

ZUR LOKALISIERUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN IN STEROIDEN MIT HILFE DER MASSENSPEKTROMETRIE X¹

5-HYDROXY-CHOLESTANE UND 3,5-DIHYDROXY-CHOLESTANE SOWIE DEREN ACETYLDERIVATE

J. JOVANOVIĆ

Institut für Organische Chemie der Technologisch-Metallurgischen Fakultät, YU Belgrad

und

G. SPITELLER*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 9 May 1973; Received in the UK for publication 10 July 1973)

Zusammenfassung—Die Massenspektren von Steroiden mit Hydroxylgruppen in den Stellungen 3 und 5 sind durch Ionen gekennzeichnet, die durch Verlust der C-Atome 1–4 entstehen. Besonders ausgeprägt ist diese Abbaureaktion bei Vorhandensein einer 5 β -ständigen Hydroxylgruppe. Für 3 α ,5 β -Dihydroxysteroiden ist daneben die Abspaltung der C-Atome des Ringes A mit C-6 eine wichtige Spaltungsreaktion, die eine eindeutige Konfigurationsbestimmung gestattet.

Neben diesen durch die funktionellen Gruppen bedingten Abbaureaktionen beobachtet man bei Cholesterinderivaten die für den D-Ring typischen Spaltungsreaktionen. 3 α ,5-Hydroxycholestanen können von ihren 3 β -Isomeren an der bevorzugten Bildung eines Ions der Masse 247 unterschieden werden.

Abstract—Mass spectra of steroids with hydroxygroups in position 3 and 5 are characterized by ions produced by elimination of C-1 to C-4. These degradation reactions are especially important for steroids with a 5 β -configured hydroxygroup.

In addition 3 α ,5 β -dihydroxysteroids lose the carbon atoms of ring A together with C-6 in a structure specific cleavage process, enabling an unambiguous determination of the configuration. Apart from these degradation reactions caused by the presence of functional groups derivatives of cholestanes show the well known cleavage processes of ring D. 3 α ,5-Dihydroxycholestanes may be differentiated from their 3 β -isomeres by the preferential production of an ion of mass 247.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Struktur von Oxydationsprodukten des 3 β -Acetoxy-5 α -androst-17-ons² beschäftigten wir uns mit der Konfigurationsbestimmung von Hydroxylgruppen in der Stellung 5 am Steroidskelett. Um zu sehen, wie weit dazu die Massenspektrometrie beitragen kann, wurden die Massenspektren von 5-Hydroxycholestanen, 3,5-Dihydroxycholestanen und deren 3-Acetylderivaten¹ studiert.

Systematische Untersuchungen über die Massenspektren von 5-Hydroxysteroiden wurden bisher nicht ausgeführt.* Allerdings zeigte kürzlich Wyllie,⁴ dass sich die Spektren von 3 β ,5 α -Dihydroxycholestan und 4 β ,5 α -Dihydroxycholestan sehr ähnlich sehen und eine Unterscheidung der beiden Isomeren massenspektrometrisch nur schwer möglich ist.⁴ Er empfahl daher eine Oxidation zu den entsprechenden 5-Hydroxyketonen. Die von Wyllie⁴ gemachte Feststellung, dass 3,5-Dihydroxysteroiden hohe Neigung zur Abspaltung von

C-1 bis C-4 besitzen, wird durch Arbeiten von Reichstein⁵ und Brown⁶ an ähnlich gebauten Cardenoliden gestützt.

