

Б. СЕРГЕЕВ, М. ГУБЕРГРИЦ, В. КОБЛЯКОВ

ФОТОИНИЦИИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕНЗ(А)ПИРЕНА N-ОКСИПИРИДИНОМ

В процессах активированного окисления канцерогенных полициклических углеводородов (ПАУ), будь то под действием физико-химических агентов или в биологических системах, присоединение кислорода к молекуле химического канцерогена происходит как правило многими путями и по различным механизмам. Выявление факторов, способствующих направленному окислению ПАУ по определенному механизму с однозначной локализацией кислорода в молекуле, представляет существенный теоретический и практический интерес.

Принято считать, что возможные механизмы метаболического окисления канцерогенов в клетке под действием монооксигеназ (согласованный или консеквативный) так или иначе включают в себя активацию кислорода через образование и распад комплекса: фермент—субстрат—кислород. В неферментативных системах, имитирующих механизм действия монооксигеназ, гидрокселирование молекулы ПАУ происходит либо через активацию кислорода с переносом к последнему электронов от окисляющихся ионов металлов переменной валентности (в комплексе), либо непосредственно переносом кислорода в субстрат, например, из N-оксили оксоанионов солей металлов [1]. В [2] исследованы взаимодействия ароматических молекул с N-оксидами ароматической же природы, которые аналогично ферментативному гидрокселированию обуславливают т. н. NJH-сдвиг: если в процессе окисления субстрата участвует атом, содержащий заместитель (дейтерий, тритий или галоген), то часть этого заместителя не выделяется в среду, а «сохраняется» в молекуле, мигрируя к соседнему скелетному атому углерода. Примером этого служит неферментативная изомеризация 3,4-толуола D-оксида в гидрокситолуен 3D [3].

Воздействие УФ-излучения на систему, реагирующую с N-оксипиридином (РуО), обеспечивает особенно высокую степень «сохранения» дейтерия в молекуле субстрата. Соответственно, в подобном эксперименте с окислением нафталина, т. е. в случае простейшего ПАУ, установлено образование 1,2-эпоксинафталина и 1-гидроксинафталина [2]. Приведенные соображения указывают на возможность использования РуО в качестве окисляющего агента при совокупном действии УФ-излучения в целях определения активных центров в молекуле ПАУ, реагирующих в системе с непосредственным переносом кислорода в субстрат, и выбора путей, по которым такой перенос происходит.

Методика исследования

В качестве модельного канцерогенного ПАУ использован широко известный и хорошо изученный индикаторный канцероген — бенз(а)пирен (БП; реактив фирмы Fluka A. G., Buchs S. G., Швейцария). Раствор БП в ацетонитриле х. ч. при неизменной во всех опытах концентрации $0,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л, температуре 20 ± 1 °С и варьируемой концентрации PuO (реактив той же фирмы) в пределах от 10^{-3} до 10^{-1} моль/л подвергался облучению в цилиндрическом стеклянном сосуде емкостью 6 мл с притертой кварцевой крышкой, магнитной мешалкой и устройством для подачи кислорода. Источником излучения служила ртутно-кварцевая лампа СВД-120А.

Сравнительно высокая начальная концентрация БП выбрана нами в расчете на обеспечение достаточного для дальнейших исследований выхода продуктов окисления ПАУ. Выбор ацетонитрила в качестве растворителя обусловлен следующими обстоятельствами: высокой устойчивостью к фотоиницированному окислению вообще; несоответствием области его максимального светопоглощения волновому диапазону испускания источника и, соответственно, инертностью в данной реагирующей системе; получением минимального набора продуктов окисления БП, свойственного природе данного растворителя.

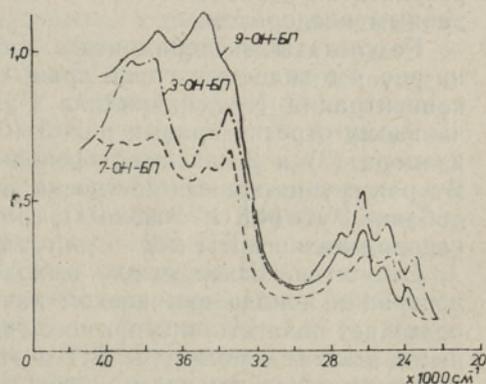
Основной эксперимент проведен при неизменной интенсивности облучения $\approx 3,65 \cdot 10^{16}$ квант/мл·с, величина которой определена с помощью ферриоксалатной актинометрии [8]. Максимальная длительность опыта 5 мин позволила избежать появления в составе реакционной смеси продуктов окисления БП, не связанного с взаимодействием его с PuO (что было проверено в специальном эксперименте). Действительно, соответствующие хроматограммы и спектры (таблица, рис. 1) свидетельствуют о наличии в реакционной смеси в этих условиях всего трех, кроме исходного БП, компонентов, причем два из них представляют собой трудноразделимую смесь.

