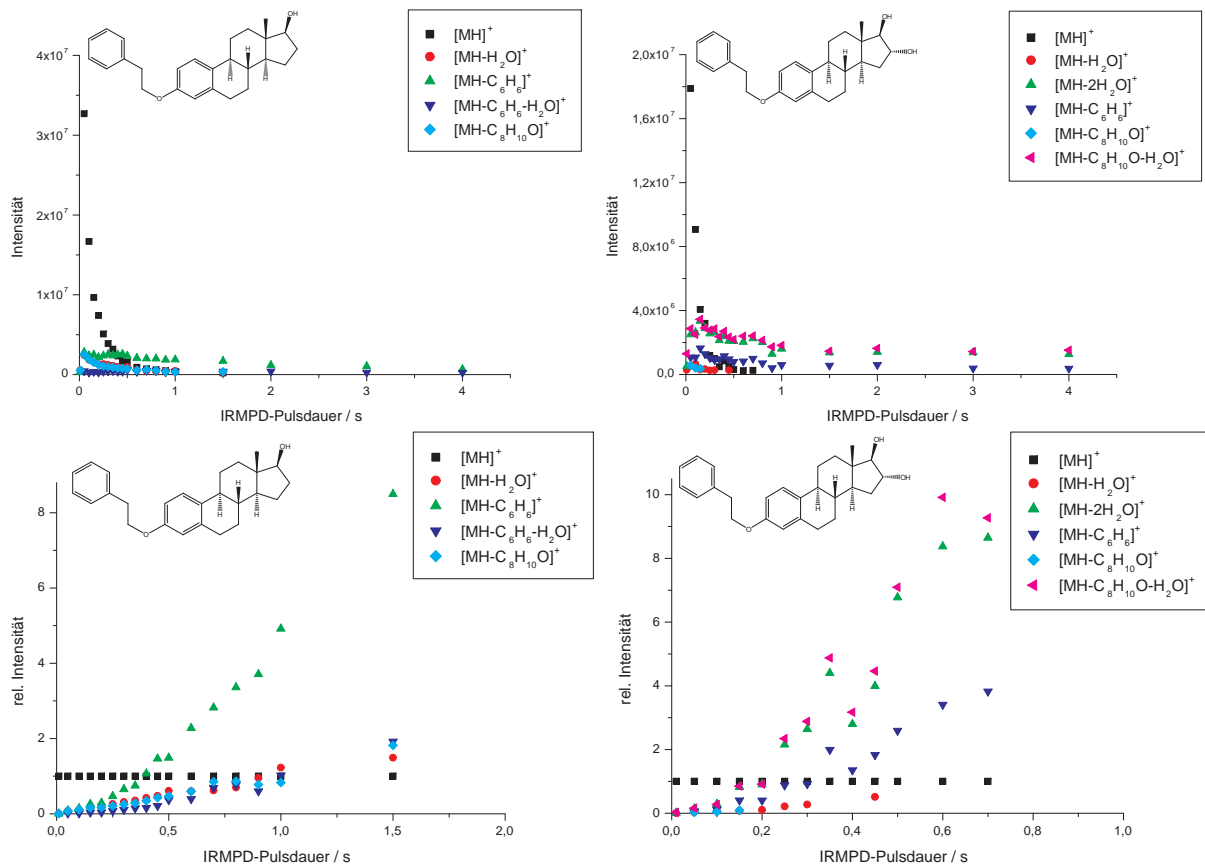


Abbildung 5.19. – Einfluss der IR-Laserpulsdauer auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolphenethylethers (rechts).

5. Ergebnisse

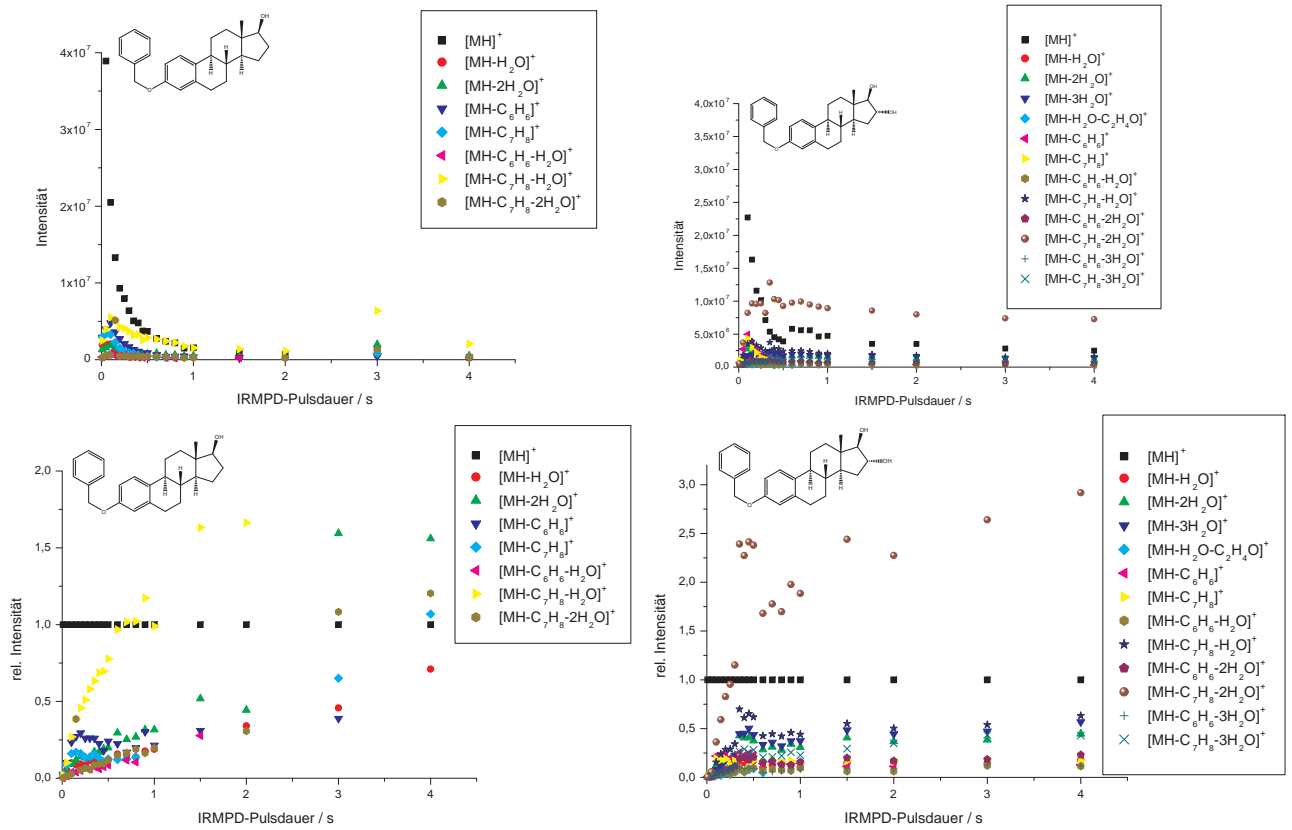
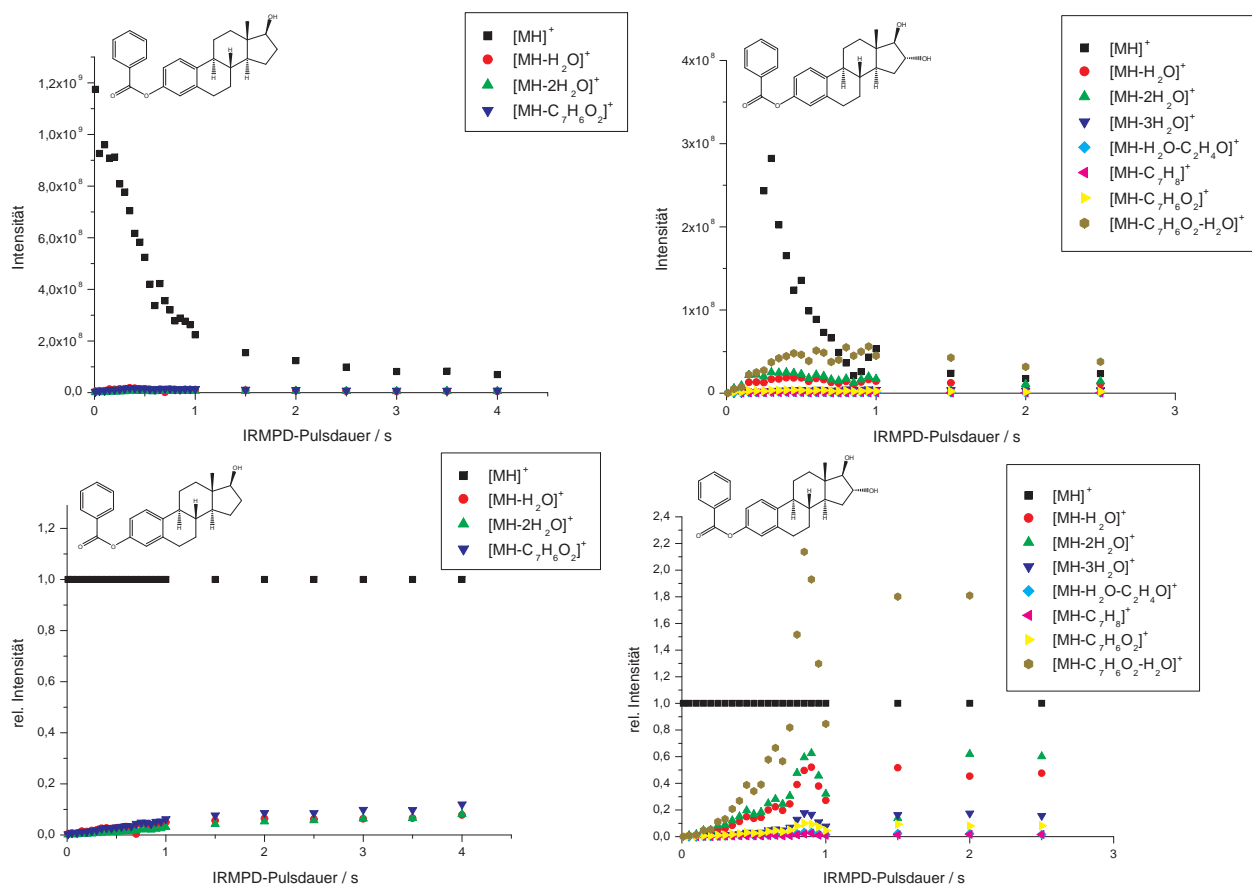


Abbildung 5.20. – Einfluss der IR-Laserpulsdauer auf die absolute und relative Ionintensität des Estradiol- (links) und Estriolbenzylethers (rechts).

## 5.2. Einfluss der Geräteparameter

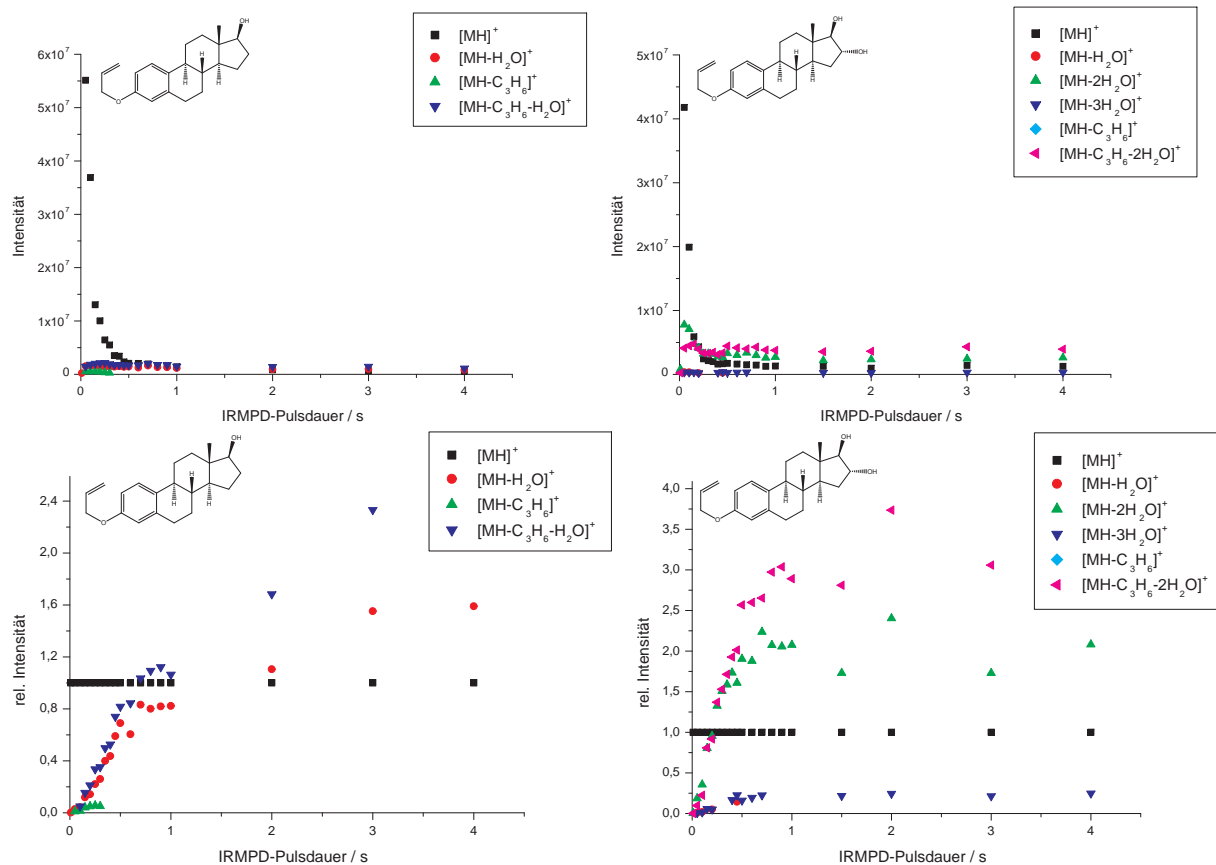


**Abbildung 5.21.** – Einfluss der IR-Laserpulsdauer auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolbenzoats (rechts)

nach Verlust des Restes (links:  $[MH-C_7H_8-H_2O]^+$ ; rechts:  $[MH-C_7H_8-2H_2O]^+$ ), gefolgt von denen der Reste selbst in der Reihenfolge  $[MH-C_6H_6]^+$  vor  $[MH-C_7H_8]^+$  und den ursprünglichen Wassereliminierungen. Letztere werden allerdings zunehmend bestimmender und übertreffen die der Restabspaltungen ab 250 bis 400 ms. Alle Intensitäten fallen bis zu einer Pulslänge von 1000 ms = 1 s ab, um danach weitgehend konstant zu bleiben. Die Quasimolekülionenhäufigkeit selbst sinkt vergleichbar zu der der Estrogenphenylether (**1**). Relativ betrachtet steigen die Fragmentintensitäten des Benzylxyestradiols (**3a**) länger und stetiger über den gesamten Messbereich, während die des Estriolbenzylethers (**3b**) ab einer Pulsdauer von 1 s langsam in eine Sättigung übergehen. Hier wird ebenso deutlich, wie schnell die  $[MH-C_7H_8-2H_2O]^+$ -Ionen ihre  $MH^+$ -Vorgänger übertreffen.

Auf die Entstehung von Estradiolbenzoatfragmenten scheint eine Erhöhung der Pulsdauer (s. Abb. 5.21) ebenso wenig Einfluss zu haben wie die der Energie. So sind über den

## 5. Ergebnisse

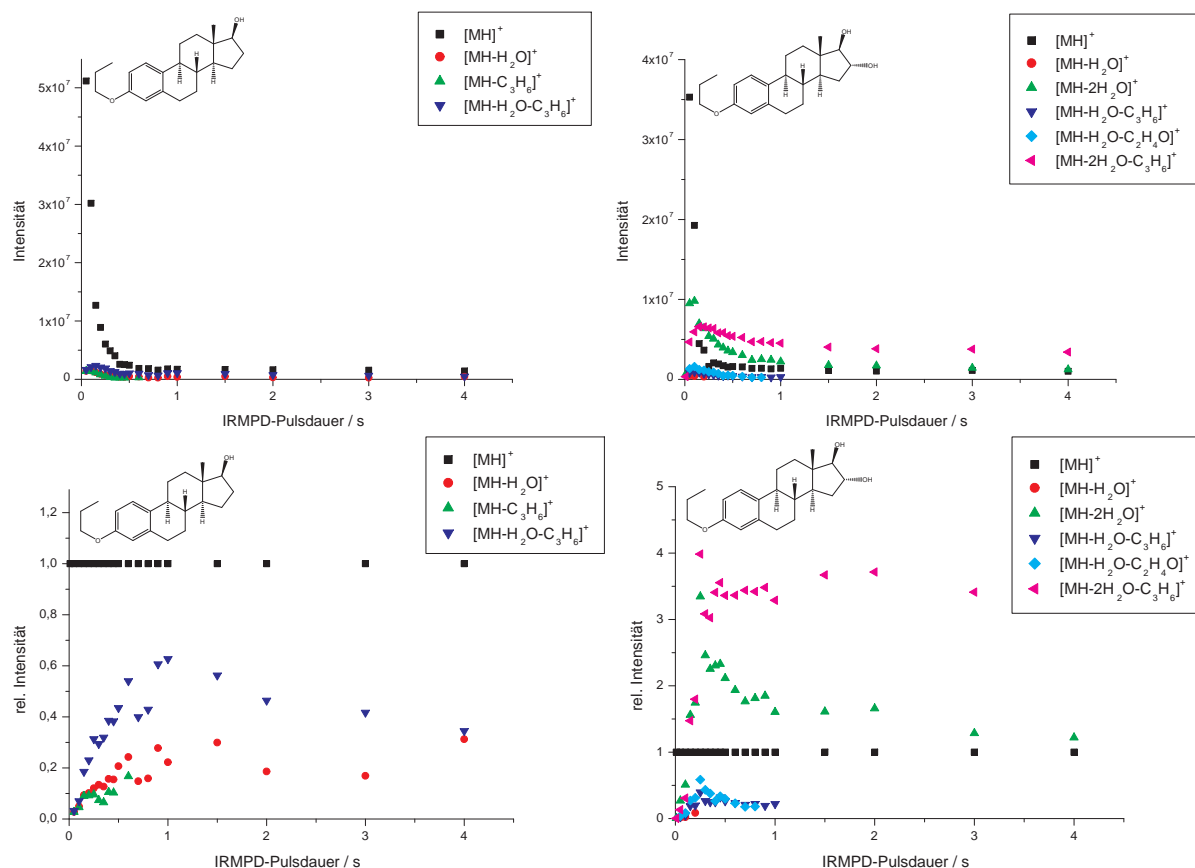


**Abbildung 5.22.** – Einfluss der IR-Laserpulsdauer auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolallylethers (rechts).

gesamten Bereich bishin zu  $4$  s nicht viele Fragmente zu erkennen und ihre Zahl - speziell der  $[MH-H_2O]^+$ ,  $[MH-2H_2O]^+$  und  $[MH-C_7H_6O_2]^+$ -Ionen - steigt in Relation zum  $MH^+$  lediglich marginal an. Deutlicher dagegen steigen die Intensitäten der Bruchstücke des Estriolbenzoats (**2b**). Gut sichtbar sind die bis zu  $1$  s anwachsenden Werte der zwei- und einfachen Wassereliminierung gefolgt von der dritten und der des Benzoesäureverlustes ( $[MH-C_7H_6O_2]^+$ ). Überlagert wird alles durch die Häufigkeit der darauf noch folgenden  $H_2O$ -Eliminierung. Die Gesamtionenintensitäten der protonierten Molekülonen sinken bei beiden Benzoaten deutlich langsamer als bei den Benzylethern, was erneut auf die Notwendigkeit von höheren Energien zur Fragmentierung hinweist.

In Abb. 5.22 werden die Allylether (**5**) der Estrogene betrachtet. Es bestätigt sich, dass sie fragiler sind als die entsprechenden Benzoate (**2**), bereits nach  $50 - 100$  ms ist die gemessene  $MH^+$ -Ionenhäufigkeit auf ca. die Hälfte abgefallen. Erneut beherrschen die vorletzt möglichen Wasserabspaltungen - wie bei den Benzylethern - das Bild der





**Abbildung 5.23.** – Einfluss der IR-Laserpulsdauer auf die absolute und relative Ionenintensität des Estradiol- (links) und Estriolpropylethers (rechts).

Fragmentierung, sowohl in purer Form als auch nach Abspaltung von  $C_3H_6$ . Die  $[MH-C_3H_6-H_2O]^+$ - und  $[MH-H_2O]^+$ -Ionenintensitäten sind links gut zu erkennen, die entsprechenden des Estriolallylethers ( $[MH-C_3H_6-2H_2O]^+$ - sowie  $[MH-2H_2O]^+$ ) rechts. In der relativen Auftragung übertreffen sie zudem recht schnell die Häufigkeit der protonierten Ursprungsmoleküle. Im Falle des Trioleters (**5b**) sind zudem die erste und dritte Wasserabspaltung schwächer sichtbar, in der Auftragung links des Allyloxyestradiols (**5a**) fehlen die Werte der zweiten. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass zur Darstellung dieser Verläufe lediglich 64 Einzelspektren pro Substanz und Pulsdauer akkumuliert werden konnten, und der Verlust von zwei  $H_2O$  noch schwerer zu beobachten ist als der von dreien aus dem entsprechenden Trioletter. Ersterer wird erst bei zahlreicheren Akkumulationen ab 128 bis zu 1024 Einzelspektren (vgl. Abb. 5.32) deutlich.

Bei den Estrogenpropylethern (**6**, Abb. 5.23) sind abschließend nur eine bzw. zwei Wasserabspaltungen zu erkennen, entsprechend der Anzahl der im Molekül befindlichen

freien Hydroxylgruppen. Die Intensitäten ihrer protonierten Molekülonen fallen ebenso schnell wie die Häufigkeiten der Estrogenphenethylether. Das Fragmentspektrum wird von einer einfachen (links) bzw. doppelten (rechts)  $\text{H}_2\text{O}$ -Eliminierung beherrscht, sowohl direkt aus dem  $\text{MH}^+$ -Ion als auch nach Verlust von  $\text{C}_3\text{H}_6$ . Die Intensitäten der einfachen Abspaltung von Wasser befinden sich darunter.

### 5.3. Estrogene

Nachdem die Einflüsse unterschiedlicher Probenparameter wie Art des Lösemittels oder deren Konzentration sowie diverser Geräteeinstellungen wie Quelltemperatur, Stoßzellendruck, Gaspulsdauer und Laser- sowie Anregungsdauern und -energien eingehend diskutiert worden sind, soll nun auf die Spektren der einzeln vermessenen Substanzen *en detail* eingegangen werden.

#### 5.3.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI

Die verwendeten Modellsubstanzen sind in der Lage, einen unterschiedlich großen Ring zwischen Etherrest und Steroidgrundgerüst auszubilden. Angefangen bei den Estrogenphenethylethern (**1**), die eine zum großen Teil ungesättigte Siebenringstabilisierung zulassen können, ist dies bei den Benzylethern (**3**) ein stabilisierter Sechsering, während die Ethyl- (**7**) und Methylether (**8**) lediglich gesättigte Vier- bzw. Dreiringe bilden. Diese wurden neben den reinen Estrogenen Estradiol (**9a**) und Estriol (**9b**) mittels positiver ESI ionisiert und entweder in der ICR-Zelle on-resonant oder in der Collision Cell nach dem Quadrupol wie folgt isoliert und fragmentiert.

#### Phenethylether

Das Quasimolekülion  $\text{MH}^+$  des Estriolphenethylethers (**1b**, Abb. 5.24) bei 393.250 Da fragmentiert unter resonanter Anregung und CID zu Teilchen der Massen 375.239 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 357.228 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ), 315.201 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6$ ), 297.190 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6 - \text{H}_2\text{O}$ ), 271.174 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ ) und 253.158 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ ). Somit ist der Verlust von zwei neutralen Wassermolekülen aus dem Steroid sowie ein Bruch des Etherrestes jeweils direkt an den beiden aromatischen Ringsystemen zu beobachten. Letzteres Verhalten zeigt gleichsam der Estradiolphenethylether (**1a**). Selbstverständlich verlässt, wie zuvor auch erwartet, nur ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül das Gerüst, deutlich zu erkennen an den Fragmenten bei

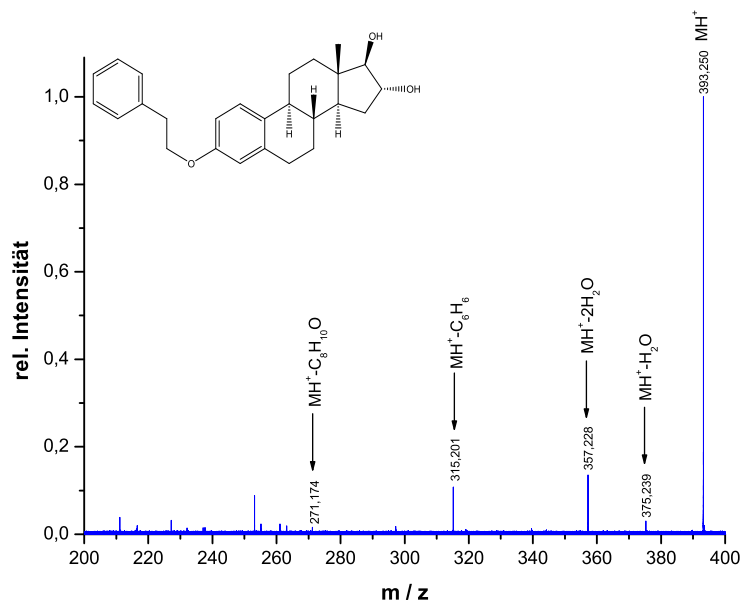


Abbildung 5.24. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolphenethylether.

$m/z$  359.243 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 299.205 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6$ ), 281.194 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6 - \text{H}_2\text{O}$ ) und 255.178 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ ) ausgehend von der Masse des Ethers bei 377.254 ( $\text{MH}^+$ ).

### Benzylether

Nach Isolierung des protonierten Moleküls  $\text{MH}^+$  der Masse 379.226 Da in der ICR-Zelle des FT-MS (Abb. 5.1) wurden im Falle des Estriolbenzylethers (**3b**) nach resonanter CID mit deutlicher Intensität Fragmente der Massen 361.217 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 343.206 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ), 325.195 ( $\text{MH}^+ - 3\text{H}_2\text{O}$ ), 301.178 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6$ ), 287.163 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_8$ ), 269.152 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_8 - \text{H}_2\text{O}$ ) und 251.142 Da ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_8 - 2\text{H}_2\text{O}$ ) beobachtet. Schwächer traten die Signale bei  $m/z$  317.190 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 299.178 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 283.168 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6 - \text{H}_2\text{O}$ ), 283.145 ( $\text{MH}^+ - 3\text{H}_2\text{O} - \text{C}_3\text{H}_6$ ), 265.157 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6 - 2\text{H}_2\text{O}$ ), 247.147 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_6\text{H}_6 - 3\text{H}_2\text{O}$ ) und 233.131 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_8 - 3\text{H}_2\text{O}$ ) auf. Es treten also ausgehend von der einen benzylich geschützten und den zwei freien Hydroxylgruppen des Estriolethers insgesamt drei Teile Wasser aus dem Molekül aus sowie die neutralen Fragmente der Summenformeln  $\text{C}_7\text{H}_8$  und  $\text{C}_6\text{H}_6$ , die den organischen Molekülen Toluol bzw. Benzol gleichzusetzen sind. Auffallend ist sowohl die Abspaltung von  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  nach der ersten und zweiten Wasserabtrennung als auch schwach die von  $\text{C}_3\text{H}_6$ , was durch MS/MS-Messungen veranschaulicht wurde.

5. Ergebnisse

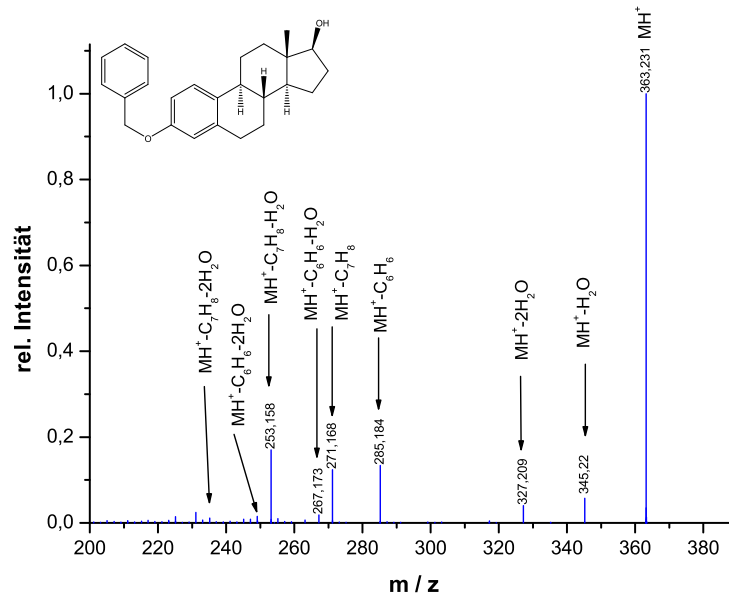


Abbildung 5.25. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

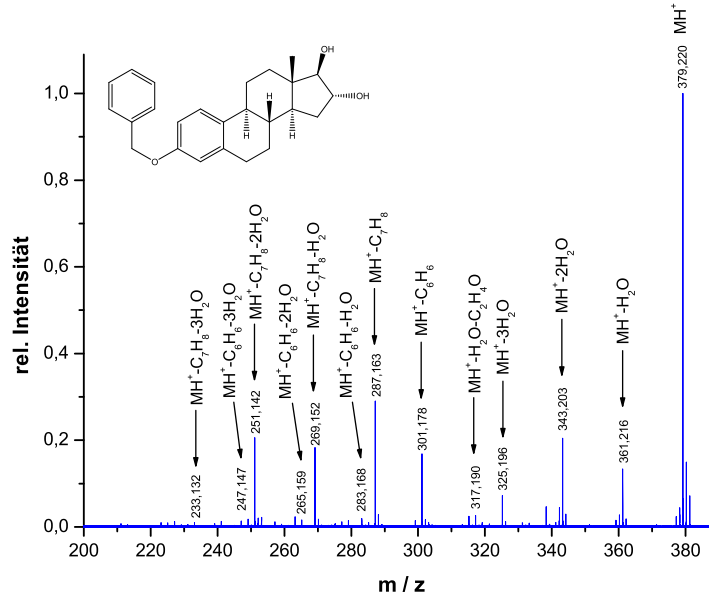


Abbildung 5.26. – Collision-Cell-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

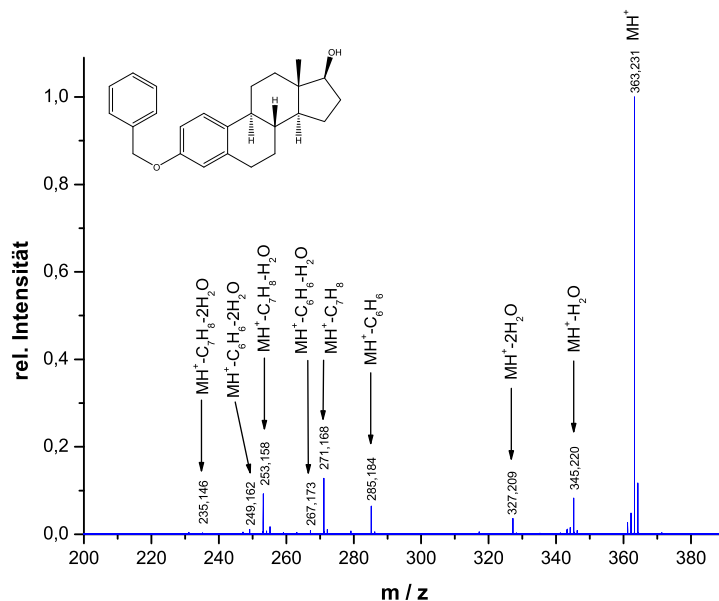


Abbildung 5.27. – Collision-Cell-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

Analoge Fragmentierungen sind im On-resonance-Spektrum (Abb. 5.25) des Estradiolbenzylethers (**3a**) auszumachen. Ausgehend vom Molekülionensignal bei  $m/z$  363.231 sind die Fragmente der Massen 345.220 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 327.209 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 285.184 (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 271.168 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>), 253.158 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-H<sub>2</sub>O) sowie mit geringerer Intensität 301.193 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O), 267.173 (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O), 249.162 (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-2H<sub>2</sub>O), 235.146 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-2H<sub>2</sub>O) und 231.116 Da (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>) zu erkennen. Es fehlen verständlicherweise die dritte Wasserabspaltung sowie die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O-Differenz zur zweiten.

Daraufhin wurden beide Substanzen an anderer Stelle im FT-MS, direkt hinter dem Quadrupol in der Collision Cell, also signifikant kürzer nach Bildung ihrer Molekülionen in der Quelle, ebenfalls durch CID fragmentiert und vom Zerfall Spektren aufgezeichnet, wie sie in den Abb. 5.26 und 5.27 dargestellt sind. Man erkennt im Wesentlichen bis auf eine kleine Intensitätsabnahme der kleineren Fragmente der Benzylether keine Unterschiede der Dissoziationen zwischen der CID in der Kollisionskammer und der in der ICR-Zelle des Systems.

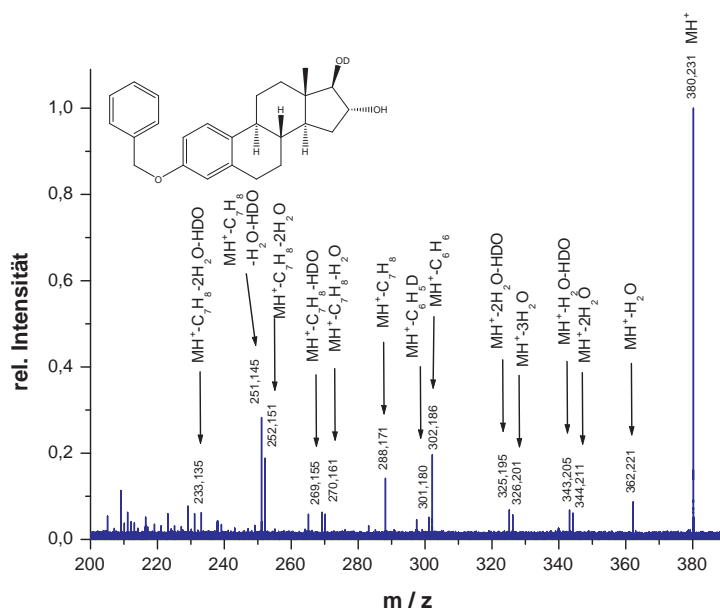


Abbildung 5.28. – On-resonance-CID-Spektrum vom monodeutierten Estriolbenzylether.

### Deuterte Benzylether

Nach der Analyse der Ergebnisse, die aus den Spektren der Benzylether gewonnen worden waren, wurden die entsprechenden Ether zur weiteren Untersuchung deuteriert, um aus sich auftretenden Massendifferenzen genauere Aussagen über die Art und Weise der Fragmentierung treffen zu können. Im folgenden soll auf das Spektrum des mono-deutierten Estriolbenzylethers (**4c**, Abb. 5.28) näher eingegangen werden, das explizitere und klarere Signale zeigt als das des di-deutierten. Ausgehend vom an Position 17 deutierten d<sub>1</sub>-MH<sup>+</sup>-Ion bei  $m/z$  380.231 ist die Eliminierung von bis zu drei Wassermolekülen [362.221 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 344.211 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 326.201 (MH<sup>+</sup>-3H<sub>2</sub>O)] bzw. von bis zu zwei Molekülen H<sub>2</sub>O und einem HDO [343.205 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-HDO), 325.195 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O-HDO)] beobachtbar. Weiterhin ist ein Verlust von C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>D und C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> [302.186 (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 301.180 (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>D), 288.171 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>)] mit folgender Wasser- und HDO-Abspaltung zu erkennen [270.161 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-H<sub>2</sub>O), 269.155 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-HDO), 252.151 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-2H<sub>2</sub>O), 251.145 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-H<sub>2</sub>O-HDO), 233.135 (MH<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>-2H<sub>2</sub>O-HDO)].

Die Isotopierung des Estradiolethers (**4a**) mündete in analogen Fragmentierungen (s. Abb. 5.29), die so auch erwartet worden sind: 364.249 (MH<sup>+</sup>), 346.237 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 345.231 (MH<sup>+</sup>-HDO), 328.226 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 327.220 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-HDO), 286.199

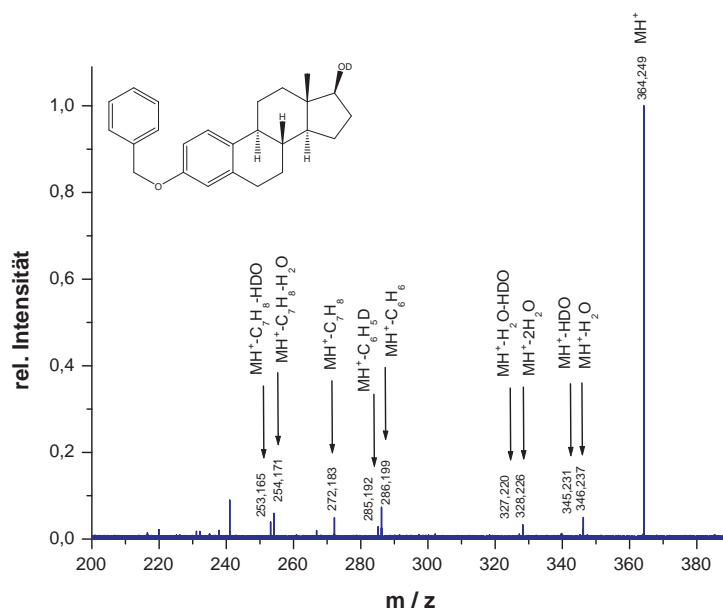


Abbildung 5.29. – On-resonance-CID-Spektrum vom deuterierten Estradiolbenzylether.

( $\text{MH}^+\text{-C}_6\text{H}_6$ ), 285.192 ( $\text{MH}^+\text{-C}_6\text{H}_5\text{D}$ ), 272.183 ( $\text{MH}^+\text{-C}_7\text{H}_8$ ), 254.171 ( $\text{MH}^+\text{-C}_7\text{H}_8\text{-H}_2\text{O}$ ), 253.165 ( $\text{MH}^+\text{-C}_7\text{H}_8\text{-HDO}$ ). Die Aufspaltung der ESI-Signale lässt sich dabei durch die Überlagerung eines schnellen Protonenaustauschprozesses mit flüchtigen Solvensbestandteilen und die bestimmten spezifischen Fragmentierungen rechtfertigen. Auf die Nutzung von vollständig deuterierten Lösemitteln wurde verzichtet, um zwischen protonierten und deuterierten ESI-Spezies ( $[\text{d-M}+\text{H}]^+$  oder  $[\text{M}+\text{D}]^+$ ) unterscheiden zu können. Eine Überlagerung der Signale der deuterierten Spezies mit Satelliten- $^{13}\text{C}$ -Ionen kann mit Hilfe der ICR-MS-Messgenauigkeit (Der Unterschied zwischen  $^{13}\text{C}$  und  $^{12}\text{C}$  beträgt 1.004 Da, der zwischen D und H 1.008 Da.) und über die unterschiedlichen Ionenhäufigkeiten ausgeschlossen werden (mono-deuterierter Estriolbenzylether:  $A(m/z\ 379) : A(m/z\ 380) : A(m/z\ 381) = 1.00 : 0.97 : 0.37$  – nicht-deuterierter Estriolbenzylether:  $A(m/z\ 379) : A(m/z\ 380) : A(m/z\ 381) = 1.00 : 0.23 : 0.03$ ). Abschließend sollte angemerkt sein, dass die NMR-Untersuchungen (s. Abschnitt 7.4) eine vollständige Deuterierung der Hydroxylgruppen nahelegen.

## Benzoate

Zum besseren Verständnis des Fragmentierungsverhaltens der Estrogenbenzylether (**3**) wurden die analogen Benzoate des Estriols und Estradiols (**2**) vermessen. Sie sind ebenfalls in der Lage, zwischen Etherrest und Steroidgrundgerüst einen stabilisierten Sechs-

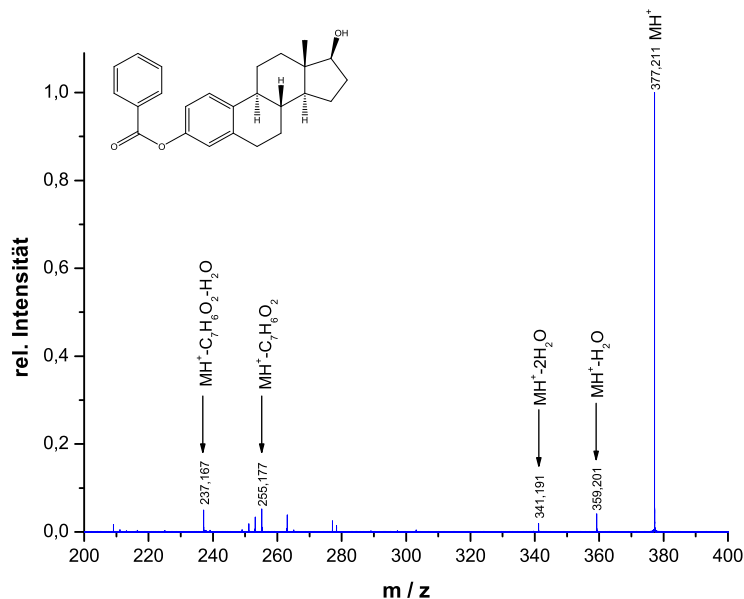


Abbildung 5.30. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzoat.

ring zu bilden. Das Spektrum des Estriolbenzoats (**2b**) zeigt neben dem Quasimolekülion  $\text{MH}^+$  bei 393.210 die Fragmente 375.199 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 357.189 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ), 339.178 ( $\text{MH}^+ - 3\text{H}_2\text{O}$ ), 331.173 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 271.172 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ) und 253.161 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}$ ), also erneut bis zu drei Wasserabspaltungen sowie ein Ablösen des Etherrestes vom Gerüst. Gleiches Verhalten zeigt das Estradiolbenzoat (**2a**, Abb. 5.30) mit Signalen der Massen 377.211 ( $\text{MH}^+$ ), 359.201 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 341.191 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ), 255.177 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ) und 237.167 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}$ ).

### Allylether

Als nächstes wurden die Allylether der Estrogene untersucht, deren  $\text{MH}^+$ -Ionen die Werte  $m/z$  329.211 bzw. 313.215 besitzen. Der allylische Rest erlaubt aufgrund seiner Länge immer noch eine eventuelle Stabilisierung über einen Sechsring mit dem aromatischen Ring A der Steroide als Grundlage für potentielle Umlagerungen, weist zugleich aber aufgrund der Doppelbindung eine stärkere strukturelle Verwandtschaft mit dem Benzylrest auf als bspw. der ebenfalls untersuchte Propylrest.

Im On-resonance-Spektrum des Estriol-Allylethers (**5b**, Abb. 5.31) ist deutlich das  $\text{MH}^+$ -Signal zu erkennen sowie bei  $m/z$  293.190 die zweifache Wasserabspaltung, während die erste bei 311.199 Da schwächer erscheint als erwartet. Dementsprechend ist die mögliche dritte  $\text{H}_2\text{O}$ -Eliminierung bei  $m/z$  275.179 auch nur äußerst schwach zu be-



obachten und tritt erst bei der On-resonance-CID des vorisolierten Fragmentes bei  $m/z$  311.199 in der ICR-Zelle verstärkt hervor. Das Fragment scheint somit aus letzterem hervorgegangen zu sein, ebenso wie das bei  $m/z$  267.174 nach weiterer Abspaltung von  $C_2H_4O$ . Erkennbar ist jedoch eine erhöhte Abtrennungstendenz des  $C_3H_6$ -Fragmentes, schon direkt aus dem Molekülion und nicht nur als Folge einer vorher erfolgten Wasserabspaltung, da es im Falle des Allylethers auch das Analogon zur  $C_7H_8$ -Abspaltung der Benzylether bildet. Ein intensiviertes Auftreten von  $C_2H_4$ -Verlusten vergleichbar mit dem oben genannten Benzolfragment ist dagegen nicht zu erkennen. Ähnlich sieht das entsprechende Collision Cell-CID-Spektrum aus: Während das Ion des protonierten Moleküls bei  $m/z$  329.211 erkennbar hervortritt, wie auch das Signal bei 293.190 ( $MH^+ - 2H_2O$ ), ist ein Signal bei 275.179 Da nicht auszumachen, allerdings bei  $m/z$  287.164 erneut die Abtrennung von  $C_3H_6$ .

In den Estradiolallyletherspektren (5a) (Abb. 5.32 und 5.33) ist die interessante zweite Wasserabspaltung dagegen bei  $m/z$  277.193 sowohl nach On-resonance- als auch CC-CID direkt zu sehen. Darüberhinaus gleichen sich beide Spektren im Auftreten des  $MH^+$ -Ions bei 313.215 Da und des Signals bei  $m/z$  295.204 ( $MH^+ - H_2O$ ), sowie der  $C_3H_6$ -Eliminierung, nicht nur nach der ersten Wasserabspaltung, die das Signal bei  $m/z$  253.158 erklärt, sondern auch aus dem protonierten Molekülion bei 271.167 Da. Ebenso erscheint im On-resonance-CID-Spektrum bei 285.185 Da in Analogie zur Benzolabspaltung des Benzylestradiolethers eine  $C_2H_4$ -Differenz.

## Propylether

Die an Position 3 propylveretherten Analytsubstanzen (Abb. 5.34) sind zwar noch in der Lage, den besagten Sechsring zur Stabilisierung zu bilden, ihnen fehlt jedoch als Strukturelement die Doppelbindung, was sich in den aufgenommenen Spektren bereits auswirkt.

Im Falle des Estriolethers (**6b**) ist weder nach einer On-resonance- noch nach Collision Cell-CID ein Auftreten des aus der dreifachen Wasserabspaltung hervorgehenden Fragmentes beim theoretischen  $m/z$ -Wert 277.196 zu beobachten. Lediglich Signale der Massen 331.227 ( $MH^+$ ), 313.216 ( $MH^+ - H_2O$ ), 295.206 ( $MH^+ - 2H_2O$ ), 271.169 ( $MH^+ - H_2O - C_3H_6$ ), 269.190 ( $MH^+ - H_2O - C_2H_4O$ ) und 253.158 Da ( $MH^+ - 2H_2O - C_3H_6$ ) erscheinen in den Spektren. Die beiden CID-Spektren des Estradiolpropylethers (**6a**) unterscheiden sich ebenso wenig und weisen vergleichbare Fragmente wie folgt auf: 315.232 ( $MH^+$ ), 297.221 ( $MH^+ - H_2O$ ), 273.185 ( $MH^+ - C_3H_6$ ) und 255.174 ( $MH^+ - H_2O - C_3H_6$ ) Da.

5. Ergebnisse

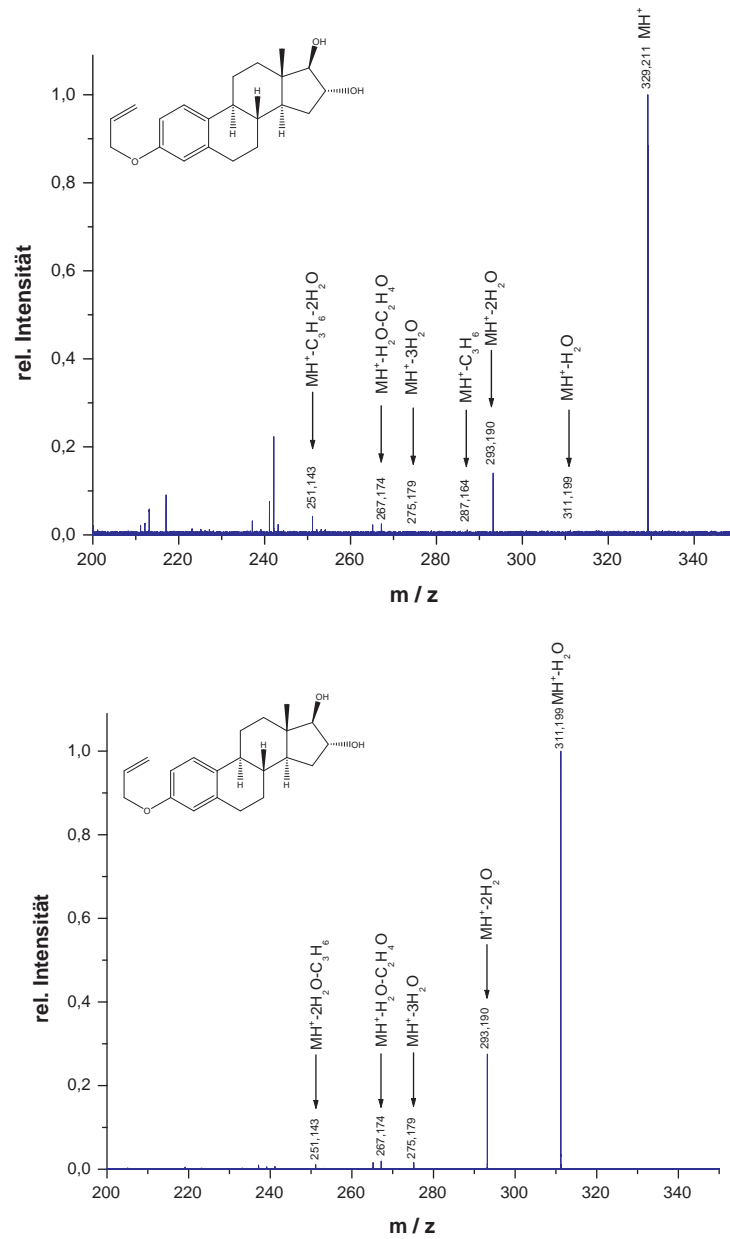


Abbildung 5.31. – On-resonance-CID-Spektrum von Estriolallylether nach Isolierung des  $MH^+$ -Ions der Masse 329.211 Da (oben) und der des ersten Fragmentes bei 311.201 Da (unten).

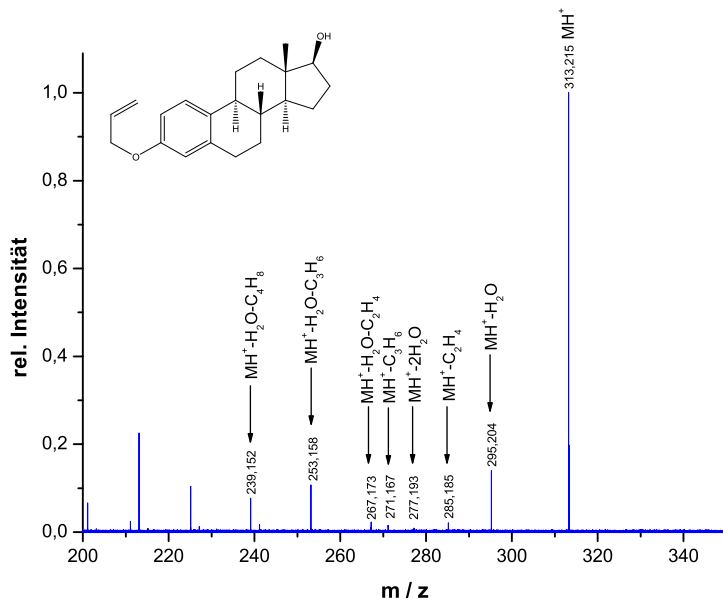


Abbildung 5.32. – On-resonance-CID-Spektrum von Estradiolallylether.

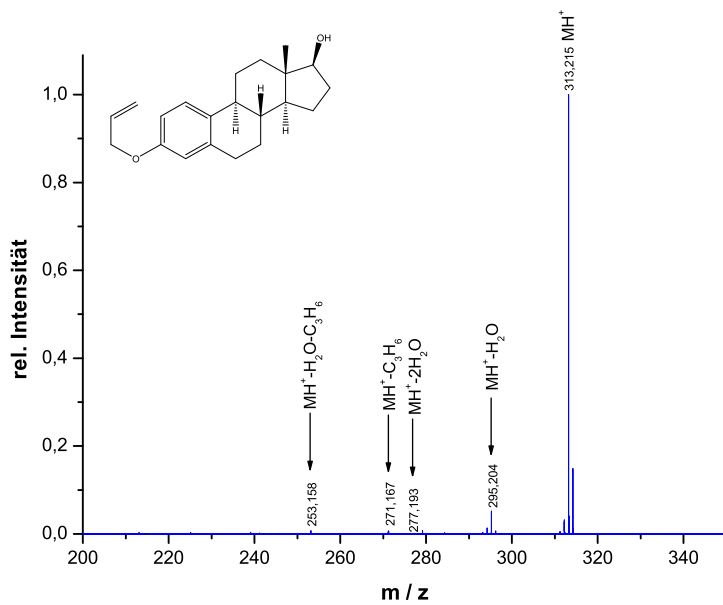


Abbildung 5.33. – Collision-Cell-CID-Spektrum von Estradiolallylether.

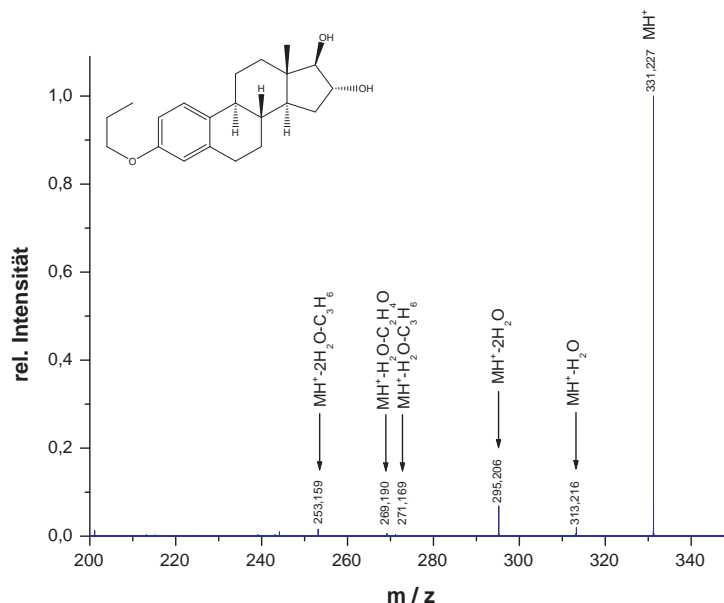


Abbildung 5.34. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolpropylether.

Die letztmögliche Wasserabspaltung ist also auch hier nicht zu erkennen, zudem fehlt wie erwartet die Abtrennung von C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O. Für die vollständige Abspaltung aller am Steroid vorhanden Hydroxylgruppen dient also eher ein ungesättigtes System in Kombination mit dem Sechsring als Grundlage anstatt der alleinigen Ringstabilisierung.

### Ethylether

Die Collision Cell- und On-resonance-Spektren beider Estrogenethylether unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander, die des ethylierten Estriols (**7b**) zeigen Signale bei  $m/z$  317.211 (MH<sup>+</sup>), 299.198 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 281.188 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 255.173 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) sowie schwächer bei 253.157 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), 239.142 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>) und 225.126 Da (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O-2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). Es wird also lediglich zweimal Wasser sowie einmal, ausgehend vom wiederum schwach intensiven 299.198-Fragment, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O abgespalten, und im geringen Ausmaße C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Analog fragmentiert der Diolether (**7a**), wie die Signale bei  $m/z$  301.214 (MH<sup>+</sup>), 283.204 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 255.173 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), 241.158 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>), 227.142 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) und 213.127 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) dokumentieren, jedoch ohne das zweite Mal Wasser oder C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O abzugeben.

## Methylether

Korrespondierend verhalten sich die Estrogenmethylether. Sowohl nach Collision Cell- als auch On-resonance-CID sind in den Spektren des Estriolethers (**8b**) die protonierten Moleküle ( $MH^+$ ) der Masse 303.195 Da zu erkennen sowie die Fragmente der ersten und zweiten Wasserabspaltung bei 285.184 bzw. 267.173 Da. Jene sind im Collision Cell-CID-Spektrum mit verschwindend geringer Intensität zu beobachten. Bei 241.159 Da erscheint das Signal der  $C_2H_4O$ -Abtrennung aus dem Fragment bei  $m/z$  285.185. Zudem treten schwach einige  $C_2H_4$ - bzw.  $C_3H_6$ -Abtrennungen bei 239.142 ( $MH^+-2H_2O-C_2H_4$ ), 225.126 ( $MH^+-2H_2O-C_3H_6$ ) und 211.111 ( $MH^+-2H_2O-2C_2H_4$ ) Da auf. Entsprechende Abspaltungen weist der Estradiolmethylether (**8a**) auf. So zeigt sein Spektrum nach Collision Cell-CID lediglich Peaks bei  $m/z$  287.199 ( $MH^+$ ) und 269.189 ( $MH^+-H_2O$ ), sowie nach On-resonance CID zusätzlich bei 213.127 ( $MH^+-H_2O-2C_2H_4$ ) und 171.080 ( $MH^+-H_2O-2C_2H_4-C_3H_6$ ).

## Estradiol und Estriol

Zum Vergleich und besseren Verständnis der Fragmentierungen innerhalb des Steroidgrundgerüsts wurden auch Kollisionsspektren der reinen Edukttestrogene Estriol (**9b**) und Estradiol (**9a**) aufgezeichnet. Die Estriolspektren weisen Signale bei 289.175 ( $MH^+$ ), 271.165 ( $MH^+-H_2O$ ) und 253.156 ( $MH^+-2H_2O$ ) sowie nach Isolierung in Quadrupol oder Zelle bei 271.165 ( $MH^+-H_2O$ ) auf; Estradiol der Masse 273.184 ( $MH^+$ ) Da fragmentiert alleinig zu  $m/z$  255.173 ( $MH^+-H_2O$ ).

### 5.3.2. IRMPD nach pos. ESI

Zur Unterstreichung der Ergebnisse, die durch strahlungslose Dissoziation der Ionen im CID-Prozess erhalten wurden, sind die Proben nachfolgend mittels Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD) fragmentiert worden.

## Phenethylether

Bei IR-Bestrahlung (vgl. den Spektrenanhang A.4) zerbricht das Quasimolekülion  $MH^+$  des Estriolphenethylethers (**1b**) bei 393.250 Da zu Fragmenten folgender Massen 375.239 ( $MH^+-H_2O$ ), 357.228 ( $MH^+-2H_2O$ ), 315.201 ( $MH^+-C_6H_6$ ), 271.174 ( $MH^+-C_8H_{10}O$ ) und 253.158 ( $MH^+-H_2O-C_8H_{10}O$ ). Der Verlust von zwei neutralen Wassermolekülen aus dem

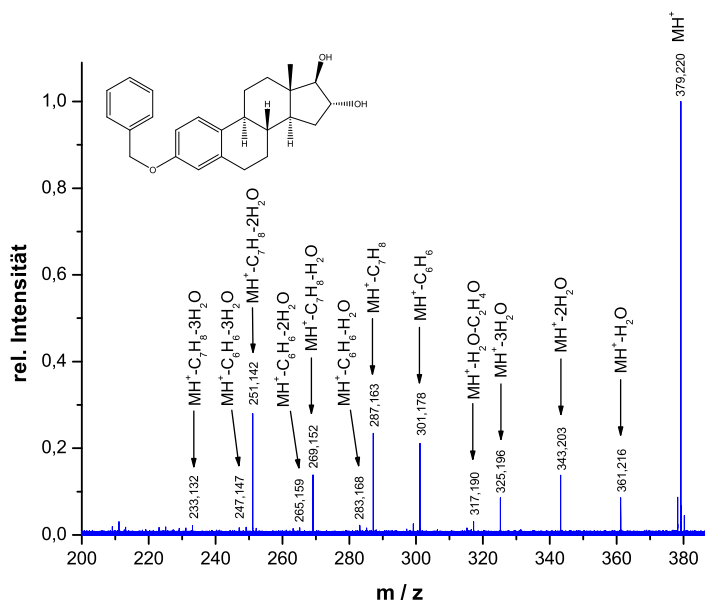


Abbildung 5.35. – IRMPD-Spektrum vom Estriolbenzylether.

Steroid sowie ein Bruch des Etherrestes jeweils direkt an den beiden aromatischen Ringssystemen ist ersichtlich. Somit gleicht das IRMPD-Spektrum näherungsweise dem mittels On-resonance-CID erhaltenen. Der Estradiolphenethylether (**1a**) weist ein ähnliches Verhalten auf, es verlässt lediglich ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül das Gerüst bei 377.254 Da ( $\text{MH}^+$ ) hin zum Fragment bei 359.243 Da ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), deutlich sind ebenfalls die Fragmente bei  $m/z$  299.205 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6$ ), 281.194 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6-\text{H}_2\text{O}$ ) und 255.178 ( $\text{MH}^+-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ ).

### Benzylether

Die Isolierung des protonierten Estriolbenzylethers  $\text{MH}^+$  der Masse 379.226 Da führte nach Bestrahlung durch den IR-Laser zu folgenden Fragmenten (s. Abb. 5.35): 361.216 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), 343.203 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}$ ), 325.196 ( $\text{MH}^+-3\text{H}_2\text{O}$ ), 301.178 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6$ ), 287.163 ( $\text{MH}^+-\text{C}_7\text{H}_8$ ), 269.152 ( $\text{MH}^+-\text{C}_7\text{H}_8-\text{H}_2\text{O}$ ) und 251.142 Da ( $\text{MH}^+-\text{C}_7\text{H}_8-2\text{H}_2\text{O}$ ) Da. Schwächer traten Signale bei  $m/z$  317.190 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 299.178 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 283.168 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6-\text{H}_2\text{O}$ ), 265.157 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6-2\text{H}_2\text{O}$ ), 247.147 ( $\text{MH}^+-\text{C}_6\text{H}_6-3\text{H}_2\text{O}$ ) und 233.132 ( $\text{MH}^+-\text{C}_7\text{H}_8-3\text{H}_2\text{O}$ ) auf.

Das Fragment bei 283.145 Da ( $\text{MH}^+-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ) trat im Vergleich zur resonanten Anregung und anschließenden Stoßfragmentierung hier nicht auf. Ausgehend von der benzylich geschützten und den zwei freien Hydroxylgruppen des Estriolethers werden insgesamt drei Wasserteilchen vom Molekül abgespalten sowie die neutralen Teile  $\text{C}_7\text{H}_8$

und  $C_6H_6$ , die Toluol bzw. Benzol gleichzusetzen sind. Auffallend ist sowohl die Abspaltung von  $C_2H_4O$  nach der ersten und zweiten Wasserabtrennung als auch schwach die von  $C_3H_6$ , was durch eine weitere Isolierung und Dissoziation der Fragmentionen veranschaulicht wurde. Die Fragmentierung des Estradiolbenzylethers (**3a**) verläuft analog, im Spektrum sind ausgehend vom Molekülionensignal bei  $m/z$  363.231 die Massen 345.220 ( $MH^+-H_2O$ ), 327.209 ( $MH^+-2H_2O$ ), 285.184 ( $MH^+-C_6H_6$ ), 271.168 ( $MH^+-C_7H_8$ ), 253.158 ( $MH^+-C_7H_8-H_2O$ ) sowie mit geringerer Intensität 267.173 ( $MH^+-C_6H_6-H_2O$ ), 249.162 ( $MH^+-C_6H_6-2H_2O$ ), 235.147 ( $MH^+-C_7H_8-2H_2O$ ) und 231.116 Da ( $MH^+-H_2O-C_2H_4O-C_2H_2-C_3H_6$ ) zu erkennen. Es fehlen verständlicherweise die dritte Wasserabspaltung sowie die  $C_2H_4O$ -Differenz zur zweiten, aber auch die zur ersten bei  $m/z$  301.193.

### Benzoate

Neben den Estrogenbenzylethern wurden ebenfalls die Benzoate des Estriols und Estradiols fragmentiert. Zu erkennen sind nach Bestrahlung wie in den On-resonance-CID-Spektren neben dem Quasimolekülion  $MH^+$  des Estriolbenzoats (**2b**) bei 393.210 die Fragmente 375.199 ( $MH^+-H_2O$ ), 357.189 ( $MH^+-2H_2O$ ), 339.178 ( $MH^+-3H_2O$ ), 331.171 ( $MH^+-H_2O-C_2H_4O$ ), schwach 271.172 ( $MH^+-C_7H_6O_2$ ) und 253.161 ( $MH^+-C_7H_6O_2-H_2O$ ), also erneut bis zu drei Wasserabspaltungen sowie ein Abbruch des Etherrestes am Gerüst. Gleiches Verhalten zeigt das Estradiolbenzoat (**2a**) mit Signalen der Massen 377.211 ( $MH^+$ ), 359.201 ( $MH^+-H_2O$ ), 341.191 ( $MH^+-2H_2O$ ), 255.177 ( $MH^+-C_7H_6O_2$ ) und 237.167 ( $MH^+-C_7H_6O_2-H_2O$ ).

### Allylether

Ebenso wie beim On-resonance-CID-Verfahren wurden als nächstes die Allylether der Estrogene mit den  $MH^+$ -Ionenmassen 329.211 bzw. 313.215 Da untersucht und mittels IR-Strahlung dissoziiert.

