

CHROM. 3707

TRENNUNG VON BASEN, NUCLEOSIDEN UND NUCLEOTIDEN AUF KATIONENAUSTAUSCHERN*, **

E. W. BUSCH

Chemisches Staatsinstitut der Universität Hamburg, Abteilung für Biochemie, 2 Hamburg 13 (Deutschland)

(Eingegangen am 13. Juni 1968; geänderte Fassung am 16. Juli 1968)

SUMMARY

The separation of bases, nucleosides and nucleotides on cation exchangers

The separation and determination of bases and nucleosides on cation exchangers using ammonium formate buffers were studied systematically and the results have been summarised in diagrams. Further possibilities of separation with water and diluted HCl are described. All methods were used in routine work. The separation of nucleotides (only pure substances) on cation exchangers is also described.

COHN hat 1949 die wesentlichen Bedingungen für die Trennungen der einzelnen Nucleinsäurederivate auf Kationen- und Anionenaustauschern beschrieben^{1,2}. In zahlreichen späteren Arbeiten wurden die Angaben von COHN modifiziert und erweitert. Ausführliche Übersichten finden sich bei SAUKKONEN³ und COHN⁴⁻⁶.

Die Bestimmung der Basen und Nucleoside auf Kationenaustauschern erfolgte bisher fast immer nach den Angaben von COHN mit 0.25 bis 2 N HCl. Benutzt man jedoch Puffer in pH-Bereichen von 2-4, lassen sich zahlreiche Basen und Nucleoside

* Auszugsweise vorgetragen auf der Nordwestdeutschen Chemiedozententagung in Clausthal-Zellerfeld 1965¹³ und teilweise in der Habilitationsschrift, Hamburg, 1966, veröffentlicht⁹.

** Abkürzungen:

Ad	= Adenin	IMP	= Inosinmonophosphat
Ado	= Adenosin	Ino	= Inosin
AMP	= Adenosinmonophosphat	1MeAd	= 1-Methyl-adenin
2'-, 3'- und 5'-AMP	= 2'-, 3'- und 5'-Adenosinmonophosphat	6MeAd	= 6-Methyl-adenin
dAMP	= Deoxyadenosinmonophosphat	6diMeAd	= 6-Dimethyl-adenin
CMP	= Cytidinmonophosphat	5MeCy	= 5-Methyl-cytosin
dCMP	= Deoxycytidinmonophosphat	NAD ⁺	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Cy	= Cytosin	NADP ⁺	= Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
Cyd	= Cytidin	Nid	= Nicotinsäureamid
dCyd	= Deoxycytidin	Th	= Thymin
GMP	= Guanosenmonophosphat	Thd	= Thymidin
dGMP	= Deoxyguanosenmonophosphat	dThd	= Deoxythymidin
Gu	= Guanin	ThMP	= Thymidinmonophosphat
Guo	= Guanosen	UMP	= Uridinmonophosphat
Ha	= Harnsäure	Urd	= Uridin
Hy	= Hypoxanthin	Xa	= Xanthin

aufgrund der verschiedenen pK-Werte der Aminogruppen trennen, die auch für die elektrophoretische Trennung verantwortlich sind. CRAMPTON *et al.*⁷ haben eine Trennung von Basen mit einem Citratpuffer beschrieben. Wir haben die Retentionswerte von Purin- und Pyrimidinderivaten in den oben genannten pH-Bereichen und bei verschiedenen Salzkonzentrationen zusammengestellt. So kann man für eine gewünschte Trennung einen günstigen pH-Wert und die richtige Salzkonzentration des Puffers herausfinden.

Daneben lassen sich Basen und Nucleoside ohne Aminogruppen sowie Nucleotide durch Adsorption an die Matrix des Austauschers trennen. Austausch- und Adsorptionseffekte überlagern sich in einem Ausmass, dass man für Purinverbindungen nur mit Einschränkungen von Ionenaustauschchromatographie sprechen kann. Die Trennungen wurden für Untersuchungen des Abbaues der freien Nucleotide in Geweben⁸⁻¹¹ und für Arbeiten über den Erythrocytenstoffwechsel eingesetzt¹².

