

MSTFA und MSTFA-D₉ – unverzichtbare Werkzeuge für die massenspektrometrische Strukturaufklärung

Dieter Urbach

Bundeskriminalamt (BKA), KT 12 – Zentrale Analytik II, 65173 Wiesbaden

1. Einführung

Für die massenspektrometrische Strukturaufklärung ist eine Derivatisierung zu einem unverzichtbaren Werkzeug geworden. Das Anwendungsspektrum ist nicht nur auf die Derivatisierung niedermolekularer Verbindungen begrenzt, sondern hat sich allgemein bei der Strukturaufklärung durchgesetzt, auch für Substanzen im hochmolekularen Bereich [1].

Eines der am häufigsten verwendeten Derivatisierungsmittel für Analysen mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ist N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA). Es wurde von Donike im Jahre 1969 erstmals beschrieben [2]. MSTFA führt unpolare Trimethylsilyl-Schutzgruppen (TMS) in polare Verbindungen ein und reduziert auf diese Weise die polaren Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen. Dadurch werden die Verdampfung dieser Moleküle bei niedrigeren Temperaturen ermöglicht und thermische Zerfallsreaktionen im Injektor oder auf der GC-Säule verhindert. Durch die damit verbesserten chromatographischen Eigenschaften sind die TMS-Derivate sehr gut für die qualitative und quantitative GC bzw. die GC/MS-Analyse geeignet. Im Folgenden soll besonders auf die Leistungsfähigkeit des Derivatisierungsmittels MSTFA eingegangen werden, wenn es in Kombination mit seiner deuterierten Form für die Strukturaufklärung [3] eingesetzt wird.

2. Herstellung der Derivate

Die Herstellung der TMS-Derivate ist einfach. Die Probe wird in einem aprotischen Lösemittel gelöst, mit MSTFA versetzt und ca. 10 - 20 min bei 60 - 80°C im Sandbad temperiert. Bei geringem Probeneinsatz kann die Zugabe von wenigen µL MSTFA ausreichend sein. Das Derivatisierungsmittel muß aber stets im Überschuss zugesetzt werden. Alternativ kann MSTFA sogar als Lösemittel eingesetzt werden, da es hervorragende Lösungseigenschaften für die sich bildenden TMS-Derivate besitzt. Ein weiterer Vorteil eines großen Überschusses an Derivatisierungsmittel besteht darin, dass nach Injektion polare Zentren im GC-System kurzzeitig deaktiviert werden. Für die quantitative Analyse ist der zusätzliche Einsatz von Katalysatoren [4] zu empfehlen. Generell können die Lösungen ohne weitere Aufreinigung direkt auf die GC-Säule injiziert werden. Die Derivatisierungstechnik wird idealerweise in Kombination mit leicht polaren bis unpolaren GC-Kapillarsäulen verwendet.

Aufgrund seiner hohen Reaktivität lässt sich MSTFA [5] mit fast allen Verbindungen mit den funktionellen Gruppen –OH, –COOH, =NH, –NH₂ und –SH umsetzen. Abbildung 1 zeigt die Reaktion von MSTFA mit einem Alkohol. Hierbei entstehen das Trimethylsilylderivat des Alkohols und N-Methyltrifluor-acetamid (MTFA).

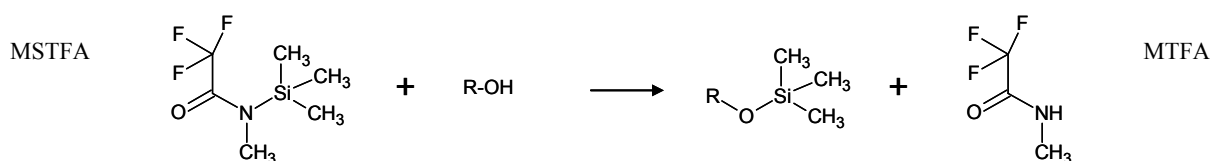


Abb. 1. Beispielhafte Reaktion von MSTFA mit einem Alkohol.

3. MS-Fragmente der MSTFA-Derivate

Alle Verbindungen, in denen die reaktiven Wasserstoffatome in einem Molekül gegen TMS-Schutzgruppen getauscht werden, zeigen im Massenspektrum ein Trimethylsilyl-Fragmentation mit m/z 73 (Abb. 2). Bei'm deuterierten MSTFA sind alle neun Wasserstoffatome der drei Methylgruppen der TMS-Gruppe durch neun Deuterium-Atome ersetzt. Deshalb besitzt das deuterierte TMS-Fragmentation eine Masse von 82 u.

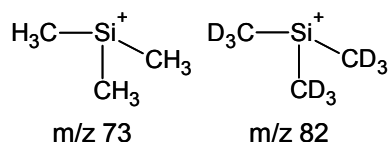


Abb. 2. Fragmentionen der TMS-Schutzgruppe und der deuterierten TMS Schutzgruppe.

Die Massenspektren der derivatisierten Verbindungen enthalten weitere für die Strukturaufklärung wertvolle Informationen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

4. Sauerstoff-Silylierung

Bei einer einfachen Silylierung von Alkoholen, Säuren und auch der Enol-Form von Ketonen und Aldehyden [6,7], tritt das Fragmentation mit m/z 75 mit unterschiedlichen Intensitäten auf. Bei Verwendung der deuterierten Form besitzt dieses Fragmentation entsprechend die Masse 81 u (Abb. 3).

