

CHROM. 13,237

## Note

### Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und tert.-Butyldimethylsilyl-enoläthern von Ketosteroiden für gas-chromatographische und massen-spektrometrische Untersuchungen

M. DONIKE\* und J. ZIMMERMANN

*Institut für Biochemie des Sports der Deutschen Sporthochschule Köln, Carl-Diem-Weg 2, 5000 Köln 41 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 22. April 1980; geänderte Fassung eingegangen am 7. August 1980)

Die Trimethylsilylierung von Hydroxyketosteroiden liefert neben den erwünschten O-Trimethylsilyl (TMS)-Ethern Nebenprodukte, die schon frühzeitig als TMS-Enolether angesprochen wurden<sup>1,2</sup>. Die Enoletherbildung lässt sich verhindern, wenn vor der Trimethylsilylierung die Ketogruppen in Oxime oder Hydrazone überführt werden<sup>3</sup>. Mehrfach wurden Versuche unternommen, die Bildung der TMS-Enolether quantitativ zu gestalten, um somit den Schritt der Oxim- oder Hydrazon-Bildung zum Schutz der Ketofunktion zu vermeiden<sup>4-6</sup>. In Verbindung mit N-TMS-Amiden erhielt Gleispach<sup>5</sup> hohe Ausbeuten an Enolderivaten, wobei Kaliumacetat sich als wirksamster Katalysator erwies.

Die bisherigen Untersuchungen lassen erkennen, dass die Enolisierungsgeschwindigkeit und das Isomerenverhältnis (1) von dem Lösungsmittel; (2) von dem Katalysator; (3) von dem Silylierungsmittel; und (4) von der Struktur des Steroids abhängig sind.

Eine Überprüfung der beschriebenen Enolisierungsprozeduren mit Testosteron - Modellverbindung ergab jedoch, dass mit keinem Verfahren das Ziel —ein einheitliches Enolderivat— erreicht werden kann. Um die zum Teil unübersichtlichen Einflüsse von Silylierungsmittel und Lösungsmittel auszuschalten, überprüften wir die TMS-Enoletherbildung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA), das gleichzeitig als Silylierungs- und Lösungsmittel dient, und den katalytisch aktiven Trimethylhalogensilanen Trimethylchloresilan (TMCIS), Trimethylbromsilan (TMSBr) und Trimethyljodsilan (TMSI) sowie Kaliumacetat.

## EXPERIMENTELLES

Aliquote Teile einer Stammlösung von Testosteron in Ethylacetat (1 mg/ml) werden in einem Zentrifugenschliffglas eingengt. Der Rückstand wird in den Silylierungsmitteln, die die in der Legende angegebenen Konzentrationen des Katalysators enthalten, gelöst. Die Reaktionsbedingungen sind in den Legenden der Fig. 1 und 2 angegeben.

Die Kinetik der Umsetzung wird zunächst am Gas-Chromatographen mit Hilfe eines Flammenionisationdetektor verfolgt. Trennsäule: 1.06 m, 1% OV-101 auf Chromosorb AW DMCS, 60 ml He/min, 190°C.

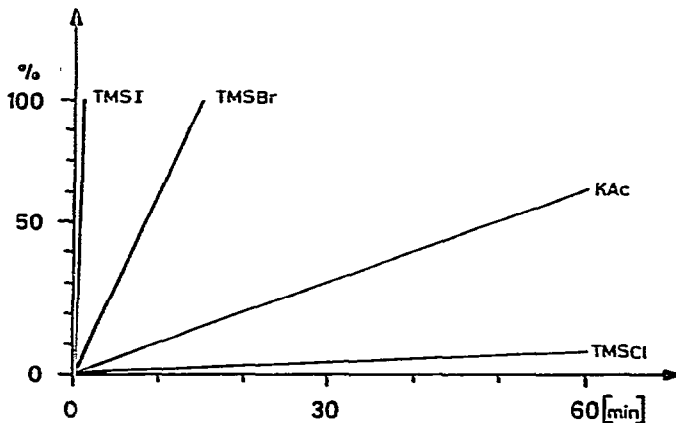


Fig. 1. Kinetik der Umsetzung von Testosteron (1 mg/ml) mit MSTFA und den Halogensilanen TMSCl (1%, v/v), TMSBr (1%, v/v), TMSI (1%, v/v) und Kaliumacetat (gesättigte Lösung). Temperatur 60°C, Ordinate: Abnahme des Signals für 17-TMS-Testosteron.

