

ZUR LOKALISIERUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN IN STEROIDEN MIT HILFE DER MASSENSPEKTROMETRIE—V¹

3, 17 β -DIHYDROXY-ANDROSTAN-11-ONE UND 11, 17 β -DIHYDROXY-ANDROSTAN-3-ONE

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—Der dominierende Einfluss einer 11-ständigen Ketogruppe auf die Bruchstückbildung eines Steroides manifestiert sich auch bei Gegenwart von zusätzlichen Hydroxylgruppen in den Stellungen 3 und 17: Schlüsselbruchstücke der Masse 180 und 193, die das C/D-Ringsystem umfassen, sind für alle 3,17 β -Dihydroxy-androstan-11-one charakteristisch. Darüber hinaus lässt sich das Vorhandensein einer 3 α -ständigen Hydroxylgruppe bei gleichzeitiger Gegenwart einer Ketogruppe in der Stellung 11 und bei *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems an einem M-72-Ion hoher Intensität ableiten. Im entsprechenden 3 β -Isomeren tritt diese Spaltung nicht ein.

Für 5 β -Androsterivate mit einer Ketogruppe in der Stellung 3 und Hydroxylgruppen in den Stellungen 11 und 17 ist der bevorzugte Abbau des Ringes A typisch, während in den entsprechenden 5 α -Isomeren hauptsächlich Spaltungsreaktionen im D-Ring eintreten.

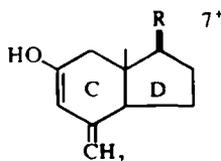
Abstract—The dominating role of a 11-keto-function for fragmentation reactions in the steroid skeleton is not changed by the presence of additional hydroxy-groups in position 3 and 17: Key fragments of mass 180 and 193, containing the C/D ringsystem are characteristic for all 3,17 β -hydroxy-androstan-11-ones. In addition the presence of a 3 α -hydroxy-group in a steroid containing a 11-ketofunction with a *cis* junction of the A/B ringsystem can be deduced by a fragment of high intensity at M-72. This degradation is not observed in the corresponding 3 β -isomeres.

Preferential degradation of ring A is typical for 5 β -androstane-derivatives with a ketogroup in position 3 and hydroxygroups in position 11 and 17, while cleavage reactions in the 5 α -isomers occur mainly by fission of bonds in the D-ringsystem.

A. 3,17 β -Dihydroxy-androstan-11-one

Gemeinsame Abbaureaktionen:

11-Ketosteroide erleiden bevorzugt Spaltung der Bindung zwischen C-6 und C-7 sowie C-9 und C-10¹⁻³ unter Ausbildung eines Fragmentes dem die Struktur (1) zugeschrieben wird.^{2,5} Bei Vorhandensein einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in der Stellung 17 wird dementsprechend ein Ion der Masse 180 gebildet.¹



(1): R = H *m/e* 164
R = OH *m/e* 180

Ein zweites Hauptspaltstück entsteht durch Bruch der Bindung zwischen C-5

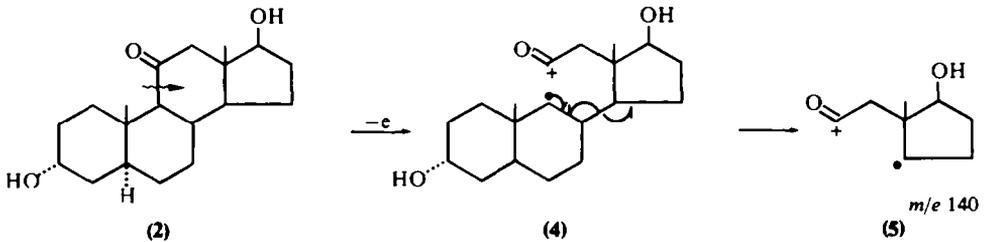
und C-6 sowie C-9 und C-10. In Steroiden mit einer zusätzlichen Hydroxylfunktion in der Stellung 17 kommt diesem Spaltstück die Masse 193 zu.