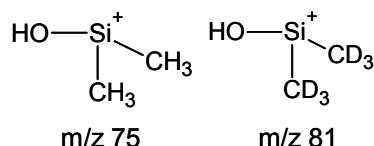


Abb. 3. Fragmentionen von TMS-Derivaten sauerstoffhaltiger Verbindungen.

Abbildung 4 zeigt das Elektronenstoß-Massenspektrum von 2-Phenoxyethanol, 2-Phenoxyethanol-TMS und des deuterierten Silylderivates. In der Abb. 4b erkennt man, dass durch die Silylierung das Moleküllion des Phenoxyethanols um 72 Masseneinheiten auf die Masse 210 u, sowie auf die Masse 219 u durch die Verwendung von deuteriertem MSTFA, verschoben wird (Abb. 4c). In den Massenspektren der derivatisierten Verbindungen tritt eine charakteristische Methylgruppenabspaltung (alpha-Spaltung) ausgehend von den Moleküllradikalkationen auf, die durch die Abspaltung von 15 Masseneinheiten bzw. 18 Masseneinheiten in der deuterierten Form charakterisiert wird. Allgemein lässt sich daraus ableiten, dass alle Fragmente in deuterierten Massenspektren im Vergleich zu den Massenspektren des normalen MSTFA mit einem Massenshift von 6 oder 9 u, Strukturelemente der TMS-Schutzgruppe enthalten.

Dementsprechend verschiebt sich auch das Fragmentation m/z 75 im Spektrum der Abb. 4b um 6 u nach m/z 81 im Spektrum 4c und bestätigt damit die Sauerstoffsilylierung (Abb. 3). Die Intensität dieses Fragments kann allerdings sehr unterschiedlich ausfallen, weist aber beim Auftreten immer eine Sauerstoffsilylierung sicher nach. Zusätzlich beobachtet man in den beiden derivatisierten Spektren die typischen Fragmentationen für die Silylierung bei m/z 73 sowie m/z 82, deuteriert silyliert.

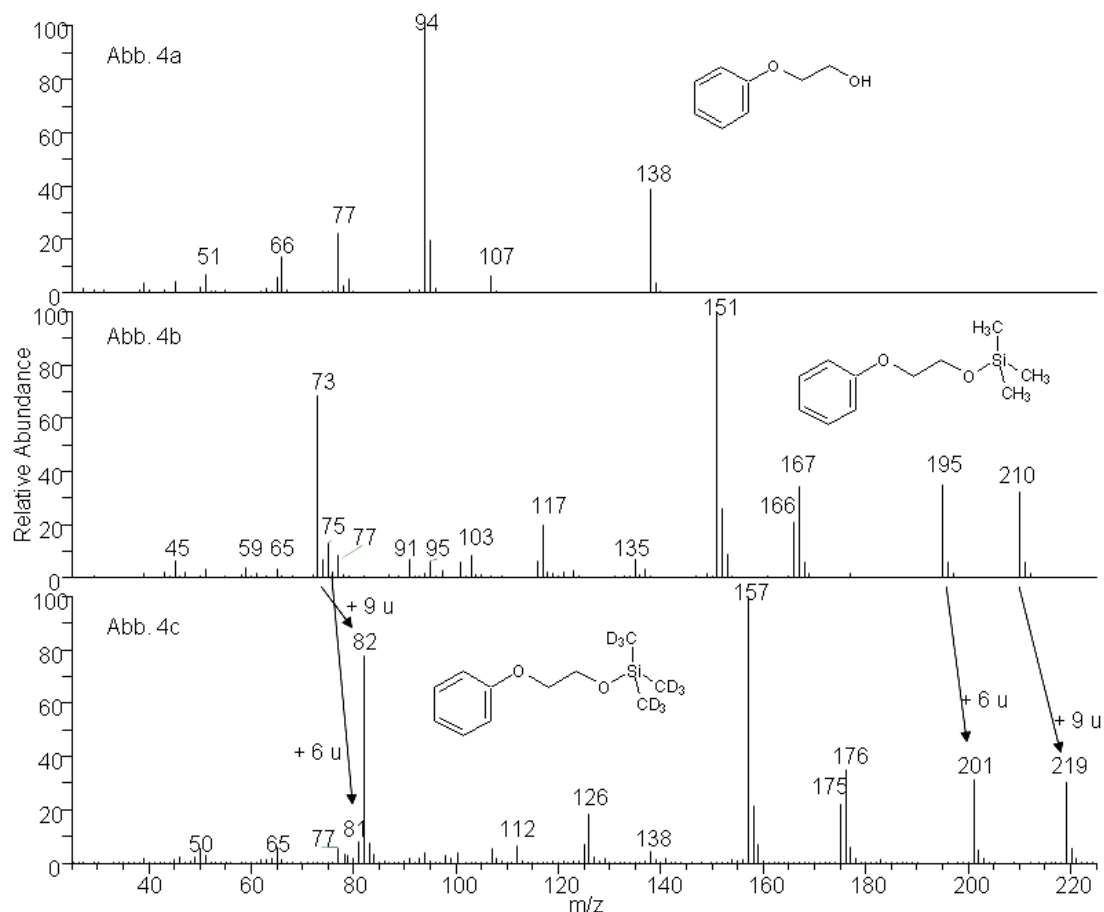


Abb. 4. Massenspektrum von a) 2-Phenoxyethanol, b) 2-Phenoxyethanol-TMS und c) 2-Phenoxyethanol-TMS-D₉.

