

CHROM. 7485

GASCHROMATOGRAPHISCHE UND MASSENSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG VON L-THEANIN UND SEINES TRIMETHYLSILYL- DERIVATS

O. VITZTHUM und P. WERKHOFF

Hag AG, Wissenschaftliche Abteilung, Hagstrasse, 28 Bremen (B.R.D.)

(Eingegangen am 14. März 1974)

SUMMARY

Gas chromatographic and mass spectrometric studies on L-theanine and its trimethylsilyl derivative

L-Theanine can be analysed by gas chromatography after conversion into its trimethylsilyl derivative. The analysis by gas chromatography indicates that the reaction proceeds quantitatively. The mass spectra of both L-theanine and its trimethylsilyl derivative are discussed. Mass spectral fragmentation patterns of L-theanine and its trimethylsilyl derivative are confirmed by fragmentation sequences of γ -N-methyl-glutamin and the corresponding silyl derivative. Analysis by mass spectrometry demonstrates the formation of tris-(trimethylsilyl)-theanine.

EINLEITUNG

L-Theanine ist 1949 von Sakato¹ aus Tee isoliert und als γ -N-Äthylglutamin identifiziert worden. Unabhängig davon ist die Verbindung von Cartwright *et al.*² in grünem Tee nachgewiesen und in neuerer Zeit von Roberts und Sanderson³ und Selvendran und Selvendran⁴ bei der Untersuchung von Teeplanten und der Teefermentation als Hauptkomponente in der Aminosäurefraktion von Tee beschrieben worden. Casimir *et al.*⁵ isolierten L-Theanine mit Hilfe der Papierchromatographie aus *Xerocomus badius* und bewiesen die Struktur durch Vergleich mit der synthetischen Verbindung. Nach Kimura und Murata⁶ soll L-Theanine im Tierversuch die krampferzeugende Wirkung hoher Coffeinmengen antagonisieren. Völlig unabhängig von den Studien des grünen und schwarzen Tees ist L-Theanine bereits 1942 von Lichtenstein⁷ aus L-Pyrrolidoncarbonsäure und Äthylamin dargestellt worden. Weitere L-Theanine-Synthesen sind bei Sakato *et al.*⁸, Hashizume⁹, Furuyama *et al.*¹⁰ und Yamada *et al.*¹¹ beschrieben.

Die Verbindung wurde von uns synthetisiert und durch IR- und MS-Spektren bestätigt.

Zur Bestimmung von L-Theanine sind bisher nur papierchromatographische Arbeiten bekannt²⁻⁵. Wir haben deshalb geprüft, ob sich L-Theanine mit der Methode

der Gaschromatographie (GC) analysieren lässt. L-Theanin ist wegen der freien Carboxylfunktion nicht genügend flüchtig und kann deshalb nicht direkt gaschromatographisch bestimmt werden. In Form seines einfach und rasch herstellbaren Trimethylsilylderivats lässt sich die Verbindung jedoch eindeutig analysieren. Die Massenspektrometrie bestätigte uns die Struktur des Theaninderivats und den erwarteten Silylierungsgrad.

EXPERIMENTELLER TEIL

Synthesen

γ -N-Äthylglutamin (L-Theanin) ist gemäss den Verfahren^{5,7,9,10} dargestellt worden. Das Verfahren von Hashizume⁹ ist wegen seiner einfachen und schnellen Aufarbeitung, die Synthese von Furuyama *et al.*¹⁰ wegen der günstigen Ausbeute hervorzuheben. Die Darstellung nach Furuyama *et al.* liefert ein analysenreines Präparat mit folgenden mikroanalytischen Daten:

Ber.: C 48.26, H 8.10, N 16.08

Gef.: C 48.21, H 8.0, N 16.20

Die Verbindung besitzt einen Festpunkt von 212 bis 213. Der R_f -Wert beträgt 0.69 (Fliessmittel: Chloroform-Methanol-17%iges Ammoniak, 4:4:2/Celluloseplatte). Die Substanz gibt mit Ninhydrin eine starke Rotfärbung. Das IR-Spektrum ist völlig identisch mit der Verbindung, die Casimir *et al.*⁵ aus *Xerocomus badius* isoliert haben.

γ -N-Methylglutamin wurde nach Lichtenstein⁷ aus L-Pyrrolidoncarbonsäure und Methylamin erhalten.

Ber.: C 44.97, H 7.56, N 17.50

Gef.: C 45.07, H 7.43, N 17.52

Der Festpunkt beträgt nach mehrmaliger Umkristallisation 205.

