

CHROM. 12,110

## Note

### Glaskapillaren zur gaschromatographischen Analyse methylierter Purine und Pyrimidine

C. HANSKI, H. TAUSCH und G. STEHLIK

*Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf, A-2444 Seibersdorf (Österreich)*

(Eingegangen am 16. November 1978; geänderte Fassung eingegangen am 15. Juni 1979)

Erhöhte Methylierung von tRNA<sup>1</sup>, und als Folge davon erhöhte Ausscheidung von methylierten Nucleinsäurebasen im Harn<sup>2–9</sup>, scheint ein charakteristisches Zeichen für maligne Tumore zu sein<sup>10</sup>. Deshalb ist eine schnelle und empfindliche Methode zur Analyse methylierter Basen von klinischem Interesse. Auch in gesunden Zellen werden die Funktionen der Nucleinsäuren durch Basenmethylierung und andere Modifizierungen der Nucleotide beeinflusst<sup>11,12</sup>. Die Analyse modifizierter Basen in den Nucleinsäuren hat daher viel zum Verständnis der vielfältigen Rolle dieser Säuren beigetragen<sup>13–15</sup>.

Analysen methylierter Basen wurden sowohl in Nucleinsäurehydrolysaten<sup>15–17</sup> als auch Harnextrakten<sup>2–9</sup> durchgeführt. Dabei wurden Papierchromatographie<sup>2,6</sup>, Dünnschichtchromatographie<sup>15</sup>, Flüssigkeitschromatographie<sup>18</sup>, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie<sup>4,5,19</sup> und Gaschromatographie (GC)<sup>7–9,20</sup> angewendet. Bei der zuletzt genannten Methode ist zwar die Herstellung flüchtiger Derivate notwendig, die GC bietet aber neben kurzer Analysendauer und gutem Trennvermögen die Möglichkeit, mit Hilfe eines Massenspektrometers als Detektor zu einer zuverlässigen Identifizierung der interessierenden Verbindungen zu gelangen<sup>5,21</sup>.

Die bisher zur gaschromatographischen Analyse dieser Verbindungsklasse verwendeten gepackten Säulen erreichen bei weitem nicht das Trennvermögen von Glaskapillaren, die sich insbesondere auch bei der GC-Massenspektrometrie (MS)-Kopplung überlegen zeigten<sup>22</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Glaskapillaren zur Bestimmung methylierter Purine und Pyrimidine in Harn verwendet werden, wo diese Verbindungen in geringen Konzentrationen neben relativ grossen Mengen einer Vielzahl chemisch sehr ähnlicher Verbindungen auftreten.

Einige verfügbare kommerzielle Kapillaren [SE-30, 25 m × 0.35 mm; OV-17, 25 m × 0.35 mm (LKB); OV-101, 40 m × 0.3 mm (Jaeggi, Labor für Gaschromatographie) entsprachen zwar bezüglich Trennvermögen den Erwartungen, nicht jedoch in Bezug auf Inertheit: Silylderivate methylierter Basen neigen dazu, nicht oder nur unvollständig aus dem gaschromatographischen Trennsystem eluiert zu werden. Auch nach der "Bariumcarbonat-Methode"<sup>23,24</sup> hergestellte Kapillaren erwiesen sich, trotz sehr guter allgemeiner Qualität, für diese Anwendung als nicht geeignet. Von den untersuchten Verbindungen reagiert silyliertes 7-Methylguanin am empfindlichsten: bei keiner der genannten Kapillaren wurde bei einer dosierten Menge von weniger als 100 ng 7-Methylguanin ein Peak registriert. Es stellte

sich daher die Aufgabe, zunächst eine für dieses spezifische Analysenproblem wirksamere Methode zur Desaktivierung des Glases zu finden; Erfahrungen mit gepackten Säulen legten nahe, dass eine gegenüber Silylderivaten inerte Oberfläche am ehesten durch Silanisieren zu erhalten sein würde.

