

Eckard Wittenburg

## Untersuchung der tautomeren Struktur von Thymin und seinen Alkylderivaten mit Hilfe von UV-Spektren

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Rostock

(Eingegangen am 14. Januar 1966)

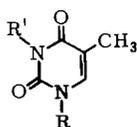
Von Thymin und seinen Alkylderivaten werden mit Hilfe der UV-Spektren die Ionisationskonstanten ermittelt und Rückschlüsse auf die tautomeren Strukturen ermöglicht. In neutraler wäßriger Lösung liegt Thymin als Dilactam **1** vor; auch 1-Methyl-thymin und 3-Methyl-thymin zeigen die Diketo-Struktur (**2** bzw. **3**). In alkalischem Medium bildet Thymin im Verhältnis ca. 1.1:1 ein Gemisch der Monoanionen **6** und **7**. Die Deprotonierung erfolgt primär an N-1. 4-O-Äthyl-thymin liegt in neutraler wäßriger Lösung als 2-Keto-Verbindung (**9**) vor, in alkalischem Medium überwiegt das Anion **12**.

Die UV-Spektren von Uracil und seinen Derivaten wurden von verschiedenen Autoren<sup>1,2)</sup> untersucht und zur Ermittlung der Struktur, der  $pK_a$ -Werte<sup>1,3)</sup> und der Berechnung tautomerer Gleichgewichte bei Uracil<sup>4,5)</sup> verwendet. Unseres Wissens sind ähnliche intensive Untersuchungen mit Hilfe der UV-Spektren bei Thymin und seinen Derivaten bisher nicht durchgeführt worden.

Nachdem eine Reihe von Alkylderivaten des Thymins dargestellt worden war<sup>6)</sup>, untersuchten wir deren spektrales Verhalten in Abhängigkeit vom pH. Einige der Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

### Diskussion der UV-Spektren

Beim Vergleich der UV-Daten von *Thymin*, *1-Methyl-*, *3-Methyl-* und *1.3-Dimethyl-thymin* in neutraler wäßriger Lösung ergibt sich, daß sich sowohl die Verschiebung des



- 1:** R = R' = H  
**2:** R = CH<sub>3</sub>, R' = H  
**3:** R = H, R' = CH<sub>3</sub>  
**4:** R = R' = CH<sub>3</sub>

Absorptionsmaximums als auch die Veränderung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  beim Übergang von Thymin (**1**) zu 1.3-Dimethyl-thymin (**4**) annähernd additiv aus den Veränderungen der partiell methylierten Produkte **2** und **3** zusammensetzt. Bei einer Ver-

1) D. Shugar und J. J. Fox, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **9**, 199 (1952); hier s. auch frühere Literatur.

2) J. Jonas und J. Gut, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **26**, 2155 (1961).

3) J. Jonas und J. Gut, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **27**, 716 (1962).

4) K. Nakanishi, N. Suzuki und F. Yamazaki, *Bull. chem. Soc. Japan* **34**, 53 (1961).

5) A. R. Katritzky und A. J. Waring, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 1540.

6) E. Wittenburg, *Chem. Ber.* **99**, 2380 (1966), vorstehend.

Tab. 1. UV-spektroskopische Daten von Thymin und einigen Derivaten in wäßrigen Pufferlösungen

Verbindung	pH	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$\lambda_{\min}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$E_{280}/E_{260}$
Thymin <sup>a)</sup>	5.43	265.5	3.98	234	3.35	0.52
	9.85	267	3.85	240	3.47	0.80
	12—13	291	3.80	245	3.39	1.40
	14	282	3.81	245	3.39	1.50
1-Methyl-thymin	5.9	273	4.05	237	3.25	1.17
	10.15	272	3.98	241.5	3.46	1.03
	11.5—13	271	3.90	245	3.52	0.90
3-Methyl-thymin	5.9	264.5	3.91	236	3.46	0.50
	10.33	271	3.80	241	3.42	1.00
	13	221; 290	3.94; 4.06	249	3.04	4.44
4-O-Äthyl-thymin	5.9	275	3.75	239	3.12	1.38
	11.52	221.5; 284	4.13; 3.80	248.5	3.17	2.61
	13	223; 286	4.15; 3.85	251	3.12	3.22
	14	226; 286	4.17; 3.85	251	3.12	3.22
1.3-Dimethyl-thymin <sup>b)</sup>	5—12	272	3.99	239	3.31	1.08
1-Methyl-4-O-äthyl-thymin	5—12	280	3.81	243	3.10	2.30
2.4-Di-O-äthyl-thymin	5—12	217; 265	3.98; 3.85	238	3.35	0.24

a) Shugar und Fox<sup>1)</sup> geben ähnliche Werte für die Wellenlänge, jedoch tiefere Werte für  $\epsilon$  an.

