

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**ESTUDIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS
DE BILIRRUBINA Y SUS DERIVADOS**

RICARDO JORGE CARDENAS PEREZ

Q U I M I C O

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS TESIS 1978
ASS M. 80 76
FECHA _____
PROC _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

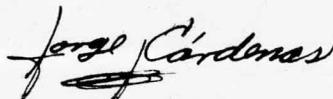
PRESIDENTE. Prof. JOSE ANTONIO NOGUEZ AMAYA.
VOCAL. " MA. CRISTINA ROCK FERNANDEZ.
SECRETARIO. " MANUEL SALMON SALAZAR.
1er. SUPLENTE. " ELOY VAZQUEZ LABASTIDA.
2do. SUPLENTE. " CECILIO ALVAREZ TOLEDANO.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE QUIMICA.

U. N. A. M.

SUSTENTANTE:



RICARDO JORGE CARDENAS PEREZ.

ASESOR DEL TEMA:



DR. MANUEL SALMON SALAZAR.

A MIS PADRES:

Guillermo Cárdenas Preciatt

Amalia Pérez de Cárdenas

A la Srita. T.F. y T.O.

Martha Del Moral

por su apoyo.

I N D I C E

Introducción	1
Generalidades	3
Bilirrubina y Derivados	16
Derivados Usados en Espectrometría de Masas ...	36
Bibliografía	62

INTRODUCCION

En el siglo XI una descripción Anglo-Sajona hace referencia a los síntomas de la cirrosis. - El pigmento amarillo al que se hace referencia fué aislado en forma cristalina por Virchow en 1847 y - llamado bilirrubina por Stadelcrantz en 1864. Su estructura fue determinada por Siedel y Fischer en 1933 y confirmada por síntesis total por Fischer y Plieninger en 1943, y más recientemente por Plieninger en 1972. Mucha de la química básica del pigmento fué - elucidada hace más de dos décadas, principalmente - por la escuela de Fischer. Hoy a pesar de que la bilirrubina es un desperdicio que no tiene ninguna utilidad práctica que no sea el valor de su diagnóstico, el interés científico en el pigmento no ha -- disminuido.

GENERALIDADES

BILIRRUBINA.

La bilirrubina es el producto final del catabolismo de la Heme. (Complejo ferroso del ácido -- 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil porfina-6,7-dipropionico). La destrucción normal de células rojas circulares, proporcionan del 80 al 90% de la producción de bilirrubina en los adultos. El catabolismo de 1g. de hemoglobina produce 34 mg. de bilirrubina. Los -- eritrocitos que envejecen son removidos de la circulación y destruidos en el sistema retículo endote--- lial, donde la hemoglobina es catabolizada y convertida en bilirrubina. (1).

La vía metabólica precisa para la conver-- sión de hemoglobina al pigmento biliar es todavía incierta. Fisher y sus colaboradores elucidaron la estructura química de la hemoglobina y de la bilirubina y mostraron su estrecha relación a una estructura de tetrapirrol. La bilirrubina es una cadena abierta de tetrapirrol. La formación de bilirrubina a partir de la hemoglobina involucra un proceso metabólico -- oxidativo, en el cual el puente del metino alfa se -- abre, se pierde un átomo de carbono y se forma una -- molécula de monóxido de carbono (Fig. 1) (1) (2).

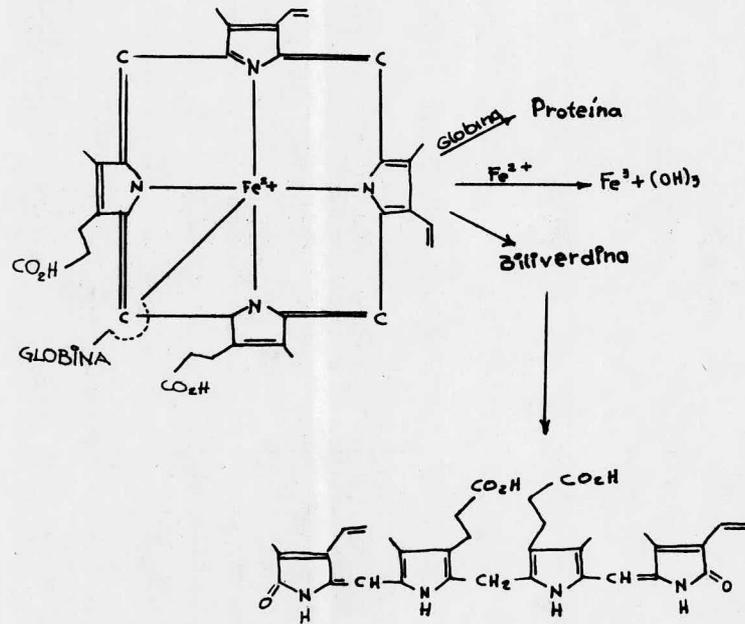


FIGURA I

La formación de monóxido de carbono a partir de la Heme en el hombre es esencialmente equimolar, un mol de CO se forma a partir del catabolismo de un mol de Heme.

El primer pigmento biliar se forma en el sistema retículo endotelial por oxidación de la hemoglobina, con pérdida de un átomo de carbono es la biliverdina.

La biliverdina es reducida por NADPH y -- una enzima reductora. La reacción inicial requiere la presencia de fierro en el anillo de la porfirina lo cual indica que la ruptura del puente metino es antes de ser removida de la globina y el hierro.

Una vez que la bilirrubina deja el sistema retículo endotelial es transportada en el plasma, estrechamente ligada a la albúmina. A pesar de esta estrecha ligadura, las células del parénquima del hígado tienen una selectiva y eficiente capacidad para remover la bilirrubina no conjugada, y otros aniones orgánicos del plasma.

Después de uno o dos minutos de inyectada una bilirrubina radioactiva en una rata, el 50% de la dosis es eliminada del plasma. En el hombre, una eliminación parecida toma alrededor de 18 minutos.

La concentración de bilirrubina en el plasma normalmente se determina por análisis espectrofotométrico de los derivados obtenidos por copulación del ácido sulfanílico diazoado. En 1916 Van Der Bergh y Muller observaron que en suero de pacientes con ictericia obstructiva dá inmediatamente una coloración roja con ácido sulfanílico diazoado (reactivo directo de bilirrubina), mientras que en pacientes con ictericia hemolítica, era necesario agregar alcohol antes que la reacción de copulación pudiera efectuarse (reactivo indirecto de bilirrubina).

No fué hasta 1956, sin embargo, que se demostró la diferencia entre los dos pigmentos. El reactivo directo del pigmento biliar fué identificado como un conjugado de bilirrubina, el cual es soluble en agua, mientras que el reactivo indirecto de bilirrubina no conjugada es insoluble en solución acuosa, pero altamente soluble en lípidos.

La conjugación de bilirrubina para formar el glucorónido de bilirrubina es considerado como esencial para la excreción de bilirrubina, no obstante pequeñas cantidades de reactivo indirecto de bilirrubina pueden ser detectadas en la bilis. En ratas Gunn recibiendo fototerapia, cantidades relativamente altas de bilirrubina no conjugada y derivados so-

lubles en agua pueden ser encontrados en la bilis, lo cual sugiere que existen vías excretoras alternas.

La evidencia experimental sugiere que la conjugación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso de las células del hígado y es catalizado por un sistema enzimático, la bilirrubina - glucoronil transferasa, induciendo la formación de ambos monoglucoronidos y diglucoronido así como -- otros conjugados, tales como los sulfatos.

Después de la conjugación, la bilirrubina es rápidamente excretada por las células del hígado.

La bilirrubina conjugada no es reabsorbida en el intestino. En el adulto, la bilirrubina - conjugada es considerablemente reducida a urobilina en el intestino por bacterias y hay una mínima - circulación enterohepática de la bilirrubina.

En casos de altos niveles de bilirrubina no conjugada en el plasma y una pobre excreción, - existirá un gradiente de bilirrubina no conjugada - del plasma a la cavidad intestinal. En éstas ocasiones es posible que cantidades apreciables de bilirrubina no conjugada pueda ser quitada por difusión de la pared intestinal.

En la Fig. 2, se ilustra el metabolismo del pigmento biliar en el recién nacido.

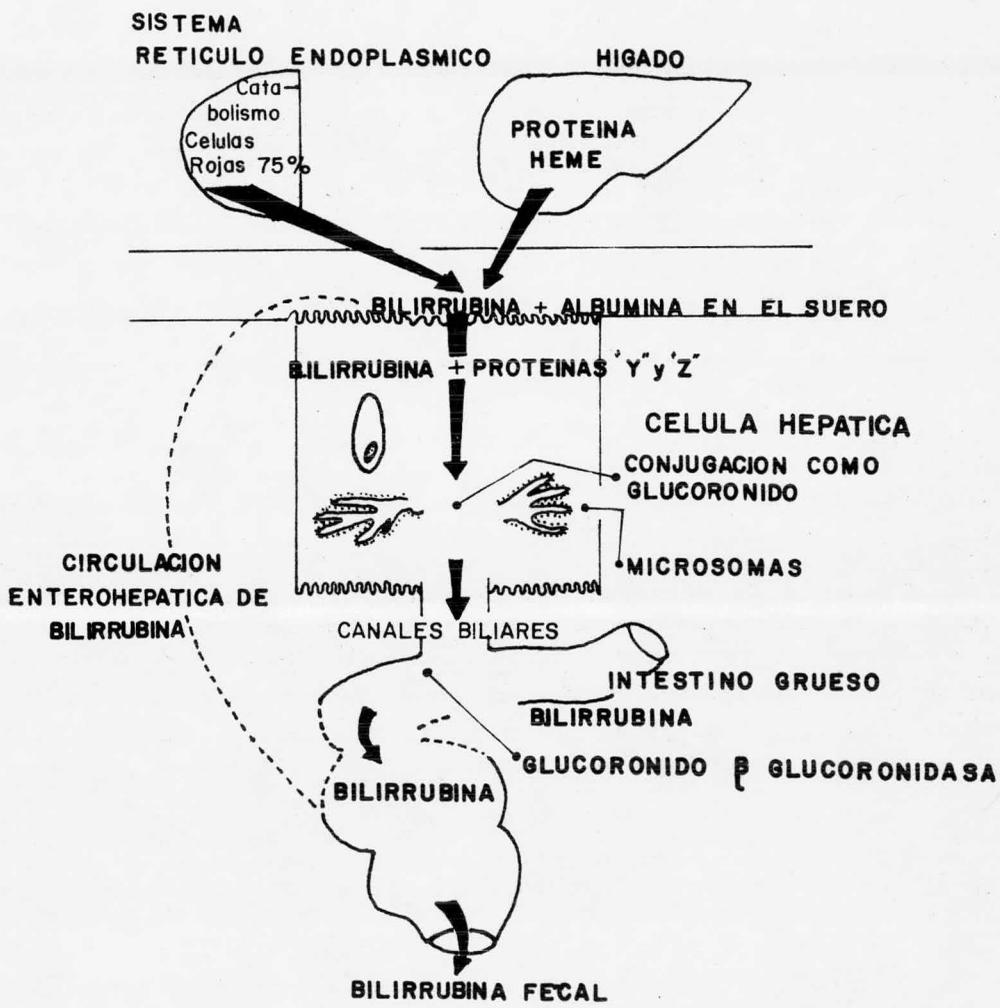


FIGURA 2

La mayoría de los niños recién nacidos, manifiestan una hiperbilirrubinemia no conjugada transitoria, la cual en muchos casos no puede ser atribuída a la reducida supervivencia de células rojas o a una sobreproducción del pigmento. Mientras que la hiperbilirrubinemia es solo de menor grado, ocasionalmente se descubre una marcada elevación de bilirubina no conjugada en el plasma, particularmente en los bebés prematuros. La máxima concentración de bilirrubina en el plasma generalmente se alcanza dentro de la primera semana después del nacimiento, y después los niveles del pigmento gradualmente regresan a lo normal.