METHODE

Wir verwendeten die Austauscher Dowex* bzw. AG** 50W X4, 200-400 mesh oder—400 mesh. Die teuren sphärischen Harze mit einheitlicher Korngrösse wurden wegen des hohen Preises nicht benutzt, obwohl sie wesentlich bessere Trennungen versprechen. Schon die intensiver nachbehandelten AG-Harze vergrössern die Trennleistung. Die Säule hatte einen Durchmesser von 0.9 cm und das Harz wurde 15-20 cm hoch gepackt. Bei den Versuchen unter optimalen Bedingungen eine grösstmögliche Anzahl von Substanzen zu trennen, arbeiteten wir mit 50 cm langen Säulen. Mit einem Fraktionssammler*** und einem 10 ml Syphon wurden die einzelnen Fraktionen quantitativ aufgefangen und mit einem Durchflussphotometer*** sowie einem Zweifarbenschreiber*** markiert. Sie konnten dann zusammengesammelt und im Spektralphotometer gemessen werden. Eichwerte publizierten wir schon früher¹⁴ und die molaren Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur entnommen^{15,16}. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 36 cm/h, der Durchfluss erfolgte durch Überdruck (0.2-0.5 atü Stickstoff) oder mit Hilfe einer Schlauchpumpe[§]. Wir verwendeten Ammoniumformiatpuffer, die gegenüber den Citratpuffern den Vorzug der geringeren U.V.-Absorption und der grösseren Flüchtigkeit besitzen, falls Eluate zur Rechromatographie einmal eingengt werden müssen. Für den pH-Bereich von 2.5-4 wurde eine 0.14 N HCOOH mit NH₃-Lösung (25 %, $D = 0.91$) auf den entsprechenden pH-Wert elektrometrisch eingestellt. Der pH-Wert von 2 wurde durch vermehrte Zugabe von HCOOH erreicht. Der Natriumformiatpuffer im zweiten Abschnitt wurde hergestellt, indem wir eine 0.05 N NaOH Lösung mit konzentrierter Ameisensäure auf die entsprechenden pH-Werte titrierten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zuerst sollen die Trennungen mit Reinsubstanzen beschrieben und daran anschliessend soll über einige Anwendungen mit biologischem Material berichtet werden.

* The Dow Chemical Company, Midland.

** Bio-Rad Laboratories, Richmond.

*** LKB-Produkte AB, Stockholm.

§ C. Desaga GmbH, Heidelberg.

Trennung von Basen und Nucleosiden mit Ammoniumformiatpuffern (pH 2-4) und 0.35 M NaCl

Im ersten Diagramm sind die Ergebnisse der Trennungen in Abhängigkeit vom pH-Wert zusammengestellt. Das Retentionsvolumen von Adenin wurde = 1 gesetzt und alle anderen Retentionswerte darauf bezogen. Adenin ist sicher keine ideale Bezugssubstanz, da es zwischen pH 3 und 4 nur teilweise ionisiert vorliegt und dadurch selbst ein pH-abhängiges Retentionsvolumen aufweist; z.B. wird Adenin bei pH 4 nach etwa 300 ml und bei pH 2 nach 600 ml eluiert. Eine ideale Bezugssubstanz dürfte nicht durch pH-Veränderungen beeinflusst werden.

Die grössten Unterschiede der Retentionswerte liegen zwischen den pH-Werten 3 und 4. Hier lassen sich aus dem Diagramm die günstigsten Puffer für die Trennung verschiedener Kombinationen von Verbindungen herausfinden (Fig. 1 und 3). So kann zwischen den pH-Werten 3.5 und 3.7 die grösste Anzahl von Verbindungen getrennt werden. Aber auch in diesem Bereich fallen die Retentionswerte verschiedener Substanzen zusammen, z.B. Guanin und Cytidin, sowie 7-Methyladenin und 1-Methyladenin. Das erste Paar lässt sich bei einem pH-Wert von 3.0 trennen und das letztere bei 4.0. Im unteren pH-Bereich sind die Aminogruppen vieler Verbindungen mit Ausnahme des Guanosins vollständig ionisiert. Da keine Ladungsänderung eintreten kann, verlaufen die Retentionskurven fast parallel. Die Retentionswerte für Guanin, Adenosin, Cytosin, 5-Methyl-cytosin, 7-Methyladenin und 1-Methyladenin liegen eng beieinander. Wenn für die Trennung der Basen und Nucleoside lediglich die Ladung verantwortlich wäre, müssten auch Cytidin, Adenin, 6-Methyladenin und 6-Dimethyladenin praktisch die gleichen Retentionswerte (pH 2) besitzen wie die vorher genannten Verbindungen.

