

Über ein eigentümliches Extraktionsverhalten von Sephadexkörnern der Sorten G 10 und LH 20 gegen wäßrige Suspensionen einiger carcinogener und nichtcarcinogener Kohlenwasserstoffe *

MANFRED WILK und JÜRGEN ROCHLITZ

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **21 b**, 975—979 [1966]; eingegangen am 22. Februar 1966)

Wäßrige Sephadex-Gele nehmen Vielfache der in Wasser gelösten Anteile polycyclischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe auf, wenn diese als Suspension vorliegen. Beobachtbar ist dieser Effekt an der Erhöhung der Fluoreszenzintensität des gelösten Anteils der Aromaten bei Zugabe von Sephadex-Körnern und anschließender kräftiger Rührung. Verwertbar ist dieses Phänomen zumindest für die Ermittlung der Lage der Emissionsbanden der Kohlenwasserstoffe in Wasser, denn es bestehen nur geringe Unterschiede zwischen den Fluoreszenzspektren in Sephadex und Wasser. Weiterhin ist beachtlich, daß die carcinogenen Kohlenwasserstoffe nach diesen ersten orientierenden Versuchen, zu einer Gruppe gehören, die eine geringe Diffusionsgeschwindigkeit in das Sephadex-Gel, bei gleichzeitigem Erreichen relativ hoher Endkonzentrationen, besitzen. Der Quotient aus beiden Größen wird daher für die Carcinogene maximal. Nach Desoxycholsäure, Detergentien^{4, 11, 14, 15}, Purinen^{3, 5, 13, 18, 10, 22}, Desoxynucleinsäuren^{2, 6, 7, 9, 17}, Adenosintriphosphat²⁴ und Proteinen^{12, 16, 20, 23} wurde damit gefunden, daß auch Polysaccharid-artige Systeme in der Lage sind, Lösungsvermittelnd auf Kohlenwasserstoffe in wäßriger Phase zu wirken (vgl. auch⁸).

Es verspricht daher, interessant zu werden, an Sephadex, als primitivem Modell von Zellbestandteilen, in der Zukunft standartisierte Kohlenwasserstoff-Suspensionen in dieser Weise zu untersuchen und gleiche Experimente mit stärker hydrophobiertem Gel durchzuführen.

Von Sephadexkörnern der Typen G 10 und LH 20 werden verschiedene kondensierte, aromatische Kohlenwasserstoffe aus ihren wäßrigen Suspensionen in gelöster Form extrahiert. Während die Fluoreszenzintensität einer methanolischen Lösung der Kohlenwasserstoffe durch Zugabe von in Methanol gequollenem Sephadex LH 20 nicht verändert wird (auch dann nicht, wenn die Sephadexkörner in der Lösung suspendiert sind), treten in wäßrigen Suspensionen der Aromaten beachtliche Erhöhungen der Fluoreszenzintensitäten des Lösungsemissionsspek-

tums der Kohlenwasserstoffe ein, wenn in diesen Suspensionen in Wasser gequollenes oder trockenes Sephadex (G 10 oder LH 20) suspendiert wird. Innerhalb kurzer Zeit wächst die Fluoreszenzintensität des gelösten Anteils der Kohlenwasserstoffe in der stark gerührten Sephadex-Suspension auf ein Vielfaches der Ausgangsintensität (Abbn. 1 und 2); dagegen verändert sich die Intensität des gelösten Anteils der Kohlenwasserstoffe in der wäßrigen Suspension nicht, wenn man den Überstand über den abgesetzten Sephadexkörnern betrachtet. Eben-

* Vgl. auch M. WILK u. J. ROCHLITZ, J. Chromatogr., im Druck [1966].

¹ J. C. ARCOS, M. ARCOS, N. P. BUU-HOI et A. LACASSAGNE, C.R. hebdom. Séances Acad. Sci. **241**, 836 [1965].

² J. K. BALL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **103**, 275 [1965].

³ A. BEY, J. LAM, J. Chromatogr. **16**, 157 [1964].

⁴ M. L. BONACCI, D. GUENTORE u. L. BELLINI, Giorn. Biochim. **13**, 231 [1964].

