

## Massenspektroskopische Untersuchung von substituierten Steroidsapogeninen

Von

H. Budzikiewicz, K. Takeda und K. Schreiber

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität, Braunschweig, dem Shionogi Research Laboratory, Fukushima-Ku, Osaka, und dem Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale

Mit 10 Abbildungen

(Eingegangen am 13. Januar 1970)

Der Einfluß von Substituenten in Ring D und F auf das Fragmentierungsverhalten von Spirostan-Derivaten wird diskutiert.

*Mass Spectrometric Investigation of Substituted Steroid Sapogenins*

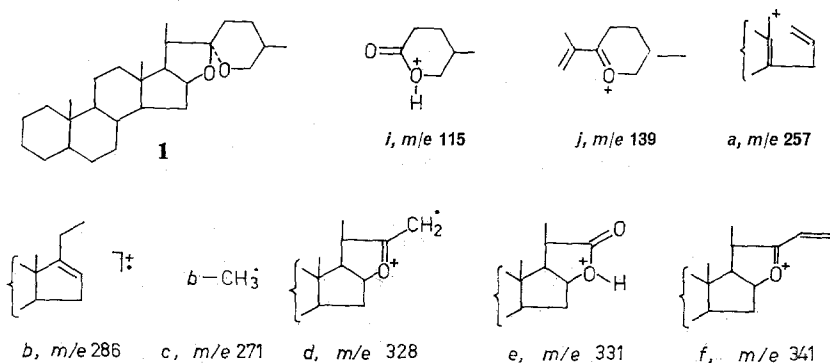
The influence of substituents in ring D and F on the fragmentation behavior of spirostane derivatives is discussed.

In einer früheren Arbeit<sup>1</sup> ist gezeigt worden, daß Spirostan-Derivate, bedingt durch die Spiroketalstruktur der Ringe E und F, eine Reihe typischer Fragmente geben, die zur Charakterisierung von Steroidsapogeninen und zur teilweisen Lokalisierung von Substituenten herangezogen werden können. Für die wichtigsten Bruchstücke waren seinerzeit<sup>1</sup> Bildungsmechanismen vorgeschlagen worden, die durch neuere Deuterium-Markierungsversuche<sup>2</sup> teils bestätigt werden konnten, teils revidiert werden mußten. Die für diese Fragmente wahrscheinlichsten Strukturformeln sind in der folgenden Übersicht nochmals zusammengestellt, wobei zum leichteren Spektrenvergleich die in der ursprünglichen Arbeit<sup>1</sup> verwendeten Bezeichnungen (*a*, *b* . . .) hier übernommen sind. Die angegebenen Massenzahlen beziehen sich auf das unsubstituierte Steroidgerüst (z. B. Deoxytigogenin<sup>1</sup>, **1**).

Im folgenden soll nun untersucht werden, wie weit Substituenten das skizzierte Fragmentierungsmuster verändern, da eine Reihe von natürlich vorkommenden Steroidsapogeninen funktionelle Gruppen trägt, die auf die Bruchstückbildung durchaus Einfluß haben können.

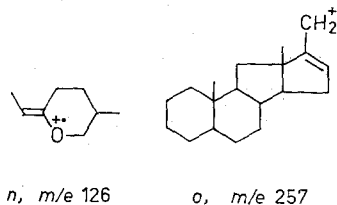
<sup>1</sup> H. Budzikiewicz, J. M. Wilson und C. Djerassi, *Mh. Chem.* **93**, 1033 (1962).

<sup>2</sup> C. Djerassi, *Pure Appl. Chem.*, im Druck.



### I. Substitution in den Ringen A—C

Das gesamte bisher vorliegende Material (vgl. auch die in dieser Arbeit abgebildeten Spektren) weist darauf hin, daß Hydroxy-<sup>1, 3, 4</sup>, Acetoxy- und Aminogruppen<sup>5</sup> sowie Doppelbindungen<sup>1, 4</sup> in den Ringen A—C das typische Fragmentierungsmuster nicht verändern. Verlust von H<sub>2</sub>O, HOAc oder NH<sub>3</sub> wird beobachtet, und zwar von den Ionen a—f ausgehend häufig stärker ausgeprägt als von M<sup>+</sup> aus. Eine mit der vom Spiroketalssystem induzierten konkurrierende Bruchstückbildung konnte in erkennbarem Ausmaße nur bei 3-Amino-spirostanen<sup>5</sup> und Spirostan-3-ol-glykosiden<sup>6</sup> festgestellt werden.



