

ZUR LOKALISIERUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN IN STEROIDEN MIT HILFE DER MASSENSPEKTROMETRIE—IV¹

17 β -HYDROXY-ANDROSTAN-3,11-DIONE, 11-HYDROXY-ANDROSTAN-
3,17-DIONE UND 3-HYDROXY-ANDROSTAN-11,17-DIONE

H. OBERMANN, M. SPITELLER-FRIEDMANN und G. SPITELLER

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 10 December 1970; Received in the UK for publication 11 January 1971)

Zusammenfassung—11-Hydroxy-androstan-3,17-dione neigen nur bei α -Konfiguration der Hydroxylgruppe zur Bildung strukturspezifischer Fragmente.

Dominierenden Einfluss auf Spaltreaktionen hat dagegen eine Carbonylgruppe in Stellung 11: Die Spektren der 17 β -Hydroxy-androstan-3,11-dione und 3-Hydroxy-androstan-11,17-dione sind durch sehr charakteristische Schlüsselbruchstücke der Masse 180 und 193, bzw. 178 und 191, die das C/D-Ringsystem enthalten, gekennzeichnet.

Abstract—11-hydroxy-androstan-3,17-diones produce structure specific fragments only if the hydroxy-group has α -configuration.

Dominant influence on the fragmentation is exerted by a ketogroup in position 11: The mass spectra of 17 β -hydroxy-androstan-3,11-diones and of 3-hydroxy-androstan-11,17-diones are characterised by key-fragments of mass 180 and 193, respectively 178 and 191, which contain the C/D ring-system.

EINLEITUNG

IN DER vorhergehenden Mitteilung wurden die Massenspektren von 17-Ketosteroiden diskutiert, die in den Stellungen 3 und 11 mit Hydroxylgruppen substituiert waren,¹ in dieser Mitteilung soll gezeigt werden, wie sich die Spektren ändern, wenn in den dort diskutierten Verbindungen eine der beiden Hydroxylgruppen durch eine Carbonylgruppe ersetzt wird.

A. Androsterivate mit Carbonylgruppen in den Stellungen 3 und 17 sowie einer Hydroxylgruppe in der Stellung 11

Der Ersatz einer 3-ständigen Hydroxylgruppe eines 3,11-Dihydroxy-androstan-17-ons¹ durch eine Ketogruppe hat nahezu keinen Einfluss auf die Bruchstückbildung: Bei Vorhandensein einer α -konfigurierten Hydroxylgruppe in der Stellung 11 laufen ganz analoge Hauptspaltreaktionen wie in den entsprechenden Dihydroxysteroiden ab.

Gemeinsam ist allen Isomeren dieser Gruppe die Neigung zur Wasserabspaltung, gefolgt von der Eliminierung eines Methylradikals unter Bildung eines Bruchstückes der Masse 271. Ein weiterer Zerfallsweg des M-18-Ions ist die Eliminierung der C-Atome 15 bis 17 zu einem Fragment der Masse 229 (C₁₆H₂₁O). Dieses Ion könnte

auch dreistufig, nämlich durch Abspaltung von Wasser, C_2H_2O und einer Methylgruppe, gebildet werden.

Für das 11α -Hydroxy- 5β -androstan-3,17-dion (1) ist die hohe Intensität des M-18-Ions und des Schlüsselbruchstückes der Masse 122 typisch (Abb. 1).

Die starke Neigung zur Wasserabspaltung wird in den anderen Isomeren nicht beobachtet. Sie ist jedoch ebenfalls sehr charakteristisch für das $3\alpha,11\alpha$ -Dihydroxy- 5β -androstan-17-on,¹ so dass offensichtlich für den leichten Ablauf der Reaktion sowohl die Konfiguration der Hydroxylgruppe in Stellung 11 als auch die *cis*-Verknüpfung der Ringe A und B von Bedeutung ist.

