

CHROM. 6541

ACYLIERUNG MIT BIS(ACYLAMIDEN)

N-METHYL-BIS(TRIFLUORACETAMID) UND BIS(TRIFLUORACETAMID), ZWEI NEUE REAGENZIEN ZUR TRIFLUORACETYLIERUNG

M. DONIKE

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

(Eingegangen am 11. Dezember 1972)

SUMMARY

Acylation with bis(acylamides). N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) and bis(trifluoroacetamide), two new reagents for trifluoroacetylation

Trifluoroacetylation of amine, hydroxyl, and thiol groups has been achieved under mild, non-acidic conditions with either N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) or bis(trifluoroacetamide). Products remaining after substituting a trifluoroacetyl residue for a reactive proton are neutral trifluoroacetamides. These volatile compounds are eluted at the beginning of the gas chromatogram as sharp peaks so that evaporation of excess reagent and by-products, which can lead to serious errors, especially in the case of very volatile substances, is not necessary. N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) is a liquid at room temperature and can be used in many cases without additional solvents, which favours its application in trace analysis. An excess of reagent protects those functions which are sensitive to hydrolysis. Selective acylation of amine functions in the presence of hydroxyl or carboxyl groups is possible if these groups are protected by trimethylsilylation.

EINLEITUNG

Obwohl schon 1881 HOFMANN¹ die acylierenden Eigenschaften von Diacylamiden beschrieben hat, wurde bisher diese Substanzklasse für die Derivatbildung bei gaschromatographischen Untersuchungen nicht verwendet. Säureanhydride werden wegen ihrer leichten Zugänglichkeit allgemein bevorzugt; daneben werden für spezielle Probleme Acylimidazolide empfohlen². Die Entfernung des Reagenzüberschusses und der Reaktionsprodukte—Carbonsäure bzw. Imidazol—erfordern jedoch zusätzliche, oft mit Fehlern behaftete Arbeitsgänge. Bis(acylamide) vermeiden diese Schwierigkeit, denn nach Übertragung eines Acylrestes verbleibt als Reaktionsprodukt ein neutrales Amid ohne katalytische Aktivität. Ähnlich der Trimethylsilylierung durch niedrig siedende N-Trimethylsilylamide^{3–6} entspricht diese Art der

Acylierung den gaschromatographischen Anforderungen an eine schnelle, die Analyse nicht störende Derivatbildung.

EXPERIMENTELLES

Synthese von N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA)

In einem 500-ml Dreihals-Rundkolben, der mit einem Rührer, einem Rückflusskühler und einem Tropftrichter ausgerüstet ist, werden unter Feuchtigkeitsausschluss 1.0 Mol (199.3 g) N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid⁶ auf 0° (Eisbad) abgekühlt. Dann lässt man zu dieser Mischung langsam 1.0 Mol Trifluoressigsäureanhydrid (210.0 g) unter Rühren zutropfen. Nach Beendigung der Zugabe des Anhydrids wird das Eisbad entfernt und der Ansatz über eine 60-cm-lange Vigreux-Kolonnen fraktioniert.

N-Methyl-bis(trifluoracetamid): $C_5H_3F_6NO_2$.

M: 223.07.

Ausbeute: ca. 210 g (0.95 Mol), 95% d.Th.

Kp.₇₆₀: 123–124°.

Synthese von Bis(trifluoracetamid) (BTFA)

1 Mol Trifluoracetamid (113.0 g) werden mit ca. 1.1 Mol Trifluoressigsäureanhydrid (230.0 g) in einem 250 ml Rundkolben unter Feuchtigkeitsausschluss zum Sieden erhitzt, wobei mit fortschreitender Reaktion die Wärmezufuhr langsam gesteigert wird. Nach 2-stündigem Erhitzen unter Rückfluss wird unter Normaldruck über eine 60-cm-lange Vigreux-Kolonnen fraktioniert. Nachdem eine geringe Menge von überschüssigem Trifluoressigsäureanhydrid sowie ca. 1 Mol Trifluoressigsäure (Kp. 71°) überdestilliert sind, wird bei einem Siedepunkt von 140° die Vorlage gewechselt.

Bis(trifluoracetamid): $C_4HF_6NO_2$.

M: 209.05.

Ausbeute: ca. 190 g (0.9 Mol), 90% d.Th.

Kp.₇₆₀: 141°.

