

CHROM. 7773

## N-TRIFLUORACETYL-O-TRIMETHYLSILYL-PHENOLALKYLAMINE

### DARSTELLUNG UND MASSENSPEZIFISCHER GASCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS

MANFRED DONIKE

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

(Eingegangen am 18. Juni 1974)

---

#### SUMMARY

*N-Trifluoroacetyl-O-trimethylsilyl-phenolalkylamines. Preparation and mass specific gas chromatographic estimation*

N-TFA-O-TMS derivatives of phenolalkylamines are relatively stable compounds which are well suited for identification by combined gas chromatography and mass spectrometry. They are easily prepared by trimethylsilylation with N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide followed by selective N-acylation with N-methyl-bis(trifluoroacetamide). This technique of derivatisation can be applied to salts of phenolalkylamines without prior liberation of the bases. The thermodynamic and the kinetic aspects of the trimethylsilylation and N-trifluoroacetylation reactions are discussed. A definition is given of the "relative trimethylsilylation potential" of N-TMS-acetamides, which is based on gas chromatographic data.

It is not necessary to evaporate the reaction medium, because the excess reagents and the remaining N-methyl-trifluoroacetamide, which originate from the trimethylsilylation as well as from the acylation step are extremely volatile and do not affect the gas chromatographic analysis.

N-TFA-O-TMS-phenolalkylamines are stable against oxidising agents and at elevated temperatures. They do not show any adsorption effects in the molecular separator and in the gas chromatographic system. Solutions of catecholamines, for example, are stable for months, provided humidity is excluded.

After electron impact the charge localisation predominates at the benzylic fragment, which gives information on the hydroxylic substitution pattern of the aromatic ring and the  $\beta$ -C-atom. The detection limits have been found to lie in the femtomol region, when this structure-specific benzylic ion is registered in the single-ion fashion.

---

#### EINLEITUNG

Der gaschromatographische (GC) Nachweis von Phenolalkylaminen mit Hilfe

der massenspezifischen (MS) Detektion\* ist z.Zt. jeder anderen Detektionsmöglichkeit überlegen, wenn man Empfindlichkeit und Spezifität berücksichtigt<sup>1-5</sup>. Von Vorteil ist, dass die MS Detektion weniger durch ubiquitär vorkommende Kontaminationen sowie durch Artefakte aus Septen und flüssigen Phasen beeinträchtigt wird, als dies bei äquivalenter Nachweisempfindlichkeit mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) der Fall ist.

Die polare Struktur der Phenolalkylamine macht jedoch eine Überführung in flüchtige Derivate erforderlich, wobei die Eigenschaften der Derivate und die der benutzten Reagenzien die gaschromatographisch erreichbare Nachweisgrenze mitbestimmen. Das durch die Schutzgruppen induzierte Fragmentierungsschema spielt ebenso eine Rolle wie die Flüchtigkeit der Reagenzien und die Kinetik sowie die Thermodynamik der gruppenübertragenden Reaktionen, von denen die Trimethylsilylierung<sup>6-9</sup>, die Acylierung<sup>2,3,5,10-20</sup> und die selektive Trimethylsilylierung der Hydroxylgruppen nach Acylierung der Aminfunktion<sup>21</sup> beschrieben werden. Seltener wird die Umwandlung der primären Amine in Isothiocyanate<sup>1,22</sup> und in Schiff'sche Basen<sup>4,23,24</sup> empfohlen.

Die Synthese des N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamids (MSTFA)<sup>25</sup> und des N-Methyl-bis(trifluoracetamids) (MBTFA)<sup>26</sup>, beides leichtflüchtige und für gaschromatographische Untersuchungen geeignete Reagenzien, eröffneten einen neuen, vorteilhaften Weg der selektiven Derivatisierung<sup>26</sup>. Im Falle der Phenolalkylamine erhält man durch Reaktion mit MSTFA und nachfolgende N-Acylierung O-Trimethylsilyl-phenolalkyltrifluoracetamide.

Diese N-TFA-O-TMS-Derivate der Phenolalkylamine\*\*, von denen den biogenen Catecholaminen Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin wegen ihrer physiologischen Wirkung besonderes Interesse gebührt, sind in der Reaktionslösung beständig und entgegen den Angaben in der Literatur<sup>3</sup> für GC Untersuchungen vorzüglich geeignet.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Bedingungen für die massenspezifische Detektion*

Betriebsbedingungen der GC-MS-Kombination (GC Modell 2700 Varian-Aerograph und MS Modell CH 5 Varian-MAT):

Gas (He)	40 ml/min
Quellendruck	$4 \cdot 10^{-6}$ Torr
Temperaturen	
GC-Einspritzblock	250°
GC-Ofen	120-200°
GC-Detektor	270°
Verbindungskapillare	270°
Separator (Glasfritte, doppelstufig)	275°
Direkteinlass	170°
Ionenquelle	160°

\* Diese Bezeichnung folgt einem Vorschlag von Brandenberger und Schnyder<sup>1</sup>. In der angelsächsischen Literatur: mass fragmentography.

\*\* Folgende Abkürzungen symbolisieren die Schutzgruppen; und die Reagenzien: TMS = Trimethylsilyl; TFA = Trifluoracetyl; PFP = Pentafluorpropionyl; HFB = Heptafluorbutyryl; MSTFA = N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid; MBTFA = N-Methyl-bis-trifluoracetamid.

Elektronenstossionenquelle	300 $\mu$ A Emission 70 eV Elektronenenergie 3 kV Beschleunigungsspannung
SEV	1.7 kV
Auflösung	ca. 400 (10% Tal)
Registrierung	Gleichstromverstärker des CH 5- Systems, Integrator Modell 3370 B Hewlett-Packard, Kompensations- schreiber Modell 7127 A Hewlett- Packard
Glassäulen	(1) 0.5 m $\times$ 2.5 mm I.D. 10% OV-17 auf Chromosorb W AW DMCS (2) 1.5 m $\times$ 2.5 mm I.D. 1% OV-101 auf Chromosorb W AW DMCS

#### *Derivatisierung im $\mu$ Mol-Masstab und Registrierung der Spektren*

Für die orientierenden GC Untersuchungen mit Hilfe des Flammenionisationsdetektor (FID) und für die Aufnahme der Massenspektren der Reinsubstanzen wurden 1.5–2.0 mg (ca. 10  $\mu$ Mol der Phenolalkylamine) in Zentrifugenschliffgläser eingewogen und mit 0.5 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  und 0.5 ml MSTFA ( $2.7 \cdot 10^{-3}$  Mol) 30 min auf 80° erhitzt.

Nach GC Kontrolle der trimethylsilylierten Verbindungen und Aufnahme der Massenspektren wurden 0.2 ml MBTFA zugefügt. Wenn innerhalb 60 min die Umwandlung in das N-TFA-Derivat noch nicht beendet war, wurden 100  $\mu$ l Trifluoressigsäure ( $1.2 \cdot 10^{-3}$  Mol) zugegeben, wodurch ca. 45% des Überschusses an MSTFA kompensiert wird.

*Aufnahme der niederaufgelösten Massenspektren.* 2  $\mu$ l der Reaktionslösungen (3–4  $\mu$ g) wurden in den Gaschromatographen injiziert. Die Ofentemperatur wurde so justiert, dass die zu messende Verbindung jeweils nach 5 min eluiert wurde. Die Registrierbedingungen entsprechen denen der massenspezifischen Detektion (siehe oben). Die Auflösung war ca. 600 (10% Tal), der Scanbereich 45–800 und die Scangeschwindigkeit 3.8 sec/Dekade. Die Auswertung fand statt mit dem Datensystem 100 MS der Firma Varian-MAT.

#### *Derivatisierung der Reinsubstanzen im p-Mol-Masstab*

Aliquote Teile einer Lösung der Phenolalkylamine in 0.1 N Essigsäure werden in Zentrifugenschliffgläser (NS 14.5) zu 0.1 ml einer frisch bereiteten, methanolischen 1% Oxalsäurelösung (w/v) gegeben und am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Die eingengten Proben werden mindestens 4 h im Vakuumexsikkator (Wasserstrahlpumpe) über  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$  getrocknet. Dann werden die Rückstände mit 0.125 ml eines Silylierungsgemisches, bestehend aus 5 ml Acetonitril und 1.5 ml MSTFA, umgesetzt (80°/30 min). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden zu dieser Lösung 0.01 ml MBTFA gegeben. Man belässt die Reaktionslösung 10 min bei Raumtemperatur und erhitzt dann für 5 min auf 80°. Diese Lösung kann nach dem Abkühlen zur Gaschromatographie verwendet werden.

Die weitere Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Hexamethyldisilazan ergibt so viel Silylierungskapazität, dass die Zentrifugenschliffgläser mehrfach geöffnet werden können, ohne dass durch die dann hinzutretende Feuchtigkeit eine Entsilylierung der Proben zu befürchten ist (Reaktionsablauf: siehe Diskussion, Abschnitt Silylierungspotential).

Die Konzentration der Stammlösungen war 1 mg/ml in 0.1 *N* Essigsäure (Catecholamine) bzw. Methanol (andere Phenolalkylamine). Es wurden Verdünnungen von 1  $\mu\text{g}$  bzw. 0.1  $\mu\text{g}$ /ml in 0.1 *N* Essigsäure oder Methanol 1 mg/ml eingesetzt.

### *Anwendungsbeispiele*

#### *Etilefrinbestimmung in Plasma*

*Extraktion des Wirkstoffes.* Zu 1.00 ml Plasma wurden 500 ng *p*-Hydroxyephedrin in 0.1 ml Wasser (innerer Standard), 0.2 ml 1 % Glycinlösung, zwei Tropfen 2 *N* HCl und 9.0 ml dest. Äthanol gegeben. Nach 30 min schütteln stellt man die Probe ca. 1 h in ein Wasserbad von 0° und zentrifugiert anschliessend 10 min bei 0°. Vom klaren Überstand wurden 7.0 ml abpipettiert und am Rotationsverdampfer bei ca. 30–32° Badtemperatur vorsichtig zur Trockene gebracht und danach im Vakuumexsikkator über  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$  nachgetrocknet.

*Eichkurve.* Je 1.0 ml Humanserum wurden mit 0, 50, 100, 150, 200 bzw. 250 ng Etilefrin und je 500 ng *p*-Hydroxyephedrin versetzt und dann wie oben beschrieben, aufgearbeitet.

