

ZUR LOKALISIERUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN IN STEROIDEN MIT HILFE DER MASSENSPEKTROMETRIE—II¹

3, 11, 17 β -TRIHYDROXYANDROSTANE

H. OBERMANN, M. SPITELLER-FRIEDMANN und G. SPITELLER
Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 28 September 1970; Received in the UK for publication 13 October 1970)

Zusammenfassung—Für alle isomeren 3, 11, 17 β -Trihydroxy-androstane ist das Auftreten eines Schlüsselbruchstückes der Masse 164 charakteristisch. Eine α -konfigurierte Hydroxylgruppe in der Stellung 11 induziert die Bildung eines weiteren Schlüsselions der Masse 124, das insbesondere bei *cis*-Verknüpfung des A/B Ringsystems stark ausgeprägt ist. Die Gegenwart einer α -konfigurierten Hydroxylgruppe in der Stellung 3 eines *cis*-verknüpften A/B Ringsystems lässt sich an Schlüsseldifferenzen von 72 ME erkennen. Die Möglichkeiten einer massenspektrometrischen Unterscheidung der Isomeren werden diskutiert.

Abstract—The presence of a key fragment of mass 164 is characteristic for all isomeric 3, 11, 17 β -trihydroxy-androstanes. A α -hydroxy-group in position 11 causes the production of another key fragment of mass 124. This ion is of especially high intensity, if the A/B ring system shows *cis* connection. The presence of a α -hydroxy group in position 3 in a steroid with an A/B *cis* connected ringsystem may be detected by key differences corresponding to 72 mass units.

The possibilities of a mass spectrometric distinction of the isomers are discussed.

STEROID stoff wechselprodukte mit Sauerstoffsubstituenten in den Positionen 3, 11 und 17 treten häufig in biologischen Materialien auf. Mit Hilfe der Massenspektrometrie ist ihr Nachweis schon in kleinsten Spuren Mengen möglich.

Bei der Untersuchung von Spurensteroiden in biologischen Materialien² finden wir immer wieder Verbindungen, die wir aus Mangel an Vergleichsmaterial nicht identifizieren können. Die Spektren erlauben oft nicht einmal die Ableitung von Teilstrukturen, weil entweder Schlüsselbruchstücke fehlen oder uns unbekannt ist, welchen Strukturelementen auftretende Schlüsselbruchstücke entsprechen können.

Dies trifft vor allem für Steroide mit Hydroxylgruppen zu.¹ Um diesem Mangel abzuwehren, haben wir eine systematische Untersuchung von Steroidspektren begonnen, mit dem Ziel, nicht nur die nötigen Vergleichsspektren zu erhalten, sondern vor allem, um herauszufinden, wie Substituenten am Steroidskelett angeordnet sein müssen, um die Bildung von Schlüsselbruchstücken zu ermöglichen, die sowohl Aussagen über die Art der funktionellen Gruppen als auch über ihre Konfiguration erlauben.

In dieser Arbeit werden die Spektren der 8 isomeren 3, 11, 17 β -Trihydroxyandrostane diskutiert.

Gemeinsame Spaltstücke. Die Spektren sind alle durch intensive Fragmente der Masse 290 und 272, die den Verlust von ein und zwei Molekülen Wasser anzeigen, gekennzeichnet. Von diesen Ionen ist jeweils die Abspaltung eines Methylradikals zu Bruchstücken der Masse 275 bzw. 257 möglich. Die Eliminierung der dritten vorhan-

denen Hydroxylgruppe in Form von Wasser erfolgt in weit geringerem Mass, wie aus den Ionen der Masse 254 ($M-3H_2O$) und 239 ($M-3H_2O + CH_3$) ableitbar ist.

Da die primäre Wasserabspaltung sowohl bei 17 β -Hydroxy-5 α -androstan,³ 17 β -Hydroxy-5 β -androstan,³ 3 α , 17 β -Dihydroxy-5 α -androstan⁴ und 3 β , 17 β -Dihydroxy-5 α -androstan,⁴ als auch bei den isomeren 3,11-Dihydroxy-5 α -androstan-17-onen⁵ aus den Molekülonen nur mit relativ geringer Wahrscheinlichkeit erfolgt, liegt der Schluss nahe, dass bei den untersuchten Trihydroxysteroiden die hohe Neigung zur Wasserabspaltung durch die gleichzeitige Anwesenheit der 17 β -Hydroxylgruppe und einer Hydroxylgruppe in der Stellung 11—unabhängig von deren Konfiguration—bedingt wird.

