

CHROM. 6889

FLÜCHTIGE CARBONSÄUREN ALS LÖSUNGSMITTEL FÜR DIE TRIMETHYLSILYLIERUNG VON POLAREN VERBINDUNGEN

MANFRED DONIKE

Institut für Biochemie der Universität Köln, An der Bottmühle 2, 5 Köln 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. Mai 1973)

SUMMARY

Volatile fatty acids as solvents for the trimethylsilylation of polar compounds

As a rule, the trimethylsilylation of polar compounds is performed under anhydrous conditions and with the aid of aprotic solvents. Volatile fatty acids, especially trifluoroacetic acid, are excellent solvents for polar compounds such as organic bases, phenolalkylamines, amino alcohols, amino acids, nucleic acid bases and their corresponding salts formed from organic or inorganic acids. In this way, high concentrations in a minimum of solvent can be achieved.

The addition of a four-fold molar excess of N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide leads to the complete silylation of active hydrogen atoms. The reaction is strongly exothermic, in favour of the formation of the trimethylsilyl esters of the carbonic acid solvent. The trimethylsilylation is virtually instantaneous in homogeneous state, and consequently the extended heating of samples becomes unnecessary. The esterification of hydroxyl groups, a possible side-reaction when using acids as solvents, does not occur.

The mild conditions associated with this method of trimethylsilylation allow the preparation of concentrated solutions, which facilitates gas chromatographic and mass spectrometric analyses. This method provides the further advantage that only extremely volatile solvents and reagents are used.

EINLEITUNG

Zur Darstellung von Trimethylsilylverbindungen für gaschromatographische Untersuchungen werden fast ausschliesslich Silylierungsmittelgemische empfohlen die neben dem Silylierungsmittel ein polares, aprotisches Lösungsmittel und Trimethylchlorosilan als Katalysator enthalten¹⁻⁷. Aprotische Lösungsmittel mit mehr oder weniger grosser Polarität dienen als Lösungsvermittler, weil die Silylierungsmittel unpolar sind und infolgedessen nur ein geringes Lösungsvermögen für die zu derivatisierenden polaren Substanzen besitzen.

Wir stellten uns die Frage, inwieweit eine geringe Menge der niederen Carbonsäuren, die als gute Lösungsmittel für polare Substanzen gelten, die aprotischen Lösungsmittel wie Pyridin, Acetonitril, etc., ersetzen können. Wird die polare Verbindung in einer geringen Menge der flüchtigen Carbonsäure, z.B. Trifluoressigsäure, gelöst, so entsteht nach Zugabe einer überschüssigen Menge von N-Methyl-N-

trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA)⁸ eine Reaktionslösung mit hoher Silylierungskapazität, die ausgezeichnete gaschromatographische (GC) Eigenschaften besitzt. Hierunter verstehen wir eine homogene Lösung, die leicht mit einer Mikroliterspritze dosierbar ist, ebenso wie eine schnelle Elution des Lösungsmittels, des überschüssigen Silylierungsmittels und des entsilylierten Amids, im vorliegenden Falle des N-Methyltrifluoracetamids.

EXPERIMENTELLES

Allgemeine Vorschrift zur Derivatbildung

Etwa 1–2 mg der in der Tabelle I aufgeführten Verbindungen wurden in 100 μ l der Carbonsäuren gelöst und tropfenweise mit 0.9 ml MSTFA versetzt. Die auftretende Reaktionswärme führte bei langsamer Zugabe des MSTFA nicht zum Sieden der Mischung. Eine bei manchen Verbindungen auftretende Trübung löst sich inner-

TABELLE I

BEISPIELE ZUR TRIMETHYLSILYLIERUNG VON POLAREN VERBINDUNGEN NACH DEM LÖSEN IN TRIFLUORESSIGSÄURE UND DURCH ZUGABE VON MSTFA