Fp.: 85°.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Derivate für die gaschromatographischen und massenspektroskopischen Untersuchungen

Etwa 2 mg der zu untersuchenden Komponenten werden mit 0.5 ml MBTFA versetzt. Erfolgt bei Raumtemperatur keine Umsetzung, so erhitzt man die Reaktionsansätze. Verbindungen, die nach einer Stunde bei 120° noch nicht gelöst sind, können in einem Gemisch, bestehend aus einem aprotischen Lösungsmittel, wie Acetonitril, Pyridin, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran etc. und MBTFA (4:1) umgesetzt werden.

BTFA, das bei Raumtemperatur als Festsubstanz vorliegt, wird in einem geeigneten aprotischen Lösungsmittel gelöst. Diese Lösung dient zur Acylierung. BTFA ist in vielen organischen aprotischen Lösungsmitteln gut löslich. So bilden

schon 30 g BTFA und 10 g Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur eine klare Lösung, die sich ebenso wie MBTFA mit Hilfe einer Spritze leicht dosieren lässt.

Gaschromatographische und massenspektroskopische Untersuchungen

Die Umsetzungen wurden zunächst gaschromatographisch verfolgt. Dann wurden in einem Massenspektrometer, das über einen Direkteinlass mit einem Gaschromatographen verbunden war, die Massenspektren der Reaktionsprodukte und—soweit wie möglich—auch die der Ausgangsverbindungen aufgenommen. Die Retentionszeiten bei diesen Untersuchungen wurden durch Variation der Ofentemperatur des Gaschromatographen auf *ca.* 5 min eingestellt.

Die gaschromatographischen Parameter waren: Gerät, Modell 7600 (Hewlett-Packard); Glassäule, 1.06 m × 3 mm I.D., 5% OV-101 auf Chromosorb-G AW-DMCS; Gase, He 60 ml/min, H₂ 35 ml/min und Luft 250 ml/min.

Die Temperatur des Einspritzblocks war 200–250°, des FIDs, 300° und des Ofens, variabel.

Die massenspektrometrischen Parameter lauteten: CH₅ (Varian MAT) Ionenquellentemperatur, 140°; Emissionsstrom, 300 μA; Beschleunigungsspannung, 3 kV; Sekundärelektronen Vervielfacher (SEV), 1.75 kV; Auflösung, *ca.* 300 m/ΔM (10% Tal); Elektronenenergie, 70 eV; Scan-Geschwindigkeit, 2.5 sec/Massendekade.

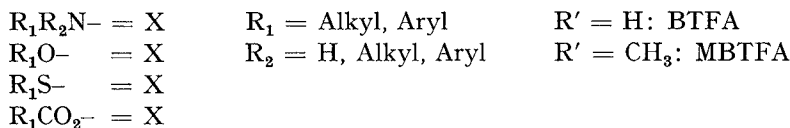
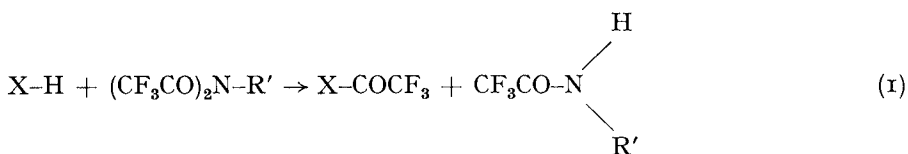
Die Temperatur der Verbindungsstücke und des Direkteinlasses war 250°.

Ein doppelstufiger Watson-Bieman-Separator wurde verwendet.

Die Betriebsbedingungen des dem Massenspektrometer vorgeschalteten Gaschromatographen lauteten: Glassäule, 0.6 m × 2 mm I.D., 5% OV-101 auf Chromosorb-G AW-DMCS; Helium, 30 ml/min; die Temperatur des Einspritzblocks, 240° und die des Ofens, variabel.

ERGEBNISSE DER TRIFLUORACETYLIERUNGEN MIT N-METHYL-BIS(TRIFLUORACETAMID) UND BIS(TRIFLUORACETAMID)

MBTFA reagiert schnell und quantitativ mit primären und sekundären Aminen unter Bildung der entsprechenden Amide (siehe Tabelle I). Etwas langsamer werden Hydroxylfunktionen bzw. Thiole zu den Trifluoracylestern bzw. Trifluoracetylthioestern umgesetzt (Gleichung 1). Freie Carbonsäuren bilden unter Erwärmen auf 120° in langsamer Reaktion gemischte Anhydride:



Sind mehrere Funktionen in einem Molekül enthalten, so reagieren diese mit

TABELLE I

BEISPIELE FÜR DIE DERIVATBILDUNG MIT BTFA UND MBTFA

Die Umsetzungen wurden gaschromatographisch und massenspektrometrisch unter den im experimentellen Teil angegebenen Bedingungen überprüft.

