

ZUR LOKALISIERUNG FUNKTIONELLER GRUPPEN IN STEROIDEN MIT HILFE DER MASSENSPEKTROMETRIE

XIII*—MASSENSPEKTREN VON 3,7,17-TRIHYDROXY-ANDROSTANEN UND 7,17-DIHYDROXYANDROSTAN-3-ONEN

B. STOCK und G. SPITELLER

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, Germany

(Received 13 May 1974; accepted 18 June 1974)

Abstract—Androstanes with a *trans* connected A/B ring system and hydroxy groups in positions 3, 7 and 17 show in their mass spectra key ions of mass 99 and 178. The ion of mass 99 contains the carbon atoms of ring D, and the ion of mass 178 those of the A/B ring system and C-11. If the rings A and B are *cis* connected, the ion of mass 178 is produced with much lower abundance and the ion of mass 99 is almost absent. The α or β position of a hydroxy group in position 7 can be deduced from the spectra of corresponding trimethylsilyl derivatives: a fragment of [M - 131] dominated by presence of a 7 α -trimethylsilyl ether group and *trans* connection of the A/B ring system. Determination of the configuration of the hydroxy group in position 3 is very difficult. Analogous fragments are observed in the spectra of the corresponding 7, 17-dihydroxyandrostane-3-ones.

Zusammenfassung—Androstane mit *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem und Hydroxylgruppen in den Stellungen 3, 7 und 17 zeigen in ihren Massenspektren Schlüsselionen der Massen 99 und 178. Das Ion der Masse 99 enthält die C-Atome des Ringes D, das der Masse 178 die der Ringe A und B sowie C-11. Bei *cis*-Verknüpfung des A/B-Ringsystems wird das Ion der Masse 178 mit bedeutend geringerer Intensität gebildet, das Ion der Masse 99 fehlt nahezu. Die Stellung der Hydroxylfunktion in der Position 7 läßt sich aus den Spektren entsprechender Trimethylsilyläther ableiten: Bei Gegenwart einer 7 α -ständigen Trimethylsilyläthergruppe und *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B dominieren [M - 131] Spaltstücke. Eine Konfigurationszuordnung der Hydroxylgruppen in Stellung 3 ist nur sehr schwer möglich. Analoge Spaltstücke treten in den Spektren der entsprechenden 7,17-Dihydroxyandrostane-3-one auf.

EINLEITUNG

IN FORTFÜHRUNG unserer Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Struktur und massenspektrometrischem Abbau von Steroiden mit drei Sauerstoffsubstituenten wurden Androstanderivate mit Hydroxylgruppen in den Stellungen 3, 7 und 17 sowie 7 α ,17 β -Dihydroxyandrostane-3-one hergestellt und ihre Massenspektren miteinander verglichen.

Darstellung der Verbindungen

Als Ausgangsmaterial stand uns 3 β ,17 β -Diacetoxyandrost-5-en-7-on (I) zur Verfügung.[†] Dieses wurde nach bekannten Vorschriften^{2,3} durch Hydrierung mit Pd/C in Methanol und anschließende Verseifung in 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstane-7-on (II) überführt. Die Natriumborhydrid-Reduktion⁴ von (II) ergab in 90%iger Ausbeute 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstane (III) und zu 10% 3 β ,7 β ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstane (IV). Aus III wurde durch Oppenauer-Oxidation⁵ das 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstane-3-on (XIII) erhalten.

* XII. Mitteilung, siehe Lit. 1.

† Für die Überlassung dieser Substanz danken wir Herrn Dr. U. Kerb von der Schering AG, Berlin.

Chromsäureanhydrid-Oxidation von II nach Literaturvorschriften lieferte 5α -Androstan-3,7,17-trion (V). Die Henbest-Reduktion^{7,8} dieser Verbindung V ergab in 40% Ausbeute das 3α -Hydroxy- 5α -androstan-7,17-dion (VI), als Nebenprodukte entstanden hierbei 10% des 3β -Isomeren und 10% Eliminierungsprodukte; 40% der Ausgangsverbindung wurden zurückerhalten. Auch durch Variation der Reaktionsbedingungen konnte die Ausbeute von VI nicht verbessert werden.

Bei der Natriumborhydrid-Reduktion des 3α -Hydroxy- 5α -androstan-7,17-dions (VI) entstanden $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstan (VII) und $3\alpha,7\beta,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstan (VIII) im Verhältnis 4:1, die durch Mehrfachchromatographie an Kieselgel HR (Merck) getrennt werden konnten.

Ausgangsmaterial zur Darstellung der analogen Verbindungen mit 5β -Konfiguration an C-5 war das $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxyandrostan-4-en-3-on (IX).^{9,*} Bei der Hydrierung mit Pd/C in Dimethylformamid¹⁰ entstand in 96%iger Ausbeute das $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5β -androstan-3-on (X). Die Natriumborhydrid-Reduktion von X lieferte ein Gemisch von $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstan (XI) und $3\beta,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstan (XII) im Verhältnis 4:1, das durch präparative DC und anschließende Gaschromatographie getrennt werden konnte.

Die Trimethylsilyläther der hier beschriebenen 3,7,17-Trihydroxyandrostane und der $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxyandrostan-3-one wurden nach einer Vorschrift von Lisboa, Gustafsson und Sjövall¹¹ hergestellt.

DISKUSSION DER MASSENSPEKTREN

Spektren der freien Steroide

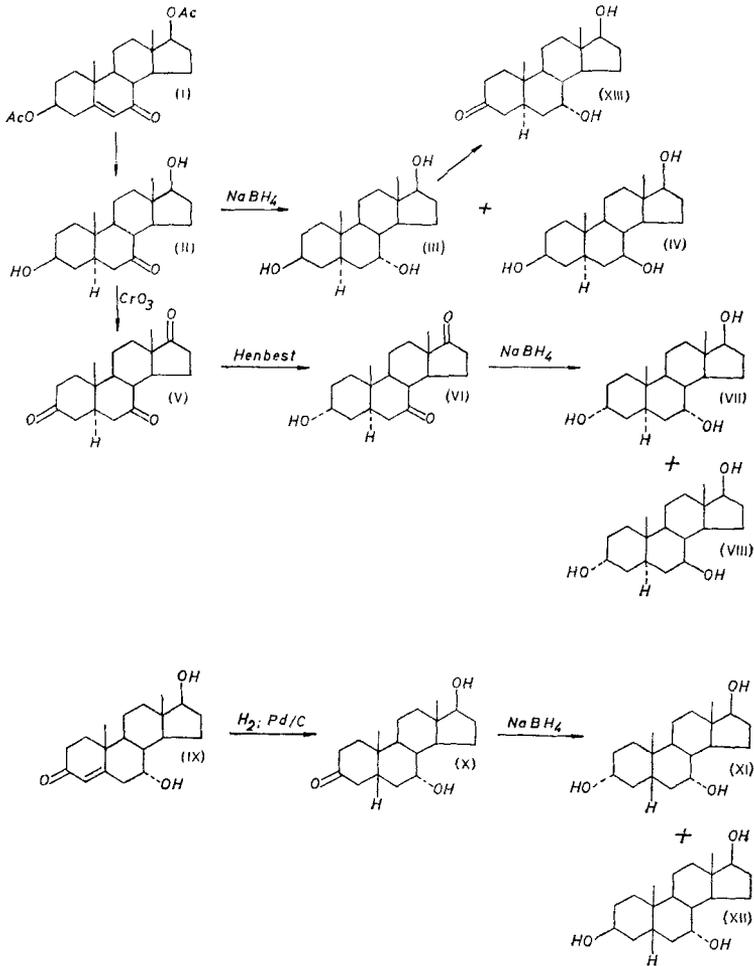
Gemeinsame Spaltreaktionen. Die Massenspektren der hier beschriebenen isomeren 3,7,17-Trihydroxyandrostane, nämlich des $3\beta,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstans (III) (Abb. 1), des $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstans (VII) (Abb. 2), des $3\alpha,7\beta,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstans (VIII) (Abb. 3), des $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstans (XI) (Abb. 4) und des $3\beta,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstans (XII) (Abb. 5), sowie der entsprechenden 7,17-Dihydroxyandrostan-3-one, nämlich des $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5α -androstan-3-ons (XIII) (Abb. 6) und des $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5β -androstan-3-ons (X) (Abb. 7), zeigen alle eine außerordentlich hohe Neigung zur Abspaltung eines Wassermoleküls.