Verbindung	Silylierte Funktionen	TMS Gruppen	Molgewicht	Charakteristische Massenzahlen		
				M	M-15	Basispeak für MZ > 75
Amphetamin· $\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄	Prim. aliph. Amin	1	207	(207)*	192	116
p-Hydroxyamphetamin·HBr	Phenol. Hydroxyl, prim. aliph. Amin	2	295	(295)*	280	116
Pholedrin· $\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄	Phenol. Hydroxyl, sec. aliph. Amin	2	309	(309)*	294	130
Phenylalanin	Aminosäure, Carboxyl- und Aminogruppe	2	309	(309)*	294	218
Tyrosin	Aminosäure mit phenol. Hydroxyl	3	397	(397)*	382	218
Serin	Aminosäure mit aliph. Hydroxyl	3	306	—	291	218
Lysin·2HCl	Basische Aminosäure mit endständiger Aminogruppe	4	434	(434)*	419	218
Asparaginsäure	Saure Aminosäure mit endständiger Carboxylgruppe	3	349	(349)*	334	232
Asparagin	Amid einer Aminosäure	3	348	348	333	231
Histidin· 2HCl	Aminosäure mit Imidazolrest	3	371	371	356	154
Cytosin	Prim. Amin und hetero- cyclische Amidfunktion	2	255	254**	240	240
Adenin	Prim. Amin und Proton des Imidazolkerns	2	279	279	264	264
Histamin· 2HCl	Endständige prim. Amin- funktion, Imidazolrest	3	327	(327)*	312	174
Adenosin	Prim. Amin, Hydroxyl- funktionen	4	555	555	540	231

* Intensität der Molekülionen unter 1%.

** M-1.

halb weniger Sekunden auf. Die Umsetzung erfolgte entweder in Zentrifugenschliffgläsern oder in Ampullengläsern mit 1 ml Nutzvolumen, die für die automatische Einspritzvorrichtung des Gaschromatographen vorgesehen sind. Die Ampullengläser wurden mit einer PTFE-beschichteten Gummischeibe und einer Aluminiumbördelkappe verschlossen. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wurden die Proben gaschromatographiert (Bedingungen siehe Fig. 2).

Parameter der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer

Ionenquellentemperatur: 140°

Emissionsstrom: 300 μ A

Beschleunigungsspannung: 3 kV

SEV: 1.75 kV

Auflösung: ca. 500 *m/M* (10%)

Elektronenenergie: 70 eV

Scan-Geschwindigkeit: 2.5 sec/Massendekade

Temperatur der Verbindungsstücke und des Direkteinlasses: 250°

Separator: doppelstufiger Watson-Bieman Separator

Glassäule: 0.6 m, 2 mm I.D., 5% OV-101 auf Chromosorb G-AW-DMCS

Helium: 30 ml/min

Temperaturen: Einspritzblock 240°, Ofen isotherm, eingestellt entsprechend einer Retentionszeit von 4–6 min für die zu messende Komponente.

ERGEBNISSE

Von den als Lösungsmittel eingesetzten flüchtigen Carbonsäuren: Ameisensäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure zeigte Trifluoressigsäure die besten Lösungseigenschaften für Aminosäuren, Nucleinsäurebasen und Phenolalkylamine. Für die weiteren Versuche wurde deshalb überwiegend Trifluoressigsäure verwendet, obwohl für spezielle Probleme auch die anderen angeführten Carbonsäuren von Vorteil sein können. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammen-

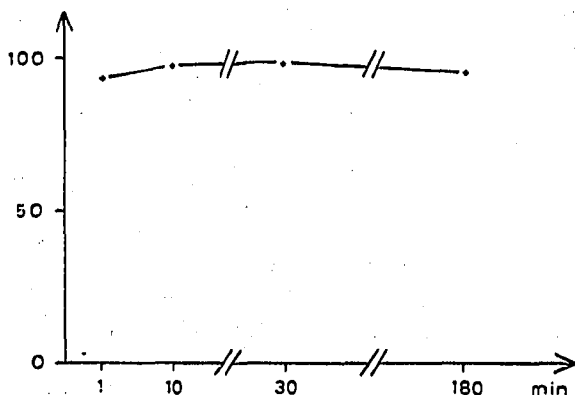


Fig. 1. Kinetik der Trimethylsilylierung von Ephedrinhydrochlorid (1 mg in 0.1 ml Trifluoressigsäure).

gestellt und beweisen, dass bei allen untersuchten Verbindungen die aktiven Protonen trimethylsilylsubstituiert werden. Die bei der Zugabe des MSTFA zu der Trifluoressigsäurelösung entstehende Reaktionswärme wurde nicht abgeführt, da bei langsamer Zugabe des Silylierungsmittels die Lösung nicht siedet und somit Verluste durch Spritzen nicht zu befürchten sind.

