

CHROM. 8053

**Note**

**Schnelle Derivatisierung von 3-Methoxytyramin, Normetanephrin und Metanephrin zu Trimethylsilyltrifluoracetylderivaten für die gaschromatographische Analyse**

G. SCHWEDT und H. H. BUSSEMAS

*Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, Ardeystrasse 67, 46 Dortmund (B.R.D.)*

(Eingegangen am 11. Oktober 1974)

Im Gegensatz zu den Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin liegen die entsprechenden O-Methylmetaboliten im Urin in weitaus höheren Konzentrationen vor (Tabelle I). Es besteht daher —ebenso wie für 3-Methoxytyramin (= Metabolit des Dopamins)— nach einer Anreicherung die Möglichkeit, geeignete Derivate auch mit dem Flammenionisationsdetektor (FID) zu bestimmen.

TABELLE I

AUSSCHEIDUNG DER KATECHOLAMINE UND IHRER O-METHYLMETABOLITEN IM URIN

| Substanz         | Mittlere Ausscheidung<br>(frei + konjugiert) ± S.D.<br>(µg/Tag) | Methode   | Literatur |
|------------------|---|---|-----------|
| Dopamin          | 402.4 ± 86.3  | GC mit ECD nach<br>Abtrennung an Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 1         |
| Adrenalin        | 24.2 ± 4.0  |   |           |
| Noradrenalin     | 52.1 ± 15.0   |   |           |
| 3-Methoxytyramin | 327 ± 168   | Fluorimetrisch nach<br>Abtrennung mit einem<br>Ionenaustauscher | 2         |
| Metanephrin      | 133 ± 75  |   |           |
| Normetanephrin   | 175 ± 105   |   |           |

Für ein Routineverfahren ist die Trifluoracetylierung dieser Verbindungen und die anschließende Bestimmung nach gaschromatographischer (GC) Trennung mit dem Elektroneneinfangdetektor (ECD)<sup>3</sup> wegen der bekannten Störanfälligkeiten (Instabilität der Derivate, geringer Linearitätsbereich des Detektors) wenig geeignet.

Die Trimethylsilylierung der Amine zeigt jedoch wegen der verschiedenen reaktiven Gruppen besondere Schwierigkeiten: Sen und McGeer<sup>4</sup> wandeln die Amine mit HMDS\* in Pyridin in Trimethyläther um (20 h bei 95°). Jedoch kann hierbei eine

\* Abkürzungen der Derivatisierungsmittel: BSA = N,O-Bis-(trimethylsilylacetamid); BSTFA = N,N-Bis-(trimethylsilyltrifluoracetamid); HMDS = 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan; MBTFA = N-Methyl-bis-(trifluoracetamid); MSHFBA = N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorbutyramid; MSTFA = N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid; TFAA = Trifluoracetanhydrid; TMCS = Trimethylchlorosilan; TSIM = N-Trimethylsilylimidazol.

teilweise N-Silylierung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Horning *et al.*<sup>5</sup> führen daher die selektive O-Silylierung mit TSIM in Pyridin oder Acetonitril durch (2–3 h bei 60°). Von Bègue *et al.*<sup>6</sup> wird eine 12-h Umsetzung mit BSA + TMCS in Pyridin bei 60°, von Cashaw *et al.*<sup>7</sup> mit BSA ohne Lösungsmittel bei 76° für 3 h beschrieben.

Eine vollständige N-Silylierung (einschliesslich der O-Silylierung) kann nach Horning *et al.*<sup>5</sup> nur bei primären Aminen mit TSIM in Acetonitril und Zugabe von BSA + TMCS in einer zweistufigen Umsetzung erzielt werden.

Eigene Versuche haben gezeigt, dass bei den Derivatisierungen mit BSA nach Cashaw *et al.*<sup>7</sup> sowie bei der Verwendung von BSTFA, MSTFA und MSHFBA keine definierten Endprodukte mit günstigen GC-Eigenschaften zu erhalten sind. Von Donike<sup>8</sup> wurde in 1973 ein neues Reagenz (MBTFA) beschrieben, dass die selektive N-Acylierung erlaubt. N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilylderivate von Aminen sind für die GC von Cancalon und Klingman<sup>9</sup> bereits über die Silylierung von Trifluoracetylverbindungen eingesetzt worden. Die Anwendung auf die O-Methylkatecholaminmetaboliten wurde bisher jedoch nicht untersucht.

