

ETUDE THERMOANALYTIQUE DE QUELQUES STEROIDES. I. TESTOSTERONE ET DERIVES

A. CHAUVET, R. PERRIER et J. MASSE

*Laboratoire de Chimie Générale et Minérale, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier
(France)*

(Reçu le 24 juin 1980)

ABSTRACT

The thermoanalytical study of testosterone (a), phenylpropionate (b), and decanoate (c) of testosterone has enabled the existence of polymorphs for (b) and (c) to be shown and to confirm that of (a). The thermal stability, decomposition kinetics of commercial forms of testosterone (I), phenylpropionate (I) and decanoate (II) of testosterone have been determined; their temperatures and intervals of fusion are given. Knowing the thermal behaviour of these drugs, their degree of purity: $99.69 \pm 0.08\%$ (a), $99.78 \pm 0.07\%$ (b), $99.53 \pm 0.08\%$ (c), their enthalpy 6151 ± 255 (a), 6123 ± 147 (b), 8598 ± 164 (c) cal mole⁻¹, and entropy have been evaluated by differential scanning calorimetry.

RÉSUMÉ

L'étude thermoanalytique de la testostérone (a), du phénylpropionate (b) et du décanoate de testostérone (c) a permis de montrer l'existence de formes polymorphes pour (b) et (c) et de confirmer celle de (a).

La stabilité thermique, la cinétique de décomposition de la forme commerciale de la testostérone I, phénylpropionate I et décanoate II de testostérone ont été déterminées; leurs températures et intervalles de fusion ont été précisés.

Connaissant le comportement thermique de ces principes actifs, leur taux de pureté $99,69 \pm 0,08\%$ (a), $99,78 \pm 0,07\%$ (b), $99,53 \pm 0,08\%$ (c), leur enthalpie de fusion 6151 ± 255 (a), 6123 ± 147 (b), 8598 ± 164 (c) en cal mole⁻¹ et l'entropie de fusion ont été évalués par analyse calorimétrique différentielle.

Dans des publications récentes, nous avons montré l'intérêt d'utiliser les techniques thermoanalytiques pour la détermination de la stabilité thermique et du taux de pureté des substances médicamenteuses [1–6].

Nous avons également appliqué ces techniques à quelques stéroïdes et nous présentons ici les résultats relatifs à la testostérone et à quelques-uns de ses esters; en effet l'estérification de la testostérone conduit à des principes actifs dont la durée d'action est augmentée. De plus la résorption est d'autant plus lente que le poids moléculaire est élevé, entraînant un effet de retard; par contre un poids moléculaire trop élevé diminue l'activité.

Le polymorphisme de la testostérone a été décrit précédemment [7–9]. En ce qui concerne le décanoate et le phénylpropionate de testostérone

l'existence de modifications cristallines ne semble pas avoir été signalée antérieurement.

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareils

Nous avons utilisé:

l'analyseur thermique différentiel Du Pont de Nemours avec les modules pour analyse calorimétrique différentielle dont le principe a été décrit par Baxter [10] et pour analyse thermogravimétrique (module 951);

l'appareil Mettler à détermination automatique de la température de fusion [11,12] composé du four FP 51, du programmateur FP 5 et de l'enregistreur GA 11;

le microscope polarisant SM Pol Leitz, la platine chauffante FP 52 et le programmateur FP 5 pour l'étude thermomicroscopique.

Conditions opératoires

L'examen thermomicroscopique s'effectue sur l'échantillon avant et après fusion; les conditions de recristallisation sont précisées en fonction de la vitesse de refroidissement 10, 3 et 1°C min⁻¹ ou de chauffage lors d'un deuxième traitement thermique.

Les courbes thermogravimétriques (TG) sont obtenues avec des prises d'essai de 5—6 mg, une vitesse de chauffage de 10°C min⁻¹, un pouce sur l'axe des ordonnées représentant une perte de poids de 0,5 ou 1 mg; en ce qui concerne les courbes dérivées (TGD) un pouce sur l'axe des ordonnées correspond à une vitesse de perte de poids de 0,2 ou 0,5 mg min⁻¹. Toutes les manipulations sont effectuées sous courant d'azote.

En analyse calorimétrique différentielle (ACD), les prises d'essai de 1—3 mg sont soumises à des vitesses de chauffage de 20°C min⁻¹, la sensibilité étant de 0,2 ou 0,5 mcal pouce⁻¹ pour l'étude du comportement thermique.

Pour déterminer le taux de pureté les conditions retenues sont les suivantes: prises d'essai 2—5 mg, vitesse de chauffage 1°C min⁻¹, base de temps 0,5 min pouce⁻¹, sensibilité 0,2 mcal pouce⁻¹. Les expériences sont réalisées en capsules ordinaires serties.

