

## ETUDE DE LA FRAGMENTATION DE DERIVES DE L'URACILE ET DE LA THYMINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

J. ULRICH, R. TEOULE\*, R. MASSOT et A. CORNU  
Service de Spectrométrie de Masse, DPC-SEAPC-CEN-38 Grenoble, France

(Received 23 May 1969; accepted 7 July 1969)

**Abstract**—Original mass spectra of uracil and thymine derivatives are presented with the corresponding fragmentation schemes.

In the first series of spectra, the fragmentations of thymine derivatives, including  $^{14}\text{C}$ -2-thymine, dimers, and bromo thymines, confirm the basic retro Diels-Alder mechanism.

The second series includes dihydro 5,6-derivatives of uracil (hydroxy and bromo substituents). The behaviour of these molecules is quite different; they are more sensitive to the substituents and a part of the fragmentation is often explained by protonated molecular ions.

**Résumé**—Nous présentons une série de spectres de masse originaux, de dérivés de l'uracile et de la thymine, ainsi que les schémas de fragmentation correspondants.

L'étude d'une première série de molécules, à caractère aromatique, dont une marquée au  $^{14}\text{C}$ , a permis de confirmer le mécanisme de base de la fragmentation comme étant un 'retro Diels Alder'.

Une deuxième série, saturée en position 5,6 du noyau uracile, montre le caractère totalement différent de ces molécules, plus fragiles, plus sensibles à la nature des substituants et donnant un ion protoné  $[\text{MH}]^+$ , responsable d'une partie des fragments observés.

LES DÉRIVÉS de l'uracile ont un rôle biologique considérable parce qu'ils sont au coeur de la vie. L'uracile et la thymine sont, en effet, des constituants fondamentaux des acides nucléiques. La pharmacopée utilise aussi, très souvent, des analogues structuraux des molécules de ce type: les dérivés halogénés comme le fluorouracile peuvent être des antimétabolites intéressants en chimiothérapie anticancéreuse ou des radiosensibilisants comme le bromouracile. Quant aux dérivés de l'uracile méthylé en 1, on les rencontre dans l'ARN de transfert.

En vue d'une étude de l'action des rayonnements ionisants sur les bases pyrimidiques, un certain nombre de ces dérivés ont été préparés et l'étude de la fragmentation par impact électronique fait l'objet de cet article.

La connaissance du spectre de masse de ces substances peut faciliter l'interprétation du spectre des dérivés inconnus, obtenus par radiolyse de la thymine et de l'uracile.

Les spectres de masse, originaux pour la plupart, correspondent aux produits suivants: la thymine  $^{14}\text{C}$  en position 2; les dimères de l'uracile et de la thymine; des dérivés bromés et carbonylés de l'uracile et de la thymine; des dérivés hydroxylés du dihydro-5,6 uracile.

Nous présentons à côté des spectres de masse, les schémas de fragmentation tels qu'ils ressortent de cette étude. La diversité des molécules étudiées permet d'éclaircir et de préciser certains mécanismes énoncés par Rice<sup>1</sup> dans son étude des termes fondamentaux de la série, en particulier la rupture 'retro Diels Alder', propre aux molécules de la série de l'uracile.

\* Laboratoire de Radiobiologie, CEN-38 Grenoble, France.

D'autre part, lorsque la liaison 5,6-des uraciles est saturée, la rupture de la molécule est profondément modifiée et devient plus sensible à la nature des substituants.

*Dérivés ayant une double liaison en 5,6: uracile, thymine  $^{14}\text{C}$ -2, thymine*

Les spectres de l'uracile et de la thymine ont été déjà étudiés par Rice *et Col.*<sup>1</sup> Nous avons reproduit les modes de fragmentation sur les Schémas 1 et 2. Mais

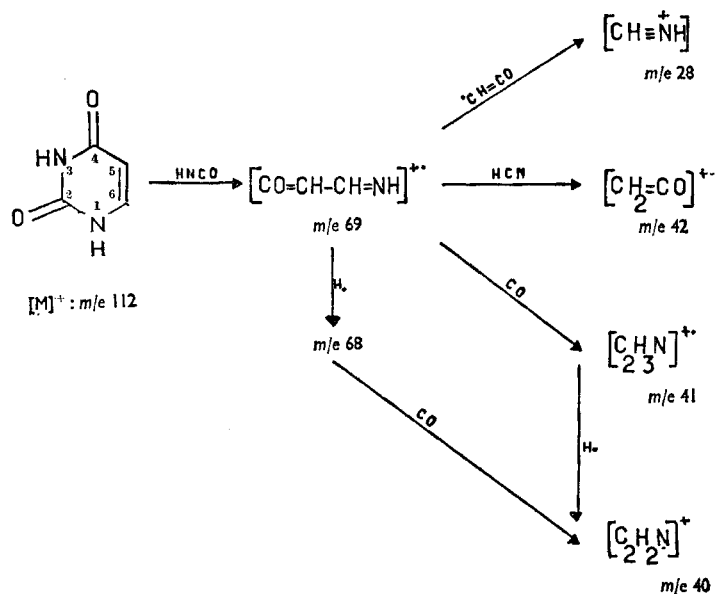


SCHÉMA 1. Uracile.

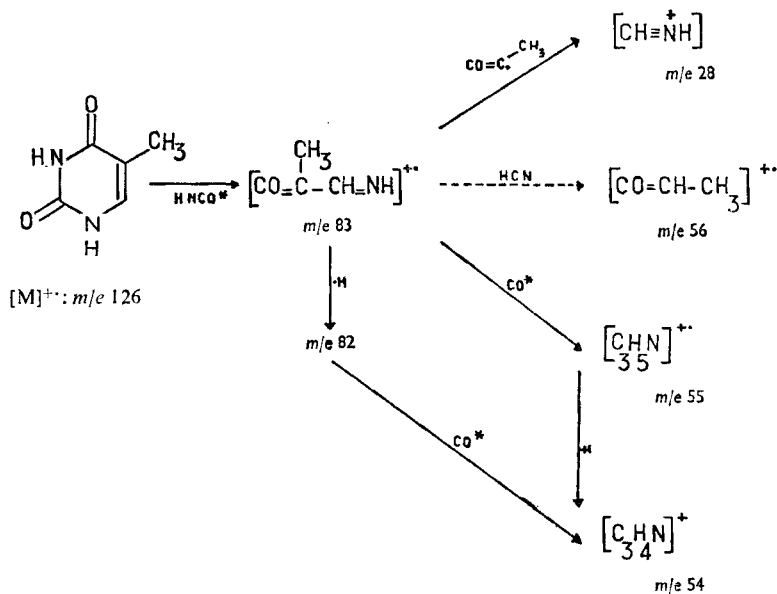


SCHÉMA 2. Thymine.

