

SPECIALIA

The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – Solo los autores son responsables de las opiniones expresadas en estas comunicaciones breves.

Structure de la sarpédobiline, pigment biliaire de Lépidoptère

Structure of sarpedobilin, a butterfly bile pigment

Michèle Bois-Choussy et M. Barbier¹

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, F-91190 Gif-sur-Yvette (France), 11 février 1977

Summary. On the basis of NMR studies, mass spectrometry, chemical reactions and correlations with phorcabilin **1**, the structure **2** is proposed for sarpedobilin, a butterfly blue pigment first isolated from *Papilio graphium sarpedon*. This structure represents a new natural heterocyclic system.

3 pigments biliaires bleu-vert appartenant à la série IX γ ont été trouvés chez les Lépidoptères: la ptérobiline, la phorcabiline **1** et la sarpédobiline²⁻⁴. L'ester diméthylque de sarpédobiline fournit par spectrométrie de masse en désorption de champ, un ion moléculaire à m/e 610 ($C_{35}H_{38}N_4O_6$) identique à ceux de la ptérobiline, de la phorcabiline **1** et de l'isophorcabiline **3**. La sarpédobiline possède un proton plus facilement échangeable dans CD_3OD que **1**. Un acétate de l'ester de sarpédobiline est préparé dans des conditions où la ptérobiline et la phorcabiline ne réagissent pas (Ac_2O/Py , une nuit à 20°C). Les ions à m/e 652 (21%) et 610 (100%) (sp. m. désorption de champ) indiquent qu'il s'agit d'un monoacétate; celui-ci s'hydrolyse facilement lors des chromatographies sur SiO_2 .

La phorcabiline **1** peut être transformée en sarpédobiline par irradiation à 500–600 nm⁵. La méthoxyhydrophorcabiline et l'isophorcabiline **3**, dérivés de **1** ne possédant plus de fonction vinyle, ne sont pas transformés; le vinyle en 7' semble donc impliqué dans la conversion en sarpédobiline.

