

Devdariani, T.V. Durmišidze, S.V.

AUFTRENNUNG UND IDENTIFIKATION DER OXIDATIONSPRODUKTE VON BENZO(a)-PYREN
IN PFLANZEN

Deutsche Vollübersetzung aus:

Metody biochimičeskich issledovanij rastenij.
Tbilisi: 1983, S. 101 - 107.

Russ.: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ
ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ БЕНЗ(a)ПИРЕНА В
РАСТЕНИЯХ

Vydelenie i identifikacija osnovnych produktov okislenija
benz(a)pirena v rastenijach

Die Untersuchung des Metabolismus von kanzerogenem Benzo(a)Pyren (BaP) ist abhängig von der Abtrennung und Identifikation der entstandenen Stoffwechselprodukte. Ihre Struktur darf durch das Aufarbeitungsverfahren der pflanzlichen Biomasse nicht verändert werden. Aufgrund der hohen Reaktionsfähigkeit von BaP und seinen Metaboliten ist dies jedoch nicht auszuschließen. In Abhängigkeit von dem gewählten Oxidationsprozeß muß mit unterschiedlichen Produkten gerechnet werden, und das Aufarbeitungsverfahren muß dementsprechend gewählt werden [1, 2].

Ziel dieser Untersuchung ist die Auftrennung und Identifikation der Hauptprodukte der Fermentation von 7,10-¹⁴C-BaP mit einem Eiweißpräparat aus Kürbiskernen.

Geräte, Methoden, Materialien

Spektralphotometer DFS-12, Gefriertrocknungsanlage OE 950, Szintillationszähler SL-30, UV-Chromatoskop, Spektralphotometer "Specol", sterile Anlage für die Gewinnung des Eiweißpräparates aus Kürbiskernen, $7,10^{-14}$ C-BaP (spez. Radioaktivität 0,48 Ci/M, Amersham England), Glasplatten für die Dünnschichtchromatographie 20 x 20 cm, Aceton, n-Hexan (chem.rein), Benzol (chem.rein), Ethanol destilliert, Zentrifuge K-24, Kieselgel mit Fluoreszenzindikator (254 nm) ("Siluphol"), konz. Schwefelsäure, Rotlicht.

Gewinnung des Eiweißpräparates aus den Kürbniskernen.

Durchführung der Versuche.

Die Kürbniskerne wurden in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7,2) homogenisiert. Das Homogenat wurde über ein Textilfilter abfiltriert und das gesamte Eiweiß mit kaltem Aceton gefällt. Es wurde umgefällt und lyophilisiert. Die Versuche wurden in einem Medium durchgeführt, das 2 ml Eiweißpräparat und 150 M $7,10^{-14}$ C-BaP in Na⁺-haltigem Puffer (pH = 6) enthielt. Die Reaktion wurde nach 60 Minuten durch Zugabe von 2 ml Aceton abgebrochen. Danach wurden 7 ml n-Hexan zugegeben und zentrifugiert. Die Phasen wurden getrennt und im Vakuum abgedampft.

Dünnschichtchromatographie.

Die Glasplatten wurden sorgfältig gereinigt und entfettet. Auf sie wurde das jeweilige Trennmittel als Brei aufgegossen, der 13 % Gips als Bindemittel enthielt. Die Platten wurden bei 110°C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde das konzentrierte Reaktionsgemisch aufgetragen und chromatographiert. Alle Schritte wurden bei Rotlicht durchgeführt, um einen photooxidativen Weiterabbau zu vermeiden. Es wurde zweidimensional chromatographiert. Als Referenzsubstanz wurde nichtradioaktives BaP aufgetragen.

Laufmittelsysteme: 1. Benzol: n-Hexan (1:15)
 2. Benzol: Ethanol (9:1)

Die Platten wurden unter UV-Licht untersucht, die Substanzflecken markiert und mit dem entsprechenden organischen Lösungsmittel eluiert. Für die spektralphotometrische Untersuchung der Substanzen wurden die gewonnenen Verbindungen weiter dünnschichtchromatographisch gereinigt. Hierzu wurden verschiedene Trennschichten mit verschiedenen Laufmittelsystemen verwendet:

BaP-Chinone: Aluminiumoxid, Benzol-Petrolether (30:70);

BaP-Dihydrodirole: Kieselgel (Siluphol, UV 254), Benzol-n-Hexan (40:60);

3-OH-BaP: Kieselgel (Siluphol, UV 254), Benzol-Petrolether (25:75).

