



УДК 547.689.6'314'11*2.057:577.175.6'14

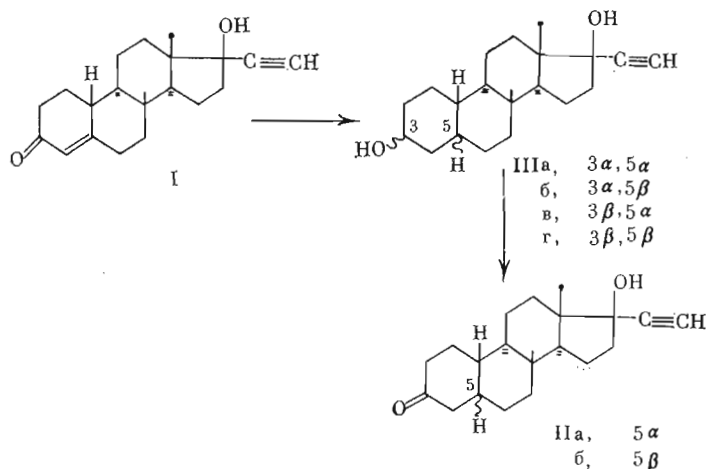
ПРОСТОЙ СИНТЕЗ ПОЛНОГО НАБОРА НЕКОНЪЮГИРОВАННЫХ
МЕТАБОЛИТОВ НОРЭГИСТЕРОНА И ИХ ДЕЙТЕРОАНАЛОГОВ*Голубовская Л. Е., Пивницкий К. Б.**Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов АМН СССР, Москва*

Малодоступные ди- и тетрагидрометаболиты норэгистерона (НЭС) и их дейтероаналоги могут быть легко получены на основе восстановления НЭС борогидридом натрия в присутствии N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамина, протекающего по схеме 1,4-присоединения. Это восстановление приводит к смеси 4 стереоизомеров тетрагидрометаболитов — 19-норпрегн-20-ин-3,17-диолов, разделенной флэш-хроматографией. Окисление индивидуальных стереоизомеров тетрагидрометаболитов хлорхроматом пиридина дает два стереоизомера дигидрометаболитов — 19-норпрегн-20-ин-17 β -ол-3-онов. Из дигидрометаболитов изотопным обменом с D_2O —MeOD в щелочных условиях с последующим восстановлением $NaBD_4$ получены 2,2,3,4,4-пентадейтерированные стереоизомеры тетрагидрометаболитов, а также два изомера 2,2,3,4,4,16,16,17-октадейтероэстран-3,17 β -диолов — стандарты для хроматомасс-фрагментографии.

Норэгистерон (НЭС, I), иногда в виде эфиров, является наиболее широко используемым сейчас контрацептивным стероидом. Недавно законченная обширная международная программа синтеза и изучения эфиров НЭС [1] привела к выявлению нескольких новых эфиров с особенно благоприятными биологическими свойствами и дальнейшему расширению области использования этого стероида. Относительно давно было установлено, что метаболизм НЭС протекает по тривиальному для стероидных гормонов пути — последовательным восстановлением Δ^4 -3-кетогруппировки, приводя через смеси стереоизомерных дигидро- (IIa, б) к тетрагидропроизводным (IIIa—г) и затем их конъюгатам [2—7]. Совсем недавно интерес к метаболитам НЭС резко возрос в связи с обнаружением значительной андрогенной и гестагенной активности у дигидрометаболита (IIa) и эстрогенной активности у тетрагидрометаболитов (IIIa, в) [8, 9]. С гормональной активностью метаболитов связывают ряд побочных эффектов НЭС, поэтому для изучения фармакологии НЭС сейчас необходимы стандарты всех шести гидрированных метаболитов НЭС, в том числе в полидейтерированной форме для количественного определения метаболитов хроматомасс-спектрометрическим методом.

Только один из указанных метаболитов — диол (IIIб) — доступен коммерчески [10]. Хотя синтезы всех метаболитов НЭС описаны в литературе [7, 9, 11, 12], они многостадийны, и каждый приводит к получению одного-двух метаболитов, так что для получения полного набора метаболитов требуется серьезная работа. Источником образцов метаболитов НЭС в цитированных выше и многих других работах служили в основном частные коллекции. Мы разработали простой способ одновременного получения всех четырех тетрагидрометаболитов (IIIa—г) в одну химическую операцию. Из тетрагидрометаболитов дополнительными одной — двумя стадиями получены дигидрометаболиты (IIa, б) и полидейтерированные аналоги метаболитов НЭС (схема 1).

