

MIKROPRÄPARATION RINGDEUTERIERTER PROSTAGLANDINE

Claus O. Meese

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie,

Auerbachstraße 112, D-7000 Stuttgart 50 (FRG)*

SUMMARY

Starting from prostaglandin E₂ ring-labelled ²H₄-prostaglandins (PGF_{2α}, PGF_{2β}, 6-keto-PGF_{1α} and PGI₂ sodium salt as intermediate) were prepared in their natural configuration. The carbon-13 NMR spectra of ²H₄-PGF_{2αβ} methyl ester, which allow the localization of the labelled positions, are presented. The utility of these ring-labelled prostaglandins as internal standards for GC/MS analysis of biological samples and as substrates for the preparation of other labelled prostaglandin metabolites is briefly discussed.

Key words: prostaglandins, deuteration, ¹³C NMR

EINLEITUNG

Die zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung (GC/MS) von Prostaglandinen (PG) in biologischem Material nach der Methode der Stabilisotopenverdünnung benötigten deuterierten Prostaglandine müssen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen (1-4):

- Die Isotopisomeren sollten mindestens 3-4 Deuteriumatome enthalten.
- Die Markierung muß chemisch stabil sein (zu keinem Zeitpunkt H/D-Rücktausch).
- Das deuterierte Prostaglandin sollte nach der Ionisierung im Massenspektrometer intensive Fragmentionen unter Erhalt der Deuteriummarkierung liefern.
- Der Anteil an unmarkierter Substanz (d₀) im deuterierten internen Standard sollte möglichst niedrig sein um den Blindwert der Bestimmungsmethode niedrig zu halten.

Dienen diese deuterierten Verbindungen darüberhinaus als Substrate zur Biosynthese weiterer Metabolite, so muß die Isotopenmarkierung auch metabolisch stabil sein. Gerade diese letzte Forderung wird von den gegenwärtig verfügbaren markierten Prostaglandinen nicht oder nur sehr unzureichend erfüllt (5).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Beschreibung einer effektiven Mikropräparation verschiedener deuterierter Prostaglandine der F-Reihe, sowie des nichtenzymatischen Hauptmetaboliten des Prostacyclins (6-keto-PGF_{1 α}), in einem relativ kurzen Syntheseweg (10).

ERGEBNISSE

Die Synthesesequenz, die im wesentlichen mit drei Schritten ohne Isolierung von Zwischenstufen und nur einer chromatographischen Isomerentrennung auskommt, ist in Schema 1 abgebildet. Durch milden basenkatalysierten H/D-Austausch mit KOAc in Carbitol-d₁ wird Deuterium in die enolisierbaren Positionen 8 und 10 des Cyclopentanringes (11) von natürlichem Prostaglandin E₂ (PGE₂, 1) eingeführt (12). Eine weitere Deuterierung und gleichzeitig eine Stabilisierung des eingeführten Deuteriums durch Aufhebung der Keto-Enol-Tautomerie sowie die Überführung in die Reihe der F-Prostaglandine (13,14) wird durch anschließende in-situ Reduktion der 9-Ketogruppe mit NaBD₄ erzielt. Die hierbei entstehenden neuen ringmarkierten d₄-Prostaglandine (PGF_{2 α} , PGF_{2 β} und geringe Mengen an 8-iso-PGF_{2 α , β}) lassen sich nach Umsetzung mit Diazomethan säulenchromatographisch in Form ihrer Methylester 2 α , 2 β gut trennen. Die folgenden Schritte zum deuterierten 6-keto-PGF_{1 α} 4 orientieren sich im wesentlichen an einigen der für unmarkierte Prostaglandine in größerem Maßstab erarbeiteten Verfahren (15-22). Um der Empfindlichkeit der Prostaglandine Rechnung zu tragen und die Gesamtausbeute der im μ -Molmaßstab durchzuführenden Reaktionen optimal zu gestalten, wurde die folgende Reaktionssequenz entwickelt. Zunächst wird d₄-PGF_{2 α} -methylesters 2 α mit etherischer Jodlösung in nahezu quantitativer Ausbeute in ein Gemisch isomerer Iodester (19,23,s.u.) überführt. Die nachfolgende HI-Abspaltung aus beiden Isomeren mittels Natriummethanolat liefert intermediär den Methylester von d₄-Prostacyclin, der nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels Methanol durch schonende basische Hydrolyse (NaOH/H₂O) das kristalline Natriumsalz 3 des tetradeuterierten Prostacyclins (d₄-PGI₂-Na) ergibt. Dieses kann zwar rein isoliert und charakterisiert werden (18,21,22), wird aber wegen der Empfindlichkeit der cyclischen Enolethergruppe im Interesse einer optimalen