Herstellung und gaschromatographische Analyse des Trimethylsilylderivats

Zur Darstellung des Trimethylsilylderivats verwendeten wir N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA), N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorbutyramid (MSHFBA) und N,N-Bis(trimethylsilyltrifluoracetamid) (BSTFA). BSTFA ist ein geeignetes Silylierungsmittel für viele Aminosäuren^{12,13}. Als beste Methode hat sich für L-Theanin die Umsetzung mit MSTFA erwiesen. Zur Durchführung der Derivatisierungsreaktion haben wir kleine Reaktionsgefässe eingesetzt, die mit einem Silicongummiseptum verschlossen sind. Die Silylderivate sind bekanntlich sehr feuchtigkeitsempfindlich; für die Probeentnahme durchsticht man das Septum mit der Injektionsspritze.

Zu einer Mischung von 3 mg L-Theanin und 3 mg Hexadecan (n -C₁₆H₃₄, interner Standard) gibt man 100 μ l MSTFA, schüttelt einige Minuten kräftig und lässt ca. 120 min bei Raumtemperatur stehen. Nach dieser Zeit ist die Reaktionslösung klar geworden und kann analysiert werden.

Zur Bestimmung der optimalen Reaktionszeit der Silylderivatbildung ist eine Theaninprobe in verschiedenen Zeitabständen auf den Gehalt der Reaktionsmischung an silyliertem Theanin überprüft worden.

Der Tabelle I, in der die Quotienten der Peakflächen aufgeführt sind, ist zu entnehmen, dass bei Raumtemperatur eine Reaktionszeit von 120 min ausreicht. Die GC Auswertung erfolgte durch Messung des Produkts aus Höhe und Breite in halber

TABELLE I

OPTIMALE REAKTIONSZEIT FÜR DIE THEANINSILYLIERUNG BEI RAUMTEMPERATUR

Reaktionszeit (min)	$F_{Th}/F_{C_{16}}$
5	0.398
20	0.534
35	0.816
48	0.939
60	0.969
80	1.108
100	1.132
120	1.158
150	1.156
180	1.159

 F_{Th} = Peakfläche von Trimethylsilyltheanin. $F_{C_{16}}$ = Peakfläche von innerem Standard $C_{16}H_{34}$

Höhe. Arbeitet man im Trockenschrank bei einer Temperatur von 100°, so kann die Silylierungszeit auf 80 min verkürzt werden. Zur quantitativen Bestimmung von L-Theanin sollte unbedingt ein 25- bis 30facher Überschuss an Silylierungsmittel verwendet werden. Der unangenehme Nebeneffekt, der sich im Detektor abscheidenden, nicht brennbaren Siliciumverbindungen, wurde umgangen, indem wir die silylierten Theaninproben bei nicht brennendem Flammenionisationsdetektor (FID) auf die Säule gegeben haben. Der Detektor wurde erst dann gezündet, wenn das Lösungsmittelgemisch aus MSTFA und seinem entsilylierten Reaktionsprodukt bereits eluiert war. Auf diese Art und Weise entsteht in der Brennkammer des FIDs nur eine unwesentliche Menge von Siliciumdioxid. Eine Messerie ist dann ohne Unterbrechung und

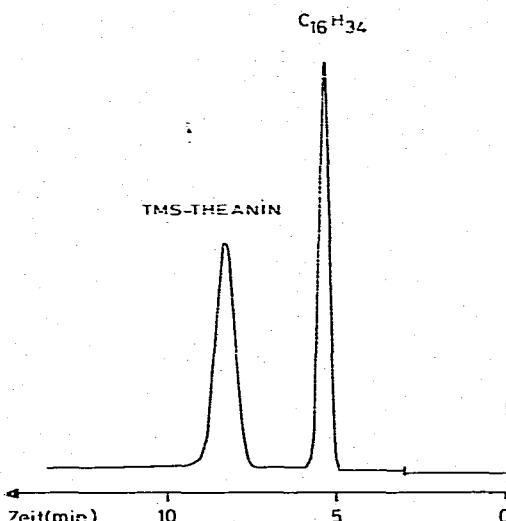


Fig. 1. Chromatogramm von Trimethylsilyltheanin mit Hexadecan als innerem Standard. Trennsäule 3,5 m 2% Dexsil 300 auf Chromosorb G HP, 100-120 mesh; Säulentemperatur 210°; Einspritzblocktemperatur 250°; 17 ml Stickstoff/min.

damit ohne Veränderung der Messparameter möglich. Ein Tailing bei Trimethylsilyltheanin kann weitgehend ausgeschlossen werden, wenn eine ausreichende Vorbehandlung der Säule mit Silylierungsmittel durchgeführt worden ist.

