

27/348

Kosk, Marika, Kirso, UUwe

DIE OXYDATION VON BENZO(A)PYREN-CHINONEN

Deutsche Vollübersetzung aus:

Izvestija Akademii Nauk Estonskoj SSR. Chimija.
Tallin, 36 (1987), Nr 1, S. 53 - 59.

Russ:

ОКИСЛЕНИЕ БЕНЗ(а)ПИРЕН-ХИНОНОВ.

1. ВОЗДЕЙСТВИЕ КИСЛОРОДА ВОЗДУХА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

OKISLENIE BENZO(a)PIREN-CHINONOV.

1. Vozdejstvie kisloroda vozducha i perekisi vodoroda.

The autoxidation and the oxidation with hydrogen peroxide (H_2O_2) of intermediate products of BP oxidation — 6-hydroxy-BP and three BP quinones have been studied in aqueous solution. The reaction of autoxidation of BP derivatives is of first order which rate does not depend on the structure of quinone ($k_{\text{eff}} = (1.277 \pm 0.069) \cdot 10^{-3} s^{-1}$). The oxidation with H_2O_2 is the reaction of mixed first-second order. The estimation of concentration effect of H_2O_2 on the oxidation of three BP quinones indicates that reaction rate depends on the initial concentration of oxidant and on the structure of BP quinones. The rate as well as autoxidation and oxidation with hydrogen peroxide decrease during further oxidation of BP and BP derivatives because of the inhibitory effect of some reaction products such as BP quinones.

Übersetzungsstelle
der Universitätsbibliothek Stuttgart

1. Die Einwirkung des Sauerstoffs der Luft und Wasserstoffperoxids

Die Oxydation von Benzo(a)pyren und anderer polynuklearer karzinogener Arene wurde hauptsächlich in biologischen Systemen durchgeführt, und zwar am zellularen, subzellularen und auf den Organismus bezogenen Teil der Tiere. Das Hauptaugenmerk wurde auf die sich hierbei bildenden Umwandlungsprodukte gerichtet, von denen sich einige als "tatsächlich" karzinogen erwiesen /1-6/. Die Kinetik der metabolischen Oxydation von Benzo(a)pyren ist bis jetzt kaum erforscht /7-10/. Angesichts der experimentellen Schwierigkeiten (die hohe Hydrophobie von Benzo(a)pyren) gibt es in der Literatur sehr wenig Angaben über die Oxydationsreaktion bei niedrigen Konzentrationen von karzinogenen Arenen in Wasserlösungen. Im Kontakt mit der durch karzinogenen Arenen verschmutzten Biosphäre erhalten die lebendigen Organismen durch sie ihre Nahrung, Arzneimittel und andere Quellen in äußerst niedriger Dosierung. Dabei erfahren die karzinogenen Arene in der Umgebung (Selbstverteidigung) oder im Organismus (Metabolismus) eine Oxydationsumwandlung.

Früher untersuchten wir die Oxydation des karzinogenen Benzo(a)pyren in der Wasserlösung unter Einwirkung des Luftsauerstoffs und der Pflanzenfermente /11, 12/. Zum gegenwärtigen Moment kann die Untersuchung der kinetischen Oxydationsmerkmale der Benzo(a)pyren-Derivate, die sich während seiner Oxydation sowie der Oxydation der Chinone und Phenole bilden, bis zu einem gewissen Grade den Oxydationsmechanismus aufdecken, was auch das Ziel der vorliegenden Arbeit ist.