Experimentos realizados in vitro indican -- que en muchas especies mamíferas, la actividad de -- UDP-glucoronil transferasa y la concentración de ácido UDP-Glucorónico en el hígado del feto son más reducidas, comparado con los valores en los adultos. Los mecanismos de conjugación gradualmente maduran -- durante los primeros días a las dos semanas del nacimiento. Se ha concluído, por lo tanto, que la ictericia fisiológica del recién nacido resulta de una incapacidad del hígado neonatal para formar glucorónido de bilirrubina a una velocidad suficiente para -- igualar la producción de bilirrubina. Investigacio--

nes directas del metabolismo de la bilirrubina en fetos y niños recién nacidos, sugiere que este concepto puede ser simplificado. Se encontró que además de una conjugación deteriorada, un defecto excretorio puede jugar un papel para contribuir en la evolución de la ictericia fisiológica.

La bilirrubina no conjugada es soluble en cloroformo, pero escasamente soluble en agua. En solución acuosa a pH levemente alcalino, la precipitación del pigmento puede ser inducida por una ligera reducción en el pH o en la concentración iónica, y por la presencia de trazas contaminantes. Soluciones acuosas del pigmento son estabilizadas por la presencia de taurocolato. Realmente la bilis contiene una concentración suficiente de sales biliares para mantener la bilirrubina en solución, aún si no estuviese conjugada. No obstante el cambio más obvio que se lleva a cabo por acoplamiento del pigmento con el ácido glucorónico, es la transformación de la molécula de bilirrubina soluble en lípidos a un conjugado soluble en agua. Parece razonable el asumir que la estabilidad de la solución bilirrubina-ácido biliar es aumentada por conjugación, reduciendo de éste modo la tendencia de precipitación y formación de los cálculos biliares.

La excreción biliar efectiva es dependiente de mecanismos que previenen o limitan la reabsorción intestinal. En estudios con el pigmento marcado con carbono 14 en hombres y ratas, se encontró que la bilirrubina no conjugada, es fácilmente absorbida en el intestino grueso. Por lo tanto, si la bilirrubina no conjugada fuese excretada inalterada en la bilis, la eficiencia de excreción del pigmento sería disminuída por reabsorción y circulación enterohepática del pigmento. Este proceso sería aún más exagerado por absorción de bilirrubina no conjugada de la vesícula biliar. Substancias orgánicas polares con peso molecular superior de 200, no son transferidas en un grado significativo a través de membranas biológicas lipoides a no ser que sean transportadas por un mecanismo activo. De éste modo, no es sorprendente encontrar que en contraste al pigmento no conjugado, el glucorónido de bilirrubina C-14, no es reabsorbido por el intestino. Un segundo efecto de la conjugación del glucorónido es la prevención de reabsorción intestinal de bilirrubina, el cual permite una eliminación eficiente del pigmento en los excrementos.

Finalmente la esterificación de bilirrubina con ácido glucorónico, parece ser un mecanismo ge

neral que facilita la excreción biliar de diversos ácidos orgánicos débiles. Característicamente pero no invariablemente, tales metabolitos aparecen en la bilis conjugados con moléculas polares más pequeñas. Estos conjugados con frecuencia muestran una configuración molecular polar no polar, son secretadas en la bilis a pesar del apreciable gradiente de concentración.

Algunos de éstos ácidos orgánicos parecen competir por ser transportados en la bilis y con estas bases ha sido sugerido que el mecanismo de excreción involucra transporte de membrana activo. Puede postularse que la conjugación con ácido glucorónico condiciona la molécula del pigmento para el acarreo de membrana. De tal modo permitiendo la secreción activa de bilirrubina a la bilis. Con esta consideración, es algo sorprendente que por lo menos un derivado tetrapirrólico de bilirrubina, el mesobilirrubinógeno (3) es excretado sin conjugación.

Estudios recientes han demostrado que a pesar de sus similitudes estructurales, el pigmento tetrapirrólico biliar puede diferenciarse debido a los enlaces internos de hidrógeno y a la formación de polímero. Por lo tanto es posible que la estructura molecular del mesobilirrubinógeno es apropiada pa

ra la excreción activa en la bilis, mientras que la molécula de bilirrubina debe ser químicamente modificada para condicionar el mecanismo de transporte. (2).

Con relación al estandar adulto, casi cada niño recién nacido revela ictericia (bilirrubina no conjugada en el suero, mayor de 2 mg. por 100 ml) durante la primera semana de vida.

Esta hiperbilirrubinemia es casi siempre considerada normal en los recién nacidos y ha sido llamada ictericia fisiológica, la cual puede ser definida, como una elevación de bilirrubina en el suero noexcediendo 12 mg. por 100 ml., en recién nacidos ó 15 mg. por 100 ml. en niños prematuros durante la primera semana de vida.

En varios casos, se ha enfocado la atención a diferentes mecanismos como posibles responsables de la ictericia fisiológica (1).

Siendo una combinación de factores, incluyendo la inmaduración del hígado y la corta supervivencia de los glóbulos rojos. Sin embargo, la ictericia de los recién nacidos a menudo es causada por una variedad de desórdenes como la incompatibilidad de sangre entre el feto y la madre e infecciones.

En altos niveles, la bilirrubina causa un

patrón de daños neurológicos conocidos como Kernicerus, o encefalopatía de bilirrubina. Este caso es caracterizado por el tenido del cerebro por bilirrubina, particularmente en el ganglio basal de niños en asociación con severos daños neurológicos (4).

Varios métodos de tratamiento han sido desarrollados para reducir el nivel de hiperbilirrubinemia.

Desde 1947, se ha usado ampliamente la -- transfusión para eliminar la bilirrubina. Administración de fenobarbital y agar, son algunas veces de -- ayuda. Más recientemente la aplicación de luz para -- degradar la bilirrubina ha llegado a ser el trata--- miento más aceptado (4).

BILIRRUBINA Y DERIVADOS

La bilirrubina tiene una estructura de metilenbispirrometeno, se fragmenta como es de esperarse de acuerdo a la estabilidad de los puentes metileno y metino.

Se ha obtenido el siguiente espectro de masas por introducción directa de la bilirrubina (Fig. 3).

m/e	%
585	15
584	50
301	14
300	41
299	100
288	13
287	19
286	95
241	14
239	14
226	45
224	18
223	12
210	20
163	14
145	12
110	55

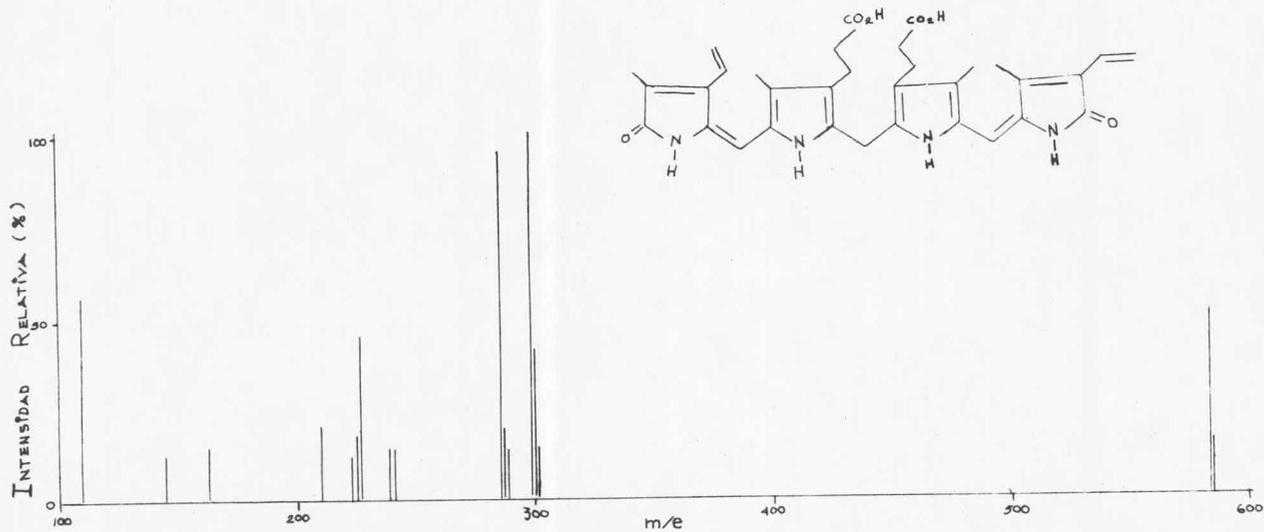


FIGURA 3

Estudios realizados sobre pirrometenos y pirrometanos (5), han sido de gran utilidad en la interpretación de la fragmentación de los pigmentos biliares.

Los tipos de fragmentación de los pirrometanos pueden clasificarse convenientemente en tres grupos principales: fragmentación en las cadenas -- unidas a los núcleos pirrólicos, fragmentación internuclear para dar fragmentos monopirrólicos y formación de fragmentos tricíclicos. La segmentación -- entre los dos núcleos regularmente es el proceso -- predominante, pero la fragmentación sobre las cadenas puede ser predominante, especialmente si varios grupos carbonilos se encuentran presente.

Considerando que en el espectro de masas de la bilirrubina (Fig. 3), los 2 iones fragmento -- principales provienen de la fragmentación entre los núcleos, el ión de m/e 299 por ser nón y tener dos nitrógenos sufre una fragmentación simple sin transposición, el ión de m/e 286 por ser par y tener dos nitrógenos necesariamente debe involucrar la transposición y se puede explicar por el mecanismo de la Fig. 4.

