

## Synthèse de Stéroïdes Tritiés en C<sub>16</sub>

S. WEINMAN, J. LIVET

Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine, 45, rue des Saints Pères,  
Paris

Reçu le 2 septembre 1968

### SUMMARY

*A general method for the preparation of 16-tritiated 17 $\alpha$ -hydroxy and 17 $\alpha$ ,21-dihydroxy pregnane-steroids is related.*

*It consists in a two step sequence :*

- hydrogen bromide opening of the corresponding 16,17 $\alpha$ -epoxide.*
- catalytic debromination of the bromhydrin with tritium gas.*

*Purification is performed by saponification, thin-layer chromatography on silica gel and column chromatography of Celite.*

*Recrystallization with a carrier attests purity and radioactive homogeneity of the labelled compound.*

### RÉSUMÉ

*Une méthode générale de préparation de stéroïdes de type 17 $\alpha$ -hydroxy et 17 $\alpha$ ,21dihydroxy prégnanestéroïdes tritiés en 16 est présentée dans ce travail.*

*Elle consiste en la formation d'un dérivé 16 $\beta$  bromé, suivie d'une hydrogénolyse sous l'action du tritium gaz donnant lieu au dérivé 16-<sup>3</sup>H.*

*La purification est réalisée au moyen d'une saponification non dénaturante suivie de chromatographie sur couche mince de gel de silice et de chromatographie sur colonne de celite.*

*La cristallisation en présence d'un entraîneur non radioactif rend compte de la pureté et de la radiohomogénéité du produit.*

Il est nécessaire, pour l'étude des transformations métaboliques des stéroïdes au sein de certains tissus, de disposer de prégnane-stéroïdes hydroxylés en C<sub>17</sub> ou dihydroxylés en C<sub>17</sub> et en C<sub>21</sub>, marqués par un isotope radioactif.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherches avec l'Euratom (N° 092-67-1RISF)

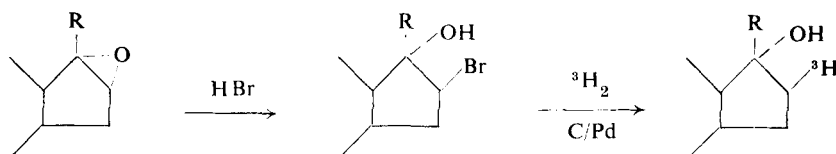
Un certain nombre d'entre eux sont actuellement disponibles :

- 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone 4-<sup>14</sup>C (RCA\*, NEN\*) ou 7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H (NEN)
- 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone 7  $\alpha$ -<sup>3</sup>H (NEN)
- 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprogestérone 4-<sup>14</sup>C (NEN) ou 7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H (NEN) ou 1,2 <sup>3</sup>H (CEA\*).

Dans ce travail, nous nous sommes attachés à mettre au point une méthode générale de préparation de stéroïdes de ce type, répondant aux impératifs suivants :

- le marquage est réalisé par l'introduction d'un atome de tritium en une position déterminée;
- la purification est réalisable par chromatographie;
- l'activité spécifique peut être élevée;
- dans les conditions de stockage convenables, le produit radioactif ne doit pas se décomposer de façon importante.

Pour atteindre ce but, nous avons fixé notre choix sur une méthode de synthèse en deux étapes qui, du point de vue chimique, est satisfaisante.



- a) formation d'un dérivé 16 $\beta$ -bromo 17 $\alpha$ -hydroxy par action de l'acide bromhydrique en milieu acétique sur un  $\alpha$ -époxyde-16-17.
- b) formation d'un dérivé 16-<sup>3</sup>H par action du tritium, en présence de charbon palladié, sur le corps précédemment obtenu.

Nous avons choisi comme technique de purification :

- une saponification non dénaturante des groupes acétoxy protégeant les groupes hydroxyles lors de l'exposition au tritium;
- une chromatographie sur couche mince de gel de silice, suivie d'élution;
- une chromatographie sur colonne de celite dans un ou plusieurs systèmes.

Nous avons enfin testé la pureté et la radiohomogénéité de nos produits par cristallisation en présence d'entraîneur et mesure de la radioactivité dans les cristaux et les eaux-mères.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### SYNTHÈSE

La méthode de synthèse proprement dite est la même pour les 4 stéroïdes. Le corps de départ est un  $\alpha$ -époxyde 16-17, dont tous les éventuels hydroxyles sont acétylés :

\* RCA : Radiochemical Centre Amersham; NEN : New England Nuclear Corporation; CEA : Commissariat à l'énergie Atomique, France.