b) Pfeleiderer und Strauss<sup>7)</sup> haben für diese Substanz in methanolischer Lösung ähnliche Werte gefunden.

lagerung der  $\pi$ -Bindungen wäre diese gute Additivität nicht gegeben. Thymin, 1-Methyl-thymin (2) und 3-Methyl-thymin (3) weisen daher in neutraler wäßriger Lösung vorwiegend dieselbe tautomere Struktur wie das 1.3-Dimethyl-thymin auf, nämlich die Diketofom<sup>8)</sup>. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit ähnlichen Ergebnissen bei Uracil<sup>1)</sup>, 6-Aza-uracil<sup>2)</sup> und 5-Brom-uracil<sup>9)</sup>.

Das UV-Spektrum von 1.3-Dimethyl-thymin ist in *alkalischer* Lösung gegenüber der neutralen Lösung unverändert. Bei Thymin (1), 1-Methyl-thymin (2) und 3-Methyl-thymin (3) treten dagegen mit steigendem pH bei den Absorptionskurven (Abbild. 1—3) isosbestische Punkte auf.

Man kann annehmen, daß 1, 2 und 3 ein Monoanion bilden, 1 in stark alkalischem Medium auch ein Dianion. Die entstehenden Anionen sind dabei als resonanzstabilisierte Hybride verschiedener kanonischer Formen aufzufassen<sup>10)</sup>.

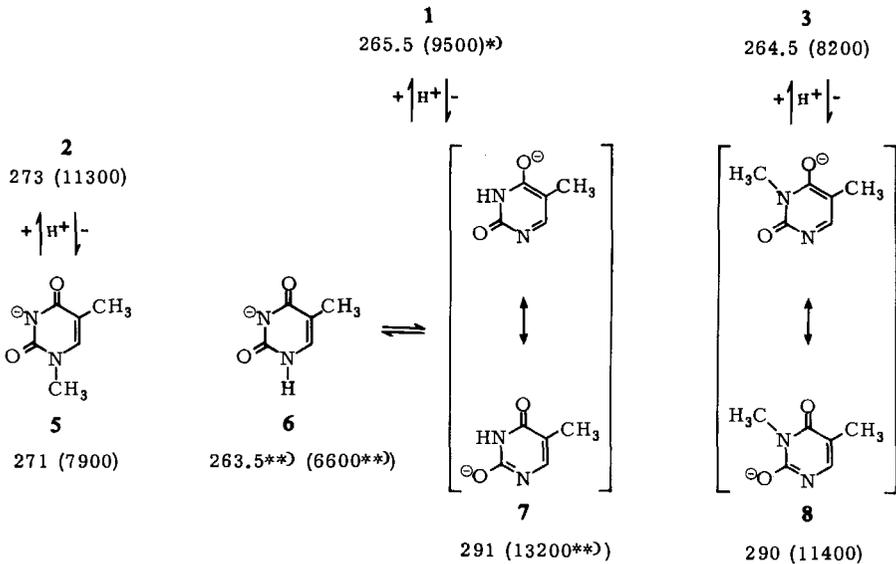
7) W. Pfeleiderer und G. Strauss, Liebigs Ann. Chem. **612**, 173 (1958).

8) Für Thymin war die Dilactamstruktur bereits früher<sup>1)</sup> wegen der Ähnlichkeit der UV-Spektren von Thymin und Uracil angenommen worden. Bei Thymidin wurde die Diketofomstruktur durch H. T. Miles, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **22**, 247 (1956) und ebenda **27**, 46 (1958), mit Hilfe von IR-Spektren in neutraler D<sub>2</sub>O-Lösung nachgewiesen.

9) K. Berens und D. Shugar, Acta biochim. polon. **10**, 25 (1963).