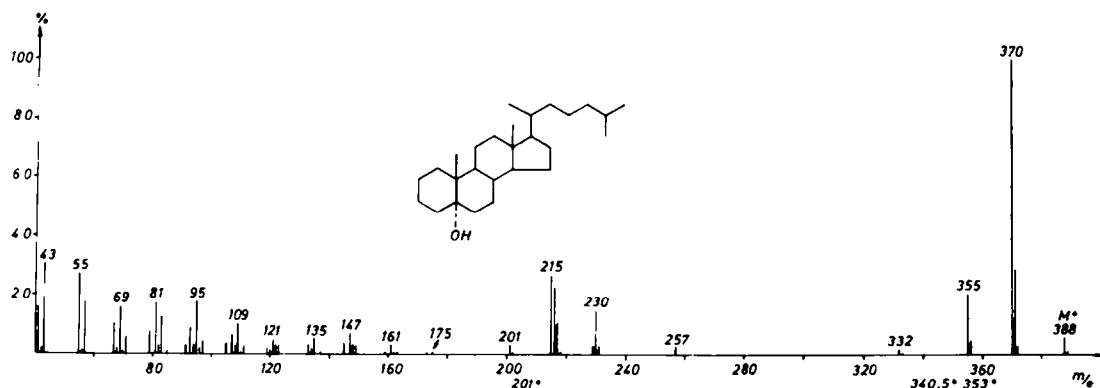
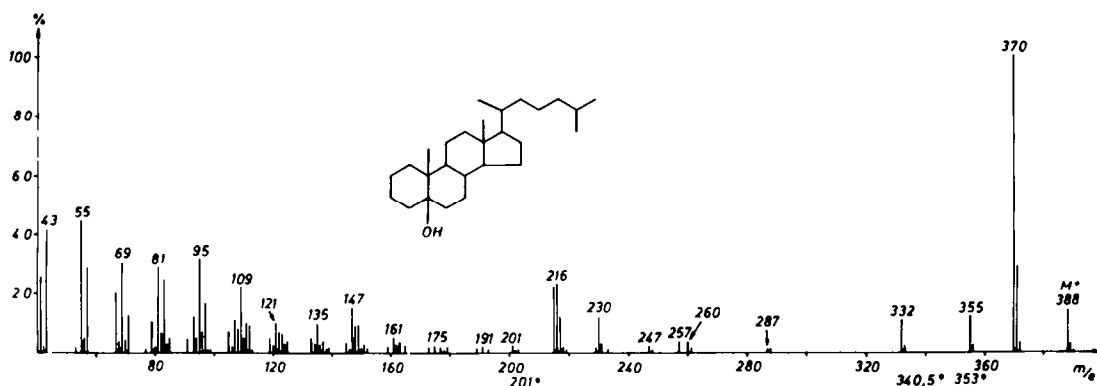
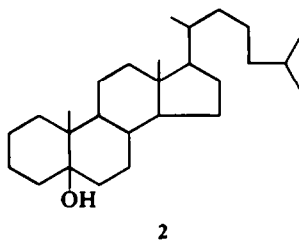
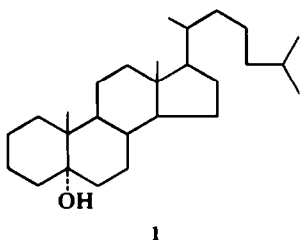
Die bevorzugte Eliminierung von C-1 bis C-4 wurde im Falle des 3 β ,5 β -Dihydroxycholestans offenbar nicht beobachtet. Dagegen wird für diese Verbindung das Auftreten von Schlüsselionen der Masse 110 und 249 als charakteristisch angegeben. Unsere eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Autoren der Arbeit einem Irrtum unterlegen sind, denn auch für das 3 β ,5 β -Dihydroxycholestan ist die Eliminierung von C-1 bis C-4 typisch, und die Ionen der Masse 110 und 249 zeigen eine geringe Intensität.

Um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu gewährleisten, haben wir das Spektrum des 3 β ,5 α -Dihydroxycholestans, das bereits Wyllie publiziert, auch in unsere Arbeit aufgenommen.

A. 5-Hydroxycholestan

Die Spektren von 5 α -Hydroxycholestan (1) und 5 β -Hydroxycholestan (2) sind durch hohe Neigung zur Abspaltung von Wasser gekennzeichnet (Abb 1 und Abb 2).

*Nach Einsendung unseres Manuskriptes erschien eine Arbeit zu dem gleichen Thema von A. Rotman, A. Mandelbaum und Y. Mazur (Tetrahedron 29, 1303 (1973).

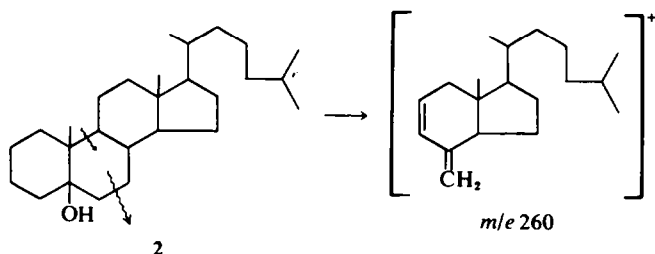
Abb 1. Massenspektrum des 5 α -Hydroxycholestans.Abb 2. Massenspektrum des 5 β -Hydroxycholestans.

