

PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

SYNTHESES DE STEROIDES ^{14}C -4
ACETATES DE 19-NOR TESTOSTERONE
ET DE TESTOSTERONE

par

H. FLOCH

Rapport C.E.A. n° 2218

CEA 2218 - FLOCH Hervé

SYNTHESES DE STEROIDES ^{14}C -4 : ACETATES DE 19-NORTESTOSTERONE
ET DE TESTOSTERONE (1962)

Sommaire. - Les acétates de 19-nortestostérone 4- ^{14}C et de testostérone 4- ^{14}C ont été préparés à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{Hg I}$ avec des rendements respectifs de 32 pour cent et de 56 pour cent par rapport à $^{14}\text{CH}_3$.

La cyclisation en milieu acide nous a donné de bons rendements contrairement à la cyclisation en milieu alcalin qui donne des rendements faibles pour la testostérone et négatifs pour la 19-nortestostérone.

CEA 2218 - FLOCH Hervé

SYNTHESIS OF ^{14}C -4 STEROIDS : ACETATES OF 19-NORTESTERONE AND
OF TESTOSTERONE

Summary. - Acetates of 19-nortestosterone-4 ^{14}C and of testosterone-4 ^{14}C have been prepared from $^{14}\text{CH}_3\text{Hg I}$ with respective yields of 32 per cent and 56 per cent based on $^{14}\text{CH}_3\text{Hg I}$.

The cyclisation in acidic medium gave good yields, in contrast, to the cyclisation in basic medium which gave low yields for the testosterone and failed for the 19-nortestosterone.

- Rapport C.E.A. n° 2218 -

Département des Radioéléments

SYNTHESES DE STEROIDES ^{14}C -4
ACETATES DE 19-NOR TESTOSTERONE ET DE TESTOSTERONE

par

Hervé FLOCH
Attaché de Recherches au C.N.R.S.
Stagiaire à la Section des Molécules Marquées

SYNTHESES DE STEROIDES ^{14}C -4

ACETATES DE 19-NOR TESTOSTERONE ET DE TESTOSTERONE

Afin d'étudier le problème de la biosynthèse des hormones oestrogéniques (mécanisme de l'aromatisation du cycle A des hormones androgéniques) et celui de la conjugaison des 19 norstéroïdes, nous avons entrepris, sur la demande du Professeur JAYLE, de la Faculté de Médecine de Paris, et sous la direction du Professeur CRASTES de PAULET, la synthèse des acétates de testostérone et de 19-Nor testostérone marqués par du ^{14}C sur le carbone 4.

Nous décrivons ici en détail les points délicats de cette synthèse déjà mise au point par FUJIMOTO [1], HARTMAN [2] [3] et USKOKOVIC [4].

Le principe de la synthèse est le même pour la testostérone que pour la 19-Nor testostérone, après avoir bloqué la fonction 17 β hydroxy du 3 oxo, 17 β hydroxy, estra-4-ène (I) par un groupement acétate, on effectue l'ozonisation du 3 oxo, 17 β acetoxy, estra-4-ène (II). Le 17 β acetoxy, 5 oxo, 3 oïque, 3-5 soco, 4 Nor Estrane (III) ont ensuite cyclisé en 17 β acetoxy, 5 hydroxy, 3 oïque, 3-5 soco, 3-5 lactone, 4 Nor extra-5-ène (IV).