10) Vgl. E. S. Gould, Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie, S. 24—30, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 1962, und F. Klages, Lehrbuch der organischen Chemie, 2. Aufl., Bd. 2, S. 369, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1957.

## Struktur der Monoanionen von Thymin und seinen Methylderivaten

\*)  $m\mu$  ( $\epsilon$ ).

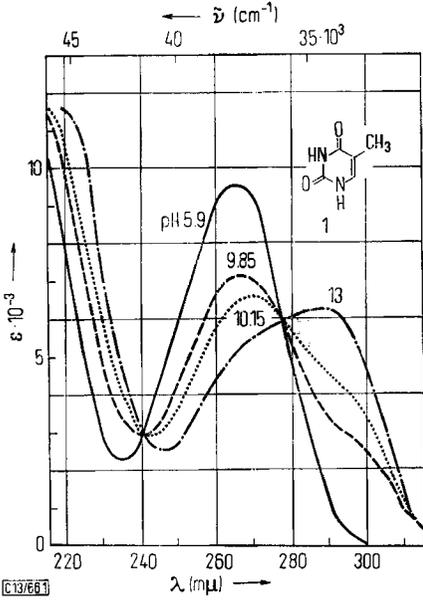
\*\*) Aus Meßdaten berechnet.

Das 1-Methyl-thymin-Anion (**5**) (pH 12–14), bei dem eine Deprotonierung an N-3 erfolgt, zeigt eine *hypsochrome* Verschiebung des Maximums um  $2 m\mu$ , verbunden mit einer Verringerung des  $\epsilon$ -Wertes im Vergleich zu seiner neutralen Form **2** (pH 5.9) (Tab. 1, Abbild. 2). Wegen der geringen *hypsochromen* Verschiebung und des fast symmetrischen Kurvenverlaufs beim Maximum kann man die Beteiligung weiterer kanonischer Strukturen am Anion **5** vernachlässigen, da diese als höher konjugierte Systeme zu einer stärkeren *bathochromen* Verschiebung des Maximums führen würden, wie auch aus dem Spektrum des stärker konjugierten 1-Methyl-4-O-äthyl-thymins (**10**, vgl. Tab. 1) hervorgeht.

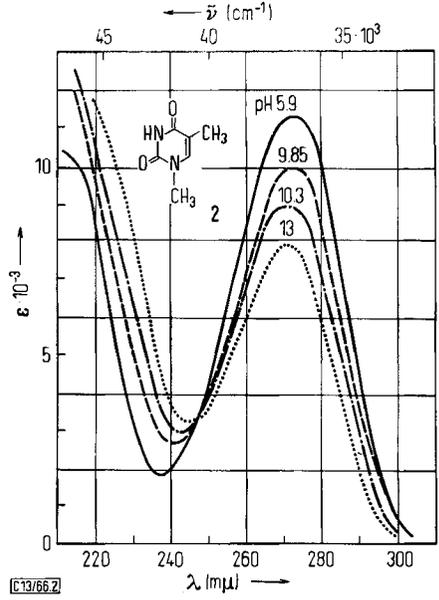
Beim 3-Methyl-thymin-Anion (**8**) (pH 12–14) kann die Deprotonierung nur an N-1 erfolgt sein. Diese ist durch eine starke *bathochrome* Verschiebung des Maximums um  $25.5 m\mu$  und ein Ansteigen des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 11400$ ) charakterisiert (vgl. Tab. 1 und Abbild. 3). Dies kann man mit einem erweiterten Konjugationssystem im Vergleich zum Ausgangsprodukt **3** erklären<sup>11)</sup>.

Da auch das Thymin-Monoanion (pH 12–13) gegenüber der neutralen Form **1** (pH 5.9) eine *bathochrome* Verschiebung des Maximums um  $25.5 m\mu$  aufweist, kann man annehmen, daß Thymin ebenfalls zunächst an N-1 deprotoniert wird. Allerdings zeigt die Kurve des Monoanions (Abbild. 1) gegenüber der neutralen Form einen geringeren  $\epsilon$ -Wert im Maximum ( $\epsilon = 6250$ ) und eine breite Schulter bei ca.  $265 m\mu$ , so daß das Monoanion des Thymins aus mehreren Formen bestehen muß.

