

We found that, besides methanol, other alcohols can be added photochemically to bilirubin giving 8a-alkoxy-8a,8b-dihydrobilirubins (X). Thus, 8a-ethoxy- (X, R = C₂H₅), 8a-n-propoxy- (X, R = CH₂CH₂CH₃) and 8a-iso-propoxy-8a,8b-dihydrobilirubin (X, R = CH(CH₃)₂) were obtained⁶ when bilirubin was irradiated in chloroform containing ethanol, n-propanol and iso-propanol, respectively. It is noteworthy that these products, as well as III, were found to be the only ones formed in significant yield under the above conditions. The mechanism suggested to account for the formation of all the photoadducts is outlined below.

The finding that photoinduced addition of protic reagents (ROH) to bilirubin occurs preferentially at the *exo*-vinyl group and follows Markownikoff's rule, may be rationalized by assuming the attack by the nucleophile at position 8a of a cation such as IX. The formation of IX is best explained as involving a protonation of the basic intermediate VIII arising from a rearrangement of an electronically excited state of bilirubin (VII), although an external protonation of the same excited state to form IX directly, cannot be ruled out a priori. The assumption of the rearrangement outlined in VII is consistent with the finding that bilirubin exists in the enol form (Ib)¹⁴; furthermore, according to the process shown in the scheme, formation of III was observed when methanol was added to a previously irradiated chloroform solution of bilirubin¹⁵.

The reaction which results from irradiation of bilirubin in the presence of a nucleophile is a unique example of a photochemically induced ionic addition to a vinyl double bond¹⁶ and raises the possibility that at least

part of the serum bilirubin in new-born infants may be eliminated during phototherapy as photoadducts with nucleophilic substances occurring in the body.

Riassunto. Per azione della luce ultravioletta la bilirubina disciolta in CHCl₃-CH₃OH somma una molecola di metanolo fornendo un prodotto per il quale si dimostra la struttura III. Tale reazione, osservata anche con altri alcoli, suggerisce la possibilità che parte della bilirubina del siero dei neonati itterici sottoposti a fototerapia venga eliminata sotto forma di prodotti di fotoaddizione con sostanze nucleofile presenti nell'organismo.

P. MANITTO¹⁷

Istituto di Chimica Organica della Facoltà di Scienze dell'Università di Milano, Centro per lo studio delle sostanze organiche naturali del C.N.R., Via Saldini 50, I-20133 Milano (Italy), 9 March 1971.

¹⁴ A. W. NICHOL and D. B. MORELL, *Biochim. biophys. Acta* **177**, 599 (1969); it is likely that the photoadducts we report here are also in the enol form in chloroform solution.

¹⁵ Eventually, the above mechanism is supported by the observed pH dependence of photoadduct formation (faster at lower pH) under irradiation; pH of the medium was varied by adding acetic acid or triethylamine.

¹⁶ J. A. MARSHALL, *Acet. chem. Res.* **2**, 33 (1969).

¹⁷ The author wishes to thank Prof. L. CANONICA for helpful discussions, Dr. G. SEVERINI RICCA for running the NMR-spectra and Dr. T. SALVATORI for the mass-spectra.

Teratologische Prüfung einiger Thalidomid-Metabolite

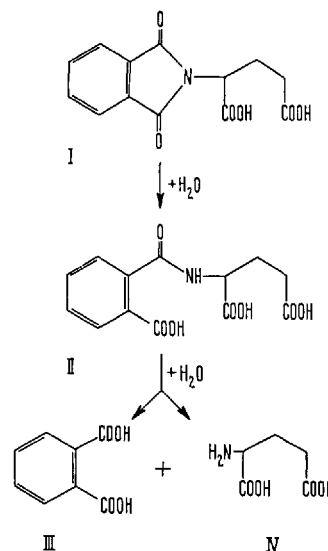
Thalidomid bildet im Organismus durch Hydrolyse zahlreiche Metabolite¹. Zur Klärung der Frage, ob Thalidomid selbst oder eines der Hydrolysenprodukte das eigentliche teratogene Agens darstellt, wurden die aufgefundenen Spaltprodukte synthetisiert und am Kaninchen teratologisch geprüft². In keinem Falle liess sich eine eindeutige teratogene Wirkung beobachten. Dieser Befund könnte nach KEBERLE³ darauf zurückgehen, dass für die Metabolite auf Grund ihrer polaren Struktur Membranschranken bestehen, während für Thalidomid weder das Endometrium und die Blastocystenmembranen noch die Placenta Hindernisse darstellen.