Die GC Analysen wurden mit einem Gaschromatographen F 30 der Fa. Perkin-Elmer ausgeführt.

Massenspektrometrie

Zur Aufnahme der Massenspektren diente das Gerät MAT 111 der Fa. Varian. Die Probeneingabe erfolgte im Falle von L-Theanin mit Hilfe der Direkteinlassmethode. Das Spektrum von Trimethylsilyltheanin ist mit einer Kopplung Gaschromatograph-Massenspektrometer aufgenommen worden, wobei das Massenspektrometer über einen Spaltseparator mit einer 50 m langen SF-96 Glaskapillarsäule gekoppelt war. Die Kopplung GC-Massenspektrometrie hat bei der silylierten Verbindung gegenüber der Direkteinlassmethode den Vorteil, dass keine präparative Isolierung des Theanin-peaks durchgeführt werden musste. Auf diese Weise konnte die Bildung hydrolytischer Artefakte bei der stark feuchtigkeitsempfindlichen Silylverbindung völlig ausgeschaltet werden. Die Probenaufgabe erfolgte gemäß der Splitless-Injection-Methode nach Grob und Grob¹². Die Arbeitsbedingungen waren: Säule, 50 m SF-96 Glaskapillarsäule; Säulentemperatur, 180°; Trägergas, Helium; Strömung, ca. 1 ml/min; Ionisierungsspannung, 80 eV; Ionenquellentemperatur, 200°.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Reproduzierbarkeit der Analyse

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Analysenmethode wurde eine Reaktionslösung von Trimethylsilyltheanin sechsmal analysiert. Die Verhältnisse der Peakflächen von Theanin und innerem Standard sind in Tabelle II eingetragen.

TABELLE II
REPRODUZIERBARKEIT DER GC TRIMETHYLSILYLTHEANIN-ANALYSE

Versuch						
1	2	3	4	5	6	
$F_{\text{Th}}/F_{C_{10}}$	1.46	1.37	1.39	1.50	1.47	1.46

Näherungsstandardabweichung, s_w : 0.05

Variationskoeffizient: 3.47%.

Die Reproduzierbarkeit ist ausreichend. Die Abweichungen der Einzelmessungen liegen in einer Größenordnung, die eine Zersetzung während der GC Analyse ausschließt.

Linearität des Detektors

Zur Prüfung der Linearität des Detektors und der quantitativen Silylierung von L-Theanin wurden fünf Ansätze mit verschiedenen Mengen Theanin, jedoch gleicher Menge innerem Standard, eingewogen und analysiert. Das Ergebnis ist in Fig. 2 wiedergegeben. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

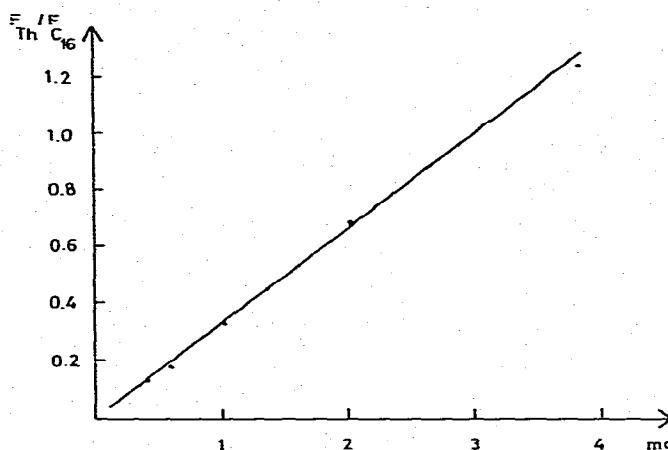


Fig. 2. Linearität des Detektors für silyliertes Theanin.

Der Verlauf der Geraden beweist die Linearität des Detektors und zeigt zugleich, dass die Umsetzung mit MSTFA unter den angegebenen Versuchsbedingungen quantitativ verläuft.

