

DIREKTNA REAKCIJA PIRIDINIJSKIH OKSIMA SA ORGANOFOSFORNIM JEDINJENJIMA

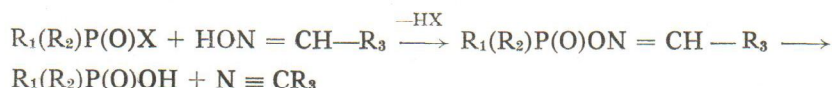
V. Markov¹, M. Maksimović¹, Z. Binenfeld²

Vojnotehnički institut, Beograd¹, Zavod za organsku kemiju i biokemiju
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Zagreb²

(Primljeno 8. VI 1984)

Ispitana je *in vitro* interakcija devet mono- i bis-piridinijskih mono- i dioksima sa tabunom, sarinom, somanom i VX. Reakcija je praćena spektrofotometrijski u pH 7,7 na 37°C, pri koncentraciji oksima $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L i koncentraciji organofosfata $8 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Oksimi se najbrže fosforilišu tabunom i sarinom ($t/2 = 3,4-16,7$ min), nešto sporije somanom ($t/2 = 14,4-22,5$ min), a veoma sporo ako se upotrebi VX ($t/2 = 191,1-457,5$ min). S obzirom na to da su konstante brzine izračunate iz reakcije samo jedne koncentracije otrova i jedne koncentracije oksima, koje nisu identične koncentracijama u *in vivo* eksperimentu, teško je proceniti povezanost fosforilacije *in vitro* i efikasnosti oksima *in vivo*.

Mono- i bis-kvaternerni oksimi (Pralidoksim, Obidoksim, Trimedoksim) su zaštitna sredstva u trovanjima organofosfornim antiholinesterazama, u koje spadaju i nervni bojni otrovi. Svojim nukleofilnim delom molekule oksimi odvajaju fosforilnu grupu od površine fosforilisane holinesteraze, čime se regeneriše prvobitna enzimaska aktivnost (reaktivacija). Međutim, dokazano je da oksimi, u fiziološkim uslovima (odgovarajuće pH i temperatura), mogu direktno reagovati sa organofosfornim jedinjenjima pri čemu se formira fosforilisani oksim (1, 2, 3):



Fosforilisani oksim je najčešće nestabilan, pa se spontano raspada u netoksične proizvode — nitril i alkilfosfonsku, odnosno alkilfosfornu kiselinu (4, 5, 6), ali može delovati i kao snažno antiholinesterazno i veoma toksično jedinjenje i komplikovati terapiju trovanja organofosfatima. *In vitro* je pokazano da holinesteraza, inhibirana različitim organofosfornim jedinjenjima, a potom reaktivirana oksimima, može biti ponovo inhibirana fosforilisanim oksimom nastalim u toku reaktivacije (7, 8).

Brzina reinhibicije zavisi od stabilnosti fosforilisanog oksima i njegove efikasnosti kao inhibitora (9).

Merenje brzine reakcije oksima sa organofosforim jedinjenjima zavisi se na merenju povećanja koncentracije fluoridnog jona, ako je reč o fluorofosfatima ili fluorofosfonatima (4, 10, 11), ili na praćenju smanjenja intenziteta betainske trake oksima, u alkalnom medijumu, na odgovarajućoj talasnoj dužini (2, 5, 6, 12). Osim toga, reakcija se može pratiti i gasnom hromatografijom preko smanjivanja koncentracije organofosfata (13).

U prethodnom radu (14) ispitivali smo direktnu reakciju oksima HI-6 i HS-6 sa tabunom, sarinom, somanom i VX u puferu pH 7,7 i na 37 °C, a u ovom radu proširili smo ispitivanja i na druge mono- i bis-piridinijske mono- i dioksime, sa ciljem da se dobije uvid u to kako na reakciju utiču hemijske strukture piridinijskih oksima i organofosfata.

MATERIJAL I METODE

Rastvor pufera pH 9,7 pripremljen je mešanjem 645 ml 0,025 mol/L rastvora barbiturne kiseline, 25 ml 0,5 mol/L rastvora natrijumbarbiturata, 75 ml 0,5 mol/L rastvora natrijumhlorida i destilovane vode do 1000 ml.

