

Zur Reaktion von Uracil mit Äthylencarbonat

Kurze Mitteilung

Von

H. Tuppy und E. Küchler

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 30. September 1964)

Aus dem bei der Umsetzung von Uracil mit Äthylencarbonat entstehenden Reaktionsgemisch wurde neben 1,3-Di-(2'-hydroxyäthyl)-uracil (I) und 1-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (II) auch 3-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (III) isoliert. Die Stellung des Substituenten in dieser Uracilverbindung wurde durch Vergleich der pH-Abhängigkeit ihres UV-Spektrums mit jener der Spektren verschiedener bekannter Methyluracile ermittelt.

From the reaction mixture, which was obtained by treating uracil with ethylene carbonate, small amounts of 3-(2'-hydroxyethyl)-uracil (III) could be isolated in addition to large quantities of 1,3-di-(2'-hydroxyethyl)-uracil (I) and 1-(2'-hydroxyethyl)-uracil (II). The position of the hydroxyethyl group in III was established by comparing the pH dependence of its ultraviolet absorption spectrum with that of various methyluracils of known structure.

Gegenwärtig finden Derivate von Nukleinsäurebasen als Abbauprodukte chemisch modifizierter Nukleinsäuren und als potentielle Carcinostatika größeres Interesse. Wir beschäftigten uns mit der Herstellung solcher Derivate, die homöopolar an ein unlösliches Trägermaterial gebunden werden können^{1, 2}.

Prystas und *Gut*³ haben die Umsetzung von Äthylencarbonat mit cyclischen Imiden⁴ auf das Uracil angewandt und durch fraktionierte

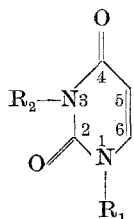
¹ H. Tuppy und E. Küchler, Mh. Chem. **95**, 1677 (1964).

² H. Tuppy und E. Küchler, Mh. Chem. **95**, 1691 (1964).

³ M. Prystas und J. Gut, Coll. Czech. Chem. Comm. **27**, 1054 (1962).

⁴ K. Yanagi und S. Akiyoshi, J. Org. Chem. **24**, 1122 (1959).

Kristallisation aus den Reaktionsprodukten 1,3-Di-(2'-hydroxyäthyl)-uracil (I) und 1-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (II) erhalten. Durch säulenchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches konnten wir noch ein weiteres Produkt isolieren.



I: $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; 1,3-Di-(2'-hydroxyäthyl)-uracil.
 II: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$; 1-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil.
 III: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; 3-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil.

Die Abtrennung des 1,3-Di-(2'-hydroxyäthyl)-uracils (I) von dem Monohydroxyäthylderivat II wurde an Dowex-1 (Acetatform) bei pH 10,2 vorgenommen. Es war zu erwarten, daß bei diesem pH-Wert die 3-Imidogruppe von II bereits weitgehend ionisiert ist, da ihr im analog gebauten 1-Methyluracil ein pK_a -Wert von 9,71 zugeschrieben wird⁵. Hingegen sollte I in ungeladener Form vorliegen. Wie vorhergesehen, wurde bei der Säulenchromatographie II retardiert, nicht jedoch I. Nachdem alles I bei pH 10,2 durchgelaufen war, wurde die Säule mit einem Puffer von pH 8,2 eluiert und die Eluatfraktionen durch Papierchromatographie charakterisiert. Bei der Elution trat nach II noch eine weitere Verbindung aus, die im UV ebenfalls stark absorbierte, sich von II jedoch durch einen höheren R_f -Wert unterschied.

Eine Elementaranalyse ergab dieselbe Bruttoformel wie für II. Die Verbindung war demnach ein Isomeres des letzteren mit einer Hydroxyäthylgruppe entweder am N-3 oder an einem der O-Atome des Uracils. Eine Unterscheidung war durch Vergleich der pH-Abhängigkeit ihres UV-Spektrums mit den bekannten Spektren der verschiedenen Methyluracile⁶ möglich. Zunächst wurde gezeigt, daß die Hydroxyäthylgruppe einen ähnlichen Einfluß wie die Methylgruppe ausübt: Das Spektrum von II war mit dem des 1-Methyluracils fast gleich⁷.

Das Absorptionsspektrum des unbekanntes Uracilderivats wurde bei pH 7,25, 9,4, 9,93 und 12,0 aufgenommen (Abb. 1a); es unterschied sich deutlich von den Spektren der O-Methyluracile und erwies sich als fast identisch mit dem des 3-Methyluracils (Abb. 1b)⁶. Bei der Verbindung handelt es sich also um 3-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (III). Diese Verbindung ist inzwischen auch von Ukita *et al.*⁸ auf einem anderen Wege

⁵ P. A. Levene, L. W. Bass und H. S. Simms, *J. Biol. Chem.* **70**, 229 (1926).

⁶ D. Shugar und J. J. Fox, *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 199 (1952).

⁷ E. Küchler, Dissertation, Univ. Wien (1964).

⁸ T. Ukita, H. Okuyama und H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* **11**, 1399 (1963).