Das Vorhandensein dieser Gruppierung bewirkt ausserdem die Bildung des Schlüsselbruchstückes der Masse 122, das die C-Atome des A-Ringes sowie C-6 und C-19 umfasst.²

Die Gegenwart des Strukturelementes (2), ist ferner aus einem Ion der Masse 261 ableitbar: Es entspricht der Abspaltung von $CH_3CO\cdot$ aus dem Ring A.³ Solche Fragmente wurden auch in den Massenspektren einfacher 3-Ketosteroide mit *cis*-verknüpftem A/B-Ringsystem beobachtet.³



Durch Abspaltung eines C_4H_6O -Teilchens aus dem Wassereliminierungsprodukt wird das Ion der Masse 216 gebildet. Diese Abspaltung der C-Atome 1–4 ist ebenfalls eine typische Abbaureaktion für Steroide, die das Strukturelement (2) enthalten.⁴

Das 11α -Hydroxy- 5α -androstan-3,17-dion (3) zeichnet sich gegenüber den anderen Isomeren durch seine Fähigkeit zur Bildung eines M-29-Fragmentes von grösserer Intensität aus. Es zeigt die Gegenwart des Strukturelementes (4) an¹ (Abb. 2). Charakteristisch und daher ebenfalls zur Unterscheidung von den Spektren der sehr ähnlichen 11β -Hydroxy-Isomeren geeignet ist das Auftreten eines Ions der Masse 258, das dem Verlust von CO aus dem Wasserabspaltungsfragment der Masse 286 entspricht.

Eine geringe Tendenz zur Bildung von Bruchstücken höherer Intensität ist für das 11β -Hydroxy- 5β -androstan-3,17-dion (5) und das 11β -Hydroxy- 5α -androstan-3,17-dion (6) ein typisches Merkmal (Abb. 3 und Abb. 4).

Das Vorhandensein des Strukturelements (2) in (5) ermöglicht die Bildung eines M-43-Ions der Masse 261, das in diesem Fall aber wegen der relativ starken Intensität des Ions der Masse 260 (der Eliminierung der C-Atome 16 und 17, einer häufig bei 17-Ketosteroiden beobachteten Abbaureaktion^{1,3} entsprechend) weniger zur Geltung kommt. Charakteristisch für die Verbindung ist auch das mehrfache Auftreten der Schlüsseldifferenz von 70 ME, eine Eigenschaft, die ebenfalls auf das Vorhandensein des Strukturelementes (2) hinweist: So wird in gleicher Weise wie aus 1 ein Ion der Masse 216 gebildet. Überdies ist die Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 auch aus dem Ion der Masse 242, das seinerseits durch Wasserabspaltung aus dem Fragment der Masse 260 gebildet wird, zum Ion der Masse 172 möglich.

Das 11 β -Hydroxy-5 α -androstan-3,17-dion (6) lässt sich von 5 nicht nur durch das Fehlen der Ionen der Masse 172, 216 und M-43 unterscheiden: Die gleichzeitige Anwesenheit einer Hydroxylgruppe in Stellung 11 und einer Carbonylgruppe in Stellung 17 eines *trans*-verknüpften A/B-Ringsystems bedingt offensichtlich die Entstehung des Ions der Masse 244, C₁₇H₂₄O, das sich vom Wasserabspaltungsprodukt durch Eliminierung von Keten ableitet. Ein derartiges Fragment entsteht auch aus 4, allerdings in verminderter Intensität, weil in diesem Fall als Konkurrenzreaktion die Abspaltung von CHO \cdot dominiert. Bei *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems tritt diese Reaktion praktisch nicht ein.

Typisch ist ferner die Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 des Ringes A aus dem Wasserabspaltungsprodukt als 71 ME schweres Teilchen, unter Bildung eines Ions der Masse 215, eine Reaktion, die auch beim Abbau von 4 auftritt, während—wie oben dargelegt—bei 1 und 5 die Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 als 70 ME schweres Teilchen überwiegt.

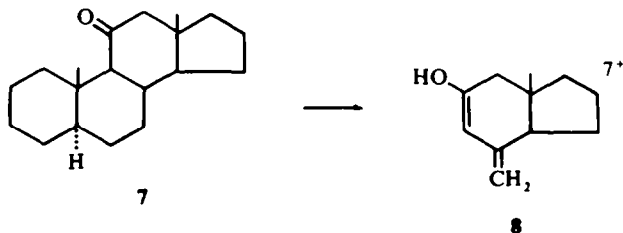
Obwohl die erwähnten Ionen in den einzelnen Isomeren nur mittlere Intensität erreichen, erlauben sie dennoch bei einer genauen Analyse des Spektrums eine eindeutige Identifizierung.