⁵ E. BOYLAND et al., Brit. J. Cancer **16**, 347 [1962].

⁶ E. BOYLAND et al., Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **87**, 653 [1964].

⁷ E. BOYLAND et al., Brit. J. Cancer **16**, 507 [1962].

⁸ E. BOYLAND et al., J. molekular Biol. **9**, 589 [1964].

⁹ P. BROOKES, P. D. LAWLEY, Nature [London] **202**, 781 [1964].

¹⁰ N. P. BUU-HOI, Cancer Res. **24**, 1511 [1964].

¹¹ R. R. DEMISCH u. G. F. WRIGHT, Can. J. Biochem. Physiol. **41**, 1655 [1963].

¹² P. DAUDEL, C.R. hebdom. Séances Acad. Sci. **258**, 5775 [1964].

¹³ B. L. VAN DUUREN, J. phys. Chem. **68**, 2544 [1964].

¹⁴ P. ERWALL, K. SETÄLÄ u. L. SJÖBLÖM, Acta chem. scand. **5**, 175 [1951].

¹⁵ P. ERWALL, Acta Univ. Intern. Cancrum **10**, 44 [1954].

¹⁶ C. HEIDELBERGER et al., J. cellular comparat. Physiol. Pt II Suppl. **1**, 129 [1964].

¹⁷ C. HEIDELBERGER, B. C. GIOVANELLA u. L. E. MCKINNEY, J. molecular Biol. **8**, 20 [1964].

¹⁸ PONZY LU u. P. O. P. Ts'o, Proc. nat. Acad. Sci. USA **51**, 252 [1964].

¹⁹ B. PULLMAN, Science [Washington] **147**, 1305 [1965].

²⁰ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **15 b**, 578 [1960].

²¹ P. RONDONI, Advances Cancer Res. **3**, 171 [1955].

²² H. WEIL-MALHERBE, Biochemistry **40**, 351 [1946].

²³ M. WILK, Biochem. Z. **333**, 166 [1960].

²⁴ M. WILK u. H. SCHWAB, Diplomarbeit, Frankfurt (vgl. auch Angew. Chem. **75**, 1128 [1962]).

²⁵ M. WILK u. E. L. WYNDER, Z. Naturforschg. **21 b**, 161 [1966].

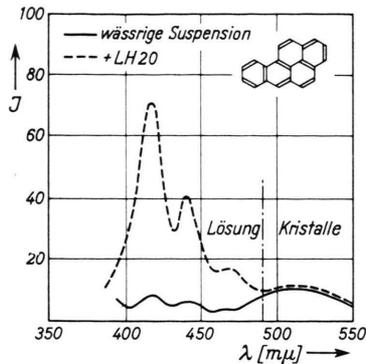


Abb. 1. Zunahme der Fluoreszenzintensität (I) des gelösten Anteils von 3,4-Benzopyren nach Zugabe von Sephadex LH 20 zur wässrigen Suspension des Kohlenwasserstoffs.

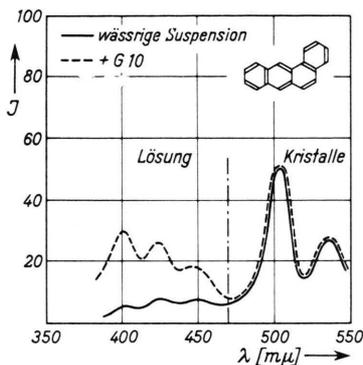


Abb. 2. Zunahme der Fluoreszenzintensität des gelösten Anteils von 1,2-Benzanthracen nach Zugabe von Sephadex G 10 zur wässrigen Suspension des Kohlenwasserstoffs.

so bleiben die der Festkörper-Emission zugeordneten Intensitäten während des „Lösungsvorgangs“ nahezu unverändert. Die Fluoreszenzspektroskopie von Sephadex-Suspensionen erlaubt also die Aussage, daß Sephadexkörner in der Lage sind, unter Konstanthaltung der Konzentration der gelösten Kohlenwasserstoffe in der wässrigen „Außenlösung“, in ihren Innenräumen weit mehr Kohlenwasserstoff in monodisperser Form zu binden, als dieser Außenkonzentration entspricht.

