

Massenspektrometrie und ihre Anwendung auf strukturelle und stereochemische Probleme, CCXXVI²⁾

Wasserabspaltung durch Elektronenstoß von 3-Hydroxy-5 β -cholanen

Harald Klein¹⁾ und Carl Djerassi*

Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California, USA

Eingegangen am 21. Februar 1973

3-Hydroxysteroiden der 5 β -Reihe spalten auffallend leicht Wasser ab, insbesondere die 3 α -Alkohole. Durch Deuterierung der 9 α -Position im 5 β -Cholan-3 α -ol ergab sich, daß die Hydroxylgruppe bei der Dehydratisierung nach Umklappen des Ringes A in die Bootform das Deuterium abstrahiert. Für das entsprechende [9 α -D₁]-5 β -Cholan-3 β -ol muß ein anderer Mechanismus wirksam sein, da hier nur H₂O eliminiert wird. Der Abstand der Hydroxylgruppe zu einem aktivierten Wasserstoff scheint ganz allgemein für das Ausmaß der Wasserabspaltung maßgebend zu sein. Die Konformation spielt bei der Reaktion von Ionen offenbar eine ähnliche Rolle wie bei Umsetzungen von Molekülen in Lösung.

The Electron Impact Induced Elimination of Water from 3-Hydroxy-5 β -steroids

3-Hydroxysteroids of the 5 β -series eliminate water very readily, in particular the 3 α -alcohols. Deuteriation of 5 β -cholan-3 α -ol at C-9 proved that the hydroxyl group abstracts the deuterium in the course of the dehydration, after ring A has changed to the boat conformation. A different mechanism must operate in the corresponding decomposition of [9 α -D₁]-5 β -cholan-3 β -ol, because only H₂O is ejected. In general, the spatial distance of the hydroxyl group to an activated hydrogen seems to govern the extent of the water elimination. At least in this instance, the ring conformation has the same importance in reactions of radical ions in the gas phase as it has in reactions of molecules in solution.

Es wurde verschiedentlich versucht³⁾, eine Beziehung zwischen der Stereochemie eines Alkohols und der relativen Intensität des M⁺ – 18-Ions (und des M⁺ – 33-(H₂O + CH₃[•])-Ions für Steroide) in dessen Massenspektrum herzuleiten. Die schon früh auftauchende Annahme⁴⁾, daß eine Verbindung mit axialer Hydroxylgruppe leichter Wasser abspaltet als eine solche mit äquatorialer, erwies sich als unbefriedi-

¹⁾ Postdoctoral Research Fellow 1971–1972, unterstützt durch ein Stipendium der NATO. Gegenwärtige Adresse: Lehrstuhl für Strukturchemie der Ruhr-Universität Bochum, Bochum.

²⁾ CCXXV. Mittel.: K. B. Tomer und C. Djerassi, *Org. Mass Spectrom.*, im Druck.

³⁾ ^{3a)} H. Egger und G. Spitteller, *Monatsh. Chem.* **97**, 579 (1966). — ^{3b)} N. S. Wulfson, V. I. Zaretskii, V. L. Sadovskaja, A. V. Zakharychev, N. S. Anachenko und I. V. Torgov, *Tetrahedron* **23**, 3667 (1967). — ^{3c)} H. W. Fehlhaber, D. Lenoir und R. Tschesche, *Advan. Mass Spectrom.* **4**, 182 (1968).

⁴⁾ K. Biemann und J. Seibl, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3149 (1959).

gend⁵⁾. Wie an Cyclopentanol⁶⁾ und -hexanol⁷⁾ durch Markierungsversuche gezeigt wurde, verläuft diese Reaktion als 1,3- oder 1,4-Eliminierung, im Gegensatz zu der thermischen 1,2-Dehydratisierung. Um zuverlässige Aussagen über die Stereospezifität zu erhalten, muß durch Direkteinführung⁸⁾ der Substanzprobe in die Ionenquelle vermieden werden, daß vor der Ionisierung eine thermische Wasserabspaltung erfolgt.

