

NEUE REAKTIONEN DER CARCINOGENEN KOHLENWASSERSTOFFE—II¹

J. ROCHLITZ*

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt/Main

(Received in Germany 11 November 1966; accepted for publication 25 November 1966)

Zusammenfassung—Nukleophile Agentien, wie Pyridin reagieren mit den Radikalkationen aromatischer Carcinogene zu Pyridiniumsalzen. Hierdurch lassen sich die bei der Oxydation von Aromaten mit Jod oder Sauerstoff intermediär entstehenden Radikalkationen abfangen.

Zur Erklärung der Bildung der im Teil I¹ beschriebenen oligomeren Kohlenwasserstoffe werden als Zwischenstufen "Oxydomere" (ähnlich den Excimeren) angenommen.

Die nukleophile Abfangreaktion unterstützt unsere Vorstellungen über den Ablauf der Oligomerisierung der Radikalkationen sowie ihre Reaktion mit nukleophilen Zellstrukturen. Sie eröffnet einen Weg, den Zwischenzustand der carcinogenen Aromaten zu blockieren, den wir bei den Primärprozessen der chemischen Carcinogenese für entscheidend halten.

Abstract—Nucleophilic agents such as pyridine yield pyridinium salts with radical cations of aromatic carcinogens. In this way the intermediate radical cations, produced by the oxidation of aromatic systems with iodine or oxygen, may be caught.

Presumably, the generation of oligomer aromatic hydrocarbons as described,¹ passes via "oxydomeres" (similar to the excimers). The results support our mechanism of oligomerization of radical cations as well as their reaction with nucleophilic cell structures. The "pyridine-reaction" indicates a possibility of stopping the activity of these intermediate states, which we consider to be decisive in primary processes of chemical carcinogenesis.

KÜRZLICH¹ konnten wir von einer neuen Reaktion der carcinogenen Kohlenwasserstoffe 3,4-Benzpyren (I), 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen (II) und 20-Methylcholanthren berichten. Unter dem Einfluss von verschiedenen Oxydationsmitteln (J₂, FeCl₃, O₂, BF₃-Nitrobenzol²) hinreichenden Oxydationspotentials gelingt eine Oligomerisierung der Aromaten. Wir nahmen an, dass diese Reaktion über die Radikalkationen der besagten polycyclischen Kohlenwasserstoffe verläuft. Zur Stützung dieser Hypothese wurde die vorliegende Arbeit unternommen.

Führt man die in Teil I¹ beschriebene "J₂-Reaktion" mit den carcinogenen Kohlenwasserstoffen I, II, Methylcholanthren, 1,2,3,4-Dibenzopyren³ und Buttergelb in Pyridin statt in Benzol als Lösungsmittel aus, dann beobachtet man ein völlig verändertes Reaktionschromatogramm.² Während bei der normalen "J₂-Reaktion" der Kohlenwasserstoffe neben den Dimeren noch Chinone, im Falle des Buttergelb ein vielfarbiges Spektrum von Reaktionsprodukten² im Chromatogramm zu finden sind, besteht das Reaktionschromatogramm bei der "J₂-Pyridin-Reaktion" nur aus dem Ausgangsmaterial und einem gelb fluoreszierenden und gelb gefärbten Produkt, das auch mit Methanol nicht vom Start weg wandert. Nach dieser Beobachtung war uns klar, dass in der gewünschten Weise die intermediär entstehenden Radikalkationen durch Pyridin unter Bildung eines gelben Pyridiniumsalzes abgefangen wurden. Diese Reaktion ist analog der Abfangreaktion von Lund,⁴ dem es gelang, bei der

* Present address: Kalle A.C., Wiesbaden-Biebrich.

¹ Teil I: M. Wilk, W. Bez und J. Rochlitz, *Tetrahedron* 22, 2599 (1966).

