

### 43. Gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchung von Vitamin-B<sub>6</sub>-Trimethylsilylderivaten

von W. Richter, M. Vecchi, W. Vetter und W. Walther

(12. XII. 66)

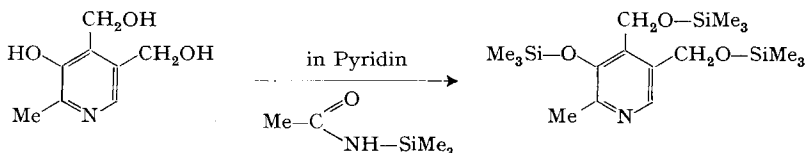
Für die quantitative Bestimmung des Pyridoxins (Vitamin B<sub>6</sub>, vgl. [1]) sind zahlreiche chemische und mikrobiologische Methoden bekannt, welche sich jedoch nur zum Teil für biologisches Material und Lösungen komplexer Zusammensetzung eignen. Wir haben deshalb geprüft, ob sich Pyridoxin mit der sehr stoffspezifischen Gas-Chromatographie bestimmen lässt. Ein weiterer Vorteil dieser Analysenmethode ist die hohe Nachweisempfindlichkeit und die Genauigkeit der quantitativen Auswertung.

Unsere verschiedenen Versuche, Pyridoxin und auch Pyridoxin-hydrochlorid gas-chromatographisch zu analysieren, lieferten durchwegs unbefriedigende Ergebnisse. Wie im weiteren gezeigt wird, lassen sich dagegen Pyridoxin und Pyridoxal in Form der einfach und rasch herstellbaren Trimethylsilylderivate mit diesem Verfahren einwandfrei bestimmen. Die Kontrolle der entsprechenden gas-chromatographischen Fraktionen erfolgte hauptsächlich mittels Massenspektrometrie. Letztere bestätigte in allen Fällen den erwarteten Silylierungsgrad und die jeweilige Struktur der Derivate. Im Falle des Pyridoxals lieferte das Massenspektrum starke Evidenz für das Vorliegen eines silylierten cyclischen Halbacetals, was durch Kernresonanz bestätigt wurde. Eine eingehendere Besprechung der Massenspektren erfolgt in Abschnitt II dieser Arbeit.

#### I. Herstellung und gas-chromatographische Analyse der Trimethylsilylderivate

**1. Trimethylsilyl-pyridoxin.** – *a) Herstellung des Silylätherderivates.* SWEELY *et al.* [2] zeigten, dass sich OH-Gruppen mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan als Katalysator veräthern lassen. BIRKHOFER & RITTER [3] verwendeten N-Trimethylsilyl-acetamid als Silylierungsmittel. Vergleichende Silylierungsversuche an Pyridoxin bzw. Pyridoxal lieferten für beide Methoden die gleichen Ergebnisse. Wir haben uns dieses letzteren Verfahrens bedient.

Die Silylierung von Pyridoxin [3] mittels N-Trimethylsilyl-acetamid verläuft folgendermassen:



Die Struktur des gebildeten Silyläthers wird unter II bewiesen.

*Ausführung:* Zu einer Lösung von 20 mg Pyridoxin-hydrochlorid und 18 mg *n*-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub> (interner Standard) in 10 ml abs. Pyridin gibt man 560 mg N-Trimethylsilyl-acetamid, schüttelt einige Min. kräftig und lässt 15 Min. stehen. Die Reaktionslösung kann nun analysiert werden.

Auch in anderen Lösungsmitteln, z. B. Dioxan und Aceton, erzielt man einen quantitativen Umsatz. Da jedoch Pyridoxin-hydrochlorid und auch Pyridoxal-hydrochlorid in diesen Lösungsmitteln schlecht löslich sind, muss man die Reaktionslösung so lange kräftig schütteln, bis sie klar geworden ist. Alsdann wird noch 15 Min. gewartet, ehe man analysiert.

Die Silyläther sind bekanntlich sehr feuchtigkeitsempfindlich, und es sind deshalb ähnliche Arbeitsbedingungen einzuhalten wie bei der Durchführung von GRIGNARD-Reaktionen. Es erwies sich als zweckmässig, die Silylierungen in kleinen braunen Serumflaschen auszuführen, die nach Zugabe aller Reagenzien sofort verschlossen wurden. Für die Probeentnahme durchsticht man jeweils das Septum mit der Injektionsspritze.

*Herkunft der Reagenzien:* Verwendet wurde Pyridin reinst der Firma MERCK; H<sub>2</sub>O-Gehalt (nach KARL FISCHER bestimmt): 0,05%.

N-Trimethylsilyl-acetamid wurde nach BIRKHOFFER [4] hergestellt.

b) *Bestimmung der optimalen Reaktionszeit der Silylätherbildung.* Zu diesem Zweck wurde bei einer Silylierung – wie unter 1 a) beschrieben – in verschiedenen Zeitabständen der Gehalt der Reaktionslösung an trisilyliertem Pyridoxin bestimmt (Ergebnisse s. Tab. 1).

Tabelle 1. *Bestimmung der Reaktionszeit für die Silylierung von Pyridoxin*

Reaktionszeit in Min.	V*	Reaktionszeit in Min.	V*
5	1,01	150	1,15
10	1,19	175	1,14
25	1,18	200	1,18
50	1,18	225	1,16
75	1,17	3 Tage später	1,18
100	1,17	3 Tage später	1,17
125	1,20	3 Tage später	1,19

$$V^* = \frac{\text{Pikfläche Trimethylsilyl-pyridoxin}}{\text{Pikfläche interner Standard (C}_{18}\text{H}_{38}\text{)}}$$

Aus Tabelle 1 geht eindeutig hervor, dass bei Zimmertemperatur eine Reaktionszeit von 15–20 Minuten ausreicht.

c) *Bestimmung der nötigen Menge Silylierungsmittel.* Eine etwas unangenehme Nebenerscheinung bei routinemässiger gas-chromatographischer Untersuchung von Silyläthern ist die relativ rasche Verschmutzung des Detektors durch die sich abscheidenden, nicht brennbaren Siliciumverbindungen. Aus diesem Grunde bestimmten wir die Mindestmenge Silylierungsmittel, die zu einem Umsatz mit möglichst grosser und reproduzierbarer Ausbeute führt.