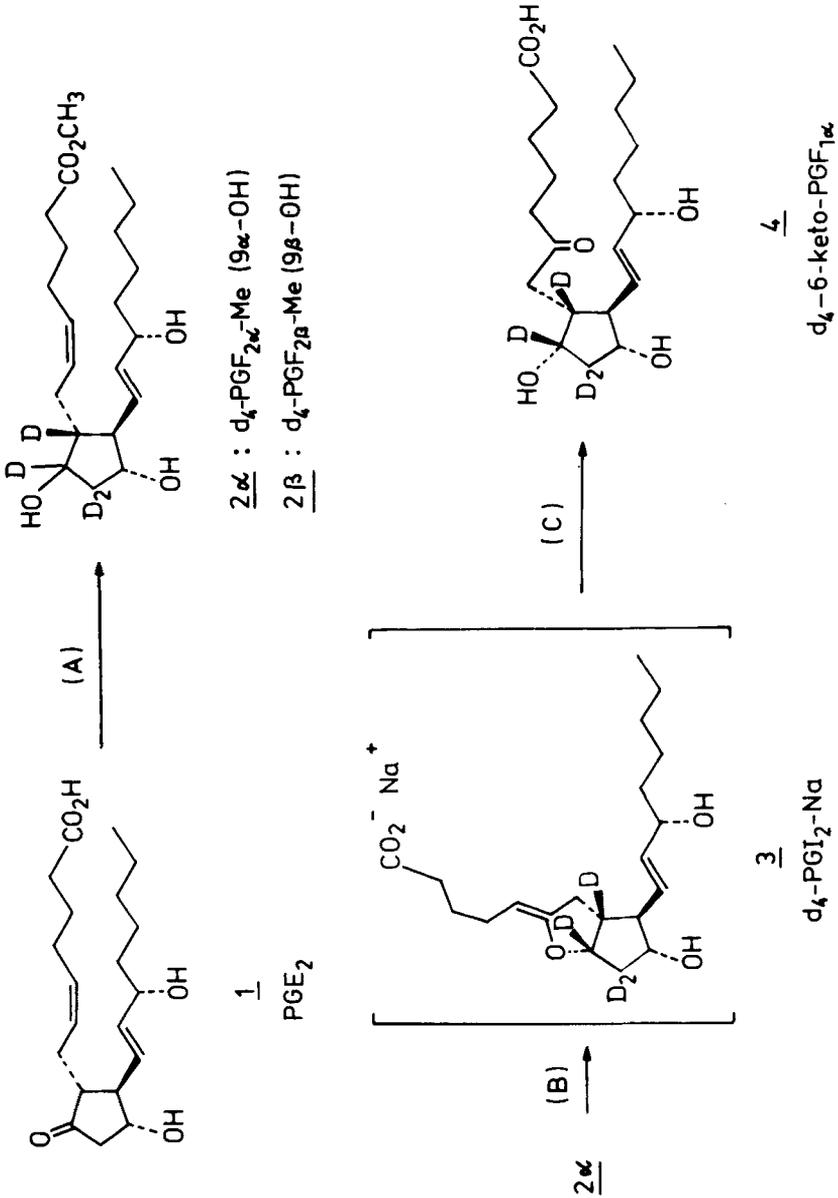
Schema 1

Semisynthese ringdeuterierter Prostaglandine . -

(A) 1) Carbitol-d₁ / KOAc, 2) NaBD₄, 3) CH₂N₂, 4) Isomerentrennung. -

(B) 1) I₂ / NaHCO₃, 2) MeOH / MeONa, 3) H₂O. -

(C) H⁺ / H₂O. -
[D = ²H]



Gesamtausbeute in-situ weiter umgesetzt. Im sauren wässrigen Medium (0°C , verd. H_2SO_4) wird das Salz 3 in einer Rohausbeute von 70-85% (bezogen auf eingesetztes 2a) in das gesuchte freie 8,9,10,10($^2\text{H}_4$)-6-keto-Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (4, d_4 -6-keto-PGF $_{1\alpha}$) überführt. Letzte dünn-schichtchromatographisch nachweisbare Spurenverunreinigungen lassen sich durch vorsichtiges Umkristallisieren entfernen.