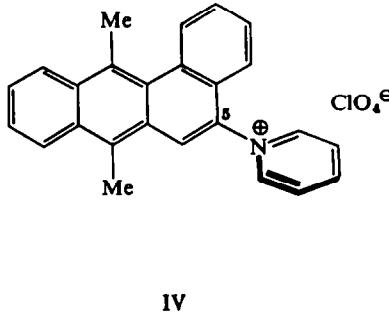
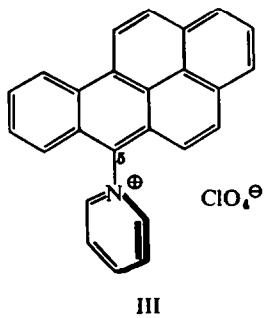
² M. Wilk, U. Hoppe, W. Taupp und J. Rochlitz, *J. Chromatog.* z. Veröffentl. angenommen.

³ U. Hoppe, unveröffentlicht.

⁴ H. Lund, *Acta Chem. Scand.* 11, 1323 (1957).

anodischen Oxydation von Anthracen in Pyridin ein 9,10-Dihydro-dipyridinium-anthracen-perchlorat zu isolieren.

Bei I und II konnten wir die Monopyridinium-Absangprodukte der Kohlenwasserstoffe als Perchlorate in Substanz erhalten. Die UV-Absorptionsspektren (Abb. 1 und 2) zeigen, dass der Aromatanteil erhalten geblieben sein muss. Dasjenige des 5-N-Pyridinium-3,4-benzpyren-perchlorats (III) gleicht in groben Zügen dem des 3,4-Benzpyrens bzw. dem des dimeren I. Das Spektrum des 5-N-Pyridinium-7,12-dimethyl-benzanthracenperchlorats (IV) ist dem II-Spektrum weitgehend ähnlich, besitzt jedoch mit dem des tetrameren II nur wenige Gemeinsamkeiten. In beiden Spektren findet sich aber deutlich bei 260 nm eine zusätzliche Absorptionsbande, die wir der isolierten Absorption des Pyridiniumringes zuordnen (vgl. Spektrum des N-Methyl-pyridinium-jodids). Dies bedeutet, dass der Pyridinium-Ring weitgehend vom übrigen Konjugationssystem entkoppelt ist. Also sollten die beiden Absangprodukte folgende Struktur besitzen; wobei der Pyridiniumring im Schwerpunkt eine senkrechte Lage zum Restmolekül einnimmt:



Diese konnte ausser durch die Analyse noch durch eine osmometrische Molgewichtsbestimmung sichergestellt werden. Die osmometrische Molgewichtsbestimmung wurde in Aceton mit N-Methylpyridinium-jodid als Vergleich vorgenommen. Im Konzentrationsbereich von 0.005 molar wies dieses einen Dissoziationsgrad von 0.4 auf. Legt man diesen Wert der Berechnung der Molgewichte von III und IV zugrunde, dann erhält man bei verschiedenen Konzentrationen:

$$\begin{array}{ll} M_{III} = 294; 225 & M_{IV} = 315; 305 \\ \text{ber.: } M_{III} = 430 & M_{VI} = 434 \end{array}$$

Demnach hat keine Oligomerisierung stattgefunden. Bestimmt man mit Hilfe der osmometrischen Daten und den berechneten Molgewichten den Dissoziationsgrad, dann ergeben sich Werte, die um 0.9-1.0 schwanken! Ein Dissoziationsgrad um 1.0 ist weit wahrscheinlicher für diese voluminösen Perchlorate als 0.4 (Methylpyridinium-jodid).

Weiterhin gelang es, das Salz III nach Zincke⁵ mit Alkali zu spalten. Hieraus liess sich dann das entsprechende Amin erhalten, das chromatographisch einheitlich und identisch war mit authentischem 5-Amino-3,4-benzpyren.⁶ Ebenso liess sich auch IV nach Zincke in ein Amin überführen. Da die UV-Spektren sich durch

⁵ Th. Zincke und W. Würker *Liebigs Ann.* **338**, 107 (1905).