Les enthalpies de fusion sont évaluées en se référant à l'indium et par pesée des courbes.

La température et la cinétique de fusion sont déterminées à l'aide de l'appareil Mettler en utilisant des tubes capillaires. Le tassement de la substance préalablement triturée au mortier d'agate se fait par trois chutes du tube à l'intérieur d'un cylindre de verre de 60 cm de long.

Les températures de fusion sont lues par affichage direct (A) et déterminées à partir de la courbe de fusion (B) pour des vitesses de chauffage programmées de 1, 2 et 10°C min⁻¹, le chauffage débutant à des températures inférieures de 5° ($T_d = T_f - 5$) ou 10° ($T_d = T_f - 10$) à celle du principe actif.

Le domaine de fusion est évalué à partir des courbes de fusion. L'écart-type sur la moyenne est déterminé à partir de cinq déterminations, le seuil de probabilité étant choisi égal à 0,05.

RESULTATS

Réactifs

La testostérone *, $C_{19}H_{28}O_2$ 17 β hydroxy androst-4-ène-3-one, de poids moléculaire 288,41, se présente sous forme d'une poudre blanche, insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et l'éther.

Le phénylpropionate de testostérone **, $C_{28}H_{36}O_3$, 3 oxoandrost-4-ène-17 β yle 3 phénylpropionate, de poids moléculaire 420,60, poudre blanche à odeur caractéristique. est peu soluble dans l'eau mais soluble dans l'alcool.

Le décanoate de testostérone **, $C_{28}H_{44}O_3$, 17 β hydroxy 19-nor-4-androstène-3-one 17 décanoate, de poids moléculaire 428,70 se présente également sous forme d'une poudre blanche.

Identification

Examen thermomicroscopique

Les principes actifs étudiés ne présentent pas de transformation solide—solide au cours du chauffage.

La testostérone fondue ($T_f = 154,8^\circ\text{C}$), soumise à un refroidissement à la vitesse de 3°C min^{-1} , recristallise en sphérulites à 124°C ($T_f = 154,8^\circ\text{C}$). Après refroidissement rapide suivi d'un deuxième traitement thermique apparaissent, à 40°C , des prismes ($T_f = 144,1^\circ\text{C}$) et à $73,9^\circ\text{C}$ des sphérulites ($T_f = 154,8^\circ\text{C}$). D'autres formes cristallines sont également observées dont la température de fusion n'a pu être déterminée. Les modifications cristallines décelées correspondent aux formes I et IV précédemment décrites [7,9].

Après recristallisation le phénylpropionate de testostérone présente des aspects cristallins différents, prismes ou sphérulites, apparaissant lors du refroidissement du composé préalablement fondu; à la vitesse de refroidissement de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, recristallisent, entre 100 et 80°C , des prismes et entre 80 et 70°C , des sphérulites (Fig. 1a) observés dans le même champ du microscope. En chauffant à 3°C min^{-1} au voisinage des températures de fusion, les sphérulites fondent à $112,0^\circ\text{C}$ et dans le fondu est observée la croissance des prismes (Fig. 1b) dont la température de fusion se situe à $115,8^\circ\text{C}$.

Après fusion ($T_f = 49,1^\circ\text{C}$), le décanoate de testostérone refroidi à la vitesse de 3°C min^{-1} , recristallise à 46°C sous forme de prismes ($T_f = 54,6^\circ\text{C}$). Lors d'un deuxième traitement thermique précédé d'un refroidissement rapide à la température ambiante, ce composé cristallise dès 23°C en sphérulites et à 36°C en prismes fondant respectivement à $49,1$ et $54,6^\circ\text{C}$.

Le phénylpropionate et le décanoate de testostérone présentent au moins

* Produit Sigma référence T 1500.

