

ОКИСЛЕНИЕ БЕНЗ(а)ПИРЕН-ХИНОНОВ.

1. ВОЗДЕЙСТВИЕ КИСЛОРОДА ВОЗДУХА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

(Представил М. Губергриц)

Окисление бенз(а)пирена (БП) и других канцерогенных полиядерных аренов (ПА) исследовано, в основном, в биологических системах — на клеточном, субклеточном и организменном уровнях животных, при этом основное внимание уделено образующимся продуктам превращения, часть которых и является «истинными» канцерогенами [1-6]. Кинетика метаболического окисления БП и его производных изучена мало [7-10]. Ввиду экспериментальных трудностей (высокая гидрофобность ПА) в литературе также мало данных по реакциям окисления при низких концентрациях канцерогенных ПА в водных растворах. Живые же организмы, контактируя с загрязненной ПА биосферой, получают их через пищевые продукты, лекарства и другие источники именно в сверхмалых дозах. При этом ПА претерпевают в окружающей среде (самоочищение) или в организме (метаболизм) окислительное превращение.

Ранее нами исследовано окисление канцерогенного БП в водном растворе под действием кислорода воздуха и растительных ферментов [11, 12]; на данном этапе изучение кинетических показателей окисления производных БП, которые образуются в процессе его окисления, — хинонов и фенолов, позволяет в какой-то мере раскрыть механизм окисления канцерогенных ПА, что и является целью настоящей работы.

Методика исследования

БП-хиноны синтезировали фотохимическим методом (УФ-излучение ртутной лампы при длине волны $\lambda_{\text{макс}}$ 360 нм и длительности экспозиции 1 ч) из БП с концентрацией 2 мМ в ацетоновом растворе (БП фирмы «Fluka», Швейцария). Фракцию хинонов выделяли из реакционной смеси при помощи тонкослойной хроматографии на активной окиси алюминия (по Брокману II) мобильной фазой — петролейный эфир: хлороформ (9:1). Дальнейшее разделение изомерных хинонов проводили тем же методом, используя в качестве растворителя бензол. Хиноны идентифицировали спектрофотометрически на приборе «Specord M 40» (ГДР) после их очистки на пластинках Силуфол (ЧССР).

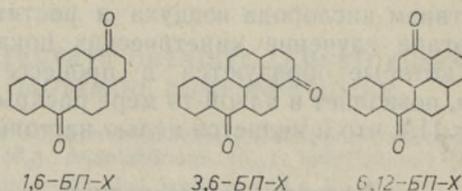
Опыты проводили с БП-хинонами в водном растворе в реакторах объемом 4,0 л, при механическом перемешивании, в интервале концентраций 5—50 нМ (нижним пределом служили возможности анализа, верхним — растворимость соединения), при рН 7,6 (0,02 М фосфатный буфер) и комнатной температуре. В опытах по перекисному окислению добавляли перекись водорода (х. ч.) в концентрации от 5,9 до 73,5 мМ. Через заданные промежутки времени отбирали пробы (500 мл) реакционной смеси, из которых БП-хиноны экстрагировали предварительно очищенным диэтиловым эфиром. После удаления экстрагента пробы растворяли в метаноле и подвергали количественному анализу либо

спектрофотометрически, либо методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе «Кнауер» (ФРГ) с колонкой ОДС Зорбакс 6×150 мм (диаметр частиц 5 мкм). Соединения элюировали предварительно очищенным метанолом. Условия хроматографирования: скорость потока 1,5 мл/мин, давление 3,0 МПа, температура 30 °С. УФ-детектирование проводили при 368, 435 и 469 нм для 6,12-, 1,6- и 3,6-БП-хинонов соответственно, время выхода — 5 мин при использовании в качестве элюента 99% метанола. Элюенты при хроматографии: смесь метанола с водой (2:8) и метанол, концентрация последнего в первые 10 мин составляла 10% и в последующие 30 мин — 90%. Калибровку проводили БП-хинонами в количествах 0,1—2,0 нмоля.

Методика определения 6-окси-БП отличалась от предыдущей, что обусловлено относительно меньшей стабильностью данного производного БП. Опыты по авто- и перекисному окислению 6-окси-БП (синтезирован М. Броницкой в ОНЦ АМН СССР, Москва) проведены в 35%-ном растворе этанола при pH 7,6 (0,02 М фосфатный буфер), концентрации реагента 1—2 мкМ. Через заданные промежутки времени отбирали пробы объемом 80 мкл для анализа методом ВЭЖХ. В качестве элюента использовали смесь метанола с водой, расход которой составлял 1,5 мл/мин и состав программировался линейно от 10 до 99% метанола в течение 15 мин. Количественное определение 6-окси-БП проводили по флуоресценции реагента при 402 нм, длина волны возбуждения — 315 нм, детектор фирмы «Perkin-Elmer» (США), чувствительность метода 0,2 нмолей.