⁶ H. J. Creech, *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 576 (1941).

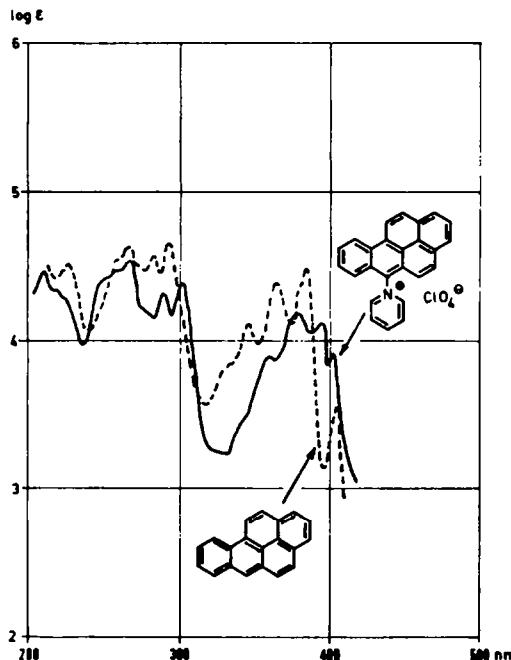
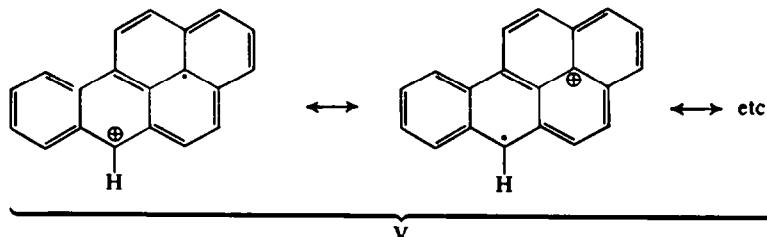


ABB. 1. Absorptionsspektren von 3,4-Benzpyren und 5-Pyridinium-3,4-Benzpyren-perchlorat in Methanol.

Säurezugabe nicht verändern lassen, ist somit erwiesen, dass es sich um einheitliche Pyridiniumsalze handelt.

Aus den IR-Spektren von III und IV lässt sich herauslesen, dass der 5-fach substituierte Benzolring des I in einen 6-fach gebundenen verwandelt, bzw. dass der 4-fach substituierte des II durch einen 5-fach gebundenen ersetzt wurde.⁷

Eine interessante Beobachtung konnten wir bei der *Luftoxydation* von I an Kieselgelplatten machen. Während sich aus auf Kieselgel in Benzol und—besonders stark—in Benzol + Trifluoressigsäure aufgetragenem I nach 14 Tagen (Dunkelheit) mit Hexan und Benzol rot fluoreszierendes 3,4-Benzpyren-5,8-chinon und 5,5'-Bis-3,4-benzpyrenyl eluieren lassen, ist dies beim in Pyridin aufgetragenen I nicht möglich. Ausser Ausgangsmaterial kann aus dem in diesem Fall rot-gelb bis blau (sonst grünblau) fluoreszierenden Startpunkt nichts eluiert werden. Auch bei der Oxydation von I mit O₂ zu Chinonen und 5,5'-Bisbenzpyrenyl kann demnach das Pyridin ein gemeinsames Zwischenprodukt abfangen und zwar das Radikalkation (V):



⁷ K. Nakanishi, *Infrared Absorption Spectroscopy* S. 27. Tokyo (1962).

So ist verständlich, dass bei allen Oxydationen des 3,4-Benzpyrens zu Chinonen das 5,5'-Bisbenzpyrenyl ebenfalls als Reaktionsprodukt auftritt, wenn I in genügender Konzentration vorhanden ist.

