

Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 38. Mitt.¹:

Zur Assoziation von Gallenpigmenten

Heinz Falk^{*,a}, Thomas Schlederer^b und Peter Wolschann^c

^a Institut für Analytische, Organische und Physikalische Chemie,
Johannes Kepler Universität Linz, A-4040 Linz, Österreich

^b Institut für Organische Chemie, Universität Wien,
A-1090 Wien, Österreich

^c Institut für Theoretische Chemie und Strahlenchemie,
Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 19. Mai 1980. Angenommen 9. Juli 1980)

On the Chemistry of Pyrrole Pigments, XXXVIII: On the Association of Bile Pigments

The long standing problem of solvent dependent absorption spectra of certain bile pigments such as bilirubindimethylester has been solved by measurement of molecular masses by means of vapour pressure osmometry. Using this method and the investigation of the concentration and temperature dependence of the absorption spectra on several model compounds an association equilibrium for pigments of the rubinoid structural type could be confirmed. Moreover the optical properties of the coexisting species and the corresponding equilibrium constants could be deduced by spectroscopic techniques. Verdinoid pigments lacking free carboxylic functions on the other hand tend to be monomeric in solution. A heteroassociated species involving equimolar amounts of a verdinoid and a rubinoid pigment could be verified existing on adsorbents like silicagel.

(*Keywords: Association equilibria; Bile pigments; Bilirubindimethylester; Molecular masses*)

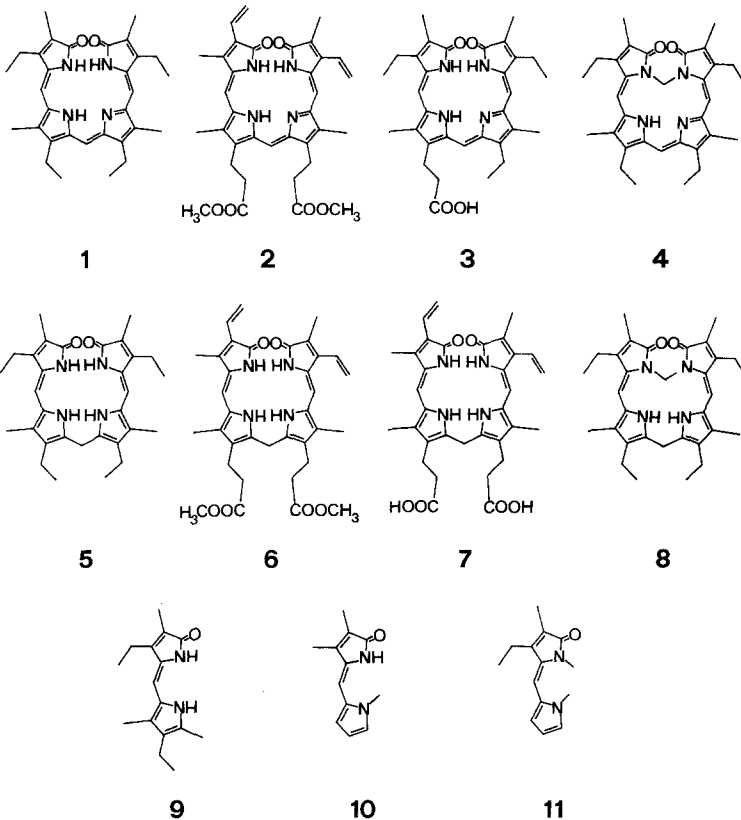
Einleitung

Untersuchungen des Assoziationsverhaltens porphinoider Pigmente nehmen in der Literatur² einen breiten Raum ein — entsprechende Daten für die linearen tetrapyrrolischen Systeme sind hingegen kaum zu finden³. Anlässlich einer Studie über die Eigenschaften des Gallenpigment-Partialstruktursystems „Pyrromethenon“ konnte gezeigt

werden, daß die betonte Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften vom Lösungsmittel in erster Linie auf das Assoziationsverhalten dieser Verbindungen zurückzuführen ist⁴ — ähnlich ist die Situation beim Emissionsverhalten⁵. Eine entsprechende Untersuchung im Bereich der integralen Systeme, die ja letzten Endes immer das Ziel des Studiums von Partialstrukturen darstellen, war bislang noch ausständig. Die vorliegende Mitteilung ist dem Phänomen der Assoziation von verdinoiden und insbesondere rubinoiden Gallenpigmenten und dessen Auswirkungen auf die absorptionspektroskopischen Eigenschaften gewidmet.