Sind weitere Sauerstoff- oder Stickstoffatome mit einem oder mehreren reaktiven Wasserstoffatomen in einem Molekül verfügbar, dann wird zusätzlich das Fragmentation mit m/z 147 gebildet (Abb. 5). In diesen Fällen ist u. U. das Dimethylhydroxysilyl-Fragmentation (m/z 75) im Massenspektrum nicht vorhanden.

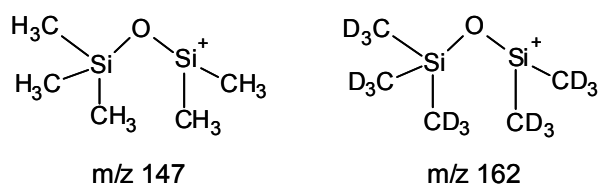


Abb. 5. Di-TMS-Ether-Fragmentationen.

5. Carbonsäure-Derivatisierung

Als Beispiel zeigen die Massenspektren der derivatisierten Benzoesäure wiederum deutlich die Molekülradikalkationen bei den Massen 194 u (Abb. 6a) bzw. 203 u, deuteriert silyliert (Abb. 6b). Dabei tritt zwischen der mit MSTFA und der deuterierten Form eine Massendifferenz von 9 u auf, während nach der typischen Methylgruppenabspaltung (179 u in Abb. 6a bzw. 185 u in Abb. 6b) eine Massendifferenz von sechs Masseneinheiten auftritt. Weiterhin

beobachtet man die typischen Fragmente für die Silylierung (73 u bzw. 82 u) und die Sauerstoffsilylierung (75 u bzw. 81 u) in den Spektren.

Im Massenspektrum der silylierten Benzoesäure fällt besonders die hohe Intensität des Ions mit m/z 135 auf. Eine Zuordnung zu einem Strukturteil ist ohne die Einbeziehung des Spektrums des deuterierten MSTFA-Derivates nicht einfach. Fragment m/z 135 (Abb. 6a) wird im Massenspektrum der deuterierten Verbindung um sechs Masseneinheiten nach m/z 141 (Abb. 6b) verschoben. Aufgrund dieser Massenverschiebung muss man davon ausgehen, dass das Fragment m/z 141 noch $\text{Si}(\text{CD}_3)_2$ ($28 \text{ u} + 2 \times 18 \text{ u} = 64 \text{ u}$) beinhaltet. Zieht man nun die 64 Masseneinheiten der Dimethylsilylgruppe von der Masse des Fragmentions ab, dann ergibt sich daraus ein rechnerischer Rest von 77 u, der nur vom Aromaten stammen kann.

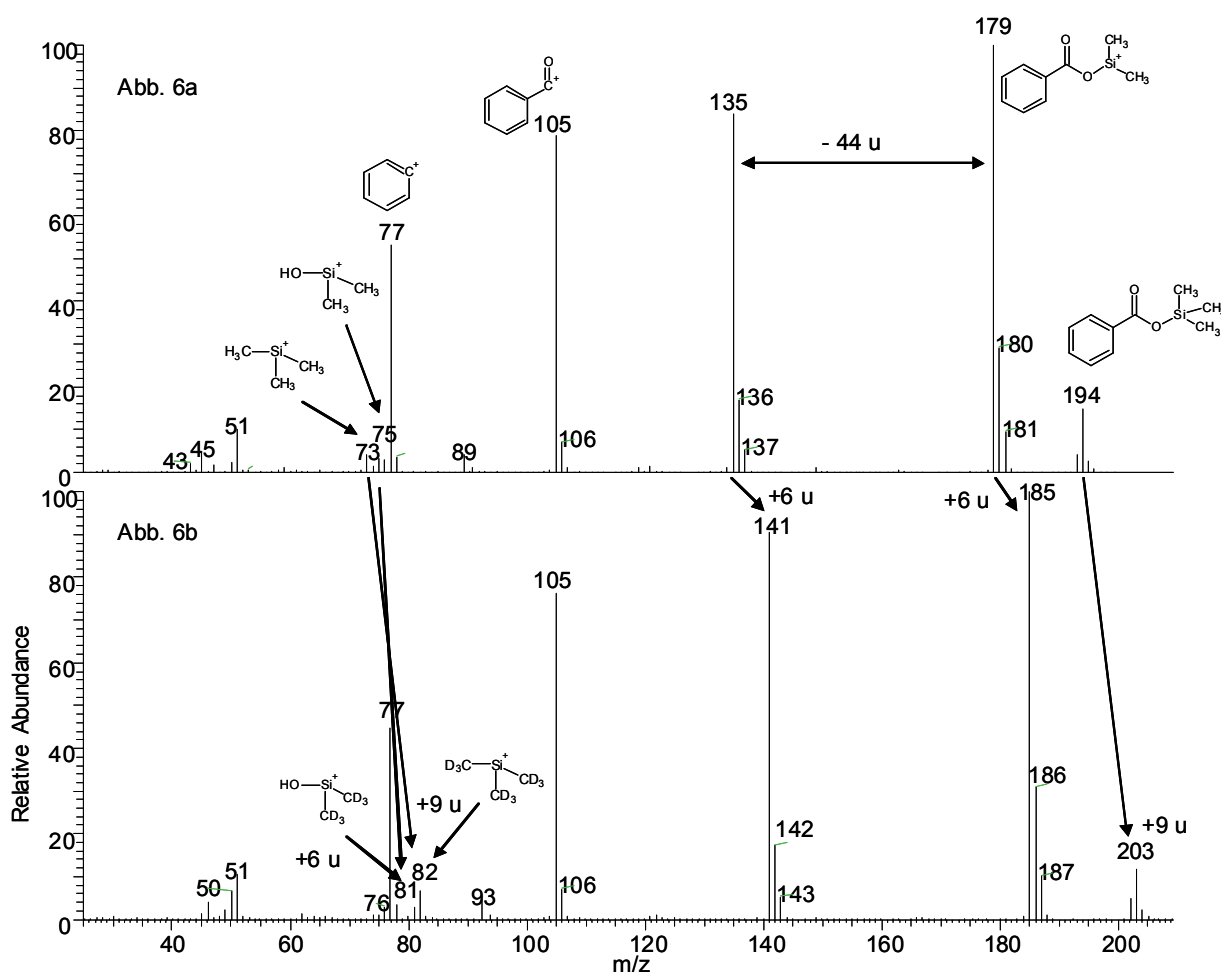
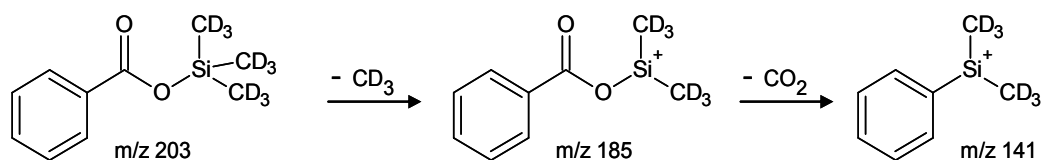