Je nach Konfiguration der vorhandenen Hydroxylgruppen wird im zweiten Abbauschritt mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit ein zweites Molekül Wasser eliminiert. Nach unseren bisherigen Erfahrungen¹² ist eine 17β -konfigurierte Hydroxylgruppe im allgemeinen nur schwer in Form von Wasser eliminierbar. Die primären Wasserabspaltungsreaktionen sollten daher die Hydroxylgruppen in den Stellungen 3 und 7 betreffen.

In Folgeabbaureaktionen kann nach der Eliminierung von Wasser ein Methylradikal abgespalten werden, so daß bei den Trihydroxyverbindungen (III, VII, VIII, XI und XII) Ionen der Massen 275 und 257, bei den 3-Keto-Dihydroxyverbindungen (X und XIII) analoge Fragmente der Massen 273 und 255 gebildet werden. Aus dem Spaltstück der Masse 257 bei den Trihydroxyverbindungen ist dann noch der Verlust eines weiteren Moleküls Wasser möglich.

Diese mehrfache Eliminierung von Wasser und von Methylradikalen ist bei

* Wir danken Herrn Dr. K. Irmscher von der Fa. Merck AG, Darmstadt für die Überlassung von 100 mg 7α -Hydroxytestosteron.



SCHEMA 1. Syntheseplan.

Trihydroxysteroiden üblich^{13,14} und läßt noch keine Schlußfolgerung auf die Position und die Konfiguration der Hydroxylgruppe zu.

Eine weitere für alle Verbindungen gemeinsame Abbaureaktion nach der ersten Wasserabspaltung ist die Eliminierung der Kohlenstoffatome C-16 und C-17 mit der Hydroxylgruppe in Position 17 als Acetaldehydenol.¹⁵ Die Trihydroxyverbindungen zeigen daher ein charakteristisches Spaltstück der Masse 246, die 7,17-Dihydroxyandrostano-3-one (X und XIII) einerseits der Masse 244. Typisch für alle 3,7,17-Trihydroxysteroiden ist die Bildung eines Fragments der Masse 178, das vor allem bei *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem große Intensität erreicht. Ein analoges Schlüsselbruchstück der Masse 176 wird aus dem 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstano-3-on (XIII) gebildet, nicht aber aus der Verbindung X mit *cis*-verknüpften Ringen A und B. Aus der Verschiebung dieses Schlüsselbruchstückes um zwei Masseneinheiten ist abzuleiten, daß das Spaltstück der Masse 178 (C₁₂H₁₈O) den Ring A und die funktionelle Gruppe in Position 3 enthält. Das Fragment sollte demnach die Kohlenstoffatome der Ringe A und B sowie C-11 und C-19 enthalten.

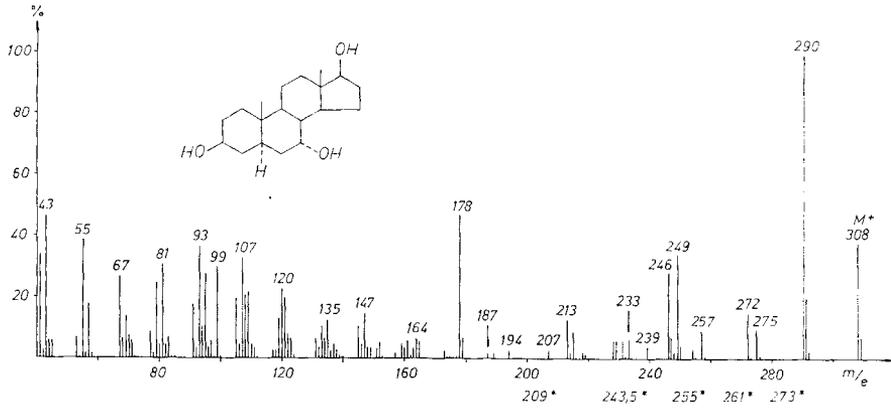


ABB. 1. 3β,7α,17β-Trihydroxy-5α-androstan (III).

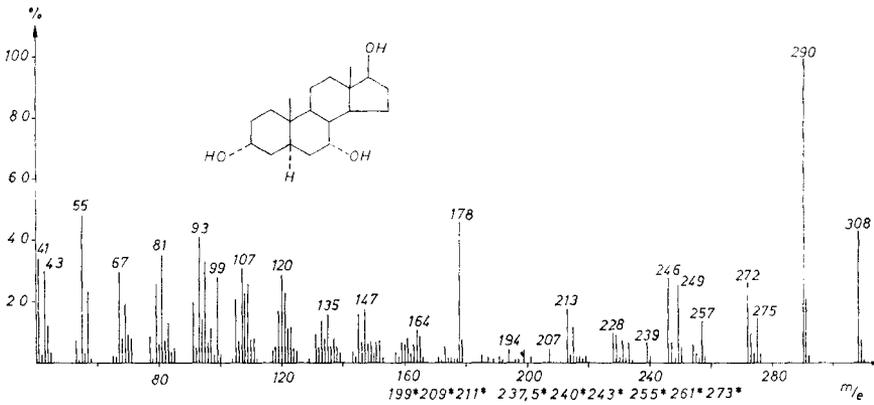


ABB. 2. 3α,7α,17β-Trihydroxy-5α-androstan (VII).

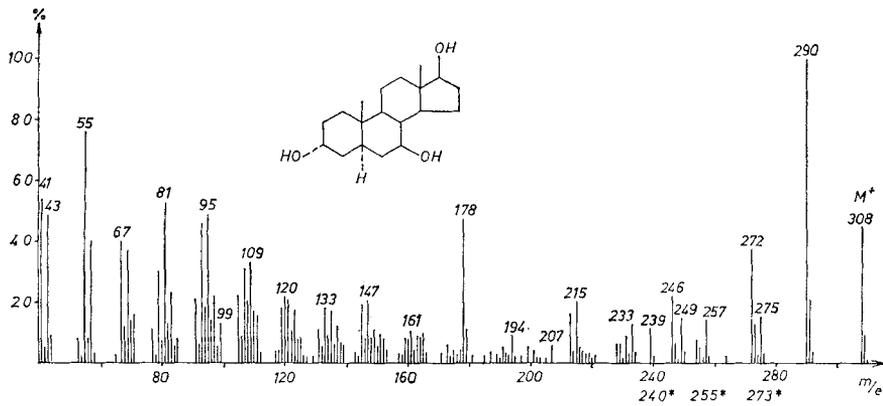


ABB. 3. 3α,7β,17β-Trihydroxy-5α-androstan (VIII).