Methodik

Die Verbindungen **1**, **2**, **4**—**6** und **8**—**11** wurden in der Literatur^{1, 4, 6, 7, 8} beschrieben. **3** stellte man in Analogie zu Lit.⁶ aus Xanthobilirubinsäure⁹ und **9** mit nachfolgender Trennung der drei möglichen Produkte dar. Schmp. 143—144 °C; die spektroskopischen Daten (MS, IR, ¹H-NMR) sind in Über-



einstimmung mit der Struktur. Bilirubin (7) war kommerziellen Ursprungs (Fluka). Es wurde bei diesen Verbindungen nicht nur auf die einwandfreie spektroskopische Identität geachtet, sondern auch durch CHN-Analyse sichergestellt, daß evtl. anhaftendes Lösungsmittel usw. nicht zu einer Verfälschung der Einwaagekonzentrationen führen konnte. Für die Bestimmung der Molmassen verwendete man ein Knauer Dampfdruckosmometer (Meßtemperatur 45 Grad). Die Lösungsmittel waren von p. A. bzw. Uvasol-Qualität (Merck) — Chloroform filtrierte man unmittelbar vor Verwendung über Al_2O_3 (neutral, Akt. II—III). Als Eichstandard fand Benzil, mehrfach kristallisiert und sublimiert, Verwendung. Die UV-VIS-Daten erhielt man auf den Cary-15- bzw. Uvikon-800- bzw. Perkin-Elmer-330-Spektrometern (Konzentrationsbereich $2 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1} , Schichtdicken 1 und 10 mm). Die Temperaturmessung erfolgte unmittelbar am Küvetteninhalt ($\pm 0,1$ Grad). Die Extinktionen bei verschiedenen Temperaturen wurden für die Volumsänderung mit der Temperatur korrigiert. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K sowie der Spektren der beiden Spezies von **6** erfolgte mit Hilfe des Rechenprogramms MINUIT an der Großrechenanlage CDC 73 des Interfakultären Rechenzentrums der Universität Wien.

Ergebnisse und Diskussion

1. Homoassoziate

1.1. Verdinoide Pigmente

Die Daten der Tabelle 1 zeigen, daß nur für den Fall, daß ein Bilatrien-abc-Skelett über eine freie Carboxylgruppe verfügt, mit einer Assoziation zu rechnen ist. Im üblichen Konzentrationsbereich spektrophotometrischer Messungen (10^{-3} — 10^{-5} mol l^{-1}) kann jedoch die

Tabelle 1. Molmassen verdinoider Pigmente in Chloroform

Verbindung	$M_{\text{ber.}}$	$M_{\text{exp.}}$	c (mol kg^{-1})
1	498	509 ± 10	0,01 — 0,007
2	610	615 ± 10	0,01 — 0,006
3	544	949 ± 30	0,006 — 0,004
4	510	503 ± 10	0,009 — 0,006

Assoziation bei Pigmenten ohne freie Carboxylgruppen nicht für spektroskopische Phänomene verantwortlich gemacht werden. Sind jedoch freie Carboxylgruppen anwesend, so ist von Fall zu Fall der Assoziationsgrad abzuklären, ehe Aussagen z. B. über die Korrelation zwischen Struktur und Absorptionsspektren gemacht werden können. Obwohl also im Kristallverband über die Laktamfunktion auch bei „unpolaren“ Pigmenten Dimere ausgebildet werden¹⁰, ist die Assoziationskonstante für diesen Prozeß im gelösten Zustand zu klein, um

im Konzentrationsbereich unterhalb von 10^{-2} mol l⁻¹ innerhalb der Meßgenauigkeit irgendwelche Folgen für die Absorptionsspektren zu zeigen. Ein K von etwa 1 für **10**, welches die übliche Laktam-Dimerisierung einzugehen vermag⁴, unterstreicht diesen Befund sehr deutlich.

