

Die Derivatisierung in der gaschromatographischen Analyse

Anwendung in der toxikologischen Praxis

Walter Vycudilik

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien, Chemische Abteilung, Sensengasse 2,
A-1090 Wien, Österreich

Derivatisation Methods in Gas Chromatographic Analysis. Application in the Toxicological Field

Summary. Derivatisation methods are described, which can be used in gas chromatography of drugs in the forensic toxicological usage. Especially acetylation, silylation and methylation can be performed quite simply and fast. Several procedures for these reactions are compiled from the literature.

Zusammenfassung. Es erfolgt eine Beschreibung der Derivatisierungsmethoden, welche für die gaschromatographische Analyse von Arzneimitteln in der toxikologisch-forensischen Praxis einsetzbar sind. Insbesondere Acetylierung, Silylierung und Methylierung lassen sich genügend einfach und schnell durchführen. Verschiedene Verfahren für diese Reaktionen sind aus der Literatur zusammengestellt.

Key words: Gaschromatographie, Derivatisierung – Toxikologie, Gaschromatographie

Ihrer Struktur nach umfassen Arzneimittel meist polare Verbindungen mit freien OH- und NH-Gruppen. Beim Versuch, diese Verbindungen aus biologischem Material zu extrahieren, werden in größerem Ausmaß auch biologische Inhaltsstoffe isoliert. Nach Möglichkeit sollen diese abgetrennt werden, um keine Störungen zu verursachen.

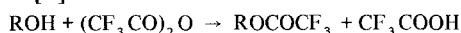
Trotz der Entwicklung von hochtemperierbaren GC-Phasen (OV-1, OV-101, OV-17, OV-225) ist es notwendig, schwer flüchtige oder leicht zersetzliche Substanzen in Derivate überzuführen. Auf Grund der Ausbildung von Wasserstoffbrücken der freien OH- oder NH-Gruppen treten Adsorptionsverluste auf. Damit ist eine wesentliche Verschlechterung der gaschromatographischen Trennung (Tailing) und der Nachweisempfindlichkeit verbunden. Die Derivatisierung [1] kann zu einer besseren Auftrennung und zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit – insbesondere bei Einsatz stoffspezifischer Detektoren – führen. Allerdings stellt die Derivatbildung, als ein weiterer Schritt im Analysengang, auch eine Fehlerquelle dar. Verunreinigungen können durch das Reagens eingeschleppt, die Detektoranzeige verändert und die GC-

Leitungen, Düsen und Elektroden korrodiert werden. Derivate für die GC-Praxis in einem toxikologischen Labor sollen unter einfachen Bedingungen quantitativ und eindeutig herstellbar sein: eine Forderung, die derzeit nicht immer erfüllt werden kann. Wird eine GC/MS-Analyse durchgeführt, sollten die Derivate noch einige weitere Forderungen erfüllen. Das Molgewicht soll so wenig wie möglich verändert werden, um Strukturaussagen über die Ausgangsverbindung zu ermöglichen. Daher sind Silylierungen dafür weniger geeignet als Methylierungen, Benzoylierungen weniger als Acetylierungen.

I. Acylierung

Arzneimittel mit freien OH- und NH₂-Gruppen können acyliert werden. Die direkte *Acetylierung* mit Acetanhydrid ist eine sehr leicht durchführbare Reaktion, die auch im Mikrolitermaßstab noch gute Ergebnisse erbringt. 5 Mikroliter der Probenlösung werden in ein Röhrchen gegeben, das Lösungsmittel abgedampft (Vakuum), 50 Mikroliter Acetanhydrid zugegeben, eingeschmolzen und eine Stunde bei 100° erwärmt. Danach wird das Reaktionsgemisch direkt gaschromatographiert. Schonender, aber zeitraubender, erweist sich die Verwendung äquimolarer Mengen Acetanhydrid und Pyridin. Leicht acetylierbare Verbindungen können auch im Einspritzblock durch aufeinanderfolgendes Injizieren von Probe und Acetanhydrid dargestellt werden [2].

