

CHROM. 4169

## CHROMATOGRAPHIE DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE LA THYMINE

R. TEOULE ET J. CADET

*Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, Laboratoire de Radiobiologie, Grenoble (France)*

(Reçu le 12 mai 1969)

## SUMMARY

*Chromatography of thymine radiolysis products*

[<sup>14</sup>C]Thymine in aqueous solution ( $10^{-3}$  to  $10^{-4}$  M) was irradiated with  $\gamma$  rays of <sup>60</sup>Co at doses between  $10^2$  and  $10^6$  rad.

Different chromatographic techniques for separation of the radiolysis products are described. For the paper system solvents such as butanol-water (86:14) and acetonitrile-phosphate buffer (0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (85:15) were employed. Bidimensional thin-layer chromatography with cellulose powder was also used. For this experiment the best solvents were either butanol-methanol-water-NH<sub>4</sub>OH (60:20:20:1) or propanol-water (10:3) in the first dimension, and isopropanol-water-saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3:77:20) in the second dimension. The separation is rapid and can be obtained at 4°.

We have identified a new photoproduct of thymine: 5-methyl-5-hydroxy hydantoin.  $R_F$  values of this compound are given.

## INTRODUCTION

L'inactivation et les mutations des cellules animales ou végétales sous l'action des rayonnements ionisants semblent être dues en grande partie à une atteinte nucléaire. On sait aussi que la radiosensibilité est étroitement liée aux modifications chimiques de l'ADN, par conséquent de ses constituants et notamment des bases pyrimidiques.

Ceci explique l'intérêt biologique particulier que présente l'étude de la radiolyse de la thymine en milieu aqueux. L'isolement des produits radioformés est un problème difficile à résoudre et qui est inhérent au nombre, à la grande similitude structurale, à la labilité des composés à séparer.

Les techniques de chromatographie sur papier ont été largement utilisées dans les études relatives à la photolyse ou à la radiolyse des constituants des acides nucléiques<sup>1-14</sup>. A notre connaissance, dans ce domaine, trois publications seulement font état de l'utilisation de silice ou de cellulose sur couches minces<sup>15-17</sup>.

Dans le cadre d'une étude cinétique concernant la radiolyse de la thymine nous avons mis au point ou expérimenté quelques techniques de séparation.

Afin de respecter l'intégrité structurale des substances labiles deux préoccupations essentielles ont guidé notre recherche des systèmes chromatographiques: (1) durée de développement minimale; (2) déroulement des différentes opérations dans des conditions très douces (pH non extrêmes, températures faibles ou modérées).

Dans cet exposé nous ferons le point des différentes méthodes utilisées et qui, à des titres divers, nous ont donné des résultats intéressants.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La thymine marquée  $^{14}\text{C}$ , en solution aqueuse  $2.10^{-3} M$  est irradiée par du  $^{60}\text{Co}$  à des flux choisis entre 48 000 et 600 000 rad/h.

Des activités aussi faibles que  $0.2 \mu\text{C}$  de thymine initiale pour les plaques de cellulose uniplate et de  $0.8 \mu\text{C}$  pour le papier Whatman No. 1 donnent une révélation convenable par contact avec du papier Kodirex pendant 15 h. Ceci correspond à 2.5 et  $10 \mu\text{g}$  pour une thymine  $^{14}\text{C}$  d'activité spécifique moyenne ( $10 \text{ mC/mM}$ ).

Pour des charges peu importantes, l'examen en lumière ultraviolette à  $254 \text{ m}\mu$  permet la localisation des composés pyrimidiques présentant une double liaison en position 5-6.

Certaines pyrimidines hydroxylées, l'urée et ses dérivés donnent une coloration bleue ou jaune après action de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ou de la potasse alcoolique suivie d'une pulvérisation de paraminobenzaldéhyde d'après la méthode de FINK modifiée par NOFRE<sup>1</sup>.

## CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Le papier Whatman No. 1 a été utilisé en raison de son débit moyen et du pouvoir de résolution élevé qu'il peut présenter. Nous avons utilisé préférentiellement la chromatographie descendante parce qu'elle est plus rapide.