Durch Abspaltung einer Methylgruppe entstehen daraus M-33 Ionen. Weitere Abbauprodukte werden vorzugsweise durch Spaltungsreaktionen im D-Ringsystem und im A/B-Ringsystem gebildet: Durch Spaltung der Bindung zwischen C-17 und C-20 wird unter Verlust der Seitenkette das Ion der Masse 257 [$M - (18 + 113)$] gebildet.⁸ Durch Eliminierung der Seitenkette zugleich mit C-16 und C-17 entsteht das Fragment der Masse 230 [$M - (18 + 140)$].⁸ Die Spaltung zwischen C-13 und C-17 sowie C-14 und C-15 führt schliesslich zur Bildung der Ionen der Masse 216 [$M - (18 + 154)$] und 215 [$M - (18 + 155)$].⁸

Die Unterscheidung der beiden Isomeren 1 und 2 ist mit Hilfe der Schlüsselionen der Masse 332 und 260 möglich: Das Ion der Masse 332 entsteht durch

Verlust der C-Atome 1 bis 4. Diese Reaktion ist bei dem Isomeren 2 mit 5 β -ständiger Hydroxylgruppe stark ausgeprägt, während sie bei dem Isomeren 1 mit 5 α -ständiger Hydroxylgruppe kaum ins Gewicht fällt.

Die Abspaltung der C-Atome 1 bis 4 ist sonst typisch für Steroide mit einer Δ^2 -Doppelbindung im Ring A^{9,10} oder für 3 α -Hydroxysterone bei *cis*-Vernüpfung des A/B-Ringes.^{11,12} Das Ion der Masse 260 im Spektrum des 5 β -Hydroxycholestans (2) entspricht formal dem Verlust des Ringes A mit dem C-Atom 6 und 2 Wasserstoffatomen aus dem C/D-Ringsystem. Da diese Abbaureaktion in der isomeren Verbindung 1 praktisch nicht erfolgt, ermöglicht sie eine eindeutige Konfigurationszuordnung.



B. 3,5-Dihydroxy-cholestane

Für 3,5-Dihydroxy-cholestane sind analoge Spaltungsreaktionen wie für 5-Hydroxyandrostan typisch, doch verlaufen die Abbaureaktionen wegen des Vorhandenseins einer zusätzlichen Hydroxylfunktion meist etwas komplexer.

Hauptspaltungsreaktionen sind wieder die Wasserabspaltung sowie der Abbau durch Spaltungsreaktionen der Ringe A und D. Je nach der Stellung der vorhandenen Hydroxylgruppen verlaufen die einzelnen Spaltschritte jedoch mit verschiedener Leichtigkeit und teilweise auch in verschiedener Richtung.

Bei Gegenwart einer β -ständigen Hydroxylgruppe in der Stellung 5 ist die Eliminierung der C-Atome 1 bis 4 auf Kosten von Spaltreaktionen im

Ring D begünstigt. Diese Reaktion dominiert vor allem bei 3 β ,5 β -Dihydroxycholestan (3), in dessen Spektrum praktisch nur ein der Abspaltung von H₂O und C-1 bis C-4 entsprechendes Ion der Masse 332 (M-72) vorhanden ist (Abb 3). Ist die Hydroxylgruppe in der Position 3 α -ständig, so wie im 3 α ,5 β -Dihydroxycholestan (4), so tritt diese Reaktion bedeutend an Intensität zurück (Abb 4). Hauptspaltstück ist das M-18 Ion. Daneben erreicht das Ion, das der Abspaltung beider Hydroxylgruppen entspricht (M-36) erhebliche Intensität.

Abbaureaktionen, die auf Spaltungsreaktionen am oder im D-Ring bei gleichzeitiger Eliminierung von ein oder zwei Wassermolekülen zurückzuführen sind, sind gekennzeichnet durch Fragmente der Masse 273 [M - (113 + 18)] und 255

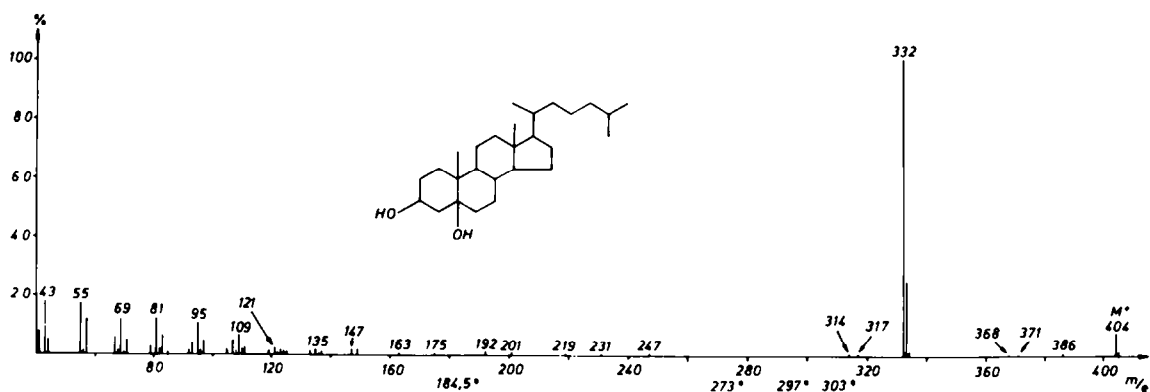


Abb 3. Massenspektrum des 3 β ,5 β -Hydroxycholestans.