Nr.	Verbindung	Reagenz	Derivat	Umgesetzte Funktion
1	Amphetamin	MBTFA BTFA	N-TFA-Amphetamin	prim. Amin
2	Methamphetamin	MBTFA BTFA	N-TFA-Methamphetamin	sec. Amin
3	Diphenylamin	MBTFA	N-TFA-Diphenylamin	sterisch stark gehindertes, sec. aromatisches Amin
4	<i>n</i> -Octanol	MBTFA BTFA	TFA- <i>n</i> -Octylester	prim. Hydroxylgruppe
5	Stearylalkohol	MBTFA	TFA-Stearylester	prim. Hydroxylgruppe
6	Glykol	MBTFA	1,2-Bis(TFA)glykol	prim. Hydroxylgruppen
7	Mannit	MBTFA	Hexakis(TFA)mannit	Polyglykol mit prim. und sec. Hydroxylgruppen
8	Capronsäure	MBTFA	Gemischtes Anhydrid	Carboxylgruppe
9	Thioglykol	MBTFA	O,S-Bis(TFA)thioglykol	prim. Thiol- und prim. Hydroxylgruppe
10	Vanillinmandelsäure	MBTFA	O,O-Bis(TFA)Vanillin- mandelsäure	phenolische und sterisch stark gehinderte sec. Hydroxylgruppe
11	Leucinmethylester	MBTFA	N-TFA-Leucinmethyl- ester	Aminogruppe in Amino- säureester
12	Tyrosinmethylester	MBTFA	N,O-Bis(TFA)tyrosin- methylester	phenolische Hydroxyl- gruppe und Aminogruppe in Aminosäureester
13	Ephedrin	MBTFA	N,O-Bis(TFA)Ephedrin	sterisch gehinderte sec. Hydroxylgruppe, sec. Aminogruppe
14	Stearylalkohol-TMS- äther	MBTFA	—	—
15	Palmitinsäure-TMS- ester	MBTFA	—	—
16	N,O-Bis(TMS)- ephedrin	MBTFA	N-TFA-O-TMS-ephedrin	N-TMS-geschütztes sec. Amin
17	N,O-Bis(TMS)- tyrosin-TMS-ester	MBTFA	N-TFA-O-tyrosin-TMS- ester	prim. Aminogruppe, N-TMS-substituiert

unterschiedlicher Geschwindigkeit, die durch die Art der zu substituierenden Funktion und dem Ausmass der sterischen Hinderung gegeben ist. Bei dem für gaschromatographische Untersuchungen verwendeten hohen Überschuss an Reagenz werden jedoch alle oben aufgeführten Funktionen acyliert. Tyrosinmethylester z.B. wird in N,O-Bis(trifluoracetyl)tyrosinmethylester überführt. Ephedrin, als Base in Acetonitrol gelöst, reagiert ebenfalls unter Bildung der N,O-Bis(trifluoracetyl)verbindung. Weniger reaktionsfähig ist das Bis(trifluoracetamid) (BTFA). So verläuft die Acylierung von Hydroxyl- und Aminfunktionen bei gleicher Konzentration an Reagenz deutlich langsamer als mit MBTFA (vergl. Fig. 1).

Darüber hinaus ist eine selektive N-Acylierung mit diesen Reagenzien möglich, wenn Hydroxyl- und Carboxylgruppen durch vorhergehende Trimethylsilylierung geschützt werden. O-Trimethylsilyläther- und Trimethylsilylesterfunktionen werden durch MBTFA und BTFA nicht angegriffen (vergl. Beispiele 14 und 15 in Tabelle I).

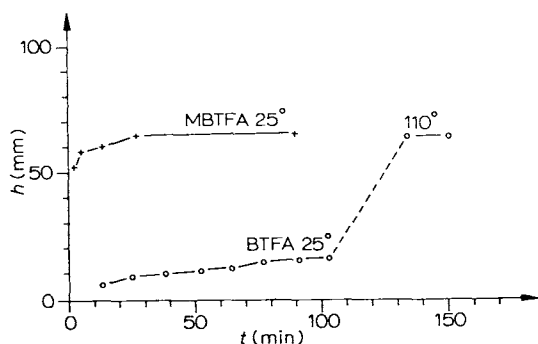
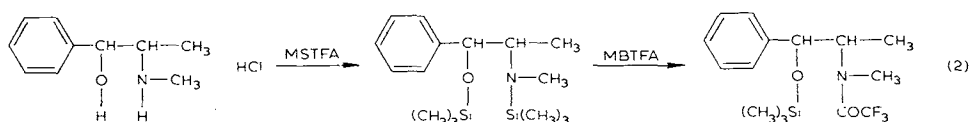


Fig. 1. Geschwindigkeit der Trifluoracetylierung von Amphetamin mit MBTFA und BTFA. 10 mg Amphetamin und 100 mg der Bis(trifluoracetamide) in 1 ml Tetrahydrofuran.