Zu diesem Zwecke lösten wir 200 mg Pyridoxin-hydrochlorid und 180 mg *n*-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub> (als interner Standard) in 200 ml abs. Pyridin; 8 Ansätze von je 20 ml wurden mit steigenden Mengen Trimethylsilyl-acetamid versetzt und nach 30 Min. Reaktion untersucht (s. Tab. 2).

Tabelle 2. *Bestimmung der für eine quantitative Silylierung von Pyridoxin notwendigen Menge N-Trimethylsilyl-acetamid*

(20 mg Pyridoxin-HCl + 18 mg *n*-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub> in 20 ml Pyridin pro Ansatz)

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
MeCONHSi(Me) <sub>3</sub> in mg	47	94	188	282	356	470	564	705
Einges./ber. Menge	1,2	2,4	4,8	7,2	9,1	12,1	14,5	18,1
Fläche B <sub>0</sub> /Fläche C <sub>18</sub>	0,0	0,0	0,27	0,93	1,09	1,17	1,15	1,18

Wie ersichtlich, sollte unbedingt ein 12–15facher Überschuss an Silylierungsmittel verwendet werden.

d) *Gas-Chromatographie*. Ein unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen ausgeführtes Chromatogramm zeigt Fig. 1.

Ausgeführt wurden die Analysen mit einem Gas-Chromatographen AEROGRAF, Modell 200, unter den folgenden Bedingungen: Detektor: Flammenionisation. – Temperatur: a) Einspritzblock: 240°C; b) Trennsäule: 150° (bei SE-30-Kolonne), 115° (bei XE-60-Kolonne), 130° (bei Carbowax 20 M). – Säule/Säulendimension: Glas; 2 m; 2,2 mm  $\varnothing$ . – Trägergas: Helium; Gasfluss: 40 ml/Min. – Stationäre Phase: 5% Silicon E-301 oder 10% Silicon XE-60 oder 5% Carbowax 20 M. – Trägermaterial: Gaschrom Q, 80–100 mesh. – Einspritzmenge: 2  $\mu$ l.

Bei Serienanalysen von Silylderivaten lässt sich eine relativ rasche Verschmutzung des Detektors nicht vermeiden. Das Entfernen der sich abscheidenden Siliciumverbindungen erfolgt zweckmässig durch einstündiges Einlegen in ein Ultraschallbad, das eine Mischung von gleichen Teilen Äthanol, Chloroform und Aceton enthält.

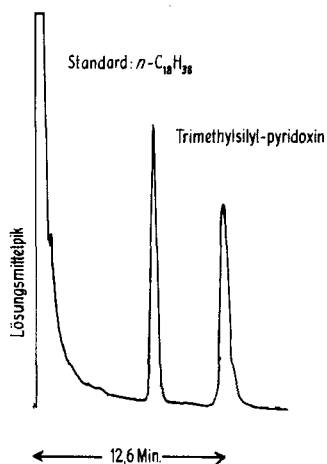


Fig. 1. Gas-Chromatogramm von Trimethylsilyl-pyridoxin auf einer 10% Silicon E 301 Säule. Interner Standard:  $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ .

e) *Reproduzierbarkeit der Analysenmethode*. Um dies zu prüfen, wurde die Reaktionslösung von Versuch Nr. 8 zehnmal analysiert. Die erhaltenen Verhältnisse der Pikflächen von Vitamin B<sub>6</sub> und vom Standard zueinander sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Reproduzierbarkeitsprüfung der gas-chromatographischen Bestimmung von Trimethylsilyl-pyridoxin  
(interner Standard:  $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ )

Analysen-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$V^a)$	1,19	1,18	1,18	1,17	1,17	1,20	1,15	1,14	1,18	1,16

Näherungsstandardabweichung nach DEAN & DIXON [5]  $S_w = 0,02$

Vertrauensbereich  $\Delta\bar{x}$  bei einer Doppelbestimmung und Voraussetzung von 95% statistischer Sicherheit: 0,03, d.h. 1,8%

a)  $V$  = Pikfläche Trimethylsilyl-pyridoxal/Pikfläche interner Standard

Die Reproduzierbarkeit ist gut. Die Streuungen der Einzelmessungen liegen in einer Größenordnung, die eine Zersetzung während der gas-chromatographischen Analyse ausschliesst. Analoge Versuche auf den polaren stationären Phasen Silicon XE 60 und Carbowax 20 M ergaben ebenfalls eine sehr gute Reproduzierbarkeit.

f) *Linearität der Detektorangaben.* Sie wurde wie folgt festgestellt: Vier Silylierungsansätze mit verschiedenen Mengen Pyridoxin, jedoch gleicher Menge Standard, wurden wie vorher beschrieben ausgeführt und jeweils nach 30 Min. Reaktion analysiert (Ergebnisse s. Fig. 2; die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen).

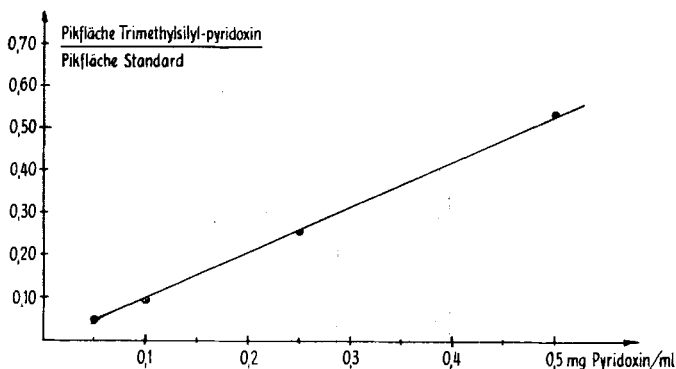
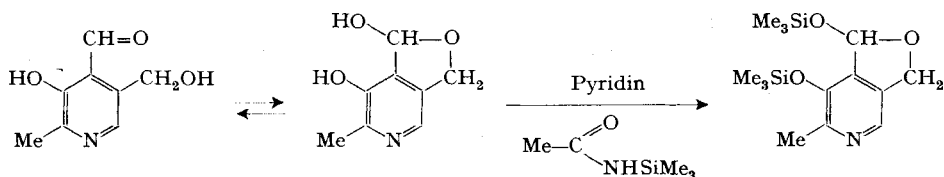


Fig. 2. Linearitätsprüfung des Detektors für Trimethylsilyl-pyridoxin.

