

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. LITT & M. SZWARC, J. Polymer Sci. *42*, 159 (1960).  
 [2] D. C. PEPPER, European Polymer J. *1*, 41 (1965).  
 [3] E. PASCUAL, Diss. ETH Zürich, Prom. Nr. 3742 (1965).  
 [4] C. S. MARVEL & G. E. HARTZELL, J. Amer. chem. Soc. *81*, 448 (1959).  
 [5] D. N. BHATTACHARYYA, C. L. LEE, J. SMID & M. SZWARC, J. physic. Chemistry *69*, 612 (1965);  
 W. K. R. BARNIKOL & G. V. SCHULZ, Makromol. Chem. *86*, 298 (1965).  
 [6] J. E. LEFFLER, J. org. Chemistry *20*, 1202 (1955).  
 [7] C. G. OVERBERGER, J. E. MULVANEY & A. M. SCHILLER, Encycl. Polymer Sci. Technol. *2*, 120 (1964).  
 [8] T. ALFREY JR. & L. J. YOUNG, High Polymers, XVIII: Copolymerisation, Interscience, New York 1964, S. 75.  
 [9] M. G. EVANS, J. GERGELY & E. C. SEAMAN, J. Polymer Sci. *3*, 866 (1948).  
 [10] H. LÜSSI, Chimia *20*, 379 (1966).  
 [11] J. E. HOFMANN, P. A. ARGABRIGHT & A. SCHRIESHEIM, Tetrahedron Letters *17*, 1005 (1964).  
 [12] H. LÜSSI & J. BARMAN, Helv. *50*, 1229 (1967).  
 [13] W. KERN, D. BRAUN & M. HERNER, Makromol. Chem. *28*, 66 (1958).  
 [14] F. IBRAHIM, J. Polymer Sci. *A 3*, 469 (1965).  
 [15] E. H. FARMER & C. G. MOORE, J. chem. Soc. *1951*, 139.

## 126. Gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchung der Trimethylsilyläther von Vitamin A und einigen seiner Isomeren

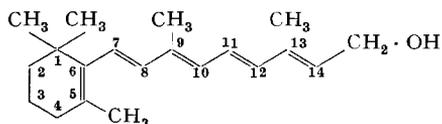
von M. Vecchi<sup>1)</sup>, W. Vetter<sup>1)</sup>, W. Walther<sup>1)</sup>, S. F. Jermstad<sup>2)</sup> und G. W. Schutt<sup>2)</sup>

(20. IV. 67)

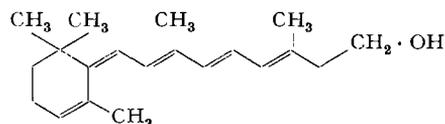
In den letzten Jahren konnte eine grosse Anzahl schwer verdampfbarer Substanzen durch Umwandlung in geeignete Derivate der gas-chromatographischen Analyse zugänglich gemacht werden. Insbesondere sind es die erstmals von SWEELEY *et al.* [1] eingeführten Trimethylsilyläther-Derivate, mit denen überraschende Ergebnisse erzielt werden konnten.

Da es bis heute nicht gelungen ist, die Gas-Chromatographie zur Analyse von Vitamin A zu verwenden, prüften wir die Möglichkeit, Vitamin A und seine Isomeren in Form ihrer Trimethylsilyl(TrMS)-äther gas-chromatographisch zu analysieren.

Folgende Verbindungen wurden in Form ihrer TrMS-Derivate untersucht: a) all-*trans*-Vitamin A (I); b) 13-*cis*-Vitamin A (II); c) 11,13-di-*cis*-Vitamin A (III); d) *retro*-Vitamin A (IV).



I



IV

<sup>1)</sup> Abteilung für Physik und physikalische Chemie der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel.

<sup>2)</sup> Technical Development Department of HOFFMANN-LA ROCHE INC., Nutley, New Jersey.