Известно, что восстановление сопряженных непределельных кетонов борогидридом натрия в тетрагидрофуране в присутствии N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамина (TMEDA) в отличие от восстановления в гидроксисодержащих растворителях протекает с нестереоселективным восстановлением сопряженной двойной связи и приводит к смеси насыщенных кетонов и соответствующих спиртов [13, 14]. Это восстановление подобно метаболическому восстановлению стероидных непределельных кето-



пов, в связи с чем представляется логичным использовать его для синтеза набора метаболитов. Действительно, восстановление НЭС в указанных условиях приводит к сложной смеси продуктов 1,2- и 1,4-присоединения, из которых высокоэффективной флэш-хроматографией [15] выделены в индивидуальном состоянии все четыре тетрагидрометаболита (IIIа–г) с выходами от 1 до 32%. Суммарный выход тетрагидропроизводных с учетом неподеленных промежуточных фракций достигает 63,4%, соотношение стереоизомеров составляет 2,5 : 31 : 62 : 4,5. Окислением индивидуальных (IIIб, в) хлорхроматом пиридиния получены дегидрометаболиты (IIа, б) с высокими выходами. В литературе, по-видимому, описаны константы в всех полученных соединений, поэтому мы свели измеренные нами константы в таблицу; имеющиеся в литературе константы согласуются с нашими.

Для синтеза полидейтерированных аналогов метаболитов НЭС применен метод, ранее разработанный для синтеза дейтерированных метаболитов прогестерона [18]. При этом также использован принцип одновременного синтеза смеси всех стереоизомеров с последующим разделением. Вышеописанным восстановлением НЭС и окислением полученной смеси продуктов без разделения легко получена смесь 3-кетопроизводных (IIа, б) с выходом в 82% на невозвращенный НЭС. Изотопный обмен протонов в α-положениях к карбонильной группе проведен на этой смеси нагреванием в растворе Na_2CO_3 в $\text{D}_2\text{O} - \text{MeOD} - \text{ТГФ}$. По завершении изотопного обмена (23 ч) добавка в реакционную смесь NaBD_4 стабилизирует введенный изотоп восстановлением карбонильной группы (с одновременным введением еще одного атома дейтерия). Полученная смесь

Свойства метаболитов норэтистерона

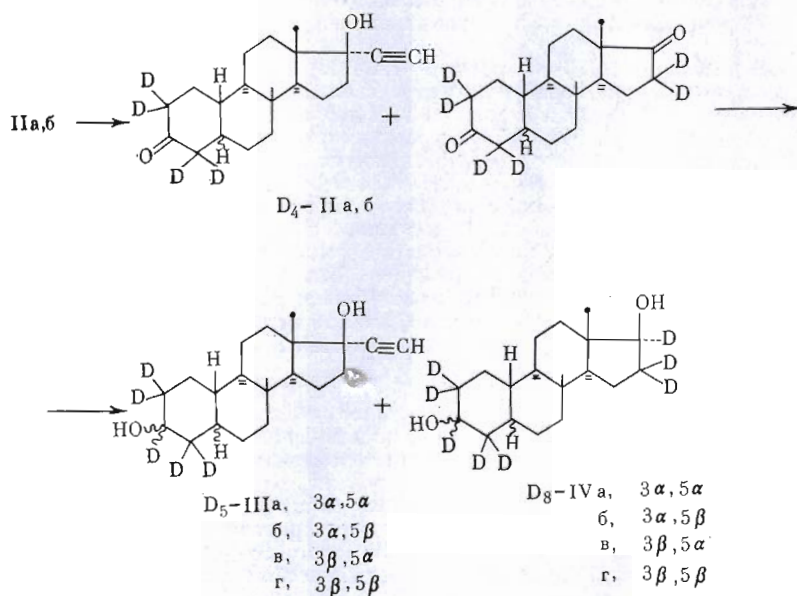
Соединение	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, град (с)	R_f в условиях **				ГЖХ-подвижности (относительное время удерживания бис-ВДМС-эфира)	Литература
			А	Б	В	Г		
IIа	210–212	+8,3(0,78)	0,53	0,65	0,67	0,62		[12]
IIб	194–196	+4,8(0,84)	0,55	0,67	0,70	0,63		
IIIа	117–119	-2,4(0,81)	0,31	0,52	0,50	0,56	0,755	
IIIб	85–89	-19,8(0,74)	0,21	0,40	0,37	0,44	0,772	[16]
IIIв	190–192	-23,4(0,92)	0,22	0,39	0,42	0,42	1,000 ***	[9, 12]
IIIг	165–170		0,33	0,51	0,54	0,54	0,903	
D ₈ -IVб	210–212	+24,6(0,75)	0,06	0,17	0,13	0,21	0,644	[17]
D ₈ -IVв	174–176	+18,4(0,83)	0,09	0,23	0,30	0,36	0,774	[12]

* Образцы кристаллизовали из водного ацетона (IIа, б; IIIа, в), гексана (IIIб), смеси бензол — гексан (IIIг) или этилацетата (D₈-IVб, в).