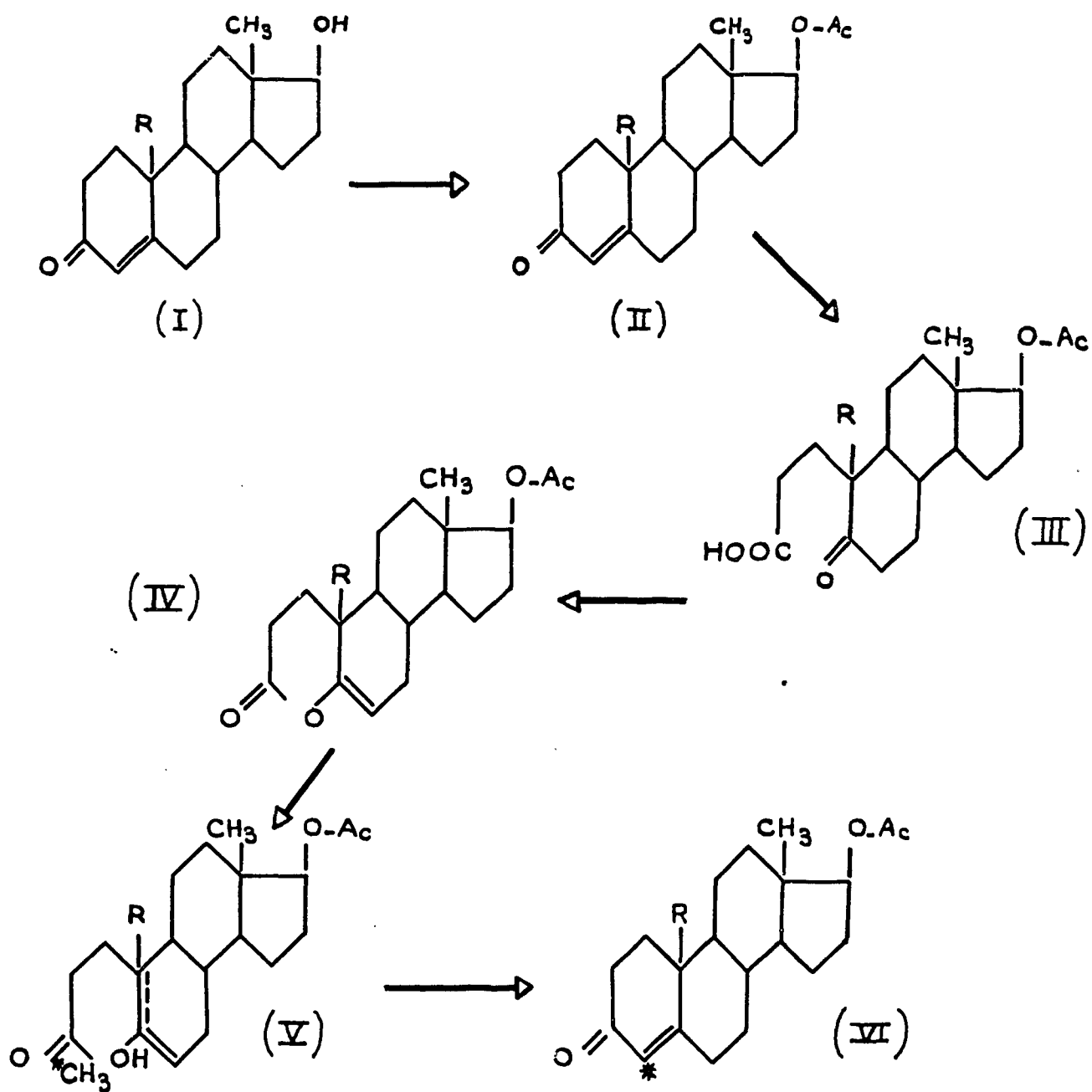
Le ^{14}C est introduit dans la molécule sous forme de $\text{I}^{14}\text{CH}_3\text{Mg}$ préparé selon [5]. La réaction de Grignard sur l'énol-lactone (IV) conduit à une dicétone (V) qui est ensuite cyclisée en acétate de 19-Nor testostérone (II).

On peut théoriquement utiliser deux méthodes de cyclisation :

- une cyclisation en milieu alcalin : par la soude méthanolique (technique de FUJIMOTO [1]),
- une cyclisation en milieu acide : par un mélange acide acétique, acide chlorhydrique (technique de USKOKOVIC [4]).

Des essais "à blanc" sur l'énol-lactone de testostérone, ont montré la supériorité de la cyclisation en milieu acide (R = 35 p. 100), sur la cyclisation en milieu alcalin (R = 10 p. 100). Un essai de cyclisation en milieu alcalin de l'énol-lactone de 19-Nor testostérone a été négatif ; en milieu acide elle se fait par contre avec un rendement de 25 p. 100.