Aus den bisher beschriebenen Abbaureaktionen lassen sich keine Schlüsse über die Stellung der funktionellen Gruppen ableiten, doch ergeben sich diesbezüglich Hinweise aus einer Reihe von Sekundärspaltprodukten des M—18 Ions.

Das Ion der Masse 290 zerfällt, wie die Untersuchung entsprechend deuterierter Verbindungen beweist, unter Verlust der C-Atome 16 und 17 zu einem Fragment der Masse 246 (Bruttoformel $C_{17}H_{26}O$). Aus diesem Ion wird durch Eliminierung einer Methylgruppe das Fragment der Masse 231 gebildet ($m^*=217$), das seinerseits unter Wasserabspaltung zum Bruchstück der Masse 213 zerfällt ($m^*=197$). Der Verlust von H_2O und CH_3 aus dem Ion der Masse 246 ist auch in umgekehrter Reihenfolge möglich, so dass als Zwischenabbauprodukt ein Bruchstück der Masse 228 entsteht ($246 \rightarrow 228 : m^*=211$). Besonders typisch für das Vorliegen der 3, 11, 17 β -Trihydroxystruktur ist die Bildung des Fragmentes der Masse 164. Dieses Ion der Summenformel $C_{11}H_{16}O$ enthält das D-Ringsystem (quantitative Verschiebung des Bruchstückes zur Masse 165 im Falle des 17 α -Deutero-5 α -androstan-3 α , 11 β , 17 β -triols), jedoch nicht den A Ring (im Spektrum des 3 α -Deutero-5 α -androstan-3 β , 11 β , 17 β -triols wird keine Verschiebung des Fragmentes der Masse 164 beobachtet). Demnach müssen in dem $C_{11}H_{16}O$ Bruchstück noch die Kohlenstoffatome des C und D Ringes sowie C—7 enthalten sein. Die Neigung zur Bildung dieses Schlüsselbruchstückes ist am grössten in den Isomeren, in denen das A/B Ringsystem *trans*-verknüpft ist und die Hydroxylgruppe in Stellung 11 α -konfiguriert ist. Dementsprechend ist dieses Spaltstück von relativ geringer Intensität im 3 α - und 3 β , 11 β , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstan.

In den Spektren der Isomeren der 5 β -Reihe zeigen die Ionen der Masse 147 meist mittlere Intensität: Sie entsprechen einem Spaltstück, das die C Atome der Ringe A/B enthält, jedoch nicht mehr die 3-ständige Hydroxylgruppe. Man kann daraus daher den mitunter wertvollen Hinweis erhalten, dass im A/B Ringsystem des ursprünglichen Moleküls nur eine Hydroxylgruppe bzw. nur eine Doppelbindung vorhanden war.

Unterscheidung der Isomeren. Im allgemeinen unterscheiden sich Spektren Isomerer mit verschiedenartiger Verknüpfung des A/B Ringsystems relativ stark voneinander. Charakteristische Unterschiede ergeben sich auch bei unterschiedlicher Konfiguration der 11-ständigen Hydroxylgruppe, während isomer 3 α - und 3 β -Hydroxysterioide im allgemeinen nahezu gleiche Neigung zur Bildung von Bruchstücken zeigen und Spektren solcher Isomerer oft kaum unterscheidbar sind. Dementsprechend wurden die 8 Isomeren in 4 Gruppen zu je zwei Verbindungen, die sich jeweils nur in der Konfiguration der 3-ständigen Hydroxylgruppe voneinander unterscheiden, eingeteilt.