Spiteller et al.^{3a)} untersuchten die Massenspektren epimerer 3-Hydroxysterioide der 5 α - und 5 β -Reihe, wobei eine stärkere Wassereliminierung für die 5 β -Verbindungen gefunden wurde. Insbesondere das 3 α -Hydroxy-5 β -Isomere dehydratisierte außerordentlich leicht^{3a)}. Es wurde eine Beteiligung des 9 α -Wasserstoffs vorgeschlagen, da, wie an Dreiding-Modellen gezeigt werden kann, nach Umklappen des Ringes A in die Bootform der Abstand dieses Wasserstoffs zur Hydroxylgruppe sehr gering ist.

Um diese Annahme zu überprüfen, haben wir die epimeren 5 β -Cholan-3-ole und ihre 9 α -D₁-Isomeren dargestellt.

Synthese der 5 β -Cholan-3-ole

Als geeignetes Ausgangsmaterial wurde Desoxycholsäure (**1**) gewählt, da bei ihr schon eine 3 α -Hydroxylgruppe und *cis*-Verknüpfung der Ringe A und B vorliegt.

Umwandlung der Säurefunktion in eine Methylgruppe⁹⁾ wurde durch Lithiumaluminiumhydrid(LAH)-Reduktion, Tosylierung und nochmalige Reduktion erreicht. Die Reaktionsfolge führte zu einem Gemisch aus 5 β -Cholan-3 α ,12 α ,24-triol, 5 β -Cholan-3 α ,12 α -diol (**2**) und 5 β -Cholan-3 α -ol, das sich durch Säulenchromatographie trennen ließ. Das 3 α ,12 α -Diol **2** wurde in das 3 α -Acetat umgewandelt, dessen Oxidation mit Natriumdichromat¹⁰⁾ 3 α -Acetoxy-5 β -cholan-12-on (**4**) lieferte.

Mittels *Wolff-Kishner*-Reduktion¹¹⁾ entfernte man die 12-Ketogruppe bei gleichzeitiger Verseifung des Acetats zum 5 β -Cholan-3 α -ol (**6a**). Die Solvolyse des Tosylats¹²⁾ von **6a** in Formamid ergab das epimere 5 β -Cholan-3 β -ol (**7a**).

Die [9 α -D₁]Cholanole wurden erhalten durch Dehydrierung des 12-Ketons **4** mit Selenoxid¹³⁾ und anschließende Reduktion¹⁴⁾ des $\Delta^{9(11)}$ -Enons **3** mit Lithium in Deuterioammoniak. Rückaustausch des Deuteriums in 11-Stellung zu **5** erforderte zweitägiges Kochen in methanolischer Kalilauge. Um zu den beiden [9 α -D₁]-5 β -Cholanolen **6b** und **7b** zu gelangen, wurde wie bei den unmarkierten Verbindungen **6a** und **7a** weiterverfahren

⁵⁾ *M. Spiteller-Friedmann* und *G. Spiteller*, Fortschr. Chem. Forsch. **12**, 440 (1969).

⁶⁾ *P. Natalis*, Bull. Soc. Chim. Belges **69**, 224 (1960).

⁷⁾ ^{7a)} *C. G. McDonald*, *J. S. Shannon* und *G. Sugowdz*, Tetrahedron Lett. **1963**, 807. — ^{7b)} *H. Budzikiewicz*, *Z. Pelah* und *C. Djerassi*, Monatsh. Chem. **95**, 158 (1964). —

^{7c)} *M. M. Green* und *R. J. Cook*, J. Am. Chem. Soc. **91**, 2129 (1969).

⁸⁾ ^{8a)} *G. Spiteller* und *M. Spiteller-Friedmann*, Monatsh. Chem. **94**, 742 (1963). — ^{8b)} *J. F. Lynch*, *J. M. Wilson*, *H. Budzikiewicz* und *C. Djerassi*, Experientia **19**, 211 (1963).

⁹⁾ *R. T. Blickenstaff* und *F. C. Chang*, J. Am. Chem. Soc. **81**, 2835 (1959).

