

CHROM. 9761

NACHWEIS VON INDOLALKYLAMINEN NACH SELEKTIVER DERIVATISIERUNG*

M. DONIKE, R. GOLA und L. JAENICKE

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

(Eingegangen am 21. Oktober 1976)

SUMMARY

Determination of indolalkylamines after selective derivatisation

The $^1\text{N-TMS-}\omega\text{N-TFA}$ -derivatives of indolalkylamines are suitable for estimation by combined gas chromatography and mass spectrometry for two reasons, *viz.* (1) Under electron impact charge stabilisation at the indole nucleus is favoured, so structure-specific ions form the base peak. For unsubstituted indoles m/e values of 202 are found and for hydroxyl-substituted indoles m/e values of 290. (2) The calibration curves of the derivatives are linear, even in the femtomole range.

The $^1\text{N-TMS-}\omega\text{N}$ -derivatives can easily be obtained by trimethylsilylation with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide containing catalytic amounts of *N*-trimethylsilylimidazole followed by acylation with *N*-methyl bis(trifluoroacetamide). The serotonin concentrations in different rat tissues are determined by this method of selective ωN -trifluoroacylation- ^1N -trimethylsilylation and compared with the values obtained by pertrimethylsilylation.

EINLEITUNG

In einer früheren Publikation konnte gezeigt werden, dass für die biogenen und pharmakologisch genutzten Phenolalkylamine die selektive Derivatisierung mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA)¹ und *N*-Methyl-bis(trifluoroacetamid) (MBTFA)², die zu *N*-TFA-*O*-TMS-Phenolalkylaminen führt, brauchbarer ist, als die Pertrifluoroacetylierung oder Pertrimethylsilylierung^{3,4}. Die *N*-TFA-*O*-TMS-substituierten Phenolalkylamine eignen sich aufgrund ihres charakteristischen Fragmentierungsschemas besonders gut für den massenspektrometrischen Nachweis. Die Übertragung der für Phenolalkylamine ausgearbeiteten Vorschrift auf Indolalkylamine machte zunächst wegen der unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit der ω -Aminfunktion und der ^1NH -Funktion Schwierigkeiten. Bei saurer Katalyse wird die ω -Aminfunktion der Indolalkylamine durch das Trimethylsilylierungsmittel sehr rasch bis-trimethylsilylsubstituiert, dagegen die ^1NH -Funktion unter diesen Bedingungen nur äusserst langsam trimethylsilyliert.

* IV. Mitteilung über selektive Derivatisierung. I.-III. Mitteilung, siehe Lit. 2-4.

Unter kontrollierten Reaktionsbedingungen gelingt jedoch die Herstellung der $^1\text{N-TMS-}^{\omega}\text{N-TFA-Indolalkylamine}$, die neben vorzüglichen gaschromatographischen Eigenschaften einen empfindlichen massenspezifischen Nachweis gestatten.

EXPERIMENTELLES

Bedingungen für die massenspezifische Detektion

Die Bedingungen für die massenspezifische Detektion sind in Tabelle I zusammengefasst worden.

TABELLE I

BEDINGUNGEN FÜR DIE MASSENSPEZIFISCHE DETEKTION

GC-MS-Kombination	GC Modell 2700 Varian-Aerograph und MS Modell CH 5 Varian-MAT
Betriebsbedingungen der GC-MS-Kombination	
Gas (He)	40 ml/min
Quellendruck	$4 \cdot 10^{-6}$ Torr
Temperaturen	
GC-Einspritzblock	250°
GC-Ofen	200–280°
Verbindungsleitungen und doppelstufiger Watson-Bieman-Separator	275°
Direkteinlass	170°
Ionenquelle	200°
Elektronenstossionenquelle	300 μA Emission, 70 eV Elektronenenergie. 3 kV Beschleunigungsspannung
SEV	1.7 kV
Auflösung	ca. 600 (10% Tal)
Registrierung	Gleichstromverstärker des CH 5-Systems, Integrator Modell 3370 B Hewlett-Packard, Kompensationsschreiber Modell 7172 A Hewlett-Packard
Glassäule	1.5 m \times 2.5 mm I.D. 3% OV-17 auf Chromosorb Q

Gaschromatographische Bedingungen

Die Messungen wurden auf dem Modell 7600 der Firma Hewlett-Packard durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Flammenionisationsdetektors (FID). Die Temperatur des Einspritzblocks betrug 250°, die des FID 300°. Die Trennung erfolgte auf einer Glassäule (1.5 m \times 2.5 mm I.D.), gefüllt mit 3% OV-17 auf Chromosorb Q (Applied Science Labs., State College, Pa., V.S.).

