

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Klinická a toxikologická analýza



Veronika Felklová

Studium adice thiolů na biliverdin, syntéza značených bilirubinů

Study of thiol addition to biliverdine, the synthesis of labelled bilirubine

Bakalářská práce

Doc. RNDr. Ladislav Lešetický, CSc.

Praha, 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením grantu GAČR P206/11/0836.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité literární prameny. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 5. 2011

Abstrakt

Biliverdin a bilirubin jsou žlučová barviva, která jsou degradačními produkty hemu. Biliverdin (BV) je zelenomodré barvivo, které je meziproduktem rozkladu tetrapyrrolového jádra hemu působením enzymu hemoxygenázy (HO). Konečným produktem této degradace je žlutohnědé barvivo bilirubin (BR), který vzniká z BV díky enzymu biliverdinreduktáze (BVR). Normální a mírně zvýšená hladina bilirubinu v plasmě má cytoprotektivní vlastnosti, naopak vysoké hodnoty bývají často cytotoxické. U případů těžké nekonjugované hyperbilirubinemie (u novorozeňat), se nekonjugovaný bilirubin (UCB) usazuje v centrální nervové soustavě (CNS) a způsobuje tak bilirubinem vyvolanou neurologickou dysfunkci (BIND). Bohužel je zde omezení pro zjištění patofyziologie UCB, které je způsobené obtížným určením obsahu a rozdělení UCB ve tkáních a biologických tekutinách. Hlavním cílem této práce je proto objevení a začlenění ojedinělých metod, které budou základem při zjišťování distribuce bilirubinu. Tento pokrok by měl významný vliv na studium neurotoxicity bilirubinu u novorozeňat. Tato metoda je založená na radioaktivním označení UCB. Přednostně se na navázání vhodné funkční skupiny (thioly) použije atom C10, protože v této poloze by se konformace značeného bilirubinu neměla změnit. A následně se nukleofilní substitucí do molekuly inkorporuje isotop jodu. Takto označený UCB bude testován pomocí MS, NMR. Výsledky ovšem ukázaly, že adice thiolů na BV není vhodná. Takto vytvořené sloučeniny nejsou stabilní, a proto není možné je označit vhodným radioisotopem. Jedinou možností je adice jiné funkční skupiny, která bude odolnější vůči vnějším faktorům.

Klíčová slova: biliverdin, bilirubin, thiol, nukleofilní adice, hyperbilirubinemie, MS, tosylace

Abstract

Biliverdin and bilirubin are bile pigments which are degradation products of heme. Biliverdin (BV) is greenish-blue pigment and is reduction product of tetrapyrrolic core of heme by influence of the hemoxygenase (HO). The final product of this degradation is yellowish-brown pigment bilirubin (BR) which forms from BV thanks to the biliverdinreduktase (BVR). Normal and slightly raised level of bilirubin in plasma has cytoprotective effects whereas high levels are cytotoxic often. In severe unconjugated hyperbilirubinemia cases (newborn children) unconjugated bilirubin (UCB) accumulates in central nervous system (CNS) and causes bilirubin-induced neurologic dysfunction (BIND). Unfortunately there is a limitation for finding UCB pathophysiology caused by difficult determination of UCB content and distribution in tissues and biological fluids. So the main purpose of this thesis is to find and integrate isolated methods which will serve as the basis of finding bilirubin distribution. This progress would have a significant effect on studies of bilirubin neurotoxicity on newborn children. This method is based on radioactive labeling of UCB. Preferentially atom C 10 used for binding suitable functional group (thiols) because conformation of indicated bilirubin shouldn't change in this position. And then the isotope of iodine is incorporated into the molecule by nucleophilic substitution. So labeled UCB will be tested by MS, NMR. However results revealed that the addition of thiols on BV is not appropriate. Compounds created by this way are not stable and therefore it is not possible to mark them by suitable radioisotope. The only one possibility is the addition of other functional group which will be more resistant to external factors.

Key words: biliverdin, bilirubin, thiol, nucleophilic addition, hyperbilirubinemia, MS, tosylation

Poděkování

Děkuji mému školiteli, Doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc. za vedení mé bakalářské práce, za cenné podněty a pomoc. Dále děkuji RNDr. Martinu Štíchovi za měření MS spekter a Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za neomezené poskytování argonu. Také děkuji kolektivu pracovníků Katedry organické a jaderné chemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
Cíl bakalářské práce	9
1. Teoretická část	10
1. 1. Žlučová barviva.....	10
1. 1. 1. Obecná charakteristika.....	10
1. 1. 2. Choroby spojené s poruchami metabolismu bilirubinu.....	12
1. 1. 2. 1. <i>Nekonjugovaná hyperbilirubinemie</i>	13
1. 1. 2. 2. <i>Konjugovaná hyperbilirubinemie</i>	13
1. 1. 2. 3. <i>Směšená hyperbilirubinemie</i>	14
1. 2. Funkcionalizace v poloze 10.....	15
1. 3. Příprava tosyloxythiolu.....	19
1. 3. 1. Tosylace 2-hydroxyethylsulfidu.....	19
1. 3. 2. Redukce disulfid-ditosylátu na tosyloxythiol.....	20
1. 3. 2. 1. <i>Redukce LTBA</i>	20
1. 3. 2. 2. <i>Redukce Ph₃P</i>	20
1. 3. 2. 3. <i>Převedení disulfidu na BS</i>	20
1. 3. 2. 4. <i>Hydrolyza BS</i>	21
2. Experimentální část	22
2. 1. Použité materiály, přístroje.....	22
2. 1. 1. Materiály.....	22
2. 1. 2. Přístroje.....	22
2. 2. Seznam použitých chemikálií.....	22
2. 3. Plán provedení experimentů.....	23
2. 4. Postup práce.....	24
2. 4. 1. Syntéza konjugačního činidla.....	24

2. 4. 1. 1. Tosylace 2-hydroxyethyldisulfidu.....	24
2. 4. 1. 2. Redukce disulfid-ditosylátu.....	24
2. 4. 1. 2. 1. Redukce trifenyfosfinem.....	24
2. 4. 1. 2. 2. Redukce LTBA.....	25
2. 4. 1. 2. 3. Příprava Bunteho soli.....	26
2. 4. 1. 2. 4. Hydrolýza BS.....	26
2. 4. 2. Michaelova adice na BV.....	27
2. 4. 2. 1. Tosyloxythiol z redukce Ph_3P	27
2. 4. 2. 2. Tosyloxythiol z redukce LTBA.....	27
2. 4. 2. 3. Tosyloxythiol z hydrolýzy BS.....	28
2. 4. 2. 4. Adice 3- chlor -1- propanthiolu.....	28
2. 4. 2. 5. Adice disulfid-ditosylátu pomocí Rongalitu®.....	29
2. 4. 2. 6. Adice metkaproethanolu.....	30
3. Výsledky a diskuse.....	31
3. 1. Výtěžek tosylace 2- hydroxyethyldisulfidu.....	31
3. 2. Výsledky redukcí disulfid-ditosylátu.....	31
3. 2. 1. Redukce trifenyfosfinem.....	31
3. 2. 2. Redukce LTBA.....	31
3. 2. 3. Hydrolýza BS.....	31
3. 3. Výsledky Michaelovy adice.....	32
3. 3. 1. Adice nesyntetizovaných tosyloxythiolů.....	32
3. 3. 2. Adice komerčních thiolů.....	32
3. 3. 2. 1. 3- chlor -1- propanthiol.....	32
3. 3. 2. 2. Merkaptoethanol.....	32
3. 3. 3. Adice disulfid-ditosylátu pomocí Rongalitu®.....	32
4. Závěr.....	33
5. Seznam použité literatury.....	34

Seznam zkratek

BIND	bilirubinem vyvolaná neurologická dysfunkce
BR	bilirubin
BS	Bunteho sůl
BV	biliverdin
BVR	biliverdinreduktáza
CNS	centrální nervový systém
DMF	N,N – dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EI	ionizace proudem elektronů
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOAc	ethylacetát
Et ₃ N	triethylamin
LAH	lithium aluminium hydrid
LTBA	lithium tri-tert-butoxyaluminium hydrid
LTMA	trimethoxyaluminium hydrid lithný
Ph ₃ P	trifenylfosfin
R _F	retenční faktor (TLC)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TsCl	p-toluensulfonyl chlorid
UCB	nekonjugovaný bilirubin

Cíl bakalářské práce

Cílem této práce je vyrobit vhodné činidlo (tosyloxythiol), které bude schopné nukleofilní adice na žlučové barvivo biliverdin do polohy C10. Následně bude nukleofilní substitucí nahrazena tosyloxy- skupina za radioisotop jodu. Takto označená sloučenina bilirubinu by pomohla při výzkumu distribuce bilirubinu v lidském organismu. Tento pokrok by měl vliv na studium neurotoxicky bilirubinu u novorozeňat.