*Derivatisierung.* Zu dem getrockneten Rückstand gibt man 0.4 ml eines Gemisches von Acetonitril–MSTFA (50:15, v/v) und erhitzt 30 min im Aluminium-Heizblock auf 80°. Nach dem Erkalten der Proben werden 25  $\mu\text{l}$  MBTFA zugetropft. Nach 10 min Stehen bei Raumtemperatur werden die Proben 5 min lang in einem 80° heissen Aluminiumblock gestellt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und nach Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  Hexamethyldisilazan können die Proben bis zur GC Analyse aufbewahrt werden.

#### *Catecholamine in tierischem Gewebe*

Unmittelbar nach dem Töten einer männlichen Ratte durch Genickschlag wurden Gewebsproben (30–100 mg) entnommen, ausgewogen und mit einer eiskalten, frisch bereiteten 0.25 % Lösung von Oxalsäure in Methanol (1 ml pro 30 mg Gewebe) homogenisiert. Nach 60 min Stehen bei 0° wird abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert, eingengt und im Vakuumexsikkator über  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$  getrocknet (mindestens 6 h, im allgemeinen über Nacht). Die zur Silylierung verwendete Menge eines Gemisches aus Acetonitril–MSTFA (1:1, v/v) richtet sich nach dem eingesetzten Volumen der methanolischen Oxalsäurelösung. Für je 1 ml Extraktionsmittel werden 0.1 ml Acetonitril–MSTFA zur getrockneten Probe hinzugefügt und anschliessend 30 min lang auf 80° erhitzt. Zur Acylierung fügt man 0.01 ml MBTFA pro ml Extraktionsgemisch hinzu.

### *Einfluss des Silylierungspotentials auf die Reaktionsgeschwindigkeit*

*N-Trifluoracetylierungsgeschwindigkeit von Amphetamin und Methamphetamin*  
Amphetamin bzw. Methamphetamin werden in Acetonitril–1 *M* MSTFA

(81:19, v/v) gelöst, wobei die Konzentration der Amine auf *ca.* 1 mg/ml (*ca.* 7  $\mu$ Mol) eingestellt wird. Zu diesen Lösungen fügt man 0.1 ml MBTFA (670  $\mu$ Mol) und verfolgt die Abnahme des N-TMS-Amphetamins bzw. des N-TMS-Methamphetamins bei Raumtemperatur (bei diesem Versuch 23°).

In einem aliquoten Teil der Amphetaminlösung reduziert man das Silylierungspotential durch Zugabe von 16.8  $\mu$ l Trifluoressigsäure (0.2 mMol), bzw. von 42  $\mu$ l Trifluoressigsäure (0.5 mMol). Die Acylierung erfolgt mit 0.1 ml MBTFA.

*Gaschromatographische Bedingungen.* Ein Hewlett-Packard Modell 7600 Gaschromatograph wurde verwendet. Die Trennsäule war 10% OV-225 auf Chromosorb W AW DMCS, 1.5 m  $\times$  3 mm I.D., Glass, durchgehend vom Septum bis zum Detektor. Die Temperatur des Einspritzblocks war 180°, die des Ofens 140° und die des FID 300°. Es wurde *ca.* 2.5  $\mu$ l mit der automatischen Einspritzvorrichtung auf die Trennsäulenfüllung injiziert.

#### *N-Trifluoracetylierung von Catecholaminen*

25 mg Noradrenalin bzw. Adrenalin werden in 25 ml eines Silylierungsmittelgemisches von Acetonitril, 1 M MSTFA und 2 M N-Methyl-trifluoracetamid (MTFA) — 50 g MSTFA (0.25 Mol) und 63.5 g MTFA (0.5 Mol) mit Acetonitril auf 250 ml aufgefüllt — gelöst. Die Acylierung erfolgt mit 0.05 ml MBTFA. Das molare Verhältnis von MSTFA zu MTFA wird stufenweise durch Zugabe von 0.19 ml MSTFA (1 mMol) pro 1 ml Catecholaminlösung erhöht. Die Reaktion wird gaschromatographisch wie oben beschrieben verfolgt (Ofentemperatur 180°).

## ERGEBNISSE

Unter den im Experimentellen Teil angegebenen Bedingungen wurden von allen eingesetzten Phenolalkylaminen N-TFA-O-TMS-Derivate erhalten. Die für einen MS Nachweis geeigneten Bruchstücke sind in der Tabelle I zusammengestellt, ebenso wie die zur GC Charakterisierung dienenden Kováts-Indizes<sup>27</sup> für die flüssige Phase OV-101, die wegen ihrer Temperaturbeständigkeit in der GC-MS Kombination eingesetzt wurde.

Die Tabelle II enthält die Daten einiger Substanzen, die als nahe Verwandte der Phenolalkylamine zur Abklärung des Reaktionsverlaufes der N-Trifluoracetylierung verwendet wurden bzw. die als Vorläufer bzw. Metabolite der biogenen Phenolalkylamine im biologischen Material zu erwarten sind.

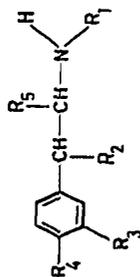
Die Kinetik der N-Trifluoracetylierung lässt sich gaschromatographisch verfolgen, wie die in der Fig. 1 wiedergegebenen Chromatogramme belegen. Die N-TFA-Verbindungen ergeben auf allen bisher untersuchten flüssigen Phasen des Silicongummi-Typs (OV-101, OV-17, OV-225 und OV-210) symmetrische Signale. Die Symmetrie der Signale bleibt auch beim massenspezifischen Nachweis in der Kombination GC-MS weitgehend erhalten, was auf eine geringe Adsorptionsneigung der N-TFA-O-TMS-Derivate im gesamten Analysensystem schliessen lässt. Die Folge ist, dass die Signalhöhe bis hinab in den Grenzbereich der Nachweisbarkeit linear mit der Konzentration abnimmt (Fig. 2).

Die GC-MS Bestimmung der Phenolalkylamine in biologischem Material ist ohne umfangreiche Probenvorbereitung möglich.

Eine Fällung der Proteine und Lipide mit Methanol, ähnlich der von Hutterer

TABELLE I

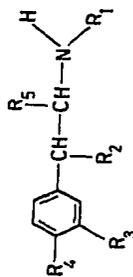
## KOVÄTS-INDIZES UND INTENSITÄTEN DER STRUKTURELEVANTEN IONEN DER N-TFA-O-TMS-PHENOLALKYLAMINE



No.	Trivialname	Koväts- Indizes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	69	73	179	267	355 298	M <sup>+</sup> -15	M <sup>+</sup>	M
1	Tyramin	1621	H	H	H	OH	H	26	100	91	—	—	—	16	305
2	Hydroxyamphetamin	1682	H	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	—	70	100	—	—	1	25	319
3	Pholedrin	1734	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	CH <sub>3</sub>	7	100	83	—	—	1	5	333
4	Norfenefrin	1741	H	OH	OH	H	H	8	100	—	73	—	3	2	393
5	Metaraminol	1743	H	OH	OH	H	CH <sub>3</sub>	7	100	—	100	—	2	1	407
6	Phenylephedrin	1750	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	H	5	100	—	98	—	3	1	407
7	Octopamin (Norphen)	1784	H	OH	H	OH	H	5	100	—	97	—	7	1	393
8	p-Hydroxy-norephedrin	1789	H	OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	41	78	—	100	—	2	1	407
9	Synephrin	1840	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH	H	14	100	—	94	—	3	1	407
10	Etilefrin	1851	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	OH	OH	H	H	2	100	—	98	—	3	1	421
11	Oxyphedrin	1858	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	3	56	—	100	—	3	1	421
12	Bamethan	2023	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	OH	H	OH	H	3	55	—	100	—	2	1	449
13	Dopamin	1828	H	H	OH	OH	H	9	100	—	49	—	4	29	393
14	Isonormethanephrin	1847	H	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H	3	100	7	—	(89)*	3	2	423
15	Normethanephrin	1888	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	3	100	8	—	(81)*	2	4	423
16	Epinin	1910	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	H	8	100	—	52	—	3	10	407
17	Noradrenalin (N-TFA)	1933	H	OH	OH	OH	H	6	100	—	9	54	1	2	481
18	Noradrenalin (N-HFB)	1949	H	OH	OH	OH	H	2	100	—	9	71	1	4	581
19	Corbasil	1937	H	OH	OH	OH	H	4	100	—	9	52	2	2	495
20	Metanephrin	1941	CH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	4	100	6	—	(80)*	2	3	437
21	Adrenalin (N-TFA)	1987	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	H	5	100	—	10	76	3	2	495
22	Adrenalin (N-HFB)	2000	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	H	2	84	—	9	100	4	3	595
23	Isoprenalin	2056	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH	OH	OH	H	3	100	—	8	66	2	2	523

\*m/e = 298.

TABELLE II  
 KOVÄTS-INDIZES UND INTENSITÄTEN DER STRUKTURELEVANTEN IONEN DER VERGLEICHSSUBSTANZEN



No.	Trivialname	Koväts- Indizes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	69	73	179	267	355	M <sup>+</sup> -15	M <sup>+</sup>	M
1	2-Amino-1-phenyläthanol	1460	H	OH	H	H	H	8	99	100	—	—	2	1	305
2	Norephedrin	1468	H	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	19	94	100	—	—	1	—	319
3	Ephedrin	1548	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	23	77	100	—	—	1	—	333
4	Tyrosin	1895	H	H	H	OH	CO <sub>2</sub> H	7	69	100	—	—	8	11	421
5	3,4-Dihydroxyphenylalanin	2057	H	H	OH	OH	CO <sub>2</sub> H	6	100	—	87	—	9	24	509
6	N-Methyl-3,4-dihydroxy-phenylalanin	2165	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	CO <sub>2</sub> H	5	100	—	95	—	9	18	523
7	3,4-Dihydroxy-phenylglykol	1913	OH	OH	OH	OH	—	—	92	3	5	100	5	4	458
								<i>m/e (%)</i>							
8	Amphetamin	1293	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	140(100), 118(89), 91(48), 69(15)							
9	N-Methylamphetamin	1389	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	154(100), 118(32), 110(24), 91(16), 69(9)							
10	Phenylalanin	1578	H	H	H	H	CO <sub>2</sub> H	220(100), 73(96), 91(75), 69(9), M <sup>+</sup> -15 = 318(10)							

*et al.* vorgeschlagen Prozedur<sup>28</sup>, reicht in vielen Fällen aus, wie die Beispiele der Etilfrinbestimmung in Plasma<sup>29</sup> und der Catecholaminbestimmung in Geweben beweisen. Die gefundenen Werte stimmen mit den Literaturangaben überein<sup>30</sup>.