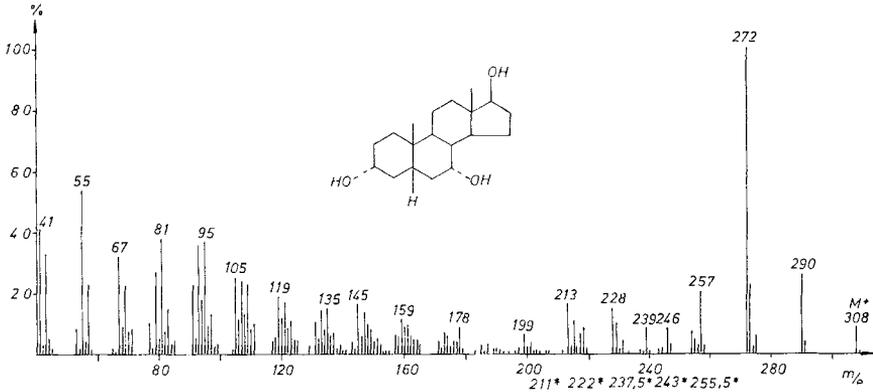


ABB. 4. 3 α ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XI).

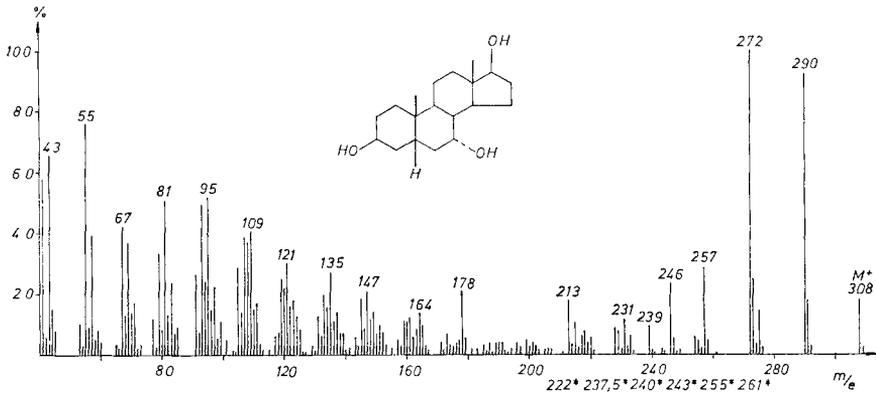


ABB. 5. 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XII).

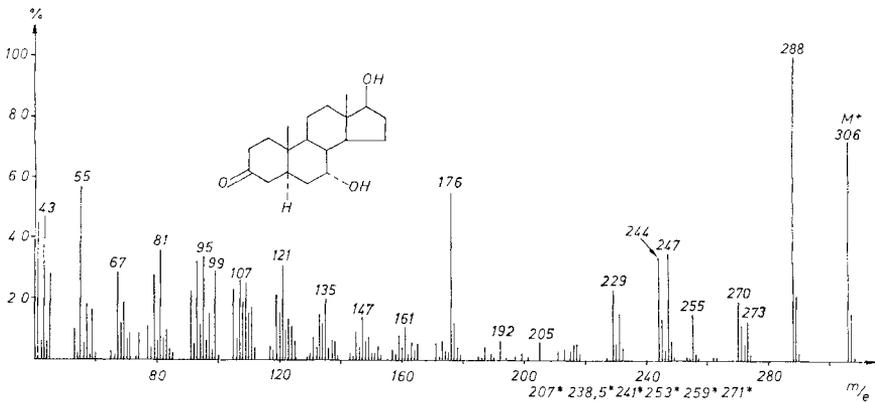


ABB. 6. 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (XIII).

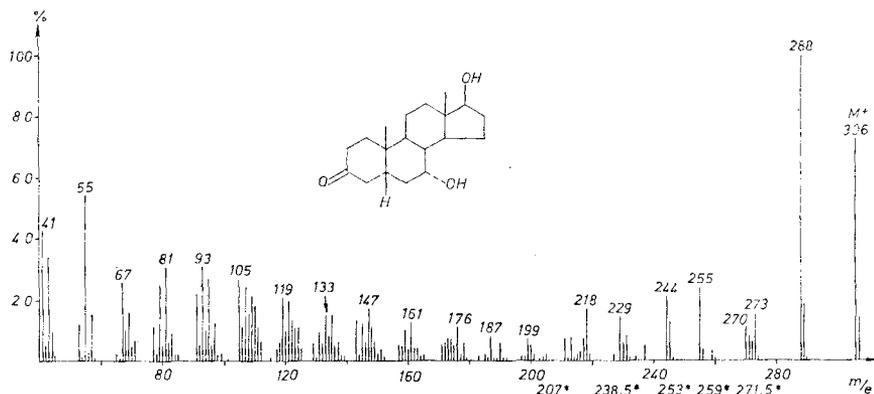
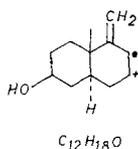


ABB. 7. $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5β -androstan-3-on (X).

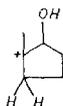


Unterscheidung der Isomeren. Bei *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B ist die Neigung zur Eliminierung eines zweiten Moleküls Wasser wesentlich geringer als bei den *cis*-verknüpften Isomeren. Dadurch kommen offensichtlich Konkurrenzreaktionen stärker zur Geltung: Aus dem Molekülion werden die Kohlenstoffatome 15, 16 und 17 in der für Steroide mit 17β -ständiger Hydroxylgruppe bekannten Weise als Spaltstück von 59 Masseneinheiten eliminiert, so daß ein Schlüsselion der Masse 249, bzw. 247 [bei dem $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5α -androstan-3-on (XIII)] entsteht. Dieses Ion kann unter Wasserabspaltung zu m/e 231 bzw. m/e 229 weiter zerfallen.

Ein bei oberflächlicher Betrachtung der Spektren zunächst nicht ins Auge fallender Unterschied zwischen den Isomeren mit *cis*- und *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem ist das Ion der Masse 99, das in den Isomeren mit 5α -Konfiguration relativ hohe Intensität erreicht. Dieses Spaltstück ($C_6H_{11}O$) umfaßt den D-Ring mit C-18 sowie die Hydroxylgruppe an C-17. Es erreicht besonders hohe Intensität in den Verbindungen mit 7α -konfigurierter Hydroxylgruppe III und VII. Bei *cis*-Verknüpfung der Ringe A und B ist die Intensität nur sehr gering. Ferner ist für Verbindungen mit *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem eine sehr starke Intensität des Ions der Masse 178 bzw. 176 charakteristisch.

Unterschiede in den Spektren der 3,7,17-Trihydroxy- 5α -androstane sind nur bei sehr genauem Vergleich erkennbar. Während sich das $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5α -androstan (VII) von dem 3β -Isomeren (III) auch bezüglich der Intensitätswerte kaum unterscheidet, hat bei 7β -konfigurierter Hydroxylgruppe (VIII) das Schlüsselion der Masse 99 viel geringere Intensität. Typisch ist ferner die unterschiedliche Intensität der Ionen der Massen 213, 215, 231 und 233, die der Abspaltung von ein bzw. zwei Molekülen Wasser und dem Verlust der C-Atome 14, 15 und 16 als C_3H_5O bzw. C_3H_7O entsprechen.