** Nous devons ces produits à l'obligeance du Laboratoire Organon.

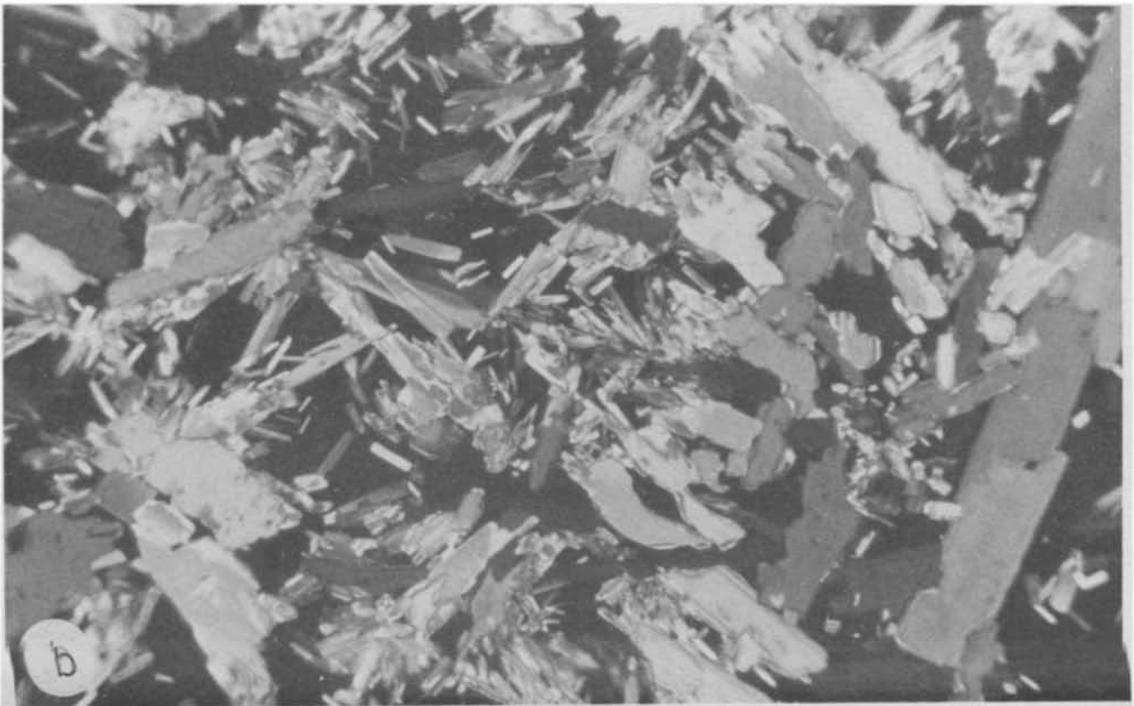
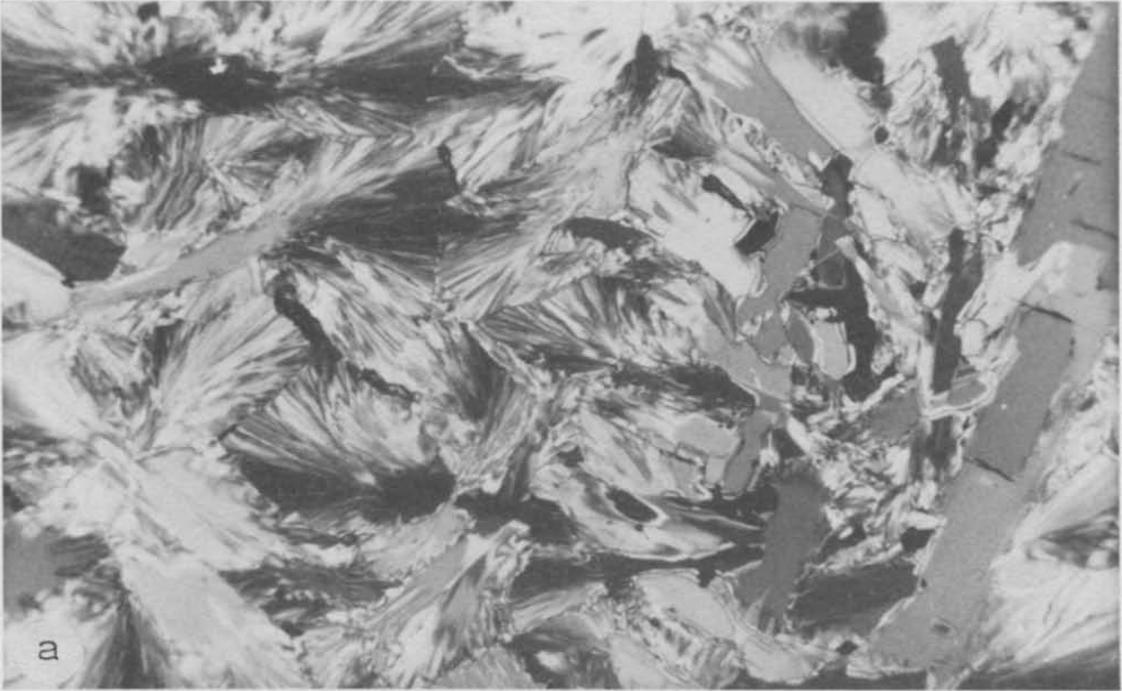


Fig. 1. Deux formes (I et II) du phénylpropionate de testostérone pris dans le même champ du microscope. (a) Prismes et sphérulites observés après recristallisation; (b) fusion des sphérulites et croissance des prismes dans le fondu des sphérulites après chauffage à $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

TABLEAU 1

Températures de fusion des eutectiques de la testostérone, du phénylpropionate et du décanoate de testostérone avec l'azobenzène, le benzile ou l'acétanilide *

	Températures de fusion eutectique (°C)		
	Azobenzène	Benzile	Acétanilide
Testostérone (I)	107,1 (107)	117,0 (120)	
Phénylpropionate de testostérone (I)		66,6 (67)	75,3 (76)
Décanoate de testostérone (II)		36,5	39,0

* Les valeurs entre parenthèses ont été publiées antérieurement [7].

deux formes cristallines, la forme commerciale étant la forme I pour le premier composé et la forme II pour le second.