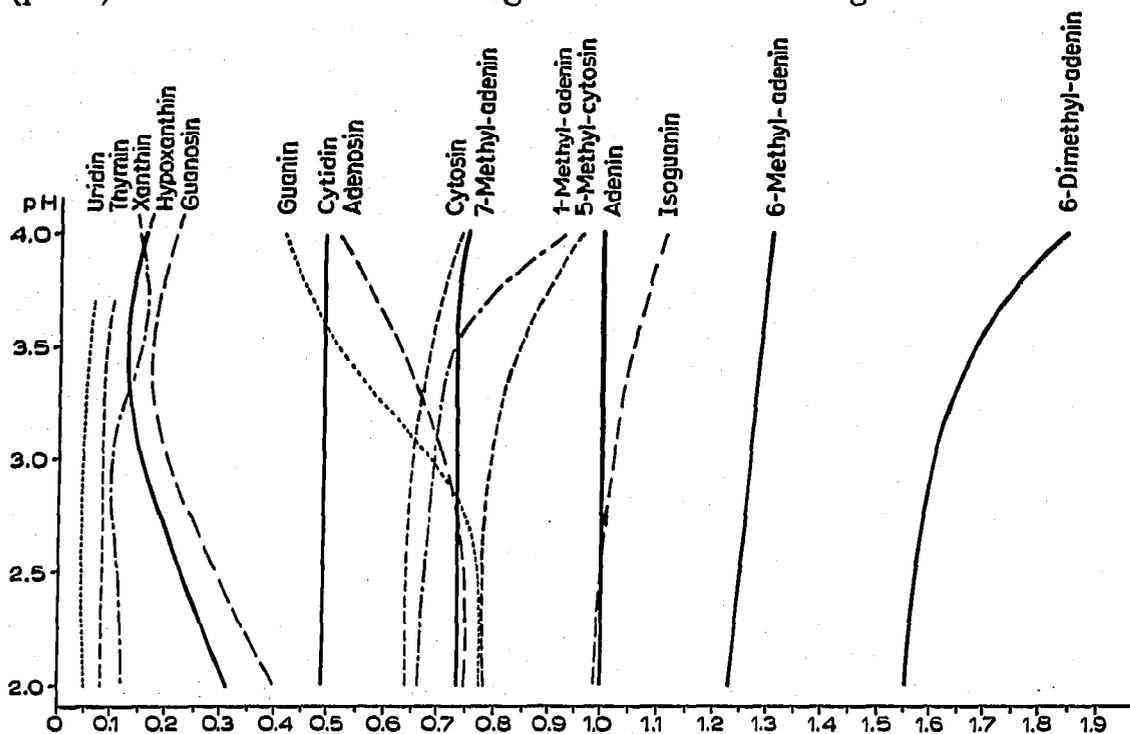


Fig. 1. Relative Retentionswerte verschiedener Basen und Nucleoside in Abhängigkeit vom pH-Wert. Das Retentionsvolumen von Adenin wurde als Bezugssubstanz = 1 gesetzt. (Dowex 50W X4, 200-400 mesh, Na⁺, Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 1 cm, Ammoniumformiatpuffer mit 0.35 M NaCl.)

Aus dem Diagramm (Fig. 1) mit den relativen Retentionswerten allein lassen sich die Trennmöglichkeiten nicht ablesen. Die einzelnen Verbindungen haben ein bestimmtes Elutionsvolumen, das vom Retentionswert abhängt. Alle Substanzen, die früh eluiert werden, besitzen ein kleines Elutionsvolumen von 15–30 ml, Verbindungen, die nahe beim Adenin eluiert werden eines von 90–180 ml und die letzten Substanzen eines von 200–300 ml. Deshalb wurden im zweiten Diagramm die einzelnen Elutionsvolumina bei verschiedenen pH-Werten aufgezeichnet, wie sie sich auf einer 50 cm langen Säule ergeben (Fig. 2). Die Elutionsvolumina entsprechen auch den von kürzeren Säulen. Es wurde gewöhnliches Harz, Dowex 50W X4, 200–400 mesh verwendet. Bei Benutzung von sphärischen Harzen mit ziemlich einheitlicher Partikelgröße, lassen sich die Trennergebnisse wesentlich verbessern. Es kam uns aber darauf an mit der üblichen und gebräuchlichen Ausrüstung die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen, um in Routinebetrieb gute, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Höher vernetzte Harze bedingen erheblich grössere Elutionsvolumina und verschlechtern deshalb die Trennleistung.

Die Trennungen wurden alle bei Raumtemperatur (21–23°) ausgeführt. Chromatographiert man bei 37.5°, verändern sich viele Retentionswerte (Tabelle I), denn