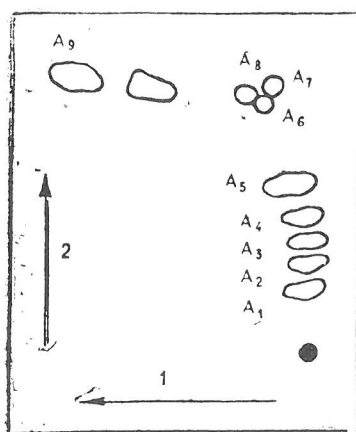


Abb. 1. Zweidimensionales Chromatogramm der Metaboliten von $7,10\text{-}^{14}\text{C}$ -BaP.

Lösungsmittel: 1) Benzol-n-Hexan (1:15)
2) Benzol-Ethanol (9:1)

Identifikation der Metaboliten von $7,10\text{-}^{14}\text{C}$ -BaP

Abb. 1 zeigt das zweidimensionale Chromatogramm der Metaboliten von $7,10\text{-}^{14}\text{C}$ -BaP auf Kieselgel; Laufmittelsysteme siehe Abb. 1. Es zeigt sich, daß mehrere Oxdationsprodukte voneinander getrennt werden. Ihre Identifikation kann anhand von Literaturangaben vorgenommen werden [3 - 6]. Diese Verbindungen zeichnen sich durch einen hohen Radioaktivitätsanteil aus. Am Startpunkt bleiben mehrere Substanzen sitzen, die nicht identifiziert werden konnten.

In Tabelle 1 ist eine Charakterisierung der Produkte angegeben, die dünnschichtchromatographisch aufgetrennt wurden. Die Substanzen $A_1 - A_4$ wurden von uns als Hydroxy-BaP bzw. als BaP-Dihydrodirole identifiziert. Sie zeichnen sich durch einen hohen Radioaktivitätsanteil aus und wurden wiederholt chromatographiert. Die Substanzen in A_5 mit $R_f = 0,46$ wurden als 3-OH-BaP identifiziert, und in $A_6 - A_8$ sind die isomeren BaP-Chinone enthalten. Alle BaP Umwandlungsprodukte wurden nochmals chromatographiert.

Bei der Bilanzierung der Radioaktivität wurde festgestellt, daß 42 % der Radioaktivität in den Zonen der BaP-Chinone enthalten ist. 27 % entfallen auf die BaP-Dihydrodirole und 12 % auf 3-OH-BaP. Weitere 19 % enthält die Zone der nicht-identifizierten Substanzen.

T a b e l l e 1

Charakterisierung der Metaboliten von BaP aus der enzymatischen Oxidation mit einem Eiweißpräparat aus Kürbiskernen. Identifikation anhand der dünnschichtchromatographischen Daten

Meta- bolit	Fluoreszenz unter UV-Licht	R _f	Radio- aktivität, Imp/min	mögliche Substanz
Start	dunkelbraun		8 040	Konjugationsprod.
A ₁	blau	0,6	5 120	BaP-Dihydrodiole
A ₂	violett	0,12	2 800	"
A ₃	orangerot	0,21	2 500	"
A ₄	violett	0,34	1 800	"
A ₅	violett	0,46	5 400	3-OH-BaP
A ₆	gelbl. orange	0,72	6 800	BaP-Chinon
A ₇	orange gelb	0,84	11 800	"
A ₈	blau	0,87	150	"
A ₉	violett	0,9	150	BaP

Folglich werden bei der enzymatischen Oxidation von 7,10-¹⁴C-BaP in der pflanzlichen Zelle in erster Linie stabile Verbindungen wie die BaP-Chinone gebildet.