*Herstellung der Silylderivate.* Es zeigte sich, dass nach der Vorschrift von SWEeley [1] wohl reproduzierbare Analysenergebnisse für kleine Vitamin-A-Konzentrationen erzielt werden konnten, dass jedoch die Silylierung nicht quantitativ verläuft. Wird z. B. eine 2proz. Lösung von all-*trans*-Vitamin A nach SWEeley silyliert und anschliessend gas-chromatographisch analysiert, so erhält man dabei durchwegs um 40–50% kleinere Pike, als wenn dieselbe Vitamin-A-Probe nach einer Methode silyliert wird, die wir für die gas-chromatographische Bestimmung von Vitamin C [2] und Vitamin B<sub>6</sub> [3] ausgearbeitet hatten. Wir setzten dabei N-Trimethylsilyl-acetamid ein, das erstmals von BIRKHOFFER und Mitarbeiter [4] als Silylierungsmittel verwendet wurde. Nachträglich durchgeführte Versuche zeigten, dass Vitamin A auch mit Hexamethyldisilazan quantitativ silyliert werden kann, wenn nicht die von SWEeley in seiner Vorschrift angegebene Menge Silylierungsmittel, sondern das 20fache davon eingesetzt wird.

Alle eingesetzten Verbindungen wurden in unserer Firma synthetisiert. Die Identität der einzelnen Verbindungen ist durch PMR.-Spektren und Massenspektren belegt.

Ca. 2proz. Lösungen der trimethylsilylierten Verbindungen wurden wie folgt hergestellt:

a) Aus Vitaminen A: 3 ml mit Stickstoff begastes Pyridin werden in eine Serumflasche eingefüllt und mit 380 mg N-Trimethylsilylacetamid (15facher molarer Überschuss) versetzt. Hierauf wird die erforderliche Menge Vitamin A (54 mg) schnell abgewogen und ebenfalls beigefügt. Als dann wird die Flasche mit reinstem Stickstoff begast und verschlossen. Für die Probeentnahme durchsticht man jeweils das Septum mit der Injektionsspritze.

b) Aus acetylierten Vitaminen A: Zu einer Suspension von 45 mg O-Acetyl Vitamin-A in 4 ml Äthanol gibt man 1 g KOH gelöst in 6 ml 86proz. Äthanol und rührt gut durch. Nach dem Begasen des Kölbchens mit Stickstoff lässt man die Lösung 1 Std. stehen. Hierauf gibt man 50 ml H<sub>2</sub>O zu, schüttelt 2mal mit je 20 ml Hexan aus, engt die Hexan-Lösung auf wenige ml ein und fügt ihr dann das Silylierungsmittel zu.

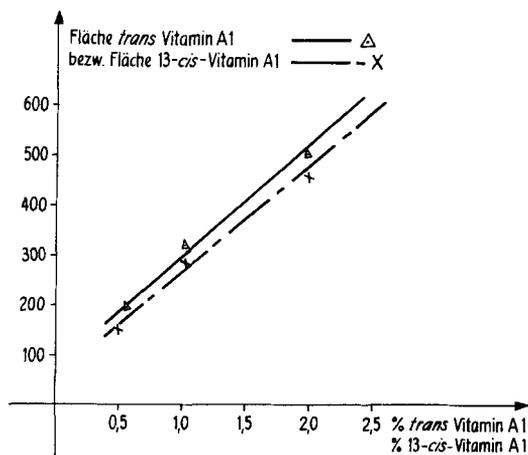


Fig. 1. Linearitätstest

Die erhaltenen Pikflächen sind als Funktion der Konzentration von *trans*-Vitamin A bzw. 13-*cis*-Vitamin A aufgetragen

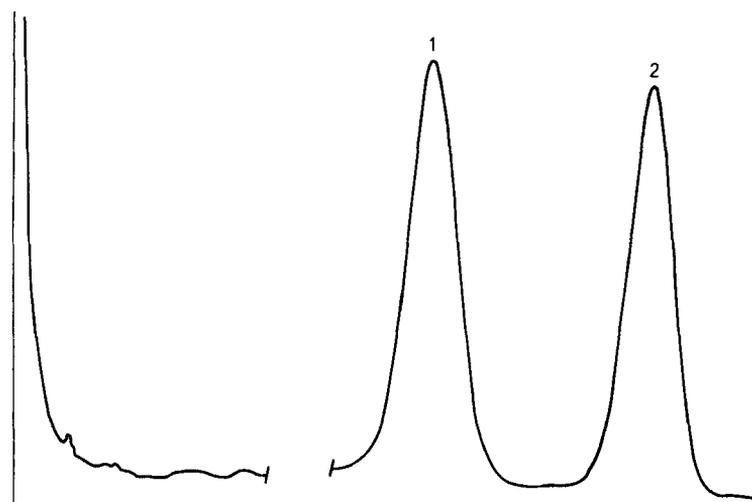


Fig. 2. Gas-Chromatogramm der Trimethylsilylderivate von 13-cis-Vitamin A (Pik 1) und all trans Vitamin A (Pik 2)