Le schéma des réactions est le suivant :



R = H ----- 19 Nor TESTOSTERONE $\overset{14}{C}_4$

R = CH₃ ----- TESTOSTERONE $\overset{14}{C}_4$

PARTIE EXPERIMENTALE

I. - Synthèse du 3 oxo, 17 β acétoxy, estra-4-ène $^{14}\text{C}_4$. (acétate de 19-nortestostérone $^{14}\text{C}_4$).

A) Acétate de 19-Nor testostérone (II).

Seule la méthode suivante donne de bons rendements.

2 g de 19-Nor testostérone, solubilisés dans 20 ml de pyridine R.P. et de 20 ml d'anhydride acétique R.P., sont abandonnés 48 heures à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire.

Après avoir concentré la solution, sous pression réduite, sans la chauffer, on précipite l'acétate par 50 ml d'eau et on l'extrait par 100 ml d'éther. La phase organique, lavée par une solution de CO_3Na_2 (5 p. 100) et par de l'eau jusqu'à neutralité est ensuite évaporée sous vide.

Le résidu huileux, solubilisé dans le mélange benzène/pentane (8 V/2 V) est adsorbé sur une colonne d'alumine Merk (H = 5 cm, ϕ = 2 cm), montée dans le benzène, l'acétate est élué par 200 ml de benzène.

On obtient après évaporation du solvant 2 g 200 d'huile qui cristallise spontanément.

Ce résidu est très soluble dans l'éther et on le recrystallise dans le mélange pentane/heptane (8 V/2 V) :

F = 93° - 94° (pentane/heptane)

IR (CHCl_3) pics à 1720 cm^{-1} ; 1670 cm^{-1} ; 1600 cm^{-1} (C = O et Δ)

1255 cm^{-1} (acétate)

870 cm^{-1} (Δ)

Rendement : 90 p. 100.

B) Ozonisation du 17 β acétoxy 19-Nor testostérone (III).

2 g 600 d'acétate de 19-Nor testostérone sont solubilisés dans 65 ml d'acétate d'éthyle et 15 ml d'acide acétique (ces solvants sont fraîchement redistillés). La solution est refroidie à -10°C, puis mise à ozoniser (pression d'oxygène 0,5 kg/cm², puissance 60 W) pendant 40 minutes ; la température de la solution est maintenue à -10°C durant l'ozonisation.

L'ozonide est détruit par addition de 3 ml d'acide acétique, de 10 ml d'eau distillée et de 2 ml d' H_2O_2 à 50 volumes. On abandonne le tout durant une nuit. Le lendemain matin on ajoute encore 1 ml d' H_2O_2 , et on concentre sous vide, sans chauffer, aux 2/3 du volume initial.

On dilue par 200 ml d'eau et on extrait par trois fois 100 ml d'éther.

Le seco acide (III) est extrait de la phase étherée par lavage avec de la soude N glacée. On effectue cinq lavages par 50 ml de NaOH chaque fois. Chacun des extraits est neutralisé séparément, à froid, par 5 ml de HCl fumant. Le seco acide précipite en milieu acide (précipité blanc abondant).

Le premier extrait contient un large excès d'acétate de Na et peu de seco acide.

Les deuxième, troisième et quatrième extraits contiennent de l'acide d'ouverture.

Le cinquième extrait ne se trouble pas par acidification.

Les extraits 2, 3 et 4 sont réunis et extraits par 200 ml d'éther. La phase étherée est lavée à l'eau, jusqu'à neutralité, séchée sur Sikkon et évaporée à sec. Le résidu est une huile incolore qui cristallise difficilement à froid au bout de 48 heures, en présence de MeOH.

$F = 113^{\circ} - 115^{\circ}$ $R = 80 \text{ p. } 100$
pics à $1720^{\text{cm}^{-1}}$, $1700^{\text{cm}^{-1}}$, $1254^{\text{cm}^{-1}}$, $1025^{\text{cm}^{-1}}$

Structure confirmée par spectrophotométrie I. R. (KBr)

C) Synthèse de l'énol-lactone (IV).