Die beiden erwähnten Schlüsselbruchstücke der Masse 180 und 193 können unter Eliminierung von CO bzw. CHO[•] zu Ionen der Masse 152, 151 und 165 weiter zerfallen. Die Bildung dieser sekundären Abbauprodukte ist besonders bei *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems begünstigt.

Ein weiteres Hauptspaltstück hat die Masse 147: Es enthält die Kohlenstoffatome des A/B-Ringsystems und entspricht der Summenformel C₁₁H₁₅⁺. Dieses Fragment gibt somit einen gewissen Hinweis, dass abgesehen von der Hydroxylgruppe bzw. einer Doppelbindung keine weiteren Substituenten im A/B-Ringsystem vorhanden sind.

Unterscheidung der Isomeren:

In den Spektren des 3 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstano-11-ons (2), Abb. 1, und des 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstano-11-ons (3), Abb. 2, treten neben den eben erwähnten Schlüsselbruchstücken Ionen der Masse 140—allerdings geringer Intensität—auf, die in den Spektren der 5 β -Isomeren fehlen. Diese Fragmente, denen die Bruttoformel C₈H₁₂O₂ zukommt, enthalten die C-Atome des Ringes D sowie C-11 und C-12² (2) \rightarrow (4) \rightarrow (5):



Die erwähnten Schlüsselbruchstücke ermöglichen zwar die Identifizierung der Verbindungen als 11-Ketosteroide mit einer Hydroxylgruppe in der Stellung 17 und zeigen an, dass im A/B-Ringsystem noch eine weitere Hydroxylgruppe vorhanden ist, geben aber keine Auskunft darüber, wo diese Hydroxylgruppe im A/B-Ringsystem zu lokalisieren ist.

Da die Hydroxylgruppe in der Position 3 nur wenig Einfluss auf die Bruchstückbildung nimmt, ist eine Unterscheidung der Isomeren (2) und (3) nur bei sorgfältiger Analyse der Spektren möglich: Das Ion der Masse 193 zeigt bei der Verbindung (3) eine geringe Neigung zur Wasserabspaltung unter Bildung eines Ions der Masse 175. Bei der Verbindung (2) wird dieser Prozess unterdrückt.

Die *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems führt zu einer noch stärkeren Bevorzugung der Bildung der Schlüsselbruchstücke der Masse 180 und 193 sowie der CO- bzw. CHO-Eliminierungsprodukte der Masse 152 und 151. Diese Ionen erreichen daher in den Spektren des 3 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstano-11-ons (6), Abb. 3, und des 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstano-11-ons (7), Abb. 4, sehr hohe Intensität. Schon dadurch und durch das Fehlen der Ionen der Masse 140 ist eine gewisse Unterscheidungsmöglichkeit von den Vertretern mit *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem gegeben.

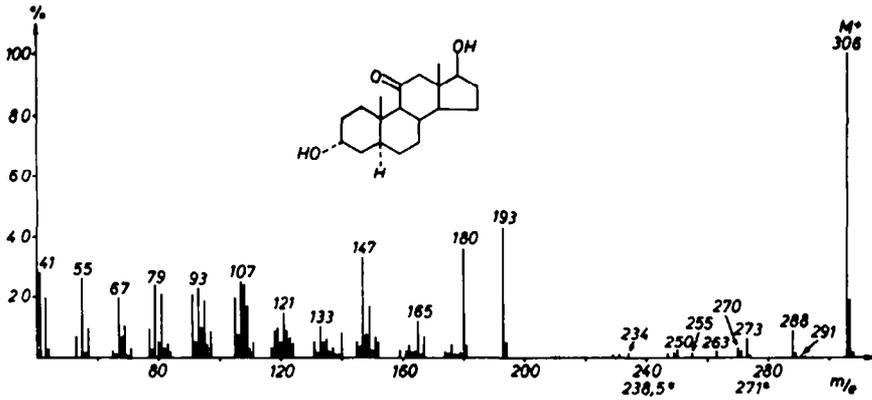


Abb 1. Massenspektrum des 3α, 17β-Dihydroxy-5α-androstan-11-ons (2)