** Расшифровка условий — см. «Экспер. часть».

*** Время выхода 4,2 мин в указанных в эксперименте условиях.

пентадейтеросоединений (IIIa—г) хроматографически разделена на компоненты; при этом их суммарный выход составил 52%. Дополнительно выделены индивидуальные $3\alpha,5\beta$ - и $3\beta,5\alpha$ -стереоизомеры октадейтеро-эстран-3,17 β -диолов (IVб, в) и в смеси хроматографически идентифицированы стереоизомеры D₈-(IVa, г); суммарный выход этих продуктов 46,3%. Образование последних, учитывая изотопный состав, происходит путем отщепления этинильной группы в щелочных условиях и изотопного обмена в продукте деградации с последующим восстановлением образовавшейся 17-кетогруппы аналогично 3-кетогруппе (схема 2). Действительно, изотопный состав D₅-(IIIa—г) (D₀ 0,3%, D₁ 0,3%, D₂ 0,7%, D₃ 2,9%, D₄ 17,7%, D₅ 47,7%, D₆ 30,3%) свидетельствует о частичной ионизации (и обмене) этинильного водородного атома в процессе изотопного обмена. Изотопный состав D₈-(IVб, в) свидетельствует о высокой гомогенности: D₀ — D₄ ≤ 1%, D₅ 1,1%, D₆ 2,2%, D₇ 19,9%, D₈ 76,2%. По изотопному составу, в особенности низкому содержанию D₀-форм, полученные дейтерированные образцы пригодны для использования как внутренние стандарты в хроматомасс-фрагментографии.



Стереизомерные эстран-3,17-диоли (и, по-видимому, соответствующие 17-кетопроизводные) также наблюдались как метаболиты НЭС в макак, хотя, насколько нам известно, индивидуальные соединения идентифицированы не были [19]. Кроме того, эстран-3,17 β -диоли являются метаболитами эндогенных стероидов [20].

Предлагаемый синтез восстановленных неконъюгированных метаболитов НЭС позволяет в одну — три химические стадии получать все дигидро-, тетрагидро- и некоторые деэтинилированные метаболиты и их полидейтерированные аналоги для целей биохимического изучения, идентификации и количественного анализа. Наиболее трудоемкая часть — хроматографические выделения индивидуальных соединений при анализе спектра метаболитов не требуется, если имеются детали сведения о хроматографической подвижности метаболитов, приведенные в таблице.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на нагревательном столике Voetius (ГДР) углы вращения измерены на приборе Polamat A (ГДР) в хлороформе. ГЖХ-подвижности и масс-спектры соединений в виде бис-*трет*-бутилдиметилсилиловых (BDMS) эфиров получены на хроматомасс-спектрометре LKB-2091 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 22,5 эВ в хроматографическом режиме на кварцевой капиллярной колонке (25 м × 0,36 мм) с фазой SE-30, газ-носитель — гелий (70 см/с) при 280° С.

Качественный анализ смесей проводили методом ТСХ на пластинах марки Silufol UV₂₅₄(ЧССР) в системах бензол — эфир, 4 : 1, четыре проявления (условия А); циклогексан-этилацетат, 2 : 1, четыре проявления (Б), и на пластинах Whatman LK5DF (Merck, ФРГ) в тех же системах, два проявления (условия В и Г), обнаружение опрыскиванием 10% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты. Для препаративного разделения смесей использовали метод высокоэффективной флэш-хроматографии (ВЭФХ) [15] на силикагеле Silasorb 300, 15 мкм (ЧССР), диаметр колонки 20 мм (Д), и на силикагеле Kieselgel H (Fluka A. G., Швейцария), диаметр колонки 35 мм (Е), система для элюции бензол — эфир, 9 : 1, нанесение смеси в виде 10% раствора в смеси бензол — хлороформ — CCl₄, 1 : 1 : 1.