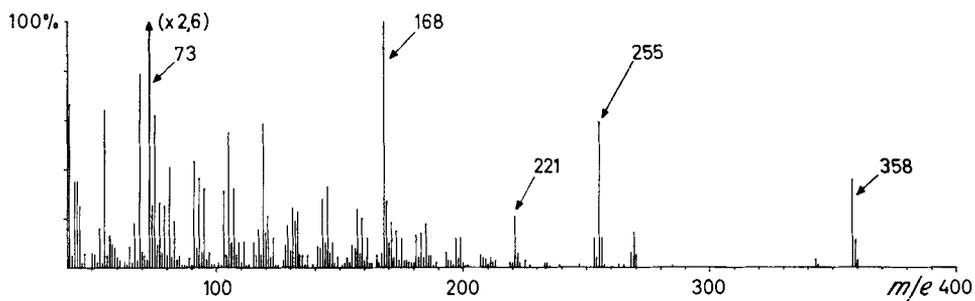


Fig. 3. Massenspektrum von Trimethylsilyl-all-trans-vitamin-A

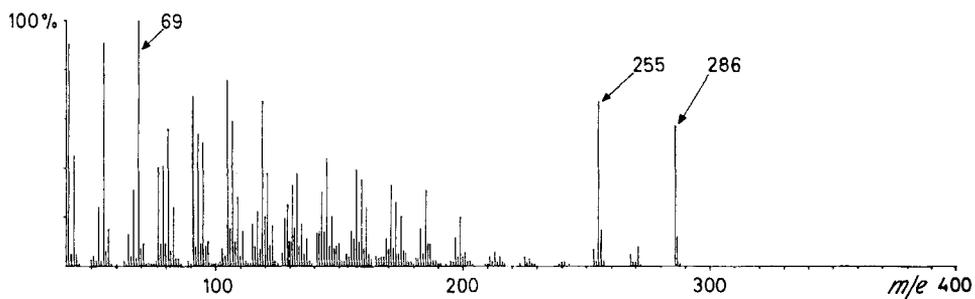


Fig. 4. Massenspektrum von all-trans-Vitamin A

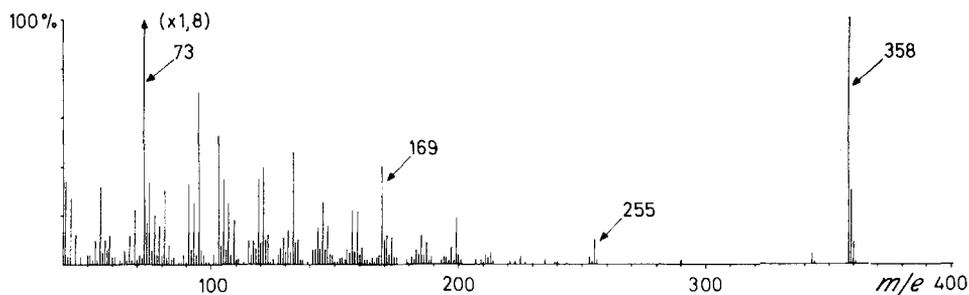


Fig. 5. Massenspektrum von Trimethylsilyl-retro-vitamin-A

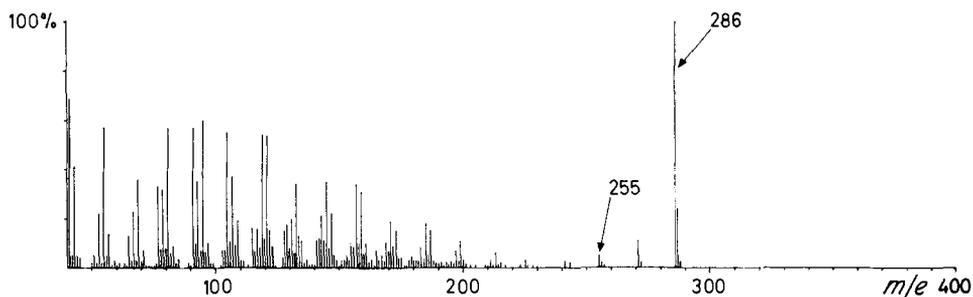


Fig. 6. Massenspektrum von retro-Vitamin A

Wir haben uns davon überzeugt, dass die Silylierungsreaktion unter den obigen Bedingungen reproduzierbar verläuft. Zu diesem Zwecke wurden 3 Lösungen unterschiedlicher Vitamin-A-Konzentration silyliert und nach Ablauf einer Stunde analysiert. Das Ergebnis wird durch Fig. 1 wiedergegeben.

*Analysenbedingungen.* Die Analysen wurden mit dem Gas-Chromatographen GC 2000-R der Firma MICRO-TEK. unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Detektor:	Flammenionisation	Trägergas:	Helium
Temperatur:		Gasfluss:	70 ml/min
a) Einspritzblock	245–250°	Stationäre Phase:	5% Silicon QF-1
b) Trennsäule	160°	Trägermaterial:	GaschromQ; 80/100 mesh
Säule/Säulendimension:	Glas; 2 m; 2,3 mm Ø	Analysendauer:	25 min

Ein unter obigen Analysenbedingungen erhaltenes Gas-Chromatogramm zeigt Fig. 2.

**Ergebnisse.** – 1) *Massenspektrometrische Untersuchung.* Die jeweils durch den Detektor angezeigten Substanzen wurden am Ende der Trennsäule auf der Spitze eines Keramikstabes kondensiert und sofort in die Ionenquelle des Massenspektrometers<sup>3)</sup> eingeführt.

Fig. 3 zeigt das Massenspektrum von silyliertem all-*trans*-Vitamin A (TrMS-I), Fig. 5 das von silyliertem *retro*-Vitamin A (TrMS-IV). Die Spektren von reinem all-