Organofosforna jedinjenja. Tabun (etil N,N-dimetilaminocijanofosfat), sarin (izopropilmetilfluorofosfonat), soman (pinakolilmetilfluorofosfonat) i VX (etil-S-diizopropilamino etil metiltiofosfonat), sintetisani u Vojnotehničkom institutu, bili su čistoće 97 do 98%. Osnovni rastvori organofosfata, 0,123 mol/L, pripremljeni su u propanolu-2.

Oksimi, primenjeni u ovim ispitivanjima (tabela 1), sintetizovani u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju PMF u Zagrebu, bili su više od 99,5 postotne čistoće. Rastvori oksima su pravljani u rastvoru pufera u približnoj koncentraciji od $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Postupak za ispitivanje direktne reakcije oksima sa OFJ. Reakcija fosforilacije oksima praćena je spektrofotometrijski spektrofotometrom Varian Superscan, u kivetama od 1 cm termostatiranim na 37 °C. Najpre se rastvor oksima termostatira 5 minuta, a zatim doda 20 μ l osnovnog rastvora OFJ, tako da njegova koncentracija u reakcionoj smeši iznosi $8 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Odmah po dodavanju rastvora OFJ snima se UV spektar ispitivane reakcione smeše, a zatim se smanjenje apsorbancije betainske trake oksima (UV_{max} u tabeli 1) prati spektrofotometrijski u određenim vremenskim intervalima.

Način izračunavanja brzine reakcije. Iz dijagrama zavisnosti logaritamskih vrijednosti apsorbancije (merilo koncentracije oksima) i vremena reakcije, metodom najmanjih kvadrata, na programiranom kalkulatoru HP-97S, izračunate su jednačine pravca. Iz nagiba su izračunate kon-

stante brzine reakcije pseudo prvog reda prema jednačini

$$k_{obs} = -2,303 \cdot \text{vrednost nagiba (min}^{-1}\text{)}$$

te zatim poluvreme reakcije prema jednačini

$$t_{1/2} = 0,693/k_{obs} \text{ (min)}$$

REZULTATI I DISKUSIJA

Vrednosti konstante brzine fosforilacije pseudo prvog reda (k_{obs}) i poluvremena reakcije prikazani su u tabeli 2. Dobljeni rezultati nedvosmisleno potvrđuju da je došlo do nastanka fosforilisanog oksima. Konstante brzine fosforilacije su različite i zavise od upotrebljenog organofosfata i oksima. Oksimi se najvećom brzinom fosforilišu tabunom i sarinom, nešto sporije somanom, a veoma sporo ako se upotrebi VX.

Redosled oksima prema brzini fosforilacije je skoro isti kod tabuna i VX, a veoma sličan kada je reč o sarinu i somanu.

Tabela 1.
Hemijska struktura oksima

OKSIM					UV max u pH 7,7 (nm)
	R ₁	R ₂	a	b	
HS-6·2H ₂ O	CO	NH ₂	2	3	354
HGO-12·2H ₂ O	CO	pH	2	3	355
HI-6·H ₂ O	CO	NH ₂	2	4	352
HI-1	CO	NH ₂	4	3	355
HI-2	CO	NH ₂	4	4	353
TOKSOGONIN	CH=NOH	-	4	4	354
PAM-2		Cl ⁻			336
PAM-4		J ⁻			336
TMB-4		2Cl ⁻			345

Tabela 2.

Konstante brzine fosforilacije oksima sa OFJ na pH 7,7 i 37 °C.
U zagradama je dato poluvreme fosforilacije u minutama.