Otro mecanismo que se propuso fué el de -- la migración del átomo de Hidrógeno del NH de un --

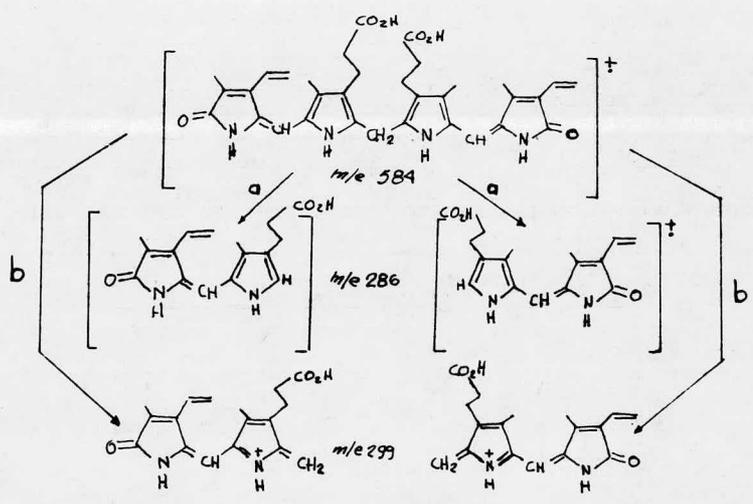
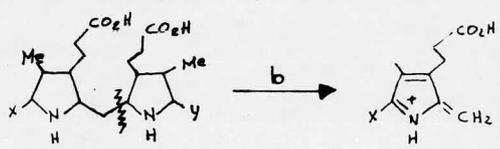
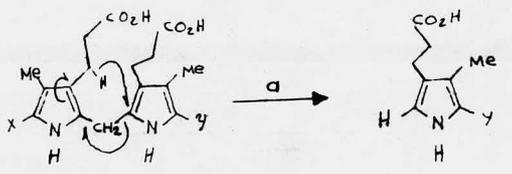


FIGURA 4

anillo al otro, pero en experimentos con pirrometanos N-dideuterados, se observó que el deuterio es retenido en el fragmento que contiene el puente del metileno.

Los fragmentos principales son pirrometenos. La característica más notable del espectro de los pirrometenos es su gran intensidad relativa de la línea molecular, esto se refleja de la gran estabilidad del sistema dipirrólico completamente conjugado. En general, la fragmentación en las cadenas laterales predomina sobre la ruptura en el puente metino.

El espectro de masas de los pigmentos biliares dipirrólicos de los productos de degradación muestran que la ruptura beta de la cadena del pro-- pionato es la fragmentación predominante y el ión - molecular es realmente intenso. Los iones fragmento producidos de la ruptura internuclear, a menudo son muy déviles.

Se puede usar como modelo el espectro de masas del compuesto análogo al ión m/e 286 obtenido de la fractura de la bilirrubina, pero teniendo un grupo etilo en lugar del vinilo, que tiene el si--- guiente espectro de masas obtenido por introducción directa (Fig. 5).

m/e	%
289	17
288	100
273	22
259	47
313	10
199	14

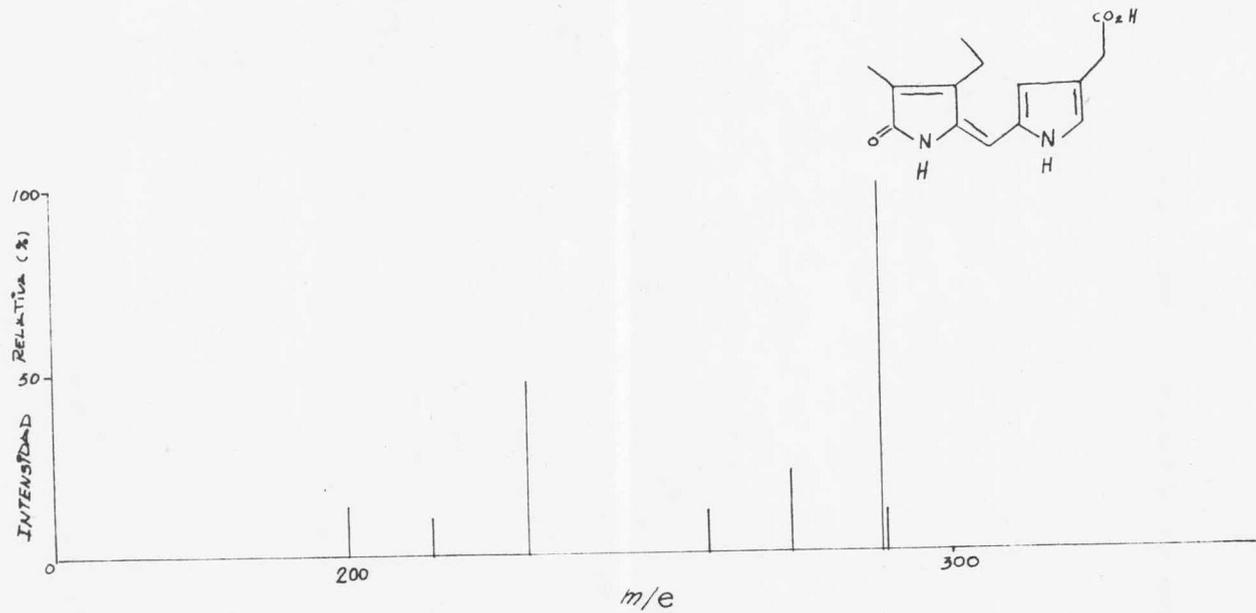


FIGURA 5

Mostrando iones metaestables: 259 (288-273)
233 (288-259), 205 (288-243), 182 (288-229).

Con el uso de los iones metaestables se observa un M-15, de la pérdida de un metilo extraído del grupo etilo, la pérdida de un etilo, la pérdida de un carboxilo y la pérdida de un $\text{CH}_2\text{-COOH}$, la cual tiene el ión más intenso después del pico base del espectro que es el del ión molecular.

En el espectro de masas de la bilirrubina, el ión molecular m/e 584 es relativamente grande comparado con los obtenidos en otros estudios (6).

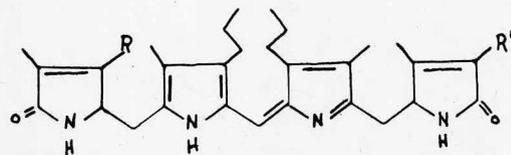
La mayor parte de los otros picos de menor intensidad pueden ser derivados de la fragmentación de 2 picos más intensos en el espectro correspondientes a los fragmentos m/e 286 y m/e 299, pero el origen del ión m/e 110 no es conocido.

Para los iones de mayor intensidad existen 2 isómeros para cada uno, que contribuyen en un solo pico en el espectro, dependiendo de la manera que ocurre la ruptura y parece no haber razón para suponer que una pueda ser más favorecida que la otra (5).

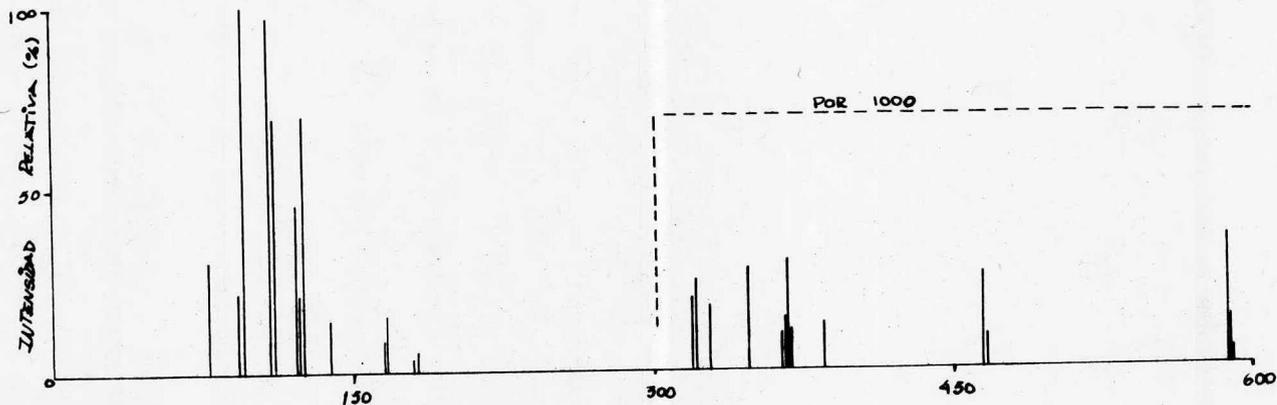
La estructura del pigmento biliar, d-urobilina, que es un metabolito de la bilirrubina todavía es incierta, pero parece ser que por un acuerdo general queda mejor presentada como uno u otro de los dos análogos tetrahidro de la bilirrubina.

Se ha obtenido el siguiente espectro de masas para el derivado d-urobilina por introducción directa, y solo reportan los picos muy intensos abajo de m/e 300 (Fig. 6), (5).

m/e	%	m/e	%
590	5	181	6 000
589	14	180	3 600
588	36	167	15 000
467	9	166	9 600
466	26	139	14 000
386	13	125	70 000
369	11	124	21 000
368	30	122	46 000
366	14	110	69 000
364	10	108	97 000
348	28	95	100 000
328	18	93	23 000
322	25	82	31 000
320	20		



- a) R=v, R'=et, e'
 b) R=et, R'=v



m/e
 FIGURA 6

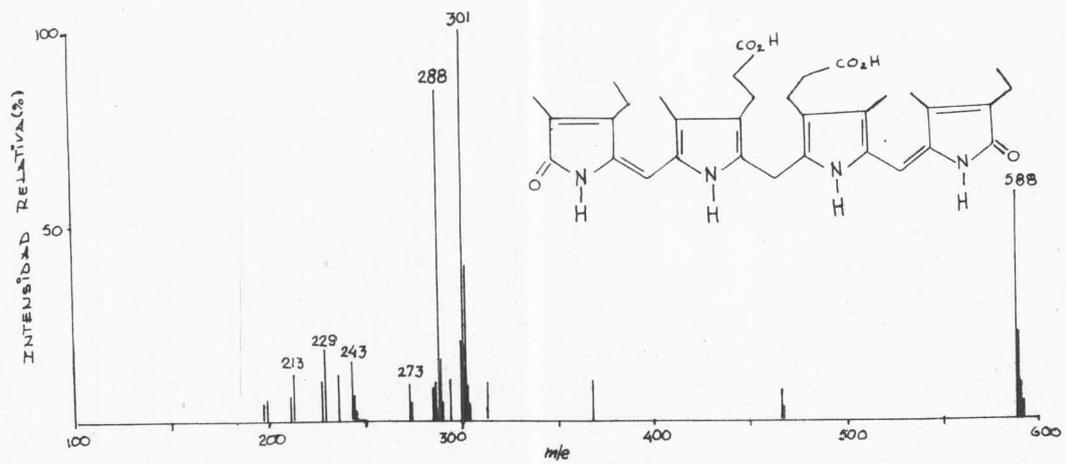
Los resultados de la espectrometría de masas para las estructuras antes propuestas soportan esta suposición. Para el ión molecular en m/e 588 - (10% del pico base) y un ión en m/e 466 (ausente en el espectro de la bilirrubina), se puede suponer -- que proviene de la fisión de uno de los anillos (de aquel que todavía lleva un sustituyente vinilo). -- Los iones m/e 288 y 301, son posiblemente los análogos etilo del vinilo substituído de los iones m/e - 286 y 299 observados en el espectro de la bilirrubina, pero la estructura exacta del otro fragmento dipirrólico intenso en m/e 302 es menos evidente.

