

γ -Radiolyse wäßriger, sauerstoffhaltiger Lösungen von 5-Brom-2'-desoxyuridin (I)

Identifizierung von Radiolyseprodukten

γ -Radiolysis of Aqueous Solutions of 5-Bromo-2'-deoxyuridine in Presence of Oxygen I
Identification of Products

P. KOURIM * und W. BORS

Institut für Strahlenchemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

und

D. SCHULTE-FROHLINDE

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Abteilung Strahlenchemie, Mülheim/Ruhr

(Z. Naturforsch. **26 b**, 308–311 [1971]; eingegangen am 20. August 1970)

γ -radiolysis of 5-bromo-2-deoxyuridine in neutral oxygen saturated aqueous solutions leads to the following products: hydrogen bromide, hydrogen peroxide, organic peroxides, isodialuric acid deoxyriboside, deoxyuridine, deoxyribosylurea, urea, deoxyribose and 5-bromouracil. In addition some unidentified products are formed. The main products are isodialuric acid deoxyriboside and hydrogen bromide.

5-Bromuracil (BU) läßt sich in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) von Phagen einbauen. Hierdurch wird die Strahlenempfindlichkeit der Phagen um ein Mehrfaches erhöht¹. Um einen Beitrag zur Aufklärung der chemischen Vorgänge bei dieser Sensibilisierung zu leisten, wurde in vorangegangenen Arbeiten^{2, 3} die Radiolyse von BU in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung untersucht.

Im Folgenden werden diese Arbeiten auf den nächst größeren 5-Bromuracil enthaltenden Baustein der DNS, das 5-Bromdesoxyuridin (BUdR), ausgedehnt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung der Radiolyseprodukte.

Ergebnisse

Der überwiegende Teil der Bestrahlungen wurde in wäßrigen, mit Sauerstoff gesättigten Lösungen an BUdR (Konz. $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) durchgeführt. Die Zahl und Art der Radiolyseprodukte ist weitgehend von der BUdR-Ausgangskonzentration und der Strahlendosis unabhängig. Die Trennung der Produkte erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Cellulose-Platten oder auf Papier. Die Identifizie-

rung wurde aufgrund der R_f -Werte, der Fluoreszenz im UV-Licht und der Farbreaktionen im Vergleich mit authentischen Substanzen durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte die Bestimmung der R_f -Werte radiochromatographisch unter Verwendung von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertem BUdR als Ausgangsmaterial. Hierbei konnten Umsatz und aufgetragene Menge 5- bis 10-mal kleiner gewählt werden als mit nichtmarkiertem Material.

Ein typisches Radiochromatogramm zeigt Abb. 1. Die als P_1 und P_5 bezeichneten Peaks wurden nicht zugeordnet. Als Hauptprodukt bildet sich Isodialursäure-desoxyribosid (IDSdR, P_3) analog zur Isodialursäure (IDS) bei der BU-Radiolyse². Weitere Analogien bestehen in der Bildung von Desoxyribosylharnstoff (dRH, P_2) und Desoxyuridin (UdR, P_6). Überdies entstehen noch Verbindungen, die als Hydrolyseprodukte des BUdR und des dRH bezeichnet werden können, nämlich BU, Desoxyribose (dR) und Harnstoff (H, P_5). Einen nicht unwesentlichen Beitrag stellen die zwar beobachteten, aber nicht identifizierten Produkte dar.

Folgende Substanzen konnten jedoch ausgeschlossen werden: IDS und Isobarbitursäure-desoxy-

* P. K., gegenwärtige Adresse: Institut für Kernforschung, Abteilung für Strahlenchemie, Rež bei Prag. Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. D. SCHULTE-FROHLINDE, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Abteilung Strahlenchemie, D-4300 Mülheim/Ruhr.

¹ H. DERTINGER u. H. JUNG, Molekulare Strahlenbiologie, Springer-Verlag, Heidelberg-New York 1969.

² E. GILBERT, O. VOLKERT u. D. SCHULTE-FROHLINDE, Z. Naturforsch. **22 b**, 477 [1967].

³ O. VOLKERT, W. BORS u. D. SCHULTE-FROHLINDE, Z. Naturforsch. **22 b**, 480 [1967].