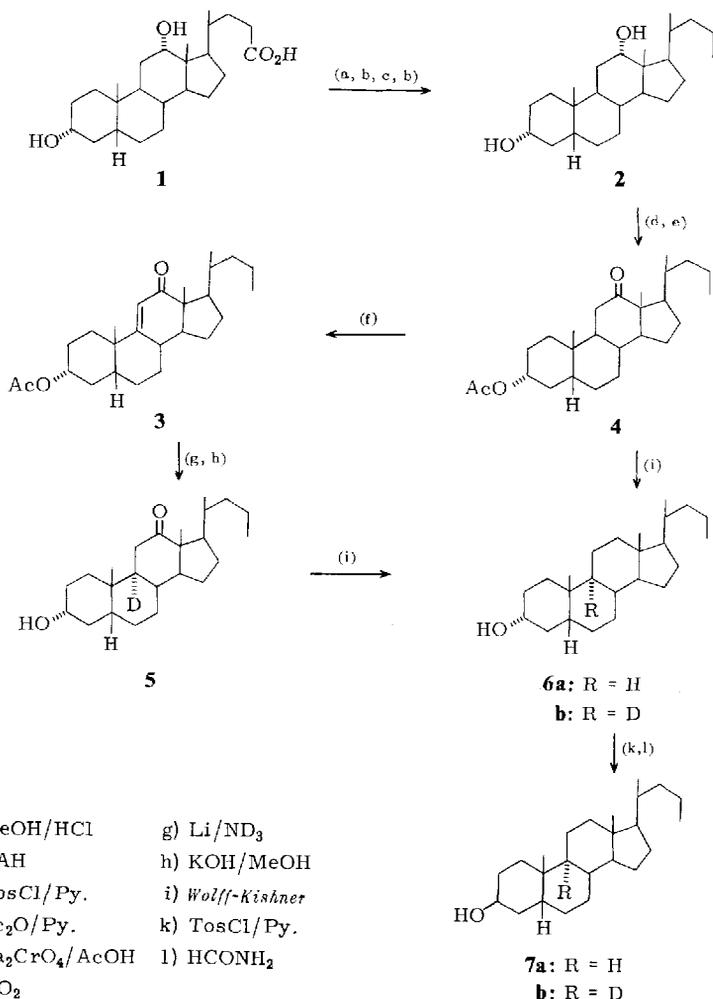
¹⁰⁾ *L. F. Fieser* und *S. Rajagopalan*, J. Am. Chem. Soc. **72**, 5530 (1950).

¹¹⁾ *Huang-Minlon*, J. Am. Chem. Soc. **68**, 2487 (1946).

¹²⁾ *R. T. Blickenstaff* und *F. C. Chang*, J. Am. Chem. Soc. **80**, 2906 (1958).

¹³⁾ *A. Bowers*, *E. Denot*, *M. B. Sanchez*, *F. Neuman* und *C. Djerassi*, J. Chem. Soc. **1961**, 1859.

¹⁴⁾ *L. Tökés*, *G. Jones* und *C. Djerassi*, J. Am. Chem. Soc. **90**, 5465 (1968).

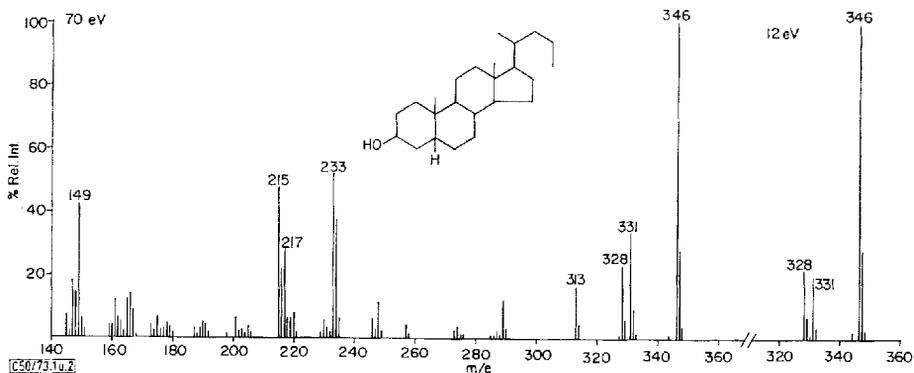
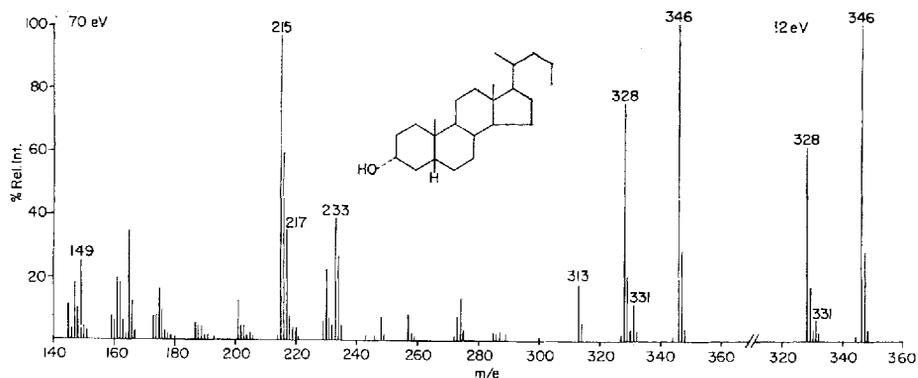


