

Reaktive Metabolite cancerogener polycyclischer Kohlenwasserstoffe: Synthese und Abfangreaktion von 9-Hydroxybenzo[a]pyren-4,5-oxid**

Von Werner Bochnitschek, Albrecht Seidel, Horst Kunz* und Franz Oesch*

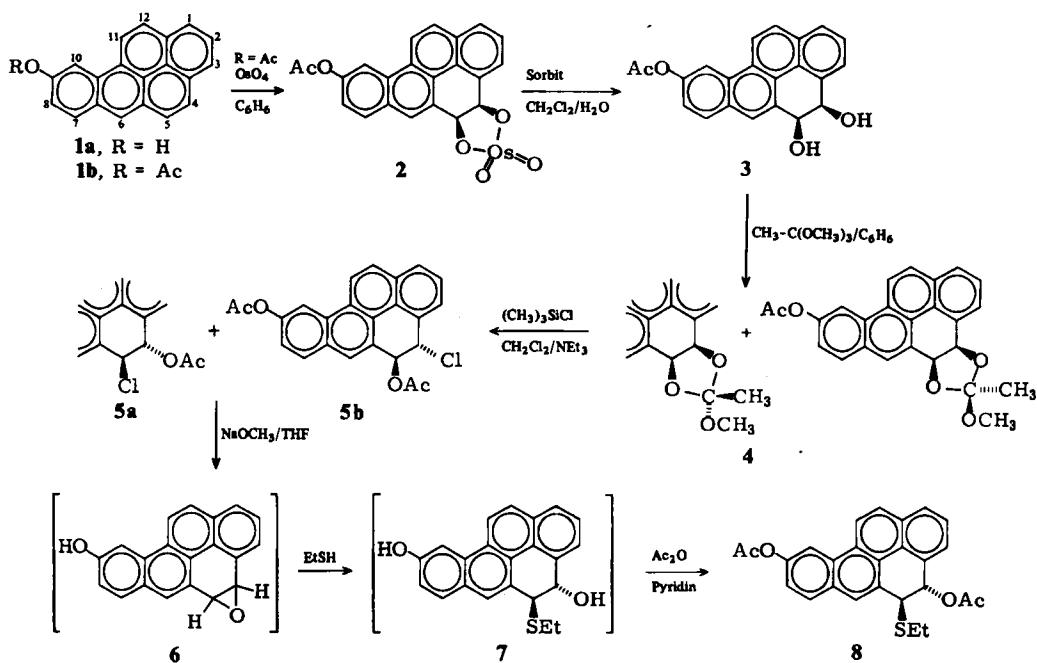
Die cancerogene Wirkung von Benzo[a]pyren entfaltet sich erst nach metabolischer Aktivierung durch Cytochrome-P450-abhängige Monoxygenasen^[1]. Sie wurde bisher nur mit DNA-Bindungsprodukten von 7,8-Dihydro-7,8-benzo[a]pyrendiol-9,10-oxid in direkten Zusammenhang gebracht^[2]. Im Ames-Test zeigt jedoch auch ein anderer Metabolit, 9-Hydroxybenzo[a]pyren **1a**, mutagene Wirkung^[3]. Diese Verbindung wird in vivo an Nucleinsäuren gebunden^[4]; als reaktive Spezies wird das 4,5-Oxid von **1a** betrachtet^[5]. Die Erhärting dieser Hypothese scheiterte bisher am fehlenden Zugang zu diesem Epoxid, da die Epoxidierung von **1a** wegen der freien phenolischen Hydroxygruppe mißlang^[6].

Wir beschreiben nun eine Synthese für das vermutete ultimale Cancerogen, die Titelverbindung **6**, und deren Abfangreaktion mit Ethanethiol (Schema 1). Das Acetat **1b** wird mit Osmiumtetroxid in 93% Ausbeute in das Osmat **2** übergeführt. Aus diesem erhält man durch Umesterung mit Sorbit in wäßrigem NaHCO₃/Dichlormethan die enantiomeren *cis*-Diole **3** in 54% Ausbeute. Es ist bemerkenswert, daß H-4 und H-5 im ¹H-NMR-Spektrum von **3** nur ein Singulett ($\delta = 5.15$) verursachen. Mit Orthoessigsäure-trimethylester entsteht aus **3** ein Gemisch zweier Diastereomerenpaare **4**. Sie werden durch Flash-Chromatographie gereinigt und UV-, NMR- und massenspektrometrisch

skopisch charakterisiert. H-4 und H-5 sowie die OCH₃- und die CH₃-Protonen verursachen jeweils ein Singulett für das *exo*- und *endo*-Methyl-Isomer ($\delta = 5.73, 2.60, 1.79$ bzw. $5.82, 3.67, 1.58$).