1.2. Rubinoide Pigmente

1.2.1. Molmassen

Schon in sehr verdünnten Lösungen präsentiert sich **5** in Chloroform offenbar vorwiegend als Dimeres. **6** stellt in Chloroform ein teilweise aggregiertes System dar, das sich in Methanol völlig auf die Seite des

Tabelle 2. *Molmassen rubinoider Pigmente*

Verbindung	$M_{\text{ber.}}$	$M_{\text{exp.}}$	c (mol kg ⁻¹)	Lösungsmittel
5	500	966 ± 25	0,007—0,0003	Chloroform
6	612	1110 ± 30	0,01 —0,005	Tetrahydrofuran
6	612	850 ± 20	0,02 —0,002	Chloroform
6	612	595 ± 30	0,002—0,001	Methanol
8	512	520 ± 15	0,007—0,005	Chloroform

Monomeren drängen läßt. Die sterisch stark gehinderte und ihres Laktam-Protons beraubte Verbindung **8** zeigt keine Tendenz zu Assoziatbildung. Leider reichte die Löslichkeit von **7** nicht für eine verlässliche Messung aus¹¹. Die Daten für die Konzentrationsabhängigkeit der scheinbaren Molmassen von **6** in Chloroform und Tetrahydrofuran waren für die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten (vgl. Lit.⁴) nicht ausreichend genau zu erhalten. Die in Tabelle 2 angeführten Werte sind Mittelwerte über 4—8 Messungen im dort angegebenen Konzentrationsbereich.

Im Fall von **5** wird eine sehr wirkungsvolle intermolekulare Wechselwirkung offenbar, die ihre Analogie im diesbezüglichen Verhalten des Pyrromethenons **9** hat⁴. Die Anwesenheit stärker polarer Reste am rubinoiden Skelett (**6**) dürfte diese starke Wechselwirkung etwas konkurrenzieren (vgl. dazu die Kristallstruktur des Bilirubins¹²) — die Art des Lösungsmittels spielt, wie sich dies beim Methanol zeigt, eine entscheidende Rolle. Das Verhalten von **8** ist völlig analog zu jenem des Pyrromethenons **11** — hier sind praktisch keine Möglichkeiten für die Ausbildung genügend starker intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen mehr vorhanden.

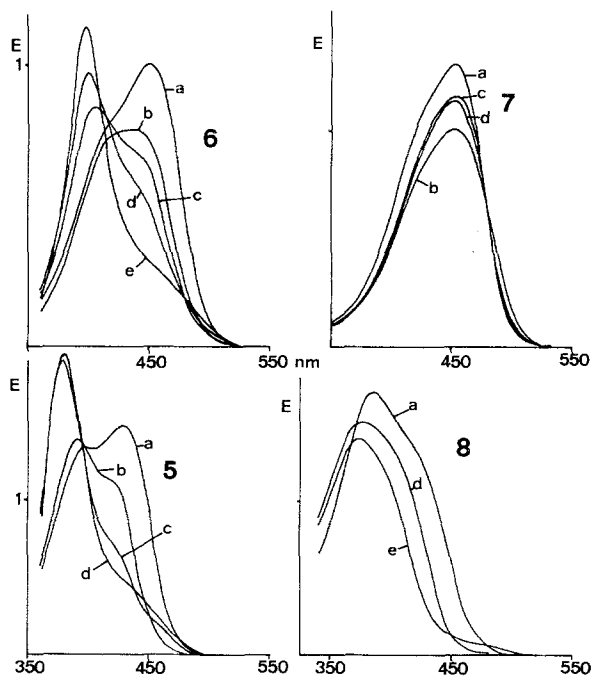


Abb. 1. UV-Spektren von 5–8 in Methanol (a), Pyridin (b), Tetrahydrofuran (c), Chloroform (d) und Cyclohexan (e), $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, 25°C