Die Trimethylsilylierung verläuft so schnell, dass sie kinetisch nicht oder nur schlecht verfolgt werden kann (siehe Fig. 1). So ergeben z.B. Proben 1, 10, 20 und 30 min nach der MSTFA-Zugabe analysiert, gleich hohe Peaks für N,O-bis-TMS-ephedrin. Auch nachträgliches Erhitzen auf 110° für mehrere Stunden bringt keine weitere Zunahme des Ephedrinsignals.

DISKUSSION

Die als Silylierungsmittel für GC Untersuchungen in Frage kommenden Verbindungen sind so apolar, dass die meisten der zu silylierenden polaren Substanzen sich nicht oder nur in einem geringen Ausmass in diesen Reagenzien auflösen. Pyridin, Acetonitril, Dimethylformamid und andere polare, aprotische Lösungsmittel dienen als Lösungsvermittler. Der Zusatz von Trimethylchlorsilan als Katalysator und eine drastische Temperaturerhöhung, zuweilen bis über den Siedepunkt, des verwendeten Silylierungsmittelgemisches hinaus, geschehen meist unkritisch und verschleiern, dass weniger die Reaktionsgeschwindigkeit als das in Lösunggehen der Substanzen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Trimethylsilylierung ist.

Der Umsatz der polaren Funktionen, Hydroxyl-, Amin-, Carboxyl- und Thiolgruppen, ist bei einmal in Lösung befindlichen Verbindungen so rasch, dass er sich nur in seltenen Fällen kinetisch verfolgen lässt, z.B. bei einer starken sterischen Hinderung, wie sie bei α -17-Hydroxysteroiden vorliegt⁹.

Von den bekannten Silylierungsmitteln weist nur N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid¹⁰ eine geringe Polarität auf, die in manchen Fällen die zusätzliche Verwendung eines Lösungsmittels überflüssig macht. Ein Anwendungsbeispiel für die lösungsmittelfreie Verwendung ist die Trimethylsilylierung von α - bzw. β -Glucose, die unter Zusatz von einigen Prozenten Trimethylchlorsilan als Katalysator bei Raumtemperatur ohne Racemisierung erfolgt.

Gemeinsam ist allen bisher vorgeschlagenen Verfahren, dass die verwendeten Lösungsmittel aprotisch und wasserfrei sein sollen, damit durch diese Lösungsmittel nicht Silylierungsmittel verbraucht wird. Nur zwei Publikationen beschreiben die Silylierung von in Wasser gelösten Polyalkoholen durch einen grossen Reagenzüberschuss^{11,12}.

Ziel einer Derivatisierung sollte aber sein, dass unter möglichst schonenden Bedingungen schnell eine für GC Untersuchungen geeignete Lösung hergestellt werden kann. Mehrstündige Reaktionszeiten und hohe Temperaturen entsprechen nicht diesen Forderungen. Die interessierenden Komponenten sollten ferner in möglichst hoher Konzentration vorliegen. Eine hohe Konzentration erleichtert die qualitative und quantitative Bestimmung ebenso wie die Identifizierung in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer.

Die drastischen Reaktionsbedingungen beweisen, dass die aprotischen Lösungsmittel trotz ihrer Polarität letzten Endes schlechte Lösungsmittel für polare Verbindungen, insbesondere für die amphoteren Aminosäuren und Phenolalkylamine

sowie für die Salze von organischen Basen sind. Ferner führt die Verwendung eines Lösungsmittels zu einer Konzentrationserniedrigung, die sich nachteilig auf Spurenanalysen auswirkt. Polare hochsiedende Lösungsmittel wie Pyridin haben den weiteren Nachteil, dass sie einen breiten Lösungsmittelpeak mit einem ausgesprägten "tailing" erzeugen.

Amphotere Verbindungen sind jedoch in wasserfreier Ameisensäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure oder auch in Heptafluorbuttersäure extrem leicht löslich. Das beste Lösungsvermögen weist Trifluoressigsäure auf, eine Tatsache, die Weygand und Csendes¹³ schon in 1952 zur N-Trifluoracetylierung von Aminosäuren ausnutzten.

