Die gas-chromatographische Untersuchung von dimeren Pyrimidinen, XXIII *

Investigation of Dimeric Pyrimidines by Gas Chromatography, XXIII*

EGON FAHR, REINHARD PASTILLE und HANSJÖRG MAGERL

Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg

(Z. Naturforsch. **28 b**, 454–458 [1973]; eingegangen am 19. März 1973)

Gas chromatography, dimeric pyrimidines

Dimeric pyrimidines (dimeric uracils, dimeric thymines, dimeric uridines) could be detected in complex mixtures of irradiation products by gas chromatography after methylation or silylation.

Die Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von Nukleinsäuren und deren Bestandteile ablaufenden Prozesse ist wegen der Fülle der dabei entstehenden Bestrahlungs-Produkte zu einem schwierigen analytischen Problem geworden. Die in der Regel zur Auftrennung verwandten Methoden der Dünnschicht-, Papier- und Säulen-Chromatographie sind häufig zeitraubend und nicht immer zuverlässig. Auch die Identifizierung macht oft – besonders im Falle der Cyclobutan-Dimeren – Schwierigkeiten¹⁻³. Die Massenspektrometrie ist zwar sehr empfindlich; sie erlaubt jedoch keine Unterscheidung der verschiedenen Pyrimidin-Dimeren vom Cyclobutan-Typ, da diese für die einzelnen Dimeren keine spezifischen Fragmente ergeben¹⁻⁴. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht in manchen Fällen (z. B. bei den dimeren Thyminen⁴) zwar eine Identifizierung der einzelnen Dimeren im Dimeren-Gemisch, setzt jedoch mg-Mengen an Substanz und brauchbare Löslichkeit der Bestrahlungs-Produkte in den für die NMR-Spektroskopie geeigneten Lösungsmittel voraus. Darüberhinaus versagt diese

Methode z. B. bei den dimeren Uracilen. Die IR-Spektroskopie ist zwar grundsätzlich für die Identifizierung von Substanzen hervorragend geeignet⁵, die in der Regel benötigten Mengen liegen aber immer noch zwischen 0,01 und 0,1 mg. Weiter müssen andere Bestandteile, deren Anteil größer als 10% ist, sorgfältig abgetrennt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, daß sich mit Hilfe der Gas-Chromatographie einfach und noch im μg -Bereich eine Analyse von Bestrahlungs-Produkten – auch in komplexen Gemischen – ausführen läßt.

Experimentelles

Gas-chromatographische Methoden:

Verwandt wurde ein Gas-Chromatograph, Modell 1800, der Firma VARIAN GmbH.

I. Säulen für methylierte Bestrahlungs-Produkte: Glas- bzw. Metallsäule $5' \times 1/4''$, gepackt mit 3% SE 30 auf Varop. 30 80/100 mesh.

II. Säulen für silylierte Bestrahlungs-Produkte: Glassäule $1/4'' \times 2\text{ mm} \times 6$, gepackt mit 3% OV 101 auf Chromosorp W High Performance 100–200 mesh. Zur Vorbehandlung wurde die Säule langsam ($10^\circ/\text{min}$) auf 350°C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 30 Min. ausgeheizt. Danach wurden 3–4 ml Trimethylchlorsilan in die Säule eingespritzt.

Methylierungen⁶

Maximal 20 mg eines Pyrimidin-Dimeren werden in 15 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) bei Raumtemperatur so lange gerührt (unter Umständen 5–7 Tage), bis praktisch eine klare Lösung entstanden ist. Zu dieser werden 2,5 g Silberoxid und 15 ml frisch destilliertes Methyljodid gegeben. Nach weiterem 5-tägigen Rühren bei Raumtemperatur erfolgt Zugabe von weiteren 5 ml DMSO und Filtra-

* XXIII. Mitteilung in der Reihe „Die Einwirkung von Strahlung auf Nukleinsäure-Bestandteile“; XXII. Mitteilung E. FAHR, P. MAUL, K.-A. LEHNER und D. SCHEUTZOW, Z. Naturforsch. **27b**, 1481 [1972]. Teil der Dissertation R. PASTILLE 1972, und der in Arbeit befindlichen Dissertation H. MAGERL, beide Univ. Würzburg.

