

FRAGMENTATION DES AMINO-2 STEROIDES EN SPECTROMETRIE DE MASSE

CHRISTIAN MARAZANO ET PIERRE LONGEVIALLE

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France

(Received 17 October 1974; accepted 26 February 1975)

Abstract—The mass spectrometric fragmentation of the 2-dimethylaminosteroids has been studied and interpretations are proposed for the formation of the principal fragment ions. A comparative study with the mass spectrum of a β -amino alcohol (3 OH) allows the determination of the initial C—C bond rupture in the mechanism of formation of the principal fragment ions. The fragmentation pattern of 2- and 3-amino steroids are compared.

Résumé—La fragmentation des diméthylamino-2 stéroïdes en spectrométrie de masse est étudiée et des interprétations proposées pour la formation des principaux ions formés. L'étude comparée avec le spectre d'un β -amino-alcool (OH en 3) permet de déterminer la rupture initiale dans le mécanisme de formation des principaux ions. Une comparaison est faite entre la fragmentation des amino-3 et celle des amino-2 stéroïdes.

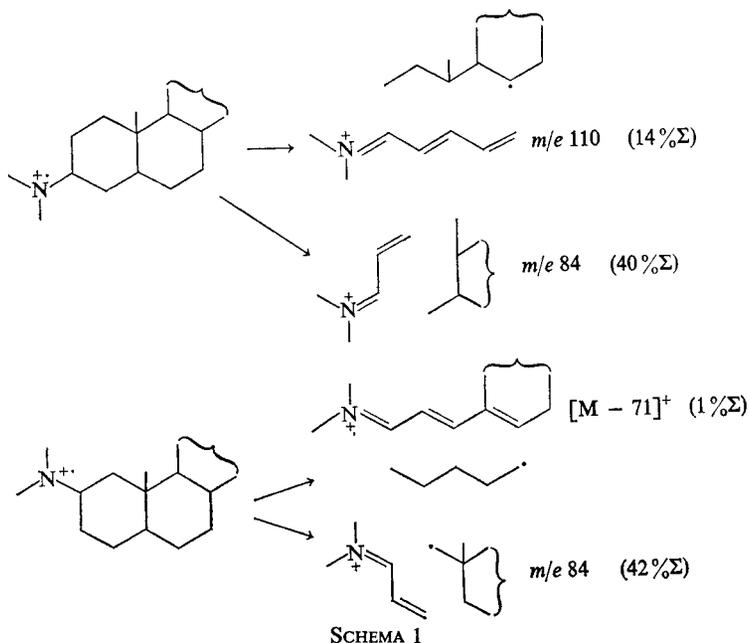
LA FRAGMENTATION en spectrométrie de masse des molécules alicycliques comportant un groupement fonctionnel à bas potentiel d'ionisation se fait généralement en plusieurs étapes représentant des ruptures homolytiques de liaisons C—C et des réarrangements. Dans le cas des diméthyl-aminostéroïdes, la fragmentation commence généralement, après localisation de la charge sur l'hétéroatome,¹ par la rupture d'une liaison C—C en β de cet hétéroatome. Cette première étape stabilise la charge sous forme d'un ion immonium et libère un radical primaire (Schéma 2). D'après des résultats qui feront l'objet d'un prochain mémoire² il est très probable que la réaction inverse de 'rebouclage' a une forte entropie d'activation négative, donc un facteur de fréquence relativement bas, et ne concurrence que faiblement l'étape suivante (réarrangement d'hydrogène (cf. par exemple Schéma 2). On doit donc pouvoir considérer cette rupture initiale, dans de nombreux cas, comme à peu près irréversible.

S'il en est ainsi, l'ensemble des ions produits par la fragmentation d'une telle molécule se divise en deux familles distinctes d'après la rupture initiale dont ils dérivent et la compétition entre ces deux familles d'ions se fait au moment de cette rupture initiale.