Trifluoracetate haben zum Teil niedrigere Retentionszeiten als die entsprechenden Acetate; sie werden unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit eine Stunde bei 50° mit Trifluoressigsäureanhydrid erwärmt und danach direkt gaschromatographisch untersucht [3].

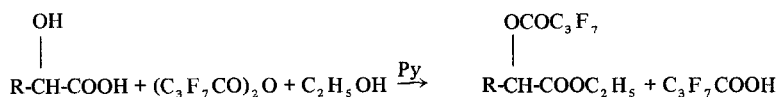


Halogenierte Verbindungen eignen sich vortrefflich für die Detektion mittels ECD. Eingesetzt werden Heptafluorobuttersäureanhydrid in Benzol, Pyridin und Acetonitril oder die entsprechenden Acylimidazole.

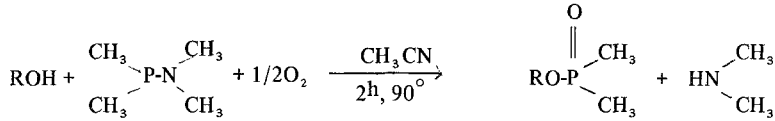


Wegen der höheren Nachweisempfindlichkeit der Heptafluorobutyrate mittels ECD wird dieses Derivat auch beim Spurennachweis von Steroiden und Catecholaminen angewendet.

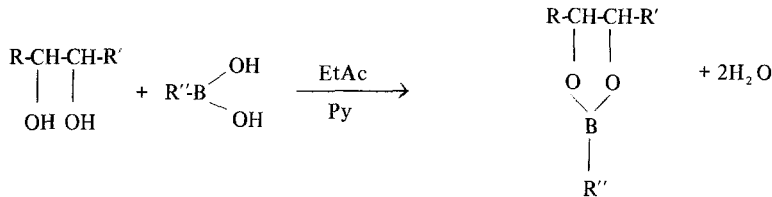
Zur Derivatisierung von Hydroxysäuren hat sich ein Verfahren bewährt, simultan Carboxyl- und Hydroxylgruppen mit Heptafluorobuttersäureanhydrid, Äthanol und Pyridin zu verestern [4].



Dimethylphosphinsäureester [5] bzw. Phosphorigsäureester [6] wurden als Derivate für die Gaschromatographie von Alkoholen, Phenolen und Steroiden verwendet.



Nachteilig wirkt der an die Reaktion anschließende, notwendige Reinigungsschritt, bei dem überschüssiges phosphorhaltiges Reagens und stickstoffhaltige Basen entfernt werden. Außerdem scheinen die Verbindungen über 280° nicht stabil zu bleiben. Verbindungen, welche 1,2 oder 1,3-diole enthalten [7], lassen sich auch als Borsäureester gaschromatographieren. Als Vorteil bieten diese Verbindungen eine gute Trennung von 1,3- und 1,2-diole, welche als Silyläther nicht so einfach zu erreichen ist.



II. Silylierung

Silylderivate werden in großem Umfang für die Gaschromatographie von nicht flüchtigen Verbindungen verwendet, da fast alle polaren -X-H-Gruppen durch die Silyläther blockiert und die meisten Verbindungen in einer Eintopfreaktion derivatisiert werden können. Als Reagentien dienen:

1. Trimethylchlorsilan (TMCS)
2. Hexamethyldisilazan (HMDS)
3. Silylamien, z. B. Trimethylsilylimidazol (TMSI)
4. Silylamide, Bis(trimethylsilyl) acetamid,

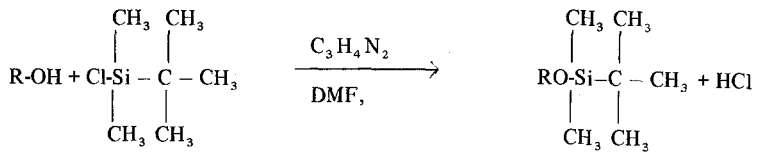
Bistrimethylsilyltrifluoracetamid, Methyltrimethylsilyltrifluoracetamid (BSA, BSTFA, MSTFA)

Silylamide [8] bieten den Vorteil, daß nach Übertragen der Trimethylsilylgruppe nur neutrale Amide entstehen.

