

Mit β -Emittern markierte Steroide -

Ester des Östradiols und Cholestenols mit [^{103}Ru]-Ruthenocencarbon-
säure

K. Hoffmann, B. Rießelmann, M. Wenzel

Isotopen-Abteilung des Pharmazeutischen Instituts der Freien
Universität, Königin-Luise-Str. 2/4, 1 Berlin 33 (Deutschland)

Summary

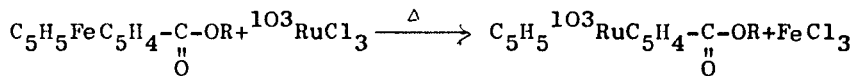
Radioactive esters of estradiol and cholestenol with ruthenocene-carboxylic acid were prepared. In case of the estradiol esters there had been exchange of Fe in the corresponding ferrocene compounds with $^{103}\text{RuCl}_3$ resulting in poor yield only. Good radiochemical yields were obtained by exchanging ^{103}Ru for Fe in (2-chlorobenzoyl)ferrocene and synthesis of the esters by reaction of estradiol with [^{103}Ru]ruthenocencarboxylic acid chloride generated from (2-chlorobenzoyl)ruthenocene. High specific activities of estradiol esters for biochemical studies were achieved after separation of the ferrocene and ruthenocene esters by HPLC.

Einleitung

Die Markierung von biochemisch interessanten Verbindungen wie Östradiol- und Cholestenol-Estern mit extern meßbaren β -Strah-

lern ist für die Entwicklung von Radiopharmaka zur nuklearmedizinischen Diagnostik von Interesse ¹⁾.

Ester der Ruthenocencarbonsäure lassen sich am einfachsten durch thermischen Austausch des Zentralatoms der entsprechenden Ferrocen-Verbindung mit $^{103}\text{RuCl}_3$ synthetisieren ^{2,3,4)}. Diese Einstufenreaktion verläuft nach folgendem Schema:



Da dieser Weg bei den Östradiol-Estern nur zu unbefriedigenden radiochemischen Ausbeuten von maximal 0.1-0.5% führte, wurde zunächst [^{103}Ru]-o-Chlorbenzoylruthenocen synthetisiert und daraus Ruthenocencarbonsäurechlorid hergestellt, das mit den Steroid-Alkoholen verestert wurde.

Bei dem Austausch des Zentralatoms wird das Ferrocen-Derivat in deutlichem Überschuß eingesetzt (Mol-Verhältnis Fe: ^{103}Ru ca. 20-100:1). Somit wird das radioaktive Ruthenocen-Produkt durch die inaktive Ferrocen-Verbindung verdünnt. Für biochemische Untersuchungen der Östradiol-Ester ¹⁾ wird jedoch eine hohe spezifische Aktivität angestrebt. Aus diesem Grund wurde der bei der indirekten Synthese mitgebildete Ferrocencarbonsäureester durch HPLC abgetrennt.

Ergebnisse

Der einfachste Weg zu radioaktiven Estern der Ruthenocencarbonsäure ist der direkte Austausch des Zentralatoms in den en-

sprechenden Ferrocencarbonsäureestern mit $^{103}\text{RuCl}_3$. Dieser Weg führte beim $[\text{}^{103}\text{Ru}]3$ -cholestenol-ruthenocencarboxylat zu gerade noch befriedigenden radiochemischen Ausbeuten von 4.5 % , nicht jedoch bei dem gewünschten $[\text{}^{103}\text{Ru}]3$ - bzw. 17-Östradiol-ruthenocencarboxylat. Auch der Einsatz von Al_2O_3 als Träger für $^{103}\text{RuCl}_3$ ⁴⁾ führte hier entgegen den Ergebnissen mit Ferrocencarbonsäure-methylester zur vollständigen Zersetzung der eingesetzten Ester unter teilweiser Bildung von ^{103}Ru -Ruthenocen. Im Falle der Östradiol-Ester waren wir daher gezwungen, einen indirekten Syntheseweg über eine besser durch Direktaustausch zu markierende Verbindung zu finden.