#### EXPERIMENTELLES

Kapillaren von 30 m Länge und 0.25 mm Innendurchmesser wurden aus Bor-silicatglas (Duran 50) mit Hilfe einer Glasziehapparatur (Hewlett-Packard) gezogen. Die GC Analysen erfolgten an den Geräten Fractovap 2101 AC und Fractovap 2400 T (Carlo Erba). Letzteres war über eine "offene Kopplung" mit einem Massenspektrometer CH 5 DF (Varian MAT) verbunden. Die Kopplungsmethode entsprach funktionsmässig der von Henneberg *et al.*<sup>25</sup> angegebenen, jedoch wurde die Verbindungsleitung anstelle von Pt-Ir aus Glas gefertigt, sodass die Probe im gesamten System nur mit Oberflächen gleicher Qualität in Kontakt kam<sup>26</sup>.

#### *Desaktivierung der Kapillaren*

*Methode 1 (Silanisierung unter milden Bedingungen).* Die Kapillare wurde nach Füllen mit einer Lösung von 5% Dimethyldichlorsilan (DMCS) in Toluol 30 min stehen gelassen. Anschliessend wurde unter Stickstoffdurchfluss zunächst bei 100° 30 min, dann bei 250° 1 h getrocknet.

*Methode 2 (Silanisierung, kombiniert mit PEG-Desaktivierung).* Die Kapillare wurde mit einer niederschlagsfreien Mischung von Trimethylchlorsilan (TMCS) und Hexamethyldisilazan (HMDS) (1:5) zu 90% gefüllt, beidseitig zugeschmolzen und etwa 20 h einer Temperatur von 150° ausgesetzt. Dabei entsteht eine Oberfläche, die eine homogene Belegung auch mit polaren Trennflüssigkeiten, z.B. Polyäthylenglycol (PEG), zulässt. Die beschriebene Behandlung führt nämlich zur Bildung von Kristallen, die unter dem Stereomikroskop (50-fache Vergrösserung) als Reflexe sichtbar sind. Die Kristalle sublimieren bei etwa 300° und sind wasserlöslich; es handelt sich also höchstwahrscheinlich um NH<sub>4</sub>Cl, ein Nebenprodukt der Silylierungsreaktion. Zur weiteren Desaktivierung wurde die Kapillare nun mit Polyäthylenglycol (Carbowax 20 M) nach der statischen Methode<sup>27</sup> aus einer Lösung von 0.2% in Dichlormethan belegt. (Wie entsprechende Tests zeigten, erhält man auf diese Weise durchaus brauchbare PEG-Kapillaren; über Langzeitstabilität im praktischen Betrieb liegen jedoch keine Erfahrungen vor.)

Nach der Belegung wurde die Kapillare unter geringem Stickstoffdurchfluss 30 min einer Temperatur von 280° ausgesetzt<sup>23</sup>. Dabei entsteht nach Aue *et al.*<sup>28</sup> ein nicht extrahierbarer, desaktivierender Film. Zur Verbesserung der Filmbildung der unpolaren stationären Phase (OV-1) wurde anschliessend durch Spülen mit einer 0.1%igen Lösung von Triton X-100 in Dichlormethan und anschliessendes kurzes Erhitzen auf 240° (30 min) bei geringem Stickstoffdurchfluss eine vermittelnde Zwischenschicht erzeugt<sup>23</sup>.

*Methode 3 (Silanisierung nach Welsch *et al.*<sup>29</sup>).* Die Kapillare wurde zu etwa 10% mit HMDS gefüllt und dieser Pfropfen mit 4–5 cm/s mittels Stickstoff durch die Kapillare gedrückt. Anschliessend wurden die beiden Enden zugeschmolzen und die Kapillare 20 h einer Temperatur von 300° ausgesetzt. Nach Abkühlung wurde mit Stickstoff trockengeblasen. Wie sich zeigte, lassen sich jedoch desaktivierende