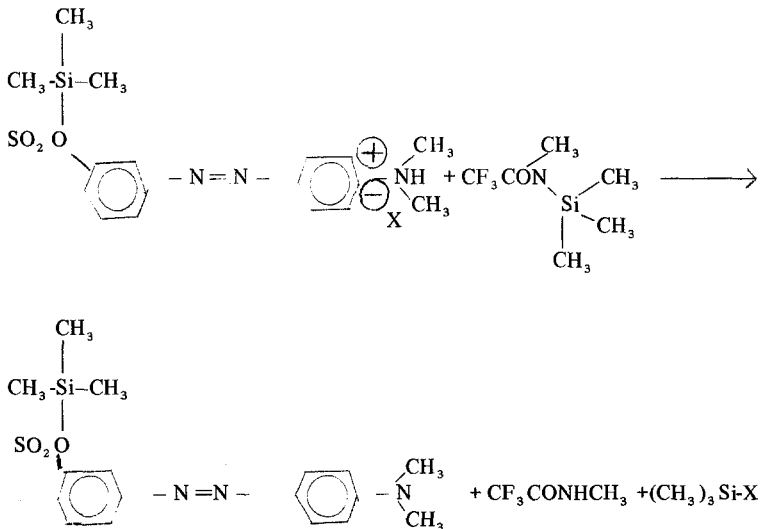
Die Reaktivität der einzelnen Gruppen fällt von $-\text{COOH} > -\text{OH} > -\text{NH}$ (abgesehen von sterischen Einflüssen) ab. Will man nur die OH-Gruppen silylieren, kann TMSI eingesetzt werden.

Als Lösungsmittel dienen wasserfreies Methylenchlorid, Chloroform, Pyridin oder einfach das Derivatisierungsmittel selbst. Meist genügt eine Erwärmung von einer

Stunde bei 60° im geschlossenen System; Aminosäuren müssen jedoch bei erhöhter Temperatur umgesetzt werden (100°). Weiters besteht noch die Möglichkeit, direkt auf der Säule durch nachfolgende Injektion von Silylierungsmitteln zu derivatisieren. Im allgemeinen sind Silylverbindungen empfindlich hinsichtlich Feuchtigkeit und Basen; E. J. Corey [9] führte den t-Butylsilyläther ein, welcher weitgehend inert gegen basische und hydrierende Einflüsse ist.



Bei höheren Temperaturen lassen sich auch sterisch gehinderte Verbindungen silylieren, wie beispielsweise Cholesterin, Östrogene und Corticosteroide. M. Donike [10] hat ein Verfahren angegeben, um die Silylierungskapazität durch Zugabe von Methylorange zu kontrollieren. Farbumschlag von rot nach gelb tritt dann ein, wenn überschüssiges MSTFA vorhanden ist. Auf diese Weise kann das Volumen des Silylierungsansatzes auf ein Minimum beschränkt werden.



Nachteilig wirkt bei Silylderivaten, daß das auf der Anode abgeschiedene SiO₂ die Detektorempfindlichkeit rasch verändert. Auch die Einführung von Fluor in das Reagens (BSTFA, MSTFA) bringt keine prinzipielle Verbesserung. Die einfachste Lösung, eine zu rasche Verschmutzung zu verhindern, besteht in der Entfernung des

überschüssigen Reaktionsgemisches durch Eindampfen unter Stickstoff oder Verwendung säulenchromatographischer Verfahren (Lipidex 5000). Wird der FID kurz vor der Injektion gelöscht und nach dem Passieren des Lösungsmittelpicks wieder gezündet, verzögert dies ebenfalls die Kontaminierung [11].