Abb. 6. Massenspektrum von a) Benzoessäure-TMS und b) Benzoessäure-TMS-D₉.

Die Massendifferenz von 44 u zwischen den Ionen der Methylgruppenabspaltung m/z 185 und m/z 141 kann dann nur durch eine Neutralteilchenabspaltung von Kohlendioxid (CO_2) hervorgerufen werden. Diese Abspaltung tritt bei den meisten monosilylierten Säuren auf und ist mit einer Umlagerungsreaktion verbunden (Abb. 7), wie man nach Derivatisierung mit deuteriertem MSTFA erkennen kann.

Abb. 7. MS-Fragmente der Benzoesäure-TMS-D₉.

6. Derivatisierung einer Enol-Form

Ketone und Aldehyde können bei Keto-Enol-Tautomerie ebenso mit MSTFA reagieren. Bei Derivatisierung der Enol-Form des Benzylmethylketons (Abb. 8) entstehen zwei Derivate, die sich chromatographisch trennen lassen. Normalerweise unterscheiden sich die resultierenden Massenspektren der beiden Isomere jedoch sehr wenig. Diese Reaktionen sind in der Regel ohne Katalysator unvollständig, sodass im Chromatogramm auch noch das underivatisierte Keton erscheint.

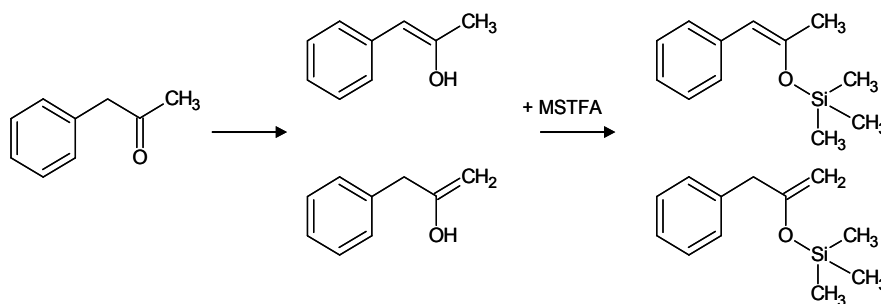


Abb. 8. Silylierung der Enol-Form von Benzylmethylketon.

7. Derivatisierung von Stickstoffverbindungen

Amine mit einem oder zwei austauschbaren Wasserstoffen, wie z. B. Amphetamin (Abb. 9), zeigen häufig im Massenspektrum nicht eindeutig die Molmasse an. Das $[M]^{+*}$ Ion, m/z 135 zeigt nur eine geringe Intensität und ist kleiner als das $[M-1]^+$ Ion (m/z 134), das scheinbar die Molmasse andeutet. Bei der Strukturaufklärung einer unbekanntes Verbindung kann es dadurch in Kombination mit der Stickstoffregel zu einer Fehlinterpretation kommen, denn die Masse 134 u deutet dann darauf hin, dass die Struktur kein Stickstoffatom oder eine gerade Anzahl von Stickstoffatomen beinhaltet. Wenn man davon ausgeht, dass sie kein Stickstoff enthält, dann wäre auch eine sauerstoffhaltige Verbindung denkbar.

Auch das Fragmentation mit der Masse 44 u, das den Basispeak in dem Massenspektrum der Abb. 9 bildet, lässt sich strukturell nicht eindeutig zuordnen. Es könnte sich sowohl um das in Abb. 10 beschriebene stickstoffhaltige Ion handeln oder auch um ein Radikalkation eines Aldehyds, das durch eine McLafferty-Umlagerung [8] gebildet wird.

Durch die Derivatisierung der Aminofunktion des Amphetamins mit MSTFA und der alpha-Spaltung in der Ionenquelle entsteht aus dem Ion 44 u das Ion mit der Masse 116 u (Abb. 10 und 11). Im Gegensatz dazu würde sich ein Aldehyd ohne Katalysator nur unvollständig derivatisieren lassen. Da an dieser Stelle keine McLafferty-Umlagerung mehr möglich ist, würde aus m/z 44 ein ungerades Fragment entstehen und zusätzlich m/z 75 zu sehen sein.