Substanz (Peak-Bezeichnung in Abb. 1)	Abkürzung	L ₁		L ₂		L ₃
		MN-212	CD	MN-212	CD	MN-212
Desoxyribosylharnstoff (P ₂)	dRH	0,10	0,11			
Isodialursäure-desoxyribosid (P ₃)	IDSdR	0,14	0,16	0,07	0,05	0,50
Harnstoff (P ₄)	H	0,12	0,15	0,02	0,02	0,20
Desoxyribose	dR	0,26	0,30	0,33	0,33	0,70
Desoxyuridin (P ₆)	UdR	0,37	0,40	0,14	0,18	0,55
Bromuracil	BU	0,42	0,50	0,17	0,20	0,52
Bromdesoxyuridin (P ₇)	BUdR	0,60	0,76	0,49	0,55	0,65
		0,62	0,78	0,39	0,47	0,63

Tab. 1. *R_f*-Werte von BUdR und Radiolyseprodukten. Mn-212 — Papier Mn-212, CD — Cellulose-Dünnschicht. L₁: *t*-Butylalkohol/Methylenäthylketon/Ameisensäure/Wasser 44 : 44 : 0,25 : 11. L₂: Essigester/Ameisensäure/Wasser (obere Schicht benutzt) 60 : 5 : 35. L₃: Essigester/Ameisensäure/Wasser 70 : 20 : 10.

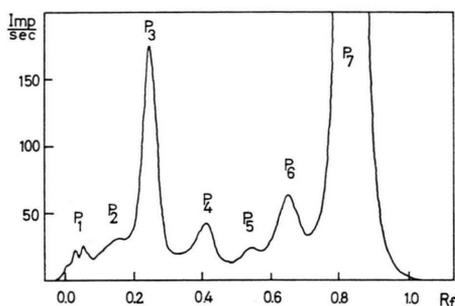


Abb. 1. Radiochromatogramm des bestrahlten BUdR-2-¹⁴C. Konzentration $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, Dosis $1,94 \cdot 10^{18}$ eV/ml, Cellulose Dünnschichtplatte, Laufmittel L₁ (zweimal entwickelt), 40λ (1,4 μ Ci) aufgetragen.

ribosid (IBSdR) sowie dessen Aglykon, die Isobarbitursäure (IBS), obwohl die letztgenannte Verbindung ein Produkt der BU-Radiolyse ist. Die organischen Produkte und ihre chromatographischen Eigenschaften sind aus Tab. 1 ersichtlich.

Daneben entstehen Bromwasserstoff, Wasserstoffperoxid und unbeständige organische Peroxide, die mit üblichen analytischen Methoden bestimmt wurden.

Experimenteller Teil

Bestrahlung: Lösungen von BUdR ($2 \cdot 10^{-3}$ M) wurden in Reagenzgläsern mit Gaseinleitungsrohren in einer ⁶⁰Co- γ -Quelle vom Typ Gammacell 220 bestrahlt. Die Dosisleistung der Quelle betrug $2 \cdot 10^5$ r/h, die absorbierten Dosen lagen zwischen 1 und $4,5 \cdot 10^{18}$ eV/ml. Der höchsten hier angegebenen Dosis entspricht ein Umsatz von 20 Prozent; die niedrigeren Dosen wurden für

die Bestrahlung der radioaktiven Lösungen benutzt. In die mit reinem Sauerstoff bei Atmosphärendruck gesättigten Lösungen (15 Min. begast) wurde auch während der Bestrahlung Sauerstoff eingeleitet.

Ausgangsmaterial: BUdR war ein p.A. Präparat der Fa. Serva, Heidelberg. Das 2-¹⁴C markierte BUdR wurde von New England Nuclear Corp., Boston, erworben; die spezifische Aktivität betrug 58 Ci/mg. Die Substanz enthielt ca. 3% aktive Verunreinigungen, überwiegend UdR.

Vergleichssubstanzen: Harnstoff (H), 2-Desoxy-D-ribose (dR), Desoxyuridin (UdR) und 5-Bromuracil (BU) waren p.A. bzw. reinst Präparate von Serva, Heidelberg. Sie wurden ohne weitere Reinigung als Vergleichssubstanzen verwendet.