Ces principes actifs peuvent être identifiés par leurs températures de fusion eutectique avec des substances de référence (Tableau 1).

Analyse thermogravimétrique

Les résultats obtenus par analyse thermogravimétrique (Fig. 2) sont rapportés dans le Tableau 2.

L'estérification de la testostérone augmente la stabilité thermique de la molécule dans le cas des composés envisagés; la différence entre la température de fusion et celle de décomposition (plus de cent degrés) a facilité grandement l'étude thermoanalytique de ces médicaments, en particulier, l'examen thermomicroscopique.

Analyse calorimétrique différentielle

L'examen des courbes d'analyse calorimétrique différentielle obtenues avec la testostérone met en évidence un seul accident endothermique au cours du chauffage, la fusion, se situant à 155°C. Après refroidissement lent suivi d'un deuxième traitement thermique, un très faible accident endothermique apparaît à 144°C; il peut être attribué à la fusion de la forme IV observée par thermomicroscopie et décrite antérieurement (Fig. 3). Après refroidissement rapide un accident exothermique apparaît au cours du

TABLEAU 2

Résultats de l'étude thermogravimétrique

	Température de décomposition (°C)		Vitesse de décomposition (mg min ⁻¹)
	Début	Fin	
Testostérone	158	325	1,04
Phénylpropionate de testostérone	225	410	2,75
Décanoate de testostérone	225	410	1,48

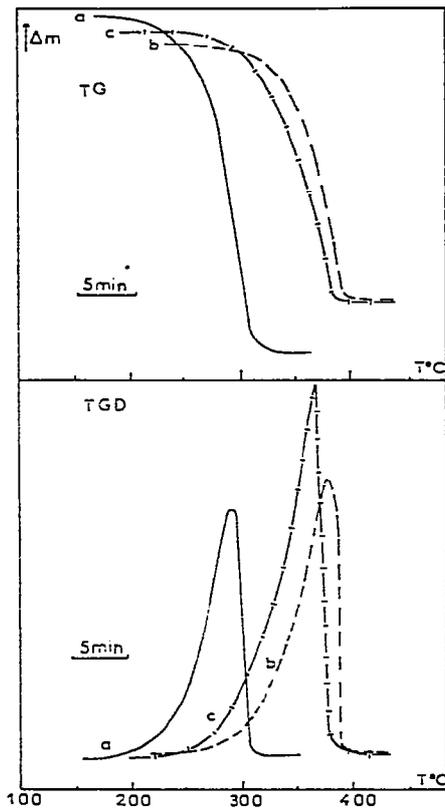


Fig. 2. Courbes thermogravimétriques (TG) et dérivées (TGD). a, Testostérone (—): prise d'essai 6 mg, perte de poids $0,5 \text{ mg pouce}^{-1}$ (TG), vitesse de perte de poids $0,2 \text{ mg min}^{-1} \text{ pouce}^{-1}$ (TGD). b, Phénylpropionate de testostérone (---): prise d'essai 5,56 mg, perte de poids $0,5 \text{ mg pouce}^{-1}$ (TG), vitesse de perte de poids $0,2 \text{ mg min}^{-1} \text{ pouce}^{-1}$ (TGD). c, Décanoate de testostérone (-|-|-): prise d'essai 5,60 mg, perte de poids $0,5 \text{ mg pouce}^{-1}$ (TG), vitesse de perte de poids $0,2 \text{ mg min}^{-1} \text{ pouce}^{-1}$ (TGD).