Dieses merkwürdige Verhalten des Sephadex fiel uns auf bei der Suche nach physikalischen Eigenschaften carcinogener Kohlenwasserstoffe, die mit ihrer physiologischen Wirkung in Zusammenhang gebracht werden können. Damit soll *nicht* gesagt sein, daß eine einzige physikalische Eigenschaft mit der Carcinogenität korrelierbar ist. Vielmehr scheint uns erst, entsprechend der Wirkung der Kohlenwasserstoffe als polyfunktionelle Zellgifte, das Zusammenspiel *verschiedener* chemischer und physika-

lischer Eigenschaften die Carcinogenität oder Unschädlichkeit zu bestimmen.

In einer Reihe von Veröffentlichungen wird darauf hingewiesen, daß bestimmte Regionen der Krebs-erzeugenden Moleküle *nicht* verantwortlich sind für die das Zellgeschehen störenden Bindungen zu irgendwelchen Zellbestandteilen. So vertreten WOERNLEY²⁶, EKWALL^{14, 15}, RONDONI²¹, ARCOS, ARCOS, BUU-HOI et LACASSAGNE¹ die Meinung, daß das gesamte Molekül mit seinen kovalenten, Charge-transfer-, hydrophoben, Dipol-Dipol-, London- und Van der Waals-Bindungskräften an dem Entdifferenzierungs-Prozeß der Zelle zur Krebszelle beteiligt ist. Nach einer Zusammenstellung der Eigenschaften carcinogener Kohlenwasserstoffe hat BUU-HOI¹⁰ neuerdings festgestellt, daß deren einzige Gemeinsamkeit eben die Carcinogenität sei, die vielleicht mit den Van der Waalschen Kräften parallel ginge. Leider ist ein derartiger Zusammenhang zwischen hydrophober Bindungskraft und Krebs-erzeugender Wirksamkeit bisher noch nicht gefunden worden.

Auf der Suche nach einer solchen möglichen Beziehung, wollten wir die unterschiedliche Adsorption von Kohlenwasserstoffen in normalem und hydrophobiertem Sephadex studieren. In den Sephadex-Körnern existieren Hohlräume; in den hydrophobierten Sorten liegen neben den hydrophilen Bereichen noch stark hydrophobe Grenzflächen vor, wie sie auch beim Aufbau der Zellstrukturen, etwa bei den Mitochondrien angenommen werden, an denen WILK²⁵ ebenfalls eine weitaus spezifische Löslichkeitsvermittlung für carcinogene Kohlenwasserstoffe aus ihren wässrigen Suspensionen fand. So können Sephadex-Partikel als größte Modelle für Zellen oder Zelluntereinheiten dienen, wenn Bereiche verschiedener Affinitäten zu Wasser und Kohlenwasserstoffen simuliert werden sollen. Sie besitzen den Vorteil einer besseren Reproduzierbarkeit.

Diese Betrachtungen erhalten Gewicht, wenn man die folgenden Experimente berücksichtigt:

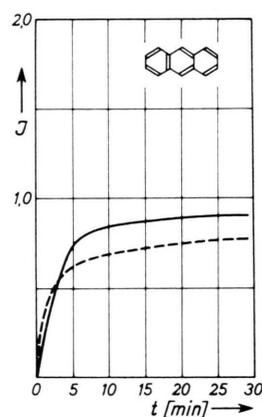
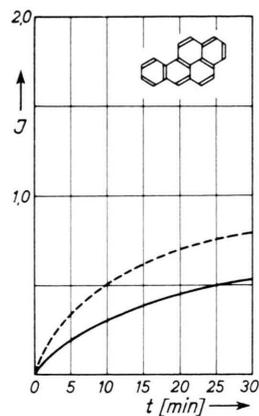
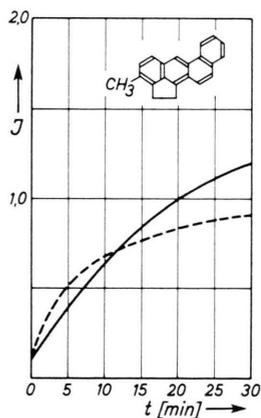
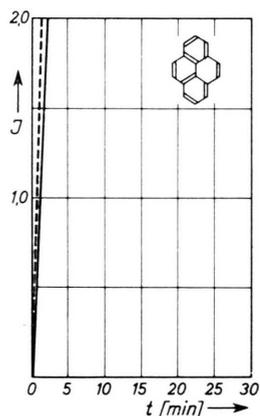
Die wässrigen Suspensionen polycyclischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe weisen in vielen Fällen ein Fluoreszenzspektrum auf, bei dem im kurzwelligen Teil die Emission des gelösten Anteils gut zu beobachten ist^{23, 25}. In vielen Fällen ist nur eine schwache Andeutung des Lösungsspektrums im