Dieses Ergebnis beweist gleichzeitig, dass die Silylierung unter den gewählten Versuchsbedingungen quantitativ verläuft.

g) *Bestimmungsgrenze für Pyridoxin (in Form seines Silyläthers).* Es zeigte sich, dass  $8 \times 10^{-9}$  g Pyridoxin unter den gewählten Versuchsbedingungen noch gut quantitativ nachgewiesen werden können.

**2. Trimethylsilyl-pyridoxal.** – a) *Herstellung.* Die Umsetzung von Pyridoxal mit N-Trimethylsilyl-acetamid verläuft wie folgt:



Die Struktur des gebildeten Silylderivates konnte mit Hilfe des PMR.-Spektrums und des Massenspektrums (s. Abschnitt II) als Silylderivat des Halbacetals festgelegt werden.

Um allen Schwierigkeiten, die durch die extreme hydrolytische Empfindlichkeit der Trimethylsilylderivate entstehen können, aus dem Wege zu gehen, wurde auf eine Isolierung des Reaktionsproduktes verzichtet und von einer Probe des Reaktionsgemisches direkt das PMR.-Spektrum (VARIAN A-60, in Aceton- $d_6$ , Tetramethylsilan als interner Standard) aufgenommen.

Folgende Signale können dem Trimethylsilyl-pyridoxal zugeordnet werden: 0,30 ppm, 9 H, s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ; 0,43 ppm, 9 H, s,  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ ; 2,43 ppm, 3 H, s, arom.  $\text{CH}_3$ ; 4,99 und 5,18 ppm, 2 H, *AB*-Spektrum mit *J* ca. 13 Hz (*B*-Teil mit weiteren, nicht aufgelösten Kopplungen),  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ; 6,52 ppm, 1 H, *d*, *J* ca. 1 Hz  $-\text{O}-\text{CH}-\text{O}$  (Kopplung mit  $\text{H}_\text{B}$  bei 5,18 ppm); 8,12 ppm, 1 H, s, arom. H.

*Ausführung der Silylierung:* Zu einer Lösung von 20 mg Pyridoxal-hydrochlorid und 12 mg Hexadecan (als interner Standard) in 10 ml abs. Pyridin gibt man 390 mg N-Trimethylsilyl-acetamid, schüttelt einige Min. und lässt die Lösung 15 Min. stehen. Dann wird die Gas-Chromatographie wie folgt ausgeführt:

*Gas-Chromatographie:* Gerät: AEROGRAPH, Mod. 200. – Detektor: Flammenionisation. – Empfindlichkeit:  $1/8-1/32$ . – Temperatur: a) Säule: 153°C; b) Einspritzblock: 260°. – Säule/Säulendimension: Glas; 2 m; 2,3 mm  $\varnothing$ . – Trägergas: Helium; Gasfluss: 40 ml/Min. – Stationäre Phase: 5% Silicon SE-30. – Trägermaterial: Gaschrom Q; 80–100 mesh. – Papiervorschub: 20"/h. – Eingespritzte Menge: 2  $\mu\text{l}$ ; Verdünnungsmittel: Pyridin.

Ein unter diesen Bedingungen erhaltenes Gas-Chromatogramm zeigt Fig. 3.

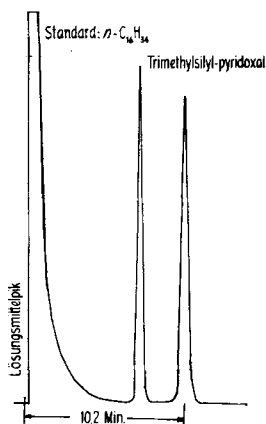


Fig. 3. Gas-Chromatogramm von Trimethylsilyl-pyridoxal auf einer Silicon E 301 Säule.  
Interner Standard,  $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ .

b) *Prüfung des Silylierungsverfahrens auf Zeitbedarf und Reproduzierbarkeit.* Zu diesem Zwecke wurde wie oben beschrieben eine Silylierung angesetzt und die Lösung in verschiedenen Zeitabständen analysiert (Ergebnisse s. Tab. 4).

Tabelle 4. *Bestimmung der Reaktionszeit für die Silylierung von Pyridoxal und Reproduzierbarkeitsprüfung der Analysen des silylierten Pyridoxals*

Reaktionszeit (Min.)	10	20	40	55	70	85	100	115	130
<i>V</i> <sup>a)</sup>	1,24	1,41	1,43	1,41	1,39	1,40	1,39	1,42	1,40

Näherungsstandardabweichung nach DEAN & DIXON [5]  $S_w = 0,01$

Vertrauensbereich  $\Delta\bar{x}$  bei einer Doppelbestimmung und Voraussetzung von 95% statistischer Sicherheit: 0,016, d. h. 1,2%

$$^a) V = \frac{\text{Pikfläche Trimethylsilyl-pyridoxal}}{\text{Pikfläche interner Standard (C}_{16}\text{H}_{34}\text{)}}$$

Die Silylierungsreaktion erreicht schon nach 15–20 Minuten ihren Endpunkt, und die Resultate sind sehr gut reproduzierbar. Es ergibt sich ein Vertrauensbereich von 1,2% bei Ausführung einer Doppelbestimmung und der Voraussetzung von 95% statistischer Sicherheit.

c) *Prüfung der Methode auf Linearität.* Zu diesem Zweck wurden 3 Ansätze mit verschiedenen Mengen Pyridoxal, jedoch gleicher Menge internem Standard, angesetzt und analysiert (Ergebnisse s. Fig. 4; die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus je 3 Einzelbestimmungen). Das Resultat beweist, dass der Umsatz tatsächlich quantitativ verläuft.

