

Synthese von 14C-markiertem Polyvinylpyridin-N-oxid

W. MAUL

Isotopen-Institut, Farbenfabriken Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld

Erhalten am 9. September 1968

SUMMARY

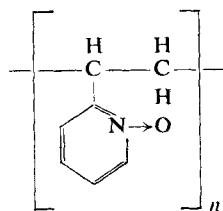
Polyvinylpyridine-N-oxide is a macromolecular compound exhibiting therapeutic activity on experimental silicosis. For biological studies ^{14}C -labelled polyvinylpyridine-N-oxide was prepared. The synthesis took the following route : ethyl-2-(2'-pyridyl)-acetate-[$1-^{14}\text{C}$], 2-(2'-pyridyl)-ethanol-[$1-^{14}\text{C}$] and 2-vinyl-pyridine-[vinyl- $2-^{14}\text{C}$], which was polymerized and oxidized to give polyvinylpyridine-N-oxide-[vinyl- $2-^{14}\text{C}$]. A fractional precipitation of this product yielded fractions which showed medium molecular weights ranging from 7 000 to 570 000.

ZUSAMMENFASSUNG

Polyvinyl-pyridin-N-oxid ist eine hochmolekulare Verbindung, die eine therapeutische Wirkung auf die experimentelle Silikose hat. Für biologische Untersuchungen wurde ^{14}C -markiertes Polyvinylpyridin-N-oxid hergestellt. Die Synthese verlief über folgende Stufen : 2-(2'-Pyridyl)-essigsäureäthylester-[$1-^{14}\text{C}$], 2-(2'-Pyridyl)-äthanol-[$1-^{14}\text{C}$] und 2-Vinylpyridin-[vinyl- $2-^{14}\text{C}$]. Letzteres wurde polymerisiert und oxydiert zu Polyvinylpyridin-N-oxid-[vinyl- $2-^{14}\text{C}$]. Eine fraktionierte Fällung dieses Produktes lieferte Präparate mit einem mittleren Molekulargewicht von 7 000 bis 570 000.

Dem Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPN) wird in der Silikoseforschung seit der von Schlipkötter und Brockhaus⁽¹⁾ beobachteten Wirkung auf die experimentell erzeugte Staublunge steigende Aufmerksamkeit gewidmet. Ein chemischer oder spektroskopischer Nachweis dieser makromolekularen Verbindung ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur schwer zu erreichen, so daß die Tracermethode mit einem radioaktiv markiertem PVPN bei biologischen Untersuchungen als Methode der Wahl gelten dürfte.

Während Fromme und Mitarbeiter⁽²⁾ eine Markierung des PVPN mit Tritium nach Wilzbach durchführten, wird im folgenden die Synthese eines mit Kohlenstoff-¹⁴C-markierten Polyvinylpyridin-N-oxid beschrieben. Unsere mit dieser Substanz gewonnenen tierexperimentellen Ergebnisse sollen an anderer Stelle publiziert werden⁽³⁾.



Aus Kohlendioxid-¹⁴C und α -Picollolithium wurde auf dem von Woodward und Kornfeld⁽⁴⁾ für inaktives Material aufgezeigten Weg 2-(2'-Pyridyl)-essigsäure-[1-¹⁴C] synthetisiert, die jedoch ohne Isolierung durch Aufnehmen in Äthanol und Sättigen der Lösung mit Salzsäuregas in den entsprechenden Äthylester übergeführt wurde. Mit Lithiumaluminiumhydrid konnte der Ester zu 2-(2'-Pyridyl)-äthanol-[1-¹⁴C] reduziert werden. Die Dehydratisierung dieses Alkohols erfolgte unter Anlehnung an die Vorschrift von Winterfeld und Heinen⁽⁵⁾ mittels Kaliumhydroxid bei 165° C und bei einem Druck von 170 Torr in Gegenwart von Hydrochinon. Wir erhielten dabei 2-Vinyl-[vinyl-2'-¹⁴C]-pyridin in guter Ausbeute.