- 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy 3,20-dioxoprégna 4-ène (F : 210-211° C) (1)
- 3 $\beta$ -acétoxy 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy 20-oxoprégna-5-ène (F : 160-161° C) (2)
- 21-acétoxy 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy 3,20-dioxoprégna-4-ène (F : 172-173° C) (3)
- 3 $\beta$ ,21-diacétoxy 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -époxy 20-oxoprégna-5-ène (F : 178-180° C) (4)

Le corps de départ est dissous dans l'acide acétique (en général dans la proportion de 1 g de stéroïde dans 100 ml); à cette solution, on ajoute un mélange acide bromhydrique-acide acétique dans la proportion de 2 ml pour 1 g de stéroïde et on laisse réagir pendant 30 minutes à la température du laboratoire (environ 22° C) <sup>(5)</sup>. On précipite alors par l'eau et lave le précipité jusqu'à neutralité des eaux de lavages. Sans cristalliser le produit, on le dissout dans le minimum de méthanol (0,2 à 0,5 ml) et on effectue la tritiation <sup>(6, 7)</sup> par le tritium gaz enrichi à 95 % (CEA), dilué au 1/10<sup>e</sup> après fixation sur le piège, en présence de charbon palladié à 10 % dans les proportions de 100 mg de catalyseur pour 1 g de stéroïde et également en présence d'acétate d'ammonium pour éviter la réduction des doubles liaisons, à raison de 500 mg d'acétate d'ammonium pour 100 mg de catalyseur. Le mélange est agité pendant 15 minutes et le corps tritié est extrait de la manière habituelle.

#### PURIFICATION\*.

##### *17 $\alpha$ -hydroxy progestérone 16-<sup>3</sup>H.*

Dissolution du stéroïde dans la potasse méthanolique à 1 % et agitation pendant 15 minutes; réextraction et lavages selon la méthode habituelle.

Chromatographie sur couche mince de gel de silice, système : hexane acétone (3/1), deux passages; élution de la zone correspondant au témoin (tache fluorescente à 254 m $\mu$ ).

Chromatographie sur colonne de celite dans le système : isooctane-benzène-méthanol-eau (6/4/4/1) de l'éluat précédent et rechromatographie du cœur du pic obtenu dans le même système.

L'activité spécifique du stéroïde purifié est de 1,68 C/mM. Le rendement de marquage est de 56 %.

Stockage dans un mélange toluène-méthanol 9/1, à la température de 0° à + 4° C, à la concentration de 10  $\mu$ C/ml.

##### *17 $\alpha$ -hydroxy prégnénolone 16 $\alpha$ -<sup>3</sup>H.*

Nous avons été amenés à étudier les conditions d'une saponification non dénaturante : choix d'une base (potasse, soude, carbonate, carbonate acide), concentration, température, temps de réaction.

Nous sommes arrivés à la conclusion qu'une ébullition dans la potasse méthanolique à 1,5 % pendant 30 minutes saponifie complètement l'acétate

\* Le comptage de la radioactivité due au tritium est réalisé sur un compteur Packard-Tricarb (modèle 3315 avec contrôle automatique des rendements par étalonnage externe).

de 17 $\alpha$ -hydroxy-prégnénolone sans apporter d'altération. Ce traitement a, de plus, pour effet de débarrasser le corps sortant d'une tritiation, des atomes de tritium qui auraient pu éventuellement se fixer, d'une façon labile et incontrôlable, en différentes positions dans la molécule. La cinétique de cette saponification a été suivie par chromatographie sur couche mince de gel de silice, élution et caractérisation du ou des produits ainsi isolés par les techniques habituelles (cristallisation, point de fusion, spectre infrarouge, etc...).

Chromatographie sur couche mince de gel de silice, système : hexane-acétone (3/1), deux passages; élution de la zone correspondant au témoin et à la tache fluorescente.

Chromatographie sur colonne de celite dans le système: isooctane-benzène-méthanol-eau (5/5/4/1), de l'éluat de la chromatographie sur couche mince. Le cœur du pic correspondant à la 17 $\beta$ -hydroxy prégnénolone est à nouveau chromatographié sur colonne de celite dans le système : hexane-benzène-formamide, (4/6/10) ou dans le système précédent.

Cristallisation avec de la 17 $\alpha$ -hydroxy prégnénolone pure dans le méthanol; deux cristallisations successives dans ce solvant donnent une radiohomogénéité de 99 %. Un résultat identique est obtenu avec l'éthanol.

Le produit après purification a une activité spécifique de 1,21 C/mM. Le rendement de marquage est de 40 %.

Le produit est conservé dans un mélange toluène-méthanol (9/1) à la température de 0° C à +4° C, à la concentration de 10  $\mu$ C/ml.

#### *17 $\alpha$ ,21-dihydroxy progestérone 16-<sup>3</sup>H.*

Ici encore, nous avons été amenés à étudier les conditions optimum de saponification; en milieu alcalin, ce corps est extrêmement fragile et nous saponifions par une solution hydro-alcoolique de carbonate de potassium à 1 %, pendant 30 minutes, à la température de 20° C.