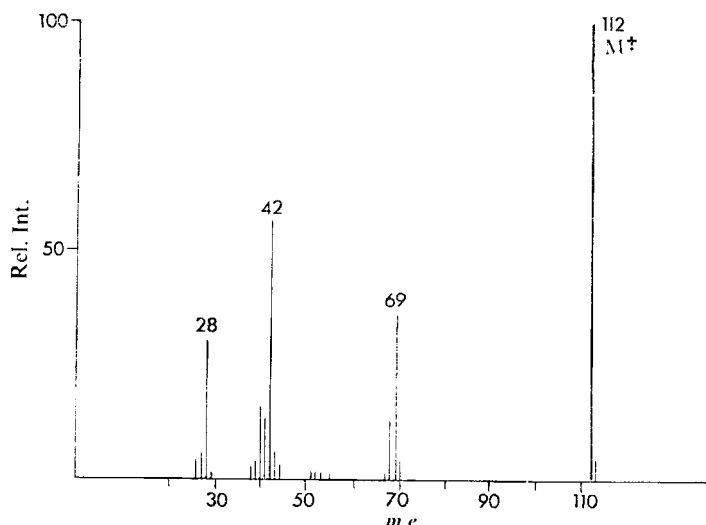


FIG. 1. Uracile ( $T_g$ : 150°C).

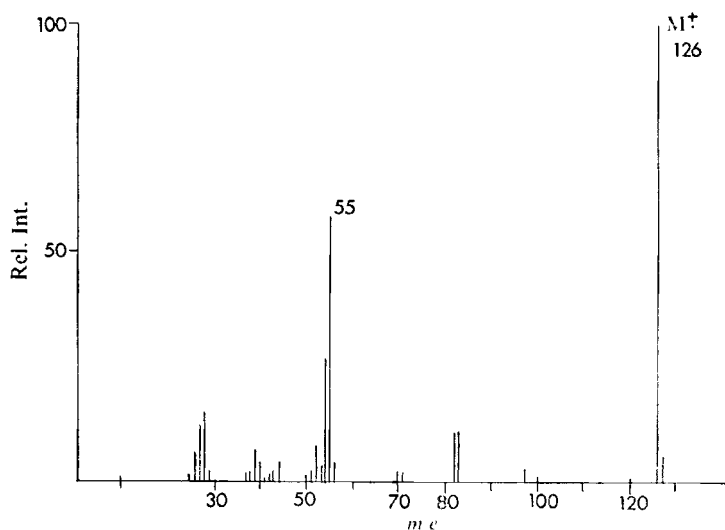
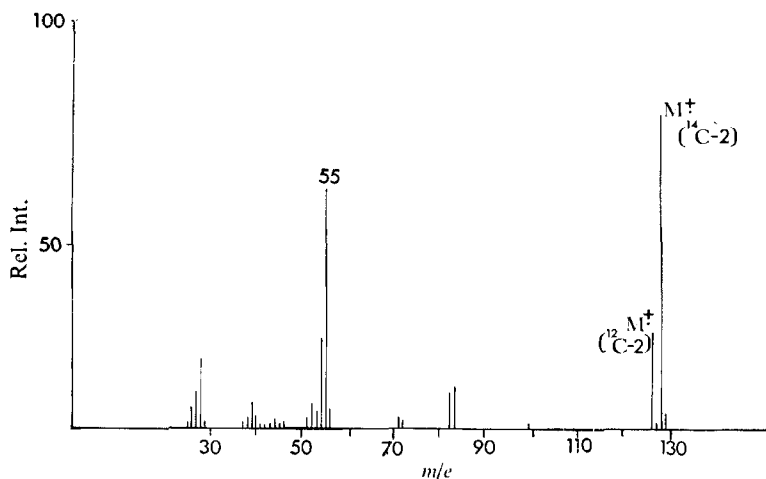


FIG. 2. Thymine.

dans nos conditions opératoires, nos spectres sont notablement différents: la fragmentation est beaucoup moins importante et le pic moléculaire est le pic de base (v. Figs. 1 et 2).

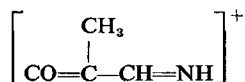
*Thymine marquée au  $^{14}\text{C}$  en position 2.* Le spectre de cette molécule très fortement marquée (plus de 75%) a été tracé (Fig. 3). Il montre avec évidence que la première rupture de l'ion moléculaire de la thymine a lieu suivant un mécanisme de 'retro Diels-Alder'.\*

\* Voir aussi la note de Pullman sur un calcul théorique conduisant à la même conclusion (C. R. Académie des Sciences Paris Tome 262) 7.3.1966, p. 826.

FIG. 3. Thymine  $^{14}\text{C}$ -2 (25% Thymine  $^{13}\text{C}$ ).

En effet, lors de cette rupture (v. Schéma 2), le  $^{14}\text{C}$  en position 2 est totalement éliminé sous forme de  $\text{HNCO}$  dans le premier fragment. Le fragment restant, de masse 83 et non 85, qui porte la charge, se décompose par perte d'une molécule de  $\text{CO}$  ou d'une molécule de  $\text{HCN}$  ou enfin d'un radical cétényle  $\text{CH}_3-\dot{\text{C}}=\text{C}=\text{O}$ .

Cette fragmentation implique pour l'ion de masse 83 une structure de type:



Ce sont donc les liaisons 1,2 et 3,4 qui se rompent dans cette fragmentation.

On remarque que le pic 70,  $\text{CO}=\text{N}=\text{CO}^+$ ; (confirmé par mesure de masse) subit aussi le décalage de deux masses dans la molécule marquée.

Le massif des pics 40 ( $\text{CH}_3-\dot{\text{C}}=\text{CH}$ ) $^+$  et suivants (39, 38, 37) provient probablement des ruptures des liaisons 4,5 et 6,1.

*Dimères de l'uracile et de la thymine.\** (v. Figs. 4 et 5). Le spectre du dimère de l'uracile est identique à celui de l'uracile, aux deux remarques suivantes près:

1. La température de l'échantillon était plus élevée que pour le spectre du monomère;
2. Malgré cette température supérieure, les ions de 2ème fragmentation sont relativement moins abondants, ce qui indiquerait qu'il y a une absorption d'énergie pour la dissociation. L'ion moléculaire n'a pas été observé pour ce dimère.

Par contre, le spectre du dimère de la thymine présente:

1. Un pic à la masse 253 correspondant à l'ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; il apparaît pour une température de source supérieure à  $200^\circ\text{C}$ .
2. Un pic très important (100%) à la masse 127: monomère protoné.
3. Deux pics, aux masses 109 et 110, absents dans le spectre du monomère, qui correspondent à l'arrachement d'un radical.  $\text{OH}$  à partir des ions 126 et 127 (métastables 93,6 et 95,3).

\* Voir aussi C. Fenselau *et al* (référence 2).

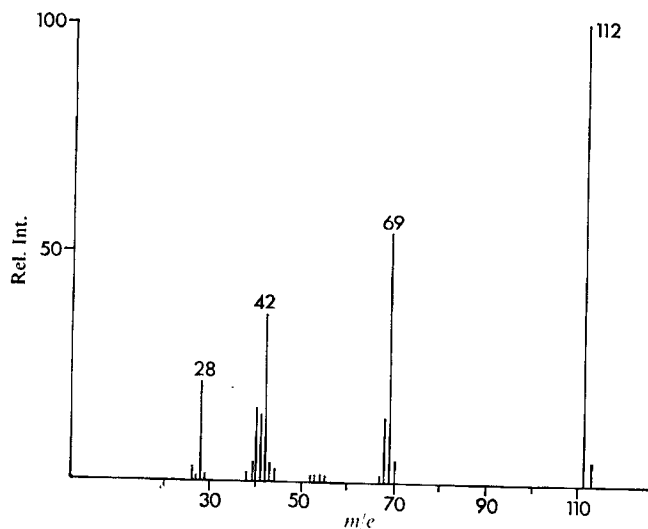


FIG. 4. Dimère de l'uracile ( $T_s$ : 200°C).