B. 17 β -Hydroxy-androsterivate mit Carbonylgruppen in den Stellungen 3 und 11

Der Ersatz einer 11-ständigen Hydroxylgruppe durch eine Ketogruppe bewirkt eine erhebliche Verstärkung der Neigung zur Bildung von Schlüsselbruchstücken.

Während man vielfach die Beobachtung macht, dass massenspektrometrische Abbaureaktionen, die bei sonst unsubstituierten Monoketo-androstanen zur Bildung intensiver Spaltstücke führen, nicht oder kaum ablaufen, wenn noch zusätzliche funktionelle Gruppen zugegen sind, lassen sich die durch eingehende Studien an deuterierten Derivaten des 5 α -Androstan-11-ons (7) erhaltenen Befunde über die Bildung von Schlüsselbruchstücken^{5,6} auch auf komplexere Verbindungen übertragen. Offensichtlich übt also eine 11-ständige Carbonylgruppe—ähnlich wie eine in Stellung 7⁷—dominierenden Einfluss auf die Bruchstückbildung aus. Damit ist ein Weg gewiesen, aus wenig strukturspezifischen Spektren von Steroiden mit Hydroxylgruppen in der Stellung 11—durch CrO₃-Oxydation—wesentlich aussagekräftigere Spektren zu erhalten.⁴

Aus 5 α -Androstan-11on (7) wird vorwiegend ein Bruchstück der Masse 164 gebildet, das die C-Atome des C/D-Ringsystems sowie C-7 umfasst.^{5,6} Ihm wird die Struktur (8) zugeschrieben:^{5,6}

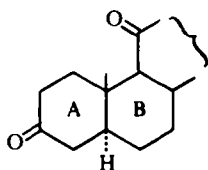


Weitere intensitätsschwächere Schlüsselbruchstücke haben die Masse 177. Diesen Ionen kommt nach den Ergebnissen der Untersuchung deuterierter Derivate

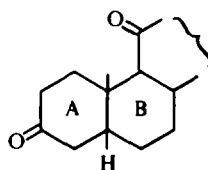
keine einheitliche Struktur zu: Ein Teil von ihnen enthält das A/B-Ringsystem und C-11, der andere das C/D-Ringsystem sowie C-6 und C-7.^{5,6}

Demzufolge zeigt das Massenspektrum des 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3,11-dions (9), Abb. 5, Schlüsselbruchstücke der Masse 180 [dem Ion (8) entsprechend, Ersatz der 17-ständigen CH₂-Gruppe durch CH(OH)], 191 [den Ionen der Masse 177 im Spektrum von (7) entsprechend, die das A/B-Ringsystem und C-11 enthalten] und 193 [den Ionen der Masse 177 im Spektrum von 7 entsprechend, die das C/D-Ringsystem sowie C-6 und C-7 enthalten]. Das Vorhandensein der Gruppierung (10) wird überdies durch Ionen der Masse 124 deutlich, die den Ring A C-6 und C-19 umfassen. Solche Ionen sind für Steroide, die in 3 und 11 eine Ketogruppe tragen und ein *trans*-verknüpftes A/B-Ringsystem besitzen, typisch.⁴

Das Spektrum des 17 β -Hydroxy-5 β -androstan-3,11-dions (11), Abb. 6, unterscheidet sich in charakteristischer Weise von seinem 5 α -Isomeren: Wohl zeigt es ebenfalls die Schlüsselbruchstücke der Masse 180 und 193, es fehlt aber das Schlüsselfragment der Masse 191: *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems verhindert nämlich—wie auch weiter unten gezeigt wird—die Bildung von Ionen der Masse 191, die das A/B-Ringsystem und C-11 enthalten. Typisch für das Strukturelement (12) ist ferner das Auftreten eines Schlüsselbruchstückes der Masse 122² sowie die viel stärkere Neigung zur Eliminierung der C-Atome 1 bis 4 als C₄H₆O unter Bildung eines Ions der Masse 234. Bemerkenswert ist überdies gegenüber (9) das Fehlen eines Fragmentes, das der Abspaltung von CO aus dem Molekülion entspricht, und die höhere Tendenz zur Eliminierung eines Methylradikals.



10



12

C. 3-Hydroxy-androsterivate mit Carbonylgruppen in den Stellungen 11 und 17

Das Spektrum des 3 β -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dions wurde bereits früher publiziert,⁸ die Zerfallswege aber bisher nicht diskutiert.

