

## SYNTHÈSE AMÉLIORÉE DE LA PROGESTÉRONE $^{14}\text{C}$ -4

H. Hoellinger <sup>\*</sup>, Nguyen-Hoang-Nam <sup>•</sup> et L. Pichat  
Service des Molécules Marquées, C.E.N.-Saclay,  
B.P. n° 2 - 91 190 - Gif-sur-Yvette, France  
Received on June 13, 1974.

### SUMMARY

*An improved synthesis of progesterone-4- $^{14}\text{C}$  is described. Purification by Mg silicate column chromatography and preparative TLC allowed the isolation of isoprogesterone-4- $^{14}\text{C}$  and 3,5,20-trioxo-4,5-seco-A-pregnan-4- $^{14}\text{C}$ , as by-products identified by NMR and mass spectrometry. Radioactive overall yield : 40 % based on Ba  $^{14}\text{CO}_3$ , specific activity : 59 mCi/mM.*

### RESUME

*La synthèse améliorée de la progestérogène  $^{14}\text{C}$ -4 est décrite. La purification de la progestérogène  $^{14}\text{C}$ -4 par chromatographie sur colonne de silicate de Mg et CCM préparative a permis l'isolement de deux sous-produits : isoprogestérogène  $^{14}\text{C}$ -4 et trioxo-3,5,20-seco A-4,5 pregnane  $^{14}\text{C}$ -4, identifiées par spectrométrie RMN et de masse. Rendement radioactif global : 40 % par rapport à  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ , activité spécifique : 59 mCi/mM.*

La progestérogène  $^{14}\text{C}$ -4 est un intermédiaire qui permet d'accéder à la pregnénolone  $^{14}\text{C}$ -4 (1).

En 1953, FUJIMOTO et PRAGER (2) ont décrit la préparation de la progestérogène  $^{14}\text{C}$ -4 à faible activité spécifique, avec un rendement de 25 % par rapport à  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ . Depuis cette date, il n'y a, à notre connaissance, aucune autre publication sur la préparation de la progestérogène  $^{14}\text{C}$ -4.

(\*) Chercheur de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), France .

Nous avons adopté la méthode de (2) pour la préparation de la progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 (VI) à partir de l'acétate de l'énol-lactone dérivée de la progestérone (I), tout en apportant des modifications à chaque stade pour améliorer les rendements et en l'adaptant à l'obtention de (VI) à haute activité spécifique (59 mCi/mM).

### RESULTATS ET DISCUSSION

Par condensation de l'iodure de méthyl-magnésium radioactif sur l'énol-lactone (I) on obtient le complexe (II) qui est hydrolysé par une solution aqueuse de chlorure d'ammonium pour donner la dicétone (IV). Cette dernière est ensuite cyclisée en milieu acide en progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 (VI) (schéma I).

Au cours des essais "à blanc" et "traceur" nous avons pu vérifier et confirmer l'observation de HEARD et ZIEGLER (3) sur la formation de l'hémicétale (III) comme produit intermédiaire de la dicétone (IV). Par contre, l'étude des composés formés lors de la cyclisation de la dicétone (IV) ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de l'hydroxy-cétone (V) signalée par ces auteurs.