Massenspektrometrische Untersuchung von L-Theanin und der Trimethylsilyltheaninverbindung

Theanin. Molekülionen von Aminosäurederivaten sind wegen des relativ geringen Energieaufwandes, der zu ihrer Spaltung benötigt wird, meist nicht zu erkennen¹⁵ und betragen oft nur 0.05 bis 0.2% des Basepeaks. Auch L-Theanin weist nur einen sehr geringen Peak bei der Massenzahl des entsprechenden Molekülions auf. Das Molgewicht von Theanin kann aber aus dem Auftreten der ($M - 1$)-Spitze bei m/e 175 abgeleitet werden, die bei Aminosäuren und ähnlichen Vertretern dieser Verbindungsklasse sehr häufig anzutreffen ist (s. Fig. 3). Die Abspaltung von Wasser führt zu dem ersten grösseren Peak des oberen Massenbereichs bei m/e 156. Das Fragment $M - 45$ gehört zu den intensivsten Bruchstücken im Spektrum von L-Theanin. Es beruht auf dem Verlust eines COOH-Radikals, wobei das Immoniumion m/e 129 gebildet wird, das seinerseits Äthylamin abspaltet und in die Ketenstruktur m/e 84

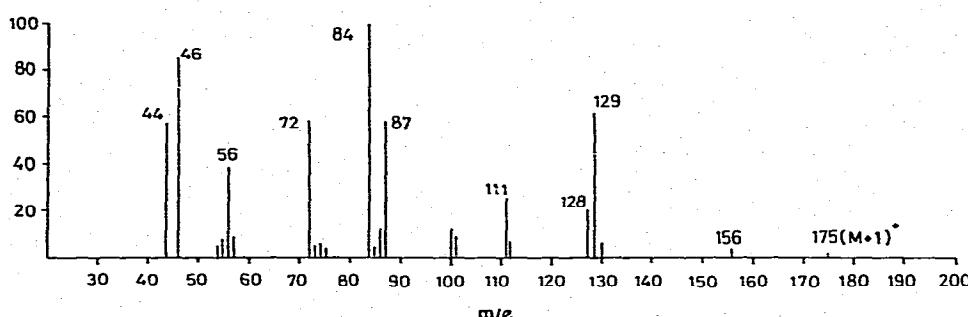


Fig. 3. Massenspektrum von L-Theanin.

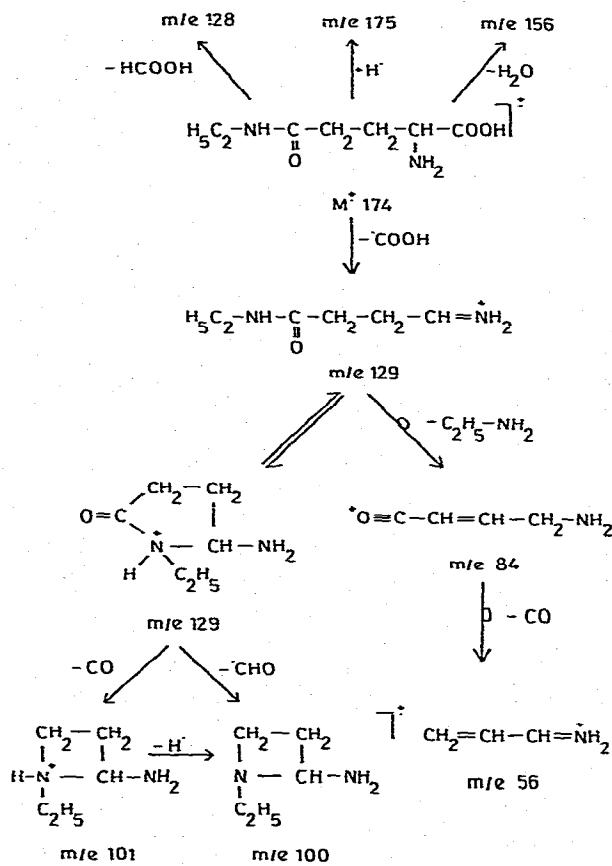
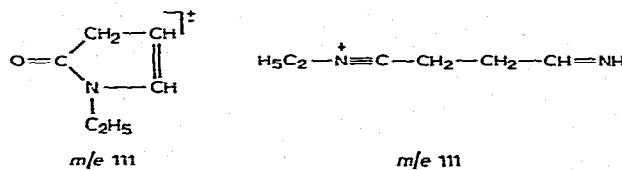


Fig. 4. Fragmentierungsschema von L-Theanin.

übergeht, die nach einer Wasserstoffumlagerung CO eliminiert und das Bruchstück $m/e 56$ liefert (Fig. 4).