Um eine höhere Membrangängigkeit der Metabolite zu erreichen⁴, lösten wir die zu prüfenden Substanzen mit Hilfe des Tensides Tween 20 und applizierten die relativ hochkonzentrierten Lösungen intraperitoneal. Unter diesen Bedingungen zeigte N-Phthalyl-DL-glutaminsäure (I) embryotoxische Effekte bei der SWS-Maus⁵. Ferner wurde nachgewiesen, dass die biologische Aktivität von I ausschliesslich auf das L-Isomere zurückgeht⁶. Die embryotoxische Wirkung des L-Isomeren konnte durch konkurrierende Verabreichung von L-Glutaminsäure, nicht aber durch D-Glutaminsäure kompensiert werden⁷.

In der vorliegenden Arbeit werden die Hydrolysenprodukte von I teratologisch untersucht: Die durch Aufspaltung des Phthalimid-Ringes entstehende N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäure (II) sowie die aus II nach einem weiteren hydrolytischen Schritt resultierenden Spaltprodukte Phthalsäure (III) und Glutaminsäure (IV). Die Substanzen II und III wurden nach Gabe von Thalidomid in Urin und Faeces nachgewiesen^{1,3}; IV fand sich

nach Hydrolyse von Thalidomid unter physiologischen Bedingungen⁸.

Zur Herstellung von II werden 2,77 g (10 mM) I⁹ unter Eiskühlung und Schütteln mit 15,3 ml 2N NaOH versetzt. Man gibt die Lösung sogleich auf eine 2 × 13 cm-Säule von Dowex 50 (H⁺-Form) und fängt etwa 60 ml Eluat (pH ≤ 3) in einer eisgekühlten Vorlage auf. Dabei kristallisiert chromatographisch reines II aus. Das Produkt wird



Hydrolysenprodukte der N-Phthalyl-glutaminsäure: Prüfung ihrer embryotoxischen Wirkung in Kombination mit Tween 20

Verabreichte Substanz	Dosis	Muttertiere	Implantationen I	Resorptionen		Feten Gesamt ♀	Missgebildet ♂
				R	R/I [%]		
N-(<i>o</i> -Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäure (II) ^a	200 mg/kg	5	58	2	3,4	56	0
	400 mg/kg	5	64	5	7,8	59	0
Phthalsäure (III) ^b	200 mg/kg	5	60	1	1,7	59	0
	400 mg/kg	5	64	5	7,8	59	0
L-Glutaminsäure (IV) ^a	400 mg/kg	5	79	5	6,3	74	0
	400 mg/kg	5	73	7	9,6	66	0
N-Phthalyl-L-glutaminsäure (I) ^b	200 mg/kg	5	73	16	21,9	57	20
	400 mg/kg	5	66	36	54,5	30	28
Physiolog. NaCl-Lösung + Tween 20 (3:1) Normaltiere	40 ml/kg	10	135	6	4,4	129	0
	—	10	131	4	3,1	127	0

^a 4%ig bzw. ^b2%ig in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 (3:1). Alle Verabreichungen erfolgten i.p. am Tag 9 p.c. als einmalige Dosis.

abgesaugt und über CaCl₂ i. Vak. getrocknet. Wegen der Hydrolysenempfindlichkeit von II sollte die Arbeitszeit bis zum Absaugen höchstens 1 h betragen. Ausbeute 2,21 g (75% d. Th.) vom Smp. 161–163° (Lit.¹⁰ 156–158°). Zur Analyse wurde bei 60°C i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. C₁₃H₁₃N₂O₇ (295,3): Ber. C 52,89, H 4,44, N 4,74%; Gef. C 52,78, H 4,50, N 4,66%. Das UV-Spektrum stimmt mit den angegebenen Daten¹⁰ überein. Das L-Isomere von I wurde nach OCKENFELS et al.⁶ synthetisiert. Die übrigen applizierten Substanzen waren Handelspräparate⁹.

Die Versuche wurden an Mäusen des Swiss-Inzuchtstammes SWS 53/65 ausgeführt. Experimentelle Einzelheiten über Tierhaltung, künstliche Besamung, Schnittentbindung und die Inspektion der Würfe auf Missbildungen finden sich unter KÖHLER et al.⁵.