Wirkung und Reproduzierbarkeit der Silanisierung beträchtlich erhöhen, wenn durch eine vorausgehende Behandlung des Glases mit wässriger HCl die säurelöslichen Glaskomponenten aus der Oberflächenschicht entfernt werden<sup>30</sup>: Dazu wurde die Kapillare mit 20%iger HCl gefüllt und dann zu 8% wieder geleert. Nach Zuschmelzen der Enden unter Vakuum wurde die HCl-gefüllte Kapillare über Nacht bei 150° belassen. Dann wurde die Kapillare geöffnet, entleert, mit Wasser gespült und unter Stickstoffdurchfluss etwa 1 h bei 120° getrocknet; es folgte eine gründliche Dehydratisierung bei 300° über Nacht, ebenfalls unter Gasdurchfluss. Unmittelbar anschliessend wurde silanisiert wie beschrieben.

#### *Belegung mit stationärer Phase*

Sämtliche nach einer der angeführten Methoden desaktivierten Kapillaren wurden in gleicher Weise nach der statischen Methode<sup>27</sup> mit OV-1 in einer Filmdicke von etwa 0.2  $\mu\text{m}$  belegt. Nach Füllen mit einer 0.2%igen Lösung der stationären Phase in Dichlormethan wurde ein Kapillarenende durch Einsaugen eines wenige Millimeter langen Pfropfens Wasserglas verschlossen. Nach einer Wartezeit von mehreren Stunden wurden die Kapillaren in ein Wasserbad von etwa 35° gebracht und das offene Ende an eine Vakuumleitung angeschlossen. Die Wartezeit dient neben dem Aushärten des Wasserglaspfropfens vor allem dazu, eingeschlossenes Gas durch Diffusion gleichmässig in der Lösung zu verteilen und damit die Gefahr eines "Durchbrechens" zu beseitigen. Schliesslich wurden die Kapillaren nach Montage im Gaschromatographen mit einer Heizrate von 1°/min auf 260° gebracht und mehrere Stunden bei dieser Temperatur konditioniert.

#### *Derivatisierung der Proben*

Die getrockneten Proben wurden mit Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid in Dichloräthan (1:1) (ref. 31) bei 150° silyliert; die Reaktionszeit betrug 35 min.

#### *Gaschromatographische Trennbedingungen*

Injektortemperatur, 280°; Detektor, Flammenionisationsdetektor; Anfangsisotherme, 90°; Heizrate, 5°/min; Endisotherme, 250°; Trägergas, Helium, 2 ml/min bei 90°; Dosierung, splitlos nach Grob und Grob<sup>32</sup>.

#### *Bedingungen zur Aufnahme der Massenspektren*

Elektronenstossionenquelle, 250°; Kathodenstrom, 85  $\mu\text{A}$ ; Elektronenenergie, 18 eV; Auflösung,  $m/\Delta m = 1000$  (10% Tal); Scangeschwindigkeit, 2.5 sec/Massendekade; Offene Kopplung; Chromatogrammaufnahme durch Registrieren des Totalionenstromes.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Tabelle I sind die wichtigsten Resultate der verschiedenen Desaktivierungsverfahren zusammengefasst. Wie bereits erwähnt, reagierte das Silylderivat von 7-Methylguanin am empfindlichsten auf die Restaktivität der Kapillaren. Daher wurde als Kriterium für die Desaktivierung jene Menge dieser Verbindung betrachtet, bei der, ohne vorherige Sättigung der aktiven Zentren durch grössere Probenmengen, ein sich deutlich vom Untergrund abhebender Peak registriert wurde (dreifache

TABELLE I

## NACHWEISGRENZE VON 7-METHYLGUANIN AN KAPILLAREN VERSCHIEDENER DESAKTIVIERUNG

Alle Kapillaren 30 m × 0.25 mm, belegt mit OV-1, 0.2 µm Filmdicke.