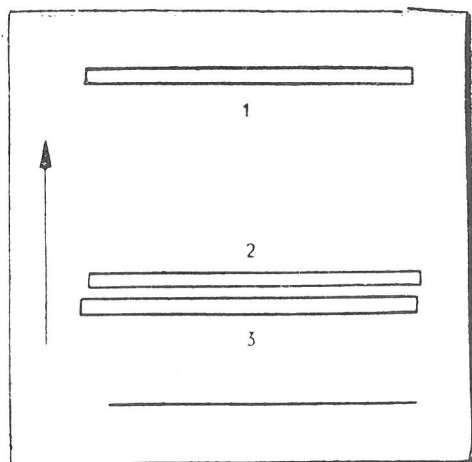


Abb. 2. Chromatogramm der BaP-Chinone (Aluminiumoxid, Benzol-petrolether = 30:70)

- 1) 6,12-BaP-Chinon (R_f = 0,95);
- 2) 1,6-BaP-Chinon (R_f = 0,36);
- 3) 3,6-BaP-Chinon (R_f = 0,25).

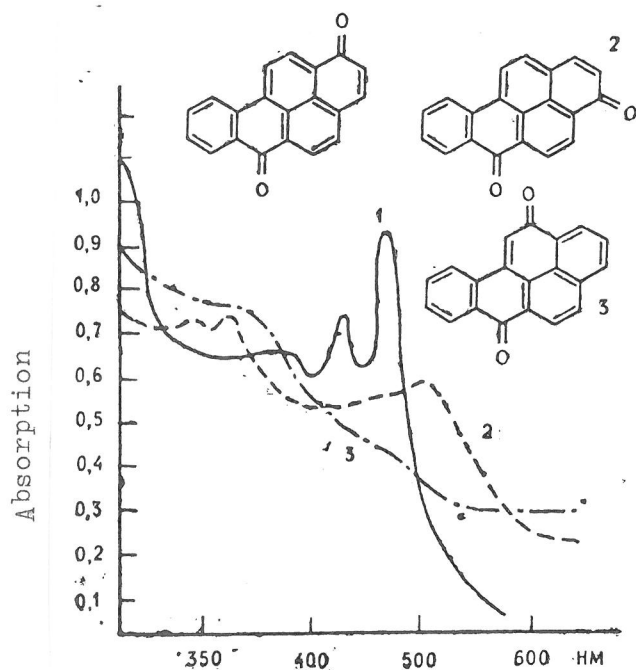


Abb. 3. UV-Vis-Absorptionsspektrum der BaP-Chinone in Benzol

- 1) BaP-1,6-Chinon; 2) BaP-3,6-Chinon;
3) BaP-6,12-Chinon

In den Abb. 2 und 3 sind die Chromatogramme der BaP-Chinone und ihre UV-Vis-Absorptionsspektren (in Benzol) dargestellt. Das Produkt, das als BaP-1,6-Chinon identifiziert werden konnte, änderte seine Farbe im Gemisch mit konzentrierter Schwefelsäure (Absorptionsmaximum im Bereich 430 und 477 nm; T_{pl} -295) von orange bis rot; BaP-3,6-Chinon (460 und 500 nm; T_{pl} -245) von orangerot bis olivbraun; BaP-6,12-Chinon (335, 370 nm; T_{pl} -327) war gelbbraun.

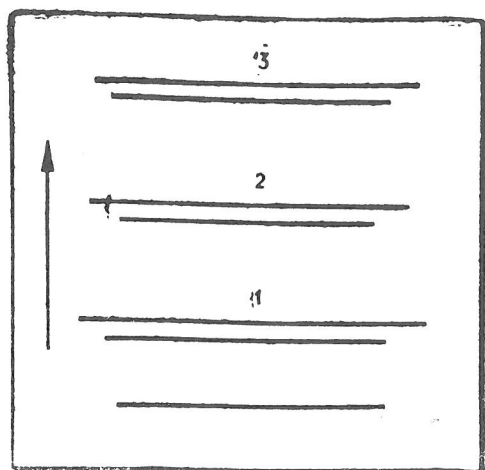


Abb. 4. Chromatogramm der BaP-Dihydrodirole (siluphol UV 254, Benzol:n-Hexan = 40:60)

- 1) BaP-9,10-Dihydrodiol ($R_f = 0,2$);
2) BaP-7,8-Dihydrodiol ($R_f = 0,53$);
3) BaP-4,5-Dihydrodiol ($R_f = 0,88$).