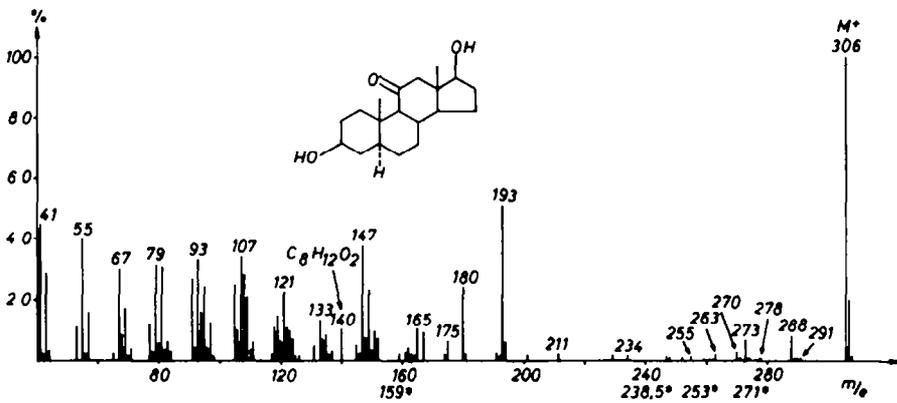


Abb 2. Massenspektrum des 3β, 17β-Dihydroxy-5α-androstan-11-ons (3)

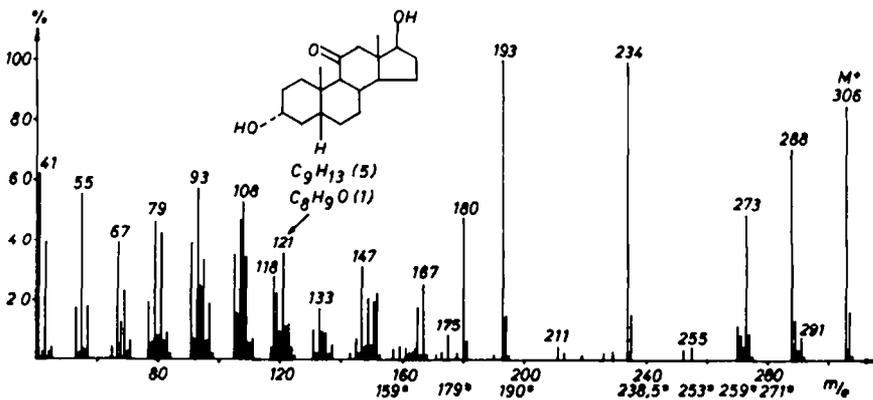


Abb 3. Massenspektrum des 3α, 17β-Dihydroxy-5β-androstan-11-ons (6)

Überdies zeichnen sich die Spektren von (6) und (7) gegenüber den 5 α -Isomeren 2 und 3 durch die Gegenwart von relativ intensiven Ionen der Masse 118 C₉H₁₀⁺ aus, deren Genese nicht bekannt ist (wahrscheinlich den Ring A und C-6 und C-7 enthaltend).

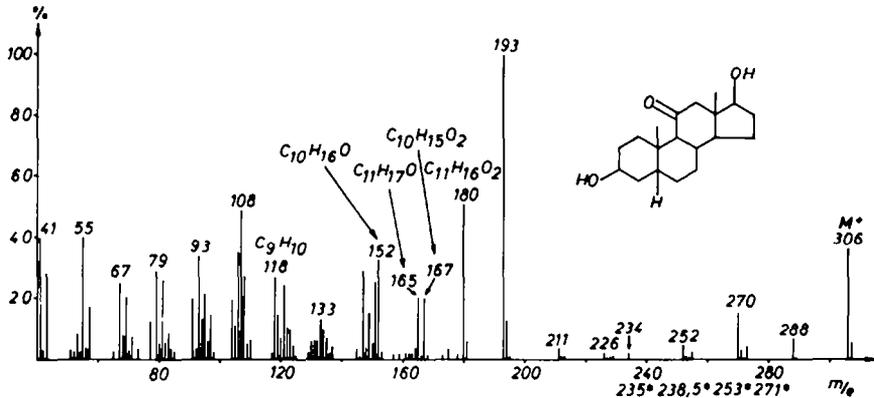
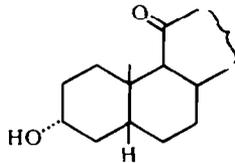