Oksim	k_{obs} (min ⁻¹)			
	Tabun	Sarin	Soman	VX
HS-6*	$2,0 \cdot 10^{-1}$ (3,4)	$1,2 \cdot 10^{-1}$ (5,8)	$3,1 \cdot 10^{-2}$ (22,5)	$3,6 \cdot 10^{-3}$ (191,1)
HGG-12*	$1,2 \cdot 10^{-1}$ (5,5)	$9,6 \cdot 10^{-2}$ (7,2)	$2,6 \cdot 10^{-2}$ (26,6)	$3,3 \cdot 10^{-3}$ (212,6)
HI-6*	$1,7 \cdot 10^{-1}$ (3,9)	$1,2 \cdot 10^{-1}$ (5,9)	$3,8 \cdot 10^{-2}$ (18,1)	$3,4 \cdot 10^{-3}$ (204,5)
HI-1	$1,2 \cdot 10^{-1}$ (5,8)	$1,7 \cdot 10^{-1}$ (4,1)	$4,8 \cdot 10^{-2}$ (14,4)	$2,9 \cdot 10^{-3}$ (238,1)
HI-2*	$1,1 \cdot 10^{-1}$ (6,1)	$1,5 \cdot 10^{-1}$ (4,5)	$3,9 \cdot 10^{-2}$ (17,9)	$3,3 \cdot 10^{-3}$ (210,0)
Toksogonin	$1,0 \cdot 10^{-1}$ (6,8)	$1,2 \cdot 10^{-1}$ (5,9)	$3,5 \cdot 10^{-2}$ (19,1)	$2,6 \cdot 10^{-3}$ (268,7)
PAM-2	$1,1 \cdot 10^{-1}$ (6,4)	(4,3) $1,6 \cdot 10^{-1}$	$3,9 \cdot 10^{-2}$ (17,8)	$2,7 \cdot 10^{-3}$ (251,6)
PAM-4	$4,2 \cdot 10^{-2}$ (16,7)	$1,3 \cdot 10^{-1}$ (5,2)	$3,6 \cdot 10^{-2}$ (19,2)	$1,5 \cdot 10^{-3}$ (457,5)
TMB-4	$5,6 \cdot 10^{-2}$ (12,4)	$1,4 \cdot 10^{-1}$ (5,1)	$3,8 \cdot 10^{-2}$ (18,2)	$1,6 \cdot 10^{-3}$ (432,2)

* Konstante brzine spontane hidrolize oksima pri istim uslovima bile su za HS-6 $1,2 \cdot 10^{-3}$, za HGG-12 $8,7 \cdot 10^{-4}$, za HI-6 $1,1 \cdot 10^{-3}$ i za HI-2 $7,0 \cdot 10^{-4}$ min⁻¹.

Od monopiridinijskih oksima, u reakciji sa sva četiri OFJ, brže se fosforiliše PAM 2 od PAM-4, posebno u reakciji sa tabunom i VX, a kod bispiridinijskih monoksima brzina fosforilacije zavisi od tipa OFJ. Derivati piridin-2-aldoksima HS-6, HI-6 i HGG-12 brže reaguju sa tabunom i VX od odgovarajućih derivata piridin-4-aldoksima HI-1 i HI-2, a obrnut je slučaj kada je reč o sarinu i somanu. Pri tome, položaj karbamoilne grupe ne utiče na brzinu interakcije.

Brzina reakcije kod dioksima takođe zavisi od tipa OFJ. U prisustvu tabuna i VX reakcija se odigrava oko dva puta brže sa toksogoninom nego sa TMB-4, dok su razlike u brzini fosforilacije ova dva oksima somanom i sarinom minimalne.

Između monopiridinijskih i bispiridinijskih oksima postoje takođe razlike u brzini fosforilacije.

Ako je oksimska grupa u položaju 2, monopiridinijski oksim (PAM-2) se brže fosforiliše sarinom i somanom od bispiridinijskih oksima (HS-6, HI-6 i HGG-12), dok su u reakciji sa tabunom i VX bispiridinijska jedinjenja u prednosti.

Međutim, ako je oksimska grupa u položaju 4, onda se monopiridinijumski oksim (PAM-4) sporije fosforiliše od bispiridinijumskih oksima.