Es claro que el ión m/e 466, puede ser -- considerado por la ruptura de una de las uniones -- del puente metileno, pero la formación del ión dipirrólico antes mencionado debe involucrar la fisión de una unión mucho más fuerte del metino central, ó alternativamente una amplia transposición de hidrógenos. Es probablemente significativo en este respecto que los fragmentos monopirrólicos m/e 181, 180, - 167, 166, 125, 122, 110, 108, etc., son mucho más intensos que en la bilirrubina, y los fragmentos correspondientes a los dos anillos centrales (los cuales están unidos por un puente metino y del cual se pudiera esperar que fuese relativamente estable) -- son virtualmente inexistentes.

La mesobilirrubina es un derivado de la bilirrubina que se obtiene por reducción de los grupos vinilo. Se puede obtener por hidrogenación a partir de la bilirrubina usando paladio en carbón. Los hidrógenos se adicionan de dos en dos, primero en el grupo vinilo-exo y posteriormente en el grupo vinilo-endo para dar la mesobilirrubina. La mesobilirrubina puede ser un metabolito de la bilirrubina, ya que si se excreta bilirrubina al intestino, esta puede ser reducida por enzimas y bacterias de la flora intestinal (3).

El espectro de la mesobilirrubina puede ser interpretado por comparación con el de la bilirrubina, los iones más intensos en el espectro de masas, son m/e 301 y 299 respectivamente. El segundo ión más abundante en éstos dos compuestos es una transposición del ión que aparece a m/e -- 288 en la mesobilirrubina y 286 en la bilirrubina. En la mesobilirrubina como en la bilirrubina, se observa la pérdida de 15 unidades de masa del fragmento m/e 288 y 301, la pérdida de carboxilo, la pérdida del $\text{CH}_2\text{-COOH}$, y otras fragmentaciones al igual que en la bilirrubina. En la figura 7 se muestra el espectro de masas de la mesobilirrubina (7).

FIGURA 7



La bilirrubina puede oxidarse para obtener biliverdina o se puede obtener por otros métodos. La biliverdina es el producto anterior a la formación de la bilirrubina por el catabolismo de la Heme. Se han hecho estudios por espectrometría de masas de los ésteres dimetílicos de la biliverdina y la mesobiliverdina Fig. 8 y Fig. 9 (7), (8), (9).

La biliverdina y la mesobiliverdina muestran un ión molecular muy intenso como pico base del espectro, muestran un gran parecido a los dipirrilmetenos que tienen sustituyentes alquilo Beta (5). Los dipirrilmetenos son particularmente estables a la fragmentación del puente del carbono metino y muestran iones debido principalmente a la fragmentación de los sustituyentes beta. Los picos que se observan en los espectros con una alta relación de masa-carga se estima que provienen de una sucesiva fragmentación de la cadena del propionato (CH_3 , $-\text{OCH}_3$, $\text{COO}-\text{CH}_3$, $\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$ y $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$). Se observó la existencia de iones metaestables para la mesobiliverdina en 584 (614-599) calculado 584.4 y otro ión metaestable en 553 debido a la transición (614-583). Los iones m/e 454 y 450 para la mesobiliverdina respectivamente, se puede suponer que su---

fren dos fracturas en las cadenas del propionato, - con pérdida de $\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$ y posterior pérdida de $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-CH}_3$, sin embargo, la naturaleza de las iones m/e 467 y 463 respectivamente es obscura.

En la figura 10 se muestran algunos iones que se obtienen en los espectros y algunos fragmentos que sufren la ruptura en el carbono metino del puente central, aunque estas estructuras solo pueden resultar de una considerable transferencia de hidrógeno. Cada uno de los fragmentos dipirrólicos pueden provenir de cualquiera de las dos mitades del tetrapirrol. No hay indicación en el espectro de masas de que el ión es el favorecido y solo se indica uno por conveniencia. Otros iones dipirrólicos a m/e 227, 229, 241, y 243 para la mesobiliverdina y iones en m/e 225, 227, 239 y 241 para la biliverdina, pueden ser derivados por una fragmentación posterior del lado de la cadena del propionato. No se observan picos entre m/e 350 y 400, lo cual indica la ausencia de iones representativos de la unidad del dipirril meteno. El ión en m/e 123 para la mesobiliverdina puede ser representado por un ión monopirrólico. (8).

Los espectros de masas de la biliverdina y mesobiliverdina (ácido libre), deben ser muy pare

cidos a los de los ésteres tratados anteriormente,-
solo que no se tienen las pérdidas de los metoxilos.

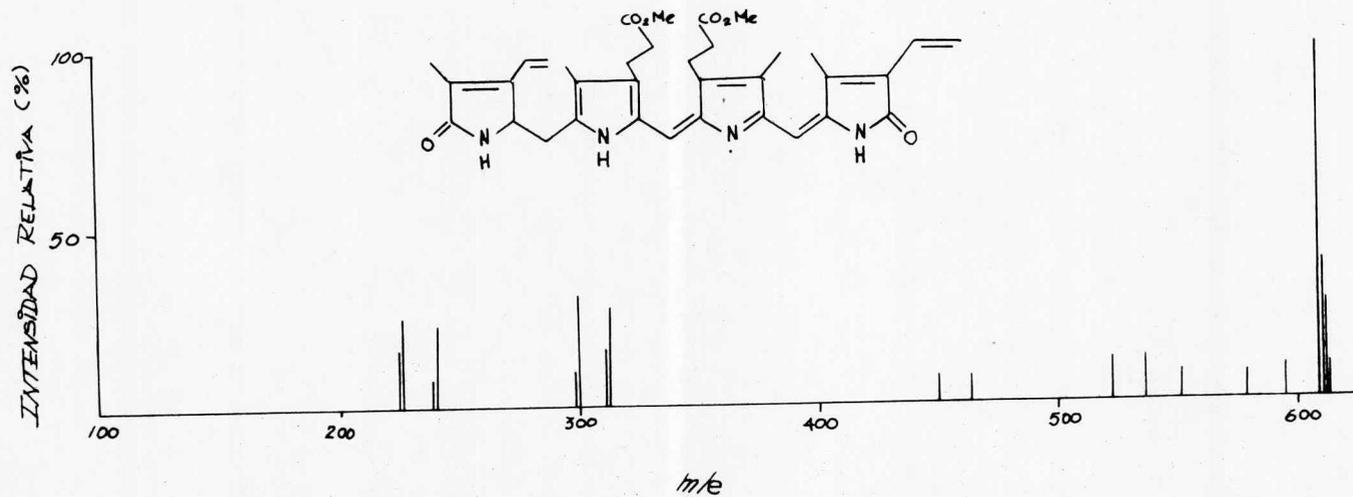


FIGURA 8

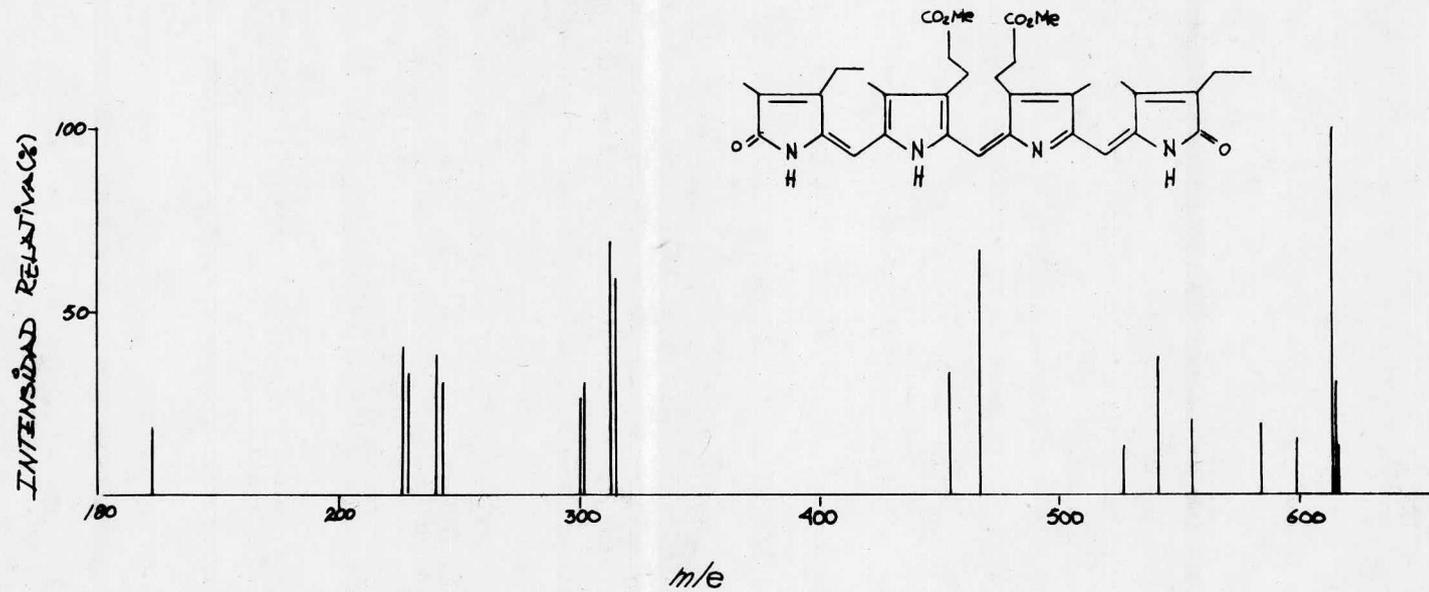
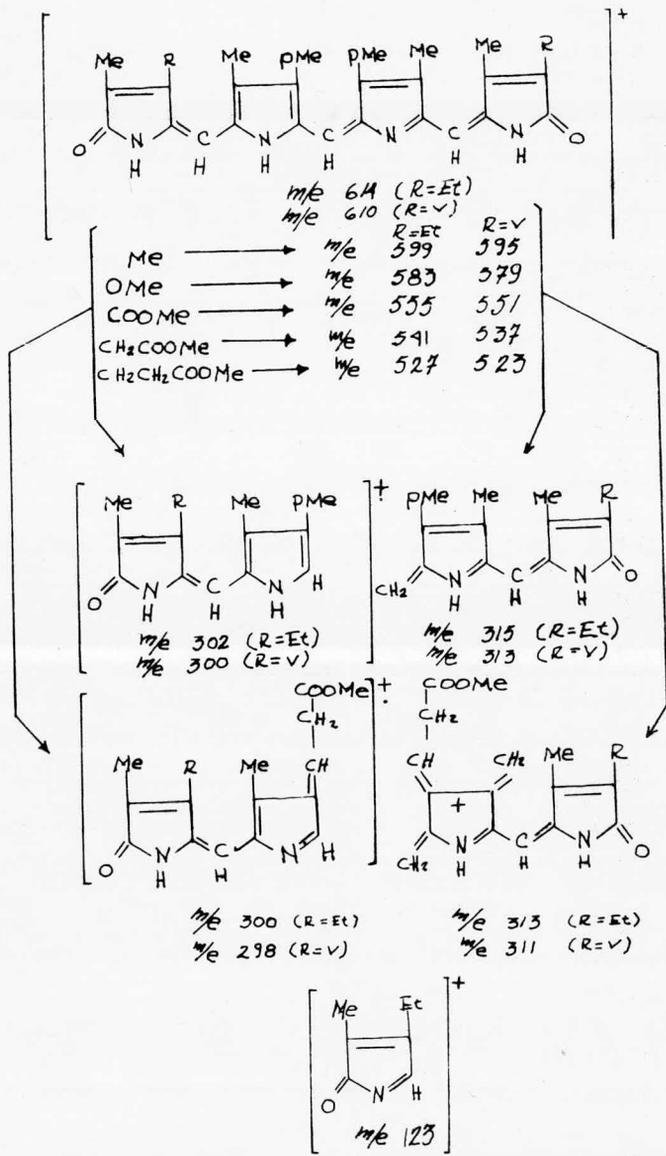