<i>Methode der Desaktivierung</i>	<i>Nachweisgrenze (ng)</i>	<i>Trennzahl, TZ (Undecan, Dodecan; 80°)</i>
1 Silanisierung unter milden Bedingungen	50–200	35
2 Silanisierung, kombiniert mit PEG-Desaktivierung	1–2	40
3 Silanisierung nach Welsch	3–5	40

Rauschbandbreite). Dieser Wert ist unter "Nachweisgrenze" in Tabelle I angegeben. Es wurde nicht näher untersucht, ob die aktiven Zentren für silyliertes 7-Methylguanin nur adsorptiv oder auch katalytisch zersetzend wirken. Zwischen der "Nachweisgrenze" und jenem Bereich, in dem Überladung der Kapillaren eintrat, verlief die Eichkurve in der Regel annähernd linear.

Nach Methode 1 (Silanisierung unter milden Bedingungen) desaktivierte Kapillaren zeigten schlecht reproduzierbare Eigenschaften, da sich hier einige wichtige Bedingungen kaum kontrollieren lassen (Glaszusammensetzung, Art der Alterung, Feuchtigkeit usw.).

Da durch die Silanisierung nach Methode 1 offenbar auch im günstigsten Fall nur ein Teil der aktiven Zentren erfasst wird, wurde in Methode 2 versucht, die Silanisierung durch eine andere Art der Desaktivierung zu ergänzen. Da wir mit der PEG-Desaktivierung bei Kapillaren vom BaCO<sub>3</sub>-Typ<sup>23,24</sup> sehr gute Ergebnisse für die verschiedensten Anwendungsgebiete erzielten, wurde ein Weg gesucht, bei silanisierten Kapillaren dieses Desaktivierungsverfahren zusätzlich anzuwenden. Tatsächlich erwies sich die kombinierte Behandlung zunächst als deutlich überlegen, doch zeigte sich bereits nach relativ wenigen Analysen eine rasch zunehmende Aktivität. Vermutlich wird der, zwar nicht extrahierbare, also relativ stabile, desaktivierende PEG-Film durch Silylierungsmittelreste in den Proben chemisch angegriffen. Für Serienanalysen hatten diese Kapillaren daher eine zu geringe Lebensdauer.

Die nach Methode 3 (Silanisierung nach Welsch) desaktivierten Kapillaren ergaben schliesslich für den ins Auge gefassten Verwendungszweck ausreichende Nachweisgrenzen und zeigten vor allem während der gesamten Analysenserie (mehrere hundert Dosierungen) weder Aktivitätszunahme noch Rückgang der Trennzahl. Die Methode erwies sich ausserdem als gut reproduzierbar und wenig arbeitsaufwendig.

Da die Silanisierung nur OH-Gruppen erfasst, während auch andere Gruppierungen (Metalloxide) als aktive Zentren wirken, ist eine vorausgehende HCl-Behandlung von wesentlicher Bedeutung. In einer erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung<sup>30</sup> wird über eingehendere Untersuchungen und Weiterentwicklungen dieser Silanisierungsmethode berichtet.

Als Beispiel für die Anwendung einer nach Methode 3 desaktivierten Kapillare zeigt Fig. 1 die Analyse einer Standardmischung, Fig. 2 die Analyse von 7-Methylguanin in Rattenharn. Die Isolierung der methylierten Purine aus dem Harn erfolgte durch Flüssigkeitschromatographie an Dowex 50 (ref. 33). Die Probe, von der Fig. 2 stammt, wurde auch mittels GC-MS-Kopplung untersucht. Ein Massenspektrum