Die besten radiochemischen Ausbeuten bei der Austauschreaktion wurden mit Ferrocen erhalten; wegen der relativen Flüchtigkeit des $[\text{}^{103}\text{Ru}]$ Ruthenocen wurde aber der Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

Bessere Resultate erhielt man durch intermediäre Synthese von $[\text{}^{103}\text{Ru}]$ -o-chlorbenzoylruthenocen, das in radiochemischen Ausbeuten von 44 % (neben 9 % $[\text{}^{103}\text{Ru}]$ Bis(o-chlorbenzoyl)ferrocen) erstmals erhalten wurde. Um bei der chemischen Reaktion nicht mit zu geringen Mengen arbeiten zu müssen, wurde die Abtrennung des Ferrocenanteils vom Ruthenocenanteil erst nach der Veresterung vorgenommen. Das Gemisch aus o-Chlorbenzoylferrocen und $[\text{}^{103}\text{Ru}]$ -o-Chlorbenzoylruthenocen wurde nahezu quantitativ über die Carbonsäure ⁵⁾ (96.9 %) in das Säurechlorid ⁶⁾ (99 %) übergeführt.

umgewandelt, das ungereinigt mit Östradiol unter Zusatz von Silbercyanid ⁷⁾ zu 3- und 17-Östradiol-ruthenocencarboxylat verestert wurde. Durch Zugabe von 4-Dimethylaminopyridin ⁸⁾ (DMAP) anstelle von Silbercyanid wurde ausschließlich 3-Östradiol-ruthenocencarboxylat gewonnen; der Diester wurde unter den gewählten Bedingungen (Östradiol-Überschuß) nicht erhalten. Tabelle 1 faßt die Ausbeuten bei den verschiedenen Methoden zusammen. Mittels fraktionierter HPLC (Methanol/H₂O) gelang die Isolierung der ferrocenfreien Ruthenocencarbonsäureester in Ausbeuten von 6.9 % (3-Ester) und 37 % (17-Ester).

Experimentelles

Die Direktmarkierung (thermische Umsetzung der entsprechenden Ferrocenverbindung mit ¹⁰³RuCl₃) und Aufarbeitung der Reaktionsprodukte geschah nach bekannten Verfahren ^{3,4)}. 2-Chlorbenzoylferrocen wurde nach ⁵⁾, die für die Austauschversuche und als Referenzsubstanzen benötigten Ester nach ⁹⁾ hergestellt.

Die Reinigung der Ferrocen-haltigen Produkte erfolgte über Dünnschichtchromatographie (Identifizierung über Co-Chromatographie), wobei die radioaktiven Zonen mit dem "Dünnschichtscanner" (Fa. Berthold) lokalisiert wurden. Die spezifische Aktivität [hier / μ Ci ¹⁰³Ru/ ,umol Metallocenverbindung] konnte nach Messung der Aktivität und photometrischer Mengenbestimmung des Ferrocens berechnet werden.

Die HPLC-Abtrennung des Ferrocenanteils bei den Östradiolestern erfolgte mit einem Chromatographen der Fa. Waters (präparative Säule μ -Bondapak C₁₈; mobile Phase: MeOH/H₂O 86:14; Durchflußgeschwindigkeit 4 ml/min, UV-Detektor 284 nm).

[¹⁰³Ru]3-Cholestenol-ruthenocencarboxylat

6, μ g (10, μ mol) Cholestenol-ferrocencarboxylat wurden in einer Glasampulle mit einer acetonischen Lösung von 100, μ Ci (0.95, μ mol) [¹⁰³Ru] RuCl₃ versetzt und im N₂-Strom eingedampft. Nach Evakuieren (2 min.) wurde die Ampulle abgeschmolzen und 1 h unter ständigem Drehen bei 200°C im Ölbad erhitzt. Weitere Aufarbeitung nach ⁴).