Характеристики выделенных продуктов окисления БП
(растворитель гексан—этилацетат 10 : 3)

Продукты окисления БП (по порядку выхода)	Максимумы флуоресцентного спектра в этаноле при комнатной температуре	R_f	Проявление	
			под УФ	под УФ с аммиаком
БП		0,45	фиол.	фиол.
7-ОН-БП	426	0,21	гол.	оранж.
3-ОН-БП	428	0,18	гол.	зел.
9-ОН-БП	418, 447	0,15	фиол.	зел.

Рис. 1. Спектры поглощения продуктов окисления БП в этаноле.

Изучение состава реакционной смеси производилось с помощью хроматографического разделения ее в тонком слое силикагеля Л40/100 (Чехословакия) при использовании в качестве растворителя смеси гексан—этилацетат 10 : 3. Определение концентрации исходных реагентов (БП, PuO) и идентификация продуктов окисления производились на основе сопоставления



спектров поглощения (спектрофотометр UV-VIS, ГДР) и флуоресценции (прибор ДФС-12) для выделенных компонентов и эталонных гидроксипроизводных БП [4], а также по хроматограммам (окраска их при проявлении аммиаком, величина R_f). Попытка количественного разделения смеси двух продуктов окисления оказалась неудачной, и идентификация ее (таблица) трудноразделимых компонентов проведена лишь по качественным показателям.

В дополнение к указанному основному циклу экспериментов, цель которых заключалась в изучении состава реакционной смеси, идентификации продуктов окисления БП и определении влияния варьируемых исходных условий на выход этих продуктов, нами было проведено несколько серий опытов вспомогательного характера. Задача последних — составить представление о возможном участии в процессе синглетно-возбужденного кислорода, присутствующего в фотоницированных системах, а также о вероятности свободно-радикального механизма образования указанных продуктов окисления БП.

В первой серии была организована дополнительная продувка системы током кислорода для дополнительного обогащения ее синглетно-возбужденным кислородом. Во втором случае в смесь вводился в варьируемой концентрации активный ингибитор свободно-радикальных процессов окисления — 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (ионол). Его присутствие [5] не оказывает заметного влияния на скорость фотоницированного окисления БП. В специальных холостых опытах установлена инертность ацетонитрила относительно растворенного в нем RuO в условиях предпринятого эксперимента.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение продуктов, выделенных из реакционной смеси в основном цикле опытов, показывает, что они представляют собой гидроксипроизводные БП: 7-ОН-БП и трудноразделимую смесь 3-ОН-БП и 9-ОН-БП. Кинетические кривые, характеризующие накопление в системе (при постоянной исходной концентрации $\text{RuO} \approx 0,9 \cdot 10^{-2}$ моль/л) этих продуктов, приведены на рис. 2. Они свидетельствуют о принципиально сходной картине накопления во времени 7-ОН-БП и смеси остальных двух изомеров.

На рис. 3 изображено изменение молярной концентрации в растворе изомера (7) и смеси изомеров (3) и (9) как функция начальной концентрации в нем N-оксипиридина. Начиная с концентрации последнего $4,5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, наблюдается некоторое уменьшение выхода 7-ОН-БП при продолжающемся незначительном накоплении смеси фенольных изомеров (3) и (9).

Дополнительный эксперимент с продувкой кислорода показал, что никаких изменений в выходе всех продуктов окисления БП в этом случае не происходит и они, как можно легко предположить, не являются результатом взаимодействия в данной системе БП с синглетно-возбужденным кислородом.

Результаты эксперимента с добавкой в систему ионола приведены на рис. 4 в виде двух групп кривых. Одна из них относится к невысокой концентрации N-оксипиридина в растворе на уровне, отвечающем начальному отрезку кривых рис. 3 ($0,45 \cdot 10^{-2}$ моль/л). Это — кривая 3 для изомера (7) и 2 для смеси фенольных изомеров 3-ОН-БП и 9-ОН-БП. Вторая группа кривых построена для случая десятикратного увеличения добавки RuO ($4,5 \cdot 10^{-2}$ моль/л), соответственно, — кривая 1 для 7-гидроксипроизводного БП и 2 — для смеси изомеров 3-ОН- и 9-ОН-БП.