ABB 4. Massenspektrum des 3 β , 17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-11-ons (7)

Eine Unterscheidung von 6 und 7 gelingt leicht: 6 besitzt eine 3 α -konfigurierte Hydroxylgruppe in einem *cis*-verknüpften A/B-Ringsystem und gleichzeitig eine 11-Ketogruppe, somit also das Strukturelement 8. Für alle bisher untersuchten Steroide, die dieses Strukturelement enthalten,^{1,4} ist die Eliminierung von Wasser mit nachfolgender Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 als C₄H₆-Einheit unter Bildung eines M-72-Ions ein dominierender Abbauprozess. Bei Fehlen der Carbonylgruppe wird diese Spaltreaktion zwar auch beobachtet,⁵ ist jedoch nur von geringer Bedeutung, während umgekehrte Konfiguration an C-5 oder der Hydroxylgruppe an C-3 sie völlig unterdrückt.



(8)

B. 11,17 β -Dihydroxy-androstan-3-one

Gemeinsame Abbaureaktionen:

Alle 11,17 β -Dihydroxy-androstan-3-one zeigen eine starke Neigung zur Abspaltung von Wasser. Von dem so entstehenden Ion der Masse 288 nehmen zwei konkurrierende Folgereaktionen ihren Ausgang:

1. Durch nochmalige Wasserabspaltung entstehen Ionen der Masse 270, die ihrerseits wieder durch Abspaltung einer Methylgruppe weiter zerfallen.

2. Ein zweiter Abbauweg der Bruchstücke der Masse 288 verläuft unter Eliminierung der C-Atome 16 und 17 als C_2H_4O zu Ionen der Masse 244, die unter Bildung der Spaltstücke der Masse 229 ein Methylradikal verlieren.

Beachtenswert ist das Fehlen von Ionen, die Spaltungsreaktionen im C-Ringsystem entsprechen: Offensichtlich sind diese nur bei Anwesenheit einer Carbonylgruppe in der Position 11 begünstigt, bei Ersatz durch eine Hydroxylgruppe hingegen werden sie unterdrückt.^{5,6}

Unterscheidung der Isomeren:

Das Vorhandensein einer α -ständigen Hydroxylgruppe in der Position 11 bei gleichzeitiger *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems, also des Strukturelements (9), führt jedoch, wie erstmals Fehlhaber⁷ erkannte, zu einer anderen typischen

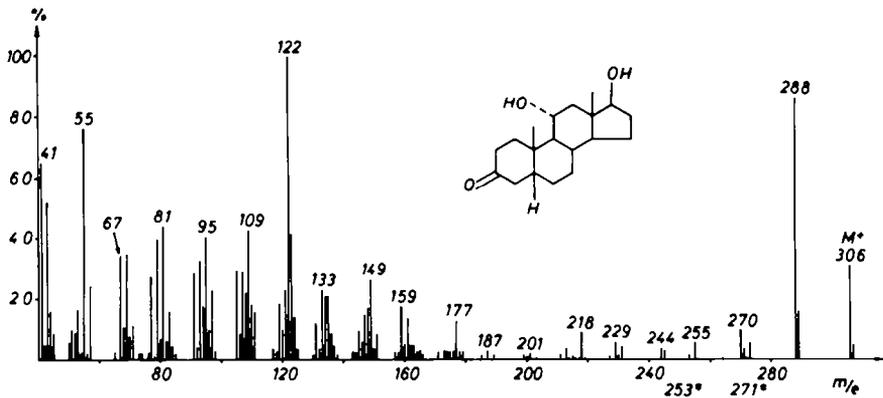


ABB 5. Massenspektrum des 11 α , 17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-ons (10)

Spaltreaktion: Unter Bruch der Bindung zwischen C-6 und C-7 sowie C-9 und C-10 entsteht ein die C-Atome des A-Ringes und C-6 und C-19 enthaltendes Schlüsselbruchstück der Masse 122. Diese Abbaureaktion ist der dominierende Zerfallsprozess des 11 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-ons (10), Abb 5.