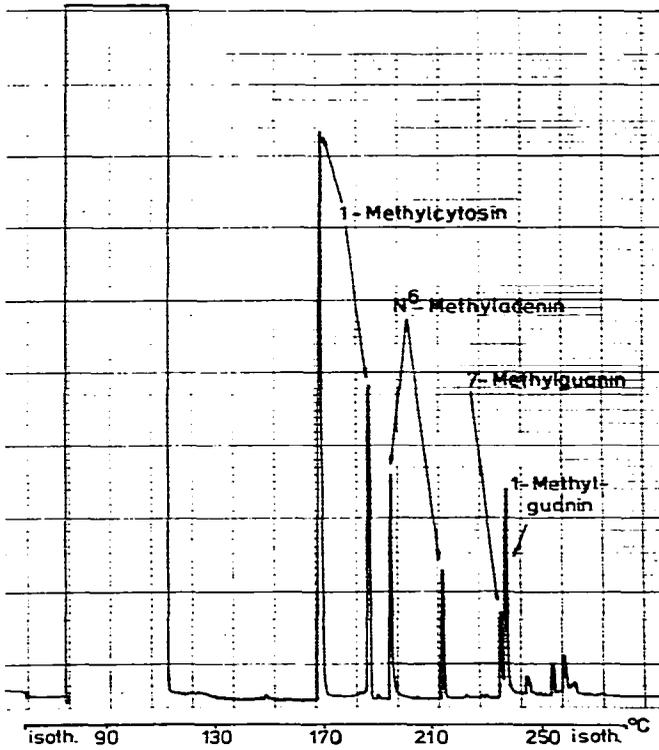


Fig. 1. Gaschromatogramm der Silylderivate methylierter Basen (100 ng je Komponente).

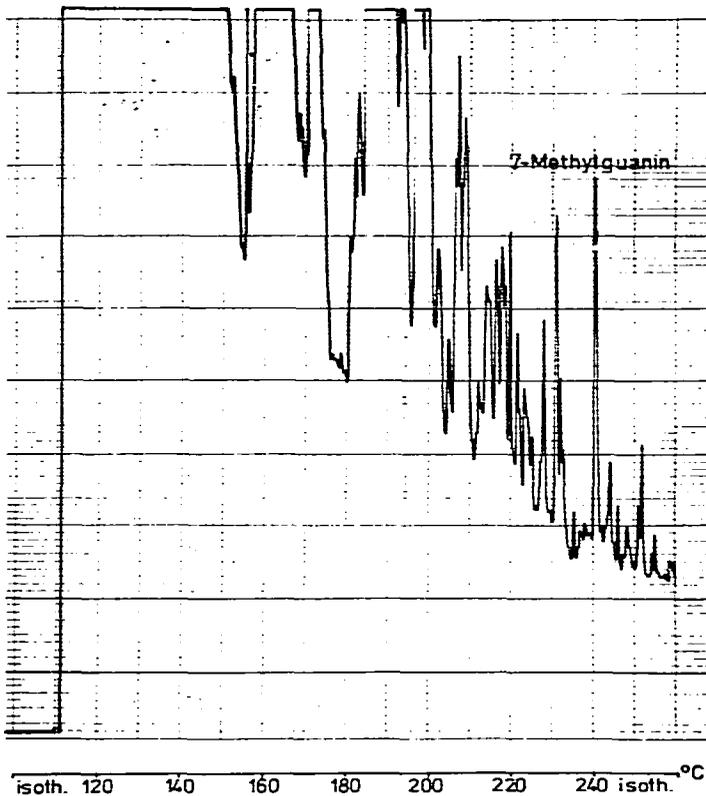


Fig. 2. Gaschromatogramm von Rattenharn nach Vorfraktionierung an Dowex 50 und Silylierung. Die Identifizierung des als 7-Methylguanin bezeichneten Peaks erfolgte mittels GC-MS-Kopplung, siehe Fig. 3.

des markierten Peaks ist in Fig. 3a zu sehen, während Fig. 3b das Massenspektrum eines silylierten 7-Methylguanin-Standards zeigt, ebenfalls mittels GC-MS-Kopplung erhalten.