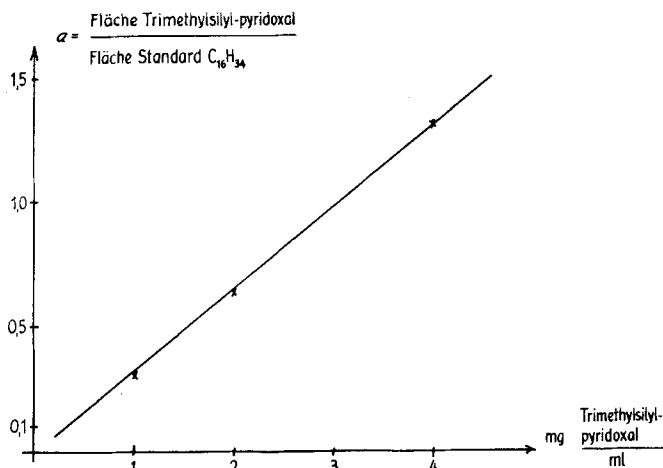


Fig. 4. Linearitätsprüfung des Detektors für Trimethylsilyl-pyridoxal.

## II. Massenspektrometrische Untersuchung der Trimethylsilyl-Derivate

Um die Strukturen und damit den Silylierungsgrad der Pyridoxinderivate festzulegen, wurden sie massenspektrometrisch untersucht<sup>1)</sup>. Dabei zeigte sich, dass die gas-chromatographischen Fraktionen unter strengem Feuchtigkeitsausschluss kondensiert und anschliessend sofort im Massenspektrometer untersucht werden müssen, um die Bildung hydrolytischer Artefakte zu verhindern. Der Einsatz einer direkten Kopplung Gas-Chromatograph/Massenspektrometer, die Manipulationen mit gereinigtem, empfindlichem Probengut erübrigt, liegt nahe und ist für ähnliche Anwendungen in Vorbereitung.

1. *Trimethylsilyl-pyridoxin.* Das Massenspektrum des Silylderivates (s. Fig. 5) ergibt ein Fragmentierungsbild, das mit der erwarteten Struktur eines vollständig silylierten Pyridoxins in Einklang ist. Wir beschränken uns auf die Diskussion der wichtigsten Fragmente und Zerfallsvorgänge, soweit sie für die angegebene Struktur im besonderen und für ähnliche aromatische Poly-trimethylsilylderivate im allgemeinen charakteristisch sind.

<sup>1)</sup> Zur Aufnahme der Massenspektren und Bestimmung der Summenformeln einzelner Fragmente Molekulargewichte diente ein MS-9-Gerät der Firma AEI, Manchester (Direkteinlass, Ionisierungsspannung 10 eV, Ionenquellentemperatur 260°C). Wir danken Herrn P. MEYER für die Ausführung dieser Messungen.

Ein Molekelion-Pik bei  $m/e$  385 ist vorhanden, besitzt jedoch so geringe Intensität (0,01% des Basispiks), dass er nicht in Fig. 5 aufscheint. Dasselbe gilt für einen gleichfalls sehr schwachen ( $M + 1$ )-Pik bei  $m/e$  386. Die geringe Intensität des Molekelion-Piks ist keineswegs überraschend, da von Trimethylsilyläthern anderer Verbindungen [6] bekannt ist, dass sie zu starker Fragmentierung neigen und somit häufig nur Molekelion-Signale verschwindender Intensität liefern. Demgegenüber weisen Pyridoxin selbst und ähnliche Vertreter dieser Verbindungsklasse stets intensive Pike bei den Massenzahlen der entsprechenden Molekelionen auf [7].

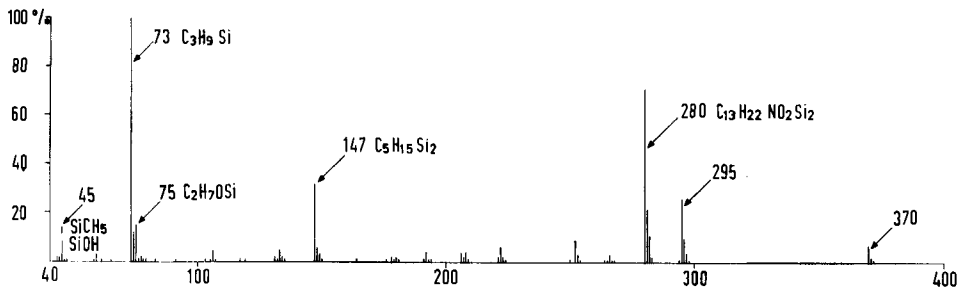


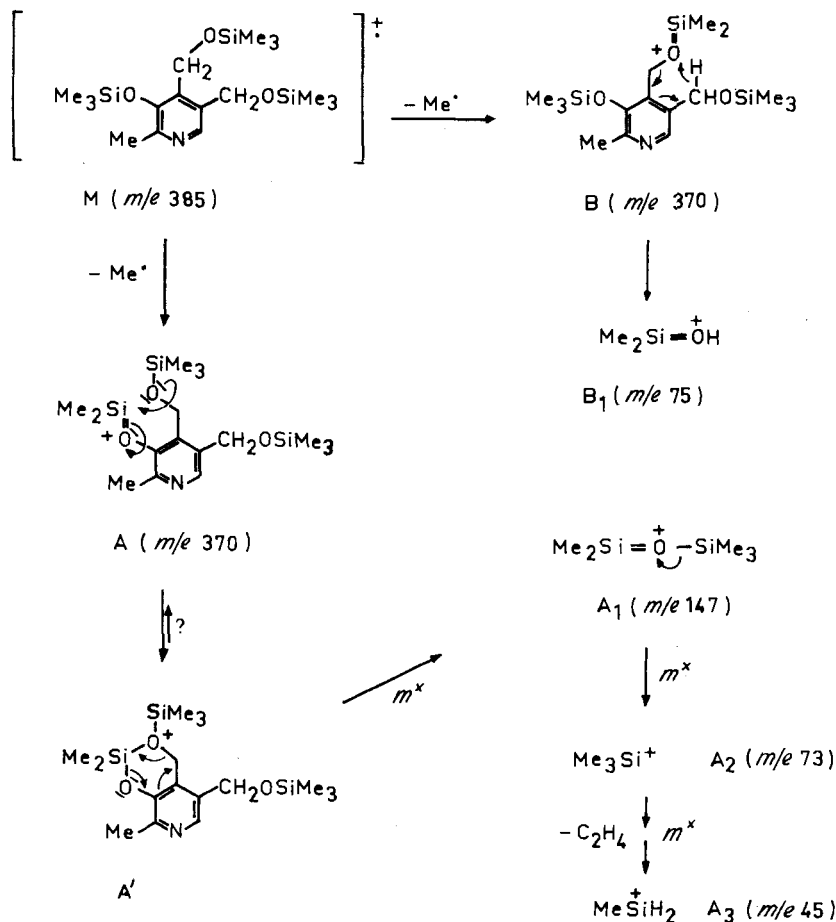
Fig. 5. Massenspektrum von Trimethylsilyl-pyridoxin.