Le conditionnement du papier avant emploi dans une atmosphère saturée de solvant n'est pas indispensable, les  $R_F$  des composés étant très reproductibles.

La charge des dépôts ne joue pas un rôle important dans un très large domaine ( $0.1-500 \mu\text{g}$ ).

La révélation du chromatogramme s'effectue comme il est décrit dans le paragraphe précédent.

### (1) Chromatographie monodimensionnelle

Deux systèmes de solvants ont été retenus: *n*-butanol-eau pour son pouvoir de résolution élevé; acétonitrile-tampon phosphate pour la rapidité de migration et la séparation convenable à laquelle il conduit.

(a) *n*-Butanol-eau (86:14). Ce système de solvant très fréquemment utilisé est lent et au bout de 24 h la migration du produit le plus mobile est voisine de 20 cm. Si on augmente cette distance par un développement à front perdu pendant deux jours, les phénomènes de diffusion ne permettent pas une meilleure séparation.

Deux techniques apportent une amélioration appréciable: (i) la répétition du développement. Après un premier développement de 24 h le chromatogramme est

séché puis replacé dans la cuve pendant une nouvelle durée de 24 h. La formule de JEANES<sup>18</sup> permet alors de calculer de manière approximative les nouvelles valeurs  $R_F'$

$$R_F' = 1 - (1 - R_F)^2.$$

(ii) Le procédé des bandes pointues. Dans ce cas le solvant diffuse non seulement dans la direction parallèle au déplacement mais aussi dans la direction qui lui est perpendiculaire. Les spots des différents produits sont étirés suivant cette deuxième dimension et se superposent moins.

La meilleure séparation est obtenue par la conjonction des deux techniques.

(b) *Acétonitrile-eau tampon phosphate*. HEDRICK ET BERGER<sup>10</sup> ont décrit récemment ce système de solvants. L'acétonitrile présente des propriétés remarquables pour la chromatographie de partage: un coefficient de tension superficielle élevé et une faible viscosité permettant un déplacement très rapide; une constante diélectrique élevée (37.5 à 20°) qui joue sur la dissociation ionique et par conséquent sur l'effet des tampons; une parfaite miscibilité à l'eau; une grande polarité associée à une faible capacité de donner des liaisons hydrogène avec les solvants ou les solutés.

L'eau au contraire est un solvant qui provoque beaucoup de liaisons hydrogène. Additionnée à la phase mobile d'acétonitrile elle s'associe avec les solutés concurrentiellement aux fonctions hydroxyles de la cellulose et de l'eau liée. Avec l'acétonitrile pur les pyrimidines ne sont pas entraînées, c'est l'eau qui provoque le déplacement.

#### *Processus expérimental*

Les 2 systèmes de solvants décrits par HEDRICK ET BERGER, c'est-à-dire acétonitrile-tampon phosphaté 0.4 M (80:20) et acétonitrile-eau ammoniacale pH 10 (70:30) ont été repris en modifiant les proportions de chaque composant du mélange. En effet, en raison de la quantité notable d'eau dans ces 2 solvants la force d'élution de la phase mobile est trop importante pour les solutés qui présentent des  $R_F$  élevés et de ce fait très voisins.

Il a suffi de ramener les volumes respectifs de tampon phosphate et d'eau ammoniacale à 15 et 20 pour obtenir une meilleure répartition de nos produits sur le chromatogramme.

Les bandes de papier préalablement au dépôt de substances sont trempées dans l'une ou l'autre des solutions tampon. Le temps requis pour le développement en utilisant la technique des bandes pointues est court (3 h). Le mélange acétonitrile tampon phosphate donne la meilleure résolution; celle-ci n'est cependant pas entièrement satisfaisante car plusieurs composés présentent des  $R_F$  voisins (Tableau I).

#### (2) *Chromatographie bidimensionnelle*

Les 2 systèmes de solvants utilisés en chromatographie unidimensionnelle ont chacun un inconvénient, *n*-butanol-eau: durée de migration trop grande; acétonitrile-phosphate: résolution moyenne.