Das Vorliegen des Strukturelements 11 ermöglicht ferner die Eliminierung der C-Atome 1 bis 4 aus dem Wasserabspaltungsprodukt der Masse 288 unter Bildung eines Schlüsselbruchstückes der Masse 218. Im Falle des 11 β -Isomeren, des 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-ons (12), Abb 6, ist dieser letzte, für 3-Ketosteroide mit *cis*-verknüpften A/B-Ringsystem typische Abbauprozess⁸ noch mehr begünstigt.

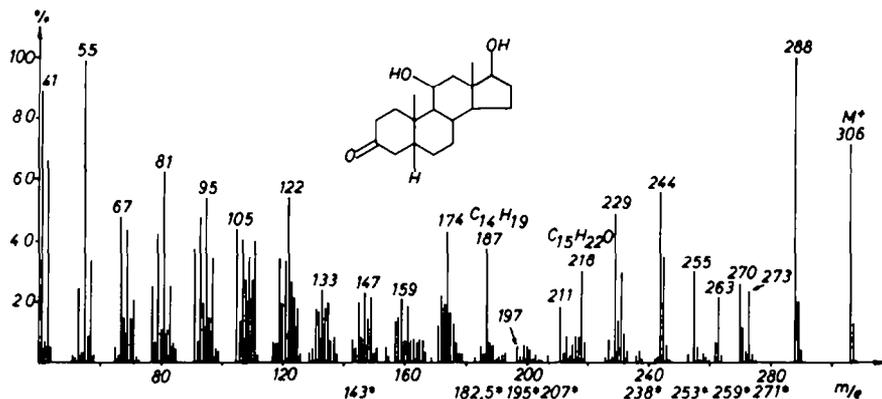


Abb 6. Massenspektrum des 11 β , 17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-ons (12)

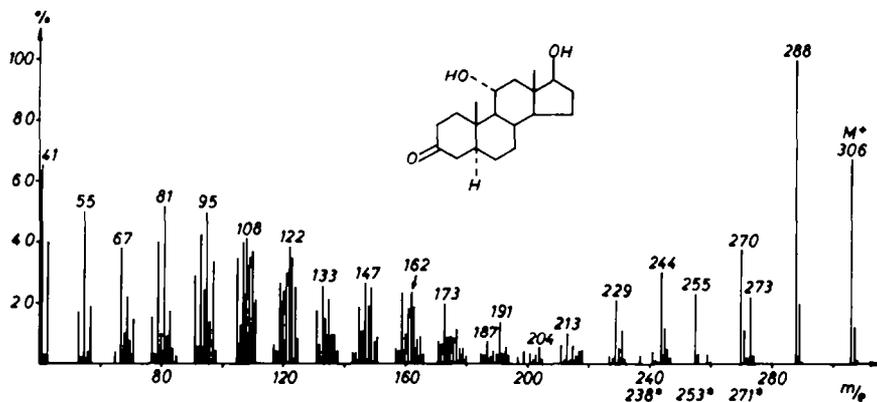


Abb 7. Massenspektrum des 11 α , 17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-ons (13)

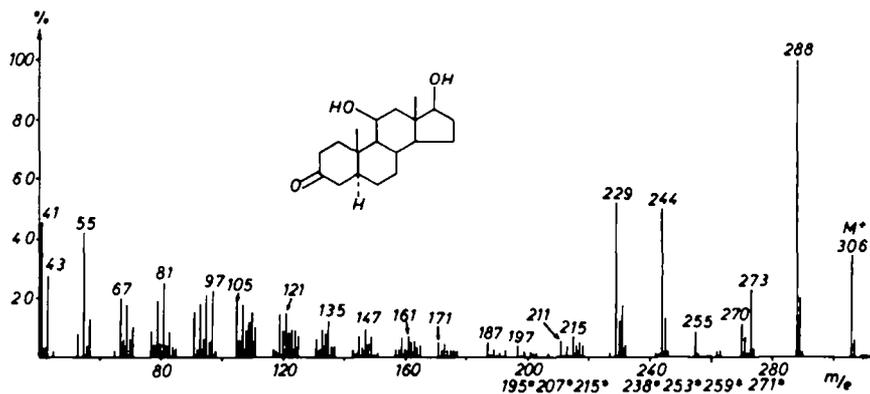


Abb 8. Massenspektrum des 11 β , 17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-ons (14)