Die Unterscheidung der beiden isomeren Ketone X und XIII ist in einfacher Weise möglich. Im Gegensatz zum 5β -Isomeren (X) treten bei *trans*-Verknüpfung

 m/e 99 ($C_6H_{11}O$)

der Ringe A und B (XIII) die Schlüsselionen der Massen 99, 176 und 247 stark hervor. Bei *cis*-Verknüpfung ist dagegen nach der ersten Wasserabspaltung die Eliminierung der C-Atome 1-4 ein wichtiger Abbauprozess. In den 3,7,17-Trihydroxy-5 β -androstanen XI und XII dominiert die zweimalige Wasserabspaltung. Alle anderen Abbauprozesse sind stark unterdrückt, so daß die Spektren wesentlich weniger Aussagen zulassen als die der Isomeren mit *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem. Hinweise auf das mögliche Vorhandensein einer 7 α -Hydroxylgruppe sind aus dem Auftreten der Ionen der Masse 178 ableitbar, die Anwesenheit einer 17-ständigen OH-Gruppe kann an den Ionen der Masse 246 erkannt werden.

Die unterschiedliche Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-3 bestimmt die Intensität der Ionen $[M - 18]^+$, $[M - 36]^+$, m/e 228 und m/e 246. Im Falle des Isomeren mit 3 α -ständiger OH-Gruppe (XI) ist nämlich ein zweiter Wasserabspaltungsprozeß außerordentlich begünstigt,¹⁵ so daß andere Spaltprodukte nur geringe Intensitäten erreichen.

Spektren der Trimethylsilyläther-Derivate

Ein Hauptziel unserer Arbeit ist es, mit Hilfe der Kombination von Gaschromatograph und Massenspektrometer Steroide in biologischen Flüssigkeiten nachzuweisen. Häufig werden die isolierten Steroide vor der GC-Trennung in TMS-Derivate übergeführt, da diese im allgemeinen eine bessere Isomerentrennung ermöglichen. Aus diesem Grund wurden von den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen auch die Spektren der Trimethylsilyläther aufgenommen.

Die in der Literatur publizierten Spektren werden vielfach bei niedriger Elektronenenergie aufgenommen (z.B. 22,5 eV). Dadurch kommt es zu einer Diskriminierung der Ionen im niederen Massenbereich. Sie betrifft besonders die für TMS-Äther typischen Ionen der Massen 73 und 75. Um unsere bei 70 eV aufgenommenen Spektren mit den Literaturspektren besser vergleichen zu können, wurden sie so normiert, daß die Intensität des höchsten Ions oberhalb der Masse 75 mit 100% gleichgesetzt wurde.

Gemeinsame Spaltreaktionen. Die Spektren der TMS-Äther VIIa und XIIIa (Abb. 10, Abb. 15) wurden bereits von Gustafsson *et al.*^{16,17} publiziert. In Übereinstimmung mit den Befunden von Gustafsson und anderen Arbeitsgruppen über den massenspektrometrischen Abbau trimethylsilylierter Trihydroxysteroiden¹⁷⁻¹⁹ treten in den Spektren der Verbindungen IIIa, IVa, VIIa, VIIIa, XIa und XIIa (Abb. 8 bis 13) Hauptionen auf, die der Abspaltung von ein, zwei und drei Molekülen Trimethylsilanol aus dem Molekülion entsprechen. In Folgespaltungsreaktionen kommt es zur Eliminierung von Methylradikalen. Dementsprechend sind die Spektren der TMS-Derivate von Trihydroxyandrostanen durch Ionen der Massen 509 $[M - 15]^+$, 434 $[M - 90]^+$, 419 $[M - 105]^+$, 344 $[M - 180]^+$, 329 $[M - 195]^+$, 254 $[M - 270]^+$ und 239 $[M - 285]^+$ charakterisiert, wobei die Intensität dieser Ionen allerdings oft recht unterschiedlich ist.

Allen Spektren gemeinsam sind ferner die Ionen der Massen 73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$ und 75 $[(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}]^+$, die für die TMS-Gruppe typisch sind, und ein Spaltstück der Masse 129 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{OSi}$), das aus Trimethylsilyläthern von 17-Hydroxysteroiden entsteht.²⁰ Es umfaßt die Kohlenstoffatome 15, 16 und 17. Durch Verlust der C-Atome 16 und 17 sowie eines Moleküls Trimethylsilanol entstehen Ionen bei $[\text{M} - 206]^+$ ($[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Si}_2]^+$). Im Falle der Trihydroxyandrostane kann aus diesem Bruchstück noch einmal Trimethylsilanol eliminiert werden, wodurch das Ion der Masse $[\text{M} - 296]^+$ entsteht.

Ein intensives Spaltstück tritt in allen hier besprochenen Spektren bei $[\text{M} - 131]$ auf. Dieses Ion wird durch Eliminierung der Kohlenstoffatome 15, 16 und 17 unter gleichzeitiger Verschiebung eines Wasserstoffatoms an das abgespaltene Teilchen gebildet. Diese Bruchstückbildung ist charakteristisch für Verbindungen, die gleichzeitig zwei TMS-Äthergruppen in den Stellungen 7 und 17 enthalten.^{16,17,19}

Unterscheidung der Isomeren. Die TMS-Äther der beiden Trihydroxyverbindungen mit *cis*-verknüpftem A/B-Ringsystem und 7α -ständiger Hydroxylgruppe, nämlich das $3\alpha,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstan TMS (XIa) (Abb. 12) und das $3\beta,7\alpha,17\beta$ -Trihydroxy- 5β -androstan TMS (XIIa) (Abb. 13) unterscheiden sich von allen anderen besprochenen Isomeren durch ein Ion der Masse 211 ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{OSi}$). Dieses Ion entsteht durch einen zweistufigen Abbauprozess. Zuerst wird durch Verlust der Kohlenstoffatome des Ringes A ein $[\text{M} - 184]^+$ Ion $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{OSi}]^+$ gebildet, das dann im zweiten Schritt unter Eliminierung der C-Atome 15, 16 und 17 zum Ion der Masse 211 abgebaut wird. Aus dem Ion $[\text{M} - 184]$ wird durch Trimethylsilanolabspaltung ein Bruchstück der Masse 250 gebildet. Eine Unterscheidung der Verbindungen XIa und XIIa wird erst bei genauem Intensitätsvergleich der Ionen der Massen 393 $[\text{M} - 131]^+$, 303 $[\text{M} - 221]^+$, 254 $[\text{M} - 270]^+$ und 228 $[\text{M} - 296]^+$ möglich.

Die Spektren der $3,7,17$ -Trihydroxyandrostane TMS mit *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem zeigen je nach Konfiguration der 7-ständigen Hydroxylgruppe eine unterschiedliche Neigung zum Verlust der C-Atome 15, 16 und 17 als 131 Masseneinheiten schwereres Teilchen und zur Abspaltung von Trimethylsilanol. Während bei 7α -Konfiguration der TMS-Gruppe bevorzugt ein Ion $[\text{M} - 131]$ gebildet wird, erfolgt bei den 7β -substituierten Isomeren vorzugsweise die Eliminierung von Trimethylsilanol. Eine weiteres Unterscheidungsmerkmal ist das Auftreten eines Ions bei $[\text{M} - 186]^+$ $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{OSi}]^+$ in den Spektren der Verbindungen mit 7α -konfigurierter Trimethylsilylgruppe.

Dieses Bruchstück, das dem Verlust des gesamten D-Ringes mit dem C-Atom 12 entspricht, fehlt bei den 7β -substituierten Isomeren. Diese zeigen dafür ein komplementäres Spaltstück der Masse 184, das unter Verlust eines Methylradikals zu einem Ion der Masse 169 zerfällt.