Der gleichfalls bekannte Verlust eines  $\text{CH}_3$ -Radikals aus Trimethylsilylresten [6] führt im vorliegenden Fall zum ersten intensiven Pik des oberen Massenbereichs bei  $m/e$  370. Ob dabei eine bevorzugte Abspaltung aus einer bestimmten Silylgruppe auftritt, geht aus den vorliegenden Daten nicht hervor, womit die Formulierung zweier isomerer ( $M-15$ )-Fragmente **A** und **B** im Schema 1 willkürlich ist.

Struktur **B** ist nur eine von 2 möglichen Varianten, die eine plausible Formulierung der Entstehung des  $\text{C}_2\text{H}_7\text{OSi}$ -Ions (**B**<sub>1</sub>,  $m/e$  75) gestatten, denn der analoge Prozess, der am Silylrest in Stellung 5 abläuft, würde zum gleichen Bruttoergebnis führen. Ein metastabiler Pik, der einen spezifisch vom ( $M-15$ )-Fragment ausgehenden Übergang in Ion **B**<sub>1</sub> bestätigen würde, ist nicht vorhanden, tritt aber bei einfacheren aliphatischen und alicyclischen Modellen wie Cetyl- und Cyclohexyl-trimethylsilyläther<sup>2)</sup> deutlich hervor. Allerdings gehören, im Gegensatz zum Pyridoxinderivat, die Fragmente  $M-15$  und  $m/e$  75 zu den weitaus intensivsten Piken in den Spektren dieser Verbindungen. Die in Schema 1 formulierte Reaktion kann als Spezialfall des formalen Alkenverlustes aus den  $\alpha$ -Spaltprodukten aliphatischer Äther (Ionen mit Oxonium-Grenzstruktur wie **B**) aufgefasst werden. Eine Olefin-Eliminierung mit synchroner Übertragung eines H-Atoms in einem cyclischen Übergangszustand war bisher die bevorzugte Schreibweise für diese Umlagerungsreaktion [8], für welche DJERASSI & FENSELAU [9] unlängst zeigten, dass zumindest hinsichtlich der Stellung des übertragenen H-Atoms ein komplexerer Ablauf stattfindet als bisher angenommen.

Ein metastabiler Pik ( $m/e$  58,5) existiert jedoch für den Zerfall von ( $M-15$ )-Fragmenten in ein Ion  $m/e$  147, ein Prozess, der sich leicht am Isomeren **A** formulieren

<sup>2)</sup> Nicht publizierte Ergebnisse. Den Herren Dr. J. P. VUILLEUMIER und K. KAISER, F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., Basel, danken wir für Proben dieser Verbindungen.



Fragmentierungsschema 1: Trimethylsilyl-pyridoxin.

lässt. Die Bestimmung seiner Masse ergibt als dessen Elementarzusammensetzung  $C_5H_{16}OSi_2$ . Diese Summenformel weist auf eine Verknüpfung zweier zunächst nicht unmittelbar verbundener Silylreste unter Ausstossung des gesamten «aromatischen» Molekelteils, d. h. auf einen Expulsions-Reaktionstyp, hin. Ein synchroner Ablauf der beiden Reaktionsschritte Verknüpfung/Elimination ( $A \rightarrow A_1$ ) kann nicht ausgeschlossen werden, und die in Schema 1 vorgezogene stufenweise Formulierung der Einzelakte soll lediglich bedeuten, dass ein cyclisches Ion  $A'$  als echtes Zwischenprodukt denkbar ist. Die unmittelbare Nachbarschaft des stabilisierenden Donoratoms sowie die bekannte Tendenz des Siliciumatoms, durch Polymerisation der Ausbildung von Doppelbindungen auszuweichen, sollten dabei die Verkettung der Substituenten durch eine «neue» Bindung begünstigen. Die in der Folge den Sechsring von Fragment  $A'$  abbauende Cycloeliminierungsreaktion entspricht formal einer Retro-DIELS/ALDER-Spaltung und liefert eine zwanglose Deutung sowohl der Genese wie auch der Struktur des Ions  $A_1$ .