1. Teoretická část

1. 1. Žlučová barviva

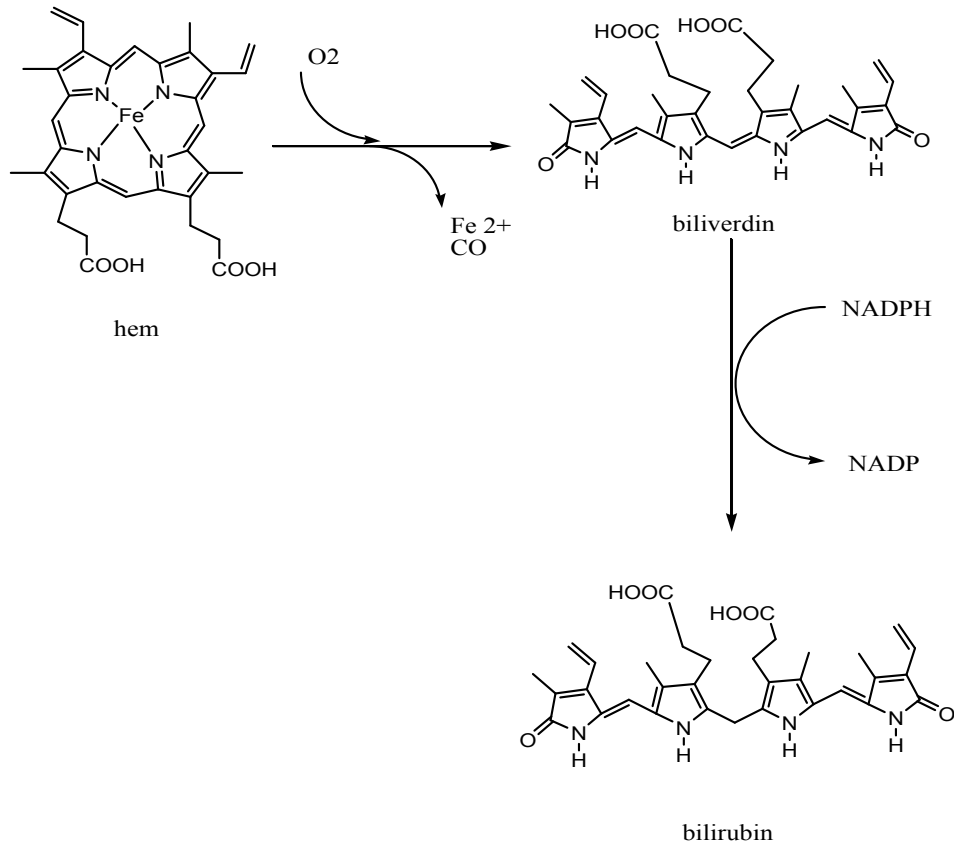
1. 1. 1. Obecná charakteristika

Žlučová barviva vznikají degradací hemu. Hem patří do skupiny tetrapyrolových sloučenin a je zastoupen jak v živočišné, tak v rostlinné říši. Kromě hemu a jeho produktů rozkladu - biliverdinu a bilirubinu, do této skupiny patří také chlorofyl a tzv. biliny (např. fykokyanobiliny). Tyto pigmenty slouží jako sběrače světla u sinic, některých řas a vyšších rostlin. Tetrapyroly mají velice rozmanité biologické účinky:

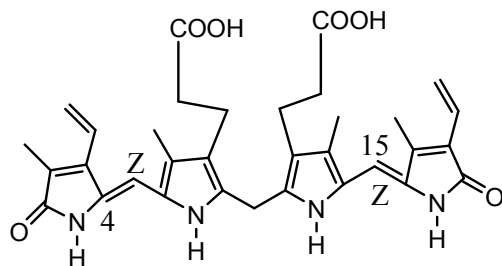
- **Tvorba energie** - vznik ATP v bakteriálních a eukaryotních buňkách
- **Antioxidační účinky** - tyto účinky se netýkají pouze biliverdinu a bilirubinu, ale také fykokyanobilinů obsažených v řasách
- **Produkce reaktivních forem kyslíku** - obrana proti patogenům
- **Pigmentace rostlin** - podílí se na maskování vajec, peří, tkání
- **Buněčná signalizace** - zprostředkovaná pomocí hemoxygenázy a biliverdinreduktázy

Biliverdin je zelenomodré žlučové barvivo, které vzniká rozkladem tetrapyrolového jádra hemu působením enzymu hemoxygenázy (HO). Při této katabolické reakci se uvolňuje dvojmocné železo a oxid uhelnatý (CO). Biliverdin se nevyskytuje u normálního séra, ale pouze u pacientů s biliární (žlučovou) obstrukcí, hepatitidou nebo podvýživou. Konečným produktem degradace hemu je žlutohnědé barvivo bilirubin, které vzniká redukcí biliverdinu enzymem biliverdinreduktázou (BVR) (obr. 1).^{1,2} BVR patří do skupiny fosfoproteinů. Fosforylace je základem pro aktivitu tohoto enzymu, díky kterému dochází k redukcí biliverdinu na bilirubin. Navíc se ukázalo, že BVR je autofosforylativní a fosforylace je reverzibilní, z čehož vyplývá, že produkty degradace hemu jsou v buňce regulovány.² U člověka jsou 2 typy bilirubinu - *konjugovaný* a *nekonjugovaný*. Konjugovaný se nachází ve žluči a je navázán na kyselinu glukuronovou, tzv. bisglukuronozylbilirubin. Toto uspořádání vede ke zvýšení jeho hydrofility a tudíž ke snadnějšímu vyloučení z těla. Druhým typem je bilirubin nekonjugovaný, který se vyskytuje v krvi. Je to nepolární, lineární tetrapyrolová sloučenina označovaná jako 4Z,15Z-bilirubin IX α (obr. 2). Díky této struktuře vznikají vodíkové můstky mezi karboxylovými skupinami a C=O a NH skupinami postranních pyrolových kruhů. Tato konformace vede k hydrofobnímu chování

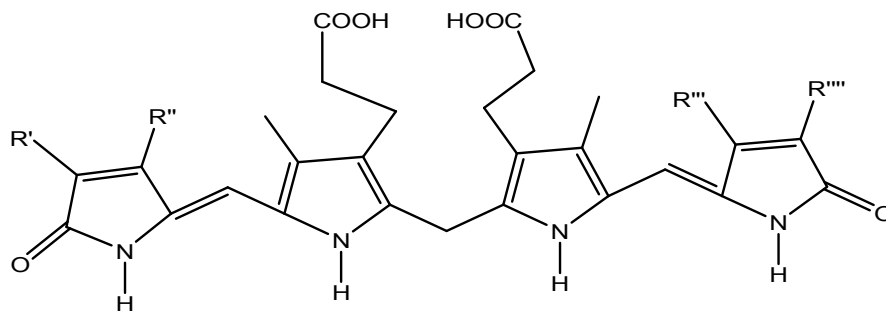
bilirubinu, a proto musí být v játrech konjugován s kyselinou glukuronovou. Nekonjugovaný bilirubin se v těle nachází v několika izomerech. Pokud se molekula bilirubinu rozštěpí vlivem kyselého pH na dvě poloviny a poté se opět spojí, rozeznáváme tři druhy konstitučních izomerů - bilirubin III α (A), bilirubin IX α (B), bilirubin XIII α (C) (obr. 3).³ Tuto skutečnost lze dokázat separací isomerů bilirubinu pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC).



Obr. 1 Katabolická dráha hemu



Obr.2 4Z,15Z-bilirubin IX α



	R'	R''	R'''	R''''
A	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₃	CH=CH ₂
B	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂
C	CH ₃	CH=CH ₂	CH=CH ₂	CH ₃

Obr. 3 Struktura bilirubinu III α (A), IX α (B), XIII α (C)

Při práci s bilirubinem se musí dát pozor na zpětnou oxidaci na biliverdin, kterou způsobuje vzdušný kyslík a také na vznik izomerů *E*, *Z*, které jsou spojeny s působením světla a kyselého pH.⁴

1. 1. 2. Choroby spojené s poruchami metabolismu bilirubinu

Jedna z hlavních nemocí je žloutenka (ikterus), která způsobuje nažloutlé zbarvení sliznic. Při ní dochází ke zvýšení hladiny bilirubinu, která nepřesahuje dvojnásobek fyziologické koncentrace (< 34 $\mu\text{mol/l}$). Žloutenka existuje ve třech typech - flavinová, rubínová a verdinová. Flavinová žloutenka je jasně žlutá, rubínová má barvu do červena a většinou se jedná o onemocnění jaterní tkáně a verdinová žloutenka je žlutozelená a jejím projevem je i tmavá moč.