Die Messungen am Gaschromatographen erfolgten, wenn nicht in der Legende zu den Abbildungen vermerkt, temperaturprogrammiert: 120° Anfangstemperatur (2 min), Heizrate 15°/min bis 260°, 4 min isotherm bei 260°.

$^1\text{N-Trimethylsilylierung mit Trimethylchlorsilan bzw. TMS-Imidazol als Katalysator}$

1 mg Tryptamin werden mit 1 ml MSTFA versetzt. Man fügt hinzu (a) 10 μl Trimethylchlorsilan (TMS-Cl) (b) 10 μl TMS-Imidazol und erhitzt auf 120°. Die Lösung wird in geeigneten Zeitabständen gaschromatographisch untersucht (vergl. Fig. 5a und b).

Bildung von 1N -TMS- $^{\omega}N$ -TFA-Derivaten

Umsetzung mit dem Silylierungsmittelgemisch MSTFA–MTFA–Imidazol und Zusatz von MBTFA (kontrollierte Bedingungen). 2–3 mg Serotoninkreatininsulfat, Tryptamin, 5-Methoxytryptamin, Melatonin, $^{\omega}N$ -Methyltryptamin und N,N-Di- α thyltryptamin werden mit 1 ml eines Gemisches aus MSTFA, N-Methyltrifluoracetamid (MTFA) und Imidazol (1.2:2.0:0.2, Mol/Mol/Mol) versetzt und 15 min auf 80° erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 50 μ l MBTFA zugefügt, erneut für 10 min auf 80° erhitzt oder 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Umsetzung mit CH_3CN , MSTFA und MBTFA⁴ (unkontrollierte Bedingungen). 2–4 mg Serotoninkreatininsulfat, Tryptamin, 5-Methoxytryptamin und Melatonin versetzt man mit 0.9 ml CH_3CN und 0.1 ml MSTFA und erhitzt 15 min auf 80°. Nach dem Abkühlen fügt man 25 μ l MBTFA hinzu und erhitzt 10 min auf 80°.

Serotoninbestimmung im Gewebe

Unmittelbar nach Dekapitieren einer Ratte werden Gewebsproben aus den in der Tabelle II angeführten Organen entnommen und mit 10 ml methanolischer HCl (0.06 N) versetzt. Nach dem Verreiben mit einem Glasstab werden die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei –18° aufgehoben. Nach dem Zentrifugieren werden in einem mit HCl, bidestilliertem Wasser und Methanol gespülten und mit Acetonitril–MSTFA–Ammonchlorid silylierten Zentrifugenschliffglas 0.5 ml des methanolischen Extraktes im Vakuumexsikkator über P_2O_5 /KOH bei Raumtemperatur eingengt (Zeitdauer 5–6 h).

TABELLE II

SEROTONINGEHALT EINIGER RATTENORGANE IN ng PRO g FEUCHTGEWEBE

(a) Nach selektiver Derivatisierung (*m/e* 290); (b) nach Pertrimethylsilylierung (*m/e* 174).

Organ	Serotoningehalt	
	a	b
Lunge	2754	2830
Grosshirn	242	615
Kleinhirn	196	—
Niere	211	483
Herz	148	512
Muskel	78	205

Die Umsetzung und der massenspezifische Nachweis erfolgen nach zwei verschiedenen Verfahren: (a) selektive Derivatisierung oder (b) Pertrimethylsilylierung.

Selektive Derivatisierung. Die Rückstände werden mit dem oben beschriebenen Silylierungsmittelgemisch MSTFA–MTFA–Imidazol silyliert, indem nach Zugabe von 0.1 ml des Reagenziengemisches 30 min auf 80° erhitzt wird. Nach weiteren 30 min Raumtemperatur fügt man 10 μ l MBTFA hinzu. Als Eichkurve dient die unter Fig. 7 erhaltene Kurve. Der Nachweis erfolgt massenspezifisch bei *m/e* 290.

Pertrimethylsilylierung. Die Rückstände werden mit 100 μ l des oben beschriebenen Silylierungsmittelgemisches MSTFA–MTFA–Imidazol umgesetzt, indem man sie 30 min bei 80° erhitzt. Als Standard dienen 50 ng Serotonin, die unter Zusatz von 10 μ g Methylorange in einer 0.06 N HCl-Lösung im Exsikkator eingengt werden. Der Nachweis erfolgt massenspezifisch bei der Massenzahl *m/e* 174.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Beeinflussung des Fragmentierungsschemas der Indolalkylamine durch die Schutzgruppen

