

Neue Synthese und ^{14}C -Markierung von Bilirubin-IX α

von Hans Plieninger*), Farouk El-Barkawi, Klaus Ehl, Rolf Kohler und Antony F. McDonagh

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität, D-69 Heidelberg, und dem Department of Medicine, University of California, San Francisco

Eingegangen am 5. Februar 1972

Durch Kondensation der Mannichbase **6** mit dem in α -Stellung unsubstituierten Oxodipyromethen **2a** unter Zusatz von Acetylendicarbonsäuredimethylester entstehen Bilirubin-IX α -dimethylester (**7a**) und Bilirubin-XIII α -dimethylester (**8a**) im Verhältnis 3 : 1. Nach diesem Prinzip wurde radioaktives Bilirubin-IX α (**7**, ^{14}C -markiert) dargestellt.

New Synthesis and ^{14}C -Labelling of Bilirubin-IX α

The condensation of the Mannich base **6** with the α -unsubstituted oxodipyromethene **2a** in presence of dimethylacetylenedicarboxylate gives a mixture of bilirubin-IX α -dimethyl ester (**7a**) and bilirubin-XIII α -dimethyl ester (**8a**) in the ratio of 3 : 1. Radioactive bilirubin-IX α (**7**, labelled by ^{14}C) has been synthesized by this procedure.

Radioaktives Bilirubin für Stoffwechseluntersuchungen war bisher nur auf biologischem Wege zugänglich^{1, 2}. Die bisherige Synthese des Bilirubins³) ist umständlich; sie führt zuerst zum Biliverdin, das zu Bilirubin reduziert werden muß.

Als Ausgangsmaterialien für die neue Synthese dienten Vinyl-neoxanthobilirubinsäure (**1**) und die isomere Vinyl-isonoxanthobilirubinsäure³) (**2**), die man durch Erhitzen der Pyrrolinone **3** bzw. **4**⁴) und des Aldehyds **5** in Natronlauge erhält; hierbei tritt gleichzeitig Kondensation zum Oxodipyromethen und Eliminierung von Trimethylamin unter Ausbildung der Vinylgruppe ein. Die Säuren **1** und **2** werden mit Diazomethan zu den Estern **1a** bzw. **2a** umgesetzt.

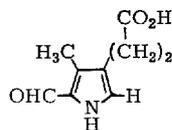
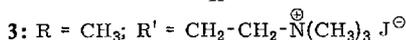
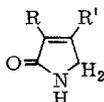
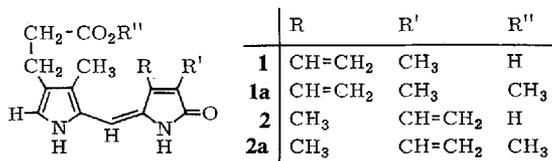
*) Herrn Prof. Dr. G. Wittig zum 75. Geburtstag gewidmet.

¹) G. W. Ibrahim, S. Schwarz und C. J. Watson, *Metabolism, clin. and exp.* **15**, 1129 (1966) [*C. A.* **66**, 44809 n (1967)].

²) J. D. Ostrow, L. Hamaker und R. Schmid, *J. clin. Invest.* **40**, 1442 (1961).

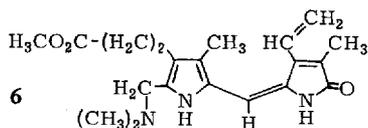
³) H. Fischer und H. Plieninger, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **274**, 231 (1942).

⁴) H. Plieninger und J. Kurze, *Liebigs Ann. Chem.* **680**, 60 (1964); vgl. R. Kohler, Diplomarbeit Univ. Heidelberg 1969.

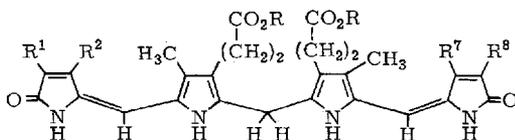


5

Durch Reaktion mit Formaldehyd und Dimethylamin in essigsaurer Lösung erhält man aus **1a** in guter Ausbeute die Mannichbase **6**. Die gleiche Reaktion führte beim Ester **2a** nicht zum Ziel.



Die Kondensation von **6** mit **2a** und Acetylendicarbonsäuredimethylester bei Raumtemperatur liefert einen orangeroten Bilirubinester, der aus Chloroform/Petroläther ähnlich wie Bilirubin-IX α -dimethylester **7a** kristallisiert. Er stimmt in UV- sowie IR-Spektrum, der Elementaranalyse und dem „Jod-Zink-Spektrum“⁽³⁾ mit **7a** überein; der Schmelzpunkt liegt bei 169–170°.