Im IRMPD-Spektrum des Estriol-Allylethers (**5b**, Abb. 5.36) sind ausgehend vom  $MH^+$ -Signal alle drei erwarteten Wasserabspaltungen zu erkennen, die erste schwächer bei  $m/z$  311.199 ( $MH^+-H_2O$ ), die zweite deutlicher bei  $m/z$  293.190 ( $MH^+-2H_2O$ ) sowie die dritte ebenfalls schwächer bei 275.179 Da ( $MH^+-3H_2O$ ). Bei Isolierung des Fragmentes bei  $m/z$  311 in der ICR-Zelle (Abb. 5.37) tritt sie stärker hervor. Das Fragment scheint somit aus letzterem hervorgegangen zu sein, ebenso wie das bei  $m/z$  267.174 nach weiterer Abspaltung von  $C_2H_4O$ . Erkennbar ist jedoch eine erhöhte Abtrennungstendenz

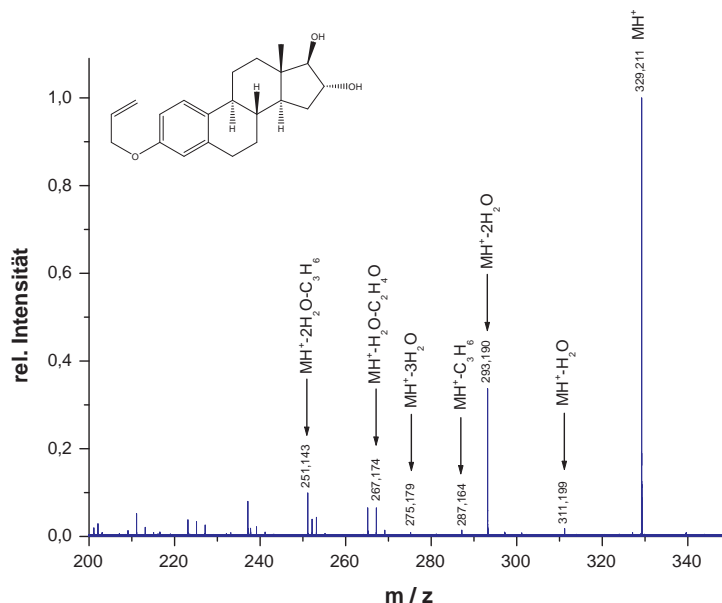


Abbildung 5.36. – IRMPD-Spektrum vom Estriolallylether.

des  $C_3H_6$ -Fragmentes - im Falle der Allylethers das Analogon zur  $C_7H_8$ -Abspaltung der Benzylether - aus dem Molekülion und nicht als Folge einer vorher erfolgten Wasserabspaltung im Vergleich zu den On-resonance-Spektren. Ein intensiviertes Auftreten von  $C_2H_4$ -Differenzen vergleichbar mit dem oben genannten Benzolfragment ist dagegen auch in den IRMPD-Spektren nicht zu erkennen.

Im IRMPD-Spektrum des Estradiolallylethers (**5a**, Abb. 5.38) ist die zweite Wasserabspaltung im Gegensatz zum On-resonance-Spektrum (Abb. 5.32) nicht zu erkennen. Beide Spektren gleichen sich im Auftreten des  $MH^+$ -Ions bei 313.215 Da und des Signals bei  $m/z$  295.204 ( $MH^+ - H_2O$ ) sowie der  $C_3H_6$ -Eliminierung nicht nur aus dem protonierten Molekülion bei 271.167 Da, sondern auch nach der ersten Wasserabspaltung bei  $m/z$  253.161. Das bereits im On-resonance-CID-Spektrum auftretende Analogon zur Benzolabspaltung des Benzylestradiolethylethers - die  $C_2H_4$ -Differenz hin zur Masse 285.185 Da - erscheint auch hier.

### Propylether

Im Gegensatz zu den allylisch veretherten Estrogenen wird bei den Estriol- und Estradiolpropylethern keine dritte Wasserabspaltung erwartet, da ihnen die Doppelbindung als Strukturelement fehlt. Sie wird auch nach IR-Bestrahlung vergleichbar zu den On-resonance-Spektren (Abb. 5.34) nicht beobachtet. Beide Spektren des Estriolallylethers



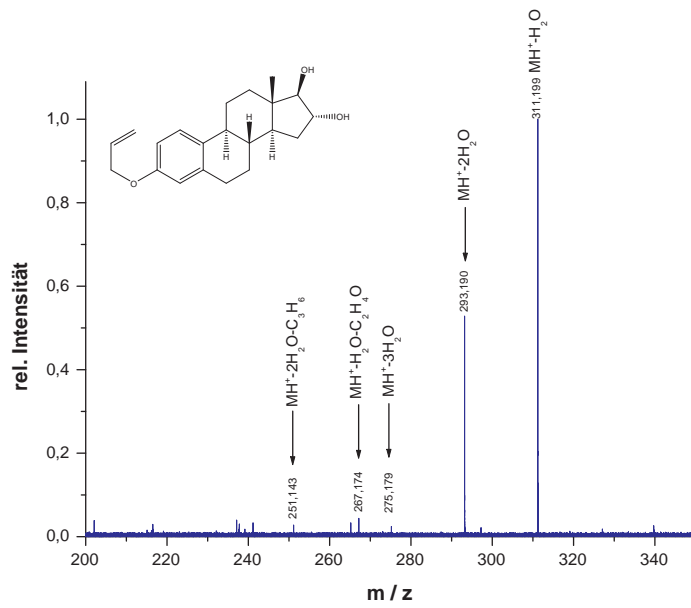


Abbildung 5.37. – IRMPD-Spektrum vom Estriolallylether: Fragmentierung nach der ersten Wasserabspaltung.

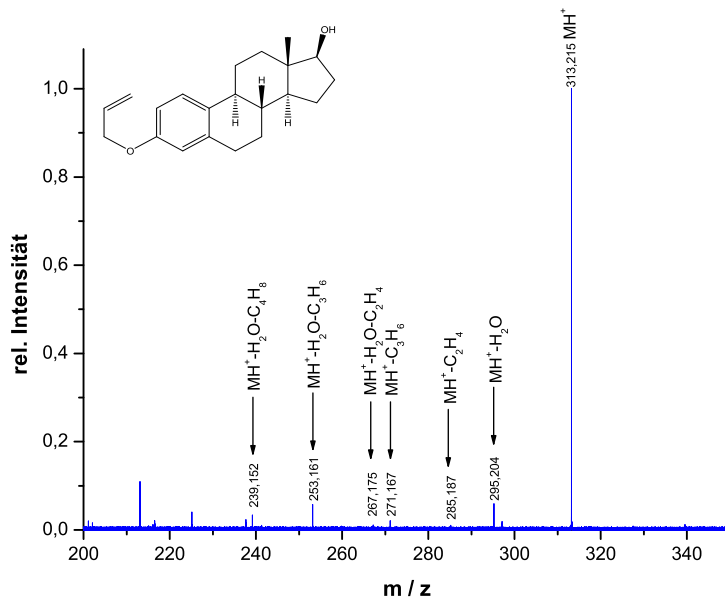


Abbildung 5.38. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolallylether.

## 5. Ergebnisse

(**6b**) ähneln sich sehr und erinnern zudem an das Collision-Cell-Spektrum, lediglich Signale der Massen 331.227 ( $\text{MH}^+$ ), 313.216 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), 295.206 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}$ ), 271.169 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ), 269.190 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ) und 253.159 Da ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ) wurden detektiert. Das Spektrum des Estradiolpropylethers (**6a**) ist mit den Signalen bei  $m/z$  315.232 ( $\text{MH}^+$ ), 297.221 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), 273.185 ( $\text{MH}^+-\text{C}_3\text{H}_6$ ) und 255.174 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ) dem entsprechenden On-resonance-Spektrum nahezu identisch. Die letztmögliche Wasserabspaltung ist also auch hier nicht zu erkennen, zudem fehlt wie erwartet die Abtrennung von  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ .

### Ethylether

Ebenso wurden erneut die 3-Ethyl- und Methylether des Estriols und Estradiols mittels IRMPD vermessen, die lediglich einen Fünf- und Vierring zu bilden vermögen, und daher niemals eine dritte bzw. zweite  $\text{H}_2\text{O}$ -Eliminierung zeigen sollten. Wiederum unterscheiden sich IRMPD- und On-resonance-Spektren beider Estrogenethylether nicht wesentlich voneinander, die des ethylierten Estriols (**7b**) zeigen Signale bei  $m/z$  317.211 ( $\text{MH}^+$ ), 299.198 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), 281.188 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}$ ), 255.173 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 253.157 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4$ ) sowie schwächer bei 239.142 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ) und 225.126 Da ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4$ ). Es wird also lediglich zweimal Wasser sowie einmal, ausgehend vom schwach intensiven 299.198-Fragment,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  abgespalten, und im geringen Ausmaße  $\text{C}_2\text{H}_4$ . Analog fragmentiert der Diolether (**7a**), wie die im Vergleich zum On-resonance-CID-Spektrum weniger auftretenden Signale bei  $m/z$  301.214 ( $\text{MH}^+$ ) und 283.204 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ) zeigen.

### Methylether

Die Estrogenmethylether verhalten sich äquivalent. Sowohl nach On-resonance-CID als auch IRMPD sind in den Spektren des Estriolethers (**8b**) die protonierten Moleküle ( $\text{MH}^+$ ) der Masse 303.195 Da zu erkennen. Die Fragmente der ersten und zweiten Wasserabspaltung bei 285.184 bzw. 267.173 Da sind im IRMPD intensiver als im On-resonance-CID-Spektrum. Bei  $m/z$  241.159 sind das Signal der  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ -Abtrennung aus dem 285-Fragment, bei 239.142 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4$ ), 225.126 ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6$ ) und 211.111 Da ( $\text{MH}^+-2\text{H}_2\text{O}-2\text{C}_2\text{H}_4$ ) zudem schwach einige  $\text{C}_2\text{H}_4$ - bzw.  $\text{C}_3\text{H}_6$ -Abtrennungen zu beobachten. Entsprechende Abspaltungen weist der Estradiolmethylether (**8a**) auf, so zeigt sein Spektrum nach IRMPD lediglich Peaks bei  $m/z$  287.199 ( $\text{MH}^+$ ) und 269.189 ( $\text{MH}^+-\text{H}_2\text{O}$ ).

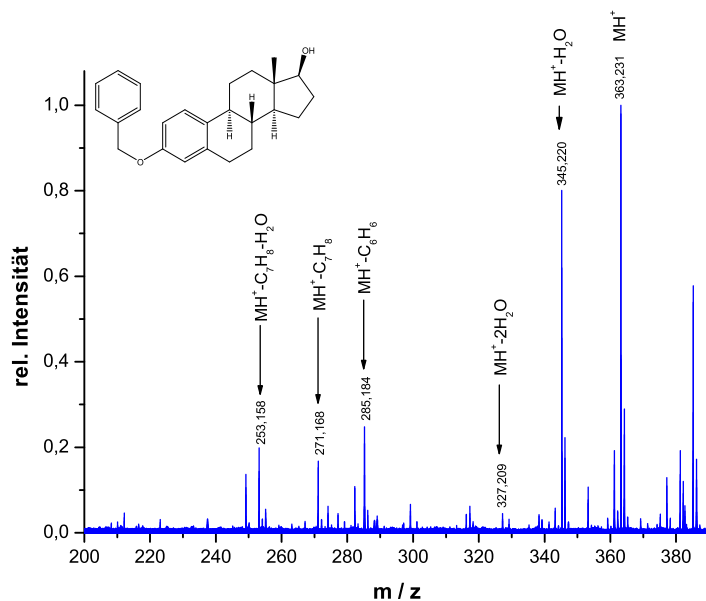


Abbildung 5.39. – ECD-Spektrum vom Estradiolbenzylether mit 1.0 A Kathodenstrom.

### Estradiol und Estriol

Zum Vergleich der Fragmentierungen innerhalb des Steroidgrundgerüsts wurden ebenso die IRMPD-Spektren der reinen Eduktestrogene Estriol (**9b**) und Estradiol (**9a**) aufgezeichnet. Das Estriolspektrum weist Signale bei 289.175 ( $MH^+$ ), 271.165 ( $MH^+-H_2O$ ) und 253.156 ( $MH^+-2H_2O$ ) mit leicht unterschiedlicher Intensität im Vergleich zum On-resonance-Spektrum auf. Estradiol der Masse 273.184 Da ( $MH^+$ ) fragmentiert alleinig zu  $m/z$  255.173 ( $MH^+-H_2O$ )

### 5.3.3. ECD nach pos. ESI

Neben der *Collision-induced Dissociation* und der IR-Multiphotonendissoziation wurde die *Electron Capture Dissociation* als weitere Fragmentierungsmethode auf die Estrogenbenzylether angewandt, um ggf. zu weiteren komplementären Ergebnissen zu kommen.

Erkennbar sind jedoch u. a. in den bei 1 A Kathodenstrom aufgenommenen Spektren des Estradiol- (**3a**, Abb. 5.39) und Estriolbenzylethers (**3b**, Abb. 5.40) die bekannten Fragmente:  $m/z$  363.231 ( $MH^+$ ), 345.220 ( $MH^+-H_2O$ ), 327.209 ( $MH^+-2H_2O$ ), 285.184 ( $MH^+-C_6H_6$ ), 271.168 ( $MH^+-C_7H_8$ ) und 253.158 ( $MH^+-C_7H_8-H_2O$ ) im Falle des Diolbenzylethers, analog die Massen 379.226 ( $MH^+$ ), 361.217 ( $MH^+-H_2O$ ), 343.206 ( $MH^+-2H_2O$ ), äußerst schwach 325.195 ( $MH^+-3H_2O$ ), 301.178 ( $MH^+C_6H_6$ ), 287.163 ( $MH^+-$

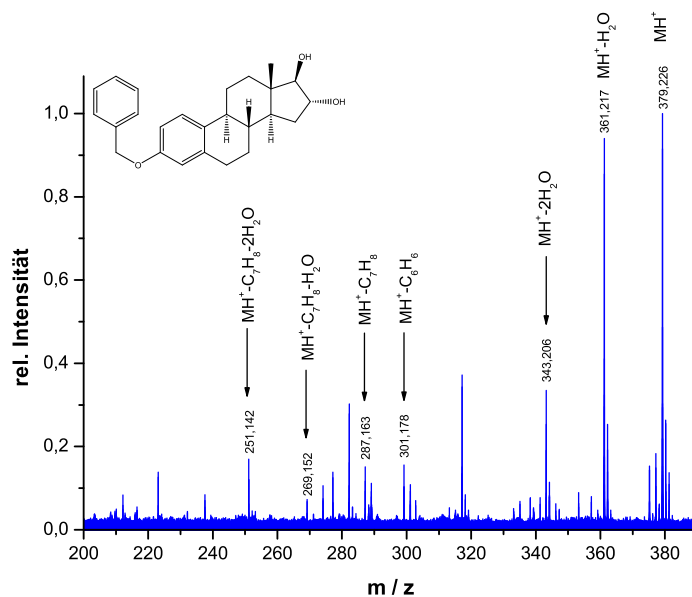
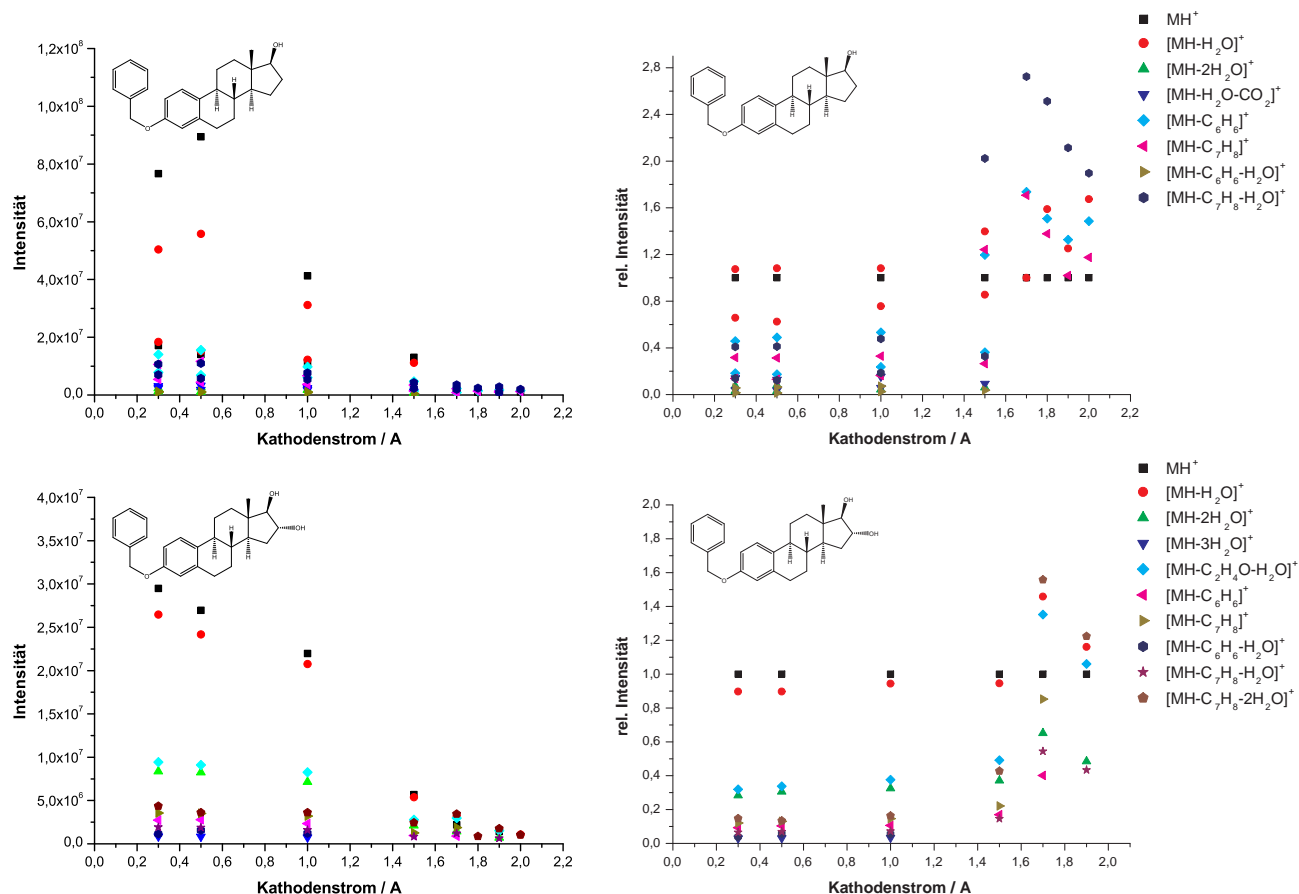


Abbildung 5.40. – ECD-Spektrum vom Estriolbenzylether mit 1.0 A Kathodenstrom.

$C_7H_8$ ), 269.152 ( $MH^+C_7H_8H_2O$ ) und 251.142 Da ( $MH^+-C_7H_8-2H_2O$ ) beim Trioether. Weitere Signale sind nur schwach im Untergrund zu sehen oder können z. B. Na-Addukten zugewiesen werden.

Die Auftragung der Ionenintensitäten der ECD-Fragmentierung bei unterschiedlichen Kathodenstromstärken von 0.3 bis 2.0 A führt zu Abb. 5.41. Deutlich wird bei beiden Estrogenethern, sowohl dem Benzyloxyestradiol als auch dem -estriol, die erwartete Abnahme der absoluten Ionenintensitäten der Quasimolekülonen  $MH^+$  sowie der daraus entstandenen Fragmente. Die Erhöhung der Kathodenstromstärke führt zu einer gesteigerten Emission an Elektronen aus der Kathode, die letztlich die einfach geladenen  $MH^+$ -Ionen und ihre Abkömmlinge neutralisiert (und ggf. fragmentiert). Dabei fallen die Signale der  $MH^+$ - und  $[MH-H_2O]^+$ -Ionen deutlich stärker ab als die der übrigen Fragmente, da sie auch bei schwächeren Stromstärken statistisch vermehrt vorhanden gewesen sind.

Die relativen Intensitäten der Signale, bezogen auf die ursprüngliche Quasimolekülonenintensität, nehmen mit zunehmender Kathodenstromstärke stärker zu. Sie weisen auf die neben der Neutralisation (doch) erhöhte Fragmentierung der Quasimolekülonen hin, insbesondere in Bezug auf das Erscheinen der vermeintlichen Toluolverluste ( $MH^+-C_7H_8$ ). Letztere treten gerade beim Trioether noch ausgeprägter hervor als die Ionen der Benzolabspaltungen ( $MH^+-C_6H_6$ ). Während die ein- und zweifachen Wasserabspaltungen



**Abbildung 5.41.** – Einfluss des Kathodenstroms auf die absolute (links) und relative (rechts) Ionenintensität von Estradiol- (oben) und Estriolbenzylether (unten).

( $MH^+-1/2H_2O$ ) nur leicht durch einen höheren Kathodenstrom verstärkt werden, hat die Intensität der kombinierten Signale der Abspaltungen von Wasser und eines aromatischen Ringsystems merklich zugenommen.

### 5.3.4. On-resonance-CID nach neg. ESI

Neben der Fragmentierung nach einer positiven Ionisierung durch Protonenanlagerung wurden ausgewählte Estrogene negativ durch eine Protonenabstraktion ionisiert, resonant angeregt und dissoziiert. Die Ergebnisse sind im folgenden genannt.

## Benzylether

Neben dem  $[M-H]^-$ -Ion bei 361.232 Da sind im Übersichtsspektrum (Abb. 5.42) des Estradiolbenzylethers (**3a**) eine einfache Wasserstoffmolekülabsplaltung bei  $m/z$  359.216 ( $[M-H]^- - H_2$ ), die nachfolgende Abtrennung von  $C_7H_7$  ( $[M-H]^- - H_2 - C_7H_7$ ), die beide im On-resonance-CID-Spektrum bestätigt werden (Abb. 5.43 / 5.44), sowie das Signal einer Wasseranlagerung bei  $m/z$  379.242 ( $[M-H]^- + H_2O$ ) zu erkennen. Das Wasseraddukt wurde in Abb. 5.45 erneut dissoziiert.

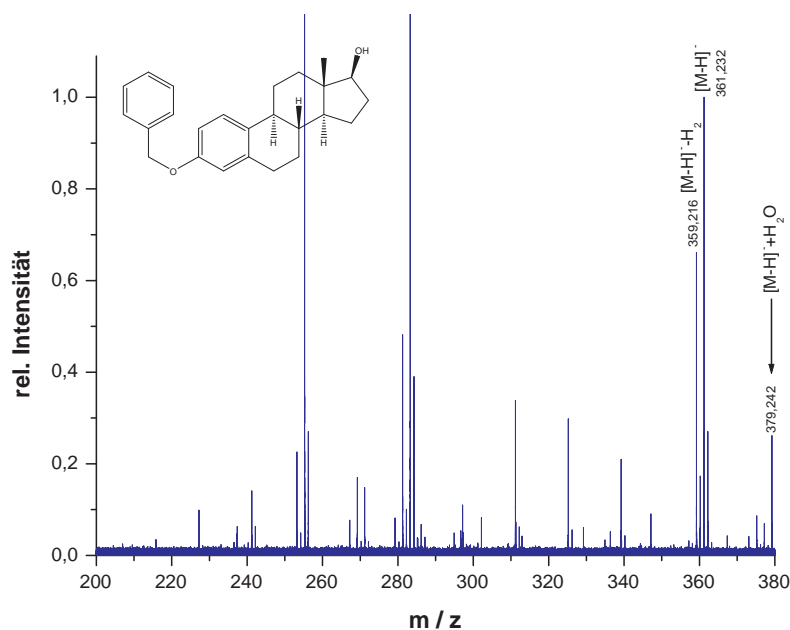


Abbildung 5.42. – Übersichtsspektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI

Das On-resonance-CID-Spektrum des Estriolbenzylethers (**3b**) nach negativer Elektrospray-Ionisierung (Abb. 5.47) zeigt ausgehend vom  $[M-H]^-$ -Ion bei 377.228 Da wie beim entsprechenden Diol eine Wasserstoffmolekülabsplaltung bei  $m/z$  375.212 ( $[M-H]^- - H_2$ ) sowie die Abtrennung von  $C_7H_7$  ( $[M-H]^- - C_7H_7$ ) bei  $m/z$  286.169. Hinzu kommen Fragmente der Massen 359.207 ( $[M-H]^- - H_2O$ ) – die erste erwartete Wasserabsplaltung –, 357.200 ( $[M-H]^- - H_2 - H_2O$ ), 285.161 ( $[M-H]^- - C_7H_8$ ), 284.153 ( $[M-H]^- - H_2 - C_7H_7$ ), 256.157 ( $[M-H]^- - H_2 - C_7H_7 - CO$ ), 228.120 ( $[M-H]^- - H_2 - C_7H_7 - CO - C_2H_4$ ) und 227.117 ( $[M-H]^- - H_2 - C_7H_8 - CO - C_2H_4$ ) Da. Im Übersichts

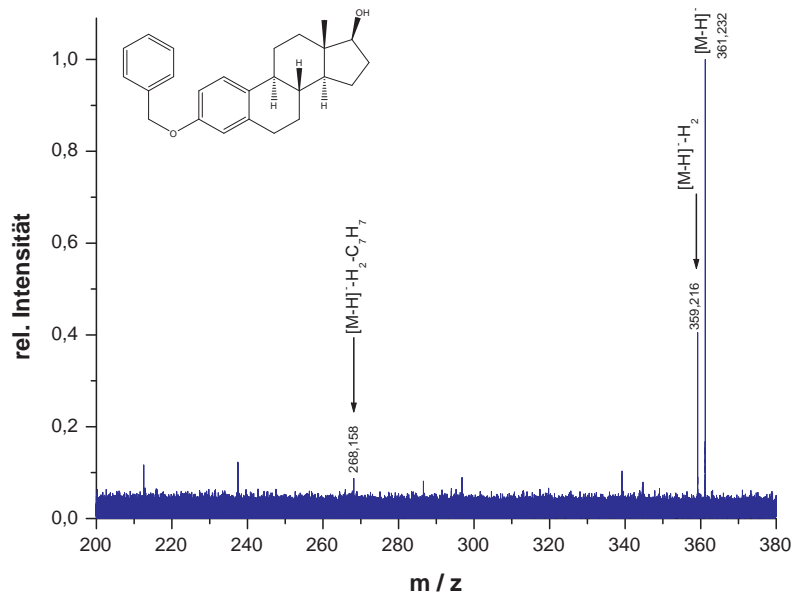


Abbildung 5.43. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.

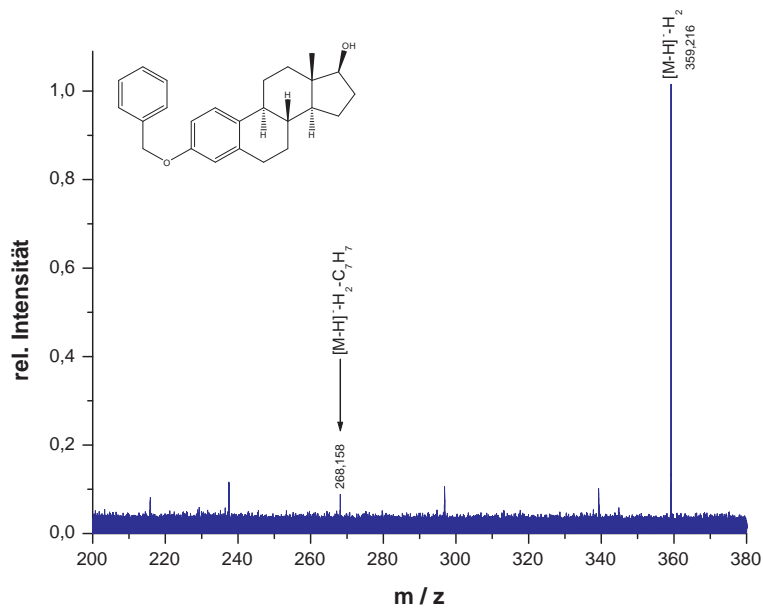


Abbildung 5.44. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

## 5. Ergebnisse

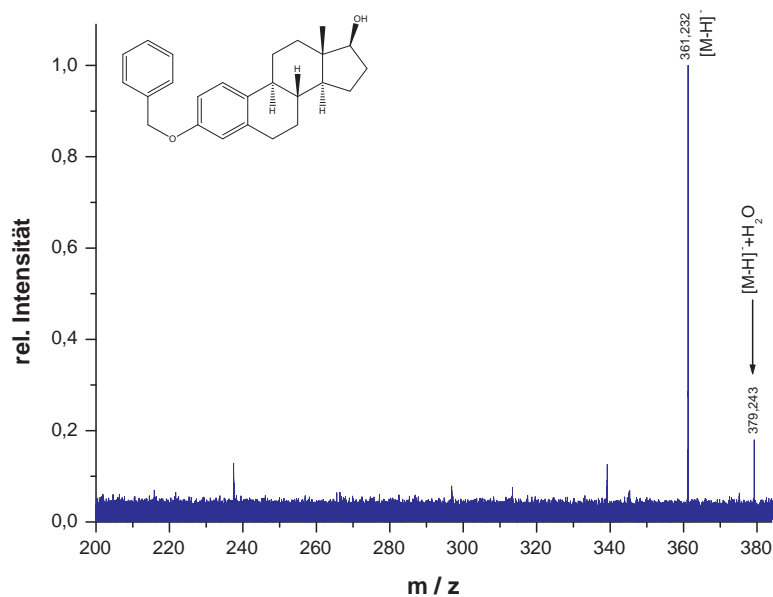


Abbildung 5.45. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung des Wasseradduktes.

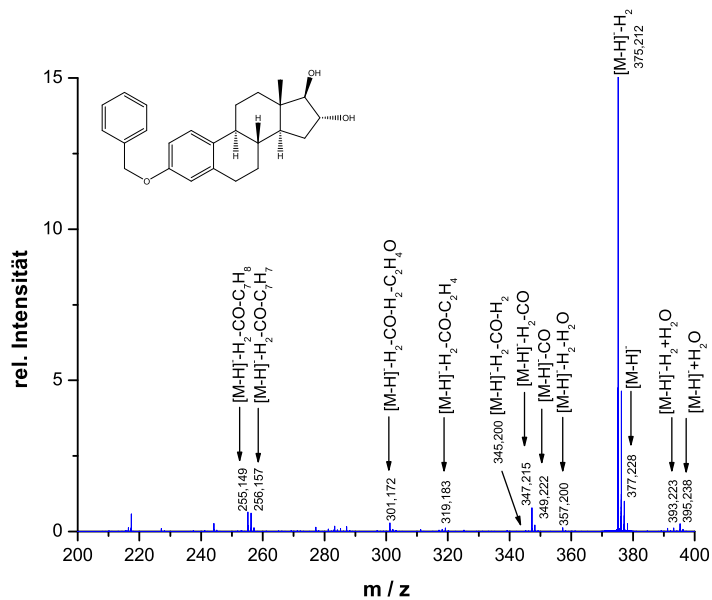


Abbildung 5.46. – Übersichts-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.



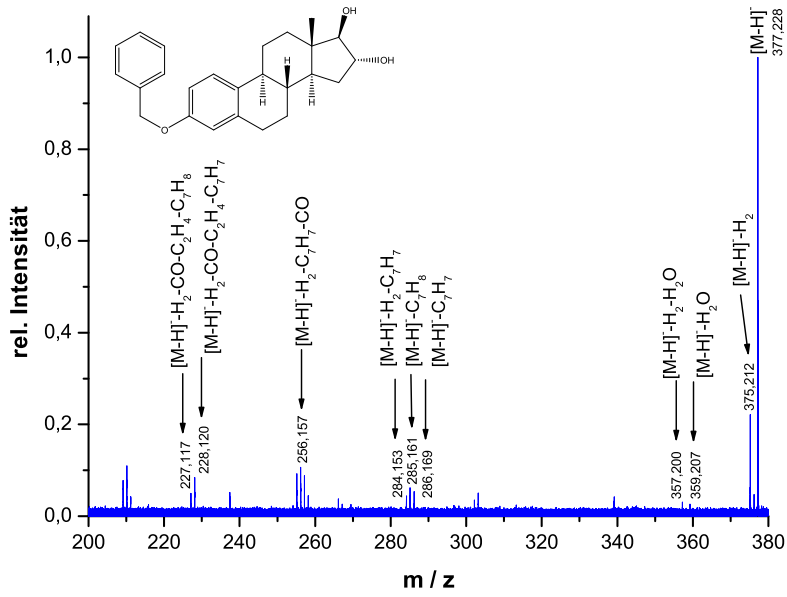


Abbildung 5.47. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach neg. ESI.

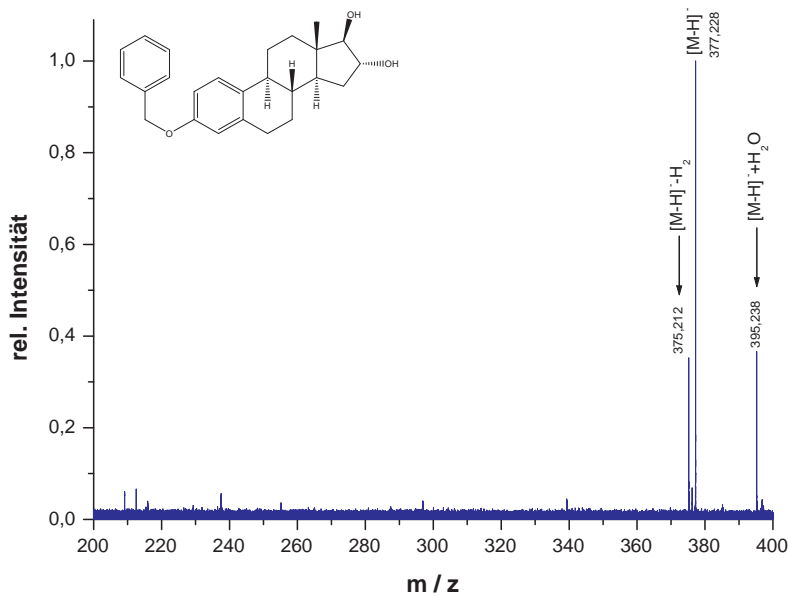


Abbildung 5.48. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung des Wasseradduktes.

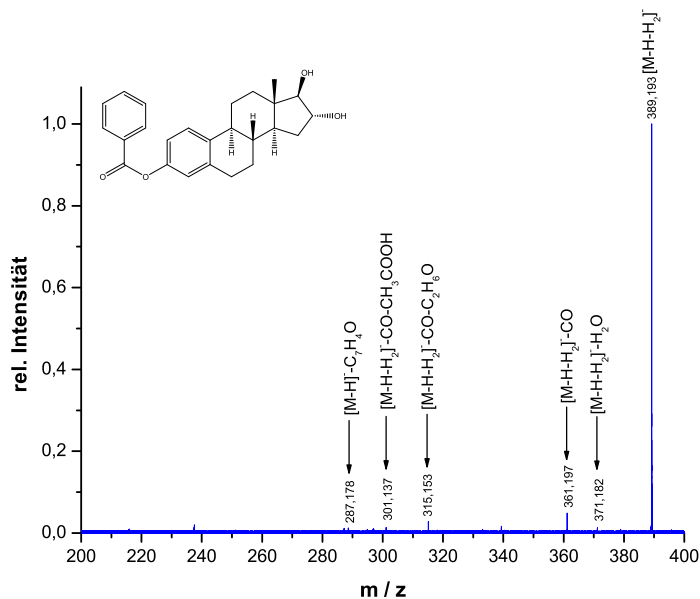


Abbildung 5.49. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzoat nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

## Benzoate

Das Übersichtsspektrum des Estriolbenzoats (**2b**) der Masse  $m/z$  391.209 zeigt nach negativer Ionisierung umgehend eine markante  $H_2$ -Abspaltung neben dem sehr deutlichen Signal bei  $m/z$  389.193 ( $[M-H-H_2]^-$ ), das nach Isolierung und resonanter Anregung (Abb. 5.49) folgende Fragmente nach CID generiert:  $m/z$  371.182 ( $[M-H-H_2]^- - H_2O$ ), 361.197 ( $[M-H-H_2]^- - CO$ ), 315.153 ( $[M-H-H_2]^- - CO - C_2H_6O$ ), 301.137 ( $[M-H-H_2]^- - CO - CH_3COOH$ ) und 287.178 ( $[M-H]^- - C_7H_4O$ ), die mit z.T. erhöhter Intensität auch in der Übersicht zu erkennen sind. Vor allem beim Signal bei  $m/z$  287.178 deutet dies auf einen verstärkten direkten Fragmentierungsweg hin.

Im Übersichtsspektrum des Estradiolbenzoats (**2a**) ist bereits ein äußerst schwaches Auftreten des  $[M-H]^-$ -Ions bei  $m/z$  375.214 zu erkennen. Ein Wasserstoffmolekülverlust ist nicht zu beobachten, genauso wenig wie die Abspaltung von  $H_2O$ . Die Eliminierung von CO erfolgt direkt aus dem deprotonierten Molekülion zu  $m/z$  347.119. Analog zum Triolbenzoat wird auch hier  $C_7H_4O$  zu 271.182 Da abgespalten, zudem treten Signale bei 283.277 ( $[M-H]^- - C_7H_8$ ), 281.261 ( $[M-H]^- - C_7H_8 - H_2$ ) und 255.244 Da ( $[M-H]^- - C_7H_8 - C_2H_4$ ) auf.

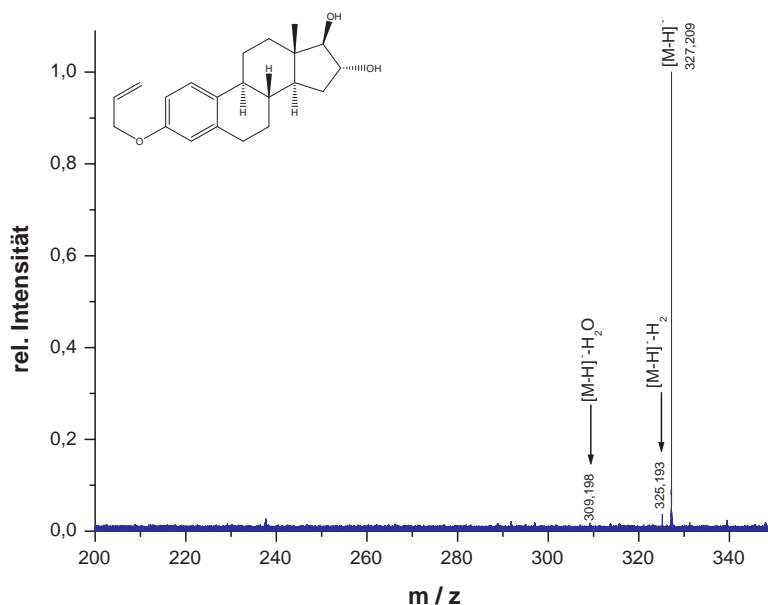


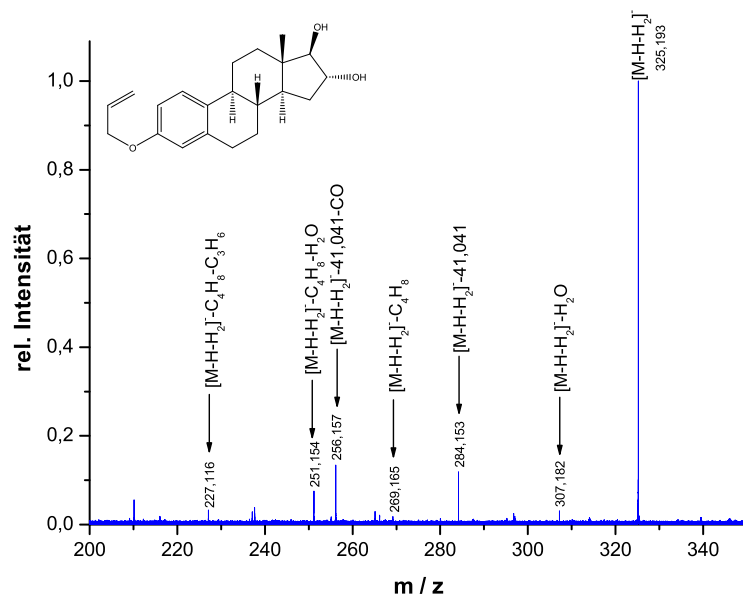
Abbildung 5.50. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI.

### Allylether

Negative Ionisierung und Fragmentierung des Estradiolallylethers (**5a**) führt ausgehend vom  $[M-H]^-$ -Ion bei 311.214 Da lediglich zur Abspaltung eines Wasserstoffmoleküls bei  $m/z$  309.198 ( $[M-H]^- - H_2$ ), im Übersichtsspektrum zusätzlich noch zu einem Wasseraddukt bei 329.226 ( $[M-H]^- + H_2O$ ). Dies kann nach einem  $C_3H_6O$ -Verlust die Signale bei 271.181 ( $[M-H]^- - 40.033$ ) und 269.165 ( $[M-H]^- - 40.033 - H_2$ ) Da erklären.

Der analoge Estriolallylether (**5b**) zeigt im On-resonance-CID-Spektrum (Abb. 5.50) beginnend bei 327.209 Da ( $[M-H]^-$ ) ebenfalls die Abspaltung von Wasserstoff zu 325.193 ( $[M-H]^- - H_2$ ) und Wasser zu 309.198 ( $[M-H]^- - H_2O$ ) Da. Die Isolierung und Fragmentierung des Ions des  $H_2$ -Verlustes bei  $m/z$  325.193 ( $[M-H]^- - H_2$ , Abb. 5.51) zieht weitere Signale bei  $m/z$  307.182 ( $[M-H]^- - H_2 - H_2O$ ), 297.198 ( $[M-H]^- - H_2 - CO$ ), 284.153 ( $[M-H - H_2]^- - 41.041$ ), 269.165 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8$ ), 256.157 ( $[M-H - H_2]^- - CO - 41.041$ ), 251.154 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8 - H_2O$ ) und 227.116 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8 - C_3H_6$ ) nach sich. Die Differenz von 41.041 Da kann dabei dem Verlust von  $C_3H_5$  entsprechen.

Im Übersichtsspektrum sind Signale der Massen 655.425 ( $[M-H+M]^-$ ), 345.220 ( $[M-H]^- + H_2O$ ), 343.205 ( $[M-H]^- - H_2 + H_2O$ ), 327.209 ( $[M-H]^-$ ), 325.193 ( $[M-H]^- - H_2$ ), 323.178 ( $[M-H]^- - 2H_2$ ), 309.198 ( $[M-H]^- - H_2O$ ), 307.182 ( $[M-H]^- - H_2 - H_2O$ ), 297.198 ( $[M-H]^- - H_2 - CO$ ), 284.153 ( $[M-H - H_2]^- - 41.041$ ), 269.165 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8$ ), 256.157 ( $[M-H - H_2]^- - CO - 41.041$ ), 251.154 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8 - H_2O$ ) und 227.116 ( $[M-H - H_2]^- - C_4H_8 - C_3H_6$ ) Da zu



**Abbildung 5.51.** – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

erkennen. Neben den beschriebenen Massendifferenzen werden Signale eines Dimers ( $[M-H+M]^-$ ), zweier Wasseraddukte ( $[M-H]^-+H_2O$  und  $[M-H]^- -H_2+H_2O$ ), einer Abspaltung von CO sowie eines weiteren Wasserstoffverlustes deutlich. Das Dimer zerfällt erneut ins Monomer bei  $m/z$  327.209 ( $[M-H]^-$ ) und verliert danach  $H_2$  zu  $m/z$  325.193 (vgl. Abb. 5.52); die Wasseraddukte sondern nach Isolierung und CID Wasser ab.

### Propylether

Der gesättigte Estradiolpropylether (**6a**) zeigt nach on-resonanter Anregung und Fragmentierung des  $[M-H]^-$ -Ions bei  $m/z$  313.229 nur die Abspaltung von Wasserstoff zu 311.214 Da ( $[M-H]^- -H_2$ ) (Abb. 5.53). Dieses wird nach Isolierung selbst nicht weiter fragmentiert, gleiche Signale und mehr, u.a. eine scheinbare H-Abstraktion des unveretherten Estradiols bei  $m/z$  271.181, erscheinen im etwas unanschaulichen Übersichtsspektrum. Analoge Werte lassen sich den Negativ-Spektren des Estriolpropylethers (**6b**) entnehmen. On-resonant zerfällt der Ether nach Isolierung des  $[M-H]^-$ -Ions bei 329.225 Da zum  $[M-H-H_2]^-$ -Fragment bei 327.209 Da. Dies zerfällt wiederum zu den  $m/z$ -Werten 309.198 ( $[M-H-H_2]^- -H_2O$ ) und 299.213 ( $[M-H-H_2]^- -CO$ ), spaltet also neben Kohlenmonoxid ein Wassermolekül ab. Gleiches ist im Übersichtsspektrum ersichtlich, ebenso wie erneut eine vermeintliche H-Abstraktion des unveretherten Triols bei 287.176 Da (Estriol-H).

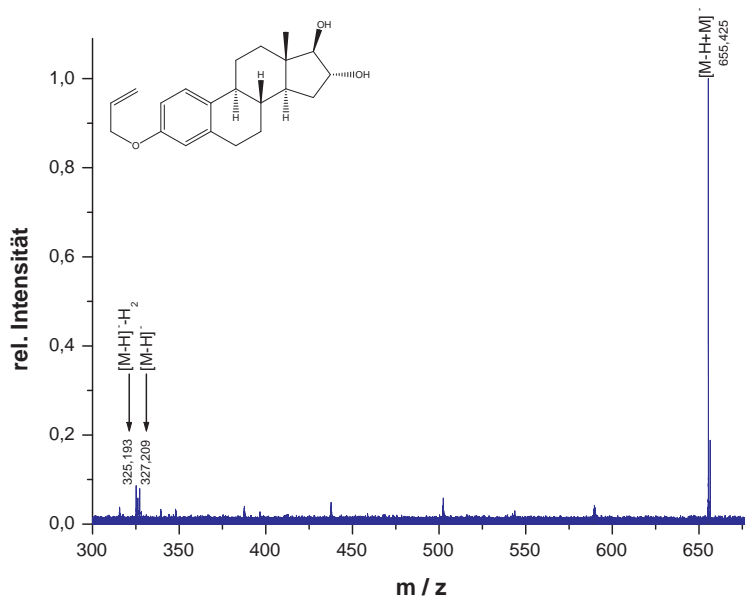


Abbildung 5.52. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallyletherdimer nach neg. ESI.

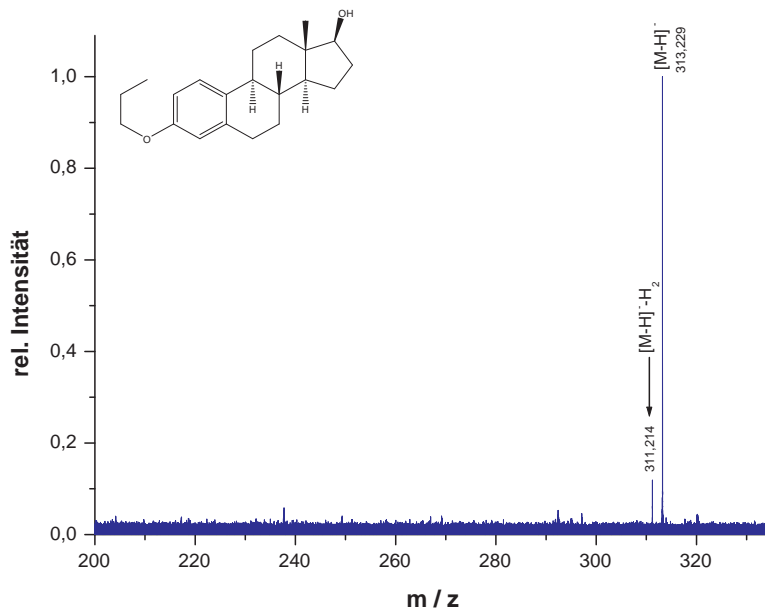


Abbildung 5.53. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolpropylether nach neg. ESI.

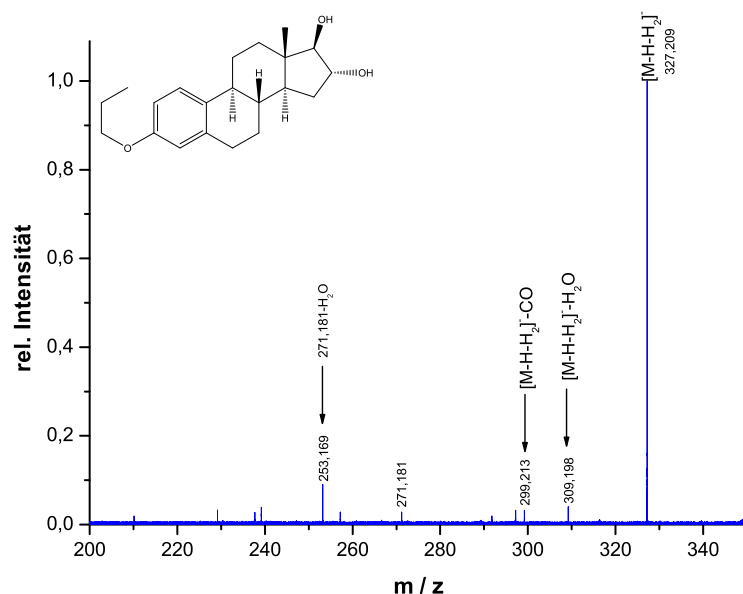


Abbildung 5.54. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolpropylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

### 5.3.5. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach MALDI

Von Interesse war zudem, ob die dreifache  $H_2O$ -Abspaltung der Benzyl- bzw. Allyl-ether auf intrinsischen Eigenschaften der Moleküle beruht oder ggf. mit der Art des Ionisierungsprozesses, der Elektro-Spray-Ionisation, in Verbindung steht. Daher wurden ebenfalls CID-Spektren der relevanten Substanzen **3a/b**, **5a/b** und **6a/b** nach Matrix-unterstützter Laserdesorptions-Ionisation aufgenommen und mit denen der ESI verglichen.

Da sich die Substanzen in einem MALDI-Standard-Lösungsmittel bestehend aus 30 % Acetonitril und 70 % 0.2 %iger wässrig. Trifluoressigsäure (TFA) nicht lösen ließen, wurden sie mit dem zuvor bereits verwendeten ESI-Lösungsmittelmix 5 präpariert und mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB) auf einem MALDI Anchorchip-Target im Matrix-Analyt-Verhältnis 500 : 1 zur Kristallisation gebracht.

Neben diversen Signalen kondensierter Matrixoligomere ( $m/z$  545.071 =  $[4 \cdot (\text{DHB} - \text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$ , 409.056 =  $[3 \cdot (\text{DHB} - \text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$  und 273.039 =  $[2 \cdot (\text{DHB} - \text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$ ) konnten lediglich in der Übersicht des Estriolbenzylethers (Abb. 5.55) einige Peaks protonierter und unprotonierter Moleküle mit geringer Intensität bei  $m/z$  379.226 ( $\text{MH}^+$ ) bzw. 378.219 ( $\text{M}^{\bullet+}$ ) ausgemacht werden. Einige Fragmentationen, 361.215 ( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) und 343.205 ( $\text{MH}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$ ), sind schwach zu erkennen, jedoch weder die dritte  $H_2O$ -

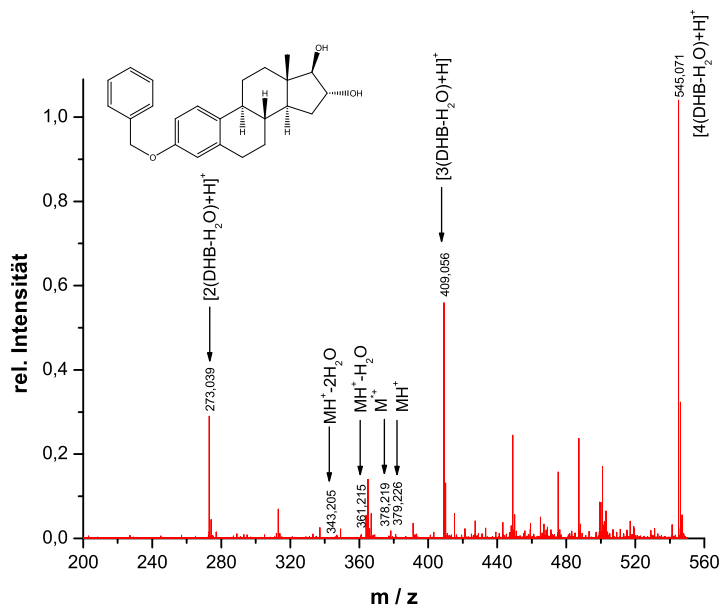


Abbildung 5.55. – MALDI-Übersichtsspektrum vom Estriolbenzylether.

Abspaltung noch die von Benzol und Toluol. Im Detail nach Isolierung in der Zelle und On-resonance-CID (Abb. 5.56) sind jene ebenso nicht zu beobachten und nur das nicht-fragmentierte Ion sticht hervor. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Spektren der anderen untersuchten Ether.

Entweder ist die Ursache für die beobachteten Fragmentierungen doch in der Methode der Elektro-Spray-Ionisation zu suchen, vielleicht weil dort die Moleküle eher an der thermodynamisch stabilsten Stelle protoniert werden anstatt relativ statistisch wie in der MALDI, oder die für die MALDI essentielle Probenpräparation war für zu interpretierende Messergebnisse ungenügend, sodass der Analyt nicht in ausreichender Menge ablatiert und ionisiert werden konnte, um ihn anschließend noch weiter beobachtbar zu fragmentieren.

Vermutlich liegen den Prozessen in der MALDI andere Mechanismen zugrunde als denen in der ESI, evtl. auch in Anbetracht von Stößen während der Ablation und Ionisierung. Da zunächst beide noch weitestgehend unaufgeklärt waren, wurde beschlossen, sich auf die Vorgänge in der ESI zu konzentrieren und im Rahmen dieser Arbeit den Ansatz der MALDI nicht weiter zu verfolgen, ebenso weil die Signalintensitäten äußerst gering waren.

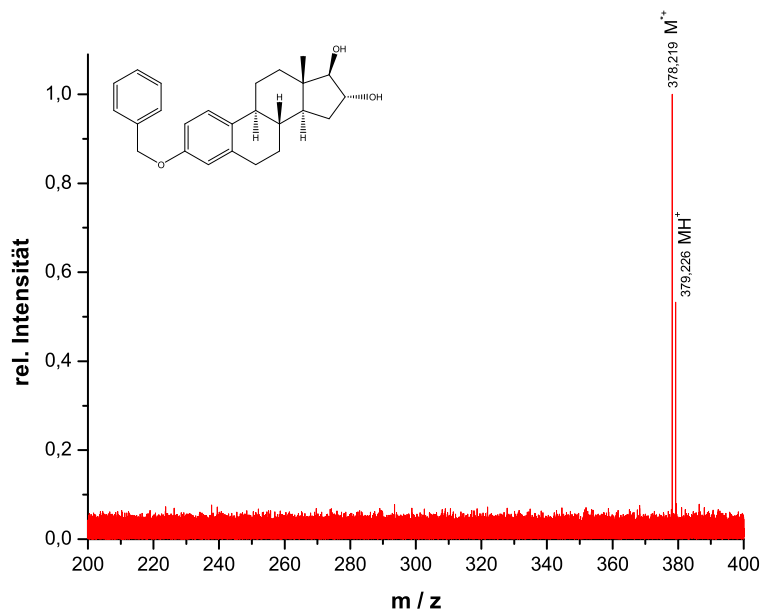


Abbildung 5.56. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach MALDI.

## 5.4. Gestagene

Neben den Estrogenen wurden aufgrund ihrer ähnlichen Struktur, wenn sie auch nicht aromatische Strukturen besitzen, ausgewählte Vertreter der Gestagene untersucht. Auf ihre Spektren soll im Folgenden näher eingegangen werden. Entsprechende Benzyloxyderivate der Gestagene sind synthetisch nicht erfolgreich zugänglich gewesen.

### 5.4.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI

#### Pregnandiol

Das Übersichtsspektrum (Abb. 5.57) des Pregnandiols (**11**) nach positiver Ionisierung zeigt schon äußerst deutliche Signale der Massen 321.287 ( $MH^+$ ), 303.276 ( $MH^+-H_2O$ ) und 285.265 ( $MH^+-2H_2O$ ) Da, das Diol sondert also, wie erwartet, zwei neutrale Wassermoleküle ab. Nach Isolierung und on-resonanter Fragmentierung des Quasimoleküliions bei  $m/z$  321.287 ( $MH^+$ ) zeigt sich außer denselben Peaks ein zusätzlicher bei  $m/z$  259.249 ( $MH^+-H_2O-C_2H_4O$ ), alle jedoch deutlich weniger intensiv.



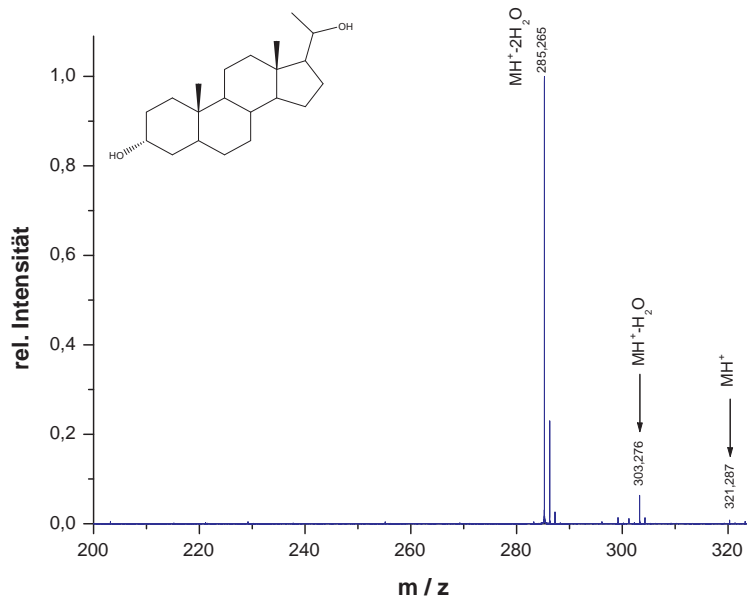


Abbildung 5.57. – Übersichtsspektrum vom Pregnanediol.

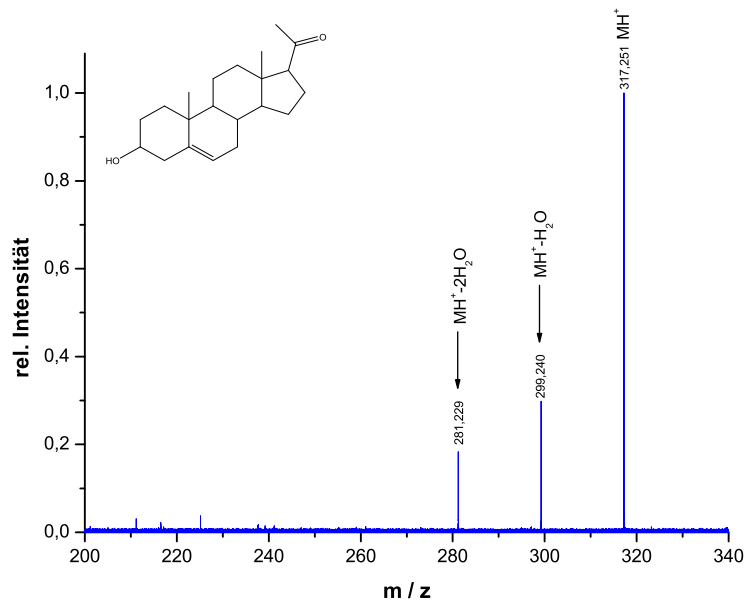


Abbildung 5.58. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnenolon.

## 5. Ergebnisse

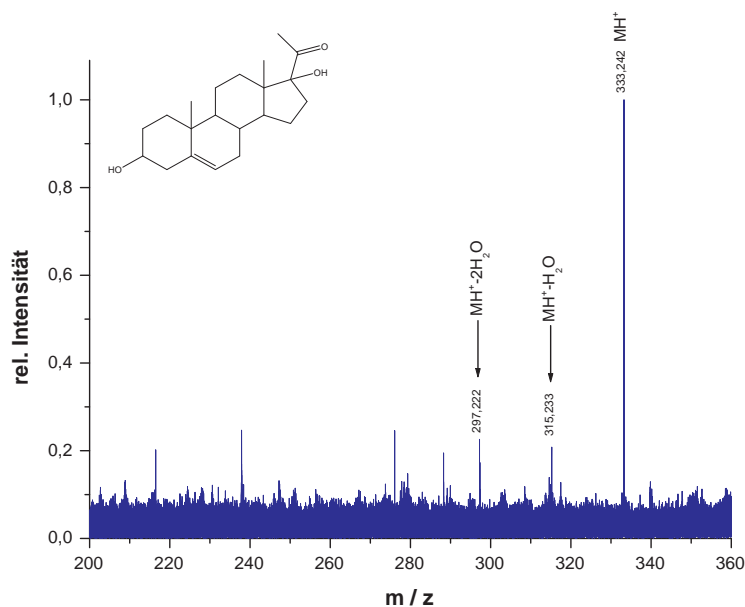


Abbildung 5.59. – On-resonance-CID-Spektrum vom 17-Hydroxypregnenolon.

### Pregnenolon

Das On-resonance-CID-Spektrum (Abb. 5.58) des Pregnenolons (**12**) weist analog zum Diol ausgehend vom 317.251 Da-Peak ( $MH^+$ ) die erwarteten zwei Wasserabspaltungen bei den  $m/z$ -Werten 299.240 ( $MH^+ - H_2O$ ) und 281.229 ( $MH^+ - 2H_2O$ ), eine davon nach Keto-Enol-Tautomerie.

### 17-Hydroxypregnenolon

Im Spektrum des 17-Hydroxypregnenolons (**13**, Abb. 5.59) zeigt sich nach Isolierung des 333.242 Da Ions ( $MH^+$ ) der zweifache  $H_2O$ -Verlust zu den Massen 315.233 ( $MH^+ - H_2O$ ) und 297.222 ( $MH^+ - 2H_2O$ ) Da.

### Dehydroepiandrosteron

Das Dehydroepiandrosteron (**14**) bei  $m/z$  289.217 ( $MH^+$ ) zerfällt on-resonant (Abb. 5.60) ebenso unter doppelter Wasserabspaltung zu  $m/z$  271.207 ( $MH^+ - H_2O$ ) und 253.197 ( $MH^+ - 2H_2O$ ).

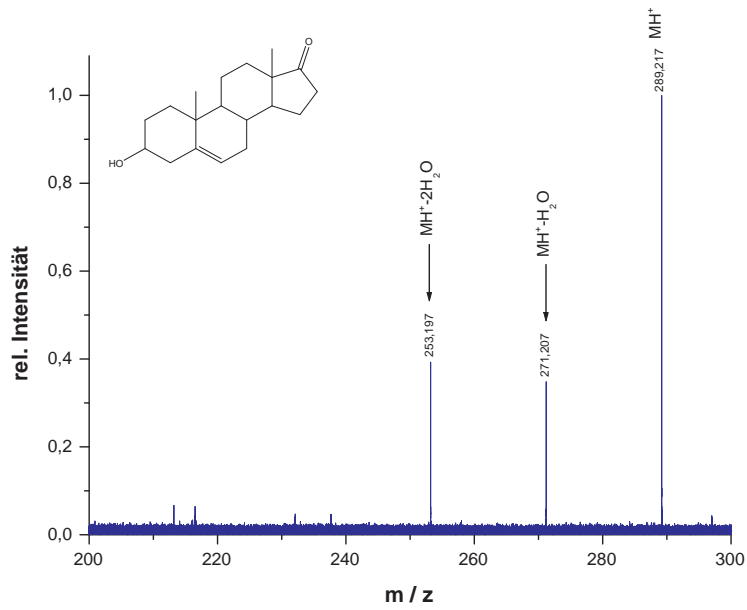


Abbildung 5.60. – On-resonance-CID-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron.

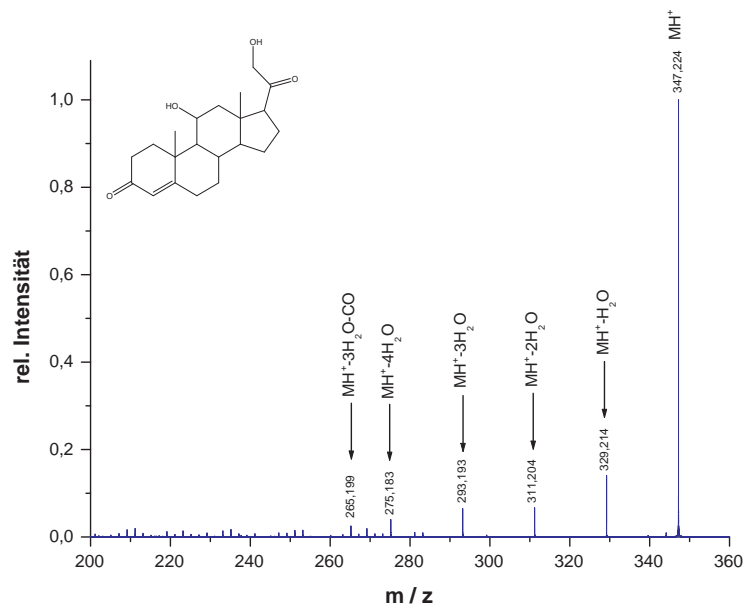


Abbildung 5.61. – On-resonance-CID-Spektrum vom Corticosteron.

## Corticosteron

Nach Isolierung und Fragmentierung sind im Corticosteron-Spektrum (Abb. 5.61) mehrfache H<sub>2</sub>O-Verluste auszumachen, ausgehend von der Masse 347.224 Da (MH<sup>+</sup>), bei  $m/z$  329.214 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 311.204 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O), 293.193 (MH<sup>+</sup>-3H<sub>2</sub>O) und 275.183 (MH<sup>+</sup>-4H<sub>2</sub>O) sowie, auf den dritten Wasserverlust folgend, die Eliminierung von CO zu einem Signal bei 265.199 Da (MH<sup>+</sup>-3H<sub>2</sub>O-CO).

### 5.4.2. IRMPD nach pos. ESI

#### Pregnenolon

Das IRMPD-Spektrum (Abb. 5.62) des Pregnenolons (**12**) gleicht dem On-resonance-CID Spektrum stark, zu erkennen sind ausgehend vom  $m/z$ -Wert 317.251 (MH<sup>+</sup>) zwei Wasserabspaltungen bei den Massen 299.240 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) und 281.229 (MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O) Da.