Vorbedingung für die gaschromatographische Identifizierung und die quantitative Bestimmung von Indolalkylaminen ist eine geeignete Derivatisierung der NH- und der gegebenenfalls vorhandenen OH-Funktionen, da die freien Amine nicht oder nur in Form unsymmetrischer Banden von der gaschromatographischen Trennsäule eluiert werden. Die Substitution der aktiven Protonen verbessert die gaschromatographischen Eigenschaften, so dass symmetrische Signale erhalten werden, eine Voraussetzung für Eichkurven im Spurenbereich. Werden Halogenacylgruppen als Schutzgruppen verwendet, so kann die hohe Nachweisempfindlichkeit des Elektroneneinfangdetektors ausgenutzt werden (vergl. z.B. Lit. 5). Für die speziellen Zwecke der massenspezifischen Detektion (mass fragmentography) muss berücksichtigt werden, dass die Art der Schutzgruppen das Fragmentierungsschema beeinflussen. Am Beispiel des Tryptamins soll das Verhalten der Indolalkylamine erläutert werden.

Tryptamin wird durch starke Silylierungsmittel, wie z.B. durch MSTFA unter TMS-Cl-Katalyse persilyliert (Fig. 1).

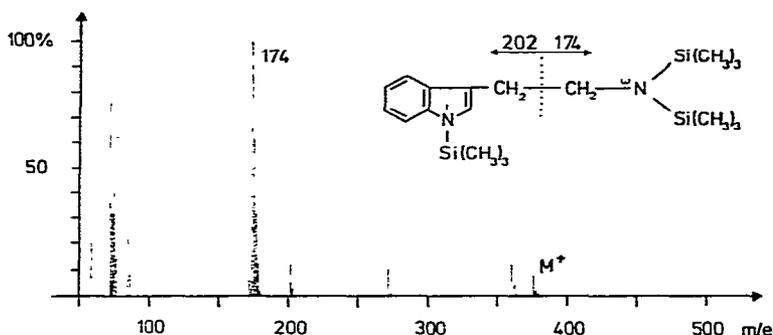


Fig. 1. EI-Massenspektrum des $^1\text{N}, \omega\text{N}$ -Tris-TMS-Tryptamins mit den charakteristischen Ionen (Masse, % des Basispeaks): 174 = 100%, 202 = 12%, $\text{M}^+ - 15 = 11\%$ und $\text{M}^+ (376) = 8\%$ (73 = 76%).

Das Massenspektrum des $^1\text{N}, \omega\text{N}$ -Tris-TMS-Tryptamins zeigt, dass die Ladungslokalisation bei Elektronenstossionisation überwiegend an dem Aminstickstoff erfolgt. Nach α -Spaltung entsteht ein Bruchstück der Massenzahl m/e 174, das nach Untersuchungen von Abramson *et al.*⁶ einen empfindlichen Nachweis bis in den Femtomolbereich erlaubt. Weitere strukturbeweisende Fragmentationen treten nur in geringer Ausbeute auf. Das Trimethylsilylkation mit der Masse m/e 73 tritt zwar in hoher Intensität auf, ist aber unspezifisch und beweist nur die Gegenwart einer Trimethylsilylverbindung.

Spezifischer als das Spektrum des tris-trimethylsilylsubstituierten Tryptamins gibt das Spektrum der $^1\text{N}, \omega\text{N}$ -Bisacylderivate die Indolalkylaminstruktur wieder^{7,8}. Nach α -Spaltung verbleibt die Ladung am heterozyklischen Teil des Moleküls. Beispielsweise ist nach Pentafluorpropionylierung das nach Elimination von Pentafluorpropionylamid verbleibende "olefinische" Bruchstück (m/e 289) (Fig. 2) Basispeak. In

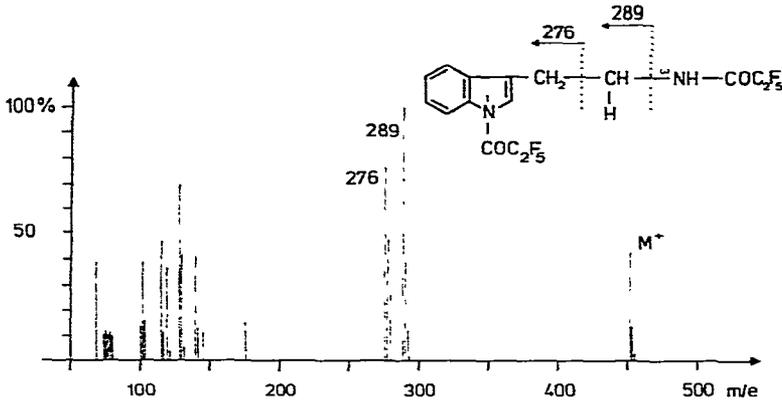


Fig. 2. EI-Massenspektrum des $^1\text{N},\omega\text{N}$ -Bis-PFP-Tryptamins mit den charakteristischen Ionen (Masse, % des Basispeaks): 130 = 43%, 276 = 74%, 289 = 100% und M^+ (452) = 42% (69 = 39%, 119 = 39%).

nahezu vergleichbarer Intensität tritt das ^1N -PFP-substituierte Chinoliniumion auf (m/e 276). Günstig ist weiter die relativ hohe Intensität des Moleküliions (m/e 452) mit 42% des Basispeaks.