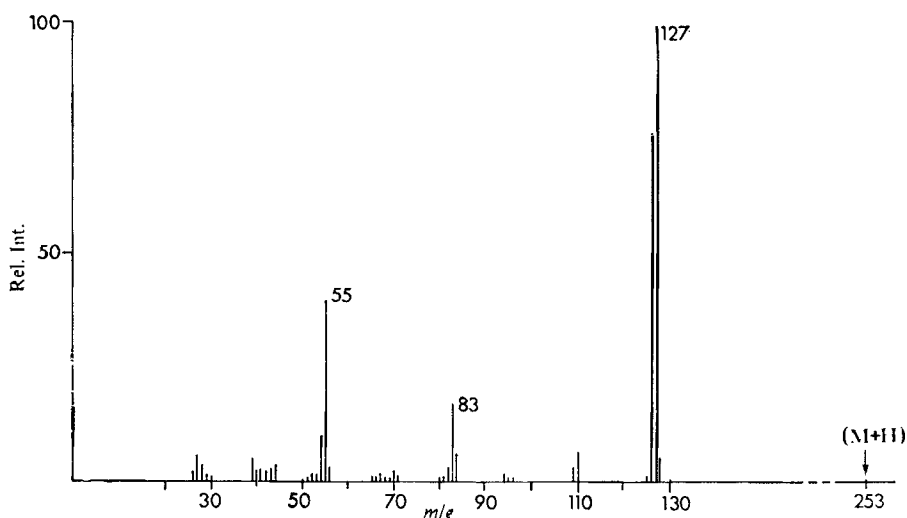


FIG. 5. Dimère de la thymine.

Dans le cas du dimère de la thymine l'ionisation directe existe, car on observe des pics propres au dimère tandis que pour l'uracile, il y aurait dissociation thermique du dimère avant ionisation, car son spectre est semblable à celui du monomère.

*Formyl-5 uracile* (v. Fig. 6 et Schéma 3). Cette molécule subit comme première fragmentation après l'ionisation, l'élimination d'une molécule de CO pour donner un ion de masse 112, de même formule brute que l'uracile.

Cet ion se décompose d'une part suivant les fragmentations normales de l'uracile:



par élimination de HNCO, on a l'ion  $m/e$  69, lequel se décompose par perte:

de HCN en  $[\text{COCH}_2]^+$  ( $m/e$  42)

de CO en  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{N}]^+$  ( $m/e$  41)

de  $\cdot\text{CHCO}$  en  $\text{CH}\equiv\text{NH}^+$  ( $m/e$  28)

d'autre part, en plus de cette décomposition normale, on observe:

—un processus direct conduisant à l'ion  $\text{CH}\equiv\text{NH}^+$  (28): un métastable apparaît à la masse 7,0 et cet ion 28 est relativement plus abondant que dans le spectre de masse de l'uracile (rapport des hauteurs de pics  $\frac{28}{112}$  supérieur dans le 1er cas).

—une élimination de CO donnant l'ion 84  $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}]^+$  qui donne à son tour l'ion 41  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{N}]^+$  par élimination de HNCO.

—une élimination de HCN conduisant à l'ion 85  $[\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}_2]^+$ .

*Bromo-5 uracile et bromo-5 diméthyl-1,3 uracile* (v. Figs. 7 et 8). Les Schémas 4 et 5

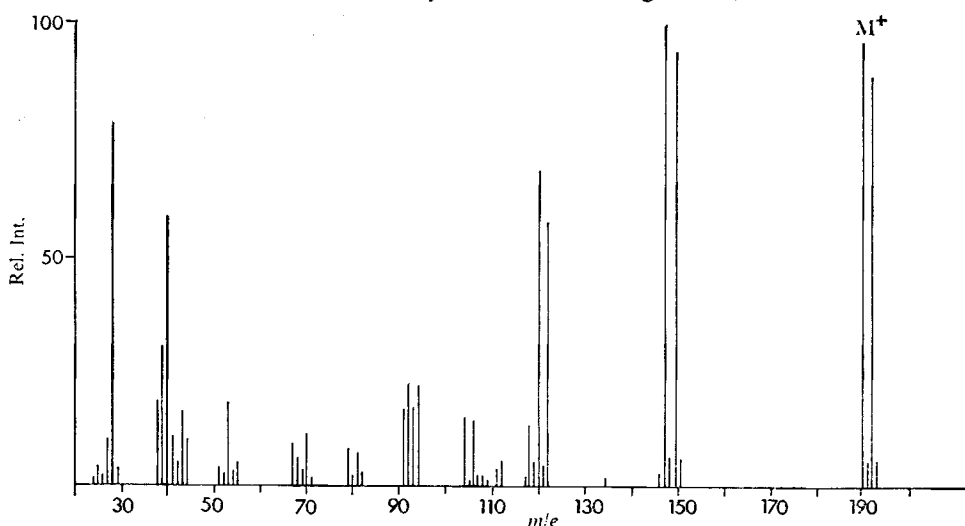


FIG. 7. Bromo-5 uracile.

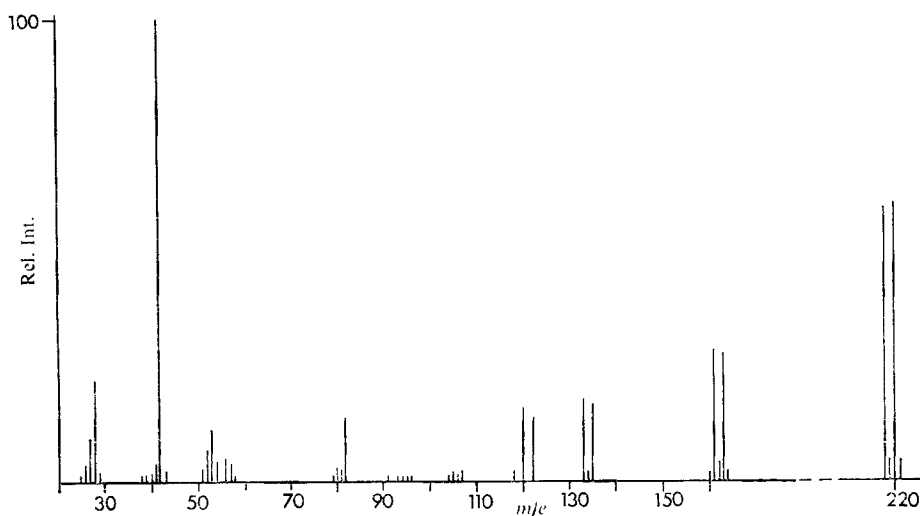


FIG. 8. Bromo-5 diméthyl-1,3 uracile.