Forschungsmethode

Die Benzo(a)pyren-Chinone wurden durch photochemisches Verfahren (UV-Bestrahlung mittels Quecksilberlampe bei einer Wellenlänge λ_{\max} 360 nm und einer Belichtungs-

zeit von 1 Std.) aus Benzo(a)pyren mit einer Konzentration von 2 nM in der Azetonlösung (Benzo(a)pyren der Firma "Flucka", Schweiz) heraussynthetisiert. Die Chinonfraktion wurde aus der Reaktionsmischung mittels dünn-schichtiger Chromatographie auf aktivem Aluminiumoxid (nach Brockmann II) der mobilen Phase abgesondert - Petroläther: Chloroform (9:1). Eine weitere Zerlegung der Isomer-Chinone erfolgte in der gleichen Weise, wobei als Lösungsmittel Benzol verwendet wurde. Die Chinone wurden spektrophotometrisch auf dem Gerät "Specord M 40" (DDR) identifiziert, nachdem sie auf den Platten Silufol (CSSR) gereinigt wurden.

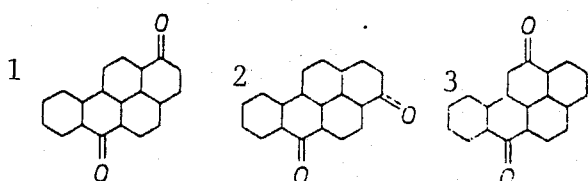
Versuche wurden mit Benzo(a)pyren-Chinonen in der Wasserlösung im Reaktor mit 4,0 Volumen und mit mechanischer Vermischung im Konzentrationsintervall 5-50 nM (als unterste Grenze dienten die Analysemöglichkeiten, als oberste Grenze die Lösbarkeit der Verbindung) bei pH = 7,6 (0,02 M Phosphatpuffer) und bei Zimmertemperaturen durchgeführt. In den Versuchen mit Peroxyd-Oxydation wurde Wasserstoffperoxyd (chemisch rein) in Konzentrationen von 5,9 bis 73,5 mM beigegeben. Nach regelmäßigen Zeitabschnitten wurden Proben (500 ml) aus der Reaktionsmischung entnommen. Aus diesen Proben wurden Benzo(a)pyren-Chinone mittels vorher gesäuberten Diäthylester extrahiert. Nachdem das Extraktionsmittel entfernt war, wurden die Proben in Methanol aufgelöst und einer quantitativen Analyse entweder mit dem Spektrophotometer oder mittels der hocheffektiven Flüssigkeitschromatographie mit dem Gerät der Firma "Knauer" (BRD) und mit der ODS-Säule Sorbax 6x150 mm (Durchmesser der Teilchen beträgt 5 µm) unterzogen. Die Verbindungen wurden mit vorgereinigtem Methanol eluiert. Die Bedingungen für die Chromatographie: Strömungsgeschwindigkeit 1,5 ml/min, Druck 3,0 MPa, Temperatur 30°C. Der UV-Nachweis wurde bei 368, 435, 469 nm für 6,12-1,6- und 3,6-Benzo(a)pyren-Chinone entsprechend geführt. Die

Ausgangszeit - 5 Minuten, wobei in der Eigenschaft des Elutionsmittels 99% Methanol verwendet wurde. Die Elemente bei der Chromatographie: eine Mischung von Methanol mit Wasser (2:8) und Methanol, dessen Konzentration in den ersten 10 Minuten 10% und in den darauffolgenden 30 Minuten 90% betrug. Die Eichung wurde mit Benzo(a)pyren-Chinonen in einer Menge von 0,1 - 2,0 nmol vorgenommen.

Die Bestimmungsmethode von 6-Oxyd-Benzo(a)pyren unterscheidet sich von der vorhergehenden darin, daß diese durch eine verhältnismäßig geringe Stabilität des vorliegenden Benzo(a)pyren-Derivats bedingt ist. Die Versuche mit der Auto- und Peroxid-Oxydation von 6-Oxyd-Benzo(a)pyren (dies wurde von Frau M. Bronovickaja im onkologischen wissenschaftlichen Zentrum der Akademie für medizinische Wissenschaften der UdSSR, Moskau, synthetisiert) wurden mit einer 35-prozentigen Äthanol-Lösung bei pH 7,6 (0,02 M Phosphatpuffer) durchgeführt. Die Reagenzkonzentration betrug 1-2 Mikro-M. Im Verlauf bestimmter Zeitabschnitte wurden Proben von einem Volumen 80 Mikro-l für Analysen mittels der Methoden "VEZCh" entnommen. Als Eluent diente eine Mischung aus Methanol mit Wasser, Verbrauch der Mischung 1,5 ml/Min. Die Zusammensetzung wurde linear mit 10-99% Methanol im Verlauf von 15 Minuten programmiert. Die quantitative Bestimmung von 6-Oxyd-Benzo(a)pyren wurde bis zur Fluoreszenz des Reagens bei 402 nm durchgeführt. Länge der Erregungswelle 315 nm, Detektor der Firma "Perkin-Elmer" (USA), Empfindlichkeit der Methode 0,2 nMol.