Die gleiche Abbaureaktion des durch Zerfall des Ringes D gebildeten Ions der Masse 244 liefert das Schlüsselbruchstück der Masse 174, während das Spaltprodukt der Masse 229 diese Zerfallsreaktion offenbar nicht mehr eingeht.

Typisch für das Strukturelement 11 ist ferner das Auftreten eines M-43-Ions, das der Abspaltung von $\text{CH}_3\text{CO}\cdot$ aus dem Ring A entspricht.⁹ Im 11 α -Isomeren 10 ist diese Reaktion wegen der hohen Neigung zur Bildung des Schlüsselbruchstückes der Masse 122 völlig unterdrückt. Das Ion der Masse 122 wird zwar auch aus 12 gebildet, doch in viel geringerer Ausbeute als aus 10 erhalten.

Das Spektrum von 12 zeigt überdies ein charakteristisches Ion der Masse 187 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}^+$), das im Zuge eines Mehrstufenprozesses, der sowohl den Ring A als auch D betrifft, entsteht. In den Spektren der anderen Isomeren erreicht dieses Schlüsselbruchstück nur sehr geringe Intensität.

In den 5 α -Isomeren, dem 11 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (13), Abb 7, und dem 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (14), Abb 8, fehlt die Neigung zur Bildung strukturspezifischer Bruchstücke. Hauptfragmente werden vorzugsweise durch Abbaureaktionen des D-Ringes gebildet.

Die Unterscheidung der beiden Isomeren 13 und 14 gelingt nur durch Intensitätsvergleich: Die Tendenz für die sekundären Spaltreaktionen der Ionen der Masse 288 ist verschieden gross. So verläuft die Wasserabspaltung aus dem 11 α -Isomeren 13 eher als aus 14. Demzufolge zeigt die Spitze bei der Masse 270 und 255 im Spektrum von 13 höhere Intensität als im Spektrum von 14. Umgekehrt zerfällt bei dieser Verbindung 14 das primäre Wasserabspaltungsprodukt der Masse 288 eher unter Verlust von Teilen des D-Rings, so dass in diesem Fall die Ionen der Masse 244 und 229 erheblich höhere Intensität erreichen als im Spektrum des 11 α -Isomeren (13).

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

EXPERIMENTELLER TEIL

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 70–90°. 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.

Ausgangsmaterialien:

Eine Probe von 11 β , 17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on wurde uns von der Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt.

3 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-11-on (2), 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-11-on (3),¹⁰ 3 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-11-on (6)¹¹ und 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-11-on (7) (Schmp.: 241–45° (Zers.)) wurden durch Reduktion der entsprechenden 17-Keto-Verbindungen⁶ mit NaBH_4 in Methanol dargestellt.¹²

Die Reinheit sämtlicher Proben wurde vor Aufnahme der Spektren durch Dünnschicht- und Gaschromatographie überprüft.¹

11 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on (10) konnte als Nebenprodukt bei der Reduktion von 11 α -Hydroxy-5 β -androstan-3,17-dion⁵ isoliert werden.

Herstellung von 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on (12). 10 mg 11 β -Hydroxy-testosteron¹³ wurden in MeOH mit H₂ an 10%iger Pd/C bei Raumtemp. unter Normaldruck (1 h) hydriert.¹⁴ Es entstanden 70% 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on und 30% 11 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on, die gaschromatographisch getrennt wurden.