Leur combinaison en chromatographie bidimensionnelle est très intéressante en raison des valeurs de  $R_F$  assez différentes que présentent certains produits dans ces 2 éluants.

La présence de sels dans le mélange acétonitrile tampon phosphate conduit à choisir le système *n*-butanol-eau comme premier solvant. Dans ce cas la durée de

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER WHATMAN No. 1

Substances	Solvants		
	Butanol- eau (86:14)	Acétonitrile- tampon $NH_4OH$ $pH = 10$ (80:20)	Acétonitrile- tampon phosphate (85:15)
	$R_{thymine}$	$R_F$	$R_F$
Thymine	1	0.68	0.50
Urée	0.52	0.54	0.33
Glycol <i>cis</i> thymine	0.42	0.54	0.35
Glycol <i>trans</i> thymine	0.55	0.60	0.40
Dihydrothymine	0.92	0.74	0.60
Hydroxy-5 dihydrothymine	0.64	0.63	0.44
Hydroxy-6 dihydrothymine	0.71	0.69	0.49
Hydroxyméthyl-5 uracile	0.50	0.51	0.27
Ac. hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique	0.59	0.50	0.54
Formylurée	0.92	0.71	0.57
Méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne	0.89	0.66	0.55

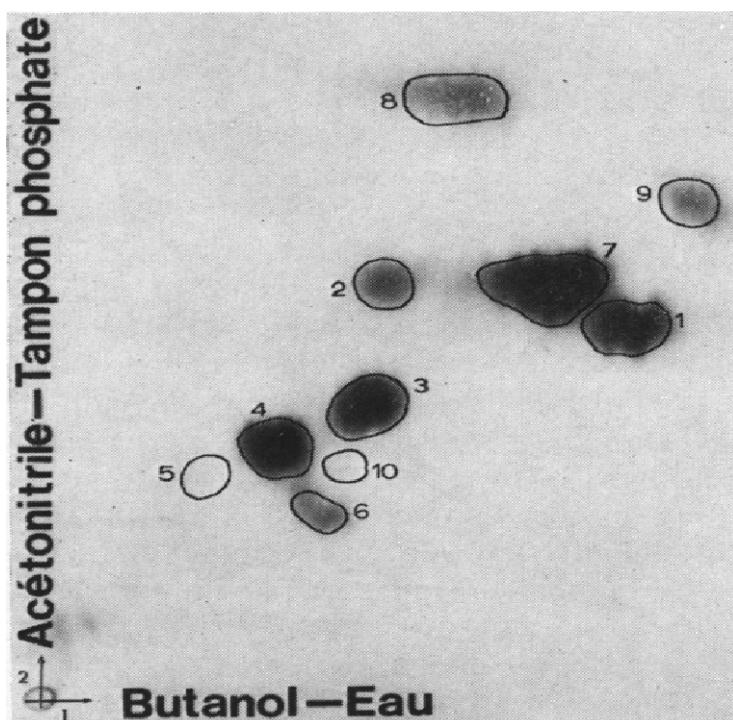


Fig. 1. Chromatographie sur papier Whatman No. 1 des produits de radiolyse de la thymine en milieu aqueux aéré dans le système de solvants butanol-eau (86:14) et acétonitrile-tampon phosphate ( $NaH_2PO_4$  0.2 M et  $Na_2HPO_4$  0.2 M) (85:15). 1 = thymine, 2 = acide hydroxy-5-méthyl-5 barbiturique, 3 = dihydroxy-5,6-dihydrothymine forme *trans*, 4 = dihydroxy-5,6-dihydrothymine forme *cis*, 6 = hydroxyméthyl-5 uracile, 7 = méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne, 10 = urée, 5, 8, 9 = produits de structure inconnue.

migration est de 15 h à 20°. Pour l'acétonitrile, dans la deuxième dimension avec les mêmes conditions opératoires il faut environ 1½ h. Un séchage de 30 min à température ambiante est nécessaire entre les deux éluions. Cette chromatographie bidimensionnelle permet une séparation très poussée de tous les produits de radiolyse de la thymine ayant un  $R_F$  élevé.