Resultate und Diskussion

Die Strukturformeln der Benzo(a)pyren-Chinone sind folgende:



- 1 1,6-Benzo(a)pyren-Chinon
- 2 3,6-Benzo(a)pyren-Chinon
- 3 6,12-Benzo(a)pyren-Chinon

Die kinetischen Werte wurden mit der Differentialmethode /13/ unter Anwendung der Angaben auf der Tabelle errechnet. Nach den kinetischen Kurven verläuft die Wechselwirkung aller Benzo(a)pyren-Chinone mit einer Nahgeschwindigkeit gemäß der ersten Reihe hinsichtlich des Substrats.

Die Anfangsgeschwindigkeiten ($v_0 \cdot 10^{-12} \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{sek}^{-1}$) der Autooxydation dreier Isomer-Benzo(a)pyren-Chinone bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen ($c_0 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) in der Wasserslösung (die Versuchsbedingungen sind im Text näher beschrieben).

6,12-Benzo(a)pyren-Chinon		1,6-Benzo(a)pyren-Chinon		3,6-Benzo(a)pyren-Chinon	
c_0	v_0	c_0	v_0	c_0	v_0
0,95	1,40	0,30	0,38	0,70	0,97
1,65	2,40	0,36	0,39	1,17	1,35
1,80	1,76	0,70	0,80	2,00	1,81
1,84	1,92	4,20	3,50	7,00	8,64
1,83	2,70	5,30	6,90	17,20	18,50
1,87	2,80	7,40	12,30	25,00	20,80
3,20	3,55	15,30	18,90		
8,00	13,17				

Die Reaktionsfolge der Benzo(a)pyren-Chinone $n_c = 0,983 \pm 0,042$ und die effektive Geschwindigkeitskonstante $K_{\text{eff}} = (1,277 \pm 0,069)$

$$K_{\text{eff}} = (1,277 \pm 0,069) \cdot 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$$

das ist fast eine Reihenfolge mehr als die für Benzo(a)pyren

$$K_{\text{eff}} = 1,68 \cdot 10^{-4} \text{ sek}^{-1}.$$

Der Vorgang der Autooxydation von Benzo(a)pyren-Chinonen unterscheidet sich von der Oxydation von Benzo(a)pyren, wobei eine Auto-Inhibition durch Umwandlungsprodukte /12/ angenommen wird. Ausgehend von $n_c > n_t$ (n_t = Reaktionsreihenfolge in der Zeit), konnte bei der Oxydation der Chinone solch ein Effekt nicht beobachtet werden.

Abb.1 Oxydationskinetik der 3,6-(1), 1,6-(2) und 6,12-Benzo(a)-pyren-Chinonen (3) unter Einwirkung von Sauerstoff (die Kurven von A) und Wasserstoff-Peroxyd (Kurven B). Versuchsbedingungen: pH 7,6 (0,02 M Phosphatpuffer), $C_0 \text{H}_2\text{O}_2 = 0,05\%$ (146,7 mM).