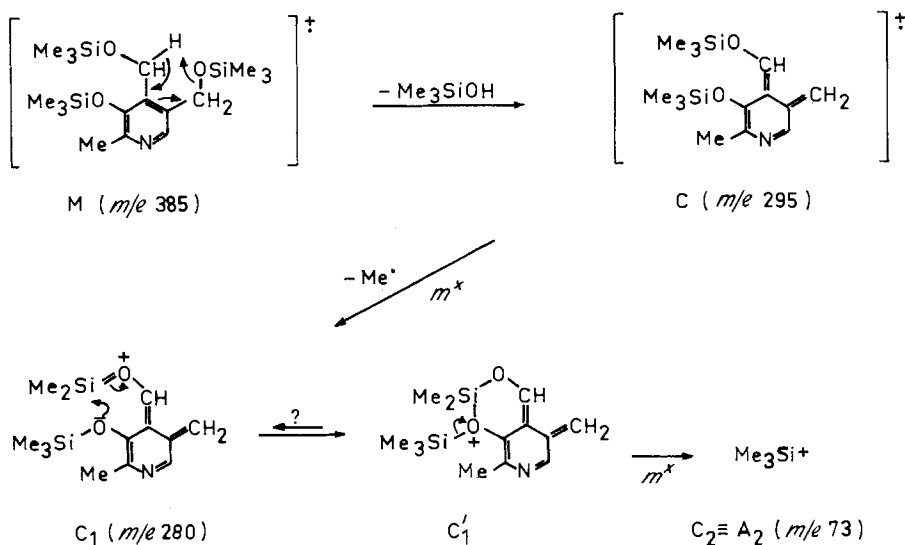


Das Auftreten cyclischer Onium-Ionen ist bereits mehrfach sowohl zur Erklärung erhöhter Stabilität als auch spezieller Reaktivität entsprechender Zwischenprodukte vorgeschlagen worden. Fälle für Stabilitätserhöhung finden sich zum Beispiel in den cyclischen Bromonium-Ionen, die zur Interpretation des Zerfalls langkettiger aliphatischer Alkylbromide gefordert wurden [10]. Für den Fall von cyclischen Zwischenstufen spezieller Reaktivität kann das als Piperidinium-Ion formulierte «Amin-Fragment» des Lysin-äthylesters als Beispiel gelten, das zur Deutung der Eliminierung des N( $\alpha$ )-Atoms als Ammoniak angenommen wurde [11].

Ion  $A_1$  ( $m/e$  147) zerfällt, wie man erwarten kann, in einer heterolytischen Spaltreaktion weiter. Das resultierende Folgeprodukt besitzt die Masse 73 und ist das Ion  $A_2$ , ein für Trimethylsilylderivate triviales Bruchstück. Metastabile Pike bestätigen sowohl die Herkunft aus  $m/e$  147 ( $m^* = 36,3$ ) wie auch den weiteren Zerfall in  $CH_5Si$  ( $m/e$  45,  $m^* = 27,8$ ). Der letzte Vorgang, nämlich die Abspaltung von Äthylen aus dem Trimethylsilyl-Ion, ist mechanistisch undurchsichtig und erfordert ein beträchtliches Ausmass an Umgruppierung von Atomen. Andererseits besitzt dieser Zerfall eine auffällige Parallele in der Fragmentierung des *t*-Butyl-Kations im Falle des Neopentans und ähnlicher Verbindungen. Um den Äthylenverlust desselben und die Ergebnisse der Isotopenverteilung bei Markierung mit  $^{13}C$  zu rationalisieren, haben GRUBB & MEYERSON [12] Zwischenprodukte wie methylierte Cyclopropan-Ionen in Betracht gezogen.

Eine Untersuchung des  $m/e$ -45-Piks bei hoher Auflösung zeigt, dass ein Dublett  $CH_5Si/SiOH$  vorliegt, in welchem die zweite Komponente überwiegt (siehe Fig. 5). Über die Herkunft und die Struktur dieses Ions gibt das Spektrum keinen Aufschluss.

Vom Molekelion  $M^+$  ausgehend, lässt sich eine weitere Reihe von Zerfällen feststellen, deren Zuordnung und Zusammenfassung in Schema 2 zu einer eigenen Serie wiederum durch die Gegenwart entsprechender metastabiler Pike vorgegeben ist.



Fragmentierungsschema 2: Trimethylsilyl-pyridoxin.

Zunächst entspricht ein Fragment  $m/e$  295 dem Verlust von Trimethylsilanol vom Molekelion. Dieser Prozess führt bei Trimethylsilyläthern im allgemeinen nicht zu intensiven Piken [6], sollte jedoch an *ortho*-substituierten Benzylsystemen mit aktivierten, leicht übertragbaren Wasserstoffatomen wie im vorliegenden Fall begünstigt sein. Die in Schema 2 wiedergegebene 6-zentrig H-Übertragung mit Ausbildung einer orthochinoiden Struktur für das Fragment-Ion **C** ist das Gegenstück zum entsprechenden Verlust einer Wassermolekel aus dem Pyridoxin-Molekelion [7].

Fragment **C** kann als Radikal-Ion leicht eine Methylgruppe verlieren, wie ein starker metastabiler Pik bei  $m^* = 265,7$  anzeigt. Für die Cyclisierung des dabei resultierenden Ions **C**<sub>1</sub> zu einem Zwischenprodukt **C**<sub>1</sub>' gilt das bereits für das ähnliche Ion **A'** Gesagte. Ein einfacher heterolytischer Abbruch des cyclisierten Molekelteils vom Silylrest liefert schliesslich, wie durch  $m^* = 19,1$  bestätigt, das bereits erwähnte Trimethylsilyl-Ion auch auf diesem Zerfallsweg.

2. *Trimethylsilyl-pyridoxal*. Das Vorliegen einer cyclischen Acetalstruktur zeigt sich in der auffälligen Verschiedenheit des Massenspektrums (Fig. 6) im Vergleich zum Spektrum des Pyridoxin-Silylderivates.

Das Molekelion wird durch einen überraschend intensiven Pik  $m/e$  311 angezeigt. Der krasse Intensitätsunterschied dieses Piks gegenüber dem Molekelion-Pik des Pyridoxinderivates wird offenbar vor allem dadurch bedingt, dass die Abspaltung von  $\text{Me}_3\text{SiOH}$ , die im Pyridoxin-Derivat besonders stark vorherrscht, hier aus sterischen Gründen zurückgedrängt ist.