Eine Unterscheidung bezüglich der Konfiguration der Trimethylsilyläthergruppe in der Stellung 3 ist bei *trans*-verknüpftem A/B-Ringsystem nicht möglich, da sich die Spektren von IIIa und VIIa sowie von IVa und VIIIa nur sehr geringfügig in den Intensitäten unterscheiden.

Die Spektren der beiden trimethylsilylierten Ketone, nämlich des $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5α -androstan-3-ons TMS (XIIIa) (Abb. 14) und des $7\alpha,17\beta$ -Dihydroxy- 5β -androstan-3-ons TMS (Xa) (Abb. 15) weisen erhebliche Unterschiede auf. Während bei *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B die Bildung des Ions bei $[\text{M} - 131]$

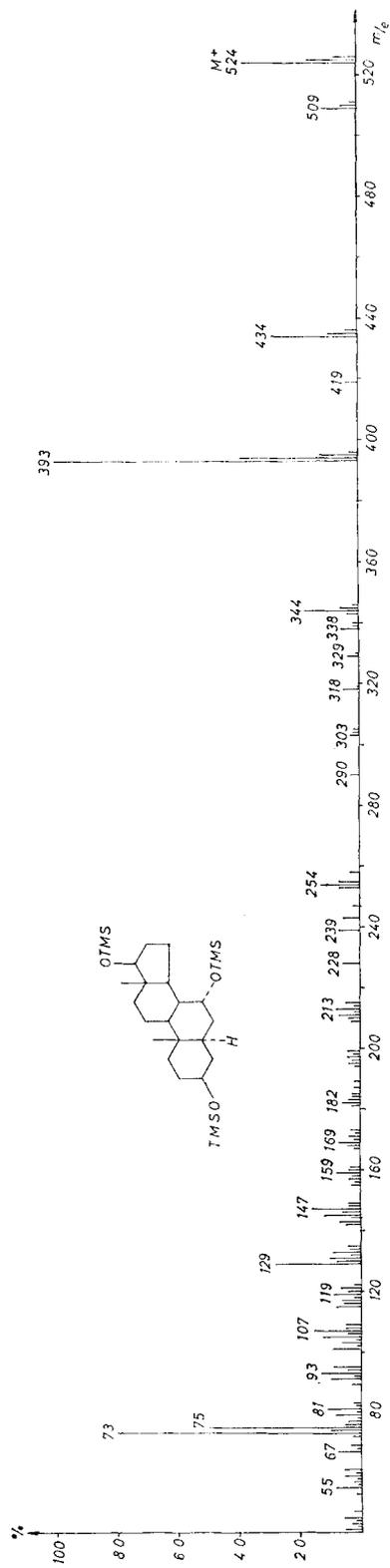


ABB. 8. TMS-Äther von 3β,7α,17β-Trihydroxy-5α-androstan (IIIa).

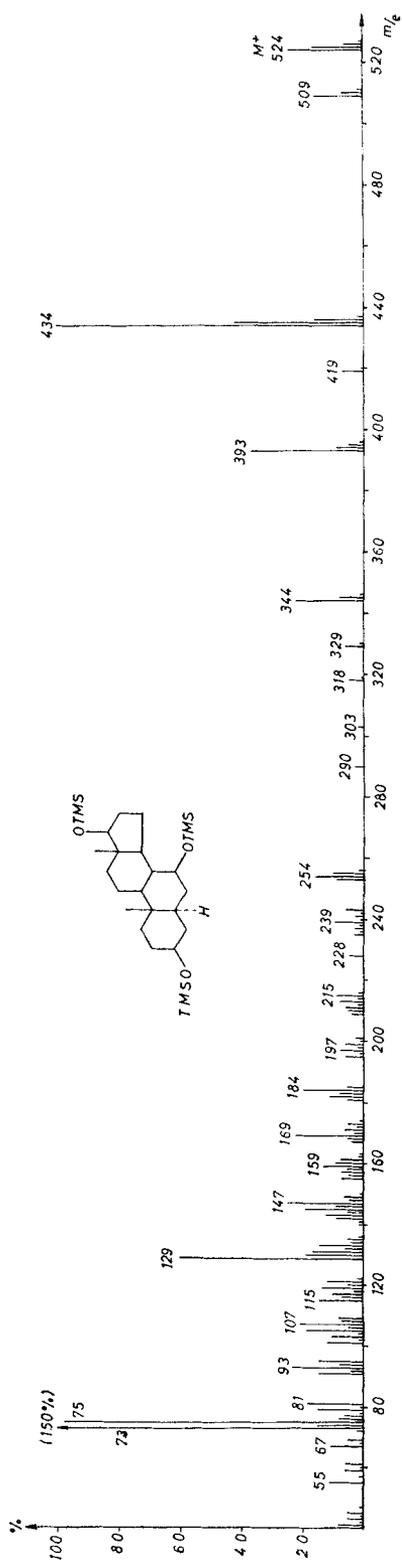


ABB. 9. TMS-Äther von 3β,7β,17β-Trihydroxy-5α-androst. (IVa).

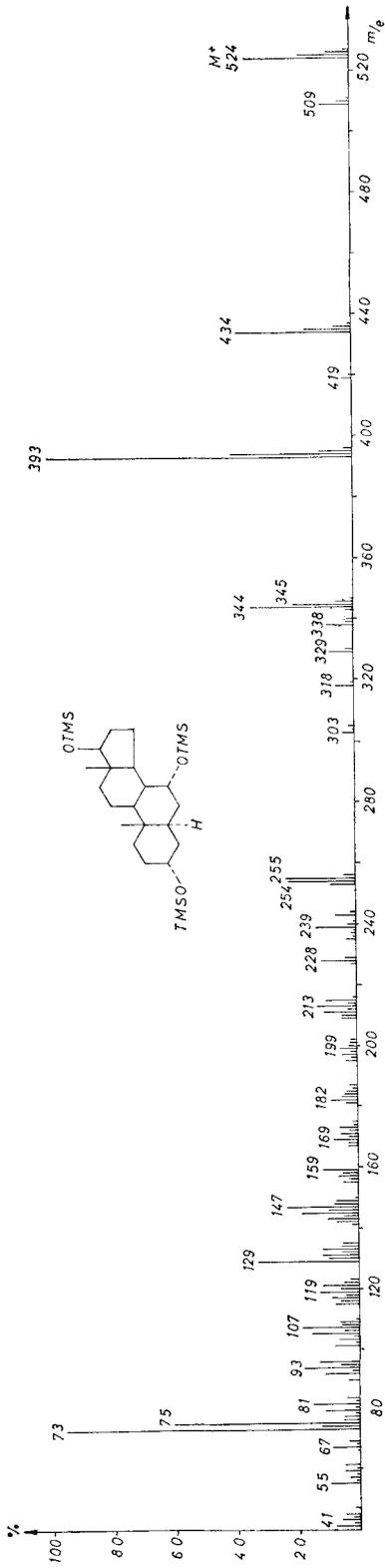


ABB. 10. TMS-Äther von 3 α ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (VIIa).