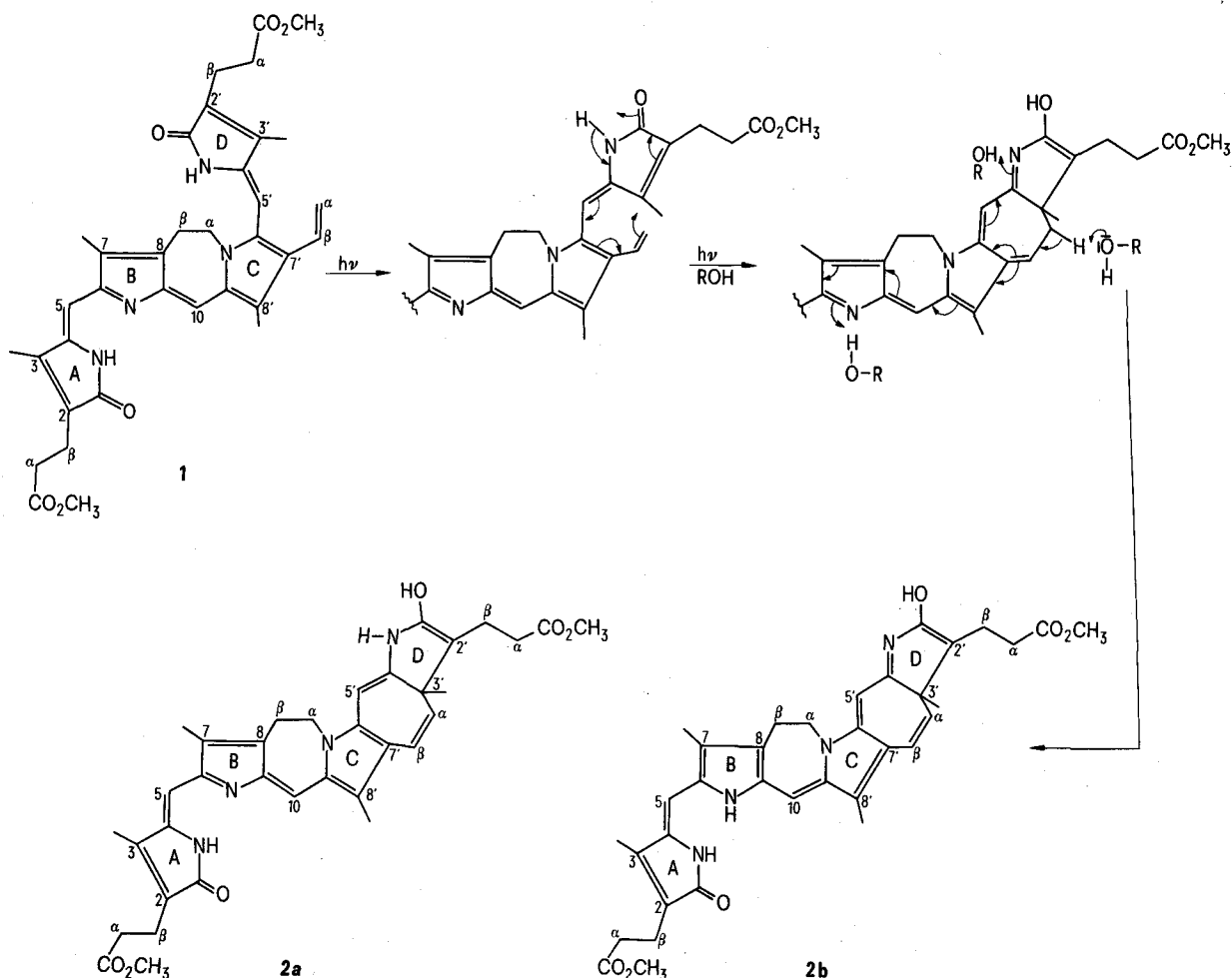
Dans le spectre RMN ($CDCl_3$) de l'ester de sarpédobiline (tableau 1) on observe à champ faible, les singulets des protons des 3 ponts méthines (notons le déplacement du H-C-5' par rapport à celui de l'ester de phorcabiline) et 2 doublets centrés à 6,45 (1H) et 5,40 (1H) qu'une expérience de double irradiation permet de relier l'un à l'autre. La constante de couplage ($J = 10$ Hz) est celle attendue pour 2 protons vicinaux cis sur double liaison; les déplacements chimiques, voisins de ceux observés pour les protons 7' α et 7' β du vinyle de **1**, peuvent correspondre aux protons α et β d'une double liaison conjuguée avec le reste de la molécule. A champ fort, un singulet à 0,93 ppm (3H) doit être attribué à un méthyle angulaire tandis que 3 méthyles allyliques seulement résonnent entre 2 et 2,3 ppm. Les méthylènes α et β des 2 chaînes propioniques fournissent dans le spectre de l'ester de phorcabiline, un signal unique ayant l'aspect d'un singulet élargi (2,65 ppm). Pour la sarpédobiline, ils résonnent entre 2,60 et 2,90 ppm à des fréquences légèrement dif-

férentes. Le massif à 2,96 est modifié par l'irradiation du signal large situé à 4,0 ppm (2H). Ce dernier peut être attribué au CH_2 8 α lié à l'azote pyrrolique, le CH_2 8 β résonnant à 2,96 ppm. Ce déplacement est celui observé dans le spectre de la biliverdine IX α pour le CH_2 en β de la chaîne propionique en position 8. Dans les spectres des esters de phorcabiline et de néobiliverdine IX δ , les signaux à $\approx 2,96$ (2H) et 4,0 (2H) sont également présents. La mesure récente du spectre de l'ester de néobiliverdine δ à 250 MHz a permis une meilleure résolution et une intégration plus précise qui obligent à modifier les attributions précédemment données². Pour cette substance, les triplets ($J = 8$ Hz) à 2,48 ppm (2H), 2,60 (2H) et 2,75 (2H) sont dus aux CH_2 3' α , 7' α et 3' β respectivement; dans le massif à 2,90 ppm (4H) on reconnaît à 2,87 un triplet attribuable au CH_2 7' β et à 2,93 un massif affiné par l'irradiation à 3,95 ppm (2H) qui correspondrait au CH_2 8 β tandis que le CH_2 8 α résonnerait à 3,95 ppm. La mauvaise résolution des signaux situés à 2,95 et 4 ppm dans tous les spectres de néobiliverdines est probablement due au fait que l'hétérocycle heptagonal n'a pas une conformation fixe: à la température à laquelle les spectres sont enregistrés, deux types d'inversion peuvent exister: l'inversion de cycle au niveau des atomes de carbone C-8 α et C-8 β et l'inversion de l'azote N α . Pour l'étude des protons sur hétéroatomes, les