### Résultats

Les  $R_F$  des substances connues sont données dans le Tableau I. La Fig. 1 montre la disposition relative des substances radioformées à une dose de  $5 \cdot 10^5$  rad et une concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  M de thymine marquée  $^{14}\text{C}$  ( $0.8 \mu\text{C}$ ) en milieu saéré. La révélation est obtenue par exposition de 15 h sur papier Kodirex.

## CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

### Choix des adsorbants

La cellulose MN 300 (Macherey) sans liant est préalablement purifiée par lavage avec une solution de méthanol et d'ammoniaque selon la technique de PATAKI<sup>20</sup>; la pâte liquide formée par un mélange de 15 g de cette poudre est brassée énergiquement pendant 1 min, puis étalée sur 4 plaques de  $200 \times 200$  mm; ces dernières sont laissées une nuit à la température ambiante ou chauffées pendant 10 min à 105° avant utilisation.

Silice. Les couches de silice sont préparées à partir d'une suspension de 35 g de Silice G (Merck) dans 85 ml d'eau et 5 ml d'acétone, les 4 plaques ainsi obtenues sont activées par chauffage à 120° pendant ½ h.

Cellulose MN polygram ("uniplate"). Ces plaques préparées par Macherey sont constituées par un mince film d'adsorbant sur feuille de plastique. Elles présentent un pouvoir de résolution élevé mais la charge maxima admissible en solutés est inférieure à celle d'une couche mince classique (0.5 mm d'épaisseur).

### Techniques analytiques

La migration des solutés se fait toujours perpendiculairement au sens de l'étalement<sup>21</sup>.

La chromatographie est toujours de type ascendant: les seules forces de capillarité assurent un développement rapide (1-4 h) pour une migration du solvant de 15-18 cm.

Le seuil de détection des produits insaturés est très bas; il est de 1  $\mu\text{g}$  pour les plaques de cellulose et de silice et même inférieur à 0.5  $\gamma$  pour les feuilles "uniplate".

Les pyrimidines saturées se révèlent difficilement sur couche mince de silice. Sur couche mince de cellulose la sensibilité est meilleure que sur papier, les taches obtenues étant moins diffuses.

### Choix des solvants

Les systèmes de solvant à base d'éther donnent lieu à d'importantes trainées. Les meilleures séparations sont obtenues avec des mélanges eau-alcool et notamment: (1) *n*-Butanol-acide formique-eau (7:3:15); (2) *n*-butanol-méthanol-NH<sub>4</sub>OH (28%) - eau (60:20:20:1) (bibl. 22); (3) *n*-propanol-eau (10:3); (4) isopropanol-solution saturée de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M (3:77:20).

TABLEAU II

CHROMATOGRAPHIE SUR "UNIPLATE" ET PLAQUE SILICE (SILICA GEL G)—VALEUR DES  $R_F$ 

Substances	Adsorbant	Cellulose	Cellulose	Silica	Cellulose	Cellulose <sup>a</sup>
	Solvants	Butanol- acide formique- eau (satu- rante) (7:3:15)	Butanol- méthanol- eau- NH <sub>4</sub> OH (28%) (60:20: 20:1)	Acéto- nitrile- tampon 0.2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> et 0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (85:15)	Propa- nol- eau (10:3)	Isopropanol- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3:77:20)
Thymine		0.49	0.68	0.71	0.74	0.42
Urée		0.30	0.50	0.52	0.55	0.84
Glycol <i>cis</i> 5,6 thymine		0.17	0.50	0.63	0.55	0.84
Glycol <i>trans</i> 5,6 thymine		0.22	0.56	0.69	0.63	0.78
Carboxy-5 uracile		0.21	0.05	0.22	0.11	0.63
Dihydro-5,6-thymine		0.64	0.69	0.49	0.74	0.49
Hydroxy-5 dihydrothymine		0.39	0.59	0.67	0.65	0.72
Hydroxyméthyl-5 uracile		0.19	0.49	0.42	0.55	0.64
Ac. hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique		0.39	0.30	0.77	0.62	0.84
Formylurée		0.50	0.66	0.73	0.71	0.76
Méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne					0.74	0.77

<sup>a</sup> Valeurs obtenues en chromatographie bidimensionnelle après développement dans le premier sens avec propanol-eau (10:3) et séchage de 15 min.