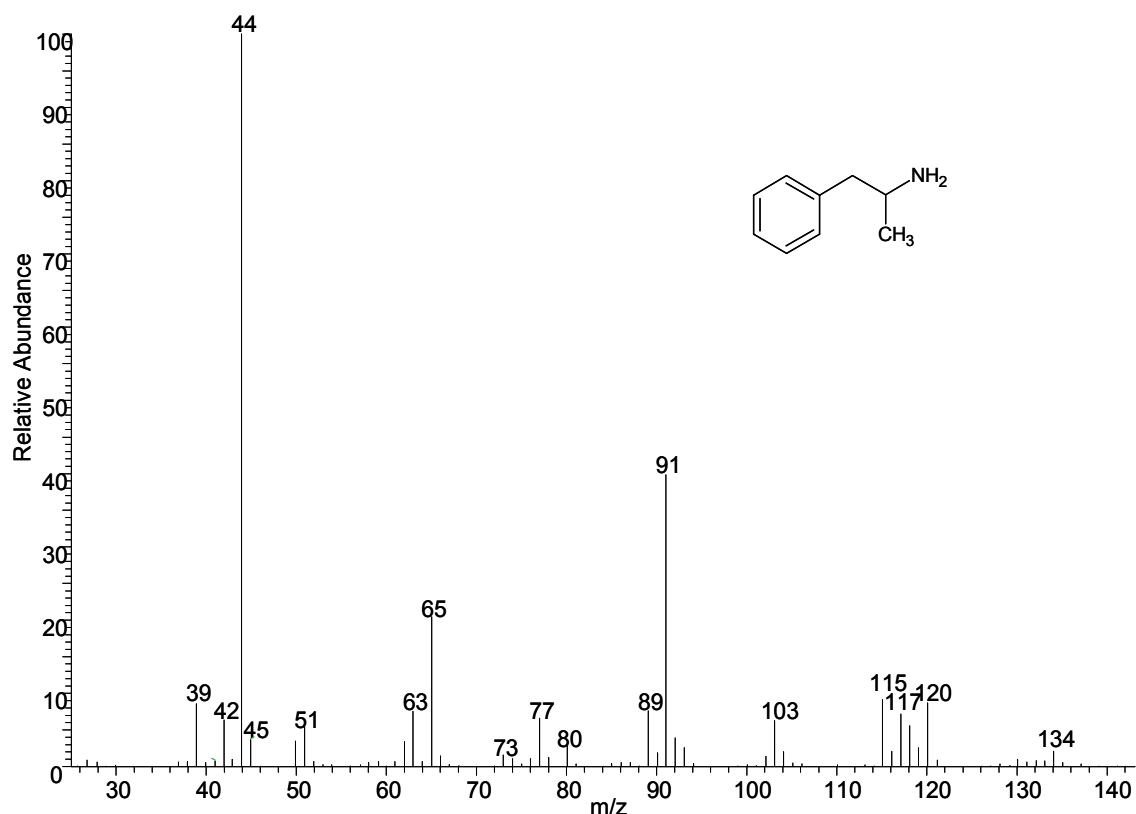


Abb. 9. Massenspektrum von Amphetamin.

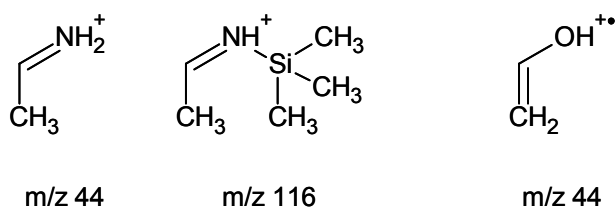


Abb. 10. Fragment eines Amins ohne und mit Silylierung nach alpha-Spaltung und eines Aldehyds nach McLafferty-Umlagerung.

Das Fragmentation 44 u wird eindeutig in die Masse 116 u überführt. Dies wird nach MSTFA-D₉-Derivatisierung durch die Bildung des Fragmentions m/z 125 bestätigt. Ebenfalls treten auch nicht die für die Sauerstoffsilylierung typischen Ionen bei m/z 75 bzw. m/z 81 auf.

Durch die Derivatisierung wird in dem vorliegenden Fall aber leider auch nicht die Molmasse sichtbar. Nahezu alle silylierten Verbindungen zeigen ausgehend von der Molmasse die Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der eingeführten TMS-Schutzgruppe (Abb. 4, 6 und 11). Ausgehend von dieser Beobachtung und dem Auftreten der Ionen bei m/z 192 im TMS-Derivat, sowie m/z 198 im D₉-TMS-Derivat (mit einer Massenverschiebung von 6 Masseneinheiten) erkennt man in Abb. 11, dass die Molmasse des derivatisierten Amphetamins bei Masse 207 u bzw. bei 216 u liegen muss.

Des weiteren kann man durch das Spektrum des TMS-D₉-Derivates erkennen, dass eine weitere alpha-Spaltung einer Methylgruppe, die kein Deuterium enthält, an dem alpha-Kohlenstoffatom der Aminofunktion stattfindet und das Fragmention 201 u bildet. Dieses Ion beinhaltet noch alle neun Deuteriumatome der Schutzgruppe.