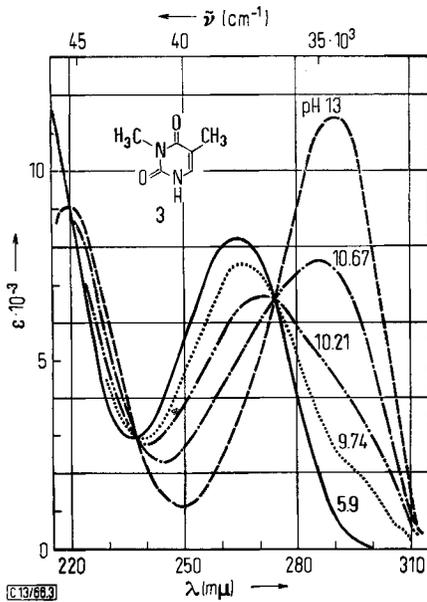
<sup>11)</sup> H. A. Staab, Einführung in die theoretische organische Chemie, 2. Aufl., S. 315 ff., Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 1960.



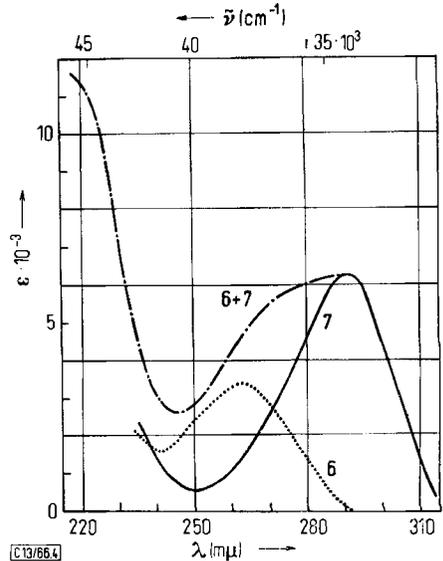
Abbild. 1. UV-Spektrum von Thymin in wäßriger Lösung in Abhängigkeit vom pH



Abbild. 2. UV-Spektrum von 1-Methylthymin in wäßriger Lösung in Abhängigkeit vom pH



Abbild. 3. UV-Spektrum des 3-Methylthymins in wäßriger Lösung in Abhängigkeit vom pH



Abbild. 4. Schulterkorrektur für das Thymin-Monoanion. 6 = Anteil der Form 6 am UV-Spektrum, 7 = Anteil der Form 7 am Gesamtspektrum des Thymin-Monoanions (---)

*Nakanishi* und Mitarbb.<sup>4)</sup> haben aus den UV-Daten von Uracil und seinen Methylderivaten die Monoanion-Formen von Uracil berechnet. Sie vermuteten ähnliche Verhältnisse beim Thymin, geben jedoch keine Befunde an. Analoge Überlegungen wurden bei den 5-Halogenuracilen angestellt<sup>12)</sup>.

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit genannten Meßergebnisse kann man nunmehr die im Monoanion des Thymins vorliegenden Formen **6** und **7** analog berechnen. **6** entspricht dabei dem durch Deprotonierung an N-3 entstandenen 1-Methyl-thymin-Anion (**5**), während sich **7** mit dem Anion des 3-Methyl-thymins (**8**) vergleichen läßt.

Bei Anwendung der Schulterkorrektur („wing correction“<sup>4)</sup>) auf das Monoanion von Thymin (s. Abbild. 4) ermittelt man das Maximum der reinen Form **6** zu 263.5 m $\mu$ ,  $\epsilon = 6600$ <sup>13)</sup>. Wie schon beim 1-Methyl-thymin festgestellt wurde, ist auch hier die Deprotonierung an N-3 mit einer hypsochromen Verschiebung des Maximums um 2 m $\mu$  verbunden. Auch die Minima von 1-Methyl-thymin und Form **6** (vgl. Abbild. 4, Tab. 1) zeigen identische Verschiebungen<sup>14)</sup>. Ähnlich läßt sich das Maximum der Form **7** berechnen: 291 m $\mu$ ;  $\epsilon = 13200$ <sup>15)</sup>.