Radiochem. Ausbeute: 4.5, μ Ci = 4.5 % d. Th.

theoret. spez. Aktivität: 9,1, μ Ci/, μ mol

gef. spez. Aktivität: 2,2, μ Ci/, μ mol

DC (Cyclohexan/Essigester 6:4): R_f:0.67

[¹⁰³Ru]o-Chlorbenzoylruthenocen (I)

217, μ Ci (2.5, μ mol) ¹⁰³Ru RuCl₃ in 200, μ l Aceton wurden in einer Glasampulle mit 10, μ g (30.8, μ mol) o-Chlorbenzoylferrocen im N₂-Strom eingedampft. Nach Evakuieren (2 min.) und Abschmelzen wurde 40 min. bei 180°C erhitzt. Anschließend wurde der Ampulleninhalt mit 6 ml CHCl₃ eluiert und durch DC (Benzol/Essigester 5:1) aufgetrennt. Neben 45.2, μ Ci (20.8 % d. eingesetzten Aktivität)

[¹⁰³Ru]-Ruthenocen (R_f: 0.68) wurden 95.5, μ Ci (44 % d. einges. Akt.)

[^{103}Ru]-o-Chlorbenzoylruthenocen I (R_f : 0.58) und 19.5 μCi (9 % d. eing. Akt.) ^{103}Ru Bis(o-Chlorbenzoyl)ferrocen (R_f : 0.47) isoliert mit CH_2Cl_2).

[^{103}Ru]Ruthenocencarbonsäure (II)

1.71 g feingepulvertes, durch Evakuieren von Luft befreites K-tert.-butylat wurden unter N_2 in 5.2 ml absolutem Ethylenglykoldimethylether suspendiert und unter heftigem Rühren mit 0.1 ml H_2O versetzt. Zu 0.5 ml dieser Suspension in einem Miniatur-Schlenkrohr (5 x 1 cm) wurden unter heftigem Rühren 95.5 μCi I in 0.5 ml abs. Ethylenglykoldimethylether in N_2 -Gegenstrom zugetropft (erst Rot-, dann Gelbfärbung) und 5 h bei 80°C unter leichtem N_2 -Überdruck gerührt. Anschließend wurde mit 3 ml Eiswasser hydrolysiert und 3 x mit Ether unter Rühren extrahiert (Extrakt verworfen). Nach Ansäuern mit 0.3 ml HCl (36 %) wurde erneut 3 x mit je 3 ml Ether extrahiert. Nach Eindampfen wurden 92.5 μCi (96.9 % d. eingesetzt. Akt.) [^{103}Ru]Ruthenocencarbonsäure II erhalten. DC in n-BuOH/ H_2O /Eisessig (4:1:1); R_f : 0.73.

[^{103}Ru]Ruthenocencarbonsäurechlorid (III)

92.5 μCi II wurden mit 2 ml abs. Benzol, 250 μl PCl_3 und 1 Tropfen abs. Pyridin unter N_2 in einem Miniatur-Schlenkrohr versetzt und 3 h bei 65°C gerührt. Nach Abkühlen wurde die Lösung abpipettiert, der Rückstand 2 x mit abs. Benzol gewaschen und die vereinigten

Benzol-Phasen am Rotationsverdampfer bei 40°C eingedampft. Anschließend wurde erneut 2 x mit je 10 ml abs. Benzol eingedampft und der Rückstand 30 min. an der Ölpumpe abgepumpt. Ausbeute: 91.6 μ Ci (99 % d. einges. Akt. = 42.2 % d. eingesetzt. $^{103}\text{RuCl}_3$) [^{103}Ru] Ruthenocencarbonsäurechlorid III.

Östradiol-Ester (Veresterung mit Silbercyanid)

Zu 288.5 mg AgCN und 213.4 mg (780 μ mol) Östradiol wurden 20.5 μ Ci (0.24 μ mol) Säurechlorid III in 3 ml abs. Benzol unter N_2 zuge- tropft und 90 min. bei 76°C heftig gerührt. Es wurde 19 h bei Raumtemperatur weitergerührt, mit 2 ml H_2O hydrolysiert das Benzol in N_2 -Strom abgedampft, 3 x mit je 3 ml CH_2Cl_2 und 3 x mit je 3 ml CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden durch Zentrifugieren von mitpipettiertem AgCN befreit und eingedampft. Der Rückstand wurde durch DC (Benzol/Essigester 5:1) auf- getrennt und die Esterzonen mit CH_2Cl_2 eluiert.