Narasimhachari und Vouros⁹ und Brandenberger und Schnyder¹⁰ schlagen für die massenspezifische Detektion von primären Indolalkylaminen die ^1N -O-TMS-Isothiocyanate vor, die relativ hohe Molekülionen sowie nach α -Spaltung den ^1N -trimethylsilylierten Indolkern einschliesslich der benachbarten Methylengruppe mit m/e 202 als Basispeak liefern (Fig. 3).

Dem gleichen Schema folgt die Fragmentierung des ^1N -TMS- ωN -TFA-Tryptamins, die nach selektiver Derivatisierung unter kontrollierten Bedingungen entsteht (Fig. 4). Intensivstes Ion ist wiederum nach α -Spaltung das Chinoliniumion (m/e 202), das aus dem heterozyklischen Ringgerüst und der 3-Methylengruppe entsteht. In hoher Intensität tritt das Moleküliion (m/e 328) im Spektrum auf, in geringer Intensität das "olefinische" Bruchstück (m/e 215).

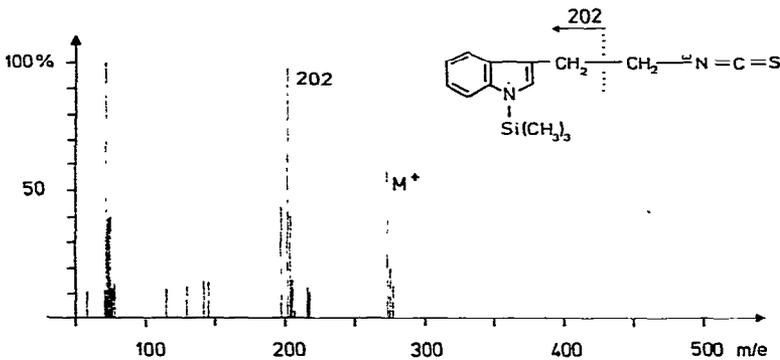


Fig. 3. EI-Massenspektrum des β -(^1N -TMS-Indolyl)-Äthylisothiocyanats, dem Reaktionsprodukt von Tryptamin mit CS_2 und MSTFA, mit den charakteristischen Ionen (Masse, % des Basispeaks): 202 = 99%, 215 = 11%, M^+ (274) = 57% (73 = 100%).

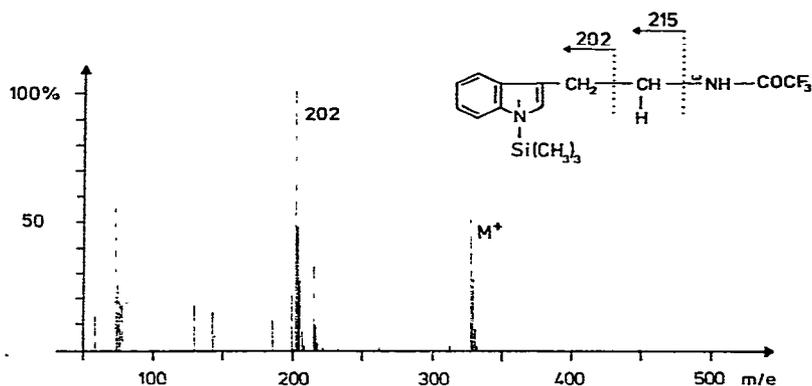


Fig. 4. EI-Massenspektrum des $^1\text{N-TMS-}\omega\text{N-TFA-Tryptamins}$ nach selektiver Derivatisierung mit den charakteristischen Ionen (Masse, % des Basispeaks): 202 = 100%, 215 = 32%, M^+ (328) = 50% (73 = 68%).

Die in den Fig. 1–4 abgebildeten Massenspektren wurden unter identischen Bedingungen mit der Kombination GC–MS aufgenommen, um Abweichungen durch differierende experimentelle Parameter zu vermeiden, und mit Hilfe des Daten-systems ausgewertet. Der Vergleich der Spektren 1–4 bestätigt die eingangs getroffene Feststellung, dass durch die Wahl der Schutzgruppen das Fragmentierungsschema stark beeinflusst wird und die Ausbeute an charakteristischen, strukturbeweisenden Ionen je nach der Art der Schutzgruppe unterschiedlich ist.