Le produit brut partiellement cristallisé (2 g 040) est solubilisé dans 20 ml d'anhydride acétique fraîchement redistillée sur acétate de sodium fondu, puis porté à reflux pendant 90 minutes sous un léger courant d' N_2 . On ajoute alors 0,2 g d'acétate de sodium fondu et on maintient le reflux et le courant d' N_2 pendant encore trois heures. Les solvants sont évaporés sous vide, le résidu est repris dans l'éther et lavé à l'eau ; par évaporation de l'éther on obtient une huile rougeâtre qui cristallise spontanément en présence de pentane ou de méthanol.

On doit recrystalliser plusieurs fois le mélange brut dans le système $C_2H_5OH_2O$ (1 V/1 V). Il faut éviter de chauffer trop énergiquement l'énol-lactone durant les recrystallisations et les dissolutions dans le solvant.

On obtient 658 mg de feuilles plates très peu colorées.

$F = 120^{\circ} - 129^{\circ}$

$[\alpha]_D = -26^{\circ} (CHCl_3)$

I. R. ($CHCl_3$) pics à $1725^{\text{cm}^{-1}}$, $1675^{\text{cm}^{-1}}$ ($C=O$ et Δ)

$1250^{\text{cm}^{-1}}$ (acétate)

$1150^{\text{cm}^{-1}}$, $1125^{\text{cm}^{-1}}$ (lactone)

$R = 32 \text{ p. } 100.$

(Cette énol-lactone peu stable, se détruit parfois au cours de la recrystallisation qui cependant est un stade indispensable).

Au cours de cette cyclisation la présence d'humidité diminue le rendement.

D) Magnésien sur l'énol-lactone.

Nous avons utilisé l'appareil schématisé dans la figure n° 1 pour réaliser le magnésien et son transfert sur la solution d'énol-lactone.

a) Préparation de l' $I^{14}CH_3Mg$.

2 matomes de magnésium (50 mg de Mg "Fluka") sont placés dans le ballon de 50 ml. On chauffe sous vide, sur la rampe, le ballon et la magnésium, avec un chalumeau, pour se débarrasser des traces d'humidité. On recommence plusieurs fois cette opération en

évitant de faire fondre les graisses des rodages. On condense ensuite dans ce ballon 5 ml d'éther anhydre (conservé sur AlH_4Li) et 2 m Moles de I^{14}CH_3 (20 mC/m Mole). L' I^{14}CH_3 est desséché par passage sur P_2O_5 . (La pureté de l' ICH_3 synthétisé selon 5 a été vérifiée par chromatographie en phase aqueuse : colonne de "Halcomid M 18"¹⁾, $t = 50^\circ\text{C}$).

Dès que les réactifs sont condensés, on scelle avec un chalumeau l'étranglement "A". Le Mg est rapidement attaqué et la solution de $\text{I}^{14}\text{CH}_3\text{Mg}$ limpide.

b) Condensation de l' $\text{I}^{14}\text{CH}_3\text{Mg}$.

Dans le ballon de 100 ml on place 2 m Moles d'énol-lactone (660 mg). On condense dans ce ballon 50 ml de benzène RP anhydre (conservé sur AlH_4Li) et 30 ml d'éther (conservé sur AlH_4Li). On scelle en "B" et après avoir cassé la "queue de cochon" "C" on transfère la solution de magnésien sur l'énol-lactone. Ce transfert est quantitatif et ne s'accompagne d'aucune contamination. L'addition de magnésien entraîne immédiatement un abondant précipité blanc. On maintient la suspension à 25°C pendant 6 heures, avec agitation magnétique.

c) Destruction de l' $\text{I}^{14}\text{CH}_3\text{Mg}$ en excès et extraction du dérivé méthylé (V).

La suspension est décomposée par un excès d' HCl 2 N (30 ml) on chauffe légèrement pour favoriser la décomposition. On rince le ballon par 30 ml de benzène. Les phases organiques réunies sont lavées plusieurs fois par du CO_3Na_2 et de l'eau, jusqu'à neutralité. Après passage sur Sikkon, elles sont évaporées à sec = résidu huileux de 630 mg.

Pour identifier sommairement les produits des réactions, la chromatographie sur "plaques" ne nous ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes adressé à la chromatographie de "partage" sur papier, en employant le système de SAVARD [6] : une bandelette de papier Whatman n° 1 est imprégnée uniformément par un mélange de propanediol 1, 2/méthanol (1/1 en volume). Elle est ensuite essuyée soigneusement entre deux feuilles de papier filtre.

