

Synthese von 4-¹⁴C, 7-³H und Heptanoyl-1'-¹⁴C markiertem 17β-Heptanoyloxy-17α-äthinyl-4-östren-3-on

P. E. SCHULZE

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin

Erhalten den 12. Mai 1969

SUMMARY

A synthesis of a ¹⁴C and ³H labelled 17β-heptanoyloxy-17α-ethinyl-4-oestrene-3-on is described.

The ¹⁴C labelling was performed in the position 4 (VIIa) as well as in position 1' (XII) of the heptanoic acid and the ³H labelling in position 7 (VIIb).

Using Ba¹⁴CO₃ as starting material, the over all yields were 6% (VIIa) and 35% (XII), starting with Tritium 6% (VIIb). The end products were rigorously purified and checked chemically and radiochemically by at least two thin layer systems and a dilution analysis.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Synthese eines ¹⁴C und ³H markierten 17β-Heptanoyloxy-17α-äthinyl-4-östren-3-on beschrieben.

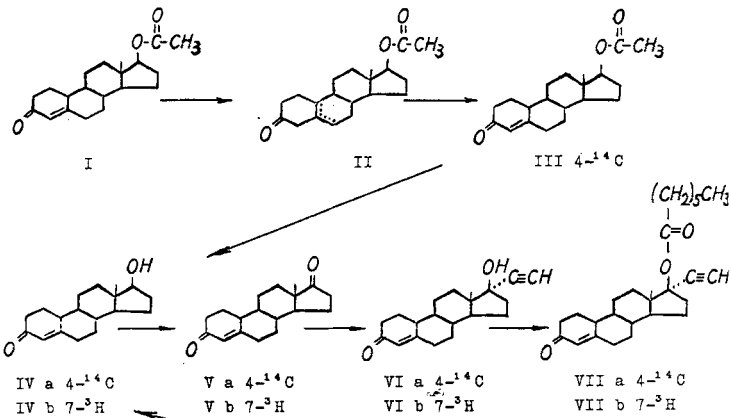
Die ¹⁴C Markierung erfolgte in der Position 4 des Steroidmoleküls (VIIa) sowie in der Position 1' der Oenanthsäure (XII) und die ³H Markierung in Position 7 des Steroidmoleküls (VIIb).

Wir benutzten Ba¹⁴CO₃ als Ausgangsmaterial und erreichten Ausbeuten über alle Stufen von 6% (VIIa) und 35% (XII); ausgehend vom Tritiumgas betrug die Ausbeute 6% (VIIb). Die Endprodukte wurden sorgfältigst gereinigt und der chemische und radiochemische Reinheitsgrad in mindestens zwei Dünnschichtsystemen und einer Verdünnungsanalyse geprüft. Die Verunreinigungen waren <3%.

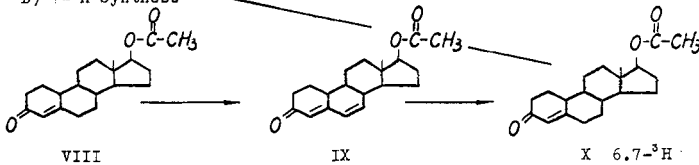
Zur Aufklärung seines Schicksals im Organismus und zum Studium der Stoffwechselkinetik synthetisierten wir 17 β -Heptanoyloxy-17 α -äthynyl-4-östren-3-on markiert mit Kohlenstoff-14 in Position 4 (VIIa) sowie im C-Atom der Carboxylgruppe der Oenanthsäure (XII) und mit Tritium in Position 7 (VIIb). Die Verbindung ist als Modellsubstanz für pharmakologische Untersuchungen über das allgemeine Verhalten langwirkender Depot-Kontrazeptiva interessant (1) *.

FORMELSCHEMA

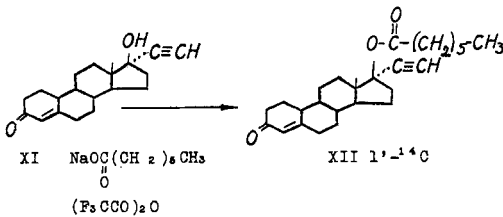
A) 4-¹⁴C Synthese



B) 7-³H Synthese



C) 1'-¹⁴C Synthese



* 17 β -Heptanoyloxy-17 α -äthynyl-4-östren-3-on wird unter der Kennziffer SH 393 von der Schering AG klinisch geprüft .