Isobarbitursäure (IBS) wurde aus 5-Nitrouracil durch Reduktion und Hydrolyse mit Zinn/Salzsäure gewonnen⁴. Weißes Pulver. Zersetzungsbereich 330–340°. **Isodialursäure (IDS)** wurde aus Isobarbitursäure durch Oxydation mit Bromwasser synthetisiert⁵. Weißes Pulver. Schmp. 135°.

Isobarbitursäure-desoxyribosid (5-Hydroxydesoxyuridin (IBSdR)). Da nach dem von BELTZ und VISSER⁶ beschriebenen Verfahren überwiegend das 5,6-Dihydro-5,6-dihydroxyderivat anstatt IBSdR entstand, wurde versucht, diese Substanz aus UdR-bromhydrin durch Hydrolyse mit NaHCO₃ unter Einleiten von CO₂ zu gewinnen. Auf diese Weise entsteht IBSdR als Hauptprodukt. Dieses ist jedoch noch von BUdR, dR und dRH begleitet. Deswegen wurde IBSdR aus der Zucker- und Basenkomponente synthetisiert.

5-Hydroxy-3',5'-di-O-p-toluyldesoxyuridin. Isobarbitursäure wurde nach dem für Thymin beschriebenen Verfahren⁷ mit Trimethylchlorosilan behandelt: aus 5,79 g IBS wurde 9,87 g des destillierten Tris-trimethylsilylderivats gewonnen. Gelbliche Flüssigkeit. Sdp.₂ 98–100°. Die Kondensation mit 3,5-Di-O-p-toluyldesoxy-D-ribofuranosylchlorid wurde in Benzol mit Silberperchlorat nach einem von WITTENBERG⁸ beschrie-

⁴ D. DAVIDSON u. O. BAUDISCH, Chem. Ber. **58**, 1685 [1925].

⁵ R. BEHREND b. O. ROOSEN, Liebigs Ann. Chem. **251**, 242 [1889].

⁶ R. E. BELTZ u. D. W. VISSER, J. Amer. chem. oc. **77**, 736 [1955].

⁷ T. NISHIMURA u. I. IWAI, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **12**, 352 [1964]; C. A. **60**, 15967 [1964].

⁸ E. WITTENBERG, Chem. Ber. **101**, 1095 [1968].

nen Verfahren durchgeführt. Aus 2,33 g Glykosylchlorid und 2,07 g trimethylsilylierter Base wurde 1,84 g Rohprodukt gewonnen. Eine Probe davon wurde mehrmals aus Äthanol und aus Benzol umkristallisiert. Weiße Kristalle. Schmp. 220–221°. Stickstoffanalyse: ber. 5,83%; gef. 6,1 Prozent. UV-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 240 und 278 nm; in 0,2% KOH in Äthanol: λ_{\max} 240 und 300 nm. NMR-Spektrum im deuterierten Pyridin mit TMS als innerem Standard (τ -Werte): H(ar) 1,98 und 2,83; CH₃(ar) 7,83; H(6) 2,49; H(1') 3,24; H(2') 7,36.

Isobarbitursäure-desoxyribosid (5-Hydroxydesoxyuridin) (IBSdR). 5-Hydroxy-3',5'-di-O-p-toluyldesoxyuridin (78 mg) wurde in 3,5 ml 0,15 M Natriummethylat (in absolutem Methanol) gelöst und nach 20 Stdn. bei Raumtemperatur noch 10 Min. zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurde die Lösung mit Amberlite IR-120 neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert, aus dem Filtrat Methanol unter vermindertem Druck entfernt und der Toluylsäuremethylester mit Methylchlorid extrahiert. Die wäßrige Lösung wurde in Vakuum eingeeengt. Nach längerem Stehen schieden sich farblose Kristalle aus. Schmp. 208–209° (l. c.⁶ 209–211°). Lage der Absorptionsmaxima im UV und die Extinktionskoeffizienten entsprechen den in l. c.⁶ angegebenen. NMR-Spektren im deuterierten Pyridin mit TMS als innerem Standard: H(6) 2,02; H(1') 3,07; H(3') 5,17; H(4') 5,71; H(5') 6,00; H(2') 7,54.