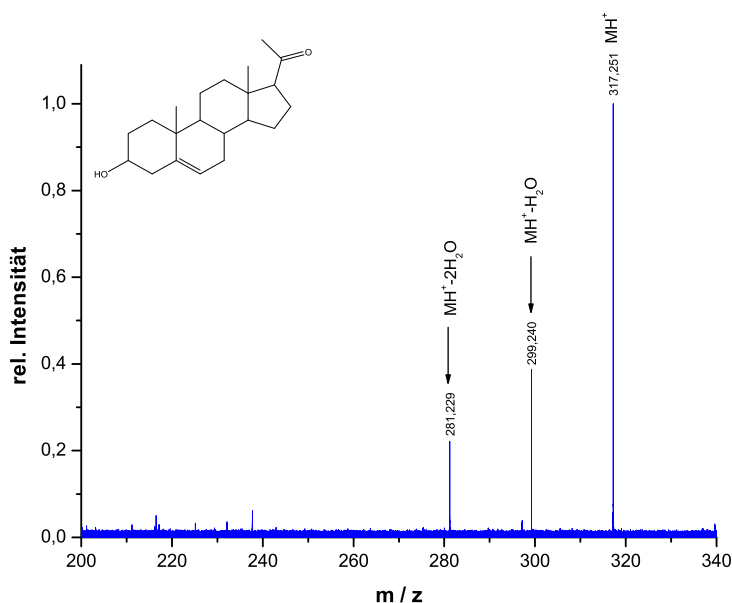


Abbildung 5.62. – IRMPD-Spektrum vom Pregnenolon.

#### 17-Hydroxypregnenolon

Die Isolierung und anschließende Strahlungsdissoziation des 17-Hydroxypregnenolons (**13**) bei 333.242 Da (MH<sup>+</sup>) führt zu einem lediglich zu erahnenden Signal im Bereich

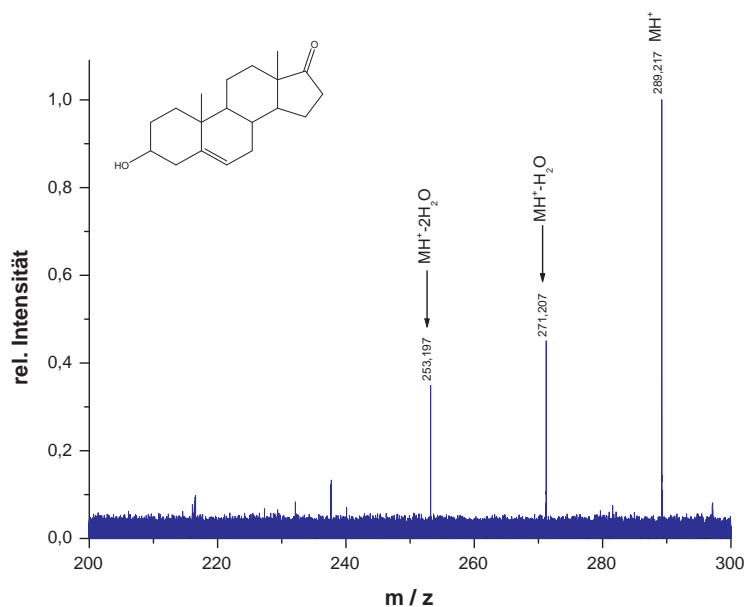


Abbildung 5.63. – IRMPD-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron.

von 315.235 Da ( $MH^+ - H_2O$ ) und einem stärkeren bei 297.225 Da ( $MH^+ - 2H_2O$ ), also ist auch hier die zweifache Wasserabspaltung zu beobachten.

### Dehydroepiandrosteron

Nach IRMPD bei 289.217 Da ( $MH^+$ ) zerfällt das Dehydroepiandrosteron (**14**) (Abb. 5.63) analog zur On-resonance-CID unter doppelter Wasserabspaltung zu  $m/z$  271.207 ( $MH^+ - H_2O$ ) und 253.197 ( $MH^+ - 2H_2O$ ).

### Corticosteron

Ausgehend vom Quasimolekülion des Corticosterons (**15**) der Masse 347.224 Da ( $MH^+$ ) (Abb. 5.64) erscheinen die bereits im On-resonance-CID-Spektrum beschriebenen Signale wie  $m/z$  329.214 ( $MH^+ - H_2O$ ), 311.204 ( $MH^+ - 2H_2O$ ), 293.193 ( $MH^+ - 3H_2O$ ), 275.183 ( $MH^+ - 4H_2O$ ) und 265.199 Da ( $MH^+ - 3H_2O - CO$ ) deutlicher, allen voran neben dem mehrfachen  $H_2O$ -Verlust die Eliminierung von CO. Zudem treten im Bereich unterhalb von  $m/z$  280 zahlreiche aus dem steroiden Grundgerüst kommende Signale weiter hervor.

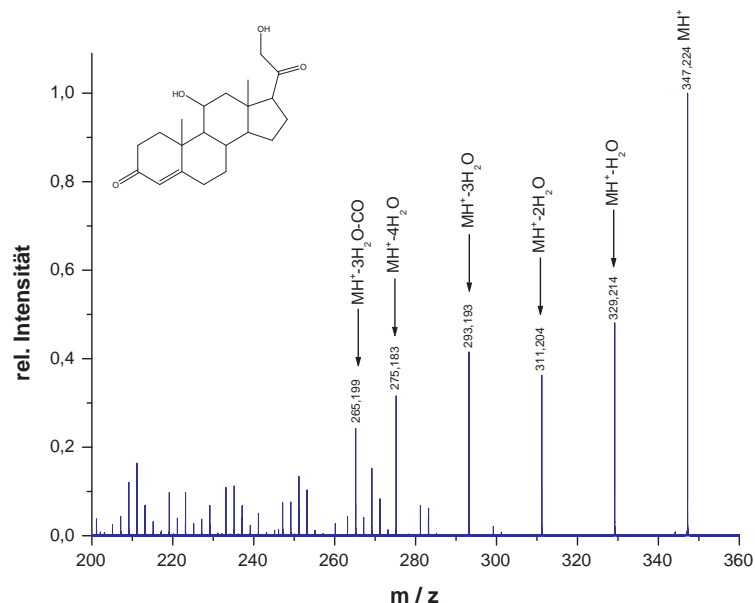


Abbildung 5.64. – IRMPD-Spektrum vom Corticosteron.

### 5.4.3. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach neg. ESI

#### Pregnandirol

Ein On-resonance-CID-Spektrum des Pregnandiols (**11**) ist nach negativer Ionisierung nicht zugänglich gewesen, im Übersichtsspektrum ist lediglich schwach das  $[M-H]^-$ -Ion bei 319.276 Da zu erkennen, gefolgt vom kaum erkennbaren Wasserverlust zu  $m/z$  301.165 ( $[M-H]^- - H_2O$ ).

#### Pregnenolon

Das nach negativer Ionisierung isolierte Pregnenolon (**12**) weist im On-resonance-CID-Spektrum (Abb. 5.65), das unter Verwendung der bisher üblichen Anregungsenergie aufgenommen worden ist, keine weiteren Fragmente auf, lediglich das deprotonierte Ion  $[M-H]^-$  bei 315.246 Da ist zu erkennen. Im Übersichtsspektrum erscheint zusätzlich die Abtrennung von Wasser zu  $m/z$  297.234 ( $[M-H]^- - H_2O$ ).

#### 17-Hydroxypregnenolon

Das On-resonance-CID-Spektrum des 17-Hydroxypregnenolon (**13**, Abb. 5.67) beinhaltet dagegen mehr Fragmentensignale. Ausgehend von  $m/z$  331.241 ( $[M-H]^-$ ) zeigt es die

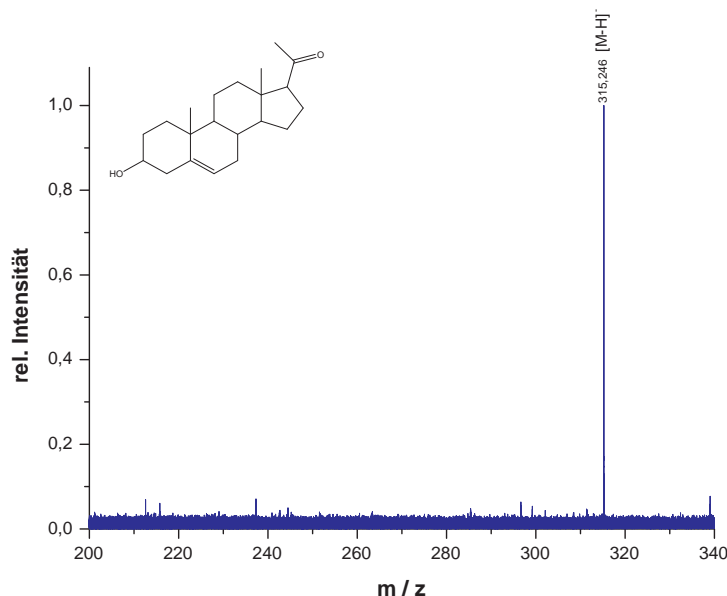


Abbildung 5.65. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnenolon nach neg. ESI.

ein- und zweifache Wasserabspaltung bei 313.230 ( $[M-H]^- - H_2O$ ) und 295.213 ( $[M-H]^- - H_2O$ ) Da sowie den Verlust von Kohlenmonoxid bei  $m/z$  303.245 ( $[M-H]^- - CO$ ) und von  $C_2H_4O$  bei 287.213 ( $[M-H]^- - C_2H_4O$ ). Gleiches ist dem Übersichtsspektrum (Abb. 5.66) zu entnehmen.

### Dehydroepiandrosteron

Wie im Falle des 17-Hydroxypregnenolons zeigen sich im On-resonance-CID-Spektrum des Dehydroepiandrosterons (**14**, Abb. 5.68) außer der Masse 287.213 ( $[M-H]^-$ ), die dem isolierten Ion entspricht, keine weiteren Fragmente. Im Übersichtsspektrum taucht zusätzlich die Abtrennung eines Wassermoleküls bei 269.202 Da ( $[M-H]^- - H_2O$ ) auf.

### Corticosteron

Wie schon nach positiver Ionisierung sind die Fragmentensignale des Corticosterons (**15**) nach negativer Ionisierung und CID (Abb. 5.69) zahlreich. Neben dem Quasimolekülion bei 345.221 Da ( $[M-H]^-$ ) sind dem Spektrum Massen bei  $m/z$  327.210 ( $[M-H]^- - H_2O$ ), 309.198 ( $[M-H]^- - 2H_2O$ ), 291.187 ( $[M-H]^- - 3H_2O$ ) und 267.186 ( $[M-H]^- - H_2O - CH_3COOH$ ) zu entnehmen. Es werden nicht nur drei  $H_2O$ -Moleküle emittiert, sondern auch Essigsäure abgesondert. Gleiches ist im Übersichtsspektrum ohne Isolierung zu erkennen.

## 5. Ergebnisse

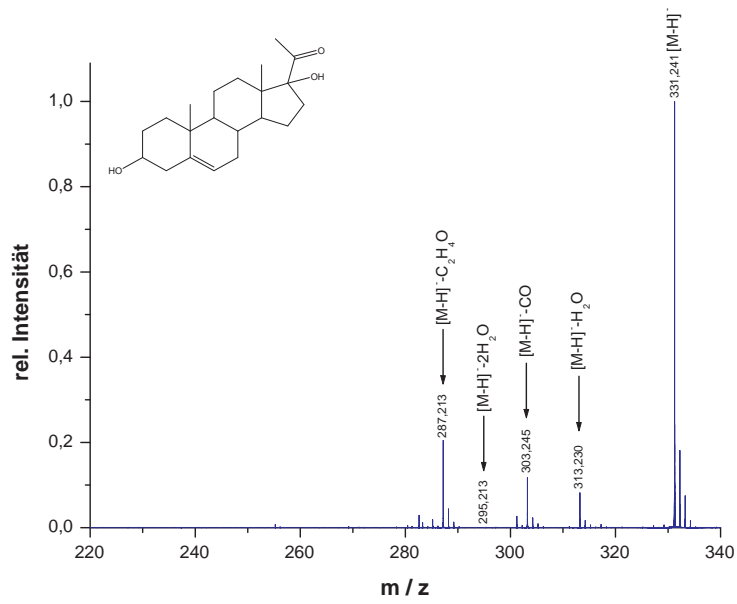


Abbildung 5.66. – Übersichtsspektrum vom 17-Hydroxypregnenolon nach neg. ESI.

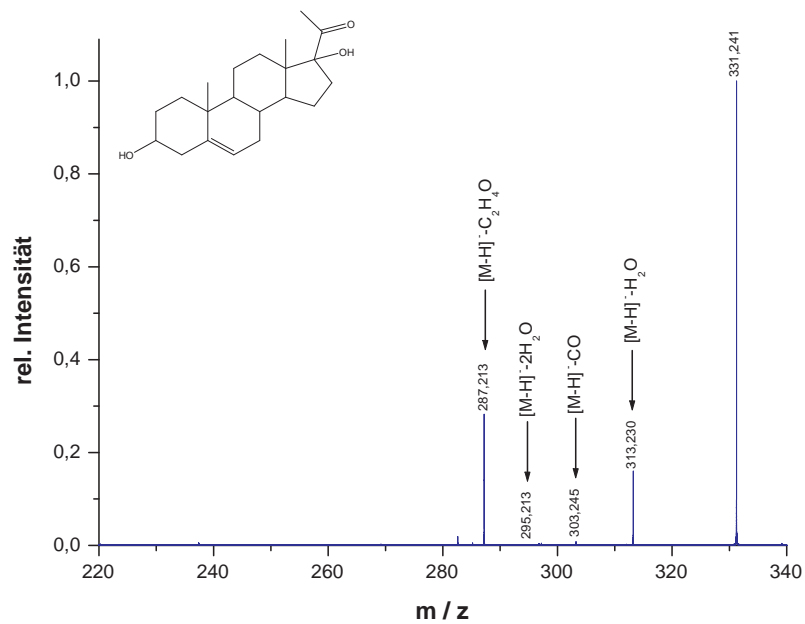


Abbildung 5.67. – On-resonance-CID-Spektrum vom 17-Hydroxypregnenolon nach neg. ESI.



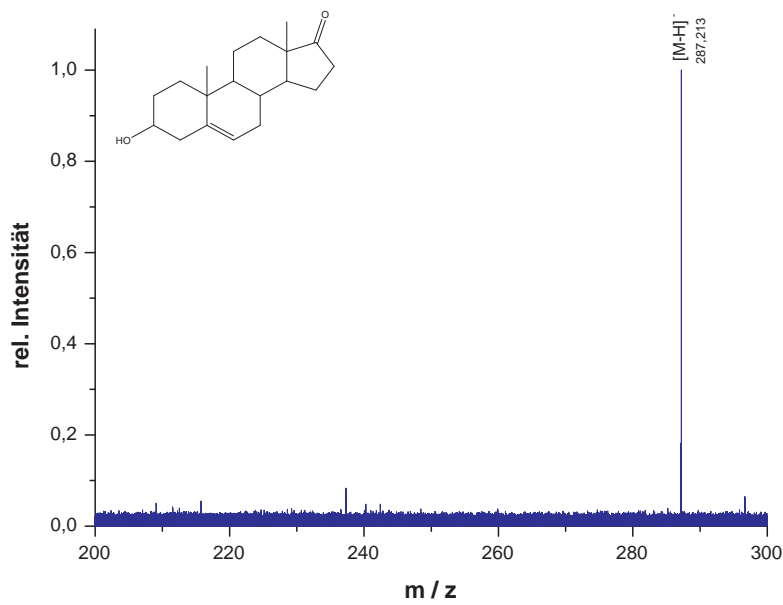


Abbildung 5.68. – On-resonance-CID-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron nach neg. ESI.

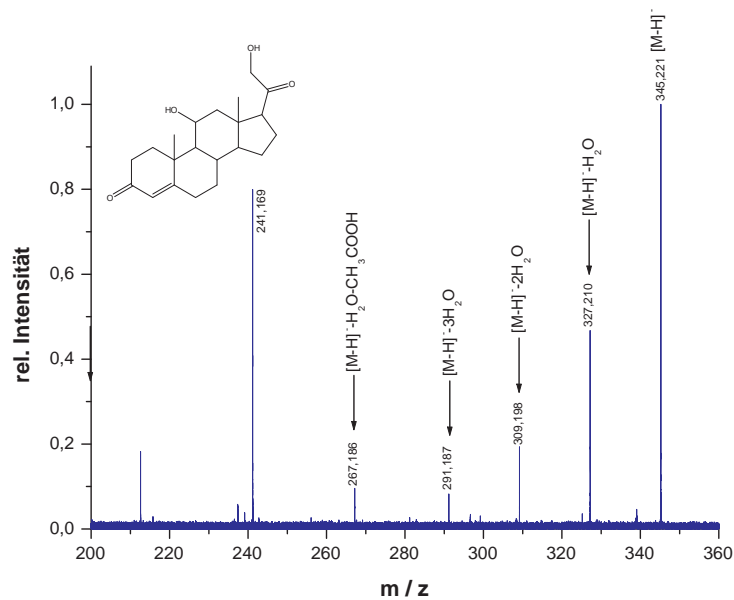


Abbildung 5.69. – On-resonance-CID-Spektrum vom Corticosteron nach neg. ESI.

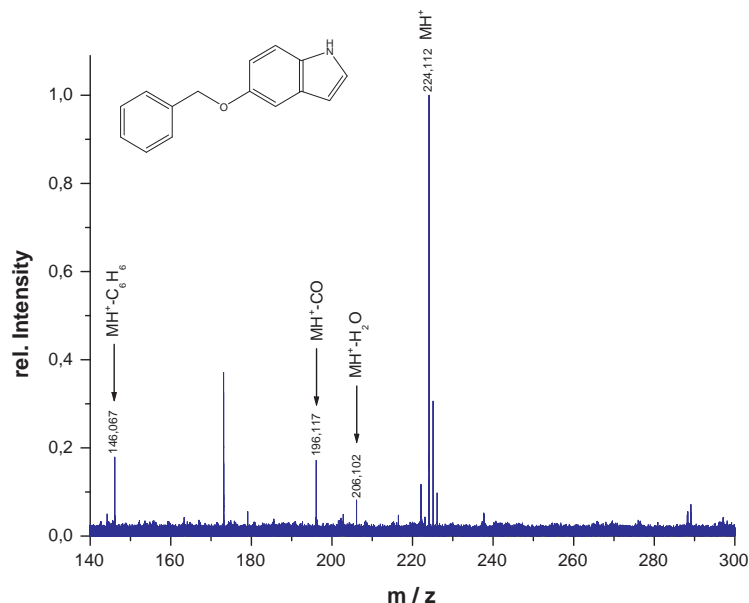


Abbildung 5.70. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol.

## 5.5. Indole

Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft mit den Estrogenbenzylethern und da ihre Umlagerungen z. T. schon in der Literatur erwähnt wurden,<sup>157</sup> sind ebenfalls verschiedene Benzyloxyindole in der ICR-Zelle isoliert und fragmentiert worden. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt eingehender thematisiert.

### 5.5.1. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach pos. ESI

#### 5-Benzyloxyindol

Ebenso wie bei den Estrogenbenzylethern zeigt sich im On-resonance-CID-Spektrum des 5-Benzyloxyindols (**16**, Abb. 5.70) die ursprünglich unerwartete Wasserabspaltung, ausgehend vom MH<sup>+</sup>-Ion bei 224.112 Da bei  $m/z$  206.102 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O). Weiterhin erkennbar sind die Abtrennung von Kohlenmonoxid bei 196.117 Da (MH<sup>+</sup>-CO) und Benzol bei 146.067 Da (MH<sup>+</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>).

#### 5-Benzyloxy-6-methoxyindol

Das an Position 6 ebenfalls veretherte Benzyloxyindol (**17**) weist nach on-resonanter Anregung des Ions bei  $m/z$  254.118 (MH<sup>+</sup>) (Abb. 5.71) zwar die Abspaltung von Kohlen-

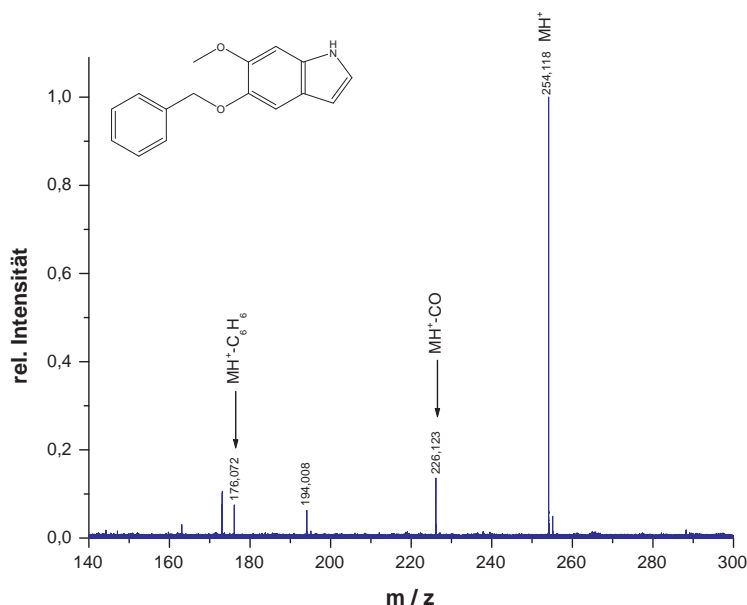


Abbildung 5.71. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol.

monoxid im Bereich von 226.123 Da ( $MH^+ - CO$ ) und Benzol bei 176.072 ( $MH^+ - C_6H_6$ ) auf, jedoch keine Wassereliminierung. Zu gleichen Signalen führt die Isolierung und Fragmentierung eines Natriumadduktes des 5-Benzyloxy-6-methoxyindols (Abb. 5.72) bei  $m/z$  276.100 ( $[M+Na]^+$ ).

### 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol

Wie zu erwarten zeigt das On-resonance-CID-Spektrum des 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindols (**18**, Abb. 5.73) ausgehend vom Quasimolekülion bei 298.111 Da ( $MH^+$ ) sowohl eine Wasserabspaltung bei  $m/z$  280.101 ( $MH^+ - H_2O$ ) als auch eine Benzolabtrennung bei  $m/z$  220.066 ( $MH^+ - C_6H_6$ ). Hinzu kommt der Verlust von Essigsäure zu 238.091 Da ( $MH^+ - CH_3COOH$ ). Ein Wasserverlust ist nicht zu beobachten.

### 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure

Das Essigsäurederivat (**19**) des 5-Benzyloxyindols (Abb. 5.74) zeigt ebenso keine direkte Wassereliminierung aus dem  $MH^+$ -Ion bei 282.117 Da, lediglich die CO-Abtrennung bei  $m/z$  254.122 ( $MH^+ - CO$ ) und ein daraus resultierender Wasserverlust bei 236.112 Da ( $MH^+ - CO - H_2O$ ) sind erkennbar.

5. Ergebnisse

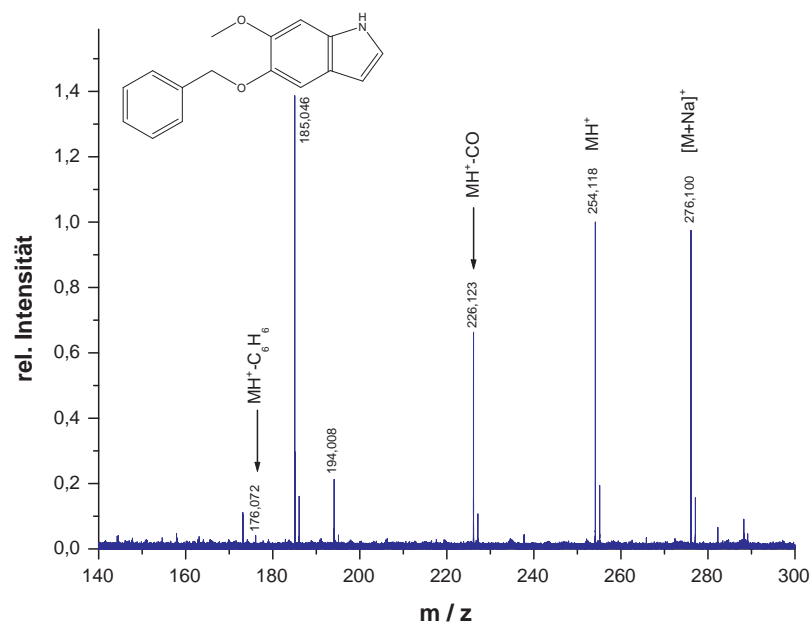


Abbildung 5.72. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol inkl. Na-Addukt.

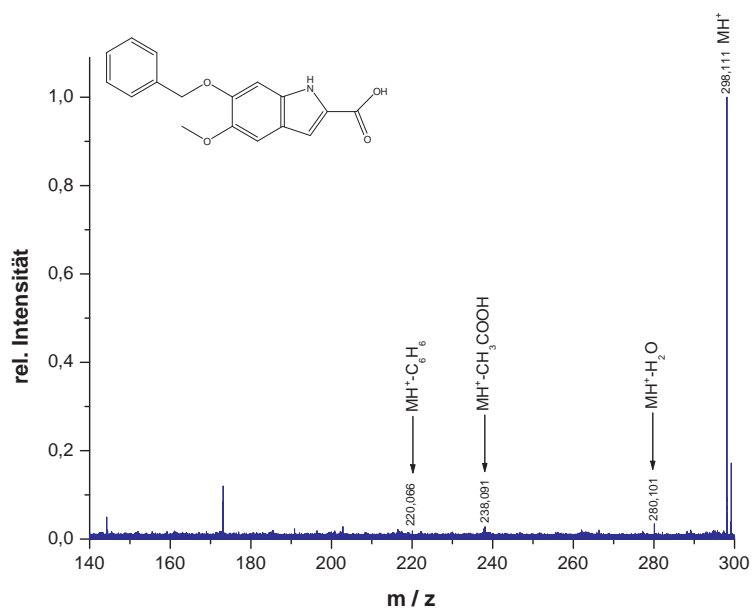


Abbildung 5.73. – On-resonance-CID-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol.

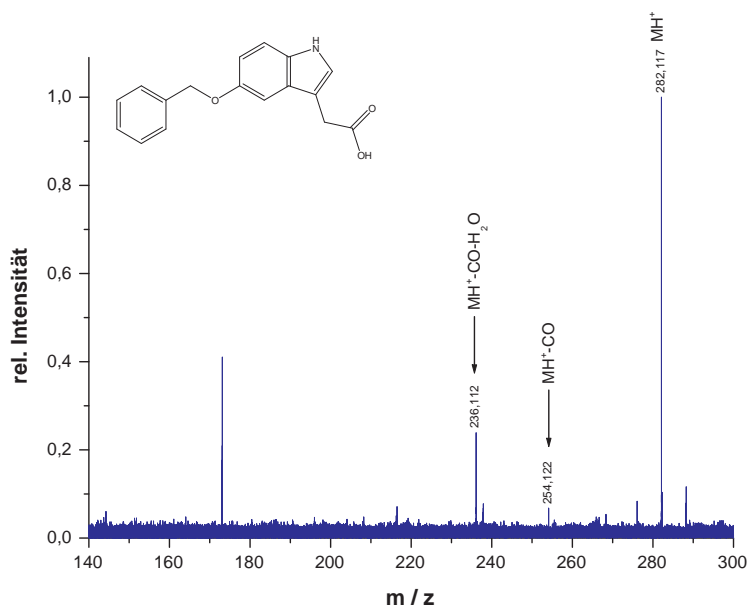


Abbildung 5.74. – On-resonance-CID-Spektrum der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure.

## 5.5.2. IRMPD nach pos. ESI

### 5-Benzyloxyindol

Im IRMPD-Spektrum des 5-Benzyloxyindols (**16**, Abb. 5.75) sind ausgehend vom  $MH^+$ -Ion bei  $m/z$  224.112 analog zum On-resonance-CID (Abb. 5.70) die Wasserabtrennung bei  $m/z$  206.102 ( $MH^+ - H_2O$ ) sowie der Verlust von Kohlenmonoxid zu 196.117 Da ( $MH^+ - CO$ ) und Benzol zu 146.067 Da ( $MH^+ - C_6H_6$ ) zu erkennen.

### 5-Benzyloxy-6-methoxyindol

Das 5-Benzyloxy-6-methoxyindol (**17**) weist nach IRMPD (Abb. 5.76) ein dem On-resonance-CID vergleichbares Spektrum auf: Ausgehend vom Quasimolekülion bei  $m/z$  254.118 ( $MH^+$ ) zeigen sich Fragmente in etwas höherer Intensität bei 226.123 Da ( $MH^+ - CO$ ) und 176.072 ( $MH^+ - C_6H_6$ ). Gleiche Signale sind ebenfalls nach Isolierung eines Natriumadduktes des Methoxy-Benzyloxyindols zu erkennen.

### 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol

Beim 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (**18**) ähneln sich IRMPD- (Abb. 5.77) und On-resonance-Spektrum ebenfalls stark. Ausgehend vom Quasimolekülion ( $MH^+$ ) bei

## 5. Ergebnisse

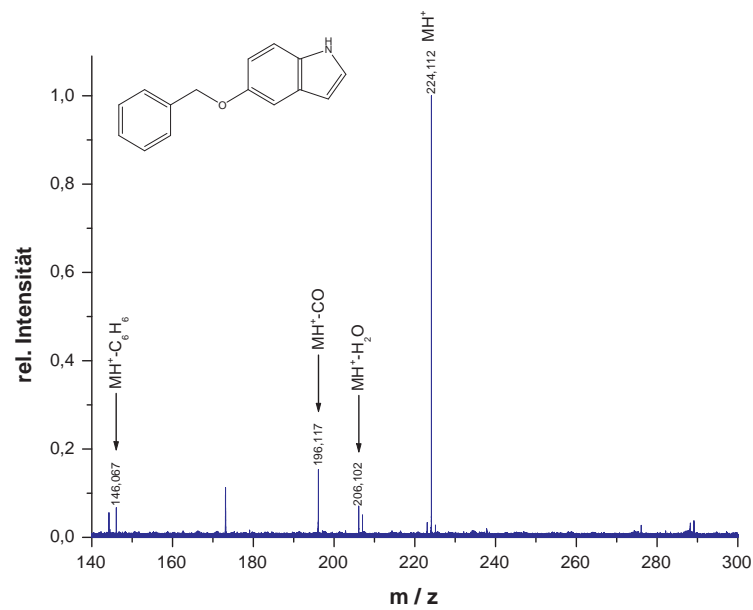


Abbildung 5.75. – IRMPD-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol.

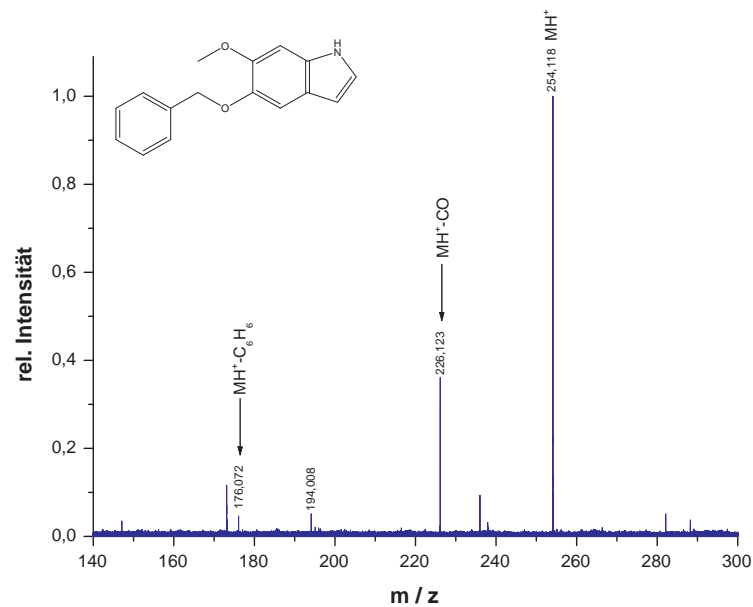


Abbildung 5.76. – IRMPD-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol.

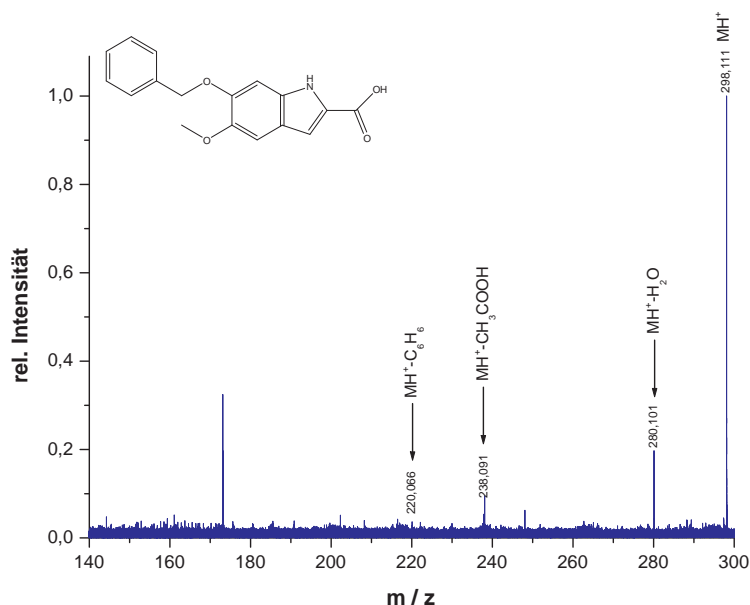


Abbildung 5.77. – IRMPD-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol.

298.111 Da treten die Fragmente bei  $m/z$  280.101 ( $MH^+ - H_2O$ ), 238.091 ( $MH^+ - CH_3COOH$ ) und 220.066 ( $MH^+ - C_6H_6$ ) jedoch etwas deutlicher hervor. Der Wasserverlust ist ebenso nicht zu erkennen.

### 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure

Aus der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (**19**) ist nach IRMPD (Abb. 5.78) ebenfalls keine direkte Wassereliminierung aus dem  $MH^+$ -Ion bei 282.117 Da zu beobachten, die CO-Abtrennung bei  $m/z$  254.122 ( $MH^+ - CO$ ) und ein daraus resultierender Wasserverlust bei 236.112 Da ( $MH^+ - CO - H_2O$ ) werden allerdings deutlich.

### 5.5.3. On-resonance-CID und Collision-Cell-CID nach neg. ESI

#### 5-Benzyloxyindol

Das On-resonance-Spektrum des 5-Benzyloxyindols (**16**) (s. Spektrenanhang A.100) nach negativer Ionisierung bei der i. d. R. genutzten Anregungsenergie zeigt lediglich das  $[MH]^-$ -Ion bei 222.101 Da und keine weiteren Fragmente.

## 5. Ergebnisse

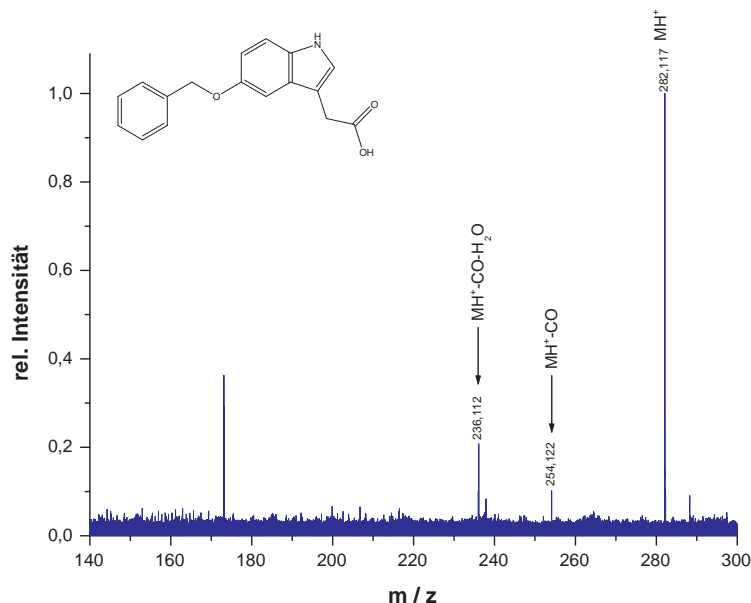


Abbildung 5.78. – IRMPD-Spektrum der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure.

### 5-Benzyloxy-6-methoxyindol

Im Übersichtspektrum des 5-Benzyloxy-6-methoxyindol (**17**) ist nach negativer Ionisierung kein Molekülionensignal zu erkennen. Dementsprechend konnte auch kein On-resonance-CID-Spektrum aufgenommen werden.

### 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol

Ausgehend vom  $[MH]^-$ -Ionensignal bei 296.105 Da sind sowohl deutlich im Übersichtspektrum (Abb. 5.79) als auch nach Isolierung in der ICR-Zelle im On-resonance-CID-Spektrum (Abb. 5.80) die Abspaltungen von  $CO_2$  bei  $m/z$  252.113 ( $[MH]^- - CO_2$ ) und von Benzyl bei  $m/z$  205.046 ( $[MH]^- - C_7H_7$ ) zu erkennen. Ein Wasserverlust ist nicht beobachtbar.

### 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure

Im On-resonance-CID- (Abb. 5.82) und Übersichtspektrum (Abb. 5.81) der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (**19**) ist ebenfalls keine Wasserabspaltung zu sehen. Ausgehend von der Masse 280.109 Da ( $[MH]^-$ ) zeigt sich dagegen der Verlust von Kohlendioxid bei  $m/z$  236.117 ( $[MH]^- - CO_2$ ) und Benzyl bei  $m/z$  189.050 ( $[MH]^- - C_7H_7$ ).



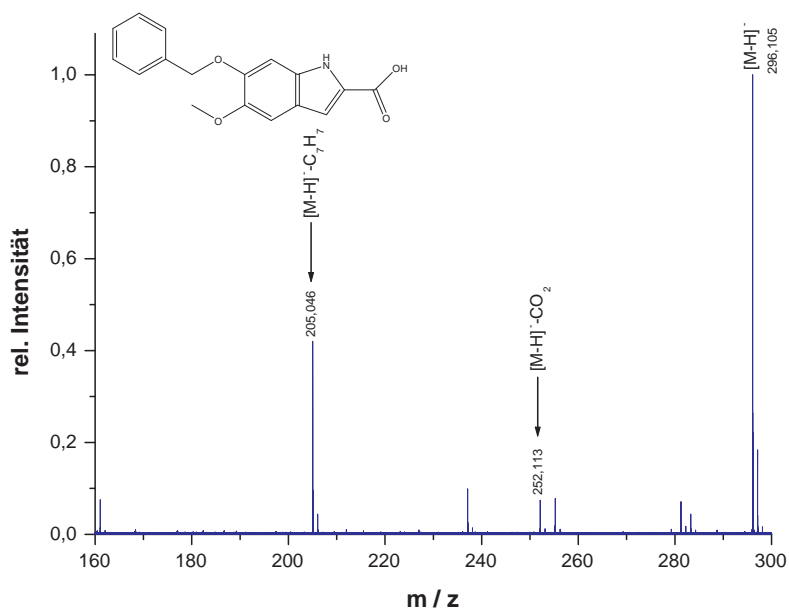


Abbildung 5.79. – Übersichts-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol nach neg. ESI.

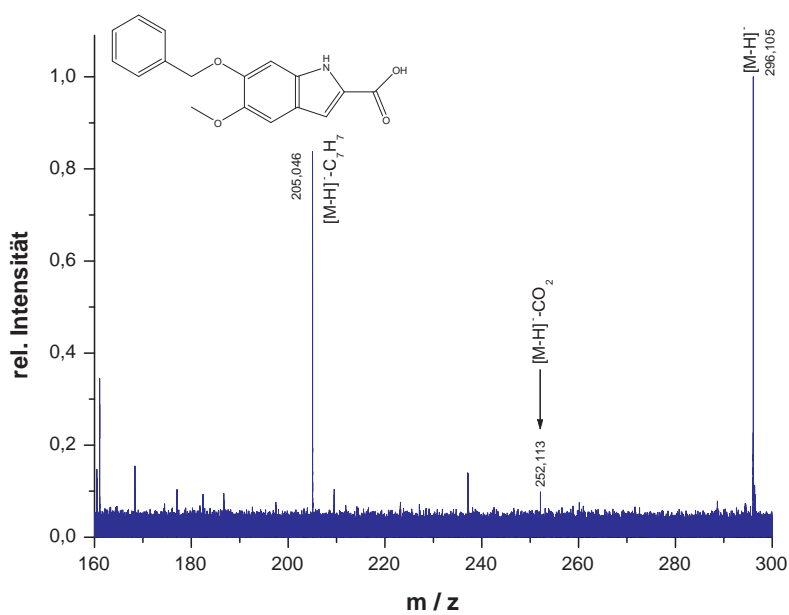


Abbildung 5.80. – On-resonance-CID-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxy-indol nach neg. ESI.

## 5. Ergebnisse

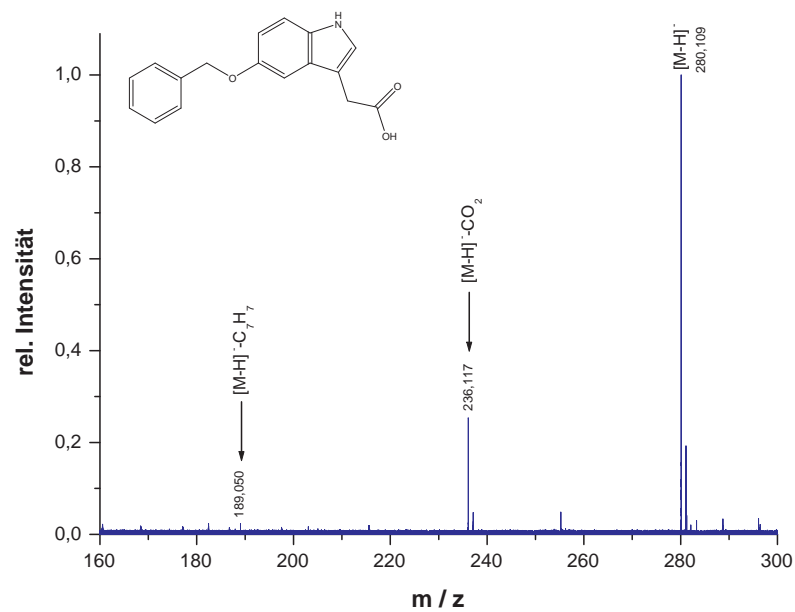


Abbildung 5.81. – Übersichts-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach neg. ESI.

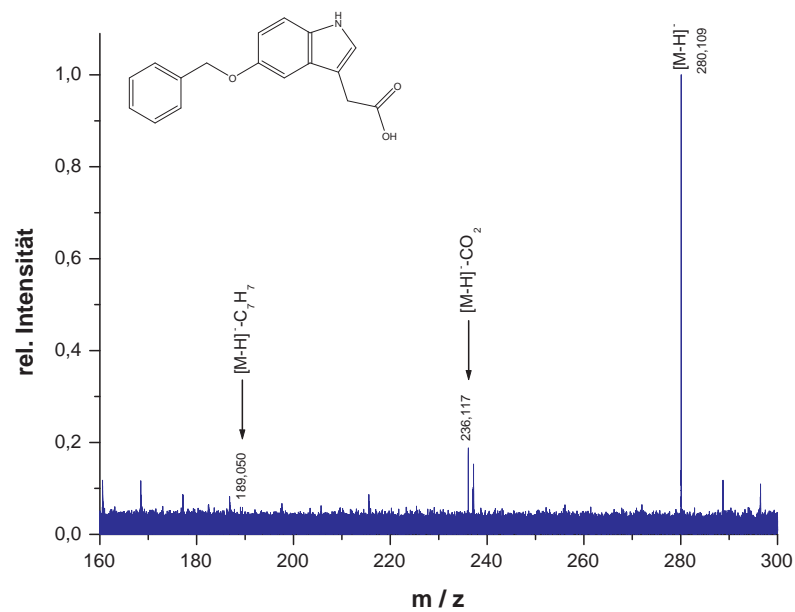


Abbildung 5.82. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach neg. ESI.

## 5.6. Protonenaffinitätsbestimmung durch Cooks' kinetische Methode

Mittels *Cooks' kinetischer Methode*<sup>14</sup> sollen im folgenden die Protonenaffinitäten der Estrogenbenzylether näher bestimmt werden. Dies ist notwendig, um die zuvor beschriebenen in Abschnitt 5.3 Fragmentierungsmuster und daraus zu schließenden Umlagerungsmechanismen besser zu erklären. Um daraus den Ort der Protonierung einzugrenzen (vgl. Abb. 5.87), wurden die Zielmoleküle mit entsprechenden Synthone verglichen, da eine direkte Bestimmung der PA einer einzelnen funktionellen Gruppe experimentell nicht möglich ist.

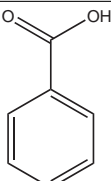
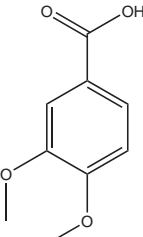
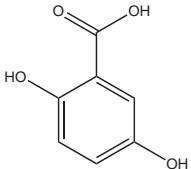
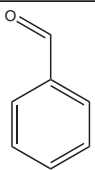
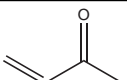
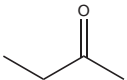
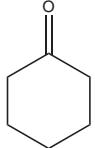
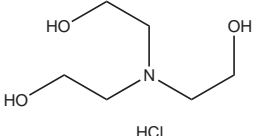
Cooks' kinetisches Verfahren<sup>14</sup> nutzt zur Bestimmung thermochemischer Werte die Dissoziation proton-gebundener Dimere: Zweiundzwanzig Basen unterschiedlicher Struktur und bekannter Basenstärke wurden mit beiden Estrogenbenzylethern jeweils über ein Proton verbrückend dimerisiert und anschließend dissoziiert. Analog wurden zwei Referenzsubstanzen untersucht, die die allgemeine Gültigkeit der Methode bestätigen sollten. In Tabelle 5.4 sind die einzelnen Basen und Referenzen gezeigt.

Unter Voraussetzung der in Abschnitt 2.5 diskutierten Annahmen ist es nun möglich gewesen, aus einem Vergleich der dem MS-MS-Spektrum des Dimers entnommenen Monomer-Ionenhäufigkeiten auf die entsprechenden Ratenkonstanten des Zerfalls zum jeweiligen protonierten Monomer rückzuschließen. Der Quotient dieser Ratenkonstanten wurde nun logarithmisch gegen die Werte der Referenzbasen aufgetragen und aus Steigung und Achsenabschnitte wiederum die Protonenaffinität der zu untersuchenden Substanz respektive der Referenz bestimmt. Diese Auftragung ist für die entsprechenden Benzyloxyestrogene (**3**) in Abb. 5.83 gezeigt.

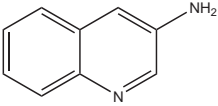
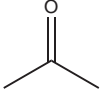
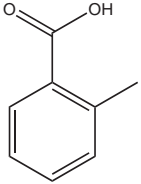
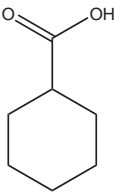
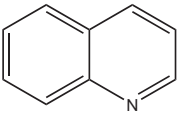
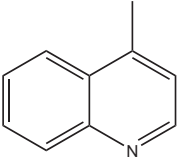
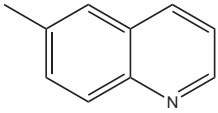
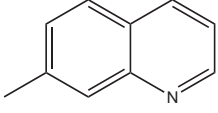
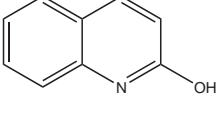
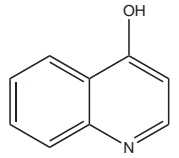
Die Bestimmung der Vergleichswerte der verschiedenartigen Basen gestaltet sich als relativ schwierig, da ihre Protonenaffinitäten in der Literatur<sup>158,159,160,161,162</sup> mit z. T. hochgradigen Schwankungen angegeben sind oder gegenüberstellend hergeleitet werden müssen. Daher sind dort auch die Affinitäten der Estradiol- und Estriolbenzylether von oben nach unten mit sinkenden Literaturvergleichswerten bestimmt und dargestellt worden.

5. Ergebnisse

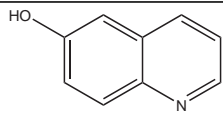
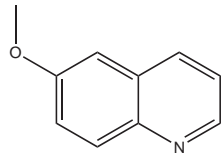
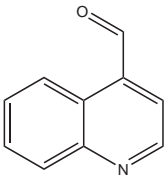
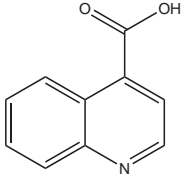
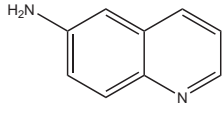
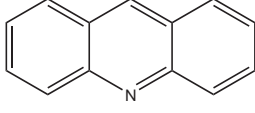
**Tabelle 5.4.** – Verwendete Basen und zwei Referenzsubstanzen, ihre Protonenaffinität und Massen.

Substanz	M / $m/z$	PA / $\text{kJ mol}^{-1}$
 <p>Benzoessäure (BA01)</p>	122.04	821.1 <sup>158</sup>
 <p>3,4-Dimethoxybenzoessäure (BA02)</p>	182.06	– <sup>a</sup>
 <p>2,5-Dihydroxybenzoessäure (BA03)</p>	154.03	855.0 <sup>163</sup>
 <p>Benzaldehyd (BA04)</p>	106.04	834.0 <sup>158</sup>
 <p>Methylvinylketon (BA05)</p>	70.04	834.7 <sup>158</sup>
 <p>2-Butanon (BA06)</p>	72.06	795.5-827.3 <sup>163, 158</sup>
 <p>Cyclohexanon (BA07)</p>	98.07	841.0 <sup>158</sup>
 <p>Triethanolamin·HCl (BA08)</p>	185.08	934.8-977.5 <sup>b; 159, 160</sup>

## 5.6. Protonenaffinitätsbestimmung durch Cooks' kinetische Methode

Substanz	M / $m/z$	PA / $\text{kJ mol}^{-1}$
 3-Aminochinolin (BA09)	144.07	742.8-814.6 <sup>162</sup>
 Aceton (BA10)	58.04	812.0 <sup>158</sup>
 2-Methylbenzoesäure (R01)	136.05	838.8 <sup>158</sup>
 Cyclohexancarbonsäure (R02)	128.08	823.7 <sup>158</sup>
 Chinolin (BQ01)	129.06	951.1-953.2 <sup>164, 158</sup>
 4-Methylchinolin (BQ02)	143.07	937.3-943.5 <sup>c; 161, 159</sup>
 6-Methylchinolin (BQ03)	143.07	933.1 <sup>159</sup>
 7-Methylchinolin (BQ04)	143.07	931.0 <sup>159</sup>
 2-Chinolinol (BQ05)	145.05	728.5-793.3 <sup>162</sup>
 4-Chinolinol (BQ06)	145.05	743.9-827.9 <sup>162</sup>

## 5. Ergebnisse

Substanz	M / <i>m/z</i>	PA / kJ mol <sup>-1</sup>
 6-Hydrochinolin (BQ07)	145.05	728.5-827.9 <sup>d;162</sup>
 6-Methoxychinolin (BQ08)	159.07	748.5-840.1 <sup>e;162</sup>
 4-Chinolincarbaldehyd (BQ09)	157.05	– <sup>f</sup>
 4-Chinolincarbonsäure (BQ10)	173.05	– <sup>g</sup>
 6-Aminochinolin (BQ11)	144.07	742.8-850.7 <sup>h;162</sup>
 Acridin (BQ12)	179.07	972.6 <sup>158</sup>

<sup>a</sup> als deprotoniertes Anion 1412 kJ mol<sup>-1</sup>, <sup>165</sup> pK<sub>a</sub> = 4.35<sup>166</sup>

<sup>b;c</sup> aus Vergleichen mit Triethylamin; 4-Methylpyridin

<sup>d;e</sup> aus Vergleichen mit 2-/3-/4-Hydroxychinolin; 2-/3-/4-Methoxychinolin

<sup>f</sup> pK<sub>a</sub> = 2.95<sup>166</sup>

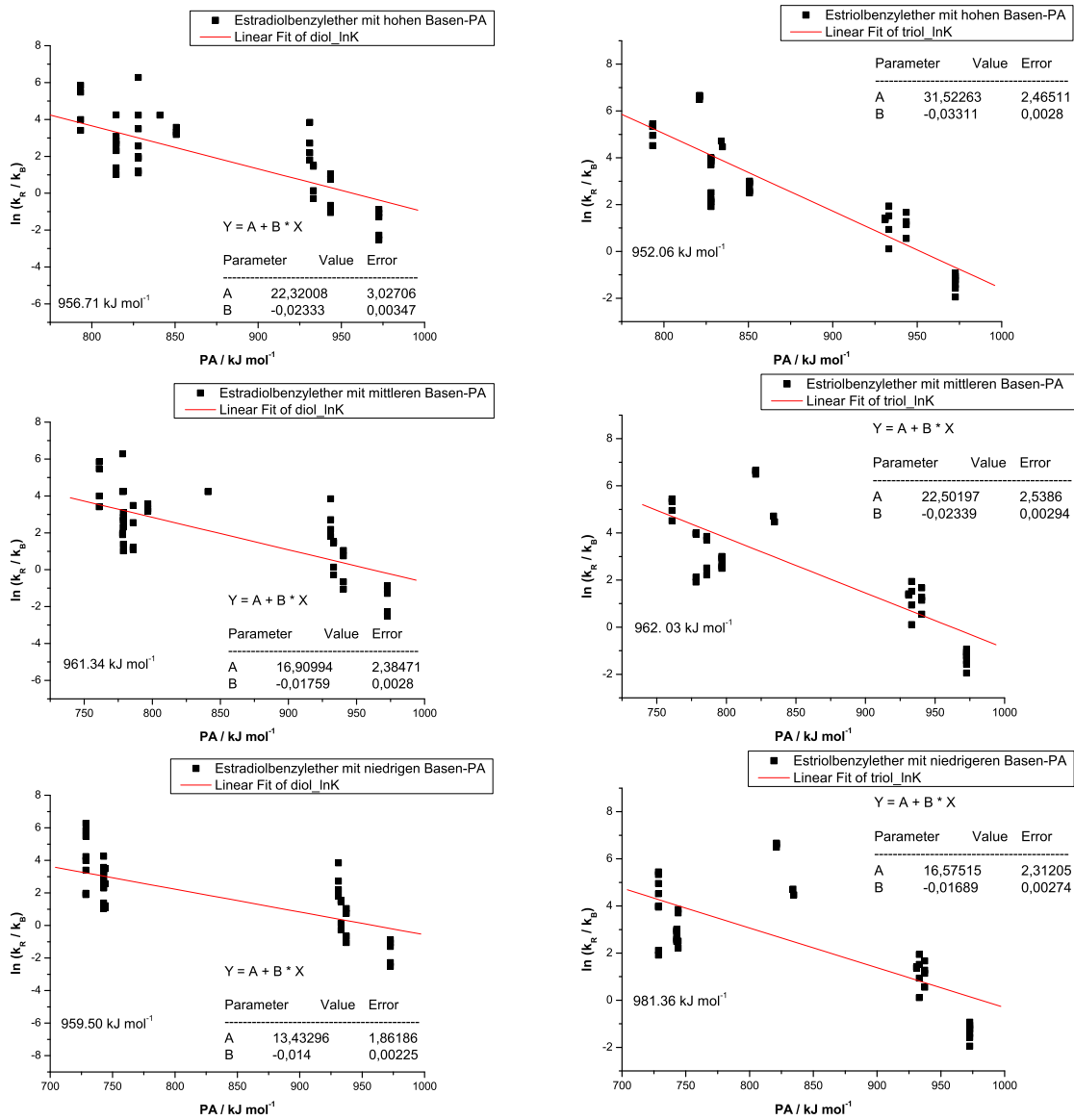
<sup>g</sup> pK<sub>a</sub> = 1.03<sup>166</sup>

<sup>h</sup> aus Vergleichen mit 2-/3-/4-Aminochinolin

Für den Estradiolbenzylether (**3a**) ergibt sich eine berechnete Protonenaffinität zwischen 956.7 und 961.3 kJ mol<sup>-1</sup>, für das entsprechende Benzyloxyestriol (**3b**) eine im Bereich von 952.1 bis 981.4 kJ mol<sup>-1</sup>. Interessant ist, dass diese Absolutwerte zwar im oberen Bereich der Erwartungen liegen, untereinander jedoch konsistent sind und lediglich in einem akzeptablen Bereich streuen. Generell wirkt die Protonenaffinität des Estriolbenzylethers leicht erhöht gegenüber der des Benzyloxyestradiols zu sein, auch wenn erstere stärker variiert und die Werte des Estradiolethers einschliesst. Jenes kann

## 5.6. Protonenaffinitätsbestimmung durch Cooks' kinetische Methode

auf die im Trioether enthaltene zusätzliche Hydroxylgruppe am D-Ring zurückzuführen sein. Unter Zuhilfenahme der mittleren Basenwerte ergeben sich allerdings relativ nahe beieinander liegende Zahlenwerte von  $961.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw.  $962.03 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Abschließend sollen diese in Abschnitt 5.7 als Diskussionsgrundlage für die im Molekül ablaufenden Prozesse herangezogen werden.



**Abbildung 5.83.** – Cooks' kinetischer Methode:<sup>14</sup> Logarithmische Auftragung der Ratenkonstanten der Dissoziation protonierter Estrogenbenzylether-Basen-Dimere. Links ist das Benzylxyestradiol, rechts das entsprechende -estriol zu erkennen. Von oben nach unten nehmen die der Literatur entnommenen Protonenaffinitäten der Vergleichsbasen ab.

## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen

### 5.7.1. Estrogene

Im folgenden Abschnitt sollen die beobachteten Fragmentierungen nun eingehend diskutiert und die ihnen zugrunde liegenden Ursachen bzw. Mechanismen erörtert werden.

Wie zuvor schon erläutert, weisen die ESI-positiv-Massenspektren der unterschiedlichen Steroidether in der Regel wenige Fragmente auf, die in ihrer Häufigkeit durch den Verlust von Wasser aus dem protonierten Molekülion dominiert werden. Im Falle der benzylich geschützten Estrogenether **3a** und **3b** kommt die aromatische Seitenkette als Reaktionsort hinzu. Weitere Fragmentierungen, die zu Signalen im höheren Massenbereich führen, werden nicht beobachtet.

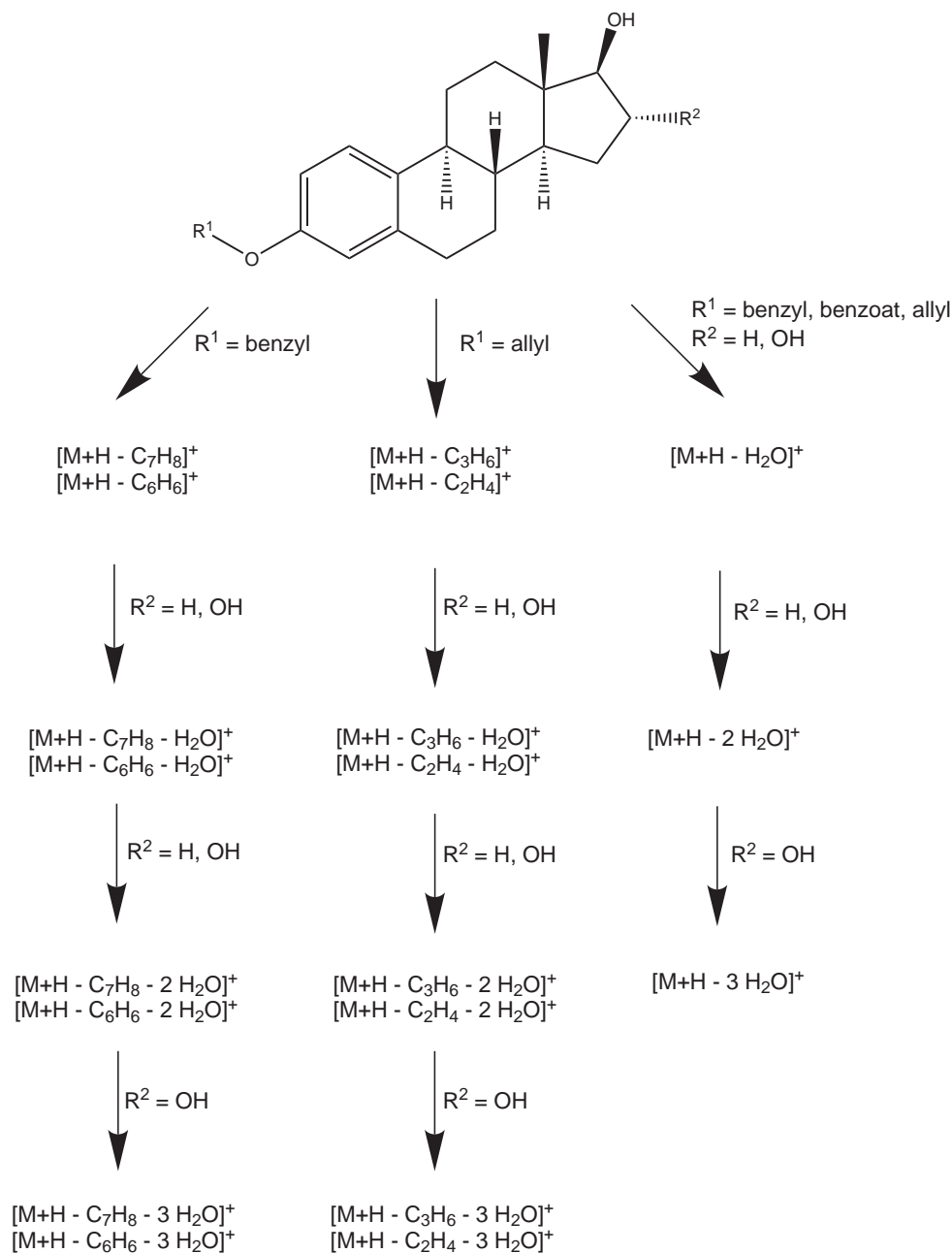
Die Aktivierung des protonierten Molekülions bietet vielfältige Möglichkeiten verschiedener Dissoziationsprodukte. In Abb. 5.1 ist das On-resonance-CID-Spektrum des Estriolbenzylethers (**3b**) dargestellt, Collision-Cell- und IRMPD-Spektren gleichen diesem im Wesentlichen (vgl. Abb. 5.26 / 5.35). Das protonierte Molekülionensignal von **3b** verliert drei Moleküle Wasser neben einer Abtrennung von Toluol und Benzol. Weitere Fragmentierungsschritte sind die Verluste von bis zu drei Wassermolekülen aus den letztgenannten Fragmenten, sodass letztlich drei verschiedene Serien einer Wasser-Abtrennung deutlich werden. Das protonierte Ion verliert entweder die neutralen Wassermoleküle oder den aromatischen Rest des phenolischen Systems, gefolgt von der Eliminierung des Wassers. Diese Ionen werden dabei mit nahezu gleicher Intensität gebildet, was als ein Anzeichen für niedrige Aktivierungsenergien der verschiedenen Prozesse angesehen werden kann. Weitere Fragmentierungsprodukte des steroiden Grundgerüsts werden mit abnehmender Häufigkeit gefunden.

Gleiches Verhalten wird für den Estradiolbenzylether **3a** in Abb. 5.25 beobachtet, der Verlust von zwei Molekülen Wasser wird von der Bildung von Toluol und Benzol begleitet. Letztere werden wiederum von der Abtrennung zweier Moleküle Wasser flankiert, sodass das Spektrum insgesamt drei Serien des Wasserverlustes aufweist. Neben der direkten Abspaltung aus dem protonierten Molekülion wird Wasser nach vorhergehender Abtrennung des aromatischen Molekülteils eliminiert. Im Vergleich zum Massenspektrum von **3b** weisen die Zerfallsprodukte des Steroidgerüsts **3a** noch geringere Intensitäten auf.



## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen

Abb. 5.84 fasst die wichtigsten Fragmentierungspfade der untersuchten Proben basierend auf  $MS^n$ -Messungen zusammen. Unterschiede zwischen den On-resonance-CID- und Collision-Cell-CID- sowie IRMPD-Spektren wurden bezüglich der Fragmente und ihrer relativen Häufigkeit nicht beobachtet. Interessanterweise führt die Isolierung einzelner



**Abbildung 5.84.** – Prinzipielle Fragmentierungspfade der protonierten Steroide **2**, **3** und **5**. Die schwachen Fragmentierungen des Steroidgerüsts sind hierbei vernachlässigt.

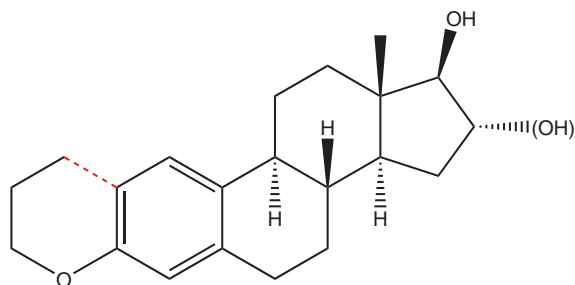
## 5. Ergebnisse

Fragmente bei gleichbleibender Anregungsenergie nach einem erneuten Kollisionsprozess zu keinen anderen Produkten. Das  $[M+H-H_2O]^+$ -Ion spaltet lediglich einmal Wasser im Falle von **3a** und zweimal im Falle von **3b** ab. Gleiches gilt für die aus dem Verlust von Toluol bzw. Benzol stammenden Fragmente. Die Spektren der Estrogenbenzoate **2a** und **2b** unterstützen die Aussagen über die Estrogenbenzylether. Deutlich ist ebenfalls der Verlust von zwei bzw. drei Wassermolekülen direkt aus dem Quasimolekülion  $MH^+$ . Die mögliche Lage des Benzoatrestes zum Steroidgrundgerüst scheint eingeschränkter zu sein als bei den Benzylethern, er ist ggf. durch die verbrückende Oxycarbonylgruppe sterisch vororientiert. Dies kann die letzte unerwartete Wassereliminierung ebenso unterstützen, da die Orbitale für die Claisenumlagerung bereits grob ausgerichtet sind. Von den Intensitäten ihrer Fragmente gleichen sich Benzyloxy- und Benzyloxycarbonylether. Ihre Estriolvarianten verlieren beide  $C_2H_4O$ , ein Bruchstück, auf dessen Herkunft später noch näher eingegangen wird.