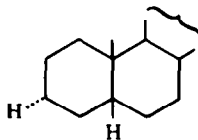
Alle Isomere dieses Verbindungstyps zeigen erwartungsgemäss Schlüsselbruchstücke der Masse 178 [dem Fragment 8 entsprechend, Ersatz der CH₂-Gruppe in Stellung 17 durch eine C=O-Gruppe] und 191 [den Ionen der Masse 177 im Spektrum von 7 entsprechend, die das C/D-Ringsystem sowie C-6 und C-7 enthalten]. Die Anwesenheit der Carbonylgruppe in Stellung 17 erlaubt weitere Zerfallsreaktionen dieser Bruchstücke unter Eliminierung von CO, so dass zusätzliche Schlüsselionen der Masse 150 (178–28) und 163 (191–28) auftreten.

Die Spektren des 3 α -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dions (13) und des 3 β -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dions (14), Abb. 7 und Abb. 8, sind überdies durch Schlüsselfragmente der Masse 193 gekennzeichnet; sie entsprechen—wie im Falle der Verbindung (9) diskutiert—Ionen, die das A/B-Ringsystem sowie C-11 enthalten. [Das Fehlen dieser Bruchstücke in den Spektren der 5 β -Isomeren, des 3 α -Hydroxy-5 β -

androstan-11,17-dions (**15**) und des 3β -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dions (**16**), Abb. 9 und Abb. 10, ermöglicht in einfacher Weise die Bestimmung der Verknüpfung des A/B-Ringsystems. **13** und **14** zeichnen sich überdies gegenüber **15** und **16** durch eine höhere Neigung zur Bildung eines Ions der Masse 147 (das die C-Atome des A/B-Ringsystems umfasst)^{1,9} aus, während in **15** und **16** die Bildung der Schlüsselfragmente der Masse 191, 178, 163 und 150 vorherrscht.

Die Hydroxylgruppen im A-Ring von **13** und **14** nehmen kaum Einfluss auf die Bruchstückbildung. Demzufolge bereitet auch die Unterscheidung von **13** und **14** erhebliche Schwierigkeiten und basiert nur auf geringfügigen Intensitätsunterschieden (z.B. Vergleich der Ionen der Masse 191 und 193 sowie 147 und 150).

Die Unterscheidung von **15** und **16** gelingt wesentlich leichter: Wie bereits früher erwähnt,¹ induziert das Vorliegen des Strukturelementes **17** nach erfolgter Wasserabspaltung die Eliminierung der C-Atome 1 bis 4 als Butadien. Dieser Prozess, der in entsprechenden 3,11,17-Trihydroxy-steroiden nur wenig Bedeutung hat,⁹ wird zu einer dominierenden Spaltreaktion, wenn wie in **15** eine Ketogruppe in der Stellung **11** vorhanden ist. Das Ion der Masse 232 ist daher von ausserordentlicher Intensität, während es im Spektrum des 3β -OH-Isomeren (**16**) kaum erkennbar ist.



17

EXPERIMENTELLER TEIL

1 Aufnahme der Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian-MAT-CH4-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 60–70°.

Bruttoformeln wurden durch "peak matching" auf einem SM-1-B-Massenspektrometer der Firma Varian bestimmt. Für die Ausführung dieser Messungen sind wir Dr. G. Remberg zu grossem Dank verpflichtet.

2 Ausgangsmaterialien

Ein grosser Teil der untersuchten Verbindungen wurde uns von anderen Instituten oder Firmen zur Verfügung gestellt.

So haben wir Prof. T. F. Gallagher (Montefiore Hospital and Medical Center, Bronx, New York) für Proben von 3β -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dion (**16**) und 11β -Hydroxy-5 β -androstan-3,17-dion (**5**) zu danken. Der Firma Ikapharm (Ramat-Gan, Israel) verdanken wir Proben von 3β -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dion (**14**) und 3α -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dion (**15**). Von der Schering AG (Berlin) erhielten wir eine Probe von 11β -Hydroxy-5 α -androstan-3,17-dion (**6**) und von der Ciba AG (Basel) 11α -Hydroxy-5 α -androstan-3,17-dion (**4**) und 3α -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dion (**13**).

Die Reinheit sämtlicher Proben wurde vor Aufnahme der Spektren durch Dünnschicht- und Gaschromatographie überprüft.