Iz naših rezultata proizlaze dokazi, u *in vitro* uslovima, o interakciji oksima sa OFJ. Međutim, postavlja se pitanje da li fosforilacija ima neki značaj u proceni reaktivatorskih ili zaštitnih moći oksima *in vivo* ili *in vitro*. Na primer, HI-6, TMB-4, i toksogonin ne fosforilišu se najbrže, što bi se moglo očekivati ako bi brzina fosforilacije bila uslovljena njihovom efikasnošću. Do sličnog zaključka došli su Rakin i saradnici (15) ispitujući brzinu inaktivacije somana i sarina oksimima HI-6, HGG-12 i PAM-2. S obzirom na to da koncentracije reaktanata (OFJ i oksima), u *in vitro* ispitivanjima, nisu identične koncentracijama koje se nalaze u *in vivo* eksperimentima, nakon aplikacije otrova i oksima, i da su brzine izračunate iz reakcije samo jedne koncentracije otrova i jedne koncentracije oksima, a od odnosa ovih koncentracija zavisi brzina reakcije, teško je proceniti povezanost fosforilacije *in vitro* i efikasnosti oksima *in vivo*.

Literatura

1. Green, A. L., Saville, B.: J. Chem. Soc, (1956) 3887.
2. De Jong, L. P. A., Wolring, G. Z.: Pharmacology, 27 (1978) 2229.
3. Nenner, M.: Biochem. Pharmacol., 23 (1974) 1225.
4. Blanch, J. H.: J. Chem. Soc. (B), (1969) 1172.
5. Hackley, B. E., Steinberg, G. M., Lamb, J. C.: Arch. Biochem. Biophys., 80 (1959) 211.
6. Hagedorn, I., Gundel, W. H., Schoene, K.: Arzneimittel-Forsch., 19 (1969) 603.
7. Schoene, K.: Biochem. Pharmacol., 21 (1972) 103.
8. Wilson, I. B., Ginsburg, S.: Biochem Biophys. Acta, 18 (1955) 168.
9. Schoene, K.: Kinetic studies on chemical reactions between acetylcholinesterase, toxic organophosphates and pyridinium oximes. Medical Protection against Chemical Warfare Agents, SIPRI, Almqvist and Wiksell International, Stockholm 1976, str. 88.
10. Ashani, Y., Dinar, N., Cohen, S.: S.: J. Med. Chem., 11 (1968) 967.
11. De Jong, L. P. A., Ceulen, I. D.: Biochem. Pharmacol., 27 (1978) 857.
12. Schoene, K.: Biochem. Pharmacol., 22 (1973) 2297.
13. Okonek, S.: Arch. Toxicol., 29 (1972) 255.
14. Markov, V.: Ispitivanje postupaka za određivanje HI-6 u vodenim rastvorima, određivanje njegove stabilnosti i interakcija sa organofosforinim jedinjenjima. Magistarski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd 1983.
15. Rakin, D., Toković, B., Bošković, B.: On the *in vitro* interaction of sarin and soman with PAM-2, HI-6 and HGG-12. Abstracts of Second International Meeting on Cholinesterases, Bled, Yugoslavia 1983, str. 149.

Summary

DIRECT INTERACTION OF PYRIDINIUM OXIMES WITH ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

A direct interaction of organophosphorus nerve agents sarin, tabun, soman and VX with nine quaternated pyridinium aldoximes was studied *in vitro*. The kinetics of the reaction (k_{obs}) was measured by UV spectrophotometry from decrease in oxime concentration. At an oxime concentration of 5×10^{-5} mol/L and organophosphate concentration of 8×10^{-4} mol/L, at pH 7.7 the half-period of the reaction between oximes and sarin or tabun was between 3.4 and 16.7 min. The half-period of the reaction between oximes and soman was slightly increased (14.4—22.5 min), and between oximes and VX it was greatly increased (191.1—457.5 min).

Considering that the reaction rate constants were calculated from the reaction of only one organophosphate and one oxime concentration, which were not identical with those *in vivo*, it is difficult to estimate to what extent these reactions may be useful in the therapy of intoxication by nerve agents.

Military Technical Institute, Belgrade¹
Laboratory of Organic Chemistry and
Biochemistry, Faculty of Science and
Mathematics, University of Zagreb, Zagreb²

Received for publication
June 8, 1984