Eine Ketogruppe an C-3 oder C-11 ist gleichfalls ohne Bedeutung, während die Nähe einer 12-Ketogruppe zu den Zentren der Fragmentierung den Zerfall teilweise beeinflusst<sup>2</sup>. Die Ionen b, d und j werden gebildet, a, c, e, f und i fehlen praktisch, während n und o (Eliminierung

<sup>3</sup> H. Ripperger, K. Schreiber und H. Budzikiewicz, Chem. Ber. **100**, 1741 (1967).

<sup>4</sup> F. Yasuda, Y. Nakagawa, A. Akahori und T. Okanishi, Tetrahedron **24**, 6535 (1968).

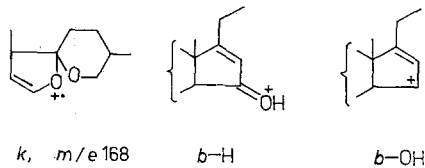
<sup>5</sup> H. Ripperger, H. Budzikiewicz und K. Schreiber, Chem. Ber. **100**, 1725 (1967).

<sup>6</sup> T. Kawasaki, O. T. Komori, Y. Ida, Y. Inatsu, K. Miyahara und T. Nohara, vorgetragen bei der Intl. Conf. on Mass Spectrometry in Kyoto, Sept. 1969 (preprint S. 221).

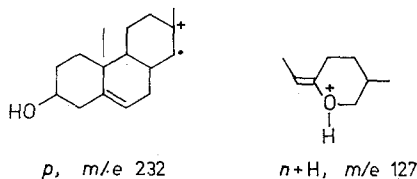
von CO, vgl. auch die folgenden Abschnitte) zusätzlich entstehen. Für die verstärkte Bildung von *n*, das sonst nur von sekundärer Bedeutung ist<sup>1, 4</sup>, scheint durch Substituenten erleichterte Bindungsspaltung in den Ringen D und E (s. den folgenden Abschnitt) sowie Stabilität des Neutralteils<sup>2</sup> maßgebend zu sein.

## 2. Substitution in Ring D

Für 15-Ketodeoxytigogenin<sup>1</sup> (1, jedoch mit einer C-15-Ketogruppe) sind die Fragmente *a-f* und *j* festgestellt worden. Während *i* praktisch fehlt, erscheint im unteren Massenbereich infolge der Labilisierung der 15,16-Bindung zusätzlich *k*; ebenso tritt *n* (vgl. Abschn. 1) stärker hervor. Schließlich ist noch ein *M-CO*-Fragment zu erwähnen.



Die 15-Hydroxyverbindung Digitogenin (2, Abb. 1) verhält sich ähnlich, doch kann sich das Radikal-Ion *b* außer durch Methyl-Verlust zu *c* noch durch Abspaltung von  $\cdot\text{H}$  (*b-H*) oder von  $\cdot\text{OH}$  (*b-OH*) stabilisieren, Prozesse, die bei dem Keto-Analogen nicht möglich sind. Die Ionen *j*, *n* und *k* und daneben auch *i* finden sich wieder.



Stärker beeinflusst wird das Fragmentierungsmuster von einer 17-Hydroxygruppe, wie am Beispiel des Pennogenins (3, Abb. 2) ersichtlich. Es treten im oberen Massenbereich zwar die Fragmente *a-f* (*b* wäre mit einer anderen Lage der Doppelbindung zu formulieren) auf, doch zusätzlich — bedingt durch die Labilisierung der 13,17-Bindung — das *M-Ring-D*-Fragment *p*, das sonst nicht beobachtet wird, sowie dessen Zerfallsprodukte ( $-\text{H}_2\text{O}$ ,  $-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ ). Im unteren Massenbereich ist *j* nur von sekundärer Bedeutung, während *i*, wie nach dem angenommenen Bildungsmechanismus zu erwarten<sup>1, 2</sup>, praktisch fehlt. Da die 17-Hydroxygruppe auch Spaltung der 17,20-Bindung begünstigt, wird *n* zum Hauptfragment, daneben bildet sich noch etwas protoniertes

$n$  ( $n + H$ ). Ein intensives Ion findet sich noch bei  $m/e$  153 und hat die Zusammensetzung  $C_{16}H_{24}O$  (gef. 153,0916). Es umfaßt daher Ring F sowie Teile von Ring E, und entweder den Hydroxyl- oder den Ring-E-Äthersauerstoff. Da zwischen den beiden Möglichkeiten keine Entscheidung möglich ist, sei von einer Formulierung abgesehen.

