

NOTE

MARQUAGE DE LA PREGNENOLONE AU CARBONE 14 ET AU DEUTERIUM EN POSITION 21

SUMMARY

Pregnenolone (Δ^5 -pregnen- 3β -ol-20-one) is labelled with ^{14}C and deuterium in position 21. The radioactive carbon is inserted by the means of diazomethane- ^{14}C . The deuteration is realized by the reduction of 21-diazo-pregnenolone under the action of iod-hydric acid dissolved in D_2O .

Key Words : Pregnenolone, Diazomethane- ^{14}C , Deuteration.

INTRODUCTION

Dans le but de faciliter l'étude du métabolisme de certains mimétiques du cholestérol présentant des variantes au niveau de la chaîne latérale, il est utile de disposer de molécules marquées.

Un synthon idéal permettant un accès facile à l'ensemble de ces mimétiques est la pregnénolone 1 marquée. La présence du carbonyle en position 20 sur ce synthon permet d'accéder aux mimétiques du cholestérol par le biais de réactions classiques comme celles de Reformatsky, de Grignard et de Wittig (1); l'hydrogénation catalytique terminale conduit à des stéroïdes de la série naturelle (2).

La synthèse de la pregnénolone marquée sur le carbone 21 2 a retenu notre attention bien qu'elle ait été précédemment réalisée en 1949 par PHILLAMY et SCHOLZ (3) selon une méthode différente de celle que nous décrivons ci-après. Ces auteurs obtiennent l'acétyl- 3β -pregnénolone- ^{14}C -21 3 par réaction entre le diméthyl-cadmium- ^{14}C et le chlorure de l'acide étiénique acétylé 4. Signalons d'autre part que la pregnénolone- ^{14}C -20 a été synthétisée par PORTO et GROS en 1968, comme décrite dans ce journal (4).

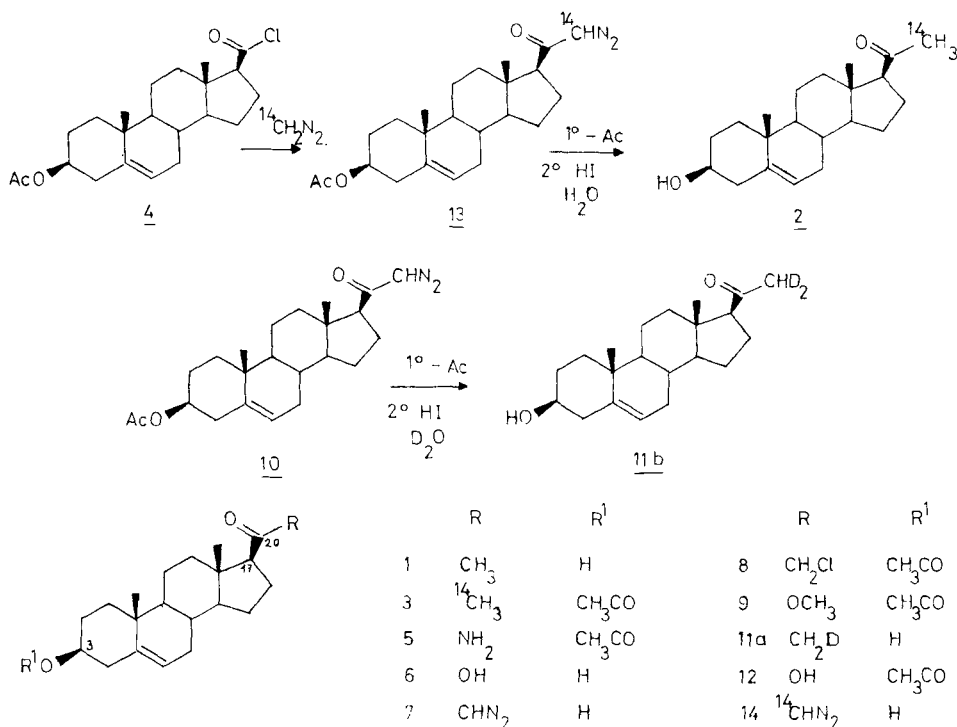
Outre la méthode utilisée par PHILLAMY et SCHOLZ, au moins trois autres possibilités d'accès à la pregnénolone marquée ou non existent; elles ont notamment été suggérées par OLIVETO (5).

L'addition de bromure de méthyl-magnésium sur l'amide de l'acide étiénique acétylé 5 a été décrite par MILLER, GREGORIOU et MOSHER (6) ainsi que dans un brevet espagnol (7).

L'addition de méthyl-lithium sur l'acide étiénique 6 pourrait être utilisée et elle est décrite par MULLER, HUYNH et MATHIEU (8) pour l'obtention d'autres stéroïdes; les détails de cette réaction ont aussi été présentés dans ce journal par RAJAN et WEMPLE (9) en ce qui concerne la transformation d'une fonction carboxyle en une méthyl-¹⁴C-cétone.