Zur Frage der optimalen Derivatisierung von Indolalkylaminen

Während im Grunde genommen für massenspektroskopische Untersuchungen der Aufwand, den die Derivatbildung erfordert, sowie die Ausbeute an einheitlichen Reaktionsprodukten gleichgültig ist, so bestimmen diese beiden Faktoren die Anwendungsmöglichkeiten und die Anwendungsbreite eines analytischen Verfahrens zur Untersuchung von biologischem Material. Hinzu kommt, dass eine umfangreiche Aufarbeitungsprozedur, die aus vielen Schritten besteht, in jeder Stufe fehlerbehaftet ist. Vorzuziehen sind daher solche analytischen Verfahren, die mit möglichst wenigen, einfachen und überschaubaren Vorbereitungsschritten zu einer messfertigen Lösung führen. Auf zusätzliche und arbeitsintensive umfangreiche Trennoperationen kann dann verzichtet werden, wenn das Messverfahren schon einen chromatographischen Trennschritt einschliesst und die Detektion spezifisch erfolgt, wie dies bei der Kombination Gaschromatograph–Massenspektrometer der Fall ist.

Arbeitet man die früher beschriebenen Vorschriften zur Derivatisierung von Indolalkylaminen nach^{5–10}, so erfüllen diese nicht die Ansprüche, die an eine Derivatisierungsprozedur zu stellen sind. Schon die Umsetzung des nur zwei funktionelle Gruppen tragenden Tryptamins (Indol-H und die primäre endständige Aminogruppe) liefert mehrere gaschromatographische Signale, ein Beweis, dass die zitierten Verfahren störanfällig und nicht alle Reaktionsparameter unter Kontrolle sind.

Überraschend ist, dass eine so einfache und vielfach empfohlene Reaktion wie die Trimethylsilylierung selbst unter relativ drastischen Bedingungen (130° , 5% Trimethylchlorsilan als Katalysator und rund 100-fach molarer Überschuss an N-TMS-Amid) nicht zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt führt (Fig. 5). Die Mas-

senspektren der beiden Signale zeigen, dass neben der pertrimethylsilylierten Verbindung noch das unvollständig silylierte ω N, ω N-bis-TMS-Tryptamin vorhanden ist. Die Indol-H-Funktion ist nur teilweise trimethylsilyliert worden. Erst der Zusatz von katalytischen Mengen TMS-Imidazol (oder von Imidazol, dass im Reaktionsansatz sofort zu TMS-Imidazol umgewandelt wird) liefert unter milden Reaktionsbedingungen das einheitliche Tris-TMS-Derivat (vergl. Fig. 5).

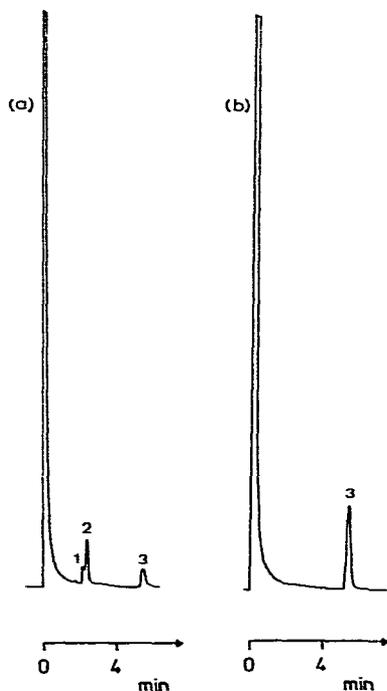


Fig. 5. Trimethylsilylierung des Tryptamins mit MSTFA. (a) 1 % TMS-Cl, 2,5 h, 120°; (b) 1 % TMS-Imidazol, 1 h, 120°. 1 = ω N-TMS-Tryptamin; 2 = ω N-Bis-TMS-Tryptamin; 3 = 1 N, ω N-Tris-TMS-Tryptamin.

Eine eingehende Diskussion der Reaktion zeigt, dass die Trimethylsilylierung des indolyischen NH-Protons kinetisch kontrolliert und unabhängig vom Silylierungspotential der Reaktionslösung ist¹¹. Die ω N, ω N-Bis-TMS-Substitution dagegen ist erstens abhängig vom Silylierungspotential des verwendeten Reaktionsgemisches und zweitens TMS-Cl katalysiert.

Der Versuch, das Tryptamin analog den für Phenolalkylamine erfolgreich erprobten Verfahren^{3,4} umzusetzen, führte zu insgesamt vier gaschromatographischen Signalen (Fig. 6), die in der Reihenfolge der Elution als 1 N-, ω N-bis-TFA-, 1 N-TFA- ω N-TFA- ω N-TMS-, 1 N-TMS- ω N-TFA- und 1 N-TMS- ω N-TFA- ω N-TMS-Tryptamin anzusprechen sind.