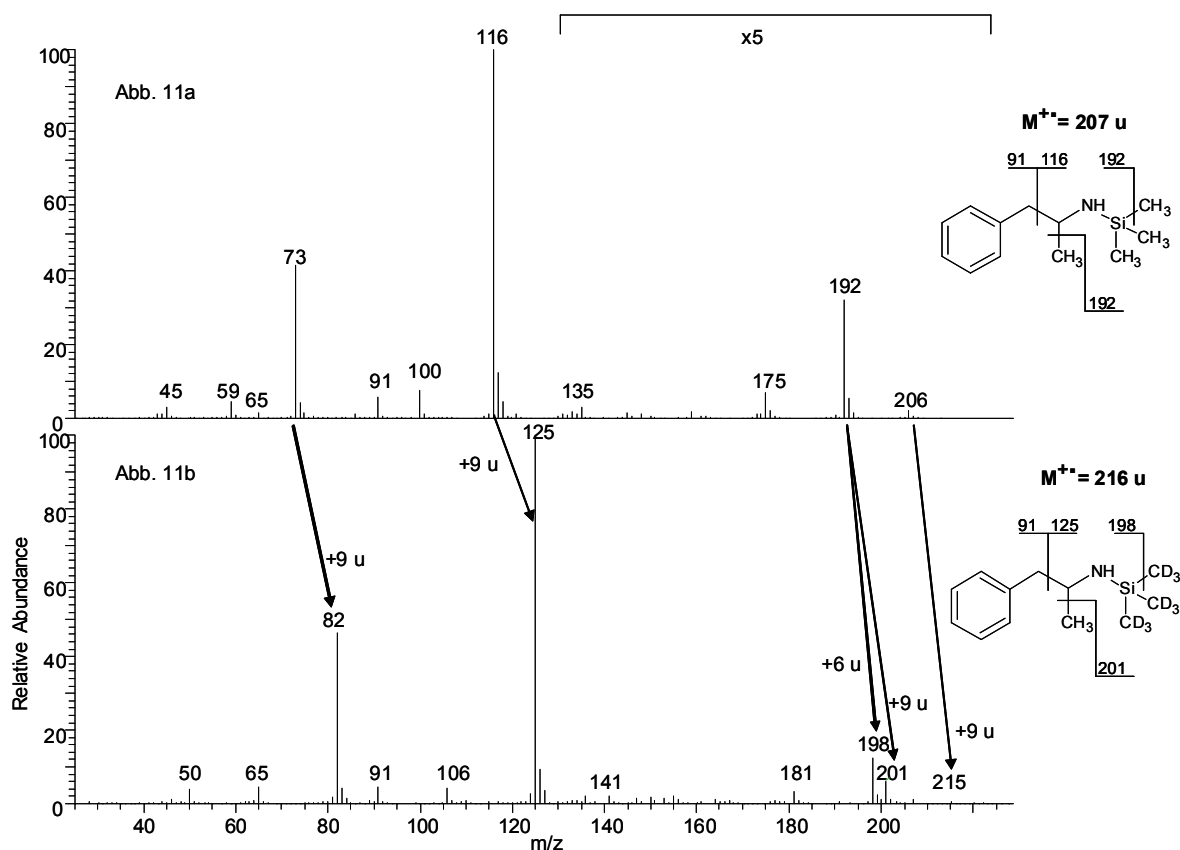


Abb. 11. Massenspektrum von a) Amphetamin-TMS, b) Amphetamin-TMS-D₉.

8. Identifizierung einer unbekanntes Verbindung nach Derivatisierung mit MSTFA und MSTFA-D₉

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit der Derivatisierungstechnik soll abschließend ein Beispiel einer unbekanntes Verbindung behandelt werden, die sich scheinbar in der underivatisierten Form zersetzt und nicht chromatographisch trennen lässt. Nach der Silylierung mit MSTFA zeigt das Chromatogramm zwei Peaks, deren Massenspektren in (Abb. 12a und 13a) dargestellt sind.

Die beiden Massenspektren unterscheiden sich in der Molmasse um 72 u, der Differenz einer TMS-Gruppe. Die Fragmente m/z 75 und m/z 147 in beiden Spektren deuten auf mindestens zwei austauschbare Wasserstoffe und Sauerstoffsilylierung hin. Die ungeraden Molmassen zeigen nach der Stickstoffregel eine ungerade Anzahl von Stickstoffatomen im Molekül an. Die Molmasse der Ausgangssubstanz kann aber aus beiden Spektren nicht errechnet werden, da die Anzahl der ausgetauschten aktiven Wasserstoffe nicht erkennbar ist.

Die Derivatisierung mit deuteriertem MSTFA führt zu den in Abb. 12b und 13b dargestellten Massenspektren. Im Massenspektrum der ersten Substanz mit dem Molekülradikalkationen bei m/z 385 (Abb. 12a), wird dieses um 27 Masseneinheiten nach m/z 412 verschoben (Abb. 12b). Das bedeutet, dass in das Molekül drei TMS-Schutzgruppen eingeführt wurden. Daraus lässt sich die Molmasse der Ausgangsverbindung errechnen, ($385 \text{ u} - 3 \times 72 \text{ u} = 169 \text{ u}$) die somit 169 g/mol beträgt. Bei der zweiten Verbindung wird das Molekülradikalkation von m/z 457 um 36 u nach Masse 493 u verschoben. Auch in diesem Fall führen die Berechnungen der Molmasse ($457 \text{ u} - 4 \times 72 \text{ u} = 169 \text{ u}$) auf eine Molmasse von 169 g/mol.