Dans l'interprétation générale des spectres, il est évidemment important mais pas toujours facile de pouvoir classer les ions dans l'une ou l'autre de ces familles. Dans le cas des diméthylamino-3 stéroïdes, par exemple (Schéma 1),³ la rupture initiale en 2-3 amène essentiellement la formation de l'ion 110 comportant les carbones 3 à 7 tandis que la rupture initiale en 3-4 amène la formation de l'ion 84 comportant les carbones 1 à 3 du squelette.

L'introduction d'un groupement OH en 2^{3a,4} ou en 4⁵ favorise beaucoup la rupture initiale de la liaison interfonctionnelle en 2-3⁶ ou 3-4 ce qui se traduit respectivement par l'accroissement dans le spectre du pic m/e 110 ou m/e 84.

Dans les cas où la rupture initiale d'une certaine fragmentation n'est pas évidente *a priori*, l'introduction d'un OH en β de l'hétéroatome, en favorisant la rupture C—C interfonctionnelle, peut entraîner une augmentation relative de l'intensité des pics



découlant de cette rupture. C'est ainsi que l'examen du spectre d'un β -amino-alcool peut éclairer l'interprétation de celui de l'amine correspondante.

L'étude de la fragmentation des diméthylamino-2 stéroïdes peut servir d'illustration à l'utilisation de cette technique.

Djerassi *et Coll.*⁷ ont interprété les deux principaux ions d'un diméthylamino-2 cholestane:† m/e 84 et $[M - 71]^+$ (Fig. 1).

Nous avons pu confirmer les mécanismes proposés par ces auteurs⁷ (Schéma 2) à l'aide des spectres des dérivés tétradeutéérié en 1 et 3 (I), et dideutéérié en 3 (II), malgré des réactions d'échange H-D intramoléculeaires dont il sera traité dans un prochain mémoire.‡⁸ Le pic de base à m/e 84 est déplacé à 85 dans les deux cas. Dans le spectre (Fig. 2) du diméthylamino-2 β hydroxy-3 α prégnane, ce pic se trouve à

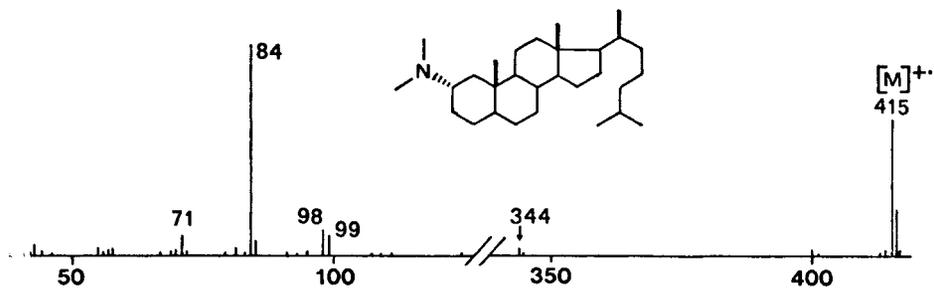
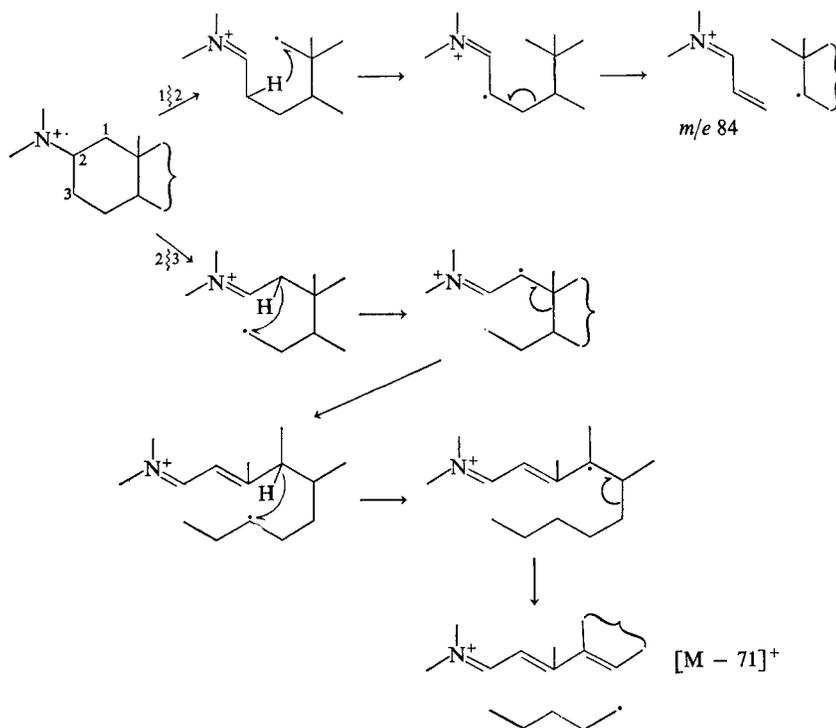