Die Umsetzung der Orthoacetate **4** mit Trimethylchlorosilan in Dichlormethan/Triethylamin liefert in glatter Reaktion die isomeren *trans*-Acetoxy-chlorverbindungen **5a** und **5b** (zusammen 74% Ausbeute nach Flash-Chromatographie). Für das Gelingen der Synthese ist es entscheidend, daß in diesem Schritt keine Aromatisierung durch Abspaltung von Chlorwasserstoff oder Essigsäure eintritt. Das Gemisch der Isomere **5a** und **5b** [$F_p = 163^\circ\text{C}$; MS: $m/z 404 (M^+)$] gibt sich im ¹H-NMR-Spektrum durch jeweils zwei Doublets bei $\delta = 6.59-6.49$ ($J = 3.2$ Hz) für H-4/H-5 geminal zu OAc und bei $\delta = 5.68-5.58$ ($J = 3.2$ Hz) für H-4/H-5 geminal zu Cl zu erkennen.

Methanolat bewirkt bei **5** zugleich Spaltung der Essigsäureester und intramolekulare S_N-Reaktion zum gewünschten 9-Hydroxybenzo[a]pyren-4,5-oxid **6**. Das Arenoxid **6** ist instabil. Im Dünnschichtchromatogramm [Farbreagens: 4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridin]^[7] ist seine Bildung eindeutig nachweisbar. Da sich **6** nicht isolieren läßt, wird es mit Ethanethiol abgefangen. Die dabei eintretende nucleophile Ringöffnung simuliert eine natürliche Entgiftungsreaktion für Arenoxide^[8]. Das Primäraddukt **7** wird mit Acetanhydrid/Pyridin in das Diacetat **8** überführt, das chromatographisch über Silicagel (Hexan/Essigsäure-ethylester 2:1) in 47% Ausbeute isoliert wird [$F_p = 172^\circ\text{C}$, MS: $m/z 430 (M^+)$]. Nach dem 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum liegt nur ein Isomer von 5-Ethylthio-4,5-dihydro-4,9-benzo[a]pyrendiyldiacetat **8** vor. Beide „Chlorhydrinaceta-



Schema 1. Synthese der Titelverbindung **6** aus dem Acetat **1b**, Abfangreaktion von **6** mit Ethanethiol zu **7** und dessen Umsetzung zum Diacetat **8**. THF=Tetrahydrofuran. Von den Verbindungen **2**, **3**, **4**, **5a** und **5b** sowie **7** und **8** ist jeweils nur ein (willkürlich gewähltes) Enantiomer abgebildet.

[*] Prof. Dr. F. Oesch, Dipl.-Chem. W. Bochnitschek, Dipl.-Chem. A. Seidel

Institut für Toxikologie der Universität Obere Zahlbacher Straße 67, D-6500 Mainz

Prof. Dr. H. Kunz

Institut für Organische Chemie der Universität J.-J.-Becher-Weg 18-20, D-6500 Mainz

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

te“ **5** haben danach über ein gemeinsames Zwischenprodukt **6** zum Addukt **7** reagiert. Die Kopplungskonstante $J_{4/5} = 2.5$ Hz ist mit der dipseudoäquatorialen Anordnung der beiden benzylischen Protonen H-4 ($\delta = 6.44$) und H-5 ($\delta = 4.74$) in **8** und damit mit der aus der *trans*-Stellung erfolgenden Öffnung des Epoxidringes von **6** in Einklang. ¹H-NMR-NOE-Differenzmessungen zeigen weiterhin, daß das Thiolat-Ion nur die 5-Stellung von **6** angegriffen hat.

Demgegenüber reagiert das gleiche Schwefelnucleophil mit unsubstituiertem Benzo[*a*]pyren-4,5-oxid sowohl in 4- als auch in 5-Position^[19]. Die Instabilität und die eindeutige nucleophile Ringöffnung von **6** belegen die Hypothese^[10], daß Arenoxide durch phenolische Hydroxyfunktionen selektiv aktiviert werden.

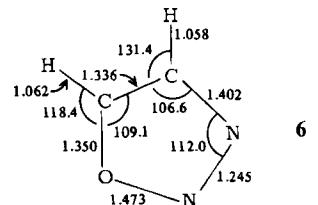
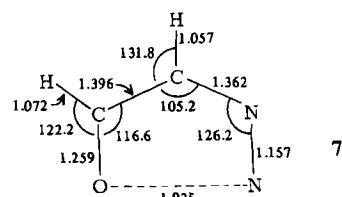
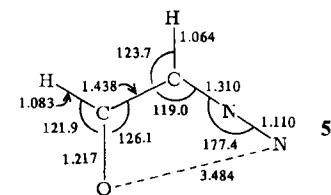
Die hier beschriebene Reaktionsfolge eröffnet einen Weg, auf dem Addukte von 6 an DNA-Bausteine oder entgiftend wirkende Nucleophile in vivo nachgewiesen und in ihrer Struktur aufgeklärt werden können.