Une troisième possibilité consiste à faire réagir le diazométhane sur le chlorure d'acide étiénique acétylé 4; la diazopregnénolone 7 formée est réduite en pregnénolone 1. C'est cette méthode que nous avons adoptée pour obtenir la pregnénolone marquée au carbone 14 en position 21 en utilisant la nitroso méthyl-¹⁴C-urée commercialement accessible.**

Nous avons d'autre part obtenu de la pregnénolone deutérée en position 21 par réduction de la diazo pregnénolone 7 au moyen d'une solution deutérée d'acide iodhydrique. Cette deutériation alliée au marquage au ¹⁴C permet d'obtenir une pregnénolone à double marquage dont l'intérêt est indéniable. Cette méthode de double marquage pourrait être étendue au dérivé tritié.



** NEN.Chemicals GmbH D 6072 Dreieichenhain West Germany

Résultats et discussions.

A. Formation de la diazocétone.

La réaction de ARNDT-EISSERT conduisant à un acide homocarboxylique par action du diazométhane sur les chlorures d'acide peut être arrêtée au stade de diazocétone; c'est de cette façon que nous avons obtenu la diazopregnénolone. La synthèse de la diazocétone s'accompagne d'un dégagement concomitant d'acide chlorhydrique; cet acide réagissant avec le diazométhane, fournit de l'azote et du chlorométhane. Cette réaction parasite consomme la moitié de la radioactivité engagée dans la réaction, radioactivité que l'on retrouve sous forme de chlorométhane- ^{14}C .

D'autre part, l'acide chlorhydrique peut aussi réagir avec la diazocétone nouvellement formée pour fournir de l'azote et de l' α -chlorocétone correspondante. En présence d'un excès de diazométhane, la formation de la chlorocétone peut toutefois être évitée. EHRENSTEIN et DUNNENBERGER (10) ont synthétisé de cette façon une diazocétone stéroïde avec un rendement de 75%; HEARD et ZIEGLER (11) ont, pour leur part, obtenu de la pregnénolone au départ d'acide étiénique avec un rendement de 85%.

Le double inconvénient cité ci-dessus peut être évité par addition de triéthylamine au milieu réactionnel (12); ceci se vérifie si on utilise des chlorures d'acides aromatiques. Dans notre cas, l'addition de triéthylamine s'est révélée inopérante, ce qui est généralement le cas pour les chlorures d'acides aliphatiques possédant un atome d'hydrogène en α (13). Nous avons été ainsi amenés à utiliser une quantité de diazométhane trois fois supérieure à celle du chlorure d'acide. Dans ces conditions nous n'avons détecté aucune trace de chlorocétone β , substance qui a été synthétisée séparément afin d'être en possession d'une référence chromatographique.

Dans la formation du chlorure d'acide étiénique acétylé 4 par action du chlorure de thionyle sur l'acide, il convient de vérifier par spectroscopie infrarouge si tout l'acide a effectivement réagi avant addition de diazométhane; on évite ainsi la formation parasite de l'ester correspondant 9.

La progression de la réaction d'addition du diazométhane sur le chlorure d'acide est suivie par chromatographie en couche mince. La fonction diazocétone est mise en évidence par infrarouge (2100 cm^{-1} pour $\text{C} \equiv \overset{+}{\text{N}} = \bar{\text{N}}$ avec absence de la fonction chlorure d'acide : 1795 cm^{-1}).

B. Formation de la pregnénolone marquée au ^{14}C sur le carbone 21

Elle est réalisée par réduction de la diazocétone au moyen d'une solution d'acide iodhydrique à 47% (13). La réaction se fait au contact de la phase aqueuse contenant l'acide et de la phase chloroformique contenant le stéroïde. Toute tentative de réduction de la diazocétone acétylée 10 s'est toutefois révélée

infructueuse. Par contre, la réaction sur la diazocétone préalablement désacétylée est totale. La pregnénolone ainsi obtenue est en tout point identique au produit naturel. Le marquage réalisé suivant cette méthode s'est fait avec un rendement radiochimique de 25% sur base du réactif radioactif.

C. Formation de la pregnénolone marquée au Deutérium sur le carbone 21.

La diazocétone **7** peut être facilement deutérée (éventuellement tritiée) sur le carbone 21 en effectuant la réduction au moyen de l'acide iodhydrique HI mis en solution dans l'eau lourde. La solution réductrice, HI-D₂O, dont l'enrichissement en deutérium est estimé à 96% fournit une pregnénolone deutérée qui a été caractérisée par les spectres de résonance magnétique nucléaire et de masse.