Die Blockpolymerisation des Vinylpyridin zu Polyvinylpyridin und dessen anschließende Oxidation zu PVPN-[vinyl-¹⁴C] mit Wasserstoffperoxid in Eisessig, sowie die Aufarbeitung des Ansatzes durch Fällung mit Perchlorsäure und anschließende Passage über einen Anionenaustauscher erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von Brockhaus⁽⁶⁾ für die Synthese inaktiven Materials. Durch Vorversuche mußten jedoch zur Erzielung von Molekulargewichten bestimmter Größe standardisierte Polymerisationsbedingungen gefunden werden. So erwies es sich als notwendig, das 2-Vinylpyridin vor der Polymerisation durch Stehenlassen über Calcium-Pulverscharf zu trocknen, für vollständigen Luftausschluß im Polymerisationsgefäß zu sorgen und die optimale Radikalkettenstarter-Menge (Azodiisobuttersäuredinitril) zu finden. Ähnliches galt für die Oxidation des Polyvinylpyridin zu PVPN, da Temperatur und Wasserstoffperoxid-Konzentration einen ausgeprägten Einfluß auf Oxidations- und Polymerisationsgrad haben.

Um eine zur Fraktionierung ausreichende Menge PVPN-¹⁴C zu erhalten, wurde das synthetisierte Polyvinylpyridin-¹⁴C vor der Oxidation mit einer inaktiven Menge etwa gleicher Molekulargewichtsverteilung geträgert. Insgesamt erhielten wir 457 ml einer 2 %igen PVPN-¹⁴C-Lösung mit einem Gehalt von ca. 95 % PVPN (Rest : Polyvinylpyridin). Die spezifische Aktivität betrug ca. 126 μ Ci/ml, woraus sich die spezifische Aktivität des PVPN zu

etwa 6,3 μ Ci/mg errechnete. Die radiochemische Gesamtausbeute betrug somit 40 %.

Zur Abschätzung des mittleren Molekulargewichtes M_V wurden Viskositätsmessungen an Lösungen von PVPN in physiologischer Kochsalzlösung herangezogen*. Aus der von Hoffmann⁽⁷⁾ experimentell bestimmten Beziehung

$$[\eta] = 1,1 \times 10^{-4} \cdot M_V^{0,7}$$

lässt sich das gesuchte Molekulargewicht schätzen. Für die obige Lösung ergab sich vor der Sterilisation $M_V \sim 270.000$ bzw. ~ 243.000 nach der Sterilisation.

Die fraktionierte Fällung der 0,9 % Kochsalz enthaltenden 2 % igen PVPN-¹⁴C-Lösung erfolgte mittels Aceton nach Angaben von Hoffmann⁽⁷⁾. Aus der obigen Beziehung ließ sich nach Ermittlung des Staudinger-Indexes $[\eta]$ das mittlere Molekulargewicht der erhaltenen sechs Fraktionen wie folgt abschätzen :

1. Fraktion 570.000	4. Fraktion 125.000
2. Fraktion 330.000	5. Fraktion 52.000
3. Fraktion 200.000	6. Fraktion 7.000

EXPERIMENTELLER TEIL.

2-(2'-Pyridyl)-essigsäureäthylester-[I-¹⁴C].

Durch Einwirkung von konz. Schwefelsäure auf 3,256 g Bariumcarbonat-¹⁴C (16,5 mMol; 144,8 mCi) wird in der Vakuumapparatur Kohlendioxid freigesetzt und dieses auf 23 ml mit einer mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen ätherischen Lösung von α -Picollylithium (33 mMol) aufkondensiert. Der unter Vakuum stehende Reaktionskolben wird von der Apparatur abgetrennt und langsam auf Zimmertemperatur erwärmt. Unter magnetischem Rühren beläßt man eine Stunde bei dieser Temperatur und zieht nach dem Belüften des Kolbens den Äther im Vakuum der Wasserstrahlpumpe ab. Der Rückstand wird in 20 ml absolutem Äthanol gelöst und unter Eiskühlung trockener Chlorwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet. Über Nacht läßt man bei Zimmertemperatur stehen, zieht das Lösungsmittel im Vakuum bei einer Badtemperatur unterhalb 80° C ab und nimmt den Rückstand in 20 ml Chloroform auf. Unter Rühren läßt man eine Lösung von 6,6 g wasserfreiem Kaliumcarbonat in 4 ml Wasser zutropfen, wobei dafür Sorge getragen werden muß, daß das frei werdende Kohlendioxid absorbiert wird. Anschließend wird eine Stunde bei 50° C erwärmt, über Quarzwolle in einen Rundkolben filtriert und das Chloroform im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in wenig

* Herrn Dr. M. Hoffmann, Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, Wissenschaftliches Hauptlabor, sind wir zu besonderem Dank verpflichtet für Rat und Hilfe bei den Molekulargewichtsbestimmungen.