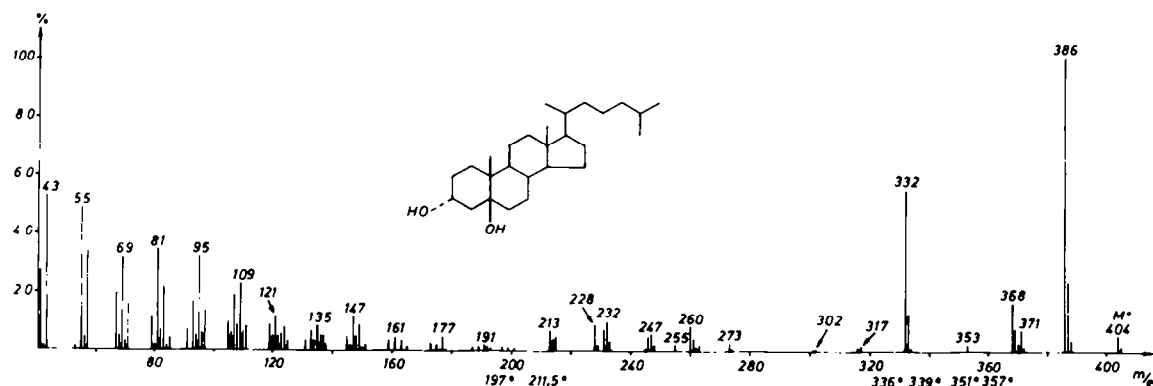
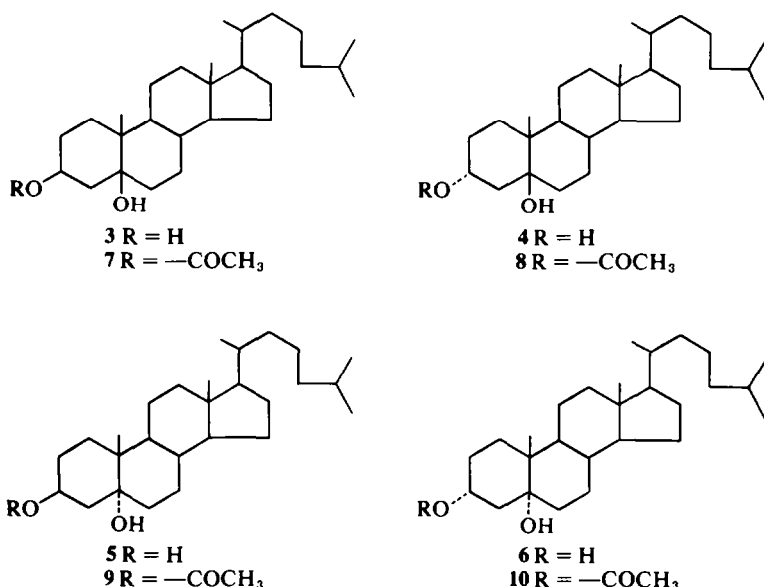


Abb 4. Massenspektrum des 3 α ,5 β -Dihydroxycholestans.



[M - (113 + 18 + 18)]—Seitenkettenverlust—, 246 [M - (140 + 18)], 228 [M - (140 + 18 + 18)]—Verlust der Seitenkette sowie C-17 und C-16—, 231, 232—Verlust des Ringes D + 18—und 214, 215—Verlust des Ringes D + 18 + 18.

Bemerkenswert ist im Spektrum von 4 (Abb 4) die Gegenwart von Ionen der Masse 247, die den Verlust von H₂O sowie C-16, C-17 mit der Seitenkette unter gleichzeitiger Verschiebung eines Wasserstoffs an das ABC-Ringsystem anzeigen. Offensichtlich werden diese Ionen bevorzugt aus solchen 5-Hydroxysteroiden gebildet, die gleichzeitig noch eine 3 α -ständige Hydroxylgruppe tragen.

Wichtig zur Unterscheidung des 3 α ,5 β -Dihydroxycholestans von den anderen Isomeren 3, 5, und 6 sind Ionen der Masse 260. Diese zeigen formal den Verlust der C-Atome des Ringes A mit C-6 an, ähnlich wie bei 5 β -Hydroxycholestan diskutiert.