Das Ion $m/e 129$ zerfällt nach dem Ringschluss in die Bruchstücke $m/e 101$ ($m/e 129 - CO$) und $m/e 100$ ($m/e 129 - CHO$). Ein charakteristisches Bruchstück des Molekülions, das durch Eliminierung von Amiensäure gebildet wird, tritt bei $m/e 128$ auf. Die gleiche Masse $m/e 128$ kann als Folgeprodukt des cyclischen Ions $m/e 129$ unter Abspaltung eines Wasserstoffradikals entstehen. Das Ion $m/e 111$ ($m/e 129 - H_2O$ bzw. $m/e 128 - NH_3$) ist eindeutig ein Fragment des Ions $m/e 129$, dessen Zusammensetzung ohne Hochauflösung nicht eindeutig anzugeben ist.

Plausible Möglichkeiten wären:



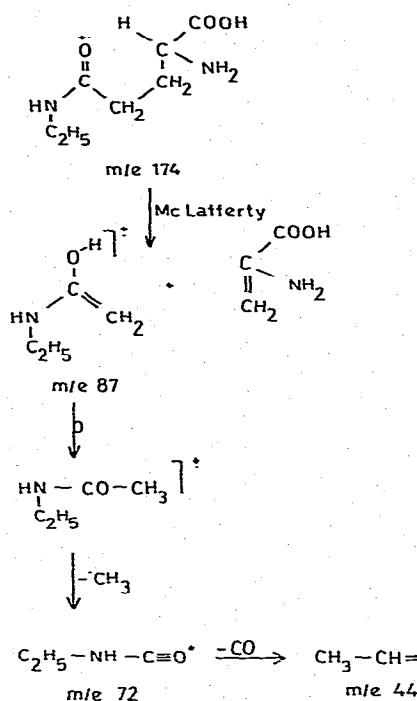


Fig. 5. Fragmentierungsschema von L-Theanin.

Der Peak bei *m/e* 112 entspricht dem Verlust von -OH aus *m/e* 129. Vom Molekülion M^+ ausgehend, lässt sich eine weitere Reihe von Zerfällen feststellen, deren Zuordnung in Fig. 5 dargestellt ist. Zunächst entspricht das Fragment *m/e* 87 dem Verlust von Imidobrenztraubensäure, die durch McLafferty-Umlagerung aus dem Molekülion

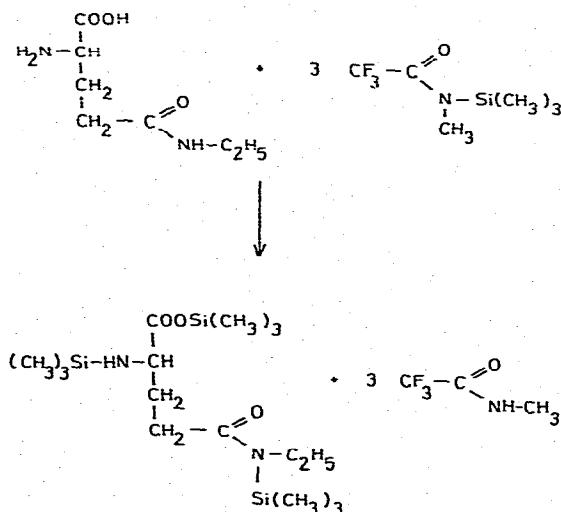


Fig. 6. Silylierung von L-Theanin.

entsteht. Das Bruchstück m/e 87 kann als Radikalion leicht eine Methylgruppe verlieren und in das Fragment m/e 72 übergehen. Die Masse m/e 44 entsteht daraus mit grosser Wahrscheinlichkeit durch Abspaltung von CO.

Trimethylsilyltheanin-Verbindung. Die Struktur des gebildeten Silylderivats wird durch die Massenspektrometrie bestätigt. Die Silylierung von L-Theanin mit N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid verläuft nach dem in Fig. 6 angegebenen Schema.

Das Massenspektrum des Silylderivats (Fig. 7) zeigt eine Fragmentierung, die mit der erwarteten Struktur eines Tris-(trimethylsilyl)-theanins in Einklang ist. Der

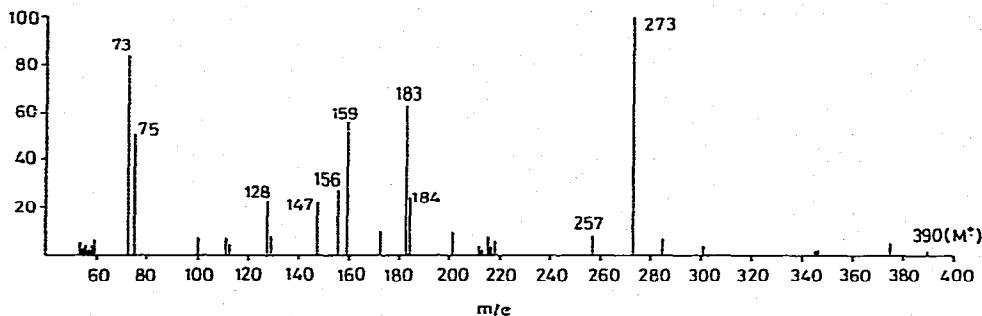


Fig. 7. Massenspektrum von Tris-(trimethylsilyl)-theanin.