In Abb. 4 ist das Chromatogramm der BaP-Dihydrodirole dargestellt. Abb. 5 zeigt die UV-Vis-Absorptionspektren (in n-Octan). In der Literatur sind qualitative Nachweisreaktionen für Hydroxy-BaP und BaP-Dihydrodirole beschrieben. Sie beruhen auf einer Farbänderung, wenn sie Ammoniak ausgesetzt werden, von violett bis hellblau [7 - 10]. Nur BaP selbst verändert seine Farbe nicht. In unserem Fall änderten die Produktzonen A₁ - A₄ ihre Farbe von hellgelb bis grün. Daher konnten wir darauf schließen, daß es sich hierbei um Hydroxy- bzw. Dihydrodiol-derivate von BaP handelte.

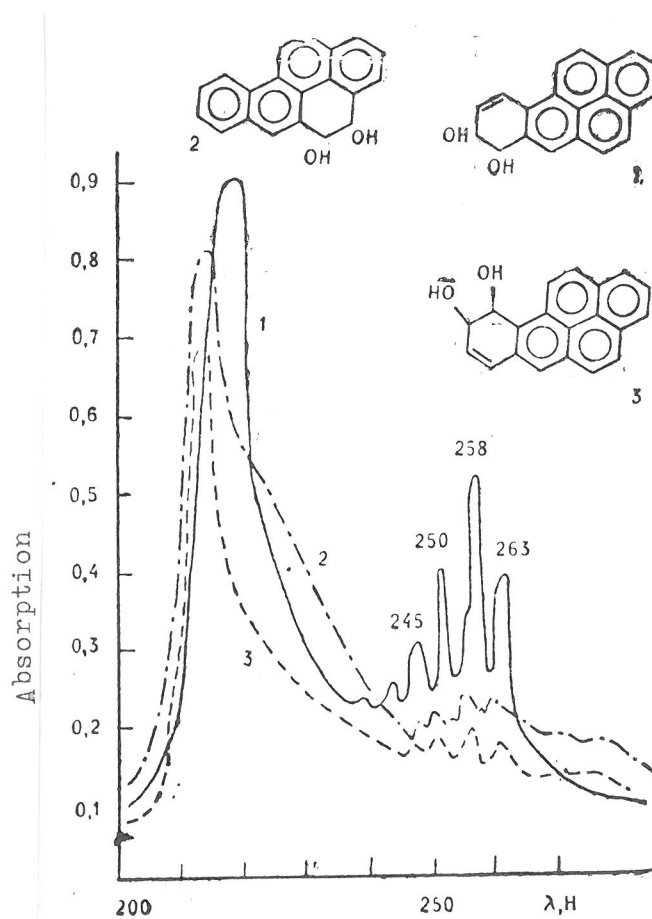


Abb. 5. UV-vis-Absorptionsspektren der BaP-Dihydrodirole (in n-Octan)
1) BaP-7,8-Dihydrodiol; 2) BaP-4,5-Dihydrodiol; 3) BaP-9,10-Dihydrodiol.

In Abb. 5 sind die Absorptionsspektren von BaP-7,8-dihydrodiol im Bereich von 210, 250, 255, 260 nm angegeben: von BaP-9,10-dihydrodiol im Bereich von 212, 244, 250, 255 nm, von BaP-4,5-dihydrodiol im Bereich von 214, 245, 250, 258, 263, 273 nm. Die Spektren wurden in n-Octan aufgenommen. Aussagen darüber, welche weiteren Oxidationsprodukte von BaP entstanden sein könnten, sind bislang schwer möglich.