FIG. 1

† Le spectre publié par ces auteurs présente plusieurs pics intenses de masse inférieure à 200 que nous n'avons pas observés.

‡ Les réactions de 'Scrambling' H-D sont ici beaucoup moins importantes que dans le cas des amino-1^o et 4¹⁰ stéroïdes.



SCHEMA 2

$m/e\ 100$ ($84 + 16$) et sa faible intensité confirme la rupture initiale en 1-2 du mécanisme, défavorisée ici. L'ion $[M - 71]^+$ conserve un D dans le cas de I et n'est pas marqué dans le cas de II. L'importance du pic à $[M - (71 + 16)]^+$ ($m/e\ 260$) dans le spectre de l'amino-alcool (Fig. 2) confirme la rupture initiale en 2-3 du mécanisme de formation de cet ion.

Il est intéressant de remarquer la 'symétrie' des positions 2 et 3 dans l'ensemble des cycles A et B du stéroïde et de comparer la fragmentation des amino-3 avec celle

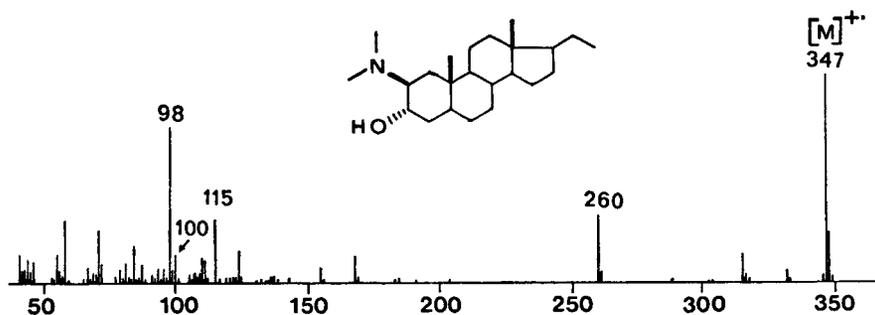
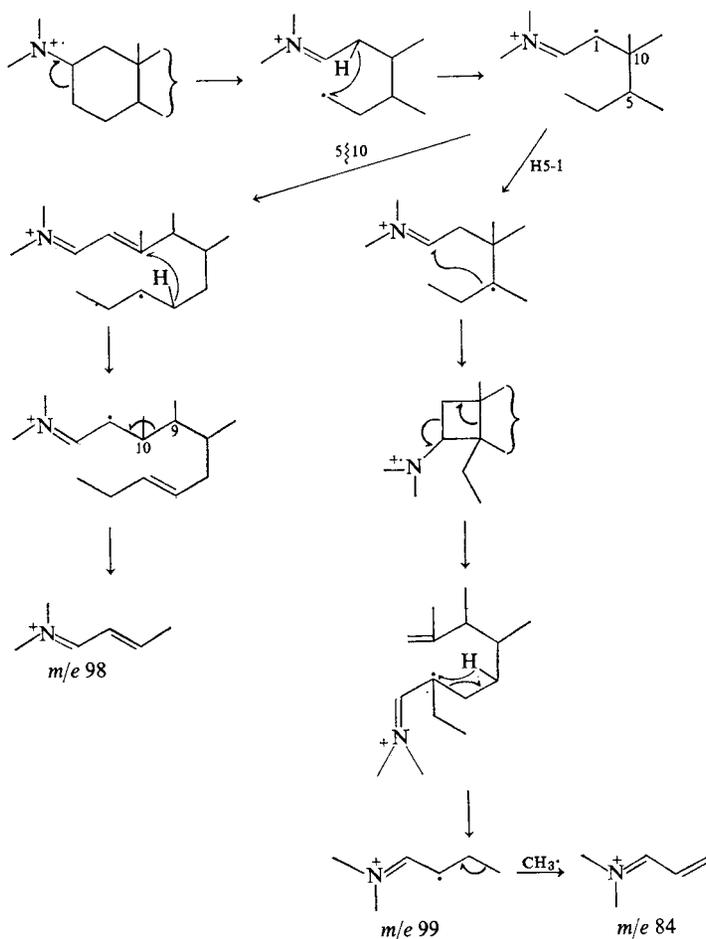