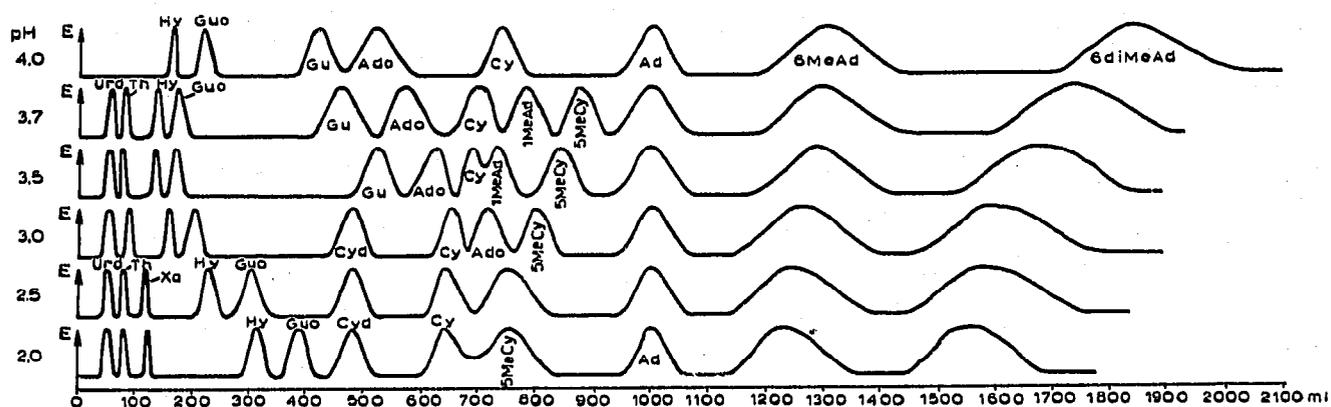


Fig. 2. Elutionsvolumen verschiedener Verbindungen im pH-Bereich 2–4. Die Trennungen wurden auf einer 50 cm langen Säule ausgeführt. Auch mit kurzen Säulen findet man die gleichen Elutionsvolumina. (Dowex 50W X4, Na⁺, 200–400 mesh, Ammoniumformiatpuffer mit 0.35 M NaCl.)

TABELLE I

DIE RELATIVEN RETENTIONSWERTE BEZOGEN AUF ADENIN BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN (pH 3.5)

Substanz	21–23°	37.5°	Differenz in %
Hypoxanthin	0.12	0.18	+50
Guanosin	0.17	0.20	+18
Cytidin	0.48	0.49	+2
Guanin	0.52	0.49	–6
Adenosin	0.64	0.56	–12
Cytosin	0.69	0.77	+11
1-Methyl-adenin	0.72	0.83	+15
5-Methyl-cytosin	0.82	0.93	+13
Adenin	1.00	1.00	± 0
6-Methyl-adenin	1.29	1.35	+5
6-Dimethyl-adenin	1.68	1.71	+1.5

höhere Temperaturen begünstigen die Desorption. So erhöht sich der Retentionswert des Cytosins von 0.69 auf 0.77 und der des Methylcytosins von 0.82 auf 0.93 (Tabelle I). Aber auch einige Purine werden später eluiert, so dass man keine durchgehende Regel aufstellen kann. Gleichzeitig werden die einzelnen Banden schärfer, das heisst, sie besitzen ein kleineres Elutionsvolumen, und damit verbessert sich die Trennleistung.

Hypoxanthin und Guanin werden bei tiefen pH-Werten deutlich später eluiert als bei hohen pH-Werten. Man kann diesen Effekt für eine Abtrennung von Hypoxanthin und Guanin ausnutzen. Im nächsten Abschnitt werden jedoch für diese Verbindungen bessere Trennmöglichkeiten beschrieben.

Trennung von Basen und Nucleosiden mit Natriumformiatpuffer (pH 2–3) und 0.05 M Na⁺

Substanzen mit dem Elutionswert von 0.3 lassen sich zwar als Reinsubstanzen gut trennen, jedoch nicht aus biologischem Material. Hier kommen in den ersten 100 ml zahlreiche organische Substanzen mit U.V.-Absorption oder nach Aufgabe von sauer hydrolysierten Extrakten Bräunungsprodukte, die eine quantitative Bestimmung zu Beginn der Elution unmöglich machen. Wir haben deshalb Harnsäure, Inosin, Hypoxanthin und Guanin mit Natriumformiatpuffer (0.05 M Na⁺) eluiert. Mit diesem Elutionsmittel kommen die Substanzen wesentlich später. Hypoxanthin und Guanin werden bei pH 2.5 und 2.0 (Fig. 3) schon so spät eluiert, dass sich die chromatographische Trennung unnötig verzögert. Man kann natürlich auch beide Elutionsmittel kombinieren, und nach der Trennung von Inosin, Hypoxanthin und Guanin mit der Salzkonzentration von 0.35 Mol und dem entsprechenden pH-Wert die übrigen Substanzen eluieren.

Harnsäure oder Xanthin und Inosin als Reinsubstanzen lassen sich zwar abtrennen, aber in biologischem Material oft nicht quantitativ messen. Wir haben deshalb ein Verfahren ausgearbeitet, das einen grossen Teil der Abbauprodukte des Purinstoffwechsels auf einer Säule trennt.