	R	R ¹	R ²	R ⁷	R ⁸	
7	H	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Bilirubin-IX α
7a	CH ₃	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Bilirubin-IX α -dimethylester
8	H	CH ₃	CH=CH ₂	CH=CH ₂	CH ₃	Bilirubin-XIII α
8a	CH ₃	CH ₃	CH=CH ₂	CH=CH ₂	CH ₃	Bilirubin-XIII α -dimethylester

ester verlaufen glatt. Schwieriger ist die Frage nach der Einheitlichkeit der entstandenen Produkte zu beantworten. Die Biladiene aus der unsymmetrischen Kondensation haben nach zweimaligem Umkristallisieren meist den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt. Die chromatographische Trennung der rohen Produkte oder ihrer Dehydrierungsprodukte ließ sich nicht ohne Zersetzungen durchführen⁹⁾.

Das synthetische Bilirubinester-Gemisch (**7a** + **8a**) wird mit KOH in Tetrahydrofuran vorsichtig unter Argon verseift. Braune Nebenprodukte, die sich bei der Hydrolyse nicht ganz vermeiden lassen, entfernt man mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung⁹⁾. Nach dem Aufnehmen in Chloroform/Methanol erhält man so ein orangefarbenes, feinkristallines Bilirubin, das jedoch dünn-schichtchromatographisch⁹⁾ nicht einheitlich ist. Es enthält die Isomeren IX α , XIII α , und III α im Verhältnis 75 : 24 : 1, wovon letzteres vermutlich während der Chromatographie durch die anwesende Essigsäure entstanden ist.

Radioaktives Bilirubin

Durch eine Vilsmeier-Synthese mit Dimethylformamid-[¹⁴C]¹⁰⁾ kann die Aldehydgruppe in **5** markiert werden (spezif. Aktivität 75 μ C/mMol). Hieraus stellt man das Oxodipyrrromethen **2a** her, welches an der Methingruppe ¹⁴C-markiert ist. Die Kondensation mit der nicht-markierten Mannichbase **6** ergibt ein Isomere ngemisch der Bilirubinester (spezif. Aktivität 55 μ C/mMol).

Aus dem Syntheseverlauf geht hervor, daß das aus dem inaktiven Baustein gebildete *Bilirubin-XIII α nicht radioaktiv* sein kann. Bei vollständig unsymmetrisch verlaufener Kondensation sollte das Bilirubin-IX α die gleiche spezif. Aktivität wie der Aldehyd **5** aufweisen und das Bilirubin-III α die doppelte spezif. Aktivität wie **5** zeigen.

Die gefundenen spezif. Aktivitäten der durch Chromatographie getrennten Bilirubine-IX α , -XIII α und -III α weisen etwa das Verhältnis 1 : 0.1 : 1.5 auf. Sie entsprechen also etwa den Voraussagen, wenn man berücksichtigt, daß die chromatographische Trennung nicht vollständig ist, und die Konzentration der Bilirubine über deren Extinktionen berechnet wurden. Unter der Voraussetzung, daß die *gesamte Aktivität vom Bilirubin-IX α herrührt* und daß das Bilirubin-XIII α inaktiv ist, errechnet sich aus der spezif. Aktivität des Bilirubinester-Gemischs (55 μ C/mMol) und dem theoretischen Wert (75 μ C/mMol) ein Isomerenverhältnis IX α : XIII α = 73 : 27. Dies stimmt gut mit den Werten überein, die bei der chromatographischen Trennung der durch DDQ aus dem Bilirubinester entstandenen Biliverdine erhalten wurden, und größenordnungsmäßig mit denen nach chromatographischer Trennung des Rohbilirubins.

Bei medizinischen Untersuchungen dürfte das dem radioaktiven Bilirubin-IX α beigemengte inaktive Isomere XIII α nicht stören.

⁹⁾ A. F. Mc Donagh und F. Assisi, FEBS Letters, im Druck (private Mitteilung).

¹⁰⁾ S. Szmuszkowicz und R. G. Thomas, J. org. Chemistry **26**, 960 (1961).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit, der Badischen Anilin- & Soda-Fabrik, Ludwigshafen, für die Überlassung von Chemikalien. Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Heitzschmikroskop bestimmt und nicht korrigiert. — Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian-Gerät A-60 aufgenommen (CH_3CN als innerer Standard). — Die Darstellung einiger der bekannten Ausgangsverbindungen wird nochmals beschrieben, da gegenüber den ursprünglichen Verfahren Verbesserungen vorgenommen wurden.