<sup>3)</sup> MS-9-Gerät der Firma AEI, Manchester (Direkteinlass, Ionisationsspannung 70 V, Ionenquellentemperatur 250–270°). Wir danken Herrn P. MEYER für die Aufnahme der Massenspektren.

*trans*-Vitamin A (I) und von *retro*-Vitamin (IV), die ebenfalls nach direkter Einführung der Proben in die Ionenquelle und unter gleichen Bedingungen wie die der silylierten Produkte erhalten wurden, sind in Fig. 4 und Fig. 6 wiedergegeben.

Die Verschiebungen der Molekelionpike in den Spektren der Gas-Chromatographie-Fractionen (Fig. 3 und 5) gegenüber denen von I und IV (Fig. 4 und 6) um 72 Masseneinheiten von  $m/e$  286 auf  $m/e$  358 zeigen, dass die erwarteten Mono-trimethylsilyl-Derivate vorliegen.

Da auf die massenspektrometrische Unterscheidung von *cis-trans*-Isomeren kein Wert gelegt wurde, konnte auf die für solche Zwecke erforderliche genaue Einstellung von Ionenquellentemperatur und Verdampfungsbedingungen der Proben verzichtet werden, so dass die Reproduzierbarkeit der Pikintensitäten nur etwa bei  $\pm 10\%$  lag. Unter diesen Umständen erwies sich das Spektrum des Trimethylsilylderivates von 13-*cis*-Vitamin A (TrMS-II) als nicht signifikant verschieden vom Spektrum von TrMS-I (Fig. 3). Das Trimethylsilylderivat von 11,13-di-*cis*-Vitamin A zeigte ebenfalls im wesentlichen dasselbe Spektrum wie TrMS-I, jedoch mit Unterschieden in den relativen Intensitäten einiger Pike, die klar über der Fehlergrenze der Methode lagen. Ein *cis*-Isomeres (Lage der *cis*-Doppelbindung unbekannt) von Trimethylsilyl-*retro*-vitamin A (TrMS-IV) ergab ein Spektrum, das dem von TrMS-IV ebenfalls sehr ähnlich war.

Diese Befunde zeigen, dass eine massenspektrometrische Unterscheidung der TrMS-Derivate von *cis-trans*-Isomeren vom Typ des Vitamins A schwierig wäre.