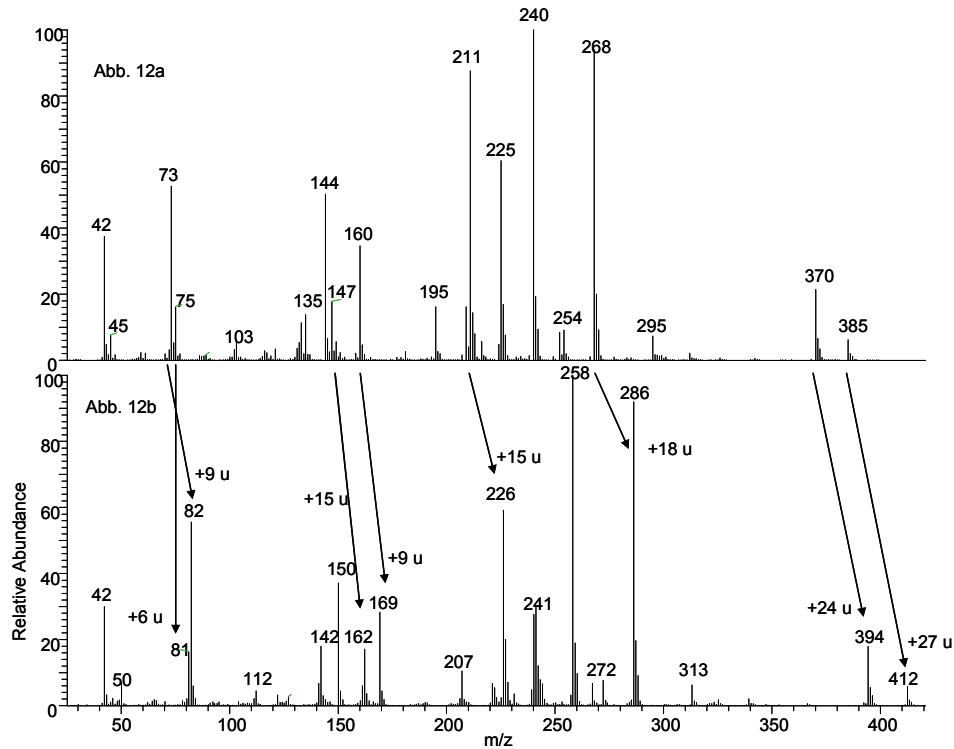


Abb. 12. MS-Spektren der ersten unbekanntes Verbindung a) silyliert, b) deuteriert silyliert.

Gesucht wird nun eine Substanz, die vermutlich vier aktive Wasserstoffe besitzt, davon einen oder mehrere an Sauerstoff und vermutlich einen an Stickstoff gebunden. Die Reaktion von MSTFA mit aktiven N-Wasserstoffen ist ohne Katalysator unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht immer vollständig, besonders bei sterischer Hinderung. Daraus resultieren die beiden unterschiedlichen Derivatisierungsstufen der Ausgangssubstanz.

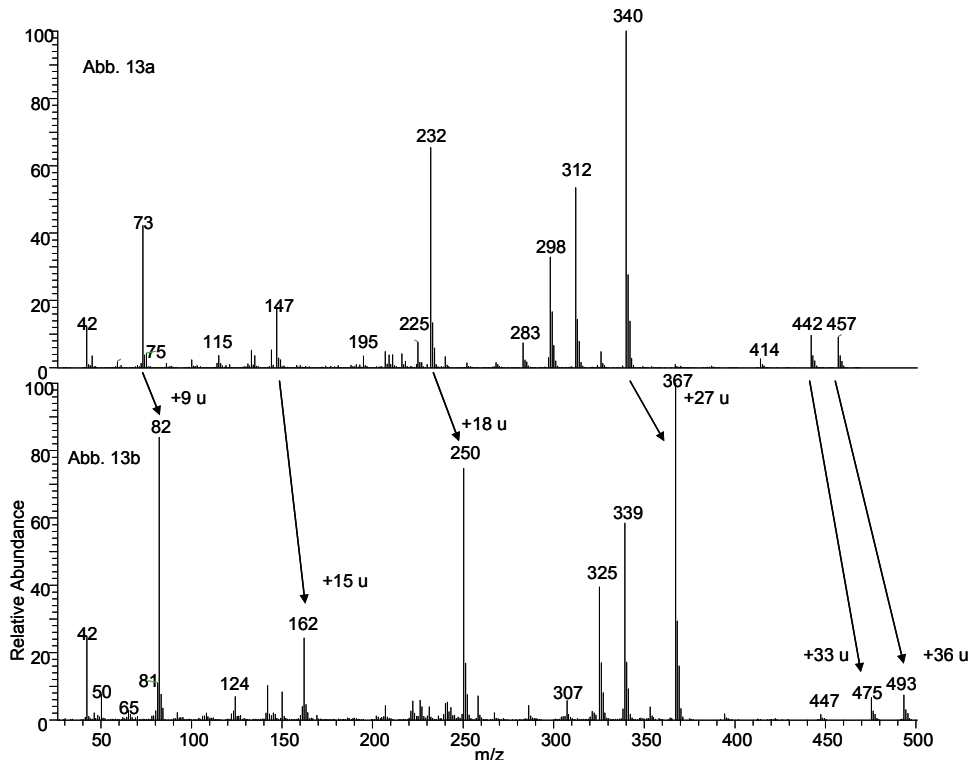


Abb. 13. MS-Spektren der zweiten unbekanntes Verbindung a) silyliert, b) deuteriert silyliert.

Mit der errechneten Molmasse von 169 u wurde eine Recherche in verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Die Überprüfung der erhaltenen Vorschläge in Verbindung mit den Informationen aus den Massenspektren führt zu dem Herbizid Glyphosat (Abb. 14).