Molekülionpeak M^+ entspricht dem zu erwartenden Molekulargewicht. Eine vollständige Silylierung von L-Theanin zum Tetra-(trimethylsilyl)-Derivat war nicht zu erwarten, da Bergström *et al.*¹⁶ bei der Untersuchung von α -Aminosäuren gezeigt haben, dass lediglich Glycin ein α -N-Bis-(Trimethylsilyl)-Derivat liefert.

Wir beschränken uns auf die Diskussion der wichtigsten Fragmente und Zerfallsvorgänge, die für die angegebene Struktur besonders charakteristisch sind. Der Molekülpeak bei m/e 390 besitzt eine recht geringe Intensität. Trimethylsilylverbindungen neigen häufig zu starker Fragmentierung und liefern deshalb oft Spektren, die Molekülionsignale mit äusserst geringen Intensitäten aufweisen^{17,18}. Das Molekülion m/e 390 besitzt ein zur Carbonylfunktion γ -ständiges C-H-Atom und geht durch McLafferty-Umlagerung in das Bruchstück m/e 159 über (Fig. 8). Der Verlust einer Methylgruppe führt im oberen Massenbereich zu einem Peak bei m/e 375. Ob dabei eine bevorzugte Abspaltung aus einer bestimmten Silylgruppe auftritt, geht aus den vorliegenden Daten nicht hervor. Aus m/e 375 entsteht durch Wasserstoffumlagerung und Abspaltung von $(CH_3)_2Si = OH$ der Peak bei m/e 75. Eine weitere Hauptabbaureaktion aus dem Molekülion führt unter Abspaltung des Radikals $COOSi(CH_3)_3$ zu dem Ion bei m/e 273, das in dem Spektrum des silylierten Theanins den Basispeak bildet. Eine weitere Alternative für den Basispeak ist durch die Reaktionsfolge m/e 390 $\rightarrow m/e$ 301 $\rightarrow m/e$ 273 gegeben, bei der die Abgabe von $OSi(CH_3)_3$ und die nachfolgende Eliminierung von CO ebenfalls zur Massenzahl m/e 273 führen kann. Die Abspaltung der Carbotrimethylsiloxygruppe $COOSi(CH_3)_3$ ist typisch für silylierte Aminosäuren¹⁶ und bei der Fragmentierung der Trimethylsilylverbindungen von α -Ketosäuren ebenfalls bekannt¹⁹. Die Abspaltung von $(CH_3)_2Si = CH_2$ aus m/e 273 unter Bildung von m/e 201 ist von etwas untergeordneter Bedeutung, während die

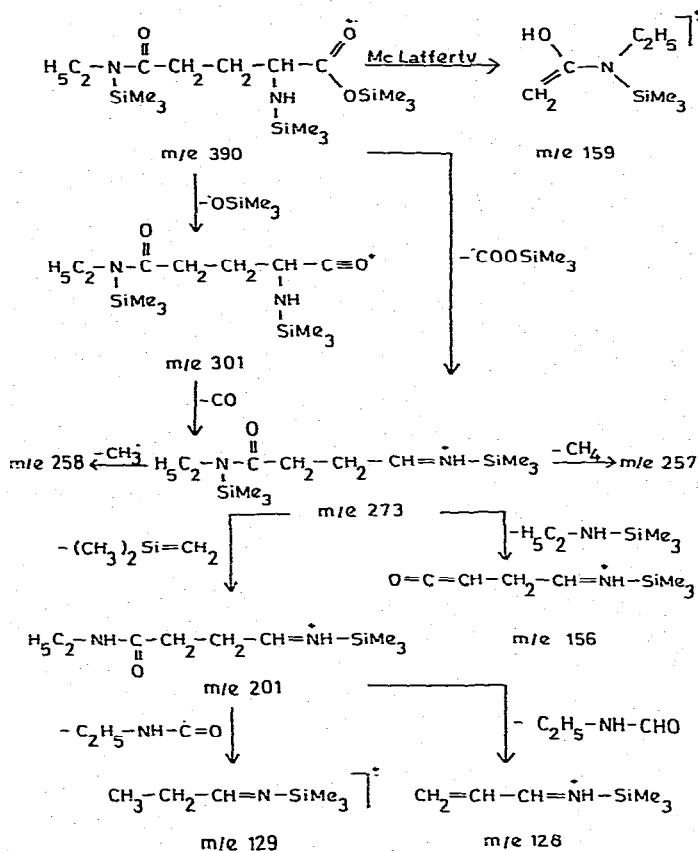


Fig. 8. Fragmentierungsschema von silyliertem Theanin.