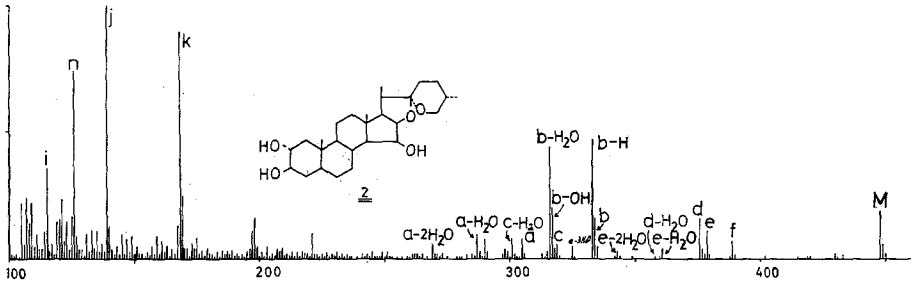


Abb. 1. Massenspektrum von Digitogenin

Änderung der Konfiguration an C-20 kann zu beträchtlichen Verschiebungen der relativen Intensitäten einzelner Fragmente führen, hervorgerufen durch die zusätzliche sterische Hinderung bei 20-Isoverbindungen, die auch zu Ring-D-Spaltung (vgl. oben) führt ( $m/e$  181,  $C_{11}H_{17}O_2^+$ )<sup>2</sup>.

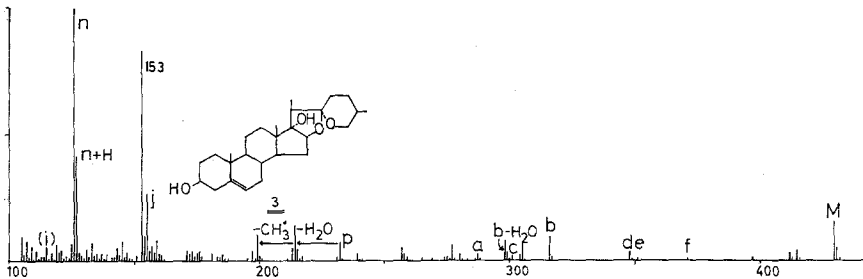
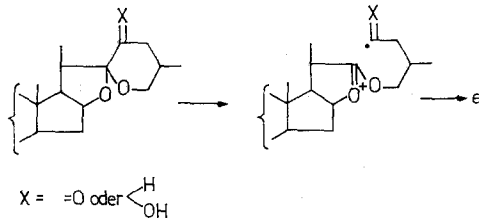


Abb. 2. Massenspektrum von Pennogenin

### 3. Veränderungen im Bereich C-23 und C-24

Einführung einer O-Funktion an C-23 führt zum Verschwinden von  $i$  und  $j$  und gleichzeitig zu intensiverem Hervortreten der Peaks im oberen Massenbereich. Da, wie gezeigt werden soll, auch die Bildung anderer Bruchstücke z. T. reduziert oder verhindert ist, tritt in allen Fällen  $a$  besonders hervor;  $b$  und  $c$  sind, wenn auch mit geringer Intensität, gewöhnlich vorhanden.