В работе использованы коммерческие дейтерированные реактивы со следующим содержанием изотопа (в атомных %): D₂O — 99,8, MeOD — 98,5, NaBD₄ — 98,0.

Коммерческие BDMS-эфир трифторметансульфоновой кислоты (Bu^tMe₂SiOTf, Fluka, Швейцария) и TMEDA (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Остальные реактивы и растворители — отечественного производства категории ос. ч. и х.ч.

Абсолютированные растворители проводили по стандартным методикам. Растворители упаривали в вакууме при 40° С.

Бис-BDMS-эфиры описанных соединений получали обработкой 0,3 мг (6·10⁻⁴ ммоль) исходного субстрата 60 мкл (0,42 ммоль) абс. Et₃N и 200 мкл (0,2 ммоль) 1 М раствора Bu^tMe₂SiOTf в абс. бензоле. Раствор нагревали 2 ч при 50° С, после охлаждения добавляли 500 мкл гексана и 200 мкл H₂O, водный слой после встряхивания отбрасывали, гексановой промывали 200 мкл H₂O, упаривали досуха и остаток растворяли в 100 мкл гексана.

19-Норпрегн-20-ин-3,17β-диола (IIIa—г). К прогретой в течение 0,5 ч при 50° С в атмосфере аргона при перемешивании суспензии 205 мг (5,39 ммоль) NaNH₄ в 1,12 мл (7,44 ммоль) TMEDA и 55 мл абс. THF добавляли раствор 800 мг (2,68 ммоль) НЭС (I) в 40 мл абс. THF. Через 5 ч нагревания при 50° С охлажденную реакционную смесь разбавляли 100 мл H₂O и к образовавшемуся прозрачному желтоватому раствору добавляли до насыщения (NH₄)₂SO₄. Двухфазную систему экстрагировали 200 мл этилацетата, водный слой вновь экстрагировали этилацетатом (2 × 70 мл). Объединенные экстракты промывали 50 мл H₂O, сушили над прокаленным MgSO₄. Полученное после упаривания зеленоватое масло подвергали многократной ВЭФХ (Д и Е) и выделенные продукты очищали кристаллизацией. Выделяли 8,2 мг (1,0%) 3α,5α-диола (IIIa), 98 мг (12,1%) соответствующего 3α,5β-изомера (IIIб), 260 мг (32,1%) 3β,5α-диола (IIIв), 48 мг (2,2%) 3β,5β-изомера (IIIг), 10 мг (1,2%) смеси изомеров (IIIa, г) и 120 мг (14,8%) смеси изомеров (IIIб, в). Константы полученных соединений приведены в таблице.

19-Норпрегн-20-ин-17β-ол-3-оны (IIa, б). А. К суспензии тонкорастертой смеси 80 мг (0,38 ммоль) RuHCrO₃Cl₂, 6 мг (0,08 ммоль) безводного AcONa и 60 мг целита в 2 мл абс. CH₂Cl₂ при 20° С и перемешивании добавляли раствор 70 мг (0,23 ммоль) диола (IIIв) в 2 мл абс. CH₂Cl₂. Через 2 ч перемешивания при 20° С реакционную смесь разбавляли 5 мл абс. эфира и фильтровали через колонку с 2 г Al₂O₃ (нейтр., II ст. акт.), элюция 50 мл эфира и 30 мл смеси эфир — CH₂Cl₂, 1 : 1. Полученное после упаривания объединенных элюатов масло хроматографировали в условиях Е. Получили 49,5 мг (70,5%) белого кристаллического 5α-кетона (IIa).

Б. Из 40 мг диола (IIIб) вышеописанным способом получали 35 мг (88,2%) 5β-кетона (IIб).

В. Восстановлением 600 мг (2,01 ммоль) НЭС (I) в 40 мл абс. THF 77 мг (2,02 ммоль) NaNH₄ в присутствии 0,84 мл (5,58 ммоль) TMEDA при 50° С в течение 8 ч с последующим окислением полученного продукта вышеописанным методом получали 244 мг (40,7%) НЭС (I) и 294 мг (46,7%) на введенное, 82,1% на вошедшее исходное) смеси изомерных кетонов (IIa, б).