Die Gaschromatogramme wurden mit einem Varian Aerograph 1520, der mit einem Flammenionisationsdetektor und einem Ganzglassystem ausgestattet ist, ausgeführt. Die Proben wurden direkt auf die Säule gespritzt (Säulenlänge 165 cm, ϕ 3 mm, Chromosorb W-AW-DMCS 80-100 mesh, stationäre

Phase: 3% OV 17, Säulentemperatur 240–250°, Einspritzblock- und Detektortemperatur 260°, Trägergas N_2 40 ml/Min.)

Für die Dünnschichtchromatographie wurde für analytische Platten (Schichtdicke 0,25 mm) Kieselgel H Merck und für präparative Platten (Schichtdicke 1 mm) Kieselgel HR Merck verwendet. Als Laufmittel dienten: 1. $CHCl_3$ -MeOH 19:1; 2. Diäthyläther p.a.; 3. Cyclohexan-Diäthyläther 3:2; 4. Diäthyläther-MeOH 19:1.

Die Darstellung von 11 α -Hydroxy-5 β -androstan-3,17-dion (I) wurde in einer früheren Mitteilung beschrieben.⁹

Darstellung von 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3,11-dion (9) Von 20 mg 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on¹⁰ wurde nach Zaffaroni¹¹ das 17 β -Acetoxy-5 α -androstan-11 β -ol-3-on dargestellt. Anschließend wurde die 11 β -OH-Gruppe mit CrO_3 in Eisessig oxydiert¹¹ und das Acetat verseift.¹² (Kristalle aus Diäthyläther Schmp. 178–179°) Überprüfung auf Einheitlichkeit mit Dünnschichtchromatographie (Laufmittel 1, 2 u. 4).

*Darstellung von 17 β -Hydroxy-5 β -androstan-3,11-dion (11)*¹³ 150 mg 5 β -Androstan-3,11-17-trion¹⁴ wurden mit Äthylenglycol und *p*-Toluolsulfonsäure-Hydrat in benzolischer Lösung 1 h Rückfluss erhitzt. Es wurden 70 mg 3,3-Äthylendioxy-Derivat erhalten, die ohne weitere Reinigung mit 10 mg $NaBH_4$ in MeOH bei Raumtemp. (10 Min) zum 3,3-Äthylendioxy-5 β -androstan-17 β -ol-11-on reduziert wurden. Die Vollständigkeit der Reduktion wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (Laufmittel 1). Mit einigen Tropfen 32%iger HCl wurde die Äthylendioxy-Gruppe bei 40° (30 Min) abhydrolysiert. Die mit Wasser verdünnte Lösung wurde mit Äther extrahiert, die neutral gewaschenen Ätherextrakte lieferten einen öligen Eindampfrückstand. Dieser zeigte im Gaschromatogramm eine schwerer flüchtige Beimengung an, die durch präparative Dünnschichtchromatographie abgetrennt wurde (Laufmittel 2, anschließend 1). Schmp. 176–177° (Äther/Pentan) (Lit. Schmp.¹³ 165–165,5), Ausbeute 25 mg.

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

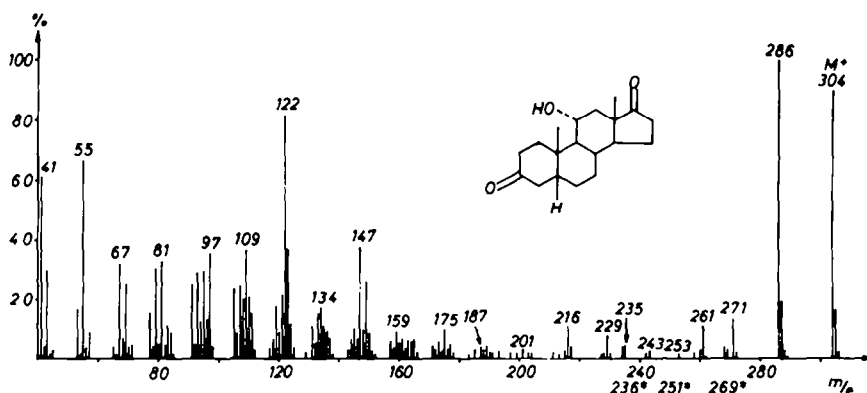


ABB 1. Massenspektrum des 11 α -Hydroxy-5 β -androstan-3,17-dions (I)