Geht man von den Benzylethern und Benzoaten zu den Allylethern über, ändern sich die entsprechenden Massenspektren der Proben **5a** und **5b** in Bezug auf die Intensitäten des Wasserverlustes. Die dritte Wasserabspaltung des Alloxy-Estriols **5b** wird im Collision-Cell-CID-Spektrum nicht beobachtet, während das resultierende Ion im On-resonance-CID-Spektrum schwach und nach IRMPD deutlich hervortritt. Dies deutet darauf hin, dass die letztgenannte Reaktion höhere Aktivierungsenergien oder längere Reaktionszeiten benötigt. Generell weist der Allylsubstituent eine nähere Verwandtschaft zur Benzylgruppe als zu den gesättigten Kohlenwasserstoffsubstituenten auf. Deshalb wird ein Verlust von Propen ( $C_3H_6$ ) aus den protonierten Molekülionen **5a** und **5b** beobachtet, da dieses Neutrale der Abspaltung von Toluol aus den Estrogenbenzylethern **3a** und **3b** entspricht. Im Gegensatz zum Verlust von Benzol aus **3a** und **3b** zeigen die Collision-Cell-CID-Spektren keine oder nur wenig intensive Signale für die Abspaltung eines Ethenmoleküls ( $C_2H_4$ ). Wird die Lebenszeit der Ionen erhöht, indem On-resonance- oder IRMPD-Massenspektren gemessen werden, beobachtet man das Fragment mit geringer Häufigkeit in den Spektren von **5b** und verstärkt in denen von **5a**. Anzumerken ist, dass im Falle der Allyloxysteroiden **5a** und **5b** einige Fragmente aus dem steroiden Ringsystem herausgelöst werden.

Nach Änderung des Ethersubstituenten von ungesättigten Gruppen hin zu gesättigten Kohlenwasserstoffen, wie Methyl-, Ethyl- oder Propyl-, wird ein Verlust der Seitenkette in den Spektren nicht mehr beobachtet. Während die Wasserabspaltung noch intensivere Signale zur Folge hat, weisen die anderen beobachtbaren Fragmente eine geringere Häufigkeit auf, auch aufgrund eines Zerfalls des Steroidgerüsts nach dem Wasserverlust.

Diese Reaktionen ergeben die Abspaltung kleiner Kohlenwasserstoffe, wie  $C_2H_4$  durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion<sup>32</sup> aus den Ringen C und D.<sup>167</sup> Unterschiede zwischen ungesättigten und gesättigten Ethersubstituenten ergeben sich nicht nur aus der Nichtbeobachtung von Ethergruppenfragmenten in den CID-Spektren, sondern auch aus der Tatsache, dass der zweite bzw. dritte Wasserverlust in keinem der gesättigten Steroidether beobachtet wird. Sowohl der Estradiolpropylether **6a** als auch der entsprechende Estriolpropylether **6b** besitzen die Fähigkeit, einen Sechsring zur Stabilisierung auszubilden (Abb. 5.85), aber ihnen mangelt es an einer Doppelbindung.

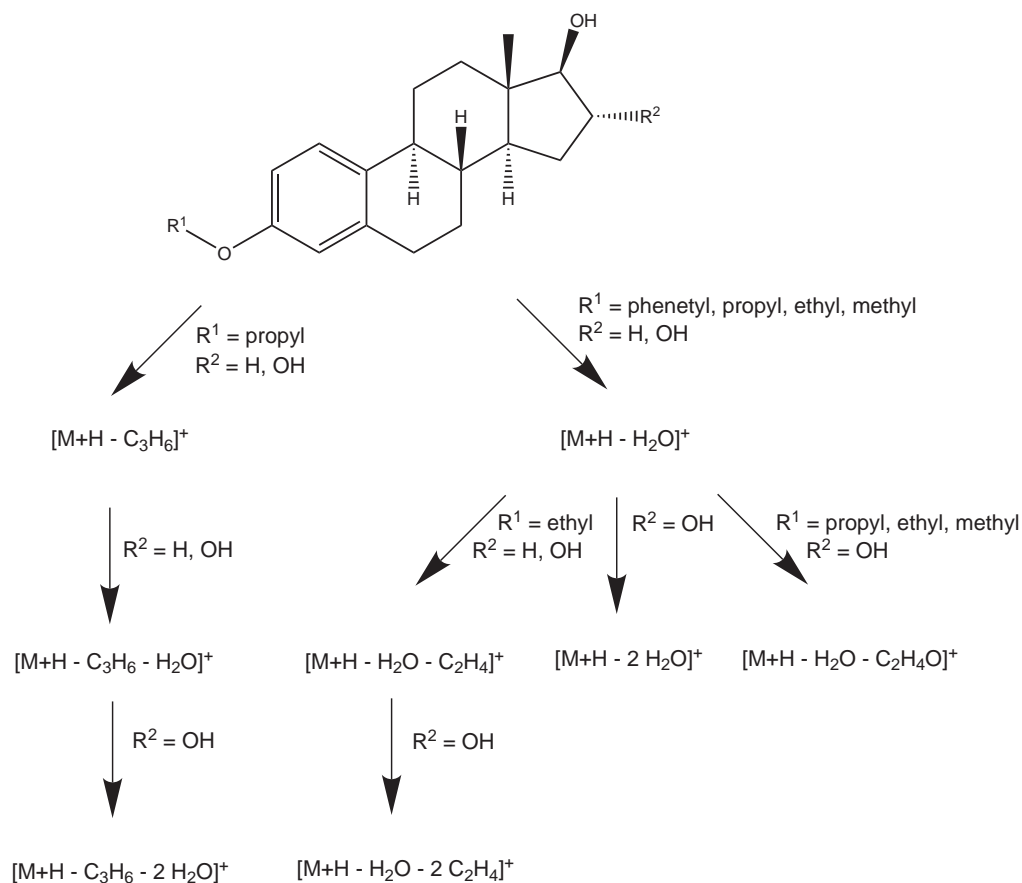


**Abbildung 5.85.** – Sechsringstabilisierung zwischen Propylrest und Steroidgrundgerüst.

Dieses Fehlen der Doppelbindung führt zu keinen markanten Abspaltungen aus der Seitenkette. Neben dem Verlust eines oder zweier Wassermoleküle, die in den Triolpropyletherspektren zu den Ionen bei  $m/z$  313.216 ( $MH^+ - H_2O$ ) und 295.206 ( $MH^+ - 2H_2O$ ) führen, lassen sich verschiedene Fragmente, die sich aus dem Steroidgerüst ergeben, identifizieren, Abb. 5.86 fasst diese Fragmentierungen zusammen. Beide CID-Spektren des Propylethers **6a** unterscheiden sich wenig von **6b**, und so zeigen sich ähnliche Fragmente. Wieder kann eine mögliche dritte (**6b**) Wassereliminierung nicht beobachtet werden. Anscheinend ist ein ungesättigtes System in Verbindung mit einem Sechsring für die komplette Fragmentierung aller vorhandenen Hydroxylgruppen des Steroids und die Ringstabilisierung elementar.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wasserabspaltung und einer Sechsringstabilisierung zu prüfen, wurden die 3-Phenethyl- (**1a**, **1b**) 3-Ethyl- (**7a**, **7b**), und 3-Methylether (**8a**, **8b**) untersucht. Diese Substituenten sind in der Lage, sieben-, fünf- oder viergliedrige Ringe hin zur aromatischen Struktur der Steroide (Ring A) zu bilden. Wie die Propylestrogenether **6a** und **6b** weisen diese Proben keine Anzeichen für einen Verlust eines dritten (**1b**, **7b**, **8b**) oder zweiten (**1a**, **7a**, **8a**) Wassermoleküls aus dem protonierten Molekülion auf. Die Phenethylether eliminieren nach IRMPD- oder On-resonance-CID neben den erwarteten Wassermolekülen lediglich ihren aroma-

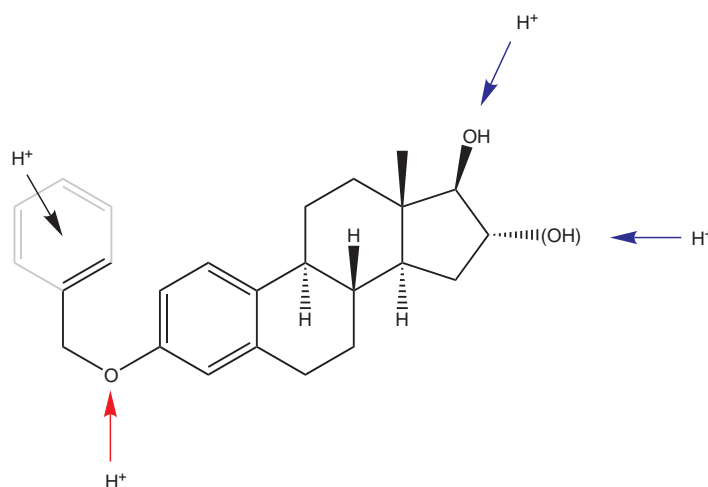
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.86.** – Prinzipielle Fragmentierungspfade der protonierten Steroide **1**, **6**, **7** und **8**. Die schwachen Fragmentierungen des Steroidgerüsts sind hierbei vernachlässigt.

tischen Rest ( $C_8H_{10}O$ ) oder Teile davon ( $C_6H_6$ ). Die intensivsten Signale, die bei den Steroiden **7a** und **7b** beobachtet werden, basieren auf dem Verlust kleinerer Kohlenwasserstoffe aus dem Steroidringsystem nach der Abspaltung einer oder zweier Wassermoleküle. Vorbedingung für die Beobachtung der intensiven Fragmente, die Kohlenstoffatome des Steroidgrundgerüsts enthalten, ist offensichtlich die Eliminierung mindestens eines Wassermoleküls. On-resonance- und Collision-Cell-CID-Spektren der beiden Ethylether unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander. Die Methyletherspektren unterstützen diese Resultate ebenfalls. Bemerkenswerterweise sind die Intensitäten des Wasserverlustes in den Collision-Cell-Spektren schwächer als in denen des On-resonance-CID. Sowohl die Collision-Cell- als auch On-resonance-CID-Spektren **8a** und **8b** zeigen Signale aus dem Steroidrückgrat, so werden i. A. Verluste von  $C_2H_4$  oder  $C_3H_6$  nach der Eliminierung des ersten Wassers beobachtet. Im Falle von **8a** kann der Verlust von  $C_4H_8$  oder zweimal  $C_2H_4$  mit geringer Intensität identifiziert werden, ebenso bei

**8b** das  $[M+H-2H_2O-2C_2H_4]^+$ -Ion. Um zu vergleichen und ein besseres Verständnis der Fragmentierungen innerhalb der Steroidgrundstruktur zu erhalten, wurden ebenfalls die CID-Spektren der puren Estrogene Estradiol und Estriol aufgenommen. Die Estriol-spektren weisen intensive Signale für das protonierte Molekülion sowie die Abspaltung von bis zu zwei Wassermolekülen auf. Dies zeigt das notwendige Vorhandensein eines ungesättigten Substituenten an der phenolischen Hydroxylgruppe, um die dritte Wasserabspaltung einzuleiten. Im Falle von Estradiol wird lediglich ein Wassermolekül eliminiert. Dies unterstützt neben der Aromatizität des Steroidringes A den Ansatz, dass im Falle des Estriols beide Wasserabspaltungen dem D-Ring entstammen, an dem an Position 16 und 17 die Hydroxylgruppen vorhanden sind.



**Abbildung 5.87.** – Mögliche Protonierungsorte der verschiedenen Steroide.

Es stellt sich die Frage nach dem Protonierungsort der Steroide während des ESI-Prozesses, um nun die Unterschiede in den Fragmentierungsreaktionen der beiden CID-Spektrenserien zu verstehen. Generell kann eine Protonierung am / (an den) Sauerstoffatom(en) der freien Hydroxylgruppe(n), an der Ethersauerstoffbrücke oder den ungesättigten Systemen des Steroidrings A oder des alkenylischen Restes stattfinden. Die hauptsächliche Lokalisierung des Protons wird dabei durch die lokalen Protonenaffinitäten der verschiedenen strukturellen Elemente der Steroide gesteuert, wie in Abb. 5.87 dargestellt. Da zunächst spezifische Werte nicht zugänglich waren, sind Daten vergleichbarer Strukturen aus den Arbeiten von Hunter und Lias<sup>158</sup> sowie Walder<sup>160</sup> herangezogen worden.

## 5. Ergebnisse

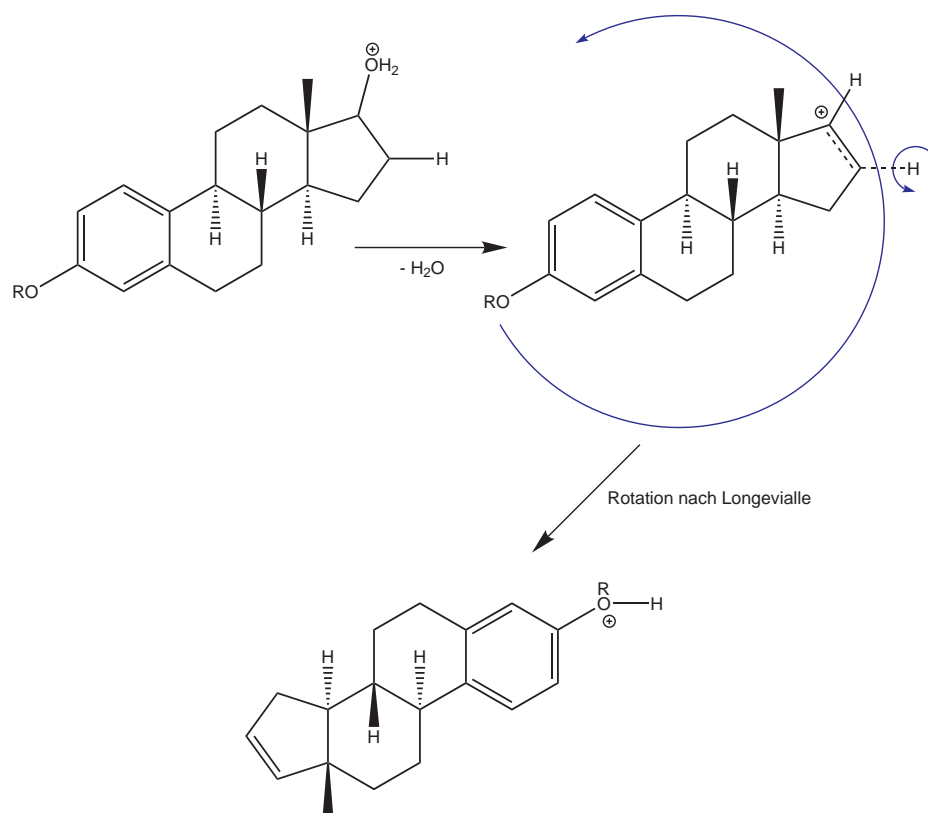
Zusammenfassend können hierzu folgende Anmerkungen gemacht werden:

1. Eine direkte Übertragung des Protons auf das ungesättigte System entweder des Steroidrings A oder der Seitenkette (schwarzer Pfeil) scheint nicht stattzufinden, die Protonenaffinitäten der Vergleichssubstanzen Toluol, Benzol und Propylen betragen 778, 759 und 751 kJ mol<sup>-1</sup> und sind somit niedriger als die Affinitäten aller anderen Positionen.
2. Im Falle der Estriolether kann die Protonierung an den Hydroxylgruppen an Position 17 und 16 (blaue Pfeile) auftreten. Proben mit gleichem strukturellen Motiv wie das *cis*-1,2-Cyclopentadiol weisen eine Protonenaffinität von 885 kJ mol<sup>-1</sup> auf, wobei dieser relativ hohe Wert durch die mögliche synchrone Stabilisierung des Protons durch beide Sauerstoffatome an Ring D erklärt werden kann. Allerdings befinden sich die beiden Hydroxylgruppen des Estriolfünfringes in *trans*-Stellung zueinander, wodurch dieser Wert deutlich gesenkt werden sollte, vielleicht nahezu auf den Wert des frei rotierenden Ethandiols mit 816 kJ mol<sup>-1</sup> (Der Unterschied beträgt -69 kJ mol<sup>-1</sup>). Eine direkte Angabe für ein zyklisiertes *trans*-Pentandiol ist nicht veröffentlicht worden, für die Annahme einer Protonenaffinitäts-Minimierung durch den Wechsel zwischen *cis*- und *trans*-Stellung spricht jedoch die Differenz der Protonenaffinität zwischen den Stereoisomeren des 1,3-Cyclohexandiols in Höhe von 54 kJ mol<sup>-1</sup> (*cis*: 882 kJ mol<sup>-1</sup>; *trans*: 828 kJ mol<sup>-1</sup>).
3. Im Falle der Estradiolether sollte die Anlagerungstendenz noch stärker erniedrigt sein, da hier die zweite OH-Gruppe an Position 16 komplett fehlt und somit für eine Protonenanlagerung nicht zur Verfügung steht, die Protonenaffinität des puren Cyclopentanol betragt 795 kJ mol<sup>-1</sup>.
4. Die Übertragung eines Protons auf den Ethersauerstoff an Ring A (roter Pfeil) führt zu einer Struktur, die einer Protonierung von Anisol oder des Methylbenzylethers nahe kommt. Die entsprechenden Protonenaffinitäten werden in der Literatur mit 840 bzw. 817 kJ mol<sup>-1</sup> beziffert.

Daraus ergäbe sich für die Estriole eine bevorzugte Protonierung der Hydroxylgruppen am D-Ring und ggf. leicht geringer des Ethersauerstoffs am A-Ring. Im Falle der verschiedenen Estradiole ist eine klare Unterscheidung beider Positionen schwerer möglich. Da sich die Protonenaffinitäten der Hydroxylgruppen am D-Ring und der Ethergruppe nahezu gleichen, ist eine Protonierung an beiden Stellen möglich und wahrscheinlich. Die Werte legen nahe, dass die Protonierung eher an der Etherbrücke geschieht.

## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen

Ein Wechsel des angelagerten Protons zu jedweder Seite kann durch einen Protonentransfer langer Reichweite – bei bifunktionalen Steroiden ist er als Longevialle-Prozess<sup>168,169,170</sup> bekannt – erreicht werden (vgl. Abb. 5.88).

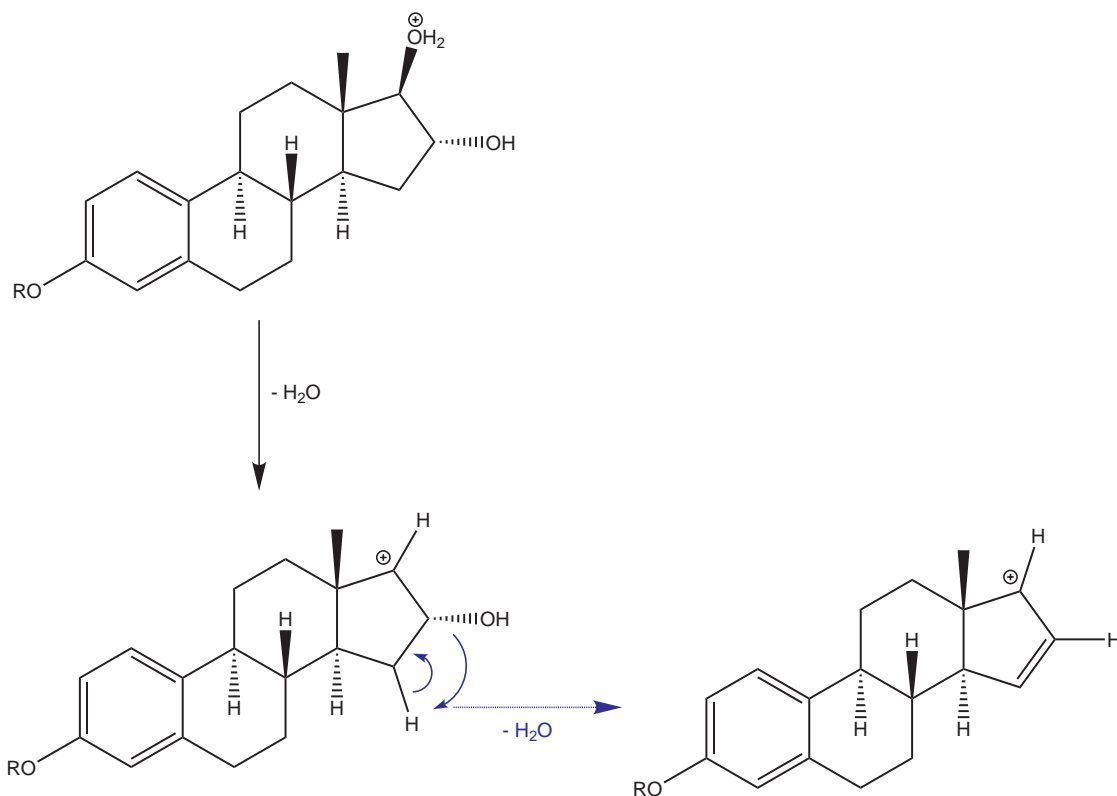


**Abbildung 5.88.** – Intramolekulare Protonenübertragung nach Longevialle: Nach vollständigem Wasserverlust am Fünfring kann sich die Bindung zwischen Proton sowie C-16 lockern und unter Voraussetzung einer nicht allzu schnellen Trennung der Fragmente sowie eines Drehimpulserhalts des Vorgängerions wird ein Proton vom D-Ring des Steroids auf die Ethergruppe übertragen.

Die mittels der Cooks'schen kinetischen Methode<sup>14</sup> (s. S. 125) experimentell für die Estrogenbenzylether bestimmten Protonenaffinitäten liegen ein gutes Stück über den Werten der Synthonstrukturen und der Erwartungen: Zieht man die mittleren Literaturwerte der Referenzbasen heran, liegt die PA des Benzyloxyestradiols bei  $961.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw. die des Benzyloxyestriols bei  $962.03 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Diese Ergebnisse unterstützen die bisher gemachten Überlegungen, auch wenn obige Werte Fehlern unterworfen sind. Die Höhe der Werte schließt eine Protonierung des ungesättigten Systems definitiv aus. Eine initiale Protonierung der Hydroxylfunktion(en) ist möglich und gerade auch bei

## 5. Ergebnisse

den Triolethern wahrscheinlich. Hierfür kann ihr leicht zu höheren Werten verschobener PA-Bereich im Vergleich zum Diolether sprechen. Für die initiale Protonierung des Ethersauerstoffs sprechen dagegen die unter Zuhilfenahme der gemittelten Referenzbasenangaben erhaltenen mittleren absoluten Protonenaffinitäts-Werte von  $961.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  für das Diol bzw.  $962.03 \text{ kJ mol}^{-1}$  für das Triol. Beide Substanzen unterscheiden sich demnach kaum in ihrem Protonierungsvermögen. Ein Austausch des Protons über den beschriebenen Longevialle-Prozess scheint zugänglich zu sein und nötig.



**Abbildung 5.89.** – Wasserverlust nach Protonierung des 17-Sauerstoffs gezeigt am Estriolbenzylether.

Abbildung 5.89 fasst die mechanistischen Betrachtungen zusammen, die zum Verlust der Wassermoleküle sowie der Ethergruppe aus den untersuchten Steroiden führen. Basierend auf obigen Überlegungen lagert sich das Proton zunächst an einer der Hydroxylgruppen des steroiden D-Ringes an. Die Abspaltung von zwei Wassermolekülen ist eine weithin bekannte Reaktion in 1,2-Diolen<sup>171</sup> – McLafferty<sup>172</sup> *et al.* sowie Xue<sup>173</sup> konnten zeigen, dass 1,2-Cyclopentadiol nach Chemischer Ionisation zwei Moleküle Wasser verliert und ein protoniertes Cyclopentadien bildet – im Fall der Steroidether entstände ein allylisches Carbeniumion. Weiterhin veranschaulichten die Autoren, dass der Verlust

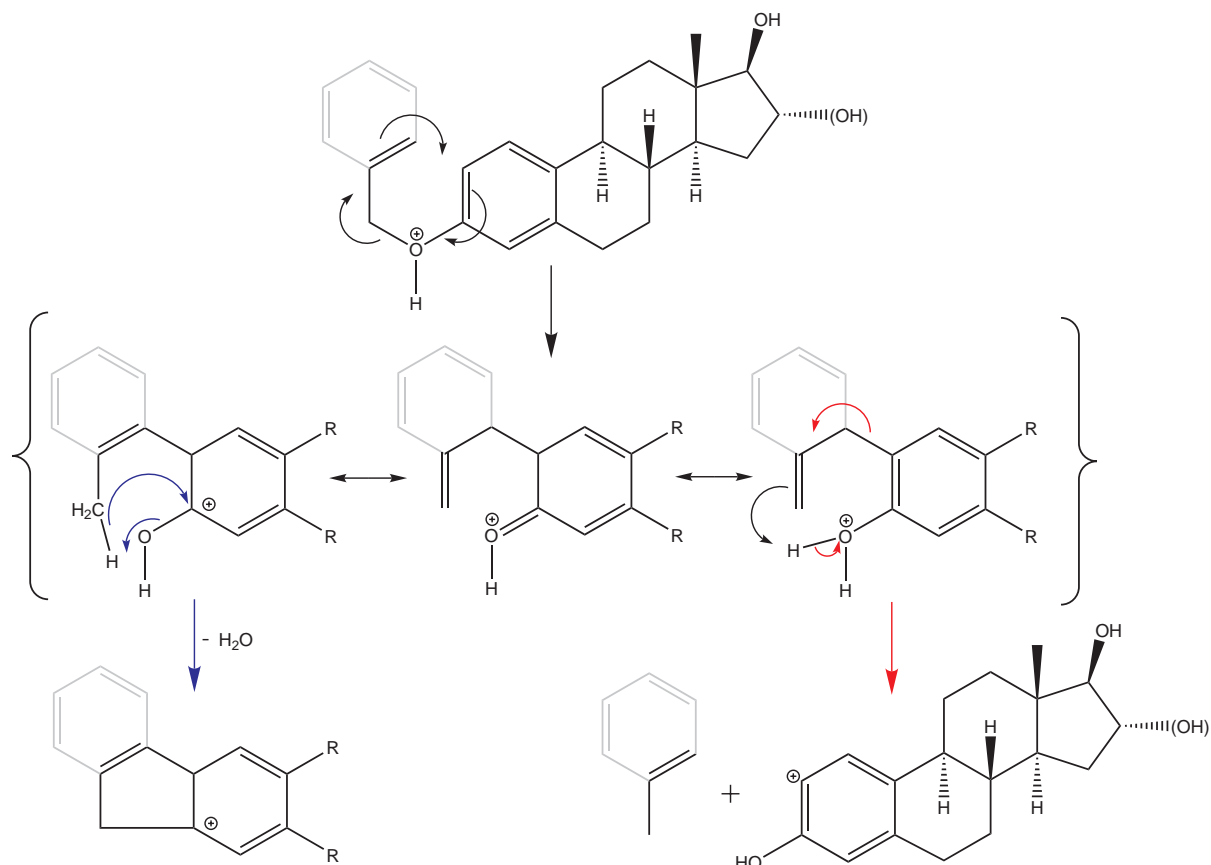


des zweiten Wassermoleküls mit höheren Intensitäten auftritt, wenn sich beide Hydroxylgruppen in *trans*-Stellung zueinander befinden, wie es auch bei den untersuchten Estrogenen der Fall ist.

Im Bereich der Estradiole tritt im ESI-Prozess nicht bevorzugt eine Protonierung der einzelnen Hydroxylgruppe am D-Ring auf, sondern die Ethergruppe wird ebenso wahrscheinlich protoniert. Das Verhältnis der Protonenaffinitäten vergleichbarer molekularer Strukturen deutet auf beide Positionen hin. Aus den Massenspektren kann geschlossen werden, dass das Steroid in einem Fragmentierungsprozess die Hydroxylgruppe des D-Ringes in Form von Wasser verliert und eine cyclopentenartige Struktur bildet. Der Substituent an der Ethergruppe spielt eine entscheidende Rolle bei der Fragmentierung der Estrogenether. Wie in den obigen Massenspektren diskutiert, verursacht ein Alkylsubstituent Fragmente, die aus dem Steroidgrundgerüst gebildet werden, während Alkenyl- und aromatische Strukturen den Verlust eines weiteren Wassermoleküls erlauben. Um diese Dissoziation einzuleiten, muss das Proton am Sauerstoff vorhanden sein, entweder direkt durch den Ionisierungsprozess oder durch Transport in Form einer Longevialle-Umlagerung oder einer anderen versteckten Protonenreueordnung. Solche Umordnungen wurden bisher nicht nur für Steroide beobachtet, sondern auch für substituierte Kohlenwasserstoffe, u. a. durch Grützmaier<sup>174,175</sup> und Mitarbeiter. Sie zeigten, dass neben Protonen sich ebenso komplette Alkylgruppen – wie *t*-Butyl – über einen aromatischen Rest wie  $\alpha$ -Methoxycarbonylbenzylkationen bewegen lassen.

Sobald ein Proton am Ethersauerstoff angelagert ist, durchlaufen die alkenylischen bzw. aromatischen Gruppen / Reste eine Claisen<sup>146</sup>-Umlagerung, die zu einem phenolischen Element am A-Ring führt. Neben ihrer Verwendung als allgemeine Isomerisierungsreaktion in der organischen Synthese ist die Umlagerung in der Massenspektrometrie bei Radikalkationen<sup>176,177,178</sup> und -anionen<sup>179</sup> sowie *even-electron*-Ionen<sup>157</sup> bekannt, und sie wurde für die Chemische Ionisierung von Allylphenylethern, Propargylphenylethern<sup>180</sup> und N-Allylanilinen<sup>181</sup> sowie die Elektronenionisation von Phenylallylphenylethern<sup>182</sup> beschrieben. Ihr Mechanismus folgt einer thermisch induzierten konzertierten [3.3]-sigmatropen Reaktion, in der eine C-X- $\sigma$ -Bindung (X = O, N, S) gebrochen und eine neue C-C- $\sigma$ -Bindung drei Atome entfernt unter Reorganisation des  $\pi$ -Elektronensystems gebildet wird. Die Claisen-Reaktion ist exotherm und kann allein durch moderates Heizen und die damit verbundene Zuführung von Aktivierungsenergie ausgelöst werden. Aufgrund ihrer Bildung im ESI-Prozess sollten die Ionen nur wenig überschüssige Energie besitzen und im energetischen Grundzustand gebildet werden.

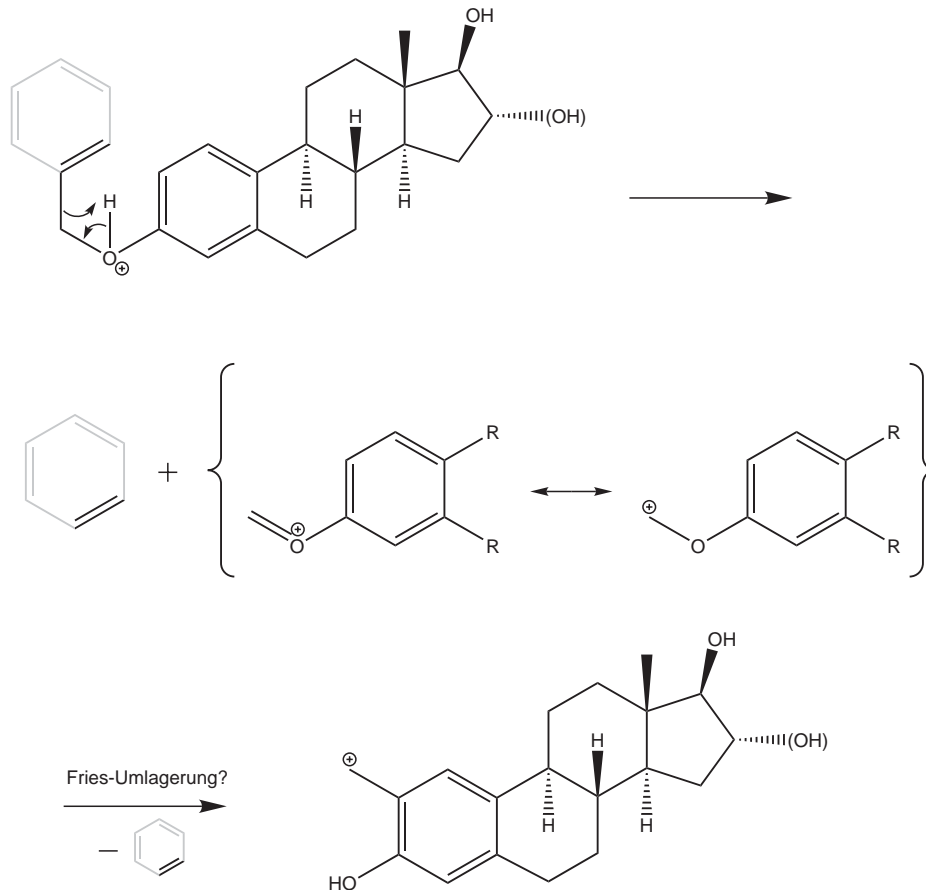
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 5.90.** – Claisen-Umlagerung sowie die Verlust von Toluol / Propen und des Wassers aus den untersuchten Benzyloxy- und Allyloxyestrogenen.

Deshalb überrascht es zunächst, diese Reaktion in den ESI-CID-Spektren der Steroide zu beobachten. Abb. 5.90 zeigt dabei einen möglichen erläuternden Mechanismus. Da die CID-Massenspektren der Substanzen **4a**, **b** und **5a**, **b** nicht nur den Verlust von Wasser anzeigen, sondern auch den alkenylischen bzw. aromatischen Rest als primäres Fragmentierungselement einer parallelen Reaktion, scheint eine solche Umlagerung glaubwürdig zu sein. Betrachtet man das Resultat dieser Fragmentierung weiter, ist es überraschend, weil im Produktion erneut der Verlust von zwei oder drei Wassermolekülen beobachtet wird. Die Claisen-Umlagerung erlaubt sowohl den Verlust von Toluol aus den Benzylothern und seinem C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-Analogon aus den Allylothern als auch die Eliminierung der aromatischen Hydroxylgruppe an Position 3 unter Verwendung eines Zwischenzustandes. Die Claisen-Umlagerung scheint unmittelbar nach der Anlagerung des Protons an den Ether stattzufinden. Als Intermediat wird ein protoniertes Keton erzeugt, das zu einem protonierten Allylestrogen oder im Falle der Originalbenzylother zu einem 2-(6-Methylcyclohexa-2,4-dienyl)-Estrogen rearomatisiert. Beginnend beim Keton wird

## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen



**Abbildung 5.91.** – Möglicher Mechanismus für den Verlust von Benzol / Ethen aus den untersuchten Benzyloxy- und Allyloxyestrogenen.

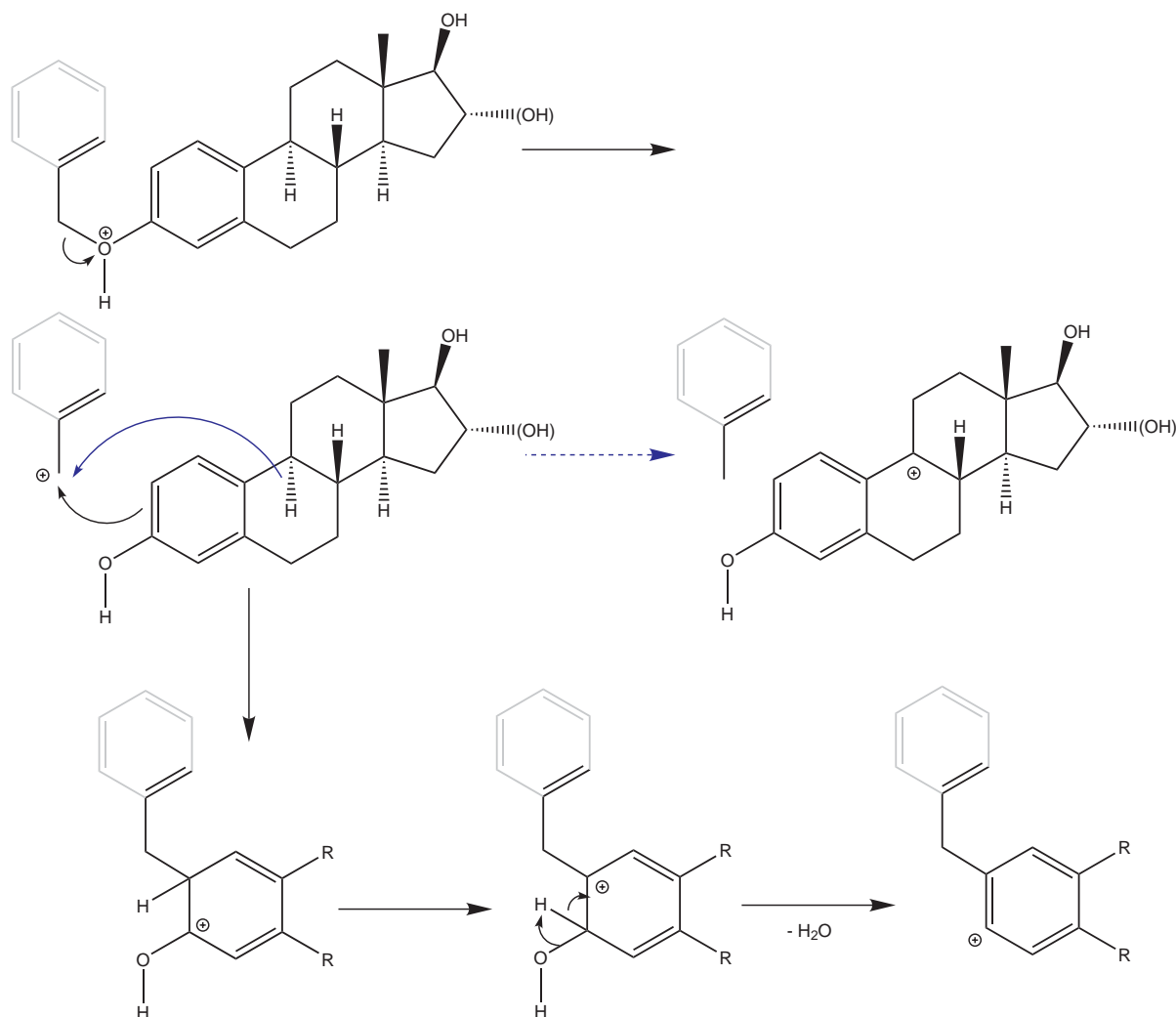
eine Protonenwanderung zur Doppelbindung des Allylrestes bzw. der Methylengruppe des Cyclohexadiens gefolgt von einem Bindungsbruch an C-2, letzterer wird dabei besonders durch die Rearomatisierung des Cyclohexadiens zum *o*-Methyl-Phenylestrogen. Schließlich werden Toluol und  $C_3H_6$  als Propen unter Verbleib der Ladung vom Steroid getrennt. Die Resonanzstruktur des einzelnen rearomatisierten Ketons erklärt dabei, warum die Benzyl- und Allylether in der Lage sind, die zweite bzw. dritte Hydroxylgruppe am aromatischen System als Wasser zu verlieren. Nach der Protonierung der affinen Sauerstoffbrücke und der stattgefundenen Umlagerung verbleibt das Proton an der Hydroxylgruppe, die komplett als Wasser abgespalten wird, während die Ladung am aromatischen System zurückbleibt und durch das ungesättigte System des A-Rings und seines Substituenten zusätzlich stabilisiert wird.

## 5. Ergebnisse

Die gesättigten Estrogenether (Methyl-, Ethyl-, Propyl-), die einer Claisen-Umlagerung *a priori* nicht unterliegen können, benötigten hier ebenfalls die Möglichkeit einer Substituentenstabilisierung, weshalb der weitere Wasserverlust an dieser Stelle unterbleibt. Ein anderer Hinweis auf die Bedeutung des Substituenten ist, dass die nicht veretherten Steroide Estradiol und Estriol trotz ihrer entsprechenden Protonenaffinität ( $PA_{Phenol} = 817 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) die Hydroxylgruppe am A-Ring nicht verlieren. Das Hervortreten des neutralen Benzolfragmentes ist noch nicht eindeutig identifiziert, ein möglicher Deutungsansatz ist in Abb. 5.91 dargestellt. Ausgehend von der protonierten Etherbrücke an Position 3 kann ein direkter  $H^+$ -Transfer auf den Etherrest stattfinden, während die Ladung am Sauerstoff zurückbleibt. Die Reaktion scheint durch die Bildung des beständigen Benzols respektive Ethens getrieben zu werden. Problematisch bleibt der Verbleib der Methylengruppe am phenolischen Sauerstoff, deren Abspaltung in den Spektren nicht beobachtet oder ggf. durch den Verlust von  $C_7H_8$  verdeckt wurde, und die eine weitere Wasserabspaltung ohne eine andere unwahrscheinliche Umlagerung (bspw. nach Fries<sup>183</sup>) verhindert. Desweiteren wird ein analoger  $C_2H_4$ -Verlust in den Spektren des Estradiolallylethers nicht beobachtet, während der Benzolverlust im On-resonance-Spektrum des Estradiolbenzylether deutlich zu beobachten ist. Er kann also nicht durch eine pure Claisen-Umlagerung erklärt werden.

Darum sollte auch ein weiterer Ansatz hinzugezogen werden, um die beschriebenen Fragmentierungen besser zu erklären. Da der beschriebene 1,3-H-Shift an Position 2 in Abb. 5.90 wie der C-C-Bindungsbruch nicht vorteilhaft scheinen, ist es möglich, die Eliminierung von Toluol und Propen als Folge eines benzyllischen Bindungsbruchs (s. Abb. 5.92) und einer nachfolgenden Hydridabstraktion des freigesetzten Benzylkations vom Steroidgrundgerüst - vermutlich von den Positionen 6 oder 9 (Ring B) - innerhalb eines Ionen-Molekül-Komplexes zu formulieren. Der dritte Wasserverlust (bzw. der zweite im Falle der Diolether) erscheint auf diesem Wege ebenso glaubwürdig. Nach elektrophiler Addition des Benzylkations ist das entstandene Wheland-Intermediat<sup>184</sup> in der Lage, über einen 1,2-H-Shift umzulagern und Wasser abzuspalten. Wie oben beschrieben, zeigen die Massenspektren aller alkyllisch veretherten Estriole und Estradiole und die der reinen Estrogene lediglich den Verlust der Hydroxylgruppen am D-Ring. Sie weisen stattdessen Fragmentierungen des Steroidgrundgerüsts auf. Der erste Schritt dieser Reaktionssequenz ist eine Reihe von Ringöffnungsmechanismen, die zu einem Makrozyklus führen und als Isomerisierungsreaktionen in der Literatur<sup>185</sup> gut bekannt sind. Da die Reaktionen bereits im protonierten Molekülion stattfinden können, sind sie u. a. die Quelle des  $C_2H_4O$ -Fragmentes der Estriolether. Der komplette Wasserverlust aus dem

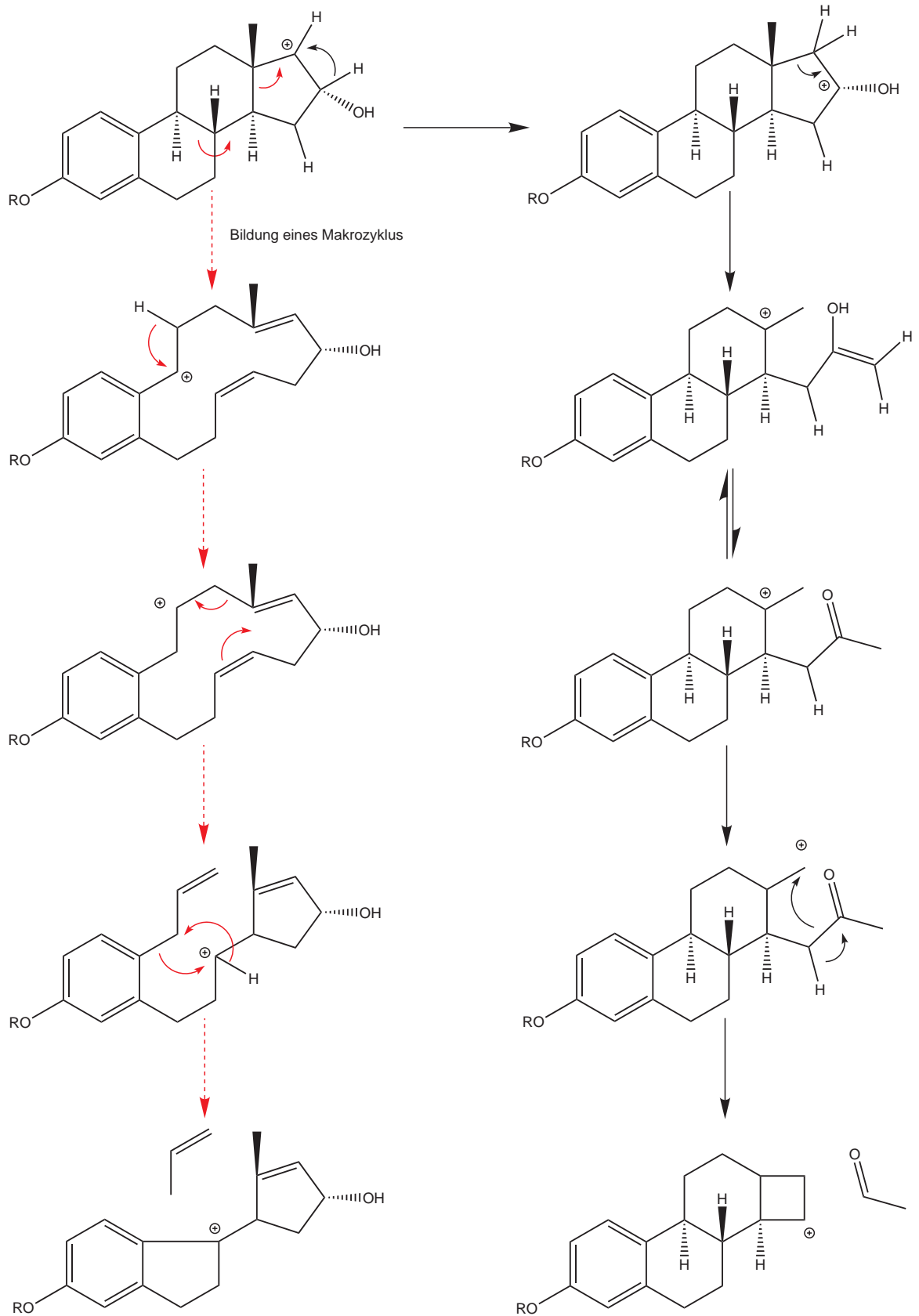
## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen



**Abbildung 5.92.** – Der Verlust von Toluol / Propen aus den untersuchten Benzyloxy- und Allyloxyestrogenen nach einem benzylichen Bindungsbruch und Hydridabstraktion, Wasser wird über einen Wheland-Komplex eliminiert.

D-Ring als auch die Bildung des zuvor erwähnten Makrozyklus - gezeigt in Abb. 5.93 - tragen zur  $C_2H_4O$ -Bildung bei und sind elementar für das schwache Auftreten von  $C_3H_6$  in nahezu allen Estrogenetherspektren. Nach Protonierung der Hydroxylgruppe an Position 17 findet der erste Wasserverlust statt und die Ladung verbleibt am steroiden Grundgerüst. Die Estriolether sind nachfolgend in der Lage, erneut Wasser entlang des blauen Pfades in Abb. 5.89 zu verlieren, über eine Öffnung des D-Ringes (Abb. 5.93) das Acetaldehyd  $C_2H_4O$  zu eliminieren oder einen Makrozyklus aus den Ringen B, C und D als Grundlage für weitere Umlagerungen und Abspaltungen zu bilden. Dem schwarzen durchgezogenen Pfad folgend wird ersichtlich, wie das  $C_2H_4O$ -Fragment freigesetzt wird.

5. Ergebnisse



**Abbildung 5.93.** – Ringöffnungsreaktionen und die daraus resultierenden Fragmente Propen (roter gestrichelter Pfad) und Acetaldehyd (schwarzer Pfad).

Unter Erhalt der Ladung an der Steroidstruktur wird es als Neutrales eliminiert. Dies erklärt auch, warum die initiale Protonierung an Position 17 stattfinden musste. Es erfolgt ein Ringbruch und das resultierende Enol tautomerisiert zu einem Keton. Nach einem 1,2-H-Shift bildet sich ein viergliedriger Ring und das Acetaldehyd wird freigesetzt. Der gestrichelte Pfad beschreibt die Entstehung von Propen aus dem genannten Makrozyklus. Letzterer zerbricht nach einem 1,2-H-Shift und bildet einen fünfgliedrigen Ring, der an den ursprünglichen D-Ring erinnert. In einem weiteren Schritt wandert erneut ein Wasserstoff und ein neuer B-Ring wird unter Freisetzung des Propens geschlossen.

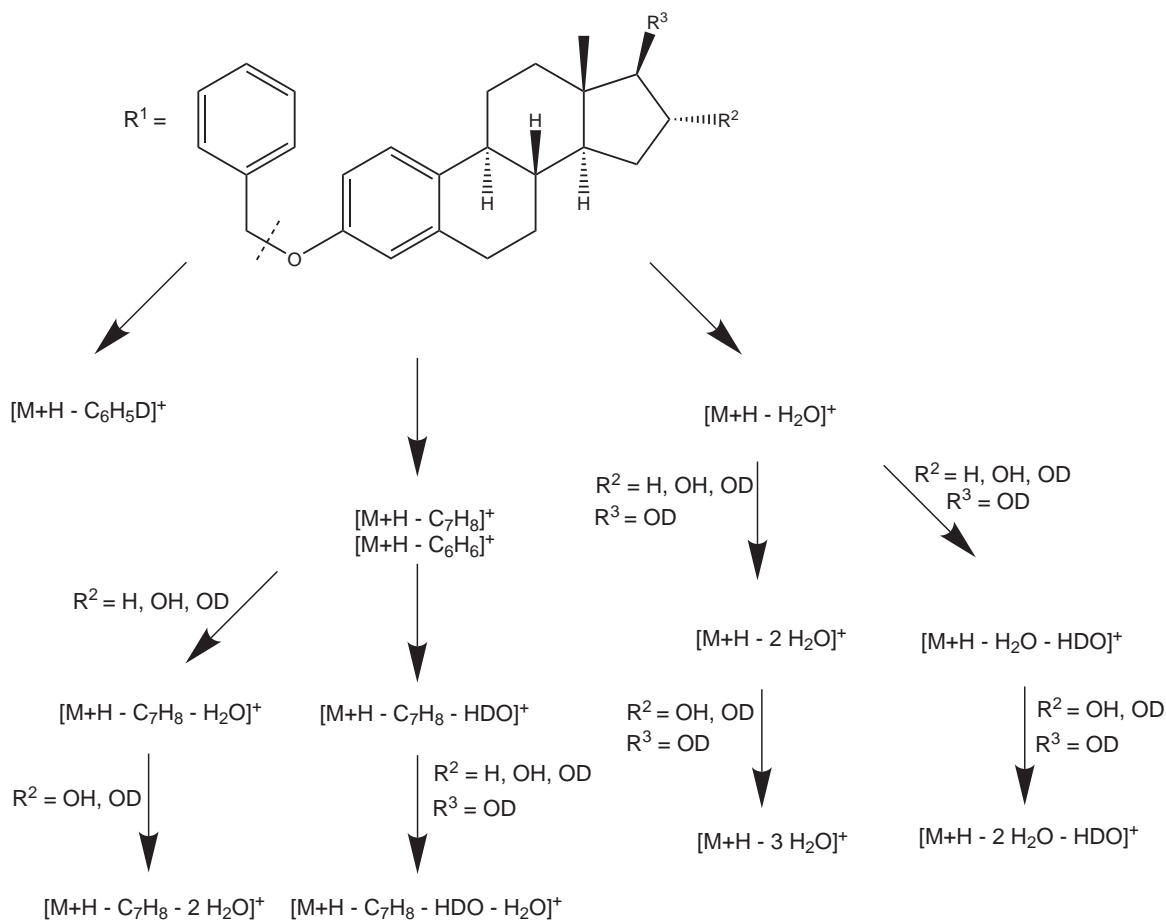
So sollten die Hauptfragmentierungen diskutiert werden, die auf der grundlegenden Struktur der Steroide basieren, wie den ersten (und zweiten) Wasserverlust der Estradiol- (und Estriol-) Ether, die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O-Eliminierung aller Estriolderivate nach dem ersten Wasserverlust und das schwache Auftreten von C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-Fragmenten in nahezu allen Estrogen-spektren.

### 5.7.2. Deuterierte Estrogene

Die Ergebnisse, die anhand der Steroide **1 - 3** und **5 - 9** erzielt worden sind, wurden durch die Deuterierung der Benzyl-derivate **4a**, **b** und **c** verifiziert.

Im Spektrum des mono-deutierten Estriolbenzylethers (Abb. 5.28), das zu deutlicheren Aussagen als das des di-deutierten führte, ist ausgehend vom d<sub>1</sub>-MH<sup>+</sup>-Ion bei *m/z* 380.231 die Eliminierung von bis zu drei Wassermolekülen bzw. zwei Molekülen H<sub>2</sub>O und einem HDO zu erkennen sowie ein weiterer Verlust von C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>D and C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> mit folgender Wasser- und HDO-Abspaltung zu beobachten gewesen; die Isotopierung des Estradiolethers mündete in analogen Fragmentierungen (s. Abb. 5.29). Die entsprechenden Pfade sind in Abb. 5.94 dargestellt.

Nachdem aufgrund der ICR-Messgenauigkeit zwischen deuterierten Spezies und <sup>13</sup>C-Satelliten-Ionen ( $\Delta C = m(^{13}\text{C}) - m(^{12}\text{C}) = 1.004 \text{ Da}$ ,  $\Delta H = m(\text{D}) - m(\text{H}) = 1.008 \text{ Da}$ ) und über die unterschiedlichen Ionenhäufigkeiten (mono-deutierter Estriolbenzylether:  $A(m/z\ 379) : A(m/z\ 380) : A(m/z\ 381) = 1.00 : 0.97 : 0.37$ ; nicht-deutierter Estriolbenzylether:  $A(m/z\ 379) : A(m/z\ 380) : A(m/z\ 381) = 1.00 : 0.23 : 0.03$ ) unterschieden werden konnte, bestätigten die Signale die angesprochenen Fragmentierungen und Umlagerungen.



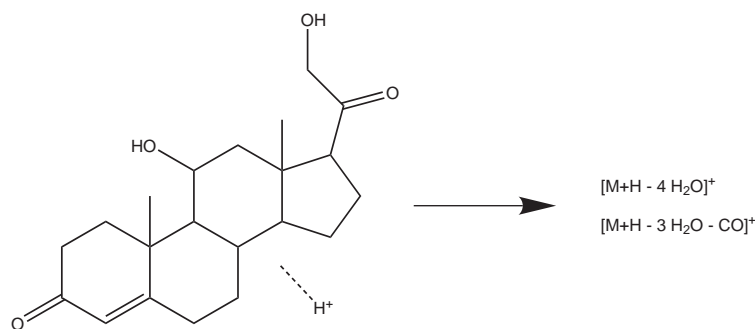
**Abbildung 5.94.** – Prinzipielle Fragmentierungspfade der deuterierten Steroide **4a**, **b** und **c**. Die schwachen Fragmentierungen des Steroidgerüsts sind hierbei vernachlässigt.

### 5.7.3. Gestagene

Neben den Estrogenen wurden aufgrund ihrer verwandten Struktur verschiedene Gestagene im ICR-Massenspektrometer vermessen - dazu gehören Pregnandiol (**11**), Pregnenolon (**12**), Hydroxy-Pregnenolon (**13**), Corticosteron (**15**) und der Estrogenvorläufer Dehydroepiandrosteron (**14**). Ihre Benzyloxyderivate waren allerdings synthetisch nicht zugänglich. Insgesamt sind die Gestagenspektren von wenigen klaren Signalen geprägt. Sie verbinden zahlreiche Wassereliminierungen der frei zugänglichen Hydroxyl- und z. T. Carbonylgruppen, letztere aufgrund einer Keto-Enol-Tautomerie, angefangen von zweien im Falle des Pregnandiols und Pregnenolon bishin zu vieren beim Corticosteron (vgl. Abb. 5.95). Diese Verluste sind aber alle erwartet worden. Das Corticosteron setzt im Zuge der Wasserabspaltung noch CO frei. Das 17-Hydroxypregnenolon emittiert al-



## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen



**Abbildung 5.95.** – Beobachtete Fragmente nach ESI des Corticosterons.

ler Erwartung nach ebenfalls drei neutrale Wassermoleküle, jedoch ließ sich dieser Verlust nicht nach positiver Ionisierung aufzeigen, wahrscheinlich da die Substanz sich nur schwer ionisieren und in der Zelle isolieren lies. Generell gleichen sich die Ergebnisse nach kollisions- und strahlungsinduzierter Dissoziation. Mehr als die beschriebenen Fragmente treten i. d. R. bei den üblicherweise verwendeten Anregungsenergien nicht auf, lediglich bei hohen IR-Laserenergie kommen weitere Ringbruchstücke schwach hinzu.

Negative Ionisierung führte zu einer weiteren Einschränkung der Fragmentvielfalt. Auch wenn sich die Gestagene vereinzelt nach neg. ESI schwer isolieren und fragmentieren ließen, zeigte sich anhand ihrer Übersichtsspektren und der deutlichen On-resonance-Spektren vor allem des Corticosterons und Hydroxypregnenolons, dass die Gestagene auf diese Weise ein Wasserteilchen weniger emittieren als in ihnen Hydroxy- und Carbonylgruppen als Ausgangsposition dafür vorhanden sind. Eben auch das Hydroxypregnenolon setzt hier zwei Wasserteilchen frei, sodass von der nicht beobachteten dritten Eliminierung im Positivmodus ausgegangen werden kann. Deutlich geworden ist auch anhand der Verluste der Gestagenanalyten ihre strukturelle Nähe zu den Estrogenen, auch wenn ihr Steroidring A in Sesselkonformation vorliegt statt der aromatisch planar wie der der Estrogene. Interessant wäre gewesen, wie sich benzylich geschützte Gestagenvarianten verhalten hätten. Nach bisherigen Erkenntnissen allerdings verhalten sie sich wie ihre underivatisierten Vorgänger, sodass sie lediglich ausgehend von den freien funktionellen Gruppen  $H_2O$ -Moleküle freigesetzt hätten, da es aufgrund ihrer Struktur zu keiner sigmatropen Umlagerung kommen kann.

### 5.7.4. Indole

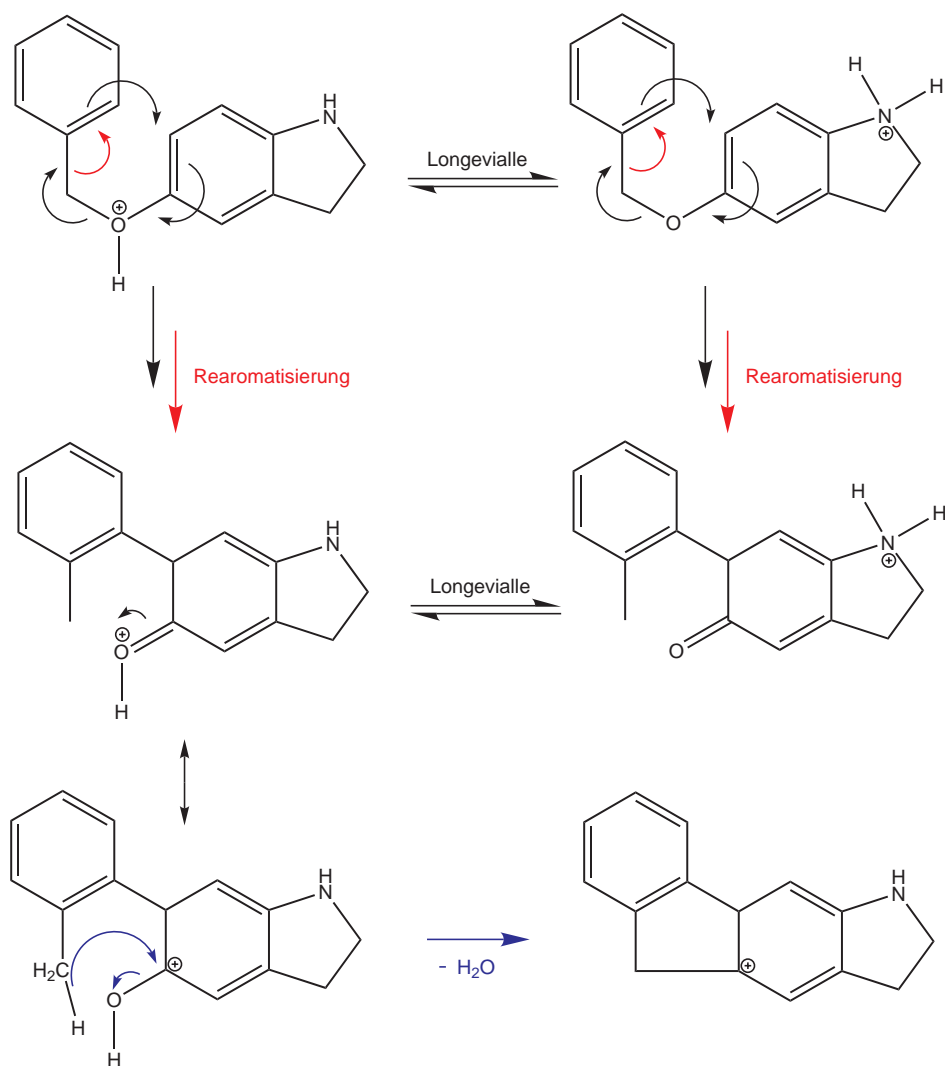
Den Benzyloxy- und Allyloxyestrogenen vergleichbare Umlagerungen und Fragmentierungen zeigen verschiedene Abkömmlinge des Benzyloxyindols (**16**); die aus den Spektren von 5-Benzyloxyindol, 5-Benzyloxy-6-methoxy-indol (**17**), 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (**18**) und 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (**19**) erhaltenen Hypothesen und Erkenntnisse sollen nachfolgend erörtert werden.

Wie viele der Indolderivate bildet das 5-Benzyloxyindol unter positiven ESI-Bedingungen zunächst sowohl ein  $[M+H]^+$  als auch ein  $[M+Na]^+$ -Ion, ersteres zerfällt sowohl nach CID als auch IRMPD in mehrere Fragmente, die dem Verlust von  $H_2O$ ,  $CO$  und  $C_6H_6$  entsprechen. Es generiert also ein Wasserteilchen, obwohl das Indol wie die Benzyloxy- und Allyloxyestrogenether eigentlich benzylich geschützt sein sollte. Generell stellt sich für das  $MH^+$ -Ion wieder die Frage, wo die initiale Protonierung stattgefunden hat: am Stickstoffatom des Indolrings oder dem Sauerstoffatom des Phenylbenzylethers, das ungesättigte System ist aufgrund obiger Überlegungen (S. 136) zu vernachlässigen. Die Protonenaffinität von Indol als Modellsubstanz ist mit  $933 \text{ kJ mol}^{-1}$  höher als die von Anisol, die  $840 \text{ kJ mol}^{-1}$  beträgt,<sup>158,186</sup> womit der Stickstoff als Ort der Protonierung anfangs plausibler erscheint. Dennoch sollte bedacht werden, dass in massenspektrometrischen Betrachtungen nicht nur thermodynamische sondern auch kinetische Aspekte eine Rolle spielen können, und auch unter Berücksichtigung der Longevialle-Umlagerung unter ESI-Bedingungen sowohl Stick- als auch Sauerstoff protoniert werden können.

Alle im Spektrum des 5-Benzyloxyindols auftretenden Fragmente entsprechen *even-electron*-Ionen. Sie repräsentieren die energetisch günstigsten Spaltprodukte des  $[M+H]^+$ -Ions, vorausgesetzt, dass Kollisionsfragmentierungen in einer Ionenfalle Zerfallsreaktionen niedrigster Energie begünstigen.<sup>187</sup> Einige Fragmente wie das bei  $m/z$  146.067 lassen sich relativ leicht über die Struktur des protonierten Vorgängermoleküls erklären. Die Masse entspricht der daraus stattfindenden Benzolabspaltung. Dennoch können die meisten der gebildeten Ionen nicht auf eine Quasimolekülionenspezies zurückgeführt werden, deren Struktur der des Benzyloxyindols entspricht, im besonderen die der Massen 206.102 und 196.117 Da, übereinstimmend mit der Eliminierung von  $H_2O$  und  $CO$ .