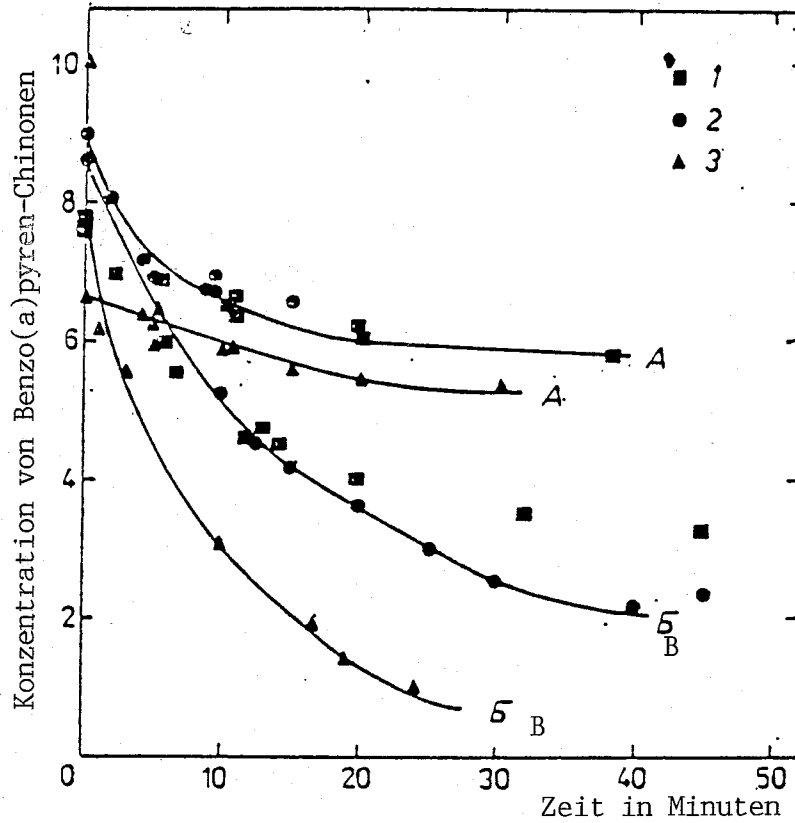
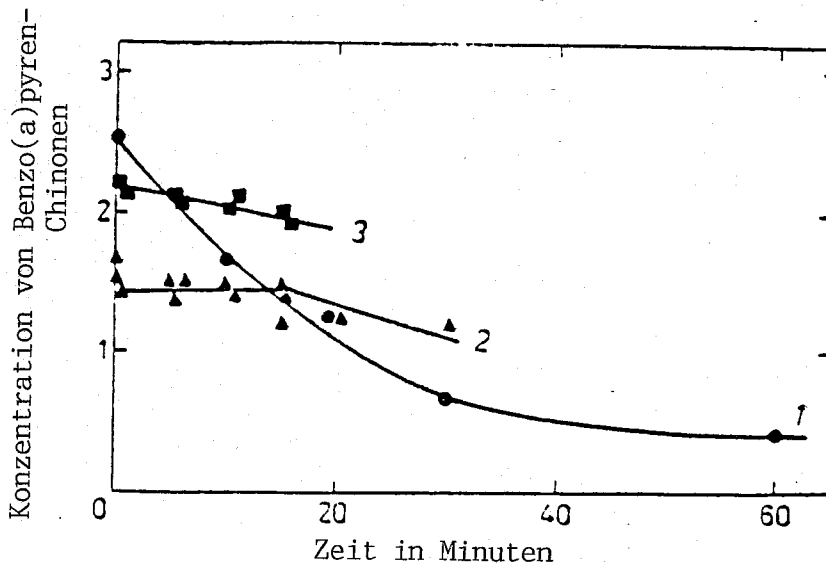


Abb.2 Autooxydationskinetik eines Benzo(a)pyrens (1) und zusammen mit 6,12-Benzo(a)pyren-Chinon (2) und der Mischung aus Isomer-Chinonen (3). Versuchsbedingungen: pH 7,6 (0,002 M Phosphatpuffer).