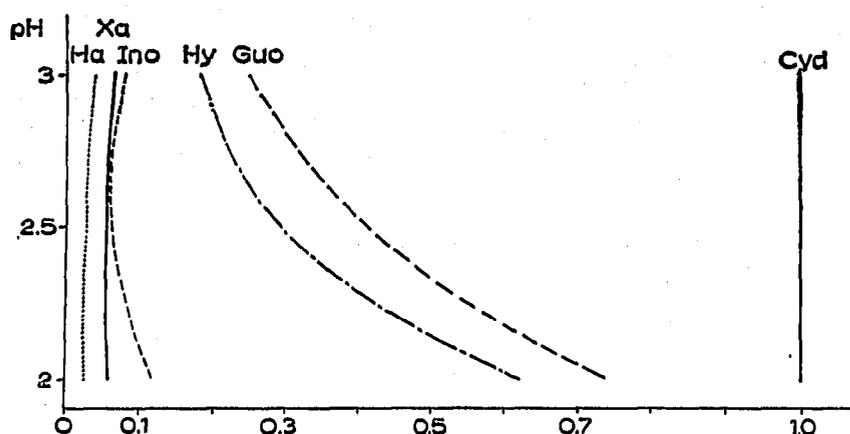


Fig. 3. Relative Retentionswerte einiger Basen und Nucleoside im pH-Bereich von 2–3. Cytidin diente als Bezugssubstanz. Der Natriumformiatpuffer besitzt eine Ionenkonzentration von 0.05 M Na⁺. (Dowex 50W X₄, Na⁺, 200–400 mesh, Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 1 cm.)

Trennung mit H₂O und HCl als Elutionsmittel

Auf Kationenaustauschern (Dowex 50W X₄, 200–400 mesh) in der H⁺-Form eluierten wir NAD⁺ und 5'-AMP mit H₂O, Xanthin und Inosin mit 0.005 N HCl und

anschliessend mit 0.5 *N* HCl Hypoxanthin, Nicotinsäureamid und Adenosin. Danach kann man mit 2 *N* HCl⁶ auch Adenin und Guanin trennen. Die Fig. 4 zeigt die Trennung eines Gewebsextraktes. Für die Bestimmung der Abbauprodukte von Purin nucleotiden in Herzgewebe hat sich die Methode bewährt, jedoch ist das mehrmalige Wechseln des Elutionsmittels und auch die lange Elutionsdauer umständlich.

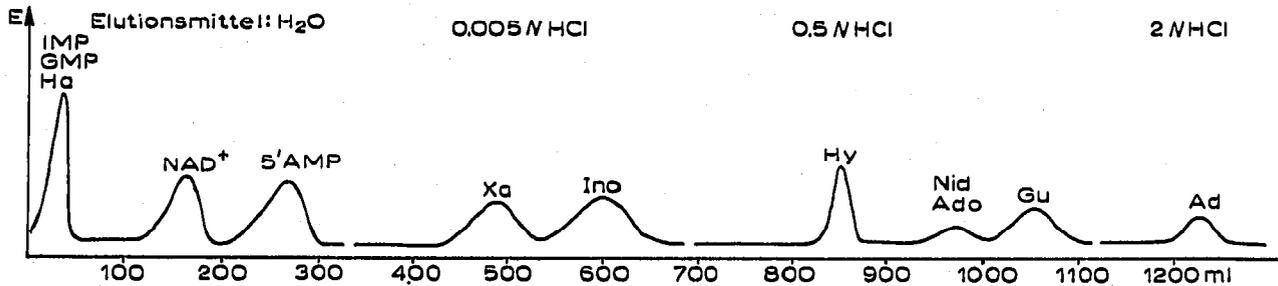


Fig. 4. Trennung von Nucleosiden, Nucleotiden und Basen auf Kationenaustauschern. Elution mit Wasser und steigenden Konzentrationen von HCl-Lösungen. (Dowex 50W X₄, H⁺, 200–400 mesh, Säulenlänge 25 cm, Durchmesser 1 cm.)