So entsteht nach Zugabe von MBTFA aus N,O-Bis(trimethylsilyl)ephedrin, in N-Methyl-trimethylsilyl-trifluoracetamid⁶ und Tetrahydrofuran gelöst, N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilyl-ephedrin (Gleichung 2). Analog reagiert N-Trimethylsilyl-O-trimethylsilyl-tyrosin-trimethylsilylester unter Bildung von N-Trifluoracetyl-O-trimethylsilyl-tyrosin-trimethylsilylester.

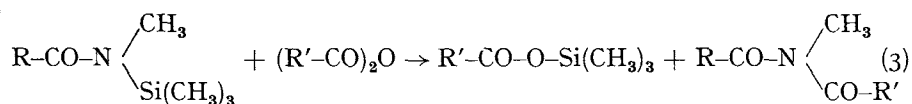


DISKUSSION

Zur Darstellung von N-Methyl-bis(trifluoracetamid) und Bis(trifluoracetamid)

Bis(acylamide) sind synthetisch leicht zugänglich, wenn man Säureanhydride auf Amide einwirken lässt⁷. Zur Darstellung von MBTFA erwies sich jedoch der Umweg über das N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) als der günstigste Syntheseweg. MSTFA reagiert mit äquimolaren Mengen von Trifluoressigsäureanhydrid unter stark positiver Wärmetönung und bildet quantitativ MBTFA und Trifluoressigsäure-trimethylsilylester, der sich wegen seines niedrigen Siedepunktes von 91° (760 mm) leicht destillativ abtrennen lässt. MBTFA ist eine farblose Flüssigkeit, die im weiteren Verlauf der Destillation unzersetzt bei 123–124° übergeht.

Die in der Gleichung (3) beschriebene Reaktionsfolge lässt sich auch auf weitere N-Trimethylsilylamide und Carbonsäureanhydride übertragen. Sie bietet besonders dann einen vorteilhaften Zugang zu den symmetrischen und unsymmetrischen Bisacylamiden, wenn es auf die Reinheit der Produkte ankommt.



R = R' = -CF₃: MBTFA

BTFA ist nach der konventionellen Methode⁷ durch Erhitzen von Trifluoracetamid mit Trifluoressigsäureanhydrid leicht und in guter Ausbeute zugänglich.

Der Vorteil der Acylierung mit Bis(acylamiden)

Zur Trifluoracetylierung für gaschromatographische Untersuchungen wird fast ausschliesslich Trifluoressigsäureanhydrid verwendet, eine äusserst reaktionsfähige Verbindung, die zur Vermeidung von Nebenreaktionen eine genaue Kontrolle der Reaktionsbedingungen erfordert. Als Beispiel sei die Oxazolidinonbildung bei der lang andauernden Einwirkung von Trifluoressigsäureanhydrid auf Aminosäuren angeführt⁸. Der Überschuss des Reagenzes und die als Nebenprodukt der Acylierung entstehende Trifluoressigsäure müssen vor der gaschromatographischen Analyse entfernt werden, um katalytisch induzierte Nebenreaktionen infolge der hohen Temperatur des Einspritzblockes und um nachteilige Einflüsse auf die Trennsäule auszuschalten. Ähnliche Überlegungen gelten für die anderen Säureanhydride, sowie auch für Säurechloride. Acylimidazole, die in einigen Fällen zur Acylierung empfohlen werden, ergeben als Reaktionsprodukt zwar die schwache Base Imidazol, die jedoch wegen ihrer Polarität und ihrer Schwerflüchtigkeit ungünstige gaschromatographische Eigenschaften aufweist.

Symmetrisch substituierte Bis(acylamide) als Acylierungsmittel vermeiden diese Nachteile. Als Reaktionsprodukt entsteht das neutrale Säureamid, das sich gegenüber Trennsäulen inert verhält. Im Falle von MBTFA bzw. BTFA handelt es sich darüber hinaus um Amide mit hohem Fluorgehalt, die als relativ flüchtige Verbindungen zu Beginn eines Gaschromatogramms eluiert werden (vergl. Tabelle II). Damit wird eine unmittelbare Injektion des Reaktionsansatzes ermöglicht. Eine

TABELLE II

KOVATS-INDICES¹²

Glassäule, 1.06 m × 3 mm I.D., 5% OV-101 auf Chromosorb G AW-DMCS; Temperatur des Ofens 50°, des Einspritzblocks 150° und des FID 150°. Helium, 45 ml/min.