A. 3 α , 11 α , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (1) und 3 β , 11 α , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (2). Die Spektren dieser beiden Verbindungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Fehlhaber⁶ durch ein Ion der Masse 124 von besonders hoher Intensität gekennzeichnet (Abb. 1 und Abb. 2). Es ist typisch für

Steroide mit einer α -ständigen Hydroxylgruppe in der Stellung 11, einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in der Stellung 3 und eine *cis*-verknüpften A/B Ringsystem*. Das Bruchstück umfasst die C-Atome des Ringes A sowie C-6 und C-19. Der Bildungsmechanismus ist noch ungeklärt.⁶ Die hohe Neigung zur Bildung des Bruchstückes der Masse 124 unterbindet nahezu alle anderen Abbaureaktionen, vor allem solche, die von den 3-ständigen Hydroxylgruppen induziert werden, so dass eine Unterscheidung der beiden Isomeren 1 und 2 sehr schwierig ist: Das 3β -OH-Isomere zeigt gegenüber dem 3α -OH-Isomeren eine stärkere Neigung zur Eliminierung einer Methylgruppe aus dem primären Wasserabspaltungsprodukt, so dass bei Vorliegen von Reinstspektren eine Unterscheidung durch das verschiedene Intensitätsverhältnis der Ionen der Masse 272 und 275 möglich erscheint.

B. 3α , 11α , 17β -Trihydroxy- 5α -androstan (3) und 3β , 11α , 17β -Trihydroxy- 5α -androstan (4). Im Vergleich zu den Spektren der Verbindungen der Gruppe A ist die Intensität der Schlüsselbruchstückes der Masse 124 in den Spektren der beiden Isomeren 3 und 4 wesentlich geringer, jedoch noch so beträchtlich, dass ohne Vorliegen von Vergleichsspektren eine *cis* Verknüpfung des A/B Ringsystems nicht ausgeschlossen werden könnte (Abb. 3 und Abb. 4), wodurch die Fehlhaber's chen Befunde⁶ eine gewisse Einschränkung erfahren.

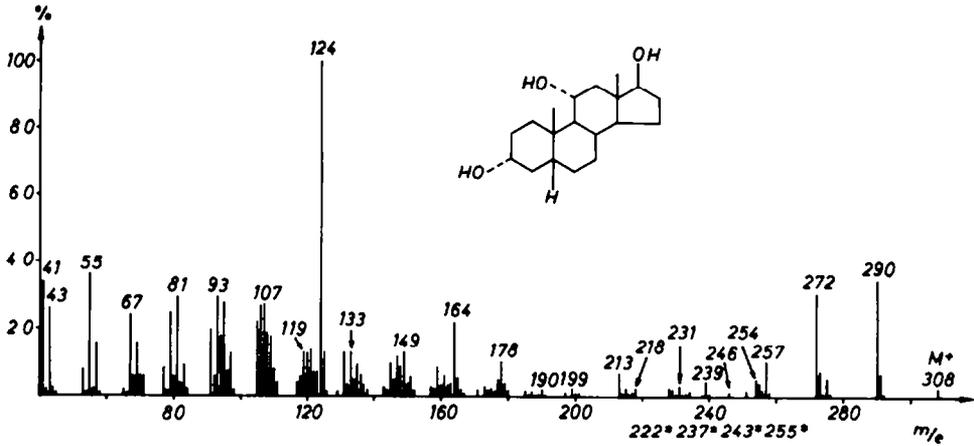
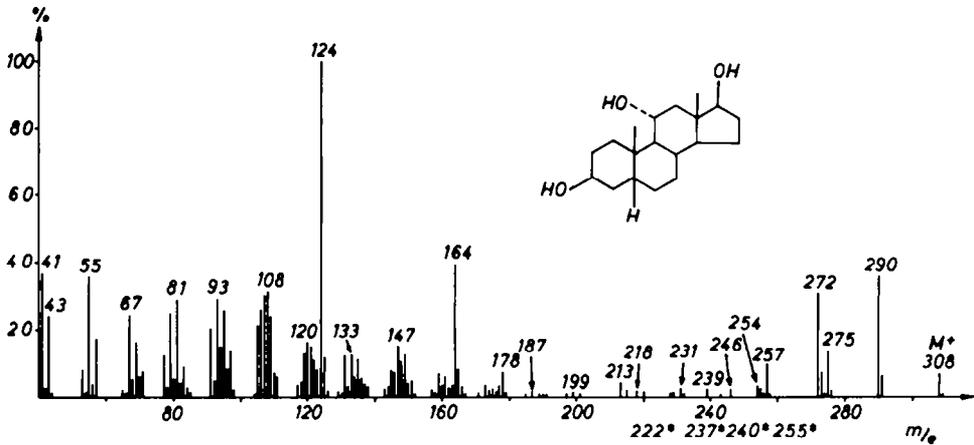
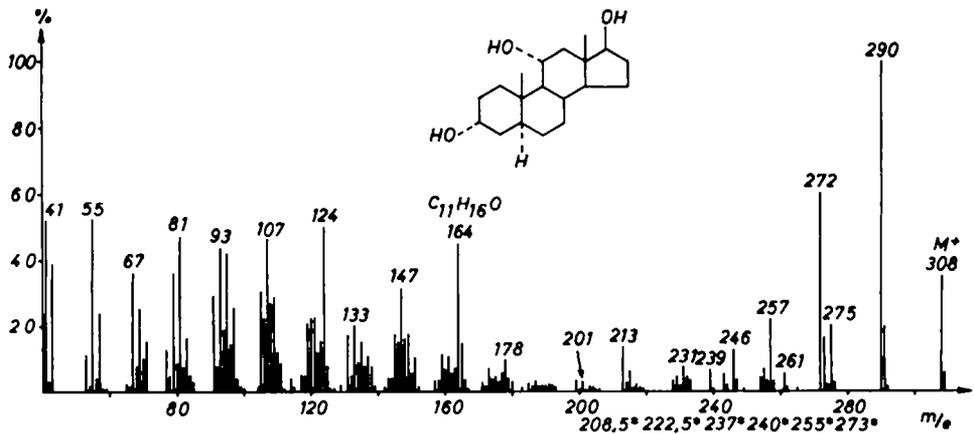
Bemerkenswert ist das Auftreten von zwar intensitätsschwachen, wegen der Geradzahligkeit der Masse jedoch leicht als Schlüsselbruchstücke erkennbaren Ionen der Masse 178: Sie entstehen aus dem primären Wasserabspaltungsprodukt der Masse 290 durch Eliminierung der C-Atome des Ringes A und C-19 als 112 ME schweres Teilchen. Da Ionen gleicher Masse in den Spektren der Verbindungen der Gruppe A, Kaum aber in denen der Gruppe C und D auftreten, kann der Schluss gezogen werden, dass dieses Fragment unabhängig von der Verknüpfung des A/B Ringsystems, bei Vorhandensein einer α -kon figurierten Hydroxylgruppe in der Stellung 11 entsteht.