Diskussion der Massenspektren

Die Massenspektren (Abb. 1 und 2) der beiden isomeren 3-Hydroxy-5 β -cholane **6a** und **7a** stimmen bis auf Intensitätsunterschiede einzelner Peaks überein. Eine Unterscheidung ist jedoch durch die verschieden stark ausgeprägte Tendenz zur Wasserabspaltung möglich. Dies drückt sich im unterschiedlichen Intensitätsverhältnis der Bruchstück-Ionen zu den jeweils zugehörigen dehydratisierten Fragmenten aus.

In der 3 α -OH-Verbindung **6a** sind die dehydratisierten Fragment-Ionen stärker vertreten als die entsprechenden Sauerstoff enthaltenden Ionen (außer dem Molekülion); der 3 β -Alkohol **7a** zeigt umgekehrtes Verhalten (Tab. 1).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das Auftreten eines metastabilen Peaks für den Übergang 328 (M⁺ - H₂O) \rightarrow 215 (Ring-D-Spaltung nach Dehydratisierung),

Abb. 1. Massenspektrum von 5β-Cholan-3α-ol (**6a**)Abb. 2. Massenspektrum von 5β-Cholan-3β-ol (**7a**)

der nur im 3α-Produkt **6a** auftritt; für das 3β-Isomere **7a** hingegen findet man einen entsprechenden Peak für den Zerfall $346 (M^+) \rightarrow 233$ (Ring-D-Spaltung ohne Wasserverlust), der im 3α-Alkohol **6a** nur sehr schwach ausgebildet ist. Mit Hilfe der Metastabilen-Defokussierung erhält man genauere Angaben über die Herkunft der Bruchstücke (Tab. 2).

Diese Daten zeigen, daß in beiden Steroiden die Ring-D-Spaltung (m/e 234 und 233) als Hauptfragmentierungsweg abläuft. Im 3α-Isomeren **6a** tritt jedoch zusätzlich in beträchtlichem Ausmaß zuerst eine Dehydratisierung des Molekül-Ions ein (m/e 328), an die sich dann die Abspaltung der Seitenkette mit C-15 bis C-17 anschließt.

Beim Verlust von Wasser aus dem [9α-D₁]-3α-Hydroxy-5β-cholan (**6b**) wird zu etwa 80% H₂O eliminiert. Die Differenz von neunzehn Masseneinheiten wird auch bei anderen Ionen gefunden (235 → 216; 234 → 215). Beim entsprechenden 3β-Cholanol **7b** wird ausschließlich H₂O abgespalten.

Dieses Verhalten kann erklärt werden, wenn man den Abstand der Hydroxylgruppe zu einem aktivierten Wasserstoff als den bestimmenden Faktor für das Ausmaß der Dehydratisierung annimmt. Betrachtungen an Dreiding-Modellen zeigen, daß für 3α-Hydroxysteroiden bei einer *cis*-Verknüpfung der Ringe A und B die OH-Gruppe

Tab. 1. Ionen und ihre zugehörigen dehydratisierten Fragmente

	Mutter-Ion <i>m/e</i>	% rel. Int.	Dehydratisiertes	
			Mutter-Ion <i>m/e</i>	% rel. Int.
3 α -Cholanol 6a	346 (M ⁺)	100	328 (M ⁺ - 18)	75
	331 (M ⁺ - 15)	11	313 (M ⁺ - 33)	18
	234	27	216	59
	233	39	215	96
3 β -Cholanol 7a	346 (M ⁺)	100	328 (M ⁺ - 18)	23
	331 (M ⁺ - 15)	34	313 (M ⁺ - 33)	16
	234	37	216	22
	233	52	215	47