Bei 23-Keto- (z. B. 23-Ketotigogenin<sup>1</sup>) und 23-Hydroxy-Verbindungen (z. B. Paniculogenin<sup>3</sup>, 23  $\xi$ -Hydroxyneotigogenin<sup>7</sup>, 4, Abb. 3) tritt *e* mit besonderer Intensität hervor, wohl weil die Radikalstelle im primären  $\alpha$ -Spaltprodukt besser als in 23-unsubstituierten Spirostanen stabilisiert ist:



Im Spektrum von 23 $\xi$ -Hydroxytigogenin-23  $\xi$ -d werden *a*, *b*, *c*, *e* und die um H<sub>2</sub>O leichteren Ionen mit der gleichen Masse wie für 4 gefunden. Bemerkenswert ist, daß ~ 25% des *M*-H<sub>2</sub>O-Peaks das Deuterium verloren haben, daß also Wasser nicht nur durch die übliche 1,3- bzw. 1,4-Eliminierung<sup>8</sup> abgespalten wird. Der für 3-Hydroxy-tetrahydropyransysteme (vgl. den folgenden Abschnitt) typische Verlust von 31 u wird hier wegen der konkurrierenden bevorzugten Ringspaltung praktisch nicht beobachtet.

23,24-Dioxotigogenin<sup>7</sup> (5, Abb. 4) zeigt analoges Verhalten: *a*, *e* und die sich davon ableitenden um H<sub>2</sub>O leichteren Produkte beherrschen das Spektrum. Bei 3  $\beta$ -Acetoxyspirost-24-en-23-on<sup>5</sup> (6, Abb. 5) sowie 3  $\beta$ , 24-Acetoxy-spirost-24-en-23-on<sup>7</sup> tritt *e* jedoch nicht so stark hervor. Wie eine Reihe anderer Spirostan-ketone gibt auch 6 einen *M*-CO-Peak.

Andere Substituenten an C-23 scheinen das Fragmentierungsmuster im oberen Massenbereich nicht zu verändern. So findet sich bei den epimeren 23-Bromdeoxytigogeninen<sup>1, 9</sup> sowie bei 23-Acetylneotigogenin *a*-*f*, wobei *b* und *c* bei der 23(*S*)- bedeutend stärker als bei der 23(*R*)-Bromverbindung hervortreten. Verlust des C-23-Substituenten, *M*-Br<sup>+</sup> (*M*-HBr<sup>+</sup> ist offensichtlich thermischer Natur, vgl. <sup>9</sup>) bzw. *M*-CH<sub>3</sub>CO<sup>+</sup>, wird zusätzlich beobachtet. Die Ionen *i* und *j* fehlen bei den 23-Bromspirostanen praktisch vollkommen; bei der 23-Acetylverbindung ist ihre Intensität erheblich reduziert (*j* etwa 60% von *a*).

<sup>7</sup> R. K. Callow und P. N. Massy-Beresford, J. Chem. Soc. [Lond.] 4482 (1957).

<sup>8</sup> H. Budzikiewicz, Z. Pelah und C. Djerassi, Mh. Chem. **95**, 158 (1964); C. G. McDonnald, J. S. Shannon und G. Sugowdz, Tetrahedron Letters **1963**, 807.

<sup>9</sup> J. T. Kutney, W. Cretney, G. R. Pettit und J. C. Knight, Tetrahedron **20**, 1999 (1964).