III. Alkylierung

Für die Alkylierung gibt es mehrere gut eingeführte Methoden:

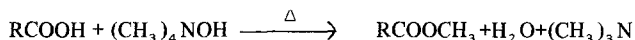
1. Diazomethan
2. Methanol mit Borfluorid
3. Methanol mit Salzsäure oder Schwefelsäure
4. Pyrolyse von Tetramethylammoniumsalzen
5. Alkyljodide und Tetramethylammoniumhydroxyd
6. Dimethylformamidacetal

Verbindungen mit Carboxylgruppen, Barbiturate und Phenole werden mit Diazomethan schonend methyliert.

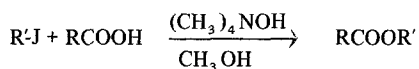
Nachteilig können sich Giftigkeit, Explosionsgefahr wie auch die Tendenz zu Cycloadditionen bei ungesättigten Verbindungen auswirken.

Die Veresterung mit Borfluorid/Methanol erfolgt bei 100° innerhalb von zwei Minuten. Dagegen benötigt die mit Methanol/Schwefelsäure katalysierte Umsetzung etwa 2–3 Stunden am siedenden Wasserbad. Nach Zugabe von Äther und Wasser muß bei beiden Methoden die organische Phase erst isoliert und für die Analyse verwendet werden [12].

Quartäre Ammoniumhydroxydverbindungen zersetzen sich oberhalb 300°, wobei Carboniumionen auf alkylierbare Verbindungen übertragen werden können.

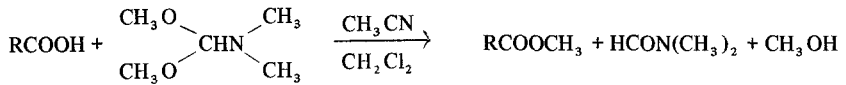


Tetramethyl-, Tetrabutyl- und Trimethylaniliniumhydroxyd [13, 14] in Methanol werden dazu verwendet. Die Methode empfiehlt sich insbesondere dann, wenn Screeniganalysen, zum Beispiel auf Barbiturate, durchzuführen sind. Nachteilig wirkt der Einfluß der quartären Ammoniumverbindungen auf die silikonhaltigen Phasen, der durch Alkylieren in Lösung mit Alkyljodiden vermieden werden kann [15].



Beim Spurennachweis und bei der quantitativen Bestimmung von Barbituraten aus biologischem Material empfiehlt sich auf jeden Fall zu alkylieren, da diese Verbindungen an Silikonphasen stark adsorbiert werden. Einige ihrer Methyl-derivate lassen sich unter Umständen nur schwierig trennen, und außerdem erfolgen Demethylierungsreaktionen auch im Stoffwechsel. Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, bietet die Butylierung [16]. Es verlängern sich die Retentionszeiten, wodurch eine bessere Trennung vom Lösungsmittel und von niedermolekularen Verunreinigungen ermöglicht wird. Durch die Alkylierung sinkt nicht nur die Verringerung der Adsorptionsverluste, es steigt auch die Ansprechempfindlichkeit des Stickstoff-Phosphordetektors.

Dimethylformamidacetale werden für die Alkylierung von Säuren, Aminverbindungen und Diolen verwendet. Die Veresterung von Säuren erfolgt innerhalb von 10–15 min bei 60° C in hoher Ausbeute ohne saure oder basische Katalyse [17].



Mit Hilfe der angegebenen Reaktionen, der Acylierung, Silylierung und Alkylierung sollte es im allgemeinen möglich sein, die mit üblichen Aufarbeitungsmethoden erhaltenen polaren Arzneimittel in besser chromatographierbare Verbindungen überzuführen. Quantitative Analysen erfordern unbedingt eine genaue Kenntnis der Reaktion und der Faktoren, die sie beeinflussen. Die Verwendung entsprechender innerer Standards ist in diesem Zusammenhang unbedingt erforderlich. Speziell für die toxikologische Praxis, in welcher zuerst die Identifizierung einer unbekanntes Substanz und dann erst eine quantitative Bestimmung benötigt wird, empfiehlt sich die verschiedene Derivatisierung der sauren und basischen Extrakte. Vorteilhaft für die saure Fraktion erweist sich, äquivalente Mengen mit 1. Diazomethan oder 2. durch Alkylierung mit Alkyljodiden umzusetzen. Die neutrale und basische Fraktion wird analog 1. acyliert (Acetanhydrid, Trifluoressigsäureanhydrid) und/oder 2. silyliert. Diese genannten Reaktionen können im Mikrolitermaß durchgeführt werden und bei Kenntnis der GC-Parameter eine Identifizierung mit nur geringsten Probenmengen ermöglichen.