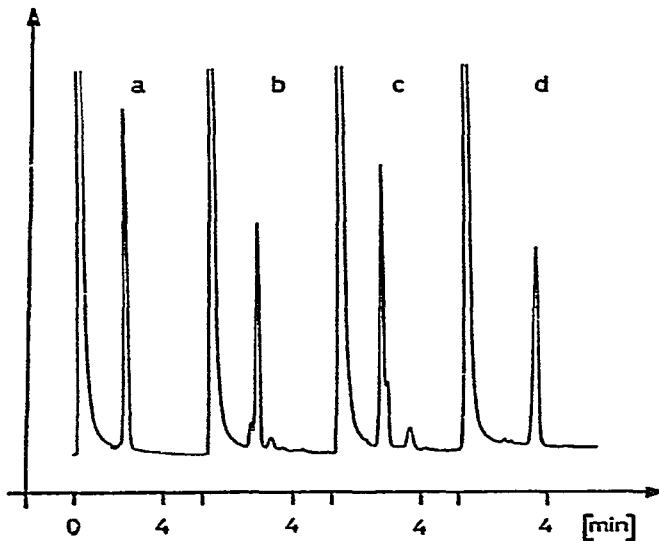


Fig. 2. Umsetzung von Testosteron (1 mg/ml) mit MSTFA und Halogensilanen und Kaliumacetat. (a) TMSI (1%, v/v) 10 min, 25°C; (b) TMSBr (1%, v/v) 4 h, 60°C; (c) Kaliumacetat (gesättigte Lösung im MSTFA), 60°C; (d) TMSCl (1%, v/v) 4 h, 60°C.

Die auftretenden Signale wurden gas-chromatographisch (GC)-massenspektrometrisch charakterisiert.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die 17-Hydroxylgruppe des Testosterones wird so schnell trimethylsilyliert, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mittels GC praktisch nicht verfolgt werden kann. Die Enolisierung und die Trimethylsilylierung der 3-Ketofunktion verläuft wesentlich langsamer, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit und der Einfluss der Katalysatoren experimentell ermittelt werden können. Die katalytische Aktivität bezüglich der

Enolisierung steigt von TMSCl über Kaliumacetat, TMSBr zu TMSI stark an und zeigt damit eine deutliche Abstufung (siehe Fig. 1).

Die grossen Unterschiede in der katalytischen Aktivität gestatten eine selektive Derivatisierung. TMSCl in geringer Konzentration bei nur kurzzeitigem Erhitzen überführt nur die OH-Funktionen in TMS-Ether. Die TMS-Enoletherbildung verläuft bei 25°C so langsam, dass sie für mehrere Stunden vernachlässigt werden kann.

Wie schon die Arbeiten von Aringer *et al.*<sup>6</sup> gezeigt haben ist TMSBr ein ausgezeichnete Katalysator. In Verbindung mit MSTFA müssen jedoch je nach Struktur des Steroids Reaktionszeiten von mehreren Stunden sowie das Entstehen von Isomeren in Kauf genommen werden (siehe Fig. 2). Neben der Geschwindigkeit ist, wie dieses Beispiel zeigt, die Einheitlichkeit des Reaktionsverlaufes das zweite Kriterium für die Beurteilung eines Katalysators.

Eine schnelle Reaktion, die meist innerhalb von wenigen Minuten beendet ist und nur ein Isomer ergibt, erhält man durch Verwendung von TMSI als Katalysator, wobei jedoch die Möglichkeit der Entstehung von jodierten Nebenprodukten besteht (siehe Fig. 2). Die Bildung von jodierten Produkten lässt sich vermeiden, wenn frisch destilliertes Trimethyljodsilan in geringer Konzentration, z.B. 1‰, eingesetzt und der Einfluss von Licht vermieden wird.

Die Stabilität eines solchen Reaktionsgemisches beträgt mindestens 24 h. Zusatz von Cystein (z.B. 1 ng/ml Silylierungsgemisch) unterdrückt gleichfalls die Entstehung von jodsubstituierten Steroiden. Die Stabilität der silylierten Proben beträgt mehrere Tage bis Wochen.

Ein weiterer Aspekt der Enolisierung ist, dass bei massenspektrometrischen Untersuchungen die Intensität des Moleküliens des TMS-Enolethers, verglichen mit der Ketoform des Steroids um ein Mehrfaches erhöht ist. Die Tabelle I zeigt dies am Beispiel des Testosterons. Mit 12% entfällt ein relativ hoher Prozentsatz der oberhalb der Massenzahl 70 registrierten Ionen auf das Molekülion  $M^+$ . Dies ist ein sehr günstiges Ergebnis, wenn man bedenkt, dass die Ionen der Massenzahl 73 und 75, von den TMS-Ethergruppierungen stammend, in der Summe der Ionenintensitäten enthalten sind.

Die Silylenolether-Bildung ist nicht nur mit der Trimethylsilylgruppe möglich<sup>7-11</sup>. Andere Silylgruppen, die für massenspektrometrische (MS) Untersuchungen zum Teil noch höhere Ausbeuten an Molekülion bzw. Molekülion minus Alkylgruppe ergeben, können gleichfalls eingeführt werden. Untersucht wurden die Reaktionspaare N-Methyl-N-*tert.*-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid (M-TBDMS-TFA)/*tert.*-Butyldimethyljodsilan (TBDMSI) und N-Methyl-N-triethylsilyl-trifluoracetamid (M-TES-TFA)/Triethyljodsilan (TESI). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(1) Eine Enoletherbildung ist auch mit sterisch anspruchsvolleren Silylgruppen, wie die Triethylsilyl- bzw. *tert.*-Butyldimethylsilyl-Gruppe, möglich; die Enolisierungsgeschwindigkeit ist jedoch deutlich geringer.