Wie Versuche von Graffi,⁸ sowie Wilk und Wynder⁹ zeigen, können carcinogene Kohlenwasserstoffe in hydrophoben Zellbereichen angesammelt werden.¹⁰ Eine genügend hohe Konzentration wäre so gewährleistet. Die Fähigkeit der Zelle, I zu Chinonen zu oxydieren ist hinlänglich bekannt.¹¹⁻¹⁵ Die Bildung von 5,5'-Bisbenzpyrenyl in der Zelle, ist daher—wie in Teil I¹ postuliert—durchaus möglich.

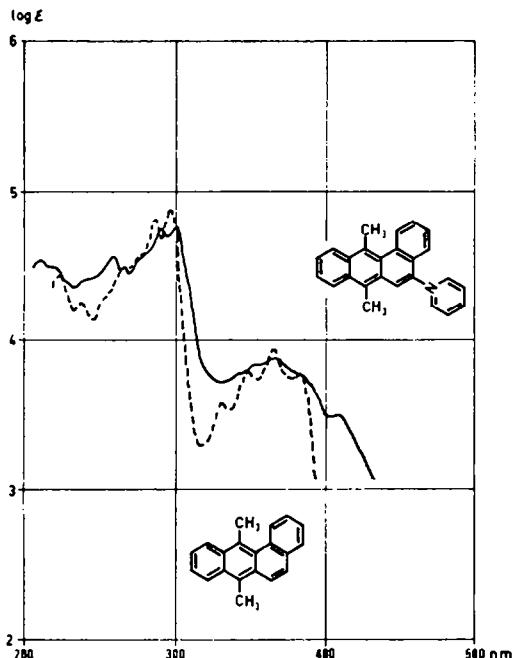


ABB. 2. Absorptionsspektren von 7,12-Dimethyl-benzanthracen und 5-Pyridinium-7,12-dimethyl-benzanthracen-perchlorat in Methanol.

DISKUSSION

Die von uns formulierten Zwischenprodukte der "J₂-Reaktion" mit polycyclischen Aromaten, nämlich die zugehörigen Radikalkationen bilden sich also auch in Pyridin. Da dieses aber weit stärker nukleophil als der unveränderte Aromat ist, reagieren die

⁸ A. Graffi, *Z. Krebsforsch.* **52**, 165 (1942).

⁹ M. Wilk und E. L. Wynder, *Z. f. Naturf.* **21b**, 161 (1966).

¹⁰ M. Wilk und J. Rochlitz, *Z. f. Naturf.* **21b**, 975 (1966).

¹¹ E. Boyland, *Biochem. J.* **92**, 631 (1964).

¹² I. Berenblum, *Canc. Res.* **3**, 686 (1943).

¹³ E. Boyland, *Biochem. J.* **97**, 7 (1965).

¹⁴ H. L. Falk, *J. Natl. Cancer Inst.* **28**, 699 (1962).

¹⁵ A. H. Comrey, *Diss. Abstr.* **17**, 1886 (1957).

Radikalkationen in folgendem Sinn weiter:

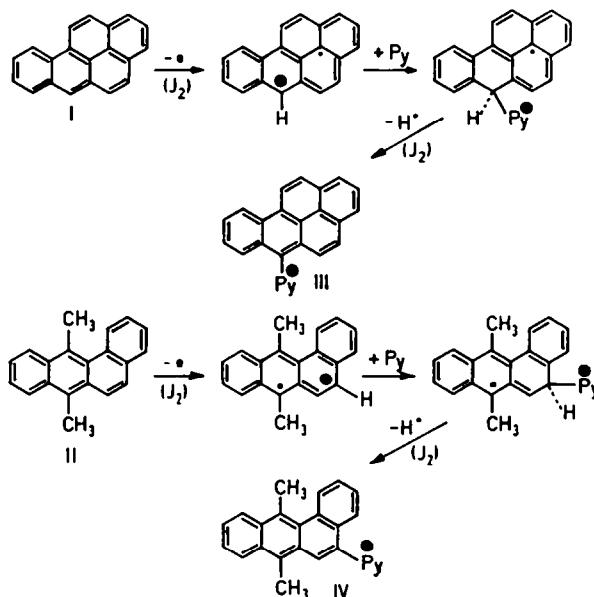
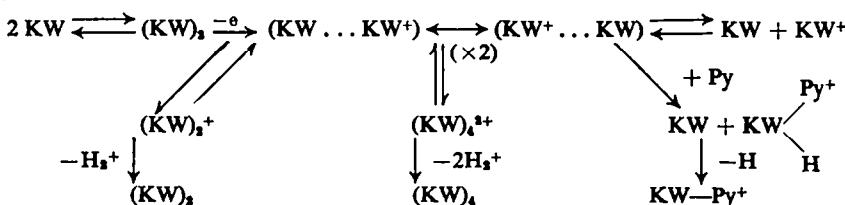