FIGURA 9



Me = CH₃ ; Et = CH₂ CH₃ ; V = CH₂ ; pMe = CH₂ CH₂ COOCH₃

FIGURA 10

DERIVADOS USADOS EN
ESPECTROMETRIA DE MASAS

Para identificar la existencia de los mono y diconjugados de la bilirrubina en la bilis, se han realizado dos estudios por espectrometría de masas, uno de ellos hace la identificación de monoconjugados de bilirrubina en la bilis como derivados de amida (10), y el otro se efectúa por una transesterificación de glucorónidos (11).

En el estudio efectuado para la identificación de los conjugados de bilirrubina como derivado de amida, aquellos se sometieron a una amonólisis. La sustitución nucleofílica es en el átomo de carbono del carbonilo de la cadena del propionato esterificada de la bilirrubina, para la formación de la amida de la bilirrubina. Se hizo reaccionar las dos monoamidas de la bilirrubina con azoantranilato de etilo para la formación de sus respectivos derivados.

Las monoamidas de la bilirrubina fueron estudiadas por espectrometría de masas, se observa un ión molecular intenso a m/e 583. La fragmentación principal resulta de la fisión del puente del metileno central de la bilirrubina, dando iones intensos a m/e 300 y 299 y a m/e 286 y 285. Los iones en m/e 299 y 285 son consistentes con la mitad de la bilirrubina que contiene el grupo amida. Otros iones son idénticos con los que se encuentran en la bilirrubina y se producen principalmente de la fragmentación de la cadena de la amida. El ión en m/e 267 probablemente resulta de la -

pérdida de agua del grupo de la amida a 285, esta trans posición es poco común en las amidas, y es probable que resulte del efecto térmico, esto no sucede cuando se co rre la muestra a 200°C.

Se muestran los espectros de masas de las monoamidas en la figura 11 (10).

Otro estudio fué llevado a cabo por transeste rificación de los conjugados de la bilirrubina extraí— dos de bilis de rata. Estos conjugados sufren una transesterificación cuando se exponen al metanol.

Los productos de la transesterificación fue— ron trimetil sililados y estudiados por espectrometría— de masas.

El espectro de masas de la mezcla de tetra~~pi~~ rroles sililados contiene picos de ión molecular en m/e 756 y 814, acompañados por los picos M-15 a 741 y 799 - respectivamente. Estos pesos moleculares sugieren que - la muestra sililada es una mezcla de los ésteres dime— til bis (trimetilsilil) bilirrubina y el monometil tris (trimetilsilil) bilirrubina. Los picos intensos en m/e- 371 y 385 en el espectro del éster dimetílico de la bi— lirrubina trimetilsililada, se forman por la fragmenta— ción del puente el metileno central. En la figura 12 se muestran parte de los espectros de masas de una muestra auténtica del éster dimetílico de la bis (trimetilsilil) bilirrubina y de los derivados trimetilsilil de -

los productos de transesterificación, así como la fragmentación del metileno de los derivados sililados de la bilirrubina (11).

Por estos estudios se puede concluir que como las reacciones son específicas para ésteres, resulta evidente que en la bilis existen los mono y di-conjugados de bilirrubina y que los mono conjugados son excretados en dos formas isoméricas. Estos estudios -- pueden ser interpretados como indicativos de que el monoglucorónido de bilirrubina existe como una entidad química en la bilis.

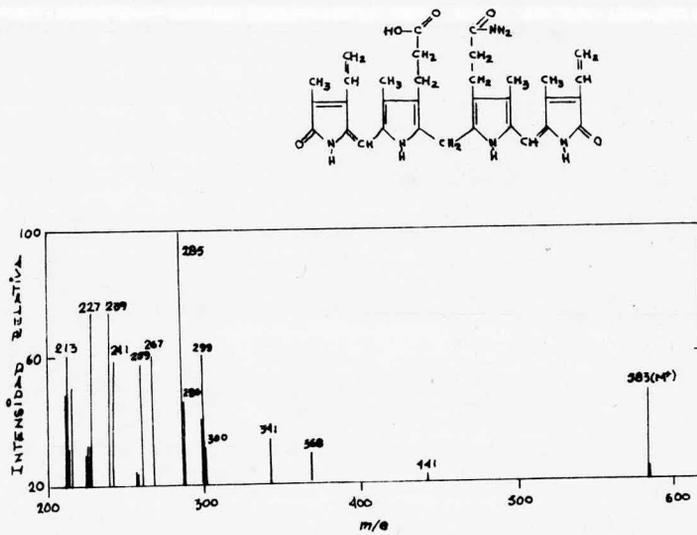
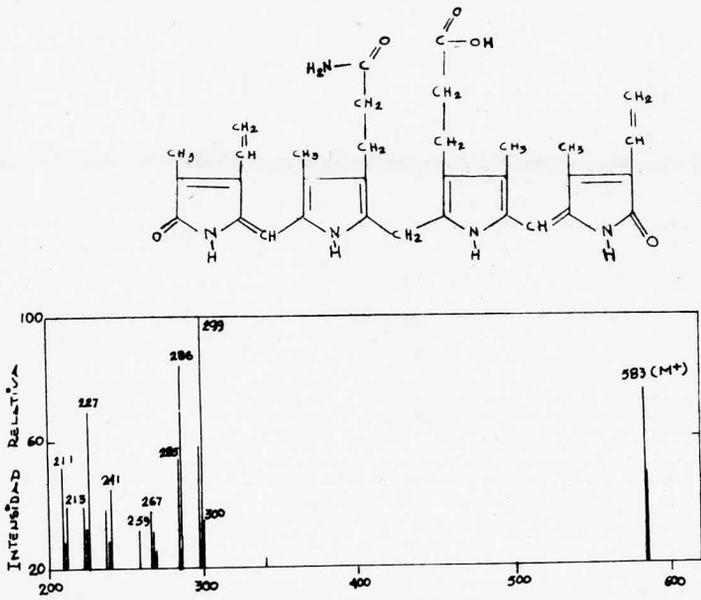


FIGURA II

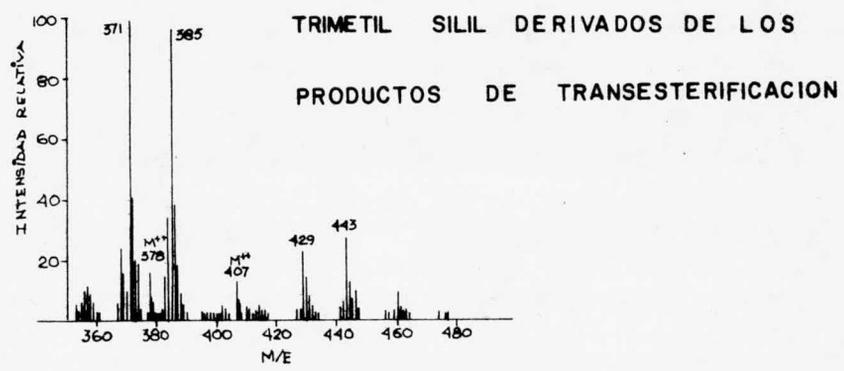
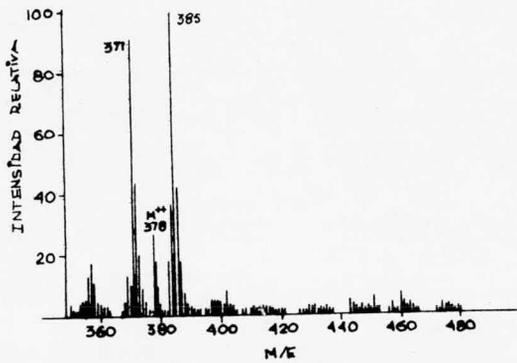
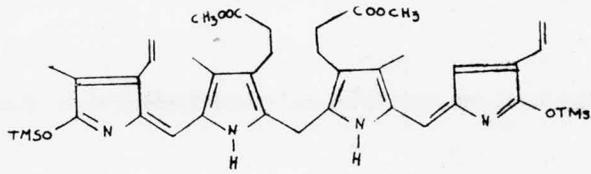


FIGURA 12

Se ha demostrado que la copulación de bilirrubina con la sal de diazonio del antranilato de etilo divide la molécula de la bilirrubina en el puente del metileno central, originando dos moléculas de azobilirrubina antranilato de etilo - - (12).