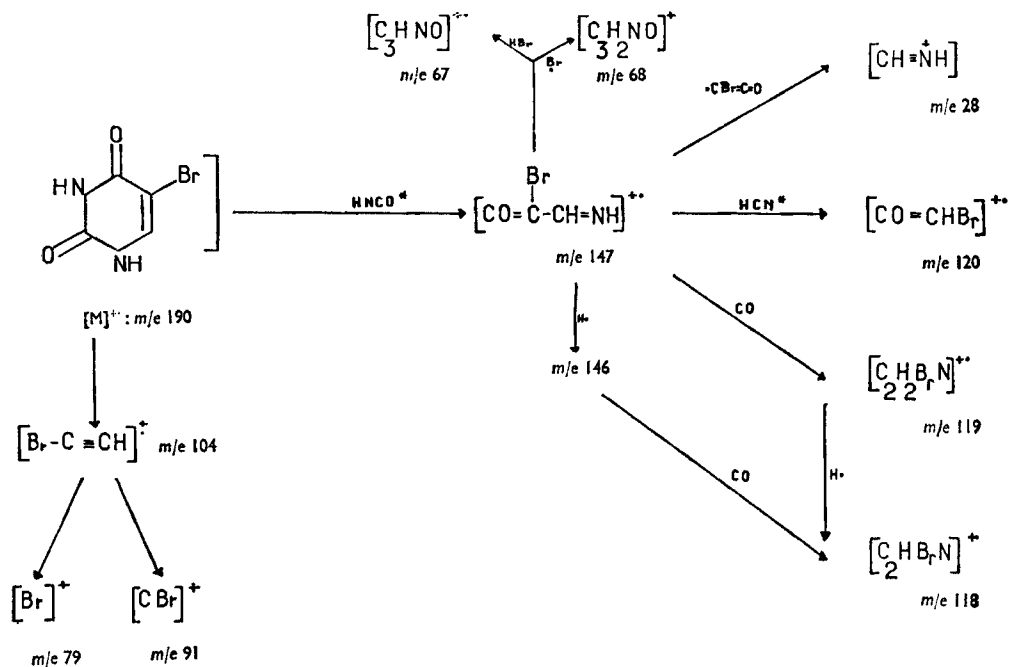


SCHÉMA 4. Bromo-5 uracile.

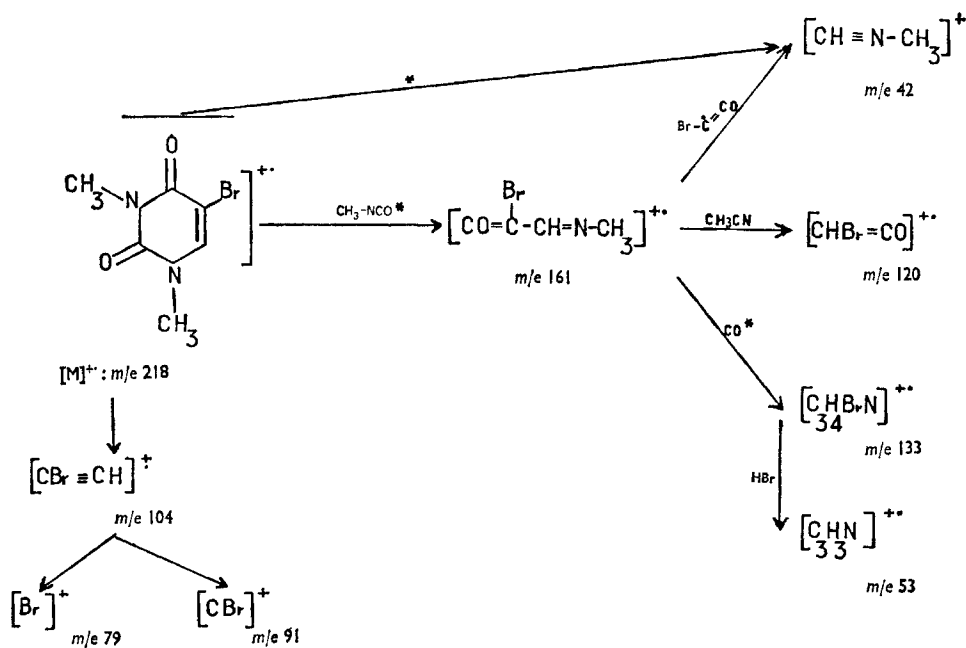


SCHÉMA 5. Diméthyl-1,3 bromo-5 uracile.



représentent la fragmentation de ces deux molécules. On retrouve pour chacune d'elle les fragmentations de la molécule non bromée correspondante (v. Schéma 1) à savoir:

1. Elimination de HNCO (ou  $\text{CH}_3\text{NCO}$ ) par un mécanisme de rétro Diels-Alder, conduisant à l'ion 147 à 149 (ou 161 à 163 pour la molécule diméthylée).
2. Puis élimination du radical cétényle  $\cdot\text{CBr}=\text{CO}$ , ou hydrogène  $\cdot\text{H}$  ou d'une molécule de CO, ou d'une molécule de HCN( $\text{CH}_3\text{CN}$ ).

Pour le composé diméthylé, nous observons en outre une deuxième fragmentation de l'ion moléculaire conduisant directement de l'ion 218 à l'ion 42 ( $\text{CH}\equiv\text{N}^+\text{CH}_3$ ) (ion métastable à la masse 8,1).

Enfin, ces deux molécules donnent lieu, au cours de leur fragmentation à des ions  $[\text{CBr}\equiv\text{CH}]^{+\cdot}$ . Nous avons admis une formation directe de cet ion à partir de l'ion moléculaire, ce qui est à rapprocher de la présence d'ions  $[\text{C}_3\text{H}_4]^+$  et suivants ( $m/e$  40, 39, etc ...) observés dans la thymine.

#### Dérivés 'Dihydro-5,6' de l'uracile et de la thymine

Du fait de la saturation de la liaison 5,6, le caractère aromatique des molécules précédentes n'existe plus: l'ion moléculaire est beaucoup moins important, la molécule étant plus fragile. Les liaisons 5,6 et voisines sont des points de fragilité à partir desquels auront lieu les principales ruptures. On n'observe pratiquement pas d'ion métastable dans les conditions habituelles d'enregistrement; ces processus de fragmentation nécessitent moins d'énergie d'activation; par ailleurs, les substituants influent beaucoup plus sur la fragmentation.

Enfin, ces molécules très polaires, présentant dans la plupart des cas un ion moléculaire protoné, en position 1, sur la fonction amine, lorsque l'azote n'est pas substitué.

*Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine* (v. Fig. 9). L'ion moléculaire  $m/e$  144 est notable (5%) et il est accompagné d'un ion protoné à  $m/e$  145, probablement sur l'atome d'azote-1, comme il apparaît dans le Schéma de fragmentation (Schéma 6).