Poruchy metabolismu bilirubinu:

1. Nekonjugovaná hyperbilirubinemie
2. Konjugovaná hyperbilirubinemie
3. Smíšená hyperbilirubinemie

1. 1. 2. 1. Nekonjugovaná hyperbilirubinémie

Tato porucha vzniká v jaterních mikrosomech ještě před konjugací bilirubinu s kyselinou glukuronovou. Příčinami může být nadprodukce bilirubinu, porucha vychytávání bilirubinu játry nebo porucha konjugace bilirubinu. Při nadprodukci bilirubinu jsou nejčastějšími příčinami hemolytické anemie. Tato porucha velmi často propuká v novorozeneckém období a způsobuje těžké neonatální žloutenky. U poruchy vychytávání bilirubinu játry jde o nedostatek transportních proteinů nebo o nezralost transportních funkcí jaterní buňky. Mnohem častější je porucha konjugace bilirubinu v játrech. Pokud jsou tyto defekty vrozené, projevuje se u postiženého Gilbertův syndrom nebo Criglerův-Najjarův syndrom I. a II. typu.¹ Mohou také vznikat onemocnění poháněná oxidativním stresem jako např. rakovina, autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění.^{5,6} Pokud je hladina bilirubinu v séru normální nebo mírně zvýšená, má cytoprotektivní účinky. Naopak vysoká hladina bilirubinu v plazmě a tkáních je cytotoxická. Při těžkém průběhu nekonjugované hyperbilirubinémie u novorozenců nebo pacientů s Crigler-Najjarovým syndromem I. typu, může nahromadění nekonjugovaného bilirubinu (UCB) v nervové soustavě způsobit bilirubinem vyvolanou neurologickou dysfunkci (BIND).⁷

1. 1. 2. 2. Konjugovaná hyperbilirubinémie

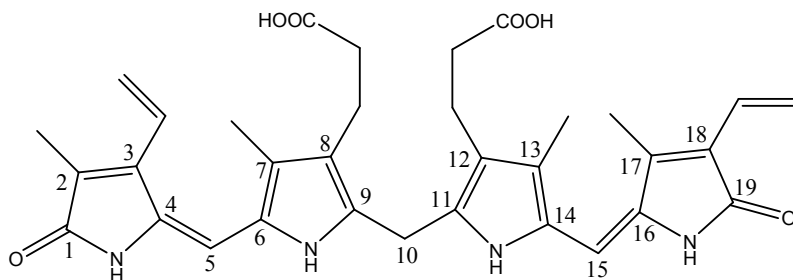
Nejčastějším typem žloutenek jsou právě konjugované hyperbilirubinémie. Ty vznikají při poruše metabolismu bilirubinu po jeho konjugaci s kyselinou glukuronovou v jaterních mikrosomech. Konjugovaná hyperbilirubinémie se dělí na dva základní typy - *familiární konjugovaná hyperbilirubinémie* a *získaná konjugovaná hyperbilirubinémie*. Získaná se projevuje alkoholovou hepatitidou, primární biliární cirhózou, nádory podjaterní krajiny, záněty žlučových cest. Pokud pacient trpí familiárním typem konjugované hyperbilirubinémie, projeví se u něj buď Rotorův syndrom nebo Dubinův-Johnsonův syndrom.¹

1. 1. 2. 3. Smíšená hyperbilirubinemie

Tato porucha vzniká při kombinaci dvou předchozích typů hyperbilirubinemií. Nejčastěji k tomu dochází při jaterní cirhóze či fibróze.¹

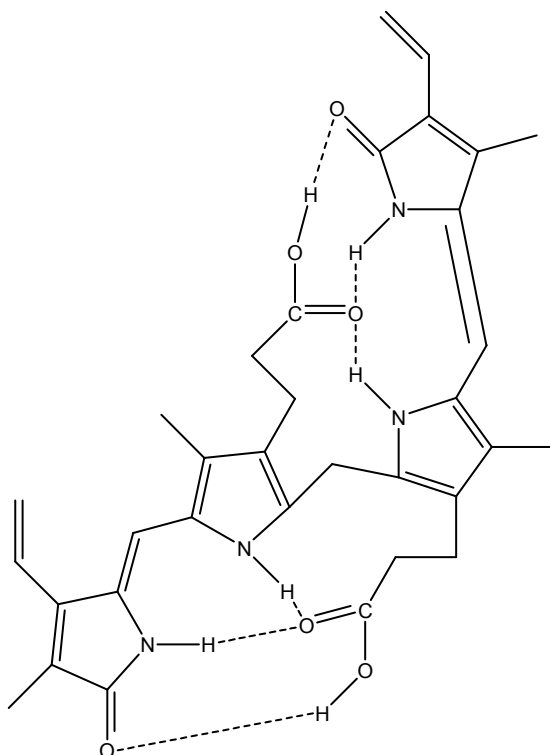
1. 2. Funkcionalizace v poloze 10

Aby nedošlo k porušení konformace bilirubinového skeletu (obr. 4), která má tvar pootevřené knihy (obr. 5), jevílo se nám vhodné zavést vhodnou funkční skupinu do polohy 10. Na ní potom provést značení vhodným radionuklidem. Jednou z možností se nabízela nukleofilní adice (Michael) na konjugovaný systém biliverdinu (obr. 6).

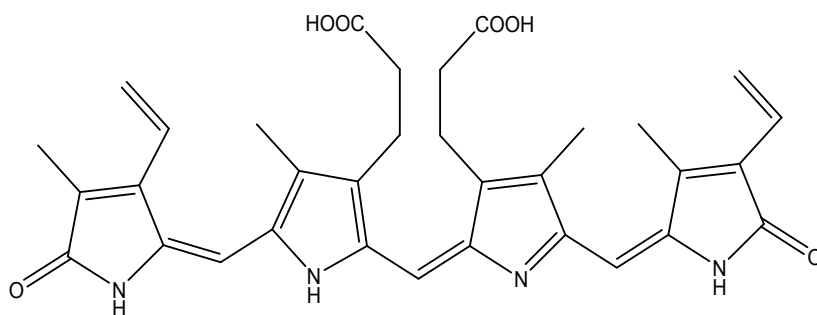


Obr. 4 Bilirubin IXa

Konformace je stabilizována 6 vodíkovými vazbami mezi karboxylovými skupinami a pyrrolovými dusíky.



Obr. 5 Ridge tile



Obr. 6 Biliverdin IXa

Nukleofilní adice na verdinový skelet je popsána v několika publikacích. Reakce je vratná a rovnováha je obvykle posunuta významně na stranu výchozích látek. Proto je třeba použít velkého nadbytku nukleofilního činidla. Reakce byla podrobně studována Falkem a spol.⁸ na biliverdinu (schéma 1) s různými nukleofily, jako aminy, thioly, C-kyseliny (nitromethan, acetocetan ethylnatý, acetylaceton, kyanovodík). Autoři produkty neizolovali, reakce studovali spektroskopicky.

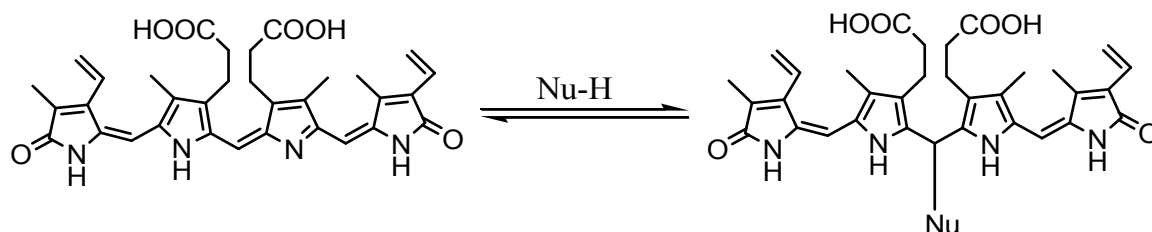


Schéma 1

Výjimkou je reakce s kyanidem draselným, která probíhá formálně jako nukleofilní substituce za vzniku 10-kyanobiliverdinu (schéma 2)⁹, ale samozřejmým meziproductem je adukt, který je následně dehydrogenován.

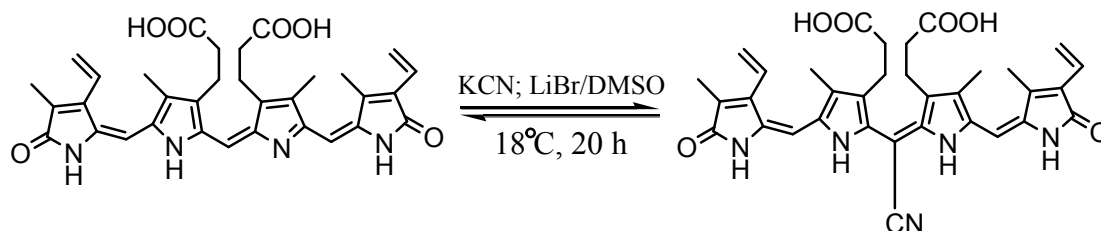


Schéma 2

Produkt byl izolován ve výtěžku 95 % a charakterizován NMR a MS. Otázkou je, co bylo oxidačním činidlem, mohl jim být DMSO.

Na biliverdin IX α byly adovány různé thioly (thiooctová kyselina, methanthiol, merkaptooctová kyselina, cystein, glutation aj.). Některé produkty byly izolovány a charakterizovány. Zde je reakce též rovnovážná a pro dosažení dobrého výtěžku je třeba vzít velký nadbytek nukleofilu (schéma 3)⁴.

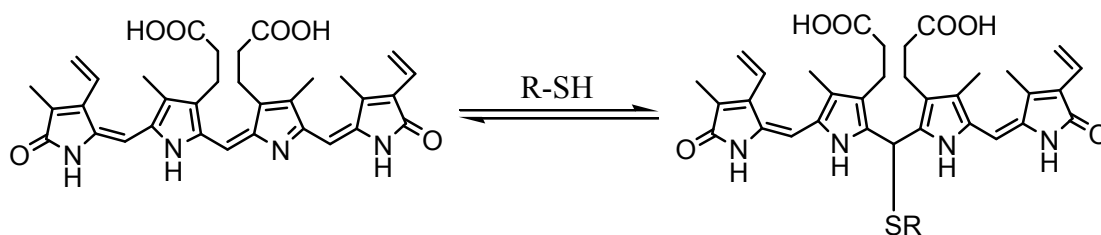


Schéma 3

Další možnou reakcí je adice NaHSO₃/ KHSO₃ za vzniku tzv. ranarubinu (bilirubin -10- sulfonát sodný). Je opět potřeba vzít velký nadbytek nukleofilního činidla (schéma 4)¹⁰.