Alle Verabreichungen erfolgten i.p. als einmalige Dosis (200 bzw. 400 mg/kg) am Tag 9 p.c. (Tabelle). Die injizierten Lösungen waren 2%ig im Falle der Substanzen I (L-Form) und III, 4%ig bei II und IV (L- bzw. D-Form). Als Lösungsmittel diente eine Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. Die Lösungen kamen innerhalb einer Stunde nach der Zubereitung⁷ zur Anwendung.

Die Untersuchung der am Tag 18½ p.c. schnittentbundenen lebenden Feten sowie der mit Alizarinrot gefärbten Skelette ergab, dass die Substanzen II, III und IV bis zur Dosis von 400 mg/kg keine Missbildungen hervorrufen. Auch auf die Resorptionsrate R/I üben die Hydrolysenprodukte von I keinen merklichen Einfluss aus. Mit dem parallel geprüften L-Isomeren von I dagegen ist bei gleicher Dosierung der schon früher beobachtete embryotoxische Effekt reproduzierbar: 28 von 30 Feten (93,3%) weisen Anomalien im Bereich der Wirbelsäule, der Rippen und der Extremitäten auf. Die Resorptionsrate zeigt mit 54,5% eine signifikante Erhöhung gegenüber den nur mit Lösungsmittel behandelten Tieren (Vierfelder- χ^2 , $P < 0,01$).

Aus den Versuchsergebnissen folgt, dass durch Aufspaltung des Phthalimid-Ringes die embryotoxische Wirkung von I verlorengeht. Auch die synthetisch hergestellten Verbindungen mit enger struktureller Beziehung zum Thalidomid^{2,11}, bei denen sich teratogene Eigenschaften beobachten liessen, besitzen ausnahmslos das intakte Phthalimid-Gerüst. Hiermit stimmt überein, dass von den in vivo aus Thalidomid entstehenden Produkten, die bis-

her in Kombination mit Tween 20 geprüft wurden, auch N-Phthalyl-DL-glutamin embryotoxische Aktivität aufweist¹².

Summary. The teratogenicity of 3 hydrolysis products of thalidomide, 2-(*o*-carboxybenzamido)-glutaric acid, phthalic acid and glutamic acid, was determined by administering 25% Tween 20 i.p. to pregnant SWS-mice. Under these experimental conditions, the tested products were devoid of any teratogenic properties, whereas the L-isomer of phthaloyl-glutamic acid showed the well-known embryotoxic and teratogenic activity.

F. KÖHLER, W. MEISE¹³ und H. OCKENFELS¹⁴

*Institut für Humangenetik der Universität Bonn,
Wilhelmsplatz 7, D-53 Bonn (Deutschland),
22. April 1971.*

- J. W. FAIGLE, H. KEBERLE, W. RIESS und K. SCHMID, *Experientia* 18, 389 (1962).
- H. KEBERLE, J. W. FAIGLE, H. FRITZ, F. KNÜSEL, P. LOUSTALOT und K. SCHMID, in *Embryopathic Activity of Drugs* (J. and A. Churchill, London 1965), p. 210. — H. FRITZ, *J. Reprod. Fertil.* 17, 157 (1966).
- H. KEBERLE, P. LOUSTALOT, R. K. MALLER, J. W. FAIGLE und K. SCHMID, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 123, 252 (1965).
- W. A. RITSCHER, *Angew. Chem.* 81, 757 (1969).
- F. KÖHLER und H. OCKENFELS, *Experientia* 26, 1157 (1970).
- H. OCKENFELS und F. KÖHLER, *Experientia* 26, 1236 (1970).
- F. KÖHLER und H. OCKENFELS, *Experientia* 27, 421 (1971).
- H. SCHUMACHER, R. L. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Br. J. Pharmacol.* 25, 324 und 338 (1965).
- N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure puriss. und D-Glutaminsäure puriss., Fluka AG, Buchs (Schweiz); Phthalsäure krist. und L-(+)-Glutaminsäure für biochemische Zwecke (LAB), E. Merck AG, Darmstadt (Deutschland).
- R. BECKMANN, *Arzneimittel-Forsch.* 13, 185 (1963).
- H. M. WUEST, R. R. FOX und D. D. CRARY, *Experientia* 24, 993 (1968).
- F. KÖHLER und W. MEISE, *Z. Naturforsch.* 26 b, 857 (1971).
- Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, Kreuzbergweg 26, D-53 Bonn.
- Abteilung für Biochemie der Universität Ulm, Parkstrasse 11, D-79 Ulm.