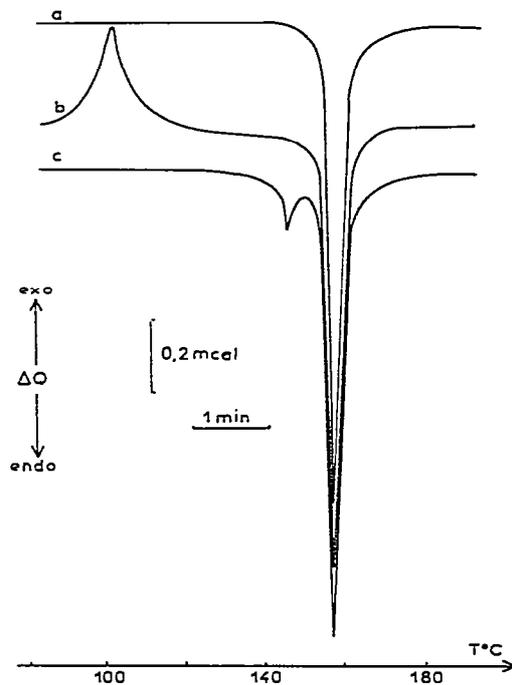


Fig. 3. Courbes d'analyse calorimétrique différentielle de la testostérone. Conditions expérimentales: prise d'essai 1 mg, vitesse de chauffage $20^\circ\text{C min}^{-1}$. a, Premier traitement thermique; b, deuxième traitement thermique après refroidissement lent; c, troisième traitement thermique après refroidissement rapide.

chauffage entre 85 et 110°C correspondant à la recristallisation (Fig. 3).

En ce qui concerne le phénylpropionate de testostérone, un seul accident endothermique apparaît à la même température quel que soit le mode de refroidissement. Dans les conditions expérimentales retenues la forme II n'a pu être mise en évidence (Fig. 4).

Dans le cas du décanoate de testostérone le produit initial présente une courbe d'analyse calorimétrique différentielle avec un seul accident endothermique à 49°C . Après fusion et, selon les conditions de refroidissement, apparaît un deuxième accident endothermique dont l'intensité varie (Fig. 5).

Température et cinétique de fusion par mesure de la transparence

Les résultats moyens correspondant aux valeurs déterminées par affichage direct (A) et à partir des courbes de fusion (B) (Fig. 6) de cinq mesures sont

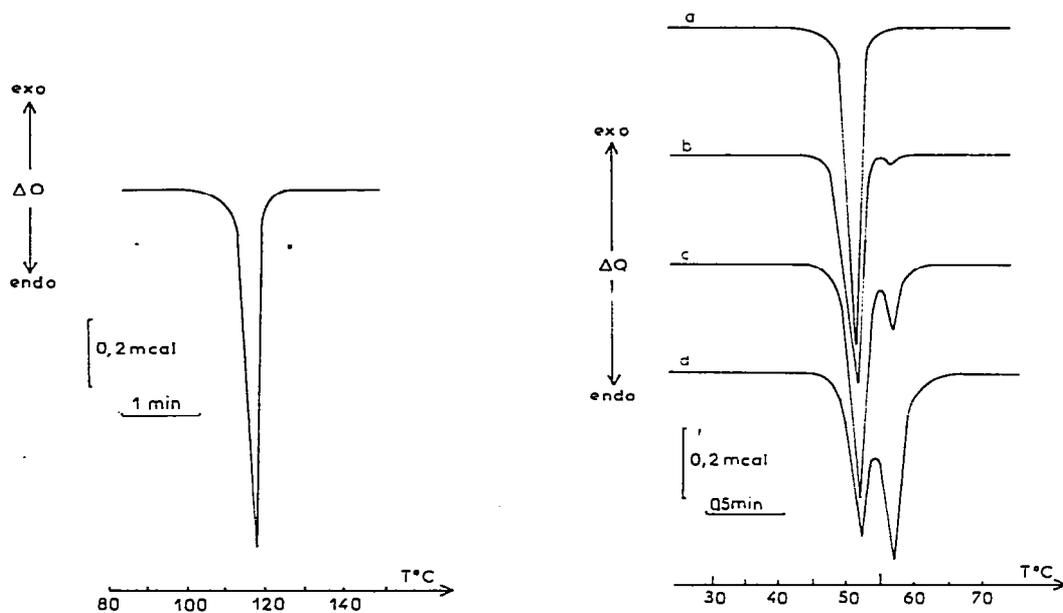


Fig. 4. Courbe d'analyse calorimétrique différentielle du phénylpropionate de testostérone. Conditions expérimentales: prise d'essai 1 mg, vitesse de chauffage $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Fig. 5. Courbes d'analyse calorimétrique différentielle du décanoate de testostérone. Conditions expérimentales: prise d'essai 1,14 mg, vitesse de chauffage $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$. a, Premier traitement thermique; b, deuxième traitement thermique après refroidissement lent; c, troisième traitement thermique après refroidissement rapide; d, quatrième traitement thermique après refroidissement par l'azote liquide.