Andererseits geht aus einem Vergleich von Fig. 3 und Fig. 5 hervor, dass die Spektren der Trimethylsilylderivate von Vitamin A (TrMS-I) und *retro*-Vitamin A (TrMS-IV) starke Unterschiede aufweisen (Intensität der Pike  $m/e$  358, 255, 221, 169, 168), so dass eine Unterscheidung dieser beiden Reihen durch Massenspektrometrie kein Problem darstellt.

Als Argument für die Strukturen der erhaltenen Produkte ist es von Bedeutung, dass die Spektren von all-*trans*-Vitamin A (I), Fig. 4, und dessen TrMS-Derivat, Fig. 3, in den entscheidenden Punkten, nämlich den Intensitäten der Molekelionpike  $m/e$  286 (Fig. 4) und  $m/e$  358 (Fig. 3) sowie der Pike  $m/e$  255, die dem Verlust von  $\text{CH}_2\text{OR}$  ( $\text{R} = \text{H}$  in I,  $\text{R} = (\text{CH}_3)_3\text{Si}$  in TrMS-I) entsprechen, sehr ähnlich sind<sup>4)</sup>. Dasselbe gilt für die beiden Spektren von *retro*-Vitamin A (IV) und dessen Trimethylsilylderivat, TrMS-IV (Fig. 5 und 6).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die ursprünglichen Lagen der Doppelbindungssysteme unter den Bedingungen der Silylierung und der Gas-Chromatographie nicht verändert wurden. Die massenspektrometrischen Befunde – zusammen mit der Tatsache, dass die Derivate der *cis-trans*-Isomeren im Gas-Chromatogramm als verschiedene Pike erscheinen – beweisen, dass die erhaltenen Derivate die Trimethylsilyläther der sonst unveränderten Ausgangsprodukte I–IV sind.

2) *Reproduzierbarkeit*. Die quantitative Auswertung der Gas-Chromatogramme erfolgte durch Ausschneiden und Auswägen der Pikflächen.

Bei Ausführung einer Doppelbestimmung und unter der Voraussetzung von 95 proz. statistischer Sicherheit ergibt sich für all-*trans*-Vitamin A und 13-*cis*-Vit-

---

4) Eine ausführlichere Diskussion der Fragmentierung dieser Verbindungen soll zu einem späteren Zeitpunkt in anderem Zusammenhang erfolgen.

amin A eine Reproduzierbarkeit von 3,5%. Für *retro*-Vitamin A ergibt sich ein Wert von 3%. Durch Verwendung eines internen Standardes dürften sich diese Werte noch verbessern lassen.

3) *Detektorlinearität*. Fig. 1 zeigt für *all-trans*-Vitamin A und 13-*cis*-Vitamin A eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration dieser Substanzen und dem entsprechenden Detektorsignal. Diese Tatsache ist ein weiterer Beweis dafür, dass während der gas-chromatographischen Analyse keine Umlagerungen stattfinden.

4) *Retentionszeiten bezogen auf all-trans-Vitamin A*. Unter den oben angegebenen Analysenbedingungen ergaben sich folgende relative Retentionswerte:

<i>all-trans</i> -Vitamin A	1,00
13- <i>cis</i> -Vitamin A	0,64
11,13-di- <i>cis</i> -Vitamin A	0,28
<i>retro</i> -Vitamin A	0,72 und 1,00

Den Herren Dr. G. ENGLERT, Dr. U. SCHWIETER und Dr. J. WEHRMÜLLER möchten wir an dieser Stelle für Ratschläge und Hilfe danken.

#### SUMMARY

Vitamin A and some of its isomers are separated and quantitatively determined as trimethylsilylethers by gas liquid chromatography. The identity of the different fractions is proved by mass spectrometry.

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

Technical Development Department  
of HOFFMANN-LA ROCHE Inc.,  
Nutley, New Jersey

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. G. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAHITA & W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. 85, 2497 (1963).
  - [2] M. VECCHI & K. KAISER, J. Chromatogr. 26, 22 (1967).
  - [3] W. RICHTER, M. VECCHI, W. VETTER & W. WALTHER, Helv. 50, 364 (1967).
  - [4] L. BIRKHOFFER *et al.*, Chem. Ber. 96, 1473 (1963).
-