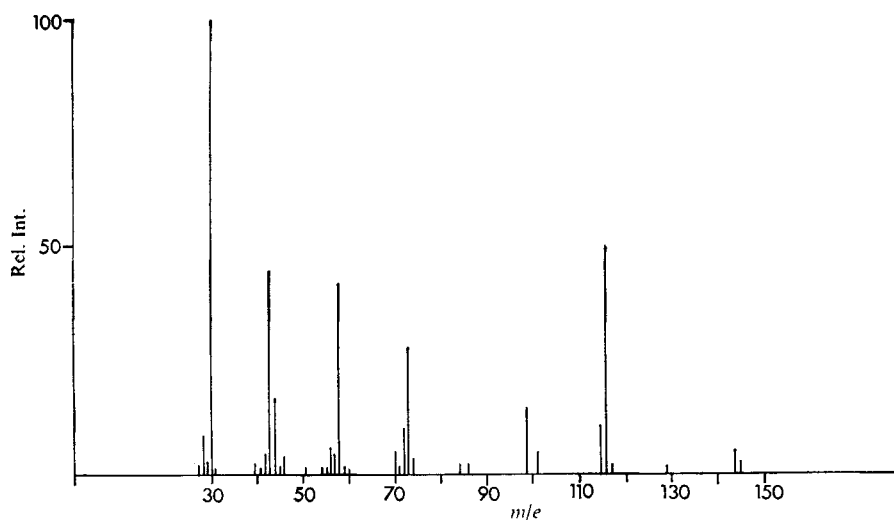


FIG. 9. Hydroxy-5 dihydrothymine.

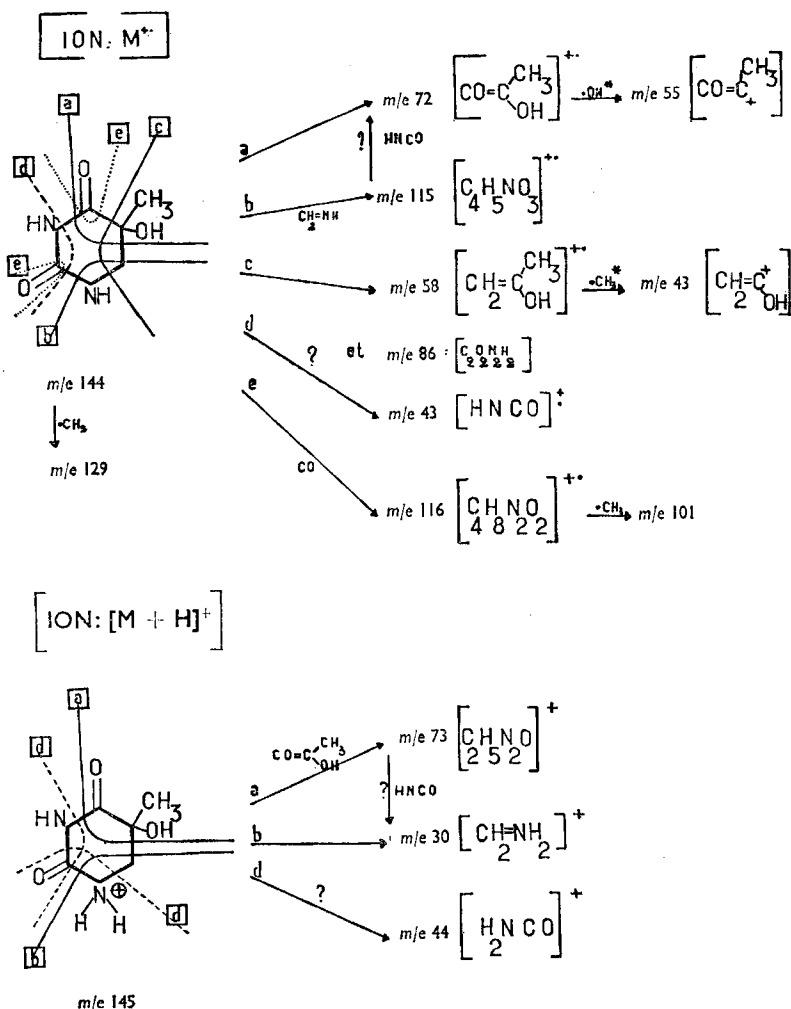


SCHÉMA 6. Hydroxy-5 dihydrothymine.

Dans ce schéma, nous avons rassemblé les ruptures observées pour l'ion moléculaire, puis pour cet ion  $[M + H]^+$ .

Pour l'ion moléculaire, on observe de nombreux processus de rupture dont certaines sont bien localisées, que l'on appellera types (a), (b) et (c); les autres, de type (d) et (e) ne pourront être précisées qu'à l'aide de molécules marquées.

L'ion 72 peut, par ailleurs, provenir soit de la rupture directe de type (a), soit d'une rupture de type (b) suivie d'une seconde fragmentation (transition  $115 \rightarrow 72$ ).

L'élimination d'un radical  $\cdot CH_3$  à partir de l'ion moléculaire, totalement absente dans les dérivés de substitution de la thymine, apparaît ici, quoique faible.

C'est la rupture du type (b) de l'ion  $[M + H]^+$  qui fournit l'ion le plus abondant:  $CH_2=NH_2^+$  ( $m/e$  30). La charge positive est probablement portée par l'azote 1. De

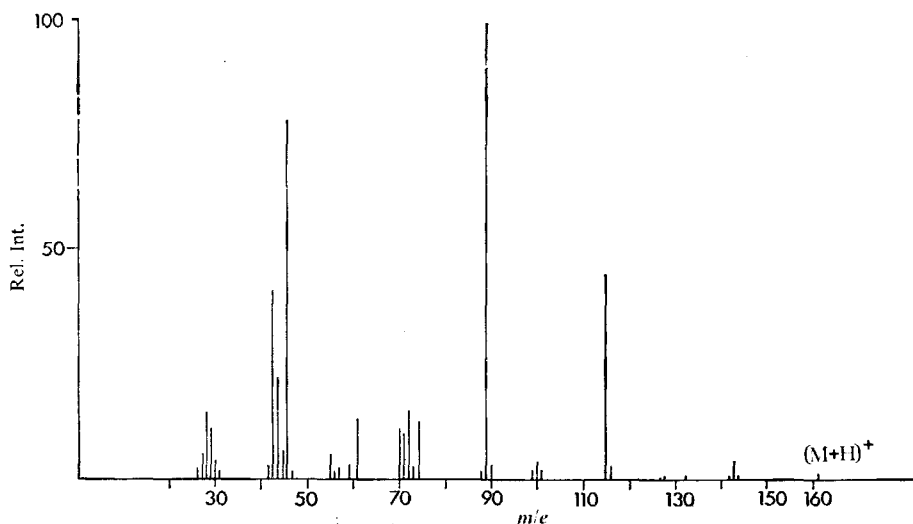


FIG. 10. Dihydroxy-5,6 dihydrothymine.

même l'autre fragment important à  $m/e$  73 est dû à une rupture du type (a) de l'ion  $[M + H]^+$ . L'ion 44 ( $CONH_2$ ) provient peut-être d'une rupture du type (d) de l'ion  $[M + H]^+$ .

*Dihydroxy-5,6 dihydrothymine* (Thymine-glycol) Fig. 10. Le pic moléculaire n'a pas été observé. Le pic de masse 161, nettement visible, correspond à la molécule protonée  $[M + H]^+$ , relativement plus abondante grâce à la plus forte polarité amenée par le deuxième groupement OH.