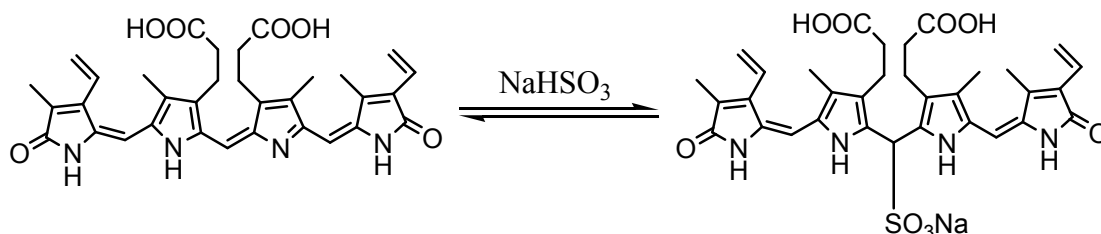


Schéma 4

Zvláštním případem nukleofilní adice je, vzhledem k mechanismu, redukce poloh 9,10 pomocí hydridů (NaBH₄). Průběh je složitý, avšak při této nukleofilní adici se hydridy chovají jako donory hydridového iontu (schéma 5).¹¹

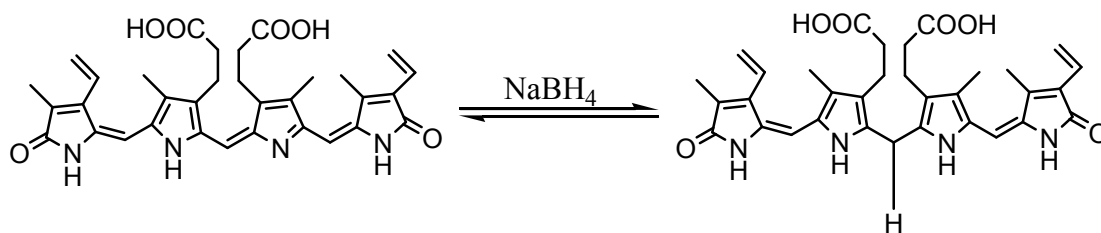


Schéma 5

Pokud bychom měli k dispozici pouze disulfid a nechtěli bychom se zdržovat jeho redukcí na thiol, naskytuje se zde možnost Michaelovy adice disulfidu na biliverdin pomocí Rongalitu® (formaldehyd sulfoxylát sodný), který štěpí disulfid na thiol.¹² (schéma 6)

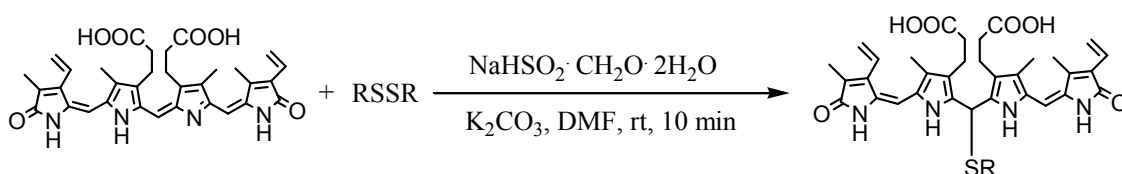


Schéma 6

Dalším typem adice thiolů je nukleofilní adice skupiny tosyloxythiol (TsO(CH₂)_nSH). Následně by tosyloxy- skupina mohla být vyměněna za izotop jodu nebo fluoru (schéma 7).

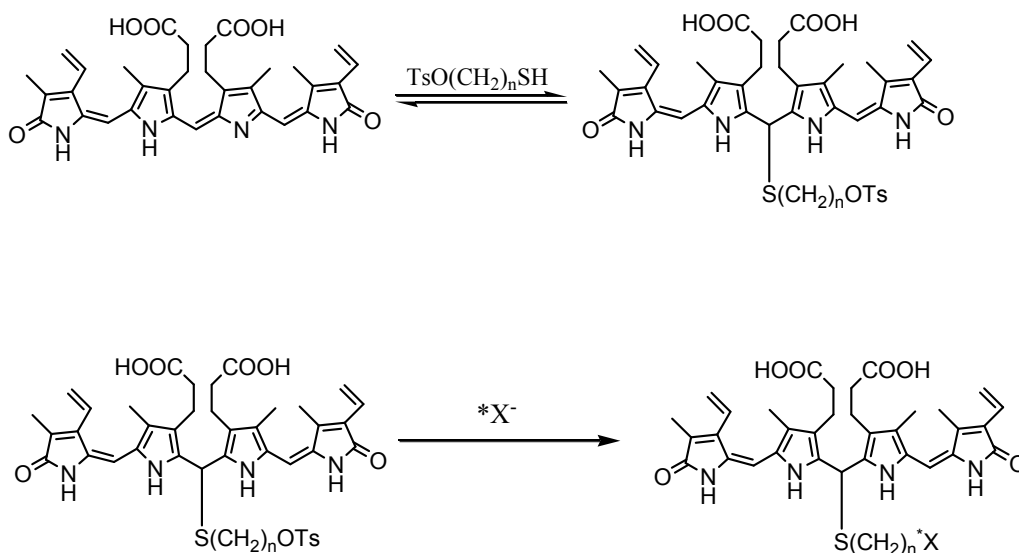


Schéma 7

1. 3. Příprava tosyloxythiolu

1. 3. 1. Tosylace 2- hydroxyethyldisulfidu

Tosylace (sulfonylace) alkoholů je běžná přeměna, která následně usnadňuje nukleofilní substituci.¹³ (schéma 8)

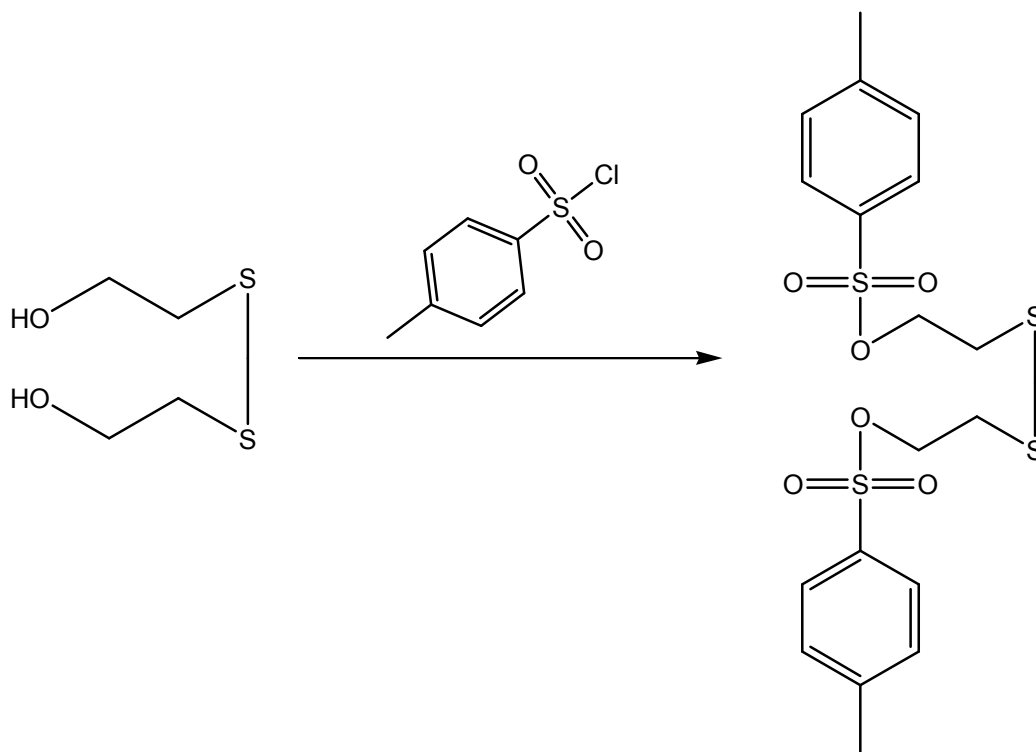


Schéma 8

Možností tosylování se nám nabízí hned několik. Jde však pouze o drobné změny v reakčních podmínkách. Jako báze se nejčastěji používá pyridin¹³ nebo triethylamin. Nejvhodnějším rozpouštědlem je chloroform, tetrahydrofuran (THF) nebo dichlormethan¹⁷.