Aus den so ermittelten Extinktionswerten läßt sich der Anteil der Formen **6** und **7** im Gleichgewicht abschätzen. Danach liegt die Form **7** mit einem Anteil von 47 bzw. 49%, Form **6** mit 53 bzw. 51% vor<sup>16)</sup>. Ein Vergleich mit den entsprechenden Angaben bei Uracil<sup>4)</sup> und 5-Brom-uracil<sup>12)</sup> zeigt, daß in der Reihe 5-Brom-uracil—Uracil—Thymin die an N-3 deprotonierte Form (bei Thymin Form **6**) im Gemisch der Anionen an Gewicht gewinnt (0.55:0.9:1.1)<sup>17)</sup>.

### Struktur des 4-O-Äthyl-thymins (**9**)

Bei Methylierung von **9** an N-1 zum 1-Methylderivat **10** erfolgt eine *bathochrome* Verschiebung des Maximums um 5 m $\mu$ . Diese Verschiebung ist damit etwas geringer als bei der N-1-Methylierung von Thymin (7.5 m $\mu$ ). Setzt man die durch N-1-Methylierung bedingte Verschiebung des Maximums und Erhöhung der Intensität in Rechnung, dann erweisen sich die UV-Absorptionsspektren von **10** und **9** (in neutraler wäßriger Lösung) als außerordentlich ähnlich, während deutliche Unterschiede zu den anderen Vergleichssubstanzen bestehen (Abbild. 5). Die mit der Einführung einer Äthylgruppe am Sauerstoff von C-4 verbundenen Molekülveränderungen spiegeln sich bei den beiden Paaren Thymin/4-O-Äthyl-thymin bzw. 1-Methyl-thymin/1-Me-

<sup>12)</sup> *I. Wempen* und *J. J. Fox*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 2474 (1964).

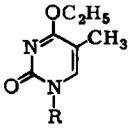
<sup>13)</sup> Zunächst muß man die Kurve des 3-Methyl-thymin-Anions **8** auf das Thymin (pH 12–13) umrechnen, indem man die  $\epsilon$ -Werte von **8** bei der Wellenlänge  $\lambda$  mit 6250/11400 multipliziert und bei der Wellenlänge  $\lambda + 1$  m $\mu$  (wegen der durch die Methylierung an N-3 bedingten hypsochromen Verschiebung des Maximums um 1 m $\mu$ , vgl. Tab. 1) aufträgt (Abbild. 4, Kurve 7). Durch Subtraktion der Kurve **7** von der Kurve des Thymin-Monoanions ergibt sich das Maximum (m $\mu$ ) der Anion-Form **6**. Die aus Kurve **6** ablesbare Extinktion ( $E = 3350$ ) gibt lediglich den Anteil von **6** an der Gesamtextinktion der Formen des Thymin-Monoanions wieder. Der molare Extinktionskoeffizient der Form **6** wird auf Grund der Beziehung  $\epsilon_6:\epsilon_1 = \epsilon_5:\epsilon_2$  berechnet.  $\epsilon_6 = 9500 \times 7900/11300$ .

<sup>14)</sup> **2**→**5**: 237→245 m $\mu$ ; **1**→**6**: 234→242 m $\mu$ .

<sup>15)</sup> Gemäß der Beziehung  $\epsilon_7:\epsilon_1 = \epsilon_8:\epsilon_3$ ;  $\epsilon_7 = 9500 \times 11400/8200$ .

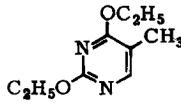
<sup>16)</sup> % **7** =  $6250 \times 100/13200 \approx 47\%$ , % **6** =  $100 - 47 = 53\%$ ; bzw. % **6** =  $3350 \times 100/6600 \approx 51\%$ , % **7** =  $100 - 51 = 49\%$ .

<sup>17)</sup> Berechnet aus den Mittelwerten der angegebenen Verhältnisse und bezogen auf den Anteil der Form **7** entsprechenden Formen = 1.