El espectro de masas en los ésteres metílicos de los azopigmentos antranilato de etilo y anilina (compuestos I, II, III, IV Figura 13), muestran ión molecular a m/e 476 para los azopigmentos del antranilato de etilo (compuesto I y II) y a m/e 404 para los azopigmentos de la anilina (compuestos III y IV), como se muestran en sus espectros de masa en la figura 14. El patrón de fragmentación es consistente con la estructura teórica de los ésteres metílicos de la azobilirrubina antranilato de etilo. Aunque los cuatro espectros fueron corridos bajo idénticas condiciones, se observan ligeras diferencias. El espectro del compuesto I y III, muestran ión molecular a m/e 476 y 404 respectivamente con intensidad relativa aproximadamente de 50%. El pico base está registrado para los iones a m/e 165 y 93 respectivamente, resultantes de la fragmentación del enlace $N=N$ con migración de dos átomos de hidrógeno a la parte del éster antra

nílico ó anilina respectivamente; el fragmento del ión dipirrólico aparece a m/e 312 en todos los espectros. El ión molecular a m/e 476 y 404 es el pico base en los espectros de los compuestos II y IV. La fragmentación del lado de la cadena del propionato de metilo del azopigmento antranilato de etilo, resulta en la formación de los iones m/e 445 y 403 por pérdida del metoxilo y del grupo $\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$ respectivamente. Un patrón de fragmentación similar fué observado para los azopigmentos de la anilina dando iones a m/e 373 y 331. El ión fragmento m/e 312 resultante de la fragmentación del azopigmento en el enlace N=N , sufre fragmentaciones adicionales con pérdida de metanol y de los grupos COO-CH_3 y $\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$, además de un átomo de hidrógeno para dar los iones a m/e 280, 252 y 238 respectivamente. Los iones a m/e 165 en los espectros de los compuestos I y II, pierden un grupo etóxi o etanol para dar iones abundantes a m/e 120 y 119 respectivamente. Los iones a m/e 389 y 317 para los compuestos del antranilato de etilo y anilina respectivamente, son consistentes con la pérdida completa de la cadena del propionato de metilo y sólo se observan en los espectros de masas de los compuestos II y IV. La medición exacta de las-

masas de éstos iones, dá 389.1584 (calculado para $C_{22}H_{21}O_3N_4$ 389.1612) y 317.1385 (calculado para $C_{19}H_{17}O_1N_4$ 317.1400) respectivamente. Este fenómeno fué observado primero para los ésteres metílicos de la azobilirrubina antranilato de etilo (12), de la cual se sugirió que era el resultado del isomerismo syn-anti causado por el enlace N=N o del isomerismo vinil isovinil o un cambio en la conjugación del sistema del doble enlace. La última posibilidad puede ser descartada, en base de un desplazamiento en el sistema de la doble ligadura conjugada en un desplazamiento en la absorción máxima del visible y ultravioleta, el cual es similar para los antranilatos y ambos isómeros de la anilina cuando el espectro de absorción de cada par de isómeros se corrió en el mismo disolvente. Ligeras diferencias reflejan la diferente conjugación del grupo vinilo en los dos isómeros. En el isómero isovinilo, este grupo está linealmente conjugado con el cromóforo, pero en el isómero vinilo, éste tiene una conjugación cruzada. Por lo tanto, hay una diferencia en el espectro, la absorción máxima para los isómeros isovinil está bacteriocrómicamente desplazado comparado con los isómeros vinilo. La estructura de los compuestos isoméricos no pueden ser determinados solamente por espectrometría de masas (12), (13).

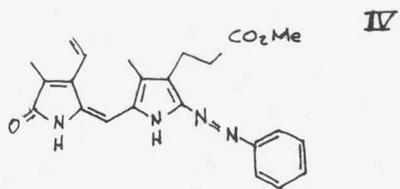
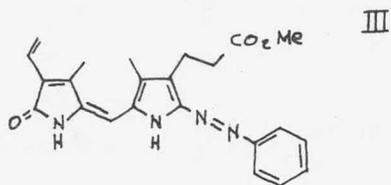
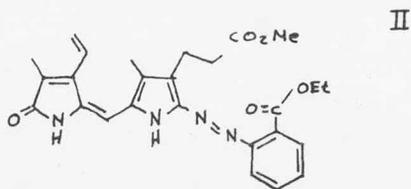
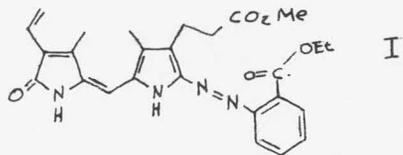
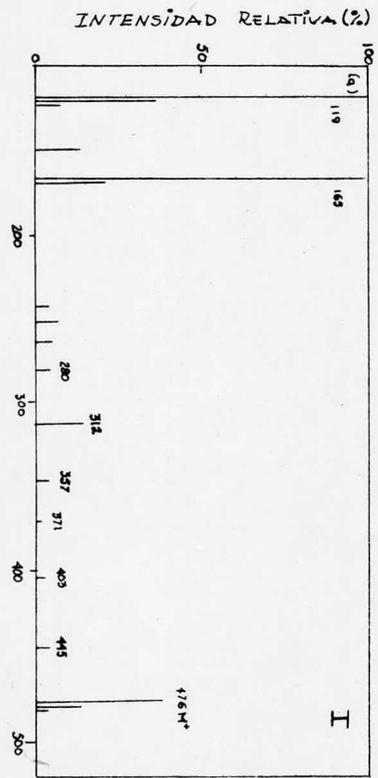
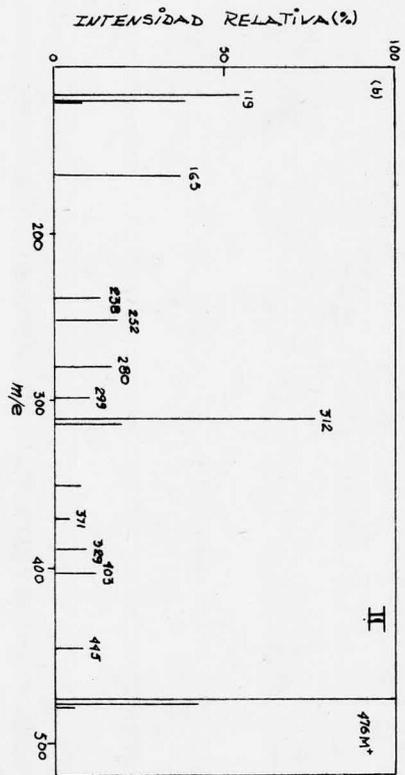


FIGURA 13



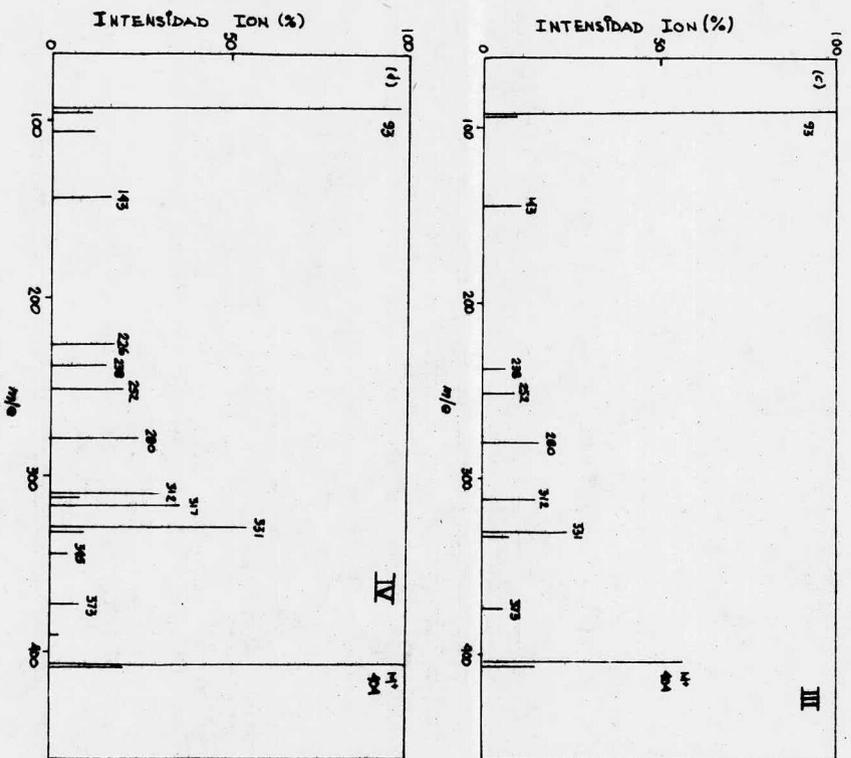


FIGURA 14

Algunos autores han reportado espectros - de masas de la bilirrubina que contienen ión molecular relativamente intenso (5) (7), pero no en todos los espectros de masas aparece el pico del ión molecular digno de confianza (6). La presencia e intensidad del pico del ión molecular cuando son detectables, dependen del diseño del espectrómetro de masas la temperatura del sistema de introducción y el - - tiempo entre la introducción de la muestra y la medición del espectro.

Varios ésteres y derivados de ésteres de la molécula del tetrapirrol se presentan, ya que parece ser preferible analizar la molécula completa.

En la figura 15, se muestra el porcentaje que corresponde al ión molecular de todos los iones de cada espectro. Se puede ver que el ión molecular de la bilirrubina a m/e 584 es menos del 2% de todos los iones detectados en el espectro medido para su estudio. El pico del ión molecular más intenso, es el del derivado tetrakis (trimetilsilil) de la bilirrubina a m/e 872, que corresponde al 22% de todos los iones en el espectro (figura 16).

El segundo ión molecular más abundante es el del derivado del éster metílico trimetilsilil fenilazo a m/e 476. El ión molecular es el pico base-

- en el espectro de la figura (17).

El espectro de masas del derivado tetrakis (trimetilsilil) de la bilirrubina (Fig. 16), contiene pocos iones fragmentos de abundancia moderada. Hay pequeños picos M-15, M-73 y M-90 característicos de los grupos trimetilsilil. La ruptura del metileno central origina dos picos de iones dipirrólicos a -- m/e 443 y m/e 249. Entre estos dos picos de los fragmentos dipirrólicos en el espectro, está un grupo de iones que representan las especies de iones moleculares de doble carga. Se dan los iones de doble carga en la siguiente tabla del espectro de la figura 16 y del mismo derivado d_{36} .

ESPECIES DE IONES MOLECULARES DE DOBLE CARGA

ION.	FIG. 16	d_{36} .
(M)	436	454
M+1	436.5	454.5
M+2	437	455
M+3	437.5	455.5
M+4	438	456

Las especies moleculares de doble carga, - han sido observadas frecuentemente en compuestos aromáticos.