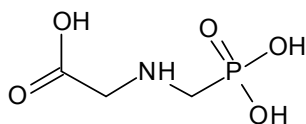
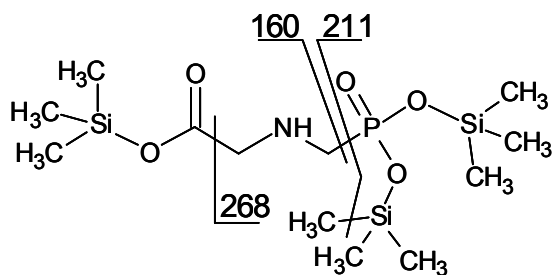


Abb. 14. Das Herbizid Glyphosat (M = 169 u C₃H₈NO₅P).

Eine Überprüfung einzelner Fragmente, auch in Verbindung mit der Stickstoffregel und der Massenverschiebung der deuterierten Derivate, bestätigt das Ergebnis (Abb. 15).

Glyphosat-TMS₃ M = 385 u C₁₂H₃₂NO₅PSi₃



Glyphosat-TMS₄ M = 457 u C₁₅H₄₀NO₅PSi₄

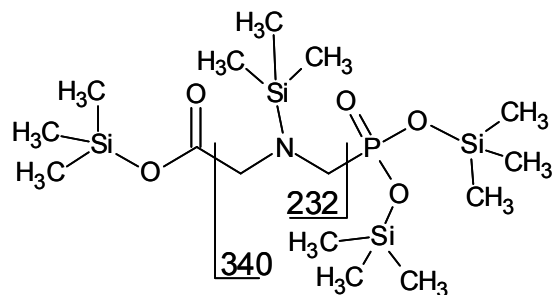


Abb.15. Strukturformeln der unterschiedlichen Silylierungsstufen von Glyphosat.

9. Schlussfolgerung

Nicht jedes Labor besitzt Massenspektrometer mit MS/MS-Möglichkeiten oder hochauflösende Geräte. Mit Hilfe des Derivatisierungsmittels MSTFA und seiner deuterierten Form ist es möglich, mit niederauflösenden Massenspektrometern zusätzliche Informationen für eine erfolgreiche Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen zu gewinnen. Natürlich gibt es auch andere Derivatisierungsreagenzien die ähnliche Ergebnisse liefern. Der Vorteil von MSTFA allerdings besteht darin, dass sich die Retentionszeiten der silylierten und der deuteriert silylierten Derivate nur um wenige Sekunden unterscheiden. Die deuterierten Derivate eluieren etwas früher, befinden sich aber im gleichen Zeitfenster. Diese Eigenschaft kann entscheidend sein, wenn nur eine geringe Konzentration einer aufzuklärenden Substanz neben vielen Matrixbestandteilen enthalten ist.

Ein weiterer Vorteil ist, dass bei derivatisierbaren Verbindungen meistens auf eine weitere Messung mit schonender Ionisierung, z. B. chemische Ionisierung, verzichtet werden kann, da nahezu in allen Fällen nach Derivatisierung mit MSTFA und seiner deuterierten Form die Molmasse der Ausgangssubstanz errechnet werden kann.

10. Referenzen

- [1] Spengler B, Lützenkirchen F, Kaufmann R. On-target deuteration for peptide sequencing by laser mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* 1993;28:1482-1490.
- [2] Donike M. N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. *J Chromatogr* 1969;42:103.
- [3] Urbach D. Improved detection and identification using MSTFA/MSTFA-D₉ derivatization. *Reporter, Sigma-Aldrich* 2012, U.S. Vol. 30.1, 14-15.
- [4] Donike M, Zimmermann J. Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und tert. Butyl-dimethylsilyl-enoläthern von Ketosteroiden für gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen. *J.Chromatogr* 1980;202:483-486.
- [5] Blau K, King G. *Handbook of Derivatives for Chromatographie.* Verlag Heyden 1977: 152-194.
- [6] Ende M, Luftmann H. Unerwartete Reaktionsprodukte von N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) mit Aldehyden. *Tetrahedron* 1984;40:5167-5170.
- [7] Little JL. Artifacts in trimethylsilyl derivatisation reactions and ways to avoid them. *J Chromatogr A* 1999;844:1-22.
- [8] McLafferty FW, Turecek F. *Interpretation von Massenspektren.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1995: 82-84.

Abstract

Derivatization is commonly used to identify and quantify known and unknown compounds using mass spectrometry. It is not limited to small molecules. Even peptides can be derivatized for these purposes.

Silylation has been proven to be a helpful tool for GC/MS analysis of organic compounds. One of the favored utilized reagents is N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA), because it can be used to derivatize most of the functional groups with exchangeable hydrogens commonly found in organic compounds. Thus, a nonpolar trimethylsilyl (TMS) substituent will be added to the analytes, which improves the chromatographic separation and the thermal stability in the injector or on the column. Specific fragment ions in mass spectra indicate either it is an O- or N-silylation. In some cases it is unclear precisely how many of the molecule functional groups are affected by the derivatization reaction, especially when dealing with unknown compounds. Using deuterated MSTFA (MSTFA-D₉) helps to overcome this problem because the molecular mass of the MSTFA-D₉ derivative increases by exactly 9 mass units for each derivatized functional group. Thus, it is possible to calculate the molecular mass of the original compound by taking the mass shift in the MSTFA/MSTFA-D₉ spectra into account. A further advantage is that both derivatives - TMS and TMS-D₉ - elute within the same time frame which facilitate the interpretation.