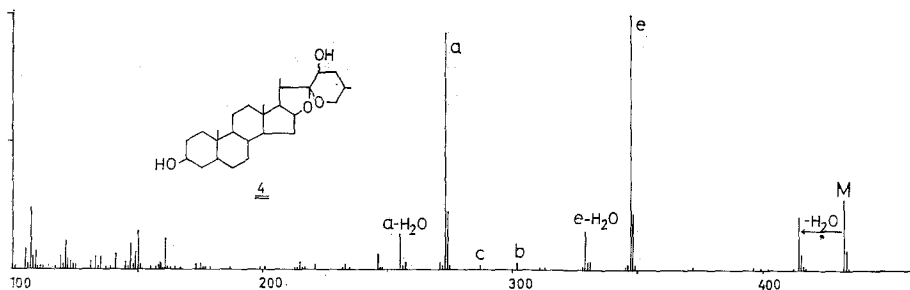


Abb. 3. Massenspektrum von 23ξ-Hydroxynootigenin

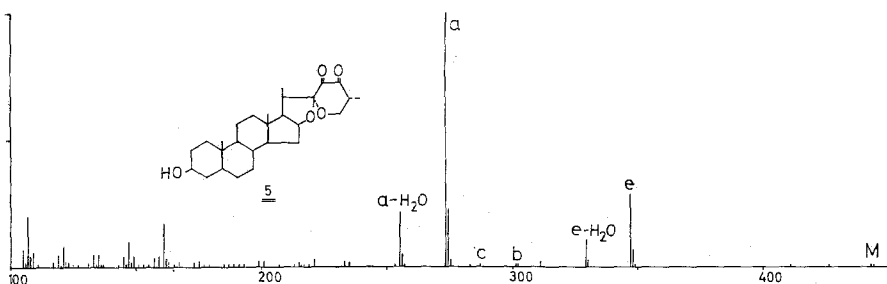


Abb. 4. Massenspektrum von 23,24-Dioxynootigenin

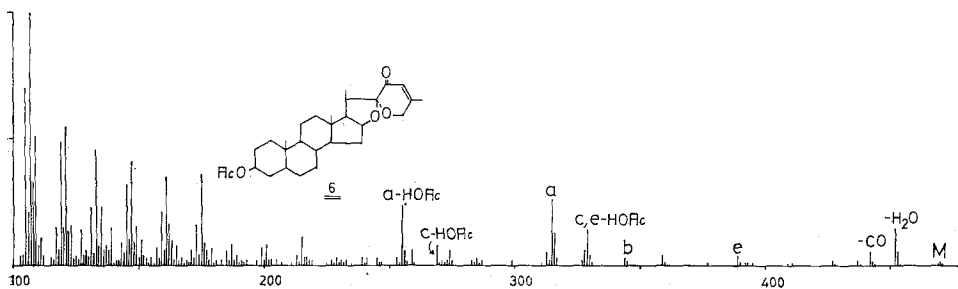


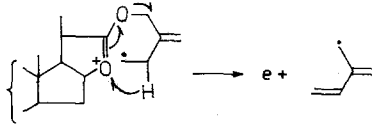
Abb. 5. Massenspektrum von 3β-Acetoxy Spirost-24-en-23-on

## 4. Veränderungen im Bereich C-25 bis C-27

Einführung einer  $\Delta^{25(27)}$ -Doppelbindung (Convallamarogenin<sup>10</sup>, 7, Abb. 6) macht sich durch das Fehlen von *f* bemerkbar. Dies war zu

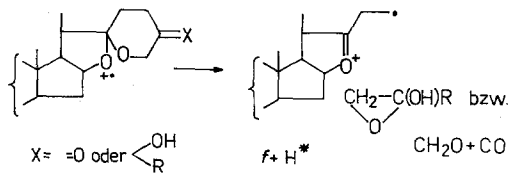
<sup>10</sup> K. Takeda, T. Okanishi, H. Minato und A. Shimaoka, Tetrahedron **21**, 2089 (1965).

erwarten, da die zu *f* führende Spaltung der C-24,C-25-Bindung bei 7 den energetisch ungünstigen Bruch einer vinylischen Bindung erfordert. Hervorzuheben ist die Bildung von *e*, da der für das normale Spirostan-system bewiesene Bildungsmechanismus<sup>2</sup> hier nicht ablaufen kann. Eine plausible Erklärung besteht in einer H-Übertragung von C-24, die zu einem stabilen Neutralteil führt.



Von Bedeutung für die folgende Diskussion ist die Beobachtung, daß 27-Hydroxyspirostande (iso-Carneagenin<sup>10</sup>, 8, Abb. 7, Igagenin und Iso-narthogenin<sup>4</sup>) Verlust von 30 ( $M-CH_2O$ ) und 31 u ( $M-CH_2OH$ ) nur in geringem Ausmaß zeigen. Das Fragmentierungsmuster wird ansonsten nicht beeinflusst.

Von besonderem Interesse sind 25-Hydroxyspirostande (Reineckia-genin<sup>10</sup>, 9, Abb. 8, Isocholegenin<sup>11</sup>). Einmal macht sich die bessere Radikalstabilisierung an C-25 und damit die leichtere Spaltbarkeit der 24,25- und 25,26-Bindungen bemerkbar, was in einem starken Intensitätszuwachs von *d* und in der Ausbildung von  $f + H$  resultiert. Zusätzlich findet sich ein intensiver  $M-CH_2OH$ -Peak, dessen Auftreten typisch für 3-Hydroxytetrahydropyransysteme zu sein scheint<sup>11, 12</sup> und über dessen Bildungsmechanismus Untersuchungen im Gange sind. Jedenfalls ist eine Unterscheidung zwischen furanoiden (Cholegenin<sup>1, 11</sup>) und pyranoiden Isomeren auf Grund des Verlustes von  $CH_2OH$  nicht möglich.