Bei Gegenwart einer 5 α -ständigen Hydroxylgruppe, in dem 3 β ,5 α -Dihydroxycholestan (5) und

dem 3 α ,5 α -Dihydroxycholestan (6), ist die Wasserabspaltung so begünstigt, dass die Moleküle nur geringe Intensität erreichen (Abb 5 und Abb 6). Im Gegensatz zu 5 α -Hydroxycholestan (1) tritt sowohl im 3 β ,5 α -Dihydroxycholestan (5) als auch im 3 α ,5 α -Dihydroxycholestan (6) im beträchtlichen Ausmass die Eliminierung von C-1 bis C-4 unter Bildung von Ionen der Masse 332 ein. Allerdings bleiben diese an Intensität hinter den entsprechenden Ionen der Isomeren der 3,5 β -Dihydroxycholestane (3) und (4) zurück. Die für den D-Ring Abbau typischen Fragmente, vor allem die der Masse 231 und 232 treten dagegen stärker hervor als in den Isomeren 3 und 4. Eine Unterscheidung zwischen den Spektren von 5 und 6 gelingt mit Hilfe der Ionen der Masse 246 und 247: Im 3 α ,5 α -Dihydroxycholestan (6), das eine 3 α -konfigurierte Hydroxylgruppe trägt, ist wie in 4—ebenfalls mit α -konfigurierte Hydroxylgruppe—die Bildung von Ionen der Masse 247 unter Abspaltung von Wasser sowie der Seitenkette mit C-16 und C-17 unter

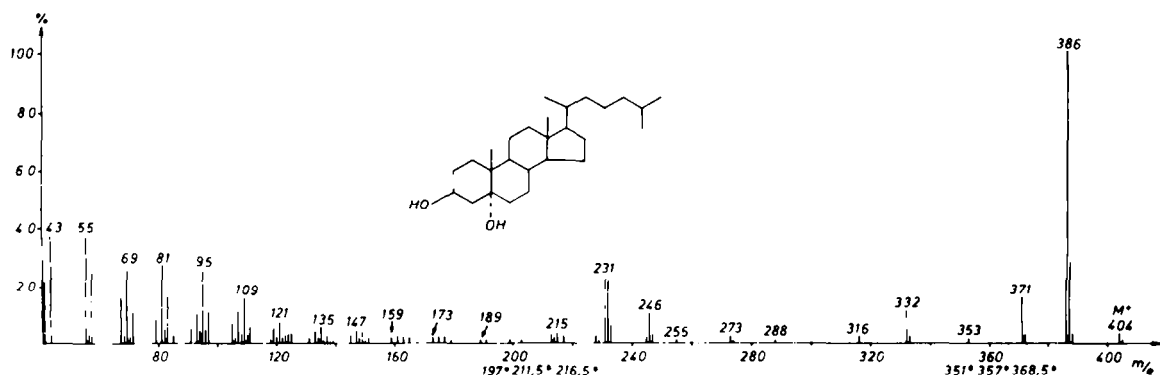
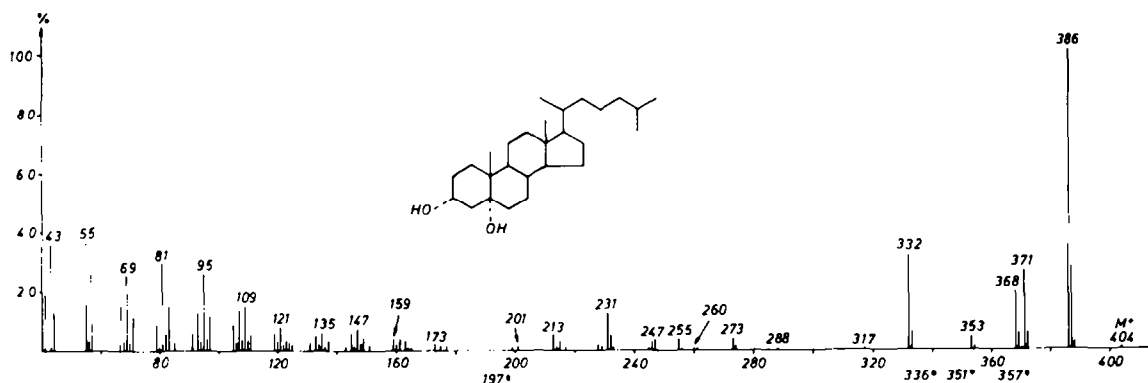


Abb 5. Massenspektrum des 3 β ,5 α -Dihydroxycholestans.