#### DISKUSSION

Über die Eignung der für Phenolalkylamine, insbesondere für Catecholamine zu empfehlenden Schutzgruppen existieren in der Literatur widersprüchliche Angaben. Beispielsweise favorisieren Karoum *et al.* die N,O-Perfluorpropionylderivate<sup>3</sup>. Diesen N,O-PFP-Derivaten aber schreiben Goodwin und Mitarbeiter eine starke Absorptionsneigung im GC System zu<sup>31</sup>. Horning *et al.*<sup>21</sup> schlagen N-HFB-O-TMS-Derivate vor, denen Karoum *et al.* in der obengenannten Publikation Stabilität absprechen. Die von Brandenberger und Schnyder<sup>1</sup> bevorzugte Isothiocyanatbildung ist nur für primäre Amine geeignet, die bei gleichzeitiger Trimethylsilylierung der OH-Funktionen mit TMS-Imidazol ein mehrstündiges Erhitzen des Basen mit CS<sub>2</sub> erfordert. Unter ähnlichen, für Catecholamine als drastisch anzusehenden Reaktionsbedingungen, verläuft die Herstellung der Pentafluorbenzylidenderivate<sup>24</sup>, die ebenfalls nur von primären Aminen erhältlich sind.

Weiter sind die Angaben über die Gründe der Instabilität der derivatisierten Phenolalkylamine in Lösung unzureichend. Karoum *et al.*<sup>3</sup> finden bei den PFP-Derivaten der Catecholamine eine bessere Beständigkeit gegenüber Feuchtigkeitszutritt als bei den entsprechenden Heptafluorbutyrylverbindungen, eine Beobachtung,

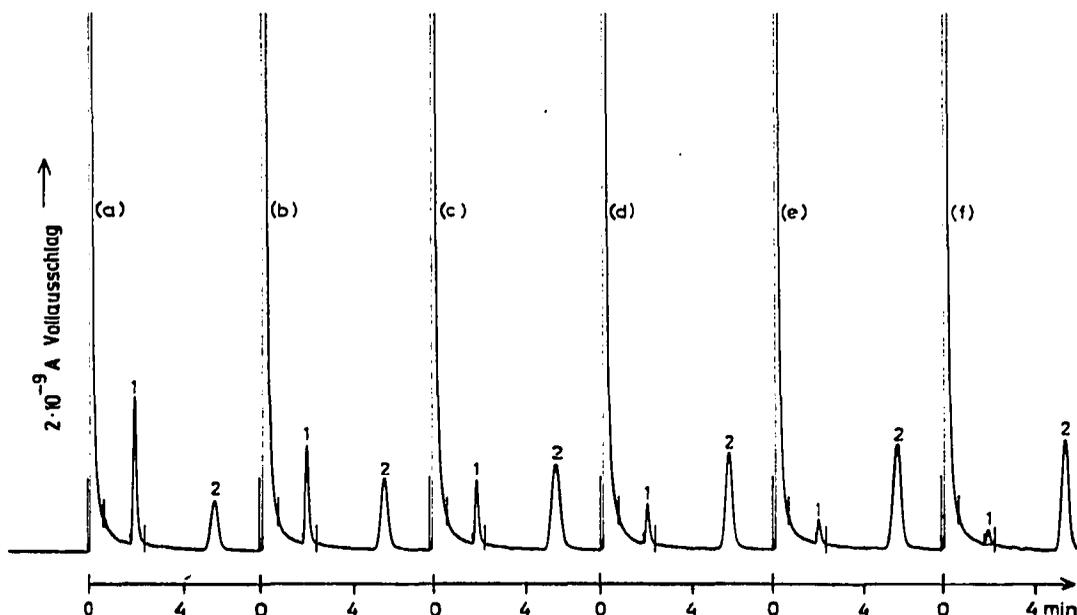


Fig. 1. Verfolgung der N-Trifluoracetylierung von O-TMS-Adrenalin (1) mit MBTFA, die zum N-TFA-O-TMS-Adrenalin (2) führt. (a) 2,5  $\mu$ l einer Lösung von Adrenalin in Acetonitril-2 M MSTFA-2 M MTFA. 1 min nach Zugabe von 50  $\mu$ l MBTFA/ml. (b) bis (f) Injektion der Reaktionslösung in Intervallen von 7,5 min. Säule: 10% OV-225 auf Chromosorb W AW DMCS, 180°, FID (vergl. Experimenteller Teil).

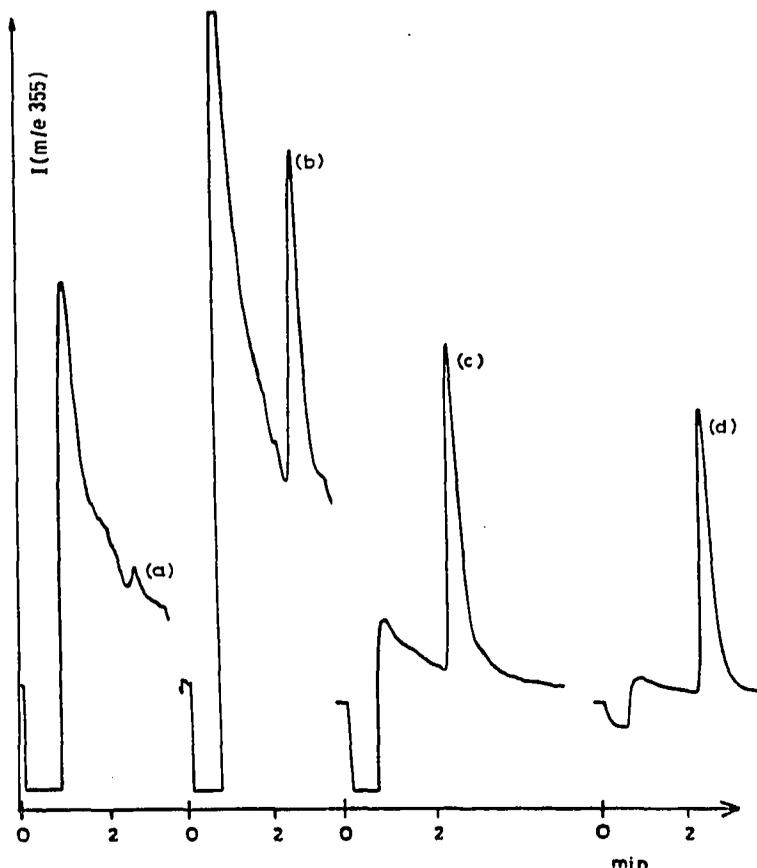


Fig. 2. Bestimmung der Nachweisgrenze von N-TFA-O-TMS-Adrenalin. Injiziert wurden jeweils 2  $\mu$ l folgender Konzentrationen von N-TFA-O-TMS-Adrenalin. In Klammern ist die Empfindlichkeit des Kompensationschreibers angegeben in Ampère pro Vollausschlag. (a) 1 ng/ml: 2 pg ( $2 \times 10^{-9}$  A); (b) 10 ng/ml: 20 pg ( $2 \times 10^{-9}$  A); (c) 100 ng/ml: 200 pg ( $2 \times 10^{-8}$  A); (d) 1.0  $\mu$ g/ml: 2 ng ( $2 \times 10^{-7}$  A).

die im Widerspruch steht zu der Tatsache, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei Acylierungsreaktionen mit steigendem Molekulargewicht der übertragenden Gruppe abnimmt ( $RG_{TFA} > RG_{PFP} > RG_{HFB}$ ).

Im Hinblick auf das Ziel, biologisch relevante Konzentrationen der biogenen Phenolalkylamine zu erfassen, müssen mögliche Derivatisierungsprozeduren auch die speziellen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse berücksichtigen.

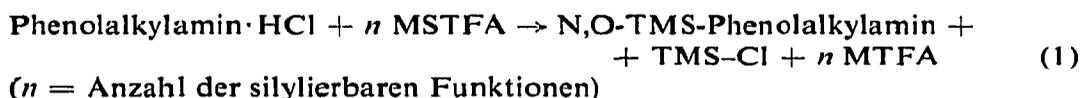
Eine für den Analytiker unangenehme Eigenschaft ist die überaus grosse, durch Schwermetallsalze katalysierte Oxydationsempfindlichkeit in neutralen und schwach-basischen pH-Bereichen. Die Stabilität bei sauren pH-Werten ist auch nur als relativ zu bezeichnen, z.B. erfolgt die selektive fluorimetrische Bestimmung des Adrenalins neben Noradrenalin bei pH 3.0 unter Zusatz von Oxydationsmitteln<sup>32</sup>. Stärker saure Medien unterhalb von pH 2.0 führen, auch in reduzierender Atmosphäre, zu Verlusten an Catecholaminen<sup>33</sup>. Bei der Isolierung der Catecholamine

wird diesem Verhalten Rechnung getragen, in dem der letzte Schritt der Aufarbeitung die Überführung in ein schwach-saures Medium vorsieht, gleichgültig, ob Aluminiumoxidadsorption, Ionenaustauscherchromatographie oder Extraktionsprozeduren für die Abtrennung der biologischen Matrix benutzt werden<sup>32</sup>. Schonendes Einengen dieser Lösungen liefert die beständigen Salze der Catecholamine.

Die nachfolgende Derivatisierung muss von diesen Salzen ausgehen, und zu einem schnellen Schutz der oxydationsempfindlichen Struktur führen.

#### *Darstellung der N-TFA-O-TMS-Derivate*

Die Trimethylsilylierung der Phenolalkylaminsalze, formuliert für die Hydrochloride als Beispiel, erfolgt mit überschüssigem MSTFA nach der Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion verläuft in drei Schritten, wobei der erste Reaktionsschritt die Freisetzung des Amins aus dem Salz ist:



Das Silylierungsmittel dient bei diesem Reaktionsschritt als HCl-Akzeptor. Es übernimmt die Funktion der sonst zur Freisetzung des Amins erforderlichen Base ohne basische Reaktionsbedingungen zu schaffen.