Отсутствие связи между выходом изомера (7) и увеличением концентрации ионола при низком начальном содержании RuO в растворе позволяет полагать, что прямого гидроксирования свободно-радикальными агентами молекулы БП в этом положении не происходит, а оно протекает обычным путем — непосредственным переносом к ней кисло-

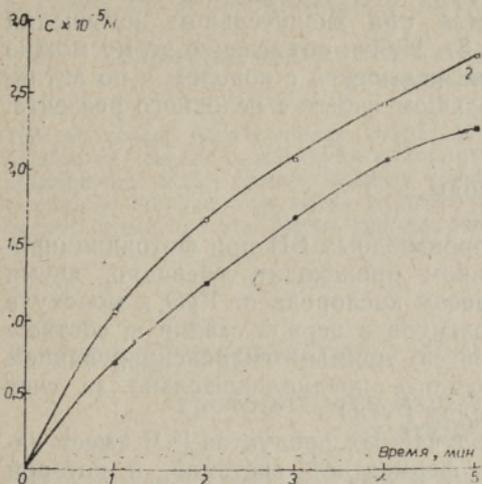


Рис. 2. Изменение во времени молярной концентрации продуктов фотоиницированного окисления БП N-окси- пиридином в ацетонитриле (исходные концентрации реагентов, соответственно, $0,7 \cdot 10^{-3}$ и $0,9 \cdot 10^{-2}$ моль/л). 1 — накопление 7-ОН-производного БП, 2 — накопление смеси 9-ОН- и 3-ОН-БП.

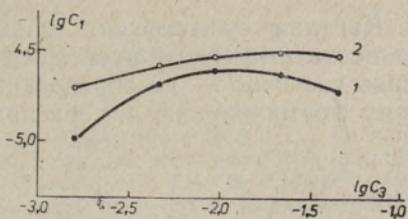
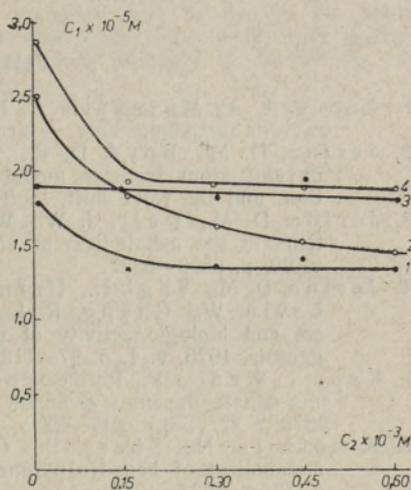


Рис. 3. Зависимость молярной концентрации в реакционной смеси (C_1) продуктов окисления БП от начального содержания в системе N-окси- пиридина (C_3). 1 — для 7-ОН-БП, 2 — для смеси изомеров (3) и (9) после 5-минутного взаимодействия.

Рис. 4. Изменение молярной концентрации в реакционной смеси (C_1) продуктов окисления БП (2 — для смеси (3) и (9) изомеров, 3 — для 7-ОН-БП) как функция содержания в растворе ингибитора ($C_2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при низкой концентрации N-окси- пиридина ($0,45 \cdot 10^{-2}$ моль/л) и при высоком его содержании ($4,5 \cdot 10^{-2}$ моль/л) (1 — для 7-ОН-БП, 4 — для смеси 3-ОН-БП и 9-ОН-БП).



рода из RuO с образованием 7,8-эпоксида БП с дальнейшим разрывом одной из эпоксидных связей и формированием 7-ОН-БП как конечного продукта.

Добавка ионола ингибирует образование одного из компонентов смеси 3- и 9-ОН-изомеров (рис. 4, 2). Поскольку образование первого из них особенно вероятно через 9,10-эпоксид БП по тому же механизму, о котором речь шла выше для изомера (7), а образование 3-ОН-производного БП — путем непосредственного гидроксирования [9], можно считать, что ингибирующее действие ионола в данном случае относится именно к формированию 3-ОН-БП. Вклад последнего в сумму изомеров 9- и 3-ОН-БП, судя по полученным нами данным и кривой 2 рис. 4, должен составить $\approx 40\%$, а доля изомеров от суммы всех идентифицированных в растворе фенольных продуктов окисления БП на основном изучаемом участке (рис. 2) составит приблизительно (%): 7-ОН 46,0, 9-ОН 32,5 и 3-ОН-БП 21,5 (их примерное соотношение 2,1 : 1,4 : 1). Предположительным источником образования 3-ОН-БП может явиться перекисный радикал RuOO^{\cdot} , формирование которого в этих условиях представляется вероятным.