Abb 6. Massenspektrum des 3 α ,5 α -Dihydroxycholestans.

gleichzeitiger Verschiebung eines Wasserstoffs an das ABC-Ringsystem stärker begünstigt als die Bildung der Ionen der Masse 246, die im Spektrum von 5 dominieren. Dies ermöglicht eine eindeutige Konfigurationszuordnung.

C. 3-Acetoxy-5-hydroxy-cholestan

Die wesentlichen massenspektrometrischen Abbaureaktionen der 3-Acetyl-derivate der Verbindung 3 bis 6 unterscheiden sich nicht sehr von denen der 3,5-Dihydroxycholestan.

Hauptsplittingsreaktionen sind:

1. die Abspaltung der Hydroxylgruppe in Form von Wasser
2. die Abspaltung der Acetoxygruppe in Form von Essigsäure
3. die Abspaltung von Wasser und Essigsäure
4. die Abspaltung von C-1 bis C-4, wodurch Ionen bei M-114 gebildet werden
5. Verlust von Wasser und der C-Atome 16 und 17 zusammen mit der Seitenkette (Ionen der Masse 288)
6. Abspaltung von Wasser, Essigsäure und der C-Atome 16 und 17 zusammen mit der Seitenkette (Ionen der Masse 228)
7. Abspaltung von Wasser und der C-Atome 15, 16 und 17 (Ionen der Masse 274)—sowie unter gleichzeitiger Wasserstoffverschiebung aus dem ABC-Ringsystem (Ionen der Masse 273)
8. Abspaltung von Wasser, Essigsäure sowie C-15, C-16, C-17 zusammen mit der Seitenkette und einem Wasserstoff aus dem ABC-Ringsystem (Ionen der Masse 213)
9. Abspaltung von Wasser, Essigsäure und der Seitenkette (Ionen der Masse 255).

Bei Vorhandensein einer 5 β -ständigen Hydroxylgruppe und einer β -ständigen Acetoxygruppe in 3-Stellung, nämlich im 3 β -Acetoxy-5 β -hydroxycholestan (7), dominiert der Verlust von Essigsäure und C-1 bis C-4 als C₄H₈ (Abb 7). Alle anderen Spaltungsreaktionen treten dagegen stark an Intensität zurück.

Dieselbe Abbaureaktion unter Bildung eines M-114 Ions ist auch bei 3 α -Acetoxy-5 β -hydroxycholestan (8) von grosser Bedeutung, doch kommen hier auch andere Zerfallsreaktionen zur Geltung, insbesondere die Abspaltung von Wasser und Essigsäure (Abb 8). Zur sicheren Unterscheidung von den anderen Isomeren ist das Ion der Masse 260 geeignet: Es entspricht wie bei dem analog gebauten 3 α ,5 β -Dihydroxycholestan (4) dem Verlust des Ringes A mit C-6. Wesentlich schlechter lassen sich 3 β -Acetoxy-5 α -hydroxycholestan (9) und 3 α -Acetoxy-5 α -hydroxycholestan (10) massenspektrometrisch identifizieren, denn die Spektren von 9 und 10 unterscheiden sich voneinander nur bezüglich der Intensitätswerten in den Ionengruppen der Massen 214 und 215 sowie 273 und 274 (Abb 9 und Abb 10).

Die Massenspektren von 5 α - und 5 β -Hydroxycholestan-3-on unterscheiden sich voneinander nur sehr wenig. Sie sind erwartungsgemäss durch Spaltstücke gekennzeichnet, die dem Verlust von Wasser entsprechen. Weitere Schlüsselionen zeigen die Abspaltung von C-1 bis C-4 an. Überdies erfolgt der Abbau des Ringes D: [M - (113 + 18)]—Verlust der Seitenkette und Wasser—[M - (140 + 18)]—Verlust von C-16 und C-17 mit der Seitenkette + H₂O—[M - (154 + 18)] und [M - (155 + 18)]—Verlust von C-15, C-16 und C-17 mit der Seitenkette sowie Wasser.

Ein Ion der Masse 124, das in dem von Wyllie⁴ publizierten Spektrum Basisspitze ist, erreicht nur eine Intensität von etwa 30%. Dies zeigt, dass dieses Fragment sowie jenes bei M - 60 aus 3-Keto- Δ^4 -cholesten entsteht, das durch thermische Wasserabspaltung vor der Ionisation gebildet wird. Offenbar konnten auch wir eine teilweise Zersetzung der Verbindung nicht vermeiden.