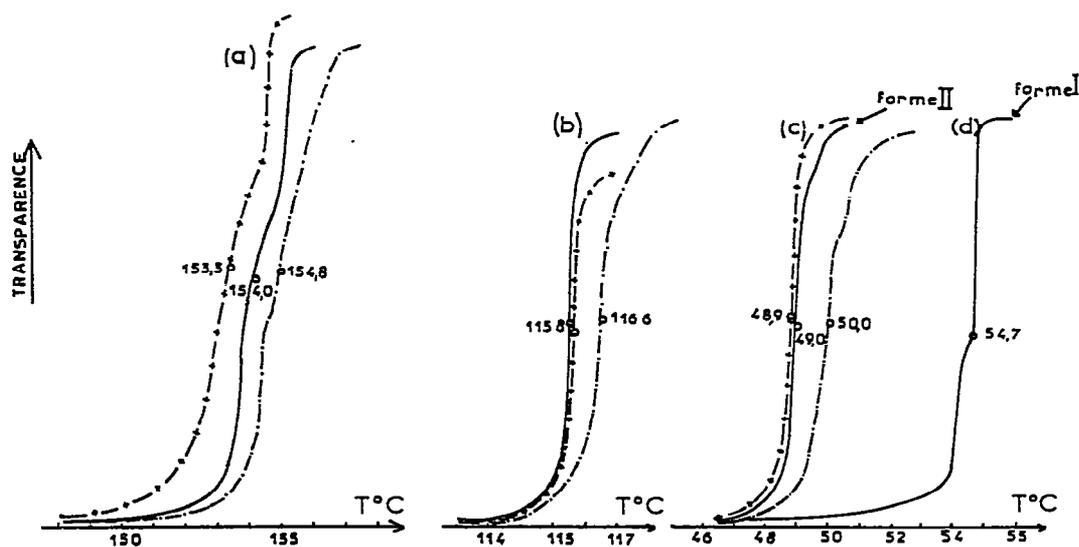


Fig. 6. Cinétique de fusion de la testostérone, du phénylpropionate et du décanoate de testostérone en fonction de la transparence. Conditions expérimentales: vitesses de chauffage $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (---), $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (—), $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (-.-.-). Température de départ: $T_d = T_f - 10$. a, Testostérone (I); b, phénylpropionate de testostérone (I); c, décanoate de testostérone (II); d, décanoate de testostérone (I).

TABLEAU 3
Températures de fusion de la testostérone, du phénylpropionate et du décanoate de testostérone

	Vitesse de chauffage (°C min ⁻¹)	$T_d = T_f - 5$		$T_d = T_f - 10$	
		A *		A *	
		B **	B **	B **	B **
Testostérone	1	153,30 ± 0,15	153,33 ± 0,21	153,34 ± 0,16	153,22 ± 0,28
	2			154,02 ± 0,23	153,60 ± 0,24
	10			154,66 ± 0,25	154,50 ± 0,30
Phénylpropionate de testostérone	1	115,42 ± 0,05	115,42 ± 0,05	115,64 ± 0,18	115,56 ± 0,11
	2			115,80 ± 0,15	115,64 ± 0,22
	10			116,56 ± 0,06	116,48 ± 0,10
Décanoate de testostérone	1			48,86 ± 0,11	48,86 ± 0,06
	2	49,16 ± 0,07	49,12 ± 0,02	49,16 ± 0,16	49,02 ± 0,10
	10			50,44 ± 0,13	50,26 ± 0,18

* Lues par affichage automatique.

** Déterminées à partir de l'enregistrement en fonction de la transparence.

TABLEAU 4

Intervalles de fusion de la testostérone, du phénylpropionate et du décanoate de testostérone

	Vitesse de chauffage (°C min ⁻¹)	$T_d = T_f - 5$	$T_d = T_f - 10$
Testostérone	1	3,36 ± 0,34	3,36 ± 0,34
	2		3,63 ± 0,56
	10		5,48 ± 0,49
Phénylpropionate de testostérone	1	3,82 ± 0,37	4,06 ± 0,11
	2		4,90 ± 0,25
	10		7,98 ± 0,49
Décanoate de testostérone	1		3,58 ± 0,25
	2	4,00 ± 0,17	4,04 ± 0,25
	10		6,52 ± 0,41

indiqués dans le Tableau 3; l'intervalle de confiance a été calculé avec un seuil de probabilité choisi à 0,05 près.

La température de fusion des trois principes actifs étudiés n'est pas modifiée par la température de départ ($T_d = T_f - 5$ ou $T_d = T_f - 10$) en utilisant une même vitesse de chauffage (Tableau 3). Elle est faiblement influencée par la vitesse de chauffage. Les intervalles de fusion (Tableau 4) sont sensiblement plus importants pour les esters de la testostérone que pour la testostérone.

Si l'on considère les vitesses de chauffage de 1 et 2°C min⁻¹, ces composés semblent pouvoir être classés dans le groupe I défini par Vergnon et Drevon [11]. Cependant, à la vitesse de 10°C min⁻¹, les intervalles de fusion sont élargis, particulièrement dans le cas du phénylpropionate.