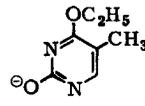


9: R = H

10: R = CH<sub>3</sub>

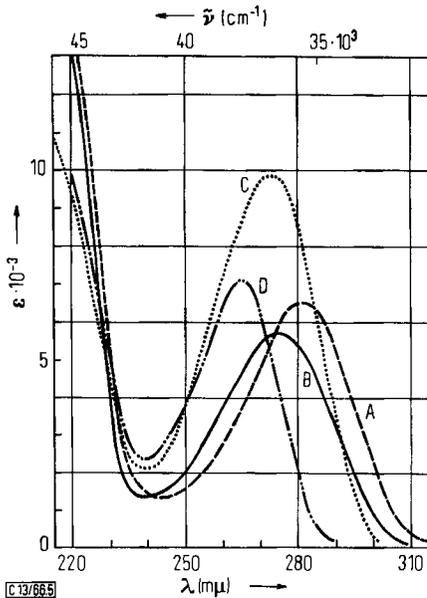


11

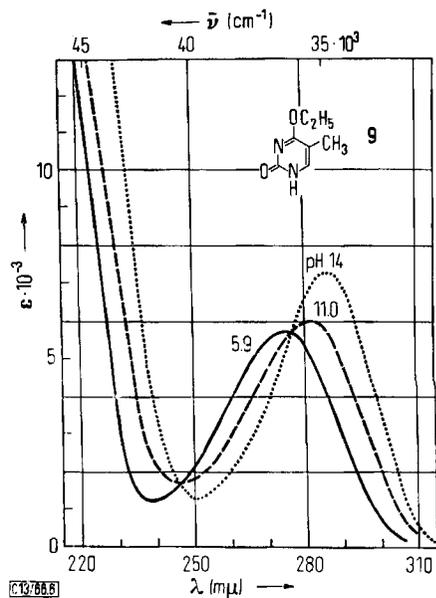


12

thyl-4-*O*-äthyl-thymin durch gleichartige Verschiebungen der Maxima und der Extinktion im UV-Spektrum wider (s. Tab. 1). Man kann daher für das 4-*O*-Äthyl-thymin in neutraler wäßriger Lösung die 2-Keto-Struktur (9) als vorherrschend annehmen, die in 1-Methyl-4-*O*-äthyl-thymin (10) fixiert ist.



Abbild. 5. UV-Spektren von 1-Methyl-4-*O*-äthyl-thymin (A), 4-*O*-Äthyl-thymin (B), 1,3-Dimethyl-thymin (C) und 2,4-Di-*O*-äthyl-thymin (D) in neutraler wäßriger Lösung



Abbild. 6. UV-Spektrum von 4-*O*-Äthyl-thymin in wäßriger Lösung in Abhängigkeit vom pH

Bei der Deprotonierung zeigt das UV-Spektrum des 4-*O*-Äthyl-thymins eine starke *bathochrome* Verschiebung des Maximums (Tab. 1, Abbild. 6). Man kann daher — ähnlich wie beim 3-Methyl-thymin-Anion (s. o.) — das Vorliegen eines im Vergleich zum neutralen Molekül höher konjugierten Systems annehmen. In *alkalischer* Lösung wird daher das 4-*O*-Äthyl-thymin vorwiegend in der Form 12 vorliegen.

### Ionisationskonstanten

Aus den UV-Spektren einiger Pyrimidin-Derivate wurde deren erste Ionisationskonstante ermittelt (s. Versuchsteil und Tab. 2). Wie aus den gefundenen Werten und

einem Vergleich mit den entsprechenden Uracil-Derivaten<sup>1,3,18)</sup> hervorgeht, zeigen die Thymin-Derivate unter dem Einfluß der Methylgruppe eine geringe Abnahme der Säurestärke. Analoge Effekte in ähnlichen Systemen sind bereits beschrieben worden<sup>3,19</sup>.

Tab. 2.  $pK_a$ -Werte für Thymin und einige Derivate

Verbindung	$pK_a$	Analytische Wellenlängen (m $\mu$ )	$\Delta pK_a$ <sup>a)</sup> (Thymin — Uracil)
Thymin	9.87 <sup>b)</sup>	250, 260, 265, 270	0.4
1-Methyl-thymin	10.09	235, 270, 275	0.4
3-Methyl-thymin	10.52	260, 265, 280, 290	0.5
4-O-Äthyl-thymin	11.1	260, 286, 290	0.4

<sup>a)</sup> Bezogen auf die für die entsprechenden Uracil-Derivate in l. c. <sup>18)</sup> angegebenen Werte.

<sup>b)</sup> *Levene et al.*<sup>18)</sup> geben 9.94 (potentiometrische Titration), *Shugar und Fox*<sup>1)</sup> 9.9 (UV-Spektrum) an; Lit.<sup>20)</sup> zitiert 9.82.