Die Substanzproben stellten uns Frau Dr. Ljubinka Lorenc und Herr Dr. Miroslav Gašić von der chemischen Abteilung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Belgrad liebenswürdigerweise zur Verfügung.³ Nur durch dieses

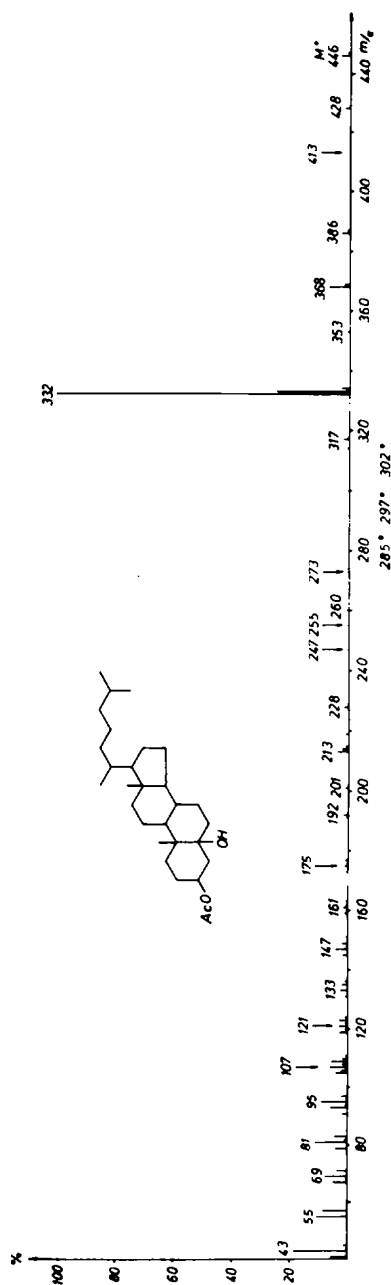


Abb 7. Massenspektrum des 3β-Acetoxy-5β-hydroxycholestans.

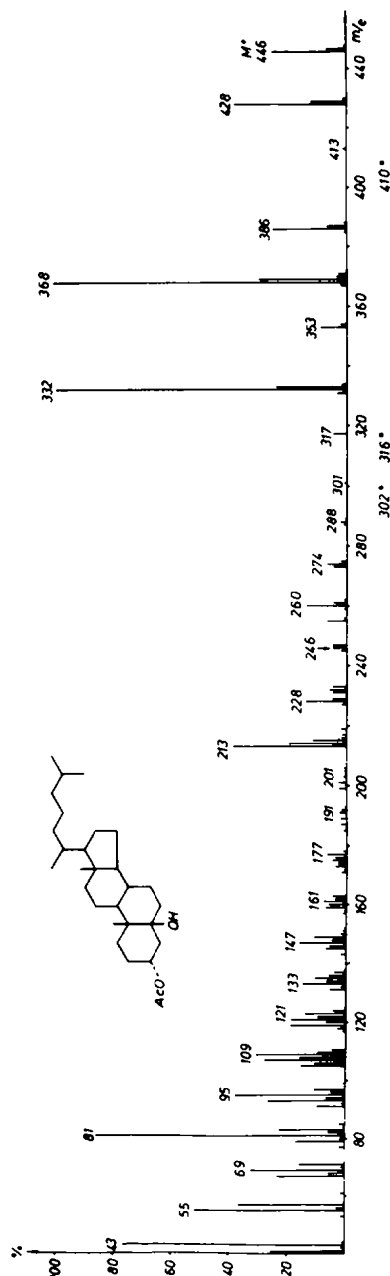


Abb 8. Massenspektrum des 3α-Acetoxy-5β-hydroxycholestans.