Parmi les stéroïdes, les dérivés de l'androstane sont pratiquement les seuls à présenter une fusion franche. Leur température de fusion peut être considérée comme un critère d'identification et de pureté. La cinétique de fusion en fonction de la transparence nous a permis de confirmer l'existence de deux formes polymorphes pour le décanoate de testostérone (Fig. 6).

Détermination de la pureté

Les conditions opératoires de détermination du taux de pureté par analyse calorimétrique différentielle sont choisies en fonction de l'étendue du domaine de fusion, de la stabilité thermique et de l'existence du polymorphisme après recristallisation des principes actifs envisagés.

La vitesse de 1°C min⁻¹ a été retenue en utilisant les courbes obtenues lors du premier traitement thermique. Le pic endothermique résultant de la fusion du décanoate de testostérone est présenté (Fig. 7). Les diverses fractions de substance fondue F et les températures de fusion ont été également mesurées (Fig. 7).

La droite représentant l'inverse de la fraction de fondu $1/F$ en fonction de la température, après linéarisation, définit par son intersection avec l'axe

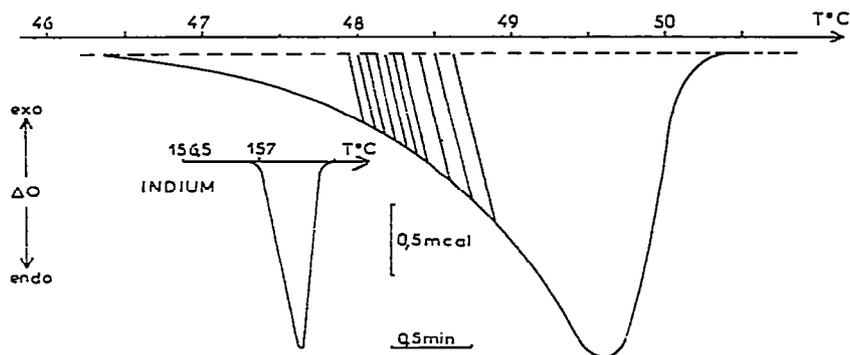


Fig. 7. Courbe de fusion du décanoate de testostérone (II) par analyse calorimétrique différentielle. Conditions expérimentales: prise d'essai 4,02 mg, vitesse de chauffage $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, base de temps $0,5 \text{ mcal pouce}^{-1}$.

des températures la valeur T_{fo} (Fig. 8). Nous indiquons les résultats d'une manipulation effectuée sur une prise d'essai de 4,02 mg (Tableau 5).

La pente de la droite étant de 0,135, la température de fusion de l'échantillon pur $49,20^{\circ}\text{C}$ (soit $322,30 \text{ K}$) (Fig. 8), l'enthalpie de fusion évaluée $8599 \text{ cal mole}^{-1}$, la fraction molaire d'impureté est donnée par la relation

$$x_2 = \frac{0,135 \times 8599}{1,98 \times (322,30)^2} = 0,0053$$

soit en pourcentage 0,53. Le taux de pureté en pour cent est donc 99,47.

Les déterminations effectuées sur cinq prises d'essai d'un même échantillon, dans des conditions opératoires identiques, ont donné les résultats rapportés dans le Tableau 6. Le taux de pureté du décanoate est déterminé avec précision. Les résultats obtenus en respectant le même protocole expéri-

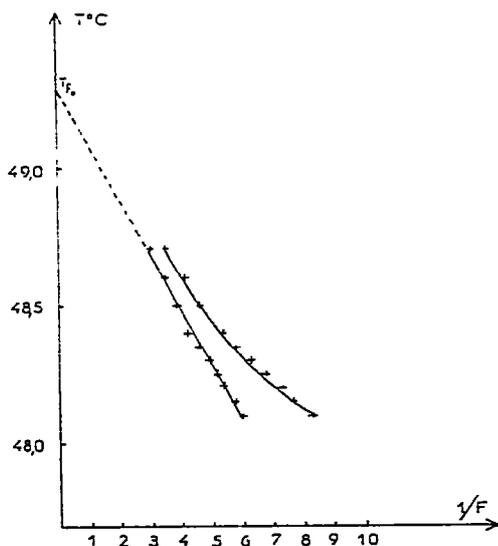


Fig. 8. Courbes présentant les températures de fusion en $^{\circ}\text{C}$ du décanoate de testostérone (II) en fonction de l'inverse de la fraction de substance fondue.