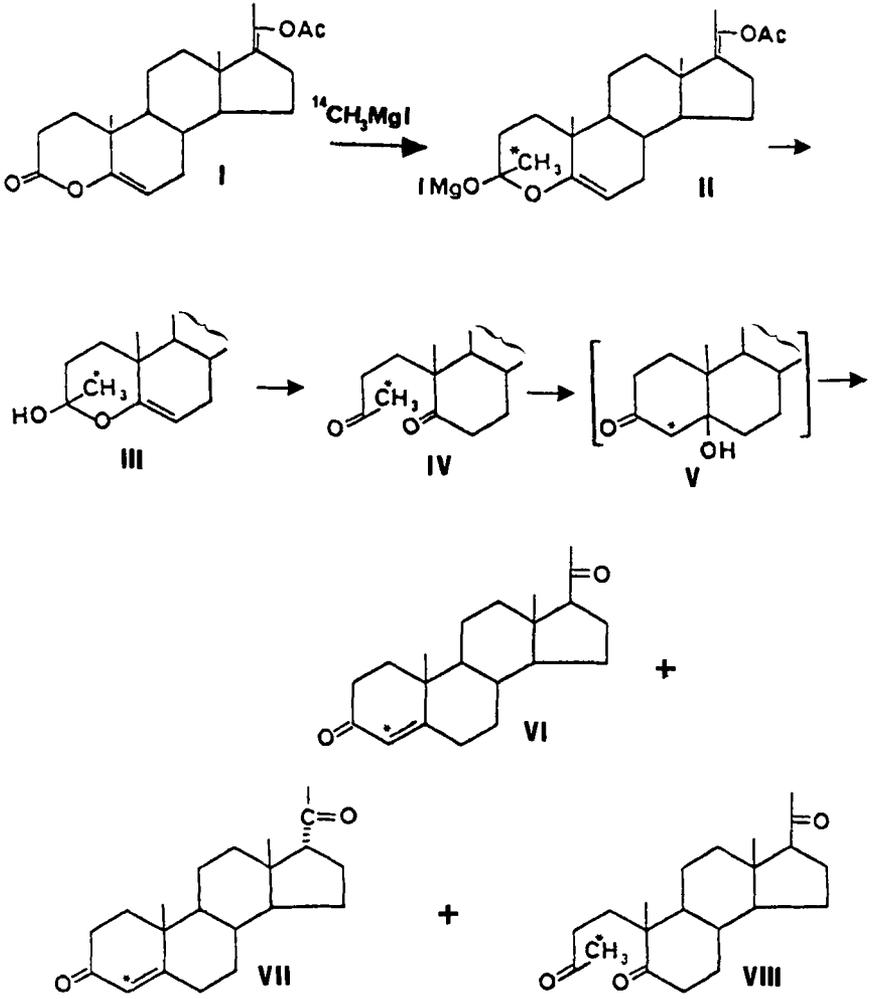
Par CCM nous avons observé deux taches principales : l'une extrêmement polaire de  $R_f = 0,05$  et l'autre, de  $R_f = 0,30$  qui pourraient être attribuées respectivement aux composés (III) et (IV). L'analyse des spectres de masse et RMN confirme que nous avons bien un mélange de ces deux composés, l'hémicétale se transformant rapidement en dérivé dicétonique.

Le spectre de masse de l'hémicétale (III) montre un pic de masse  $M^+ = 376$  et un pic  $m/e = 359$  correspondant à  $M^+ - [\text{OH}]$ . Le spectre de masse de la dicétone (IV), effectué sur un échantillon où cette dernière était prépondérante, montre un pic de masse  $M^+ = 376$  et un pic  $m/e = 302$  correspondant au fragment  $M^+ - [\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_3]$  dû à la coupure de la chaîne en 10 (tableau III).

La RMN confirme la structure de ces deux composés (tableau II).

L'étude des conditions opératoires nous a permis d'améliorer le rendement en progestérone  $^{14}\text{C}$ -4. Mais, c'est l'adoption

SCHEMA I



de méthodes chromatographiques de purification qui nous a permis d'obtenir un accroissement sensible du rendement final.

Les faibles activités sur lesquelles travaillaient FUJIMOTO et PRAGER (2) leur ont permis de purifier la progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 par recristallisation, après un passage préalable sur "Hyflo supercel".

Cette technique ne pouvait être utilisée pour notre synthèse active à haute activité spécifique. Nous avons effectué une purification préalable par chromatographie sur colonne de silicate de Mg avec un gradient d'éluion. Les fractions de tête et de queue de cette opération ont été repurifiées par chromatographie en couche mince préparative. A partir de 252 mCi de progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 brute, nous avons isolé 64 % de progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 pure (VI), 11 % d'isoprogestérone  $^{14}\text{C}$ -4 (VII) et 3 % de dérivé trioxo  $^{14}\text{C}$ -4 (VIII).

La structure de ces deux derniers composés a été établie par RMN et par spectrométrie de masse.

Le spectre RMN de l'isoprogestérone  $^{14}\text{C}$ -4 (VII) est identique à celui de la progestérone, seul le singulet du méthyle 18 se trouve déplacé vers les champs faibles. Le spectre de masse est conforme à la structure.

Le spectre RMN du trioxo-3,5,20 seco-A-4,5 pregnane  $^{14}\text{C}$ -4 (VIII) ne présente aucun signal dans la zone des protons oléfiniques. Par contre, on observe le même singulet à 2,11 ppm du méthyle 4 que pour la dicétone (IV). On retrouve dans le spectre de masse les principaux fragments caractéristiques de la dicétone (IV), en particulier le pic  $m/e = 261$  correspondant à  $\text{M}^+ - [\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{*CO CH}_2]$  (tableau III).

#### T A B L E A U I

##### CCM DES PRINCIPAUX COMPOSES DE LA SYNTHÈSE DE LA PROGESTERONE $^{14}\text{C}$ -4

Plaques gel de silice 60 F254 Merck

Révélateurs : UV ou par pulvérisation d'une solution alcoolique d'acide phosphorique à 25 % et chauffage de la plaque à 100° C pendant 10 minutes.