Результаты и обсуждение

Структурные формулы БП-хинонов таковы:



Кинетические показатели рассчитывали дифференциальным методом [13], пользуясь данными таблицы. Судя по кинетическим кривым (рис. 1), взаимодействие всех БП-хинонов с кислородом протекает с близкой скоростью по первому порядку относительно субстрата, порядок реакции по

**Начальные скорости ($v_0 \cdot 10^{-12}$ моль \cdot л $^{-1}$ \cdot с $^{-1}$) автоокисления
трех изомерных бенз(а)пирен-хинонов при различных исходных концентрациях
($c_0 \cdot 10^{-9}$ М) в водном растворе (условия опытов см. в тексте)**

6,12-БП-хинон		1,6-БП-хинон		3,6-БП-хинон	
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				

БП-хинонам $n_c = 0,983 \pm 0,042$ и эффективная константа скорости $k_{\text{эфф}} = (1,277 \pm 0,069) \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$, что почти на порядок выше таковой для БП ($k_{\text{эфф}} = 1,68 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$). Механизм автоокисления БП-хинонов отличается от механизма окисления БП, где предполагалось автоингибирование продуктами превращения [12]. Судя по $n_c > n_t$ (n_t — порядок реакции по времени), в случае окисления хинонов такой эффект не наблюдался.

При совместном окислении БП и его хинонов (рис. 2) отмечено практически полное ингибирование реакции превращения ПА в начальных

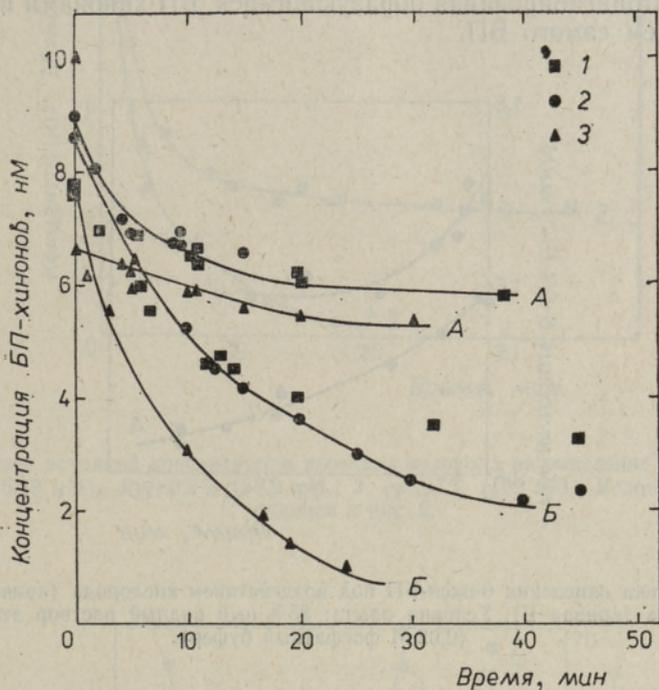


Рис. 1. Кинетика окисления 3,6- (1), 1,6- (2) и 6,12-БП-хинонов (3) под воздействием кислорода (кривые А) и перекиси водорода (кривые Б). Условия опыта: рН 7,6 (0,02 М фосфатный буфер), $c_0 \text{H}_2\text{O}_2 = 0,05\%$ (146,7 мМ).

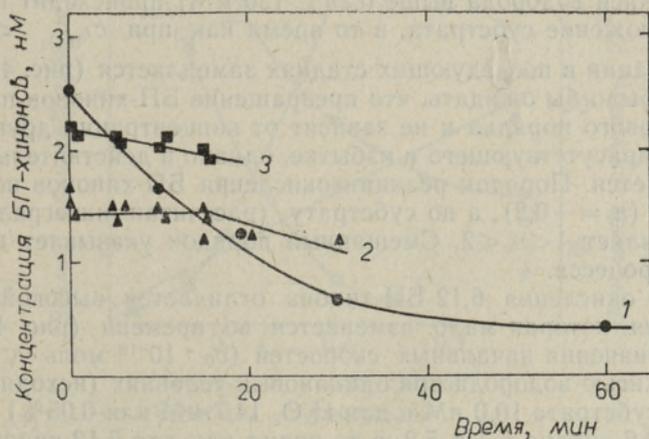


Рис. 2. Кинетика автоокисления одного бенз(а)пирена (1) и совместно с 6,12-БП-хиноном (2) и смесью изомерных хинонов (3). Условия опыта: рН 7,6 (0,02 М фосфатный буфер).