Auch die Unterscheidung von 3 und 4 ist ausserordentlich schwierig und gelingt erst bei Berücksichtigung relativ intensitätsschwacher Ionen, wodurch natürlich bei nicht ganz untergrundfreien und sorgfältig aufgenommenen Spektren die Identifizierung in Frage gestellt wird: In 4 ist die Neigung zur Abspaltung von 3 Molekülen Wasser stärker als in 3, das Ion der Masse 254 erreicht daher höhere Intensität.

In 3 kommt dagegen offensichtlich eine für 17-Ketosteroide mit einer α -ständigen Hydroxylgruppe in der Stellung 11 typische Abbaureaktion⁵ zum Zuge: Aus dem Wasserabspaltungsprodukt wird die 11-ständige CH(OH) Gruppierung als CHO-eliminiert, so dass ein Ion der Masse 261 resultiert.

C. 3α , 11β , 17β -Trihydroxy- 5β -androstan (5) und 3β , 11β , 17β -Trihydroxy- 5β -androstan (6). Die Spektren von 5 und 6 zeigen zwar noch Ionen der Masse 124, doch entsprechen diese bezüglich ihrer intensität in etwa der der benachbarten Ionen (Abb. 5 und Abb. 6). Die geringe Neigung zur Bildung eines Ions der Masse 124 ermöglicht Konkurrenzspaltungsreaktionen: So ist in den Verbindungen der Gruppen C und D die Tendenz zur Bildung des Fragmentes der Masse 246 (Eliminierung von C-16 und C-17 aus dem primären Wasserabspaltungsprodukt) höher als in den Isomeren mit einer 11α -OH Gruppe. Da der dominierende Einfluss einer 11α -Hydroxylgruppe auf die Bruchstückbildung in den 11β -OH Isomeren ausgeschaltet ist, können Abbaureaktionen zur

* Schlüsselbruchstücke der Masse 124 zeigen allerdings auch 3-Ketosteroide und 3,11 Diketosteroide bei *trans*-Verknüpfung des A/B Ringsystems.