Tab. 2. Metastabilen-Defokussierung für 3-Cholanole

Tochter-Ion <i>m/e</i>	Mutter-Ion		% rel. Int.)						
	346	328	249	248	235 ^{a)}	234	233	232	230
3 α 234	89	11							
6a 233	83	9		8					
217 ^{b)}	7	29			50			13	
216	9	20				71			
215	2	19					69		10
3 β 234	90		10						
7a 233	80	20							
217 ^{b)}		5			95				
216	1	3				96			
215	1	2					97		

^{a)} Peak *m/e* 235 ist der ¹³C-Isotopenpeak von *m/e* 234.

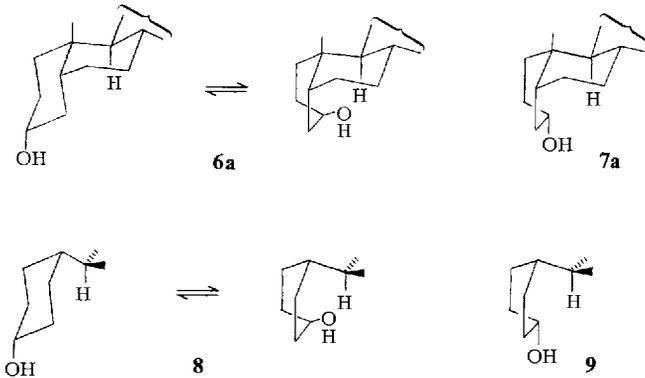
^{b)} Peak *m/e* 217 ist teilweise der ¹³C-Isotopenpeak von *m/e* 216.

sehr nahe an den tertiären 9 α -Wasserstoff heranreicht, wenn der Ring A vor der Wasserabspaltung in die Bootform umklappt^{3a)}, wie es auch schon für 19-Norsterioide der 5 α -Reihe vorgeschlagen wurde^{3a, 7a)}. Daraus kann man zwanglos die sehr leicht erfolgende Wassereliminierung der 3 α -Hydroxy-5 β -sterioide ableiten. Da für das 3 β -Cholanol **7a** diese Möglichkeit aus sterischen Gründen nicht gegeben ist, liegt es nahe, eine Beteiligung der *cis*-ständigen 1 β - und 5 β -Wasserstoffe anzunehmen, analog zum 3 α -Hydroxy-5 α -cholestan¹⁵⁾, wo eine 70proz. Beteiligung des 5 α -Wasserstoffs gefunden wurde. Ähnliche Ergebnisse erhielt Green¹⁶⁾ bei der Untersuchung von 4-Isopropylcyclohexanolen. Für das *cis*-Isomere **8** wurde eine 1,5-Eliminierung gefunden, die nur möglich ist, wenn der Cyclohexanring in eine Boot- oder

¹⁵⁾ J. Karliner, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, J. Org. Chem. **31**, 710 (1966).

¹⁶⁾ ^{16a)} M. M. Green, R. J. Cook, J. M. Schwab und R. R. Roy, J. Am. Chem. Soc. **92**, 3076 (1970). -- ^{16b)} M. M. Green und R. R. Roy, ebenda **92**, 6368 (1970).

Twistform übergeht. Die *trans*-Verbindung **9** zeigte eine nicht stereospezifische 1,3-Wasserabspaltung, was durch eine vorhergehende Ringöffnung erklärt wird. Da beide 5 β -Cholanole fast identische Massenspektren zeigen, scheinen bei dieser Fragmentierungsreaktion die Ringe A und B intakt zu bleiben. Aus diesen Ergeb-



nissen kann geschlossen werden, daß Konformationen wie Boot- oder Sesselform für Radikal-Ionenreaktionen in der Gasphase eine ähnliche Rolle spielen können wie für Umsetzungen in Lösung.

Ein relativ intensiver Peak für ein Ion m/e 217 wird beobachtet (Abb. 1 und 2). Dieses Fragment enthält keinen Sauerstoff und wegen seines Auftretens in Spektren von Steroiden mit verschiedenen Seitenketten muß dieses Bruchstück durch Dehydratisierung und Abspaltung des Ringes D entstanden sein, wobei ein Wasserstoff aus dem ungeladenen Teilstück auf das Ion übertragen wird.