Bei einer gemeinsamen Oxydation von Benzo(a)pyren und seiner Chinone (Abb. 2) konnte praktisch die gesamte Verzögerung im Umwandlungsprozeß der polynuklearen karzinogenen Arene in den Anfangsstadien des Prozesses beobachtet werden. Lediglich nach der Oxydation des Hauptteils der Chinone (mehr als 60%) begann die Umwandlung von Benzo(a)pyrene mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Getrenntoxydation, d.h. die Produkte der weiteren Chinon-Degradation wiesen keine Antioxydationseigenschaften auf. Gleichzeitig wirkte sich die Anwesenheit von Benzo(a)pyren nicht nachteilig auf die Oxydationsgeschwindigkeit seiner Chinone aus (Abb. 2). Auf diese Weise bewahrheitete sich die Hypothese /12/, daß die Benzo(a)pyren-Chinone als Auto-Inhibitoren bei der Benzo(a)pyren-Oxydation auftreten können.

Die Autooxydation von 6-Oxyd-Benzo(a)pyrenen, d.h. des betreffenden Phenols, erfolgt im langsamen Prozeß (Abb.3), was den

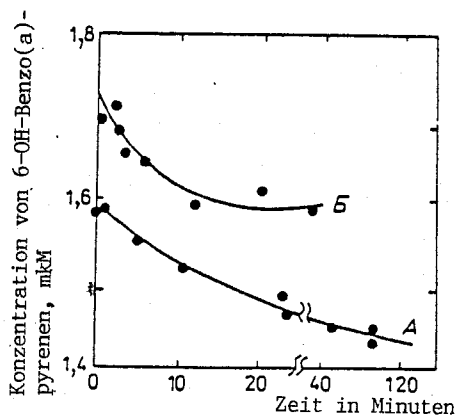


Abb. 3 Kinetik der Oxydation von 6-Oxyd-Benzo(a)pyren unter Einwirkung von Sauerstoff (Kurve A) und von Wasserstoff-Peroxyd (Kurve B). Versuchsbedingungen: 35-ige Wasserlösung von Äthanol, pH 7,6 (0,02 M Phosphatpuffer).

Effekt der Auto-Inhibition durch die Bildung von Benzo(a)pyren-Chinonen in Analogie mit der Oxydation von Benzo(a)pyren vermuten läßt.

Die Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxyd im System erhöht die Umwandlungsgeschwindigkeit des Kanzerogens und seiner Chinone (Abb. 4 und 5). Dabei lassen sich für die 1,6- und 3,6-Benzo(a)pyren-Chinone ähnliche kinetische Oxydationsgesetzmäßigkeiten beobachten, deren Geschwindigkeit durch die Menge von H_2O_3 im

System (siehe die Konzentrationsabhängigkeit auf Abb. 4 und 5) bestimmt wird. Bei einer Konzentration des Wasserstoff-Peroxyds über 0,25% (20 mM) findet praktisch ein vollständiger Zerfall des Substrats statt, während dessen bei bei $C_{O_2} H_2O_2 < 0,02\%$ der Degradationsprozeß in den folgenden Etappen sich verzögert (Abb. 4).

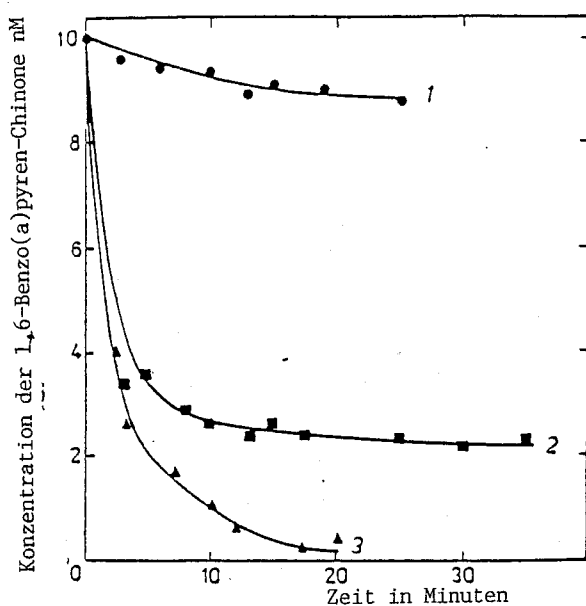


Abb. 4 Der Einfluß der Ausgangskonzentration von Wasserstoff-Peroxyd auf die 1,6-Benzo(a)pyren-Oxydation:

- 1 - 0,02% (5,89 mM)
- 2 - 0,2 % (58,9 mM)
- 3 - 0,37% (109 mM)

Versuchsbedingungen - siehe Anmerkungen zu Abb. 2.

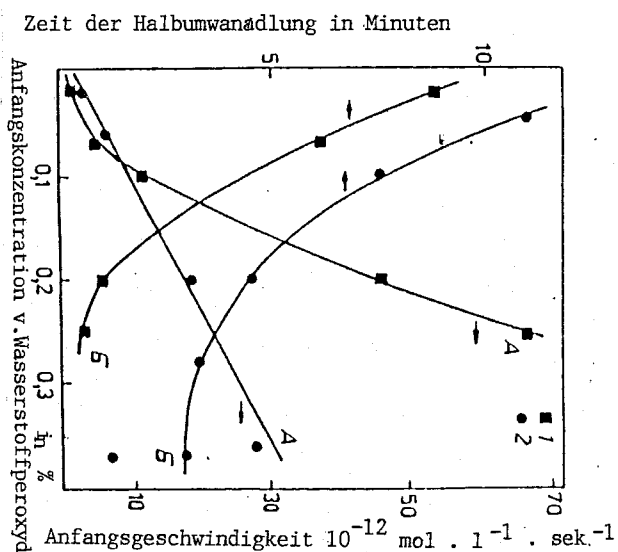


Abb. 5 Der Einfluß der Ausgangskonzentration von Wasserstoff-Peroxyd auf die Anfangsgeschwindigkeit (Kurven A) und die Zeit der Halbumwandlung (Kurven B) für die 3,6- (1) und 1,6-Benzo(a)pyren-Chinone (2).

Versuchsbedingungen - siehe Anmerkungen zu Abb. 3.

Es wäre zu erwarten, daß die Umwandlung von Benzo(a)pyren-Chinonen entsprechend der Reaktion der ersten Reihenfolge verläuft und nicht von der Konzentration eines anderen Reagenzen (H_2O_2), der im Überfluß vorhanden ist, abhängig ist. Jedoch in der Realität tritt dieses nicht auf. Die Reihenfolge der Reaktion bei der Oxydation von Benzo(a)pyren-Chinonen gemäß H_2O_2 ist nahezu null ($n_c = \sim 0,2$), nach dem Substrat (berechnet nach der Integralmethode) beträgt sie $1 < n_c < 2$. Eine gemischte Reihenfolge ist ein Hinweis auf den komplizierten Charakter des Prozesses.

Die Oxydationsreaktion von 6,12-Benzo(a)-Chinon weist eine hohe Umwandlungsgeschwindigkeit auf, die sich nach der Zeit (Abb. 4) wenig verändert. Entsprechende Werte der Anfangsgeschwindigkeit ($v_0 \cdot 10^{-12} \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{sek}^{-1}$) in der Oxydation von Wasserstoff-Peroxyd bei gleichen Bedingungen (Ausgangskonzentration für Substrat 10,0 nM und für H_2O_2 14,7 mM oder 0,05%) sind für 1,6- und 3,6 -Chinon 6,7 und 5,2, währenddessen für 6,12-Chinon wir hier eine Reihenfolge mehr, also 61,7 haben. Folglich unterscheidet sich der Umwandlungsprozeß von 6,12-Chinon von dem für alle übrigen Benzo(a)pyren-Chinone. Der Grund dieser Erscheinung ist vorläufig ungeklärt.