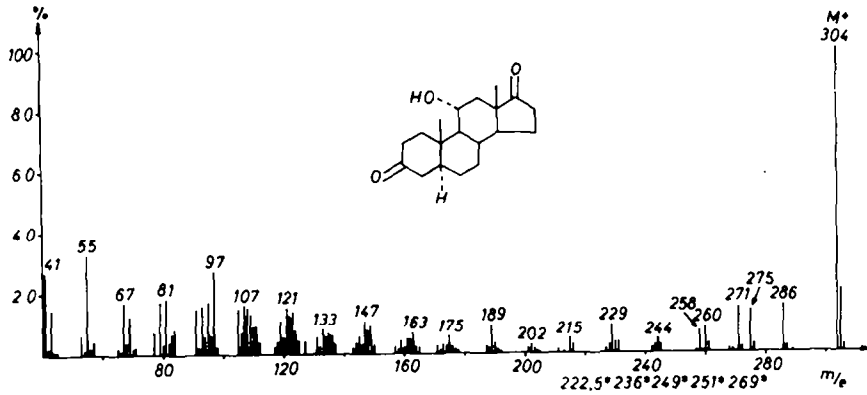


ABB 2. Massenspektrum des 11 α -Hydroxy-5 α -androstan-3,17-dions (3)

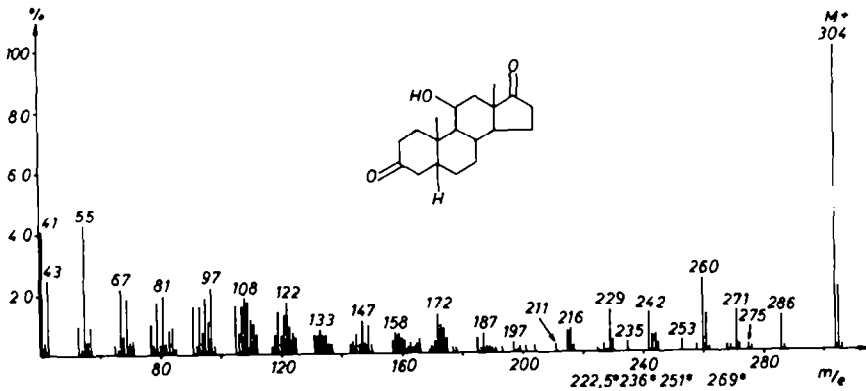


ABB 3. Massenspektrum des 11 β -Hydroxy-5 β -androstan-3,17-dions (5)

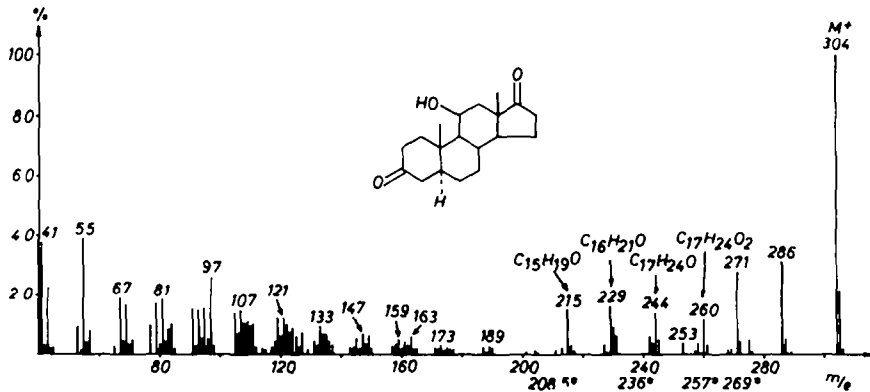


ABB 4. Massenspektrum des 11 β -Hydroxy-5 α -androstan-3,17-dions (6)