## EXPERIMENTELLES UND ERGEBNISSE

### Reagentien

BSA, BSTFA, MSTFA, MSHFBA, TMCS, TFAA und Pyridin wurden von Macherey, Nagel und Co., Düren, B.R.D. bezogen; DL-Normetanephrihydrochlorid, DL-Metanephrihydrochlorid und 3-Methoxy-4-hydroxyphenyläthylaminhydrochlorid (= 3-Methoxytyramin) von Calbiochem, Luzern, Schweiz; Lösungen von 3-Methoxytyramin, Normetanephri und Metanephri bestanden aus je 1 mg der Hydrochloride in 1 ml Methanol.

Als Reaktionsgefässe zur Derivatisierung wurden 1 ml-Ampullen mit PE-Kappen (+ PTFE-Dichtungsscheibe) benutzt.

Für die Untersuchungen zur Derivatisierung wurden jeweils 20  $\mu$ l der Lösungen bei 60° in 1 ml-Ampullen zur Trockene eingedampft. Zur Silylierung wurden jeweils 50  $\mu$ l an Silylierungsmittel eingesetzt.

Allgemeine Bedingungen für die GC waren: Varian-Aerograph Modell 2100 mit FID, Glassäule 1.80 m  $\times$  3 mm I.D., 3% OV-17 auf Chromosorb G AW DMCS, 80–100 mesh. Gase: Stickstoff, 30 ml/min; Wasserstoff, 25 ml/min; Luft, 250 ml/min. Temperaturen: Einspritzblock 220°, FID 220° und Säulenofen variabel zwischen 170 und 210°.

Die Silylierung der Amine mit BSA, BSTFA, MSTFA und MSHFBA wurde durch 16-h Stehenlassen bei Zimmertemperatur bzw. 3-h Erhitzen auf 80° (in Anlehnung an Cashaw) durchgeführt. Die Chromatogramme zeigten in allen Fällen ähnliche Formen wie in Fig. 1. Einzelne symmetrische Peaks für jede Verbindung traten jedoch nicht auf. Auch der Zusatz katalytischer Mengen an TMCS ergab keine Verbesserung.

Fügt man zu den uneinheitlich silylierten Derivaten jedoch MBTFA hinzu, so erhält man unter den gleichen GC-Bedingungen für jedes Amin einen einzelnen symmetrischen Peak (Fig. 2).

Bei der Umsetzung von Normetanephri wurde jedoch, insbesondere nach kurzzeitiger Umsetzung mit MSTFA bei Zimmertemperatur, ein zweiter symme-

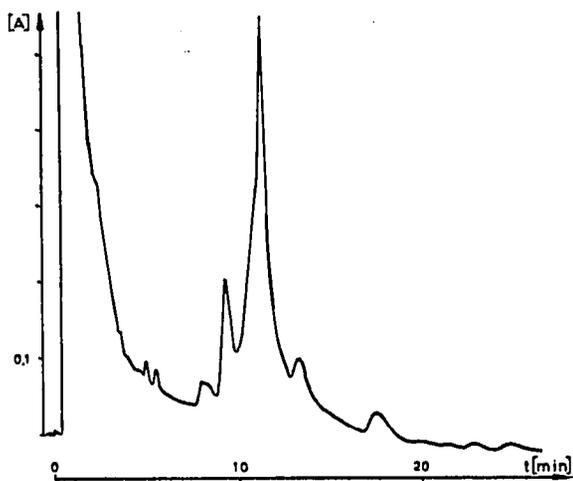


Fig. 1. 3-h Umsetzung eines Gemisches von 3-Methoxytyramin, Normetanephrin und Metanephrin mit 50  $\mu$ l BSTFA bei 80°. Trennflüssigkeit, 3% OV-17; Säulentemperatur, 180°; Detektorempfindlichkeit,  $2 \times 10^{-10}$  A.

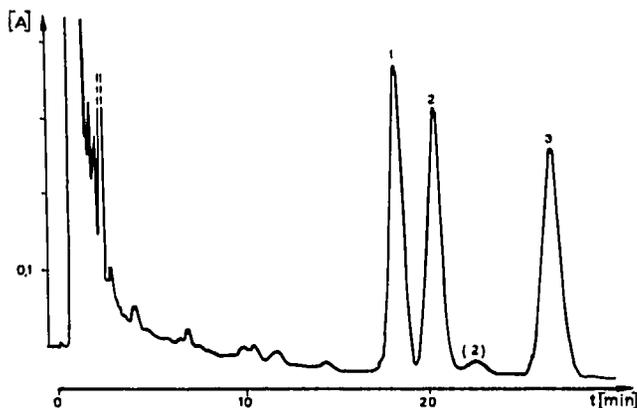


Fig. 2. Umsetzung von 3-Methoxytyramin (1), Normetanephrin (2) und Metanephrin (3) mit 50  $\mu$ l BSTFA (5 min bei 80°) + 5  $\mu$ l MBTFA. Trennflüssigkeit, 3% OV-17; Säulentemperatur, 170°; Detektorempfindlichkeit,  $4 \times 10^{-10}$  A.

trischer Peak beobachtet, der beim Erwärmen nach der Zugabe von MBTFA noch anwächst (Tabelle II). Werden die Amine jedoch mit dem Silylierungsmittel vor der Zugabe von MBTFA auf 80° erwärmt oder bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen, so verringert sich die Fläche des zweiten Peaks auf weniger als 5% des ersten.