ABB. 3. Reaktionsschema zur Bildung der Pyridiniumsalze aus 3,4-Benzpyren und 7,12-Dimethyl-benzanthracen (Py = Pyridin).

Wir sind im Begriffe zu klären, ob in Pyridin eine sonst stattfindende Assoziation verhindert wird, oder ob das Pyridinmolekül ein "oxydomeres Kohlenwasserstoff-Molekül" angreift. Unter "Oxydomeren" verstehen wir Vorstufen zu den von uns gefundenen oligomeren Aromaten; d.h. nämlich Radikalkationen, die von unveränderten Aromatenmolekülen stabilisiert werden, wobei ihre positive Ladung und die Radikalstelle im Aggregat delokalisiert sind. Erstmals wurde ein solches Gebilde von Lewis und Singer¹⁶ beim Naphthalin-Radikalkation beobachtet. Ebenso wie bei dem von Förster¹⁷ und anderen^{18,19} beschriebenen excimeren Zustand der aromatischen Kohlenwasserstoffe erhebt sich die Frage, ob diese Oxydomeren sich nach der Oxydation bilden oder ob sie schon in Form von Assoziaten des Kohlenwasserstoffs vorgebildet sind. Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeiten kann man folgendes Reaktionsschema aufstellen (KW = polycyclischer Aromat, Py = Pyridin):



¹⁶ I. C. Lewis und L. S. Singer, *J. Chem. Phys.* **43**, 2712 (1965).

¹⁷ Th. Förster und K. Kasper, *Ber. d. Bunsenges., Z.f. Elektrochem.* **59**, 976 (1955).

¹⁸ J. B. Birks und A. J. W. Cameron, *Proc. Roy. Soc. A249*, 297 (1959).

¹⁹ J. Ferguson, *J. Chem. Phys.* **44**, 2677 (1966).

Damit könnte man erklären, wieso sich in der "Pyridin-Jod-Reaktion" von I und II analoge Produkte bilden, bei der normalen "Jod-Reaktion" jedoch im einen Fall ein dimerer, im anderen ein tetramerer Kohlenwasserstoff entsteht. Die Tetramerisierung des DMBA (II) erfolgt danach durch Reaktion zweier Oxydomere miteinander. Die analogen, asymmetrischen Chinoliniumsalze bilden sich zwar auf demselben Weg, doch ist uns ihre Isolierung bisher nicht gelungen.

Die geschilderte Reaktion stellt ein universelles Verfahren zum Auffangen von Radikalkationen dar, die durch Jod oder Sauerstoff erhältlich sind. So lässt sich auch das aus Tetraphenylhydrazin leicht zu bildende Radikalkation auf diesem Weg in Form eines Pyridiniumsalzes auffangen.

Sowohl die oben skizzierte Modellreaktion einer Oligomerisierung im Zellbereich, als auch die im Teil I¹ angenommene Reaktion des Radikalkations mit (nukleophilen) Zellstrukturen, werden durch diese Auffangreaktion untermauert. Dies gilt umso mehr, als auch *freier Sauerstoff* die Radikalkationen erzeugen kann. Weitere Untersuchungen mit nukleophilen Agentien (Purine, Pyrimidine, Aminosäuren, Thiole, etc.) sind inzwischen begonnen worden. Außerdem soll geprüft werden, ob sich die aromatischen Carcinogene über solch eine Auffangreaktion unschädlich machen lassen.