Картина существенно усложняется при значительном повышении концентрации PuO в растворе (рис. 3). Найти объяснение этому можно лишь частично — по образованию им комплекса с ионолом и по активному формированию димера при большом избытке исходного реагента.

Выводы

Формирование изомерных гидроксипроизводных БП при фотоиницированном окислении его N-оксипиридином происходит, очевидно, двумя путями: 1) непосредственным переносом кислорода от PuO к молекуле ПАУ с образованием 7,8- и 9,10-эпоксидов в первой стадии и, соответственно, 7- и 9-фенолов — во второй, 2) прямым гидроксильрованием арена с образованием 3-ОН-производного, предположительно за счет взаимодействия с перекисным радикалом PuOO^\cdot .

Указанная система по набору получаемых продуктов [6, 7] имеет известное сходство с микросомальной ферментной системой, в которой также формируются 7- и 9-фенолы БП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Метелица Д. И., Скурко М. Е. Ферменты-монооксигеназы и пути их моделирования. — Успехи химии, 1975, т. 44, с. 868—896.
2. Jerina, D. M., Boyd, D. R., Daly, J. W. Photolysis of pyridine-N-oxide: an oxygen atom transfer model for enzymatic oxygenation, arene oxide formation, and the NJH shift. — Tetrahedron Letters, 1970, v. 6, p. 457—460.
3. Jerina, D. M., Daly, J. W., Witkop, B. The role of arene oxide-oxepin systems in the metabolism of aromatic substrates. — J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, p. 6523—6527.
4. Jerina, D. M., Yagi, H., Hermenden, O., Donsette, P. M., Wood, A. W., Levin, W., Chang, R. L., Wislocki, P. G., Conney, A. H. Synthesis and biologic activity of potential benzo(a)pyrene metabolites. — Carcinogenesis, 1976, v. 1, p. 97—113.
5. Кару Т., Кирсо У., Губергриц М. Кинетика фотоиницированного соокисления бенз(а)пирена и фенолов разного строения. — Изв. АН ЭССР. Хим. Геол., 1973, т. 22, № 3, с. 217—223.
6. Kinoshita, N., Shers, B., Gelboin, H. V. K-Region and Non K-Region metabolism of benzo(a)pyrene by rat liver microsomes. — Cancer Res., 1973, v. 33, p. 1937—1944.
7. Selkirk, J. K., Groy, R. G., Gelboin, H. V. High pressure liquid chromatographic separation of 10 benzo(a)pyrene phenols and the identification of 1-phenol and 7-phenol as new metabolites. — Cancer Res., 1976, v. 36, p. 922—926.
8. Верещинский И. В., Пикаев А. К. Введение в радиационную химию. М., 1963, с. 354.
9. Loew, G. H., Wong, J., Phillips, J., Hjelmland, L., Pack, G. Quantum chemical studies of the metabolism of benzo(a)pyrene. — Cancer Biochem. Biophys., 1978, v. 2, p. 123—130.

B. SERGEJEV, M. GUBERGRITS, V. KOBLYAKOV

**BENZO(a)PÜREENI FOTOINITSIEERITUD OKSÜDEERIMINE
PÜRIDIIN-N-OKSIIDIGA**

Töös on uuritud reaktsioonisegu koostist ja esitatud hüpoteetilised teed 3-, 7- ja 9-mofenoolide tekkeks benso(a)püreeeni fotoinitsieeritud oksüdeerimisel püridiin-N-oksiidiga atsetonitriilis. Kaks viimast isomeeri moodustuvad eelistatult 7,8- ja 9,10-epoksiidide ja hapniku liitumise ning sellele järgneva epoksüsidemete lõhustumise teel, esimene tõenäoselt benso(a)püreeeni otsesel hüdroksüülimisel vaba radikaaliga.

B. SERGEYEV, M. GUBERGRITS, V. KOBLYAKOV

**PHOTOINITIATED OXIDATION OF BENZO(a)PYRENE
BY PYRIDINE-N-OXIDE**

The content in the reaction mixture and hypothetic ways of formation of three phenolic products obtained under the photoinitiated oxidation of benzo(a)pyrene by pyridine-N-oxide were studied. The formation of 7- and 9-isomers may be due to the direct epoxidation of BP by PyO in the positions 7,8- and 9,10- respectively, with a consequent rupture of the epoxy-bonds. The 3-isomer may probably be formed by the direct free-radical hydroxilation of benzo(a)pyrene.