R_f -Werte: Papier, Laufmittel L₁ 0,40; L₂ 0,09; L₃ 0,41; Cellulose-Dünnschicht, L₁ 0,39; L₂ 0,11.

Desoxyribosylharnstoff (dRH). dRH wurde einerseits durch Ammoniakolyse des 3,5-Di-p-nitrobenzoylderivats (Methode A), andererseits durch Hydrogenolyse des 3,5-Dibenzyläther (Methode B) gewonnen und als Lösung zum Vergleich mit den bestrahlten Proben benützt.

A. 150 mg 3,5-Di-O-p-nitrobenzoyl-2-desoxy-D-ribofuranosylharnstoff (aus 3',5'-Di-O-p-nitrobenzoylthymidin durch Oxydation mit KMnO₄⁹) wurde mit 40 ml absolutem Ammoniak gesättigtem Methanol versetzt. Nach 3 Tagen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit wenig Wasser zerrieben, der unlösliche Teil abfiltriert, das Filtrat von Resten des nachacylierten Produkts durch mehrmaliges Schütteln mit Äther befreit.

B. 50 mg 3,5-Di-O-benzyl-2-desoxy-D-ribofuranosylharnstoff¹⁰ in 5 ml Äthanol wurde in einer analytischen Hydrierungsapparatur mit 50 mg 10% Pd auf CaCO₃ und 55 mg Benzylmethyläther als Hydrierungspromotor versetzt. Nach 1-stdg. Rühren bei Raumtemperatur und normalem Druck wurde die theoretische Menge von Wasserstoff verbraucht. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck von Lösungsmittel und Toluol befreit. Weißes, hygroskopisches Pulver (25 mg, 100% der Theorie).

⁹ W. E. JENSEN, A. S. JONES u. G. W. ROSS, J. chem. Soc. [London] 1965, 2463.

¹⁰ J. ŠMEJKAL, J. FARKAŠ u. F. ŠORM, Collect. czechoslov. chem. Commun. 31, 291 [1966].

Die R_f -Werte beider Präparate waren identisch: Papier, Laufmittel L₁ 0,10 und 0,14; L₂ 0,07; L₃ 0,50; Cellulose-Dünnschicht, L₁ 0,10 und 0,15; L₂ 0,05. Die Furanosyl- und Pyranosylformen des Desoxyribosylharnstoffs wandeln sich in Lösung relativ leicht ineinander um⁹. Es wurde in dieser Arbeit nicht versucht, die Isomere zu trennen. Die Isomeren trennen sich mit Laufmittel L₁.

Isodialursäure-desoxyribosid (IDSdR). 538 mg IBSdR in 35 ml H₂O wurden im Eisbad gekühlt, unter Rühren Bromwasser zugetropft (1 Moläquivalent) und die Spuren von überschüssigem Brom mit Stickstoff ausgeblasen. Um HBr zu entfernen, wurden 3,6 g Merck-Ionenaustauscher II (schwach basisch) zugegeben und die Lösung gerührt bis der pH konstant blieb (pH ~5,5). Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und das Filtrat gefriergetrocknet. Der weiße, feste Rückstand (629 mg) wurde im Vakuumexsikkator mit P₂O₅ nachgetrocknet. Zersetzungspunkt 150°; im UV zeigt das Produkt im Unterschied zum Ausgangsstoff kein Maximum, sondern – ähnlich wie IDS – nur eine ansteigende Absorption ($\epsilon_{220\text{ nm}} = 4000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Es erwies sich chromatographisch als nicht ganz rein, u. a. war es mit dRH verunreinigt (dRH entsteht im größeren Ausmaß nach Behandeln des Produktes mit Alkali). Die Reinheit des Produktes konnte durch andere Methoden der HBr-Entfernung nicht verbessert werden. Abtrennung der Hauptkomponente bei Verwendung der präparativen Dünnschichtchromatographie führte nach Eluieren und Gefrier Trocknung zum gleichen Substanzgemisch wie vor der Chromatographie. IDSdR ist unter diesen Bedingungen nicht stabil.