Aus den  $pK_a$ -Werten für 1-Methyl-thymin und 3-Methyl-thymin könnte man eventuell annehmen, daß das Thymin zunächst an N-3 deprotoniert wird. Dies ist aber nicht der Fall. Aus dem Vergleich der UV-Spektren von Thymin, 1-Methyl-thymin und 3-Methyl-thymin geht hervor, daß das Thymin primär an N-1 deprotoniert wird. Die mit der Deprotonierung an N-3 verbundene schwach hypsochrome Verschiebung tritt bei Thymin erst bei einem pH > 13 auf (2. Ionisationsstufe).

Herrn Dr. H. Krause, Institut für Organische Katalyseforschung Rostock, danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung des UV-Spektralphotometers und des pH-Meßgerätes sehr herzlich.

## Beschreibung der Versuche

**Präparate:** Bis auf Thymin (Fluka AG/Buchs, Schweiz) wurden alle Verbindungen nach den früher<sup>6,21)</sup> beschriebenen Verfahren dargestellt und gereinigt. Die Konzentration der vermessenen Lösungen lag im Bereich  $10^{-5}$  Mol/l.

**Verwendete Puffer**<sup>22)</sup>: Sörensen-Phosphat-Puffer 0.0066 *m* (pH 5–7); Glycin-Natronlauge-Puffer, Ionenstärke 0.01 (pH 9–11.5). Für verd. Natronlauge (0.01, 0.1 bzw. 1.0 *n* NaOH) wurden pH-Werte von 12, 13 bzw. 14 angenommen. Zur Kontrolle der pH-Werte diente das pH-Meßgerät MV 11 der Firma Clamann und Grahnert, Dresden.

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem registrierenden Zweistrahl-Spektralphotometer USP 2 in 10-mm-Quarzküvetten gemessen.

Die scheinbaren Ionisationskonstanten  $pK'_a$  wurden mit Hilfe der Gleichung<sup>23)</sup>

$$pK'_a = \text{pH} - \log \frac{\epsilon_{\text{HA}} - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_{\text{A}^-}}$$

<sup>18)</sup> P. A. Levene, L. W. Bass und H. S. Simms, *J. biol. Chemistry* **70**, 229 (1926).

<sup>19)</sup> A. Albert und R. Goldacre, *J. chem. Soc. [London]* **1946**, 706.

<sup>20)</sup> E. Chargaff und J. N. Davidson, *The Nucleic Acids*, Bd. 1, S. 457, Academic Press, New York 1955.

<sup>21)</sup> E. Wittenburg, *J. prakt. Chem.*, im Druck.

<sup>22)</sup> H. M. Rauen, *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Aufl., Teil 2, S. 90, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964.

<sup>23)</sup> l. c. <sup>20)</sup>, S. 493.

berechnet, wo  $\epsilon_{\text{HA}}$ ,  $\epsilon_{\text{A}^\ominus}$  bzw.  $\epsilon$  die molaren Extinktionskoeffizienten des neutralen Moleküls HA, des Anions  $\text{A}^\ominus$  bzw. der Mischung aus beiden in der Lösung bei gegebenem pH bedeuten. Die Wellenlängen, für die die Berechnung durchgeführt wurde, sind in Tab. 2 angegeben. Außerdem wurden die errechneten Ergebnisse mit denen der graphischen Methode<sup>1)</sup> — Auftragen der bei einer bestimmten Wellenlänge gemessenen  $\epsilon$ -Werte gegen den pH-Wert — verglichen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung.

Die erhaltenen scheinbaren Ionisationskonstanten  $\text{p}K'_a$  sind gegenüber den thermodynamischen  $\text{p}K_a$ -Werten zu niedrig. Sie müssen daher unter Berücksichtigung der Aktivitätskoeffizienten umgerechnet werden<sup>24)</sup>. Es gilt dann

$$\text{p}K_a = \text{p}K'_a + 0.04 \quad (J = 0.01, t = 25^\circ).$$

Die Genauigkeit der ermittelten  $\text{p}K_a$ -Werte beträgt  $\pm 0.05$ .

<sup>24)</sup> <sup>24a)</sup> A. Albert in A. R. Katritzky, Physical Methods in Heterocyclic Chemistry, Bd. 1, S. 2 ff., Academic Press, New York und London 1963; <sup>24b)</sup> l. c. <sup>22)</sup>, S. 48.