Verwandte Abkürzungen: DMU = 1,3-Dimethyluracil, DMT = 1,3-Dimethylthymine, LM = Lösungsmittel, GC = Gas-Chromatographie, Ura = Uracil, Thy = Thymin, U = Uridin.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. FAHR, Institut für Organische Chemie der Universität, D-8700 Würzburg, Landwehr.

tion. Das Filtrat wird tropfenweise mit so viel Chloroform (50–70 ml) versetzt, bis sich kein weißbrauner Niederschlag mehr ausscheidet. Dieser wird abfiltriert, das Chloroform/DMSO-Filtrat i. Hochvak. zur Trockene gebracht und der verbleibende Rückstand in 50 ml einer 5-proz. KCN-Lösung gelöst.

Die Lösung wird mit 100 ml Chloroform extrahiert und der Chloroform-Extrakt i. Vak. zur Trockene eingengt. Der verbleibende Rückstand wird in 2–3 ml Chloroform gelöst und gas-chromatographisch untersucht.

Silylierungen

Ca. 5–7 mg Substanz werden in 0,7 ml Pyridin (für GC) aufgeschlämmt, mit 0,2 ml *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid und 0,1 ml Trimethylchlorosilan versetzt und unter Feuchtigkeitsschluß 45 Min. im Ölbad auf 130 °C erhitzt. Die überstehende Lösung wird direkt gas-chromatographisch untersucht.

Darstellung der untersuchten Cyclobutan-Dimere

Dimere Dimethyluracile^{7,8}, dimere Dimethylthymine⁹, dimere Uracile¹⁰, dimere Thymine¹¹ (modifiziert nach Lit.^{9,12}), dimere Uridine^{7,9,12}, *cis/syn*-Thymin/Uracil-Mischdimeres⁹ (zur Struktur s. Lit.⁹).

- a: $R^1=R^2=CH_3$, $R^3=R^4=H$
 b: $R^1=R^2=R^3=R^4=CH_3$
 c: $R^1=R^2=R^3=R^4=H$
 d: $R^1=R^2=H$, $R^3=R^4=CH_3$
 e: $R^1=$ Ribosyl, $R^2=R^3=R^4=H$
 f: $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=CH_3$

Ergebnisse

Bestrahlungs-Produkte, besonders die Cyclobutan-Dimeren, sind sehr schwer flüchtig. Zum Teil werden sie beim Erwärmen monomerisiert. Um sie besser flüchtig und damit für die Gas-Chromatographie verwendbar zu machen, haben wir Methylierung und Silylierung geprüft. Untersucht wurden dimere Uracile, dimere Thymine und dimere Uridine.

Methylierte Dimere

Bei der Methylierung von dimeren Uracilen und dimeren Thyminen entstehen unter den von uns verwandten Bedingungen die Tetramethyl-Derivate (dimere Dimethyluracile (1a)–(4a) bzw. dimere Dimethylthymine (1b)–(4b). Allerdings erfolgt bei den instabilen *anti*-dimeren Uracilen (1a) und (3a) zum Teil Monomerisierung¹³. Die Gas-Chromatogramme der dimeren DMU und dimeren DMT zeigen die Abb. 1 und 2, aus denen hervorgeht, daß die Peaks von 1a und 3a nicht völlig getrennt werden konnten. Zum Nachweis der beiden Dimeren in einem Gemisch langt die Auftrennung allerdings aus. Die untere Nachweisgrenze liegt unter den von uns verwandten apparativen Bedingungen bei den di-

Abb. 1. Gas-chromatographische Auftrennung einer Mischung der vier dimeren DMU (1a)–(4a) und monomeren DMU.

a. Säulen-Temperatur: 255 °C, Detektor-Temperatur: 275 °C, Injektor-Temperatur: 275 °C, Durchflußgeschwindigkeit von N_2 , O_2 , H_2 : 25 ml/min, eingespritzte Menge 0,8 μ l. Empfindlichkeit: $16/10^{-11}$.

b. Säulen-Temperatur: 120–260 °C programmiert in 20°/min, LM = Chloroform.

Abb. 2. Gas-chromatographische Auftrennung einer Mischung der dimeren DMT (1b), (2b) und monomeren DMT.

Apparative Bedingungen: a. s. Abb. 1a; b. s. Abb. 1b.

meren DMU und dimeren DMT bei ca. 10 ng, Monomerisierung erfolgt nicht, so daß auf diesem Wege eine quantitative Bestimmung der dimeren DMU und dimeren DMT* möglich ist.