- 1 Nous remercions les Professeurs E. Lederer et J. Bergerard pour leur intérêt et le CEA Saclay pour une subvention ayant facilité l'achat des molécules isotopiques. Nous remercions aussi le Dr H. J. Veith, Darmstadt (République fédérale d'Allemagne), pour les mesures en spectrométrie de masse par désorption de champ.
- 2 M. Choussy et M. Barbier, *Helv. chim. Acta* **58**, 2651 (1975).
- 3 M. Vuillaume et M. Barbier, *C. r. Acad. Sci.*, Paris **163**, 591 (1969); M. Vuillaume, M. Choussy et M. Barbier, *Bull. Soc. Zool. France* **95**, 19 (1970); M. Choussy et M. Barbier, *Biochem. Systematics* **7**, 199 (1973).
- 4 M. Choussy, M. Barbier, W. Rüdiger et W. Klose, *Comp. Biochem. Physiol.* **44B**, 47 (1973).
- 5 M. Choussy et M. Barbier, *C. r. Acad. Sci.*, Paris **282**, sér. C, 619 (1976).

Tableau 1. Spectres RMN de l'ester de sarpédobiline dans différents solvants. (Les zones × sont celles encombrées par des signaux de solvants.) Les déplacements sont exprimés en ppm par rapport au TMS

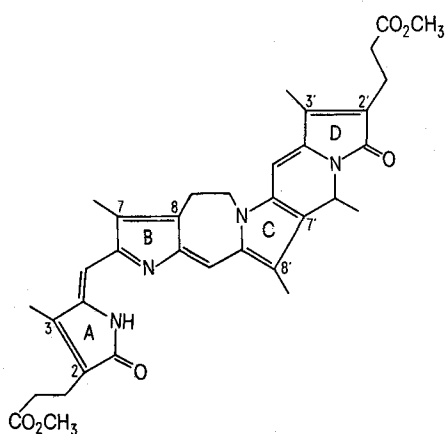
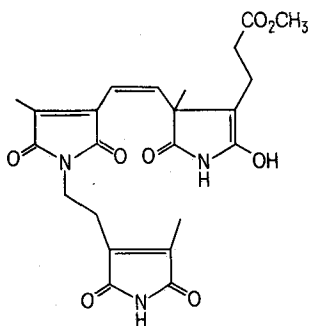
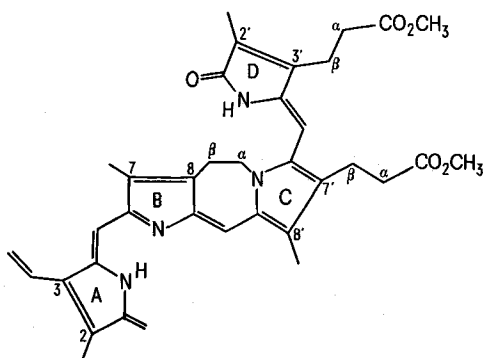
	Ester de phorcabiline (1) CDCl ₃	Ester de sarpédobiline (2) CDCl ₃	C ₆ D ₆	DMSO + 0,2% CF ₃ CO ₂ H
C-CH ₃ =C-CH ₃	2,03 s 3H } CH ₃ 3 2,09 s 3H } CH ₃ 3' 2,16 s 3H } CH ₃ 7 2,33 s 3H } CH ₃ 8'	0,93 s 3H CH ₃ 3' 2,04 s 3H CH ₃ 3 2,11 s 3H CH ₃ 7 2,24 s 3H CH ₃ 8'	0,78 s 3H 1,78 s 6H 1,89 s 3H	1,07 s 3H 2,14 s 6H 2,33 s 3H
-CH ₂ -CH ₂ -	2,65 m 8H { 2 CH ₂ 2 2 CH ₂ 2' 2,90 m 2H CH ₂ 8β 4,0 m 2H CH ₂ 8α	2,66-2,98 m { CH ₂ 2α-2β 2'α-2'β-8β 4,0 m 2H · CH ₂ 8α	2,42 m } 10H 2,62 m }	×
-CO ₂ CH ₃	3,62 6H 2 CH ₃ CO ₂	3,64 s 3H } 2 CH ₃ CO ₂ - 3,68 s 3H }	3,55 m 2H 3,27 s 3H 3,34 s 3H	×
=CH-	5,28 dd 1H H ₇ , α cis 5,36 dd 1H H ₇ , α trans 6,36 dd 1H H ₇ , β	5,40 d (J = 10 Hz) 1H H ₇ , α 6,45 d (J = 10 Hz) 1H H ₇ , β	5,30 d 1H 6,25 d 1H	5,53 s 3H 3,59 s 3H
-CH= pont méthine	5,80 s 1H } H ₅ 5,85 s 1H } H ₅ ' 7,20 s 1H H ₁₀	5,82 s 1H H ₅ 5,94 s 1H H ₅ ' 7,27 s 1H H ₁₀	5,70 s 2H ×	6,03 s 1H 6,10 s 1H 7,33 s 1H
N-H				10,08 s 1H
O-H				11,19 s 1H 11,72 s 1H