Für die $4\text{-}^{14}\text{C}$ Markierung (I bis III) wählten wir das von Fujimoto ⁽²⁾ erstmalig publizierte Verfahren (Ozonisierung, Lactonisierung, Grignardierung) und erreichten in verschiedenen Ansätzen Reinausbeuten an 17β -Acetoxy-4-östren-3-on- $4\text{-}^{14}\text{C}$ (III) zwischen 30 und 40 %, bezogen auf Methyljodid- ^{14}C . Das 17-Acetat wurde in wäßrig methanolischer Lösung mit 4 n-KOH verseift und der Alkohol nach Jones zum 17-Keton (Va) oxydiert. Die Aethinierung des gereinigten 4-Oestren-3.17-dions- $4\text{-}^{14}\text{C}$ (Va) wurde nach dem Druckverfahren ⁽³⁾ im Autoklaven vorgenommen. Die Ausbeuten dieser mikro Druckansätze lagen bei 60 %, etwa 10 % nicht umgesetztes 4-Oestren-3.17-dion- $4\text{-}^{14}\text{C}$ (Va) wurden zurückgewonnen.

Die übliche Veresterungsmethode, Erhitzen von 17β -Hydroxy- 17α -äthynyl-4-östren-3-on in Pyridin/Oenanthsäureanhydrid unter Stickstoff, erwies sich als wenig schonend. Wir veresterten daher in trockenem Benzol mit 10 Äquivalenten Oenanthsäure unter Zusatz katalytischer Mengen Trifluoressigsäureanhydrid ⁽⁴⁾. Dabei fiel der Ester (VIIa) in ca. 70 %iger Ausbeute an; ca. 15 % unverestertes Steroid (VIa) wurden zurückgewonnen.

Die radiochemische Ausbeute über alle Stufen, bezogen auf $\text{Ba-}^{14}\text{CO}_3$, betrug ca. 6 %, die spezifische Aktivität ca. 9 mc/mMol.

Als Vorstufe für die Tritiumeinführung in Position 7 stellten wir aus 17β -Acetoxy-4-östren-3-on (VIII) durch Enolacylierung, Bromierung und HBr-Abspaltung das 17β -Acetoxy-4.6-östradien-3-on (IX) ⁽⁵⁾ her. Mit Pd/ CaCO_3 Katalysator wurde bis zur Aufnahme von einem Mol Tritium/Wasserstoff hydriert und das erhaltene Stoffgemisch durch präparative Schichtchromatographie getrennt. Beim alkalischen Verseifen zur 17β -Hydroxyverbindung (IVb) wurde gleichzeitig durch Enolisierung das Tritium aus Position 6 entfernt. Die Oxydation verlief analog der $4\text{-}^{14}\text{C}$ Synthese. Bei der Aethinierung hatten Vorversuche gezeigt, daß die übliche Druckäthinierung bei Material höherer spezifischer Aktivität (ca. 1 c/mMol) nicht anwendbar war. Beim Aufarbeiten des Reaktionsgutes blieben über 60 % der Radioaktivität im Fällungswasser und beim Trennen bis zu 75 % der noch vorhandenen Radioaktivität am Start. Für die Aethinierung wendeten wir daher keine höheren spezifischen Aktivitäten als 100 mc/mMol an *. Die Veresterung zum Oenanthat verlief analog der $4\text{-}^{14}\text{C}$ Synthese. Die radiochemische Ausbeute an $7\text{-}^3\text{H}$ markiertem VIIb über alle Stufen, bezogen auf ^3H Gehalt des Hydriergemisches, betrug ca. 6 %, die spezifische Aktivität 40 mc/mMol.