ABB 1. Massenspektrum des 3 α , 11 α , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstans (1)ABB 2. Massenspektrum des 3 β , 11 α , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstans (2)ABB 3. Massenspektrum des 3 α , 11 α , 17 β -Trihydroxy-5 α -androstans (3)

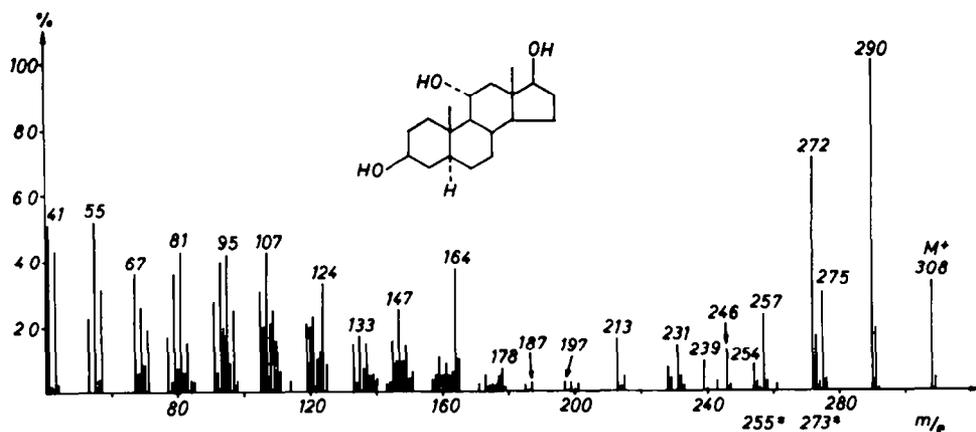
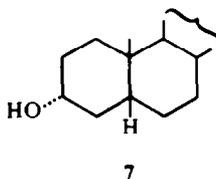


Abb. 4. Massenspektrum des 3β , 11α , 17β -Trihydroxy- 5α -androstan (4)

Geltung kommen, die für Steroide typisch sind, in denen das A/B Ringsystem *cis* verknüpft ist und die gleichzeitig eine α -konfigurierte Hydroxylgruppe in der Stellung 3 besitzen:⁷ Aus Verbindungen, die das Strukturelement (7) enthalten, werden nämlich vielfach nach primären Abbaureaktionen im C und D Ring des Steroidmoleküls die 3 ständige Hydroxylgruppe als Wasser und danach die Kohlenstoffatome 1–4 als Butadienmolekül eliminiert:



Man könnte geneigt sein, diesen Prozess als Dienzerfall aufzufassen, der nach 1,2 Eliminierung der Hydroxylgruppe (wobei ein Ion mit einer Δ^2 -Doppelbindung entstände) eintritt. Da aber bei einfachen Molekülen nachgewiesen wurde, dass die Wasserabspaltung nicht als 1,2 Eliminierung verläuft,^{4, 8} liegt der Schluss nahe, dass die Reaktion einen komplexeren Verlauf nimmt.

Aus 5 wird im Zuge solcher Spaltungsreaktionen aus dem primären Wasserabspaltungsprodukt über das Ion der Masse 246 ein Bruchstück der Masse 174 ($C_{13}H_{18}$) gebildet. Da diese Spaltprozesse in 6 nicht eintreten, gelingt in diesem Fall eine einfache Unterscheidung der Isomeren.

Überdies ist aus dem Ion der Masse 246 in 5 Wasserabspaltung zum Fragment der Masse 228 sehr viel wahrscheinlicher als bei der Verbindung 6.

D. $3\alpha, 11\beta, 17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstan (8) und $3\beta, 11\beta, 17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstan (9). In den Verbindungen 8 und 9 fehlt die für die Bildung strukturspezifischer Schlüsselbruchstücke so wichtige α -ständige Hydroxylgruppe in Stellung 11. Die Spaltreaktionen verlaufen in beiden Verbindungen völlig analog, selbst bei Vorliegen von Vergleichsmaterial erscheint eine Unterscheidung der beiden Isomeren kaum möglich (Abb. 7 und Abb. 8). Auch die Ähnlichkeit der Spektren von 8 und 9 mit dem des

3 β ,11 β ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstans (6), Abb. 6, ist sehr gross. Eine Unterscheidung gelingt am ehesten durch Vergleich der Ionengruppe im Bereich der Massen 120–125: (6) zeigt immerhin noch eine gewisse Tendenz zur Bildung eines Ions der Masse 124, die in 8 und 9 nicht mehr vorhanden ist.