2-Formyl-3-methyl-4-[β -carboxy-äthyl]-pyrrol¹¹⁾ (5). — Zur Lösung von 5 g (30 mMol) 3-Methyl-4-[β -methoxycarbonyl-äthyl]-pyrrol¹²⁾ in 2.5 g (34 mMol) Dimethylformamid und 100 ml absol. Äther tropft man bei 10° unter Kühlung und Rühren 5.05 g (33 mMol) Phosphoroxotrichlorid. Die Mischung wird 6 Stdn. bei 20° gerührt. Man gießt den Äther ab, löst das zurückbleibende Öl in 60 ml Wasser und fügt unter Eiskühlung sowie Rühren eine Lösung von 8 g NaOH in 20 ml Wasser zu. Die Lösung wird 3 Stdn. bei 50° gehalten, auf 0° abgekühlt und mit 30proz. Schwefelsäure angesäuert. Dabei fällt der Opsopyrrolcarbonsäurealdehyd 5, der durch Verunreinigungen schwach gefärbt ist, kristallin aus. Man wäscht gründlich mit eiskaltem Wasser, saugt ab und trocknet über P_4O_{10} im Exsikkator. Das rohe 5 wird aus der Hülse mit peroxidfreiem, absol. Äther extrahiert. Die gelben Verunreinigungen werden hierbei zuerst eluiert. Man erhält 3.55 g (66%) reines 5 vom Schmp. 151° (Lit.¹⁰⁾ 152°) Die Verbindung muß im Dunkeln aufbewahrt werden.

3-Methyl-4-[β -trimethylammonium-äthyl]- Δ^3 -pyrrolinon-(2)-jodid (3). — 1.4 g (10 mMol) 4-[β -Amino-äthyl]-3-methyl- Δ^3 -pyrrolinon-(2)⁴⁾ und 2.1 g (20 mMol) wasserfreies Natriumcarbonat werden in 20 ml Wasser mit 14 g (0.1 Mol) Methyljodid 6–8 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Abdampfen des überschüssigen Methyljodids wird die Reaktionslösung mit verd. Jodwasserstoffsäure auf pH 3–4 angesäuert, wodurch die in der Lösung vorhandenen anorganischen Salze in NaJ übergeführt werden. Man dampft ein, pulverisiert den bräunlichen krist. Rückstand und löst durch 6maliges Digerieren mit je 100 ml wasserfreiem Aceton das NaJ heraus. Das quartäre Ammoniumsalz 3 bleibt rein und farblos zurück. Ausbeute 2.3 g (75%); Schmp. 221° (aus Äthanol). — NMR-Spektrum (D_2O): $\tau = 8.36$ (s; kernständiges CH_3), 6.95 (s; Ammonium- CH_3), 6.14 (s; CH_2 im Ring) 6.45–7.3 (m; Aminoäthylgruppe).

$[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}]\text{J}$ (309.9) Ber. C 38.72 H 6.13 N 9.03 J 40.94

Gef. 38.81 6.31 9.27 40.75

4-Methyl-3-[β -trimethylammonium-äthyl]- Δ^3 -pyrrolinon-(2)-jodid (4). — Es wird aus 3-[β -Amino-äthyl]-4-methyl- Δ^3 -pyrrolinon-(2)⁴⁾ analog der Darstellung von 3 erhalten. In Äthanol ist 4 wesentlich besser löslich als 3. Ausbeute 2.6 g (85%); Schmp. 193°. — NMR-Spektrum (D_2O): $\tau = 8.1$ (s; kernständiges CH_3 , fällt mit Standard zusammen), 6.97 (s; Ammonium- CH_3), 6.16 (s; CH_2 im Ring), 6.6–7.6 (m; Äthylaminogruppe).

$[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}]\text{J}$ (309.9) Ber. C 38.72 H 6.13 N 9.03 J 40.94

Gef. 38.88 6.37 9.05 40.94

¹¹⁾ H. Fischer und A. Treibs, Ber. dtsch. chem. Ges. 60, 379 (1927).

¹²⁾ H. Plieninger, H. Bauer, W. Bühler, J. Kurze und U. Lerch, Liebigs Ann. Chem. 680, 69 (1964).