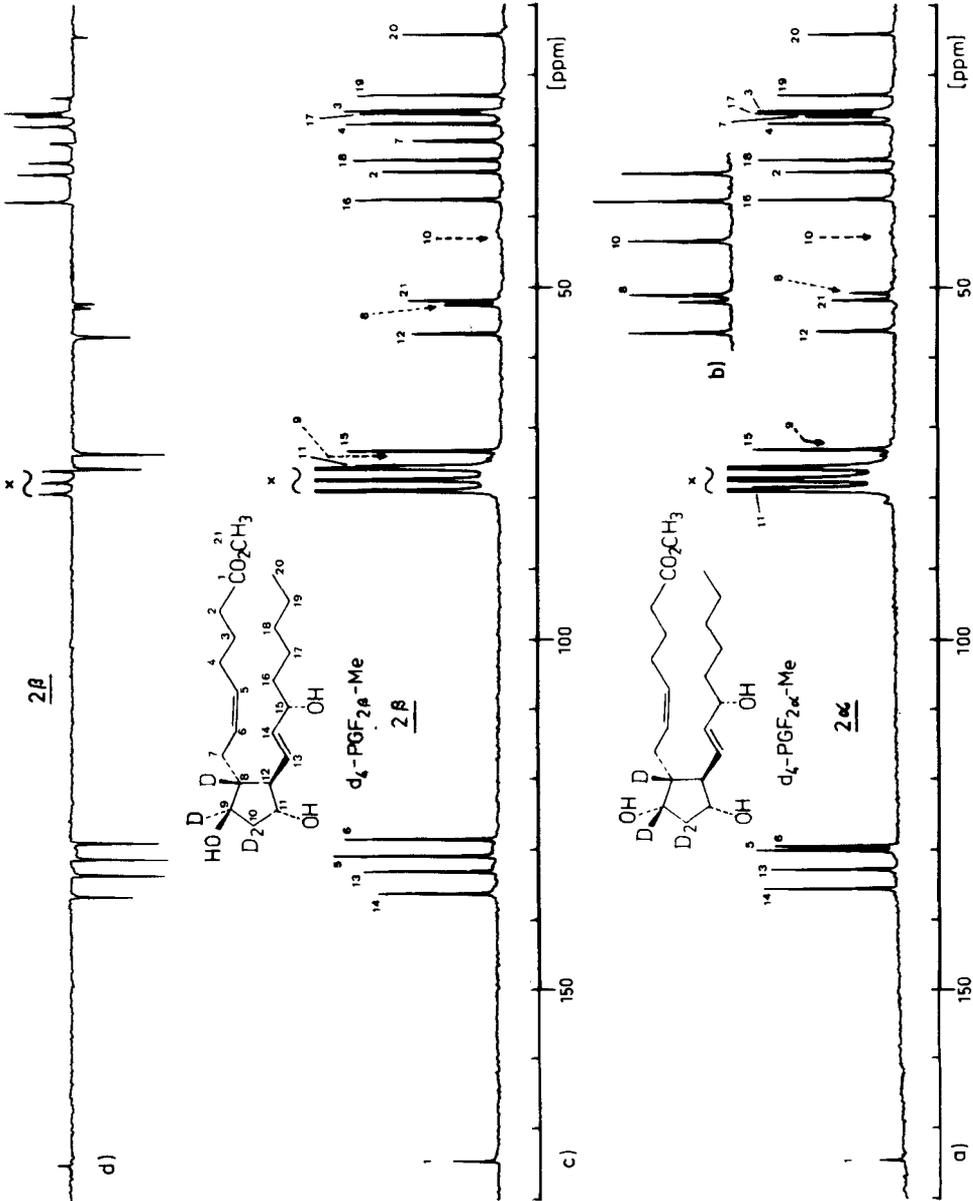
Der molare Markierungsgrad wird am besten an den epimeren Estern 2a und 2b sowie an 4 massenspektrometrisch (EI: derivatisiert, s. Exp. Teil; FD; underivatisiert (24)) unter Isotopenkorrektur bestimmt. Im Rahmen der Meßgenauigkeit besitzen alle drei Verbindungen die folgende Isotopenverteilung: 2% d_5 , 46% d_4 , 41% d_3 , 9% d_2 , 2% d_1 , \ll 0.2-0.6% d_0 . Eine Bestimmung des Markierungsortes läßt sich wegen möglicher H/D-Transferprozesse im Verlauf der Fragmentierung massenspektrometrisch nicht eindeutig vornehmen. Eine aussagefähigere Methode, die zudem auch eine Aussage über die Reinheit der vorliegenden Substanzen gestattet, besteht in der ^{13}C NMR-Spektroskopie. In Abb.1 sind die ^{13}C NMR-Spektren der Ester 2a (a) und 2b (c) dargestellt. Die Zuordnung der Resonanzsignale basiert auf früheren Untersuchungen über unmarkierte Prostaglandine (25,26), dem Shiftvergleich mit totalsynthetisch erhaltenem (2) 18, 18, 19, 19($^2\text{H}_4$) PGF $_{2\alpha}$ -methylester (27), 5 (s.u.), sowie auf Messungen mit der J-modulierten Spin-Echo-FT-Technik (SEFT); Abb.1d zeigt hierzu das ^{13}C NMR-Spektrum mit positiven (C, CH_2) und negativen (CH, CH_3) Signalen der Kohlenstoffatome von 2b. Verglichen mit den Daten der unmarkierten PGF $_{2\alpha/\beta}$ -methylester ergeben sich folgende Unterschiede. Von den erwarteten 21 ^{13}C -Resonanzsignalen werden bei 2a, 2b 19 in guter Übereinstimmung mit den beschriebenen chemischen Verschiebungen gefunden. Das evidente Verschwinden der Signale der Ringkohlenstoffatome C-9 und C-10 in den ^{13}C NMR-Spektren beruht einerseits auf dem durch den Ersatz von Wasserstoff durch Deuterium bewirkten Verlust an Kern-Overhauser-Signalverstärkung (NOE) und andererseits auf einer zusätzlichen "Signalschwächung" durch ^2H - ^{13}C -Kopplung (CD: Triplett, CD_2 : Quintett; $J = 19\text{-}22$ Hz). Daraus läßt sich ein hoher Deuterierungsgrad sowohl des tertiären Kohlenstoffatoms C-9 als auch des sekundären C-10 ableiten. Die in beiden Spektren noch sichtbare Resonanz des Kohlenstoffatoms C-8 verrät, daß diese Position nur partiell deuteriert ist.

Abbildung 1:

^{13}C FT-NMR-Spektren von

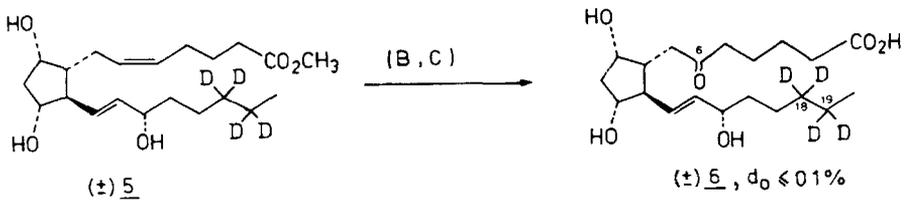
- (a) $\text{d}_4\text{-PGF}_{2\alpha}\text{-Me}$ (2α , ^1H -breitbandenkoppelt),
- (b) Teilspektrum von $\text{d}_0\text{-PGF}_{2\alpha}\text{-Me}$ (^1H -breitbandenkoppelt),
- (c) $\text{d}_4\text{-PGF}_{2\beta}\text{-Me}$ (2β , ^1H -breitbandenkoppelt) und
- (d) 2β unter den Meßbedingungen der SEFT-Technik.

Die gestrichelten Pfeile bezeichnen die Resonanzlagen der Ringkohlenstoffatome der unmarkierten Verbindungen.



Die hohe Ausbeute des gemäß Schema 1 semisynthetisch gewonnen d_4 -6-keto-PGF_{1 α} ließ den Einsatz anders markierter Prostaglandine attraktiv erscheinen. In völliger Analogie kann racemischer 18, 18, 19, 19(²H₄)-Prostaglandin F_{2 α} -methylester \pm 5 (27) (\gg 92% d_4 , 48 μ mol-Ansatz) in 84% gaschromatographisch bestimmter Ausbeute in \pm 6 (Öl) überführt werden. Erwartungsgemäß wird der hohe Markierungsgrad von \pm 5 ($d_0 \ll 0.1\%$) durch die Reaktionssequenz B, C nicht beeinflusst:

Schema 2: Synthese von 18, 18, 19, 19(²H₄)-6-keto-PGF_{1 α}



DISKUSSION

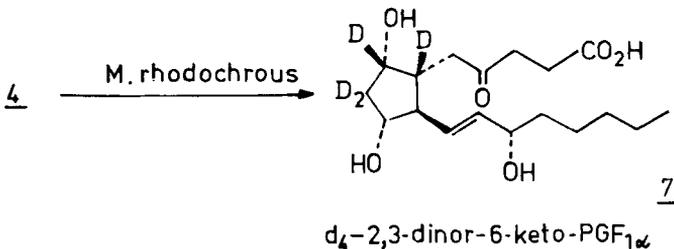
Die in Schema 1 skizzierte Mikropräparation läßt sich auch noch gut im 10 μ mol-Maßstab reproduzieren. Entscheidend ist eine sorgfältige Reinigung auf der Stufe der Reduktionsprodukte 2, da E-Prostaglandine in protischen Solvenzien und in Gegenwart von Acetat zu 10-20% in 8-Stellung isomerisiert vorliegen (28-30) und aus dem 8-iso-PGE₂ dann bei der Reduktion ein Gemisch von 8-iso-PGF_{2 α} und 8-iso-PGF_{2 β} gebildet wird. Die Entstehung der 8-iso-F-Prostaglandine kann chromatographisch nachgewiesen werden, sie besitzen (derivatisiert, s.Exp. Teil) mit 2 β gaschromatographisch nahezu identische Retentionszeiten und ununterscheidbare Massenspektren. Andere Synthesewege (z.B. HI-Eliminierung mit 1,5-Diazabicyclo [5.4.0]-undec-7-en (DBU) oder 1,5-Diazabicyclo [4.3.0]non-5-en (DBN), die über Prostacyclin-methylester, 6-keto-PGF_{1 α} -methylester und anschließende alkalische Verseifung zu freiem 6-keto-PGF_{1 α} verlaufen (15, 17, 18, 20-22), machten bei der Mikropräparation dieser Prostaglandine mehrere säulenchromatographische Abtrennungen von Nebenprodukten und Reagenzien erforderlich und führten zu einer somit stark verringerten Gesamtausbeute. Auch die alkalische Verseifung des so erhaltenen Methylesters sowie die anschließend erforderliche Chromatographie des freien

6-keto-PGF_{1α} (22) ist keineswegs trivial. Bereits geringe Variationen des pH-Wertes, der chromatographischen Sorptions- oder Laufmittel oder der Standzeit bei saurem pH, führen zu unreproduzierbarer Bildung von Nebenprodukten (z.B. in Gegenwart von Alkoholen (31)) oder Isomeren (9,32,33a), für die aus den NMR-Spektren die Struktur diastereomerer cyclischer Hemiketale vorgeschlagen worden ist (20).

Daß im Verlauf der Austauschmarkierung der Cyclopentanring markiert worden ist (33b), kann anhand der ¹³C NMR-Spektroskopie, die hier als Sonde zur Ermittlung des Markierungsortes eingesetzt ist, nachgewiesen werden; unter den gewählten Reaktionsbedingungen tritt kein nachweisbarer D-Einbau in α-Stellung zur Carboxylgruppe ein (Abb.1). Auch Unsicherheiten, die in der Zuordnung der ¹³C-Resonanzen C-9 und C-11 beim PGF_{2β}-Methylester (26) bestanden, werden durch das ¹³C NMR-Spektrum des markierten 2β beseitigt, da das Signal des Kohlenstoffatoms 11 unverändert beobachtet wird, das Signal von C-9 durch Deuterierung hingegen praktisch verschwunden ist (Abb.1).

Die Ringmarkierung dieser Prostaglandine beinhaltet Vorteile gegenüber den in der oberen Seitenkette deuterierten Verbindungen aber auch Risiken. Da Prostanoiden in vivo generell durch enzymatische β-Oxidation in Metabolite mit verkürzter oberer Seitenkette überführt werden, bleibt die Deuteriummarkierung erhalten. Auch ein Verlust des Deuteriumatoms in der Ringposition 9 durch in einigen Fällen nachgewiesene (34,35) enzymatische Dehydrierung/Reduktion wird bei der mikrobiellen β-Oxidation von 4 zu markiertem 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}, 7, nicht gefunden (36,37) (Schema 3). 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} wird als Hauptmetabolit des Prostacyclins (PGI₂) aus dem Säugetierorganismus ausgeschieden (38-41).

Schema 3: Mikrobielle β-Oxidation von 4.



Andererseits wäre bei der zur Gaschromatographie günstigen Derivatisierung (Tris-9,11,15 (Trimethylsilyl) ether, O-Methyloxim) bei der massenspektrometrischen Fragmentierung mit einem Deuteriumverlust durch Abspaltung von $(\text{CH}_3)_3\text{Si-OD}$ aus dem Cyclopentanring zu rechnen. Die im Exp. Teil beschriebenen Prostaglandine und auch 7 (37) liefern nach der Elektronenstoßionisierung im Massenspektrum ausnahmslos intensive Fragmentionen bei hohen reduzierten Massen, die durch Eliminierung unmarkierter Molekülteile gebildet werden. Diese nicht nur chemische und biochemische, sondern auch massenspektrometrische Retention der Deuteriummarkierung (vgl. dagegen (42)) macht den analytischen Einsatz der ringmarkierten Prostaglandine nach dem Verfahren der Stabilisotopenverdünnung möglich.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeines

Die Markierungen wurden mit Carbitol- d_1 (Diethylenglycol- monoethylether- d_1 , EGA, Isotopenreinheit nicht angegeben) und Natriumbor-deuterid (EGA, 98 Atom% D) vorgenommen. Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden E.Merck Fertigplatten (SiO_2 60-F₂₅₄) verwendet, zur Sichtbarmachung der Flecke dienten Spraylösungen aus Molybdätdiphosphorsäure (3.5% in Ethanol) oder eine gesättigte Lösung von 2.4-Dinitrophenylhydrazin in Ethanol/10 Vol.% konz. HCl, gefolgt von 5 min. Erhitzen auf 140°C. Als Laufmittel (43,44) dienen Gemische aus CHCl_3 (80) /MeOH(10)/AcOH(10)(=LM I), reines Ethylacetat (= LM II), 2 Vol% AcOH in Ethylacetat (=LM III), Dichlormethan (50)/Aceton (50) (=LM IV) oder CHCl_3 (90)/MeOH (5) (=LM V). Zur Säulenchromatographie wurden Lobar Fertigsäulen (E.Merck) oder SiO_2 -60 und SiO_2 -40 (70-230 mesh, E.Merck) eingesetzt. Die ^{13}C NMR-Messungen (20.1 MHz, D-Lock) wurden in gepulster Fourier-Transform-Technik unter vollständiger Protonen-Breitbandentkopplung am Bruker WP 80 bei +39°C in 10 mm-Röhrchen mit CDCl_3 als Lösungsmittel und Locksubstanz sowie Tetramethylsilan als internem Standard (δ = Oppm)durchgeführt. Die Pulsweite betrug 2 μsec (=24°), die Spektrenweite 5000 Hz ohne Relaxationspause (8 k FID, Aspect 2000 Computer). Die ^{13}C NMR- Messungen nach dem SEFT-Verfahren wurden mit Hilfe eines Bruker- Mikroprogrammes ("J-modulated Spin-echo for X-nuclei") vorgenommen (vgl. auch (45,46)). Die Massenspektren wurden am Modell 5985 A (Hewlett-Packard, 70eV, EI) nach Derivatisierung (s.u.) und GC-Trennung (Temperaturprogramm, Glaskapillarsäule 30 m SP-2100) aufgenommen. Die FD-MS-Messungen sind anderenorts näher beschrieben (24). Die Schmelzpunkte (unkorrigiert) wurden am Gerät "Electrothermal" bestimmt.

(A)

8,9,10(²H₄) Prostaglandin-F_{2 α , β} - Methylster (2 α , 2 β)

In einem kräftigen Strom von trockenem Argon werden 1.5g wasserfreies Kaliumacetat in einem 250 ml Zweihalskolben mit Hilfe einer Bunsenbrennerflamme geschmolzen, anschließend wird der Reaktionskolben sorgfältig ausgeflammt um restliche Feuchtigkeitsspuren zu entfernen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wird die erstarrte Schmelze unter Rühren in 40 ml Carbitol-d₁ gelöst (2-3 Std.) Zu dieser Lösung werden 176 mg(500 μ mol) Prostaglandin-E₂ (natürlich konfiguriertes PGE₂, 1) zugesetzt. Man rührt unter Argon bis alles PGE₂ in Lösung gegangen ist und beläßt den homogenen Ansatz vor Licht geschützt 5 Tage bei RT. Anschließend wird auf -20°C gekühlt und unter Rühren im Argonstrom mit 150 mg(3.6 mmol) festem Natriumbordeuterid versetzt. Nach dem Erwärmen auf 0-5°C (2 Std.) wird der Ansatz in 600 ml Eiswasser aufgenommen und mit 5%iger wässr. HCl auf pH 2-3 angesäuert. Die Extraktion mit Dichlormethan (4-6 x 100 ml), Trocknen der org. Phase (Na₂SO₄) und Einengen am Rotationsverdampfer erbringt 25-30g blaßgelben Rohextrakt. Das DC (LM I) zeigt vollständige Umsetzung des PGE₂ (R_f 0.53) und neben überschüssigem Carbitol (R_f~0.8) die Bildung von (deuteriertem) PGF_{2 α} (R_f 0.42) und PGF_{2 β} (R_f 0.37). Die freien F-Prostaglandine lassen sich aus diesem Rohgemisch (0.2 -0.4g) durch Säulenchromatographie an Kieselgel (SiO₂-40) im 100 μ g-Maßstab DC-rein isolieren (LM I). Zur vereinfachten Reinigung wird der Rohextrakt in 300 ml CH₂ Cl₂ aufgenommen und mit 200 ml eiskalter, gesätt. wässr. NaHCO₃- Lösung ausgeschüttelt. Die wässr. Phase wird noch mehrfach mit Dichlormethan nachextrahiert, bis im organischen Extrakt dünnschichtchromatographisch kein Carbitol mehr nachzuweisen ist. Nach dem Ansäuern mit wässr. Oxalsäure (0°C, pH 2) wird die Lösung mit festem Ammoniumsulfat gesättigt und mit 3 x 200 ml Dichlormethan rückextrahiert.

Nach dem Trocknen der vereinigten org. Phasen (Na₂SO₄) und Einengen wird der ölige Rückstand in einigen ml Ethylacetat/Methanol (1:1) aufgenommen und bei -4°C mit einem leichten Überschuß etherischer Diazomethanlösung versetzt. Es wird zur Trockene eingengt und zur chromatographischen Isomerentrennung in 0.2 ml Chloroform/Methanol (9:1) aufgenommen. Die Trennung der isomeren F-Prostaglandine kann auf einer Kieselgelsäule erzielt werden (Lobar-B, LiChrorep Si-60, 40-63 μ m; 1 bar, Fluß 1 ml/min., Fließmittel Chloroform/Methanol (9:1), RI-Detektion). Nach einem Vorlauf (160-170 ml)

werden drei deutlich getrennte Fraktionen erhalten. Fraktion I (50 ml) ergibt nach dem Einengen und Trocknen im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz 39.4 mg dünn- und gaschromatographisch reinen

8,9,10,10(²H₄) Prostaglandin-F_{2 α} Methylester, 2 α ,

als klares, farbl. Öl (23% d. Th. bezogen auf 1). DC: R_f 0.17(LM II), R_f 0.26 (LM III)

¹³C NMR [ppm] : 174.6(C-1), 33.6(C-2), 24.9(C-3), 26.8(C-4), 130.0(C-5), 129.4(C-6), 25.7 (C-7), 50.7 (C-8), 78.4 (C-11), 56.1 (C-12), 132.7 (C-13), 135.4 (C-14), 73.1 (C-15), 37.5 (C-16), 25.3 (C-17), 31.9 (C-18), 22.7 (C-19), 14.1 (C-20), 51.7 (C-21, OCH₃).