Nach Methode 3 hergestellte Kapillaren werden derzeit auch bei der Analyse anderer Basen und Nucleoside mittels gekoppelter GC-MS eingesetzt. Trennvermögen

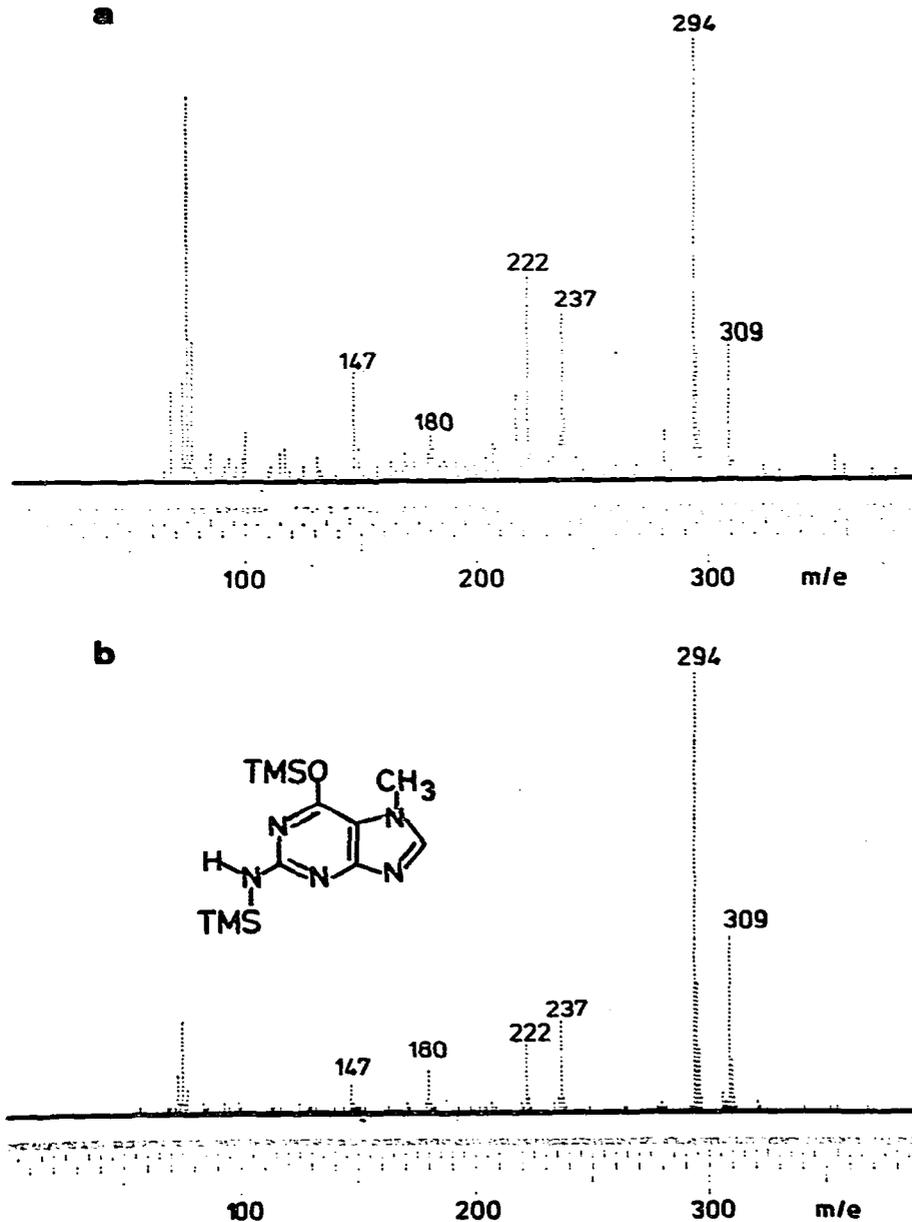


Fig. 3. (a) Mittels GC-MS-Kopplung erhaltenes Massenspektrum des bezeichneten Peaks aus Fig. 2. (b) Referenz-Spektrum von silyliertem 7-Methylguanin.

und Nachweisgrenze gestatten auch die Untersuchung von Nucleinsäurehydrolysaten, in denen das Verhältnis von modifizierten zu Standardbasen ungünstiger als in Harn ist.