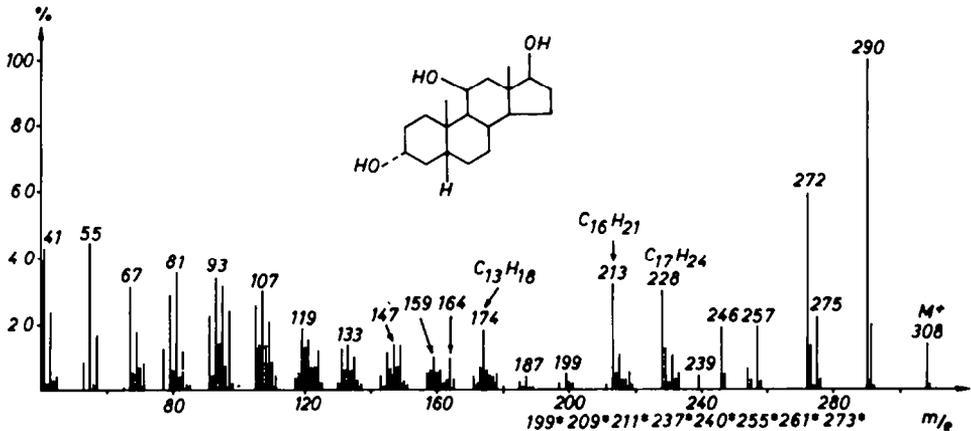


ABB 5. Massenspektrum des 3 α , 11 β , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstans (5)

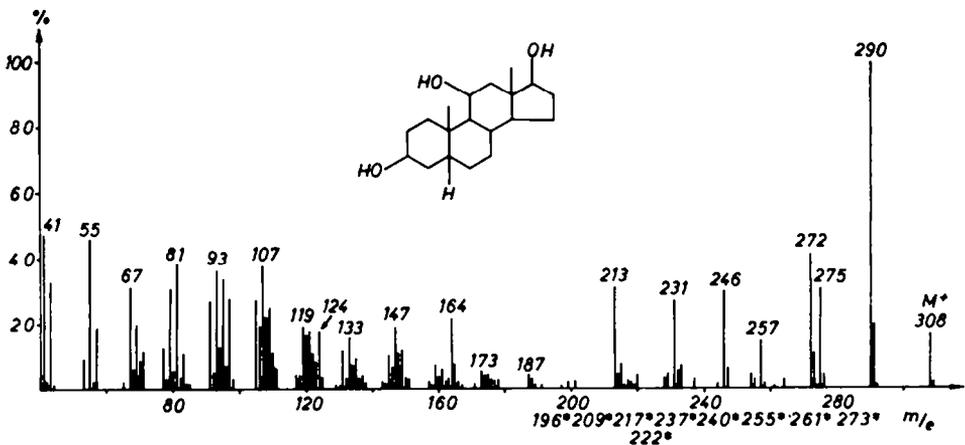


ABB 6. Massenspektrum des 3 β , 11 β , 17 β -Trihydroxy-5 β -androstans (6)

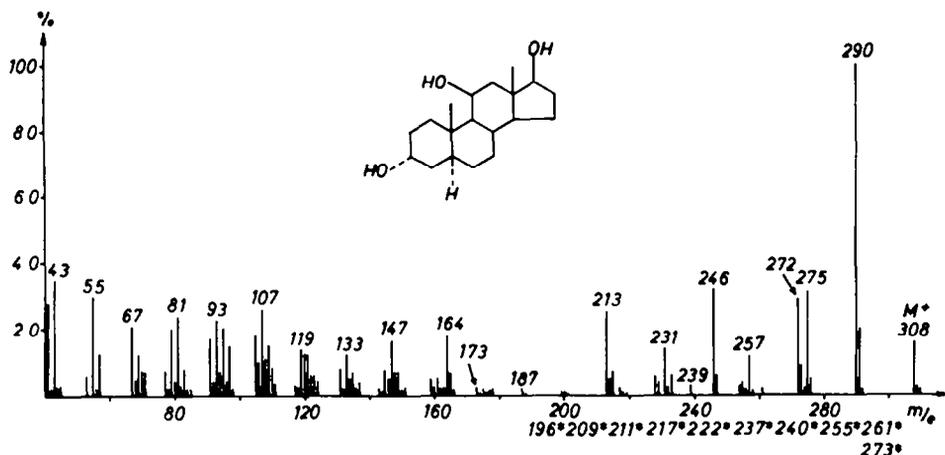


ABB 7. Massenspektrum des 3α , 11β , 17β -Trihydroxy- 5α -androstans (8)