Der zweite Schritt, die Trimethylsilylierung der OH-Funktionen, erfolgt schnell:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weit auf der rechten Seite, im Gegensatz zu der langsamer ablaufenden Trimethylsilylierung der Aminfunktion.



Diese Reaktion erfordert zur vollständigen Trimethylsilylierung der Aminfunktion einen relativ grossen Überschuss an Silylierungsmittel, wobei das Ausmass des Überschusses von der Struktur des Amins abhängt.

Eine Sonderstellung nehmen bei dieser Art der Trimethylsilylierung primäre Amine ein, die durch überschüssiges MSTFA ebenso wie durch andere N-TMS-Amide in die N,N-Bis-TMS-amine umgewandelt werden:



Die N,N-Bis-trimethylsilylierung endständiger aliphatischer Aminfunktionen tritt unter TMS-Cl-Katalyse innerhalb weniger Stunden ein<sup>34,35</sup>. Nicht endständige primäre Aminogruppen reagieren wesentlich langsamer. So erfordert die Umwandlung

des 1-Phenyl-2-aminopropans (Amphetamin) ein mehrmonatiges Stehen bei Raumtemperatur. Sie verläuft über die Stufe der N-Mono-TMS-Verbindung zu dem N,N-Bis-TMS-derivat<sup>30</sup>.

Die N,O-TMS-Phenolalkylamine scheinen auf den ersten Blick für GC Untersuchungen vorzüglich geeignet, da die Polarität aufgehoben ist und die TMS-Derivate thermisch stabil sind. Ein FID Nachweis ist bei relativ hohen Konzentrationen und grossen Mengen an Probenmaterial möglich<sup>6-9</sup>. Der wesentlich empfindlichere ECD kann jedoch nicht verwendet werden, da der Elektroneneinfangquerschnitt der TMS-Derivate gering ist. Bis hinab in den Femtomolbereich gelingt der massenspezifische Nachweis der TMS-Verbindungen, wobei sich jedoch im Verlauf der Untersuchungen Einschränkungen bemerkbar machten, die einer breiten Anwendung entgegenstehen:

(1) N,O-TMS-Phenolalkylamine sind im überschüssigen Silylierungsmittel instabil. Diese Instabilität macht sich bei mehrstündigem Erhitzen oder bei längerer Aufbewahrung bei Raumtemperatur deutlich bemerkbar. Sie stellt keine Entsilierung durch Wasserzutritt dar, kann jedoch mit einer, durch Schwermetallionen katalysierten Oxidation erklärt werden<sup>37</sup>. Die sekundären Amine Adrenalin, Epinin und Pholedrin erweisen sich als besonders oxidationsempfindlich. Dagegen sind die N,N-Bis-TMS-Verbindungen der primären Amine unter gleichen Reaktionsbedingungen beständig.

(2) In den Massenspektren der N,O-TMS-Phenolalkylamine dominiert unter den Bedingungen der Elektronenstossionisation die  $\alpha$ -Spaltung, wobei die elektrische Ladung bevorzugt bei dem stickstoffhaltigen Bruchstück verbleibt (vergl. Fig. 3). Das über die Substitution des Phenylrestes und des  $\beta$ -C-Atoms Auskunft gebende Benzylbruchstück ist nur in geringer Intensität vorhanden. Die weiteren, in hoher Intensität aufgefundenen Massenzahlen, wie das Trimethylsilyl- bzw. Dimethylsilyloxykation (MZ = 73 bzw. = 75) sind schon im Untergrund vorhanden und wegen ihrer Unspezifität für den Nachweis nicht geeignet, wie dies für alle TMS-Derivate zutrifft.

(3) Der Umstand, dass die N-Trimethylsilylierung sowohl nach Gleichung 1c als auch nach der Gleichung 1d zu einem Gleichgewicht führt, macht sich bei Spurenanalysen nachteilig bemerkbar, denn der zur Verschiebung des Gleichgewichtes zur rechten Seite erforderliche Überschuss an Silylierungsmittel bedeutet eine unerwünschte Verringerung der Konzentration.

Die Ursache der Instabilität der silylierten Amine liegt darin begründet, dass trotz der Ausbildung einer  $d\pi p\pi$ -Bindung zwischen Silizium und Stickstoff das freie Elektronenpaar am Stickstoff noch partiell für einen oxydativen Angriff verfügbar ist. Für diese Annahme spricht nicht nur die Stabilität der N,N-Bis-TMS-amine, sondern auch die Stabilität der Phenolalkylaminesalze, in denen das freie Elektronenpaar durch die Salzbildung in Anspruch genommen wird. Dies führt zu der logischen Folgerung, dass durch Substitution der N-TMS-Gruppe durch eine N-Acylgruppe und die dadurch erfolgende Einbeziehung des freien Elektronenpaares in das Resonanzsystem des Amids stabile, oxidationsunempfindliche Derivate erhalten werden sollten.

Dies ist in der Tat der Fall, wie am Beispiel des N-TFA-O-TMS-Adrenalins gezeigt werden konnte. Die N-Acylderivate sind in der Reaktionslösung selbst nach Zugabe eines 100-fachen molaren Überschusses an  $Fe^{3+}$ -Ionen über 24 h bei 80° stabil!

Die N-Acylierung mit MBTFA, dessen Synthese und dessen acylgruppen-

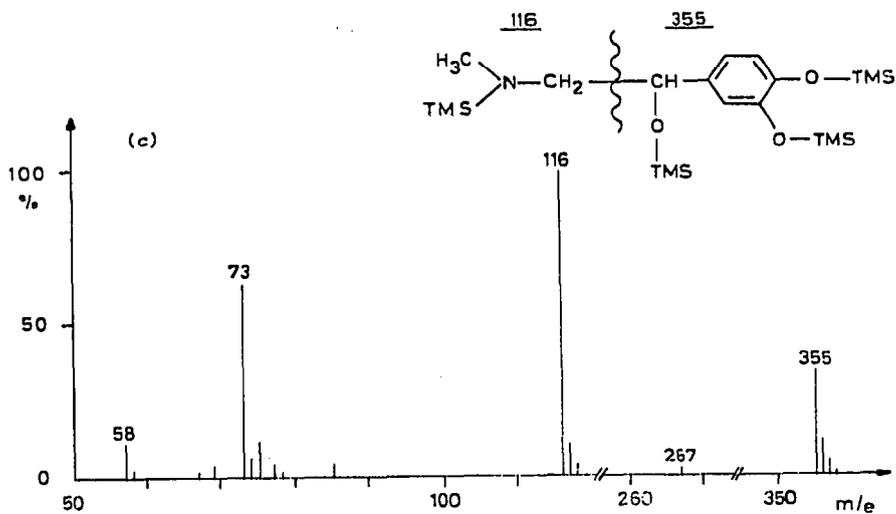
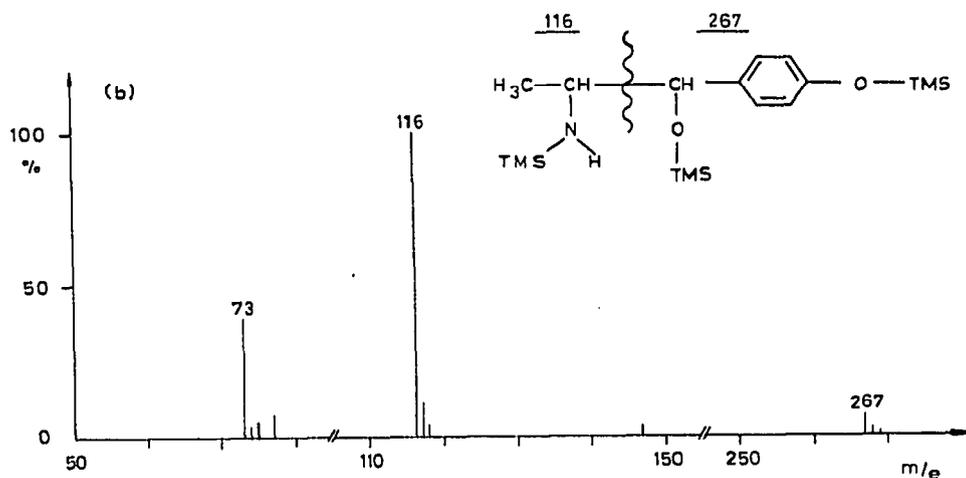
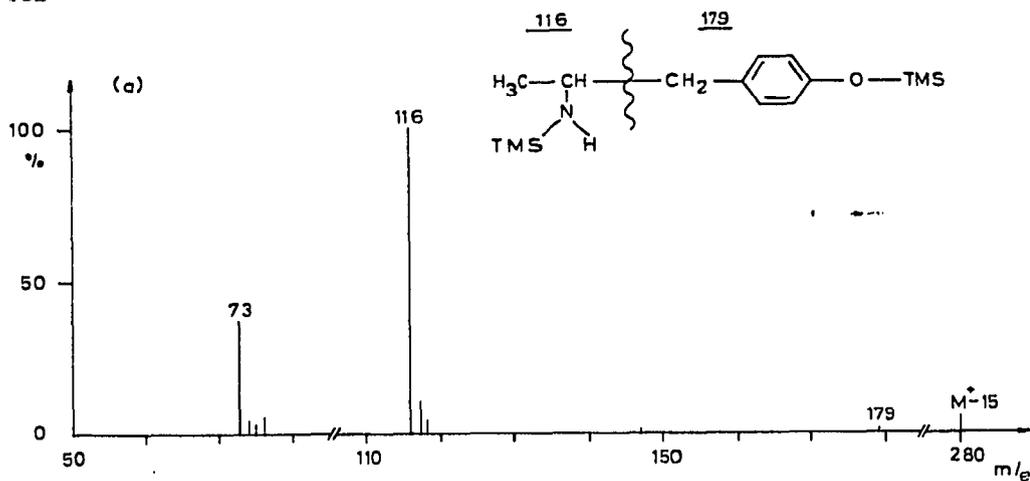
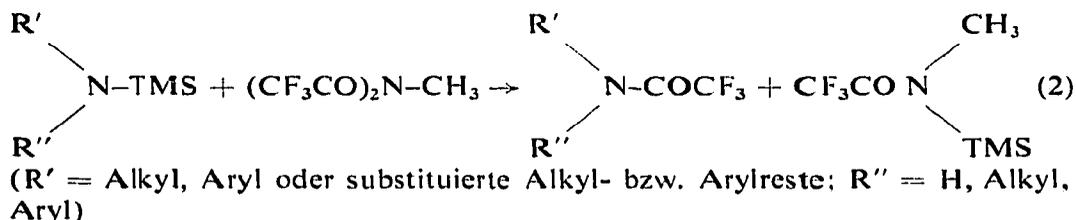


Fig. 3. Das Fragmentierungsschema der N,O-TMS-Derivate von (a) *p*-Hydroxyamphetamin  $m/e$  116 = 100%,  $m/e$  179 = 2%,  $M^+ - 15$  = 6%,  $M^+$  = 0.1%; (b) *p*-Hydroxynorephedrin  $m/e$  116 = 100%,  $m/e$  267 = 7%,  $M^+$  und  $M^+ - 15$  = 0.1%; (c) Adrenalin  $m/e$  116 = 100%,  $m/e$  355 = 35%,  $M^+$  und  $M^+ - 15$  = 0.1%.