Après dépôt du produit à identifier le chromatogramme placé dans une cuve peut être aussitôt développé par de la ligroïne saturée de propanediol 1, 2.

Le développement dure de 4 à 5 heures et est fonction de l'imprégnation du papier. On retire le chromatogramme quand le front est à 5 cm environ du bord inférieur de la feuille et on le place une demi-heure dans une étuve à 80°C .

Le chromatogramme peut être alors, soit révélé par le réactif de Zimmerman, soit enregistré directement.

Un chromatogramme du produit brut de la réaction de Grignard montre trois pics d'inégale intensité :

- un dôme de $R_F = 0,64$ très faible
- un pic de $R_F = 0,15$ important correspond au produit méthylé isolé au cours d'une synthèse "à blanc",

1) Nom commercial du N-N diméthylstéaramide de C. . Hall Company Chicago U.S.A.

- un pic de $R_F = 0,04$ faible n'est pas identifié.

d) Cyclisation (VI)

Le résidu est solubilisé dans 15 ml d'acide acétique RP et 1,5 ml d'HCl fumant. On place le tout sous courant d' N_2 pendant 48 heures à 25°C.

Les acides sont évaporés sous vide. Le résidu sec coloré, incristallisable est solubilisé dans 15 ml de benzène.

La phase organique est lavée jusqu'à neutralité. Les solvants sont évaporés et le résidu (560 mg) chromatographié sur colonne.

Une chromatographie de partage sur papier du produit brut montre l'existence de trois composés radioactifs :

- un produit, très peu polaire $R_F = 0,90$
- un produit, plus polaire, ayant un R_F identique à l'acétate de 19-nortestostérone, et de plus absorbant à 240 mμ (présence d'une cétone α-éthylénique) $R_F = 0,50$.
- un produit très polaire, restant pratiquement sur la ligne de départ, $R_F = 0,04$.

On monte une colonne d'alumine MERCK, dans du pentane RP, hauteur de la colonne d'adsorbant : 48 cm, diamètre intérieur : 2 cm.

Les 560 mg sont solubilisés dans le mélange benzène 1 V/pentane 3 V.

Le volume de chaque éluant est de 25 ml en 10 minutes.

Un chromatogramme "de partage" est réalisé sur chaque fraction (en employant le système de Savard et en enregistrant les chromatogrammes).

Eluats n°	Solvants utilisés	Chromatogramme de partage
Fixation	benzène 1 V/pentane 3 V	-
$E_1 \longrightarrow E_{10}$	benzène 1 V/pentane 3 V	impureté peu polaire $R_F = 0,90$
$E_{11} \longrightarrow E_{17}$	benzène 2 V/pentane 3 V	$R_F \neq 0,90$
$E_{18} \longrightarrow E_{24}$	benzène 1 V/pentane 1 V	$R_F \neq 0,90$
$E_{25} \longrightarrow E_{31}$	benzène 2 V/pentane 1 V	$R_F \neq 0,90$
$E_{32} \longrightarrow E_{34}$	benzène 3 V/pentane 1 V	Ac. de 19-Nor + impureté peu polaire
$E_{35} \longrightarrow E_{39}$	benzène 3 V/pentane 1 V	Ac. de 19-Nor pur $R_F = 0,5$
$E_{40} \longrightarrow E_{52}$	benzène	$R_F \neq 0,50$
$E_{52} \longrightarrow E_{54}$	benzène 9 V/éther 1 V	impureté plus polaire + ac. 19-Nor

Les fractions de E_{35} à E_{52} sont rassemblées.

Le dosage donne une activité globale de 8 mC 2.

Rendement en activité 17,5 p. 100 à partir du $^{14}\text{Ba CO}_3$ de départ.

Les fractions de E_1 à E_{34} sont également rassemblées. L'activité totale de ces fractions, essentiellement constituées du composé peu polaire, est de 4,2 mC.

Pour affirmer l'identité du produit de $R_F = 0,50$ avec de l'acétate de 19-Nortestostérone, nous nous basons que :

1° - l'identification au cours d'essais "à blanc" par spectrographie infra-rouge du produit avec de l'acétate de 19-Nortestostérone de référence.