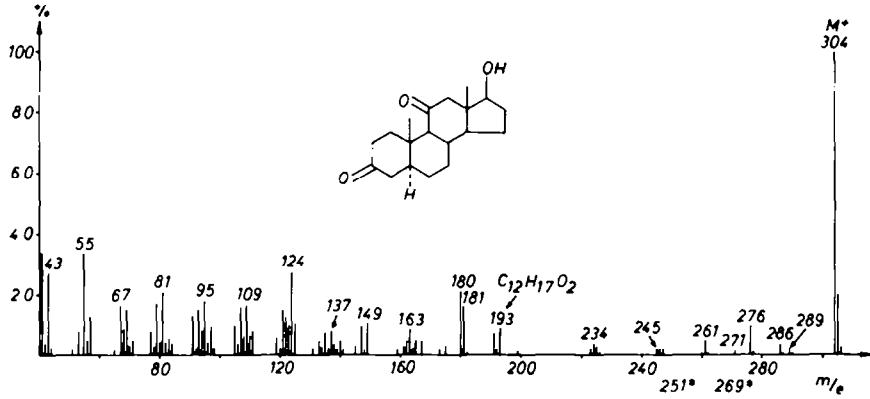


ABB 5. Massenspektrum des 17β-Hydroxy-5α-androstan-3,11-dions (9)

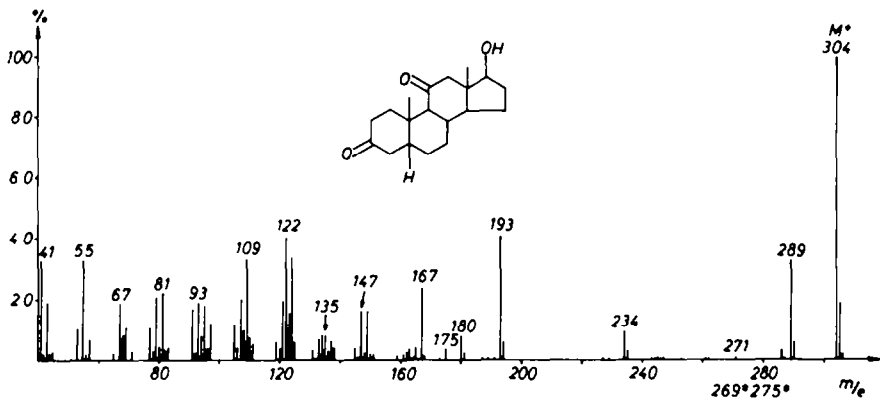


ABB 6. Massenspektrum des 17β-Hydroxy-5β-androstan-3,11-dions (11)

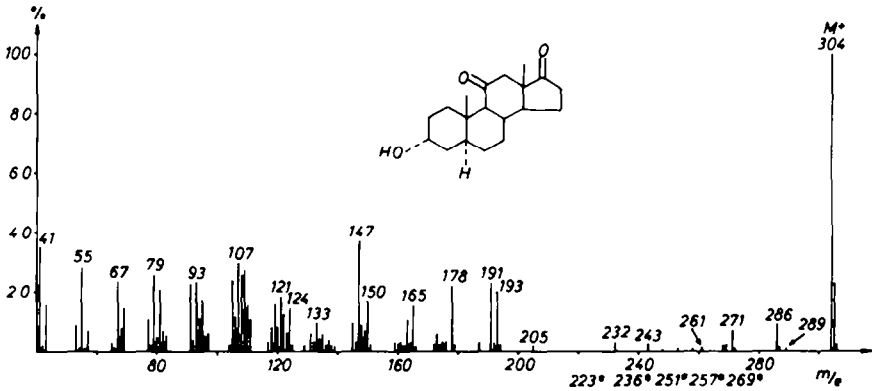


ABB 7. Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dions (13)

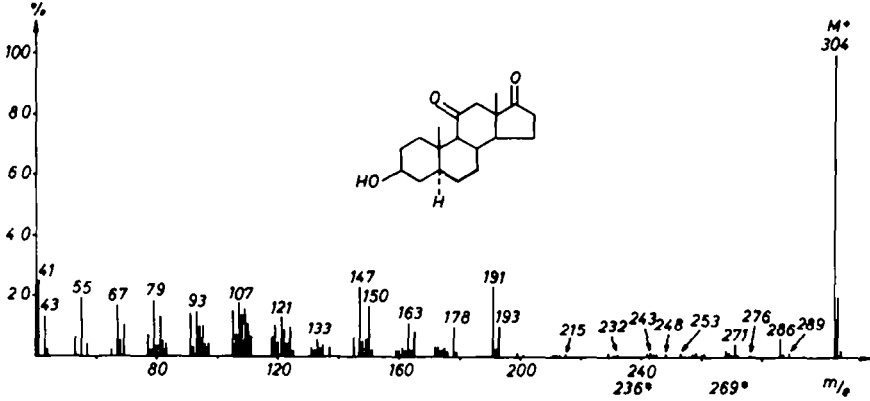


ABB 8. Massenspektrum des 3β-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dions (14)