Für die Synthese C benutzten wir Oenanthsäure- $1\text{-}^{14}\text{C}$, die durch ^{14}C Carboxylierung der Grignardverbindung des 1-Chlorhexans erhalten und in 70 % iger Ausbeute als Natriumönanthat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ isoliert wurde. Zur Vereste-

* Inzwischen wurde eine modifizierte Druckäthinierung erarbeitet, bei der auch 4-Oestren-3.17-dion- $7\text{-}^3\text{H}$ beliebig hoher spez. Akt. eingesetzt werden kann. Veröffentlichung in Vorbereitung.

rung wurde aus dem Natriumönanthat-1-¹⁴C in trockenem Benzol durch Zugabe von Trifluoressigsäureanhydrid freie Oenanthsäure-1-¹⁴C bzw. partiell das gemische Anhydrid hergestellt. Um einen möglichst großen Anteil der Oenanthsäure-1-¹⁴C zum Verestern benutzen zu können, setzten wir das Steroid im dreifachen Ueberschuß ein und trennten den nicht umgesetzten Anteil wieder ab. Die radiochemische Ausbeute der Synthese betrug ca. 35%, bezogen auf Ba-¹⁴CO₃, die spezifische Aktivität ca. 10 mc/mMol.

Die Steroidester-¹⁴C Markierung im C₁-Atom der veresternden Fettsäure läßt sich vergleichen mit der stoffwechsel-labilen 17 α -³H Markierung von Steroidalkoholen bzw. Steroidestern⁽⁶⁾. Während bei der ¹⁴C Markierung — *in vivo* — nach enzymatischer Verseifung über den Fettsäureabbau ¹⁴CO₂ entsteht, das in der Atemluft gemessen werden kann (Radiospirometrie)⁽⁷⁾, wird bei der stoffwechsel-labilen 17 α -³H Markierung über die Atmungskette THO gebildet, das ebenfalls gemessen werden kann und nun seinerseits ein Maß für die Verseifungs- und Oxydationsgeschwindigkeit des betreffenden Steroids ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert, sie wurden mit dem Kofler-Mikro-Heiztisch bestimmt. Die chemische und radiochemische Reinheit wurde durch Dünnschichtchromatographie (DC), Radio-Gaschromatographie (RGC) und Verdünnungsanalyse (VA) gesichert.

DC-Systeme : Cyclohexan/Essigester	90 : 60 (C/E 1)
Cyclohexan/Essigester	90 : 30 (C/E 2)
Cyclohexan/Essigester	90 : 20 (C/E 3)
Chloroform/Aceton	90 : 10 (C/A 1)
Chloroform/Aceton	95 : 5 (C/A 2).

DC-präparativ :

2 mm dicke Platten, Silicagel, Fa. Merck PF 254,3 Stdn. bei 110° aktiviert.

Alle über präparative DC-Platten getrennten Substanzen wurden mit Aceton vom Schichtmaterial eluiert, zur Trockne eingengt, mit Methylchlorid aufgenommen und von Spuren Silicagel durch Absaugen über eine G-4-Fritte befreit.

Die RGC wurde mit einem modifizierten PERKIN-ELMER F7G in Verbindung mit einem RGC 170 der Fa. Berthold ausgeführt, Tritiummessung durch hydrierende Crackung⁽⁸⁾. Die Abweichungen innerhalb der VA, bei einer Verdünnungsrate von $1 \times 10^0 : 1 \times 10^6$, waren <3 %.

Die Angaben der Ausbeute gelten, sofern nicht gesondert erwähnt, sowohl für die chemische als auch radiochemische Ausbeute.

4-¹⁴C SYNTHESE

I → II.

6 g (19 mMol) I wurden wie von S. Kushinsky⁽⁹⁾ beschrieben, ozonisiert und lactonisiert. Das Gemisch der $\Delta^{5,6}$ und $\Delta^{5,10}$ Verbindungen wurde nicht aufgetrennt. Ausbeute : 3,6 g (61 % d. Th.) 17 β -Acetoxy-4-oxa-5(6),5(10)-östren-3-on, Fp : 126/128 °C.

II → III.

