

Das tautomere Gleichgewicht des Bilirubins*

Kurze Mitteilung

Von

Heinz Falk, Stefan Gergely und Karl Grubmayr

Lehrkanzel für Organische Chemie, Universität Wien, Österreich

(Eingegangen am 21. April 1976)

The Tautomeric Equilibrium of Bilirubin

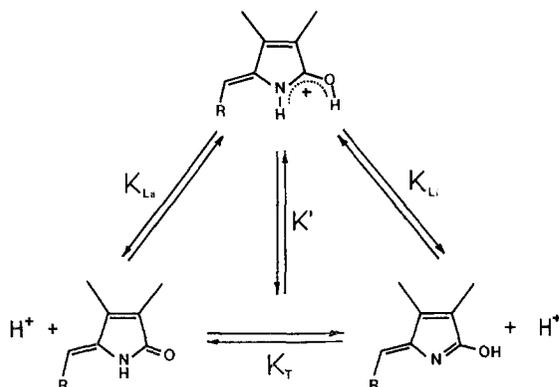
The equilibrium between lactam and lactim forms of bilirubin was studied by means of optical pK -measurements of model compounds of the arylmethylidenpyrrolinone and pyrromethenone series as well as bilirubin, bilirubin dimethyl ester and dimethoxybilirubin dimethyl ester. The lactam form of bilirubin was found to be more stable by a factor of at least 10^4 compared with the lactim form. Therefore the latter is not responsible for the spectroscopic anomalies of bilirubin.

Im letzten Jahrzehnt haben sich zahlreiche Befunde angesammelt, die darauf hinweisen, daß das Bilirubin weitgehend in einer durch Wasserstoffbrücken stabilisierten Bis-Lactamform vorliegt¹. Es besteht jedoch weiterhin das brennende Problem, ob nicht doch in gewissen Mengen auch die Lactimformen als Komponenten eines tautomeren Gleichgewichtes vorhanden sind — eine Vermutung, die einerseits auf Grund der möglichen O-Alkylierung der Pyrrolinonstruktur, andererseits im Hinblick auf das absorptionspektroskopische Verhalten des Bilirubins und seiner Derivate ausgesprochen wurde².

Unserer Zielsetzung folgend, Einsichten in die Struktur (Tautomerie, Konfiguration, Konformation) von Gallenpigmenten aus der Untersuchung von Gallenpigment-Partialstrukturen zu erlangen³, haben wir uns mit den tautomeren Gleichgewichten bei 5-Arylmethyliden-3-pyrrolin-2-onen und Pyrromethenonen näher beschäftigt. Zur Untersuchung des Gleichgewichtes zwischen Lactam- und Lactimform sind wir davon ausgegangen, daß die beiden Tautomeren ein identisches Protonierungsprodukt ergeben. Das daraus resultierende Gleichgewichts-

* Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes Nr. 2732 vom Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung in Österreich unterstützt.

schema ermöglicht es, aus der Messung von mindestens zwei der Dissoziationskonstanten (K' , K_{La} , K_{Li}) die Gleichgewichtskonstante K_T des tautomeren Gleichgewichtes abzuleiten⁴:



Die thermodynamische Dissoziationskonstante K' folgt aus der optischen Bestimmung des pK' -Wertes eines Pyrromethenons, die mikroskopischen Konstanten K_{La} und K_{Li} sind aus Messungen an den N- bzw. O-methylierten Derivaten abzuleiten⁵.

Daß diese Näherung auch in der vorliegenden Substanzklasse anwendbar ist, zeigen⁶ Derivate mit $R = 4$ -Methylphenyl⁷. $pK' = -2,20 \pm 0,1$, $pK_{La} = -2,30 \pm 0,1$ (N-Methylderivat) und $pK_{Li} = 4,24 \pm 0,05$ (O-Methylderivat); K' und K_{La} stimmen überein, d. h. der Einfluß der Methylgruppe auf die Basizität ist vernachlässigbar. Demnach beträgt im Tautomeriegleichgewicht der Überschuß an Lactamtautomeren $2,5 \cdot 10^6$.