Die Gas-Chromatogramme der Bestrahlungs-Produkte vom DMU und DMT in der Eismatrix zeigen die Abbn. 3 und 4. In Abb. 5 ist das Gas-Chromatogramm eines Gemisches von *cis/syn*-dimerem Uracil (2c) und *cis/syn*-dimerem Thymin (2d) nach Methylierung wiedergegeben.

Silylierte Dimere

Die Silylierung wurde bei der gas-chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchung der in Nukleinsäuren vorkommenden Pyrimidin- und Purin-Bestandteile wiederholt angewandt^{15,16}. Die Gas-Chromatogramme silylierter dimerer Uracile zeigt die Abb. 6. Ihre Retentionszeiten – einzeln bestimmt – unterscheiden sich deutlich, im Gemisch lassen sich jedoch 1c/2c und 3c/4c nicht voneinander trennen. Ein weiterer Nachteil der Silylierung ist, daß dabei die säure-instabilen dimeren Uracile (1c) und (3c)¹⁰ weitgehend monomerisiert werden. In den Abbn. 7 und 8 sind die Gas-Chromatogramme von Gemischen der dimeren Thy-

* Dimere DMT wurden auch von R. KLEOPFER und H. MORRISON¹⁴ gas-chromatographisch quantitativ bestimmt.

Abb. 3. Gas-Chromatogramm der UV-Bestrahlungs-Produkte von DMU in der Eismatrix (in Chloroform). Apparative Bedingungen: s. Abb. 1b.

Abb. 4. Gas-Chromatogramm der UV-Bestrahlungs-Produkte von DMT in der Eismatrix (in Chloroform). Apparative Bedingungen: s. Abb. 1b.

Die mit Pfeilen bezeichneten Peaks sind im Maßstab 1:5 vergrößert gezeichnet.

Abb. 5. Gas-Chromatogramm einer methylierten Mischung von dimerem Uracil (2c) und dimerem Thymin (2d) in Chloroform. Apparative Bedingungen: s. Abb. 1a.

Abb. 6. Gas-Chromatogramm silylierter dimerer Uracile.

— Gas-Chromatogramm der Mischung;
- - - theoretische Lage der vier Dimeren auf Grund der Einzeluntersuchung.
Apparative Bedingungen: s. Abb. 1a, jedoch Empfindlichkeit: $2/10^{-11}$.

Abb. 7. Gas-Chromatogramm einer silylierten Mischung von dimerem Thymin (1d) und (2d). Apparative Bedingungen: s. Abb. 1a, jedoch Säulentemperatur 250 °C.

Abb. 8. Gas-Chromatogramm eines silylierten Gemisches von Uracil, Thymin und dem dimeren Thymin (2d). Apparative Bedingungen: s. Abb. 1a, jedoch Säulentemperatur 150 °C.

mine 1d und 2d bzw. von Uracil, Thymin und 2d nach Silylierung wiedergegeben.

Vergleicht man die Retentionszeiten der methylierten und silylierten Dimeren (Tab. I), so zeigt

Tab. I. Retentions-Zeiten der methylierten und silylierten Dimeren (apparative Bedingungen s. Abb. 1a; jedoch Säulen-Temperatur 250 °C).

Dimere	Retentions-Zeiten [sec.] silyliert	methyliert
1c	132	188
2c	140	235
3c	160	178
4c	165	216
1d	119	128
2d	100	175
2f	128	—

sich, daß die silylierten Verbindungen kleinere Retentions-Zeiten haben – also besser flüchtig sind – als die methylierten. Das *cis/syn*-Thymin/Uracil-Mischdimere (2f) liegt nach Silylierung in der Retentions-Zeit zwischen dem *cis/syn*-dimeren Uracil (2c) und dem *cis/syn*-dimeren Thymin (2d). Die Gas-Chromatogramme der dimeren Uridine (1e) und (2e) zeigt Abb. 9.

Abb. 9. Gas-Chromatogramm der Produkte der Uridin-Bestrahlung in der Eismatrix nach Silylierung (oben) und der durch säulen-chromatographische Auftrennung erhaltenen Fraktionen A, A', B, C (s. dazu Lit.⁹) nach Silylierung. Apparative Bedingungen: s. Abb. 1b.

Die Fraktionen A und A' geben bei der Hydrolyse das *cis/syn*-dimere Uracil (2c), B und C die beiden optischen Antipoden des *cis/anti*-dimeren Uracils (1c).