Trennung von Nucleotiden auf Kationenaustauschern

Auf Dowex 50W X₄, in der H⁺-Form lassen sich Mononucleotide von den entsprechenden Deoxynucleotiden trennen (Fig. 5), mit Ausnahme von Thymidinmonophosphat und Uridylsäure. Als Elutionsmittel dient 0.001 *N* HCl. Die Nucleotide besitzen in diesem Bereich als Zwitterionen, abgesehen von ThMP und UMP, verschieden stark ionisierte Aminogruppen und unterscheiden sich daneben in ihrer Adsorption an die Matrix des Austauschers⁵. Beide Effekte machen die Trennung aus. Etwa 10–20 % der Purindeoxynucleotide werden auf der Säule N-glykosidisch gespalten^{4,17}. Die 2',3'-Isomere konnten mit der gleichen Anordnung nur teilweise getrennt werden, da 2',3'-CMP mit AMP zusammenfiel. Es liess sich lediglich UMP, 2',3'-GMP und 2',3'-AMP gut trennen (Fig. 6). KATZ UND COMB¹⁸, sowie BLATTNER UND ERIKSON¹⁹, die eine ähnliche Trennung für 2',3'-Ribonucleotide beschrieben, konnten AMP und CMP auf Säulen mit normaler Länge auch nicht separieren.

Erfolgreicher waren die Versuche, die verschiedenen Adeninnucleotide zu

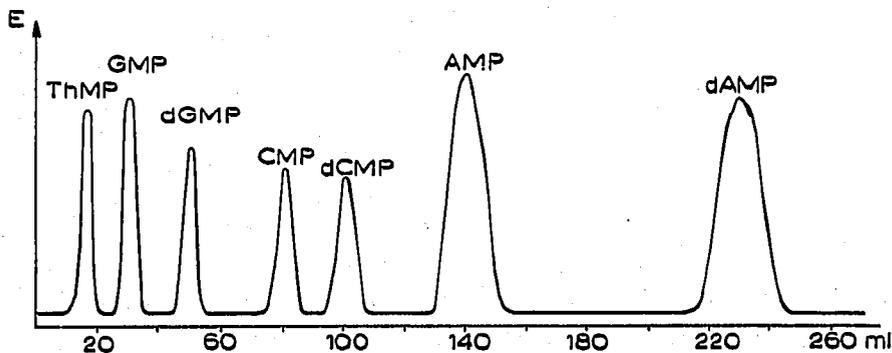


Fig. 5. Trennung von Nucleotiden und Deoxynucleotiden auf Kationenaustauschern. (Dowex 50W X₄, Na⁺, –400 mesh, Säulenlänge 55 cm, Durchmesser 1 cm, Elutionsmittel 0.001 *N* HCl + 0.01 *M* NaCl.)

trennen. Zu diesem Zweck benutzten wir wiederum Kationenaustauscher in der H^+ -Form. Auf einer 20 cm langen Säule lassen sich $NADP^+$, zyklisches AMP, 2',3'- und 5'-AMP trennen (Fig. 7). Als Elutionsmittel diente 0.1 N HCl. NAD^+ fällt jedoch mit dem 3'-AMP zusammen (Fig. 7). Die Nucleotide wurden fast alle als Reinsubstanzen getrennt, grössere Erfahrungen mit Bestimmungen aus biologischem Material liegen nicht vor im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Verfahren.

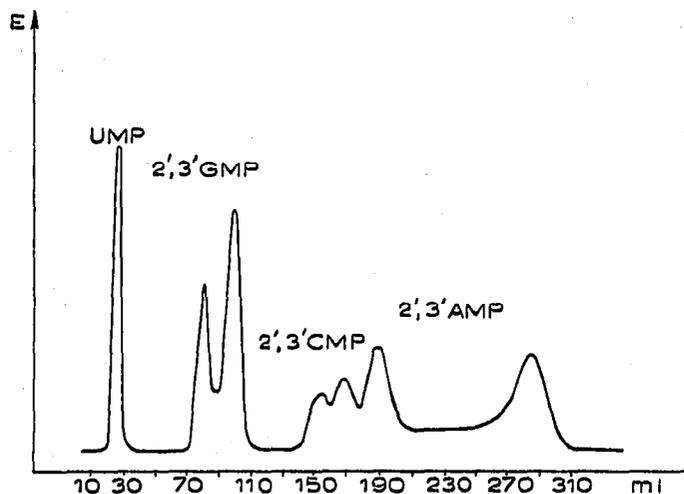


Fig. 6. Trennung von 2',3'-Nucleotiden auf einem Kationenaustauscher. (Dowex 50W X₄, H^+ , -400 mesh, Säulenlänge 15 cm, Durchmesser 1 cm, Elutionsmittel 0.01 N HCl.)