La proportion de fragments provenant de l'ion  $[M + H]^+$  est relativement plus importante que dans la molécule précédente. On retrouve les mêmes types de fragments (a), (b) et (d). (Schéma 7).

Par ailleurs, la molécule non protonée donne aussi ses fragments propres du type (a), (b), (c) et (d); le type (e) par élimination de CO n'est pas observé.

Des ions obtenus par perte d'une seule molécule d'eau ont été observés (masses 142 et 143) et sont peu importants. Le caractère glycol n'est donc pas prédominant dans ce type de molécule.

*Dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile* (Fig. 11). L'ion moléculaire se décompose par des ruptures de type (a), (b), (c) et (e), comme pour l'hydroxy-5 dihydrothymine (Schéma 8). L'ion  $[M + H]^+$  n'a pas été observé, mais le pic  $m/e$  46 ( $NH_2=CHOH$ )<sup>+</sup>, très intense (100%) ne peut s'expliquer que par une rupture de type (b) de cet ion  $[M + H]^+$ .

La rupture (a) de cet ion  $[M + H]^+$  n'est plus visible car la rupture (b) est prépondérante, se trouvant facilitée par la présence des deux atomes de brome en position 5 aussi bien par le groupement OH en position 6.

Enfin, l'élimination d'une molécule d'acide hypobroméux BrOH est un processus caractéristique de ces molécules dibromées et nous ramène à l'ion 190, ion moléculaire du bromo-5 uracile déjà étudié. On observe alors tous les pics principaux de cette molécule.

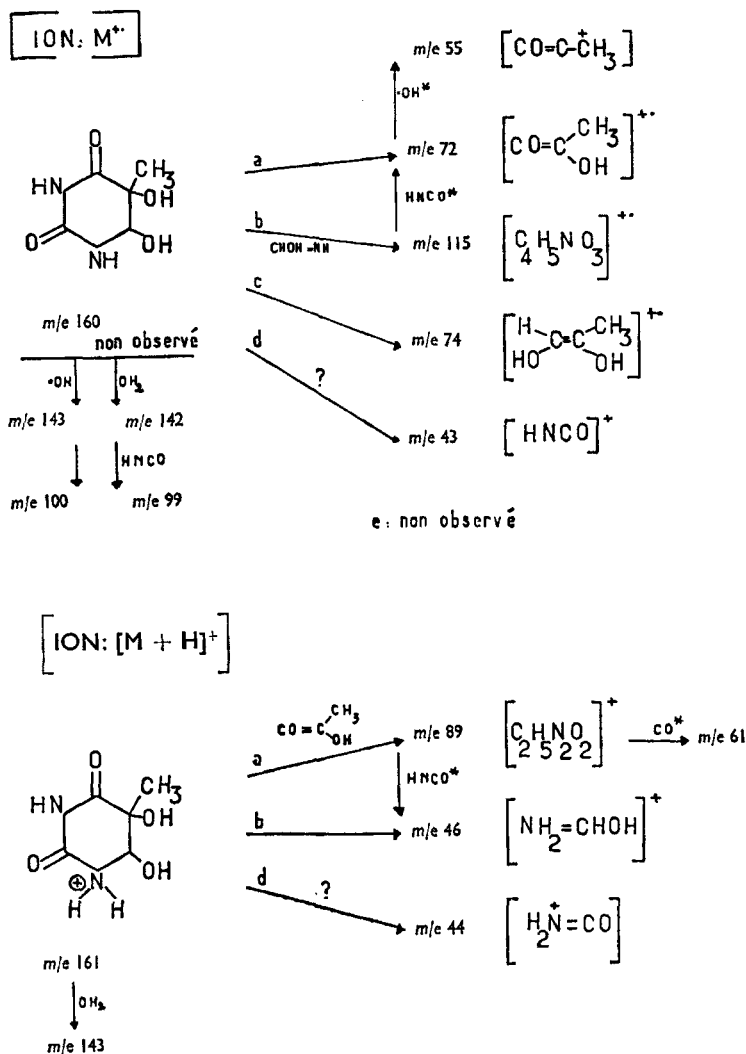


SCHÉMA 7. Dihydroxy-5,6 dihydrothymine.

*Dimethyl-1,3 dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydroxuracile* (Fig. 12). Le schéma de fragmentation de cette molécule (Schéma 9) dont les fonctions amines sont totalement substituées, se distingue plus encore des schémas précédents :

L'élimination de  $BrOH$  devient prépondérante pour l'interprétation du spectre ; ce qui conduit à l'ion moléculaire de la NN'Diméthyl-bromo-5 uracile (Schéma 5) dont on retrouve tous les fragments ;

On n'observe plus de protonation de la molécule ;

Les ruptures (a) et (b) demeurent, (b) étant prépondérante ;

La rupture (e), qui précédait l'élimination de  $HNCO$  dans la molécule non diméthylée, a fait place à la rupture (d) (élimination de  $CH_3NCO$ ) suivie de l'élimination de  $CO$  ou de  $CHOH=NCH_3$ .

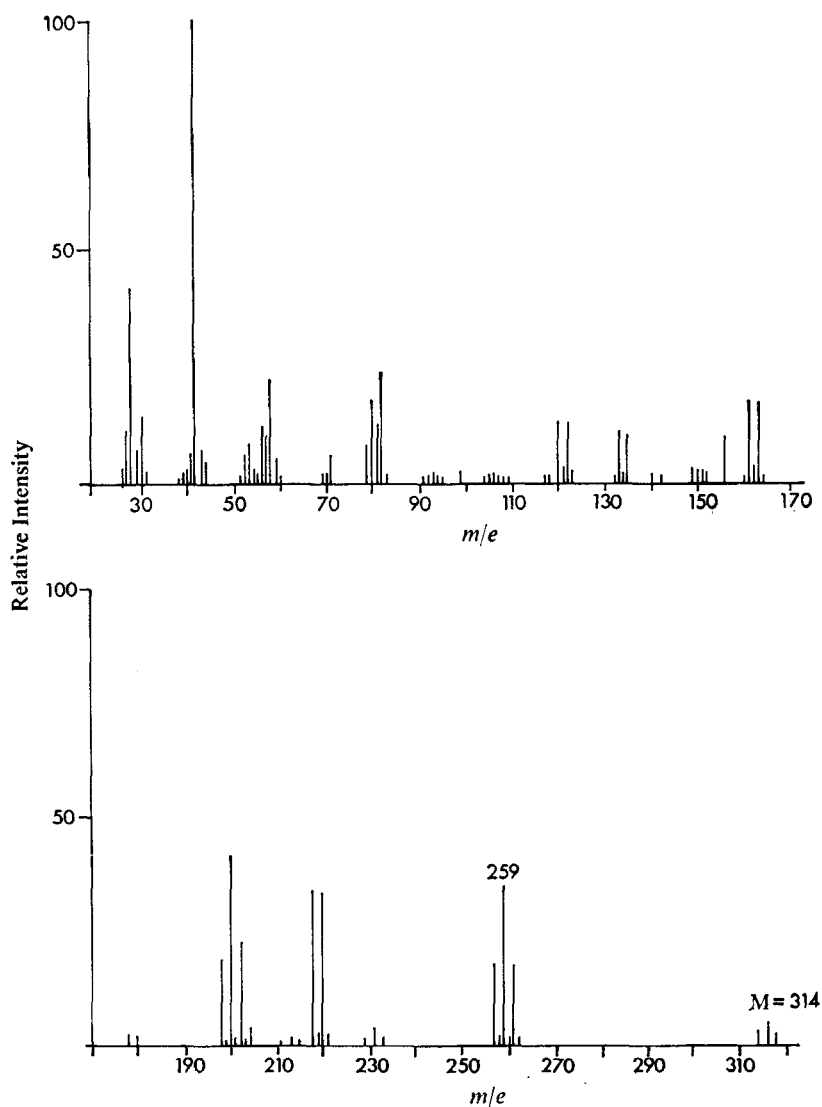


FIG. 11. Dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile.