PRODUITS	Solvants de développement Rf approximatifs			
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> MeOH 4%	Cyclohexane 70 Ac O Et 30	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> 60 Ether 10	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> 60 Ether 15 MeOH 5
I	0,68	0,36	0,44	0,76
III		0,03	0,05	
IV		0,12	0,23	
VI	0,82	0,28	0,27	0,61
VII	0,61	0,22		0,51
VIII	0,57	0,15		0,56

T A B L E A U I I

RMN DES PRINCIPAUX COMPOSES DE LA SYNTHÈSE DE LA PROGESTERONE <sup>14</sup>C-4Appareil : JEOL C 60 HL - Solvant : CDCl<sub>3</sub> avec TMS comme référence interne, δ ppm

Produits	Me-4	Me-18	Me-19	Me-21	AcO-20	H-5	H-6
I		(s) 0,75	(s) 0,80	(s) 1,80	(s) 1,80		(m) 5,18
III	(s) 1,80	(s) 0,90	(s) 1,14	(s) 2,14	(s) 2,14		(m) 5,25
IV	(s) 2,11		(s) 1,11				
VI		(s) 0,68	(s) 1,20	(s) 2,14		(m) 5,70	
VII		(s) 0,98	(s) 1,18	(s) 2,10		(m) 5,68	
VIII	(s) 2,11	(s) 0,69	(s) 1,11	(s) 2,14			

s = singulet

m = multiplet

T A B L E A U III

PRINCIPAUX FRAGMENTS DES SPECTRES DE MASSE DES COMPOSES DE LA  
SYNTHÈSE DE LA PROGESTERONE <sup>14</sup>C-4

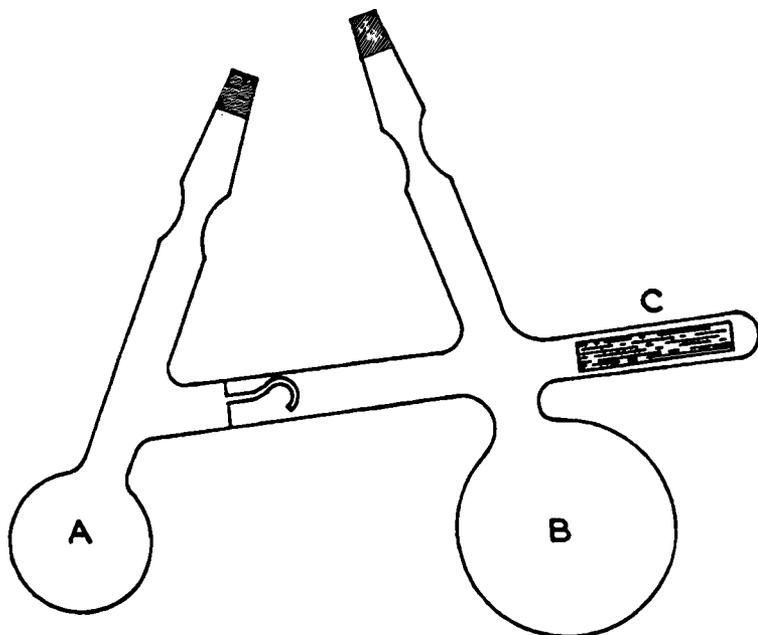
Appareil : Varian CH7 - Introduction directe dans la source

PRODUITS	m/e	ion	Intensité relative %
III	376	M <sup>+</sup>	11
	359	M-17	16
	317	M-59	100
IV	376	M <sup>+</sup>	6
	317	M-59	100
	302	M-74 (*)	91
VI	316	M <sup>+</sup>	43
	274	M-42	25
	246	M-70	9
	41		100
VII	316	M <sup>+</sup>	27
	262	M-54	7
	246	M-70	34
	44		100
VIII	334	M <sup>+</sup>	15
	316	M-18	13
	261	M-73 (*)	100

(\*) La coupure de la chaîne en 10 se fait avec protonation dans la cas de (IV) provenant de l'essai "traceur" mais pas dans celui de (VIII) provenant de la synthèse à haute activité. Ce phénomène est dû probablement à l'effet isotopique.

PARTIE EXPERIMENTALEPROGESTERONE <sup>14</sup>C-4 (VI)

La préparation du réactif de Grignard et son transfert sur la solution d'énol-lactone (I) sont réalisés dans l'appareil schématisé dans la figure I.