(2) Der Austausch der Trimethylsilyl- durch die Triethylsilyl- bzw. durch die *tert.*-Butyldimethylsilyl-Gruppe bringt im Gas-Chromatogram eine Verlängerung der Retentionszeit mit sich, die entsprechend der Anzahl der silylierbaren Funktionen unterschiedlich ausfällt<sup>7-11</sup> (siehe Tabelle I).

(3) Die Massenspektren der Triethylsilyl- bzw. *tert.*-Butyldimethylsilyl-enolether lassen im höheren Massenbereich analytisch verwertbare hohe Ionenintensitäten erkennen. Insbesondere das Molekülion  $M^+$  und das  $(M-alkyl)^+$ -Ion ist stark

TABELLE I

GC- UND MS-DATEN VON MONO- UND BIS-SILYLIERTEN TESTOSTERONDERIVATEN  
 Molekulargewicht, 288.43; Summenformel,  $C_{19}H_{28}O_2$ . GC-Bedingungen: 1% OV-17 Gas-Chrom Q (Applied Science Labs., State College, PA, U.S.A.; 120–140 mesh) 1.20 m  $\times$  2 mm I.D., O.D. 6 mm; Temperatur: 220°C, 15°C/min, 280°C (10 min); 12 ml He/min. MS-Bedingungen: MAT CH5, EI, 70 eV, 300  $\mu$ A, Ionenquelle: 250°C, I registriert von 70–800.

Derivat	$M^+$ (%)	Basis Peak	(M-Alkyl)* (%)	$\frac{I}{\Sigma I}$ (%)	Retentionszeit (min)	Relative Retentionszeit
–OH	288(14)	124	270(4)*	288(1.2)	4.6	1.05
–O-TMS	360(13)	73	345(5)	360(1.2)	4.4	1.0
–(O-TMS) <sub>2</sub>	432(88)	73	417(15)	432(12.1)	3.7	0.84
–O-TES	402(6)	373	373(100)	373(9.0)	6.4	1.45
–(O-TES) <sub>2</sub>	516(96)	87	487(8)	516(9.4)	7.1	1.61
–O-TBDMS	402(0.5)	75	345(85)	345(11)	5.0	1.14
–(O-TBDMS) <sub>2</sub>	516(100)	516	459(12)	516(24.7)	6.4	1.45
–O-TMS- 3-methoxim	389(37)	73	358(13)**	389(2.9)	4.3	0.98

\* (M–18)<sup>+</sup>.

\*\* (M–31)<sup>+</sup>.

ausgeprägt. Die Ausbeute an diagnostisch verwertbaren Ionen höherer Massenzahl liegt höher als bei den mono-silylierten Derivaten und übertrifft sogar die des 3-Methoxyaminderivats (siehe Tabelle I).

(4) Sterisch stark gehinderte Hydroxylgruppen werden durch die Reagentienkombination M–TES–TFA/TESI, bzw. M–TBDMS–TFA/TBDMSI nicht silyliert. Dies bedeutet eine Einschränkung der allgemeinen Anwendbarkeit, beispielsweise lassen sich 17 $\alpha$ -Alkylsteroiden, die vielfach als orale androgene und anabole Wirkstoffe therapeutisch eingesetzt werden, auch nach Zugabe von Imidazol als Katalysator nicht in 17 $\beta$ -Stellung silylieren<sup>12</sup>.

Die bisher bei den Untersuchungen zum Nachweis von Anabolica gemachten Erfahrungen lassen erwarten, dass zumindest für Routineuntersuchungen die Trimethylsilylenolether die Derivate der Wahl sind, wenn man die Schnelligkeit der Bildung, die gas-chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften sowie die Verfügbarkeit der Reagentien berücksichtigt. Die tert.-Butyl-dimethylsilyl- bzw. die Triethylsilyl-Gruppe ermöglicht darüberhinaus eine Verbesserung der Nachweisgrenze und eine bessere gas-chromatographische Auftrennung von komplexen biologischen Proben durch die Verschiebung der Retentionszeiten.

#### LITERATUR

- 1 E. M. Chambaz, G. U. B. Maume und E. C. Horning, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 749
- 2 E. M. Chambaz und E. C. Horning, *Anal. Biochem.*, 30 (1969) 7.
- 3 H. M. Fales und T. Luukkainen, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 955.
- 4 E. M. Chambaz, G. Dafaye und Ch. Madani, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1090
- 5 H. Gleispach, *J. Chromatogr.*, 91 (1974) 407.
- 6 L. Aringer, P. Eneroth und J.-A. Gustafsson, *Steroids*, 17 (1971) 377.
- 7 R. W. Kelly und P. L. Taylor, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 465.
- 8 L. Ballhorn, W. F. Mueller und F. Korte, *Steroids*, 33 (1969) 379.
- 9 M. A. Quilliam und J. B. Westmore, *Steroids*, 29 (1977) 579.
- 10 I. A. Blair und G. Phillipou, *J. Chromatogr. Sci.*, 16 (1978) 201.
- 11 M. A. Quilliam und J. B. Westmore, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 59.
- 12 M. Donike, unpublizierte Versuche.