Eliminierung von Trimethylsilyläthylamin zu dem Spaltprodukt m/e 156 führt, das immerhin eine Intensität von ca. 28 % erreicht.

Ein weiterer wichtiger Abbauprozess beginnt mit einer Silylgruppenumlagerung, bei der die N-Trimethylsilylgruppe zum Carboxylsauerstoff wandert (Fig. 9). Ursache dürfte die bisher in der Massenspektrometrie der sauerstoffhaltigen Trimethylsilylverbindungen beobachtete hohe Affinität des Siliciums zu Sauerstoff sein. Nach einer Wasserstoffumlagerung resultiert das Ion m/e 183 durch Eliminierung von Trimethylsilanol. Das durch Trimethylsilylwanderung entstandene Ion m/e 273 fragmentiert weiter unter Bildung des Ions m/e 184, das unter Abspaltung von $(CH_3)_2-Si=CH_2$ in das Bruchstück m/e 112 übergeht. Neben der Masse m/e 112 wird im Spektrum des silylierten Theanins auch das um eine Masseneinheit leichtere Ion m/e 111 gefunden. Es kommt in Analogie zu dem Ion m/e 112 ebenfalls durch Eliminierung von $(CH_3)_2-Si=CH_2$ zustande.

Das Pentamethyldisiloxoniumion m/e 147 $(CH_3)_5Si-O-Si(CH_3)_2$ war bereits im Untergrund mit geringer Intensität vorhanden und kann durch spezifische Desorption verstärkt auftreten. Derartig unerwünschte memory-Effekte sind bei Trimethylsilyl-Experimenten wohlbekannt. Im Spektrum von Trimethylsilyltheanin ist

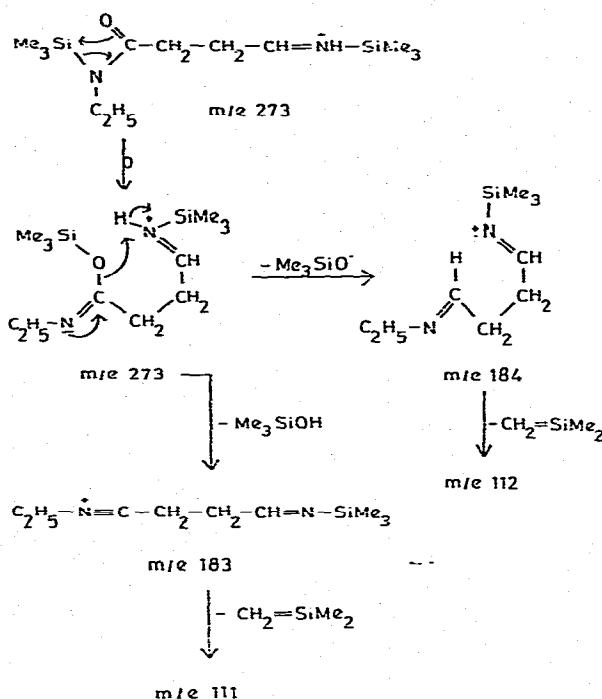


Fig. 9. Fragmentierungsschema von silyliertem Theanin.

es aber wahrscheinlich, dass das Ion $m/e 375$ zu $m/e 147$ fragmentiert. Eine Analogie ist von Bergström *et al.*¹⁶ bei der Fragmentierung von Bis- und Tris-(trimethylsilyl)-glycin beschrieben.

Der massenspektrometrische Zerfall von γ -N-Äthylglutamin und Trimethylsilyltheanin wird durch die Fragmentierung von γ -N-Methylglutamin und der entsprechenden Silylverbindung in schöner Weise bestätigt. Die Fragmentierungen der N-Methyl- und N-Äthyl-Derivate laufen völlig analog.