MS (EI, Tris-Trimethylsilylether=TMS₃-ether, M=588) [m/z] :588 (M⁺, 4%), 573(M⁺-15(CH₃), 3%), 517 (M⁺-71 (C₅H₁₁), 20%), 498(M⁺-90 (TMSOH), 35%), 427(M⁺-71-90, 100%), 408(M⁺-2x90,42%). -Massenbereich 400-620. Der Anteil an unmarkierter Substanz (d₀) beträgt < 0.2-0.6%. Der Markierungsgrad dieser Verbindung wurde anhand der Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS) ermittelt. Folgende Massen (m/z) werden registriert: 369, 370,371,373(M⁺+H,d₄), 374,375. Unter Berücksichtigung der natürlichen Isotopenverteilung und im Vergleich zu unmarkiertem PGF_{2 α} ergibt sich daraus die folgende Isotopenzusammensetzung: 2% d₅,46% d₄, 41% d₃, 9% d₂, 2% d₁, <0.2-0.6% d₀.

Die Zwischenfraktion 2(35-40ml) der säulenchromatographischen Trennung liefert einige mg eines farblosen Öls, bei dem es sich nach den NMR- und GC/MS-Daten um ein etwa 1:1-Gemisch der markiertem 8-iso-PGF_{2 α} β -methylester(R_f 0.14/0.20, LM II; R_f 0.23/0.29, LM III) handelt. Fraktion 3 (70-75 ml) ergibt nach dem Einengen ein farbl. Öl, das beim Stehen bei RT rasch kristallisiert. Die Umkristallisation aus wenig warmem Ethylacetat unter Zusatz von n-Hexan liefert 53.1 mg (28% d.Th. bezogen auf 1) farblos kristallinen

8,9,10,10(²H₄) Prostaglandin- F_{2 β} Methylester, 2 β ,

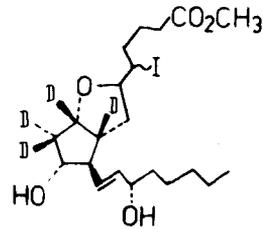
Fp 87.5-89°C. DC: R_f 0.11 (LM II), R_f 0.16(LM III). Die NMR-und Massenspektren zeigen die gleiche Isotopenverteilung bzw. Fragmentionen wie 2 α .

¹³C NMR [ppm] : 174.6(C-1), 33.6(C-2), 24.9(C-3), 26.8(C-4), 130.7(C-5), 128.4(C-6), 29.2(C-7), 52.3(C-8), 75.3(C-11), 56.4(C-12), 133.0(C-13), 136.1(C-14), 73.2(C-15), 37.4(C-16), 25.3(C-17), 31.8(C-18), 22.7(C-19), 14.1(C-20), 51.7(C-21, OCH₃).

Die beschriebene Reaktionssequenz ist auch noch gut im 10 μmol -Maßstab durchzuführen, die isolierte Ausbeute an 2 beträgt dann 17% d.Th. Obgleich $\text{PGF}_{2\beta}$ -Me in der folgenden Reaktion (Iodcyclisierung) nicht reagiert, erwies es sich wegen der im Rohprodukt vorhandenen 8-iso-Prostaglandine als notwendig, zur weiteren Umsetzung von chromatographisch gereinigtem, isomerenfreiem 2 auszugehen.

(B)

Eine Lösung von 39 mg (100 μmol) d_4 - PGF_2 -Me, 2, in 1 ml CH_2Cl_2 wird im Eisbad mit 1.2 ml einer 7%igen wässr. NaHCO_3 -Lösung versetzt. Unter starkem Rühren und Lichtausschluß werden innerhalb von 7 Std. bei gleicher Temperatur insgesamt 1.1 ml einer 2.5%igen etherischen Iodlösung in 0.1-0.4 ml-Portionen zugesetzt. Gegen Ende der letzten Iodzugabe hellt sich der Ansatz nicht mehr auf. Es wird noch 2-4 St. bei 0°C gerührt und dann mit 20 ml kaltem Diethylether versetzt. Die Etherphase wird noch in der Kälte mit einigen Tropfen einer verd. wässr. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lsg. entfärbt, mit halbkonzentrierter NaCl -Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat gelöst und über 2-3 g SiO_2 -60 filtriert. Nachspülen mit Ethylacetat, Einengen des Eluates und Trocknen im Hochvakuum liefert 51.5 mg farbl. bis blaßgelbes zähes Öl 8.



8 : [6-endo/exo]

Die Ausbeuten dieses Zwischenproduktes liegen zwischen 90 und 98% d.Th. Der so erhaltene cyclische Iodester 8

liegt als Gemisch der 6-exo/endo-Isomeren vor, wobei das 6-exo-Isomere stark überwiegt (21,23). Eine Säulentrennung dieser Isomeren ist zwar möglich (SiO_2 -60, LM IV), wegen der DC-Reinheit des Rohöls und der gemeinsamen Umsetzung beider Isomere zum gleichen Produkt 3 aber nicht erforderlich. DC (6-exo/endo): R_f 0.53/0.59 (LM IV), R_f 0.45/0.41 (LM III). 23.9 mg (48 μmol) des Iodesters (Isomeregemisch) werden bei RT unter Argonschutzgas in 0.1 ml Methanol gelöst und mit 0.3 ml einer Natriummethanolat-Lsg. (aus 0.55g Natrium und 8 ml abs. MeOH) versetzt. Der Ansatz, der sich rasch hellgelb färbt, wird 20 Std. unter Lichtausschluß bei RT belassen, dann mit 0.3-0.4 ml O_2 -freiem Wasser versetzt und innerhalb von 4 Std. bei 35 - 40°C mit einem kräftigen Argonstrom

weitgehend eingengt. Aus der wässr. Phase scheidet sich ein hellgelbes Öl ab, das langsam durchkristallisiert. Nach dem Zusatz von 5-6ml entgastem H₂O wird eine klare hellgelbe Lösung erhalten, die erneut im Argonstrom bei gleicher Temp. auf 0.2-0.5 ml eingengt wird. Aus dieser Lösung scheiden sich im Kühlschrank (+4°C) nach einigen Std. reichlich feinfaserige farbl. Kristalle des Natriumsalzes von 8,9,10,10(²H₄) Prostacyclin, 3, ab. Die Überprüfung der Reinheit dieser empfindlichen Verbindung nach dem für die unmarkierte Substanz entwickelten Verfahren (Überführung in den 4-Phenylphenacyl-ester (21)) zeigt, daß das Hydrolyseprodukt 4 unter diesen Reaktionsbedingungen nur in Spuren entstanden ist.