Die Trimethylsilylierung von polaren Substanzen nach Lösen in Carbonsäure durch Zugabe von MSTFA besitzt gegenüber den herkömmlichen Silylierungsmethoden folgende Vorteile:

(1) Die Trimethylsilylierung erfolgt in homogener Lösung. Lange Reaktionszeiten und hohe Temperaturen werden im Gegensatz zur heterogenen Trimethylsilylierung vermieden.

(2) Ein geringes Volumen des Silylierungsansatzes und damit eine hohe Konzentration der zu bestimmenden Verbindungen kann erzielt werden, wenn nur die eben zum Lösen benötigte Menge an Carbonsäure verwendet wird. Durch Zugabe der vierfachen molaren Menge an MSTFA wird eine für alle OH-, SH- und NH-Funktionen ausreichende Silylierungskapazität erreicht (vergl. Fig. 2 und Tabelle II).

(3) Nur extrem flüchtige Verbindungen dienen als Lösungsmittel, als Reagenz

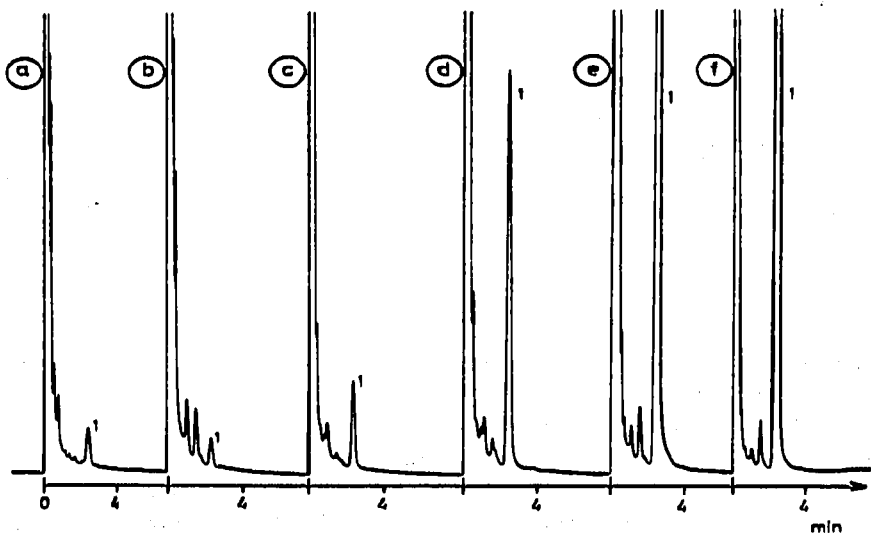


Fig. 2. Trimethylsilylierung von 100 μ g Ephedrinhydrochlorid in: (a) 0.5 ml Acetonitril und 0.5 ml Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA); (b) 1.0 ml MSTFA; (c) 0.1 ml Trifluoressigsäure und 0.9 ml MSTFA; (d) 0.02 ml Trifluoressigsäure und 0.18 ml MSTFA; (e) 0.005 ml Trifluoressigsäure und 0.045 ml MSTFA; (f) 2 mg Ephedrinhydrochlorid in 0.1 ml Trifluoressigsäure gelöst, nach 2 Std. bei 25° 0.9 ml MSTFA. GC Bedingungen: Gerät Modell 7600 (Hewlett-Packard, Avondale, Pa., U.S.A.), Glassäule 5% OV-101 auf Chromosorb G-AW-DMCS, 1.06 m, 3 mm I.D.; He 60 ml/min; Ofen 180°, FID 300°; H₂ 35 ml/min; Luft 250 ml/min; Einspritzblock 250°. 1 = N,O-Bis(trimethylsilyl)ephedrin.