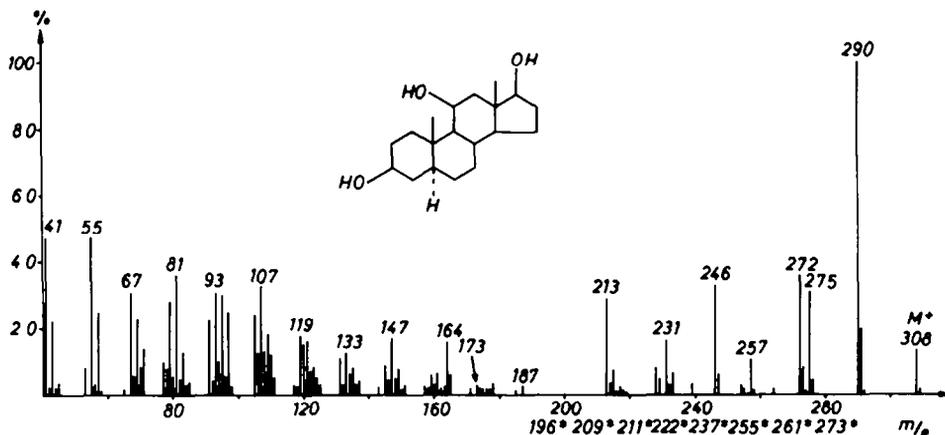


ABB 8. Massenspektrum des 3β , 11β , 17β -Trihydroxy- 5α -androstans (9)

EXPERIMENTELLER TEIL

1. *Aufnahme der Massenspektren.* Die Massenspektren wurden mit einem Varian—MAT CH 4 Massenspektrometer, versehen mit einer EB 4 Ionenquelle durch direkte Einführung der Probe in die Ionenquelle aufgenommen. Die Elektronenenergie betrug 70 eV, die Ionenquellentemperatur wurde zwischen 100 und 110° gehalten. Die Verdampfungstemperatur der Proben betrug 90 und 100°. Die exakten Bruttoformeln wurden durch peak-matching auf einem SM-1 B Massenspektrometer der Firma Varian MAT bestimmt.

Für die Ausführung der Messungen sind wir Dr. G. Remberg zu grossem Dank verpflichtet.

2. *Ausgangsmaterialien.* Proben von 1 und 8 verdanken wir der Firma Ikapharm, Ramat-Gan, Israel.⁹

Verbindungen 3, 5, 10 6 und 9 wurden aus den entsprechenden 17-Ketoverbindungen, die wir ebenfalls der Firma Ikapharm, Ramat-Gan, Israel,⁹ verdanken, durch Reduktion mit NaBH₄ in Methanol¹¹ dargestellt. Die Reaktionsprodukte wurden dünnstschichtchromatographisch (Kieselgel H von Merck; Laufmittel CHCl₃:CH₃OH 19:1; Anfärbung mit Anisaldehyd Schwefelsäure¹²) auf Einheitlichkeit geprüft und

danach zur Befreiung von Verunreinigungen (Phthalester) gas chromatographisch gereinigt (Varian-Aerograph 1520, ausgestattet mit Flammenionisationsdetektor und Ganzglassystem): Die Proben wurden direkt auf die Säule gespritzt (Chromosorb WAW-DMCS; stationäre Phase: 3% OV 17; Säulentemperatur 250°, Einspritzblocktemperatur 260°, Detektorblocktemperatur 260°. Trägergas N₂ 40 ccm/Min).