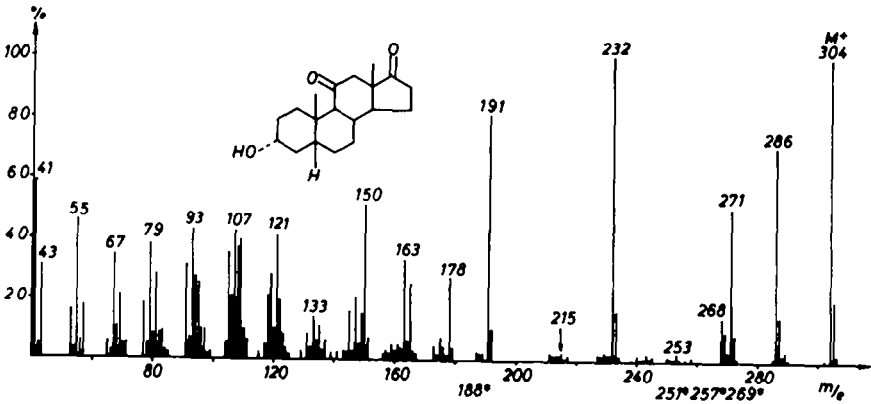


ABB 9. Massenspektrum des 3α-Hydroxy-5β-androstan-11,17-dions (15)

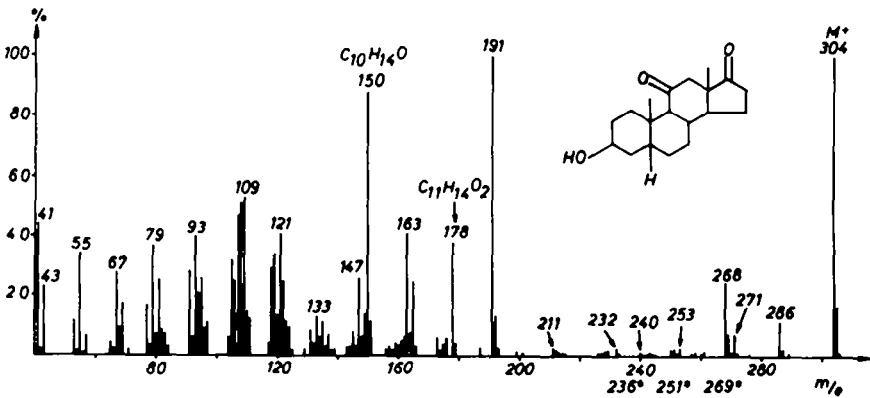


ABB 10. Massenspektrum des 3β-Hydroxy-5β-androstan-11,17-dions (16)

LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1101 (1971)
- ² H.-W. Fehlhaber, D. Lenoir und P. Welzel, Vorabdruck eines Vortrages, der im September 1970 auf der Internationalen Tagung für Massenspektrometrie in Brüssel gehalten wurde.
- ³ M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *J. Org. Mass Spectrom* **1**, 231 (1968)
- ⁴ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **103**, 1497 (1970)
- ⁵ D. H. Williams, J. M. Wilson, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2091 (1963)
- ⁶ D. H. Williams und C. Djerassi, *Steroids* **3**, 259 (1964)
- ⁷ K. Kaiser, H. Obermann, G. Remberg, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Monath.* **101**, 240 (1970)
- ⁸ H. J. M. Fitches in *Advances in Mass Spectrometry*, R. M. Elliot ed, Pergamon Press, Oxford 1963, S. 443.
- ⁹ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1745 (1971)
- ¹⁰ Für die Überlassung der Probe danken wir der Schering AG (Berlin)
- ¹¹ A. Zaffaroni, R. B. Burton, *J. Biol. Chem.* **193**, 749 (1951)
- ¹² A. S. Meyer, *J. Biol. Chem.* **203**, 469 (1953)
- ¹³ H. L. Herzog, M. A. Jevnik, P. L. Perlman, A. Nobile und E. B. Hershberg, *J. Am. Soc.* **75**, 266 (1953)
- ¹⁴ Für die Überlassung der Probe danken wir der Firma Ikapharm, Ramat-Gan, Israel.