²⁶ D. L. WOERNLEY, Arch. Biochem. Biophysics **50**, 199 [1954].

kurzwelligem Anstieg zu den Fluoreszenzmaxima des Festkörpers zu erkennen. Jedoch gestattet die Zugabe von Sephadex eine genaue Lokalisation des Lösungsspektrums der Kohlenwasserstoffe in Wasser (vgl. Abbn. 1 und 2).

Stellt man die Emissionswellenlänge auf den Maximalwert des so ermittelten Lösungsspektrums ein, dann kann man die Zunahme der Intensität an dieser Stelle in Abhängigkeit von der Zeit aufnehmen, nachdem zu einer Kohlenwasserstoff-Suspension eine bestimmte Menge in Wasser gequollenes Sephadex hinzugefügt wurde (Abbn. 3–6). Aus diesen Kinetiken wurden für eine Reihe von Kohlenwasserstoffen entnommen:

1. die Anfangsgeschwindigkeit v_{\max} ; das ist die Zunahme der Intensität pro Zeiteinheit an der steilsten Stelle der Kurve (Abbn. 3–6). Diese Geschwindigkeit stellt ein Maß dar für die Diffusionsgeschwindigkeit der Kohlenwasserstoff-Moleküle in das Sephadex-Gelgerüst.



Abbn. 3–6. Zeitliche Zunahme der Fluoreszenzintensität (I) des gelösten Anteils Kohlenwasserstoff nach Zugabe von Sephadex G 10 (ausgezogene Kurve) oder Sephadex LH 20 (gestrichelte Kurve).

2. die Zunahme der Fluoreszenzintensität gegenüber der Anfangsintensität nach genügend langer Zeit ($v_{\max} \rightarrow 0$). Dieser Intensitätswert stellt ein Maß dar für die Endkonzentration an Kohlenwasserstoff, wenn man in erster Näherung unterschiedliche Fluoreszenz-Ausbeuten vernachlässigt.

Diese ermittelten Werte sind in der folgenden Tab. 1 zusammengestellt. Weiterhin enthält sie die Intensitätswerte der reinen wässrigen Kohlenwasserstoff-Lösungen, bei denen die Intensität des überlappenden Festkörperspektrums abgezogen wurde ($I_{\text{H}_2\text{O}}$).

Zur Ermittlung der in Tab. 1 zusammengefaßten Werte wurden keine exakt gleichen Mengen Sephadex verwendet, weil eine genaue Dosierung von gequollenem Gel technisch noch nicht bewältigt wurde. Auch sind die Werte noch abhängig von der Teilchengröße der suspendierten Kohlenwasserstoffe.