Die kinetischen Untersuchungen zur Pertrimethylsilylierung des Tryptamins und die daraus gewonnene Erkenntnis, dass die Bildung des 1 N-TMS-Derivates nicht

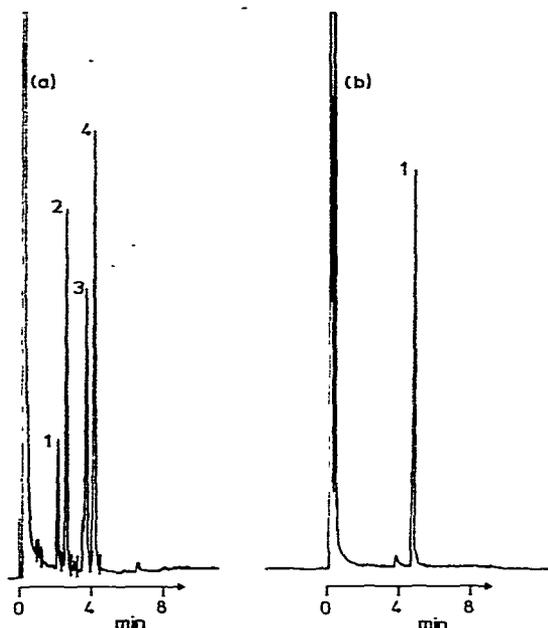
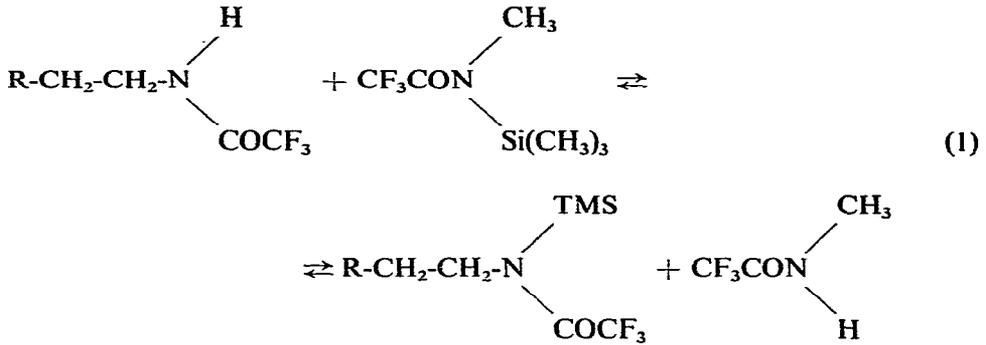


Fig. 6. Selektive Derivatisierung. (a) Unkontrollierte Reaktionsbedingungen (vergl. Experimentelles). 1 = ${}^1\text{N}$ -, ωN -Bis-TFA-Tryptamin; 2 = ${}^1\text{N}$ -TFA- ωN -TFA- ωN -TMS-Tryptamin; 3 = ${}^1\text{N}$ -TMS- ωN -TFA-Tryptamin; 4 = ${}^1\text{N}$ -TMS- ωN -TFA- ωN -TMS-Tryptamin. (b) Kontrollierte Reaktionsbedingungen (vergl. Experimentelles). 1 = ${}^1\text{N}$ -TMS- ωN -TFA-Tryptamin.

thermodynamisch, sondern kinetisch kontrolliert wird, veranlasste uns, die selektive Derivatisierung unter streng kontrollierten Reaktionsbedingungen durchzuführen. Die Indolalkylamine Tryptamin, Serotonin, ωN -Methyltryptamin, 5-Methoxytryptamin und Melatonin und zum Vergleich N,N -Diäthyltryptamin, wurden mit einer Lösung von MSTFA-MTFA-TMS-Imidazol- CH_3CN umgesetzt. Nach Zugabe von MBTFA ergab sich für jede dieser Verbindungen ein einheitliches Signal, das auch nach mehrtägigem Stehen der Reaktionslösung bei Raumtemperatur erhalten bleibt. Die Massenspektren zeigen, dass die gewünschte selektive Derivatisierung erreicht wurde (Fig. 4, Tabelle III). In allen Verbindungen ist das indolyliche Proton durch den Trimethylsilylrest substituiert worden, der weder nach kurzzeitigem Erhitzen noch nach mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur durch überschüssiges MBTFA als Acylierungsmittel verdrängt wird.

Die Trimethylsilylgruppe erweist sich somit als wirkungsvolle Schutzgruppe für das indolyliche Proton. Im Falle des Serotonins bleibt die Trimethylsilyloxyfunktion erhalten, wie dies für Phenolalkylamine und Phenolcarbonsäuren schon früher nachgewiesen wurde^{3,4}.