[^{103}Ru]3-Östradiol-ruthenocencarboxylat (IV) R_f : 0.24

0.7 μ Ci (3.4 % d. einges. Carbonsäure)

[^{103}Ru]17-Östradiol-ruthenocencarboxylat (V) R_f : 0.44

1.1 μ Ci (5.3 % d. einges. Carbonsäure)

Veresterung mit 4-Dimethylaminopyridin (DMAP)

32.7 μ Ci (0.38 μ mol) Säurechlorid III in 2 ml abs. CH_2Cl_2 wurden unter N_2 zu 10 mg (37 μ mol) Östradiol und 24 mg DMAP in 2 ml abs.

CH₂Cl₂ zugetropft und 22 h bei Raumtemperatur gerührt, 1 x mit 4 ml 2 n HCl, 2 x mit 4 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, die organische Phase durch DC (Benzol/Essigester 5:1) gereinigt und der 3-Ester mit CH₂Cl₂ extrahiert.

[¹⁰³Ru]3-Östradiol-ruthenocencarboxylat(IV)_{R_f}: 0.24
6.1/uCi (18.5 % d.einges. Carbonsäure).

HPLC-Trennung der Ferrocene- und Ruthenocenester des Östradiols

3-Ester 5.7/uCi IV in 150/ul CHCl₃ gespritzt
3-Östradiol-ferrocencarboxylat R_f: 10.15 min
Fraktionen alle 10 Sek. von t=9 bis 13 min.
Alle Fraktionen im N₂-Strom eingedampft
Ferrocenfrei waren 6.4 % der eingespritzten Aktivität,
die spezifische Aktivität von [¹⁰³Ru]3-Östradiol-
ruthenocencarboxylat(IV) betrug 60.4/uCi/umol.

17-Ester 2.0/uCi V in 100/u CHCl₃ gespritzt.
17-Östradiol-ferrocencarboxylar R_f: 10.45 min.
Fraktionen alle 10 Sek. von t=8 bis 13 min.
Ferrocenfrei waren 37 % der eingespritzten,
die spezifische Aktivität von [¹⁰³Ru]17-Östradiol-
ruthenocencarboxylat (VII) betrug 66.0/uCi/umol.

Dank

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für materielle Unterstützung.

Tab. 1 Radiochemische Ausbeuten der Östradiol-Ester

Methode	3-Ester	17-Ester	Carbonsäure zurück- gewonnen	3-Ester *)	17-Ester *)
Veresterung mit AgCN	3.4% ^{a)} 1.4% ^{b)}	5.3% ^{a)} 2.2% ^{b)}	63 %	9.2% ^{a)} 3.8% ^{b)}	14.3% ^{a)} 6.0% ^{b)}
Veresterung mit DMAP	18.5% ^{a)} 7.8% ^{b)}	-	63 %	50.0% ^{a)} 21.1% ^{b)}	-

*) Ausbeute (nach Abzug der zurückgewonnenen Carbonsäure)

a) % d. eingesetzten Carbonsäure

b) % d. eingesetzten [^{103}Ru]RuCl₃

Literatur

- 1) K. Hoffmann
Naturwissenschaften 1979 im Druck
- 2) E.A. Stadlbauer, E. Nipper, M. Wenzel
J.Label.Compounds 13 (1977), 491
- 3) M. Schneider, M. Wenzel, B. Riesselmann
J.Label.Compounds 15 (1978), 295
- 4) B. Riesselmann, M. Wenzel
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 (1977), 1353
- 5) E.R. Biehl, R.C. Reeves
Synthesis 1973, 360
- 6) H. Falk, Ch. Krasa, K. Schlögl
Monatshefte Chemie 100 (1969), 1552
- 7) S. Takimoto, J. Inanaga, T. Katsuki, M. Yamaguchi
Bull.Chem.Sec.Jap. 19 (1976), 2335
- 8) G. Höfle, E. Steflich
Synthesis 1972, 619
- 9) K. Hoffmann, B. Riesselmann, M. Wenzel
Chem.Ber. (in Vorbereitung)