355 mg (2,5 mMol) ¹⁴CH₃J, 25 mc, wurden unter He in die Grignard-Verbindung überführt und nach S. Kushinsky⁽⁹⁾ mit 795 mg (2,5 mMol) II umgesetzt und die nach Aufarbeiten und saurer Wasserabspaltung erhaltene Rohsubstanz über präp. DC-Platten im System C/E 1 aufgetrennt. Ausbeute : 244 mg (31 % d. Th.) 17 β -Acetoxy-4-östren-3-on-4-¹⁴C (III). Spez.-Akt. : 9,3 mc/mMol, DC : C/E 1, C/A 1.

III → IVa.

244 mg (0,79 mMol) III wurden in 25 ml Methanol gelöst und unter N₂ mit 2,5 ml 4 *n*-KOH innerhalb 16 Std. bei Raumtemperatur verseift. Ausbeute : 196 mg (95 % d. Th.) 17 β -Hydroxy-4-östren-3-on-4-¹⁴C (IVa). DC : C/E 1, C/A 1.

IVa → Va.

196 mg (0,71 mMol) IV, in 10 ml Aceton gelöst, wurden bei 10° innerhalb 15 Min. mit 0,4 ml Jones-Reagenz oxydiert. Nach 30 Min. wurde 0,1 ml Methanol zugegeben, aufgearbeitet und das Rohmaterial über präp. DC-Platten im System C/E 1 aufgetrennt. Ausbeute : 173 mg (90 % d. Th.) 4-Oestren-3.17-dion-4-¹⁴C (Va). Fp : 156-159/160 °C.

Va → VIa.

173 mg (0,63 mMol) Va wurden in 10 ml Tetrahydrofuran (über LiAlH₄ destilliert) gelöst, unter Druck äthinert⁽⁴⁾ und nach Aufarbeiten wurde das Rohmaterial über präp. DC-Platten im System C/E 1 (2 × gelaufen) und nochmals im System C/A 1 aufgetrennt. Ausbeute : 113 mg (60 % d.Th. %) 17 α -Aethinyl-17 β -hydroxy-4-östren-3-on-4-¹⁴C (VIa). Fp : 200-202 °C. Spez.-Akt. : 9,3 mc/mMol, 31,2 μ c/mg. DC : C/E 1, C/A 1; VA aus Methanol. Rückgewinn an Va : 22,5 mg (13 % d. Th.), DC : C/E 1, C/A 1.

VIA \rightarrow VIIa.

Zu 3 ml andestilliertem Benzol wurden 409 mg (3,8 mMol) Oenanthsäure (doppelt destilliert) und 0,71 ml (0,47 mMol, 1,25 Äquivalente, bezogen auf VIa) Trifluoressigsäureanhydrid gegeben; dann 20 Min. bei 40° (intensive Rückflußkühlung) gerührt. Zu dieser Acylierungslösung wurden 113 mg (0,38 mMol, 2 Stdn. bei 100 °C im Hochvakuum getrocknet) VIa gefügt. Es wurde 16 Stdn. bei Raumtemperatur und 2 Stdn. bei 50 °C nachgerührt. Alle flüchtigen Verbindungen wurden mit Wasserdampf abgeblasen, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen und auf präp. DC-Platten im System C/A 2 aufgetrennt. Ausbeute : 93 mg (60% d.Th.) 17 β -Heptanoyloxy-17 α -äthiny-4-östren-3-on-4-¹⁴C (VIIa). Spez.-Akt. : 9,3 mc/mMol, 22,7 μ c/mg. DC : C/E 2 (2 \times gelaufen), C/A 2; VA aus Pentan. Rückgewinn an VIa : 20 mg (18% d.Th.) Reinheitskontrolle wie für VIa.

7-³H SYNTHESE

VIII \rightarrow IX.

Aus 10 g (32 mMol) VIII wurde, wie von Djerassi ⁽⁵⁾ beschrieben, 17 β -Acetoxy-4.6-östradien-3-on (IX) hergestellt. Fp : 113/114 °C, UV : ϵ_{283} : 26 750; DC : C/E 1.

IX \rightarrow X.