Convallamarogenin-25,27-diol-1,3-diacetat<sup>10</sup> (10, Abb. 9) zeigt analoges Fragmentierungsverhalten, doch läßt sich ohne O-Markierung nicht feststellen, ob und zu welchem Prozentsatz  $M-31$  durch Umlagerung

\* Oder durch Umlagerung stabilisierte Form.

<sup>11</sup> H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, „Mass Spectrometry of Organic Compounds“, Holden-Day, San Francisco 1967, S. 254—257.

<sup>12</sup> L. Grotjahn, Diplomarbeit, Techn. Universität Braunschweig, 1968.

bzw. durch Verlust der C-27—CH<sub>2</sub>OH-Gruppe gebildet wird. M—CH<sub>2</sub>O tritt wie bei **8** ebenfalls auf.

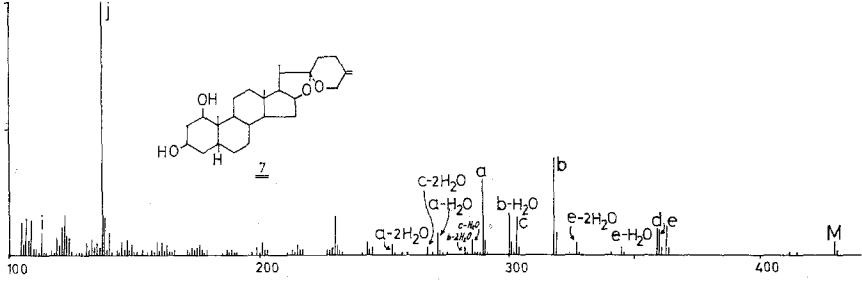


Abb. 6. Massenspektrum von Convallamarogenin

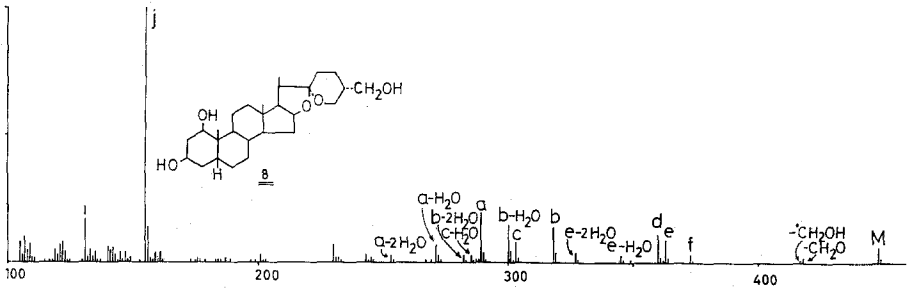


Abb. 7. Massenspektrum von iso-Carneagenin

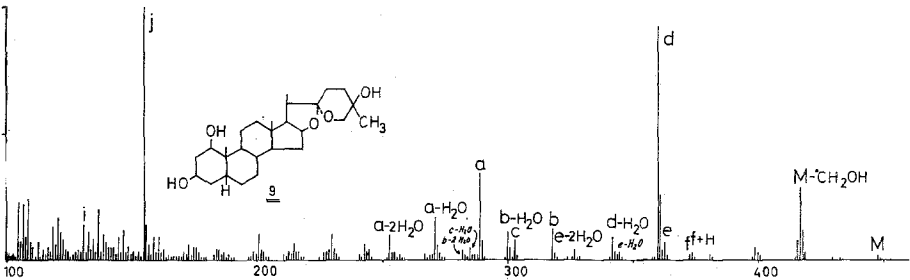


Abb. 8. Massenspektrum von Reineckiagenin

Bei 25-Ketoconvallamarogenin-1,3-diacetat (**11**, Abb. 10) dominiert Bildung von *f* + H infolge der Eliminierung der beiden stabilen Neutralteilchen CH<sub>2</sub>O und CO; *j* ist entsprechend in seiner Intensität stark reduziert, *i* fehlt praktisch.