2, 2, 3, 4, 4-Пентадейтеро-19-норпрегн-20-ин-3,17β-диола (D₅-IIIa—г) и 2, 2, 3, 4, 4, 16, 16, 17-октадейтерозэтран-3,17β-диола (D₈-IVa—г). К 260 мг (0,90 ммоль) полученной смеси кетонов (IIa, б) в атмосфере аргона при перемешивании добавляли предварительно прокипяченный раствор 230 мг (2,20 ммоль) Na₂CO₃ в смеси 9,5 мл (522 ммоль) D₂O, 4,8 мл (126 ммоль) MeOD и 26 мл абс. ТГФ. Раствор нагревали 23 ч в атмосфере аргона при 60° С, периодически контролируя изотопный состав образующихся 2, 2, 4, 4-тетрадейтерокетонов (D₄-IIa, б). Для анализа изотопного состава аликвоту реакционной смеси разбавляли гексаном и регистрировали масс-спектр прямым вводом в ионный источник. Конечный изотопный состав * продукта (по относительным интенсивностям ионов в интервале m/z 300—304 (M⁺) и 274—278 (M⁺ — C₂H₂)) : D₀ 0,43%, D₁ 0,51%, D₂ 1,48%, D₃ 7,13%, D₄ 89,6%. К охлажденному до 20° С раствору добавляли 60 мг (1,42 ммоль) NaBD₄. Через 0,5 ч перемешивания при 20° С раствор разбавляли 50 мл H₂O, органический растворитель упаривали, водный раствор экстрагировали CH₂Cl₂ (3 × 50 мл). Объединенные экстракты промывали H₂O (2 × 15 мл), промывные воды экстрагировали 50 мл CH₂Cl₂. После упаривания экстрактов полученную полукристаллическую смесь многократно делили методом ВЭФХ (Д и Е). Из смеси выделяли 46,8 мг (17,6%) D₅-3α,5β-диола (D₅-IIIб), 54,8 мг (20,6%) его 3β,5α-изомера (D₅-IIIв), 3,2 мг (1,2%) 3β,5β-диола (D₅-IIIг), 8,6 мг (3,2%) смеси изомеров (D₅-IIIa) и (D₅-IIIг) и 24,4 мг (9,2%) смеси диолов (D₅-IIIб) и (D₅-IIIв).

* Во всех приводимых изотопных составах математически вычтен вклад природной примеси ¹³C.

В результате деления получили также октадеутерированные эстрандиолы: 30 мг (12,1%) D₈-3α, 5β-диола (D₈-IVб), 70 мг (28,2%) D₈-3β,5α-изомера (D₈-IVв), 15 мг (6,0%) смеси D₈-3α,5α-(D₈-IVа) и D₈-3β,5β-(D₈-IVг)-диолов. Физико-химические характеристики и хроматографические подвижности выделенных D₅-этивилэстрандиолов (D₅-IIIа—г) идентичны наблюдаемым в случае противных аналогов (IIIа—г). Цитированные в тексте изотопные составы полученных дейтерированных соединений определены по относительным интенсивностям пиков в масс-спектрах их бис-BDMS-эфиров. В случае D₅-диолов (D₅-IIIа—г) использовали изотопный кластер ионов с m/z 473—478 ($M - Bu^t$)⁺, в случае же D₈-диолов (D₈-IVа—г) учитывали ионы с m/z 449—457 ($M - Bu^t$)⁺. Масс-спектры полученных D₅-диолов (D₅-IIIа—г), m/z (соответствующие интенсивности, %): 535 (M^+ , 25, 19, 15, 17), 520 ($(M - Me)^+$, 96, 92, 60, 88), 478 ($(M - Bu^t)^+$, 100, 100, 100, 100), 464 (32, 32, 21, 42), 403 ($(M - Bu^tMe_2SiOH)^+$; 21, 5, 14, 58), 346 ($(M - (Bu^t + Bu^tMe_2SiOH))^+$, 21, 31, 13, 44), 270 ($M - (Bu^tMe_2SiOH + Bu^tMe_2SiOD)^+$, 12, 7, 6, 24), 246 ($(M - (Bu^tMe_2SiOH + Bu^tMe_2SiOD + C_2H_2))^+$, 40, 43, 27, 61), 220 (20, 24, 12, 29). Масс-спектры полученных D₈-эстрандиолов (D₈-IVб, в), m/z (соответствующие интенсивности, %): 457 ($M - Bu^t$)⁺, 100, 100), 381 ($(M - Bu^tMe_2SiOD)^+$, 6, 16), 248 ($(M - 2 \times Bu^tMe_2SiOD)^+$, 28, 50).