Chromatographie sur couche mince de gel de silice suivie d'élution; le système précédemment utilisé hexane-acétone (3/1), convient ici encore très bien pour la séparation préparative.

Chromatographie sur colonne de celite dans le système: isooctane-benzène-méthanol-eau (5/5/4/1), suivie d'une deuxième chromatographie du cœur du pic.

Le produit obtenu a une activité spécifique de 1,54 C/mM. Le rendement de marquage est de 51 %.

Cristallisation avec le produit pur et mesure de la radioactivité dans les cristaux et dans les eaux-mères. On obtient 98 à 99 % de radiohomogénéité, tant avec le méthanol qu'avec l'acétone.

Le produit est conservé dans un mélange toluène-méthanol (9/1), à la température de 0° à +4° C à des concentrations de 10  $\mu$ C/ml et 100  $\mu$ C/ml.

*17 $\alpha$ ,21-dihydroxy prégnénolone 16-<sup>3</sup>H.*

Saponification par le carbonate de potassium en solution hydroalcoolique à 1 % pendant 2 h à 40  C.

Chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le système : hexane-acétone (3/1), deux passages, suivie d'élution.

Chromatographie sur colonne de celite dans le système : isooctane-benzène-méthanol-eau (4/6/4/1), répétée deux fois comme dans les cas précédents.

Le produit obtenu a une radioactivité spécifique de 1,89 C/mM. Le rendement de marquage est de 63 %.

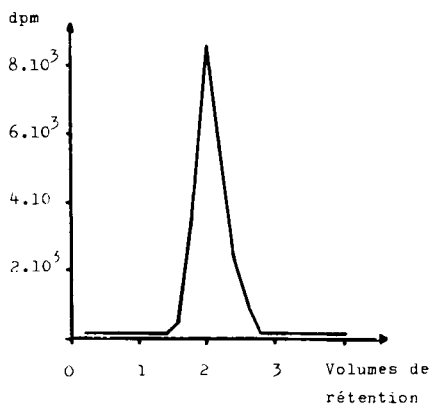


FIG. 1. Radiochromatogramme de 17 $\alpha$ -hydroxy-prégnénolone après chromatographie sur colonne de celite : système hexane benzène, formamide, 4/6/10. Durée de conservation : 6 mois.

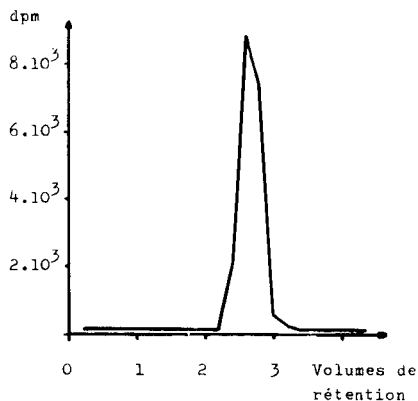


FIG. 2. Radiochromatogramme de 17 $\alpha$ -hydroxy progestérone après chromatographie sur colonne de celite : système isooctane-benzène-méthanol-eau (6/4/4/1). Durée de conservation : 1 an.

Cristallisations avec un entraîneur donnant une radiohomogénéité de 100 %.

Le produit est conservé dans un mélange toluène-méthanol (9/1) à la température de 0° à +4° C, à des concentrations de 10 et de 100  $\mu$ C/ml.

#### CONSERVATION.

Après un laps de temps indiqué, une fraction aliquote de la solution est chromatographiée sur colonne de celite.

Les chromatogrammes reproduits dans les figures 1 et 2 montrent que, dans les conditions choisies, la conservation est excellente et que la dénaturation n'affecte pas plus de 2 à 3 % du produit après 6 mois ou 1 an de stockage.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. KOMENO, T. — *Chem. Pharm. Bull., Tokio*, **8** : 680-7 (1960).
2. LÖKEN, B., KAUFMANN, S., ROSENKRANZ, G. et SONDHEIMER, F. — *J. Am. Chem. Soc.*, **78** : 1738-41 (1956).
3. JULIAN, P. L., MEYER, E. W., KARPEL, W. J. et WALLER, I. R. — *J. Am. Chem. Soc.*, **72** : 5145-7 (1950).
4. DJERASSI, C. et LENK, C. T. — *J. Am. Chem. Soc.*, **76** : 1722-5 (1954).
5. HALPERN, O. et DJERASSI, C. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81** : 439 (1959).
6. ROCHE, J., NUNEZ, J., JACQUEMIN, Cl. et POMMIER, J. — Actes sur la Conférence sur les Méthodes de Préparation et de Conservation des Molécules Marquées, Bruxelles, 1963. Presses Acad. Eur., 1963, p. 327.
7. NUNEZ, E. A. — *Bull. Soc. Chim. France*, **9** : 2756 (1966).