Figure I

On introduit 432 mg (18 milliat.) de magnésium en tournures dans le ballon A et, après avoir adapté le ballon à la rampe à vide, on sèche longuement sous vide moléculaire. On y transfère ensuite 45 cm<sup>3</sup> d'éther anhydre et 8 mM (450 mCi) d'iodure de

méthyle  $^{14}\text{C}$  (préalablement décoloré sur toile d'argent, séché sur tamis moléculaire 3 Å et jaugé). On scelle le ballon au niveau de l'étranglement, laisse le mélange revenir à la température ambiante puis on maintient la température à 30° C pendant 3 h. On abandonne ensuite à la température ambiante pendant 12 h.

Dans le ballon B séché comme précédemment, on introduit sous atmosphère d'azote sec 3,36 mg (9,4 mM) d'énol-lactone (I) et 100 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. On congèle le mélange et scelle sous vide au niveau de l'étranglement. On casse la "queue de cochon" à l'aide de l'aimant coulissant dans le tube C et transfère la solution de magnésien sur l'énol-lactone. Il se forme immédiatement un abondant précipité blanc. Le mélange réactionnel est agité à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 h.

On ouvre le ballon B, ajoute 75 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse saturée de chlorure d'ammonium et agite le mélange à la température ambiante pendant 30 mn. On extrait 3 fois à l'éther, réunit les extraits étherés, filtre sur "millipore" à travers du sulfate de sodium anhydre et évapore à sec. On obtient 3 g (282 mCi) d'un solide jaune pâle légèrement visqueux qui est un mélange de (III) et (IV).

CCM = Tableau I      RMN = Tableau II      Masse = Tableau III.

A ce mélange, on ajoute, sous courant d'azote sec, 50 cm<sup>3</sup> d'acide acétique et 12 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique concentré ( $d = 1,19$ ). On agite le mélange réactionnel pendant 6 h. à la température ambiante et à l'abri de la lumière. On évapore à sec et solubilise le résidu dans 100 cm<sup>3</sup> d'un mélange benzène-éther 1:1. On lave plusieurs fois avec une solution de carbonate de sodium à 2 % puis à l'eau. On sèche sur du sulfate de sodium anhydre, filtre sur "millipore", et après évaporation à sec sous vide on recueille 1,7 g (252 mCi) de progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 6 brute. Une radiochromatographie en couche mince décèle la présence d'environ 20 % d'impuretés radiochimiques.

#### PURIFICATION DE (VI).

La progestérone  $^{14}\text{C}$ -4 brute en solution dans un mélange

cyclohexane-acétate d'éthyle 25 % est placée sur une colonne (h = 110 cm,  $\varnothing$  ext. = 30 mm) contenant 200 g de silicate de magnésium Woelm, activité I. La colonne est équilibrée avec du cyclohexane et le gradient d'éluat est obtenu à l'aide de 2 flacons superposés. On élue successivement avec :

500 cm <sup>3</sup>	cyclohexane
500 cm <sup>3</sup>	cyclohexane - acétate d'éthyle 15 %
500 cm <sup>3</sup>	cyclohexane - acétate d'éthyle 30 %
500 cm <sup>3</sup>	cyclohexane - acétate d'éthyle 50 %.

Avec un collecteur automatique on recueille des fractions de .5 cm<sup>3</sup> environ toutes les 15 mn. On détecte simultanément la radioactivité de l'éluat avec un détecteur à scintillation et les produits absorbant dans l'UV. à 254 nm.

On recueille 170 mCi de progestérone  $^{14}\text{C-4}$  pure. Les fractions de tête et de queue sont à nouveau purifiées par CCM préparative sur plaques de gel de silice F256 Merck, éluées avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - Me OH 4 %.

176 mCi	progestérone $^{14}\text{C-4}$ (VI)
28 mCi	isoprogestérone $^{14}\text{C-4}$ (VII)
8 mCi	dérivé trioxo $^{14}\text{C-4}$ (VIII)

Rendement radiochimique en progestérone  $^{14}\text{C-4}$  (VI) par rapport à  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$  = 40 %, activité spécifique : 59 mCi/mM. La pureté radiochimique est contrôlée par CCM (tableau I) et la pureté chimique, par spectrophotométrie UV dans le méthanol à 240 nm.

RMN = tableau II, Masse = tableau III.

#### REFERENCES

- (1) HOELLINGER H., NGUYEN-HOANG-NAM et PICHAT L. - C.R. Acad. Sci., C 276 : 715 (1973) ; Bull. Soc. Chim., sous presse.

- (2) FUJIMOTO G.I. et PRAGER J. - J. Amer. Chem. Soc., 75 : 3259  
(1953).
- (3) HEARD R.D.H. et ZIEGLER P. - J. Amer. Chem. Soc., 73 : 4036  
(1951).