(C)

8,9,10,10(²H₄)-6-keto-Prostaglandin-F_{1α} 4

Die alkalische Kristallsuspension aus dem vorigen Ansatz wird bei 0°C mit 5-6ml H₂O unter Argon in Lösung gebracht und langsam unter Rühren in eine Lsg. von 8 ml 1n-H₂SO₄ in 30 ml H₂O und 20g Eis eingetroppt. Die farblose, opaleszierende Lsg. wird nach 10 min. mit Ethylacetat (5x50 ml) extrahiert, die org. Phase mit halbgesätt. wässr. NaCl-Lsg. gewaschen (3x5ml), über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Nach dem Trocknen im Vakuum (0.01 mbar, 3 Std.) verbleiben 15 mg (85% d. Th. bezogen auf 2) eines zähen, blaßgelben Öls. DC: R_f 0.10(LM II), R_f 0.14 (LM V), identisch mit unmarkiertem 6-keto-PGF_{1α}. Obgleich noch dünnschichtchromatographisch Verunreinigungen in Spuren nachweisbar sind (die gleichen Verunreinigungen, die bei einer Lsg. von authentischem d₆-keto-PGF_{1α} in Ethylacetat anzutreffen sind, die einige Tage bei RT gestanden hat), zeigt das so anfallende Produkt 4 nach der Derivatisierung gaschromatographisch keine Verunreinigungen und erweist sich somit zur Verwendung als interner Standard bei der GC/MS-Bestimmung von endogenem 6-keto-PGF_{1α} als auch zur mikrobiellen Synthese weiterer markierter Metabolite (z.B. 7) als geeignet. Die im DC nachweisbaren Spurenverunreinigungen können durch Umkristallisation wie folgt entfernt werden: 7 mg Rohöl werden in einem Mikrosplitzkolben bei RT in einigen Tropfen Ethylacetat gelöst und unter Umschwenken langsam mit der 3-5-fachen Volumenmenge n-Hexan bis zum Auftreten einer leichten Trübung versetzt. Nach dreistündigem Stehen bei RT im verschlossenen

Gefäß hat sich die Lösung unter Ausscheidung farbl. Kristalle geklärt. Es wird erneut n-Hexan bis zur Trübung zugesetzt und über Nacht bei +4°C belassen. Nach dem Abpipetieren der Mutterlauge werden die Kristalle mit wenig Ethylacetat/n-Hexan (10:1) gewaschen, im Argonstrom und anschließend Hochvakuum getrocknet. Man erhält 5.5 mg farblose Krist., Fp 85-87°C. Wegen der Bildungsmöglichkeit isomerer cyclischer Hemiketale werden in der Literatur für unmarkiertes 6-keto-PGF_{1α} sehr unterschiedliche Schmelzpunkte berichtet (Fp 101-105.5°C (20), 97-100°C(21), 60-105°C (18), 60-100°C (22)).

MS (EI, Derivat: Methylester, 0-Methyloxim, Tris-Trimethylsilyl ether, M=633) [m/z]:633 (M⁺,3%), 618(M⁺-15(CH₃), 5%), 602(M⁺-31(OCH₃), 27%), 562(M⁺-71(C₅H₁₁), 421(M⁺-31-90-91(TMSOD)), 85%), 381(M⁺-71-90-91, 100%).- Massenbereich 380-640.

([±]) **18, 18, 19, 19(²H₄)- 6-keto-Prostaglandin- F_{1α}, ([±]) **6****

Wie für natürlich konfiguriertes Prostaglandin 2 beschrieben, wird racemischer Methylester ([±]) 5 (Fp 66.5°C) (27) in einem 47 μmol-Ansatz und 84% Ausbeute (gaschromatographisch bestimmt) in ([±]) 6 (nicht kristallisierbares Öl, DC-Verhalten wie 4) überführt.

MS (EI, Derivat wie bei 4, M=633) [m/z] : 618(M⁺-15(CH₃),4%), 602(M⁺-31 (OCH₃), 25%), 558(M⁺-75(C₅H₇D₄), 10%), 512(M⁺-31-90(OCH₃, TMSOH), 63%), 422(M⁺-31-2 x 90, 92%), 378 (M⁺-75-2 x 90, 100%). d₀ < 0.1%.

LITERATUR

1. Haskins N.J.- Biomed. Mass Spectrom. 9: 269 (1982)
2. Axen U., Green K., Hörlin D. und Samuelsson B.- Biochem. Biophys. Res. Commun. 45: 519 (1971)
3. Green K., Granström E. und Samuelsson B.- Anal. Biochem. 54: 434 (1973)
4. Claeys M., Van Hove C., Duchateau A. und Herman A.G.- Biomed. Mass Spectrom. 7: 544 (1980)
5. Verfügbar sind z. Zt. einige C-20 Prostaglandine, die in der oberen Seitenkette (3, 3, 4, 4-d₄) deuteriert sind. Diese Markierung geht bei der enzymatischen β-Oxidation ganz oder teilweise verloren. Über anders ringmarkierte Prostaglandine (³H, ²H₃) ist kürzlich berichtet worden (6-9).
6. De B., Andersen N.H., Ippolito R.M., Wilson C.H. und Johnson W.D.-Prostaglandins 19: 221 (1980)