Für Pyrromethenone beobachtet man neben dem ersten Protonierungsschritt eine zweite Stufe (pK_{II}), die der bekannten Protonierung des Pyrrols⁸ entspricht. Ist $R = 2$ -Pyrrolyl⁹, so mißt man $pK_{Li} = 4,80 \pm 0,05$ (O-Methylderivat), $pK' = -1,34 \pm 0,1$ (Lactam—Lactimverhältnis demnach $1,3 \cdot 10^6 : 1$) und $pK_{II} = -5,66 \pm 0,1$ [entsprechend $(H_0)_{1/2}$ aus der Intensitätsverminderung der langwelligen „Protonierungsbande“ mit steigender Protonenkonzentration]. Wie wir an einigen substituierten Derivaten beobachten konnten, liegt pK_{Li} stets im Bereich um 4 und pK' zwischen -1 und -3 . Bei Pyrromethenonen ist also im Mittel die Lactamform im Gleichgewicht um etwa sechs Größenordnungen bevorzugt.

Die Messungen am Bilirubin¹⁰ fügen sich zwanglos in dieses Bild ein. Die Intensität der „Protonierungsbande“ (512 nm)¹¹ nimmt mit steigender Acidität des Mediums wie bei den Pyrromethenonen zu und wird bei

sehr hohen Säurekonzentrationen wieder vermindert.¹² Aus diesen Daten errechnet man für die beiden nicht getrennt erscheinenden Protonierungsschritte einen mittleren $\overline{pK'}$ -Wert von $-3,4 \pm 0,1$. Vergleicht man dies mit dem Bilirubindimethylester ($\overline{pK'} = -1,60 \pm 0,1$; vgl. mit dem Pyrromethenon!), so wird der stabilisierende Einfluß der Carboxyl—Lactam-Wasserstoffbrücken¹³ deutlich. Zur Abschätzung der Basizität der Bis-Lactimform des Bilirubins bestimmte man den $\overline{pK_{Li}}$ -Wert des Dimethoxybilirubindimethylesters ($2,20 \pm 0,05$). Daraus folgt zunächst, daß im Falle des Bilirubinesters das Lactam—Lactim-Verhältnis $6,3 \cdot 10^3$ beträgt. Extrapoliert man diesen Befund unter Berücksichtigung der starken Basizitätsabsenkung durch die Wasserstoffbrücken auf das Bilirubin, so ergibt sich der Schluß, daß auch bei diesem die Lactamform um mindestens vier Größenordnungen gegenüber der Lactimform bevorzugt ist.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß beim Bilirubin die Lactimformen für die Interpretation absorptionsspektroskopischer oder chemischer Anomalien ohne Bedeutung sind^{1, 14}. Darüber hinaus sind Betainstrukturen¹⁵ wegen der geringen Basizität der Lactamgruppierungen auszuschließen.