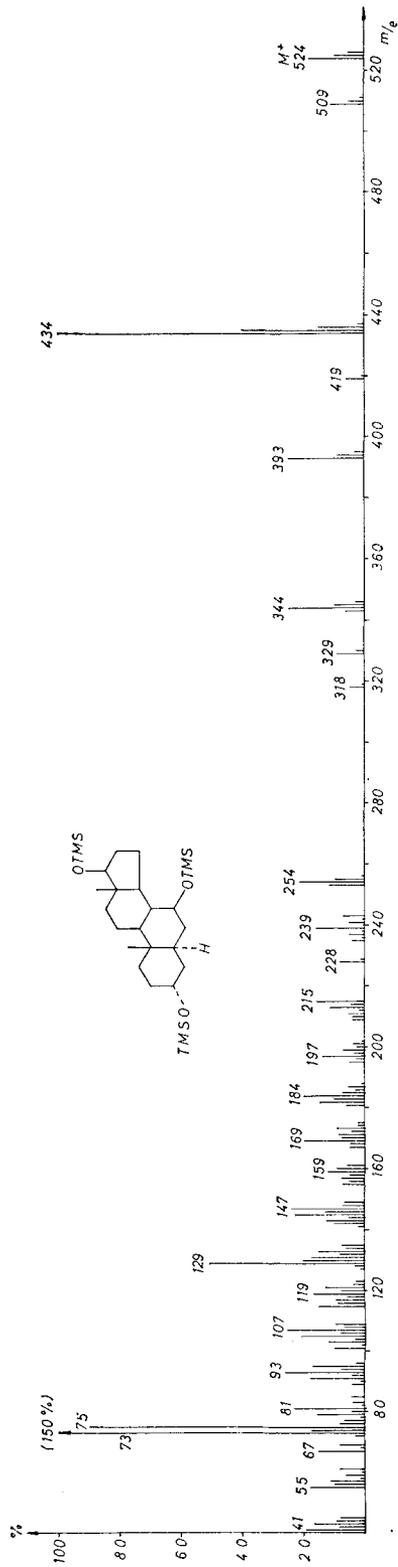


ABB. 11. TMS-Äther von 3 α ,7 β ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (VIIIa).

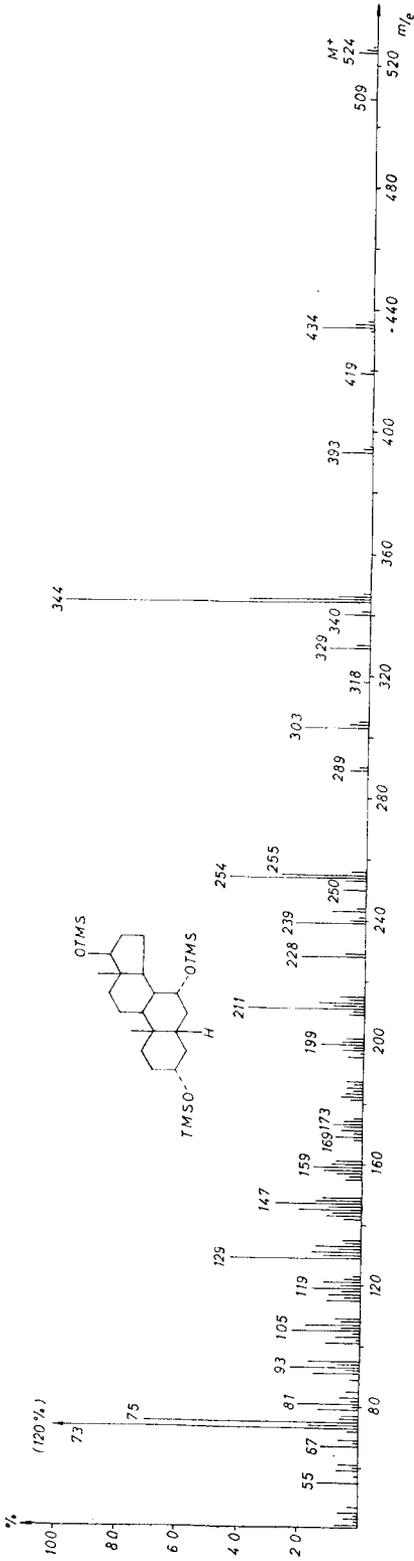


ABB. 12. TMS-Äther von 3 α ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XIIa).

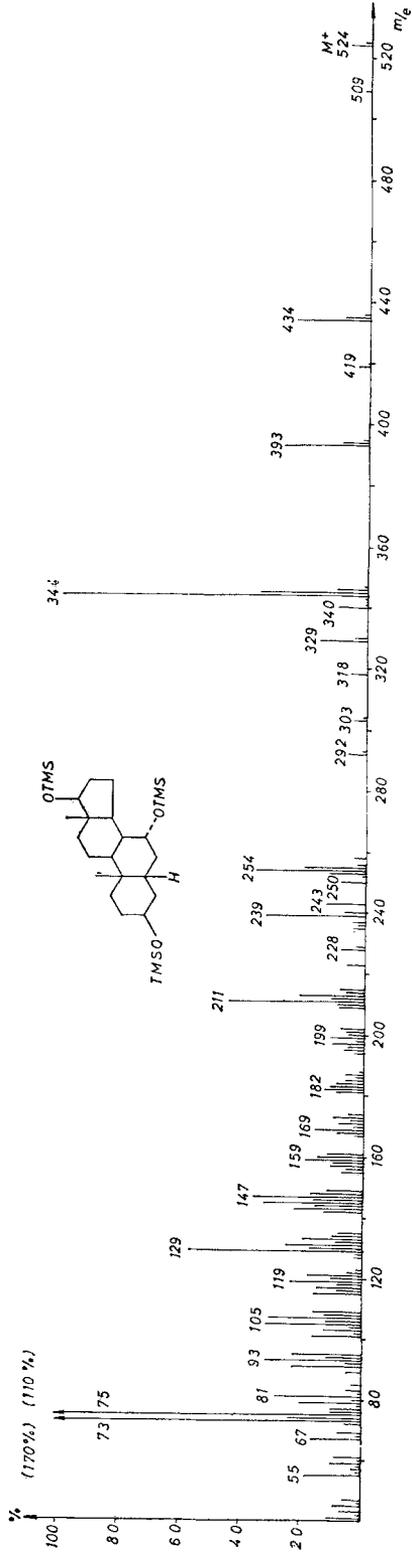


ABB. 13. TMS-Äther von 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XIIa).

dominiert, werden aus dem Isomeren mit *cis*-verknüpftem A/B-Ringsystem die Spaltstücke [M - 90], [M - 131] und [M - 180] mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit gebildet.

Eine nur für das 5 β -Isomere Xa typische Abbaureaktion ist genau wie bei den Trihydroxyverbindungen XIa und XIIa die Eliminierung der Kohlenstoffatome des Ringes A unter Bildung des Ions [M - 110].²¹ Dieses Bruchstück (C₁₈H₃₆O₂Si₂) wird unter Verlust der C-Atome 15, 16 und 17 zu einem Ion der Masse 211 weiter abgebaut.

Ferner tritt im Spektrum von Xa ein Fragment der Masse 237 auf, das aus *m/e* 255 [M - 195] durch Eliminierung von Wasser gebildet wird. Wie wir schon früher an 3-Keto-Steroiden mit *cis*-verknüpftem A/B-Ringsystem beobachtet haben,²² wird nach mehrstufigen Abbaureaktionen im letzten Schritt der Sauerstoff der 3-ständigen Carbonylgruppe in Form von Wasser eliminiert.