Sur silice on a également de bons résultats avec: (5) Acétonitrile-tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M) (85:15) (bibl. 19).

Les valeurs des  $R_F$  du Tableau II ont été déterminées pour une charge n'excédant pas 50  $\mu$ .

### Résultats

Sur couches minces les divers systèmes de solvant n'ont conduit à aucune séparation complète en monodimensionnelle des produits de radiolyse de la thymine. Ils sont beaucoup trop nombreux pour être isolés correctement.

Des essais de développement sur des plaques plus hautes n'ont apporté aucune amélioration sensible en raison des phénomènes de diffusion des solutés.

En chromatographie bidimensionnelle l'association des solvants (1), (2), (3) n'a donné que des résultats médiocres. Le comportement chromatographique des dérivés de la thymine est trop semblable et on obtient une répartition diagonale sans la dispersion souhaitée.

Par contre le mécanisme d'action du solvant (4) que nous avons mis au point en nous inspirant des travaux de PATAKI<sup>20</sup> est foncièrement différent; son utilisation dans la deuxième dimension après migration du système (3) dans le premier sens permet d'obtenir une excellente séparation; les différentes taches observées sont très nettes et dispersées (voir Fig. 2).

Le séchage nécessaire entre les deux développements n'est que de 15 min; un

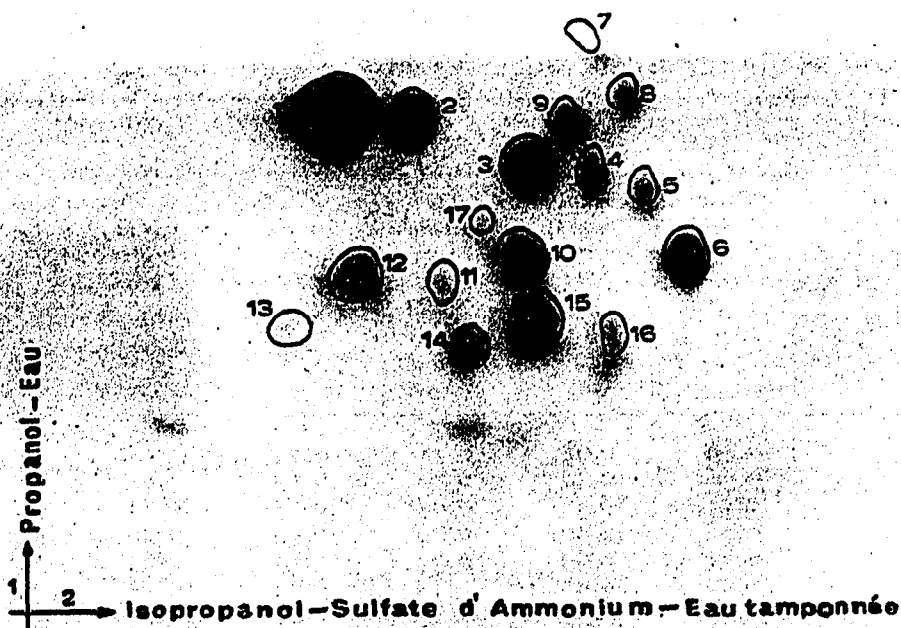


Fig. 2. Chromatographie sur couche mince de cellulose "MN polygram uniplat" des produits de radiolyse de la thymine en milieu désaéré dans le système de solvants propanol-eau (10:3) et isopropanol-sulfate d'ammonium-tampon phosphate  $K_2HPO_4$  1 M (3:77:20). 1 = thymine, 2 = dihydro-5,6 thymine, 3 = hydroxy-6-dihydrothymine, 4 = hydroxy-5-dihydrothymine, 5 = dihydroxy-5,6-dihydrothymine forme *trans*, 6 = dihydroxy-5,6-dihydrothymine forme *cis*, 10 = hydroxyméthyl-5 uracile, 8 = méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne, 7, 9, 11-17 = produits de structure inconnue.

contact plus long avec l'atmosphère ambiante modifie la seconde migration en augmentant les valeurs des  $R_F$  sans pour autant améliorer la résolution.