— durch Abbau von 3-(2'-Hydroxy ethyl)-uridin mit NaJO_4 und Cyclohexylamin — erhalten, jedoch nicht kristallisiert, sondern nur durch Papierchromatographie und durch das UV-Spektrum charakterisiert worden.

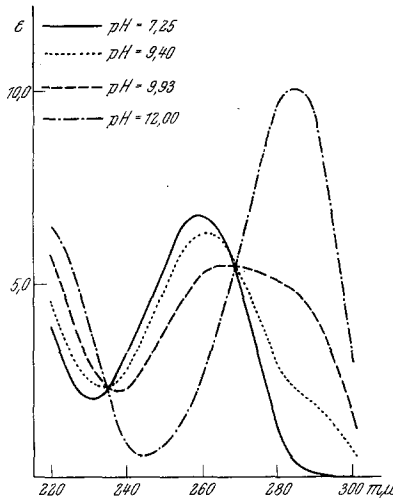


Abb. 1 a

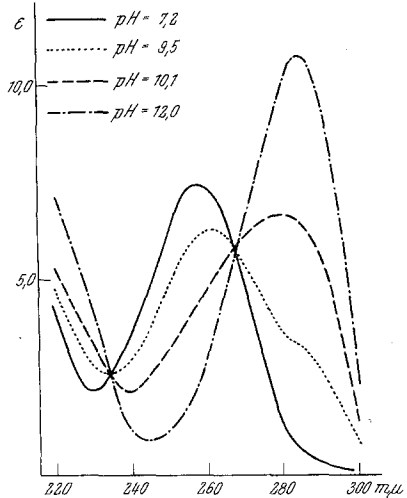


Abb. 1 b

Abb. 1 a. Absorptionsspektrum von 3-(2'-Hydroxy ethyl)-uracil bei pH 7,25, 9,4, 9,93 und 12,0

Abb. 1 b. Absorptionsspektrum von 3-Methyluracil bei pH 7,2, 9,5, 10,1 und 12,0°

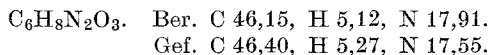
Experimenteller Teil

3-(2'-Hydroxy ethyl)-uracil (III)

Eine *Chromatographie*-Säule ($d = 4$ cm, 55 cm lang) wurde mit Dowex-1 (Acetatform) gefüllt und mit Ammonacetat—Ammoniak-Puffer pH 10,2 (0,01 *m* an Acetat) bis zur Einstellung des pH-Gleichgewichts gewaschen. Das aus einem Ansatz von 30,8 g Uracil nach *Prystas* und *Gut*⁸ erhaltene Rohprodukt wurde zur Entfernung des nicht umgesetzten Uracils mit 100 ml wasser-gesätt. *n*-Butanol schwach erwärmt, das ungelöste Uracil abfiltriert und das Filtrat wieder zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 400 ml 0,01 *m*-Ammonacetat gelöst, die Lösung durch Zugabe von Ammoniak auf einen pH-Wert von 10,2 gebracht und auf die Säule aufgetragen. Beim Entwickeln der Säule mit 0,01 *m*-Ammonacetat—Ammoniak-Puffer pH 10,2 trat zunächst I in reiner Form aus. Dann wurde mit Ammonacetat—Ammoniak-Puffer pH 8,2 (0,05 *m* an Acetat) eluiert, das Eluat in Fraktionen von je 15 ml aufzufangen und papierchromatographisch auf Reinheit geprüft. Die ersten 5 Liter enthielten reines II; nach einigen Mischfraktionen trat in ca. 350 ml Eluat III auf.

Zur Entfernung der Ammoniumionen ließen wir die Eluate durch eine Säule ($d = 2,5$ cm, 40 cm lang), die mit Dowex-50 (H^+ -Form) gefüllt war, laufen; die Lösungen wurden sodann zur Trockene eingedampft und die

Rückstände durch Umkristallisieren aus Äthylalkohol gereinigt. Auf diese Weise wurden 11,8 g 1-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (II), Schmp. 135—137° (Lit.¹: 136—137°; Ausb.: 28% d. Th.), und 0,46 g 3-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (III), Schmp. 171,5—173° (Ausb.: 1,1% d. Th.), erhalten.



Folgende Puffer kamen bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Spektren zur Anwendung:

pH 7,25, *m*/15 Kaliumdihydrogenphosphat—Dinatriumphosphat;
pH 9,40 und 9,93, *m*/10 Glycin—NaOH-Puffer;
pH 12,0, *m*/100 NaOH.

Die *Papierchromatographie* wurde auf Schleicher & Schüll 2043 a absteigend durchgeführt. In dem von uns verwendeten Lösungsmittelsystem (170 ml Isopropylalkohol mit 3*n*-HCl ad 250 ml) wurden folgende *R_f*-Werte erhalten:

Uracil	0,71
1,3-Di-(2'-hydroxyäthyl)-uracil (I)	0,98
1-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (II)	0,80
3-(2'-Hydroxyäthyl)-uracil (III)	0,89