TABELLE II

SILYLIERUNGSKAPAZITÄT EINES REAKTIONSANSATZES BESTEHEND AUS 0.1 ml CARBONSÄURE UND 0.9 ml MSTFA

<i>Verbindung</i>	<i>Molvolumen (ml)</i>	<i>Silylierbare Protonen (mMol/0.1 ml)</i>	<i>Silylierungs- kapazität/ml (mMol)</i>
MSTFA	186.1		5.37
Ameisensäure	41.0	2.44	2.39
Essigsäure	59.4	1.68	3.16
Trifluoressigsäure	84.9	1.18	3.65
Pentafluorpropionsäure	127.8	0.78	4.05
Heptafluorbuttersäure	130.4	0.77	4.06

oder verbleiben als Reaktionsprodukte: MSTFA, N-Methyltrifluoracetamid als entsilyliertes Amid und Carbonsäuretrimethylsilylester.

(4) Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure erhöhen im Reaktionsansatz das Verhältnis von Fluor zu Silicium. Die ohnehin schon geringe Rückstandsbildung des MSTFA im Flammenionisationsdetektor wird durch diese Lösungsmittel noch weiter verringert.

Die theoretisch mögliche Nebenreaktion, die Veresterung von Hydroxylgruppen durch die Carbonsäuren verläuft nur sehr langsam. Lösungen von Ephedrin, Tyrosin und Serin in Trifluoressigsäure gaben GC und massenspektrometrisch keinen Anhaltspunkt für eine Trifluoracetylierung, auch wenn die Zugabe des MSTFA erst 2 Std. nach dem Auflösen in der Carbonsäure erfolgt. Die Ursache hierfür ist die geringe Acidität der wasserfreien Carbonsäuren, in diesem Falle der Trifluoressigsäure¹⁴, sodass auch bei anderen Verbindungen nur mit einer geringen Veresterungsgeschwindigkeit zu rechnen ist (vergl. Fig. 2f). Die Überlegenheit dieser Art der Trimethylsilylierung gegenüber den herkömmlichen Verfahren demonstrieren die Fig 2a-e am Beispiel des Ephedrinhydrochlorids.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Trimethylsilylierung von polaren organischen Verbindungen wird in der Regel unter Feuchtigkeitsausschluss und mit Hilfe aprotischer Lösungsmittel durchgeführt. Die flüchtigen Carbonsäuren, besonders Trifluoressigsäure, sind aber so ausgezeichnete Lösungsmittel für organische Basen, Phenolalkylamine, Aminoalkohole, Aminosäuren, Nucleinsäurebasen sowie für deren Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, dass in wenig Lösungsmittel hohe Konzentrationen erreicht werden können.

Die Zugabe eines vierfach molaren Überschusses von N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid führt innerhalb weniger Minuten zu einer Silylierung aller aktiven Wasserstoffatome, wobei die entstehende Reaktionswärme überwiegend auf die Bildung der Carbonsäuretrimethylsilylester zurückzuführen ist. Die aus einer homogenen Lösung heraus erfolgende Trimethylsilylierung verläuft rasch und macht ein mehrstündiges Erhitzen der Reaktionsansätze überflüssig. Eine Veresterung von

Hydroxylgruppen, eine theoretisch mögliche Nebenreaktion, ist unter den angegebenen Reaktionsbedingungen nicht zu beobachten.

Mit dieser unter schonenden Bedingungen ablaufenden Silylierungsmethode sind hohe Konzentrationen erreichbar, die die gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchung erleichtern. Weiter ist von Vorteil, dass nur leichtflüchtige Reagenzien und Reaktionsprodukte im Silylierungsansatz vorhanden sind.

LITERATUR

- 1 C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2497.
- 2 I. F. Klebe, H. Finkbeiner und D. M. White, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88 (1966) 3390.
- 3 P. Capella und E. C. Horning, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 316.
- 4 S. Kawai und Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, 25 (1966) 472.
- 5 M. Rowland und S. Riegelmann, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 463.
- 6 T. Luukkainen, W. J. A. VandenHeuvel und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 599.
- 7 A. E. Pierce, *Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1968.
- 8 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 103.
- 9 W. J. A. VandenHeuvel, J. L. Patterson und K. L. K. Braly, *Biochim. Biophys. Acta*, 144 (1967) 691.
- 10 L. Birkofer und M. Donike, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 270.
- 11 K. M. Brobst und C. E. Lott, Jr., *Cereal Chem.*, 43 (1966) 35.
- 12 A. H. Weiss and H. Tambawala, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 120.
- 13 F. Weygand und E. Csendes, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 136.
- 14 L. H. Simons und K. E. Lorentzen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4746.