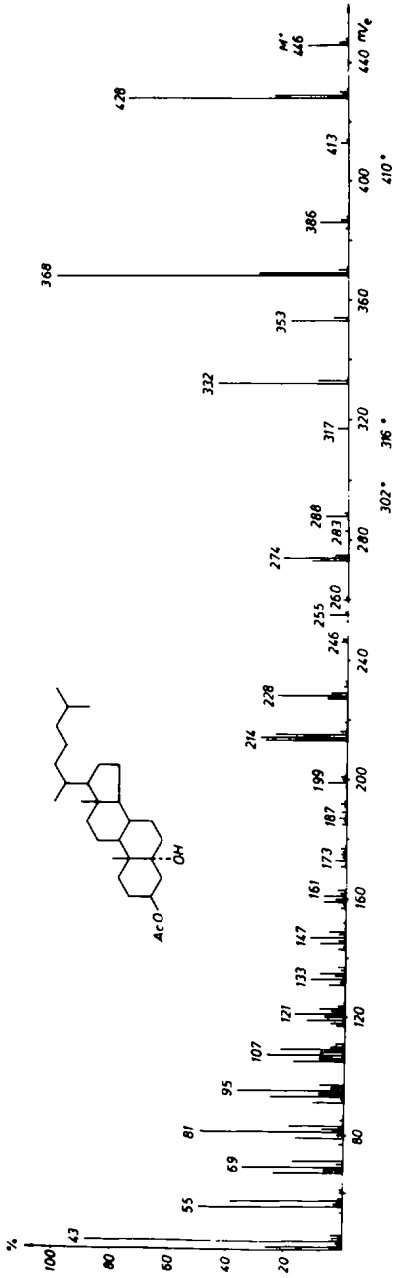


Abb 9. Massenspektrum des 3β-Acetoxy-5α-hydroxycholestans.

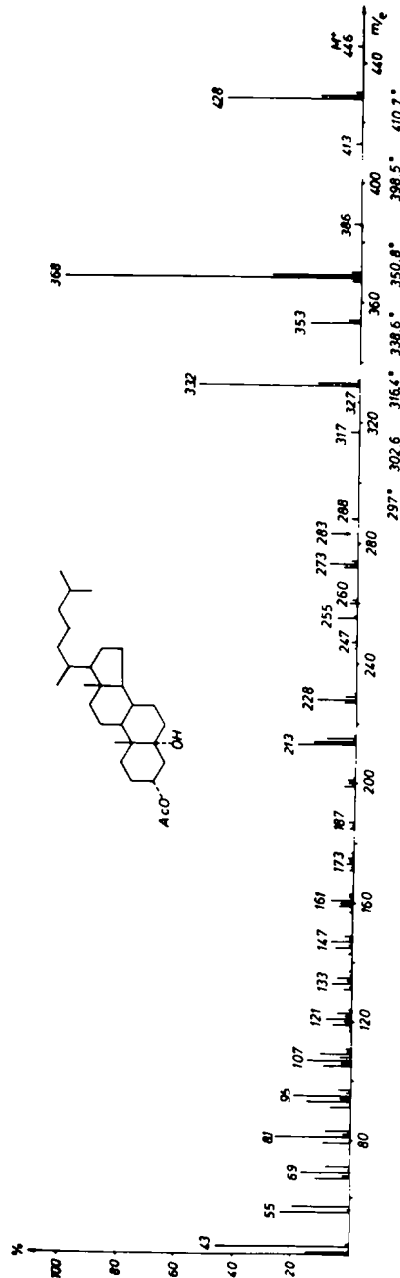


Abb 10. Massenspektrum des 3α-Acetoxy-5α-hydroxycholestans.

Entgegenkommen war die Ausführung dieser Arbeit möglich, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken wollen.

T. Tovanović dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für die Unterstützung der Arbeit durch ein Stipendium. 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 E-4B-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°.

LITERATURVERZEICHNIS

¹IX Mitteilung: F. J. Hammerschmidt und G. Spitteler

Tetrahedron **29**, (1973); im Druck.

²J. Jovanović, M. Spitteler-Friedmann und G. Spitteler *Liebigs Ann. Chem.* **394** (1973)

³M. Lj. Mihailović, Lj. Lorenc, M. Matošić und M. Gašić, *Bull. Soc. Chim. Belgrad* **37**, 129 (1972)

⁴S. G. Wyllie, *Org. Mass Spectrom.*, **6**, 559 (1972)

⁵H. Lichti, J. v. Euw, K. Stöckel, J. Polonia und T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* **55**, 1969 (1972)

⁶P. Brown, F. Brüscheiler und G. R. Pettit, *Ibid.* **55**, 531 (1972).

⁷J. A. Waters und B. Witkop, *J. Org. Chem.* **34**, 3774 (1969)

⁸L. Tökes, G. Jones und C. Djerassi, *J. Am. chem. Soc.*, **90**, 5465 (1968)

⁹H. Audier, M. Fétizon und W. Vetter, *Bull. Soc. chim. France*, 1971 (1963)

¹⁰H. Budzikiewicz, H. I. Baumann und C. Djerassi, *Tetrahedron* **21**, 1855 (1965)

¹¹H. Obermann, M. Spitteler-Friedmann und G. Spitteler, *Ibid.* **27**, 1737 (1971)

¹²H. Obermann, M. Spitteler-Friedmann und G. Spitteler, *Ibid.* **27**, 1747 (1971)