In den ωN -Trifluoracetyl-substituierten Indolalkylaminen wird unter den angegebenen Reaktionsbedingungen das Amidproton nicht durch den TMS-Rest substituiert. Das Silylierungspotential des Reaktionsgemisches (MSTFA-MTFA-Imidazol) ist somit nicht ausreichend, das Gleichgewicht der Reaktion (1)



R = ¹N-TMS-indolyl oder ¹N-TMS-5-O-TMS-indolyl

TABELLE III

RETENTIONSINDICES UND CHARAKTERISTISCHE IONEN NACH ELEKTRONENSTOSSIONISATION DER ¹N-O-TMS- ω N-TFA-INDOLALKYLAMINE UND DER BIOLOGISCHEN VORSTUFEN TRYPTOPHAN UND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN

A. RETENTIONSINDICES

No.	Substanz	Retentionsindex	
		OV-101	OV-17
1	Tryptamin	1938	2197
2	ω N-Methyltryptamin	2075	2279
3	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)	2186	2415
4	5-Methoxytryptamin	2136	2447
5	5-Methoxy- ω N-Acetyltryptamin (Melatonin)	2396	2869
6	ω N, ω N-Diäthyltryptamin	2452	2223
7	L-Tryptophan	2162	2330
8	DL-5-Hydroxytryptophan	2385	2520

B. CHARAKTERISTISCHE IONEN

m/e										% [§]	
69*	73*	86	202**	215***	232**	245***	290**	303***	M ⁺ - 15		M ⁺
1	63		100	33					5	52	11.9
2	69		100	48					4	59	11.7
3	83		22	2	2		100	16	35	71	13.0
4	82		9		100	11			3	70	18.5
5	98		6	3	100	97			4	36	18.9
6	47	100	14	3					1	19	22.8
7	62		100	2			1		5	28	19.2
8	78		14				100	2	8	26	19.3

* Relativ uncharakteristische Bruchstücke der Schutzgruppen.

** Heterocyclisches Bruchstück nach Spaltung.

*** Heterocyclisches Bruchstück nach Amidabspaltung (CF₃CO-NRH bzw. CH₃CONH₂ bei 5).

§ Prozentualer Anteil des Basispeaks an den gesamten, im Bereich von 40-600 Masseneinheiten registrierten Peakintensitäten.

auf die rechte Seite zu verschieben. Die gaschromatographisch nahezu einheitlichen Signale für die primären Amine Tryptamin, Serotonin und 5-Methoxytryptamin bestätigen diese Annahme. Analog verhält sich Melatonin, dessen ω N-Acetylgruppe erhalten bleibt.

Die für den massenspezifischen Nachweis dieser Indolalkylamine interessierenden gaschromatographischen und massenspektroskopischen Daten sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Abschliessend sei an einem Beispiel demonstriert, dass die selektive Derivatisierung auch im Falle der Indolalkylamine Vorteile gegenüber den herkömmlichen Derivatisierungsmethoden besitzt. Ohne weitere vorbereitende Trennschritte wurden aliquote Teile eines methanolischen Extraktes einiger Gewebeproben eingeengt und einmal nach Abramson *et al.*⁶ pertrimethylsilyliert zum anderen nach der im experimentellen Teil angegebenen Vorschrift selektiv derivatisiert. Die massenspezifische Detektion erfolgte bei m/e 174 für die pertrimethylsilylierten und bei m/e 290 für die selektiv derivatisierten Proben (Fig. 7).

Für die relativ hohen Serotoninkonzentrationen, wie sie im Lungengewebe vorliegen, stimmen die gefundenen Werte gut überein. Die Ergebnisse beider Methoden differieren jedoch beträchtlich, wenn man die geringen Konzentrationen in den anderen untersuchten Geweben betrachtet. Die Erklärung für die höheren Werte nach Pertrimethylsilylierung ist, dass die Massenzahl m/e 174 zwar charakteristisch