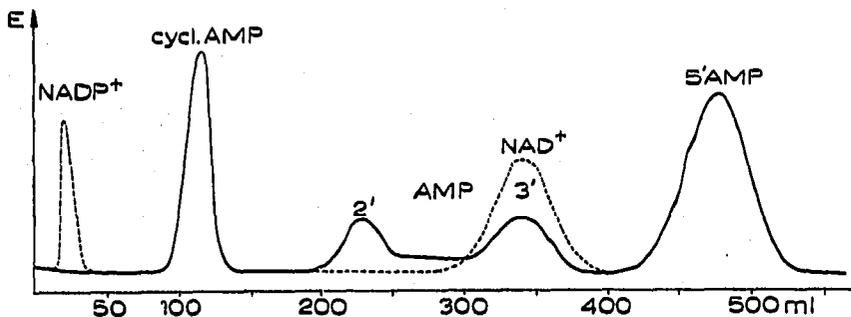


Fig. 7. Trennung von Adenosinnucleotiden auf Kationenaustauschern. (Dowex 50W X₄, H^+ , 200-400 mesh, Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 1 cm, Elutionsmittel 0.01 N HCl.) Die Retentionsvolumina der Substanzen mit den punktierten Linien wurden in separaten Versuchen ermittelt.

Anwendung

Diese Methoden wurden für Arbeiten mit biologischem Material entwickelt und alle mit Ausnahme der Trennung der Nucleotide im Routinebetrieb eingesetzt. Wir möchten daher einige von uns routinemässig angewandte Trennungen beschreiben, z.B. die Bestimmung der vier DNS-Basen aus Nieren- und Hodengewebe. Der Rückstand nach alkalischer Hydrolyse wird 1 Std. mit 10 N $HClO_4$ hydrolysiert. Das stark schwarz gefärbte Hydrolysat kommt nach Abstumpfung und Verdünnung direkt auf die Säule. Die einzelnen Komponenten liessen sich ohne Schwierigkeiten trennen und

quantitativ bestimmen, wie aus der Fig. 8 deutlich wird. Auch die Purinbasen und Pyrimidindeoxynucleoside nach enzymatischer DNS-Spaltung lassen sich gut trennen⁹.

Wesentlich schwieriger war die Aufgabe, den Abbau der Purinnucleotide im Gewebe zu verfolgen. Die Konzentrationen der gesuchten Substanzen sind sehr klein und mit zahlreichen U.V.-absorbierenden Substanzen vermischt¹¹.

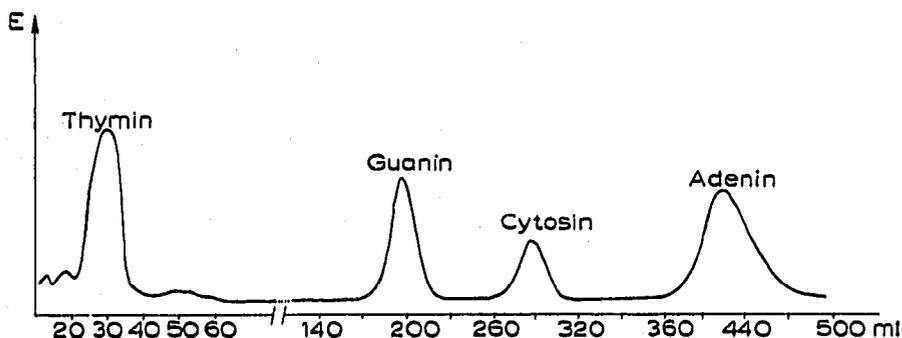


Fig. 8. Säurehydrolysat des Rückstandes von Nierengewebe nach einer Aufarbeitung von Schmidt-Thannhäuser (Bestimmung der Basen aus DNS). (Dowex 50W X4, Na⁺, -400 mesh, Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 1 cm, Ammoniumformiatpuffer pH 3.5 + 0.35 M NaCl.)

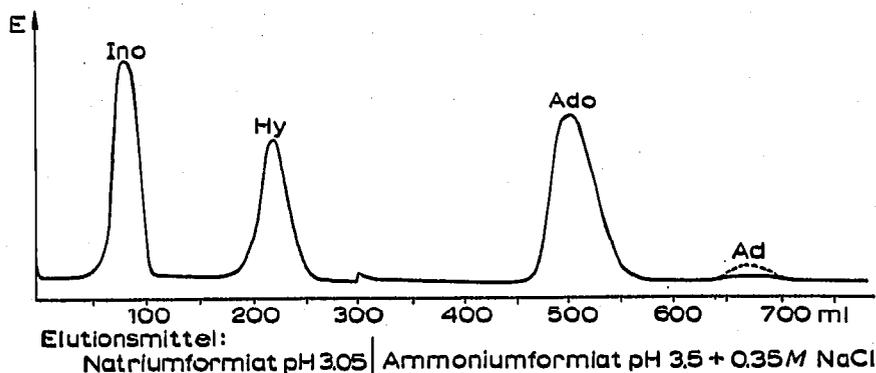


Fig. 9. Inkubation von gewaschenen Erythrocyten mit Adenosin. Inosin und Hypoxanthin wurden mit einem Natriumformiatpuffer pH 3.0 (0.05 M Na⁺), Adenosin und Adenin mit einem Ammoniumformiatpuffer von pH 3.5 + 0.35 M NaCl getrennt. (Dowex 50 W X4, Na⁺, -400 mesh, Säulenlänge 20 cm, Durchmesser 1 cm.)