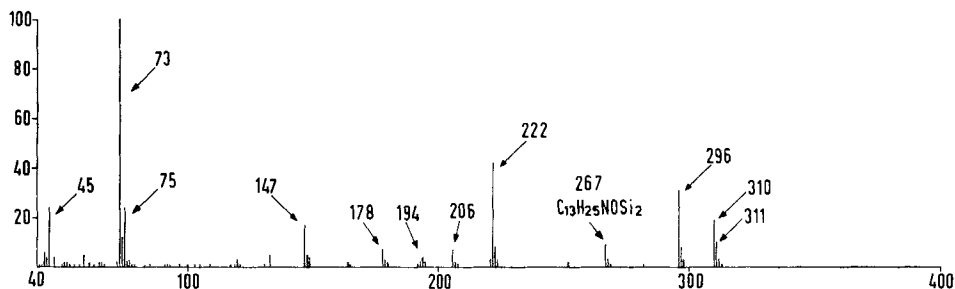
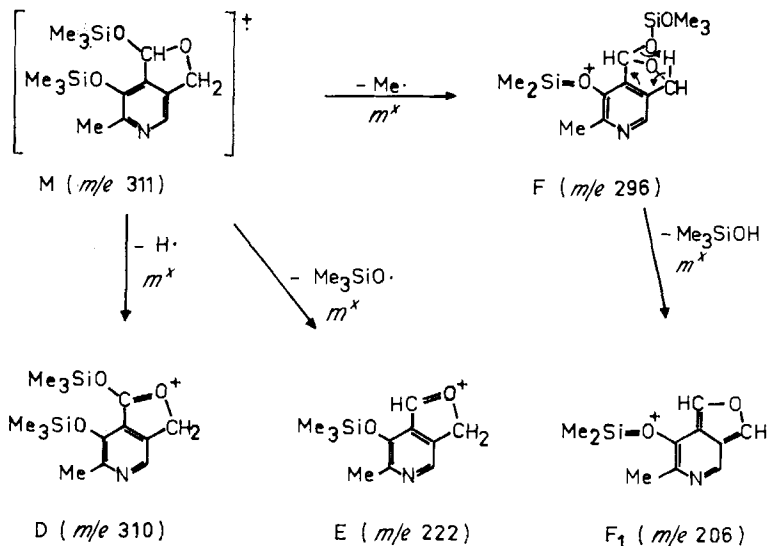


Fig. 6. Massenspektrum von Trimethylsilyl-pyridoxal.

Die beiden Pike bei  $m/e$  310 und  $m/e$  222 sind typische Acetalfragmente: Das Ion mit der Masse 310 (**D**) entsteht mit grosser Wahrscheinlichkeit durch Abspaltung des Acetal-Wasserstoffs, das Ion 222 (**E**) durch Verlust des am selben Kohlenstoffatom gebundenen Trimethylsilyloxy-Restes. Die dabei gebildeten Bruchstücke **D** und **E** sind resonanzstabilisiert, wodurch die hohe Intensität der entsprechenden Pike verständlich wird (Schema 3).

Der Verlust einer Methylgruppe führt zu einem Pik bei  $m/e$  296 (Ion **F**). Durch Eliminierung von Trimethylsilanol bildet sich daraus ein weiteres Bruchstück der Masse 206 (**F**<sub>1</sub>), wie ein metastabiler Pik bei  $m/e$  143,4 anzeigt. Die Interpretation dieser Zerfallsstufe ist vielleicht insofern fragwürdig, als die Reaktion an einem Fragment-Ion erfolgt, das keinen Radikalcharakter mehr besitzt und dessen positives Reaktionszentrum am Oxonium-Sauerstoff fern vom Reaktionsort lokalisiert ist

(Schema 3 – Ion F). Die relativ geringe Intensität dieses Piks ist – wie eingangs erwähnt – wohl wiederum auf sterische Hinderung der 6-Zenter-Reaktion durch die Sauerstoffbrücke zurückzuführen.

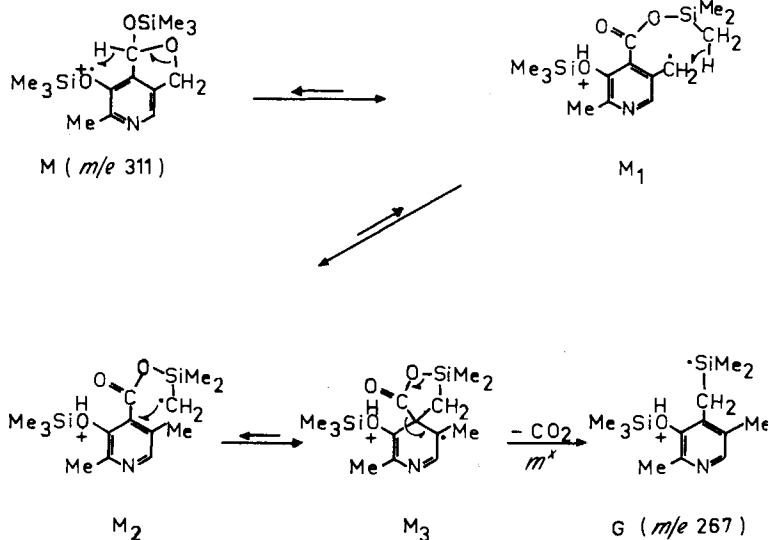


*Fragmentierungsschema 3: Trimethylsilyl-pyridoxal.*

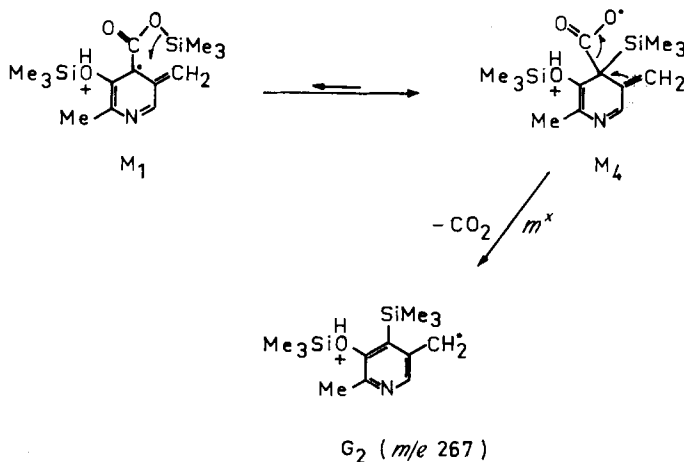
Der Pik bei  $m/e$  267 entspricht dem Verlust von  $CO_2$  aus dem Molekelion, was aus der Bestimmung der genauen Masse (Elementarzusammensetzung  $C_{13}H_{25}ONSi_2$ ) und der Gegenwart eines metastabilen Piks für diesen Übergang ( $m/e = 229,2$ ) hervorgeht. Für diesen Verlust kann nur eine Ausstossung des Acetal-Kohlenstoffatoms mit den beiden benachbarten O-Atomen in Frage kommen. Die in Schema 4 und 5 formulierten Alternativen geben zwei Reaktionsfolgen wieder, die zu dem in Frage stehenden Ion führen könnten. Der erste Schritt, die Umlagerung eines H-Atoms vom Acetal-Kohlenstoff zum Sauerstoff der phenolischen Silyl-Äthergruppe, ist beiden gemeinsam und könnte durch die besondere Natur dieses H-Atoms oder auch die vielleicht synchrone Bildung des Benzylradikals begünstigt sein. Die Öffnung des cyclischen Acetals würde zur Ausbildung einer Trimethylsilyl-Estergruppe führen, die die ausstossende  $CO_2$ -Molekel bereits vorgebildet enthält.