Diese sprechen dafür, dass auch das Benzyloxyindol wie die Estrogenbenzylether einer gravierenden Umlagerung ihrer Struktur unterworfen sind. Wahrscheinlich ist auch hier wie bei den Benzyloxy- und Allyloxyestrogenen das Auftreten einer Claisenumlagerung,<sup>146,180,182</sup> sodass die Umlagerung der Tolygruppe zu einem an Position 6 substituierten 5-Hydroxyindol führt. Möglich ist dieser Vorgang generell mit beiden anfangs

## 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen



**Abbildung 5.96.** – Claisen-Umlagerung sowie ein möglicher Mechanismus für den H<sub>2</sub>O- bzw. CO-Verlust aus den Benzyloxyindolen.

diskutierten Quasimolekülionenspezies, sowohl dem am Sauerstoff oder Stickstoff protonierten Indolion. Näheres dazu erläutert Abb. 5.96. Deutlich wird ein möglicher Mechanismus des Wasserverlustes, das Kohlenmonoxid entstammt sehr wahrscheinlich den beiden unteren, linken Strukturen. Der final gebildete Fluorenabkömmling ist thermodynamisch äußerst stabil, auch aufgrund der auftretenden Resonanz, und kann als Grund für die einfache Wasserabspaltung angesehen werden, die hier und in den Estrogenetern auftaucht. Um diesen Ansatz zu bekräftigen, haben u. a. auch Pietro Traldi und Mitarbeiter,<sup>157</sup> die sich ebenfalls mit Umlagerungsreaktionen in Indolen beschäftigen, verschiedene weiterführende Deuterierungsexperimente unternommen. Sie haben ergeben, dass anscheinend beide protonierten Vorläuferionen MH<sup>+</sup> gebildet und fragmentiert

## 5. Ergebnisse

werden. Interessant ist zudem, dass dort aufgenommene EI-Spektren einen Bruch der Etherbindung zu  $m/z$ -Werten von 91 ( $C_7H_7$ ) und 132 ( $C_8H_6NO$ ) sowie eine Spaltung des Indolrings bei 104 ( $C_7H_6N$ ) Da zeigen. Die Fragmente entsprechen dem Verhalten von *odd*-Elektronensystemen. Diese verfolgen die höchst möglichen energetischen Reaktionspfade, hier im speziellen die homolytischer Bindungsbrüche, und Dissoziationsprodukte niedrig energetischer Umlagerungen werden dementsprechend unterdrückt. Generell sind Claisen-Umlagerungen mit Wanderung von Benzylgruppen bisher selten in der kondensierten Phase, wie sie zunächst unter ESI-Bedingungen vorliegt, beobachtet worden. Neben den beschriebenen Umlagerungen der Estrogenether und Benzyloxyindole ist lediglich die Variation einer Ireland-Claisen-Reaktion<sup>183,188</sup> bekannt und in einer Patentschrift<sup>189</sup> für die industrielle Darstellung von *o*-Phenyllessigsäurebenzylethern ausgehend von Dibenzylketenacetalen beschrieben worden, was die Betrachtungen hierüber so einzigartig macht. Um nun den Einfluss bestimmter Substituenten auf den Ablauf der Claisenumlagerung nachvollziehen zu können, wurden die weiteren Benzyloxyindolderivate **17**, **18** und **19** untersucht. Einige besitzen u. a. auch z. T. eine der Benzyloxygruppe benachbarte gesperrte Position, um eine Claisenumlagerung u. U. zu verhindern. Das doppelt veretherte **17** weist im Spektrum erneut  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ -Ionen auf. Nach CID oder IRMPD des protonierten Molekülions ist ein Wasserabspaltung nicht beobachtbar, stattdessen taucht erneut ein CO-Verlust auf, der über die Claisenumlagerung analog zu **16** bedingt erklärbar scheint, die  $H_2O$ -Abspaltung wird durch das Vorhandensein der Sperrung an Position 6 jedoch sterisch verhindert. Zwar wäre in diesem Fall eine weitere Cope<sup>190</sup>-Umlagerung der Tolygruppe von der *o*- in die *p*-Position denkbar, aufgrund des Pyrrolrings der Indole respektive des B-Rings der Estrogene jedoch nahezu unmöglich. Diese Reste bewirken auch eine Vorzugsorientierung der Claisenreaktion zwischen den sich außen frei befindlichen C-Atomen des aromatischen Rings (Position 5 und 6 der Indole bzw. 2 und 3 der Estrogene), nur zwischen ihnen läuft sie erfolgreich ab. Die dichter am Pyrrol- bzw. steoriden B-Ring befindlichen *o*-Positionen sind für die wandernde Tolygruppe sterisch nicht zugänglich. Das 6-benzylierte 5-Methoxy-indol **18** weist ebenfalls einen Wasserverlust auf. Jedoch ist möglich, dass dieser der Carboxygruppe entstammt, wo das Molekül sicherlich aufgrund der Sauerstoffdoppelstruktur protoniert wird. Die Abwesenheit der CO-Eliminierung lässt den Ausschluss des Auftretens der Claisenreaktion zu, ebenso wie die Unzugänglichkeit von Position 5 für einen Tolyltransfer. Kollisions-induzierte Dissoziation sowie IRMPD der Benzyloxyessigsäure **19** führen zu beobachtbaren Fragmenten, die einen Verlust von Ameisensäure und CO widerspiegeln, was erneut auf den Ablauf einer Claisenumlagerung hindeutet. Dies wurde

### 5.7. Diskussion über mögliche Umlagerungsmechanismen

auch erwartet, da die *o*-Positionen nicht gesperrt sind. Traldi und Mitarbeiter kommen in ihrer Arbeit zum gleichen Ergebnis. Negative Ionisierung der Analyten führte i. d. R. zu wenigen Fragmenten und im Falle von **18** und **19** lediglich zu einer Decarboxylierung des deprotonierten Vorgängermoleküls.

## Kapitel 6.

# 6 Zusammenfassung und Ausblick

---

Ziel dieser Arbeit war es, das zunächst überraschende Fragmentierungsverhalten der Estradiol- und Estriolbenzylether (3-Benzyl-oxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien bzw. 3-Benzyl-oxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien) in einem Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometer näher zu untersuchen und aufzuklären. Die Massenspektren der protonierten Moleküle zeigten nicht nur den Verlust des benzylichen Restes, sondern auch von bis zu drei Wassermolekülen, also ebenso die neutrale Eliminierung der eigentlich benzylich geschützten, phenolischen Hydroxylgruppe am aromatischen Ring.

Es konnte gezeigt werden, dass für dieses Verhalten die vorangehende Veretherung mit einem ungesättigten Rest, der zu einem konjugierten System führt, essentiell ist. Estrogenbenzyl- und -allylether weisen in ihren Spektren den beschriebenen kompletten Verlust von Wasser (zwei bzw. drei Molekülen) auf. Die ungesättigten Methyl-, Ethyl- und Propylether als auch der aromatische Phenylestrogenether tun dies nicht. Daraus wurde geschlossen, dass eine anfänglich gemutmaßte Umlagerung als Folge einer reinen Sechsringsstabilisierung oder  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen Rest und Steroidgerüst lediglich eine unzutreffende Erklärung ist. Die Messergebnisse werden besser unter Annahme einer konzertierten [3.3]-sigmatropen Claisenumlagerung erklärt, die die protonierte, phenolische Hydroxylgruppe freigibt und eine Stabilisierung der am Steroid zurückbleibenden Ladung durch den neuen Substituenten in *o*-Position ermöglicht. Als Alternative speziell für die Abspaltung des Etherrestes kann ein Whelandkomplex bestehend aus der Benzylgruppe und dem aromatischen Teil des Steroids dienen. Die erwähnten Mechanismen erklären zugleich den beobachteten Verlust von C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> als Toluol im Falle der Benzylether als auch den analoger C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-Fragmente der Allylether. Unterstützend verifiziert worden sind sie ebenfalls durch die Deuterierung der Benzyl-

ether, die zu entsprechenden Fragmenten in den Spektren geführt hat. Das Fragmentierungsmuster ist zudem weitestgehend unabhängig von der verwendeten Methode. Sowohl Collision-Cell-Dissoziation und On-resonance-CID als auch Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation in der ICR-Zelle führen zu sich teilweise ergänzenden, jedoch hauptsächlich ähnlichen bis gleichen Befunden. Ein Einfluss der Ionisierungsart auf die beobachtete Umlagerung ließ sich weder belegen noch verneinen, MALDI zeigte geringe Intensitäten und zeigte keine neuen Erkenntnisse. Der Ort der initialen Protonierung der Moleküle unter ESI-Bedingungen wurde anhand der Protonenaffinitäten verschiedener Synthone der Steroidstruktur näher diskutiert und denen durch *Cooks' kinetische Methode* ermittelten Werten der Estrogenbenzylether gegenübergestellt.

Isolierung und Fragmentierung der den Estrogenen verwandten Gestagene Pregnandiol, Pregnenolon, Hydroxy-Pregnenolon, Corticosteron und Dehydroepiandrosteron führte zu erwarteten Abspaltungen. Die benzylich geschützten Varianten konnten bislang nicht synthetisiert werden. Ein neuer Darstellungsweg könnte via variiertes Williams'scher Ethersynthese gelingen, um das Bild weiter abzurunden, ebenso wie die Synthese und Untersuchung der entsprechenden Estrogenphenyl- und ethenether.

Interessant war zudem ein Vergleich der Fragmentierungen mit denen verschiedenartiger Benzyloxyindole (im speziellen des 5-Benzyloxy-indols, 5-Benzyloxy-6-methoxyindols, 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindols und der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure). Sie weisen ebenfalls z. T. eine literaturbekannte Claisen-Umlagerung auf, die jedoch wie erwartet unterbunden wird, sobald die der Benzyloxygruppe benachbarte Position geschützt ist. Zudem herrscht vordergründig eine Vorzugsorientierung der Claisenreaktion zwischen den sich außen frei befindlichen C-Atomen des aromatischen Rings (Position 5 und 6 der Indole bzw. 2 und 3 der Estrogene), die an den dem steroiden B-Ring analogen Pyrrolring angrenzenden Positionen sind für die wandernde Tolygruppe anscheinend nicht zugänglich. Diese Vermutung ließe sich noch mit entsprechend gesperrten Positionen der Estrogenether genauer bestimmen, ebenso wie die geschützten Indole ohne Substitution am Pyrrolring darzustellen sind, um dort auftretende Abspaltungen in Zukunft generell eindeutig ausschließen zu können.

# 7 Kapitel 7.

---

## Präparativer Teil

Zur Darstellung der untersuchten Estradiol- und Estriolderivate, sofern sie nicht kommerziell erworben worden sind, wurden als Grundlage die Synthesevorschriften von Joseph, Dusza und Bernstein<sup>191</sup> sowie Schindler<sup>192</sup> herangezogen und bei Bedarf abgewandelt. Deuterierungen erfolgten in der Regel nach den Informationen von Streitwieser<sup>193</sup> und Thomas.<sup>194</sup> Die Gestagene und Indole wurden i. d. R. bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

Die verwendeten Lösemittel Dichlormethan, Chloroform, Methanol und Ethanol wurden durch einmalige Destillation am Rotationsverdampfer aufgereinigt. Acetonitril wurde mit Natrium getrocknet, Pyridin über Natriumhydroxid destilliert.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX500\* aufgenommen und zu deren Auswertung folgende Abkürzungen verwendet:

**Tabelle 7.1.** – NMR-Abkürzungen.

<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
s	Singulett	p	Primäres C-Atom
d	Dublett	s	Sekundäres C-Atom
t	Triplett	t	Tertiäres C-Atom
m	Multiplett	q	Quartäres C-Atom

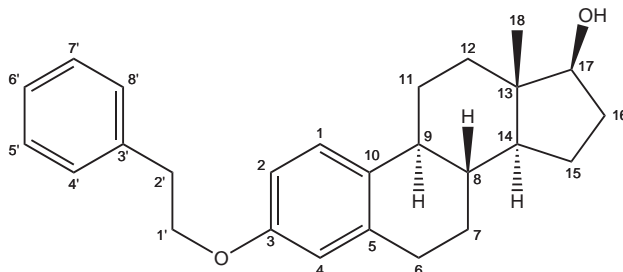
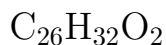
---

\*in der spektroskopischen Abteilung des Otto Diels-Instituts für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



## 7.1. Phenethylether

### 7.1.1. 3-(2-Phenyl)ethoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (1a) -



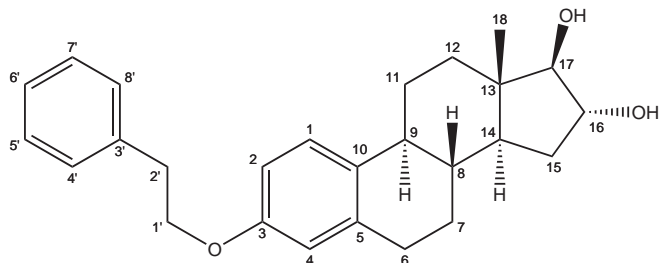
In einem 100 mL-Kolben wurden zu einer Lösung von 500 mg  $\beta$ -Estradiol (1.84 mmol) in 28 mL abs. Ethanol 1.13 g (8.18 mmol)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sowie 1.15 mL (8.69 mmol) Phenylethylchlorid gegeben und die Mischung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 20 mL Wasser wurde die Lösung i. Vak. konzentriert und mit 20 mL Eis versetzt. Der erstarrte Rückstand wurde über Celite filtriert, in 50 mL Dichlormethan gelöst und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das zurückgebliebene Rohprodukt wurde in einem Gemisch aus Aceton und Hexan umkristallisiert. Man erhielt 499 mg (1.33 mmol) eines weißen Feststoffs.

Ausbeute: 499 mg (72 %)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.34-7.21 (m, 5H, 4'-H, 8'-H, 5'-H, 7'-H, 6'-H), 7.19 (d, 1H, 1-H), 6.71 (dd, 1H, 2-H), 6.55 (d, 1H, 4-H), 4.14 (t, 2H, 1'-H), 3.72 (t, 1H, 17-H), 3.08 (dt, 2H, 2'-H), 2.87-2.77 (m, 2H, 6-H), 2.30 (dq, 1H, 9-H), 2.18 (t, 1H, 11- $\text{H}_\alpha$ ), 2.16-2.08 (m, 1H, 16- $\text{H}_\alpha$ ), 1.94 (d, 1H, 7- $\text{H}_\alpha$ ), 1.87 (m, 1H, 15- $\text{H}_\alpha$ ), 1.73-1.65 (m, 1H, 8-H), 1.53-1.15 (m, 7H, 7- $\text{H}_\beta$ , 11- $\text{H}_\beta$ , 12-H, 14-H, 15- $\text{H}_\beta$ , 16- $\text{H}_\beta$ ), 0.78 (d, 3H, 18-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.9 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.74 (q, C-3), 138.13 (q, C-3'), 137.99 (q, C-5), 132.79 (q, C-10), 128.99 (t, C-5', C-7'), 128.60 (t, C-6'), 128.46 (t, C-4', C-8'), 126.43 (t, C-1), 114.64 (t, C-4), 112.16 (t, C-2), 81.97 (t, C-17), 68.69 (s, C-1'), 50.12 (t, C-14), 44.01 (t, C-9), 43.31 (q, C-13), 38.89 (t, C-8), 36.77 (s, C-12), 35.90 (s, C-2'), 30.66 (s, C-16), 29.80 (s, C-6), 27.29 (s, C-11), 26.36 (s, C-7), 23.16 (s, C-15), 11.07 (p, C-18) ppm.

### 7.1.2. 3-(2-Phenyl)ethoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (1b) - C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>



Zur einer Lösung von 414 mg Estriol (1.43 mmol) in 28 mL abs. Ethanol wurden in einem 100 mL-Kolben 1.13 g (8.18 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sowie 0.89 mL (6.57 mmol) Phenylethylchlorid gegeben und die Mischung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 20 mL Wasser konzentrierte man die Lösung i. Vak. und versetzte sie mit 20 mL Eis. Der erstarrte Rückstand wurde über Celite filtriert, in 50 mL Dichlormethan gelöst und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt in einem Gemisch aus Aceton und Hexan umkristallisiert. Man erhielt 271 mg (0.69 mmol) eines weißen Feststoffs.

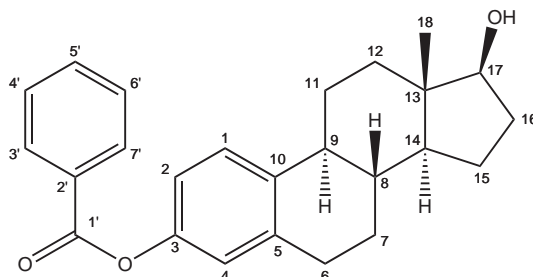
Ausbeute: 271 mg (49 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.35-7.20 (m, 5H, 4'-H, 8'-H, 5'-H, 7'-H, 6'-H), 7.17 (d, 1H, 1-H), 6.71 (dd, 1H, 2-H), 6.63 (d, 1H, 4-H), 4.18 (dt, 1H, 16-H), 4.14 (t, 2H, 1'-H), 3.59 (d, 1H, 17-H), 3.08 (dt, 2H, 2'-H), 2.82 (m, 2H, 6-H), 2.33-2.20 (m, 2H, 9-H, 11-H $\alpha$ ), 1.93-1.81 (m, 3H, 7-H $\alpha$ , 8-H, 15-H $\alpha$ ), 1.67-1.53 (m, 2H, 11-H $\beta$ , 15-H $\beta$ ), 1.53-1.30 (m, 4H, 7-H $\beta$ , 12-H, 14-H), 0.80 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.60 (q, C-3), 138.42 (q, C-3'), 137.90 (q, C-5), 132.53 (q, C-10), 128.82 (t, C-5', C-7'), 128.60 (t, C-6'), 128.47 (t, C-4', C-8'), 126.44 (t, C-1), 114.65 (t, C-4), 112.21 (t, C-2), 90.11 (t, C-17), 78.80 (t, C-16), 68.70 (s, C-1'), 47.91 (t, C-14), 43.95 (t, C-9), 43.93 (q, C-13), 38.34 (t, C-8), 36.62 (s, C-12), 35.90 (s, C-2'), 33.78 (s, C-15), 29.71 (s, C-6), 27.24 (s, C-11), 25.89 (s, C-7), 12.25 (p, C-18) ppm.

## 7.2. Benzoate

### 7.2.1. 17 $\beta$ -Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzoat (**2a**) - C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>

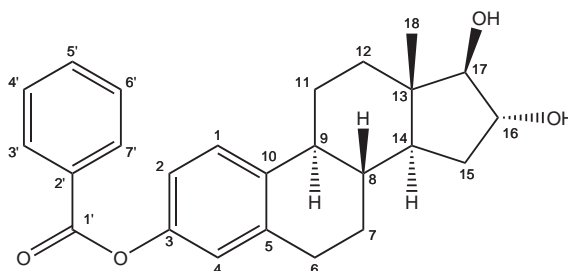
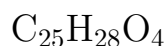


Das Estradiol-3-benzoat wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 8.19 (dd, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.62 (t, 1H, 5'-H), 7.50 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.33 (d, 1H, 1-H), 6.97 (dd, 1H, 2-H), 6.92 (d, 1H, 4-H), 3.74 (t, 1H, 17-H), 2.89 (m, 2H, 6-H), 2.35 (dq, 1H, 9-H), 2.25 (td, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.12 (m, 1H, 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.97 (m, 1H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.90 (m, 1H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.72 (m, 1H, 8-H), 1.61-1.18 (m, 8H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> , O-H), 0.78 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 165.46 (q, C-1'), 148.68 (q, C-3), 138.31 (q, C-2'), 138.04 (q, C-5), 133.46 (t, C-5'), 130.14 (t, C-4', C-6'), 129.73 (q, C-10), 128.51 (t, C-3', C-7'), 126.45 (t, C-1), 121.61 (t, C-4), 118.68 (t, C-2), 81.87 (t, C-17), 50.09 (t, C-14), 44.17 (t, C-9), 43.22 (q, C-13), 38.51 (t, C-8), 36.69 (s, C-12), 30.59 (s, C-16), 29.57 (s, C-6), 27.06 (s, C-11), 26.19 (s, C-7), 23.14 (s, C-15), 11.05 (p, C-18) ppm.

7.2.2.  $16\alpha,17\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzoat (2b) -



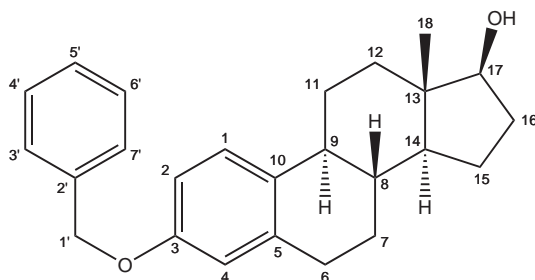
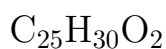
Das Estriol-3-benzoat wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K, TMS):  $\delta = 8.14$  (dd, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.56 (t, 1H, 5'-H), 7.44 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.36 (d, 1H, 1-H), 6.96 (dd, 1H, 2-H), 6.88 (d, 1H, 4-H), 4.13 (dq, 1H, 16-H), 3.54 (d, 1H, 17-H), 2.83 (m, 2H, 6-H), 2.27 (m, 2H, 9-H, 11- $\text{H}_\alpha$ ), 1.90-1.76 (m, 3H, 7- $\text{H}_\alpha$ , 8-H, 15- $\text{H}_\alpha$ ), 1.68-1.29 (m, 8H, 7- $\text{H}_\beta$ , 11- $\text{H}_\beta$ , 12-H, 14-H, 15- $\text{H}_\beta$ , O-H, O-H), 0.76 (s, 3H, 18-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.8 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta = 165.48$  (q, C-1'), 148.76 (q, C-3), 138.25 (q, C-2'), 137.81 (q, C-5), 133.50 (t, C-5'), 130.16 (t, C-4', C-6'), 129.73 (q, C-10), 128.54 (t, C-3', C-7'), 126.35 (t, C-1), 121.67 (t, C-4), 118.76 (t, C-2), 90.01 (t, C-17), 78.73 (t, C-16), 47.92 (t, C-14), 44.11 (t, C-9), 43.88 (q, C-13), 37.94 (t, C-8), 36.54 (s, C-12), 33.74 (s, C-15), 29.49 (s, C-6), 27.03 (s, C-11), 25.73 (s, C-7), 12.24 (p, C-18) ppm.

## 7.3. Benzylether

### 7.3.1. 3-Benzyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (3a) -

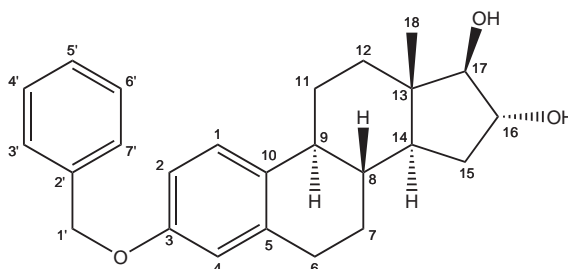
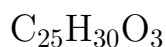


Zu einer Lösung von 999 mg  $\beta$ -Estradiol (3.68 mmol) in 55 mL abs. Ethanol wurden in einem 100 mL-Kolben 2.27 g (16.41 mmol)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sowie 2.00 mL (17.38 mmol) Benzylchlorid gegeben und die Mischung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 25 mL Wasser konzentrierte man die Lösung i. Vak. und versetzte sie mit 20 mL Eis. Der erstarrte Rückstand wurde über Celite filtriert, in 40 mL Dichlormethan gelöst und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das viskose Rohprodukt in einem Gemisch aus Aceton und Hexan umkristallisiert. Man erhielt 1138 mg (3.140 mmol) eines weißen Feststoffs.

Ausbeute: 1138 mg (85.3 %) (Literatur: 67.6 %)<sup>191</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 300 K, TMS):  $\delta = 7.39$  (d, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.35 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.22 (m, 1H, 5'-H), 7.16 (d, 1H, 1-H), 6.74 (dd, 1H, 2-H), 6.69 (d, 1H, 4-H), 5.04 (s, 2H, 1'-H), 3.53 (dt, 1H, 17-H), 2.75 (m, 2H, 6-H), 2.26 (dq, 1H, 9-H), 2.19-2.10 (m, 2H, 11- $\text{H}_\alpha$ , 16- $\text{H}_\alpha$ ), 1.93-1.75 (m, 3H, 7- $\text{H}_\alpha$ , 8-H, 15- $\text{H}_\alpha$ ), 1.61-1.55 (m, 1H, 11- $\text{H}_\beta$ ), 1.42-1.07 (m, 7H, 7- $\text{H}_\beta$ , 12-H, 14-H, 15- $\text{H}_\beta$ , 16- $\text{H}_\beta$ , O-H), 0.78 (s, 3H, 18-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.9 MHz, ( $\text{DMSO}-d_6$ ), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta = 156.79$  (q, C-3), 138.06 (q, C-2'), 137.38 (q, C-5), 133.00 (q, C-10), 128.53 (t, C-4', C-6'), 127.84 (t, C-5'), 127.44 (t, C-3', C-7'), 126.33 (t, C-1), 114.90 (t, C-4), 112.32 (t, C-2), 81.92 (t, C-17), 70.01 (s, C-1'), 50.13 (t, C-14), 44.01 (t, C-9), 43.31 (q, C-13), 38.89 (t, C-8), 36.78 (s, C-12), 30.64 (s, C-16), 29.82 (s, C-6), 27.28 (s, C-11), 26.34 (s, C-7), 23.16 (s, C-15), 11.07 (p, C-18) ppm.

7.3.2. 3-Benzoyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (3b) -

In einem 100 mL-Kolben wurden zu einer Lösung von 949 mg Estriol (3.29 mmol) in 55 mL abs. Ethanol 2.17 g (15.71 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sowie 1.82 mL (15.76 mmol) Benzylchlorid gegeben und die Mischung wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 25 mL Wasser wurde die Lösung i. Vak. konzentriert und versetzte sie mit 20 mL Eis. Der erstarrte Rückstand wurde über Celite filtriert, in 40 mL Dichlormethan gelöst und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das zurückgebliebene Rohprodukt wurde in einem Gemisch aus Aceton und Hexan umkristallisiert. Man erhielt 1169 mg (3.089 mmol) eines weißen Feststoffs.

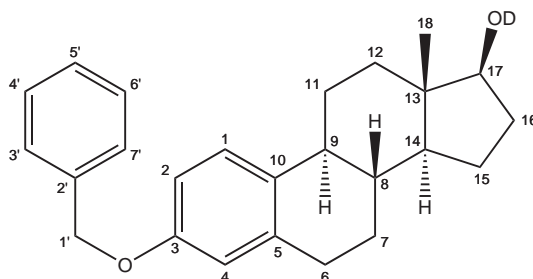
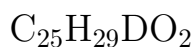
Ausbeute: 1169 mg (93.9 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.43-7.29 (m, 5H, 3'-H, 7'H, 4'-H, 6'-H, 5'-H), 7.15 (d, 1H, 1-H), 6.74 (dd, 1H, 2-H), 6.69 (d, 1H, 4-H), 5.04 (s, 2H, 1'-H), 3.85 (m, 1H, 16-H), 3.29 (m, 1H, 17-H), 2.76 (m, 2H, 6-H), 2.26-2.19 (m, 1H, 9-H), 2.16-2.10 (m, 1H, 11-H $\alpha$ ), 1.80-1.64 (m, 3H, 7-H $\alpha$ , 8-H, 15-H $\alpha$ ), 1.45-1.39 (m, 2H, 11-H $\beta$ , 15-H $\beta$ ), 1.44-1.19 (m, 4H, 7-H $\beta$ , 12-H, 14-H), 0.66 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.10 (q, C-3), 137.41 (q, C-2'), 137.37 (q, C-5), 132.44 (q, C-10), 128.29 (t, C-4', C-6'), 127.55 (t, C-5'), 127.41 (t, C-3', C-7'), 125.97 (t, C-1), 114.50 (t, C-4), 112.18 (t, C-2), 88.71 (t, C-17), 76.66 (t, C-16), 68.96 (s, C-1'), 47.29 (t, C-14), 43.45 (t, C-9), 43.27 (q, C-13), 38.05 (t, C-8), 36.61 (s, C-12), 33.98 (s, C-15), 29.17 (s, C-6), 26.80 (s, C-11), 25.58 (s, C-7), 12.30 (p, C-18) ppm.

## 7.4. Deuterierte Benzylether

### 7.4.1. 3-Benzyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-d<sub>1</sub> (4a) -



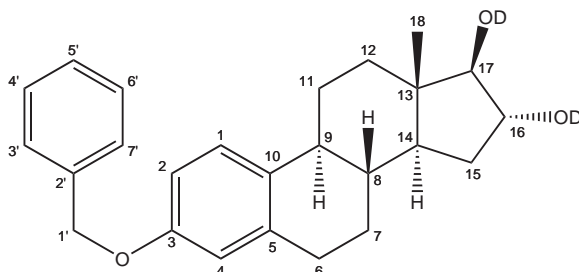
In einem 50 mL-Kolben wurden 179 mg (0.494 mmol) 17 $\beta$ -Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzyloxyether in 10 mL getr. Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 220 mg (9.57 mmol) Natrium und 0.65 mL (36.3 mmol) D<sub>2</sub>O wurde 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. konzentriert, das zurückbleibende Rohprodukt filtriert, mit D<sub>2</sub>O gewaschen, in Dichlormethan aufgenommen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und 156 mg (0.429 mmol) eines leicht orangenen Feststoffs wurden erhalten, der vor den Messungen mit Millipore ZipTips<sup>®</sup> entsalzt worden ist.

Ausbeute: 156 mg (86.8 %) (Literatur: 94.0 %) <sup>193,194</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.45 (d, 2H, 3'-H, 7'H), 7.35 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.28 (m, 1H, 5'-H), 7.12 (d, 1H, 1-H), 6.72 (dd, 1H, 2-H), 6.67 (d, 1H, 4-H), 5.03 (s, 2H, 1'-H), 3.53 (t, 1H, 17-H), 2.75 (m, 2H, 6-H), 2.26 (d, 1H, 9-H), 2.10 (m, 2H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.90-1.76 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.65-1.55 (m, 1H, 11-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.37-1.03 (m, 6H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 0.64 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.02 (q, C-3), 137.43 (q, C-2'), 137.33 (q, C-5), 132.47 (q, C-10), 128.31 (t, C-4', C-6'), 127.60 (t, C-5'), 127.39 (t, C-3', C-7'), 126.08 (t, C-1), 114.48 (t, C-4), 112.19 (t, C-2), 79.70 (t, C-17), 68.94 (s, C-1'), 49.47 (t, C-14), 43.44 (t, C-9), 42.70 (q, C-13), 38.50 (t, C-8), 36.50 (s, C-12), 29.72 (s, C-16), 29.15 (s, C-6), 26.75 (s, C-11), 25.94 (s, C-7), 22.69 (s, C-15), 11.17 (p, C-18) ppm.

### 7.4.2. 3-Benzoyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-d<sub>2</sub> (4b) - C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>D<sub>2</sub>O<sub>3</sub>



In einem 50 mL-Kolben wurden 216 mg (0.569 mmol) 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzylether in 10 mL getr. Acetonitril gelöst. Nach Sättigung der Lösung mit Natrium wurden 0.70 mL (38.8 mmol) D<sub>2</sub>O hinzugegeben und 1,5 h bei Zimmer-temperatur gerührt. Das Acetonitril wurde i. Vak. konzentriert, das zurückbleibende Rohprodukt filtriert, mit D<sub>2</sub>O gewaschen, in Dichlormethan aufgenommen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und man erhielt 177 mg (0.466 mmol) eines leicht orangenen Feststoffs, der vor den Messungen mit Millipore ZipTips<sup>®</sup> entsalzt worden ist.

Ausbeute: 177 mg (81.9 %)

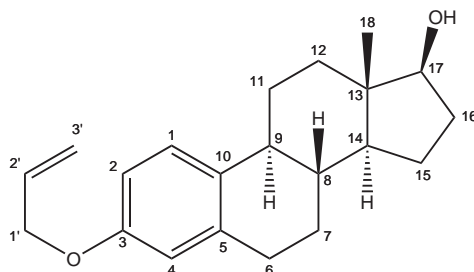
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.46-7.24 (m, 5H, 3'-H, 7'-H, 4'-H, 6'-H, 5'-H), 7.20 (d, 1H, 1-H), 6.76 (dd, 1H, 2-H), 6.65 (d, 1H, 4-H), 5.05 (s, 2H, 1'-H), 4.08 (m, 1H, 16-H), 3.75 (m, 1H, 17-H), 2.82 (m, 2H, 6-H), 2.30-2.20 (m, 1H, 9-H), 2.10-2.00 (m, 1H, 11-H $\alpha$ ), 1.91-1.72 (m, 3H, 7-H $\alpha$ , 8-H, 15-H $\alpha$ ), 1.60-1.41 (m, 2H, 11-H $\beta$ , 15-H $\beta$ ), 1.40-1.22 (m, 4H, 7-H $\beta$ , 12-H, 14-H), 0.77 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.05 (q, C-3), 137.40 (q, C-2'), 137.20 (q, C-5), 132.44 (q, C-10), 128.09 (t, C-4', C-6'), 127.39 (t, C-5'), 127.16 (t, C-3', C-7'), 125.80 (t, C-1), 114.33 (t, C-4), 119.92 (t, C-2), 69.03 (s, C-1'), 60.02 (t, C-17), 58.37 (t, C-16), 47.20 (t, C-14), 43.45 (t, C-9), 43.20 (q, C-13), 37.97 (t, C-8), 36.52 (s, C-12), 33.69 (s, C-15), 29.19 (s, C-6), 26.80 (s, C-11), 25.54 (s, C-7), 12.40 (p, C-18) ppm.



## 7.5. Allylether

### 7.5.1. 3-Allyloxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (5a) - C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>

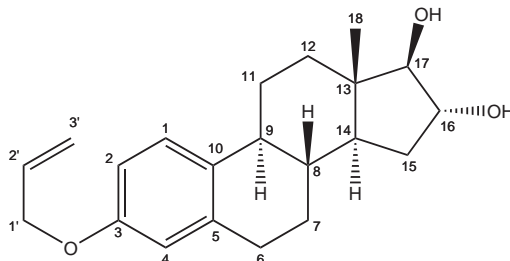
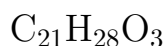


Zu einer Lösung von 501 mg  $\beta$ -Estradiol (1.84 mmol) in 27 mL abs. Ethanol wurden in einem 100 mL-Dreihalskolben 1.13 g (8.18 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sowie 0.71 mL (8.65 mmol) Allylchlorid hinzugefügt und die Mischung 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem 20 mL Wasser zugegeben worden waren, wurde die Lösung i. Vak. konzentriert und mit 20 mL Eis versetzt. Der Rückstand wurde über Celite filtriert und in 40 mL Dichlormethan gelöst. Man trocknete über MgSO<sub>4</sub> und entfernte das Lösungsmittel i. Vak. Das hochviskose, gelbe Rohprodukt wurde aus einem Gemisch von Aceton / Hexan bzw. Methanol / Ether kristallisiert und man erhielt 504 mg (1.61 mmol) eines weißlich gelben Feststoffs.

Ausbeute: 504 mg (87.7 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.14 (d, 1H, 1-H), 6.68 (dd, 1H, 2-H), 6.62 (d, 1H, 4-H), 6.02 (m, 1H, 2'-H), 5.37 (dq, 1H, 3'-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.24 (dq, 1H, 3'-H <sub>$\beta$</sub> ), 4.51 (d, 2H, 1'-H), 4.46 (s, 1H, O-H), 3.51 (t, 1H, 17-H), 2.75 (m, 2H, 6-H), 2.25 (dq, 1H, 9-H), 2.09 (td, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.92-1.75 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 15-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.58 (m, 1H, 8-H), 1.42-1.08 (m, 7H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 0.66 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 155.91 (q, C-3), 137.37 (q, C-5), 133.99 (t, C-2'), 132.36 (q, C-10), 126.05 (t, C-1), 116.96 (s, C-3'), 114.33 (t, C-4), 112.09 (t, C-2), 80.01 (t, C-17), 67.97 (s, C-1'), 49.52 (t, C-14), 43.48 (t, C-9), 42.76 (q, C-13), 38.53 (t, C-8), 36.55 (s, C-12), 29.87 (s, C-16), 29.19 (s, C-6), 26.81 (s, C-11), 25.97 (s, C-7), 22.73 (s, C-15), 11.19 (p, C-18) ppm.

7.5.2. 3-Allyloxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (5b) -

In 27 mL abs. Ethanol wurden in einem 100 mL-Dreihalskolben 498 mg (1.73 mmol) Estriol gelöst, 1.13 g (8.18 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sowie 0.71 mL (8.65 mmol) Allylchlorid hinzugefügt und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 20 mL Wasser wurde mit 20 mL Eis versetzt und über Celite filtriert, der Rückstand wurde mit 40 mL Dichlormethan aufgenommen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel entfernte man i. Vak., kristallisierte das Rohprodukt aus Aceton / Hexan und erhielt 453 mg (1.38 mmol) eines gelblichen Feststoffs.

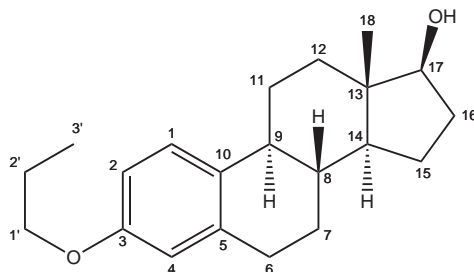
Ausbeute: 453 mg (79.6 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.14 (d, 1H, 1-H), 6.68 (dd, 1H, 2-H), 6.61 (d, 1H, 4-H), 6.01 (m, 1H, 2'-H), 5.36 (dq, 1H, 3'-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.22 (dq, 1H, 3'-H <sub>$\beta$</sub> ), 4.67 (s, 1H, O-H), 4.60 (s, 1H, O-H), 4.49 (d, 2H, 1'-H), 3.84 (m, 1H, 16-H), 3.29 (d, 1H, 17-H), 2.74 (m, 2H, 6-H), 2.23 (m, 1H, 9-H), 2.13 (m, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.80-1.65 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.42 (m, 2H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.35-1.19 (m, 4H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H), 0.65 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 155.93 (q, C-3), 137.41 (q, C-5), 134.02 (t, C-2'), 132.35 (q, C-10), 126.03 (t, C-1), 117.04 (s, C-3'), 114.35 (t, C-4), 112.12 (t, C-2), 88.74 (t, C-17), 76.69 (t, C-16), 67.98 (s, C-1'), 47.32 (t, C-14), 43.49 (t, C-9), 43.33 (q, C-13), 38.09 (t, C-8), 36.66 (s, C-12), 34.05 (s, C-15), 29.24 (s, C-6), 26.87 (s, C-11), 25.63 (s, C-7), 12.40 (p, C-18) ppm.

## 7.6. Propylether

### 7.6.1. 3-Propoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (6a) - C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>

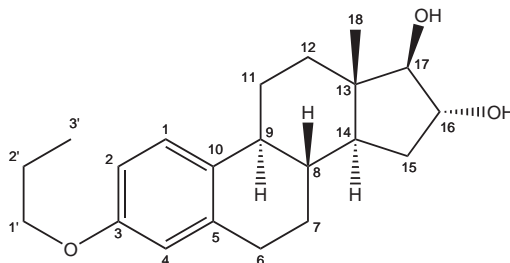
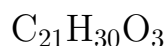


Zu 502 mg  $\beta$ -Estradiol (1.84 mmol) in 20 mL Ethanol wurden in einem 100 mL-Dreihalskolben mit Thermometer 5 mL 2N Natronlauge hinzugefügt. Bei 83 °C tropfte man unter Rühren innerhalb von 10 min 1.64 mL (10.0 mmol) Dipropylsulfat in 5 mL Ethanol zu, spülte mit weiteren 5 mL Ethanol nach und ließ die Mischung 4 h bei 83°C sowie 2 h bei RT rühren. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wurde mit 40 mL Eis versetzt, mit konz. Salzsäure auf pH = 3 eingestellt und fünfmal mit je 50 mL Chloroform / Ethanol (2:1) ausgeschüttelt. Die org. Phasen wurden vereinigt, zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Methanol / Ether (1:1) umkristallisiert und ergab 445 mg (1.42 mmol) eines gelblich-weißen Feststoffs.

Ausbeute: 445 mg (76.9 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.19 (d, 1H, 1-H), 6.69 (dd, 1H, 2-H), 6.58 (d, 1H, 4-H), 3.89 (t, 2H, 1'-H), 3.71 (t, 1H, 17-H), 2.83 (m, 2H, 6-H), 2.31 (dq, 1H, 9-H), 2.09 (t, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.95 (dq, 1H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.87 (m, 1H, 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.79 (q, 2H, 2'H), 1.69 (m, 1H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.53-1.15 (m, 8H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 8-H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.03 (t, 3H, 3'-H), 0.78 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.93 (q, C-3), 137.83 (q, C-5), 132.47 (q, C-10), 126.16 (t, C-1), 114.47 (t, C-4), 111.99 (t, C-2), 81.67 (t, C-17), 69.41 (s, C-1'), 50.03 (t, C-14), 43.91 (t, C-9), 43.21 (q, C-13), 38.84 (t, C-8), 36.72 (s, C-12), 30.45 (s, C-16), 29.72 (s, C-6), 27.21 (s, C-11), 26.28 (s, C-7), 23.06 (s, C-15), 22.57 (s, C-2'), 11.02 (p, C-18), 10.43 (p, C-3') ppm.

**7.6.2. 3-Propoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (6b) -**

Zu 401 mg Estriol (1.39 mmol) in 20 mL Ethanol fügte man in einem 100 mL-Dreihalskolben mit Thermometer 5 mL 2N Natronlauge hinzu. Innerhalb von 10 min wurden unter Rühren bei 83°C 1.25 mL (7.57 mmol) Dipropylsulfat in 5 mL Ethanol zugetropft, mit weiteren 5 mL Ethanol nachgespült und die Mischung 4 h bei 83 °C sowie 2 h bei RT gerührt. Man entfernte das Lösemittels i. Vak. und versetzte mit 40 mL Eis. Mit konz. Salzsäure wurde auf pH = 3 eingestellt und fünfmal mit je 50 mL Chloroform / Ethanol (2:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Durch Umkristallisation in Methanol / Ether (1:1) wurde das Rohprodukt gereinigt und man erhielt 429 mg (1.29 mmol) eines gelblich-weißen Feststoffs.

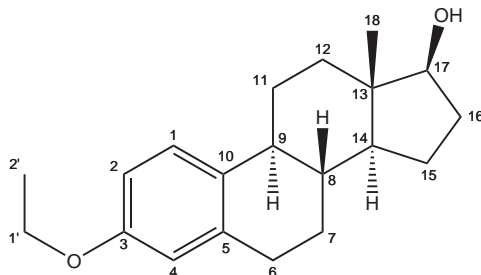
Ausbeute: 429 mg (93.3 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.17 (d, 1H, 1-H), 6.70 (dd, 1H, 2-H), 6.63 (d, 1H, 4-H), 4.19 (t, 1H, 16-H), 3.89 (t, 2H, 1'-H), 3.60 (d, 1H, 17-H), 2.84 (m, 2H, 6-H), 2.32-2.15 (m, 4H, 9-H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> , O-H), 1.93-1.81 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.78 (q, 2H, 2'H), 1.67-1.56 (m, 2H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.53-1.32 (m, 4H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H), 1.02 (t, 3H, 3'-H), 0.80 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, DEPT135):  $\delta$  = 156.39 (q, C-3), 137.31 (q, C-5), 132.03 (q, C-10), 125.91 (t, C-1), 114.09 (t, C-4), 111.90 (t, C-2), 88.71 (t, C-17), 76.67 (t, C-16), 68.70 (s, C-1'), 47.29 (t, C-14), 43.43 (t, C-9), 43.28 (q, C-13), 38.09 (t, C-8), 36.62 (s, C-12), 33.99 (s, C-15), 29.16 (s, C-6), 26.84 (s, C-11), 25.61 (s, C-7), 22.03 (s, C-2'), 12.33 (p, C-18), 10.32 (p, C-3') ppm.

## 7.7. Ethylether

### 7.7.1. 3-Ethoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (7a) - C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>

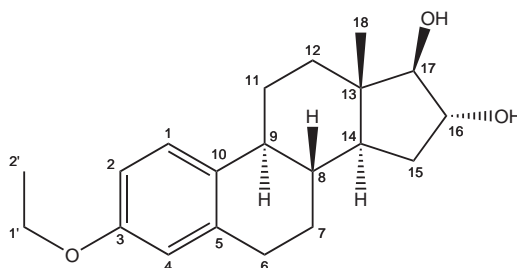
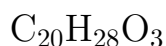


528 mg  $\beta$ -Estradiol (1.93 mmol) wurden in einem 100 mL-Dreihalskolben mit Thermometer in 20 mL Ethanol gelöst und mit 5 mL 2N Natronlauge versetzt. Unter Rühren wurde bei 83 °C innerhalb von 10 min 1.2 mL (9.7 mmol) Diethylsulfat in 5 mL Ethanol zugetropft, mit weiteren 5 mL Ethanol nachgespült und die Mischung 4 h bei 83°C sowie 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. wurde mit 40 mL Eis versetzt, mit konz. Salzsäure auf pH = 3 eingestellt und fünfmal mit je 50 mL eines Chloroform-Ethanol-Gemisches (2:1) ausgeschüttelt. Die org. Phasen wurden vereinigt, zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Methanol / Ether (1:1) umkristallisiert und ergab 424 mg (1.41 mmol) eines weißen Feststoffs.

Ausbeute: 424 mg (77.0 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.15 (d, 1H, 1-H), 6.65 (dd, 1H, 2-H), 6.55 (d, 1H, 4-H), 3.95 (q, 2H, 1'-H), 3.52 (t, 1H, 17-H), 2.75 (m, 2H, 6-H), 2.26 (dq, 1H, 9-H), 2.09 (t, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.93-1.82 (m, 2H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.78 (m, 1H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.58 (m, 1H, 8-H), 1.42-1.10 (m, 8H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> , O-H), 1.29 (t, 3H, 2'-H), 0.68 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 156.20 (q, C-3), 137.31 (q, C-5), 132.05 (q, C-10), 126.02 (t, C-1), 114.03 (t, C-4), 111.88 (t, C-2), 79.99 (t, C-17), 62.66 (s, C-1'), 49.50 (t, C-14), 43.46 (t, C-9), 42.75 (q, C-13), 38.54 (t, C-8), 36.53 (s, C-12), 29.85 (s, C-16), 29.17 (s, C-6), 26.80 (s, C-11), 25.97 (s, C-7), 22.71 (s, C-15), 14.65 (p, C-2'), 11.17 (p, C-18) ppm.

7.7.2. 3-Ethoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (7b) -

In einem 100 mL-Dreihalskolben mit Thermometer wurden 386 mg Estriol (1.37 mmol) in 20 mL Ethanol gelöst und mit 5 mL 2*N* Natronlauge versetzt. Bei 83 °C wurde unter Rühren innerhalb von 10 min 1.0 mL (7.4 mmol) Diethylsulfat in 5 mL Ethanol zugetropft, mit weiteren 5 mL Ethanol nachgespült und die Mischung 4 h bei 83°C sowie 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels i. Vak. versetzte man mit 40 mL Eis, stellte mit konz. Salzsäure auf pH = 3 ein und extrahierte die Lösung fünfmal mit je 50 mL eines Chloroform-Ethanol-Gemisches (2:1). Die org. Phasen wurden vereinigt, zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde aus Methanol / Ether (1:1) umkristallisiert und ergab 415 mg (1.31 mmol) eines weißen Feststoffs.

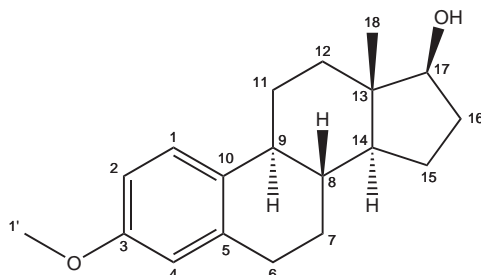
Ausbeute: 415 mg (95 %)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.18 (d, 1H, 1-H), 6.69 (dd, 1H, 2-H), 6.60 (d, 1H, 4-H), 4.18 (dq, 1H, 16-H), 4.00 (q, 2H, 1'-H), 3.59 (d, 1H, 17-H), 2.84 (m, 2H, 6-H), 2.33-2.21 (m, 2H, 9-H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.03 (s, 2H, O-H), 1.92-1.81 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.67-1.56 (m, 2H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.53-1.33 (m, 4H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H), 1.39 (t, 3H, 2'-H), 0.79 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, DMSO-*d*<sub>6</sub>, DEPT135):  $\delta$  = 156.21 (q, C-3), 137.31 (q, C-5), 132.03 (q, C-10), 125.92 (t, C-1), 114.03 (t, C-4), 111.88 (t, C-2), 88.71 (t, C-17), 76.66 (t, C-16), 62.67 (s, C-1'), 47.29 (t, C-14), 43.43 (t, C-9), 43.28 (q, C-13), 38.08 (t, C-8), 36.62 (s, C-12), 33.99 (s, C-15), 29.17 (s, C-6), 26.83 (s, C-11), 25.60 (s, C-7), 14.66 (p, C-2'), 12.33 (p, C-18) ppm.

## 7.8. Methylether

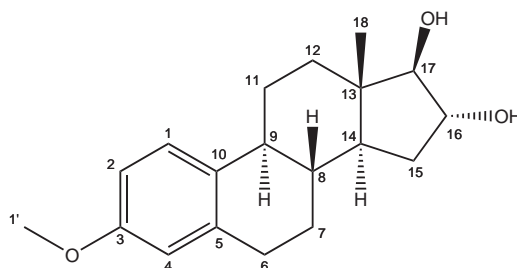
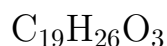
### 7.8.1. 3-Methoxy-17 $\beta$ -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien (**8a**) - C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>



Der  $\beta$ -Estradiolmethylether wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.13 (d, 1H, 1-H), 6.65 (dd, 1H, 2-H), 6.57 (d, 1H, 4-H), 4.53 (s, 1H, O-H), 3.64 (s, 3H, 1'-H), 3.52 (dt, 1H, 17-H), 2.75 (m, 2H, 6-H), 2.24 (dq, 1H, 9-H), 2.08 (t, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.92-1.81 (m, 2H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.78 (m, 1H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.61-1.54 (m, 1H, 8-H), 1.42-1.06 (m, 7H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 0.65 (s, 3H, 18-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.77 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 157.09 (q, C-3), 137.51 (q, C-5), 132.28 (q, C-10), 126.23 (t, C-1), 113.52 (t, C-4), 111.52 (t, C-2), 80.15 (t, C-17), 54.93 (p, C-1'), 49.60 (t, C-14), 43.59 (t, C-9), 42.88 (q, C-13), 38.68 (t, C-8), 36.64 (s, C-12), 29.95 (s, C-16), 29.34 (s, C-6), 26.95 (s, C-11), 26.13 (s, C-7), 22.85 (s, C-15), 11.33 (p, C-18) ppm.

7.8.2. 3-Methoxy-16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (8b) -

Zu 449 mg Estriol (1.56 mmol) in 20 mL Ethanol wurden in einem 100 mL-Dreihalskolben mit Thermometer 5 mL 2*N* Natronlauge hinzugefügt. Unter Rühren tropfte man bei 83 °C 0.81 mL (8.54 mmol) Dimethylsulfat in 5 mL Ethanol zu, mit weiteren 5 mL Ethanol wurde nachgespült und die Mischung 4 h bei 83°C sowie 2 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand mit 40 mL Eis versetzt. Mit konz. Salzsäure wurde auf pH = 3 eingestellt und fünfmal mit je 50 mL Chloroform-Ethanol (2:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten org. Phasen wurden zweimal mit je 5 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingedampft. Durch Umkristallisation in Methanol/Ether (1:1) wurde das Rohprodukt gereinigt und man erhielt 230 mg (0.76 mmol) eines leicht gelblich weißen Feststoffs.

Ausbeute: 230 mg (48.7 %) (Literatur: 89.2 %)<sup>192</sup>

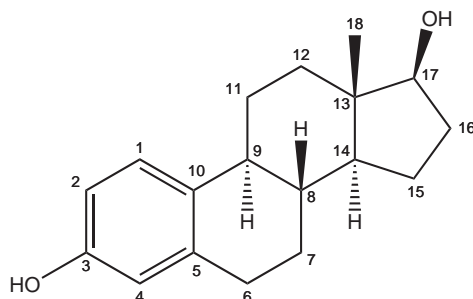
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.15 (d, 1H, 1-H), 6.64 (dd, 1H, 2-H), 6.58 (d, 1H, 4-H), 4.67 (s, 1H, O-H), 4.59 (s, 1H, O-H), 3.84 (dt, 1H, 16-H), 3.68 (s, 3H, 1'-H), 3.32 (d, 1H, 17-H), 2.76 (m, 2H, 6-H), 2.24 (m, 1H, 9-H), 2.13 (m, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.82-1.64 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.43 (m, 2H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.35-1.19 (m, 4H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H), 0.69 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125.77 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 157.01 (q, C-3), 137.39 (q, C-5), 132.15 (q, C-10), 126.03 (t, C-1), 113.42 (t, C-4), 111.43 (t, C-2), 88.74 (t, C-17), 76.68 (t, C-16), 54.84 (p, C-1'), 47.32 (t, C-14), 43.48 (t, C-9), 43.32 (q, C-13), 38.12 (t, C-8), 36.65 (s, C-12), 34.05 (s, C-15), 29.25 (s, C-6), 26.88 (s, C-11), 25.66 (s, C-7), 12.39 (p, C-18) ppm.



## 7.9. Estrogene

### 7.9.1. 3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (9a) - C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>

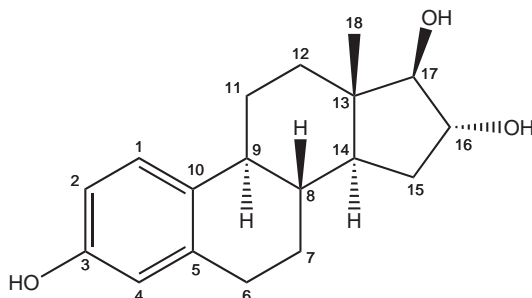


Das  $\beta$ -Estradiol wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.10 (d, 1H, 1-H), 6.49 (d, 1H, 2-H), 6.41 (s, 1H, 4-H), 4.49 (s, 1H, O-H), 3.51 (dt, 1H, 17-H), 2.65 (m, 2H, 6-H), 2.21 (dq, 1H, 9-H), 2.02 (t, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.94-1.79 (m, 2H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.74 (m, 1H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.56 (m, 1H, 8-H), 1.40-1.02 (m, 7H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H, 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 0.65 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125.77 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 154.85 (q, C-3), 137.10 (q, C-5), 130.41 (q, C-10), 125.98 (t, C-1), 114.89 (t, C-4), 112.68 (t, C-2), 80.04 (t, C-17), 49.51 (t, C-14), 43.51 (t, C-9), 42.79 (q, C-13), 38.68 (t, C-8), 36.57 (s, C-12), 29.88 (s, C-16), 29.13 (s, C-6), 26.93 (s, C-11), 26.07 (s, C-7), 22.76 (s, C-15), 11.24 (p, C-18) ppm.

7.9.2. 3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Trihydroxy-1,3,5(10)-estratrien (9b) - C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>



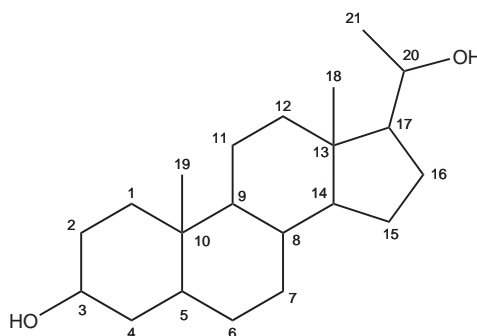
Das Estriol wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.12 (d, 1H, 1-H), 6.51 (dd, 1H, 2-H), 6.42 (d, 1H, 4-H), 4.68 (s, 1H, O-H), 4.59 (s, 1H, O-H), 3.85 (t, 1H, 16-H), 3.31 (d, 1H, 17-H), 2.70 (m, 2H, 6-H), 2.21 (m, 1H, 9-H), 2.08 (m, 1H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.79-1.60 (m, 3H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.41 (m, 2H, 11-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.35-1.18 (m, 4H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H, 14-H), 0.67 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125.77 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 154.85 (q, C-3), 137.10 (q, C-5), 130.39 (q, C-10), 125.89 (t, C-1), 114.90 (t, C-4), 112.68 (t, C-2), 88.74 (t, C-17), 76.68 (t, C-16), 47.31 (t, C-14), 43.49 (t, C-9), 43.32 (q, C-13), 38.21 (t, C-8), 36.66 (s, C-12), 34.04 (s, C-15), 29.12 (s, C-6), 26.95 (s, C-11), 25.69 (s, C-7), 12.39 (p, C-18) ppm.

## 7.10. Gestagene

### 7.10.1. Pregnandiol (11) - C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>

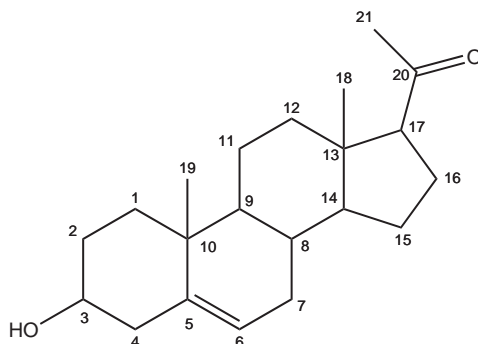


Das Pregnandiol wurde über die Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, beschafft.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 4.08 (m, 1H, 20-H), 3.75 (m, 1H, 3-H), 1.96-1.85 (m, 1H, 17-H), 1.65 (m, 4H, 4-H<sub>α</sub>, 4-H<sub>β</sub>, 7-H<sub>α</sub>, 16-H<sub>α</sub>), 1.58 (d, 3H, 21-H), 1.52-1.47 (m, 3H, 2-H<sub>β</sub>, 5-H, 7-H<sub>β</sub>), 1.40-0.86 (m, 15H, 1-H<sub>α</sub>, 1-H<sub>β</sub>, 2-H<sub>α</sub>, 6-H<sub>α</sub>, 6-H<sub>β</sub>, 8-H, 9-H, 11-H<sub>α</sub>, 11-H<sub>β</sub>, 12-H<sub>α</sub>, 12-H<sub>β</sub>, 14-H, 15-H<sub>α</sub>, 15-H<sub>β</sub>, 16-H<sub>β</sub>), 0.79 (s, 3H, 19-H), 0.67 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 70.38 (t, C-3), 68.75 (t, C-20), 65.42 (t, C-17), 56.38 (t, C-14), 52.40 (t, C-9), 44.06 (q, C-13), 41.02 (t, C-5), 38.89 (s, C-12), 37.63 (s, C-4), 37.41 (s, C-2), 36.42 (q, C-10), 31.93 (t, C-8), 31.82 (s, C-1), 31.73 (s, C-7), 31.69 (s, C-6), 28.94 (p, C-21), 24.42 (s, C-15), 23.13 (s, C-16), 21.28 (s, C-11), 19.54 (p, C-19), 12.83 (p, C-18) ppm.

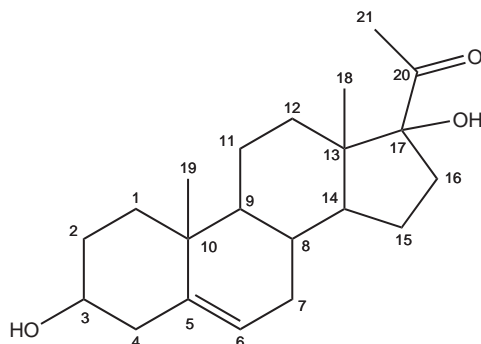
### 7.10.2. Pregnenolon (12) - C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>



Das Pregnenolon wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 5.35 (dt, 1H, 6-H), 3.52 (m, 1H, 3-H), 2.54 (t, 1H, 17-H), 2.35-1.98 (m, 4H, 4-H <sub>$\alpha$</sub> , 4-H <sub>$\beta$</sub> , 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.09 (s, 3H, 21-H), 1.85 (m, 1H, 7-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.70-1.39 (m, 10H, 1-H <sub>$\alpha$</sub> , 2-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 9-H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> , 12-H <sub>$\alpha$</sub> , 14-H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> , 15-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.28-0.95 (m, 4H, 1-H <sub>$\beta$</sub> , 2-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.00 (s, 3H, 19-H), 0.63 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 209.61 (q, C-20), 140.79 (q, C-5), 121.39 (t, C-6), 71.69 (t, C-3), 63.72 (t, C-17), 56.93 (t, C-14), 50.00 (t, C-9), 44.02 (q, C-13), 42.25 (s, C-4), 38.85 (s, C-12), 37.27 (s, C-2), 36.53 (q, C-10), 31.87 (t, C-8), 31.78 (p, C-21), 31.61 (s, C-1), 31.56 (s, C-7), 24.50 (s, C-15), 22.83 (s, C-16), 21.10 (s, C-11), 19.40 (p, C-19), 13.24 (p, C-18) ppm.

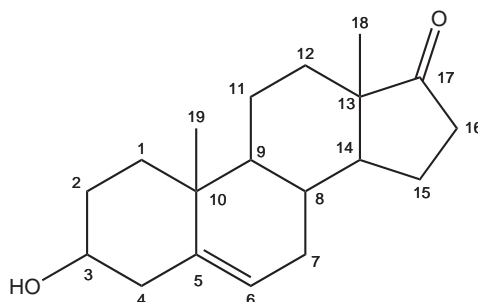
7.10.3. 17-Hydroxypregnenolon (13) - C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>

Das 17-Hydroxypregnenolon wurde über die Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, beschafft.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 5.36 (dt, 1H, 6-H), 3.54 (m, 1H, 3-H), 2.68 (m, 1H, 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.30-2.15 (m, 3H, 4-H <sub>$\alpha$</sub> , 4-H <sub>$\beta$</sub> , 7-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.22 (s, 3H, 21-H), 1.81 (m, 1H, 7-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.68-1.22 (m, 10H, 1-H <sub>$\alpha$</sub> , 2-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H, 9-H, 14-H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> , 12-H <sub>$\alpha$</sub> , 15-H <sub>$\alpha$</sub> , 15H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.12-0.91 (m, 4H, 1-H <sub>$\beta$</sub> , 2-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> , 12-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.05 (s, 3H, 19-H), 0.72 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 209.79 (q, C-20), 140.81 (q, C-5), 121.43 (t, C-6), 95.62 (q, C-17), 71.50 (t, C-3), 50.74 (t, C-9), 49.68 (q, C-13), 48.35 (t, C-14), 42.23 (s, C-4), 37.25 (s, C-2), 36.54 (q, C-10), 31.92 (t, C-8), 31.84 (s, C-1), 31.61 (s, C-7), 30.05 (s, C-12), 27.98 (s, C-16), 24.21 (p, C-21), 20.52 (s, C-11), 19.43 (p, C-19), 18.95 (s, C-15), 15.39 (p, C-18) ppm.

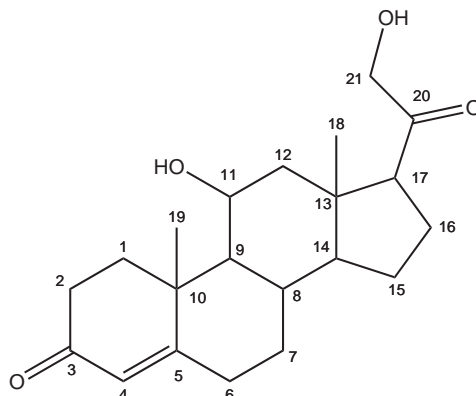
### 7.10.4. Dehydroepiandrosteron (14) - C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>



Das Dehydroepiandrosteron wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 5.39 (dt, 1H, 6-H), 3.55 (m, 1H, 3-H), 2.46 (m, 1H, 4-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.33-2.18 (m, 2H, 15-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.10 (m, 2H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.95 (m, 2H, 4-H <sub>$\beta$</sub> , 15H <sub>$\beta$</sub> ), 1.85 (m, 1H, 7-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.70-1.61 (m, 3H, 2-H <sub>$\alpha$</sub> , 12-H <sub>$\alpha$</sub> , 14-H), 1.59-1.45 (m, 4H, 8-H, 9-H, 11-H <sub>$\alpha$</sub> , 12-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.28 (m, 2H, 1-H <sub>$\alpha$</sub> , 2-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.13-0.98 (m, 2H, 1-H <sub>$\beta$</sub> , 11-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.02 (s, 3H, 19-H), 0.88 (s, 3H, 18-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 221.21 (q, C-17), 141.06 (q, C-5), 120.92 (t, C-6), 71.58 (t, C-3), 51.78 (t, C-14), 50.25 (t, C-9), 47.56 (q, C-13), 42.21 (s, C-4), 37.20 (s, C-16), 36.66 (q, C-10), 35.86 (s, C-12), 31.58 (t, C-8), 31.52 (s, C-1), 31.45 (s, C-2), 30.08 (s, C-7), 21.89 (s, C-15), 20.38 (s, C-11), 19.44 (p, C-19), 13.56 (p, C-18) ppm.

7.10.5. Corticosteron (15) - C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>

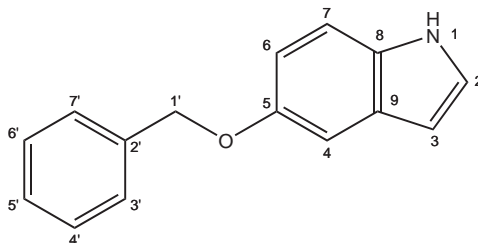
Das Corticosteron wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 5.69 (d, 1H, 4-H), 4.40 (q, 1H, 11-H), 4.19 (d, 2H, 21-H), 2.55-2.45 (m, 4H, 2-H <sub>$\alpha$</sub> , 2-H <sub>$\beta$</sub> , 6-H <sub>$\alpha$</sub> , 17-H), 2.30-2.15 (m, 3H, 1-H <sub>$\alpha$</sub> , 6-H <sub>$\beta$</sub> , 16-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.09 (dd, 1H, 12-H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.05-1.97 (m, 2H, 7-H <sub>$\alpha$</sub> , 8-H), 1.87-1.75 (m, 3H, 1-H <sub>$\beta$</sub> , 15-H <sub>$\alpha$</sub> , 16-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.61 (dd, 1H, 12-H <sub>$\beta$</sub> ), 1.45 (s, 3H, 19-H), 1.40 (m, 1H, 15H <sub>$\beta$</sub> ), 1.16-0.99 (m, 3H, 7-H <sub>$\beta$</sub> , 9-H, 14-H), 0.95 (s, 3H, 18-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 209.21 (q, C-20), 199.39 (q, C-3), 171.66 (q, C-5), 122.49 (t, C-4), 69.18 (s, C-21), 67.99 (t, C-11), 59.46 (t, C-9), 57.51 (t, C-17), 56.32 (t, C-14), 47.96 (s, C-12), 43.76 (q, C-13), 39.20 (q, C-10), 35.04 (s, C-1), 33.82 (s, C-2), 32.56 (s, C-6), 31.98 (s, C-7), 31.37 (t, C-8), 24.44 (s, C-15), 22.48 (s, C-16), 20.97 (p, C-19), 16.00 (p, C-18) ppm.