Literatur

- ¹ Übersicht: *W. Rüdiger*, Fortschr. Chem. Org. Naturst. **29**, 60 (1971).
- ² *C. C. Kuenzle*, Biochem. J. **119**, 395 (1970); *C. C. Kuenzle, M. H. Weibel* und *R. R. Pelloni*, Biochem. J. **133**, 357 (1973); *C. C. Kuenzle, M. H. Weibel, R. R. Pelloni* und *P. Hemmerich*, Biochem. J. **133**, 364 (1973). Zum Argument der Alkylierung siehe *R. Gompper*, Chem. Ber. **93**, 187 (1960).
- ³ 14. Mitt. aus der Reihe „Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente“: *H. Falk, O. Hofer* und *A. Leodolter*, Mh. Chem. **107**, im Druck.
- ⁴ Übersicht: *H. Wamhoff*, Bestimmung tautomerer Gleichgewichte, in: Methodicum Chemicum 1/1, 637; Thieme, 1973.
- ⁵ Vgl. die Untersuchung der Hydroxypyridine: *G. F. Tucker* und *J. L. Irvin*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 1923 (1951); *A. Albert* und *J. N. Phillips*, J. Chem. Soc. **1956**, 1294.
- ⁶ pK -Werte > 1 : spektrophotometrische Titration, Glaselektrode, 25 °C, CARY-15-Spektrometer (von der Stiftung Volkswagenwerk in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt), Konzentrationen um $10^{-5}M$ in $0,01M$ -Daviespuffer. pK -Werte < 1 : Spektrophotometrie einer H_2SO_4 -Konzentrationsreihe; da die Neigung (k) der Auftragung von H_0 (siehe z. B. *L. P. Hammett*, Physikalische Organische Chemie, S. 270. Weinheim: Verlag Chemie, 1973) gegen $\log(c_{BH^+}/c_B) < 1$ war, bestimmte man den pK -Wert auf zwei Wegen, die zu übereinstimmenden Ergebnissen führten: a) $pK = k \cdot (H_0)^{1/2}$, b) $pK = (H_A)^{1/2}$ [siehe *R. B. Homer* und *C. D. Johnson*, The Chemistry of Amides (*J. Zabicky*, Hrsg.), S. 187. London: Interscience, 1970]. Durch nachfolgendes Verdünnen wurde jeweils sichergestellt, daß die beobachteten spektroskopischen Änderungen reversibel waren.

- ⁷ H. Falk, K. Grubmayr und O. Hofer, *Mh. Chem.* **106**, 301 (1975); die Darstellung des O- und N-Methylderivates (Trimethyloxoniumtetrafluorborat ohne und mit N-Äthyl-N,N-diisopropylamin) soll in anderem Zusammenhang beschrieben werden. $\lambda_{\text{Base}} = 334 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Base}\cdot\text{H}^+} = 375 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{Base}}/\epsilon_{\text{Base}\cdot\text{H}^+} \sim 1$.
- ⁸ Y. Chiang und E. B. Whipple, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2763 (1963).
- ⁹ H. Falk, K. Grubmayr, U. Herzig und O. Hofer, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 559; für das O-Methylderivat vgl. ⁷; $\lambda_{\text{Base}} = 385 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Base}\cdot\text{H}^+} = 430 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{Base}}/\epsilon_{\text{Base}\cdot\text{H}^+} \sim 1$.
- ¹⁰ Für die großzügige Überlassung von Bilirubin (Fluka) danken wir Herrn Dr. K. Bauer (Fa. Werfft Chemie, Wien) sehr herzlich. Der Dimethylester bzw. dessen Dimethoxyderivat stellten wir nach H. Fischer, H. Plieninger und O. Weissbarth, *Z. physiol. Chem.* **268**, 197 (1941) dar.
- ¹¹ Aus Löslichkeitsgründen wurde das System 20% Äthanol—80% wäßr. H_2SO_4 [A. J. Kresge und H. J. Chen, *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 8192 (1972)] bzw. 20% Äthanol—80% Puffer⁶ verwendet. Die Vergleichsmessung am Pyromethanonmodell gab $\text{p}K' = -1,25 \pm 0,1$, d. h. die Werte werden gegenüber dem wäßr. System praktisch nicht verschoben.
- ¹² Wegen der Mehrfachgleichgewichte beobachtet man hier keine isobestischen Punkte.
- ¹³ Siehe ² und P. Manitto und D. Monti, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 122.
- ¹⁴ Der Grund für spektrale Verschiebungen liegt offenbar in der Stabilisierung bestimmter geometrischer Anordnungen in Abhängigkeit von Medium oder Substitutionstyp — vgl. hierzu die PPP-Rechnungen am Bilirubin: G. Blauer und G. Wagnière, *J. Amer. Chem. Soc.* **97**, 1949 (1975).
- ¹⁵ H. v. Dobeneck und E. Brunner, *Z. physiol. Chem.* **341**, 157 (1965).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Doz. Dr. H. Falk

Lehrkanzel für Organische Chemie

Universität Wien

Währinger Straße 38

A-1090 Wien

Österreich