7. Hsi R.S.P., Stolle W.T., McGrath J.P. und Morton D.R.- *J.Lab. Comp. & Radiopharm.* 18: 1437 (1981)
8. Falardeau P., Oates J.A. und Brash A.R.- *Anal. Biochem.* 115: 359 (1981)
9. Blair I.A., Hensby C.N. und MacDermot J.- *J. Lab. Comp. & Radiopharm.* 18: 361 (1981)
10. Meese C.O. und Frölich J.C.- "Stable Isotopes", H.-L.Schmidt, H.Förstel and K. Heinzinger (Editors), S.743, Elsevier, Amsterdam (1982)
11. Prostaglandin-Nomenklatur: Nelson N.A.- *J.Med.Chem.* 17: 911 (1974)
12. Brash A.R., Baillie T.A., Clave R.A. und Draffan G.H.- *Biochem. Med.* 16: 77 (1976)
13. Bergström S., Krabisch L., Samuelsson B. und Sjövall J.- *Acta Chem. Scand.* 16: 969 (1962)
14. Samuelsson B.- *J.Biol. Chem.* 239: 4091 (1964)
15. Johnson R.A., Morton D.R., Kinner J.H., Gorman R.R., McGuire J.C. und Sun F.F.- *Prostaglandins* 12: 915 (1976)
16. Corey E.J., Keck G.E. und Szekely I.- *J.Am. Chem. Soc.* 99: 2006 (1977)
17. Nicolaou K.C., Barnette W.E., Gasic G.P., Magolda R.L. und Sipio W.J.- *J.C.S.Chem. Comm.* 630 (1977)
18. Johnson R.A., Lincoln F.H., Thompson J.L., Nidy E.G., Mizsak S.A. und Axen U.- *J.Am.Chem.Soc.* 99: 4182(1977)
19. Tömösközi I., Galambos G., Simonidez V. und Kovacs G.- *Tetrahedron Lett.* 2627 (1977)
20. Whittaker N.- *Tetrahedron Lett.* 2805 (1977)
21. Johnson R.A., Lincoln F.H., Nidy E.G., Schneider W.P., Thompson J.L. und Axen U.- *J.Am. Chem. Soc.* 100: 7690 (1978)
22. Nicolaou K.C., Barnette W.E. und Magolda R.L. *J.Chem. Res. (M)* 2444 (1979)
23. Corey E.J., Pearce H.L., Szekely I. und Ishiguro M.- *Tetrahedron Lett.* 1023 (1978)
24. Lehmann W.D.- "Stable Isotopes", H.- L.Schmidt, H.Förstel and K.Heinzinger (Editors), S. 635, Elsevier, Amsterdam (1982)
25. Cooper G.F. und Fried J.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 1579 (1972)
26. Mizsak S.A. und Slomp G.- *Prostaglandins* 10: 807 (1975)
27. Meese C.O., Borstel B. und Beck G.- *J.Lab.Comp. & Radiopharm.* 19: 491 (1982)
28. Pike J.E., Lincoln F.H. und Schneider W.P.- *J. Org. Chem.* 34: 3552 (1969)
29. Miyano M. und Dorn C.R.- *J. Org. Chem.* 37: 1818 (1972)
30. Stehle R.G. und Oesterling T.O.- *J.Pharm. Sci.* 66: 1590 (1977)
31. Sih J.C. und Graber D.R.- *Prostaglandins* 16: 411 (1978)
32. Nidy E.G. und Johnson R.A.- *Tetrahedron Lett.* 2375 (1978)
- 33a. Mitchell M.D., Brunt J.D. und Webb R.- *Prostaglandins Med.* 6: 437 (1981)
- 33b. Kürzlich wurden ^1H NMR-spektroskopisch regioselektive Austauschprozesse am Cyclopentanring von 6-keto-PGE₁ nachgewiesen: Kotovych G. und Aarts G.H.M.-*Can. J.Chem.*60: 2617 (1982)

34. Wong P.Y.-K., Lee W.H., Chao P.H.-W., Reiss R.F. und McGiff J.C.-J.Biol. Chem. 255: 9021 (1980)
35. Miller M.J.S. und McGiff J.C.- vth Int. Conf. Prostaglandins, Florence (Italy), 1982, Abstract p. 739
36. Fischer C. und Meese C.O.- Vth Int. Conf. Prostaglandins, Florence (Italy), 1982, Abstract p. 38
37. Unveröffentlichte Ergebnisse
38. Wong P.Y.-K., McGiff J.C., Cagen L., Malik K.U. und Sun F.F.-J.Biol. Chem. 254: 12 (1979)
39. Sun F.F., Taylor B.M., Sutter D.M. und Weeks J.R.- Prostaglandins 17: 753 (1979)
40. Rosenkranz B., Fischer C., Reimann I., Weimer K.E., Beck G. und Frölich J.C.- Biochim. Biophys. Acta 619: 207 (1980)
41. Rosenkranz B., Fischer C., Weimer K.E. und Frölich J.C.- J.Biol. Chem. 255: 10194 (1980)
42. Mallet A.I.- Prostaglandins Leukotrienes and Medicine 8: 181 (1982)
43. Ramwell R.W. und Daniels E.G.- "Chromatography of the Prostaglandins", in: Lipid Chromatographic Analysis, Vol. II, 1st Ed. (G.V.Marinetti, Editor), Marcel Dekker, Inc., New York (1968), S.313
44. Andersen N.H.- J. Lipid Res. 10: 316 (1969)
45. LeCocq C. und Lallemand J.-Y.- J.C.S. Chem. Comm. 150 (1981)
46. Brown D.W., Nakashima T.T. und Rabenstein D.L.- J.Magn.Reson. 45: 302 (1981)

DANKSAGUNG

Wir danken Herrn Dr. U. Axen (The Upjohn Comp.) für die großzügige Überlassung unmarkierter Prostaglandine, Herrn Dr. G.Beck (Hoechst AG) für wertvolle Anregungen, Herrn Dr. W.D. Lehmann (Medizinische Biochemie, Universitäts- Krankenhaus Hamburg-Eppendorf) für die FD- MS-Aufnahmen, Frau Dr. C.Fischer und Herrn Dr. B. Rosenkranz (dieses Institut) für GC/MS- Messungen bzw. Versuche zur β -Oxidation, sowie der Robert-Bosch-Stiftung für die Unterstützung der Arbeit.