Äther aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und in ein Kugelrohr transferiert. Beim Vakuum der Wasserstrahlpumpe wird bei 30° C Äther und überschüssiges Picolin abdestilliert; der dünnenschichtchromatographisch reine Ester ging bei 115-120° C über.

1,683 g 2-(2'-Pyridyl)-essigsäureäthylester-[1-¹⁴C] $\triangle 62\%$.

2-(2'-Pyridyl)-äthanol-[1-¹⁴C].

1,683 g des Esters (10,2 mMol) werden in 15 ml absolutem Äther gelöst und innerhalb von 10 Minuten unter Rühren zu einer mit Eis/Kochsalz gekühlten Lösung von 830 mg Lithiumaluminiumhydrid (21,8 mMol) in 12 ml Äther zugetropft. Nach dem Entfernen des Eisbades wird eine Stunde nachgerührt und anschließend unter erneuter Eis/Kochsalz-Kühlung durch Zugabe von 2,5 ml einer kalt gesättigten Seignettesalzlösung zersetzt. Vom körnigen Rückstand wird nach 10minütigem Nachrühren auf einer Glasfilternutsche abgesaugt und dieser mehrmals mit Chloroform gewaschen. Nach Trocknen des Filtrates mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Alkohol durch Destillation im Kugelrohr bei ca. 130° C Ölbadtemperatur als hellgelbes, chromatographisch zu mehr als 99 % reines Öl erhalten.

1,030 g 2-(2'-Pyridyl)-äthanol-[1-¹⁴C] $\triangle 82\%$.

2-Vinylpyridin-[vinyl-2-¹⁴C].

Insgesamt 6,024 g des Alkoholes (49 mMol), die durch Trägerung mit inaktivem Material erhalten wurden, werden in einem kleinen Reaktionskolben mit 1,2 g Kaliumhydroxid (21,4 mMol) und 25 mg Hydrochinon (als Polymerisationsverzögerer) versetzt. Durch Erhitzen des Ölbades auf 165° C wird die Dehydratisierung eingeleitet. Durch Anlegen eines schwachen Vakuums destilliert bei 170 Torr das gebildete Vinylpyridin über eine kurze Destillationsbrücke in eine Vorlage, die mit Eis gekühlt wird und 1,2 g fein gestoßenes Calcium-Metall enthält. Die Destillation wird langsam bis zum Verbleiben einer klaren Kaliumhydroxid-Schmelze fortgesetzt. Eventuell mitgerissenes Wasser wird dadurch entfernt, daß man das Destillat 24 Stunden über dem Calcium stehen läßt. Das Vinylpyridin wird dann im Vakuum unter Röhren in ein 160 mm langes Glasrohr, das einseitig zugeschmolzen und auf der anderen Seite mit einem Normschliff 14,5 versehen ist, eindestilliert. Das Produkt ging bei einer Ölbadtemperatur von 100 bis 120° C und einem Druck von 50 Torr als farblose Flüssigkeit über.

4,782 g 2-Vinylpyridin-[vinyl-2-¹⁴C] $\triangle 93\%$.

Polyvinylpyridin-[vinyl-2-¹⁴C].

Die noch in dem Glasrohr, das zur Hälfte mit 2-Vinylpyridin gefüllt ist, sich befindende Luft wird durch scharf getrockneten, reinsten Stickstoff ersetzt und dem Ansatz 31,1 mg Azoisobuttersäuredinitril zugefügt. Nach dem Verschluß des Rohres mit einem durch Spiralfedern gesicherten Schliffstopfen wird die Polymerisation durch 18stündiges Erwärmen auf 70° C

ausgeführt. Das radioaktive Polymerisat der gewünschten Viskosität kann als Block erhalten werden, indem die zuvor mit Tesafilm beklebte Glaswand mechanisch zerstört wird.

4,78 g Polyvinylpyridin-[vinyl-2-¹⁴C].

Polyvinylpyridin-N-oxid-[vinyl-2-¹⁴C].