- p- toluensulfonyl chlorid (TsCl), alkohol, pyridin, chloroform, teplota 0-5°C, míchání 1 hodinu¹⁴
- TsCl, alkohol, vodný NaOH, teplota 0-5°C, míchání 5 hodin¹⁵
- TsCl, alkohol, pyridin, chloroform, teplota 25°C, míchání 24 hodin¹⁶
- TsCl, alkohol, triethylamin¹⁷, tetrahydrofuran (THF), 25°C, míchání 24 hodin

1. 3. 2. Redukce disulfid-ditosylátu na tosyloxythiol

Je známo mnoho činidel, které dokážou selektivně zredukovat disulfidickou vazbu na thioly. Mezi ně patří například lithium aluminium hydrid (LAH), trimethoxyaluminumhydrid lithný (LTMA), hydrid hlinitý, triethylborohydrid lithný, borohydrid sodný¹⁸, triisopropoxyborohydrid draselný¹⁹. Avšak silnější redukční činidlo, jako je např. lithium aluminium hydrid (LAH) je méně vhodný díky své malé toleranci vůči funkčním skupinám. Mírnější činidlo, borohydrid sodný, je naopak málo rozpustný ve vhodných organických rozpouštědlech (tetrahydrofuran). Další vysoce selektivní redukční činidla, jako boran nebo disiamylboran, jsou zásadně inertní k disulfidické vazbě.²⁰ V mé práci jsem disulfidickou vazbu redukovala třemi různými způsoby.

1. 3. 2. 1. Redukce lithium tri-tert-butoxyaluminumhydridem (LTBA)

LTBA je mírným redukčním činidlem v organické syntéze, který redukuje disulfidy na odpovídající thioly. Tato reakce toleruje širokou škálu funkčních skupin např. halogen, nitro.²⁰ Redukce probíhá na reakční aparatuře, kde v baňce s postranním ramenem je disulfid v THF pod inertní atmosférou argonu a tomu je z přikapávačky po kapkách přidáván LTBA rozpuštěný v THF. Tato reakční směs je míchána po celou dobu vyvíjení vodíku, který je detekován bublinkami v olejové probublávačce, a potom ještě další hodinu.

1. 3. 2. 2. Redukce trifenyfosfinem

Trifenyfosfin je známé redukční činidlo, tato reakce má nevýhodu v heterogenním systému.²⁰ Roztok disulfidu a trifenyfosfinu ve směsi dioxanu, vody a pár kapek koncentrované kyseliny chlorovodíkové, je pod inertní atmosférou argonu míchán při teplotě 40°C. Vymizení disulfidu je sledováno pomocí TLC.²¹

1. 3. 2. 3. Převedení disulfidu na Bunteho sůl

Disulfidy se převádí na Bunteho sůl pomocí hydrogensířičitanu sodného nebo draselného. Produktem této reakce je Bunteho sůl a thiol, který se ovšem reoxiduje zpět na disulfid. Při prvních experimentech se myslelo, že za oxidaci může vzdušný kyslík. Když byl ale stejný výtěžek získán i při striktním dodržení inertní atmosféry, ukázalo se, že za

oxidací stojí hydrogensířičitan. Díky této skutečnosti přeměna disulfidu na Bunteho sůl zahrnuje dvě nezávislé reakce (schéma 9)²² :

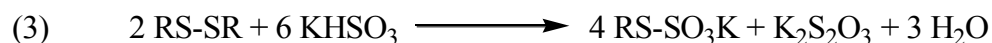
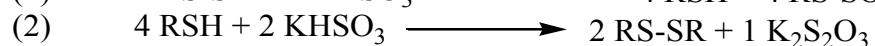
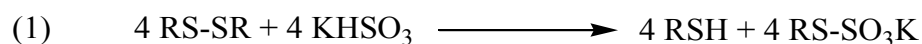
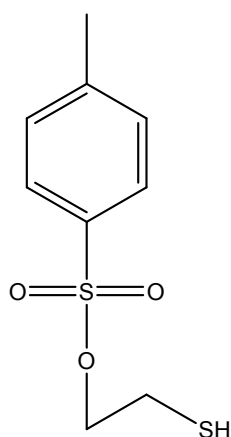


Schéma 9

Obě tyto reakce se musí objevit, pokud má být přeměna na Bunteho sůl úspěšná. Tyto dvě reakce jsou na sobě nezávislé. Thioly, které se reoxidují zpět na disulfidy, už dále s hydrogensířičitanem nereagují na Bunteho sůl.²²

1. 3. 2. 4. Hydrolýza Bunteho soli (BS)

Bylo zjištěno, že hydrolýzou BS se směsí etanolu a koncentrované kyseliny chlorovodíkové, vzniká odpovídající thiol. Tato reakční směs byla pod zpětným chladičem míchána hodinu. Poté byla směs ochlazená a zředěna vodou. Pevné krystalky NaHSO₄ přešly do roztoku a způsobily jeho mléčné zabarvení. Výsledný produkt (obr. 8) byl extrahován chloroformem.²³



Obr. 7 Tosyloxythiol

2. Experimentální část

2. 1. Použité materiály, přístroje

2. 1. 1. Materiály

TLC desky Silikagel F_{60/254}

TLC desky RP 18

97,5% Ar (Linde)

2. 1. 2. Přístroje

hmotnostní spektrometr Bruker Daltonics Esquire 3000 (ESI)

NMR spektrometr Varian Unity 400 Inova

UV lampa ($\lambda = 254$ nm)

analytické váhy Scaltec

2. 2. Seznam použitých chemikálií

Síran hořečnatý - bezvodý, čistý (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice), hydroxid sodný - čistý (Penta, Chrudim), uhličitan sodný - bezvodý, p.a. (Lachema, Brno), uhličitan draselný - bezvodý, p.a. (Lachema, Brno), pyrosiřičitan draselný (Lachema, Brno), thiosíran sodný pentahydrát – p.a. (Lachema, Brno), 2-merkapt ethanol - purris. p.a. (Fluka, Germany), triethylamin - 99% (Sigma-Aldrich, Německo), tetrahydrofuran - bezvodý, 99,9% (Sigma-Aldrich, Německo), acetonitril - p.a. (Veb Laborchemie Apolda), 2-hydroxyethylsulfid - 90% (Acros Organics), methanol - pro HPLC, trifénylfosfín - 99% (Sigma-Aldrich, Německo), tert-butanol- zur Synthese (Merck), lithium-tri-tert-butoxyaluminium hydrid - 97% (Sigma-Aldrich, Německo), thioacetát draselný - čistý, 98% (Sigma-Aldrich, Německo), 3-chlor-1-propanthiol - 98% (Sigma-Aldrich, Německo), 1,2-bis(4-toluensulfonyloxy)ethan, dimethylsulfoxid - čistý, 99% (Sigma-Aldrich, Německo), N,N-dimethylformamid - purris, 99,5% (Fluka, Německo), hexan - p.a. (Merck), ethylacetát - p.a. (Merck), amoniak - p.a. 25%-27% (Penta, Chrudim), HCl – p.a. (Merck), biliverdin hydrochlorid - (Frontier Scientific), p-toluensulfonyl chlorid (Lachema, Brno).

2. 3. Plán provedení experimentů

Pro Michaelovu adici je třeba nasynthetizovat vhodné konjugační činidlo, které je následně adováno do polohy 10. Nejlepším řešením se jevil tosyloxythiol. Jeho tosyloxy skupina velice snadno podléhá nukleofilní substituci, díky které se do molekuly inkorporuje radioisotop jodu. Provedení experimentu znázorňuje následující schéma 10.