Die Oxydation von 6-Oxyd-Benzo(a)pyren im Beisein niedriger Konzentrationen (0,1%) von H_2O_2 verläuft als Prozeß mit Verzögerungen während der Umwandlung (Abb. 3). Dieses Resultat ist durchaus logisch, weil bekanntlich /8, 14/ der gesamte Umwandlungsprozeß von Benzo(a)pyren die Entstehungsphasen über Hydroxyderivate der entsprechenden Chinone mit einschließt. Ihre Antioxydationseigenschaften sind weiter oben bereits geklärt.

So konnte man als Resultat der systematischen Erforschung der chemischen Oxydation von Chinonen und eines Benzo(a)pyren-Phenols zeigen, daß die Geschwindigkeit der weiteren

Umwandlungsreaktion der Primärprodukte karzinogener Arene um einiges höher ist, als bei der Ausgangsverbindung. Ihre Oxydation stellt folglich keine limitierende Degradationsstufe der Arene dar. Als Ergebnis der Wechselwirkung (Auto-Inhibition) der Oxydationsprodukte, d.h. der Chinone mit karzinogenen Arenen, wird der Prozeß der Autooxydation gebremst, was nicht bei genügendem Überfluß (10^6 -fach) eines stärkeren Oxydationsmittels, Wasser-Peroxyd, zu beobachten war. Es wurde die besonders hohe Oxydationsgeschwindigkeit der am meisten symmetrischen von den Benzo(a)pyren-Chinonen - des 6,12-Derivats - unter Einwirkung von Wasserstoff-Peroxyd nachgewiesen, was möglicherweise durch den Radikalkettenprozeß der Umwandlung bedingt sein kann. Diese Frage müßte noch speziell untersucht werden.

Schlußfolgerungen

1. Die Autooxydation von isomeren Benzo(a)pyren-Chinonen erfolgt gemäß der Reaktion der ersten Reihenfolge mit einer Nahgeschwindigkeit, die fast um eine Reihenfolge höher ist, als die für Polyaren.
2. Benzo(a)pyren-Chinone weisen antioxydierende Eigenschaften auf hinsichtlich der Oxydation des Ausgangspolyarens.
3. Autooxydation von 6-Oxy-Benzo(a)pyren verläuft in den Anfangsstadien des Prozesses mit hoher Geschwindigkeit, während des weiteren Verlaufs wird die Reaktion gebremst, was wahrscheinlich mit dem Effekt der Auto-Inhibition der entstehenden Chinone in Verbindung steht.
4. Die Geschwindigkeit der chemischen Oxydation von Benzo(a)pyren-Chinonen unter Einwirkung von Wasserstoff-Peroxyd ist höher als die Autooxydation; sie wird durch die Konzentra-

tion des Oxydationsmittel bestimmt. Der Prozeß und die Geschwindigkeit der Umwandlung von 6,12-Benzo(a)pyren-Chinon unterscheidet sich von solchen für die 1,6- und 3,6-Isomere.

5. Die Umwandlung von 6-Oxy-Benzo(a)pyren im Beisein von Wasserstoff-Peroxyd verläuft mit hoher Geschwindigkeit in den Anfangsphasen der Reaktion, im weiteren Verlauf ist eine Verzögerung des Prozesses zu erkennen.

Literatur:

1. De Pierre, Joseph W., Ernster, Lars:
The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer.
In: Biochimica et biophysica acta. Amsterdam, 473 (1978), Nr 149 - 186.
2. Wood, Alexander W., Levin, Wayne, Lu, Anthony Y.H., Yagi, Haruhiko, Hernandez, Oscar, Jerina, Donald M., Conney, A.H.:
Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes.
In: The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 251 (1976), Nr [6, S. 4822 - 4890.
3. Jerina, Donald M., Yagi, Haruhiko, Hernandez, Oscar, Dansette, P.M., Wood, Alexander W., Levin, Wayne, Chang, R.L., Wislocki, P.G., Conney, A.H.:
Synthesis and biologic activity of potential benzo(a)pyrene metabolites.
In: Carcinogenesis, I. Polynuclear aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis. New York, 1976. S. 91 - 113.
4. Wiebel, Friedrich J.: Metabolism of monohydroxy-benzo(a) pyrenes by rat liver microsomes and mammalian cells in culture.
In: Archives of biochemistry and biophysics. New York/ London, 168 (1975), Nr 6, S. 609 - 621.
5. Mass, Marc J., Kaufman, David G.:
Benzo(a)pyrene quinone metabolism in tracheal organ cultures.
In: Biochemical and biophysical Research Communications. New York, N.Y., 89 (1979), Nr 3, S. 885 - 892.
6. Lind, Christina, Vadi, Helena, Ernster, Lars:
Metabolism of benzo(a)pyrene-3,6-quinone and 3-hydroxybenzo(a)pyrene in liver microsomes from 3-methylcholanthrene treated rats.
In: Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 190 (1978), Nr 1, S. 97 - 108.

7. Lesko, Stephan, Caspary, William, Lorentzen, Ronald, T'so, P.O.P.:
Enzymic formation of 6-oxobenzo(a)pyrene radical in rat liver homogenates from carcinogenic benzo(a)pyrene.
In: Biochemistry. American Chemical Society. Washington, D.C., I4 (1975), Nr I8, S. 3978 - 3984.
8. Yang, Shen K., Selkirk, James K., Plotkin, Elliot V., Gelbion, Harry V.
Kinetic analysis of metabolism of benzo(a)pyrene to phenols, dihydrodiols, and quinones by high pressure chromatography compared to analysis by aryl hydrocarbon hydroxylase assay, and the effect of enzyme induction.
In: Cancer Research. Baltimore, 35 (1975), Nr I2, S. 3642 - 3650.
9. Keller, Gabriela M., Turner, Chris R., Jefcoate, Colin R.:
Kinetic determinants of benzo(a)pyrene metabolism to dihydrodiol epoxides by 3-methylcholanthrene-induced rat liver microsomes.
In: Molecular Pharmacology. Baltimore, 22 (1982), Nr 2, S. 451 - 458.
10. Akagava, Shinobu, Momoi, Hironao, Yagi, Michiko:
Binding of benzo(a)pyrene with peroxidase and its oxidation by peroxidase-peroxide intermediate.
In: Cancer Biochemistry - Biophysics. London, 7 (1984), Nr 3, S. 213 - 229.
- II. Kirso, U., Belykh, L., Stom, D.:
Kinetics of benzo(a)pyrene oxidation in aqueous solution.
In: Oxidation Communications. Amsterdam. 1983, Nr 4(I-4), S. 35 - 44.
12. Kirso, U., Belykh, L., Stom, D., Irha, N., Urbas, E.:
Oxidation of benzo(a)pyrene by plant enzymes.
In: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Formation, Metabolism and Measures. Proceedings of the 7th International Symposium, Columbus, 1982. Columbus, Ohio: Battelle Press, 1983. S. 679 - 687.
13. *Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., 1962.*
Emanuel', N.M., Knorre, D.G..
Kurs chimičeskoj kinetiki (gomogennye reakcii).
Moskva: Vysšaja škola, 1962. 414 S.
/Lehrbuch für chemische Kinetik; russ./
14. Lorentzen, Ronald J., Caspary, William J., Lesko, Stephan A., Ts'o, P.O.P.:
The autoxidation of 6-hydroxybenzo(a)pyrene and 6-oxobenzo(a)pyrene radical, reactive metabolites of benzo(a)pyrene.
In: Biochemistry. American Chemical Society, Washington, D.C. I4 (1975), Nr I8, S. 3970 - 3977.

Chemisches Institut
der Akademie der Wissenschaften
der Estnischen SSR

Redationseingang:
18.4.1986

(Eingereicht von M. Gubergric)

Stuttgart, den 22.7.1991

Übersetzt von

Andrea Ulrich-v. Oertzen
Andrea Ulrich-von Oertzen
(Dipl.-Übers.)