Darstellung von 11 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (13). 1 g 5 α -Androstan-3.11.17-trion¹⁵ wurde wie bei dem 5 β -Isomeren¹⁶ beschrieben mit Äthylenglycol umgesetzt. Das erhaltene farblose Öl (1.1 g) wurde zur Trennung in Cyclohexan-Äther 9:1 gelöst und an 100 g Kieselgel (0.02–0.5 mm) chromatographiert. Mit 200 ml Diäthyläther/Cyclohexan 1:9 als Elutionsmittel wurden 50 mg 3,3,17,17-Diäthylendioxy-5 α -androstan-11-on [Massenspektrum zeigt M⁺ 390, Schmp. 176–7° (MeOH)] erhalten.

Mit 11 Diäthyläther/Cyclohexan 1:9 bis 2:3 wurden in der Folge 300 mg 3,3-Äthylendioxy-5 α -androstan-11,17-dion mit einer geringen Verunreinigung von 17,17-Äthylendioxy-5 α -androstan-3,11-dion eluiert. Mit 11 Diäthyläther konnten 600 mg Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden. Das 3,3-Äthylendioxy-5 α -androstan-11,17-dion wurde ohne weitere Reinigung mit 50 mg NaBH₄ in MeOH 20 Min. bei Raumtemp. zum 3,3-Äthylendioxy-5 α -androstan-17 β -ol-11-on reduziert.¹²

Es wurden 300 mg farbloses Öl erhalten, das mit 2 g Na in 200 ml n-Propanol wie von Herzog et al.¹¹ beschrieben zum 3,3-Äthylendioxy-5 α -androstan-11 α ,17 β -diol reduziert wurde. Der gelbe Rückstand wurde in 100 ml MeOH gelöst und mit einem Gemisch von 50 ml ln HCl/70% MeOH bei 40° (30 Min.) behandelt. Die Ätherextrakte lieferten 200 mg Eindampfrückstand, der zur Reinigung an Kieselgel-(HR Merck)-Platten (Laufmittel Diäthyläther) chromatographiert wurde.

Die Hauptfraktion zeigte im Gaschromatographen eine flüchtigere Beimengung an, die durch Aufnahme eines Massenspektrums als 3 β ,11 α -Dihydroxy-5 α -androstan-17-on identifiziert werden konnte. Die präparative Trennung erfolgte auf Kieselgel-Platten (HR Merck, Laufmittel CHCl₃-MeOH 19:1). Umkristallisation zuerst aus Aceton/Diäthyläther, dann aus MeOH. Schmp. 200–201° (Subl.).

LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1735 (1971)
- ² D. H. Williams, J. M. Wilson, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2091 (1963)
- ³ D. H. Williams und C. Djerassi, *Steroids* **3**, 259 (1964)
- ⁴ M. Ende und G. Spiteller unveröffentlicht.
- ⁵ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1073 (1971)
- ⁶ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1101 (1971)
- ⁷ H. W. Fehlhaber, D. Lenoir und P. Wetzel, Vorabdruck eines Vortrages, der im Sommer 1970 auf der Internationalen Massenspektrometrietagung in Brüssel gehalten wurde.
- ⁸ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **103**, 1497 (1970)
- ⁹ M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *J. Org. Mass Spectrom.* **1**, 231 (1968)
- ¹⁰ H. Heusser, K. Heusler, K. Eichenberger, C. G. Hornegger und O. Jeger, *Helv. Chim. Acta* **35**, 295 (1962)
- ¹¹ H. C. Herzog, M. A. Jevnik und E. B. Hershberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 269 (1953)
- ¹² J. I. Appleby, J. U. Norymberski, *Biochem. J.* **60**, 460 (1955)
- ¹³ Für die Überlassung der Probe danken wir der Schering AG (Berlin)
- ¹⁴ O. Mancera, H. J. Ringold, C. Djerassi, G. Rosenkranz und F. Sondheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1286 (1953)
- ¹⁵ Für die Überlassung der Probe danken wir Dr. Harnik von der Ikapfarm AG (Ramat-Gan, Israel)
- ¹⁶ H. C. Herzog, M. A. Jevnik, P. C. Perlman, A. Nobile und E. B. Hershberg, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 266 (1953)