Die Fig. 9 zeigt die Trennung eines Extraktes aus Inkubationsversuchen mit Erythrocyten und Adenosin. Zuerst werden Inosin und Hypoxanthin und nach Pufferwechsel Adenosin und Adenin getrennt. Die verschiedenen beschriebenen Möglichkeiten sind weitgehend aus dem Zwang entstanden, für verschiedene Gewebe gute und quantitativ auswertbare Trennungen zu bekommen. Es können grosse Extraktmengen aufgetragen werden, bis zu 30 ml, entsprechend 3-5 g Gewebe. Geringe Konzentrationen kann man daher genau und zuverlässig bestimmen ohne die Extrakte vorher einzuengen.

In den oben erwähnten Inkubationsversuchen mit Erythrocyten und Adenosin fanden wir neben den erwarteten Spaltprodukten Inosin und Hypoxanthin auch

geringe Mengen an Adenin. Die Frage, ob dieses Adenin nicht als Beimengung im Adenosin bereits vorhanden war, veranlasste uns, verschiedene käufliche Basen und Nucleoside auf ihre Reinheit zu untersuchen. Wir konnten auf die Säule bis zu 30 mg auftragen und dadurch noch Beimengungen von 0.1 % gut bestimmen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt. Die Präparate haben nur geringe Beimengungen von 0.2–0.9 %, mit Ausnahme einer Inosinprobe (Tabelle II).

TABELLE II

Präparat	Chromatographisch bestimmte Basen (Angaben in Mol-%)
Inosin ^a	2.3% Hypoxanthin
Inosin ^b	0.2% Hypoxanthin
Guanosin ^b	0.9% Guanin
Adenosin ^a	0.25% Adenin

^a C. F. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim.

^b Sigma Chemical Company, St. Louis.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Trennungen und Bestimmungen von Basen und Nucleosiden auf Kationenaustauschern mit Ammoniumformiatpuffern systematisch untersucht und die Ergebnisse in Diagrammen zusammengefasst. Weitere Trennmöglichkeiten mit H₂O und verdünnter HCl wurden beschrieben. Alle Verfahren benutzten wir im Routinebetrieb. Über Trennungen von Nucleotiden (nur Reinsubstanzen) auf Kationenaustauschern wird ebenfalls berichtet.

LITERATUR

- 1 W. E. COHN, *Science*, 109 (1949) 377.
- 2 W. E. COHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471.
- 3 J. SAUKKONEN, in M. LEDERER (Editor), *Chromatographic Reviews*, Vol. 6, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 53.
- 4 W. E. COHN, in C. CALMON AND T. R. E. KRESSMAN (Editor), *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*, Interscience, New York, 1957, S. 345.
- 5 W. E. COHN, *The Nucleic Acids*, Vol. I, Academic Press, New York, 1955, S. 211.
- 6 W. E. COHN, *Chromatography*, Reinhold, New York, 1961, S. 501.
- 7 C. F. CRAMPTON, F. R. FRANKER, A. M. BENSON UND A. WADE, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 249.
- 8 I. M. V. BORCKE UND E. W. BUSCH, *Arch. Ges. Physiol.*, 291 (1966) 23.
- 9 E. W. BUSCH, *Habilitationsschrift*, Hamburg, 1966.
- 10 E. W. BUSCH, B. MARTÍNEZ, G. GERCKEN, *Arch. Ges. Physiol.*, 297 (1966) 1290.
- 11 E. W. BUSCH, I. M. V. BORCKE UND B. MARTÍNEZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 166 (1968) 547.
- 12 G. GERCKEN UND E. W. BUSCH, in Vorbereitung.
- 13 E. W. BUSCH UND N. TAKRITI, *Angew. Chem.*, 77 (1965) 1080.
- 14 E. W. BUSCH UND I. M. V. BORCKE, *Nature*, 210 (1966) 631.
- 15 CALIFORNIA CORPORATION CHEMICAL RESEARCH, *Properties of the Nucleic Acid Derivatives*, 1961.
- 16 G. A. HOWARD, in E. H. RODD (Editor), *Chemistry of Carbon Compounds*, Vol. IV, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton, 1960, S. 1635.
- 17 H. VENNER, *Z. Physiol. Chem.*, 339 (1964) 14.
- 18 S. KATZ UND D. G. COMB, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3065.
- 19 F. R. BLATNER UND H. P. ERIKSON, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 220.