Die Untersuchungen zur Optimierung der zweistufigen Derivatisierung brachten folgende Ergebnisse: Die günstigste Reaktionstemperatur ist 80° (Fig. 3), wobei eine Umsetzungsdauer von 5 min ausreicht. Schon bei einem Verhältnis 10:1 vom Silylierungsmittel zu MBTFA ergibt sich eine vollständige Umsetzung innerhalb weniger als 1 min. Unter diesen Bedingungen treten zwischen den Silylierungsmitteln BSTFA, MSTFA und MSHFBA keine signifikanten Unterschiede bei der Derivati-

TABELLE II

## UMSETZUNG VON NORMETANEPHRIN MIT MSTFA UND MBTFA

GC-Bedingungen: Trennflüssigkeit, OV-17; Säulentemperatur, 210°; Detektorempfindlichkeit,  $4 \times 10^{-10}$  A.

Reaktionsbedingungen: Nach Umsetzung von 20  $\mu$ g Normetanephrin mit 50  $\mu$ l MSTFA 25 min bei Zimmertemperatur + 5  $\mu$ l MBTFA; A = 10 min Stehen lassen; B = zusätzlich 10 min auf 60° erwärmen.

| Reaktionsbedingungen | GC-Ergebnis |             |        |
|----------------------|-------------|-------------|--------|
|                      | Peak        | $t_r$ (min) | h (mm) |
| A                    | 1           | 5.9         | 140    |
|                      | 2           | 6.2         | 31     |
| B                    | 1           | 5.9         | 95     |
|                      | 2           | 6.2         | 87     |

sierung auf. Die Analysen zur Optimierung und für die Eichkurven wurden mit BSTFA durchgeführt. In 100  $\mu$ l lassen sich weniger als 100 ng der Amine gaschromatographisch bestimmen. Die Linearität ist über einen Bereich bis mindestens 50  $\mu$ g/100  $\mu$ l gewährleistet. Gleiche Mengen der Amine ergeben gleich grosse Peakflächen. Die Reaktionsprodukte sind über einige Tage stabil.

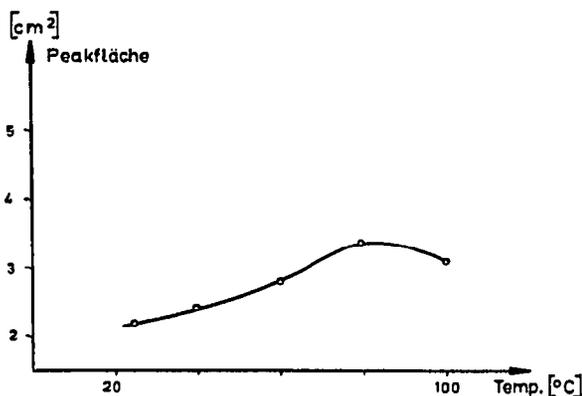


Fig. 3. Abhängigkeit der zweistufigen Derivatisierung von der Reaktionstemperatur der Silylierung (= erste Stufe) am Beispiel des 3-Methoxytyramins.

Nach Cashaw *et al.*<sup>7</sup> wurde versucht, O-Silyl-N-trifluoracetyl-derivate der Amine über die Silylierung der entsprechenden Trifluoracetylverbindungen zu erhalten. 20  $\mu$ g der Aminohydrochloride wurden mit je 100  $\mu$ l TFAA 20 min bei Zimmertemperatur umgesetzt, der Überschuss an TFAA im Vakuum abgezogen. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l Pyridin und 50  $\mu$ l BSTFA wurde das Gemisch 25 min auf 104° erwärmt. Für 3-Methoxytyramin erhält man einen einzelnen Peak, der in der Retentionszeit und Peakfläche mit dem nach der Derivatisierung durch BSTFA und MBTFA übereinstimmt. Bei Normetanephrin treten zwei kleine Peaks auf, der Peak für Metanephrin ist in der Fläche geringer und hat eine kürzere Retentionszeit als der nach obiger Umsetzung (Fig. 4).