En R.M.N., on obtient un spectre identique à celui de la pregnénolone dont le pic méthyl-cétone ($\delta = 2,1$ ppm) est très fortement diminué et se confond avec le massif stéroïdique.

La spectroscopie de masse nous renseigne sur l'abondance du produit de deutérioration et confirme le schéma de fragmentation de la pregnénolone. L'intensité des pics les plus importants de la pregnénolone diminue fortement dans le spectre du produit de deutérioration. Par contre, les pics de masse supérieure de une et deux unités sont beaucoup plus intenses dans le cas du produit deutéré; c'est ainsi que le pic parent de la pregnénolone (P^+) à m/e 316 est suivi de deux pics plus importants situés à m/e 317 et m/e 318 qui confirment la présence des espèces **11a** et **11b**. Le fragment correspondant au pic parent ayant perdu une molécule d'eau ($P^+ - H_2O$) à m/e 298 est également suivi des pics intenses m/e 299 et m/e 300. La même observation s'applique aux fragments m/e 283 ($P^+ - H_2O - CH_3$) et m/e 43 ($CO - CH_3$: position 20 et 21) qui sont accompagnés respectivement des pics m/e 284, m/e 285 et m/e 44, m/e 45.

CONCLUSION

L'intérêt de la méthode décrite réside principalement dans la possibilité de marquage de la pregnénolone en position 21 soit au carbone 14, soit au deutérium, la combinaison des deux méthodes donnant accès à un produit doublement marqué. De plus, le tritium pourrait être introduit à la place du deutérium sans la moindre difficulté.

Tout récemment SCOTT L.T. et MINTON M.A. ont mis au point une synthèse de diazocétone permettant de travailler sans excès de diazométhane (14). Cette modification des conditions expérimentales appliquées à ce marquage en augmenterait avantageusement le rendement radiochimique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Acétyl-3 β -diazopregnénone-¹⁴C-21 (13)

Dans un ballon de 50 ml., on introduit 0,425 g. ($1,18 \cdot 10^{-3}$ M.) d'acide étiénique acétylé 12 en solution dans 5 ml. de dichlorométhane. On adapte ce ballon, refroidi à -12°C , à la sortie d'un appareil à distiller. Dans ce dernier, on introduit 1 ml. de quinoléine et 2 ml. de chlorure de thionyle.

Le chlorure de thionyle distille (80°C) ainsi directement sur l'acide étiénique. Le mélange réactionnel est agité pendant 2,5 heures, à une température inférieure à -20°C , puis 30 min. à 0°C , et enfin 30 min. à 30°C . On évapore sous vide le solvant et l'excès de chlorure de thionyle. La chromatographie sur couche mince (éluant: benzène) confirme la disparition de l'acide étiénique acétylé 12 (Rf. = 0,6) au profit du chlorure d'acide étiénique acétylé 4 (Rf. = 0,9).

A partir de 0,406 g. ($3,66 \cdot 10^{-3}$ M d'après le dosage) (Activité : $28,910^{-9}$ Ci) de nitrosométhyl-¹⁴C-urée on prépare une solution de diazométhane-¹⁴C dans 10 ml. de dichlorométhane. La solution est séchée sur hydroxyde de potassium et ajoutée au chlorure d'acide étiénique. La réaction est immédiate et s'accompagne d'un dégagement d'azote dû à la réaction du diazométhane avec l'acide chlorhydrique libéré. Après une nuit à 0°C , la réaction est arrêtée par addition d'alumine, et filtration du mélange sur une colonne de chlorure de sodium. La présence d'acétyl-3 β -diazopregnénone-¹⁴C-21 13 est confirmée par la chromatographie en couche mince (éluant : benzène/acétate d'éthyle: 2/1) (Rf. = 0,9). Un produit secondaire est également détecté (Rf. = 0,95); il n'a pas été identifié mais il ne correspond pas à l'ester méthylique de l'acide étiénique acétylé 9.

Pregnénone-¹⁴C-21 (2)

La diazocétone, sans aucune autre purification, est dissoute dans 50 ml. de méthanol contenant 1 g. d'hydroxyde de potassium. La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant au moins 5 heures. Après addition d'eau, et extraction du stéroïde à l'éther, la diazopregnénone-¹⁴C-21 14 se caractérise grâce à la chromatographie en couche mince (éluant : benzène/acétate d'éthyle: 2/1) (Rf. = 0,6). Le solvant est évaporé sous vide et le produit est séché. Ensuite, il est dissous dans 4 ml. de chloroforme, et cette solution est introduite dans une boule à décanter. On y ajoute 1 ml. d'acide iodhydrique à 47%. La réaction est instantanée et s'accompagne d'un dégagement d'azote et d'iode qui colore la phase organique. La réaction est complétée par agitation du mélange pendant 2 min. Ensuite, on dilue la phase organique avec du chloroforme et on la lave successivement avec une solution aqueuse saturée en iodure de potassium, une solution diluée de thiosulfate de sodium, et une dernière fois avec de l'eau.