Überdies werden aus Xa nach Verlust von Trimethylsilanol die C-Atome 1 bis 4 als 70 Masseneinheiten schweres Teilchen unter Bildung eines Ions der Masse 290 abgespalten. Auch diese Abbaureaktion ist für 3-Ketosteroide mit *cis*-verknüpftem A/B-Ringsystem typisch.^{12,23}

DISKUSSION

Die Untersuchung der Massenspektren von 3,7,17-Trihydroxyandrostanen und analoger Ketone zeigt, daß sich aus ihnen die Stellung der Substituenten und die Verknüpfung des A/B-Ringsystems ermitteln läßt. Die Konfiguration einer Hydroxylgruppe in der Stellung 7 ergibt sich über den Umweg der Trimethylsilylätherdarstellung. Dies zeigt, daß sich Spektren freier Steroide und ihrer Trimethylsilyläther ergänzen, so daß man bei Strukturuntersuchungen sowohl die Spektren der freien Steroide als auch die ihrer TMS-Äther aufnehmen sollte.

EXPERIMENTELLER TEIL

Aufnahme der Massenspektren

Die Massenspektren der freien Steroide wurden mit einem Varian MAT CH-4 Massenspektrometer durch direkte Einführung der Probe in die E-4B Ionenquelle aufgenommen. Die Elektronenenergie betrug 70 eV, die Ionenquellentemperatur 80 bis 100 °C. Die Verdampfungstemperatur der Proben lag zwischen 110 und 145 °C.

Die Spektren der Trimethylsilyläther wurden mit einem Varian MAT CH-7 Massenspektrometer aufgenommen, das mit einem Varian 1700-Gaschromatographen gekoppelt war. Die Elektronenenergie betrug 70 eV, die Temperatur der Ionenquelle 160 °C, die des Biemann-Watson Separators 260 °C. Der Gaschromatograph war mit einer 1,50 m Glassäule mit 2 mm Innendurchmesser ausgestattet. Das Säulenmaterial war Chromosorb W, AW-DMCS (80 bis 100 mesh), belegt mit 3% OV 17. Die Säulentemperatur betrug 220 bis 280 °C (Heizprogramm 2 °/Min), die Temperatur des Einspritzblocks 260 °C. Als Trägergas wurde Helium (20 ml/Min) verwendet.

Die Bruttoformeln wurden durch 'peak-matching' mit einem SM 1-B Massenspektrometer der Firma Varian MAT bestimmt. Herrn Dr. G. Remberg danken wir für die Ausführung dieser Messungen.

Präparative Gaschromatographie

Um die Verbindungen vollständig zu reinigen, war in mehreren Fällen eine gaschromatographische Trennung notwendig, wozu ein Varian Aerograph-1700 mit Flammenionisationsdetektor und Ganzglassystem verwendet wurde. Die Proben wurden direkt auf die Säule gespritzt (1/4 Zoll, Chromosorb W, AW-DMCS 80 bis 100 mesh, belegt mit 3% SE-30, Säulentemperatur 200 bis 280 °C, Temperatur von Einspritzblock und Detektor 300 °C, Trägergas Stickstoff, 40 ml/Min).

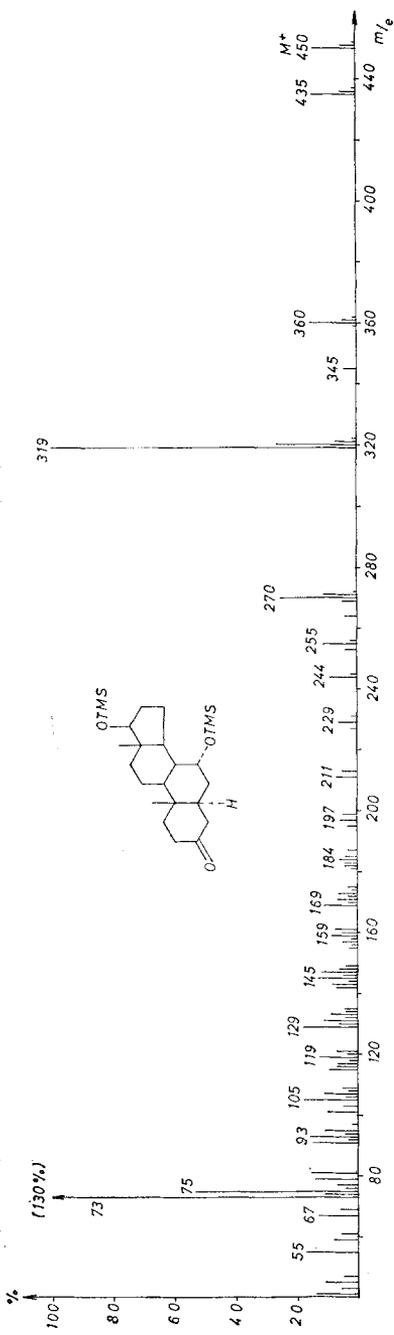


Abb. 14. TMS-Äther von 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (XIIIa).

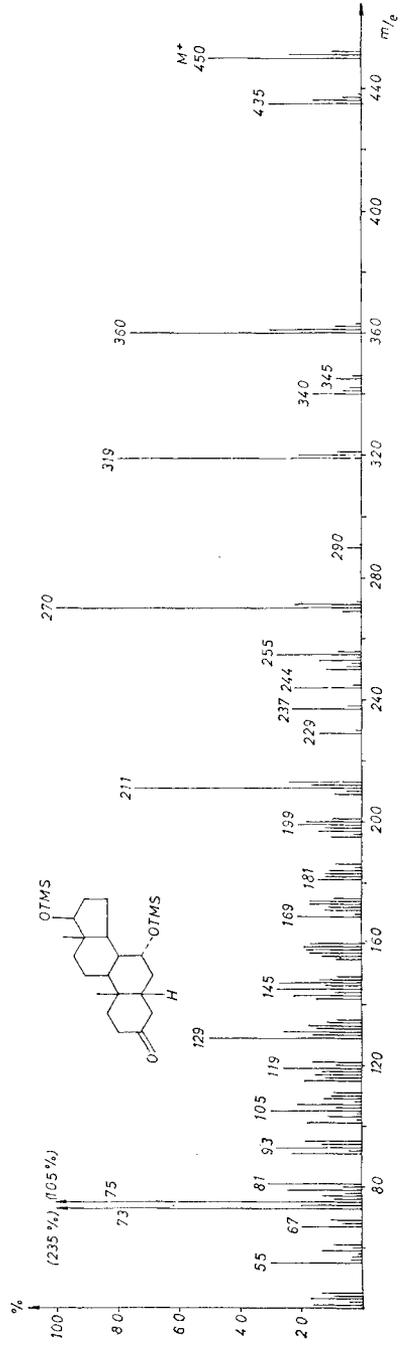


Abb. 15. TMS-Äther von 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on (Xa).

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur präparativen Trennung und Reinigung der Substanzen wurde Kieselgel HR der Fa. Merck verwendet (Schichtdicke 0,25, 0,5 oder 1 mm). Stufen- und Mehrfachchromatographie wurden kombiniert.²⁴ Die verwendeten Laufmittelsysteme sind jeweils bei der Darstellung der Verbindungen mit angegeben.

Für die analytische DC wurde Kieselgel H der Fa. Merck (Schichtdicke 0,25 mm) verwendet, als Sprühreagenz diente Anisaldehyd/Schwefelsäure in Eisessig.²⁴

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofferblock bestimmt und sind unkorrigiert.