TABLEAU 5

Températures de fusion en fonction de $1/F$, inverse de la fraction de substance fondue du décanoate de testostérone

$1/F$	Températures de fusion (°C) après correction	$1/F$ après linéarisation
3,51	48,70	3,09
4,07	48,60	3,50
4,69	48,50	3,91
5,39	48,40	4,36
5,82	48,35	4,62
6,30	48,30	4,91
6,78	48,25	5,17
7,30	48,20	5,46
7,49	48,15	5,73
8,43	48,10	6,03

TABLEAU 6

Taux de pureté de l'échantillon commercial de décanoate de testostérone (II) déterminé par analyse calorimétrique différentielle

x_i (%)	$ x_i - \bar{x} \times 10^2$	$(x_i - \bar{x})^2 \times 10^4$
99,47	6	36
99,60	7	49
99,44	9	81
99,57	4	16
99,56	3	9
497,64		191

Résultat moyen: 99,53

Ecart type sur la moyenne: 0,03

Intervalle de confiance: $\pm 0,08\%$

Taux de pureté: $99,53 \pm 0,08$

TABLEAU 7

Valeurs du taux de pureté, de l'enthalpie et de l'entropie de fusion de la testostérone, du phénylpropionate et de décanoate de testostérone, résultat moyen et intervalle de confiance

	Taux de pureté (%)	Enthalpie de fusion (cal mole ⁻¹)	Entropie de fusion (cal mole ⁻¹ K ⁻¹)
Testostérone (I)	$99,69 \pm 0,08$	6151 ± 255	$14,40 \pm 0,59$
Phénylpropionate de testostérone (I)	$99,78 \pm 0,07$	6123 ± 147	$15,78 \pm 0,38$
Décanoate de testostérone (II)	$99,53 \pm 0,08$	8598 ± 164	$26,68 \pm 0,54$

mental pour les trois composés étudiés sont consignés dans le Tableau 7. La fiabilité de la méthode de détermination de la pureté par analyse calorimétrique différentielle apparaît excellente en ce qui concerne les principes actifs envisagés.

Enthalpie et entropie de fusion

Les résultats moyens calculés à partir de cinq déterminations effectuées pour chacun des composés sont indiqués dans le Tableau 7. La valeur de l'enthalpie de fusion obtenue pour la testostérone est comparable à celle donnée par Grady et al. [13].

CONCLUSION

L'étude du comportement thermique des deux esters de la testostérone nous a permis de mettre en évidence le polymorphisme de ces principes actifs par différentes méthodes: thermomicroscopie et éventuellement analyse calorimétrique différentielle et mesure de la transparence.

Les conditions de recristallisation, l'aspect des formes observées ont été indiquées, leurs températures de fusion précisées. La forme commercialisée du décanoate de testostérone correspond à la modification cristalline possédant la température de fusion la plus faible ($T_f = 49,1^\circ\text{C}$).

Les enthalpies, 6151 ± 255 (a), 6123 ± 147 (b), 8598 ± 164 (c) cal mole⁻¹, et les entropies de fusion, $14,40 \pm 0,59$ (a), $15,78 \pm 0,38$ (b), $26,68 \pm 0,54$ (c), cal mole⁻¹ K⁻¹ ont été calculées et les taux de pureté évalués par analyse calorimétrique différentielle; la reproductibilité de la méthode se trouve confirmée. Les conditions expérimentales, en particulier la base de temps, la vitesse de chauffage ont été précisées.

La stabilité thermique et la cinétique de décomposition ont été déterminées par analyse thermogravimétrique contribuant à la connaissance des possibilités de l'étude thermoanalytique des principes actifs considérés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Masse et A. Chauvet, *J. Therm. Anal.*, 14 (1978) 299.
- 2 J. Masse et A. Chauvet, *J. Therm. Anal.*, 14 (1978) 313.
- 3 J. Masse, R. Malaviolle et A. Chauvet, *J. Therm. Anal.*, 16 (1979) 123.
- 4 J. Masse, R. Malaviolle et A. Chauvet, *J. Therm. Anal.*, 16 (1979) 341.
- 5 J. Masse, R. Malaviolle et A. Chauvet, *J. Therm. Anal.*, 17 (1979) 463.
- 6 J. Masse, A. Chauvet, J.P. Salin, F. Puisieux et D. Duchene, *Thermochim. Acta*, 40 (1980) 377.
- 7 M. Kuhnert-Brandstatter, E. Junger et A. Kofler, *Microchem. J.*, 9 (1965) 105.
- 8 R.J. Mesley, *Spectrochim. Acta*, 22 (1966) 889.
- 9 M. Kuhnert-Brandstatter, *Pharm. Ind.*, 39 (1977) 377.
- 10 R.A. Baxter, *Thermal Analysis*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1969, p. 65.
- 11 P. Vergnon et B. Drevon, *Lyon Pharm.*, 25 (1974) 541.
- 12 A. Chauvet, Thèse Pharmacie, Montpellier, 1978.
- 13 L.T. Grady, S.E. Hays, R.H. King, H.R. Klein, W.G. Mader, D.K. Wyatt et R.O. Zimmerman, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 456.