стадиях процесса. Лишь после окисления основной части хинонов (более 60%) началось превращение БП с такой же скоростью, как и при раздельном окислении, т. е. продукты дальнейшей деградации хинонов не обладали антиокислительными свойствами. В то же время присутствие БП не оказывало влияния на скорость окисления его хинонов (рис. 2). Таким образом, подтвердилась гипотеза [12], что БП-хиноны могут играть роль автоингибиторов при окислении БП.

Автоокисление 6-окси-БП, т. е. соответствующего фенола, протекает также с замедлением процесса (рис. 3), что предполагает наличие эффекта автоингибирования образующимися БП-хинонами по аналогии с окислением самого БП.

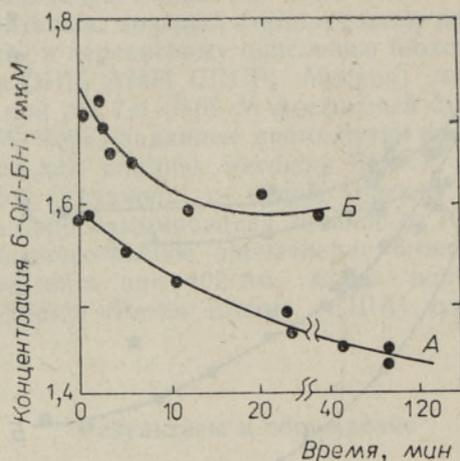


Рис. 3. Кинетика окисления 6-окси-БП под воздействием кислорода (кривая А) и перекиси водорода (кривая Б). Условия опыта: 35%-ный водный раствор этанола, рН 7,6 (0,02 М фосфатный буфер).

Наличие в системе перекиси водорода значительно увеличивает скорость превращения канцерогена и его хинонов (рис. 4 и 5). При этом для 1,6- и 3,6-БП-хинонов наблюдаются близкие кинетические закономерности окисления, скорость которой определяется количеством H_2O_2 в системе (см. концентрационную зависимость на рис. 4, 5). При концентрации перекиси водорода выше 0,25% (20 мМ) происходит практически полное разложение субстрата, в то время как при $c_{H_2O_2} < 0,02\%$ процесс деградации в последующих стадиях замедляется (рис. 4).

Можно было бы ожидать, что превращение БП-хинонов протекает по реакции первого порядка и не зависит от концентрации другого реагента (H_2O_2), присутствующего в избытке, однако в действительности этого не наблюдается. Порядок реакции окисления БП-хинонов по H_2O_2 близок к нулю ($n_c \sim 0,2$), а по субстрату (рассчитан интегральным методом) составляет $1 < n_c < 2$. Смешанный порядок указывает на сложный характер процесса.

Реакция окисления 6,12-БП-хинона отличается высокой скоростью превращения, которая мало изменяется во времени (рис. 4). Соответствующие значения начальных скоростей ($v_0 \cdot 10^{-12}$ моль \cdot л $^{-1}$ \cdot с $^{-1}$) окисления перекисью водорода при одинаковых условиях (исходная концентрация для субстрата 10,0 нМ и для H_2O_2 14,7 мМ или 0,05%) составляли для 1,6- и 3,6-хинона 6,7 и 5,2, в то время как для 6,12-хинона на порядок больше — 61,7. Следовательно, механизм превращения 6,12-хинона отличается от такового для остальных БП-хинонов. Причина этого явления пока остается невыясненной.