FIG. 2

des amino-2 stéroïdes (Schéma 1) comme on a pu le faire précédemment avec les amino-1 et 4 stéroïdes.^{9,10}

L'ion 84 est représenté par le pic de base dans les deux cas. En revanche, une grande différence d'intensité existe entre les ions à m/e 110 (14%) et $[M - 71]^+$ (1%). Ce fait peut être attribué à la libération d'un radical primaire lors de la formation de ce dernier alors que l'ion à m/e 110 se fait avec libération d'un radical secondaire plus stable. La rupture finale dans la formation de l'ion $[M - 71]^+$ est donc probablement difficile, lente et concurrencée par d'autres processus plus favorisés.

En effet, deux pics à m/e 98 et m/e 99, non signalés par les précédents auteurs⁷ apparaissent relativement importants et caractéristiques des amino-2 stéroïdes. Le spectre de l'amino-alcool (Fig. 2), dont la rupture initiale en 2 à 3 est très favorisée, montre des pics intenses à m/e 98 et m/e 115 ($99 + 16$). Ces deux ions apparaissent donc formés à la suite de cette même rupture initiale et le Schéma 3 rassemble les interprétations proposées pour leur formation.



SCHEMA 3

Après la rupture initiale en 2-3 et réarrangement d'un H de 1 en 3, l'ion radicalaire peut évoluer suivant deux voies différentes:

(1) Rupture en 5-10 suivie du réarrangement d'un H en 10 et rupture finale en 9-10 pour conduire à l'ion de masse 98. Dans le spectre de l'amino-alcool deutérié en 6: diméthylamino-2 β hydroxy-3 α (6,6- d_2) cholestane, le pic à m/e 98 est déplacé pour 63% à m/e 99 montrant l'importante participation des H en 6 à ce mécanisme, mais aussi celle d'autres H (37%) à moins que des réactions intramoléculaire d'échanges H-D soient responsables de cette non spécificité apparente (Fig. 3). Ce réarrangement d'H sur une double liaison conjuguée à un ion immonium est à rapprocher de la formation de l'ion de masse 58 important dans les cas des amino-1⁹ et 4 stéroïdes¹⁰ et de la formation des ions dits 'interdits' ('forbidden ions') observés dans le cas des éthylène cétales stéroïdiques¹¹ où une même absence de spécificité de la migration d'H a, d'ailleurs, été observée.

(2) Contraction en cyclobutane et fragmentation subséquente dont le Schéma 2 propose une possibilité de mécanisme compatible avec les observations suivantes: L'ion 99 retient trois deutériums dans le cas de I (m/e 102) et deux deutériums dans le cas de II (m/e 101). Il contient donc le carbone 3 et un des H du carbone 1. D'autre part, sa masse impaire et le fait qu'il perde un radical CH_3 . (faible pic métastable à m/e 71,2 99 \rightarrow 84), CD_3 dans le cas de I (m^* à 69,3 102 \rightarrow 84), CHD_2 dans le cas de II (m^* à 69,8 101 \rightarrow 84) ou CH_2OH dans le cas de l'amino-alcool (m^* à 61,3 115 \rightarrow 84) montre qu'il s'agit d'un ion azoté radicalaire dont le Schéma 3 présente une structure possible, compatible, en outre, avec le fait que tout le deutérium est perdu lors de la perte du radical.