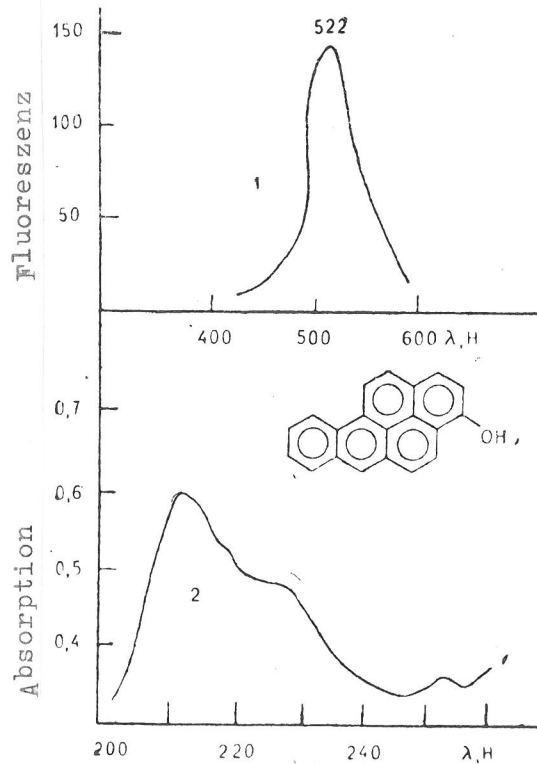


Abb. 6. Fluoreszenz- und Absorptionsspektren von 3-OH-BaP
1) in NaOH; 2) in n-Octan

In Abb. 6 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von 3-OH-BaP dargestellt. Sie wurden in 1 NaOH und in n-Octan aufgenommen. Das Fluoreszenzmaximum dieser Verbindung liegt bei 522 nm (in NaOH). Die Absorptionsmaxima liegen bei 210, 226, 260 und 270 nm (in Octan).

Es bilden sich bei der enzymatischen Oxidation von 7,10-¹⁴C-BaP in beträchtlichem Ausmaß BaP-Chinone.

L i t e r a t u r

1. Hancock, J.L., Applegate, H.G., Dodd, J.D.: Polynuclear aromatic hydrocarbons on leaves.
In: Atmospheric environment. Oxford, 4 (1970), Nr 4, S. 363 - 370.
2. Schamp, N., Wassenhove, F. van: Determination of benzo(a)pyrene in bitumen and plant.
In: Journal of chromatography. Amsterdam, 69 (1972), Nr 2, S. 421 bis 425.
3. Holder, G., Yagi, H., Levin, W., Lu, A.Y.H., Jerina, D.M.: Metabolism of benzo(a)pyrene. III. An evaluation of the fluorescence assay.
In: Biochemical and biophysical research communications. New York, 65 (1975), Nr 4, S. 1363 - 1370.
4. Kinoshita, Nadao, Shears, Barbara, Gelboin, Harry V.: K-region and non-K-region metabolism of benzo(a)pyrene by rat liver microsomes.
In: Cancer research. Philadelphia, P.A., 33 (1973), Nr 8, S. 1937 bis 1943.
5. Wang, Irene Y., Rasmussen, Ronald E., Crocker, T. Timothy: Isolation and characterization of an active DNA-binding metabolite of benzo(a)pyrene from hamster liver microsomal incubation systems.
In: Biochemical and biophysical research communications. New York, 49 (1972), Nr 4, S. 1142 - 1149.
6. Trenck, Th.v.d., Sandermann, H.: Oxygenation of benzo(a)pyrene by plant microsomal fractions.
In: FEBS letters for the rapid publication of short reports in biochemistry, biophysics, and molecular biology. Federation of European Biochemical Societies. Amsterdam, 119 (1980), Nr 2, S. 277 - 281.
7. Клар Э. Полициклические углеводороды, М., «Химия», 1971, т. 2, с. 159-161.
Klar, E.
Polícikličeskíe uglevodorody.
Moskva: Verlag "Chimija", 1971, Bd 2, S. 159 - 161.
Übersetzung von:
Clar, Erich
Polycyclic hydrocarbons.
London: Academic Press, 1964.
8. Nebert, D.W., Gelboin, H.V.: Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme.
In: Journal of biological chemistry. Baltimore, Md., 243 (1968), Nr 23, S. 6242 - 6249.
9. Sims, P.: The metabolism of benzo(a)pyrene by rat-liver homogenates.
In: Biochemical pharmacology. London, 16 (1967), Nr 4, S. 613 bis 618.

10. Waterfall, I.F., Sims, P.: Epoxy derivatives of aromatic polycyclic hydrocarbons. The preparation and metabolism of epoxides related to benzo(a)pyrene and to 7,8- and 9,10-dihydrobenzo(a)pyrene.
In: Biochemical journal. London, 128 (1972), Nr 2, S. 265 - 277.
-

Stuttgart, den 12. August 1986

übersetzt von

Ottmar Pertschi
(Ottmar Pertschi)
Dipl.-Übersetzer