31,4 mg (0,1 mMol) IX wurden in 1 ml Essigester (über Natrium destilliert und 1 Std. über Pd/CaCO₃ Katalysator unter Rückfluß gekocht und abdestilliert) gelöst, 10 mg Pd/CaCO₃ Katalysator zugefügt und bis zur Aufnahme von ca. 1 ml, 2,5 c, trägerfreiem ³H hydriert. Das labile ³H wurde durch dreimaliges Behandeln (Auflösen und wieder Einengen) mit je 250 ml Methanol entfernt. Das rohe Hydriergemisch, 38 mg, enthaltend 1,38 c, wurde auf präp. DC-Platten im System C/E 1 vorgetrennt. Im System C/E 3 (4 \times gelaufen) wurde sodann die gesuchte, etwas schneller laufende, 6.7-³H markierte Δ^4 -Verbindung vom inaktiven Ausgangsmaterial abgetrennt. Aus dem Aktivitätsgehalt von 1,09 c errechneten sich 5,45 mg 17 β -Acetoxy-4-östren-3-on-6.7-³H (X).

X \rightarrow IVb.

Das gesamte Material X wurde mit 95 mg inaktivem 17 β -Acetoxy-4-östren-3-on auf 100 mg (0,32 mMol) verschnitten und unter gleichzeitigem Entfernen des semilabilen ³H aus Position 6, in 5 ml Methanol mit 0,25 ml 4 n-KOH 4 Stdn. bei Raumtemperatur verseift.

Mit Essigsäure wurde dann auf pH 5 eingestellt, das labile Tritium im Methanol durch Einengen entfernt und wie üblich aufgearbeitet.

Erneutes Stehenlassen der Substanz in 150 ml Methanol unter N_2 mit 0,5 ml 4 n-KOH bei Raumtemperatur über Nacht ergab noch einen Aktivitätsverlust von ca. 20%. Ausbeute : 101 mg 17β -Hydroxy-4-östren-3-on-7- 3H (IVb). Akt.-Menge : 361 mc.

ivb \rightarrow vb.

83.4 mg (0,3 mMol) IVb wurden bei $+5^\circ$ mit 0,085 ml Jones Reagenz in 3 ml Aceton oxydiert. Ausbeute : 83 mg (100% d. Th.) 4-Oestren-3.17-dion-7- 3H (Vb). Akt.-Menge : 309 mc.

vb \rightarrow vib. — HOHE SPEZIFISCHE AKTIVITÄT.

14 mg (0,05 mMol) Vb, enthaltend 50 mc (3,6 mc/mg), wurden im Rollautoklaven wie für Va beschrieben, äthiniert. Das isolierte Material, $<10\%$, war mit dem gewünschten 17β -Hydroxy- 17α -äthiny-4-östren-3-on-7- 3H nicht identisch. Im DC-Test C/E 1 blieben ca. 75 % der aufgetragenen Aktivität am Start.

v \rightarrow vib. — MITTLERE SPEZIFISCHE AKTIVITÄT.

120 mg (0,44 mMol) Vb, enthaltend 27 mc, 0,225 mc/mg, wurden im Rollautoklaven wie für Va beschrieben, äthiniert. Rohausbeute : 136 mg, Fp : 155/180-191,5 $^\circ C$. Akt.-Menge : 24 mc. Das Rohmaterial wurde präparativ im System C/E 1 getrennt. Ausbeute : 69,2 mg (52,5% d. Th.) 17β -Hydroxy- 17α -äthiny-4-östren-3-on-7- 3H (VIb). Fp : 202/202,5-203 $^\circ C$. DC : C/E 1, C/A 1, VA, RGC; EGS, 1 Meter, He, 200 $^\circ C$ Säulentemperatur. Akt.-Menge : 11,25 mc (41,6% d. Th.) Spez.-Akt. : 48,5 mc/mMol, 163 $\mu c/mg$.

vib \rightarrow viib.

69 mg (0,23 mMol) VIb, enthaltend 11 mc, wurden wie für VIa beschrieben, verestert. Das Rohmaterial wurde im System C/E 2 präparativ getrennt. Ausbeute : 56 mg (58,7% d. Th.) 17β -Heptanoyloxy- 17α -äthiny-4-östren-3-on-7- 3H . DC : C/E 2 ($2\times$ gelaufen), C/A 2, VA, RGC (Bedingungen analog VIb) Akt.-Menge : 6 mc (54% d. Th.). Spez.-Akt. : 43,6 mc/mMol, 0,106 $\mu c/mg$. Rückgewinn an VIb bei der Plattentrennung : 12,8 mc (18,5% d. Th.).