2° - un spectre infra-rouge du produit "actif" identique en tous points à un spectre d'acétate de 19-Nor "inactif".

3° - un point de fusion, du produit brut obtenu après évaporation d'une fraction de la solution "active", produit spontanément cristallisé $F = 92^\circ - 93^\circ$.

4° - l'absorption dans l'U.V. caractéristique d'une double liaison conjuguée à une fonction cétonique.

II. - Synthèse de 3 oxo, 17 β acétoxy androsta-4-ène, $^{14}C_4$. (acétate de testostérone).

A) Acétate de testostérone.

Deux méthodes peuvent être employées :

a) acétylation par l'anhydride acétique, à froid, en présence de pyridine. Le protocole est celui décrit pour la 19-Nortestostérone.

b) acétylation par reflux dans l'anhydride acétique. 2 g de testostérone sont mis en solution dans 10 ml d'anhydride acétique. On porte à reflux 45 minutes et l'acétate est précipité par addition lente d'eau, il apparaît sous forme d'aiguilles que l'on peut recristalliser.

$F = 140^\circ - 142^\circ$

IR ($CHCl_3$) pics. à $= 1720^{cm-1}$, 1670^{cm-1} , 1600^{cm-1} , 1255^{cm-1} , 1040^{cm-1} ,
 870^{cm-1}

B) Ozonisation de l'acétate de testostérone.

Etape en tous points identique à celle de la 19-Nortestostérone.

Nous devons signaler cependant que nous n'avons pas obtenu le 17 β acétoxy, 5 oxo, 3 oïque, 3-5 seco, 4 Nor-androstane à l'état cristallisé.

C) Synthèse de l'énol-lactone.

Seule la méthode de Hartman (voir émolisation des 19-Nor) nous a donné de bons rendements.

L'énol-lactone est stable, et recristallise facilement dans le mélange méthanol-eau, en aiguilles légèrement colorées. On doit effectuer deux recristallisations :

F = 120° - 122°

IR (CHCl₃) pics à : 1720^{cm-1}, 1600^{cm-1}, 1250^{cm-1} (acétate)
1160^{cm-1}, 1140^{cm-1} (lactone)

R = 46 p. 100

D) Magnésion sur l'énol-lactone et cyclisation.

Le protocole est le même que pour la 19-Nor.

Après cyclisation on chromatographie le produit brut sur colonne d'alumine Merck. Colonne montée dans le pentane RP. Le résidu est solubilisé dans le minimum de benzène, et on ajoute du pentane : rapport final 4 volumes de pentane pour 1 volume de benzène. Au cours de l'addition du pentane on observe un flou : c'est le composé le plus polaire qui floccule, ne pas s'en inquiéter et continuer l'addition jusqu'au rapport 4 V/1 V.

On adsorbe la solution au sommet de la colonne (contenant en poids de 30 à 40 fois le poids du produit brut à chromatographier).

On développe en commençant par un mélange benzène 1 volume, pentane 4 volumes, et en augmentant la polarité (cf 19-Nor). L'élution doit être lente l'acétate de testostérone sortira au benzène pur, vers la 40^{ème} fraction de 25 ml. Il est utile de "forcer" un peu sur le mélange benzène 3 V/pentane 1 V, qui doit éluer complètement le composé moins polaire (R_F = 0,91).

Pour une activité totale de 35 mC 5 (en MeOH) nous avons retrouvé :