Phototransformation de l'ester diméthylque de la phorcabiline **1** en ester diméthylque de sarpédobiline **2**; mécanisme proposé.

Tableau 2. Etude comparée des protons sur hétéroatomes des esters diméthylques de différents pigments; spectres RMN partiels dans (D₆)DMSO et dans (D₆)DMSO + 0,2% CF₃CO₂H

Solvant	Ester de bilirubine	Ester de ptérobiline	Ester de neobiliverdine δ	Ester d'isophorcabiline (3)	Ester de sarpédobiline(2)
(D ₆)DMSO	9,89 1H } N _B H 10,0 1H } N _C H 10,51 1H } N _A H 10,55 1H } N _D H	10,02 1H } N _A H 10,06 1H } N _D H —	9,54 1H N _D H —	—	10,59 1H — —
(D ₆)DMSO + 0,2% CF ₃ CO ₂ H		10,63 1H } N _A H 10,69 1H } N _D H 12,07 1H } N _C H	9,80 1H N _D H 10,57 1H N _A H	10,19 1H N _A H	10,08 1H 11,19 1H 11,72 1H

3
Ester diméthylque de l'isophorcabiline.4
Structure proposée pour le fragment tripyrrolique obtenu par oxydation de 2.5
Ester diméthylque de la neobiliverdine IX δ .

spectres de l'ester de sarpédobiline sont mesurés dans (D₆)DMSO et dans (D₆)DMSO contenant 0,2% de CF₃CO₂H et sont comparés aux spectres des esters de bilirubine, ptérobiline, néobiliverdine δ et isophorcabiline 3 (tableau 2). Si l'ensemble des protons sur hétéroatomes est observé dans (D₆)DMSO + 0,2% CF₃CO₂H, on constate que certains ne fournissent pas de signaux en absence de traces d'acide. Il s'agit des protons N_C-H pour la ptérobiline, N_A-H pour la néobiliverdine δ et N_A-H pour l'isophorcabiline. Ils possèdent tous en ϵ un azote pyrrolénique avec lequel ils peuvent former une liaison hydrogène intramoléculaire. Le spectre de l'ester diméthylque de sarpédobiline dans (D₆)DMSO, possède un singulet à 10,59 ppm et celui mesuré dans (D₆)DMSO + F₃CO₂H, les signaux de 3 protons sur hétéroatomes à 10,08, 11,19 et 11,72 ppm (tableau 2).

L'oxydation chromique² à 20°C de l'ester diméthylque de la sarpédobiline libère l'ester hématinique (correspondant au cycle A) et un nouveau dérivé imide, fluorescent en lumière ultra-violette. Ce composé possède une fonction ester méthylique, est acétylable et donne en spectrométrie de masse en désorption de champ, un ion moléculaire à m/e 471 compatible avec la formule brute C₂₃H₂₅N₃O₈. Ce composé tripyrrolique est isomère de celui obtenu par oxydation de l'ester d'isophorcabiline 3². Il s'en différencie cependant par une plus grande polarité, la possibilité de former un acétate instable, une fluorescence en UV comparable à celle du méthyl-vinyle maléimide.