### CONCLUSION

Dans le premier groupe (dérivés de l'uracile), le caractère aromatique des molécules leur donne une unité de comportement qui se manifeste par l'importance de l'ion moléculaire et par la prépondérance de la rupture du type 'retro Diels Alder' lors de la fragmentation.

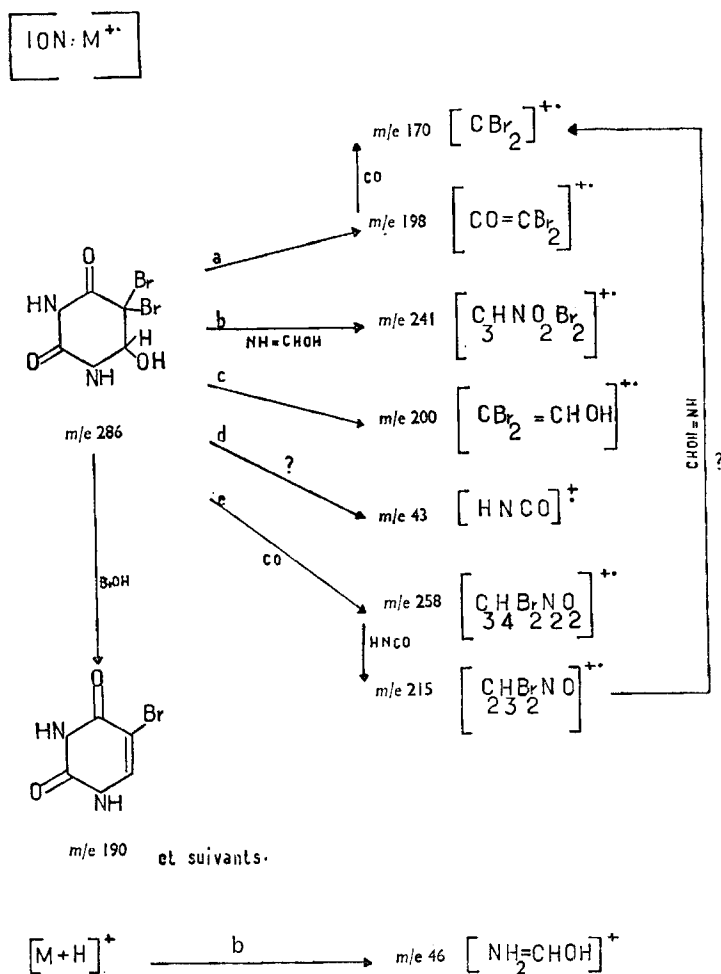


SCHÉMA 8. Dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile.

Dans le second groupe (Dihydro-5,6 uraciles), la protonation demeure un phénomène très important tant que les atomes d'azote des fonctions amines, responsables de la grande polarité de ces molécules, ne sont pas totalement substitués.

Cette étude a permis aussi de se rendre compte de la complexité de ces molécules, et de voir encore une fois l'importance de l'élimination de petites molécules (CO,

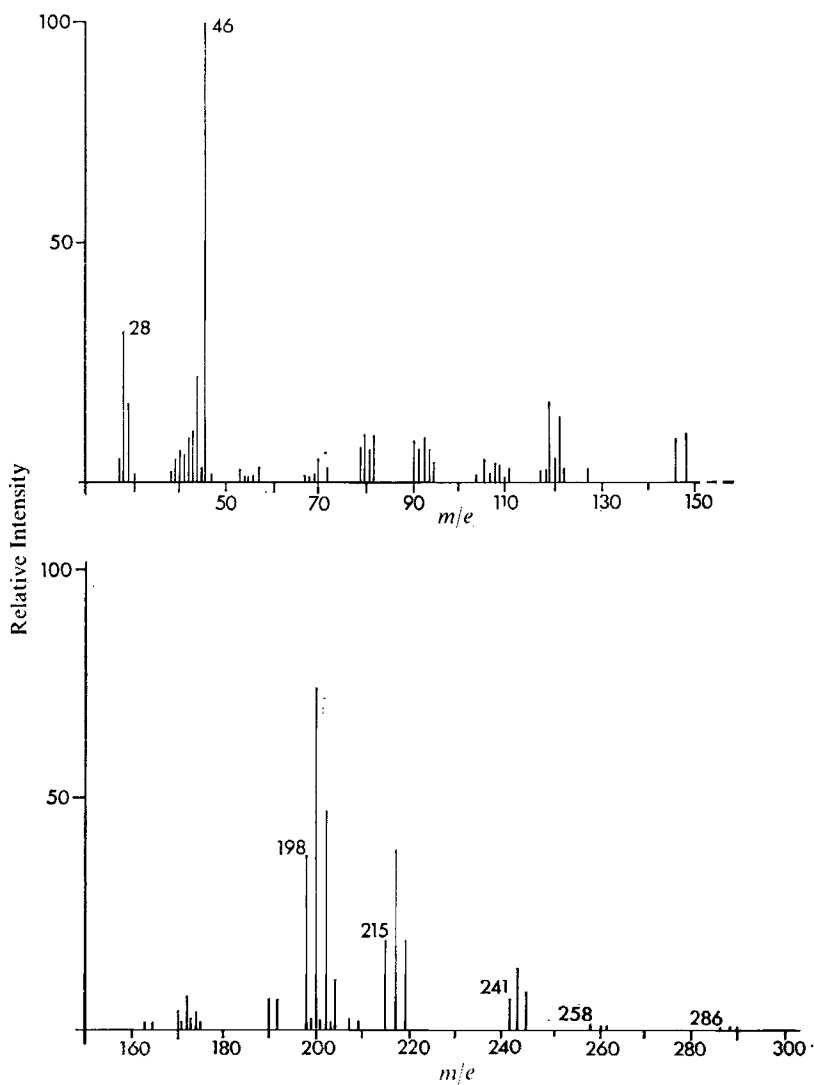


FIG. 12. Diméthyl-1,3 dibromo-5,5-hydroxy-6 dihydrouracile.

HCN, HNCO, BrOH . . .) ainsi que de la formation d'ions non radicalaires (ions  $^+NR_4$ ) dans les composés azotés.