übertragende Eigenschaften kürzlich beschrieben wurden<sup>26</sup>, erfolgt durch Zugabe des Reagenzes zu der silylierten Probe (Gleichung 2). Eine vorhergehende Entfernung des Silylierungsmittels ist nicht erforderlich. Der Vorteil dieses leichtflüchtigen Reagenzes gegenüber anderen Acylierungsmitteln ist, dass O-TMS-Funktionen nicht angegriffen werden und als Reaktionsprodukt das ebenfalls leicht flüchtige, katalytisch inaktive MTFA entsteht. MTFA ist als Endprodukt der Trimethylsilylierung mit MSTFA schon im Ansatz vorhanden, der ohne weitere Aufarbeitung für gaschromatographische Untersuchungen verwendet werden kann.



Die in obiger Gleichung formulierte Reaktion stellt formal einen Austausch der Schutzgruppen am Stickstoff, einen TMS-TFA-Austausch dar. Das N-TFA-Derivat wird in quantitativer Ausbeute erhalten, was auf das geringere thermodynamische Potential der Amidbindung zurückzuführen ist. Die Formel (2) beschreibt allgemein die Reaktion von MBTFA mit N-TMS-Derivaten, die nicht auf Phenolalkylamine beschränkt ist und auch auf Aminosäuren anwendbar ist<sup>26</sup>. Sie gilt sinngemäss abgewandelt auch für andere Bis-acylamide wie z.B. Bis-trifluoracetamid<sup>26</sup>, N-Methyl-bis-acetamid<sup>38</sup> bzw. die analogen Bis-acylamide der Pentafluorpropionsäure bzw. der Heptafluorbuttersäure.

Mit grosser Wahrscheinlichkeit verläuft jedoch die in Gleichung 2 beschriebene Acylierung über das freie Amin, da bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen primäre TMS-Amine wesentlich schneller reagieren als sekundäre N-TMS-Amine. Bewiesen wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass bei einer Verringerung des Silylierungsmittelüberschusses in der Reaktionslösung, wie sie z.B. durch Zugabe von Trifluoressigsäure erfolgen kann, die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt.

Die Kurven in der Fig. 4a zeigen den Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten von N-TMS-Amphetamin und N-TMS-Methamphetamin unter identischen Reaktionsbedingungen nach MBTFA-Zugabe. Die Acylierung verläuft wesentlich rascher bei dem N-TMS-Amphetamin als bei dem Methylhomologen. Eine Verringerung des MSTFA-Überschusses durch Trifluoressigsäure und die damit verbundene Verschiebung des Gleichgewichtes (Reaktionsgleichung 1c) beschleunigt die N-Acylierung des Methamphetamins.

Amphetamin und Methamphetamin dienen als Beispiel für primäre und sekundäre Amine, weil beide Verbindungen keine weiteren Funktionen enthalten, deren Einfluss interpretiert werden müsste. Die Phenolalkylamine verhalten sich jedoch analog, wie Versuche mit den Catecholaminen Noradrenalin und Adrenalin beweisen (Fig. 4b).

*Das Silylierungsgleichgewicht, seine Bedeutung für die Herstellung und die Gaschromatographie der N-TFA-O-TMS-Derivate*

Bei der Herstellung von TMS-Derivaten für GC Untersuchungen macht sich

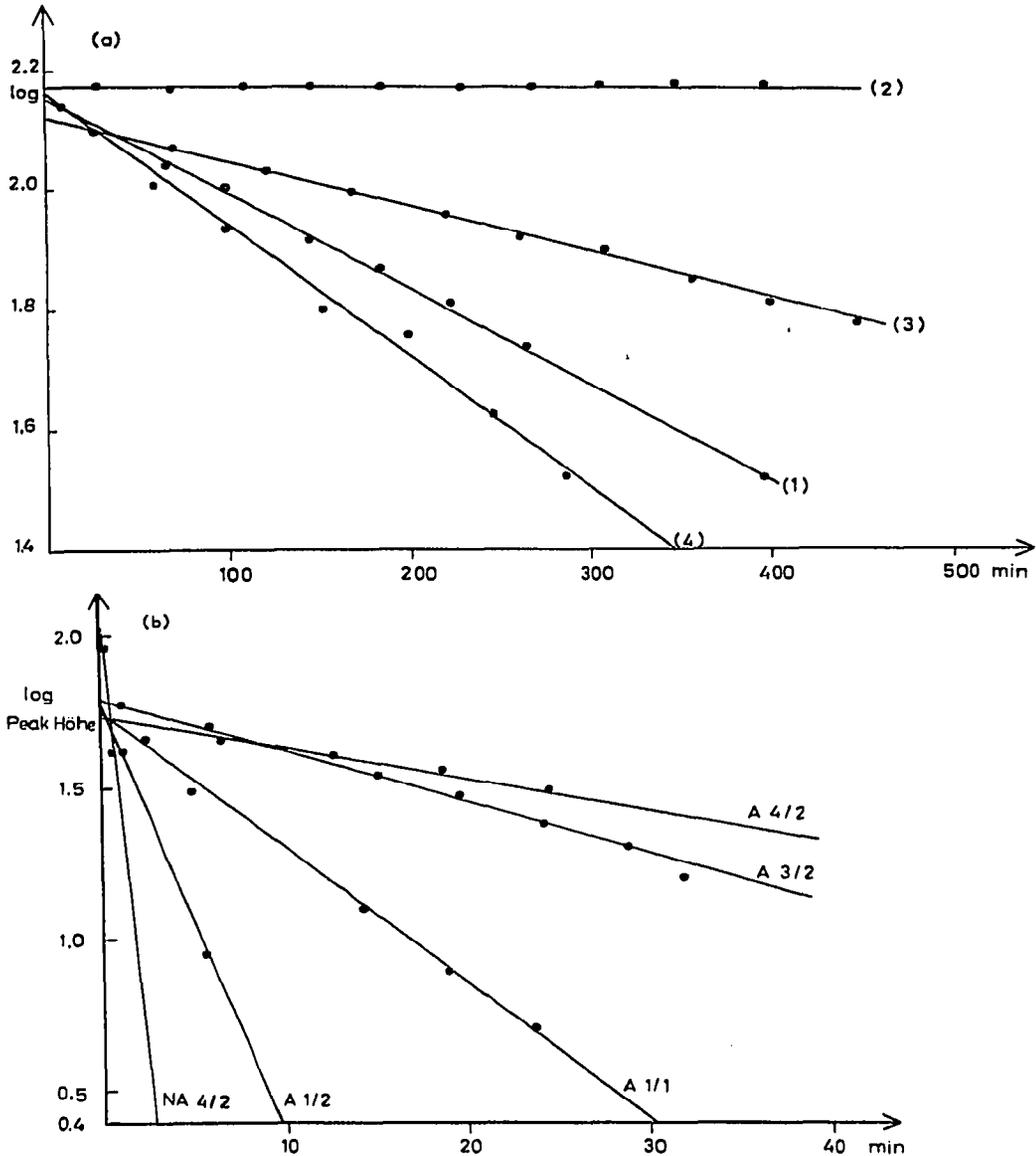


Fig. 4. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der N-Trifluoracetylierung mit MBTFA von dem Silylierungspotential des Reaktionsansatzes. (a) Amphetamin (1) und Methamphetamin (2) in Acetonitril-1 M MSTFA, Methamphetamin in Acetonitril-0.8 M MSTFA-0.2 M MTFE (3), Methamphetamin in Acetonitril-0.5 M MSTFA-0.5 M MTFE (4). (b) Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A) in Acetonitril-MSTFA-MTFE: Die Indizes geben die molaren Konzentrationen von MSTFA und MTFE im Reaktionsansatz an.

die Tatsache, dass es sich bei der Silylierung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, in vielen Fällen nicht bemerkbar, weil durch den hohen Überschuss an Silylierungsmittel ein vollständiger Umsatz erreicht wird. Die geringen, im Gleichgewicht noch vorhandenen Konzentrationen der nicht silylierten Komponenten entziehen sich

dem analytischen Nachweis. Grundsätzlich gilt jedoch, dass die Lage des Gleichgewichtes abhängig ist von der Art des Silylierungsmittels (Y-TMS), der zu silylierenden Funktion (X-H) und dem molaren Verhältnis der Reaktionspartner zueinander.



Bei der Reaktionsfolge, die zu den N-TFA-O-TMS-Phenolalkylaminen führt, ist das Vorhandensein eines Silylierungsgleichgewichtes an zwei Stellen zu beachten:

(1) Wird bei der Umsetzung der Phenolalkylaminsalze ein grosser molarer Überschuss an MSTFA verwendet, so verläuft die Reaktion mit primären Aminen bis zur Stufe der N-Bis-TMS-Amine bzw. mit sekundären Aminen zu den N-TMS-N-Alkylaminen. Beide Substitutionstypen reagieren wie vorstehend gezeigt wurde, nur langsam mit MBTFA.

(2) Nach der Umsetzung mit MBTFA enthalten primäre Phenolalkylamine noch ein aktives Proton, das Amidproton, das mit überschüssigem MSTFA bis zur Erreichung des Gleichgewichtszustandes reagiert. Gaschromatographisch erhält man dann zwei Signale für das freie und das N-TMS-substituierte Amid, ein Effekt, der unerwünscht ist, weil er die Interpretation der Analyseergebnisse erschwert.