A partir de ces différents résultats, nous proposons pour l'ester diméthylque de la sarpédobiline, la structure 2 dans laquelle les noyaux B, C et D forment un nouveau système hétérocyclique. Pour le tripyrrole formé lors de l'oxydation chromique, nous proposons la formule 4. La corrélation établie entre la phorcabiline et la sarpédobiline et les résultats de la RMN indiquent que les noyaux B et C sont reliés de façon identique dans 1 et 2. La disparition d'un groupe vinyle, la formation d'un pont -CH=CH- et la transformation d'un méthyle allylique en méthyle angulaire, laissent supposer une cyclisation du vinyle en 7' sur le carbone 3'. La polarité de la sarpédobiline, l'existence d'un proton facilement échangeable, la faculté de former un acétate instable et la présence en RMN de signaux entre 11 et 12 ppm sont compatibles avec l'existence de la fonction énol.

La formation in vitro de la sarpédobiline à partir de la phorcabiline⁵ (en milieu protique) peut être comprise (schéma) comme une photocyclisation concertée avec apparition de l'énol, suivie d'un réarrangement prototropique assisté par le solvant. Ce réarrangement peut se faire par protonation soit de l'azote du cycle B soit de celui du cycle D. Etant donné les résultats de l'étude par RMN des protons sur hétéroatomes, la forme tautomère 2a semble préférentielle: Le proton N_A-H peut donner une liaison hydrogène avec l'azote pyrrolénique N_B et comme le proton N_A-H de l'isophorcabiline ou de

la néobiliverdine δ , n'est pas observé dans le DMSO; le proton N_D-H serait le seul à fournir un signal dans ces conditions (10,59 ppm). Avec la forme tautomère **2b** on devrait s'attendre à observer les singulets des 2 protons N_A-H et N_B-H . La cyclisation de la phorcabiline en sarpédobiline ne peut avoir lieu qu'à partir du moment où la liaison C-4' C-5' a pris une configuration E. La géométrie des ponts méthines des verdines en solution n'est pas connue. Cependant l'étude de la bilirubine par les rayons X montre que pour ce pigment la liaison des cycles A et B d'une part, C et D d'autre part, conserve

la configuration Z qui est celle existant chez les porphyrines⁶; elle est très favorisée pour la phorcabiline, étant donné l'encombrement des substituants en 3' et 7'; en outre Falk et al.⁷, ont montré que l'isomérisation Z \rightarrow E des ponts méthines peut être obtenue par irradiation.

6 R. Bonnett, J. E. Davies et M. B. Hursthouse, *Nature* **262**, 326 (1976).

7 H. Falk, K. Grubmayr, U. Herzig et O. Hofer, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 559.

Interaction of molybdate with copper(II)-histidine

M. A. Pitt¹

Wallaceville Animal Research Centre, Research Division, Ministry of Agriculture and Fisheries, Private Bag, Upper Hutt (New Zealand), 13 April 1977

Summary. Molybdate and copper(II)-histidine form an insoluble complex of empirical formula $Cu_2(His)_3(MoO_4)_2(H_2O)_2$. ESR-spectroscopy indicated that the complex had tetragonal symmetry. IR-spectroscopy showed the presence of a carboxylate anion and suggested that the molybdate ion formed an ammonium-type salt with the nitrogens of the imidazole. The complex did not form following dissociation of the protonated imidazole (above a pH of approximately 6).

During studies directed towards understanding molybdenum toxicity in ruminants an in vitro interaction between copper(II)-histidine and molybdate was observed. This report describes the partial characterization of the novel compound formed following this interaction.