Die nun erforderliche Bindung des Silylrestes an den Kern könnte z. B. so erfolgen, dass durch H-Transfer das radikalische Zentrum zunächst auf die Trimethylsilylgruppe übertragen wird (Schema 4). Als Folgereaktionen wären nun der Angriff desselben auf den Aromaten (Analogie zum Primärschritt einer radikalischen Substitution) und anschliessende  $CO_2$ -Abspaltung durch doppelten Abbruch plausibel. Dabei würde im zweiten Schritt das aromatische System des Pyridinrings regeneriert.

Die andere Alternative (Schema 5), die nicht der Abstraktion eines primären Wasserstoffatoms als endothermen Schritt bedarf, ist eine direkte Silylwanderung in die  $p$ -Stellung des Pyridinringes, wofür eine entsprechende Grenzstruktur des Benzylradikals zur Verfügung steht. Der  $CO_2$ -Verlust wäre auch hier eine denkbare Konsequenz.



Fragmentierungsschema 4: Trimethylsilyl-pyridoxal.



Fragmentierungsschema 5: Trimethylsilyl-pyridoxal.

Die Ausstossung von  $CO_2$  findet eine gewisse Parallele in dem von TEETER [13] beobachteten  $CO_2$ -Verlust aus den (M-15)-Fragmenten aromatischer Carbonsäure-trimethylsilylester. In diesen Fällen und im Gegensatz zum vorliegenden muss allerdings statt einer radikalischen Reaktion ein Angriff der positiv geladenen Siliciumatoms nach Art einer elektrophilen Substitutionsreaktion angenommen werden.

Beide Interpretationsvorschläge verlangen eine Fixierung des Ladungszentrums am protonierten O-Atom der phenolischen Silyläthergruppe, wo es unbeteiligt am weiteren Reaktionsgeschehen verbleibt. Über die relative Geschwindigkeit der Reaktionschritte und die mögliche Gleichzeitigkeit einzelner Akte lassen sich kaum Ver-

mutungen anstellen. Für etwaige weitere Umlagerungsreaktionen zur Erhöhung der Stabilität der Ionen **G** und **G<sub>2</sub>** ergibt sich gleichfalls kein Anhaltspunkt.

Die Deutung der schwächeren Pike bei *m/e* 194 und 178 erscheint in Abwesenheit von Daten geeignet markierter Verbindungen problematisch, während die restlichen Pike von Bedeutung, wie *m/e* 147, 75, 73 und 45, bereits im Spektrum des Trimethylsilyl-pyridoxins auftreten und somit ähnlich wie dort gedeutet werden können (Schemata 1 und 2).

Die vorangehenden Diskussionen der wichtigen Bruchstücke und Zerfallsvorgänge zeigen, dass die Massenspektren der untersuchten Derivate das Vorliegen von vollständig silylierten Pyridoxin- bzw. Pyridoxalhalbacetal-Strukturen bestätigen. Die Ergebnisse sollten darüber hinaus für die Analyse weiterer Polyhydroxyverbindungen, die vielfach erst nach Silylierung gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht werden können, von Nutzen sein.

#### SUMMARY

Pyridoxine and pyridoxal are suitable for gas-chromatographic analysis after conversion into their trimethylsilyl derivatives. Silylation proceeds rapidly and quantitatively, pyridoxal reacting in its hemiacetal form. The mass spectra of both derivatives are discussed.

Abteilung für Physik und physikalische Chemie der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG, Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. KNOBLOCH, «Vitamine, Arzneimittelanalyse, Nahrungsmittelanalyse» in «Vitaminanalysen», E. MERCK AG, Darmstadt 1963.
  - [2] C. C. SWEeley, R. BENTLEY, M. MAKITA & W. W. WELLS, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).
  - [3] L. BIRKHOFFER & A. RITTER, *Angew. Chem.* **77**, 414 (1965).
  - [4] L. BIRKHOFFER, *Chem. Ber.* **96**, 1473 (1963).
  - [5] R. B. DEAN & W. J. DIXON, *Analyt. Chemistry* **23**, 636 (1951).
  - [6] A. G. SHARKEY, JR., R. A. FRIEDEL & S. H. LANGER, *Analyt. Chemistry* **29**, 770 (1957).
  - [7] D. C. DEJONGH, S. C. PERRICONE & W. KORYTNIK, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 1233 (1966).
  - [8] F. McLAFFERTY, *Analyt. Chemistry* **29**, 1782 (1957).
  - [9] C. DJERASSI & C. FENSELAU, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 5747 (1965).
  - [10] F. McLAFFERTY, *Analyt. Chemistry* **34**, 2 (1962).
  - [11] K. BIEMANN in F. McLAFFERTY, «Mass Spectrometry of Organic Ions», Academic Press, New York und London 1963, p. 550; A. L. BURLINGAME, Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, p. 16.
  - [12] H. M. GRUBB & S. MEYERSON in F. McLAFFERTY, «Mass Spectrometry of Organic Ions», Academic Press, New York und London 1963, p. 517.
  - [13] R. M. TEETER, Abstracts, ASTM Committee E-14 Mass Spectrometry Conference, New Orleans, La., Juni 1962, p. 51.
-