11 mC sous forme d'acétate de testostérone (activité spécifique 20 mC/mM,

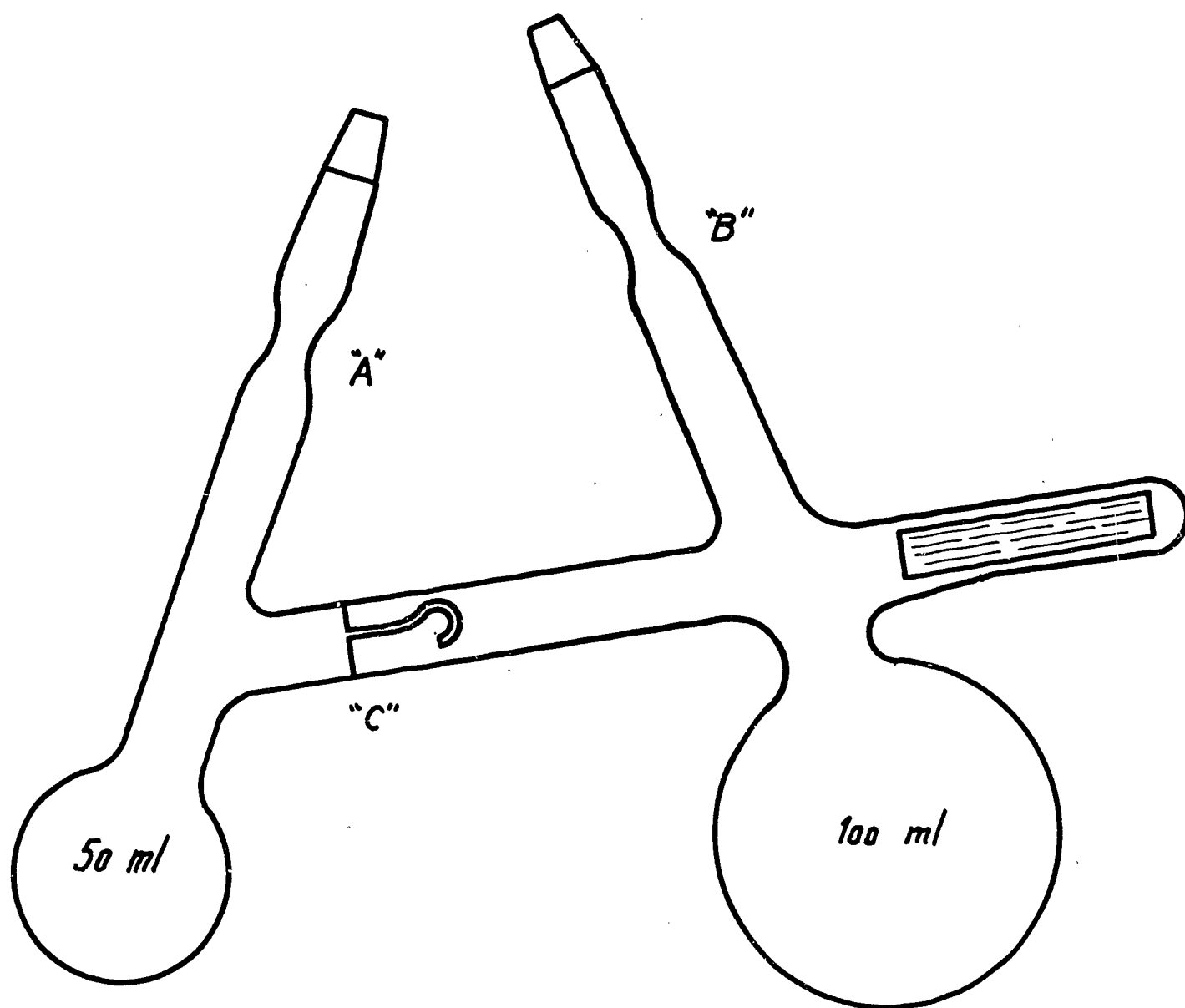
2 mC sous forme de composé moins polaire.

Rendement total : 30 p. 100 (en activité à partir du méthanol).

Pour confirmer la structure de l'acétate de testostérone, nous nous sommes adressé aux critères suivants :

- mobilité chromatographique,
- spectre infra-rouge, point de fusion F = 140° - 142°

Manuscrit reçu le 25 octobre 1962



Appareil utilisé pour la réaction GRIGNARD

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FUJIMOTO G.I.
J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1856

- [2] HARTMAN J.A.
J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5151

- [3] HARTMAN J.A., TOMASEWSKI A.J. and DREIDING A.S.
J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5662

- [4] USKOKOVIC M. and GUT M.
J. Org. Chem., 1957, 22, 996

- [5] BARET C. et PICHAT L.
Rapport C.E.A. n° 99 (novembre 1951)

- [6] SAVARD K.
J. Biol. Chem., 1953, 202, 457.