Darstellung der Verbindungen

3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (III) aus 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-7-on (II). 80 mg (II) Schmp.: 199 bis 201 °C²⁵ wurden in 20 ml Methanol gelöst und bei 0 °C unter Rühren mit 30 mg NaBH₄ versetzt.⁴ Nach 30 Min wurde die Lösung mit 2 Tropfen 50%iger Essigsäure versetzt, im Vakuum eingedampft und der Rückstand über Nacht am Soxhlet mit Äther extrahiert. 70 mg Rohprodukt wurden durch präp. DC getrennt (Laufmittel: 2 \times Chloroform/Aceton 60:40). Zone III (*R_f*-Wert: 0,48) enthielt 2 mg (2,5%) Ausgangsverbindung II, Zone II (*R_f*-Wert: 0,24–0,20) 11 mg (15%) eines Gemisches aus III und dem Nebenprodukt 3 β ,7 β ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (IV). Aus der Zone I (*R_f*-Wert: 0,18) konnten 38 mg (49%) 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (III) Schmp.: 225 bis 227 °C (aus Essigester) isoliert werden.

3 α -Hydroxy-5 α -androstan-7,17-dion (VI) aus 5 α -Androstan-3,7,17-trion (V). 100 mg V Schmp.: 236 bis 37 °C⁶ wurden mit 6 mg Iridium-(IV)-chlorwasserstoffsäure und 0,2 ml Trimethylphosphit in 100 ml 90%igem Isopropanol unter Rückfluß erhitzt.^{7,8} Nach 36 h waren erst 20% der Ausgangsverbindung reduziert worden (DC-Kontrolle). Nach Zugabe von 0,1 ml Trimethylphosphit und 3 mg H₂Ir^{IV}Cl₆ wurde weitere 24 h erhitzt, bis sich etwa 70% der Ausgangssubstanz umgesetzt hatten. Das Gemisch wurde mit 20 ml Wasser verdünnt, nacheinander mit Äther und Chloroform extrahiert und die Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Aus dem Produktgemisch wurden durch zweifache DC-Trennung (Laufmittel: Chloroform/Aceton 60:40) 32 mg (32%) 3- α -Hydroxy-5- α -androstan-7,17-dion (VI) erhalten. Schmp.: 221 bis 222 °C (Äthanol) Lit.:²⁵ 222 bis 223, 5 °C.

3 α ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (VII) und 3 α ,7 β ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (VIII) aus 3 α -Hydroxy-5 α -androstan-7,17-dion (VI). 26 mg VI wurden in 10 ml Methanol gelöst und bei 0 °C unter Rühren mit 10 mg NaBH₄ versetzt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von zwei Tropfen 50%iger Essigsäure gestoppt, mit 10 ml Wasser verdünnt und 5 \times mit je 10 ml Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung und Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Nach der DC-Trennung (Laufmittel: Chloroform/Aceton 60:40, 4 \times gelaufen) wurden 10 mg (40%) VII isoliert Schmp.: 198 bis 199,5 °C (Aceton/Cyclohexan), 2 mg VIII (8%) mußten durch präp. GC gereinigt werden. *R_f*-Werte (1 \times CHCl₃/Aceton 60:40) VII: 0,07 und VIII: 0,15.

7 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on (X) aus 7 α ,17 β -Dihydroxy-androst-4-en-3-on (IX). 40 mg (X)⁹ Schmp.: 216 °C wurden in 10 ml absolutem Dimethylformamid gelöst, mit 10 mg Pd/C-Katalysator (10%ig) versetzt und innerhalb von zwei Stunden erschöpfend hydriert. Nach der üblichen Aufarbeitung und präp. DC-Trennung (Laufmittel: Chloroform/Aceton 80:20) wurden 36 mg (90%) öliges Produkt erhalten. Die Substanz X kristallisierte auch nach präp. GC-Reinigung nicht.

3 α ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XI) und 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 β -androstan (XII) aus 7 α ,17 β -Dihydroxy-5 β -androstan-3-on (X). 15 mg X wurden aus 10 ml Methanol gelöst und bei 0 °C unter Rühren mit 2 mg NaBH₄ versetzt. Nach 20 Min wurde die Reaktion gestoppt, wie üblich aufgearbeitet und das Rohgemisch durch präp. DC auf 0,25 mm Kieselgel HR getrennt (Laufmittel: 2 \times Chloroform/Aceton 60:40). Es wurden 1 mg (7%) XII und 6 mg (40%) XI isoliert. Beide Proben waren durch Trihydroxyverbindungen mit einer Doppelbindung verunreinigt. Vor der Aufnahme der Massenspektren wurden die Substanzen XI und XII daher gaschromatographisch gereinigt.

7 α ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan-3-on (XIII) aus 3 β ,7 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan (III). 50 mg III wurden in 5 ml absolutem Aceton gelöst, mit 65 mg Aluminium-tert-butylat in 5 ml thiophenfreiem, absolutem Benzol versetzt und zehn h unter Rückfluß erhitzt.⁵ Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt (35 mg) durch zweifache präp. DC getrennt (Laufmittel: CHCl₃/Aceton 60:40). Es wurden isoliert: 13 mg (26%) Ausgangsprodukt III und 7 mg (14%) XIII, Schmp.: 181 bis 183 °C (Aceton).

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

LITERATURVERZEICHNIS

1. XII. Mitt.: E. Zietz und G. Spiteller, *Tetrahedron* **30**, 597 (1974).
2. K. Heusler und A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta* **35**, 284 (1952).
3. H. J. Ringold, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 961 (1960).
4. E. Elisberg, H. Vanderhaeghe und T. F. Gallagher, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2814 (1952).
5. J. F. Eastham und R. Teranishi, *Org. Syn. Coll. Vol.* **4**, 192 (1963).
6. H. B. Kagan und J. Jacques, *Bull. Soc. Chim. France* 1551 (1960).
7. Y. M. Y. Haddad, H. B. Henbest, J. Husbands und T. R. B. Mitchell, *Proc. Chem. Soc.* 361 (1964).
8. P. A. Browne und D. N. Kirk, *J. Chem. Soc. (C)* 1653 (1969).
9. K. Irmscher, W. Beerstecher, H. Metz, R. Watzel und K.-H. Bork, *Chem. Ber.* **97**, 3363 (1964).
10. M. G. Combe, H. B. Henbest und W. R. Jackson, *J. Chem. Soc. (C)* 2467 (1967).
11. B. P. Lisboa, J.-A. Gustafsson und J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* **4**, 496 (1968).
12. M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Org. Mass Spectrom.* **1**, 231 (1968).
13. XI. Mitt.: E. Zietz und G. Spiteller, *Tetrahedron* **30**, 585 (1974).
14. H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Tetrahedron* **27**, 1093 (1971).
15. H. Egger und G. Spiteller, *Monatsh. Chem.* **97**, 579 (1966).
16. J.-A. Gustafsson, B. P. Lisboa und J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* **5**, 437 (1968).
17. J.-A. Gustafsson und J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* **6**, 227 (1968).
18. T. Laatikainen, *Steroids* **15**, 139 (1970).
19. J.-A. Gustafsson, B. P. Lisboa und J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* **6**, 317 (1968).
20. J. Diekmann und C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **32**, 1005 (1967).
21. P. D. G. Dean und R. T. Aplin, *Steroids* **8**, 565 (1966).
22. H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Chem. Ber.* **103**, 1497 (1970).
23. H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 1430 (1962).
24. K. Randerath, *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr, 1962.
25. A. M. Bell, I. M. Clark, W. A. Denny, E. R. H. Jones, G. D. Meakins, W. E. Müller und E. E. Richards, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **19**, 2131 (1973).