## 7.11. Indole

### 7.11.1. 5-Benzyloxyindol (16) - C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NO

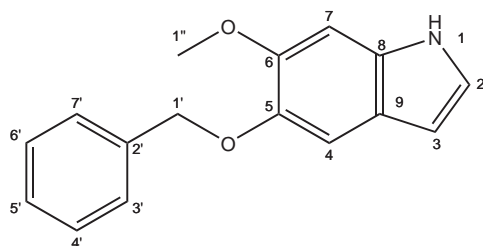


Das 5-Benzyloxyindol wurde über die Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, beschafft.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 8.01 (s, 1H, 1-H), 7.48 (d, 1H, 7-H), 7.37 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.30 (d, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.25 (m, 1H, 5'-H), 7.20 (s, 1H, 2-H), 7.15 (s, 1H, 4-H), 6.95 (dd, 1H, 6-H), 6.45 (s, 1H, 3-H), 5.12 (s, 2H, 1'-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 153.45 (q, C-5), 137.77 (q, C-2'), 131.18 (q, C-8), 128.55 (t, C-4', C-6'), 128.30 (q, C-9), 127.79 (t, C-5'), 127.59 (t, C-3', C-7'), 124.92 (t, C-2), 113.12 (t, C-7), 111.72 (t, C-6), 104.03 (t, C-3), 102.48 (t, C-4), 70.95 (s, C-1') ppm.



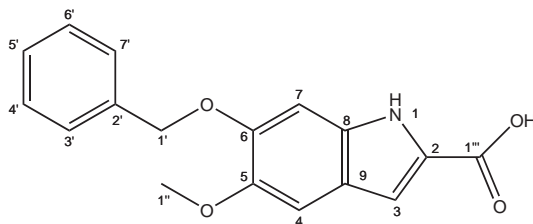
7.11.2. 5-Benzyloxy-6-methoxyindol (17) - C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

Das 5-Benzyloxy-6-methoxyindol wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 8.03 (s, 1H, 1-H), 7.46 (d, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.35 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.30 (t, 1H, 5'-H), 7.12 (s, 1H, 2-H), 7.01 (s, 1H, 4-H), 6.88 (s, 1H, 7-H), 6.39 (s, 1H, 3-H), 5.14 (s, 2H, 1'-H), 3.90 (s, 3H, 1''-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 147.86 (q, C-5), 144.25 (q, C-6), 137.81 (q, C-2'), 130.75 (q, C-8), 128.48 (t, C-4', C-6'), 127.67 (t, C-5'), 127.44 (t, C-3', C-7'), 122.88 (t, C-2), 120.68 (q, C-9), 105.92 (t, C-4), 102.37 (t, C-3), 94.96 (t, C-7), 72.06 (s, C-1'), 56.40 (p, C-1'') ppm.

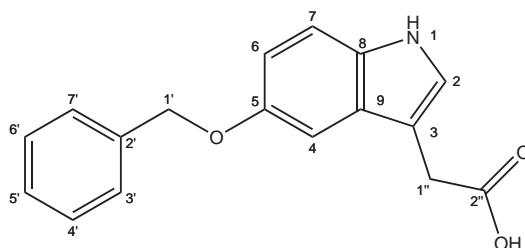
**7.11.3. 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (18) - C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>**



Das 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol wurde über die Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, beschafft.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.50 (d, 2H, 3'-h, 7'-H), 7.41 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.32 (t, 1H, 5-H), 7.12 (s, 1H, 3-H), 6.96 (s, 2H, 4-H,7-H), 5.12 (s, 2H, 1'-H), 3.80 (s, 3H, 1''-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (DMSO-*d*<sub>6</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 162.59 (q, C-1'''), 147.99 (q, C-5), 145.75 (q, C-6), 137.04 (q, C-2'), 132.25 (q, C-8), 128.38 (t, C-4', C-6'), 127.80 (t, C-5'), 127.75 (t, C-3', C-7'), 126.66 (q, C-2), 120.09 (q, C-9), 107.50 (t, C-3), 102.82 (t, C-4), 96.29 (t, C-7), 69.93 (s, C-1'), 55.71 (p, C-1'') ppm.

7.11.4. 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (19) - C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

Die 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure wurde bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K, TMS):  $\delta$  = 7.95 (s, 1H, 1-H), 7.49 (t, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.38 (d, 2H, 3'-H, 7'-H), 7.31 (t, 1H, 5'-H), 7.26 (s, 1H, 2-H), 7.15 (s, 1H, 4-H), 6.95 (d, 1H, 6-H), 5.09 (s, 2H, 1'-H), 3.78 (s, 2H, 1''-H)ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, (CDCl<sub>3</sub>), 300 K, TMS, DEPT135):  $\delta$  = 176.45 (q, C2''), 153.53 (q, C-5), 137.58 (q, C-2'), 131.40 (q, C-8), 128.51 (t, C-4', C-6'), 127.80 (t, C-5'), 127.67 (t, C-3', C-7'), 127.53 (q, C-9), 124.02 (t, C-2), 113.43 (t, C-7), 112.00 (t, C-6), 107.62 (q, C-3), 102.22 (t, C-4), 70.92 (s, C-1'), 30.93 (s, C-1'')ppm.

# **A** **Anhang A.**

---

## **Spektren**

Zusammenfassend ist an dieser Stelle jeweils ein exemplarisches Spektrum der vermessenen Substanzen und eins je verwendete Methode dargestellt.

## A.1. Phenethylether

### A.1.1. Estradiolphenethylether (1a)

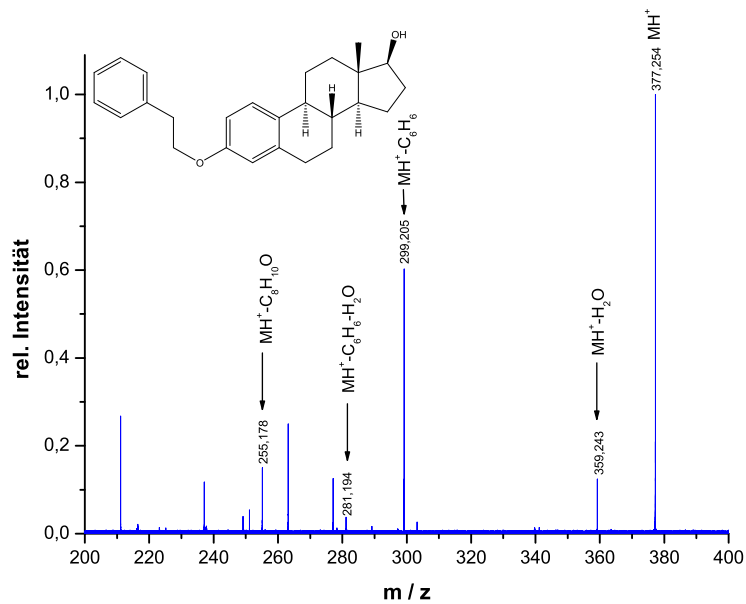


Abbildung A.1. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolphenethylether.

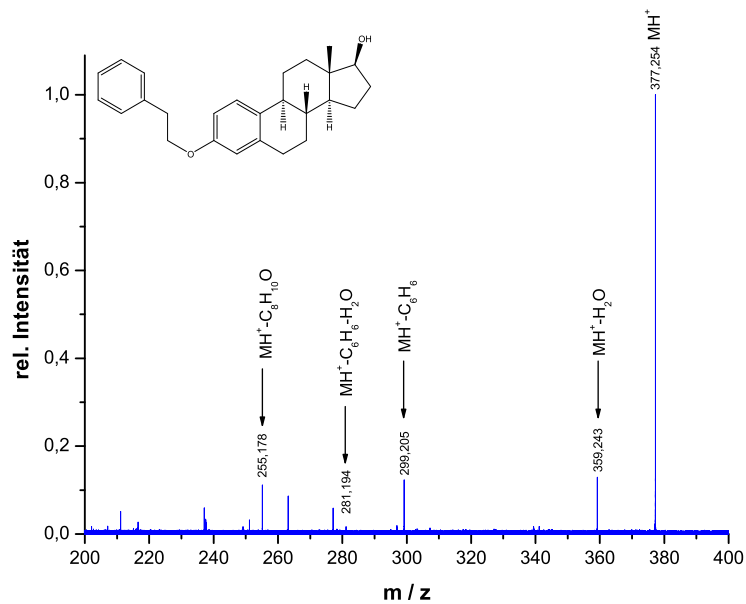


Abbildung A.2. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolphenethylether.

### A.1.2. Estriolphenethylether (1b)

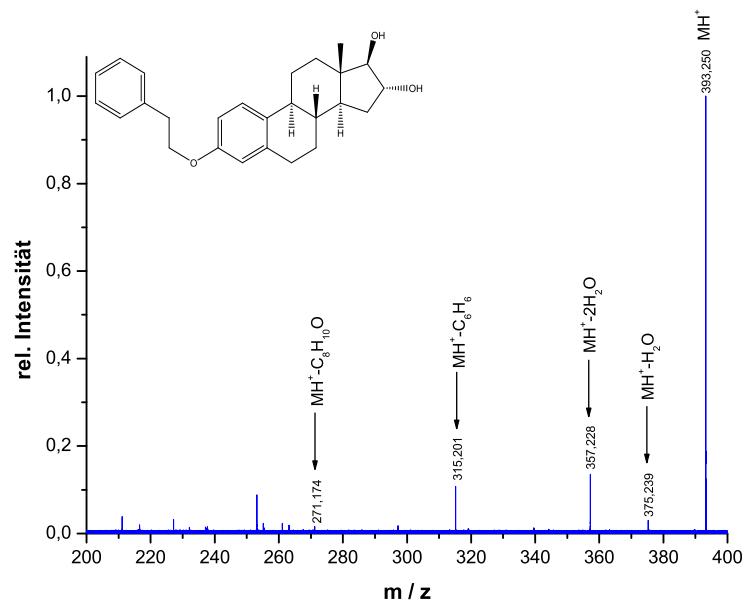


Abbildung A.3. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolphenethylether.

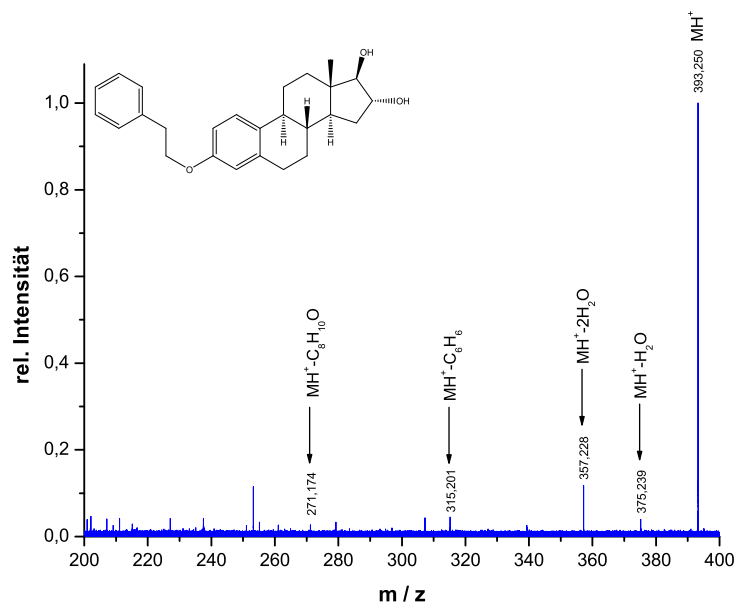


Abbildung A.4. – IRMPD-Spektrum vom Estriolphenethylether.

## A.2. Benzoate

### A.2.1. Estradiolbenzoat (2a)

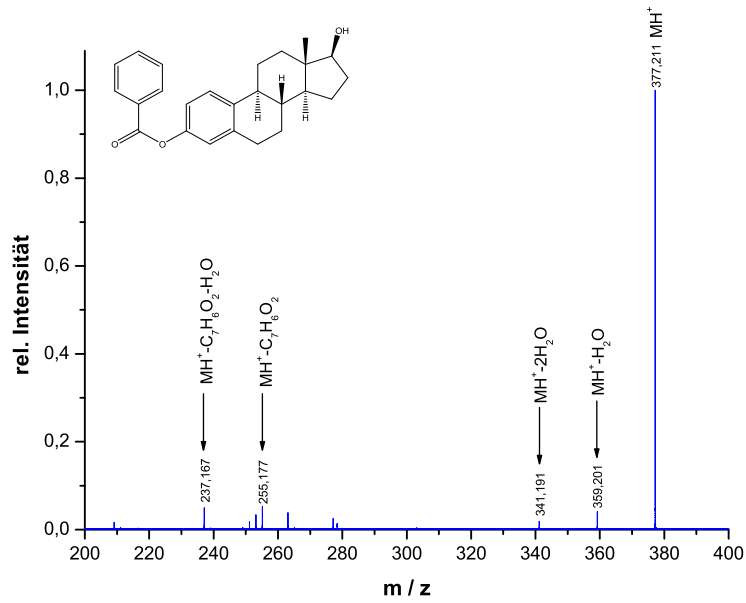


Abbildung A.5. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzoat.

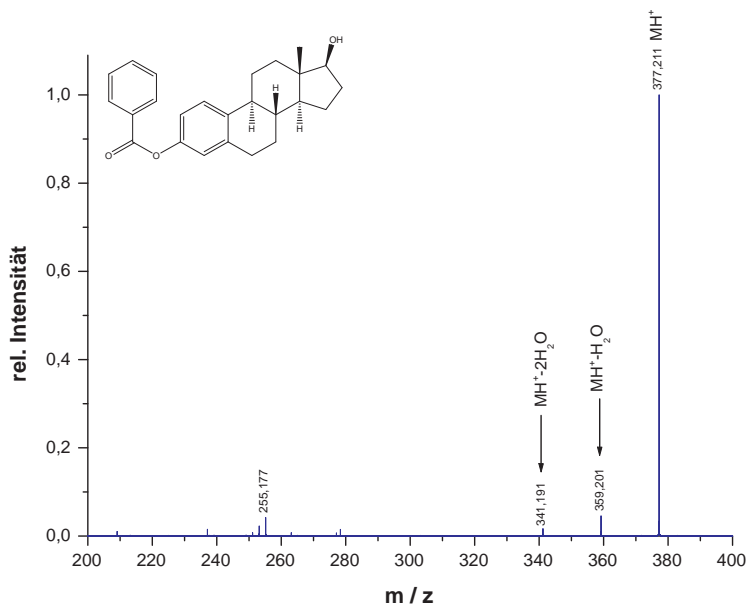


Abbildung A.6. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolbenzoat.

# A. Spektren

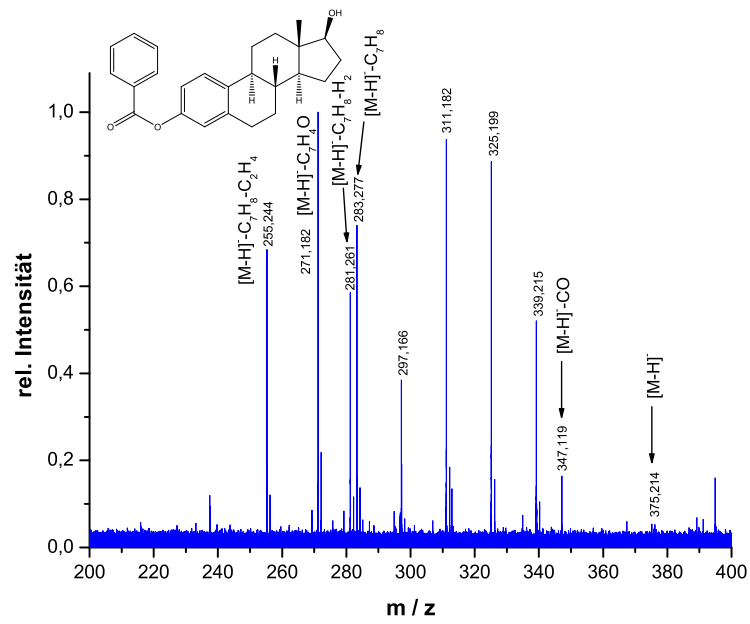


Abbildung A.7. – Übersichtsspektrum vom Estradiolbenzoat nach neg. ESI.



## A.2.2. Estriolbenzoat (2b)

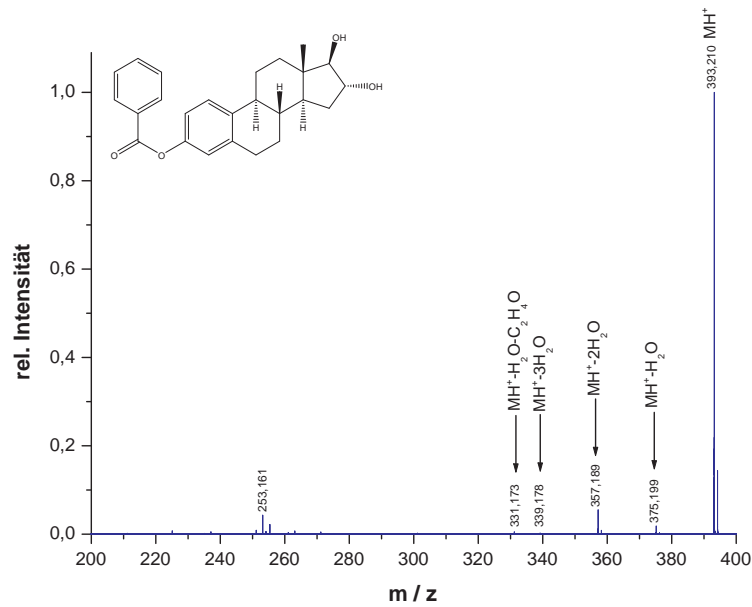


Abbildung A.8. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzoat.

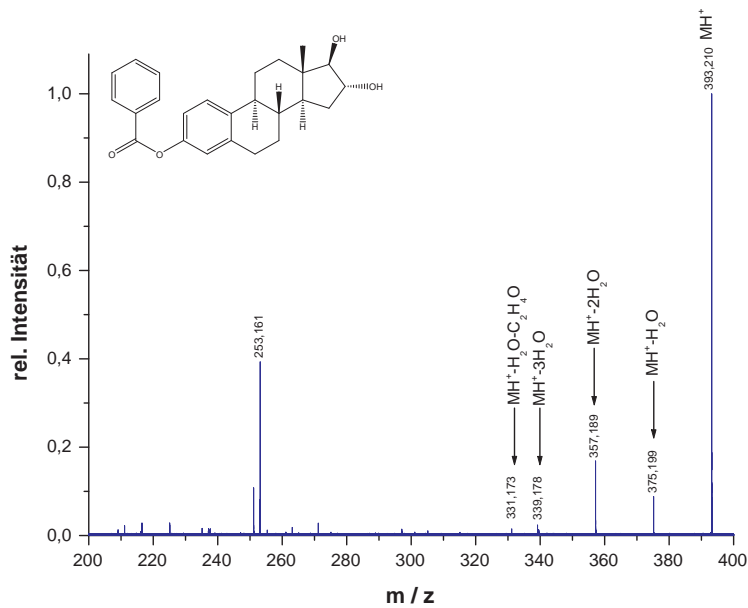


Abbildung A.9. – IRMPD-Spektrum vom Estriolbenzoat.

## A. Spektren

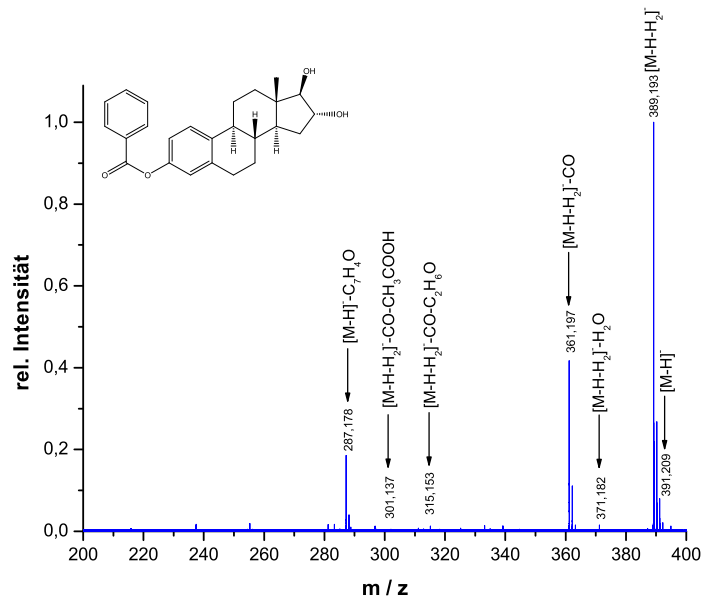


Abbildung A.10. – Übersichtsspektrum vom Estradiolbenzoat nach neg. ESI.

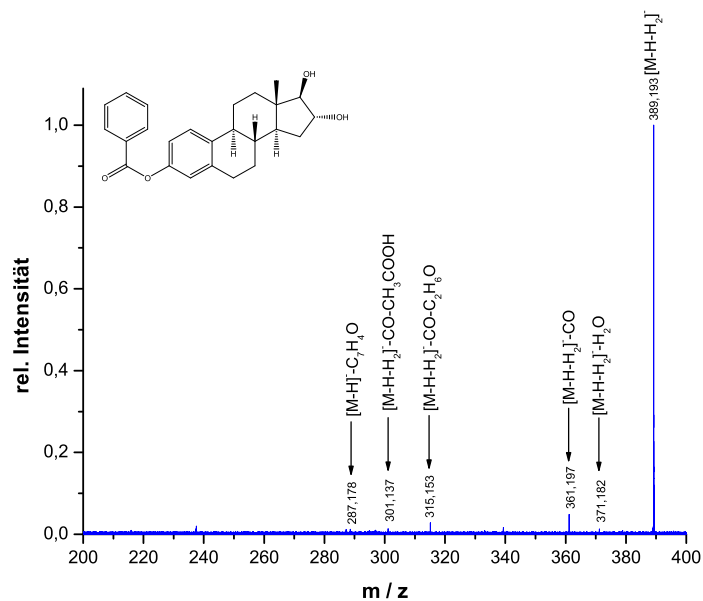


Abbildung A.11. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzoat nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

## A.3. Benzylether

## A.3.1. Estradiolbenzylether (3a)

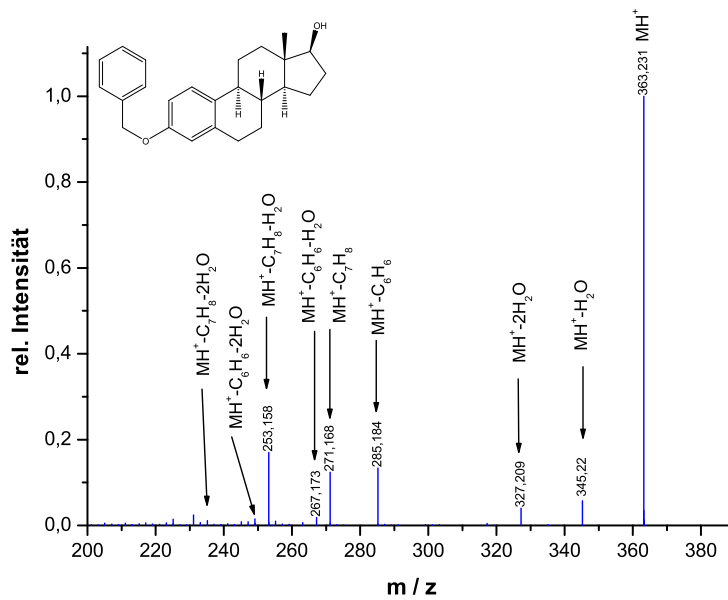


Abbildung A.12. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

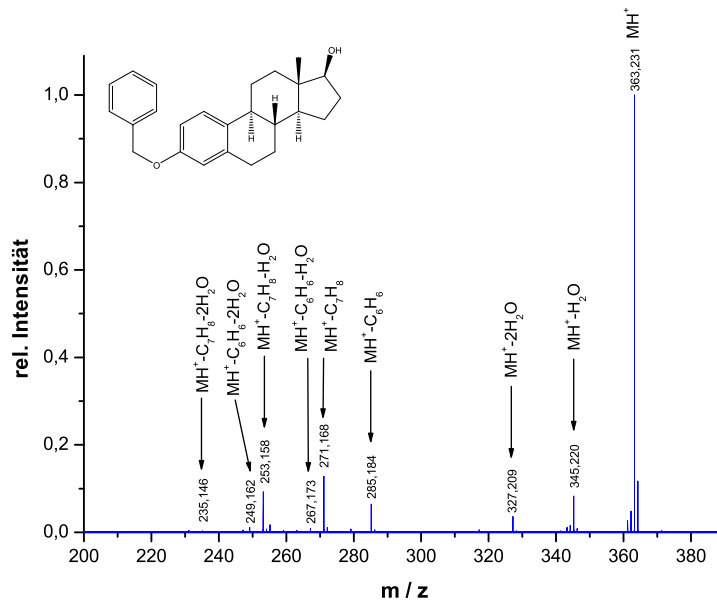


Abbildung A.13. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

A. Spektren

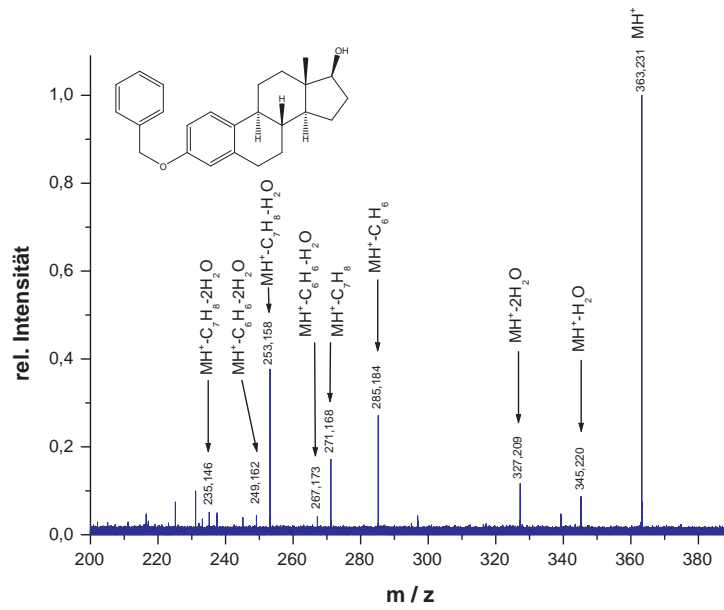


Abbildung A.14. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolbenzylether.

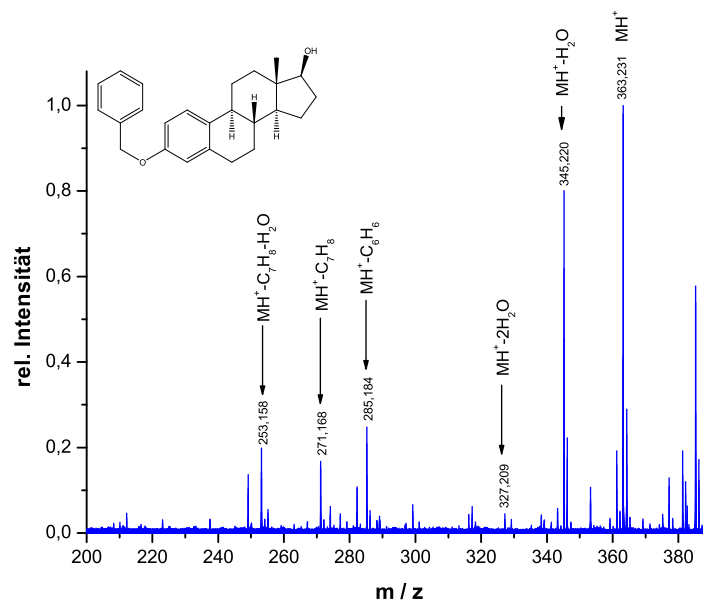


Abbildung A.15. – ECD-Spektrum vom Estradiolbenzylether mit 1.0 A Kathodenstrom.

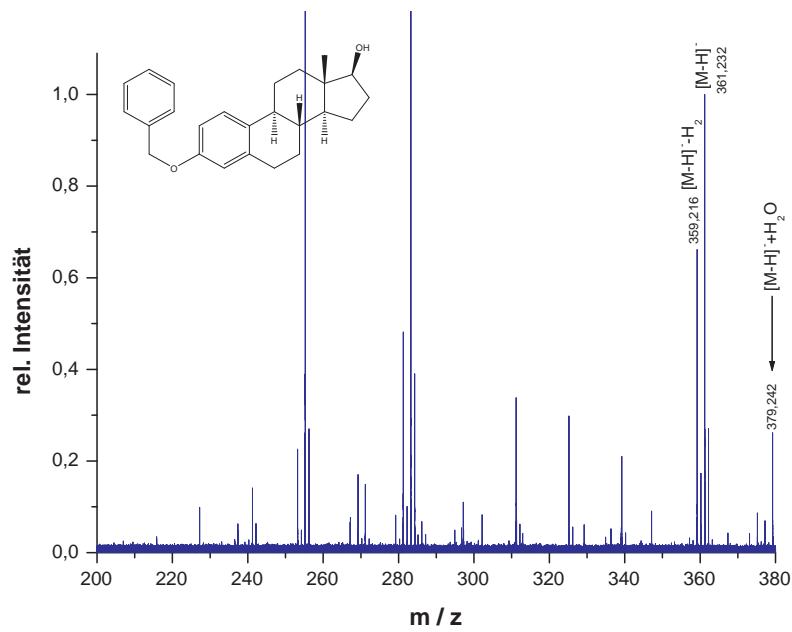


Abbildung A.16. – Übersichtsspektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.

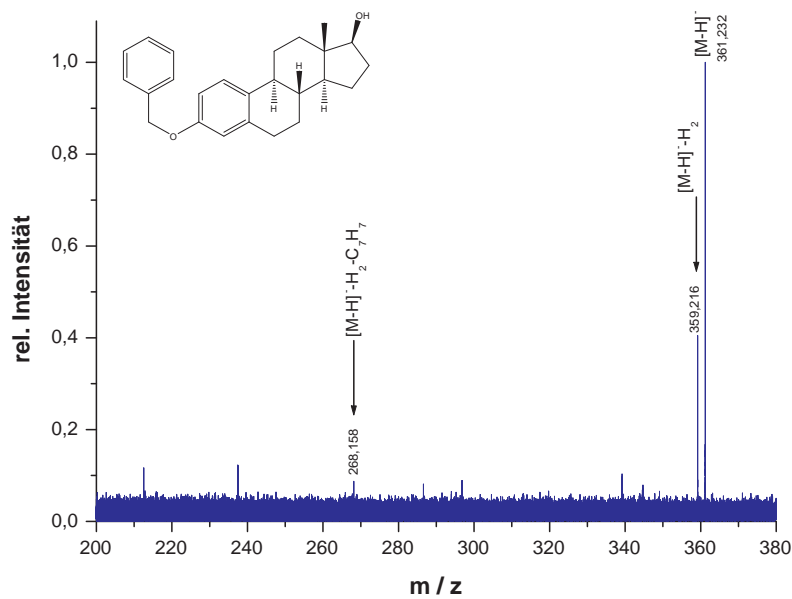


Abbildung A.17. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.

## A. Spektren

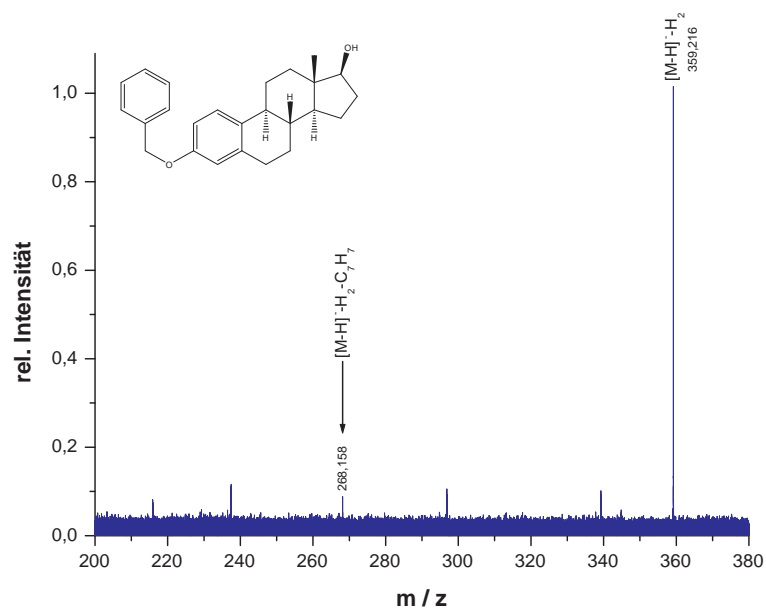


Abbildung A.18. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

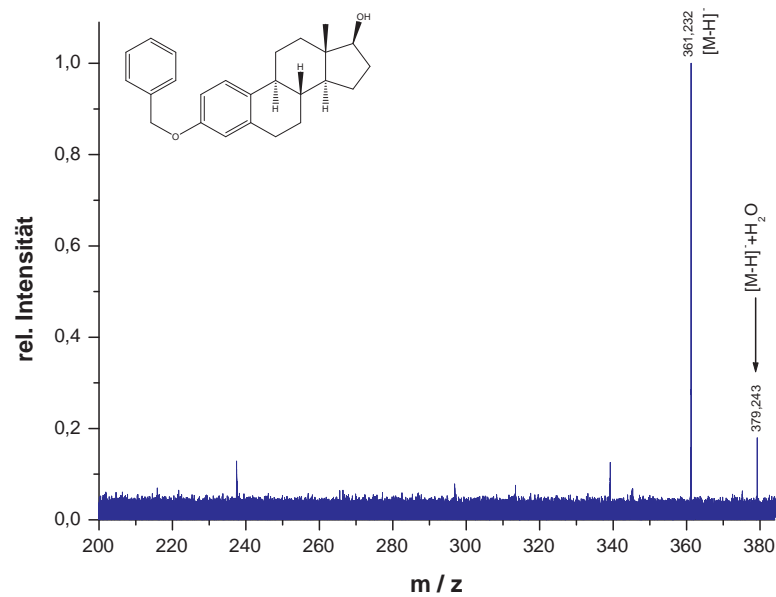


Abbildung A.19. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung des Wasseradduktes.

## A.3.2. Estriolbenzylether (3b)

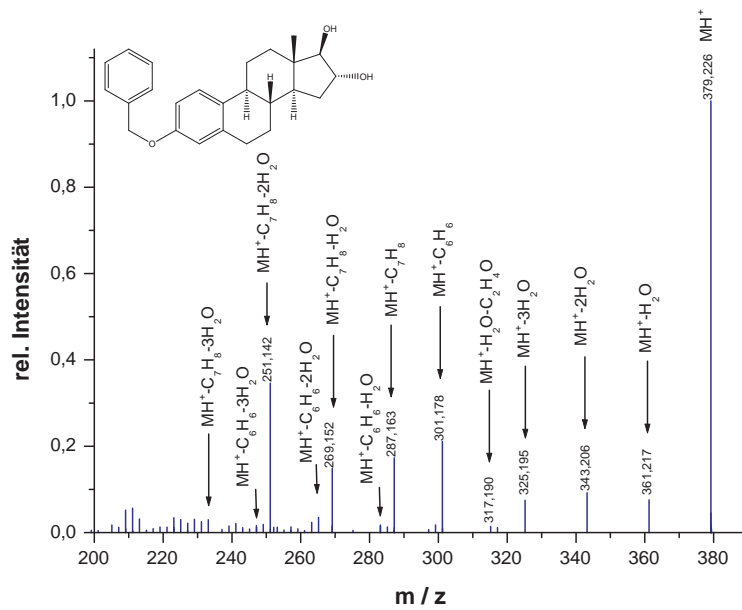


Abbildung A.20. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether.

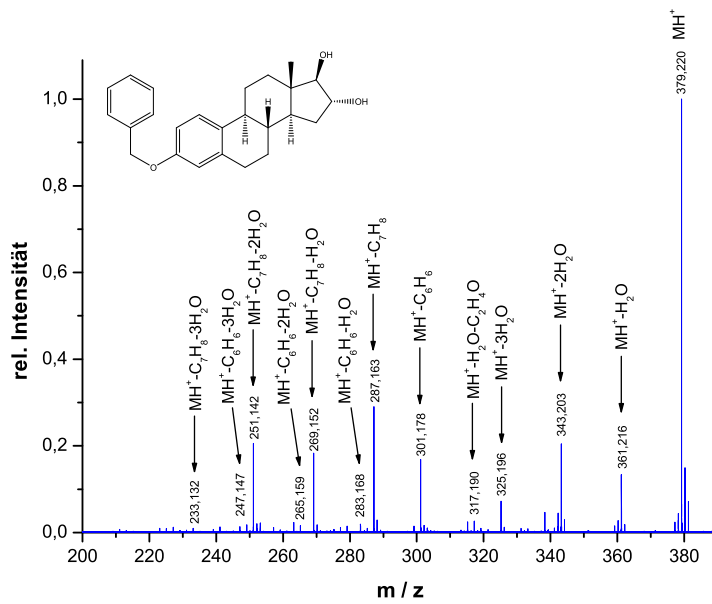


Abbildung A.21. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether.

A. Spektren

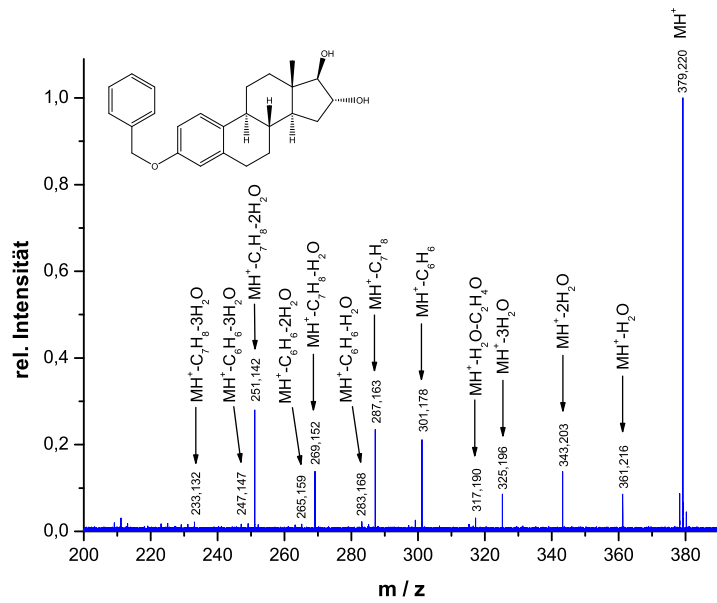


Abbildung A.22. – IRMPD-Spektrum vom Estriolbenzylether.

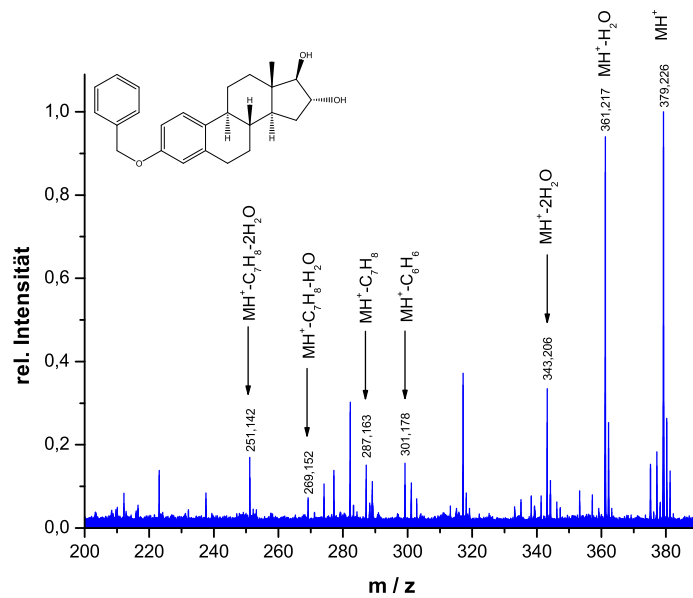


Abbildung A.23. – ECD-Spektrum vom Estriolbenzylether mit 1.0 A Kathodenstrom.



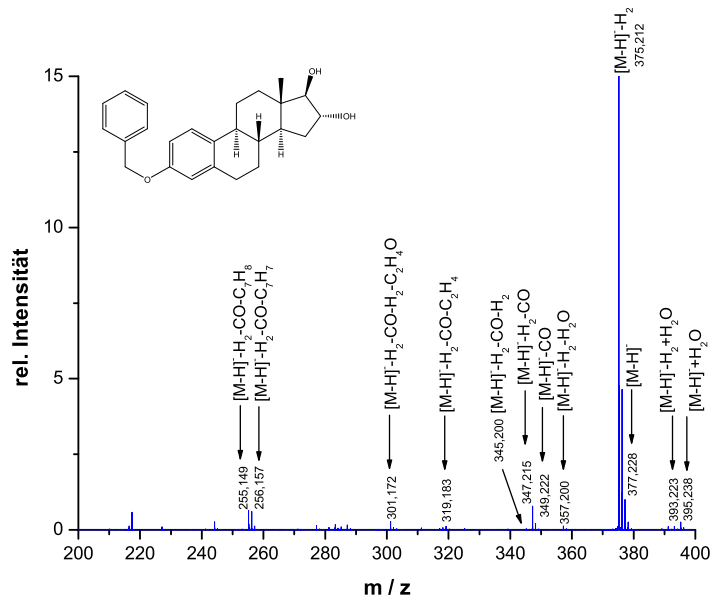


Abbildung A.24. – Übersichtsspektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.

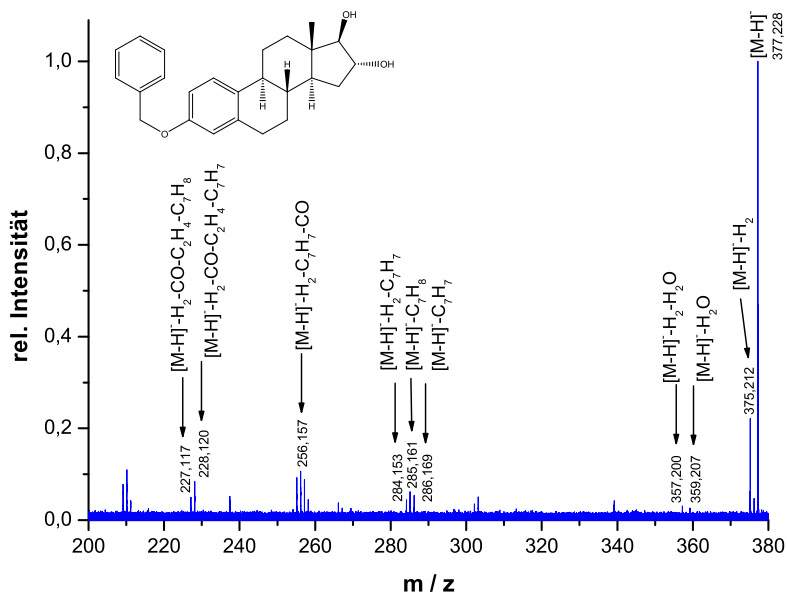


Abbildung A.25. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolbenzylether nach neg. ESI.

## A. Spektren

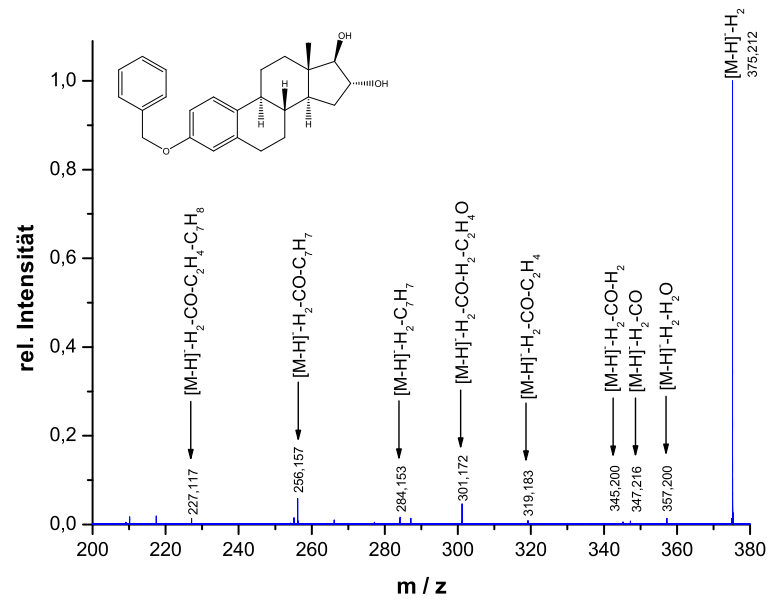


Abbildung A.26. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung nach H<sub>2</sub>-Abspaltung.

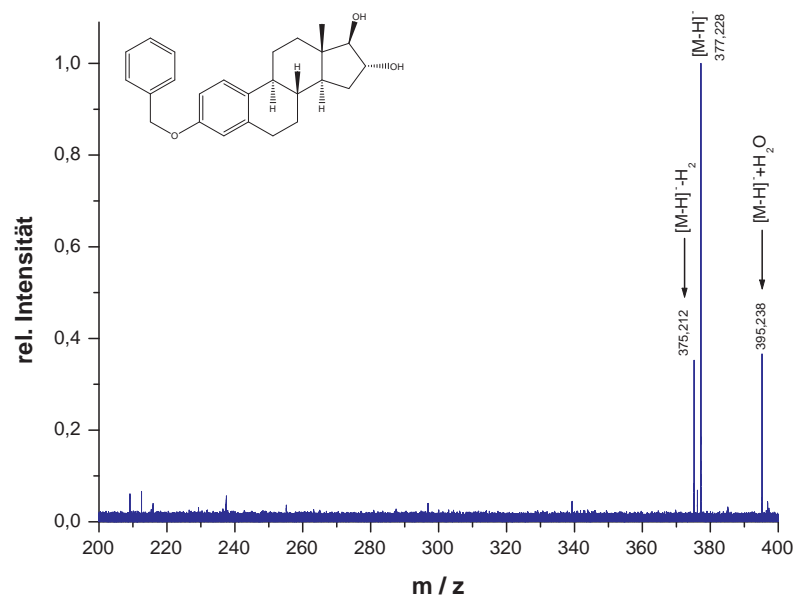


Abbildung A.27. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach neg. ESI: Isolierung des Wasseradduktes.

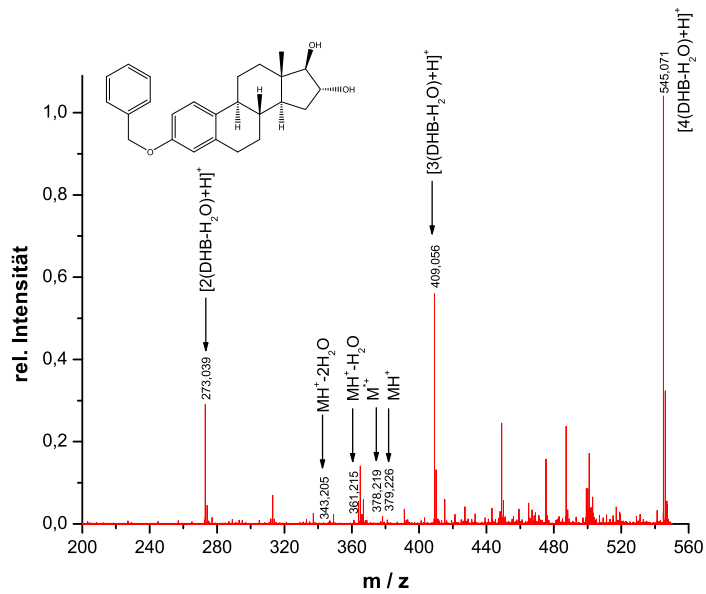


Abbildung A.28. – MALDI-Übersichtsspektrum vom Estriolbenzylether.

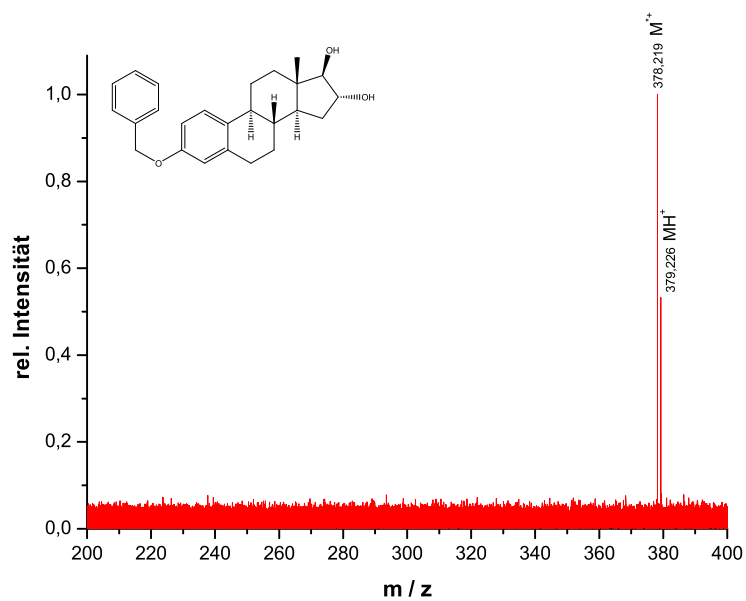


Abbildung A.29. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolbenzylether nach MALDI.

## A.4. Deuterte Benzylether

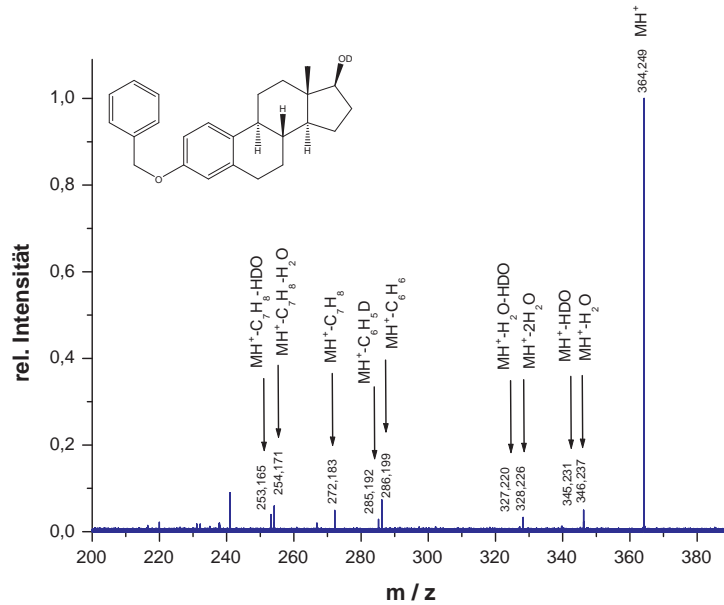


Abbildung A.30. – On-resonance-CID-Spektrum vom deuterierten Estradiolbenzylether.

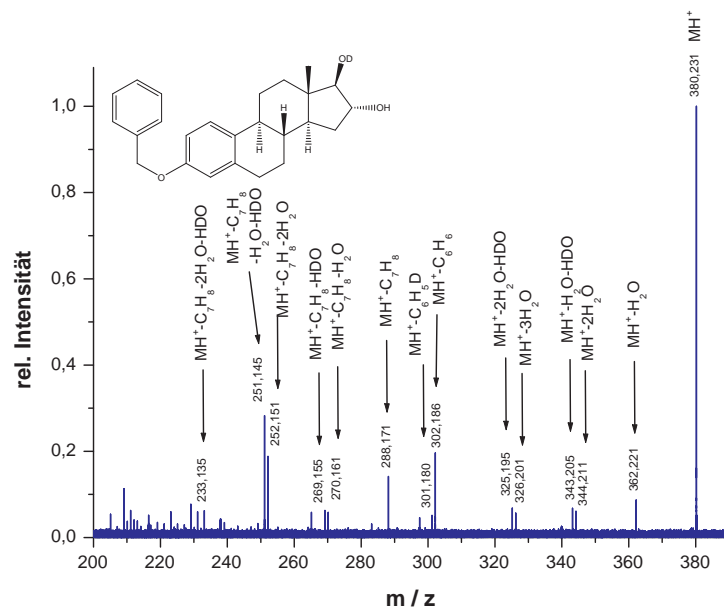


Abbildung A.31. – On-resonance-CID-Spektrum vom mono-deuterierten Estriolbenzylether.

## A.5. Allylether

### A.5.1. Estradiolallylether (5a)

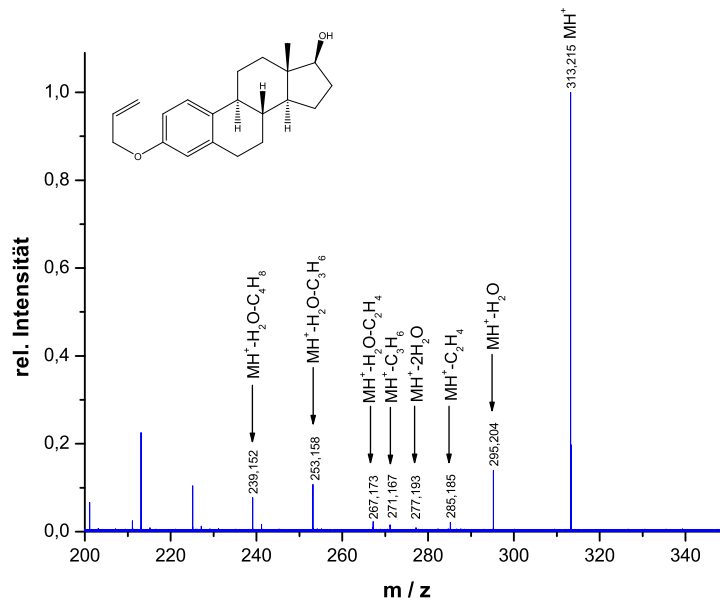


Abbildung A.32. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolallylether.

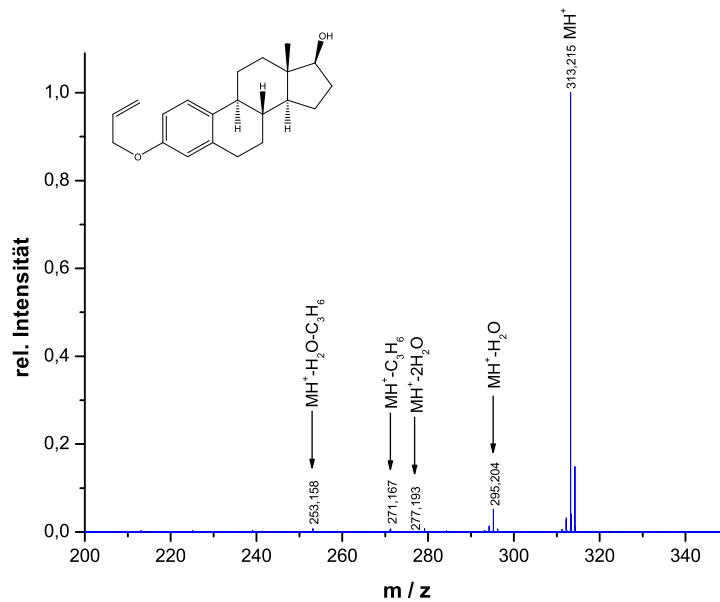


Abbildung A.33. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estradiolallylether.

A. Spektren

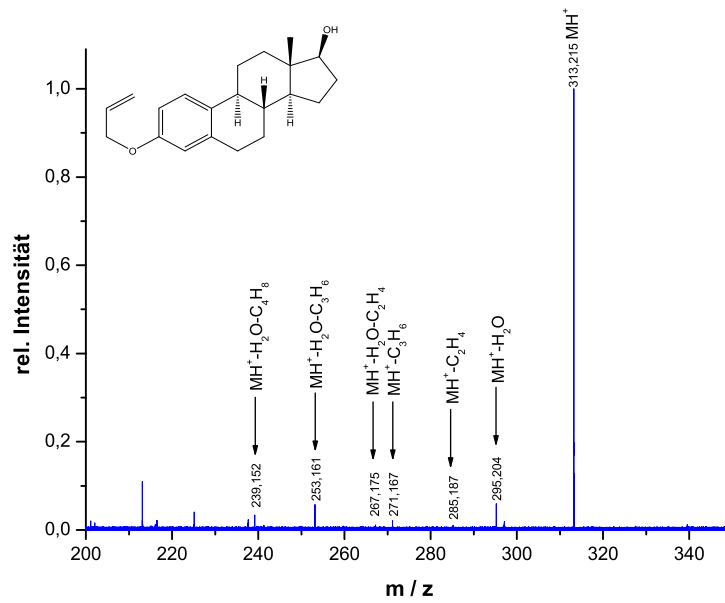


Abbildung A.34. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolallylether.

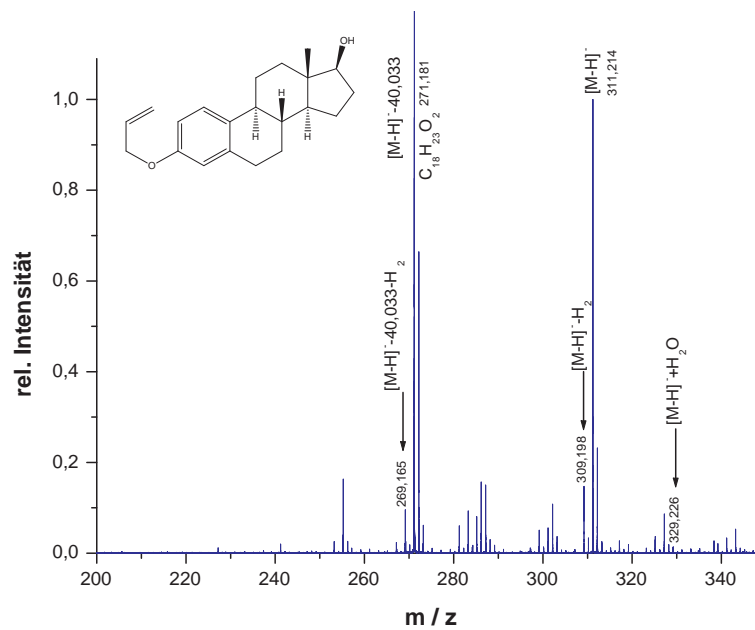


Abbildung A.35. – Übersichtsspektrum vom Estradiolallylether nach neg. ESI.

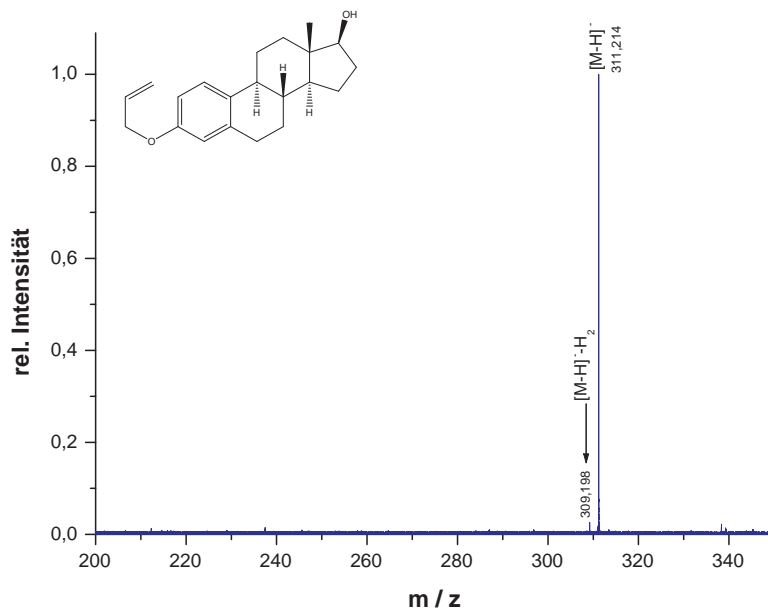


Abbildung A.36. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolallylether nach neg. ESI.

### A.5.2. Estriolallylether (5b)

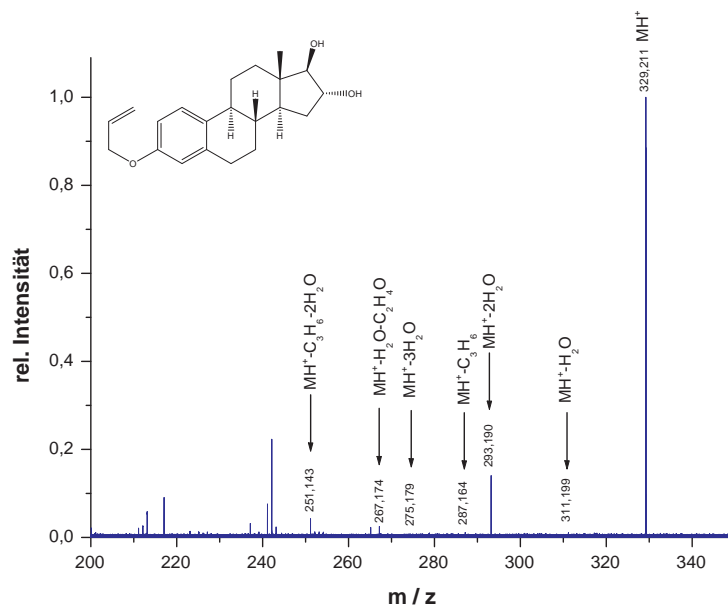


Abbildung A.37. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether 1.

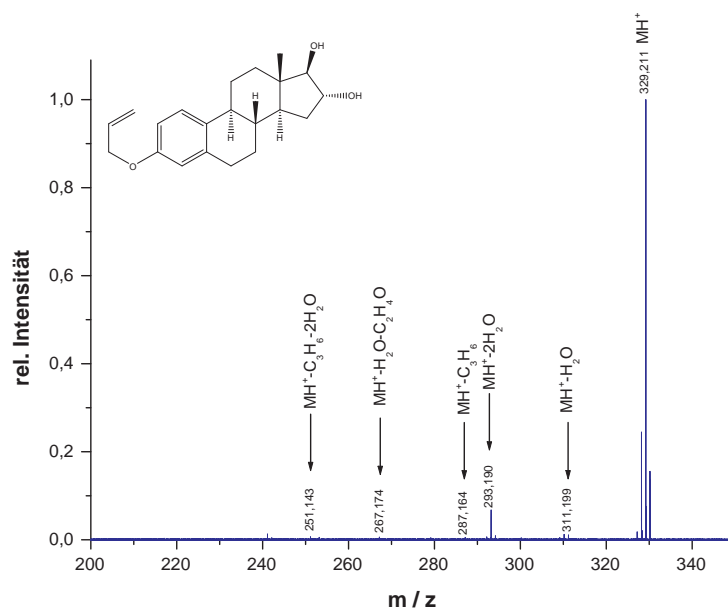


Abbildung A.38. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estriolallylether.



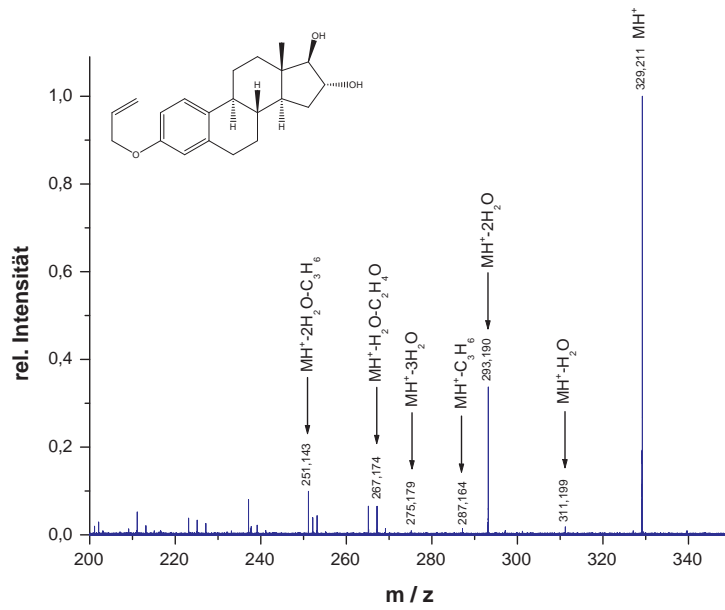
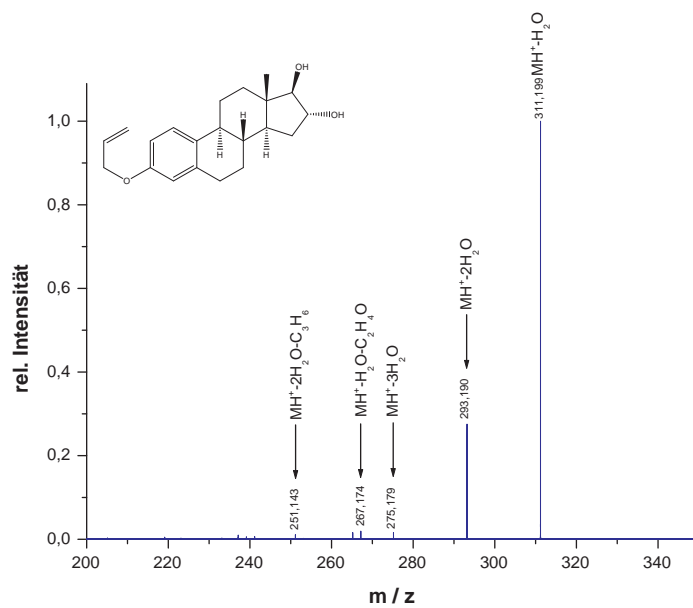


Abbildung A.39. – IRMPD-Spektrum vom Estriolallylether 1.

Abbildung A.40. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether 2:  
Fragmentierung nach der ersten Wasserabspaltung.