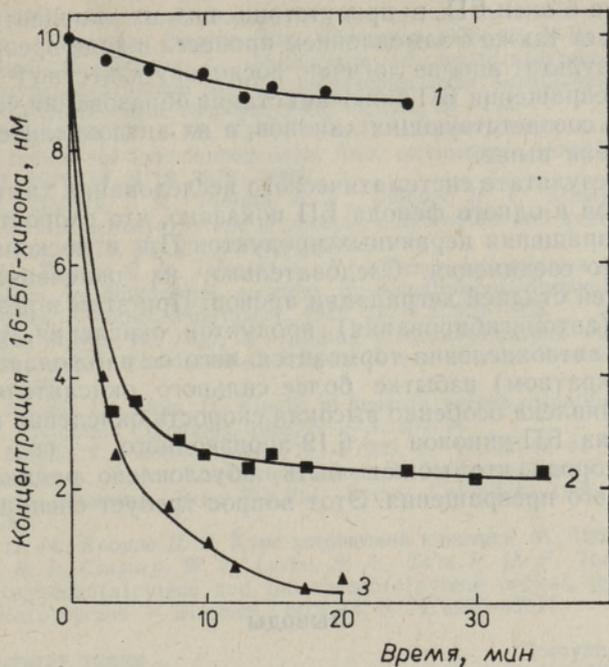


Рис. 4. Влияние исходной концентрации перекиси водорода на окисление 1,6-БП-хинона: 1 — 0,02% (5,89 мМ), 2 — 0,2% (58,9 мМ), 3 — 0,37% (109 мМ). Условия опыта см. в подписи к рис. 2.

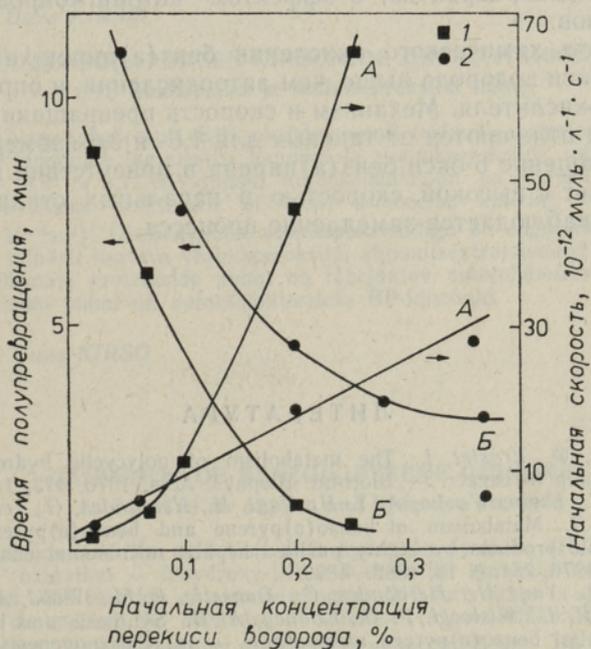


Рис. 5. Влияние исходной концентрации перекиси водорода на начальную скорость (кривые А) и время полупревращения (кривые Б) для 3,6- (1) и 1,6-БП-хинонов (2). Условия опыта см. в подписи к рис. 3.

Окисление 6-окси-БП в присутствии низких концентраций (0,1%) H_2O_2 протекает также с замедлением процесса в ходе превращения (рис. 3). Такой результат вполне логичен, поскольку известно [8, 14], что общий механизм превращения БП включает стадии образования через гидрокси-производные соответствующих хинонов, а их антиокислительная способность выявлена выше.

Итак, в результате систематического исследования химического окисления хинонов и одного фенола БП показано, что скорость дальнейшей реакции превращения первичных продуктов ПА в несколько раз выше, чем исходного соединения. Следовательно, их окисление не является лимитирующей стадией деградации аренов. При этом в результате взаимодействия (автоингибирования) продуктов окисления, т. е. хинонов с ПА, процесс автоокисления тормозится, чего не наблюдается при достаточном (10^6 -кратном) избытке более сильного окислителя — перекиси водорода. Выявлена особенно высокая скорость окисления наиболее симметричного из БП-хинонов — 6,12-производного — под воздействием перекиси водорода, что может быть обусловлено радикально-цепным механизмом его превращения. Этот вопрос требует специального исследования.

Выводы

1. Автоокисление трех изомерных бенз(а)пирен-хинонов протекает по реакции первого порядка с близкой скоростью, которая почти на порядок выше, чем для самого полиарена.

2. Бенз(а)пирен-хиноны обладают антиокислительными свойствами относительно окисления исходного полиарена.

3. Автоокисление 6-окси-бенз(а)пирена протекает с высокой скоростью в начальных стадиях процесса, в дальнейшем реакция тормозится, что связано, вероятно, с эффектом автоингибирования образующихся хинонов.

4. Скорость химического окисления бенз(а)пирен-хинонов под действием перекиси водорода выше, чем автоокисления, и определяется концентрацией окислителя. Механизм и скорость превращения 6,12-бенз(а)пирен-хинона отличаются от таковых для 1,6- и 3,6-изомеров.