TABELLE III

MASSENSPEKTROMETRISCHE DATEN UND INTENSITÄTEN DER UNTERSUCHTEN VERBINDUNGEN

Verbindung	Daten
γ -N-Äthylglutamin	m/e (rel. Int.) 175 (2.1) 156 (4.5) 129 (62.6) 128 (20.8) 112 (6.7) 111 (26.3) 101 (10.4) 100 (11.8) 87 (57.0) 84 (100) 72 (58.2) 56 (38.7)
γ -N-Methylglutamin	m/e (rel. Int.) 161 (1.8) 142 (3.4) 115 (63.0) 114 (18.0) 98 (8.5) 97 (63.0) 87 (14.2) 86 (10.5) 84 (100) 73 (51.0) 58 (42.3) 56 (45.0)
TMS-N-Äthylglutamin	m/e (rel. Int.) 390 (1.7) 375 (5.0) 273 (100) 257 (9.3) 184 (24.7) 183 (64.0) 159 (56.5) 156 (28.6) 147 (23.0) 129 (8.2) 128 (23.4) 112 (5.3) 111 (7.5) 75 (51.0) 73 (85.0)
TMS-N-Methylglutamin	m/e (rel. Int.) 376 (2.6) 361 (7.2) 259 (100) 243 (7.1) 170 (23.5) 169 (50.0) 156 (27.8) 147 (27.0) 145 (41.5) 115 (2.5) 114 (4.2) 98 (3.3) 97 (14.0) 75 (36.0) 73 (90.0)

In Tabelle III sind die Intensitäten der wichtigsten Ionen der N-Methyl- und N-Äthyl-Verbindungen zusammengestellt.

Das Massenspektrum von Trimethylsilyltheanin bestätigt das Vorliegen einer dreifach silylierten Theaninstruktur und ist mit dem Massenspektrum des nach Cartwright *et al.*² aus Tee isolierten Produktes völlig identisch.

DANK

Wir danken Herrn Dr. A. Haag, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen, sehr herzlich für die Diskussion der Massenspektren. Ferner danken wir Fräulein H. Kiank für die Ausführung der Synthesen, Fräulein M. Möhlenbrock für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn W. Gutmann für die Durchführung der GC Analysen.

ZUSAMMENFASSUNG

L-Theanin ist in Form seines Trimethylsilylderivats für eine quantitative gas-chromatographische Bestimmung gut geeignet. L-Theanin und silyliertes L-Theanin sind massenspektroskopisch untersucht worden. Die Fragmentierungen sind durch den massenspektrometrischen Zerfall des gleichzeitig untersuchten γ -N-Methylglutamins und des entsprechenden Silylderivats gesichert. Die vorangehende Diskussion der wichtigsten Bruchstücke und Zerfallsorgänge zeigt, dass das Massenspektrum des untersuchten Trimethylsilylderivats das Vorliegen eines Tris(trimethylsilyl)-theanins bestätigt.

LITERATUR

- 1 Y. Sakato, *Nippon Noge Kagaku Kaishi (J. Agr. Chem. Soc. Jap.)*, 23 (1949) 262.
- 2 R. A. Cartwright, E. A. H. Roberts und D. J. Wood, *J. Sci. Food Agr.*, 5 (1954) 597.
- 3 G. R. Roberts und G. W. Sanderson, *J. Sci. Food Agr.*, 17 (1966) 182.
- 4 R. R. Selvendran und S. Selvendran, *J. Sci. Food Agr.*, 24 (1973) 161.
- 5 J. Casimir, J. Jadot und M. Renard, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 462.
- 6 R. Kimura und T. Murata, *Chem. Pharm. Bull.*, 19 (1971) 1257.
- 7 N. Lichtenstein, *J. Amer. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1021.
- 8 Y. Sakato, T. Hashizume und Y. Kishimoto, *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 23 (1949) 269.
- 9 T. Hashizume, *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 25 (1951) 25.
- 10 T. Furuyama, T. Yamashita und S. Senoh, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 37 (1964) 1078.
- 11 Y. Yamada, M. Sakurai und Y. Tsuchiya, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 39 (1966) 1999.
- 12 C. W. Gehrke, H. Nakamoto und R. W. Zumwalt, *J. Chromatogr.*, 45 (1969) 24.
- 13 C. W. Gehrke und K. Leimer, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 219.
- 14 K. Grob und G. Grob, *Chromatographia*, 5 (1972) 3.
- 15 G. Spiteller, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
- 16 K. Bergström, J. Gütler und R. Blomstrand, *Anal. Biochem.*, 34 (1970) 74.
- 17 J. Diekmann, J. B. Thomson und C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 32 (1967) 3904.
- 18 W. Richter, M. Vecchi, W. Vetter und W. Walther, *Helv. Chim. Acta*, 50 (1967) 364.
- 19 A. E. Pierce, *Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1968, p. 39.