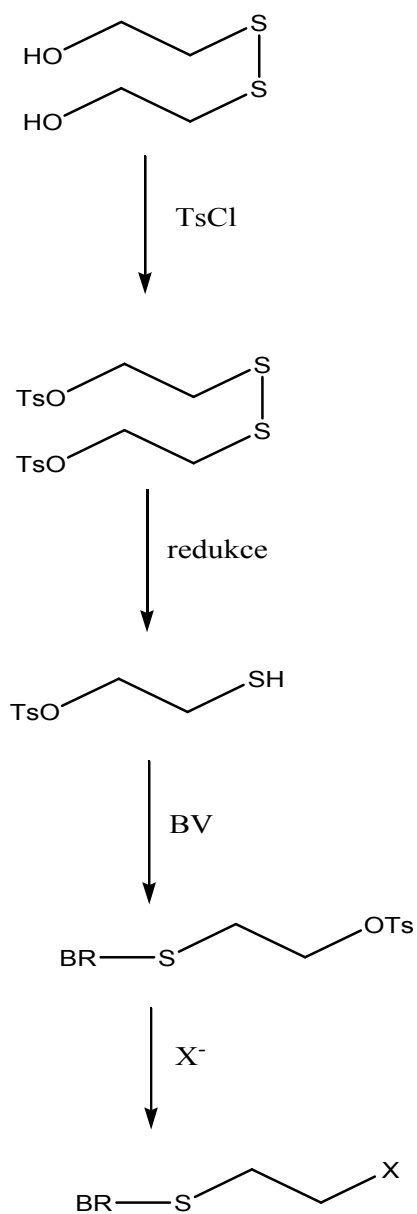


Schéma 10

2. 4. Postup práce

2. 4. 1. Syntéza konjugačního činidla

2. 4. 1. 1. *Tosylace 2- hydroxyethyldisulfidu*

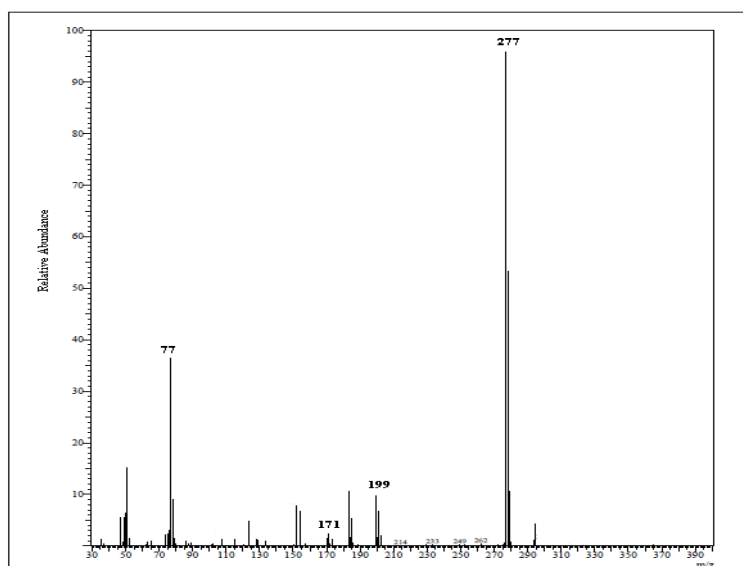
Do Ehrlenmayerovy baňky, opatřené magnetickým míchadlem, byl dán 2-hydroxyethyldisulfid (1 g, 6,5 mmol) rozpuštěn v 10 ml bezvodého THF. Jako báze byl do baňky přidán triethylamin (Et_3N) (1,8 ml, 1,3 g, 13 mmol). Postupně byl přikapáván tosylchlorid (TsCl) (2,5 g, 13 mmol, 2ekv.) v THF. Reakční směs byla míchána přes noc, dokud se nevysrážel veškerý triethylamin hydrochlorid. Pak byla směs přefiltrována a na vakuové odparce byl z filtrátu odpařen THF. K odparku byla přidána voda a vzniklá směs byla extrahována etherem. Po vysušení bezvodým síranem hořečnatým bylo rozpouštědlo přefiltrováno a odpařeno na vakuové odparce. Nažloutlé krystalky, ve výtěžku 2,12 g (106%), byly ještě překrystalovány z etanolu za vzniku bílých krystalků disulfid-ditosylátu (1,9 g, 95%).

TLC Silikagel (hexan/ EtOAc 3:1) $R_F = 0,59$

2. 4. 1. 2. *Redukce disulfid-ditosylátu*

2. 4. 1. 2. 1. *Redukce trifenylofosfinem*

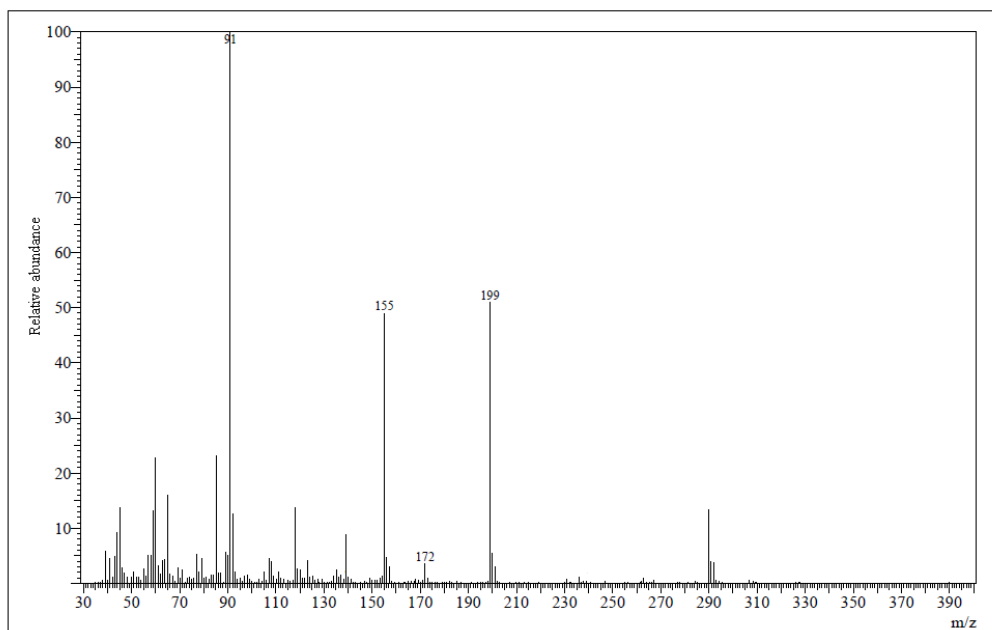
Roztok disulfid-ditosylátu (2,4 mmol) a Ph_3P (3,4 mmol) ve směsi 10 ml dioxanu a 3 ml H_2O se dvěma kapkami koncentrované HCl byl míchán pod atmosférou argonu 20 minut při 40 – 60°C. Vymizení disulfid-ditosylátu bylo sledováno pomocí TLC. Po skončení reakce byla směs zneutralizována potašem (K_2CO_3) a odpařena. Odparek byl dále extrahován tert-butylmethyletherem a vysušen bezvodým síranem hořečnatým. Po přefiltrování a odpaření rozpouštědla vznikly bílé krystalky. Analýza na MS.



Obr. 8 EI – MS (277 – Ph_3PO ; 199 – $\text{TsO}-(\text{CH}_2)_2$; 171 – TsO^- ; 77 – C_6H_5)

2. 4. 1. 2. 2. Redukce lithium-tri-tert-butoxyaluminohydridem (LTBA)

250 ml baňka s bočným ramenem byla opatřena magnetickým míchadlem a byla napojena na přívod argonu. Do baňky byl dán 1 g disulfid-ditosylátu (2,16 mmol) a 2 ml THF. Na bočné rameno byla nasazena příkapávačka s vyrovnávačem tlaku a s probublávačkou s minerálním olejem. Do příkapávačky bylo nalito 1,14 g LTBA (4,51 mmol) rozpuštěné v THF. LTBA se příkapávalo po dobu 15 minut a uvolněný vodík vytvářel bublinky v kádince s olejem. Po dokapání LTBA byla směs ještě další hodinu míchána, pak se po kapkách přidaly 2 ml vody, aby se zničil vzniklý hydrid. Výsledná směs byla okyselena kyselinou chlorovodíkovou tak, aby konečné pH bylo menší než 3. Poté byla oddělena vodná fáze od fáze organické a vodná byla extrahována etherem (3 x 50 ml). Spojený etherový extrakt byl dále promyt nasyceným solným roztokem (2 x 150 ml) a vysušen MgSO_4 . Vysušený roztok byl přefiltrován a odpařen – vznik světle žlutých krystalků. Analýza na MS.



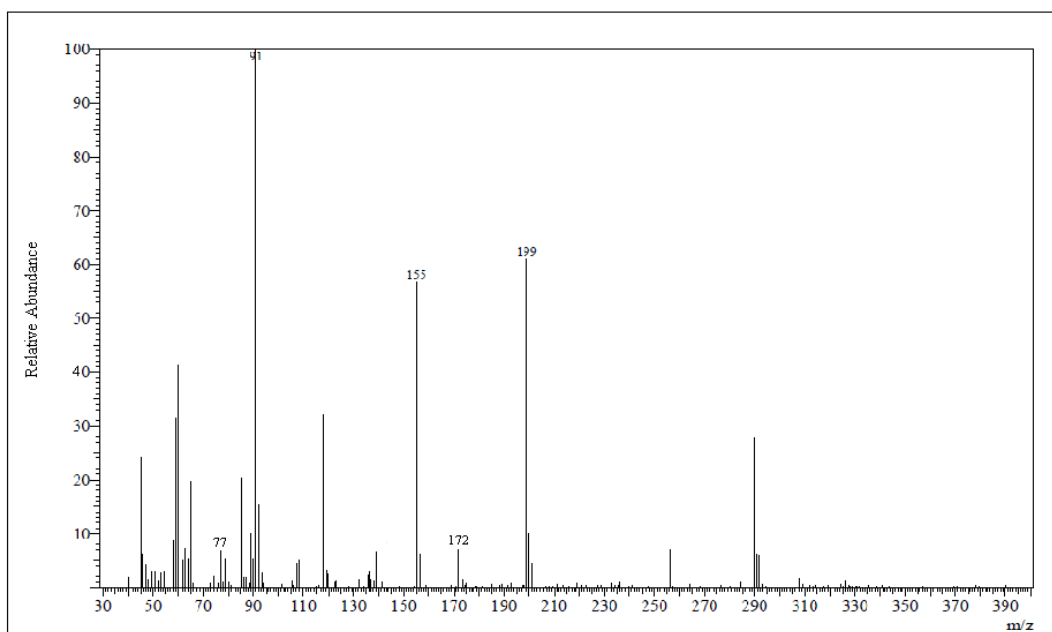
Obr. 9 EI – MS (199 – TsO-(CH₂)₂; 172 – TsOH; 155 – Ts⁻; 91 – C₇H₇)

2. 4. 1. 2. 3. Příprava Bunteho soli

K 1 g 1,2-bis(p-toluensulfonyloxy)ethanu (2,7 mmol, 5 ekv.) v baňce bylo přidáno 0,22 g pentahydrátu thiosíranu sodného (0,9 mmol, 1 ekv.). Jako rozpouštědlo byl použit 50% etanol (6 ml). Tato reakční směs byla zahřívána na 50°C a míchána 2-3 hod. Na TLC bylo průběžně kontrolováno vymizení thiosíranu. Po skončení reakce byl nezreagovaný 1,2-bis(4-toluensulfonyloxy)ethan vymyt etherem, ve kterém je rozpustný.