On a, ainsi, débarrassé la solution de l'acide restant et de l'iode. Après séchage de la solution étherée sur le sulfate de magnésium anhydre, on purifie la pregnénolone- ^{14}C -21 2 par chromatographie sur plaque préparative. L'élution se réalise avec un mélange de benzène et d'éther : 2/1. Dans ce système, le pregnénolone- ^{14}C -21 2 possède un Rf. de 0,5; tandis que la diazocétone (produit de départ, absent après réaction) se présenterait avec un Rf. de 0,65. Une impureté se retrouve à un Rf. de 0,9. La pregnénolone- ^{14}C -21 2 ainsi purifiée est cristallisée dans le tétrachlorure de carbone. On en recueille, après cristallisation, 0,289 g., soit un rendement chimique de 73%, calculé à partir de l'acide étiénique acétylé 12. Après trois recristallisations successives, l'activité spécifique de la pregnénolone- ^{14}C -21 2 reste inchangée, soit 8,5 $\mu\text{Ci}/\text{M}$. L'activité totale récupérée est de $7,76 \cdot 10^{-9}\text{Ci}$ correspondant à un rendement radiochimique de 25%.

Pregnénolone-D-21 (11)

L'acide iodhydrique est synthétisé par réduction de l'iode sous l'action du phosphore. Le gaz libéré est dissous dans l'eau deutérée. Dans une boule à décanter, on introduit 3 g. d'iode dissous dans 0,9 ml. d'acide iodhydrique à 57%. La boule à décanter est montée sur un ballon à distiller contenant un excès de phosphore rouge. Lorsque la solution d'iode s'écoule dans le ballon, l'acide iodhydrique s'échappe par l'embouchure latérale du ballon à distiller. Ce gaz barbote ensuite dans un récipient contenant 10 ml. d'eau deutérée. Après réaction, on distille le mélange deutéré, et on récupère à 127°C , 2 ml. du mélange azeotropique composé de 57% d'acide iodhydrique dans l'eau deutérée. La réduction de la diazopregnénolone 7 se réalise exactement de la même façon que celle décrite ci-dessus, dans le cas du réactif marqué au carbone 14. Par exemple, lorsque l'on introduit 0,154 g. ($0,45 \cdot 10^{-3}\text{M}$.) de diazopregnénolone 7 dans la réaction, on récupère, après chromatographie sur plaques, 0,130 g. ($0,411 \cdot 10^{-3}\text{M}$.) de pregnénolone deutérée 11, soit un rendement chimique de 91%.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) SCHMIT J.P., PIRAUX M., PILETTE J.F.- J.Org.Chem. 40 : 1586 (1975)
- (2) IKAN R., MARKUS A., BERGMANN E.- J.Org.Chem. 36 : 3944 (1971)
- (3) PHILLAMY H.R., SCHOLZ C.R.- J.Biol. 37 : 178 (1949)
- (4) PORTO A., GROS E.G.-J.Labelled Compounds 4 : 276 (1968)
- (5) OLIVETO E.P.- Organic reactions in steroid chemistry-Vol.II-ed.FRIED and EDWARDS - Van NOSTRAND REINHOLD Company
- (6) MILLER J., GREGORIOU G., MOSHER H.S.-J.Am.Chem.Soc. 83 : 3966 (1961)

- (7) Spanish Patent, 1954, 209, 871
- (8) MULLER G., HUYNH C., MATHIEU J.- Bull.Soc.Chim.France: 296 (1962)
- (9) RAJAN S.J., WEMPLE J.M.-J.Labelled Compounds II (4) : 467 (1975)
- (10) EHRENSTEIN M., DUNNENBERGER M.- J.Org.Chem. 21 : 774 (1956)
- (11) HEARD R., ZIEGLER R.- J.Am.Chem.Soc. 72 : 4328 (1950)
- (12) NEWMAN M.S., BEAL P.- J.Am.Chem.Soc. 71 : 1506 (1949)
- (13) WOLFROM M.L., BROWN B.L.- J.Am.Chem.Soc. 65 : 1516 (1943)
- (14) SCOTT L.T., MINTON M.A.- J.Org.Chem. 42 : 3757 (1977)

Pussemier L.^Δ, Vande Velde V., Piraux M.^{*}
Laboratoire de Pharmacognosie et de Chimie des Substances
Naturelles, Université Catholique de Louvain,
72, av.Em.Mounier - 1200 Bruxelles, Belgique

^ΔAdresse Actuelle : Institut de Recherches Chimiques, Museumlaan, 5 -
1980 Tervuren, Belgique.