3,4'-Dimethyl-3'-vinyl-4-[\beta-carboxy-äthyl]-5'-oxo-dipyrromethen-(2,2') (*Vinyl-neoxanthobilirubinsäure*³⁾, **1**). — Man löst 927 mg (3.0 mMol) **3** mit 450 mg (2.5 mMol) reinstem Aldehyd **5** in 10 ml 4 n KOH und erhitzt 45 Min. unter Rückfluß. Anschließend kühlt man ab und säuert mit verd. Essigsäure an. Die ausgefallene gelbe Säure **1** wird abgesaugt, noch zweimal in Wasser aufgeschlämmt und wieder abgesaugt. Zur Reinigung wird in Chloroform mit etwas Methanol gelöst und die Mischung mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt, wobei Verunreinigungen in der Grenzschicht ausfallen. Man trennt die Chloroformlösung ab, trocknet sie mit Natriumsulfat und dampft ein. Ausbeute 350 mg (49%); Schmp. 202° (aus Methanol).

Methylester 1a: Die Lösung von 143 mg (0.5 mMol) **1** in 60 ml Chloroform/Methanol (5 : 1) versetzt man bei 10° mit einer möglichst konzentrierten, destillierten ätherischen Lösung von *Diazomethan* (ca. 1 mMol). Nach etwa 20 Min. destilliert man den Äther und überschüssiges *Diazomethan* i. Vak. ab und schüttelt das Gemisch mit verd. NaHCO₃-Lösung, wobei die gelbe Substanz vollständig in der Chloroform-Phase bleiben soll, trocknet über Natriumsulfat, filtriert und dampft i. Vak. ein. Ausbeute 111 mg (74%); Schmp. 185° (aus Chloroform/Methanol); Lit.³⁾ 185°.

3,3'-Dimethyl-4'-vinyl-4-[\beta-carboxy-äthyl]-5'-oxo-dipyrromethen-(2,2') (*Vinyl-iseoxanthobilirubinsäure*, **2**). — Zur Lösung von 1.855 g (6 mMol) **4** in 20 ml 4 n KOH gibt man 0.9 g (5 mMol) reinsten Aldehyd **5**. Nach 20 min. Kochen unter Rückfluß fällt beim Abkühlen und Anreiben das *Kaliumsalz* von **2** teilweise aus. Nach dem Absaugen löst man in Wasser und säuert mit verd. *Essigsäure* an, wobei sich 647 mg **2** in reiner Form ausscheiden. Weitere Säure erhält man durch Ansäuern des alkalischen Filtrats vom Kaliumsalz. Diese Anteile reinigt man durch Aufnehmen in Chloroform/Methanol und Ausschütteln der Lösung mit Wasser; danach wird eingedampft. Gesamtausbeute 515 mg (36%); Schmp. 211–212° (aus Methanol).

C₁₆H₁₈N₂O₃ (286.3) Ber. C 67.11 H 6.33 N 9.79 Gef. C 66.99 H 6.57 N 9.82

Methylester 2a: Die Veresterung von **2** wird mit *Diazomethan*, wie bei **1a** beschrieben, ausgeführt. Ausbeute 85% d. Th.; Schmp. 200–201° (Lit.³⁾ 201°).

5'-Oxo-4-[\beta-methoxycarbonyl-äthyl]-3,4'-dimethyl-3'-vinyl-5-dimethylaminomethyl-dipyrromethen-(2,2') (**6**). — Man gibt zu einer Lösung von 100 mg (0.33 mMol) **1a** in 5 ml Eisessig 2 ml eines Gemisches aus 4 ml Eisessig, 1 ml 40proz. *Formaldehyd*-Lösung und 4 ml 40proz. *Dimethylamin*-Lösung. Der Ansatz bleibt etwa 30 Min. bei 20° stehen, wobei die Farbe nach Grün umschlägt. Nach dem Verdünnen mit Wasser, wobei grüne Verunreinigungen ausfallen, wird filtriert, die Lösung mit festem Natriumcarbonat versetzt, bis erneut eine Trübung auftritt, und nochmals filtriert. Die Mannichbase **6** wird aus dem Filtrat mit Na₂CO₃-Lösung ausgefällt und mit Wasser gewaschen. Sie ist nach dem Trocknen für die weitere Umsetzung rein genug. Ausbeute 92 mg (81%); Schmp. 164° (Zers.). — Zur Analyse wird mit Methylenchlorid/Petroläther aus der Hülse extrahiert.