Dem *NIH* (Grant AM-12758) danken wir sehr für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, H. K. dankt dem *Deutschen akademischen Austauschdienst* für ein *NATO-Forschungsstipendium*. Den Herren *E. Meier*, *J. Consul* und *R. Ross* sei für die Anfertigung der Mikroanalysen und die Aufnahme der Massenspektren gedankt.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden auf einem doppelfokussierenden AEI-MS-9 Spektrometer durch Direkteinführung der Proben in die Ionenquelle bei 180°C erhalten. Für die Drehwerte wurde ein PE Polarimeter 700 und für die IR-Spektren ein PE-700 Spektrometer benutzt. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

5 β -Cholan-3 α ,12 α -diol (**2**): In die Lösung von 15 g Desoxycholsäure (**1**) in 20 ml absol. Methanol wurden ca. 3 g Chlorwasserstoff eingeleitet, etwa 1/2 h unter Rückfluß gekocht und die Lösung über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Nach dem Eindampfen i. Vak. tropfte man den Rückstand, gelöst in 50 ml THF, langsam zu einer Suspension aus 2 g Lithiumalanat in 100 ml THF. Nach Erhitzen über Nacht wurde tropfenweise mit gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt, bis sich die Hydroxidniederschläge absetzten. Diese konnten dann abgesaugt und mit THF ausgewaschen werden. Eindampfen der Lösung i. Vak. und Umkristallisieren des Rückstandes aus Essigester ergab 10.2 g *5 β -Cholan-3 α ,12 α ,24-triol* vom Schmp. 106 – 114°C (Lit.⁹) 107 – 114°C).

10 g des Triols in 55 ml trockenem Pyridin wurden bei Eisbadtemp. unter Rühren mit 7,2 g Toluolsulfochlorid in 15 ml Pyridin während 1 h versetzt. Nach einer weiteren Stunde gab man Eiswasser zu, säuerte mit Salzsäure an und extrahierte mit Chloroform. Die organische Phase wurde mit verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft.

Der Rückstand wurde, in ca. 50 ml THF gelöst, zu 4 g Lithiumalanat in THF zugetropft. Nach Kochen unter Rückfluß über Nacht erfolgte die übliche Aufarbeitung. Die Reaktionsprodukte wurden an 200 g Kieselgel mit Hexan/Aceton-Gemisch steigender Polarität chromatographiert. Man erhielt 3 g 5 β -Cholan-3 α ,12 α -diol (**2**) vom Schmp. 171°C (Lit.⁹) 171 bis 172°C aus Essigester). MS: *m/e* 362 (M⁺).

3 α -Acetoxy-5 β -cholan-12-on (**4**): 2 g 3 α ,12 α -Diol **2** in 20 ml Benzol wurden mit je 2 ml Pyridin und Acetanhydrid versetzt und über Nacht stengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung löste man das nach dem Eindampfen zurückgebliebene Öl in 40 ml Eisessig und tropfte langsam unter Rühren 2,5 g Natriumdichromat in 10 ml Wasser hinzu. Nach 20stdg. Rühren wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und der ausgefallene Feststoff abgesaugt und gut ausgewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton/Wasser erhielt man 1,5 g **4** vom Schmp. 158–160°C.

MS: *m/e* 402 (M⁺). — $[\alpha]_D^{25}$ — 114,9°. — IR (CHCl₃): 1700, 1720 cm⁻¹ (C=O).

C₂₆H₄₂O₃ (402,6) Ber. C 77,56 H 10,52 Gef. C 77,79 H 10,64

3 α -Acetoxy-5 β -chol-9(11)-en-12-on (**3**): 1 g **4** in 50 ml Eisessig wurden mit 0,2 ml konz. Salzsäure und 1,5 g Selendioxyd 36 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen filtrierte man die Lösung durch ein Magnesiumsulfatbett, dampfte den Eisessig i. Vak. ab und nahm den Rückstand in Äther auf. Nach dem Waschen mit Wasser, Natriumhydrogencarbonatlösung und nochmals mit Wasser arbeitete man wie üblich weiter auf. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit Hexan/Aceton chromatographiert. Das Enon **3** (0,6 g) kristallisierte aus Aceton/Wasser mit Schmp. 177–179°C.