Eingegangen am 8. März 1985 [Z 1210]

- [1] R. G. Harvey, *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 218.
 - [2] J. Kapitulnik, W. Levin, A. H. Conney, H. Yagi, D. M. Jerina, *Nature (London)* **266** (1977) 378.
 - [3] H. R. Glatt, R. Billings, K. L. Platt, F. Oesch, *Cancer Res.* **41** (1981) 270.
 - [4] a) G. Theall, M. Eisinger, D. Grunberger, *Carcinogenesis* **2** (1981) 581; b) S. W. Ashurst, G. M. Cohen, *Int. J. Cancer* **27** (1981) 357.
 - [5] a) P. Vigny, M. Ginot, M. Kindts, C. S. Cooper, P. L. Grover, P. Sims, *Carcinogenesis* **1** (1980) 945; b) F. Oesch, T. M. Guenthner, *ibid.* **4** (1983) 57.
 - [6] R. G. Harvey, C. Cortez, *Carcinogenesis* **4** (1983) 941.
 - [7] R. Preussmann, R. Schneider, F. Epple, *Arzneim.-Forsch.* **19** (1959) 1059.
 - [8] N. Nemoto, H. Gelboin, *Nature (London)* **255** (1975) 512.
 - [9] W. Bochnitschek, H. Kunz, F. Oesch, unveröffentlicht.
 - [10] P. B. Hulbert, P. L. Grover, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117** (1983) 129.

stiert. In allen untersuchten Reaktionsmedien waren 80-90% 3 und 10-20% 4 vorhanden, wie aus den Intensitäten der Absorptionsbanden abgeleitet wurde. Wenn ein Gleichgewicht zwischen offenkettiger und cyclischer Form vorliegt, hängt die Existenz des thermodynamisch weniger stabilen Isomers kritisch von der Differenz der Energie der beiden Isomere ab. Um die relative Stabilität der Isomere quantitativ abzuschätzen, haben wir ab-initio-Rechnungen für die gegenseitige Umwandlung der beiden einfachsten Modellverbindungen 5 (2 mit R = H) und 6 (1 mit R = H) via 1,5-dipolare Cycloaddition vorgenommen. Die Rechnungen wurden mit modifizierten Gaussian-80-Programmen^[5] auf einem AMDAHL-470-Computer durchgeführt.

Die geometrischen Parameter von Formyldiazomethan 5 und 1,2,3-Oxadiazol 6 und dem sie verbindenden Übergangszustand 7 wurden mit der Kraftfeldmethode mit analytischen Gradienten und dem 3-21G-Basisatz^[6] bestimmt (Abb. 1).



1979 berichteten **Schulz** und **Schweig** über PE-spektroskopische Hinweise auf die Existenz von 1,2,3-Benzoxadiazol **3** in der Gasphase^[3]; 1984 wiesen sie es durch IR- und UV/VIS-Spektroskopie in Argon-Matrix und in Lösung nach^[4]. Beide Untersuchungen zeigten, daß ein Gleichgewicht zwischen **3** und 6-Diazo-2,4-cyclohexadienon **4** exi-

Abb. 1. HF/3-21G-optimierte Geometrien von Formyldiazomethan **5**, 1,2,3-Oxadiazol **6** und dem Übergangszustand **7**. Bindungsängen in Å, Bindungswinkel in Grad. Für **7** betragen der Eigenwert der Hessian-Matrix und die Imaginärfrequenz –409 bzw. 398 cm^{–1}.

Die berechneten CO-, CC-, CN- und NO-Bindungslängen in **5** stimmen recht gut mit den röntgenographisch ermittelten Werten für 5-Diazouracil- und 5-Diazocyclouridin-Derivaten überein^[7]. Von besonderem Interesse ist der NO-Abstand an drei stationären Punkten; dieser Abstand ist bei Berechnungen der Cyclisierung einiger 1,5-Dipole mit einer Azidogruppe als Reaktionskoordinate benutzt worden^[8]. Im Übergangszustand **7** beträgt der NO-Abstand 1.935 Å; dieser Wert liegt dem von **6** (1.473 Å) näher als dem von **5** (3.484 Å). Darüber hinaus ist der Wert 1.473 Å im cyclischen Isomer **6** signifikant höher als der Wert 1.438 Å, der für H—N=N—OH ebenfalls auf dem HF/3-21G-Niveau bestimmt wurde. Der erstgenannte Wert ähnelt der Länge einer typischen NO-Einfachbin-

[*] Prof. Dr. A. F. Hegarty, Dr. M. T. Nguyen
Department of Chemistry, University College
Belfield, Dublin 4 (Ireland)

Prof. Dr. J. Elguero
Instituto de Química Médica, CSIC
Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid (Spanien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Department of Education (Irish Government) unterstützt.