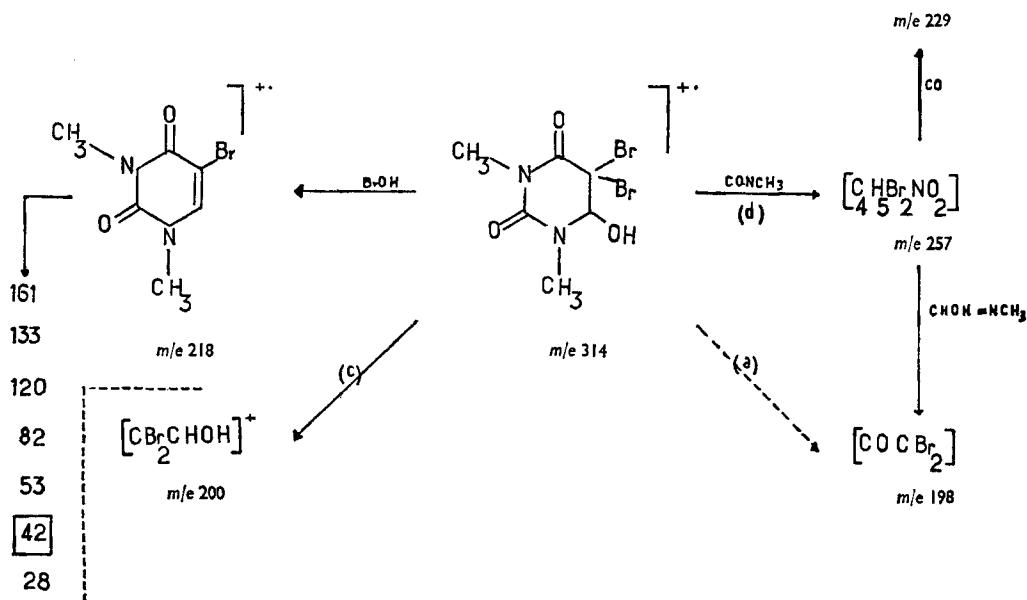


SCHÉMA 9. Diméthyl-1,3 dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile.

## PARTIE EXPERIMENTALE

*Conditions opératoires*

Nous avons utilisé un spectromètre de masse AEI, type MS-9, muni du système d'introduction directe; la température de la source ( $T_s$ ) varie de 130°C à 200°C. L'énergie électronique est de 70 eV général. La vaporisation de l'échantillon est contrôlée de façon à rester constante pendant le tracé de nos spectres (environ une minute).

Les masses des pics ont été mesurées, soit par la méthode du 'peak-matching', avec l'heptacosafuoro-tributyl-amine comme étalon interne, soit par enregistrement du spectre sur bande magnétique et traitement au calculateur IBM 360-40.<sup>3</sup>

*Préparation des substances*

*La thymine marquée  $^{14}C$  sur le carbone C-2* nous a été fournie par le Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

*Bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine.* Elle est obtenue par la méthode de O. Baudish et Davidson,<sup>4</sup> par action du brome en milieu aqueux sur le thymine.

*Dihydroxy-5,6 dihydrothymine.* Elle a été préparée selon le procédé de O. Baudish et Davidson<sup>4</sup> en faisant réagir l'hydroxyde d'argent sur la bromo-5 hydroxy-6 dihydrothymine. D'autres voies pour éliminer l'argent ont été décrites; il nous semble préférable d'utiliser à cette fin  $H_2S$  plutôt que la dithizone. Notons que, par ce procédé, on obtient la forme cis; la forme trans peut être préparée par chauffage à 90°C pendant quatre heures en solution aqueuse.<sup>5</sup>

*Hydroxy-5 dihydrothymine.* Elle a été synthétisée par la technique de Nofre et Cier.<sup>6,7</sup> En faisant barboter du chlore dans une solution aqueuse de méthacrylate de potassium, on obtient l'acide  $\beta$  amino- $\alpha$  hydroxy isobutyrique. Le chlorhydrate de cet acide aminé conduit par réaction avec l'isocyanate de potassium, préparé suivant la technique décrite dans Inorganic Syntheses,<sup>11</sup> à l'hydroxy-5 dihydrothymine.



La dernière phase de la cyclisation doit être effectuée de préférence à 100°C prenant soin d'éliminer l'alcool éthylique formé. Notons que l'hydroxy-5 dihydrothymine, à la différence de l'hydroxy-6 dihydrothymine est stable (P F 255°C).

*Dimères de la thymine et de l'uracile.* Les photodimères de ces deux substances ont été obtenus par irradiation u.v. de la solution aqueuse, en milieu congelé<sup>8</sup> et recristallisation dans l'alcool.

*Formyl-5 uracile.* Il s'obtient par oxydation de l'hydroxyméthyl uracile par le bichromate de potassium dans l'acide acétique glacial suivant la technique décrite par R. Alcantara et S. Y. Wang.<sup>9</sup> L'hydroxyméthyl-uracile avait été préalablement obtenu par action du formaldéhyde sur l'uracile en présence de potasse suivant le procédé de R. E. Cline et R. Fink.<sup>10</sup>

*Dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile et bromo-5 uracile.* Le bromo-5 uracile est obtenu en faisant réagir le brome sur l'uracile à température ordinaire puis en chauffant pour provoquer la débromhydratation de l'halohydrine. Le dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile se prépare à partir du corps précédent par action du brome, à froid.<sup>13</sup>

*Diméthyl-1,3 bromo-5 uracile et N-diméthyl-1,3 dibromo-5,5 hydroxy-6 dihydrouracile.* Ces deux substances proviennent de l'action du brome sur le diméthyl-1,3 uracile. Elles sont obtenues selon des méthodes qui rappellent celles des substances analogues non méthylées.<sup>13</sup>

*Remerciements*—Nous tenons à remercier Mme Georges, Mesdemoiselles Pouchot et Lamoure, ainsi que MM. Allet, Cadet, Huet et Drevon pour leur contribution à ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. J. M. Rice, G. D. Dudek et M. Barber, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4569 (1965).
2. C. Fenselau, A. J. Varghese et S. Y. Wang, ASTM Committee E-14, 16th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Pittsburgh, 1968.
3. R. Massot et J. Ulrich, XV Colloquium Spectroscopicum Internationale, Madrid, Mai 1969.
4. O. Baudish et D. Davidson, *J. Biol. Chem.* **64**, 233, 239 (1925).
5. R. Latarjet, B. Ekert, S. Apelgot et Rebeyrottes, *J. Chim. Phys.* **58**, 1046, 1057 (1961).
6. Claude Nofre, Thèse de Doctorat-ès-Sciences Physiques, Lyon.
7. Claude Nofre, A. Cier, R. Chapurlat et J. P. Mareschi, *Bull. Soc. Chim.* 332, 335 (1965).
8. R. Benkers et W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 181, 189 (1961).
9. Raul Alcantara et S. Y. Wang, *Photochem. Photobiol.* **4** (3) 465, 476.
10. R. E. Cline et R. Fink, *J. Am. Chem. Soc.* 2512, 2517 (1959).
11. *Inorganic Syntheses Collectives*, Vol. II, p. 279.
12. B. Doumas et H. G. Biggs, *J. Biol. Chem.* **237**, 7 (1962).
13. S. Y. Wang, *Nature* **180**, 91, 92 (1957).