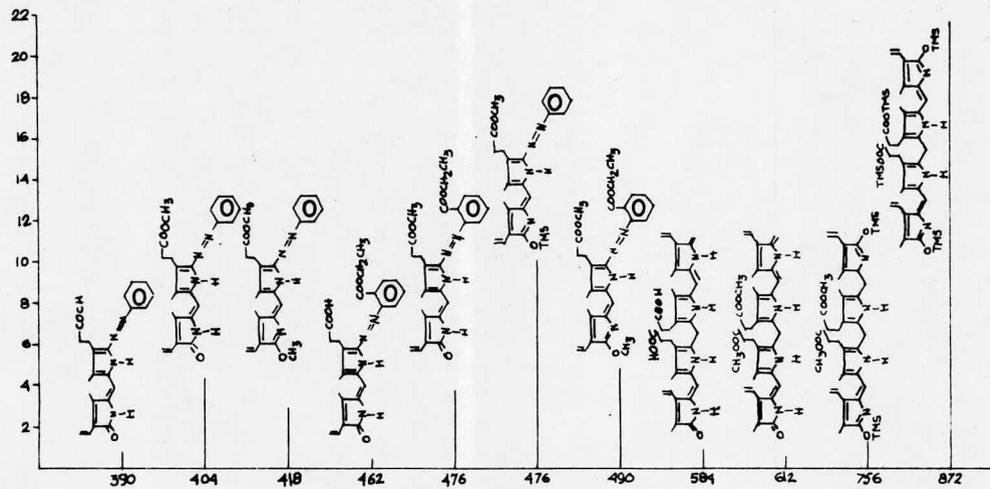


FIGURA 15

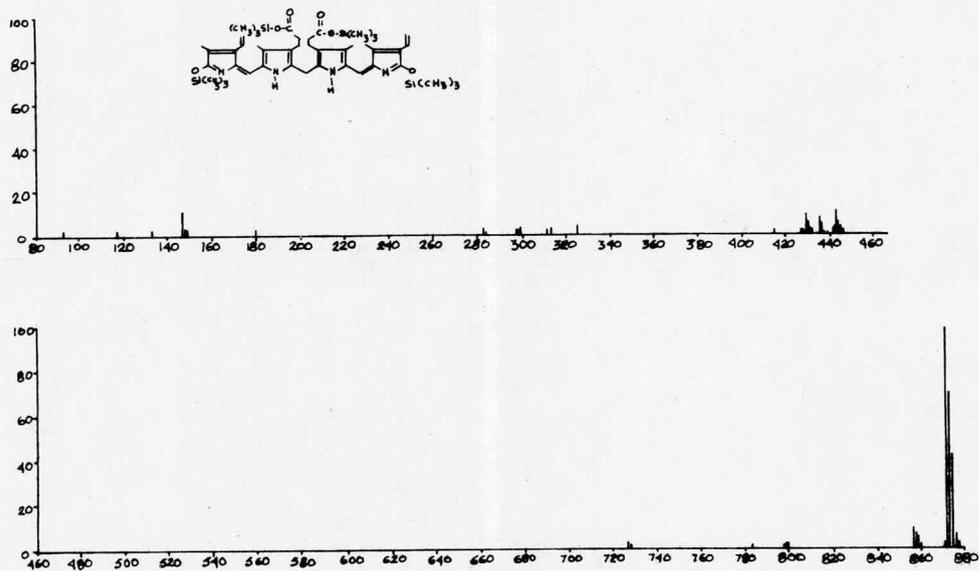


FIGURA 16

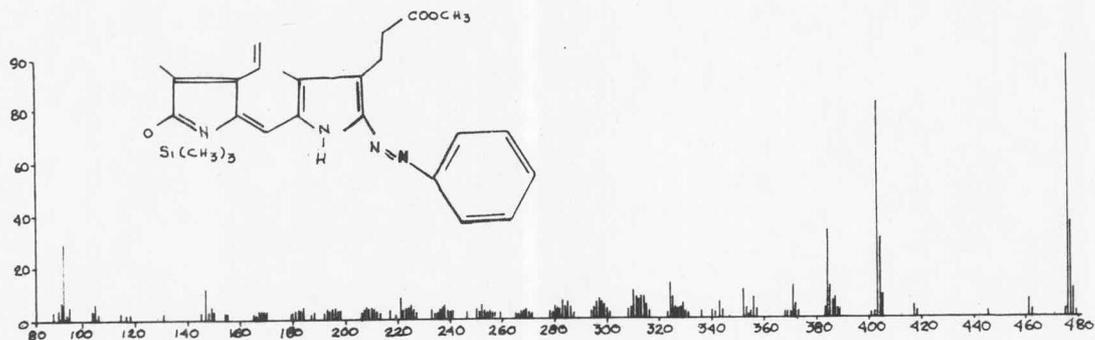


FIGURA 17

En el espectro de masas del derivado tetrakis (d_9 trimetilsilil) de bilirrubina, se observó que el peso molecular de este compuesto se incrementa en 36 unidades de masa atómica y la masa de cualquier fragmento que lleva átomos de deuterio se incrementa relativamente al compuesto no marcado. El ión M-15 se vuelve M-18, confirmando que su formación es por pérdida de un grupo metilo unido al silicio. Las masas de los iones formados por fragmentación de cualquier lado del puente del metileno central, se incrementa 18 unidades de masa a 347 y 361, confirmando la presencia de dos grupos trimetilsilil en cada mitad de la molécula.

Para examinar el patrón de fragmentación del derivado del éster metílico trimetilsilil fenilazo de la bilirrubina, se comparó con un análogo -- con nueve átomos de deuterio en el grupo trimetilsilil. El radical metilo se pierde de ambos grupos, del grupo trimetilsilil y del éster metílico. El metoxi y el radical metoxicarbonil se fragmenta del lado de la cadena del éster metílico para formar -- los iones M-31 y M-59.

El pico M-73 a m/e 403, con una intensidad relativa de 82%, representa la formación de los iones por ruptura de la cadena del éster perdiendo-

el grupo $\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$. El derivado trimetilsilil -- con nueve átomos de deuterio, mantiene el ión $m-73$, con masa de 412 en el espectro del derivado marcado.

El ión $m-92$ de masa 384 en la figura 17,- aparentemente se forma por pérdida de $\text{HN-C}_6\text{H}_5$ del grupo fenilazo (6).

Basándose en anteriores estudios realizados sobre el derivado tetrakis-(trimetilsilil) bilirrubina IX α (6), se siguió el mismo proceso de -- trimetilsililación y diazoación para caracterizar -- por espectrometría de masas los isómeros β , γ , y δ de la bilirrubina (14).

En la siguiente tabla se enlistan los picos predominantes de los espectros de masas de los derivados tetrakis-(trimetilsilil) de la bilirrubina IX α IX γ y meso-IX δ .

ION	<u>VALORES m/e E INTENSIDAD RELATIVA.</u>		
	IX α	IX γ	meso-IX δ
M ⁺	872 (100)	872 (100)	876 (100)
M ²⁺	436 (13)	436 (6)	438 (9)
M-CH ₃	857 (8)	857 (23)	861 (10)
M-COOTMS ⁺	755 (0.8)	755 (2.5)	759 (1.0)
M-CH ₂ COOTMS ⁺	741 (1.5)	741 (4)	745 (1.1)
M-CH ₂ CH ₂ COOTMS	727 (3.5)	727 (0.8)	731 (1.6)
Dipirrol ⁺	429 (30)	429 (6)	315 (17) y 547(8)
Dipirrol+H ⁺	430 (14)	430 (17)	548 (9)
Dipirrol+CH ₂ ⁺	443 (28)	443 (32)	329 (40) y 561(15)

El mismo procedimiento no es útil para -- los derivados trimetilsilil de la bilirrubina IX β , IX δ y meso-IX β .

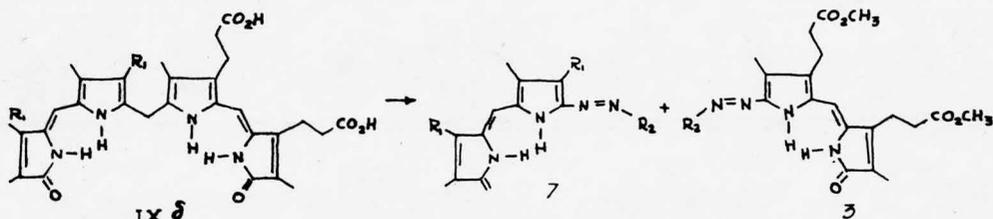
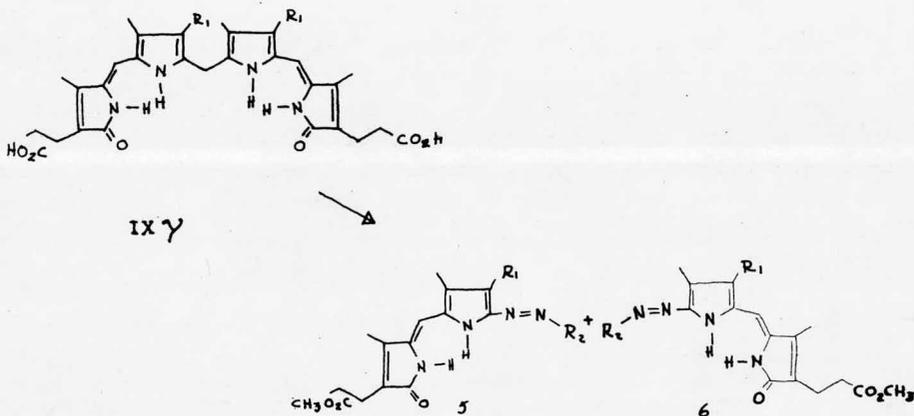
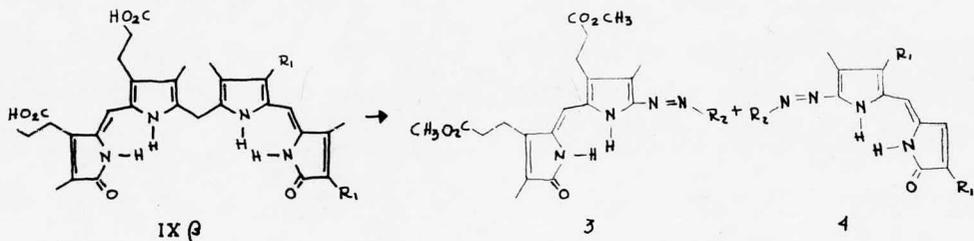
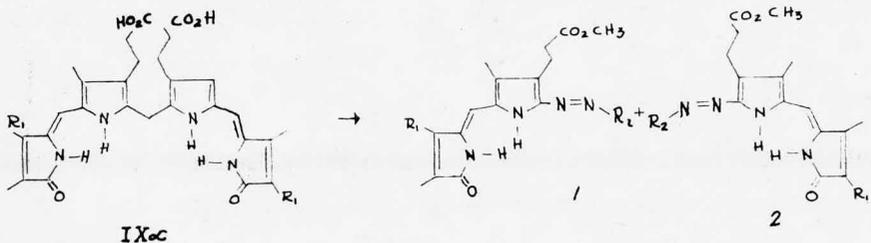
El espectro de masas de los derivados trimetilsilil de la bilirrubina IX ∞ y IX δ , son similares. El ion molecular es el pico base del espectro a m/e 872. La fragmentación en el puente del metileno central origina los picos de los dipirroles a m/e 443 y 429. Parece ser que hay una transposición a m/e 430 que es más importante para el isómero IX δ . Las fragmentaciones comunes de éstos espectros son el pico M-CH₃ y el ion molecular de doble carga a 436. Fragmentaciones en el lado de la cadena del propionato, origina los picos a m/e 727, 741 y 755. La fragmentación vinílica a m/e 727 es más importante para el isómero IX ∞ , mientras que la fragmentación alílica a m/e 741 predomina para el isómero IX δ , la fragmentación vinílica observada para el isómero IX ∞ , probablemente está relacionada a la interacción de los dos grupos voluminosos de la cadena del propionato-TMS.