## A. Spektren

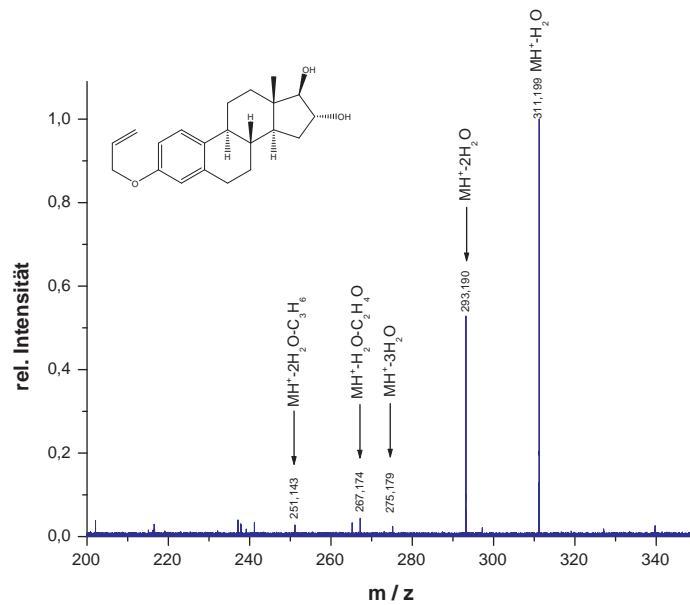


Abbildung A.41. – IRMPD-Spektrum vom Estriolallylether 2: Fragmentierung nach der ersten Wasserabspaltung.

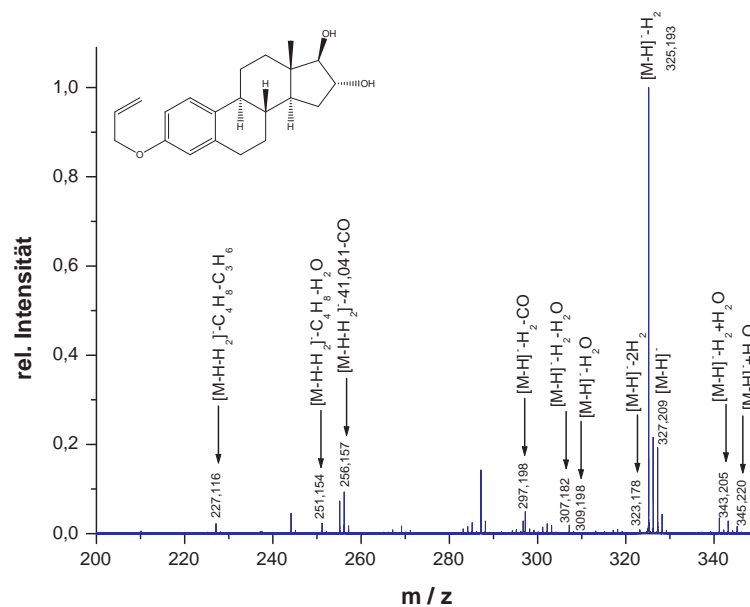


Abbildung A.42. – Übersichtsspektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI.

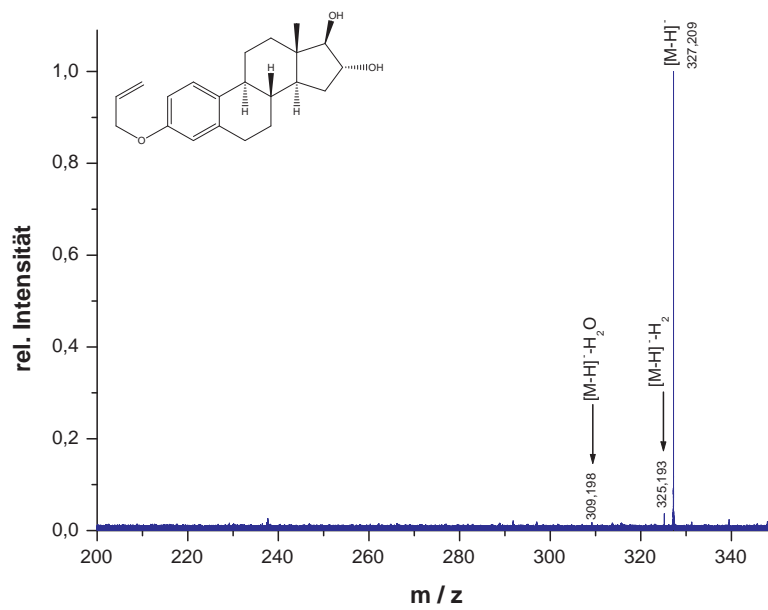


Abbildung A.43. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI.

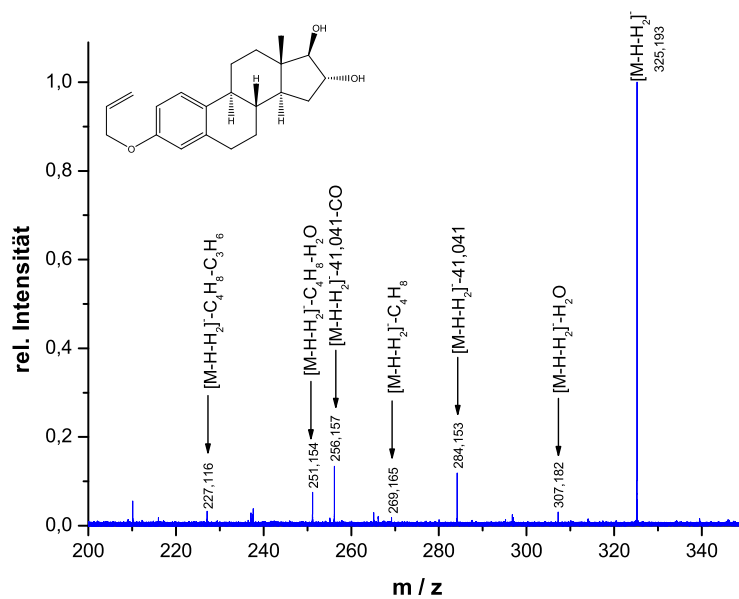


Abbildung A.44. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

## A. Spektren

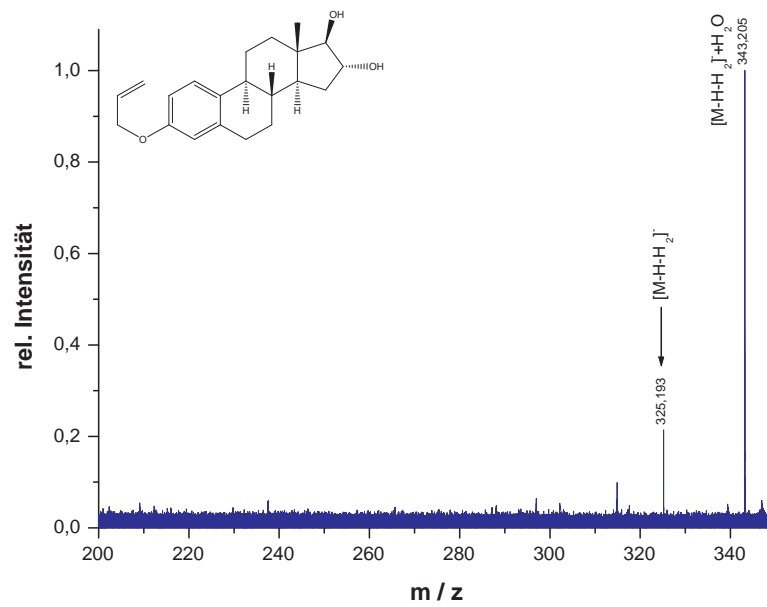


Abbildung A.45. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallylether nach neg. ESI: Isolierung des Wasseradduktes.

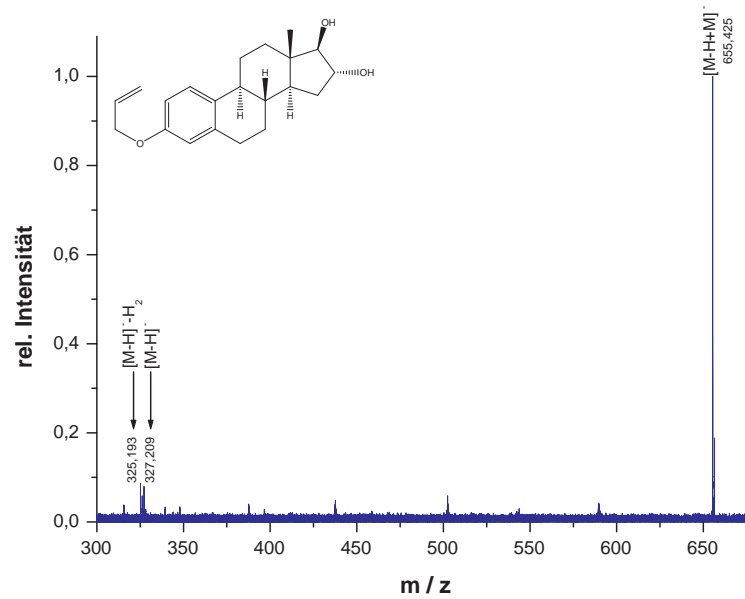


Abbildung A.46. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolallyletherdimer nach neg. ESI.

## A.6. Propylether

## A.6.1. Estradiolpropylether (6a)

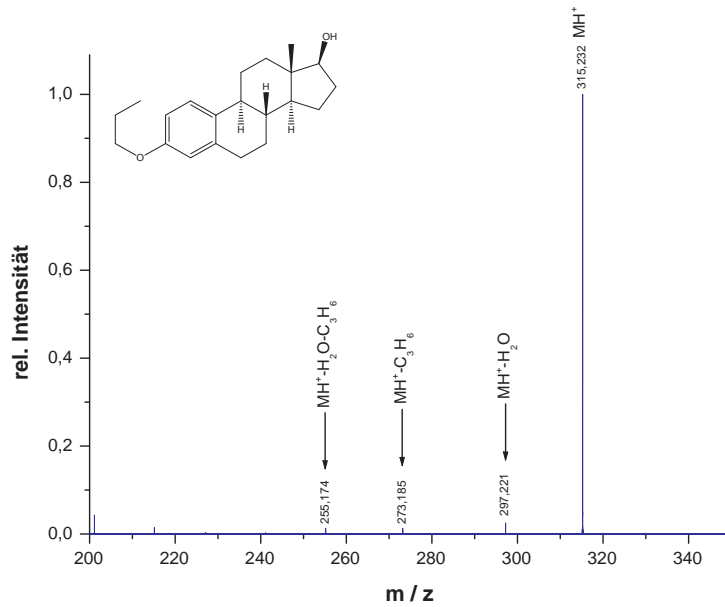


Abbildung A.47. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolpropylether.

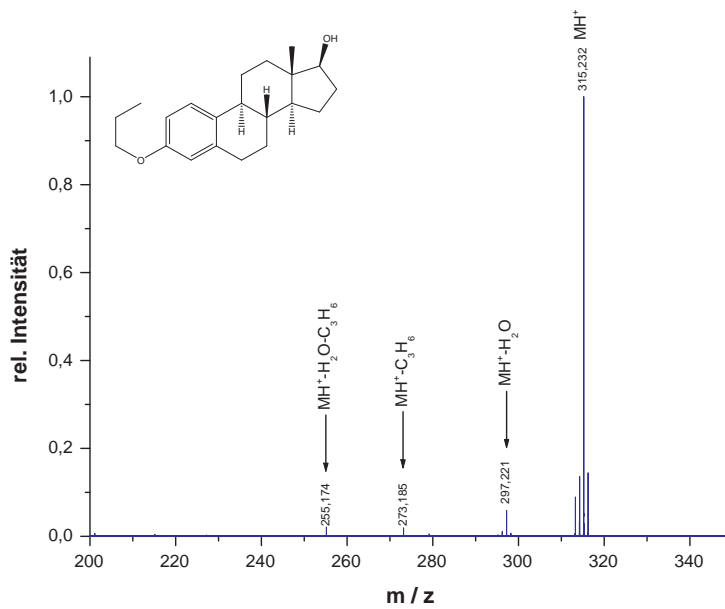


Abbildung A.48. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estradiolpropylether.

## A. Spektren

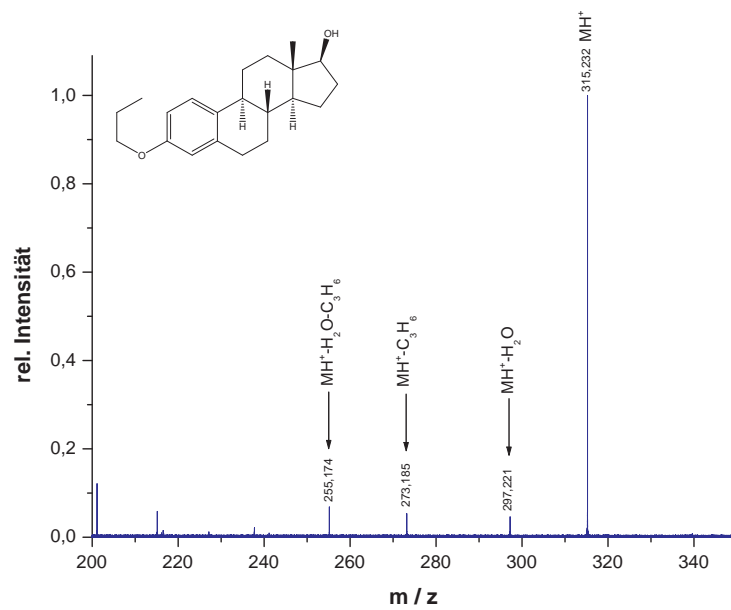


Abbildung A.49. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolpropylether.

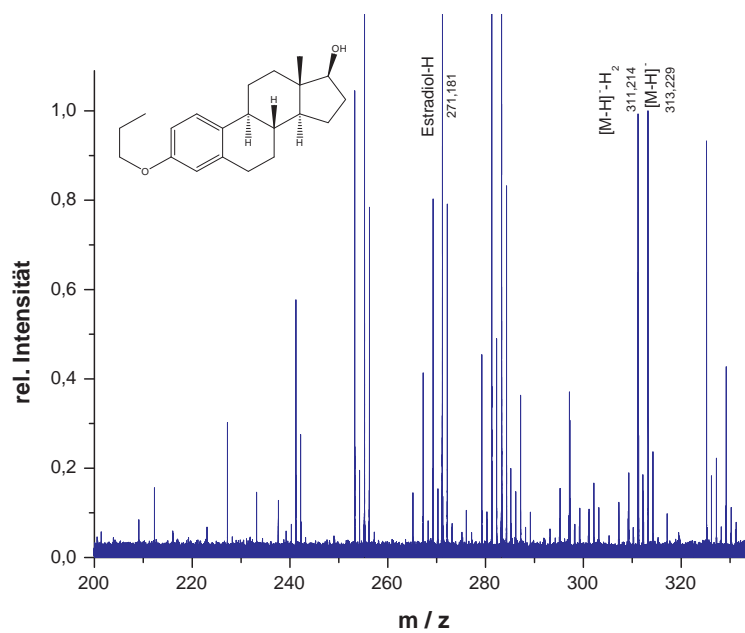


Abbildung A.50. – Übersichtsspektrum vom Estradiolpropylether nach neg. ESI.

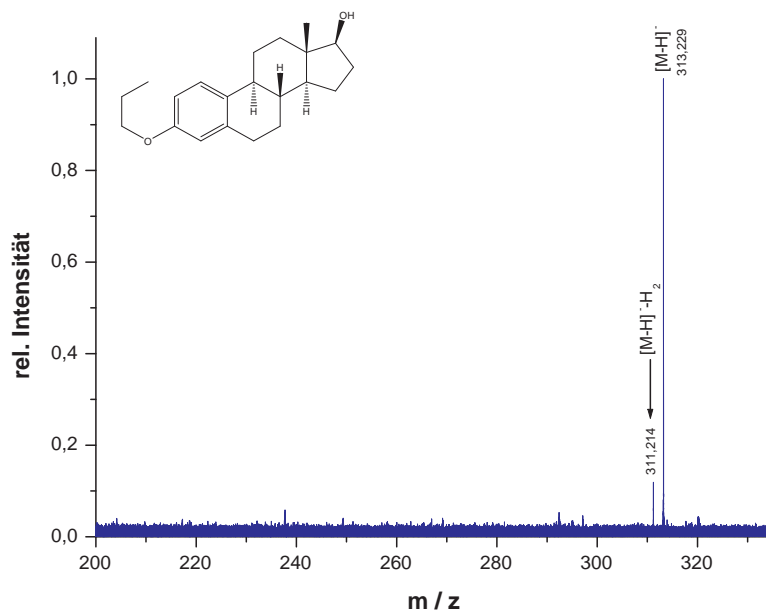


Abbildung A.51. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolpropylether nach neg. ESI.

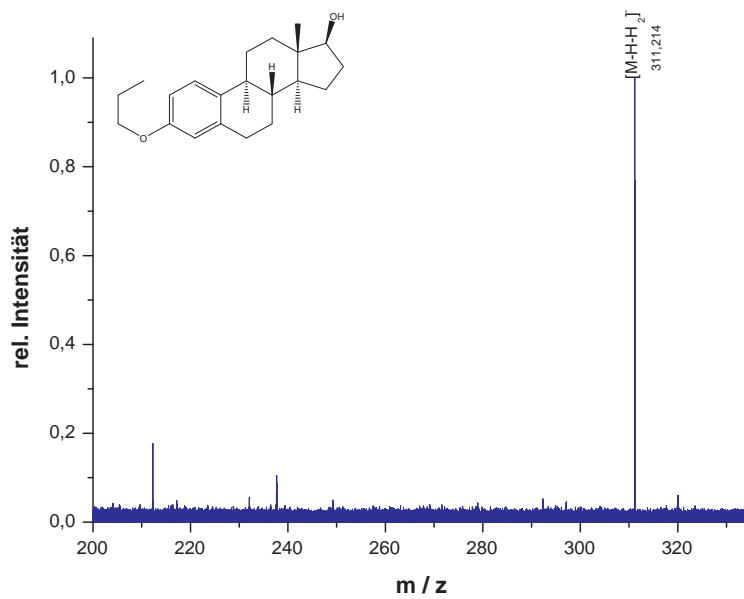


Abbildung A.52. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolpropylether nach neg. ESI: Isolierung nach  $H_2$ -Abspaltung.

### A.6.2. Estriolpropylether (6b)

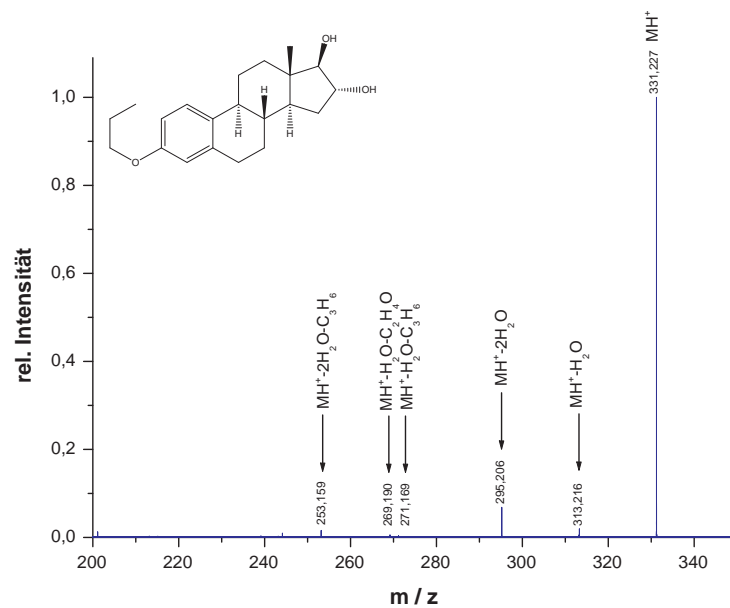


Abbildung A.53. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolpropylether.

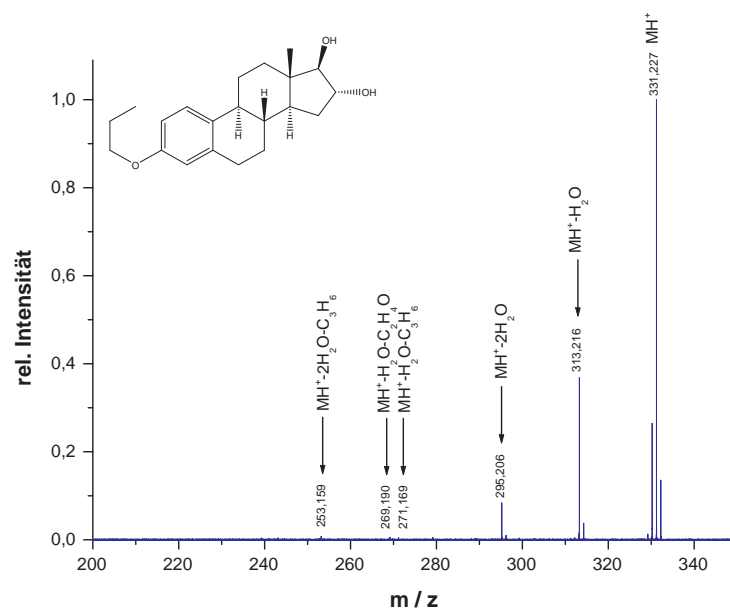


Abbildung A.54. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estriolpropylether.



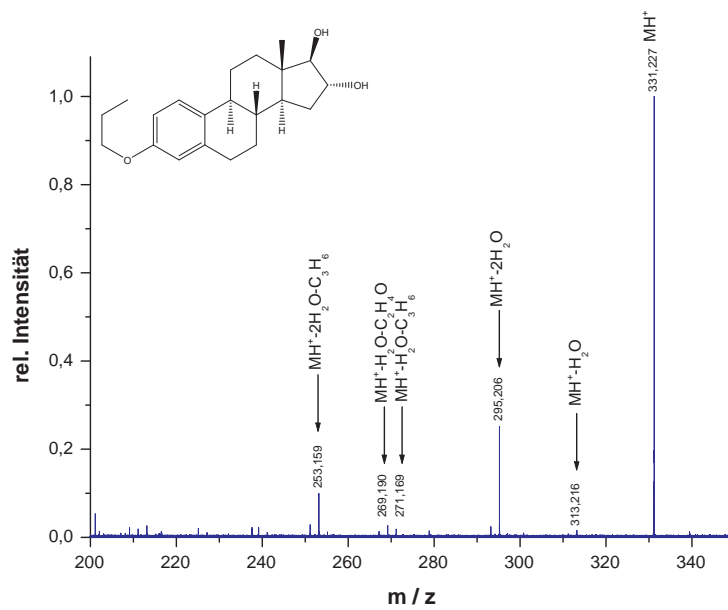


Abbildung A.55. – IRMPD-Spektrum vom Estriolpropylether.

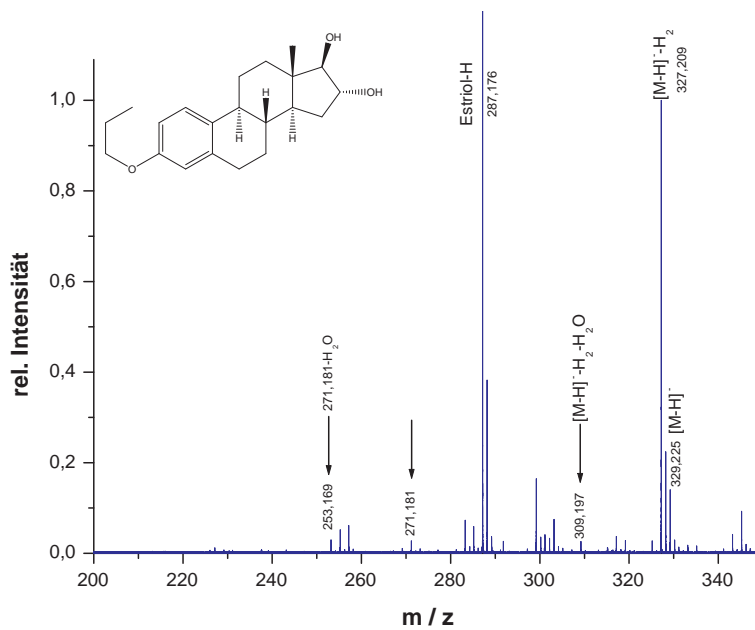


Abbildung A.56. – Übersichtsspektrum vom Estriolpropylether nach neg. ESI.

A. Spektren

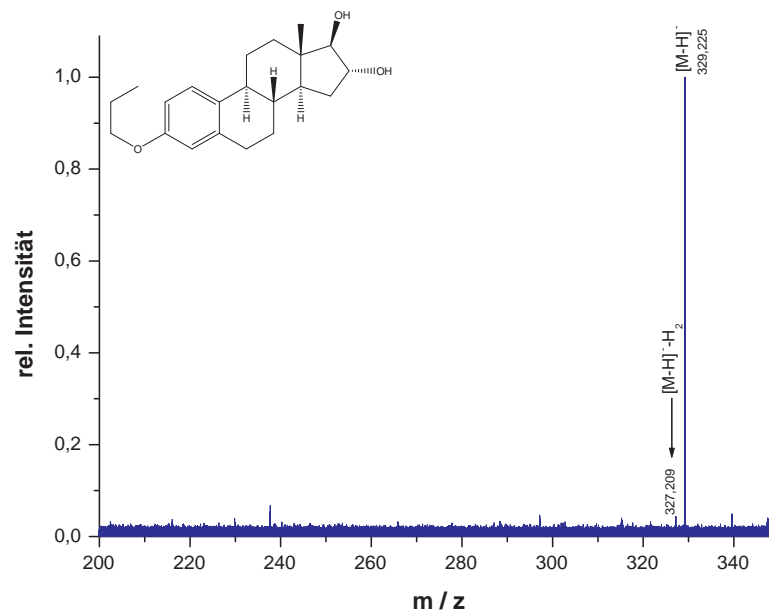


Abbildung A.57. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolpropylether nach neg. ESI.

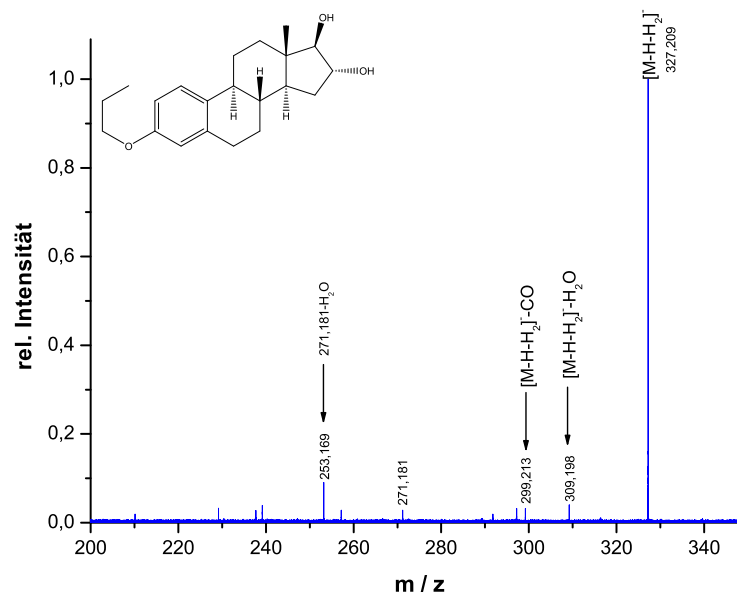


Abbildung A.58. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolpropylether nach neg. ESI: Isolierung nach H<sub>2</sub>-Abspaltung.

## A.7. Ethylether

### A.7.1. Estradiolethylether (7a)

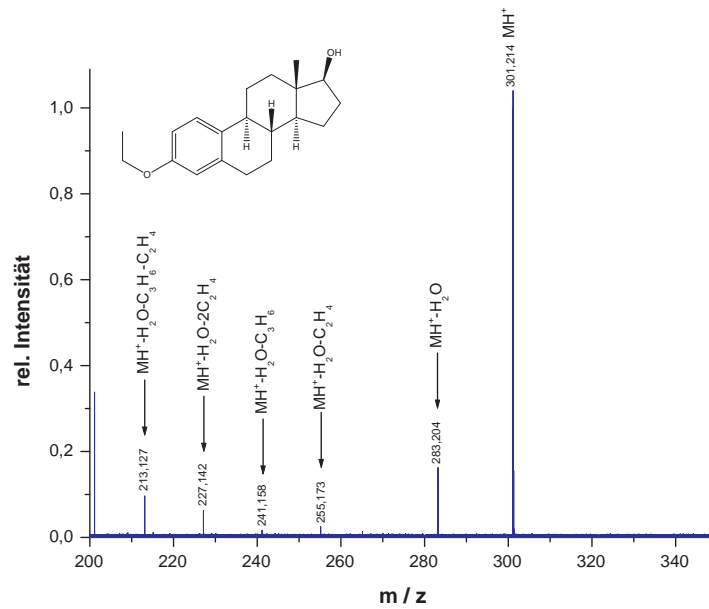


Abbildung A.59. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolethylether.

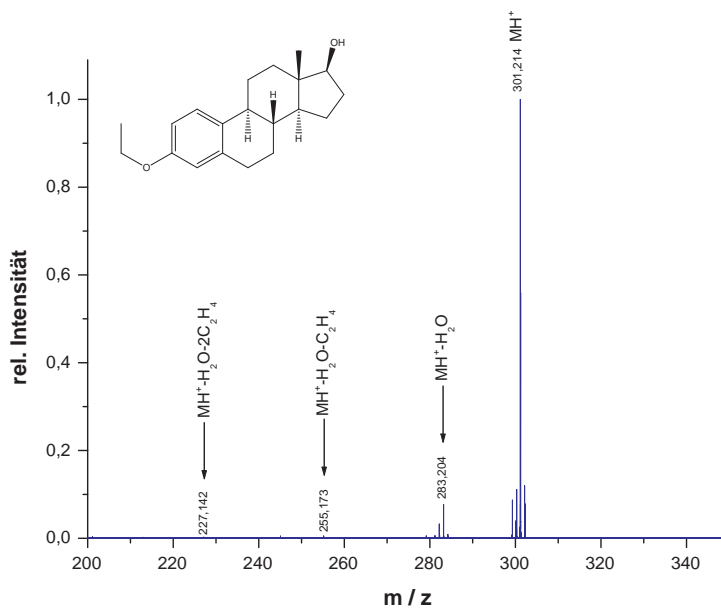


Abbildung A.60. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estradiolethylether.

## A. Spektren

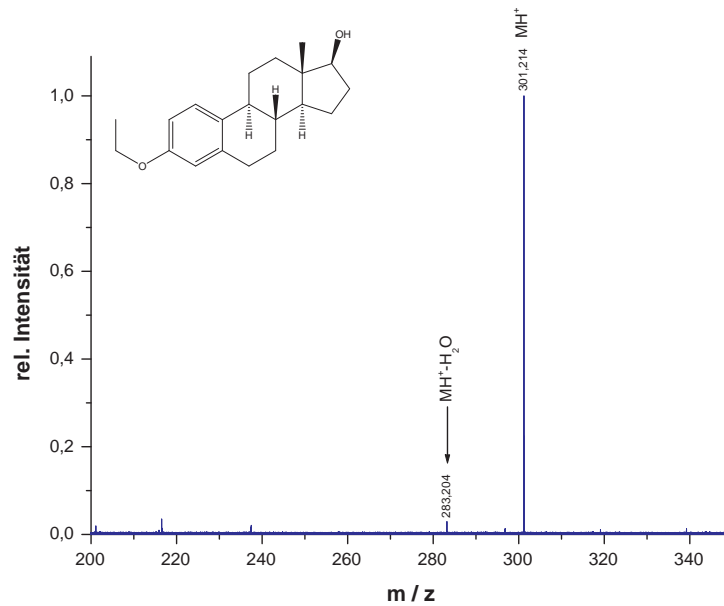


Abbildung A.61. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolethylether.

### A.7.2. Estriolethylether (7b)

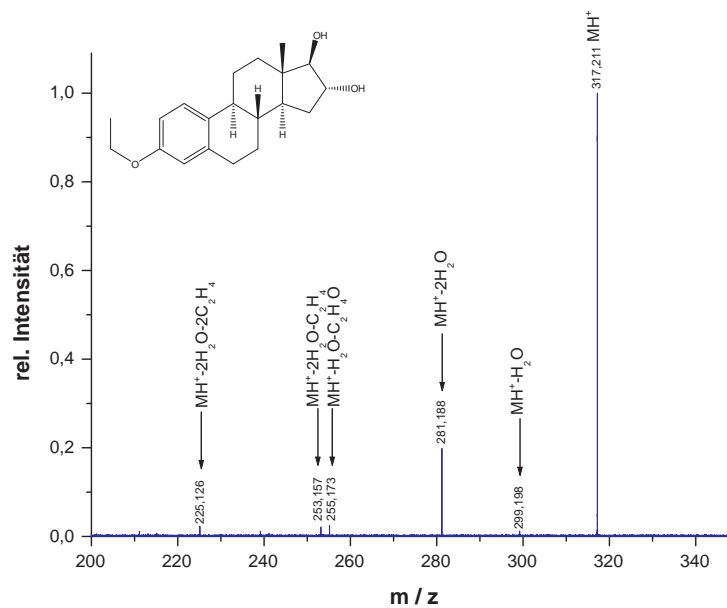


Abbildung A.62. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolethylether.

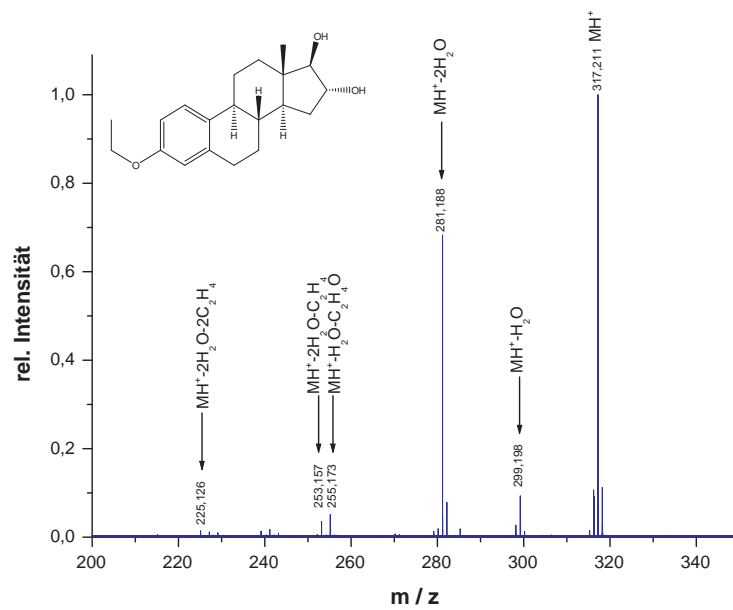


Abbildung A.63. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estriolethylether.

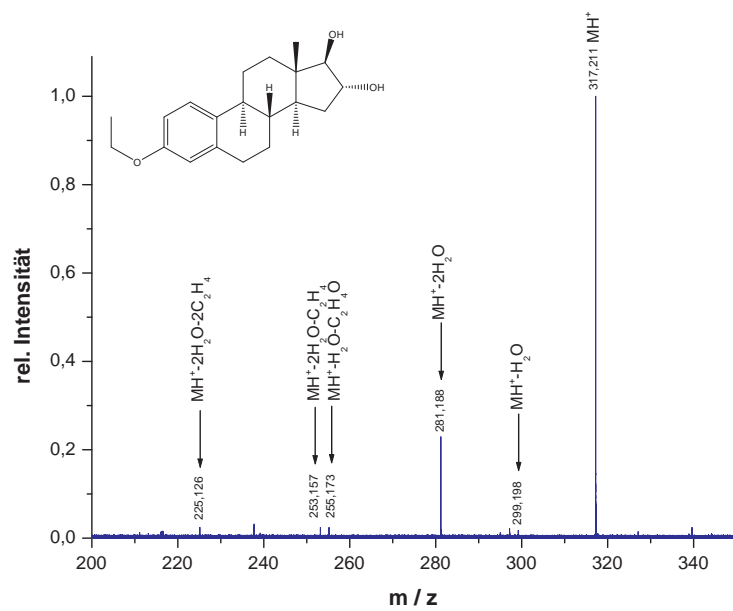


Abbildung A.64. – IRMPD-Spektrum vom Estriolethylether.

## A.8. Methylether

### A.8.1. Estradiolmethylether (8a)

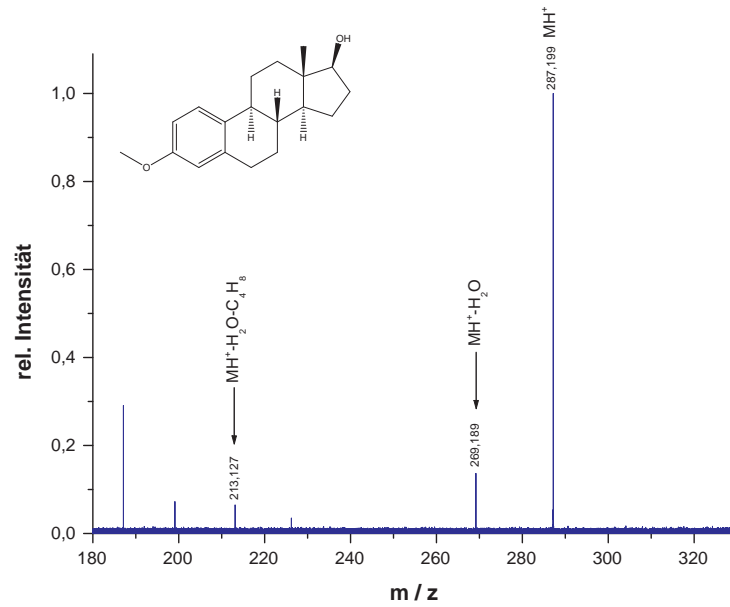


Abbildung A.65. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estradiolmethylether.

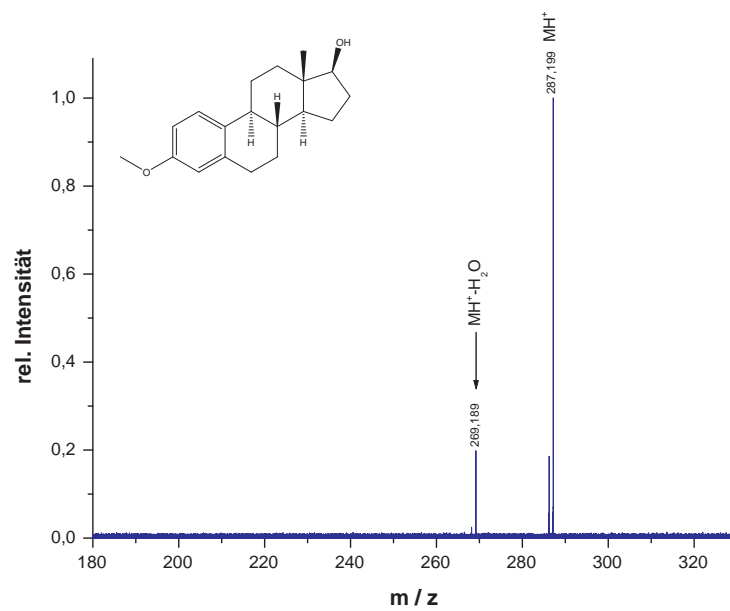


Abbildung A.66. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estradiolmethylether.

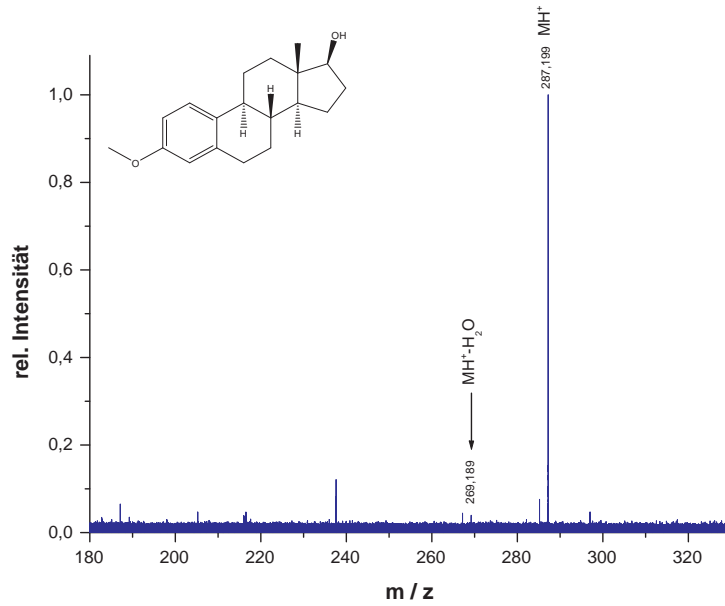


Abbildung A.67. – IRMPD-Spektrum vom Estradiolmethylether.

### A.8.2. Estriolmethylether (8b)

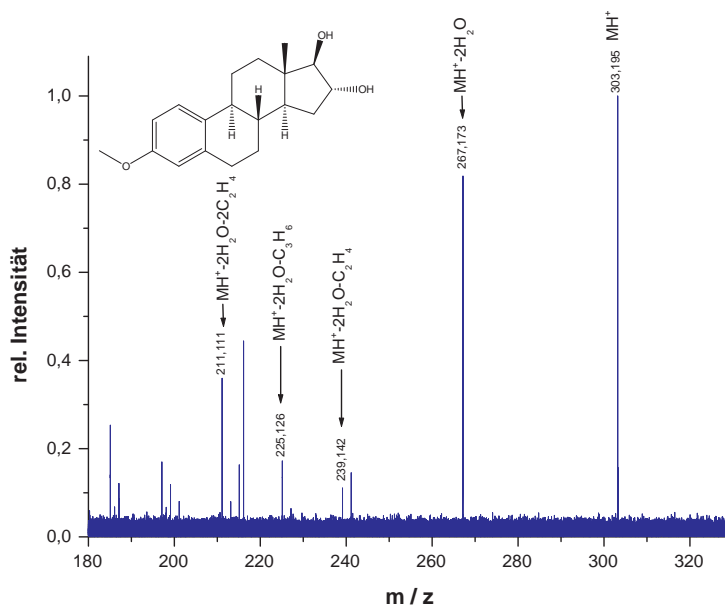


Abbildung A.68. – On-resonance-CID-Spektrum vom Estriolmethylether.

A. Spektren

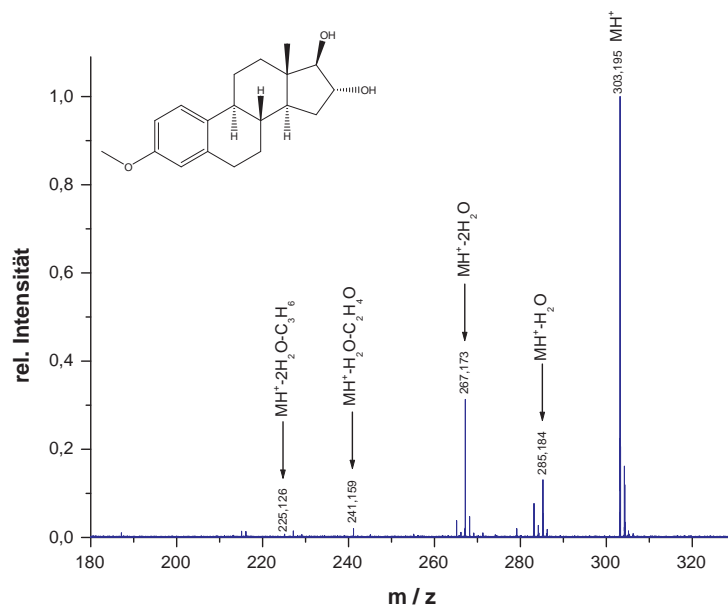


Abbildung A.69. – Collision Cell-CID-Spektrum vom Estriolmethylether.

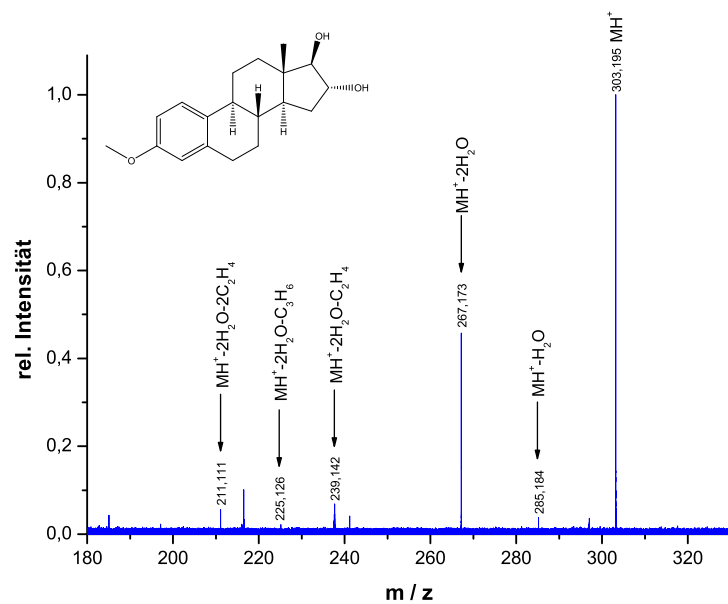


Abbildung A.70. – IRMPD-Spektrum vom Estriolmethylether.



## A.9. Pure Estrogene

### A.9.1. Estradiol (9a)

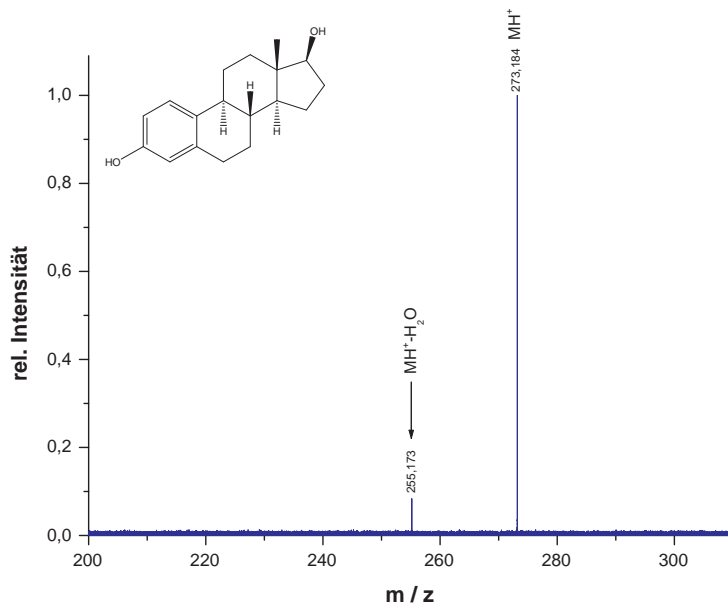


Abbildung A.71. – On-resonance-CID-Spektrum von Estradiol.

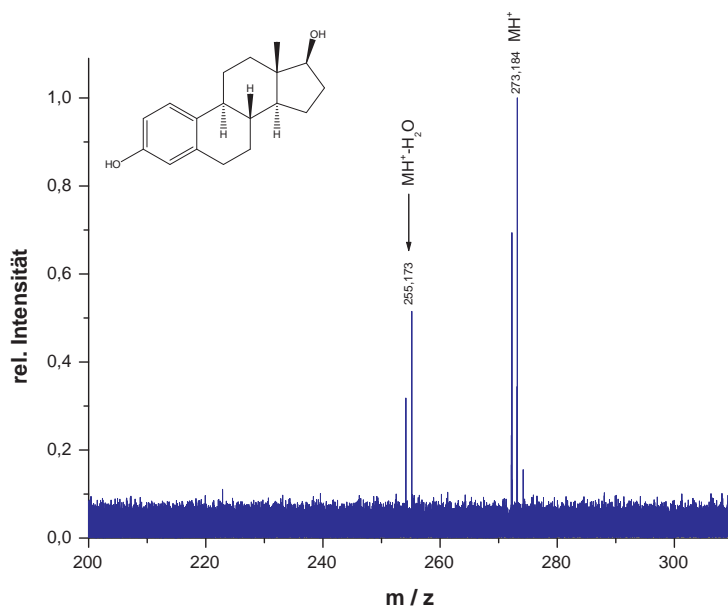


Abbildung A.72. – Collision Cell-CID-Spektrum von Estradiol.

## A. Spektren

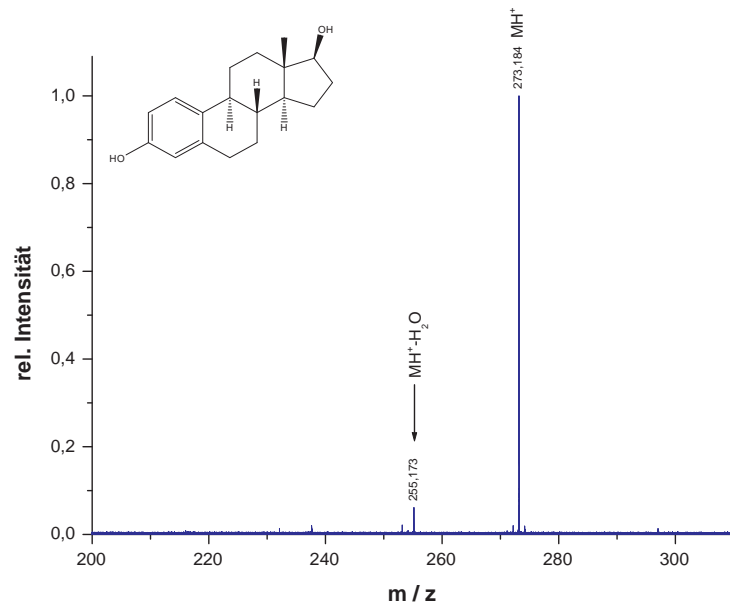


Abbildung A.73. – IRMPD-Spektrum von Estradiol.

### A.9.2. Estriol (9b)

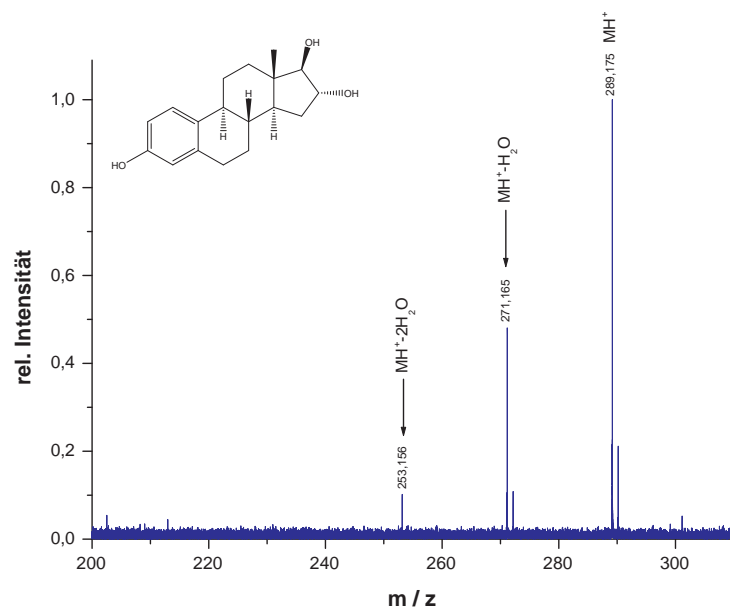


Abbildung A.74. – On-resonance-CID-Spektrum von Estriol.

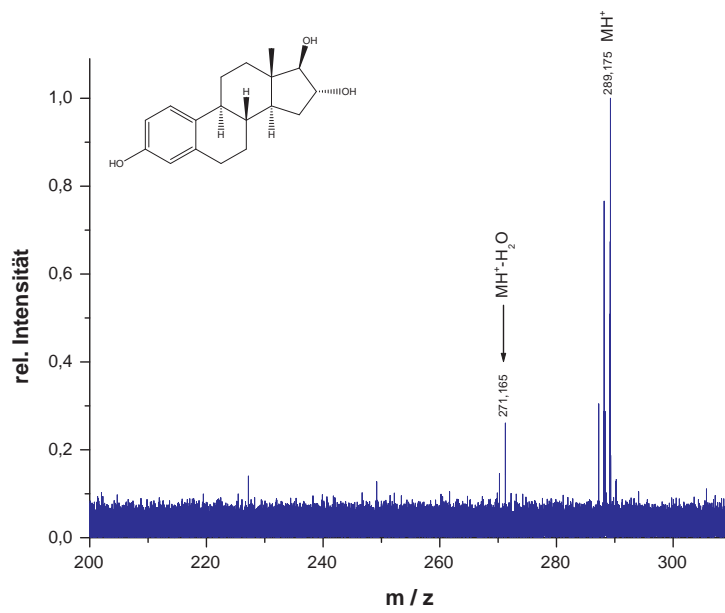


Abbildung A.75. – Collision Cell-CID-Spektrum von Estriol 1.

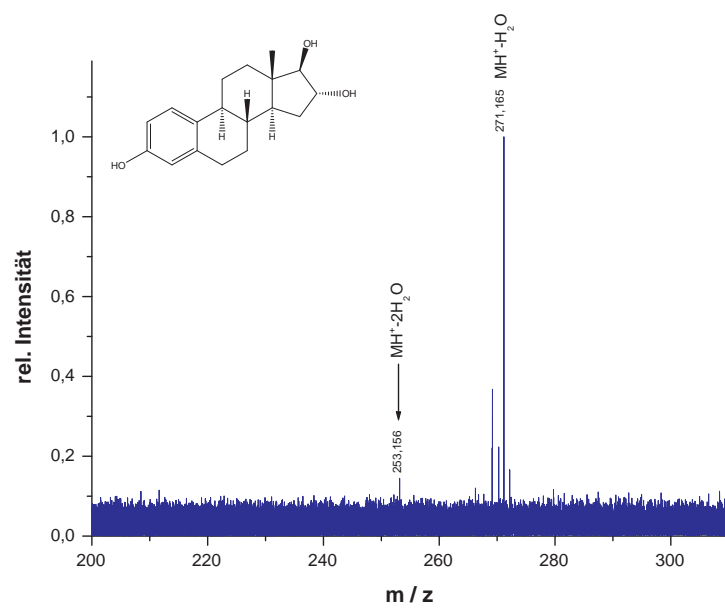


Abbildung A.76. – Collision Cell-CID-Spektrum von Estriol 2: Fragmentierung nach der ersten Wasserabspaltung.

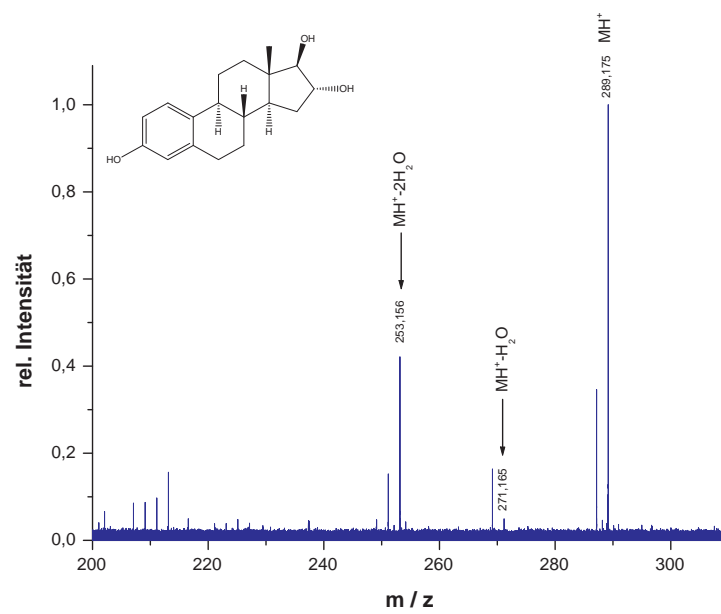


Abbildung A.77. – IRMPD-Spektrum von Estradiol.

## A.10. Gestagene

### A.10.1. Pregnandiol (11)

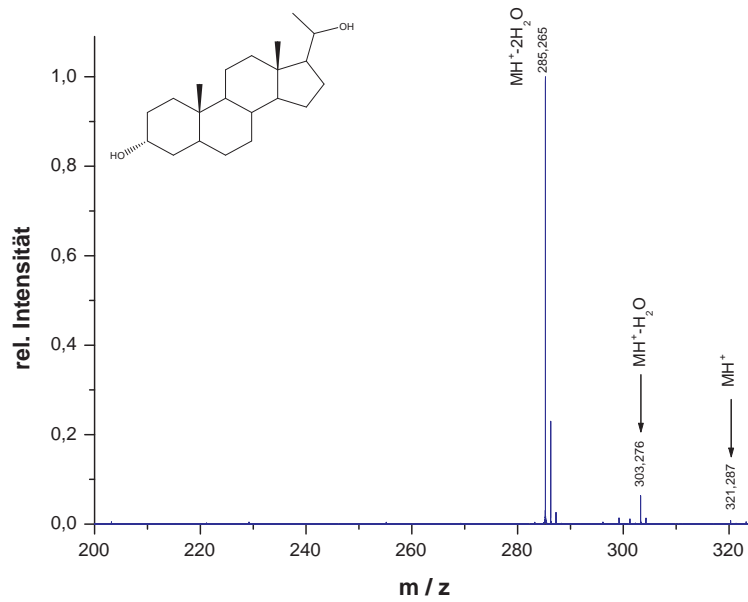


Abbildung A.78. – Übersichtsspektrum vom Pregnandiol.

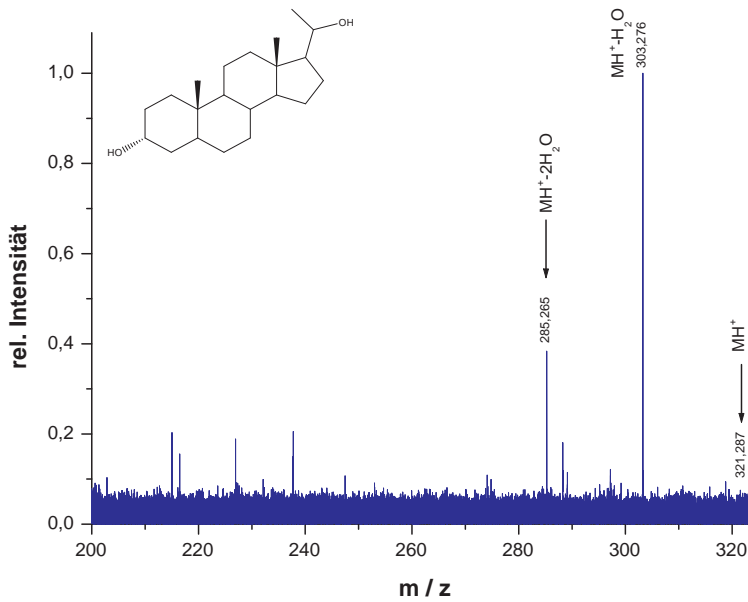


Abbildung A.79. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnandiol 1.

A. Spektren

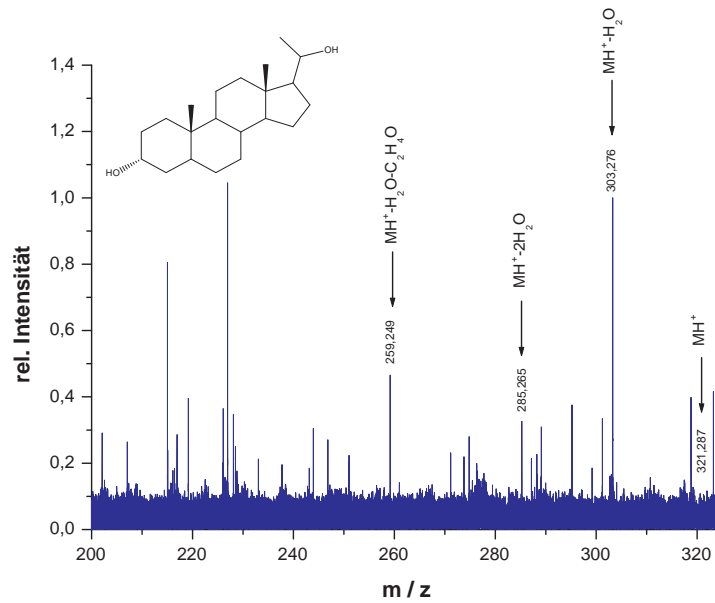


Abbildung A.80. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnanediol 2.

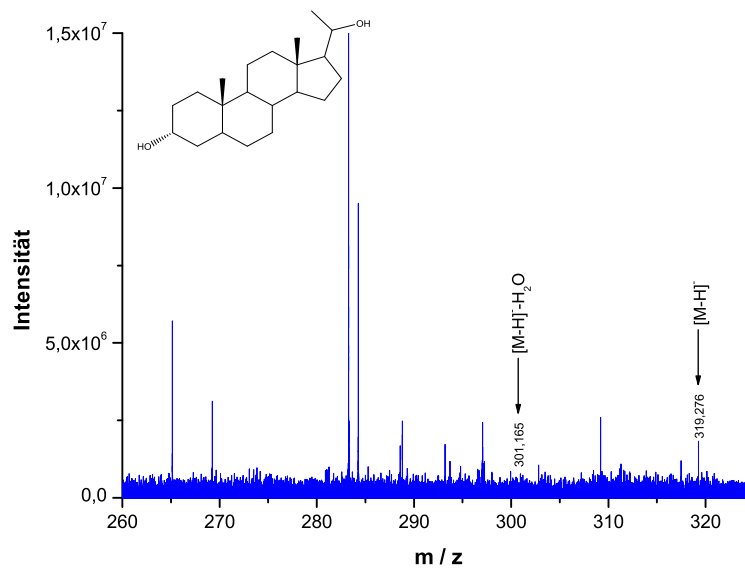


Abbildung A.81. – Übersichtsspektrum vom Pregnanediol nach neg. ESI.

## A.10.2. Pregnenolon (12)

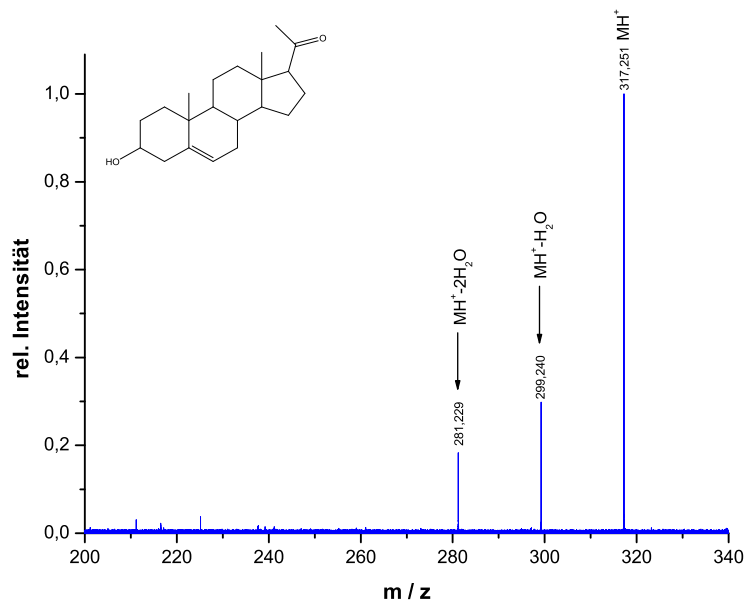


Abbildung A.82. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnenolon.

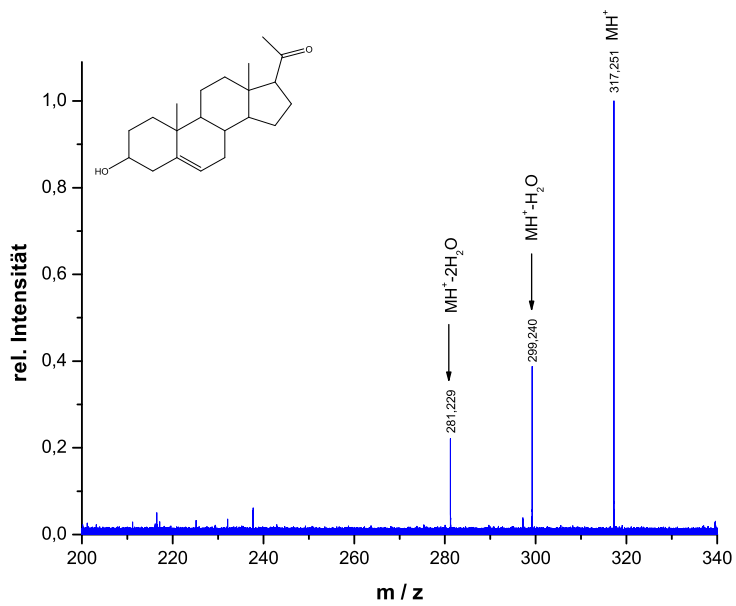


Abbildung A.83. – IRMPD-Spektrum vom Pregnenolon.

## A. Spektren

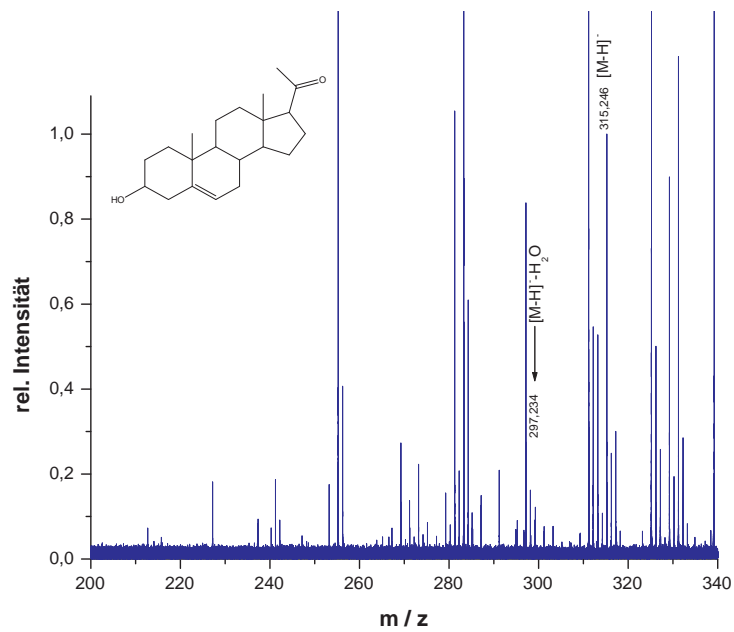


Abbildung A.84. – Übersichtsspektrum vom Pregnenolon nach neg. ESI.