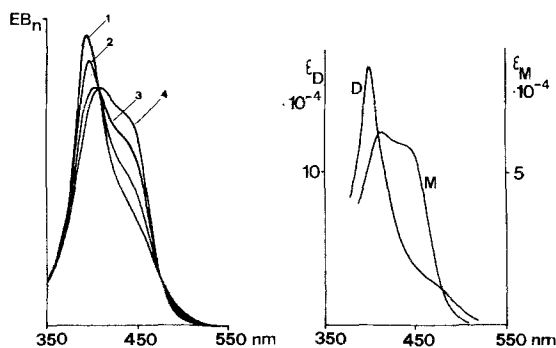


Abb. 2. UV-Spektren von 6 in Tetrahydrofuran ($c_1^* = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $d_1 = 1 \text{ mm}$, Extinktionsbereich $EB_1 = 0-2,56$; $c_2 = c_1/4$, $d_2 = 1 \text{ mm}$, $EB_2 = 0-0,64$; $c_3 = c_2/4$, $d_3 = 10 \text{ mm}$, $EB_3 = 0-1,6$; $c_4 = c_3/4$, $d_4 = 10 \text{ mm}$, $EB_4 = 0-0,4$; $t = 25^\circ \text{C}$) sowie die berechneten Absorptionsspektren der monomeren (M) und dimeren (D) Spezies von 6

* Beim Übergang zu höheren Konzentrationen tritt keine ausgeprägte Änderung des Spektrentyps ein, ebensowenig wie bei Unterschreiten von c_4 .

1.2.2. Assoziation und Absorptionsspektren

In der Abb. 1 sind die spektroskopischen Beobachtungen an den rubinoiden Pigmenten **5**—**8** zusammengefaßt, die sich aus der Variation des Lösungsmittels ergeben.

Da aus der Messung der Molmassen für **5** eine assoziierte Spezies und für **6** eine aggregierte in Chloroform bzw. Tetrahydrofuran und eine monomere in Methanol feststeht, ist aus Abb. 1 eine Ursache für die ausgeprägte Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptionsspektren von **5** und **6** evident. **7** und **8** zeigen hingegen in diesem Konzentrationsbereich nur eine geringe Lösungsmittelabhängigkeit, die offenbar die Einflüsse der Solvatation widerspiegelt. Auf Grund dieser Ergebnisse sind Monomerengleichgewichte, wie tautomere Umlagerungen oder Konformationsverschiebungen, für die Interpretation der spektroskopischen Phänomene³ nicht in Betracht zu ziehen. Was das Tautomeriegleichgewicht bei **6** anbelangt, konnte gezeigt werden, daß in Lösung die Bis-Laktamform gegenüber Laktimformen um wenigstens vier Größenordnungen bevorzugt wird¹³ — einen weiteren Befund liefert die Untersuchung der Gültigkeit des *Lambert-Beerschen* Gesetzes (vgl. Lit. 4, 11):

Liegt nämlich in einem bestimmten Lösungsmittel ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Assoziaten vor, so sollten Form und Intensität der Absorptionsbanden eine Abhängigkeit von der Konzentration zeigen. Besonders einfach läßt sich dies an Verdünnungsreihen demonstrieren, wie dies in Abb. 2 gezeigt wird.

Für dieses Gleichgewicht läßt sich über $K = c_2/c_1^2$, $E^\lambda = (\varepsilon_1^\lambda c_1 + \varepsilon_2^\lambda c_2) \cdot d$, $c_2 = (c_0 - c_1)/2$ und Meßwerten für einen Satz von Wellenlängen (λ) im interessierenden Spektralbereich (c_1 = Konzentration an Monomerem, c_2 = Konzentration an Dimerem, c_0 = Einwaagekonzentration, d = Schichtdicke) sowohl die Gleichgewichtskonstante als auch das Absorptionsspektrum der jeweiligen Extremkomponente abschätzen. Das Ergebnis für **6** gelöst in Tetrahydrofuran mit $K = 12\,000 \pm 2\,000 \text{ mol}^{-1}$ liefert die in Abb. 2 eingetragenen Absorptionsspektren für die monomere und dimere Spezies von **6**. Der dominierende Vorgang im obigen Konzentrationsbereich ist demnach der bimolekulare Prozeß der Dimerisierung. Die Absorptionsspektren der beiden Spezies zeigen deutlich die zu erwartende Aufspaltung bichromophorer Systeme^{4, 14}. Der Vergleich mit dem Wert für K von **5** ($42\,000 \pm 5\,000 \text{ mol}^{-1}$) zeigt, daß bei **6** offenbar ein Konkurrenzgleichgewicht unter Beteiligung der Esterfunktion (siehe auch die Molmassen, Tabelle 2) vorliegt.