$[\alpha]_D^{25}$ = +117,4°. — IR (CHCl₃): 1720, 1675 cm⁻¹ (C=O). — UV (Äthanol): 239 nm (ϵ = 14120).

C₂₆H₄₀O₃ (400,6) Ber. C 77,95 H 10,07 Gef. C 78,01 H 10,03

Eine Probe wurde mit methanol. Kalilauge verseift zum 3 α -Hydroxy-5 β -chol-9(11)-en-12-on Schmp. 127°C. MS: *m/e* 358 (M⁺).

[9 α -D₁]-3 α -Hydroxy-5 β -cholan-12-on (**5**): Aus 50 g Magnesiumnitrid und 35 ml Deuteriumoxyd wurden, wie in l. c.¹⁴ beschrieben, ca. 10 ml Deuterioammoniak hergestellt. Hierzu gab man bei ca. -70°C 250 mg Lithium und nach etwa 10 min unter Rühren langsam 200 mg Enon **3** in 10 ml THF. Man ließ die Lösung 1 h ohne Kühlbad stehen und verdünnte nach Zugabe von 10 ml Ammoniumchloridlösung mit Wasser. Extraktion mit Äther und übliche Aufarbeitung ergab ein Öl, das sofort in 20 ml Methanol aufgenommen und mit 0,5 g Kaliumhydroxyd ca. 48 h unter Rückfluß gekocht, danach in gewohnter Weise aufgearbeitet und chromatographiert wurde. Man erhielt 100 mg **5** vom Schmp. 117°C (aus Aceton/Wasser).

MS: *m/e* 360 (D₀, 9,6%); 361 (D₁, 87,7%); 362 (D₂, 2,7%).

5 β -Cholan-3 α -ol (**6a**): 100 mg **4** wurden mit 10 ml Diäthylenglykol und 3,5 ml Hydrazinhydrat 1/2 h auf 125°C erhitzt. Danach gab man 1,5 g Kaliumhydroxyd zu und erhitzte über Nacht auf 200–210°C. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung in Wasser gegossen und der Alkohol mit Äther extrahiert. Man erhielt 65 mg **6a** vom Schmp. 143–144°C (aus

Aceton/Wasser), Lit.¹⁷⁾ 142–143°C. — MS: *m/e* 346 (M⁺). — $[\alpha]_D = +29.7^\circ$ (Lit.¹⁷⁾ +29.8°).

C₂₄H₄₂O (346.6) Ber. C 83.17 H 12.22 Gef. C 83.03 H 12.34

[9 α -D₁]-5 β -Cholan-3 α -ol (**6b**) wurde in gleicher Weise wie **6a**, ausgehend von **5**, gewonnen. MS: *m/e* 347 (M⁺, gleiche Isotopenzusammensetzung wie **5**).

5 β -Cholan-3 β -ol (**7a**): 40 mg **6a** und 120 mg *p*-Toluolsulfochlorid wurden in ca. 5 ml trockenem Pyridin 3 d bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend arbeitete man wie gewohnt auf. Dünnschichtchromatographisch konnte kein Alkohol **6a** mehr nachgewiesen werden.

Das Tosylat erhitzte man mit 40 ml Formamid 4 d unter Rühren auf 100°C. Nach dem Eingießen in Wasser wurde mit Chloroform extrahiert. Chromatographie des Abdampfrückstandes ergab 18 mg **7a** vom Schmp. 135–137°C (aus Aceton/Wasser) (Lit.¹⁸⁾ 135 bis 138°C). — MS: *m/e* 346 (M⁺). — $[\alpha]_D = +26.9^\circ$.

[9 α -D₁]-5 β -Cholan-3 β -ol (**7b**) wurde in gleicher Weise wie **7a** dargestellt. MS: *m/e* 347 (M⁺, gleiche Isotopenzusammensetzung wie **5**).

¹⁷⁾ R. T. Blickenstaff und F. C. Chang, J. Am. Chem. Soc. **80**, 2726 (1958).

¹⁸⁾ F. C. Chang und R. T. Blickenstaff, Chem. Ind. (London) **1958**, 590.