Diese Beobachtung, dass N-Acyl-phenolalkylamine und, wie in einem anderen Zusammenhang festgestellt wurde, auch N-Acyl-aminosäuren zwei Signale ergeben, deren relatives Verhältnis zueinander von der Art und dem Überschuss des verwendeten N-TMS-Amids abhängt, war der Anlass, Silylierungsgleichgewichte gaschromatographisch zu bestimmen<sup>39</sup>. Wenn Amide als Trimethylsilyldonatoren und Trimethylsilylakzeptoren eingesetzt werden, können die im Gleichgewicht (Formel 3) vorhandenen Konzentrationen analytisch ermittelt werden. Hieraus lässt sich die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, sowie die freie Reaktionsenergie berechnen:

$$K = \frac{[X-TMS][Y-H]}{[X-H][Y-TMS]} \quad (4)$$

$$\mu^0 = -RT \ln K \quad (5)$$

Setzt man analog dem Vorgehen bei der Festlegung der Redoxpotentiale das chemische Potential des Bezugsamids gleich 0, so erhält man relative Silylierungspotentiale. Mit MSTFA als Bezugsamid, das als flüchtiges N-TMS-Amid gaschromatographisch ohne Störung durch andere Amide bestimmt werden kann, ergeben sich die in der Tabelle III für einige N-TMS-Amide angegebenen relativen Silylierungspotentiale.

Aus den Werten lässt sich erkennen, dass die Silylierungspotentiale der Amide strukturabhängig sind. Sie nehmen mit zunehmender Elektronegativität der Substituenten in  $\alpha$ -Stellung des Acylrestes ebenso zu, wie mit der Raumerfüllung eines N-Alkylsubstituenten. Da der Trimethylsilyloxy-substituierte Phenolalkylaminrest sterisch anspruchsvoll ist — das Silylierungspotential liegt zwischen dem des N-Isopropyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamids und dem des *N-tert.*-Butyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamids — reicht eine geringe Reduzierung des Silylierungspotentials des Ansatzes aus, die N-TMS-Substitution der primären Amide zu verhindern. Von den sich anbietenden Möglichkeiten berücksichtigen die im experimentellen Teil angegebenen Vorschriften die speziellen Anforderungen des gaschromatographischen Spuren-

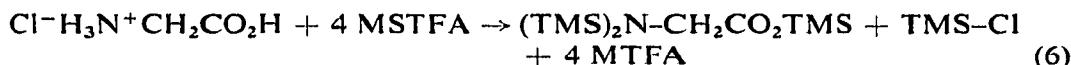
TABELLE III

ABHÄNGIGKEIT DES SILYLIERUNGSPOTENTIALS VON DER SUBSTITUTION DES ACYLRESTES (a) UND DES AMIDSTICKSTOFFS (b)<sup>39</sup>

a	$-\mu^0$ (cal)	b	$-\mu^0$ (cal)
N-Methyl-acetamid	-1048	Acetamid	-4340
N-Methyl-chloracetamid	-472	N-Methyl-acetamid	-1048
N-Methyl-dichloracetamid	416	N-Äthyl-acetamid	-844
N-Methyl-trichloracetamid	1799	N-Propyl-acetamid	-376
N-Methyl-trifluoracetamid	0	N-n-Butyl-acetamid	-342
		N-Isopropyl-acetamid	266
N-Methyl-heptafluorbuttersäureamid	455	N-Cyclohexyl-acetamid	698
		N-tert.-Butyl-acetamid	1789

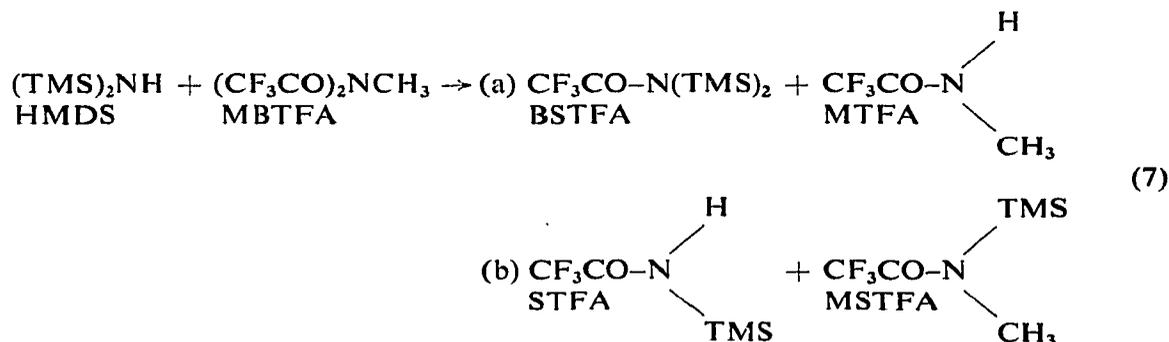
nachweises im ppm- und ppb-Bereich. Das notwendige Silylierungspotential wird durch Zugabe eines leichtflüchtigen, die GC der Phenolalkylamine nicht störenden Silylakzeptors (Trifluoressigsäure, Mercaptoäthanol usw.) zu dem Silylierungsreagenz eingestellt. Eine weitere Möglichkeit der Reduzierung des Silylierungspotentials, die gleichzeitig Verluste der Spurenkomponenten durch Adsorption auf der Glasoberfläche der Reaktionsgefäße vermeidet, ist der Zusatz definierter Mengen silylierbarer organischer Verbindungen, wie z.B. Oxalsäure oder Glycin.

Das Glycinhydrochlorid, das beim Einengen eines salzsauren Extraktes ausfällt, erfüllt gleichzeitig die Funktion eines "Silylierungspuffers". 1 Mol Glycinhydrochlorid kann bis zu 4 Mol MSTFA verbrauchen:



Jede dieser Trimethylsilylfunktionen kann gegenüber Hydroxylgruppen als Silylierungsmittel fungieren, so dass im Falle der Phenolalkylamine bzw. der Phenolalkylamide solange ein Schutz gegen Wasserzutritt gegeben ist, wie N-TMS-Funktionen im Ansatz vorhanden sind.

Bewährt hat sich weiter die im experimentellen Teil vorgeschriebene Zugabe von Hexamethyldisilazan (HMDS). Neben dem Schutz gegen Feuchtigkeit bei mehrfachem Öffnen der Glasschliffgefäße bei Wiederholmessungen zerstört HMDS den noch vorhandenen Überschuss von MBTFA unter Bildung von MTFA, MSTFA, N-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (STFA) und BSTFA nach folgender Gleichung:



Bei einer Abänderung der Derivatisierungsvorschrift sollte diese Reaktionsfolge, die zur *in situ* Synthese von N-TMS-Amiden führt und damit eine unerwünschte Erhöhung des Silylierungspotentials des Ansatzes bewirkt, beachtet werden.

#### Das Fragmentierungsschema der N-TFA-O-TMS-Phenolalkylamine

Für den MS Nachweis ist ein Fragmentierungsschema erwünscht, das Bruchstücke mit hoher Intensität bei möglichst hohen Massenzahlen aufweist. Die aussagekräftigste Information würde eine hohe Ausbeute an Molekülonen erbringen, wie sie neuerdings mit der Technik der chemischen Ionisation<sup>40</sup> angestrebt wird. Nach Elektronenstossionisation ist jedoch durch die üblicherweise verwendete hohe Anregungsenergie von 70 eV ein weitgehender Zerfall des Moleküls zu erwarten. Eine Erniedrigung der Elektronenenergie auf 20 eV vermindert die Gesamtausbeute an Ionen so weit, dass die absolute Intensität an charakteristischen Bruchstückionen abnimmt, trotz deren relativer Zunahme innerhalb des Massenspektrums.

Die oben schon diskutierte Spaltung der N,O-TMS-Phenolalkylamine führt ebenso wie die N,O-Halogenacylierung<sup>3</sup> nach  $\alpha$ -Spaltung zu einer Ladungsstabilisierung an dem stickstoffhaltigen Bruchstück. Anders verhalten sich die O-TMS-Phenolalkylamide, bei deren Zerfall der O-Trimethylsiloxy-substituierte Benzylrest bevorzugter Ladungsträger ist. Dieses Bruchstück gibt Auskunft über den Substitutionstyp des Aromaten und des  $\beta$ -C-Atoms (Fig. 5).

Die Tendenz zur Ladungsstabilisierung an diesem Rest ist so gross, dass bei einigen Verbindungen unter den angegebenen experimentellen Bedingungen dieses Signal zum Basispeak der oberhalb der Massenzahl 50 registrierten Signale wird. Bemerkenswert ist ferner die relativ hohe Ausbeute an Molekülonen der N-TFA-O-TMS-Derivate, die nur von den Isothiocyanaten bzw. den Benzylidenderivaten primärer Amine erreicht bzw. übertroffen werden<sup>1,22</sup>. In wie weit das Fragmentierungsschema durch die Eigenschaften der Acylgruppe beeinflusst wird, bedarf noch der Abklärung, jedoch scheinen Unterschiede zu bestehen. Der Übergang von der TFA- zur HFB-Gruppe erhöht die relative Ausbeute an Molekülonen (vergl. Tabelle II).

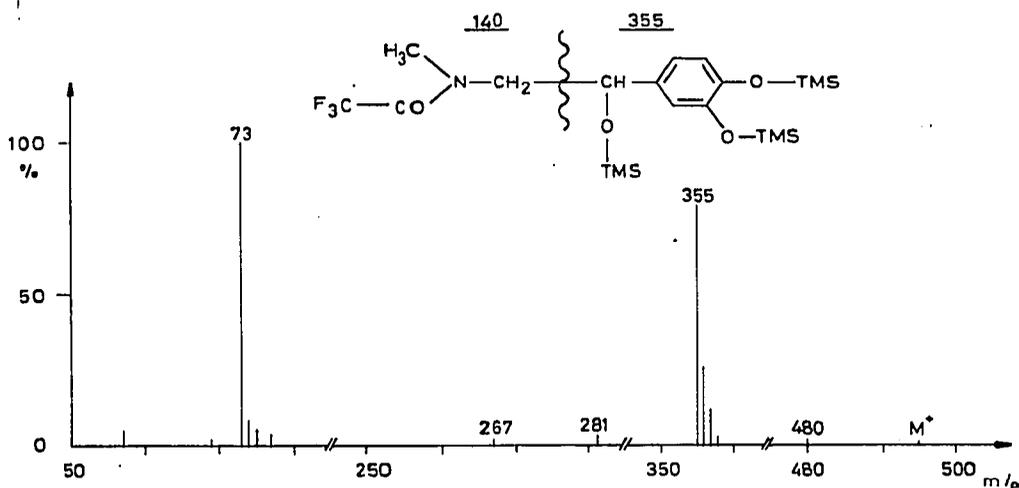


Fig. 5. Das Massenspektrum und Fragmentierungsschema des N-TFA-O-TMS-Adrenalins.