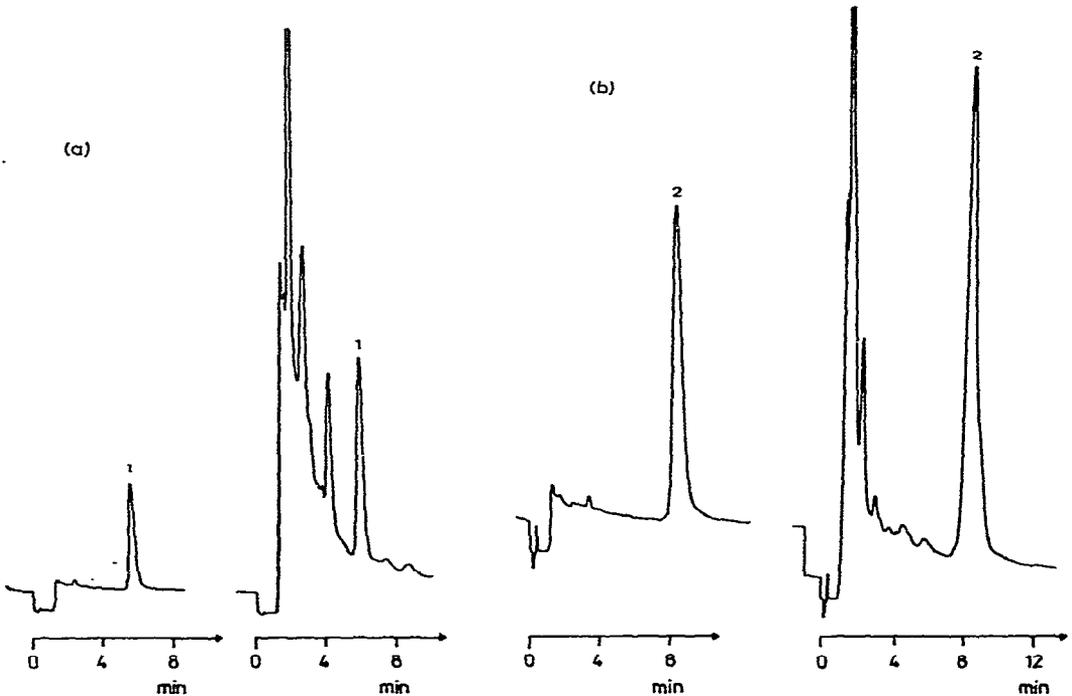


Fig. 7. Quantitative Bestimmung des Serotonins in dem Lungengewebe einer Ratte. (a) Nach selektiver Derivatisierung und massenspezifische Detektion mit m/e 290. (b) Nach Trimethylsilylierung und massenspezifische Detektion mit m/e 174.

für endständige primäre Amine ist, jedoch im biologischen Material häufig vorkommt. Bei der beschränkten Trennleistung der benutzten gaschromatographischen Säule mit etwa 2000 theoretischen Böden, werden im Falle der tetrakis-TMS-Verbindung des Serotonins andere im biologischen Extrakt vorkommende Verbindungen mit erfasst. Nach selektiver Derivatisierung, bei der das für Serotonin typische Bruchstück des Indolnukleus mit der Massenzahl 290 registriert wird, entfallen diese Störungen. Erwartungsgemäss liegen bei dieser Nachweismethode die aufgefundenen Serotoninwerte niedriger (vgl. Tabelle II).

ZUSAMMENFASSUNG

Die für den massenspezifischen Nachweis geeigneten ω N-TFA- 1 N-TMS-Derivate der Indolalkylamine können mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) als Silylierungsmittel und N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) als Acylierungsmittel unter kontrollierten Reaktionsbedingungen als einheitliche Derivate erhalten werden. Zwei Massnahmen sind zur selektiven Derivatisierung erforderlich: (1) Die Verwendung von TMS-Imidazol als Katalysator zur raschen und vollständigen Trimethylsilylierung des indolyischen Protons. Die 1 N-TMS-Gruppe ist stabil gegen den Einfluss von MBTFA. (2) Die Reduzierung des Silylierungspotentials im Reaktionsansatz. Unter den Bedingungen der Elektronenstossionisation zerfallen die 1 N-TMS- ω N-TFA-Derivate unter Ladungsstabilisierung am Indolkern.

Zieht man die strukturspezifischen Ionen, wie das 1 N-TMS-Chinoliniumion (m/e 202) für unsubstituierte Indolalkylamine bzw. das 1 N-TMS-O-TMS-hydroxychinoliniumion (m/e 290) für das ringsubstituierte Serotonin zum Nachweis heran, so erreicht man Nachweisgrenzen bis herab in den Femtomolbereich. Anwendungsbeispiele für die Bestimmung der Indolalkylamine werden gegeben, wobei ein Vergleich zur Pertrimethylsilylierung gezogen wird.

LITERATUR

- 1 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 103.
- 2 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 78 (1973) 273.
- 3 M. Donike, *Chromatographia*, 7 (1974) 651.
- 4 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 103 (1975) 91.
- 5 E. Gelpi, E. Peralta und J. Segura, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 701.
- 6 F. P. Abramson, M. W. McCaman und R. E. McCaman, *Anal. Biochem.*, 51 (1974) 482.
- 7 M. W. Couch and C. M. Williams, *Anal. Biochem.*, 50 (1972) 612.
- 8 F. Karoum, F. Cattabeni, E. Costa, C. R. J. Ruthven und M. Sandler, *Anal. Biochem.*, 47 (1972) 550.
- 9 N. Narasimhachari und P. Vouros, *Anal. Biochem.*, 45 (1972) 154.
- 10 H. Brandenberger und D. Schnyder, *Z. Anal. Chem.*, 261 (1972) 297.
- 11 M. Donike, *Chromatographia*, 9 (1976) 440.