Assoziationsgleichgewichte sind in der Regel auch von der Temperatur abhängig — Abb. 3 enthält ein solches typisches Experiment. Das

Absorptionsspektrum wird, wie zu erwarten, bei Temperaturerhöhung in Richtung des Spektrums der monomeren Spezies verschoben. Aus den Daten läßt sich ein ΔH^0 von $-7 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und weiters ein ΔS^0 von $50 \pm 10 \text{ J mol}^{-1} \text{ grad}^{-1}$ abschätzen. Dieser positive Entropiewert steht im Gegensatz zu den Daten der üblichen Dimerisierungsgleichgewichte ($\Delta S^0 < 0$) und dürfte eine typische Eigenschaft rubinoide Systeme sein.

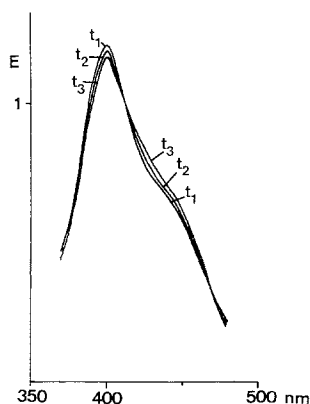


Abb. 3. UV-Spektren von **6** (Tetrahydrofuran) bei $t_1 = 15,6$, $t_2 = 30,5$ und $t_3 = 45,0^\circ \text{C}$ ($c = 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $d = 1 \text{ mm}$)

Dieser Befund steht in scheinbarem Widerspruch zur kürzlich mitgeteilten Beobachtung¹⁵, nach der bei Temperaturerhöhung die kurzwellig absorbierende Form dominiert. Diese Messungen wurden jedoch bei zehnfacher Verdünnung durchgeführt und weisen auf zwei monomere Formeln mit unterschiedlichen Absorptionsspektren hin.

Was das Emissionsverhalten anbelangt, konnte schon an Pyromethenonen wie **9** der dramatische Unterschied im Verhalten zwischen monomer gelöster und assoziierter Spezies dokumentiert und interpretiert werden^{4, 5, 16} — die intermolekularen Wasserstoffbrückensysteme erlauben eine rasche strahlungslose Desaktivierung, die zur Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute um wenigstens zwei Größenordnungen führt.

Das oben abgeleitete Assoziationsgleichgewicht des Typs $A + A = A_2$ für rubinoide Systeme kann aber auch über die Assoziation von A mit Fremdmolekülen gestört werden, wie dies z. B. mit einem Pyrrolinon (P) in Abb. 4 gezeigt wird. Erhöhung der Konzentration dieses Laktams bewirkt eine Anreicherung der Spezies, die bei längeren Wellenlängen absorbiert und die dementsprechend vom Typ AP oder PAP sein dürfte. Dieses Phänomen zeigt sich auch bei Zusatz

von Wasser oder anderen stark wasserstoffbrückenbindenden Agentien.

Die obigen Experimente geben klar das Vorliegen von Assoziationsgleichgewichten der Art, Monomer = Dimer und gegebenenfalls Dimer = Oligomere, die naturgemäß von Lösungsmittel und Temperatur abhängen, zum Ausdruck. Die spektroskopischen Eigenschaften von Bilirubin (7) in wenig polaren Lösungsmitteln weisen sehr auf eine intramolekulare Absättigung der Wasserstoffbrücken hin; für das Assoziationsgeschehen in polaren Lösungsmitteln wurden kürzlich vor allem für wäßrige Lösungen des Dianions ausführliche Daten mitgeteilt¹¹.

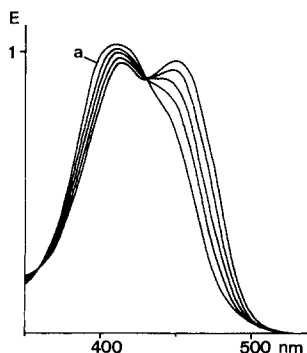


Abb. 4. UV-Spektren von **6** (Tetrahydrofuran) $c = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (a) und nach Zusatz von $6,6 \cdot 10^{-3}$, $1,3 \cdot 10^{-2}$, $2,6 \cdot 10^{-2}$ und $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ 4-Ethyl-3-methyl-3-pyrrolin-2-on