Il est possible d'opérer à basse température ( $4^\circ$ ); la seule perturbation observée est l'allongement des durées de migration qui passent respectivement de 5 à 7 h et de 2 à 3 h pour les solvants (3) et (4). Les taches sont aussi légèrement plus diffuses.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions le professeur RINALDI pour la bienveillance avec laquelle il a toujours considéré ces travaux ainsi que Mme GEORGES, Mlle POUCHOT et Mme VOITURIEZ pour leur collaboration technique.

#### RÉSUMÉ

La thymine  $^{14}C$  en solution aqueuse ( $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  M) est irradiée avec les rayons gamma du  $^{60}Co$  à des doses comprises entre  $10^2$  et  $10^6$  rad.

On décrit différentes techniques chromatographiques des produits de radiolyse. Sur papier, les solvants butanol-eau (86:14) et acétonitrile-tampon phosphate (85:15) donnent des bons résultats.

La séparation bidimensionnelle est aussi utilisée en couches minces. Dans ce cas, les meilleurs solvants sont butanol-méthanol-eau- $NH_4OH$  (60:20:20:1) ou propanol-eau (10:3) dans la première dimension, et isopropanol-eau saturée de

sulfate d'ammonium- $K_2HPO_4$ , 1 M (3:77:20) dans la deuxième dimension. La séparation est rapide et peut être effectuée à 4°.

Nous avons identifié un nouveau photoproduit de la thymine: la méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne. Les  $R_F$  de ce composé sont donnés.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. NOFRE ET A. CIER, *Bull. Soc. Chim. France*, 4 (1966) 1326.
- 2 B. EKERT, *Nature*, 194 (1962) 278.
- 3 R. DEERING ET W. SNIPES, *Biophys. J.*, 8 (1968) 326.
- 4 M. KHATTAK ET J. GREEN, *Intern. J. Radiation Biol.*, 11 (1966) 577.
- 5 G. SCHOLES, J. F. WARD ET J. WEISS, *J. Mol. Biol.*, 2 (1960) 379.
- 6 L. MYERS, J. F. WARD, W. TSUKAMOTO, D. HOLMES ET J. JULCA, *Science*, 148 (1955) 1234.
- 7 M. DANIELS ET A. GRIMSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 142 (1967) 292.
- 8 A. LAMOLA, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 813.
- 9 D. WEINBLUM ET H. JOHNS, *Biochim. Biophys. Acta*, 114 (1967) 450.
- 10 H. GÜNTHER ET W. PRUSOFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 149 (1967) 361.
- 11 T. YAMANE, J. WYLUDA ET R. SHULMAN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 58 (1967) 439.
- 12 J. L. HOSSZU ET R. RAHN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29 (1967) 327.
- 13 A. VARGHESE ET S. WANG, *Science*, 160 (1968) 186.
- 14 K. C. SMITH, *Photochem. Photobiol.*, 2 (1963) 503.
- 15 E. GILBERT, O. VOLKERT ET P. SCHULTE-FROHLINDE, *Z. Naturforsch.*, 22b (1967) 477.
- 16 C. GREENSTOCK ET H. JOHNS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30 (1968) 21.
- 17 B. SÖRBO ET B. LUNDBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 157 (1968) 445.
- 18 A. JEANES, C. WISE ET R. DIMLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 515.
- 19 C. HEDRICK, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 411.
- 20 G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 126.
- 21 K. RANDEATH ET E. RANDEATH, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 111.
- 22 K. RANDEATH, *Nature*, 205 (1965) 908.

*J. Chromatog.*, 43 (1969) 368-375