$1'-^{14}C$ SYNTHESE

XI \rightarrow XII.

a) *Natrium-önanth-1- ^{14}C* .

Aus 1,65 g (15 mMol) n-Hexylchlorid (GC : 99%ig), 413 mg (17 mMol) Magnesium und einer Spur Jod, wurde in 10 ml Aether (über $LiAlH_4$ destilliert) unter Helium auf übliche Weise die Grignardverbindung hergestellt. In das

Reaktionsgefäß wurden 5 mMole $^{14}\text{CO}_2$, aus 985 mg (5 mMol) Bariumcarbonat- ^{14}C , enthaltend 50 mc, gezogen und innerhalb von 60 Min. die Temperatur im Reaktionsgefäß unter Rühren von -196°C auf -10°C erhöht; so wurde 20 Min. belassen und das Reaktionsgemisch dann in 10 ml 2 n Schwefelsäure eingegossen, mit 2,5 g Silbersulfat versetzt und mit Wasserdampf die gebildete Oenanthsäure-1- ^{14}C abgeblasen, als Natriumsalz isoliert, aus Aceton umkristallisiert, mit Petroläther gewaschen und bei 100° im Vakuum getrocknet. Ausbeute : 641 mg (84,5% d. Th.), Titration $> 99\%$ ig. Akt.-Menge : 37,5 mc (75% d. Th.). Spez.-Akt. : 8,9 mc/mMol, 58,5 $\mu\text{c}/\text{mg}$.

b) *Veresterung XII.*

100 mg (0,66 mMol) Natrium-önanthat-1- ^{14}C wurden in 15 ml Benzol suspendiert, das Benzol bis auf 5 ml abdestilliert und unter Eiskühlung 346 mg (1,65 mMol), 0,27 ml, Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben. Es wurde 30 Min. bei Raumtemperatur und 30 Min. bei 40° gerührt (intensive Rückflußkühlung). Die Acylierungslösung wurde nun abgekühlt, 590 mg (1,98 mMol) inaktives VII zugefügt und so 16 Stdn. belassen. Die Reaktionslösung wurde ohne weitere Behandlung über präp. DC-Platten im System C/E 2 aufgetrennt. Ausbeute : 137,4 mg (50% d. Th.) 17 β -Heptanoyloxy-1'- ^{14}C -17 α -äthynyl-4-östren-3-on-7- ^3H . DC : C/E 2, C/A 2, VA. Akt.-Menge : 2,56 mc, 7,65 mc/mMol, 18,8 $\mu\text{c}/\text{mg}$.

* * *

Ich danke Herrn J. Kaufmann und Herrn J. Balzer für geschickte Mitarbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

1. KOLB, K.-H. und SCHULZE, P. E. — Vortrag : Radioisotope in Pharmakokinetik und klinischer Biochemie, Wiesbaden, 26/28-9-1968.
2. FUJIMOTO, G. I. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **73** : 1856 (1951).
3. DBP 1096354.
4. DBP 1013284.
5. ZDEVIC, J. A., CARPIO, H. und DJERASSI, C. — *Steroids*, **1** : 233 (1963).
6. WENZEL, M., PITZEL, L. und SCHULZE, P.-E. — *Angew. Chemie*, **80** : 191 (1968).
SCHULZE, P.-E., PITZEL, L. und WENZEL, M. — *Chem. Ber.*, **101** : 3655 (1968).
7. TOLBERT, B., KISK, M. und BAKER, E. — *Amer. J. Physiol.*, **185** : 269 (1956).
8. SIMON, H., MUELLHOFER, G. und MEDINA, R. — Vortrag : I.A.E.A. Radioisotope sample measurement techniques in medicine and biology. Wien 1965.
9. KUSHINSKY, S. — *J. Biol. Chem.*, **230** : 31 (1958).