4,75 g des obigen Polyvinylpyridin werden mit inaktivem Material aus einer gleichartigen Synthese und mit gleicher Viskosität auf 8,114 g (77,2 mMol) geträgert und in 290 ml Eisessig unter Rühren in der Kälte gelöst. Nach der Zugabe von 15,6 ml Wasserstoffperoxid (30 Gew %; p.a.; FLUKA) wird 8 Stunden im Thermostaten bei $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten. Sodann werden nochmals 4,0 ml Wasserstoffperoxid zugefügt, und der Ansatz wird weitere 16 Stunden bei der angeführten Temperatur belassen. Die erkaltete Lösung wird mit 6,5 %iger Perchlorsäure versetzt bis die Koagulation der entstandenen Trübung das Ende der Ausfällung erkennen lässt. Das ausgefällte PVPN wird nach dem Dekantieren in 290 ml dest. Wasser gelöst. Zur Abtrennung der Perchlorsäure wird die Hälfte der obigen Lösung über eine mit Eiswasser gekühlte Säule (2,5 cm Durchmesser innen) gegeben, die 250 ml Anionenaustauscher Lewatit® M500 in der OH-Form enthält. Analog wird mit der zweiten Lösungshälfte verfahren. Beide Säulen werden mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Vom Beginn des Aktivitätsdurchbruches an werden je 200 ml neutrale, wässrige PVPN-Lösungen gesammelt und vereinigt. Die danach noch anfallenden, radioaktiven Waschwässer werden ebenfalls vereinigt, gefriergetrocknet und die erhaltene Substanz in den obigen 400 ml gelöst.

Nach der gravimetrischen und spektrometrischen Gehaltsbestimmung wurde soviel physiologische Kochsalzlösung und festes Kochsalz zugegeben, daß eine ca. 2 %ige Lösung von PVPN in 0,9 %iger Kochsalzlösung entstand. Der titanometrisch ermittelte N-Oxid-Gehalt betrug mehr als 95 %. Das mittlere Molekulargewicht M_V wurde vor der Sterilisation zu etwa 270.000, nach der Sterilisation zu ca. 243.000 abgeschätzt. Wir erhielten 457 ml 2,01 %ige Lösung von Polyvinylpyridin-N-oxid-[vinyl-2-¹⁴C] in physiologischer Kochsalzlösung mit einer gemessenen spez. Aktivität von 126 $\mu\text{Ci}/\text{ml} \triangleq 6,3 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ PVPN.

Fraktionierung von PVPN-¹⁴C (7).

100 ml der nicht sterilisierten Lösung werden bei 25°C unter Rühren tropfenweise mit Aceton bis zur bleibenden Trübung versetzt. Der verschlossene Kolben wird dann 30 Minuten auf 40°C erwärmt und die Temperatur anschließend so geführt, daß pro Stunde eine Abkühlung von 2°C eintritt. Bei 25°C wird über Nacht belassen und vom abgesetzten PVPN-¹⁴C (1. Fraktion) dekantiert. Die dekantierte, klare Lösung wird noch insgesamt fünfmal auf diese Weise mit Aceton behandelt, wobei die letzten zwei Fraktionen etwas mitgerissenes Kochsalz enthalten. Die erhaltenen Fraktionen 1 bis 6

werden einzeln in wenig Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Nach der Auswaage wird in der für eine 2 % ige Lösung benötigten Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und das mittlere Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen aufgrund der Viskosität, wie beschrieben, abgeschätzt

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. Fraktion 639 mg M_v 570.000 | 4. Fraktion 326 mg M_v 125.000 |
| 2. Fraktion 589 mg M_v 330.000 | 5. Fraktion 340 mg ⁺ M_v 52.000 |
| 3. Fraktion 331 mg M_v 200.000 | 6. Fraktion 31 mg ⁺ M_v 7.000 |
- ⁺einschl. mitgefälltem Kochsalz

LITERATUR

1. SCHLIPKÖTER, H. W. und BROCKHAUS, A. — *Dtsch. Med. Wschr.*, **85** : 920 (1960).
2. FROMME, H. G., STÖBER W., u. STRECKER, F. J. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **346** : 74 (1966).
3. DUHM, B., MAUL, W., MEDENWALD, H., PATZSCHKE, K. und WEGNER, L. A. — *In Vorbereitung*.
4. WOODWARD, R. B. and KORNFELD, E. C. — *Organic Syntheses*, **29** : 44 (1949).
5. WINTERFELD, K. und HEINEN, C. — *Ann. Chem.*, **573** : 85 (1951).
6. BROCKHAUS, A. — *Persönliche Mitteilung*.
7. HOFFMANN, M. — *Unveröffentlichte Ergebnisse*.