La contraction de cycle est à rapprocher de celles observées par Audier *et Coll.*¹² dans le cas d'éthylène cétales. Elle se ferait ici de cyclohexane à cyclobutane à cause de la mobilité plus grande de l'H en 5.

Les événements qui suivent la rupture initiale en 2-3 sont donc différents dans les cas des amino-2 ou 3 stéroïdes. Le mécanisme produisant l'ion de masse 110 et un radical secondaire dans ce dernier cas (réarrangements successifs de 2H sur un radical selon des cycles à six centres) est retardé dans le cas des amino-2 stéroïdes (faible pic à $[\text{M} - 71]$) par la forte énergie d'activation de la perte d'un radical primaire lors de la rupture finale (Schéma 2). La faible constante de vitesse de cette dernière rupture permet l'entrée en jeu concurrentielle de mécanismes plus complexes conduisant aux ions 98 et 99 après la rupture initiale en 2-3.

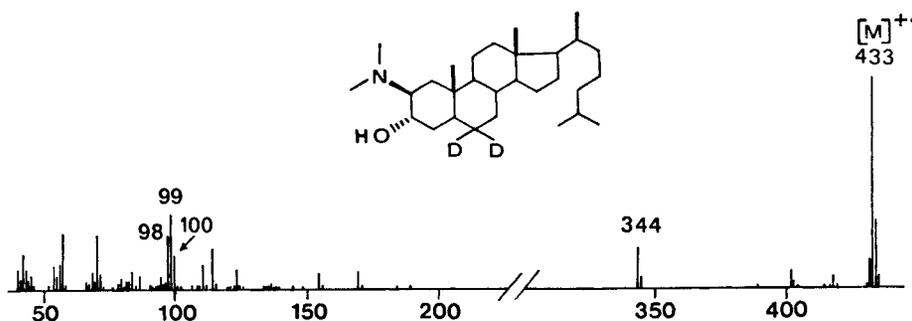


FIG. 3

Signalons pour finir qu'aucune différence notable n'a été observée entre les spectres des amines épimères en 2.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion sont pris en tubes capillaires et corrigés. Les pouvoirs rotatoires sont déterminés dans le chloroforme, à une température voisine de 20 °C, avec le Quick-polarimètre Jouan-Roussel. Les spectres de r.m.n. ont été effectués en solution dans le CDCl_3 , avec le spectromètre Varian A-60; les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm, le signal du tétraméthylsilane étant pris comme zéro de référence et les constantes de couplage en Hz. Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide d'un appareil AEI MS-9 par introduction directe dans la chambre d'ionisation (voltage de ionisation 70 eV) à la température minimum de sublimation.

Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de microanalyse du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

Diméthylamino-2 cholestanes. La préparation des amino-2 stéroïdes¹³ a été faite de façon classique par réduction de l'hydroxiimino-2 cholestane par LiAlH_4 . On obtient ainsi le mélange des amines primaires épimères de polarités très voisines.

410 mg d'oxime sont mis à reflux dans l'éther avec un excès de LiAlH_4 pendant 6 h. On extrait par CH_2Cl_2 après alcalinisation par la soude. On obtient 340 mg du mélange des deux amines épimères en 2, très polaires. Ce mélange est dissout dans 10 ml de formol et 10 ml d'acide formique et laissé à 80 °C pendant 4 h. Après alcalinisation et extraction par CH_2Cl_2 on recueille 330 mg d'un mélange de deux produits séparables sur plaque de silice.

L'amine la plus polaire (57 mg) est la *diméthylamino-2 α cholestane*. Elle ne cristallise pas dans les solvants usuels. r.m.n.: CH_3 18, s à 0,65; CH_3 19, s à 0,8; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, s à 2,25.

L'amine la moins polaire (93 mg) est la *diméthylamino-2 β cholestane*. Elle cristallise lentement en paillettes dans le méthanol. F = 61 °C; $[\alpha]_D = +40$ (c = 0,54).