Kohlenwasserstoff (Wellenlänge der Emission)	v_{\max}	ΔI_{\max}	$I_{\text{H}_2\text{O}}$	$\frac{\Delta I_{\max}}{v_{\max}}$
3.4-Benzpyren (415)	0,07 *	0,49	0,03	7,0
	0,055	0,72	0,03	13,0
1.2-Benzpyren (397)	0,10	0,70	0,05	7,0
	0,085	0,82	0,05	9,7
Anthanthren (447)	0,115	0,20	0,004	4,3
	0,115	0,36	0,004	7,8
3-Methyl-Cholanthren (410)	0,07	1,15	0,013	12,6
	0,074	0,70	0,013	9,5
1.12-Benzoperylen (421)	0,013	0,10	0,006	7,7
	0,055	0,10	0,006	1,8
3.4-Benzotetraphen (428)	0,04	0,20	0,002	5,0
	0,03	0,22	0,002	7,3
1.2-Benzofluoren (370)	0,106	0,90	0,03	8,5
	0,160	0,50	0,03	3,1
Chrysen (385)	0,10	0,21	0,012	2,1
	0,13	0,14	0,012	1,1
1.2-Benzanthracen (407)	0,12	0,32	0,06	5,3
	0,056	0,33	0,06	5,5
9.10-Dimethyl-1.2-benzanthracen (419)	0,25	2,1	—	8,4
	0,35	2,2	—	6,3
2-Hydroxychrysen (390)	0,23	2,00	0,03	8,7
	0,28	2,15	0,03	7,7
Fluoranthren (450)	1,02	1,89	0,2—0,3	1,9
	0,93	3,40	0,20	3,7
Pyren (398)	1,62	3,1	0,20	1,9
	0,14	0,22	0,40	1,6
Phenanthren (357)	0,19	0,28	0,40	1,5
	0,25	0,67	0,13	2,7
Anthracen (410)	0,30	0,48	0,13	1,6

Tab. 1. Maximale Diffusionsgeschwindigkeit (v_{\max}) und Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Extraktion von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Sephadex G-10 und LH-20 aus wäßrigen Suspensionen. * Die erste Zahlenreihe bedeutet bei jedem Kohlenwasserstoff die Messung in Sephadex G-10, die zweite in Sephadex LH-20. (Wellenlängen in $m\mu$.)

Trotz dieser Vorbehalte lassen sich folgende Aussagen machen:

Die Diffusionsgeschwindigkeit ist bei den kleinsten untersuchten Kohlenwasserstoffen Phenanthren und Anthracen relativ klein. Schon bei den nächst größeren Aromaten Pyren und Fluoranthren erreicht sie das Maximum in unserer Versuchsreihe. Dies mag an der besonderen Struktur des Sephadex-Gels liegen. Die höheren Polycyclen besitzen der Molekülgröße entsprechend sehr kleine Diffusionsgeschwindigkeiten. Erstaunlicherweise zeigen die wenigen untersuchten carcinogenen Kohlenwasserstoffe unter vergleichbaren Molekülen die geringsten Diffusionsgeschwindigkeiten. Dafür könnte die besonders starke Hydrophilie des Sephadex-Gels verantwortlich gemacht werden, die eine hohe Aktivierungsenergie beim Eintritt in das Gel erfordert. Bis auf einige Ausnahmen, die durch die angegebenen Fehler bedingt sein können, ist die Diffusionsgeschwindigkeit in das lipophilisierte Sephadex größer, als in das normale.

Die Intensitätszunahme ΔI_{\max} ist bei Hydroxychrysen, Fluoranthren und Pyren am größten. Darauf folgt die Gruppe der Carcinogene 3.4-Benzpyren, 3-Methylcholanthren und Dimethylbenzanthracen zusammen mit 1.2-Benzpyren und Benzofluoren. Aus Gründen der wesentlich verschiedenen Porengröße ist die Intensitätszunahme nur in einigen Fällen beim hydrophobierten Sephadex größer als beim normalen.

Betrachtet man den Quotienten $\Delta I_{\max}/v_{\max}$ (d. i. die Einstellzeit der maximalen Intensität), dann muß man die stark carcinogenen Kohlenwasserstoffe zur Gruppe mit den höchsten Werten zählen. Hier erreichen die Quotienten „Endkonzentration“ durch Diffusionsgeschwindigkeit Werte, die sich deutlich aus der Reihe abheben. Dieses Zusammenspiel mehrerer Größen ist offensichtlich für die Carcinogenität viel bezeichnender, als eine einzige chemische oder physikalische Eigenschaft.