Nr.	Amid	Index	Standardabweichung	Anzahl der Messungen
1	N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA)	627	0.6	4
2	N-Methyl-trifluoracetamid (MTFA)	708	0.9	4
3	Bis(trifluoracetamid) (BTFA)	597	0.9	4
4	Trifluoracetamid	718	1.8	4

Entfernung des Reagenzüberschusses und der unerwünschten Reaktionsprodukte ist überflüssig. Der Verlust von leichtflüchtigen Verbindungen als nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle, wie sie z.B. bei der Analyse von Aminosäuren als N-Trifluoracetyl-aminosäure-methylester eine Rolle spielt⁹, wird somit vermieden.

Die Injektion des Reaktionsansatzes, die nicht zuletzt den Vorteil der Silylierung mit N-Trimethylsilylamiden ausmacht, ist ohne Einschränkung auch auf Acylierungen anwendbar. Die Trennleistung und die Adsorptionsaktivität von Trennsäulen mit Silikonpolymeren als flüssige Phasen werden auch nach 1000 Injektionen nicht verändert. Die Überprüfung von anderen flüssigen Phasen des Polyester- bzw. des Polyäthylenglykoltyps steht noch aus, jedoch ist nach den bisherigen Erfahrungen

mit Silylierungsmitteln¹⁰ nur eine Veresterung der endständigen Hydroxylgruppen der flüssigen Phasen zu erwarten. Weitere, für gaschromatographische Untersuchungen interessante Acylgruppen lassen sich nach der gleichen Methode übertragen, wie erste Versuche mit N-Methyl-bis(heptafluorbutyramid) und Bis-(heptafluorbutyramid)¹¹ zeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Trifluoracetylierung von Amin-, Hydroxyl- und Thiolgruppen kann unter schonenden Bedingungen mit den Bis(acylamiden) N-Methyl-bis(trifluoracetamid) (MBTFA) und Bis(trifluoracetamid) (BTFA) erfolgen. Nach der Übertragung einer Trifluoracetylgruppe entstehen als Reaktionsprodukte die leichtflüchtigen neutralen Amide N-Methyl-trifluoracetamid und Trifluoracetamid, die zu Beginn eines Gaschromatogramms eluiert werden. Für gaschromatographische Untersuchungen ist somit die Entfernung der überschüssigen Reagenzien und der Nebenprodukte, die eine zusätzliche, oft mit Fehlern behaftete Operation darstellt, nicht erforderlich. MBTFA ist bei Raumtemperatur flüssig und kann für viele Umsetzungen ohne Lösungsmittelzusatz verwendet werden, was besonders die Derivatbildung für Spurenanalysen erleichtert. Das überschüssige Reagenz schützt darüber hinaus leicht hydrolysierbare Funktionen vor Feuchtigkeitzutritt. Eine selektive N-Acylierung ist möglich, wenn gleichzeitig vorhandene Hydroxyl- und Carboxylfunktionen durch Trimethylsilylierung geschützt werden.

LITERATUR

- 1 A. W. HOFMANN, *Chem. Ber.*, 14 (1881) 2730.
- 2 M. G. HORNING, A. M. MOSS, E. A. BOUCHER UND E. C. HORNING, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 311.
- 3 J. F. KLEBE, H. FINKBEINER UND D. M. WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 88 (1966) 3390.
- 4 L. BIRKOFER UND M. DONIKE, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 270.
- 5 D. L. STALLING, C. W. GEHRKE UND R. W. ZUMWALT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31 (1968) 616.
- 6 M. DONIKE, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 103.
- 7 C. NOLDE, S. O. LAWESSON, J. H. BOWIE UND R. G. COOKS, *Tetrahedron*, 24 (1968) 1051.
- 8 W. STEGLICH UND V. AUSTEL, *Angew. Chem.*, 79 (1967) 155.
- 9 A. DARBRE UND K. BLAU, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 49.
- 10 M. DONIKE, W. HOLLMANN, D. STRATMANN, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 490.
- 11 M. DONIKE, in Vorbereitung.
- 12 A. WEHRLI UND E. KOVATS, *Helv. Chim. Acta*, 24 (1959) 2709.