N-Acetyl-O-TMS-catecholamine, die weniger flüchtig als die analogen perfluorierten Acylverbindungen sind und aus diesem Grunde weniger intensiv untersucht wurden, spalten Acetamid als Neutralkmolekül ab und liefern ein recht intensives Ion der Massenzahl 368, das als Olefin das Kohlenstoffskelett des Phenyläthylaminabkömmlings erkennen lässt (Fig. 6).

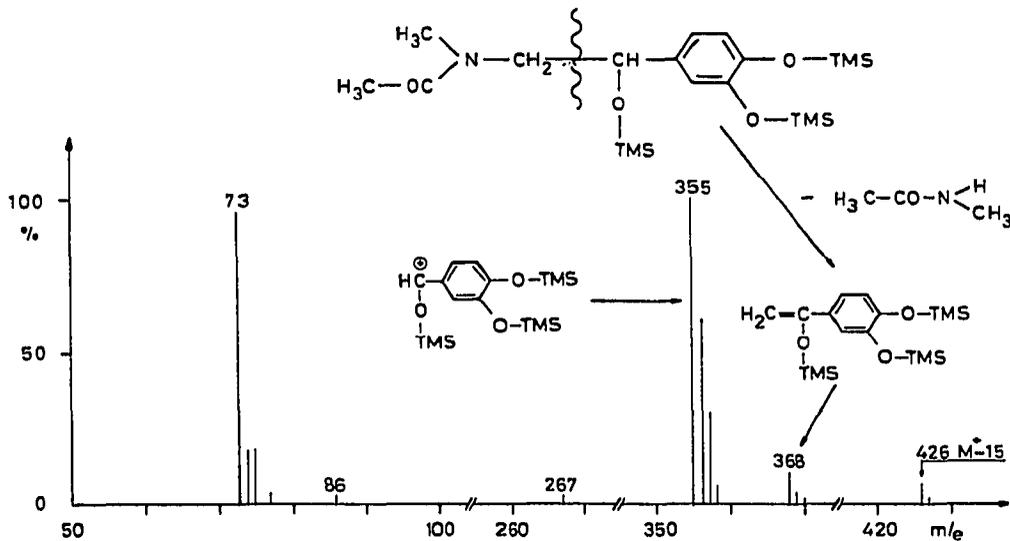


Fig. 6. Massenspektrum und Fragmentierungsschema des N-Acetyl-O-TMS-Adrenalins.

Das beobachtete einheitliche Zerfallsschema ist für gaschromatographische Untersuchungen auch noch aus einem weiteren Grund attraktiv: Verbindungen mit analoger Struktur, aber unterschiedlicher Retentionszeit können als innerer Standard bei quantitativen Bestimmungen benutzt werden. So kann beispielsweise Isoprenalin, das als Pharmakon bequem in hoher Reinheit zugänglich ist, als innerer Standard für die Adrenalin-Noradrenalin-Bestimmung herangezogen werden (vergl. Fig. 7).

#### Anwendung auf biologische Probleme

Ein struktur-spezifischer und hoch-empfindlicher GC Detektor, wie das Massenspektrometer, bietet bei der Analyse von biologischem Material und anderen, komplex zusammengesetzten Gemischen drei wesentliche Vorzüge gegenüber anderen Detektionsarten:

- (1) In Verbindung mit der Retentionszeit oder den Kováts-Indizes<sup>27</sup> wird eine substanz-spezifische Anzeige erzielt (vergl. Lit. 41).
- (2) Zugänglich werden Konzentrationsbereiche, die sonst nicht oder nur in Ausnahmefällen erreichbar sind.
- (3) Langwierige und über viele Aufarbeitungsschritte sich hinziehende Proben-  
vorbereitungen können auf einfache und überschaubare Arbeitsschritte reduziert werden.

Wie einfach sich die Probenvorbereitung von Phenolalkylaminen in günstig

gelagerten Fällen gestaltet, sei am Beispiel der Bestimmung von Etilefrin in Plasma sowie der biogenen Catecholamine in Geweben demonstriert.

Etilefrin ist als 2-Äthylamino-1-(3'-hydroxyphenyl)äthanol ein pharmakologischer Wirkstoff, dessen physiologische Aktivität aus der nahen Verwandtschaft zu den körpereigenen Hormonen Noradrenalin und Adrenalin herrührt. Zur quantitativen Bestimmung der Blutspiegel reicht es aus, Plasma mit dem neunfachen Volumen salzsauren Methanols zu versetzen, die ausgefallenen Proteine und Lipide abzuzentrifugieren, den methanolischen Überstand einzuengen und nach dem Trocknen zu derivatisieren. Die Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung, bei der die Verluste der Aufarbeitung durch Zusatz eines inneren Standards kompensiert werden, ist ausgezeichnet. Die relative Standardabweichung von Mehrfachbestimmungen liegt unter 5%.

Die in der Fig. 7 wiedergegebenen Chromatogramme zeigen die Möglichkeiten, gleichzeitig aber auch die Grenzen einer einfachen Aufarbeitungsprozedur auf. Die

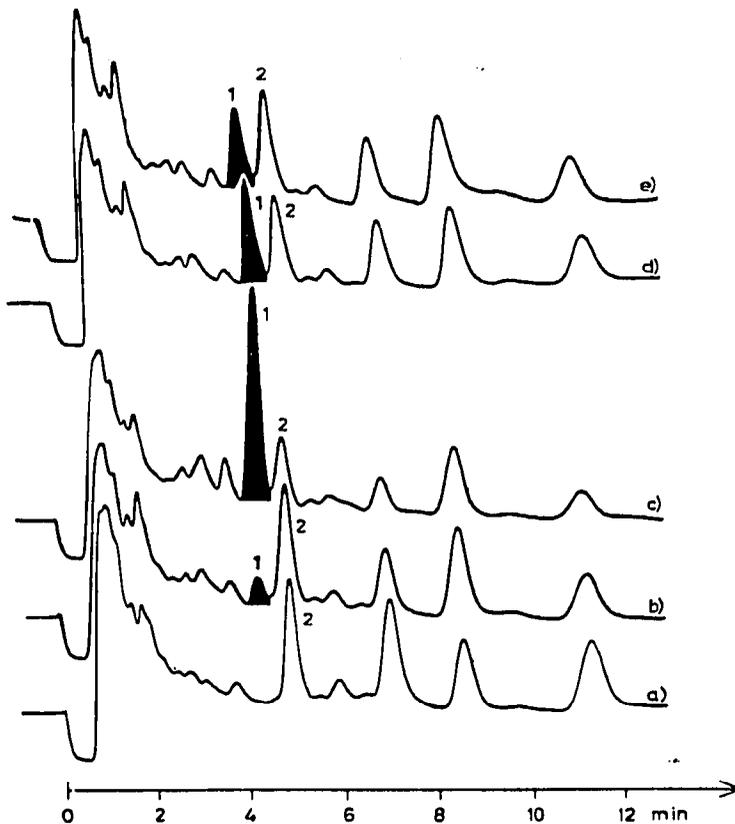


Fig. 7. Plasmakonzentrationen von Etilefrin, 2-Äthylamino-1-(3'-Hydroxyphenyl)äthanol, nach oraler Gabe von 40 mg des Wirkstoffes. Wiedergegeben sind die Gaschromatogramme der massenspezifischen Detektion ( $m/e$  267). 1 = Etilefrin; 2 = *p*-Hydroxynorephedrin als innerer Standard. Die schwarz ausgefüllten Signale des Etilefrins entsprechen Plasmakonzentrationen von: (a) 0 ng/ml, Leerwert; (b) 37 ng/ml, 1 h nach Applikation; (c) 597 ng/ml, 2 h nach Applikation; (d) 225 ng/ml, 4 h nach Applikation; (e) 142 ng/ml, 6 h nach Applikation.

im weiteren Verlauf des Chromatogramms eluierten Begleitstoffe verlängern wesentlich die GC Analysenzeit. Im Einzelfall muss entschieden werden, ob zu Gunsten einer schnellen gaschromatographische Analyse sich der Aufwand von weiteren Trennschritten zur Entfernung der störenden Verunreinigungen lohnt.

Für die Bestimmung der biogenen Amine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin bzw. deren O- oder N-Methylierungsprodukte in Geweben erscheint der oben aufgezeigte Weg der direkten methanolischen Extraktion jeder anderen Methode überlegen zu sein. Nach Entnahme der Gewebsproben und Homogenisieren in einem Gemisch von Methanol-Oxalsäure ist der erhaltene alkoholische Extrakt nach Einengen, Trocknen und Derivatisierung unmittelbar für die gaschromatographische Analyse geeignet (Fig. 8).

Dass es sich bei den vermessenen Verbindungen tatsächlich um die angesprochenen Catecholamine handelt, lässt sich beweisen, indem unter Verwendung der gleichen gaschromatographischen Trennsäule weitere charakteristische Ionen vermessen werden, oder wie im Falle der relativ hohen Konzentrationen der Catecholamine in der Nebenniere durch Aufnahme von Massenspektren im Bereich von 40–600 Massenzahlen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die N-Trifluoracetamid-O-trimethylsilyl-Derivate sind ausgehend von den Phenolalkylaminen bzw. deren Salze durch Trimethylsilylierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid und nachfolgender N-Acylierung mit N-Methyl-bis-trifluoracetamid leicht zugänglich. Für die Analyse von biologischem Material hat diese Derivatisierungstechnik den Vorteil, dass die nach Isolierung anfallenden Salze der Phenolalkylamine direkt, d.h. ohne vorhergehende Freisetzung der Basen, umgesetzt werden können. Die Entfernung der überschüssigen Reagenzien ist nicht erforderlich, da nach Übertragung der Schutzgruppen sowohl aus dem Silylierungsmittel als auch aus dem Acylierungsmittel das leichtflüchtige und katalytisch inaktive N-Methyl-trifluoracetamid freigesetzt wird.