El espectro de masas del derivado meso-IX δ , muestra una fragmentación análoga. La hidrogenación de los dos grupos vinilo se refleja en el desplazamiento de varios picos por cuatro unidades de masa atómica. Debido a una sustitución más asimétrica con dos grupos etilo en una mitad del dipirrol y dos ésteres propiónicos de la otra mitad del dipi-

rrrol, la fragmentación de cualquier lado del puente del metileno central origina iones fragmento a m/e 315, 329 y a m/e 547, 561. La extracción de hidrógeno (m/e 548, análogo al m/e 430 para el IX γ y IX ∞), se observa solo para la mitad del dipirrol -- que lleva las dos cadenas del propionato. Se puede concluir que el carboxilo de uno de los grupos COO-TMS es el aceptor del hidrógeno.

Los espectros de masas de los productos -- de reacción de las bilirrubinas con la sal de diazotio del antranilato de etilo de la figura 18, se enlistan en la tabla 1, así como la composición de -- los iones y los espectros de los compuestos meso -- (14).

Las estructuras y los espectros de masas de los compuestos 1 y 2 fueron reportados previamente en otros estudios (13).



$R_1 = \text{CH}=\text{CH}_2 \quad \text{CH}_2\text{CH}_3$ (COMPUESTOS MESO)
 $R_2 = \text{O}-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

FIGURA 18

T A B L A . # 1.

	1	meso-1	2	meso-2	5	meso-5	6	meso-6	meso-4	meso-7	3
(M) [†]	476 (100)	478 (100)	476 (100)	478 (100)	476 (5)	478 (100)	476 (100)	478 (100)	420 (100)	420 (100)	536 (100)
(M-CH ₃) ⁺	461 (0.8)	463 (3)	461 (0.7)	463 (3)		463 (1.5)	461 (5)	463 (0.7)	405 (3)	405 (5)	521 (0.5)
(M-C ₂ H ₅) ⁺									391 (5)	391 (1)	
(M-OCH ₃) ⁺	445 (6)	447 (5)	445 (5)	447 (6)	445 (0.5)	447 (6)	445 (6)	447 (6)			505 (8)
(M-OC ₂ H ₅) ⁺	431 (1)	433 (1.5)	431 (1.1)	433 (1.5)	431 (0.2)	433 (0.6)	431 (1.5)	433 (1.1)	375 (3)	375 (1)	491 (2)
(M-HOC ₂ H ₅) [†]	430 (0.7)	432 (3)	430 (1.5)	432 (3)	430 (0.3)	432 (0.5)	430 (2)	432 (0.8)	374 (7)	374 (3)	490 (3)
^a (M-CH ₂ COOCH ₃) [†] or	403 (7)	405 (15)	403 (7)	405 (16)	403 (1)	405 (8)	403 (15)	405 (12)			463 (33)
^a (M-COOC ₂ H ₅) [†]	403 (7)	405 (15)	403 (7)	405 (16)	403 (1)	405 (8)	403 (15)	405 (12)	347 (24)	347 (12)	463 (33)
(M-CH ₂ =C(OH)OCH ₃) [†]											462 (5)
(M-CH ₂ CH ₂ COOCH ₃) [†]	389 (6)										449 (15)
(M-C ₆ H ₅ (COOEt)NH) [†]	312 (45)	314 (85)	312 (32)	314 (80)	312 (0.3)	314 (18)	312 (11)	314 (5)	256 (8)	256 (65)	372 (8)
(C ₆ H ₄ (COOEt)NH ₂) [†]	165 (40)	165 (30)	165 (45)	165 (22)	165 (60)	165 (13)	165 (15)	165 (12)	165 (7)	165 (15)	165 (40)
(C ₆ H ₄ (COOEt)NH ₂ -OEt) [†]	120 (32)	120 (30)	120 (35)	120 (21)	120 (35)	120 (15)	120 (20)	120 (12)	120 (10)	120 (20)	120 (36)
(C ₆ H ₄ (COOEt)NH ₂ -HOEt) [†]	119 (65)	119 (40)	119 (80)	119 (24)	119 (100)	119 (16)	119 (30)	119 (16)	119 (12)	119 (24)	119 (70)

La bilirrubina puede ser oxidada por medios fotoquímicos cuando se encuentra en solución y se expone a la luz visible. El mecanismo y los productos de la foto-oxidación varían con la naturaleza del disolvente, pero la reacción predominante en muchos disolventes parece ser un proceso de foto-oxigenación en el que la bilirrubina actúa como un fotosensibilizador. (15), (3).

La absorción de luz por el pigmento, genera una molécula en estado excitado que puede transferir su energía a una molécula de oxígeno de la solución. El oxígeno singulete reacciona por adición al doble enlace del puente, o transversalmente a los anillos centrales tetrapirrol. Los principales productos que se forman en la foto-oxigenación de la bilirrubina en metanol amoniacal son: metil-vinil, maleimida, ácido hemático y metanol propendio-pent, como también se ha encontrado biliverdina obtenida por la foto-oxidación. (15), (16).

La metil-vinil maleimida fue caracterizada de una foto-oxigenación de bilirrubina en metanol con hidróxido de amonio, con un rendimiento de 5%. El espectro de masas de la metil-vinil maleimida es: m/e 137 (35%) M^+ , m/e 119 (3%), m/e 109 (8%), m/e 94 (5%), m/e 66 (100%). (15).

El ácido hemático fué aislado de una foto-oxigenación en metanol con hidróxido de amonio, fué aislado como el éster metílico, que muestra el siguiente espectro de masas: m/e 197.0681 (4%) M^+ para $C_9H_{11}NO_4$, m/e 165 (100%) y m/e 137 (85%). El ión a m/e 165 probablemente se debe a la pérdida de alcohol metílico. De la misma reacción se identificó el aducto del metanol propendiopent como su éster metílico con el siguiente espectro de masas: m/e 346.1526 (19%) M^+ , m/e 327 (5%), m/e 315 (9%) -- ($M-OCH_3$), m/e 259 (17%), m/e 255 (21%) y m/e 212 -- (51%). Se observó por resonancia magnética nuclear que correspondía al isómero con el vinilo exo y que también se forma el isómero con el vinilo endo que muestra un espectro de masas semejante al del isómero exo. (16), (17).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 Sherlock, S., Diseases of The Liver and Biliary System. Oxford, Blackwell. (1968).
- 2 Dutton, G. J., Glucuronic Acid, Free and Combined. 493-506 Academic Press, London. (1966).
- 3 Mc Donagh, A. P. Jaundice. New York, Plenum Publishing Corporation, P 1-17.
- 4 Weldon, V. V. and Odell, G. B., Mortali Risk of Exchange Transfusion. Pediatrics 41 797-801. (1968).
- 5 Jackson, A. H., Kenner, G. W., Budziliewics, H., Djerassi, C. and Wilson, J. M., Pyrroles and Related Compounds-X. Tetrahedron 23 603-32. (1967).
- 6 Salmon, M. and Fenselau, C., Evaluation of Bilirubin Derivatives for Mass Spectral Analysis -- Biomedical Mass Spectrometry 1 219-22. (1974).

- 7 Schram, B. L. and Kroes, H. H., Structure of Phycocyanobilin. Eur. J. Biochem. 19 581-94. (1971).
- 8 Cole, W. J., Champman, D. J., and Siegelman the Structure and Properties of phycocyanobilin and Related Bilatrienes. Biochem. J. 7 2929-35. (1968).
- 9 Nichol, A. W. and Morell, D. B., Studies on the Isomeric Composition of Biliverdin and Bilirubin by Mass Spectrometry. Biochim. Biophys. Acta 184 173-83 (1969).
- 10 Jansen, F. H. and Billing, B. H., The Identification of Monoconjugates of Bilirubin in bile - as Amide Derivatives. Biochem. J. 125 917-19 (1971).
- 11 Salmon, M., Fenselau C., Cukier, J. O. and ---- Odell, G., Rapid Transesterification of Bilirubin Glucuronides in Methanol. Life Science 15 - 2069-78 (1974).

- 12 Compernelle, F., Jansen, F. H. and Heirwegh, K. P. M., Spectrometric Study of the Azopigments - Obtained from Bile Pigments with Diazotized - - Ethyl Anthranilate. *Biochem. J.* 120 891-4 - - - (1970).
- 13 Jansen, F. H. and Stoll, M. S., Separation and- Structural Analysis of Vinyl - and Isovinyl ---- Azobilirubin Derivatives. *Biochem. J.* 125 585-- 97 (1971).
- 14 Compernelle, F., Blanckaert, N. and Heirwegh, - K. P. M., Mass Spectral Study of Derivatives of the Four Bilirubin - IX Isomers *Biomedical Mass Spectrometry* 3 155-60 (1976).
- 15 Lightner, D. A. and Quistad, G. B., Imide Produc- ts from Photo - Oxidation of Bilirubin and Meso- bilirubin. *Nature New Biology* 236 203-5 (1972).
- 16 Lightner, D. A. and Quistad, G. B., Hematic -- Acid and Propentdyopents from *FEBS Letters* 25 - 94-6 (1972).

- 17 Onishi, S., Fujikake, M., Ogawa, Y. and Ogawa -
J., Photodegradation Products of Bilirubin Stud-
ied by High Pressure Liquid Chromatography, --
Gel Permeation Chromatography, Nuclear Magnetic
Resonance and Mass Spectrometry. Birth Defects:
Original Articles Series 12 41-52 (1976).