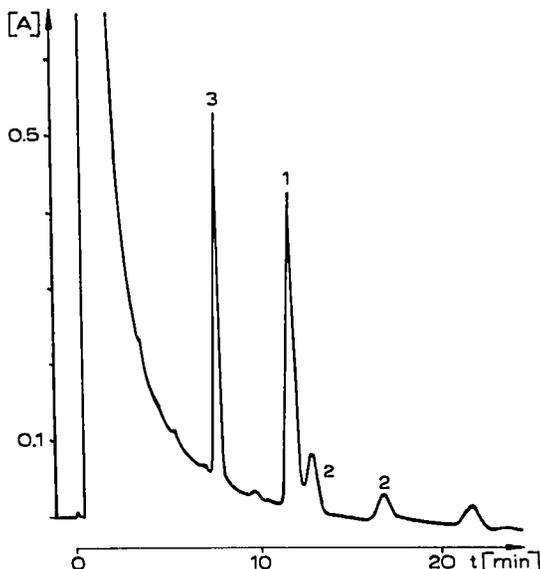


Fig. 4. Silylierung der Trifluoracetyl-derivate von 3-Methoxytyramin (1), Normetanephrin (2) und Metanephrin (3) mit BSTFA in Pyridin nach Cashaw<sup>7</sup>. Trennflüssigkeit, 3 % OV-17; Säulentemperatur, 180°; Detektorempfindlichkeit,  $2 \times 10^{-10}$  A.

#### Analysenvorschrift

Die zur Trockene eingedampfte Probe an Aminen oder Aminohydrochloriden wird mit 50  $\mu$ l BSTFA 5 min auf 80° erwärmt. Nach der Zugabe von 5  $\mu$ l MBTFA kann die Probe sofort in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

#### DISKUSSION

Eine Identifizierung der erhaltenen Derivate als N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilyl-Verbindungen der Amine durch GC-MS-Kopplung war nicht möglich, da kein Massenspektrometer zur Verfügung stand.

Die von Cashaw *et al.*<sup>7</sup> beschriebene Derivatisierung zur Silylierung der Trifluoracetylprodukte am phenolischen Sauerstoff führte erwartungsgemäss nur für das 3-Methoxytyramin zu einem vergleichbaren Ergebnis.

Normetanephrin lässt sich offensichtlich unter diesen Bedingungen nicht umsetzen, Metanephrin liefert kein gaschromatographisch übereinstimmendes Produkt, da die aliphatische O-Trifluoracetylgruppe erhalten bleibt.

Nach den Ausführungen von Donike<sup>8</sup> ist jedoch anzunehmen, dass nach der Silylierung der Hydroxylgruppen eine selektive Trifluoracetylierung mit MBTFA am Stickstoff der Amine erfolgt, wobei eventuell vorhandene Silylgruppen ausgetauscht werden. Der unter bestimmten Bedingungen bei der Derivatisierung von Normetanephrin im Chromatogramm auftretende zweite Peak ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Substitution am Stickstoff oder auch auf die Bildung von O-Trifluoracetyl- und O-Trimethylsilylgruppen im Molekül zurückzuführen.

Das uneinheitliche Bild im Chromatogramm der silylierten Verbindungen (Fig. 1) kann nach einem persönlichen Hinweis von Donike auf die Verwendung von Chromosorb G AW-DMCS als Trägermaterial zurückzuführen sein. Auch eigene Versuche mit Gas-Chrom Q, die ein besseres Ergebnis zeigten, scheinen diese Vermutung zu bestätigen.

Die Anwendung der beschriebenen GC-Methode auf die Bestimmung der Amine aus Urin wird zur Zeit erprobt.

#### LITERATUR

- 1 K. P. Wong, C. R. J. Ruthven und M. Sandler, *Clin. Chim. Acta*, 47 (1973) 215.
- 2 F. Geissbuhler, *Clin. Chim. Acta*, 30 (1970) 143.
- 3 L. M. Bertani, S.W. Dziedzic, D. D. Clarke und S. E. Gitlow, *Clin. Chim. Acta*, 30 (1970) 227.
- 4 N. P. Sen und P. L. McGeer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13 (1963) 390.
- 5 M. G. Horning, A. M. Moss und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 148 (1967) 597.
- 6 R. J. Bègue, O. Bazerolle, J. Desgres, C. Lallemand und P. Padiou, *Pathol. Biol. (Paris)*, 19 (1971) 719.
- 7 J. L. Cashaw, M. J. Walsh, Y. Yamanaka und V. E. Davis, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 98.
- 8 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 78 (1973) 273.
- 9 P. Cancalon und J. D. Klingman, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 253.