## LITERATUR

- 1 E. Borek und S. Kerr, *Advan. Cancer Res.*, 15 (1972) 163.
- 2 S. S. Mirvish, J. Medalie, C. A. Linsell, E. Yousuf und S. Reyad, *Cancer*, 27 (1971) 736.
- 3 L. Mandel, P. R. Srinivasan und E. Borek, *Nature (London)*, 209 (1966) 586.
- 4 T. P. Waalkes, S. R. Dinsmore und J. E. Mrochek, *J. Nat. Cancer Inst.*, 51 (1973) 271.
- 5 J. E. Mrochek, S. R. Dinsmore und T. P. Waalkes, *J. Nat. Cancer Inst.*, 53 (1974) 1553.
- 6 Ho Ying und Ju Lin Hsiang, *Cancer Res.*, 34 (1974) 986.
- 7 Sai Y. Chang, D. B. Lakings, R. W. Zumwalt, C. W. Gehrke und T. P. Waalkes, *J. Lab. Clin. Med.*, 83 (1974) 816.
- 8 D. B. Lakings, T. P. Waalkes, E. Borek, C. W. Gehrke, J. E. Mrochek, J. Longmore und R. H. Adamson, *Cancer Res.*, 37 (1977) 285.
- 9 D. B. Lakings, C. W. Gehrke und T. P. Waalkes, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 69.
- 10 V. Craddock, *Nature (London)*, 228 (1970) 1264.
- 11 M. Caboche und J. P. Bachelierie, *Eur. J. Biochem.*, 74 (1977) 19.
- 12 L. Shugart und G. Novelli, *Biochim. Biophys. Acta*, 157 (1968) 83.
- 13 C. E. Singer, G. R. Smith, R. Cortese und B. N. Ames *Nature New Biol.*, 238 (1972) 72.
- 14 M. L. Geftter und R. L. Russel, *J. Molec. Biol.*, 39 (1969) 145.
- 15 W. Arber, *Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol.*, 14 (1974) 1.
- 16 P. A. Shaw, J. T. Tidwell, L. S. Y. Chia, E. Randerath und K. Randerath, *Biochim. Biophys. Acta*, 518 (1978) 457.
- 17 D. B. Lakings und C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 62 (1971) 347.
- 18 P. Weyland, H. J. Gross und H. Dannenberg, *Z. Krebsforsch.*, 77 (1972) 141.
- 19 B. Shaikh, Shing-Kwan S. Huang, N. J. Pontzer und W. L. Zielinski, *J. Liquid Chromatogr.*, 1 (1978) 75.
- 20 C. W. Gehrke und D. B. Lakings, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 45.
- 21 D. B. Lakings und C. W. Gehrke, *Clin. Chem.*, 18 (1972) 810.
- 22 J. Eyem, *Chromatographia*, 8 (1975) 456.
- 23 K. Grob und G. Grob, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 471.
- 24 K. Grob, G. Grob und K. Grob, *Chromatographia*, 10 (1977) 181.
- 25 D. Henneberg, U. Henrichs und G. Schomburg, *Chromatographia*, 8 (1975) 449.
- 26 H. Tausch und C. Hanski, *SGAE, - Ber. Nr. 3036*, 4 (1979) 12. pp.
- 27 J. Bouche und M. J. Verzele, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 501.
- 28 W. A. Aue, C. R. Hastings und S. Kapila, *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 299.
- 29 Th. Welsch, W. Engewald und Ch. Klaucke, *Chromatographia*, 10 (1977) 22.
- 30 K. Grob, G. Grob und K. Grob, Jr., *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 2 (1979) 31.
- 31 C. W. Gehrke, persönliche Mitteilung.
- 32 K. Grob und G. Grob, *Chromatographia*, 5 (1972) 3.
- 33 C. Hanski und G. Stehlik, *Nature (London)*, eingereicht.