Работа выполнена по планам и при финансовой поддержке Комиссии по репродукции человека Всемирной организации здравоохранения. Авторы благодарны фирме Сёрль (США) за предоставление технических отчетов фирмы и результатов литературного поиска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crabbell P., Archer S., Benagiano G., Diczfalusy E., Djerassi C., Fried J., Higuchi T. // *Steroids*. 1983. V. 41. № 3. P. 243—253.
2. Watanabe H., Menzies J. A., Jordan N., Loo J. C. K. // *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 1983. V. 41. P. 513—516.
3. Ho-Ngoc, Loo J. C. K., Stanczyk F. Z., Mensies J. A., Jordan N., Watanabe H. // *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 1984. V. 44. P. 307—313.
4. Freudenthal R., Cook C. E., Forth J., Rosenfeld R., Wall M. E. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1971. V. 177. № 2. P. 468—473.
5. Braselton W. E., Lin T. J., Mills T. M., Ellegood J. O., Manesh V. B. // *J. Steroid Biochem.* 1977. V. 8. № 1. P. 9—18.
6. Braselton W. E., Lin T. J., Ellegood J. O., Mills T. M., Manesh V. B. // *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 1979. V. 133. № 2. P. 154—160.
7. Stillwell W. G., Horning E. C., Horning M. G., Stillwell R. N., Zlatkis A. // *J. Steroid Biochem.* 1972. V. 3. № 4. P. 699—706.
8. Chávez B. A., Vilchis F., Pérez A. E., Garcia G. A., Grillasco J., Pérez-Palacios G. // *J. Steroid Biochem.* 1985. V. 22. № 1. P. 121—126.
9. Vilchis F., Chávez B. A., Pérez A. E., Garcia G. A., Angeles A., Pérez-Palacios G. // *J. Steroid Biochem.* 1986. V. 24. № 2. P. 525—531.
10. Каталог фирмы Steraloids Inc. N. Y., Wilton.
11. Gazza-Flores J., Vilchis F., Garcia G. A., Menjivar M., Pérez-Palacios G. // *Acta Endocrinol.* 1986. V. 112. P. 278—283.
12. Bowers A., Ringold H. J., Denot E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 6115—6118.
13. D'Incan E., Loupy A., Restalli A., Seyden-Penne J., Viout P. // *Tetrahedron*. 1982. V. 38. № 12. P. 1755—1761.
14. D'Incan E., Loupy A., Maia A., Seyden-Penne J., Viout P. // *Tetrahedron*. 1982. V. 38. № 19. P. 2923—2929.
15. Васильева Л. Л., Пишницкий К. К. // Высокоэффективная флэш-хроматография. М., 1986. Деп. в ВИНТИ 2.9.86, № 6390-В.86.
16. Neudert W., Röpke H. *Steroidspektrenatlas*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1965, № 756.
17. Rapala R. T., Farkas E. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. № 4. P. 1008—1012.
18. Голубовская Л. Е., Пишницкий К. К. // *Биоорг. химия*. 1988. Т. 14. № 2. С. 253—260.
19. Lewis C. J., Vose C. W., Spalton P. N., Ford G. C., Haskins N. J., Palmer R. F. // *Xenobiotica*. 1980. V. 10. P. 705—713.
20. Marker R. E., Rohrmann E., Writtle E. L., Lawson E. J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1938. V. 60. P. 1512—1515.

Поступила в редакцию
20.V.1988

1
SIMPLE SYNTHESIS OF THE COMPLETE SET
OF THE NORETHISTERONE UNCONJUGATED METABOLITES
AND THEIR DEUTEROANALOGUES

GOLUBOVSKAYA L. E., PIVNITSKY K. K.

*Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The short-step synthesis of all norethisterone (NET) hydrogenated metabolites and their deuterioanalogues has been accomplished. Reduction of NET by NaBH_4 in the presence of N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine provided 19-norpregn-20-yn-3,17-diols as a mixture of 3- and 5-epimers. The individual isomers were isolated by flash chromatography and oxidized by PyHCrO_3Cl into 5α - and 5β -dihydro-NET. These products were converted, on isotopic exchange with $\text{D}_2\text{O} - \text{MeOD}$ in alkaline conditions followed by reduction with NaBD_4 , into four stereoisomeric 2,2,3,4,4-pentadeuterated 19-norpregn-20-yn-3,17-diols; two isomeric 2,2,3,4,4,16,16,17-octadeuterated estrane-3,17-diols were also isolated as side products. All compounds obtained will be used as internal standards for chromat-mass-fragmentographic analysis.