### 5. Zusammenfassung

Die Fragmente *i* und *j* spiegeln durch ihre Masse Veränderungen in Ring F wider (s. Abb. 6—10 sowie 23-Acetylneotigogenin), wobei jedoch *i* infolge seiner häufig geringen Intensität mitunter nicht eindeutig zu erkennen ist. Das Ion *j* verliert an Bedeutung, wenn durch entsprechende Substitution intensive Ring-E-Spaltung induziert wird (Abb. 2 und 10

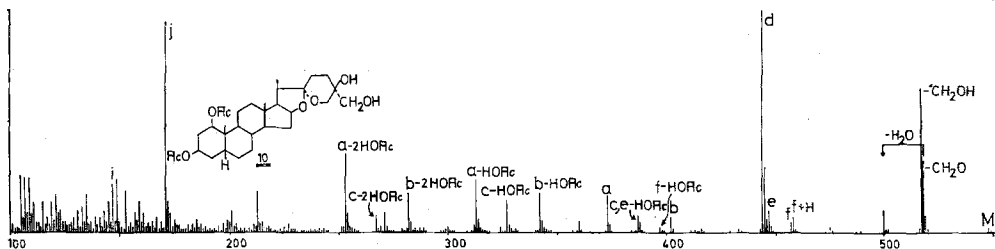


Abb. 9. Massenspektrum von Convallamarogenin-25,27-diol-1,3-diacetat

sowie 23-Acetylneotigogenin) und kann unter diesen Umständen auch praktisch gänzlich unterdrückt werden (Abb. 3—5, 23-Brom-Verbindungen). Im unteren Massenbereich finden sich zusätzliche intensive Ionen (*k*, *n*), wenn C-12, C-15 oder C-17 funktionalisiert ist.

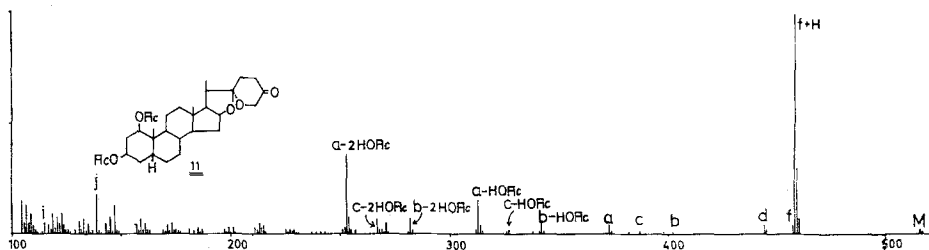


Abb. 10. Massenspektrum von 25-Ketoconvallamarogenin-1,3-diacetat

Im oberen Massenbereich wird *a* zum wichtigsten Bruchstück, wenn andere Fragmente (und besonders *j*) unterdrückt sind. O-Substituenten in Ring F können zu einer leichteren Spaltung der benachbarten Bindungen und damit zur intensiveren Bildung bestimmter Ionen führen (*e* in Abb. 3 und 4, *d* in Abb. 8 und 9, *f+H* in Abb. 10), sofern die Substitutionen nicht den normalen Fragmentierungsmechanismus unterbinden. In diesem Fall kann auch ein bestimmtes Fragment gänzlich fehlen (*f* in Abb. 6).

Soweit bisher untersucht, machen sich Substituenten bzw. Doppelbindungen in den Ringen A—C (mit Ausnahme einer 12-Ketogruppe)

nur durch entsprechende Massenverschiebungen der Fragmente *a—f* sowie u. U. durch Verlust von H<sub>2</sub>O usw. bemerkbar. Bei Glycosiden beobachtet man bevorzugte Fragmentierung im Zuckerrest.

### Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät MS-9 (AEI) mit direkter Probeneinführung bei 70 eV gemessen.

23  $\xi$ -Hydroxytigogenin-23  $\xi$ -d wurde durch Reduktion von 23-Ketotigogenin mit Natriumbordeuterid<sup>7</sup> dargestellt.

Herrn Prof. Dr. *R. K. Callow* sowie Miss *Massy-Beresford* möchten wir für die freundliche Überlassung von **4**, **5**, **6** sowie von 23-Acetylnicotigogenin und von 3  $\beta$ ,24-Acetoxyprost-24-en-23-on, Herrn Dr. *H. Vorbrüggen* (Fa. Schering, Berlin) für **2** bestens danken.