Diskussion

Aus den in den Abbn. 1 bis 5 dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß sich dimere Uracile und dimere Thymine nach Überführung in die entsprechenden Tetramethyl-Derivate auch in komplexen Gemischen gas-chromatographisch nachweisen lassen. Die Silylierung bewährt sich vor allem bei der Untersuchung der dimeren Uridine (s. Abb. 9).

Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens demonstriert die Untersuchung der bei der UV-Bestrahlung von Uridin in der Eismatrix entstehenden Produkte (Abb. 9). Nach Silylierung wurden neben dem Peak des monomeren Uridins (U) insgesamt 9 Peaks beobachtet, von denen 4 nicht näher identifi-

ziert werden konnten (mit * bezeichnet). Möglicherweise sind sie dem *trans/anti*-dimeren Uridin (**3e**), dem *trans/syn*-dimeren Uridin (**4e**) (2 Enantiomere) und einer Verbindung zuzuordnen, die bei der Hydrolyse **5** liefert. Die Bildung einer derartigen Substanz bei der UV-Bestrahlung von Uridin in der Eismatrix wurde von G. FÜRST¹⁷ (s. dazu auch Lit. 2) und A. J. VARGHESE¹⁸ beschrieben.

Weiterhin ist auf diesem Wege eine Reinheitskontrolle von bereits isolierten Bestrahlungs-Produkten möglich, die über die Leistungsfähigkeit der Dünnschicht- und Papier-Chromatographie hinausgeht. So zeigen die Gas-Chromatogramme (Abb. 9) der dünn- und papier-chromatographisch einheitlichen Fraktionen A, A' und B der säulen-chromatographischen Auftrennung der Produkte der UV-Bestrahlung von Uridin in der Eismatrix, daß sich A und A' sowie A/A', C und B nicht völlig voneinander trennen ließen. Überraschend ist weiter, daß die Fraktion C, die bei der Hydrolyse *cis/anti*-dimeres Uracil lieferte, sowohl im Gemisch als auch nach Abtrennung zwei dicht benachbarte, nicht völlig getrennte Peaks aufwies.

Wir danken Fräulein S. KLÜPFEL für ihre Mithilfe bei den Untersuchungen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie für großzügige Förderung.

- ¹ E. FAHR, Strahlentherapie **141**, 718 [1971].
- ² E. FAHR, Angew. Chem. **81**, 581 [1969]; Angew. Chem. Intern. Edit. **8**, 578 [1969].
- ³ E. FAHR, Studia Biophysica **19**, 1 [1970].
- ⁴ B. H. JENNINGS, S.-C. PASTRA und J. L. WELLINGTON, Photochem., Photobiol. **11**, 215 [1970].
- ⁵ E. FAHR und W. ROHLFING, Z. analyt. Chem. **243**, 43 [1968].
- ⁶ D. ELAD, I. ROSENTHAL und S. SASSON, J. chem. Soc. [London], Ser. C **1971**, 2053.
- ⁷ P. MAUL, Dissertation Universität Würzburg 1971.
- ⁸ E. FAHR, G. FÜRST, P. MAUL und H. WIESER, Z. Naturforsch. **27b**, 1475 [1972].
- ⁹ R. PASTILLE, Dissertation Würzburg 1972.
- ¹⁰ P. RICHTER und E. FAHR, Angew. Chem. **81**, 188 [1969], Angew. Chem. Intern. Edit. **8**, 208 [1969], Tetrahedron Letters [London] **1970**, 1921.
- ¹¹ D. WEINBLUM und H. E. JOHNS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **114**, 450 [1966].
- ¹² B. SOJKA, Dissertation Universität Würzburg 1969.
- ¹³ H. MAGERL, in Arbeit befindliche Dissertation Universität Würzburg.
- ¹⁴ R. KLEOPFER und H. MORRISON, J. Amer. chem. Soc. **94**, 255 [1972].
- ¹⁵ C. W. GEHRKE und D. B. LAKINGS, J. Chromatogr. [Amsterdam] **61**, 45 [1971].
- ¹⁶ A. M. LAWSON, R. N. STILLWELL, M. M. TACKER, K. TSUBOYAMA und J. A. MCCLOSKEY, J. Amer. chem. Soc. **93**, 1014 [1971].
- ¹⁷ G. FÜRST, Dissertation Universität Würzburg 1968.
- ¹⁸ A. J. VARGHESE, Biochemistry **10**, 4283 [1971].