2. Heteroassoziate

Löst man **1** und **5** in etwa gleichen Mengen in Chloroform und appliziert eine Mischung dieser Lösungen auf ein Adsorbens (z. B. Silikagel), so wandert bei chromatographischer Entwicklung (Chloroform/Methanol = 50/1) neben Spuren der Edukte [$R_f(\mathbf{1}) = 0,7$; $R_f(\mathbf{5}) = 0,6$] eine grün gefärbte Bande, welche einen R_f von etwa 0,1 aufweist. Diese läßt sich auch präparativ isolieren und zeigt ein definiertes Schmelzverhalten (Schmp. 245—247 °C). Durch Ausschütteln mit verdünnter Säure läßt sich der Komplex mühelos in die Edukte zerlegen. Die Bestimmung der scheinbaren Molmasse von **1** + **5** in Chloroform gibt jedoch keine ausgeprägte Abweichung vom zu erwartenden Wert (aus den Daten der Tabellen 1 und 2 kann man für ein äquimolares Gemisch einen Erwartungswert von 738 abschätzen, die Messung bei $c = 0,01 \text{ mol kg}^{-1}$ ergab 775 ± 15). Das auf Adsorbentien stabile Heteroassoziat eines verdinoiden und rubinoiden Pigmentes

dürfte demnach in Chloroform-Lösung offenbar keine ausreichende Stabilität besitzen — hier überwiegt die Stabilität des rubinoiden Homoassoziates. Einen Hinweis liefert auch der Umstand, daß diese Art eines Assoziates nicht gebildet wird, wenn eine der Komponenten sterisch gehindert ist, wie dies bei den Paaren **4 + 5** und **1 + 8** der Fall ist.

Dank

Die vorliegende Untersuchung wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Unser Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. P. Schuster für die Möglichkeit zur Benützung des aus Mitteln des genannten Fonds angekauften Perkin-Elmer-UV-VIS-NIR-Spektrometers. Herrn Prof. Dr. K. Schaffner sind wir für die Übersendung von Manuskripten sehr verbunden.

Literatur

- 1 37. Mitt.: Falk, H., Thirring, K., Tetrahedron, im Druck.
- 2 Siehe z. B.: White, M. J. in: The Porphyrins (Dolphin, D., Hrsg.), Bd. 5, 303. New York: Acad. Press. 1978; sowie Katz, J. J., Shipman, L. L., Cotton, T. M., Janson, T. R., *ibid.* 5, 402.
- 3 Siehe die Übersicht von McDonagh, A. F., in: The Porphyrins 6, 293.
- 4 Falk, H., Grubmayr, K., Höllbacher, G., Hofer, O., Leodolter, A., Neufingerl, F., Ribo, J. M., Mh. Chem. 108, 1113 (1977).
- 5 Falk, H., Neufingerl, F., Mh. Chem. 110, 987 (1979).
- 6 Falk, H., Grubmayr, K., Synthesis 1977, 614.
- 7 Falk, H., Grubmayr, K., Haslinger, E., Schlederer, T., Thirring, K., Mh. Chem. 109, 1451 (1978).
- 8 Stoll, M. S., Gray, C. H., Biochem. J. 163, 59 (1977).
- 9 Grunewald, J. O., Cullen, R., Bredfeldt, J., Strobe, E. R., Org. Prep. Proc. Int. 7, 103 (1975).
- 10 Sheldrick, W. S., J. Chem. Soc., Perkin II 1976, 1457.
- 11 Carey, M. C., Koretzky, A. P., Biochem. J. 179, 675 (1979).
- 12 Bonnett, R., Davis, J. E., Hursthouse, M. B., Nature 262, 326 (1976).
- 13 Falk, H., Gergely, S., Grubmayr, K., Hofer, O., Ann. Chem. 1977, 565; Falk, H., Gergely, S., Grubmayr, K., Mh. Chem. 107, 827 (1976).
- 14 Blauer, G., Wagniere, G., J. Amer. Chem. Soc. 97, 1949 (1975).
- 15 Holzwarth, A. R., Langer, E., Lehner, H., Schaffner, K., Photochem. Photobiol. 32, 17 (1980).
- 16 Falk, H., Grubmayr, K., Neufingerl, F., Mh. Chem. 110, 1127 (1979).