Analyse: $\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{N} = 415,72$; Calc. % C 83,78 H 12,85 N 3,37

Tr. % 83,48 12,67 3,63

r.m.n.: CH_3 18, s à 0,64; CH_3 19, s à 1,03; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, s à 2,18.

Diméthylamino-2 β hydroxy-3 α (5 α) prégnane. Ce produit a été préparé à partir du prégnène-2 que l'on fait réagir avec l'acide *p*-nitroperbenzoïque. L'ouverture de l'époxyde α obtenu par la diméthylamine à l'autoclave (4 jours à 200 °C) conduit à l'amino-alcool ci-dessus. Cette réaction est difficile du fait des interactions 1,3 diaxiales entre le groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ introduit et le CH_3 19. Le produit est sublimé. F 106 °C; $[\alpha]_D = +93$ (c = 1,26).

Analyse: $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{ON}$ Calc % C 79,47 H 11,89 N 4,03

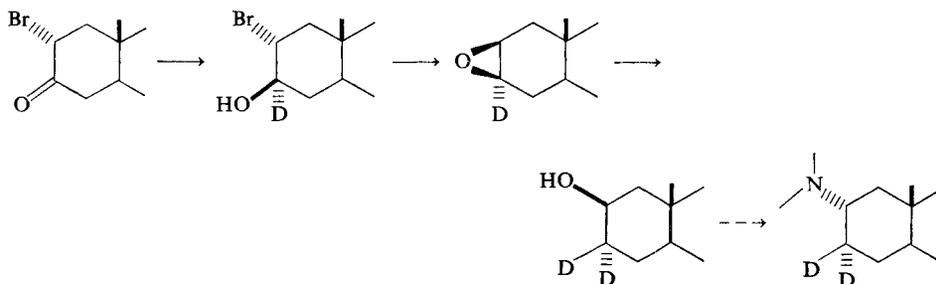
Tr. % 79,36 11,71 3,90

Le même produit a été préparé en série cholestane.

Préparation des dérivés deutériés

Dérivé tétradeutérié (I). Préparé de façon classique par échange des H en 1 et 3 de la cholestanone-2 par reflux 2 h dans CH_3OD , CH_3O^- et D_2O . Après traitement habituel, on transforme en oxime que l'on réduit par le lithium dans l'éthylamine⁹ en diméthylamino-2 α (1, 1, 3, 3, d_4)-cholestane.† Incorporation: 0D: 5%; 1D: 0,5%; 2D: 1,5%; 3D: 9%; 4D: 84%.

Dérivé dideutérié en 3II. Ce dérivé a été obtenu de la façon suivante:



† Nous n'avons pas éprouvé de difficulté particulière à obtenir le dérivé tétradeutérié contrairement à C. Djerassi et Coll.¹⁴

La cholestanone-3 est dissoute dans du THF (fraichement distillé sur LiAlH_4). On ajoute peu à peu une quantité équimoléculaire de réactif de Jacques (perbromure de tétraméthylanilinium)¹⁵ dissous dans le même solvant, goutte à goutte, en agitant et à la température ambiante. Après agitation $\frac{1}{2}$ h, on dilue par l'eau et extrait par CH_2Cl_2 . Le produit est filtré sur colonne de Florisil (CH_2Cl_2). On recueille ainsi la bromo-2 α cholestanone-3 cristallisée.

On met à réduire la monocétone dans le THF par (*t*-BuO₃) LiAlD₄^{14,16} à reflux pendant 1 h. Le produit est extrait par l'éther et purifié par chromatographie sur colonne de silice, puis sur plaques. On recueille ainsi le bromo-2 α hydroxy-3 β d₁-3 α cholestane ($[\text{M}]^+$ 467 - 9) que l'on met dans l'isopropanol en présence de potasse (6 g dans 100 ml) à reflux 1 h. L'époxyde est extrait par l'éther et filtré sur une colonne de florisil (benzène). ($[\text{M}]^+$ 387. r.m.n.: proton en 2 massif centré sur 3,05 ppm). Cet époxyde est réduit dans l'éther par LiAlD₄ (reflux 1 h) en hydroxy-2 β (3,3-d₂)-cholestane.