EXPERIMENTELLER TEIL

(1) *Darstellung von 5-Pyridinium-3,4-benzpyrenyl-perchlorat (III).* 600 mg 3,4-Benzpyren löst man in 50 ml Pyridin. Diese Lösung wird auf ca. 80 Dünnschichtplatten (20×20) in einem dicken Strich mit einer Kapillare aufgetragen. Die Platten sollen ca. 48 Stunden lang in einer Jodkammer stehen. Dabei ist darauf zu achten, dass das Jod immer wieder erneuert wird, da es stark deaktiviert wird durch die Reaktion mit dampfförmigem Pyridin. Anschliessend wird so oft mit Methanol entwickelt, bis die braun gefärbten Pyridin-J₁-Reaktionsprodukte und das Jod vom Start wegwaschen sind. An den Auftragsstellen muss dann eine hellgelbe Färbung zu beobachten sein, die noch deutlicher an ihrer gelben Fluoreszenz zu erkennen ist. Man sammelt die gelb fluoreszierenden Kieselgelschichten und extrahiert mit MeOH-verd. HCl (3:1). Beim Eindampfen dieser Lösung scheidet sich das gewünschte Produkt zusammen mit viel "Kieseläure" (kristallin!) ab. Von dieser lässt es sich durch Auflösen in MeOH trennen. Die methanolische Lösung wird eingeeengt und das 3-5 ml betragende Konzentrat mit der gleichen Menge Perchlorsäure versetzt. Sodann giesst man diese Lösung in viel Wasser. Das ausgefallene Perchlorat wird abgesaugt und mehrmals aus MeOH-CHCl₃ umkristallisiert. Das gelbe kristalline Produkt (Fp.: 271-272°, Zers.; 150 mg Ausbeute = 15% d.Th.) ist chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. (Analyse: Gef: C, 69.65; H, 3.89; N, 3.33; Cl, 8.05; Ber: für C₂₁H₁₆ClNO₄: C, 69.8; H, 3.73; N, 3.26; Cl, 8.25%).

Zincke-Spaltung: Man löst das Perchlorat III in der eben nötigen Menge Aceton, gibt dann das gleiche Volumen konz. NaOH zu. Sofort fällt ein dunkelroter Stoff aus. Man lässt 2 h unter Rückfluss sieden. Dann wird abfiltriert, in Aceton gelöst und mit verd. HCl versetzt. Nach einstündigem Sieden überschichtet man mit Benzol und macht mit Ammoniak alkalisch. Aus der Benzollösung lässt sich dann das 5-Amino-3,4-benzpyren auf üblichem Weg gewinnen.

(2) *Darstellung von 5-N-Pyridinium-7,12-dimethyl-benzanthracenperchlorat.* Das Synthese- und Aufarbeitungsverfahren ist gleich dem unter (1) beschriebenen.

2.34 g II wurden in 117 ml wasserfreiem Pyridin gelöst; die Lösung wurde auf 100 DC-Platten 20×20 aufgetragen und 24 h in der Jodkammer belassen. 0.8 g rohes Perchlorat konnten isoliert werden (20% d.Th.). Mehrfaches Umkristallisieren aus Aceton-H₂O ergab schöne, zitronengelbe Kristalle (Fp.: 248-250°, Zers., unkorr.), die chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich waren (Analyse: Gef: C, 69.26; H, 4.76; N, 3.58; Cl, 7.94; Ber für C₂₅H₂₀NCIO₄: C, 69.2; H, 4.61; N, 3.23; 8.15%).

Herrn Prof. Dr. M. Wilk danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit sowie für die Bereitstellung von Mitteln.