Nun ist noch die Frage anzugehen, in welchem Solvatationszustand sich die Kohlenwasserstoffe be-

Kohlenwasserstoffe	Anregungs- wellenlänge [m μ]	Emissionsmaxima			
		Methanol	Wasser	G 10	LH 20
3.4-Benzpyren	310	415,5*	414,5	414,5	415
		439,5	438,5	439	439,5
1.2-Benzpyren	325	405,5		403	403,5
		428		424	
Anthanthren	302	439	444	446,5	445,5
		466	472,5	473	473
3-Methylcholanthren	295	405,5	410	410	410,5
		427,5		429,5	429
1.12-Benzperylen	295	426	421	421	422
3.4-Benzotetraphen	285	403	407	407	408
		424,5	428	427,5	428
1.2-Benzofluoren	280	367,5	369	369,5	370
		315	368,5		
Chrysen	340	388	384	384,5	385
		395,5	407,5?	398,5	398
1.2-Benzanthracen	340	417	424?	419,5	419
		388,5	395	390	391
2-Hydroxychrysen	300	407		407	408
		453	448?	453,5	
Fluoranthren	350	468,5	464		
		268	382,5	383,5	383,5
Pyren	268		399	399,5	400
		252	358,5	357,5	358,5
Phenanthren	252	372	372	373,5	372,5
		385	389	391,5	391
Anthracen	252				

Tab. 2. Emissionsmaxima aromatischer Kohlenwasserstoffe in Sephadexkörnern und den Lösungsmitteln Methanol und Wasser. * Die beiden Zeilen geben die Lage der kurzwelligsten Teilbanden wieder.

finden, wenn sie im Sephadex-Gel eingeschlossen sind. In Richtung der Beantwortung führt hier die Untersuchung der Lage der Emissionsmaxima in Methanol, Wasser, Sephadex G 10 und LH 20. In Tab. 2 sind diese Werte mit den zugehörigen Anregungswellenlängen aufgeführt. Aus der Zusammenstellung geht eindeutig hervor, daß die Emissionsmaxima in den Sephadex-Suspensionen nur um 1–2 m μ gegenüber denen in Wasser verschoben sind. Von den Werten der Emission in Methanol unterscheiden sie sich um größere Beträge, mit den Ausnahmen 3.4-Benzpyren und Phenanthren. Die Unterschiede der Lage der Fluoreszenzmaxima sind bei den verwendeten Sephadexarten vernachlässigbar. Dieses bedeutet aber, daß sich die Kohlenwasserstoffe auch im Sephadex-Gel in der weitgehend intakten Solvatationshülle des Wassers befinden oder in Solvatations-Strukturen des Gels, die analoge Wirkungen auf den Kohlenwasserstoff ausüben, wie die Hydrathülle. Vollständig gleichgertigt kann aber die Solvatation im Gel und im Wasser nicht sein, sonst könnte man nicht die großen Konzentrationsunterschiede der gelösten Kohlenwasserstoffe zwischen den Systemen beobachten. Demnach sind die 1–2 m μ ernst zu nehmen, um welche die

Aromaten in Sephadex-Gelen langwelliger emittieren, als in wäßriger Lösung. Die höher geordneten Strukturen in den Sephadex-Gelen stabilisieren die (schwach) polaren Anregungszustände der Kohlenwasserstoffe in stärkerem Maße, als es das reine Wasser vermag.

Experimentelle Hinweise

Zur Darstellung der Kohlenwasserstoff-Suspensionen wurden deren gesättigte Lösungen in Methanol zu Wasser getropft (2–3 Tropfen), so daß im Wasser gleiche Opaleszenzen zu beobachten waren.

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Aminco-Bowman-Spektrofluorometer aufgenommen. Alle angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Das Sephadex wurde mindestens drei Stdn. in Wasser quellen gelassen und danach immer etwa gleiche Mengen feuchten Gels mit Hilfe eines Pipettenrohrs in 2,5 ml Kohlenwasserstoffsuspension eingebracht. Vor jeder Messung wurde das abgesetzte Sephadex kräftig aufgerührt, um das Gel gleichmäßig in den Lichtweg zu bringen. Das Spektrum der reinen Kohlenwasserstoff-Suspensionen wurde sowohl vor der Zugabe von Sephadex-Gel, als auch nach dessen Absetzen aufgenommen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Sachbeihilfen.