Après alcalinisation par la soude et extraction par l'éther on oxyde l'alcool dans l'acétone selon la technique de Jones.¹⁷ On recueille la (3,3-d₂) cholestanone-2 que l'on met à réagir immédiatement dans la pyridine en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine pendant 10 h à la température ambiante. Après extraction par l'éther, l'oxime ($[\text{M}]^+$ 403) est dissoute dans une petite quantité d'éthylamine et ajoutée peu à peu et en agitant à une solution de lithium dans l'éthylamine à 0 °C. Le lithium est ajouté au fur et à mesure de la réaction de façon à maintenir un excès de réactif (coloration bleue). Après destruction de l'excès de lithium par un peu de méthanol et évaporation de l'éthylamine, le produit est extrait par l'éther. On obtient ainsi l'amino-2 α (3,3-d₂)-cholestane. Cette amine est méthylée dans le mélange formol-acide formique (50/50) à 80 °C pendant 5 h. Après quoi on alcalinise par la soude et extrait par l'éther. On recueille un produit (purifié sur plaque de silice alcaline) identique au diméthylamino-2 α cholestane et comportant deux deutériums (3,3-d₂) II. Incorporation: 1D: 6%; 2D: 94%.

Diméthylamino-2 β hydroxy-3 α (6,6-d₂) cholestane

Ce produit a été synthétisé à partir de la (6,6-d₂) cholestanone-3 préparée précédemment^{9,18} selon la technique ci-dessus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cf. D. H. Williams et I. Howe, *Principles of Organic Mass Spectrometry*, McGraw-Hill, London 1972, p. 18.
2. P. Longevialle et C. Marazano, en préparation.
3. (a) W. Vetter, P. Longevialle, F. Khuong-Huu-Lainé, Q. Khuong-Huu et R. Goutarel, *Bull. Soc. Chim. France* 1324 (1963).
(b) L. Dolejs, V. Hanus, V. Cerny et F. Sorm, *Collection Czech. Chem. Commun.* **28**, 1584 (1963).
(c) H. Budzikiewicz, C. Djerassi et D. H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Holden Day, San Francisco, 1964, p. 5.
4. M.-M. Janot, P. Longevialle, R. Goutarel et C. Conreur, *Bull. Soc. Chim. France* 2158 (1964).
5. P. Longevialle et R. Goutarel, *Bull. Soc. Chim. France* 3225 (1965).
6. H. Audier, S. Bory, M. Fétizon, P. Longevialle et R. Toubiana, *Bull. Soc. Chim. France* 3034 (1964).
7. Z. Pelah, D. H. Williams, H. Budzikiewicz et C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 574 (1965).
8. P. Longevialle et C. Marazano, *Réactions d'échanges H-D intramoléculaires au cours de la fragmentation des amino-stéroïdes en spectrométrie de masse*, en préparation.
9. C. Marazano et P. Longevialle, *Bull. Soc. Chim. France*, sous presse.
10. C. Marazano et P. Longevialle, *Org. Mass Spectrom.* **10**, 442 (1975).
11. Z. Pelah, D. H. Williams, H. Budzikiewicz et C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 3722 (1964).
12. H. E. Audier, M. Fétizon et J. C. Tabet, *Org. Mass. Spectrom.* **9**, 274 (1974).
13. C. W. Shoppee, J. G. Feher, R. M. Hall, R. E. Lack et L. Tarasoff, *J. Chem. Soc. (C)* 2211 (1968);
C. W. Shoppee, R. J. W. Cremllyn, D. E. Evans et G. H. R. Summers, *J. Chem. Soc.* 4364 (1957);
C. W. Bird et R. C. Cookson, *J. Chem. Soc.* 2343 (1960).
14. J. E. Gurst et C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 5542 (1964).
15. A. Marquet et J. Jacques, *Tetrahedron Letters* 24 (1959).
16. J. Diekman et C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **32**, 1005 (1967).
17. H. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones et B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc.* 39 (1946)
18. R. H. Shapiro, D. H. Williams, H. Budzikiewicz et C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 2837 (1964).