Um eine schnelle und quantitative N-Acylierung zu erreichen, muss die Lage der im Verlaufe der Reaktion auftretenden Silylierungsgleichgewichte beachtet werden. Für N-TMS-acetamide werden versuchsweise relative Trimethylsilylierungspotentiale definiert, die aus gaschromatographisch ermittelten Gleichgewichtskonzentrationen berechnet wurden.

Die N-TFA-O-TMS-Phenolalkylamine stellen thermisch stabile und gegen oxidative Einflüsse beständige Derivate dar, die ausserdem ausgezeichnete gaschromatographische Eigenschaften besitzen. Bei Feuchtigkeitsausschluss sind selbst die in freier Form extrem oxidationsempfindlichen Catecholamine mehrere Monate beständig.

Unter den Bedingungen der Elektronenstoss-ionisation findet im Gegensatz zu anderen Derivatisierungsarten die Ladungsstabilisierung an dem Trimethylsilyloxy-substituierten Benzylrest statt. Dieses, in hoher Ausbeute auftretende charakteristische Bruchstückion gibt Auskunft über den Grad der Hydroxyl-Substitution des Phenylringes und des  $\beta$ -C-Atoms. Nachweisgrenzen für die einzelnen Phenolalkylamine bis herab in den Femtomolbereich erreicht man, wenn man den Konzentrationsverlauf dieses Bruchstückions während einer gaschromatographischen Analyse registriert.

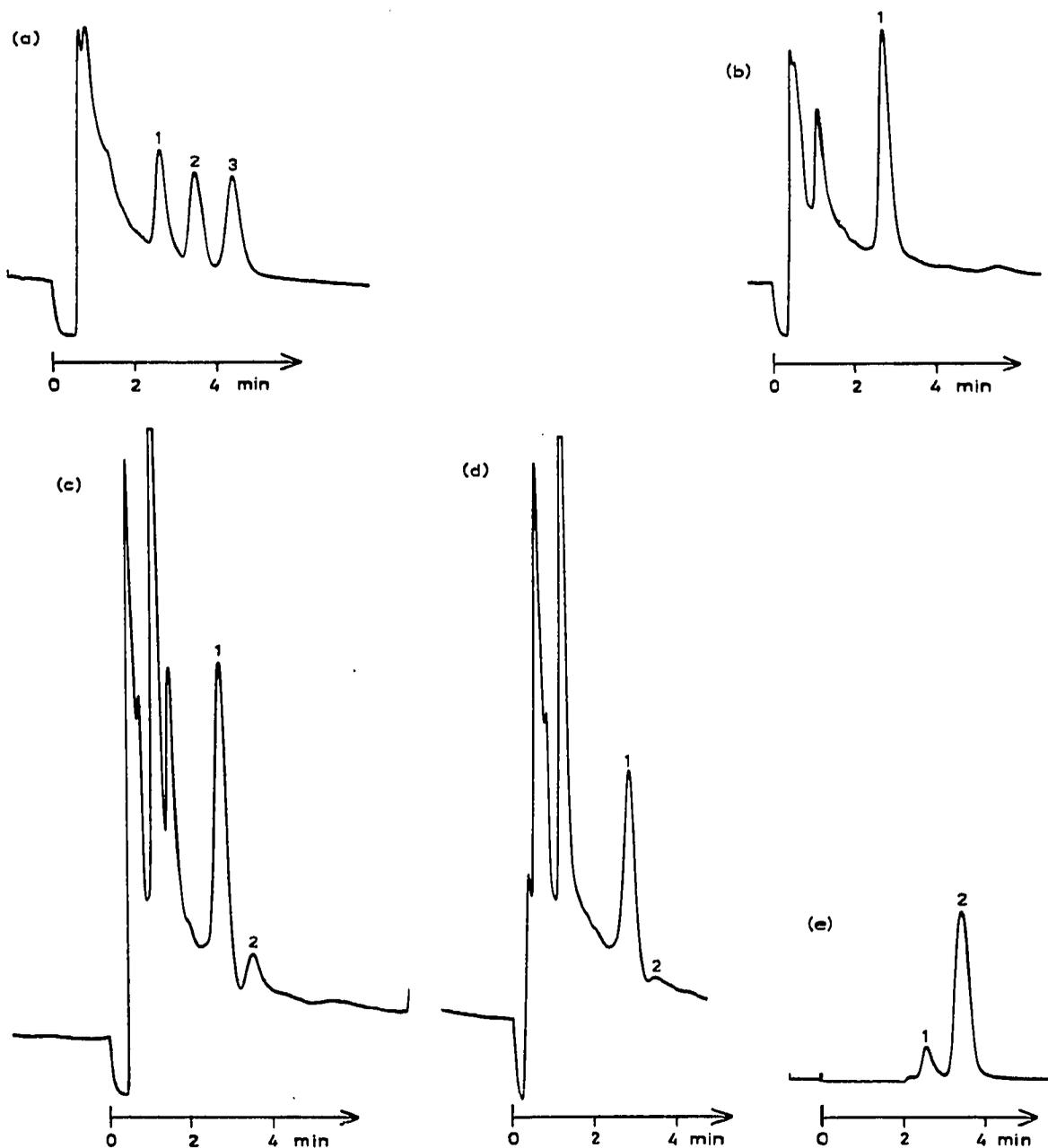


Fig. 8. GC-MS Nachweis von Catecholaminen in Geweben. (a) Standard mit Noradrenalin (1), Adrenalin (2) und Isoprenalin (3);  $2 \mu\text{l}$  einer Lösung mit  $100 \text{ ng/ml}$ . (b) Medulla:  $1.4 \mu\text{g}$  Noradrenalin (1)/g; injiziert:  $2 \mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes entsprechend  $0.36 \text{ mg}$  Gewebe. (c) Kleinhirn:  $1.2 \mu\text{g}$  Noradrenalin (1)/g,  $0.11 \mu\text{g}$  Adrenalin (2)/g; injiziert:  $2 \mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes entsprechend  $0.62 \text{ mg}$  Gewebe. (d) Grosshirn:  $0.9 \mu\text{g}$  Noradrenalin (1)/g und  $0.05 \mu\text{g}$  Adrenalin (2)/g; injiziert:  $2 \mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes entsprechend  $0.72 \text{ mg}$  Gewebe. (e) Nebenniere:  $200 \mu\text{g}$  Noradrenalin (1)/g und  $1320 \mu\text{g}$  Adrenalin (2)/g; injiziert:  $2 \mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes entsprechend  $0.13 \text{ mg}$  Gewebe. Die Empfindlichkeit des Kompensationsschreibers wurde gegenüber den Analysen (a)-(d) auf  $1/100$  reduziert.

## DANK

Dem Bundesinstitut für Sportwissenschaft danke ich für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

## LITERATUR

- 1 H. Brandenberger und D. Schnyder, *Z. Anal. Chem.*, 261 (1972) 297.
- 2 S. H. Koslow, F. Cattabeni und E. Costa, *Science*, 176 (1972) 177.
- 3 F. Karoum, E. Cattabeni, E. Costa, C. R. J. Ruthven und M. Sandler, *Anal. Biochem.*, 47 (1972) 550.
- 4 B. F. Maume, P. Bournot, J. C. Lhuguenot, C. Baron, F. Barbier, G. Maume, M. Prost und P. Padiou, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1073.
- 5 G. Belvedere, S. Caccia, A. Frigerio und A. Jori, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 355.
- 6 L. Birkofer und M. Donike, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 270.
- 7 M. G. Horning, A. M. Moss und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 597.
- 8 W. C. Butts, *Anal. Biochem.*, 46 (1972) 187.
- 9 N. P. Sen und P. L. McGeer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13 (1963) 390.
- 10 Y. Maruyama und A. E. Takemori, *Anal. Biochem.*, 49 (1972) 240.
- 11 D. Clarke, S. Wilk und S. E. Gitlow, *J. Gas Chromatogr.*, 4 (1966) 310.
- 12 D. R. Sharman, *Brit. J. Pharmacol.*, 36 (1969) 36.
- 13 D. E. Coppin, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 52 (1969) 1044.
- 14 E. Anggard und G. Sedvall, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1250.
- 15 L. M. Bertani, S. W. Dziedzic, D. C. Clarke und S. E. Gitlow, *Clin. Chim. Acta*, 30 (1970) 227.
- 16 S. Kawai und Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 16 (1969) 699.
- 17 K. Imai, M. Sugiura und Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 19 (1971) 409.
- 18 E. L. Arnold und R. Ford, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 85.
- 19 I. L. Martin und G. B. Ansell, *Biochem. Pharmacol.*, 22 (1973) 521.
- 20 Kim Ping Wong, C. R. Ruthven und M. Sandler, *Clin. Chim. Acta*, 47 (1973) 215.
- 21 M. G. Horning, A. M. Moss, E. A. Boucher und E. C. Horning, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 311.
- 22 N. Narasimhachari und P. Vouros, *Anal. Biochem.*, 45 (1972) 154.
- 23 P. Capella und E. C. Horning, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 316.
- 24 A. C. Moffat und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 222 (1970) 248.
- 25 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 103.
- 26 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 78 (1973) 273.
- 27 A. Wehrli und E. Kovats, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1959) 2709.
- 28 F. Hutterer, J. Roboz, L. Sarkozi, A. Ruhig und P. Bacchin, *Clin. Chim.*, 8 (1971) 789.
- 29 M. Donike und H. D. Dell, in Vorbereitung.
- 30 M. Holzbauer und D. F. Sharman, in H. Blaschko und E. Muscholl (Herausgeber), *Catecholamines*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, pp. 113–170.
- 31 B. L. Goodwin, C. R. J. Ruthven, M. Sandler und B. Hine, *Clin. Chim. Acta*, 44 (1973) 271.
- 32 H. Weil-Malherbe, in D. Glick (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Suppl. Vol., Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 1972, S. 191.
- 33 J. Häggendal, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 14 (1962) 537.
- 34 L. Birkofer und D. Brokmeier, *Tetrahedron Lett.*, (1963) 1325.
- 35 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 121.
- 36 M. Donike, unpublizierte Versuche.
- 37 M. Donike, H. Suberg und L. Jaenicke, *J. Chromatogr.*, 85 (1973) 9.
- 38 A. W. Hofmann, *Chem. Ber.*, 14 (1881) 2730.
- 39 G. Schroers, *Dissertation*, Universität Köln, Köln, 1973.
- 40 D. M. Schoengold und B. Munson, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1811.
- 41 H. Nau und K. Biemann, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 426.