Zur Darstellung von 2 und von 4¹³ wurde wie folgt verfahren: 2 g 11 α ,17 α ,21-Trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion¹⁴ wurden mit NaBiO₃ zum 11 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion oxydiert¹⁵ (Reinigung durch Umkristallisieren aus Aceton) und dieses dann zu einem Gemisch von 11 α -Hydroxy-5 α -androst-3,17-dion und 11 α -Hydroxy-5 β -androst-3,17-dion durch Reduktion mit Pd/H₂ auf CaCO₃ in Methanol unter Normaldruck umgesetzt.¹⁶ Das erhaltene Isomergemisch (700 mg) wurde an einer Kieselgelsäule (200 g, Merck, 30–100 mesh) chromatographiert (Äther, dann Äther mit 1–10% Methanol). Zuerst wurde reines 11 α -Hydroxy-5 β -androst-3,17-dion (300 mg, aus Äther umkrist. Smp. 143°¹⁷) eluiert. Das nachfolgende 11 α -Hydroxy-5 α -androst-3,17-dion konnte nicht frei von dem 5 β -Isomeren erhalten werden. Die Reinigung gelang durch präparative Dünnschichtchromatographie (2 mm Beschichtung mit Kieselgel HR Merck, Stufentechnik, zuerst Äther, dann Äther + 5% Methanol). Das langsamer laufende 5 α -Isomere (100 mg, gelber Farbfleck bei Behandlung mit Anisaldehyd/H₂SO₄ im Unterschied zum 5 β -Isomeren, das einen orangen Farbfleck zeigt) wurde abgekratzt und aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Je 20 mg 11 α -Hydroxy-5 α -androst-3,17-dion¹⁸ (Smp. 187–188°) und des 5 β -H Isomeren wurden mit NaBH₄ in Methanol zu Gemischen von 3 und 4 bzw. 1 und 2 reduziert.¹¹ Die Isomeren mit entgegengesetzter Konfiguration des H an C-5 und der Hydroxylgruppe in Stellung 3—(1) und (4) entstehenden grösserer Ausbeute (70%) (also 5 α H und 3 β OH bzw. 5 β H und 3 α OH). Die Isomeren wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie auf 1 mm dicken mit Kieselgel HR Merck beschichteten Platten (Laufmittel, Äther + 10% Methanol) getrennt. Die Isomeren mit der gleichen Konfiguration des H an C—5 und der Hydroxylgruppe an C-3 (2) und (3) zeigten grössere Wanderungsgeschwindigkeit. Danach wurden die Verbindungen einer wie angegebenen gaschromatographischen Reinigung unterzogen.

Danksagung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Schering AG, Berlin danken wir für die Unterstützung der Arbeit durch Sachbeihilfen.

LITERATUR

- ¹ H. Obermann und G. Spiteller, *Chem. Ber.* **103**, 1497 (1970)
- ² K. Kaiser, H. Obermann, G. Remberg, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Monatsh.* **101**, 240 (1970)
- ³ M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *J. Org. Mass Spectrom.* **1**, 231 (1968)
- ⁴ H. Egger und G. Spiteller, *Monatsh.* **97**, 579 (1966)
- ⁵ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1101 (1971)
- ⁶ H. -W. Fehlhaber, D. Lenoir und P. Welzel, Vorabdruck eines Vortrages der im Sommer 1970 auf der Internationalen Massenspektrometrietagung in Brüssel gehalten wurde
- ⁷ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, unveröffentlicht
- ⁸ J. Karliner, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **31**, 710 (1966)
- ⁹ Für die Proben sind wir Herrn Direktor Hornik von der Ikapharm., Ramat-Gan, Israel, zu grossem Dank verpflichtet
- ¹⁰ H. L. Herzog, M. A. Jevnik und E. B. Hershberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 269 (1953)
- ¹¹ J. I. Appleby, J. K. Norymberski, *Biochem. J.* **60**, 460 (1955)
- ¹² K. Randerath, *Dünnschichtchromatographie* S. 109. Verlag Chemie, Weinheim (1962)
- ¹³ K. Heusler, H. Heusser und R. Antiker, *Helv. Chim. Acta* **36**, 652 (1953)
- ¹⁴ Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Wiechert von der Schering Ag., Berlin danken wir für die Überlassung dieser Verbindung
- ¹⁵ C. J. W. Brooks und J. K. Norymberski, *Biochem. J.* **55**, 371 (1953)
- ¹⁶ O. Mancera, H. J. Ringold, C. Djerassi, G. Rosenkranz und F. Sondheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1286 (1953)
- ¹⁷ H. L. Herzog, E. P. Oliveto, M. A. Jevnik und E. B. Hershberg, *Ibid.* **74**, 4470 (1952)
- ¹⁸ Für eine Vergleichsprobe danken wir der Ciba AG., Basel