2. 4. 1. 2. 4. Hydrolýza Bunteho soli

1 g BS byl rozpuštěn ve 13 ml ethanolu a přidal se 1 ml koncentrované HCl, tato směs byla vařena pod zpětným chladičem 1 hodinu. Následně byla ochlazená a zředěna 27 ml vody. Pevná látka představovala NaHSO₄, která po přechodu do roztoku způsobila její mléčné zbarvení. Pak byla směs extrahována chloroformem a chloroformový extrakt byl poté vysušen a odpařen do sucha na vakuové odparce. Analýza na MS.



Obr. 10 EI – MS (199 – TsO-(CH₂)₂; 172 – TsOH; 155 – Ts⁻; 91 – C₇H₇; 77 – C₆H₅)

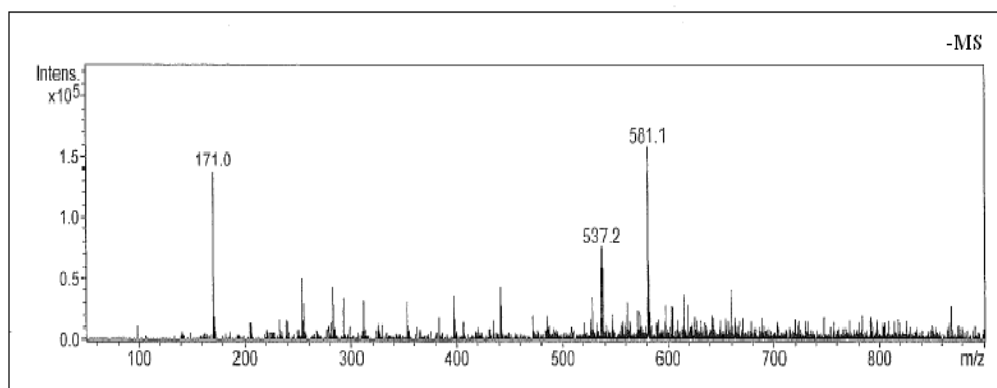
2. 4. 2. Michaelova adice na BV

2. 4. 2. 1. Tosyloxythiol z redukce trifenyfosfinem

K 6 mg (0,01 mmol) biliverdin hydrochloridu, rozpuštěném v methanolu, bylo přidáno pár krystalků potaše a 10 – 50 μl Et₃N pro udržení slabě alkalického prostředí. Tosyloxythiol byl do směsi přidán v pětinasobném nadbytku. Reakce proběhla za tmy pod atmosférou argonu. Surová reakční směs byla analyzována pomocí MS.

2. 4. 2. 2. Tosyloxythiol z redukce LTBA

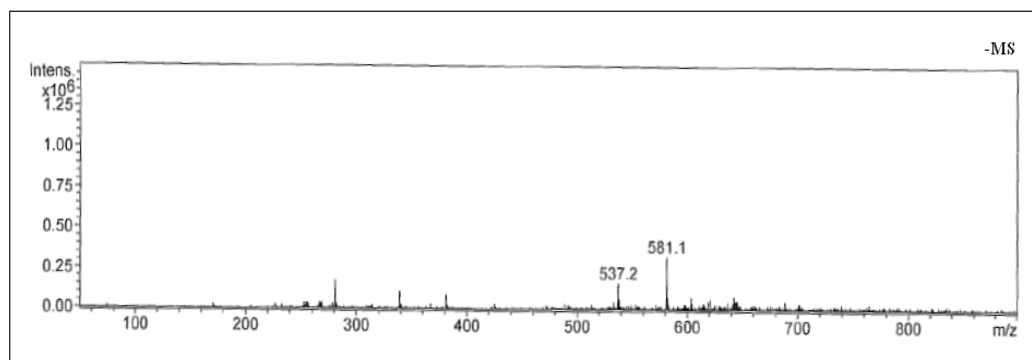
Postup viz. 4.2.1.



Obr. 11 ESI – MS (581,1 – biliverdin; 537,2 – 1. dekarboxylace biliverdinu; 171,0 – TsO⁻)

2. 4. 2. 3. Tosyloxythiol z hydrolýzy BS

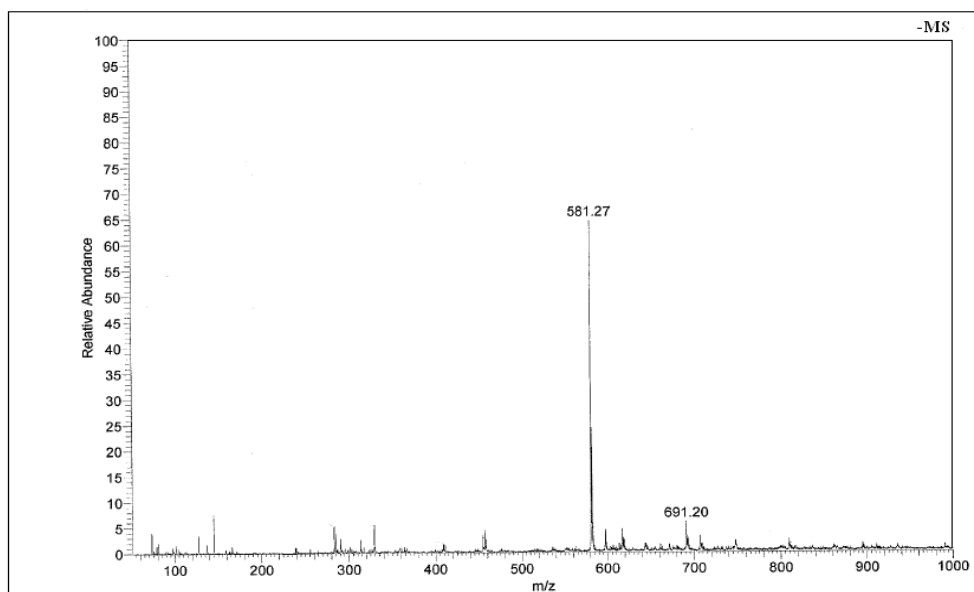
Postup viz. 4.2.1.



Obr. 12 ESI – MS (581,1 – biliverdin; 537,2 – 1 dekarboxylace biliverdinu)

2. 4. 2. 4. Adice 3- chlor -1- propanthiolu

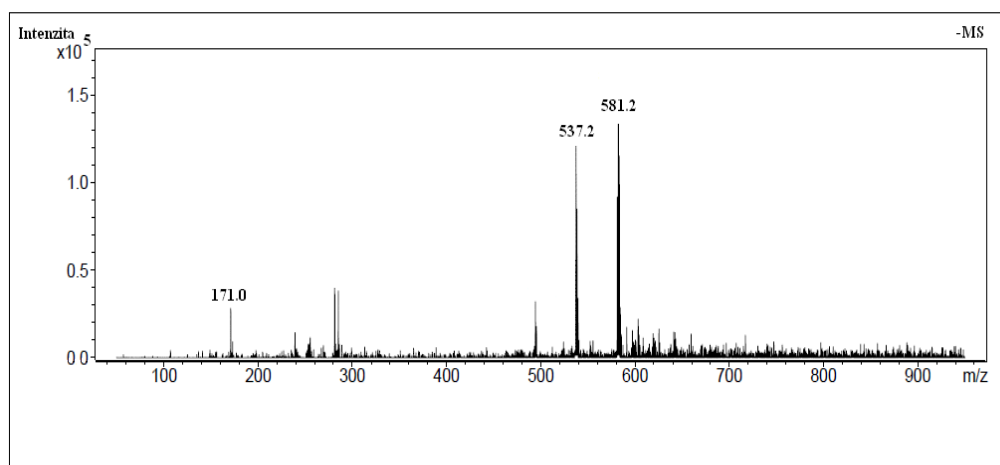
6 mg (0,01 mmol, 1 ekv.) Biliverdin hydrochloridu bylo rozpuštěno v EtOAc, přidán pětinasobek Et₃N (0,05 mmol, 5 ekv.) a 20μl 3-chlor-1-propanthiolu (0,20 mmol, 20 ekv.). Nutnost inertní atmosféry argonu. Výsledný produkt byl odpařen na vakuové odparce, vyfoukán proudem argonu a zanalyzován na MS.