R_f -Werte der Hauptkomponente: Papier, Laufmittel L₁ 0,12; L₂ 0,02; L₃ 0,20; Cellulose-Dünnschicht, L₁ 0,12; L₂ 0,02.

Chromatographie: Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Cellulose F (mit Fluoreszenzindikator) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Papierchromatographie wurde mit den Papieren Macheray und Nagel, Düren, Mn 212 (normal saugend) durchgeführt. Auf den entwickelten Chromatogrammen wurden zuerst die im UV-Licht (254 nm) sichtbaren Flecke markiert (BUdR, BU, UdR, IBS, IBSdR), dann wurden die Chromatogramme mit Sprühreagenzien behandelt.

Folgende Sprühreagenzien wurden benützt:

1. Tollens Reagenz¹¹ (gleiche Volumina 0,1 N AgNO₃ und 5 N NH₄OH); nach Besprühen wurde auf 110° erhitzt. Unspezifisches Reagenz – einzelne Substanzen geben graue bis braune Tönungen, die von vielen Faktoren abhängen, so daß nur unter identischen Bedingungen chromatographierte und besprühte Substanzen miteinander verglichen werden können.

2. Ehrlich-Reagenz¹¹ (1-proz. Lösung von p-Dimethylamino-Benzaldehyd im Gemisch aus 1 Tl. konz.

¹¹ F. CRAMER, Papierchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1958.

HCl und 9 Tln. Äthanol) gibt schon bei Raumtemperatur eine gelbe Färbung mit H und dRH. Nach vorherigem Behandeln der Chromatogramme mit 0,5 N NaOH reagieren auch Dihydropyrimidin-Derivate¹², z. B. IDSdR.

3. Cystein-Schwefelsäure (0,4% Lösung in 3 N H₂SO₄)¹³ gibt nach Besprühen und 5–10-minütigem Erhitzen auf 85° eine rosa Färbung mit dR und Desoxyribosiden.

4. Natriumperjodat 0,02 M wäßrige Lösung und *p*-Aminoacetophenon (0,8-proz. Lösung in einem Gemisch von 1 Tl. konz. HCl und 4 Tln. Äthanol)¹⁴. 5 Min. nach Besprühung mit der ersten Komponente wird die zweite Lösung aufgesprüht. dR gibt einen hellgelben Fleck, der im UV-Licht (350 nm) grün fluoresziert.

Die Radiochromatogramme wurden mit einem Dünnschichtscanner der Fa. Berthold (Bad Liebenzell), Typ

LB 2721, gemessen, und der registrierte Verlauf für die in der nicht bestrahlten Ausgangslösung vorhandenen Verunreinigungen korrigiert.

Bromwasserstoff konnte argentometrisch nachgewiesen und titriert werden.

Wasserstoffperoxid wurde colorimetrisch mit Titanylsulfat bestimmt¹⁵; $\epsilon_{408 \text{ nm}} = 750 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Organische Peroxide wurden anhand der Differenz zwischen der H₂O₂-Konzentration und der des gesamten Peroxids nachgewiesen. Die gesamte Peroxid-Konzentration wurde nach Zugabe von KJ in gepufferter Lösung aufgrund der Extinktion des gebildeten I₃[⊖] bei 353 nm gemessen¹⁶. Die organischen Peroxide sind unbeständig. Ihr Anteil nimmt mit steigendem Zeitintervall zwischen Bestrahlungsende und Beginn der Aufarbeitung ab.

¹² R. M. FINK, R. E. CLINE, C. MCGAUGHEY u. K. FINK, *Anal. Chem.* **28**, 4 [1956].

¹³ J. G. BUCHANAN, *Nature* [London] **168**, 1091 [1951].

¹⁴ E. SAWICKI, C. R. ENGEL, W. C. ELBERT u. K. GERLACH, *Talanta* [London] **15**, 803 [1968].

¹⁵ G. EISENBERG, *Indian Eastern Chemist* **15**, 327 [1943].

¹⁶ C. J. HOCHANADEL, *J. phys. Chem.* **56**, 585 [1952].