Experimental. Copper(II)-L-histidine molybdate (**1**) was prepared by mixing (10.0 ml) of a solution of L-histidine (200 mM) with an equal volume of $CuSO_4$ (100 mM) or $CuCl_2$ (100 mM). To the deep blue solution 10.0 ml of Na_2MoO_4 (200 mM) was added dropwise. The precipitate formed was filtered, washed with water, absolute ethanol and dried over P_2O_5 in vacuo. (Found C, 21.4; H, 3.02; N, 12.1; Cu, 12.2; Mo, 21.2; H_2O , 3.75%. Cu:Mo:His: H_2O , 1.00:1.15:1.55:1.08. Histidine was calculated from the carbon content. Calculated for $Cu_2(C_6H_9O_2N_3)_3(MoO_4)_2(H_2O)_2$: C, 22.8; H, 3.29; N, 13.3; Cu, 13.4; Mo, 20.2; H_2O , 3.80%.) Bis-L-histidine-copper(II) dinitrate dihydrate (**2**) was prepared as described previously^{2,3}. (Found C, 26.8; H, 4.05; N, 20.8; Calculated for $Cu(C_6H_9O_2N_3)_2(NO_3)_2(H_2O)_2$: C, 27.0; H, 4.15; N, 21.0%.) For ESR studies **1** was prepared in which Cu^{2+} was magnetically diluted with Zn^{2+} . An aliquot (5 ml) of

$CuSO_4$ (2 mM) was mixed with 10 ml of L-histidine (200 mM). To this 5 ml of $ZnSO_4$ (200 mM) was added followed by the dropwise addition of 10 ml Na_2MoO_4 (200 mM). The precipitate was filtered, washed with water, absolute ethanol and dried over P_2O_5 in vacuo. The above substance contained 0.22% Cu. Cu and Mo were determined by atomic absorption spectroscopy. Attempts to detect Na were carried out by atomic absorption spectroscopy and by precipitation of sodium zinc uranyl acetate and SO_4^{2-} by the precipitation of $BaSO_4$ in the presence of MnO_4^- (Feigl⁴).

- 1 Acknowledgments. Drs C. Tennant, D. McGavin and B. Cleverly, Chemistry Division, D.S.I.R., Petone, for the computer simulated ESR spectrum and for help in interpreting ESR- and IR-spectra; Prof. A. D. Campbell, Department of Chemistry, University of Otago, Dunedin, for C, H, N- and H_2O -microanalyses.
- 2 S. Valladas-Dubois, *Bull. Chem. Fr.* 967 (1961).
- 3 B. Evertsson and G. Lundgren, *Acta chem. scand.* **20**, 2310 (1966).
- 4 F. Feigl, *Spot Tests in Inorganic Analysis*, 5th ed., p. 229 and p. 314. Elsevier, Amsterdam 1958.

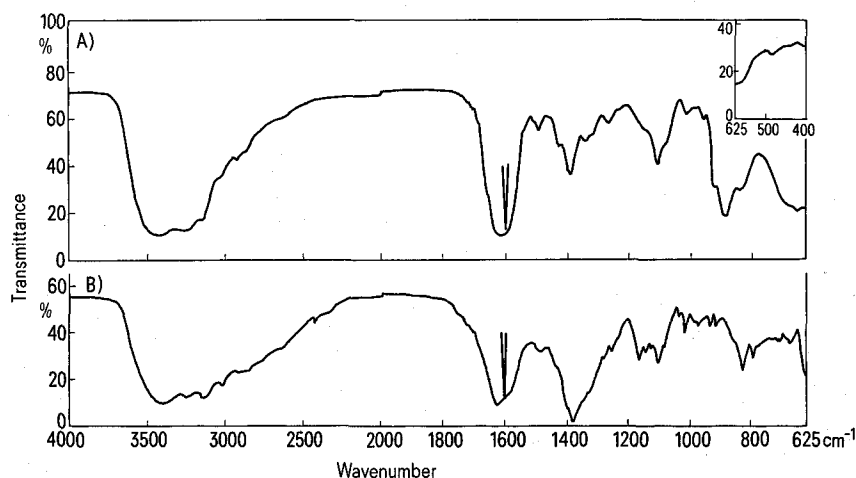


Fig. 1. IR-spectra of copper(II)-L-histidine molybdate (A) and bis-L-histidine-copper(II) dinitrate dihydrate (B). Spectra contain the absorption band of polystyrene at 1603 cm^{-1} as calibration.