5. Превращение 6-окси-бенз(а)пирена в присутствии перекиси водорода протекает с высокой скоростью в начальных стадиях реакции, в дальнейшем наблюдается замедление процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Pierre, I. W., Ernster, L. The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **473**, 149—186.
2. Wood, A. W., Levin, W., Lu, A. Y. H., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D. M., Conney, A. H. Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes. — *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, N 16, 4882—4890.
3. Jerina, D. M., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P. M., Wood, A. W., Levin, W., Chang, R. L., Wislocki, P. G., Conney, A. H. Synthesis and biological activity of potential benzo(a)pyrene metabolites. — In: *Carcinogenesis*, 1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis. New York, 1976, 91—113.
4. Wiebel, F. I. Metabolism of monohydroxybenzo(a)pyrenes by rat liver microsomes and mammalian cells in culture. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, **168**, N 6, 609—621.

5. Mass, M. J., Kaufman, D. G. Benzo(a)pyrene quinone metabolism in tracheal organ cultures. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, 89, N 3, 885—892.
6. Lind, C., Vadi, H., Ernster, L. Metabolism of benzo(a)pyrene-3,6-quinone and 3-hydroxybenzo(a)pyrene in liver microsomes from 3-methylcholanthrene-treated rats. — Arch. Biochem. Biophys., 1978, 90, N 1, 97—108.
7. Lesko, S., Lorentzen, W. C. R., Ts'o, P. O. P. Enzyme formation of 6-oxobenzo(a)-pyrene radical for liver homogenates from carcinogenic benzo(a)pyrene. — Biochem. J., 1975, 14, N 18, 3978—3984.
8. Yang, S. K., Selkirk, J. K., Plothin, E. V., Gelboin, H. V. Kinetic analysis of the metabolism of benzo(a)pyrene to phenols, dihydrodiols and quinones by HPLC. — Cancer Res., 1975, 35, N 12, 3642—3650.
9. Keller, G. H., Turner, C. R., Jefcoate, C. R. Kinetics determinates of benzo(a)pyrene metabolism to dihydrodiol epoxides by 3-methylcholanthrene-induced rat liver microsomes. — Molec. Pharmacol., 1982, 22, N 2, 451—458.
10. Akagava, Sh., Momoi, H., Yagi, M. Binding of benzo(a)pyrene with peroxidase and its oxidation by peroxidase-H₂O₂-intermediate. — Cancer Biochem. Biophys., 1984, 7, 213—229.
11. Kirso, U., Belykh, L., Stom, D. Kinetic of benzo(a)pyrene oxidation in aqueous solution. — Oxidation Commun., 1983, N 1—4, 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. Proc. 7th Int. Symp. Columbus, 1982. Columbus, 1983, 679—687.
13. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. М., 1962.
14. Lorentzen, R. I., Caspary, W. J., Lesko, S. 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. — Biochem., 1975, 14, N 18, 3970—3977.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/IV 1986

MariKa KOSK, Uuve KIRSO

BENSO(a)PÜREEN-KINOONIDE OKSÜDATSIIOON

1. Õhuhapniku ja vesinikperoksiidi toime

On uuritud benzo(a)püreeni (BP) oksüdatsioonil tekkivate vaheproduktide — 6-hüd-roksü-BP ja BP-kinoonide lagunemist hapniku ja vesinikperoksiidi toimel. Kõigi kolme BP-kinooni: 1,6-, 3,6- ja 6,12-BP-kinooni autooksüdatsioon on esimest järku reaktsioon, mille kulgemise kiirus praktiliselt ei olene isomeerse kinooni struktuurist ($k_{\text{eff}} = (1,277 \pm 0,069) \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$). Oksüdatsioon vesinikperoksiidiga on segajärku (1—2) ja tema algkiirus sõltub niihästi lisatava vesinikperoksiidi algkontsentratsioonist kui ka BP-kinooni struktuurist. Mõlemate protsesside puhul on täheldatav autoinhibeerimine. On näidatud, et BP oksüdatsiooni puhul on autoinhibiitoriteks BP-kinoonid.

MariKa KOSK, Uuve KIRSO

OXIDATION OF BENZO(a)PYRENE QUINONES

1. Effect of air oxygen and hydrogen peroxide

The autoxidation and the oxidation with hydrogen peroxide (H₂O₂) 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 ($k_{\text{eff}} = (1,277 \pm 0,069) \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$). The oxidation with H₂O₂ is the reaction of mixed first-second order. The estimation of concentration effect of H₂O₂ 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.