C₂₀H₂₇N₃O₃ (357.5) Ber. C 67.20 H 7.61 N 11.76 OCH₃ 8.70
Gef. 66.63 7.50 11.78 8.68

Bilirubin-IXa-dimethylester (7a) und Bilirubin-XIIa-dimethylester (8a). — Zur Lösung von 179 mg (0.5 mMol) der Mannichbase **6** in 30 ml Tetrahydrofuran gibt man 100 mg (0.7 mMol) *Acetylendicarbonsäuredimethylester* und läßt 12 Stdn. bei 20° stehen. Danach destilliert man das Lösungsmittel i. Vak. ab und nimmt den Rückstand mit 5 ml Methanol auf, wobei das

Kondensationsprodukt ausfällt. Ausbeute 240 mg (80%). Man löst das Rohprodukt in wenig siedendem Chloroform, gießt in 50 ml vorgewärmten Petroläther (60–80°) und filtriert heiß, wonach sich 60 mg orangerote Kristalle von **7a** + **8a** abscheiden; Schmp. 169–170° (Bilirubin-IX-dimethylester¹³): Schmp. 198–200°, nach Sintern ab 163°. Den Filtrerrückstand löst man wieder in Chloroform und erhält durch Fällen mit Petroläther weitere 120 mg weniger reines Bilirubinester-Gemisch.

Dehydrierung des Bilirubinester-Gemischs: Man versetzt eine Lösung von 6 mg (0.01 mMol) des Gemischs aus **7a** und **8a** in 20 ml Chloroform mit 2 mg (0.01 mMol) Dicyan-dichlor-*p*-benzochinon, wobei sofort eine intensiv blaugüne Farbe auftritt. Man wäscht mit wäßriger NaHSO₃- und anschließend mit NaHCO₃-Lösung, trocknet die tiefgrüne Lösung durch Filtrieren und dampft i. Vak. ein. Durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel PF (Merck) mit Chloroform (DAB 7)/Aceton (100 : 5) werden die Biliverdinester getrennt und mit authent. *Biliverdin-IX α -dimethylester* ($R_F = 0.6$) und *-XIII α -dimethylester* ($R_F = 0.5$) verglichen. Aus Extinktionsmessungen in Chloroform bei $\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$ ergibt sich ein Isomerenverhältnis von IX α : XIII α = 77 : 23.

Verseifung des Bilirubinester-Gemischs: Man löst 102 mg (0.165 mMol) Gemisch von **7a** und **8a** im Dunkeln unter Argon in 5 ml peroxidfreiem Tetrahydrofuran bei 20°. Nach Versetzen mit 35 mg (0.9 mMol) KOH in 5 ml Wasser läßt man 30 Min. unter Rückfluß rühren, gibt 20 ml Wasser hinzu, kocht nochmals auf und fällt in der Hitze tropfenweise mit 2 *n* Essigsäure. Es wird abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Ausbeute 80 mg (85%). Das anfangs orangefarbene Pulver wird beim Stehenlassen dunkel. Man reinigt durch Lösen in reinem Chloroform und Ausschütteln mit verd. NaHCO₃-Lösung. Die Chloroformlösung wird durch Filtrieren getrocknet und i. Vak. eingedampft. Nach dem Aufnehmen des Rückstands in Chloroform/Methanol (1 : 1) scheiden sich orangerote Kristalle eines Gemischs von *Bilirubin IX α* und *-XIII α* ab. Die chromatographische Trennung und die Bestimmung der Anteile an den Isomeren wird nach Lit.⁹) durchgeführt.

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität: Die durch ^{14}C markierten Substanzen wurden in 5 ml Methanol (p. a.) unter Zusatz von 5 Tropfen 2 *n* NaOH gelöst, und die Lösung wurde in einem Quarzkolben unter magnetischem Rühren mit einem Hg-Hochdruckbrenner (Hannovia 450 W) bis zur völligen Entfärbung bestrahlt. Es wurde mit Methanol auf 10 bzw. 25 ml aufgefüllt, jeweils 1 ml der aktiven Lösung mit 13 ml Bray-Lösung¹⁴) gemischt und in einem TRI-CARB-Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell 3315 (Packard), gemessen. Als interner Standard diente eine Lösung von *n*-Hexadecan- ^{14}C in Dioxan, wobei 1 ml $3.46 \cdot 10^3$ Impulse/Min. lieferte. Die spezif. Aktivitäten wurden nach folgender Gleichung berechnet, wobei man nachstehende Werte erhielt:

$$[\mu\text{C}/\text{mMol}] = \frac{\text{Impulse}/\text{Min} \cdot 100 \cdot \text{Mol.-Gew.}}{\text{Zählausbeute} (\%) \cdot \text{Einwage} (\text{mg}) \cdot 2.22 \cdot 10^6}$$

Substanz Nr.	Einwage [mg]	Impulse je Min.	Zählausbeute [%]	spezif. Aktivität [$\mu\text{C}/\text{mMol}$]
5	0.068	52000	83	75
7a + 8a	0.016	27000	84	55

¹³) W. Küster, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **141**, 52 (1924).

¹⁴) G. A. Bray, Analytic. Biochem. **1**, 279 (1960).