Literatur

1. Drozd, J.: Chemical Derivatisation in Gas chromatography. *J. Chromatog.* **113**, 303 (1975)
2. Anders, M.W., Mannering, G.J.: New Peak-Shift Technique for Gas-Liquid Chromatography: Preparation of Derivatives on Column. *Anal. Chem.* **34**, 731 (1962)
3. Schuchmann, H.: Trifluoressigsäureanhydrid – ein wertvolles Derivatisierungsmittel in der Gaschromatographie. *Kontakte (E. Merck)* **1**, 20 (1974)
4. Brooks, J.B., Alley, C.C., Liddle, J.A.: Simultaneous Esterification of Carboxyl and Hydroxyl Groups with Alcohols and Heptafluorobutyric Anhydride for Analysis by Gas Chromatography. *Anal. Chem.* **46**, 1930 (1974)
5. Jakob, K., Vog, W., Knecht, M., Schäfer, W.: Steroid Phosphorus Compounds Mass Spectrometry of Phosphinic Esters of Mono hydroxy Steroids. *Biomedical Mass Spectrometry* **3**, 64 (1976)
6. Vilceanu, R., Schulz, P.: Gaschromatographie einiger Derivate phosphorhaltiger Heterocyclen. *J. Chromatog.* **82**, 279 (1973)
7. Brooks, C.J.W., Mac Lean, I.: Cyclic n-Butylboronates as Derivatives of Polar Bifunctional Groups for gas chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatog. Sci.* **9**, 10 (1971)
8. Donike, M.: N-Trifluoracetyl-o-Trimethylsilyl-Phenolalkylamine. Darstellung und massenspezifischer gaschromatographischer Nachweis. *J. Chromatog.* **103**, 91 (1975)
9. Corey, E.J., Venkateswarlu, A.: Protection of hydroxyl groups by t-butyldimethyldilyl-derivatives. *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 6190 (1972)
10. Donike, M.: Control of trimethylsilylation potential and trimethylsilylation capacity by the use of colour indicators. *J. Chromatog.* **115**, 591 (1975)
11. Axelson, M., Sjoval, J.: Selective liquid chromatographic isolation procedure for gas chromatographic – mass spectrometric analysis of 3-Ketosteroids in biological materials. *J. Chromatog.* **126**, 705 (1976)

12. Schuchmann, H.: Bortrifluorid-Komplexe – wertvolle Veresterungshilfsmittel in der Gaschromatographie. Kontakte (E. Merck) 2, 34 (1975)
13. Stevenson, G. W.: On column methylation of barbituric acid. Anal. Chem. 38, 1948 (1966)
14. Brochmann-Hanssen, E., Oke, T. A.: Gas Chromatography of barbiturates, phenolic alkaloids and xanthine bases: Flash-heater methylation by means of trimethyl anilinium hydroxide. J. Pharm. Sci. 58, 370 (1969)
15. Greeley, R. H.: New Approach to Derivatisation and Gas chromatographic Analysis of Barbiturates. Clin. Chem. 20/2, 192 (1974)
16. Vycudilik, W.: Der Nachweis von Barbituraten in biologischem Material. Beitr. gerichtl. Med. XXXV, 213 (1977)
17. Thenot, J. P., Horning, E. C.: Fatty Acid Esterification With N, N-Dimethylformamidialkylacetals for GC-Analysis. Anal. Letters 5, 217 (1972)

Eingegangen am 9. Dezember 1976

Angenommen am 21. Juli 1977