Obr. 13 ESI – MS (691,20 – produkt; 581,27 – biliverdin)

2. 4. 2. 5. Adice disulfid-ditosylátu s pomocí Rongalitu®

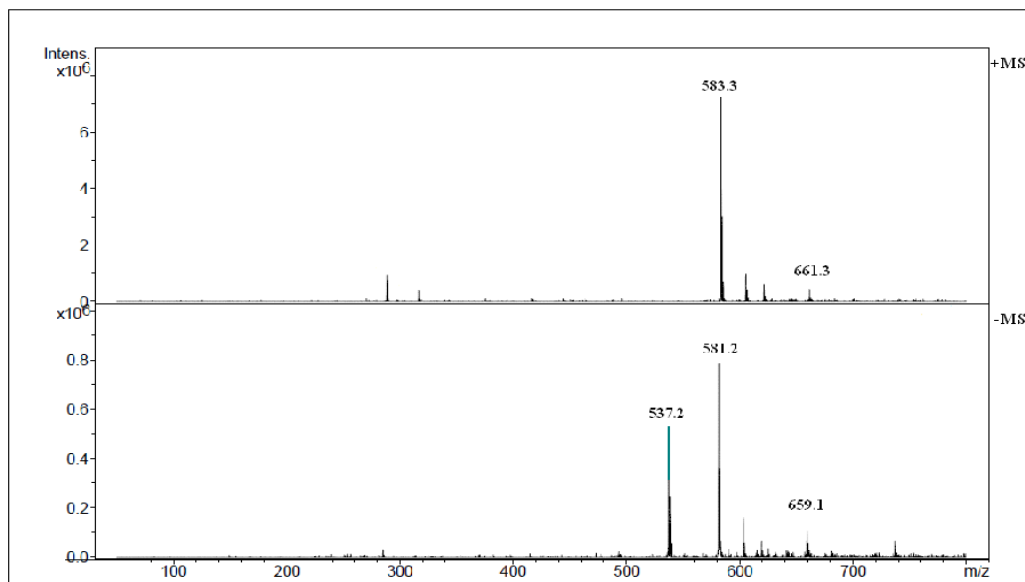
Reakční směs obsahovala 1 ekvivalent biliverdin hydrochloridu, 0,5 ekv. disulfid-ditosylátu, 4 ekv. Rongalitu® a 2 ekv. K_2CO_3 . Jako rozpouštědlo byl použit DMF (3 ml), reakce proběhla za laboratorní teploty a stálého míchání v inertní atmosféře argonu. Po 10 minutách míchání byla přidána voda a tato směs byla extrahována EtOAc. Organická fáze byla oddělena a vysušena $MgSO_4$. Po přefiltrování a odpaření rozpouštědla byl produkt analyzován na MS.



Obr. 14 ESI – MS (581,2 – biliverdin; 537,2 – 1. dekarboxylace biliverdinu; 171,0 – TsO)

2. 4. 2. 6. Adice merkptoethanolu

6 mg biliverdin hydrochloridu bylo rozpuštěno v EtOAc a přidáno 50 μ l Et₃N. Merkptoethanolu pro tuto reakci byl použit pětinasobný nadbytek (5 μ l). Výsledná surová směs byla analyzována na MS.



Obr. 15 ESI – MS: +MS (661,3 – produkt; 583,3 – biliverdin)

-MS (659,1 – produkt; 581,2 – biliverdin; 537,2 – 1. dekarboxylace biliverdinu)

3. Výsledky a diskuse

3. 1. Výtěžek tosylace 2- hydroxyethylsulfidu

Tosylace byla provedena v souladu s údaji uvedenými v literatuře. Za reakčních podmínek uvedených v experimentální části bylo dosaženo výborného výtěžku (95 %). Proto se dále nemusely tyto podmínky měnit.

3. 2. Výsledky redukcí disulfid-ditosylátu

Redukcí disulfid-ditosylátu měl být připraven thiol, který bude vhodným činidlem k nukleofilní adici na biliverdin. Tyto reakce byly provedeny za reakčních podmínek uvedených v literatuře a s různými redukčními činidly – trifenylofosfin, LTBA, BS.

3. 2. 1. Redukce trifenylofosfinem

Z hmotnostního spektra uvedeného v experimentální části je patrné, že výsledná surová směs obsahovala velký nadbytek vzniklého trifenylofosfinoxydu ($M = 277$). Po redukcí měl vzniknout tosyloxythiol ($M = 232$), takový pík ovšem ve spektru není viditelný. Ale jako důkaz, že redukce proběhla, je pík s hmotností 199, který představuje tosyloxythiol po odpadnutí $-SH$ skupiny.

3. 2. 2. Redukce LTBA

Výsledné spektrum po redukcí pomocí LTBA je obdobné jako u redukcí trifenylofosfinem. Největší zastoupení má ovšem látka C_7H_7 ($M = 91$), druhý nejvyšší pík patří již zmiňované látce ($M = 199$).

3. 2. 3. Hydrolýza BS

Hmotnostní spektrum je totožné se spektrem předchozí reakce (redukce LTBA), mírný rozdíl je pouze v poměrném zastoupení analyzovaných látek.

3. 3. Výsledky Michaelovy adice

Adice na biliverdin byla provedena s několika látkami – syntetizovanými tosyloxythioly a komerčními thioly. Práce a analýza s výslednými adukty byla velmi náročná pro jejich malou stabilitu.

3. 3. 1. Adice syntetizovaných tosyloxythiolů

Nízká stabilita výsledných aduktů způsobila, že při analýze došlo k odpadnutí funkční skupiny, a proto je na hmotnostním spektru (záporný mód) pouze pík čistého biliverdinu ($M = 581$) a pík jeho prvního dekarboxylačního stupně ($M = 537$).

3. 3. 2. Adice komerčních thiolů

3. 3. 2. 1. 3- chlor -1- propanthiol

Na hmotnostním spektru v experimentální části je vidět, že výsledný produkt ($M = 691$) je přítomen, ovšem v minoritním zastoupení oproti čistému biliverdinu ($M = 581$). Není jasné, zda je výtěžek tak malý, nebo došlo k odštěpení $\text{Cl}(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ v MS přístroji.

3. 3. 2. 2. Merkaproethanol

Výsledný adukt je opět v minoritním zastoupení oproti čistému biliverdinu a jeho prvnímu dekarboxylačnímu stupni.

3. 3. 3. Adice disulfid-ditosylátu pomocí Rongalitu®

Tato metoda, kdy v jednom kroku proběhne jak redukce disulfid-ditosylátu, tak nukleofilní adice, se jevila velice výhodně. Avšak výsledné hmotnostní spektrum dokázalo pouze přítomnost čistého biliverdinu ($M = 581$), prvního dekarboxylačního stupně BV ($M = 537$) a TsO^- ($M = 171$).

4. Závěr

Byla připravena vhodná činidla obsahující thiolovou skupinu –SH (tosyloxythioly) pro nukleofilní adici na žlučové barvivo biliverdin. S těmito získanými konjugáty byly provedeny adiční reakce. Výsledné adukty měly být následně podrobeny nukleofilní substituci, kdy tosyloxy skupina měla být nahrazena radioisotopem jodu. Avšak při separaci aduktů ze surové reakční směsi docházelo k odpadnutí funkční skupiny navázané na C10 atomu biliverdinu. Tyto produkty adice vykazovaly velice malou stabilitu při separaci a analýze. Tudíž nemohly být dále značeny radioaktivním jodem.

Z této práce vyplývá, že nukleofilní adice thiolů na biliverdin není vhodná, protože stabilita vazby na barvivo přes síru není stabilní. Další možností, jak připravit značený bilirubin, se jeví adice nitromethanu nebo kyanidů. Touto variantou bych se ráda zabývala dále v diplomové práci.

5. Seznam použité literatury

- 1) Vítek L.: *Bilirubin a interní choroby*, **2009**, Grada.
- 2) Salim M., Brown – Kipphut B. A., Maines M. D.: *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 10929-10934.
- 3) McDonagh A. F., Assisi F.: *Febs Letters*, **1971**, 18.
- 4) Manitto P., Monti D.: *Experientia*, **1979**, 35.
- 5) Vítek L., Schwertner H. A.: *Adv. Clin. Chemistry*, **2007**, 43, 1-57.
- 6) Rigato I., Ostrow D., Tiribelli C.: *Trends in Mol. Medicine*, **2005**, 11, 277-283.
- 7) Calligaris and col.: *Ped. Res.*, **2007**, 62, 576-580.
- 8) Falk H., Müller N., Schlederer T.: *Monatsh. Chem.*, **1980**, 111, 159-175.
- 9) Falk H., Schlederer T.: *Monatsh. Chem.*, **1978**, 109, 1013.
- 10) Ma J. S., Yan F., Wang Ch. Q., Chen J. H.: *Chin. Chem. Letters*, **1990**, 1, 171-172.
- 11) McMurry J.: *Organická chemie*, **2007**, VUTIUM
- 12) Guo W., Lv G., Chen J., Gao W., Ding J., Wu H.: *Tetrahedron*, **2010**, 66, 2297-2300.
- 13) Kabalka G. W., Varma M., Varma R. S.: *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 2386-2388.
- 14) Julia M., Maumy M.: *Org. Synth.*, **1988**, Coll. Vol. 6, 586.
- 15) Brady B., Lynam N., O'Sullivan T., Ahern C., Darcy R.: *Org. Synth.*, **2004**, Coll. Vol. 10, 686.
- 16) LaMattina J. L., Suleske R. T.: *Org. Synth.*, **1990**, Coll. Vol. 7, 149.
- 17) Mosa F., Thirsk C., Vaultier M., Maw G., Whiting A.: *Org. Synth.*, **2008**, Coll. Vol. 85, 219-230.
- 18) D'Amico J. J.: *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 3436-3445.
- 19) Brown H. C., Nazer B., Cha J. S.: *Synthesis*, **1984**, 498.
- 20) Krishnamurthy S., Aimino D.: *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4458-4462.
- 21) Overmann L. E., Smoot J., Overmann J. D.: *Synthesis*, **1974**, 59.
- 22) Lecher Z. L., Hardy E. M.: *American Cyanamid Company*, **1955**, 20, 475-487.
- 23) Weiss U., Sokol S.: *Research Laboratory of Endo Products, Inc.*, **1950**, 72, 1687-1689.