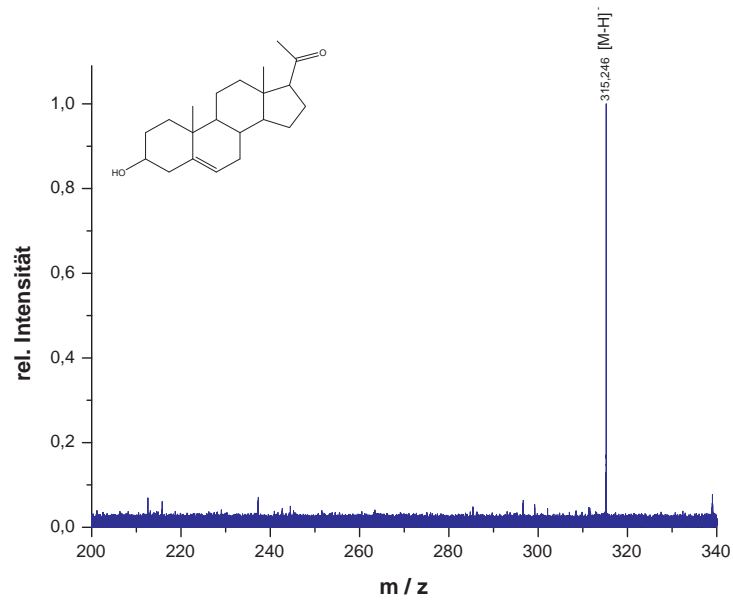


Abbildung A.85. – On-resonance-CID-Spektrum vom Pregnenolon nach neg. ESI.



## A.10.3. 17-Hydroxypregnenolon (13)

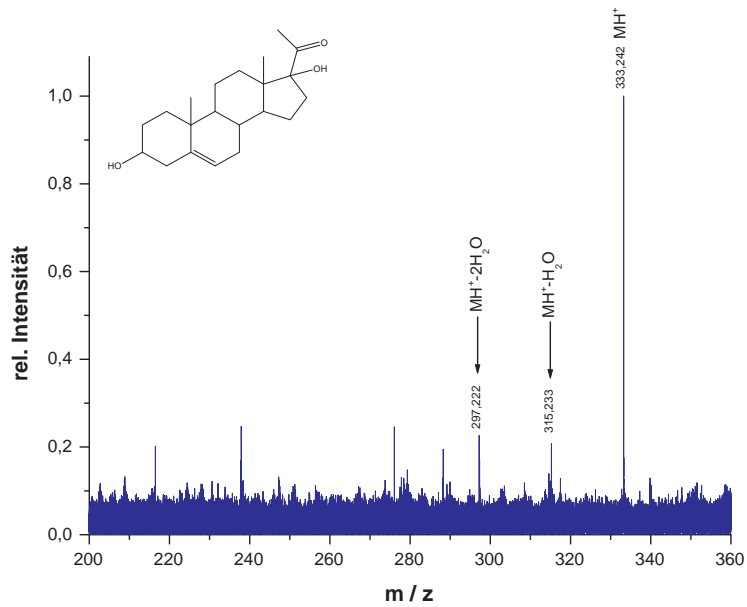


Abbildung A.86. – On-resonance-CID-Spektrum vom 17-Hydroxypregnenolon.

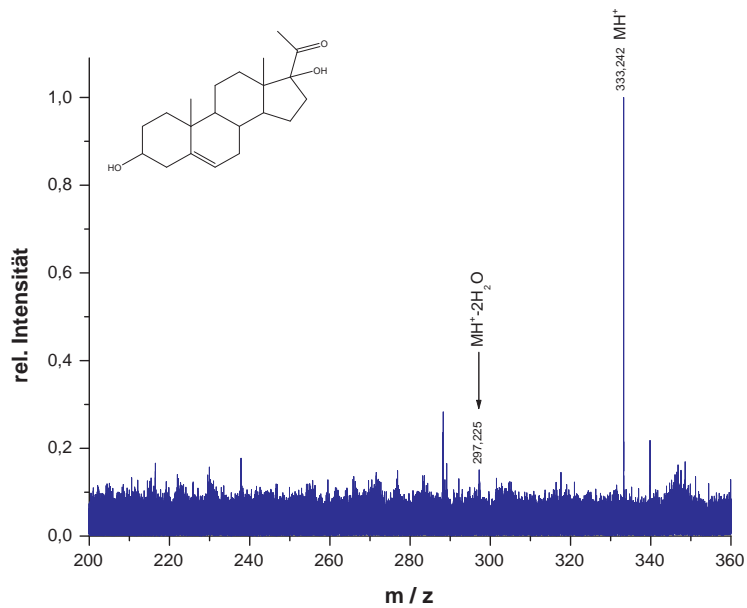


Abbildung A.87. – IRMPD-Spektrum vom 17-Hydroxypregnenolon.

## A. Spektren

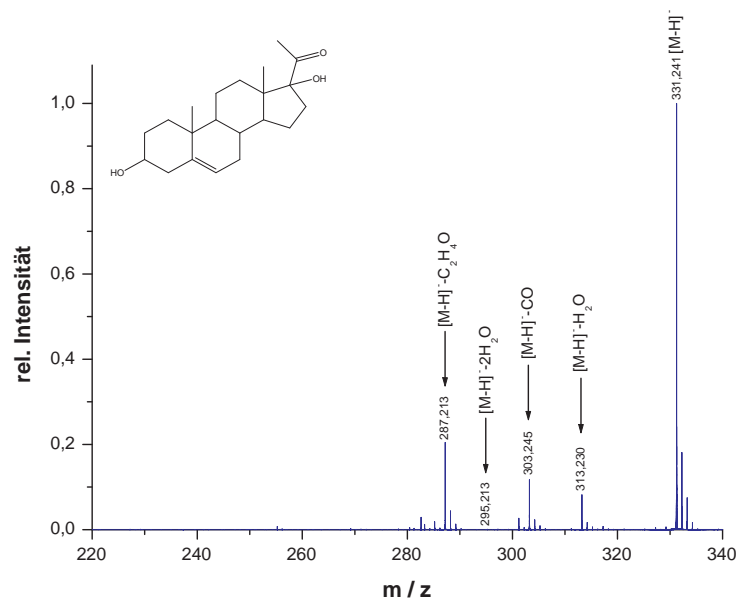


Abbildung A.88. – Übersichtsspektrum vom 17-Hydroxypregnenolon nach neg. ESI.

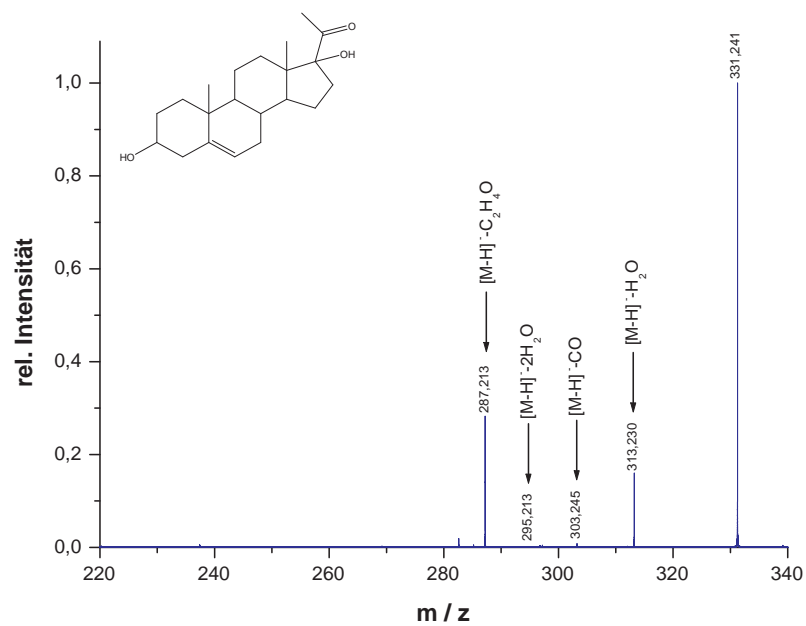


Abbildung A.89. – On-resonance-CID-Spektrum vom 17-Hydroxypregnenolon nach neg. ESI.

## A.10.4. Dehydroepiandrosteron (14)

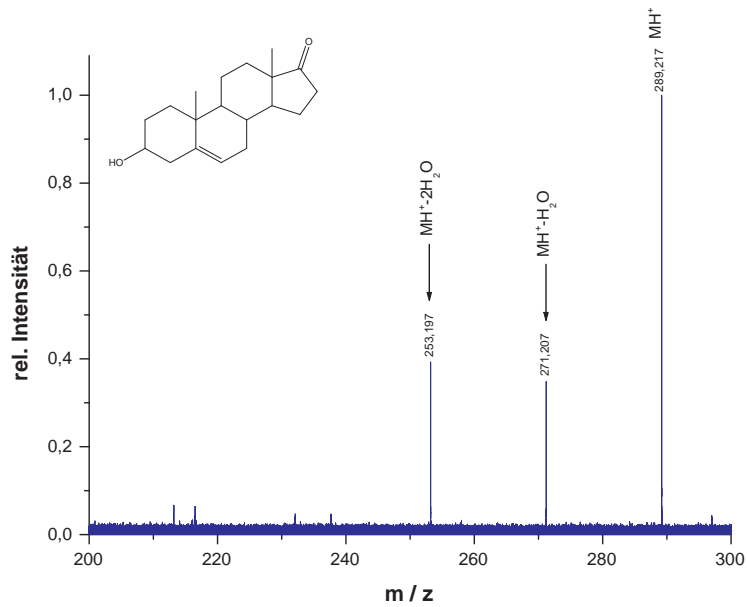


Abbildung A.90. – On-resonance-CID-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron.

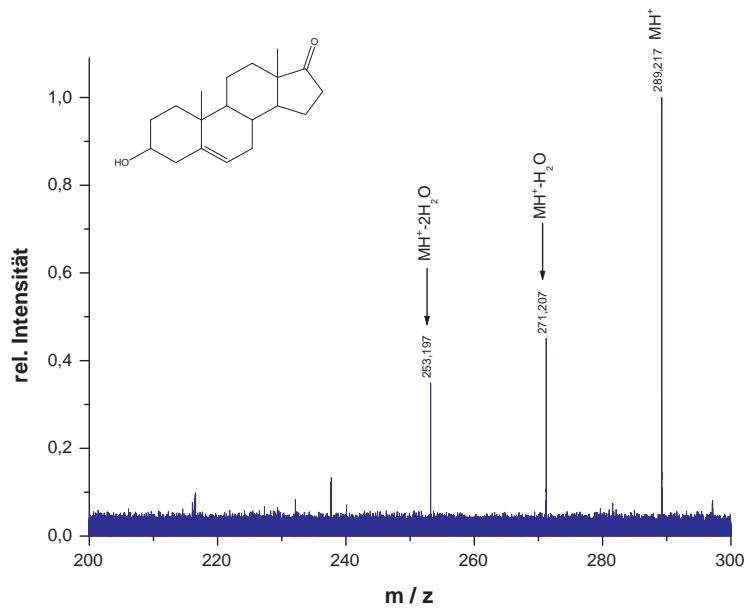


Abbildung A.91. – IRMPD-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron.

## A. Spektren

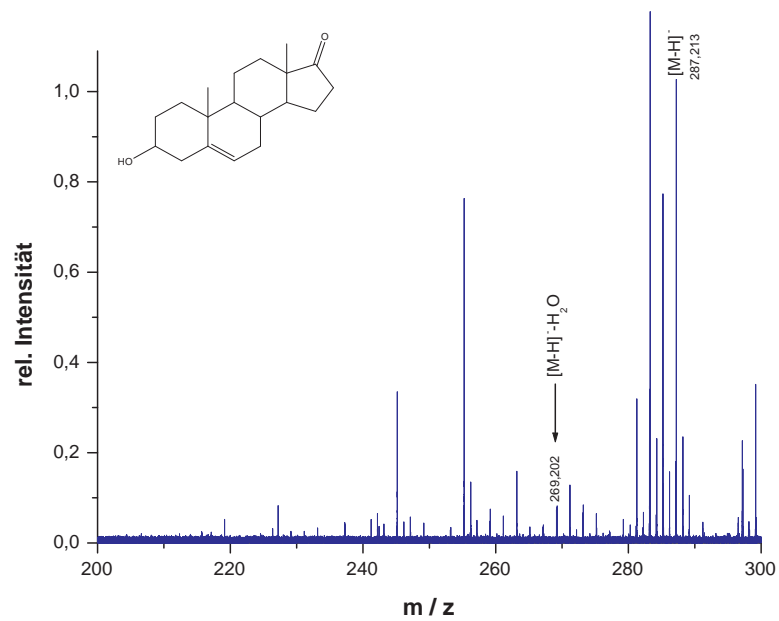


Abbildung A.92. – Übersichtsspektrum vom Dehydroepiandrosteron nach neg. ESI.

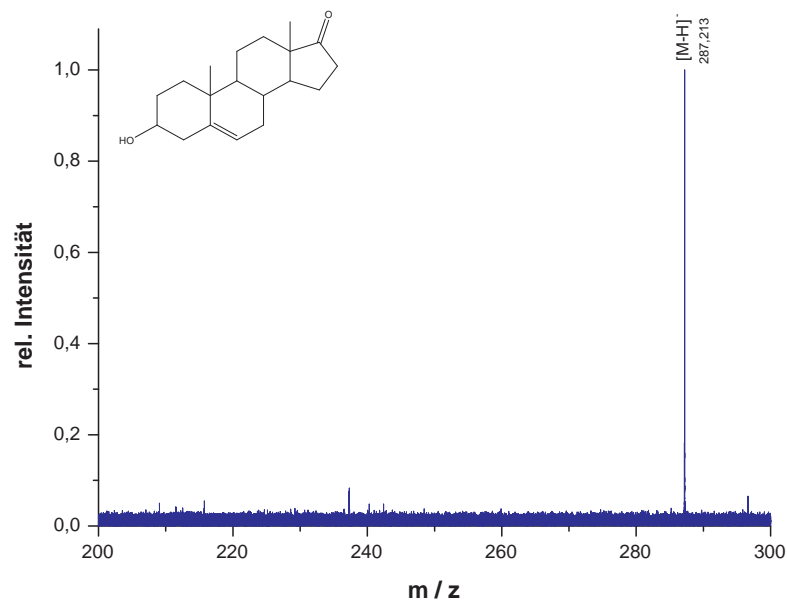


Abbildung A.93. – On-resonance-CID-Spektrum vom Dehydroepiandrosteron nach neg. ESI.

## A.10.5. Corticosteron (15)

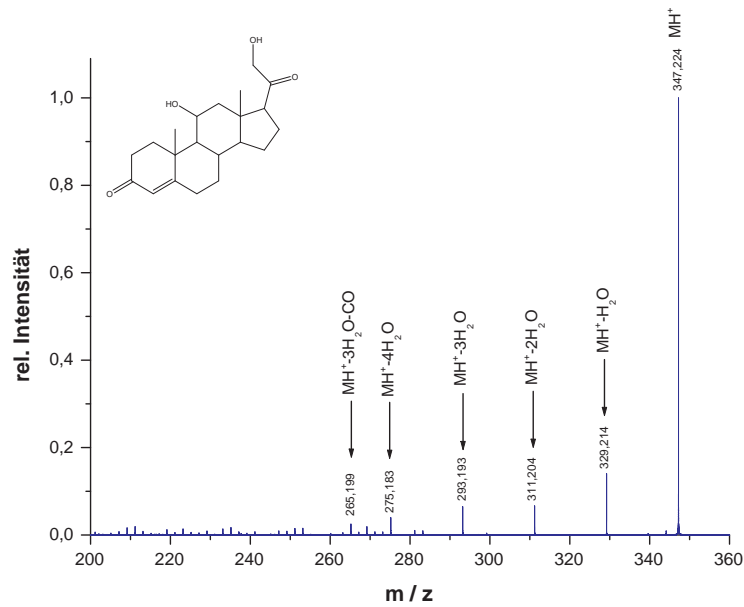


Abbildung A.94. – On-resonance-CID-Spektrum vom Corticosteron.

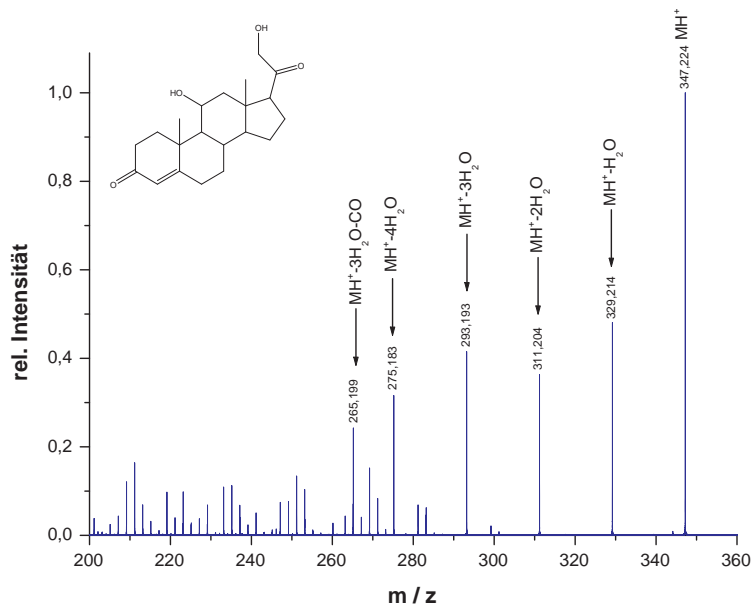


Abbildung A.95. – IRMPD-Spektrum vom Corticosteron.

## A. Spektren

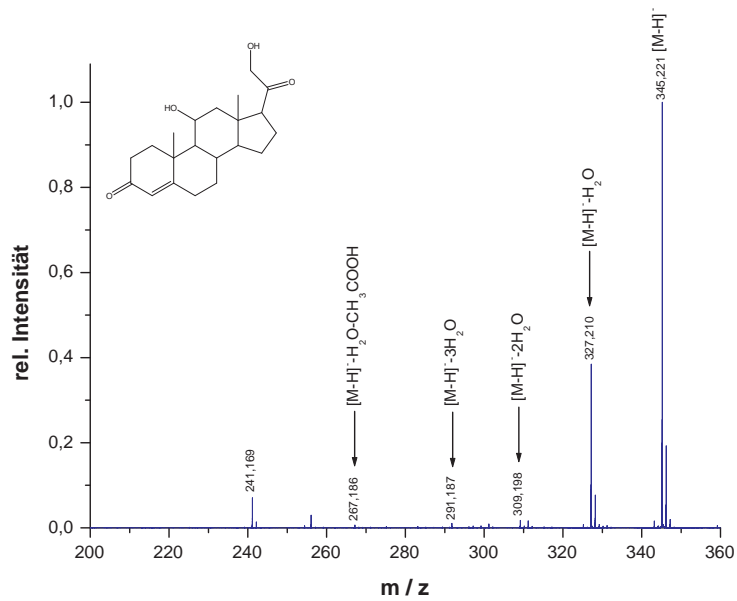


Abbildung A.96. – Übersichtsspektrum vom Corticosteron nach neg. ESI.

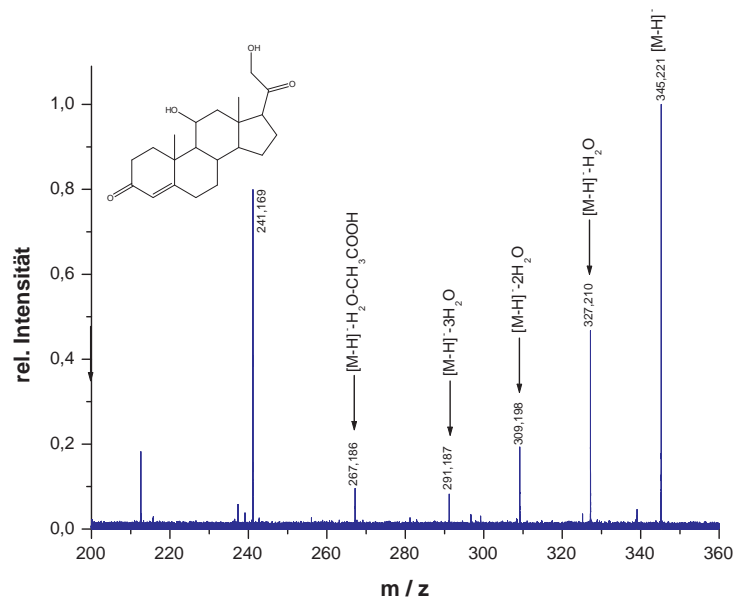


Abbildung A.97. – On-resonance-CID-Spektrum vom Corticosteron nach neg. ESI.

## A.11. Indole

### A.11.1. 5-Benzyloxyindol (16)

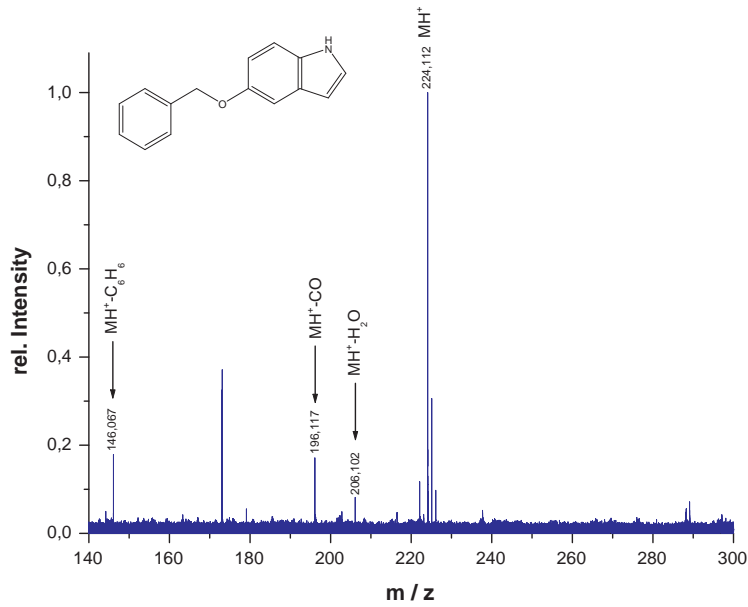


Abbildung A.98. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol.

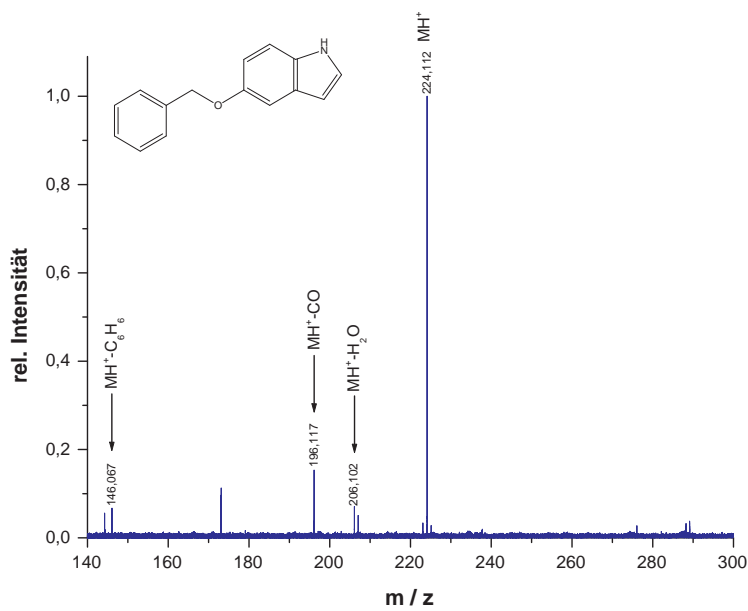


Abbildung A.99. – IRMPD-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol.

## A. Spektren

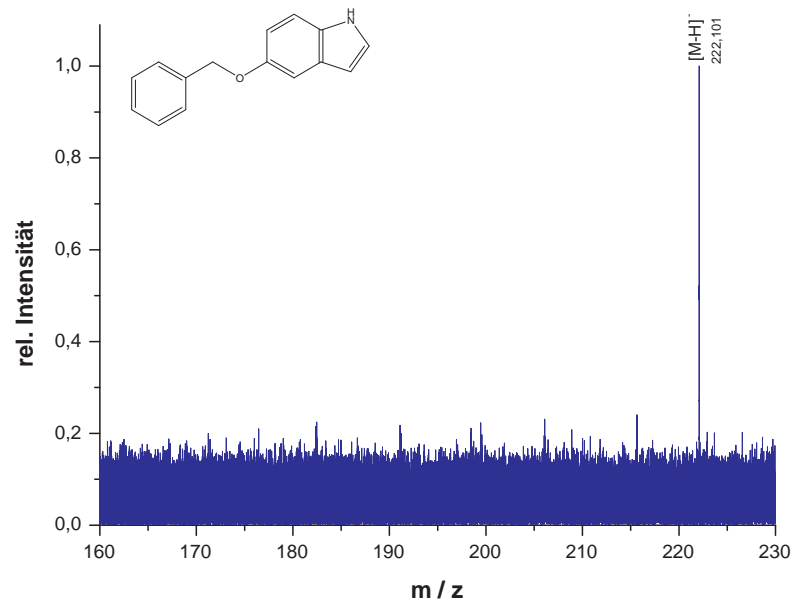


Abbildung A.100. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol nach neg. ESI.

### A.11.2. 5-Benzyloxy-6-methoxyindol (17)

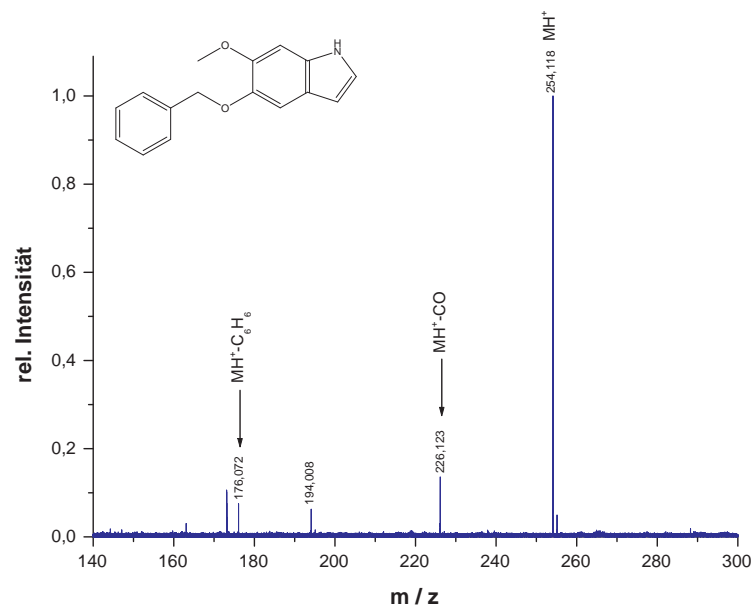


Abbildung A.101. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol.



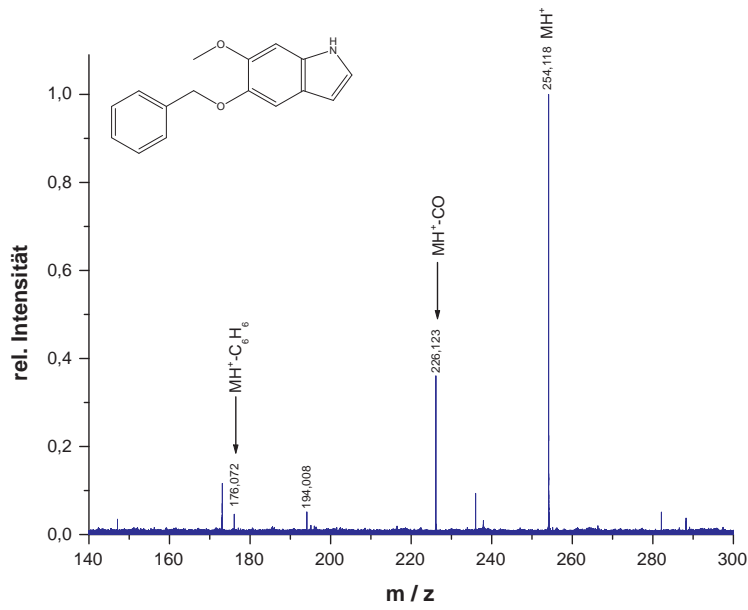


Abbildung A.102. – IRMPD-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol.

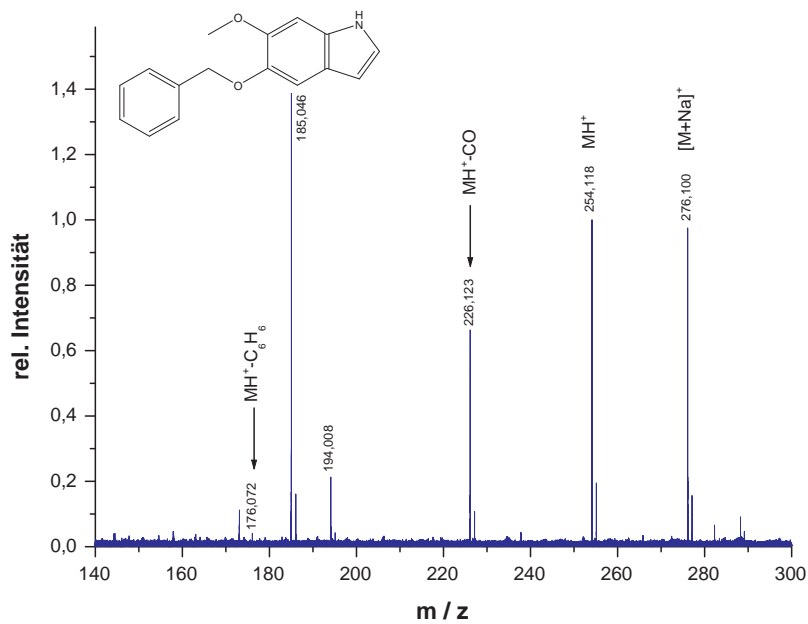


Abbildung A.103. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol inkl. Na-Addukt.

A. Spektren

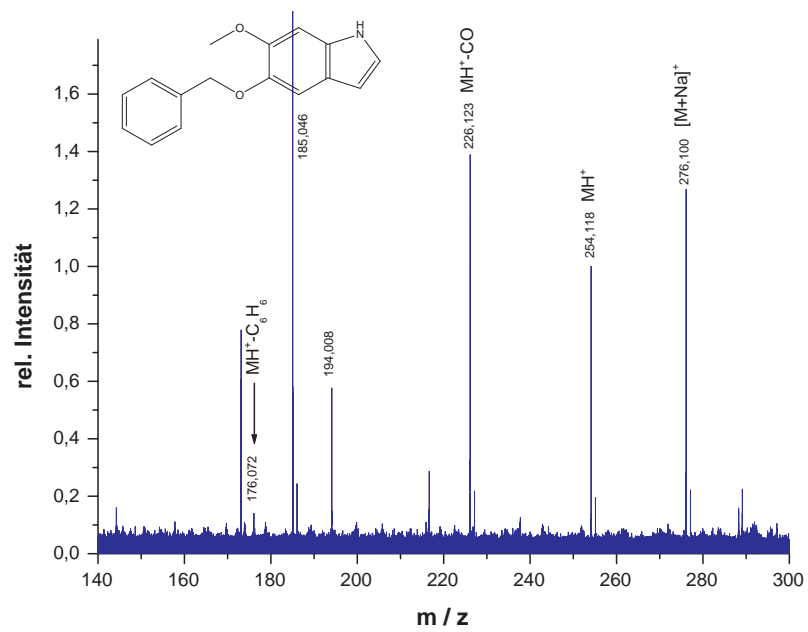


Abbildung A.104. – IRMPD-Spektrum vom 5-Benzyloxy-6-methoxyindol inkl. Na-Addukt.

## A.11.3. 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol (18)

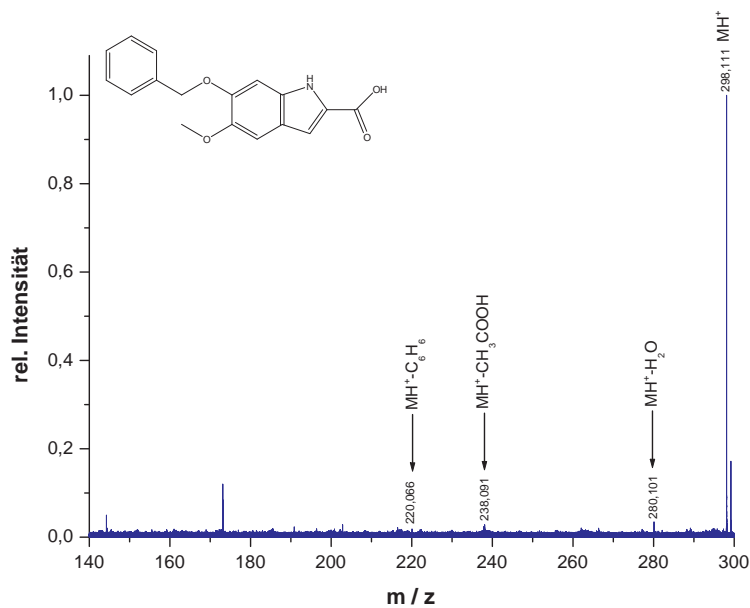


Abbildung A.105. – On-resonance-CID-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol.

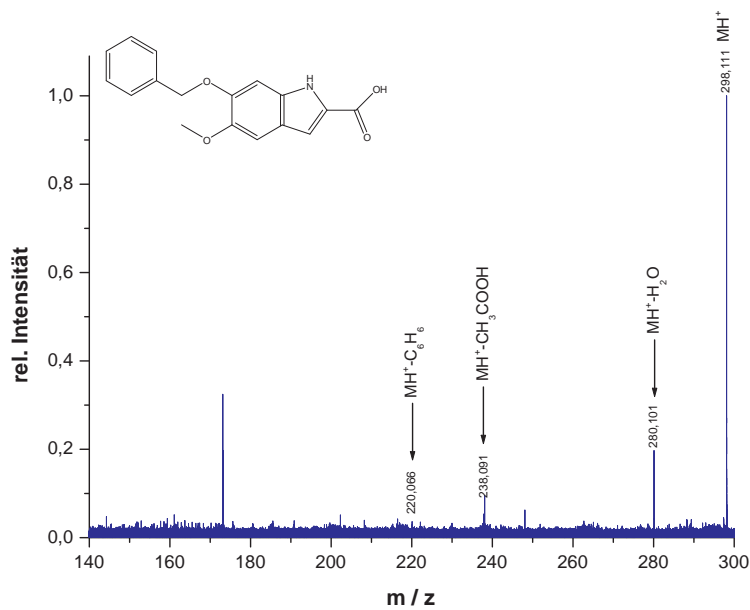


Abbildung A.106. – IRMPD-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol.

## A. Spektren

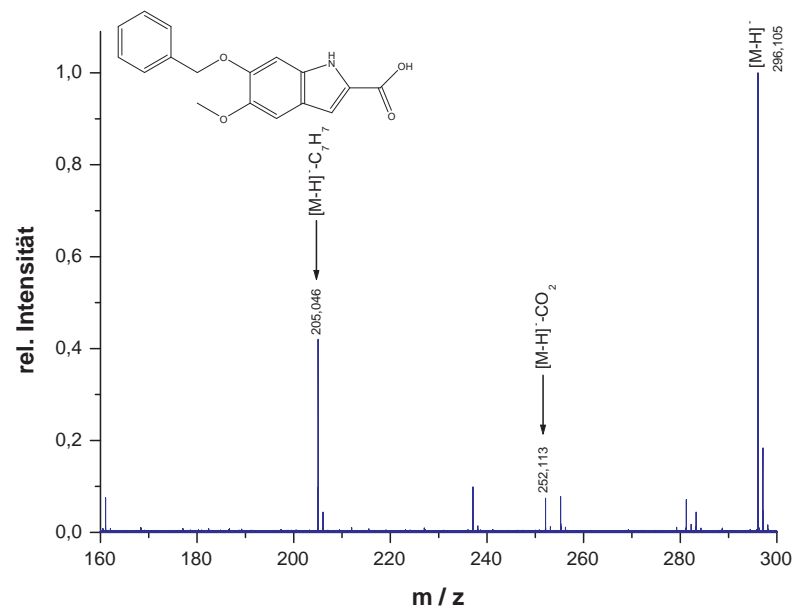


Abbildung A.107. – Übersichtsspektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol nach neg. ESI.

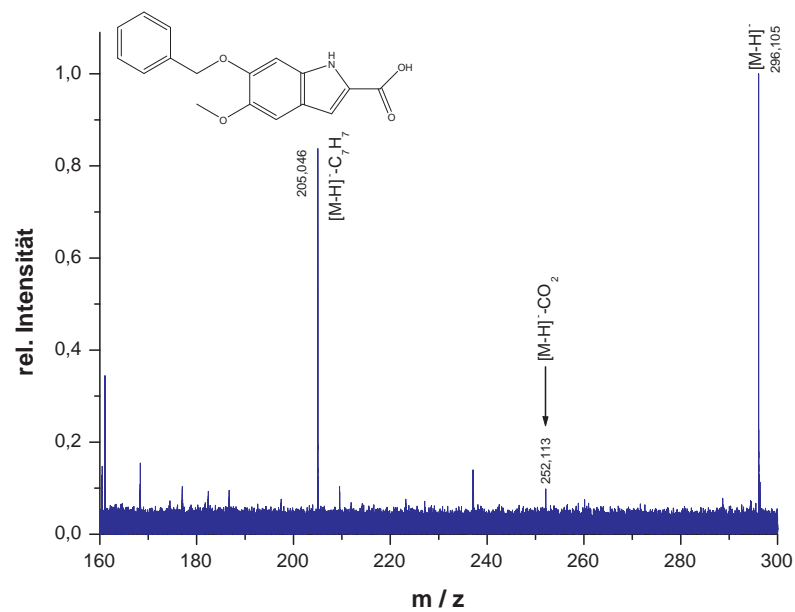


Abbildung A.108. – On-resonance-CID-Spektrum vom 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindol nach neg. ESI.

## A.11.4. 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure (19)

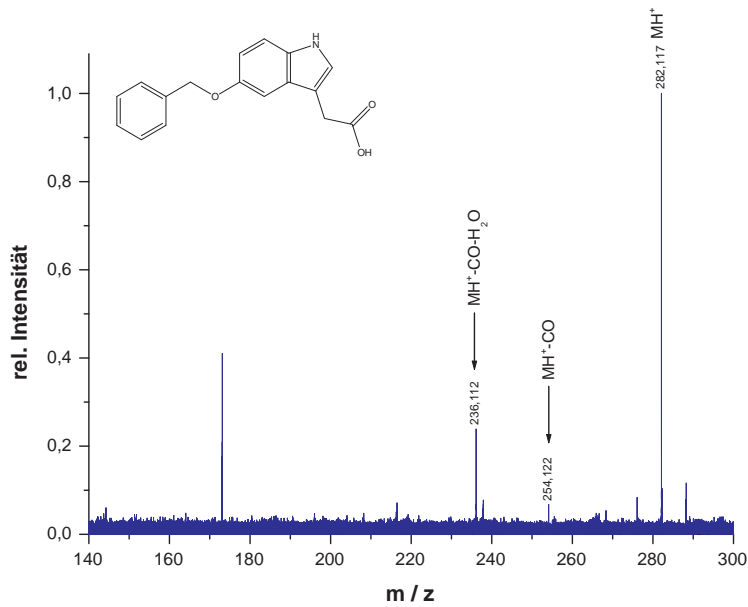


Abbildung A.109. – On-resonance-CID-Spektrum der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure.

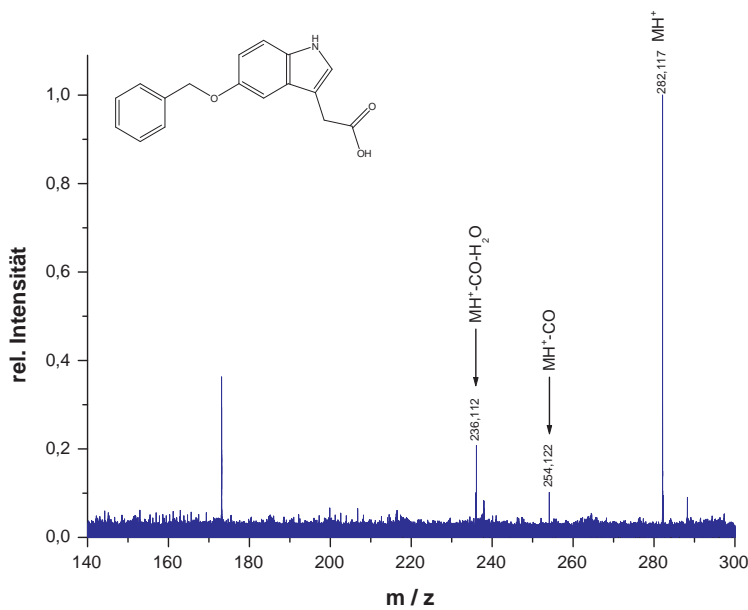


Abbildung A.110. – IRMPD-Spektrum der 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure.

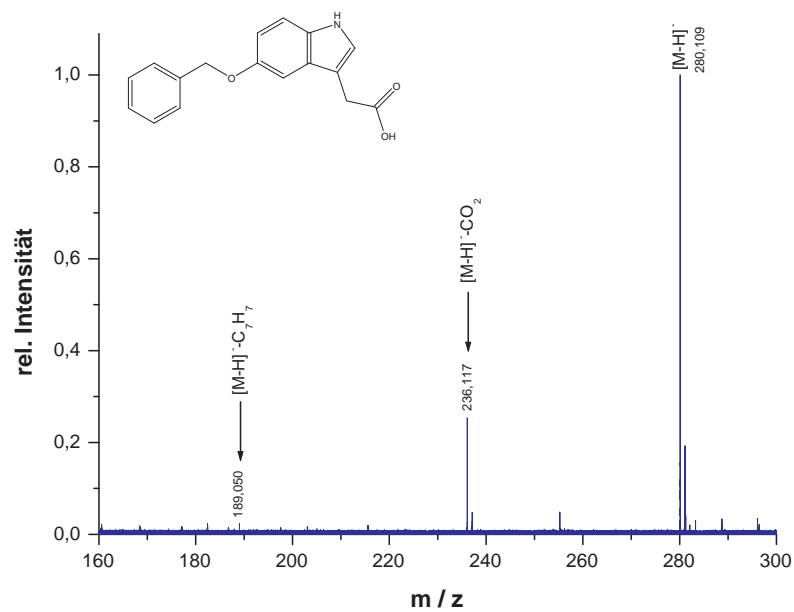


Abbildung A.111. – Übersichtsspektrum vom 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach neg. ESI.

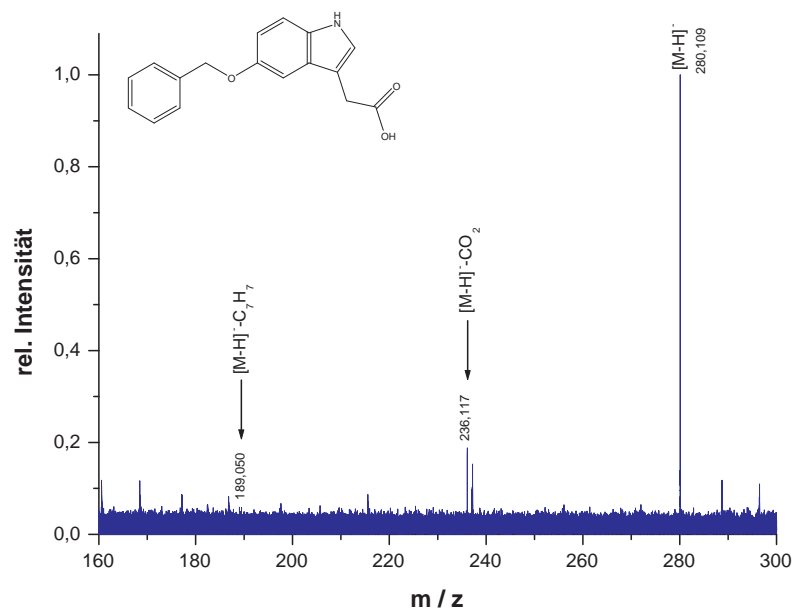


Abbildung A.112. – On-resonance-CID-Spektrum vom 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure nach neg. ESI.

# Literaturverzeichnis

- [1] A. Windaus, *Sterine als Ausgangsstoffe für Hormone, Vitamine und andre physiologisch wichtige Verbindungen*, Vandenhoeck und Ruprecht, Berlin, 1. Aufl., **1935**.
- [2] H. Wieland, M. Asano, *Liebigs Ann.* **1929**, *473*, 300.
- [3] E. Dane, *Die Naturwissenschaften* **1942**, *30*, 333.
- [4] L. James, *Nobel laureates in chemistry*, American Chemical Society and Chemical Heritage Foundation, **1993**.
- [5] D. Barton, *Cellular and molecular life sciences* **1950**, *6(8)*, 316.
- [6] O. Hassel, H. Kringstad, *Tidsskr. Kjemi Bergves.* **1930**, *10*, 128.
- [7] R. Gray, C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.* **1970**, *3*, 245.
- [8] C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 1341.
- [9] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel, Stuttgart, 3. Aufl., **1997**.
- [10] D. Onken, *Steroide - Zur Chemie und Anwendung*, Wissenschaftliche Taschenbücher, Akademie Verlag, Berlin, 1. Aufl., **1971**.
- [11] J. Fenn, *Biomolecular Techniques* **2002**, *13*, 101.
- [12] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
- [13] A. G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 331.
- [14] S. McLuckey, D. Cameron, R. G. Cooks, *J. Am. Soc. Chem.* **1981**, *103(6)*, 1313.
- [15] W. Hüchel, *Liebigs Ann. Chem.* **1925**, *441*, 1.
- [16] J. J. Thomson, *Philosophical Magazine* **1911**, *6*, 752.

- [17] W. Wien, *Ann. Physik u. Chemie* **1896**, 294, 669.
- [18] S. Borman, H. Russell, G. Siuzdak, *Today's chemists at work* **2003**, 9, 47.
- [19] W. Stephens, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 691.
- [20] W. C. Wiley, I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, 1150.
- [21] W. Paul, H. Steinwedel, *Z. Naturforsch* **1953**, 8(A), 448.
- [22] A. G. Marshall, M. Comisarow, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 25(2), 282.
- [23] A. G. Marshall, M. Comisarow, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26(4), 489.
- [24] J. Hipple, H. Sommer, H. Thomas, *Phys. Rev.* **1949**, 76, 1877.
- [25] J. Hipple, H. Sommer, H. Thomas, *Phys. Rev.* **1951**, 82, 697.
- [26] H. Budzikiewicz, *Massenspektrometrie - Eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, 4. Aufl., **1998**.
- [27] J. H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, Berlin Heidelberg, 1. Aufl., **2004**.
- [28] J. Barker, *Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry by Open Learning, Wiley and Sons, Chichester, 2. Aufl., **1998**.
- [29] H. Dehmelt, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 774.
- [30] W. Paul, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 780.
- [31] H. J. Hübschmann, *Handbuch der GC/MS - Grundlagen und Anwendungen*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [32] F. W. McLafferty, F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Aufl., **1995**.
- [33] I. Lüderwald, *Z. Anal. Chem.* **1977**, 285, 184.
- [34] D. Laude, C. Johlman, R. Brown, D. Weil, C. Wilkins, *Mass Spectrometry Reviews* **1986**, 5, 107.
- [35] M. Comisarow, *Hyperfine Interactions* **1993**, 81, 171.



- [36] A. G. Marshall, M. Comisarow, *Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 581.
- [37] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 1.
- [38] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *215*, 59.
- [39] M. Amad, N. Cech, G. Jackson, C. Enke, *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 784.
- [40] J. Zeleny, *Phys. Rev.* **1917**, *10*, 1.
- [41] G. Taylor, *Proc. Royal Soc. London A* **1964**, *280*, 383.
- [42] S. Chapman, *Phys. Rev.* **1937**, *52*, 184.
- [43] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, R. Ferguson, M. Alice, *J. Phys. Chem.* **1968**, *49*, 2240.
- [44] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, R. Ferguson, M. Alice, *Macromolecules* **1968**, *1*, 96.
- [45] L. Rayleigh, *London, Edinburg, Dublin Phil. Mag. Sci.* **1882**, *14*, 184.
- [46] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whithouse, *Science* **1989**, *246*, 64.
- [47] R. B. Dole (ed.), *ESI MS - Fundamentals, Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, Chichester, 1. Aufl., **1997**.
- [48] A. Kantrowitz, J. Grey, *Rev. Sci. Inst.* **1951**, *22*, 328.
- [49] M. Ikonomou, P. Kebarle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 791.
- [50] T. Covey, A. Bruins, J. Henion, *Org. Mass Spectrom.* **1988**, *23*, 178.
- [51] T. Covey, A. Bruins, J. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642.
- [52] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972A.
- [53] M. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1994**, *136*, 167.
- [54] A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids* **1994**, *6*, 404.
- [55] R. Cole, *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 763.
- [56] D. Duft, T. Achtzehn, R. Müller, B. Huber, T. Leisner, *Nature* **2003**, *421*, 128.

- [57] B. Winger, K. Light-Wahl, R. Ogorzalek-Loo, H. Udseth, R. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 536.
- [58] J. Iribarne, B. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287.
- [59] J. Iribarne, B. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4451.
- [60] J. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 524.
- [61] J. Fenn, J. Rosell, C. Meng, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 1147.
- [62] J. Loo, R. Loo, H. Udseth, C. Edmonds, R. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 101.
- [63] S. Chowdhury, V. Katta, B. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9012.
- [64] A. Miranker, C. Robinson, S. Radford, C. Dobson., *FASEB journal* **1996**, *10*(1), 93.
- [65] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 804.
- [66] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935.
- [67] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, *78*, 53.
- [68] K. Dreisewerd, *Chem. Rev.* **2003**, *226*, 189.
- [69] M. Glückmann, A. Pfenninger, R. Krüger, M. Thierolf, V. Horneffer, M. Karas, K. Strupat, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *210/211*, 121.
- [70] B. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 393.
- [71] P. Juhasz, C. Costello, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 343.
- [72] E. Lawrence, M. Livingston, *Phys. Rev.* **1932**, *40*, 19.
- [73] M. Comisarow, *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 4097.
- [74] P. Limbach, P. Grosshans, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 135.

- [75] A. G. Marshall, F. R. Verdun, *Fourier Transforms in NMR, Optical and Mass Spectrometry - A User's Handbook*, Elsevier, Amsterdam, 1. Aufl., **1990**.
- [76] A. G. Marshall, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 307.
- [77] M. Allemann, H. Kellerhans, K. Wanczek, *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *84*, 547.
- [78] M. Senko, J. Speir, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2801.
- [79] R. Cody, R. Burnier, B. Freiser, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 96.
- [80] T. Carlin, B. Freiser, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 571.
- [81] S. Guan, M. Wahl, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1363.
- [82] R. Cody, R. Burnier, B. Freiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7436.
- [83] S. Lee, C. Jiao, Y. Huang, B. Freiser, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 819.
- [84] A. G. Marshall, T. Wang, T. Ricca, *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *105*, 233.
- [85] K. Boering, J. Rolfe, J. Brauman, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 303.
- [86] J. Gauthier, T. Trautman, D. Jacobson, *Anal. Chim. Acta* **1991**, *246*, 211.
- [87] A. Heck, L. de Koning, F. Pinke, F. Nibbering, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 406.
- [88] C. Cassady, B. Freiser, D. Russell, *Org. Mass Spectrom* **1983**, *18*, 378.
- [89] R. Woodin, D. Bomse, J. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3248.
- [90] D. Little, J. Speir, M. Senko, P. O'Connor, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2809.
- [91] K. Hakansson, H. Cooper, M. Emmett, C. Costello, A. G. Marshall, C. Nilsson, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3605.
- [92] B. Budnik, R. Zubarev, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *316*, 19.
- [93] R. Cody, B. Freiser, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 547.
- [94] R. Cody, B. Freiser, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1056.

- [95] R. Zubarev, N. Kelleher, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Chem.* **1998**, *120*, 3265.
- [96] R. Zubarev, A. Zubarev, M. Savitski, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 753.
- [97] B. D. Nourse, R. G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* **1990**, *106*, 249.
- [98] T. Majumbar, F. Clairet, J.-C. Tabet, G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2897.
- [99] F. Wang, S. Ma, D. Zhang, R. G. Cooks, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 2988.
- [100] A. Castleman, R. Keesee, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15*.
- [101] S. Lias, J. Bartness, J. Liebman, J. Holmes, R. Levin, G. Mallard, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*(1).
- [102] J. B. Cummings, P. Kebarle, *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1.
- [103] S. Ingemann, R. Fokkens, N. Nibbering, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 607.
- [104] R. Wolf, H. F. Grützmacher, *New J. Chem.* **1990**, *14*, 379.
- [105] M. Fujio, Y. Tsuno, M. Mishima, *Chem. Lett.* **1990**, *12*, 2281.
- [106] M. Fujio, Y. Tsuno, M. Mishima, *Chem. Lett.* **1990**, *12*, 2277.
- [107] G. Paul, P. Kebarle, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 2070.
- [108] S. Glasstone, K. Laidler, H. Eyring, *The theory of rate processes*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1. Aufl., **1941**.
- [109] P. Robinson, K. Holbrook, *Unimolecular Reaction*, Wiley-Interscience, London, 1. Aufl., **1972**.
- [110] R. Squires, M. Schnute, S. Graul, *Int J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1990**, *96*, 181.
- [111] F. Greco, A. Liguori, G. Sindona, N. Uccella, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9092.
- [112] F. Greco, A. Liguori, G. Sindona, N. Uccella, *39th ASMS Annual conference on mass spectrometry and allied topics*, Nashville, TN, **1991**, pp. 1183–1184.
- [113] G. Bojesen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, (3), 244.

- [114] K. Isa, Y. Takeuchi, *Org. Mass. Spectrom* **1989**, *24*, 153.
- [115] D. Burinsky, E. Fukuda, J. Campana, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2770.
- [116] G. Puzo, J. Fournié, J. Promé, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 892.
- [117] G. Puzo, J. Fournié, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2287.
- [118] G. Puzo, J. Promé, J. Fournié, *Carbohydr. Res.* **1985**, *140*, 131.
- [119] M. Jarrold, J. Bower, J. Kraus, *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 3876.
- [120] Bruker Daltonics, Bremen, *apex-Qe User Manual*, **2007**.
- [121] J. Fuchser, *Fourier Transform Mass Spectrometry - A training course - FT-ICR MS APEX IV and APEX IV-Q*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, **2006**.
- [122] P. Caravatti, M. Allemann, *Organic Mass Spectrometry* **1991**, *26*, 514.
- [123] L. Fieser, M. Fieser, *Steroide*, Verlag Chemie, Weinheim, 1. Aufl., **1961**.
- [124] H. Christen, K. Freytag, *Chemie organischer Naturstoffe*, Studienbücher, Diesterweg, Frankfurt, 1. Aufl., **1974**.
- [125] W. Walter, W. Francke, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel, Stuttgart, 23. Aufl., **1998**.
- [126] T. Colburn, F. v. Saal, A. Soto, *Environ. health perspect.* **1993**, *101*, 378.
- [127] T. Colburn, D. Dumanowski, J. Myers, *Our stolen future*, Dutton/Penguin, New York, **1996**.
- [128] R. Marcus, S. Korenman, *Annu. Rev. Med.* **1976**, *27*, 357.
- [129] R. Scholler, L. Dehennin, *Pathol. Biol.* **1990**, *38*, 920.
- [130] H. Oepfinger, *Einige Umsetzungen in der Indol-Reihe*, Dissertation, TH München, **1926**.
- [131] R. Sundberg, *The chemistry of indoles*, Academic Press, New York, **1996**.
- [132] A. Baeyer, C. Knop, *Ann. Chem.* **1866**, *140*, 1.
- [133] E. Fischer, F. Jourdan, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16*, 2241.

- [134] T. Ueno, T. Honda, T. Jimbo, M. Kotani, *Chem. Abstr.* **1987**, *106*, 165.
- [135] H. Sato, M. Tsuzuki, *Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 734.
- [136] M. Tsuzuki, H. Sato, *Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 681.
- [137] K. Joshi, P. Chand, *Pharmazie* **1982**, *37*, 1.
- [138] E. Schneider, F. Wrightman, *Phytohormones and related compounds - a comprehensive treatise 1*, Elsevier, Amsterdam, **1978**.
- [139] N. Osborne (ed.), *Biology of serotonergic transmission*, Wiley, Chichester, **1982**.
- [140] I. Southon, J. Buckingham, *Dictionary of alkaloids*, Chapman and Hall, London, **1989**.
- [141] V. Betina, *Dev. Food Sci.* **1984**, *8*, 415.
- [142] C. Christophersen, *The Alkaloids* **1985**, *24*, 25.
- [143] T. Shen, C. Winter, *Adv. Drug. Res.* **1977**, *12*, 90.
- [144] W. Feniuk, P. Humphrey, *Drug Dev. Res.* **1992**, *26*, 235.
- [145] C. Freudenhammer, *Untersuchung von Umlagerungen und Fragmentierungen an Steroiden mittels Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2007**.
- [146] L. Claisen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 3157.
- [147] S. Valentine, J. Anderson, A. Ellington, D. Clemmer, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3891.
- [148] T. Covey, D. Douglas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 616.
- [149] P. Sullivan, J. Axelsson, S. Altmann, A. Quist, B. Sunquist, C. Reimann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 329.
- [150] R. Hudgins, J. Woenckhaus, M. Jarrold, *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes* **1997**, *165/166*, 497.
- [151] K. Shelimov, M. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2987.

- [152] U. Miraz, S. Cohen, B. Chait, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1.
- [153] J. LeBlanc, D. Beuchemin, K. Siu, R. Guevremont, S. Berman, *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 582.
- [154] A. R. M. Busman, H. Udseth, R. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 582.
- [155] O. K. Bates, G. Hazzard, G. Palmer, *Ind. Eng. Chem.* **1941**, *33*, 375.
- [156] V. Mayer, V. Swoboda, *Enthalpies of Vaporization of Organic Compounds: A Critical Review and Data Compilation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1. Aufl., **1985**.
- [157] S. Crotti, L. Stella, I. Munari, F. Massaccesi, L. Cotarca, M. Forcato, P. Traldi, *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1562.
- [158] E. Hunter, S. Lias, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1998**, *27*(3), 413.
- [159] B. Nogaj, E. Dulewicz, B. Brycki, A. Hrynio, P. Barczynski, Z. Dega-Szafran, M. Szafran, P. Koziol, A. Katritky, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1279.
- [160] R. Walder, J. Franklin, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1980**, *36*, 85.
- [161] M. Eberlin, T. Kotiaho, B. Shay, S. Yang, R. G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2457.
- [162] N. Tokay, C. Ögretir, *Journal of molecular structure* **2002**, *594*, 185.
- [163] M. Mormann, S. Bashir, P. Derrick, D. Kuck, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 544.
- [164] M. M.-N. (Mautner), *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2396.
- [165] P. Kebarle, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1979**, *28*, 445.
- [166] Calculated, using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02, ACD/Labs, **1994-2011**.
- [167] F. Turecek, J. S. Splitter, *Applications of Mass Spectrometry to Organic Stereochemistry*, VCH Publishers Inc., New York, 1. Aufl., **1993**.

- [168] P. Longevialle, R. Botter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, , 823.
- [169] P. Longevialle, R. Botter, *International Journal of Mass Spectrometry* **1983**, *47*, 179.
- [170] P. Longevialle, R. Botter, *Organic Mass Spectrometry* **1983**, *18*(1), 1.
- [171] R. Wolfschütz, H. Schwarz, W. Blum, W. J. Richter, *Org. Mass Spectrom.* **1978**, *13*, 697.
- [172] F. J. Winkler, F. W. McLafferty, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2971.
- [173] S. M. Hua, Y. Z. Chen, L. F. Liang, S. M. Xue, *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 719.
- [174] G. Thielking, U. Filges, H. F. Grützmacher, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 417.
- [175] A. Kukol, F. Strehle, G. Thielking, H. F. Grützmacher, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1107.
- [176] S. Dhanalekshimi, C. Venkatachalam, K. Balasubramanian, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, , 511.
- [177] D. Kirchhoff, H. F. Grützmacher, H. Grützmacher, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2006**, *12*, 171.
- [178] L. N. Heydorn, *Spontaneous and catalyzed hydrogen shifts in radical cations having a phosphoryl or carbonyl group: a tandem mass spectrometry and cbs-qb3 computational study*, Dissertation, McMaster Univ., Hamilton, ON, Canada, **2003**.
- [179] P. C. H. Eichinger, J. H. Bowie, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1988**, *2*, 497.
- [180] E. Kingston, J. Beynon, J. Liehr, J. Meyrant, R. Flammang, A. Maquestiau, *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 351.
- [181] E. Kingston, J. Beynon, A. Vandezonneville, R. Flammang, A. Maquestiau, *Org. Mass Spectrom.* **1988**, *23*, 437.
- [182] D. Ramada, M. Sudha, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 1121.



- [183] T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwortreaktionen der organischen Chemie*, Teubner Verlag, Wiesbaden, 4. Aufl., **2004**.
- [184] G. W. Wheland, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*(4), 900.
- [185] G. Horvath, G. Ambrus, *Advances in Mass Spectrometry* **1978**, *7B*, 1280.
- [186] K. Hartman, S. Lias, P. Ausloos, H. Rosenstock, S. Schroyer, C. Schmidt, D. Martinsen, G. Milne, *A compendium of gas-phase basicity and proton affinity measurements*, US Department of commerce, Washington, **1979**.
- [187] J. Gronowska, C. Paradisi, P. Traldi, U. Vettori, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 306.
- [188] E. J. Corey, *Chem. Soc. Rev.* **1988**, *17*, 111.
- [189] E. Takeshi, Y. Naoto, Production of 2-methylphenyl acetic acids, Japan patent 620539939, **1987**.
- [190] A. Cope, E. Hardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*(2), 441.
- [191] J. P. Joseph, J. Dusza, S. Bernstein, *Biochemistry* **1971**, *10*(15), 2941.
- [192] O. Schindler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*(212-213), 1955.
- [193] A. Streitwieser, L. Verbit, P. Stang, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3706.
- [194] A. F. Thomas, *Deuterium Labeling in Organic Chemistry*, Educational Division, Appleton Century Crofts, New York, **1974**.

# Publikationen und Poster

## 2011

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „Untersuchungen von Umlagerungen und Fragmentierungen in Steroidethern und Indolen mittels Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie“, **44. DGMS-Jahrestagung**, Dortmund.

## 2010

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: Rearrangement and fragmentation of estrogen ether ions: New aspects found with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2010**, 16(4), 489-501.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR Untersuchungen an Estrogenethern und Indolen - Umlagerungen und Fragmentierungen“, **43. DGMS-Jahrestagung**, Halle.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR investigation: Rearrangement and fragmentation reactions of different steroid and indole ethers“, **58<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, Salt Lake City.

## 2009

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR-Massenspektrometrie an Estrogenethern: Umlagerungen und Fragmentierungen“, **42. DGMS-Jahrestagung**, Konstanz.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR investigation: Rearrangement and fragmentation reactions of different steroid ethers“, **18<sup>th</sup> IMSC**, Bremen.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR investigation: Rearrangement and fragmentation reactions of different steroid ethers“, **57<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, Philadelphia.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR investigation: Rearrangement and fragmentation reactions of different estrogen ethers“, **Gordon Conference on Physical Organic Chemistry**, Holderness.

## **2008**

C. Freudenhammer, T. Muskat, J. Grotemeyer: „Untersuchung von Umlagerungen und Fragmentierungen an Steroiden mittels ICR-Massenspektrometrie“, **41. DGMS-Jahrestagung**, Gießen.

C. Freudenhammer, J. Grotemeyer: „ESI-ICR investigation or rearrangement and fragmentation reactions of different steroid ethers“, **56<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, Denver.



# Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Grotemeyer für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stets freundliche Betreuung dieser Arbeit und dafür, dass er mir den nötigen Freiraum für die Durchführung der Experimente gelassen hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Tassilo Muskat, der immer ein offenes Ohr hatte und bei Problemen sowie Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, gern auch in den allmittwöchlichen Abschlussrunden, und bei Heiko Bannick für die immer (un-?)freundliche ;- ) moralische Unterstützung dieser Arbeit und die Überbrückung der langen Bürozeiten. Andrea Hahn und Jonathan Peters sei gedankt für die netten Zeiten im Keller und vor dem Whiteboard.

Weiterhin allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern, insbesondere Uwe Eggers, Michael Karstens und Klaus Warns für die Unterstützung in den Bereichen Elektronik, Vakuum und Technik und für die nötige Konstanz in unserem wilden Arbeitskreishaufen, sowie den Teilnehmern der freitaglichen „Semesterrunde“ für die entsprechende Ablenkung beizeiten.

Und nicht zu vergessen sind die Menschen außerhalb des Instituts und der Universität, die stets geduldig waren und mich aufmunterten, wenn es nötig war, aber auch sehr flexible und spontane Kommens- und Gehenszeiten ertragen haben. Dazu gehören im speziellen meine Eltern, die sich zum Abschluss auch die Mühe gemacht haben, diese Arbeit Korrektur zu lesen, wobei nicht nur einige Tippfehler, sondern auch manch unverständliche Formulierungen beseitigt worden sind.



# Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01. März 2008 bis zum 17. Juni 2011 am Institut für Physikalische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer bearbeitet.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und ich dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sie ist dabei unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Diese Arbeit hat weder in Auszügen noch in ganzer Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Sie wurde in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht und auch nicht zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, den 17. Juni 2011

(Christoph Freudenhammer)

