

CHROM. 6025

## BEZIEHUNG ZWISCHEN STRUKTUR UND GELCHROMATOGRAPHISCHEM VERHALTEN VON PYRIMIDINVERBINDUNGEN

C. WASTERNAK

*Sektion Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Biochemie, Biologische Abteilung, X 40 Halle/Saale, Neuwerk 1 (D.D.R.)*

(Eingegangen am 9. Februar 1972)

### SUMMARY

*Relation between structure and gel chromatographic behaviour of pyrimidine compounds*

Sephadex G-10 adsorption chromatography was employed for the separation of pyrimidines. The  $V_e^0$ -values of about 140 different pyrimidine compounds have been estimated in a highly reproducible manner.

Examples were given for the use of MARTIN's relation in column chromatography of pyrimidines on Sephadex G-10. A relation was demonstrated between a log function of  $V_e^0$ -values and the pattern of substitution of the pyrimidine nucleus. The contribution of a substituent to the chromatographic behaviour was dependent on the ring position. Methylation raised the  $V_e^0$ -values in the order  $1\text{-CH}_3 < 3\text{-CH}_3 < 6\text{-CH}_3 < 5\text{-CH}_3$ . Adsorption on the gel was especially lowered by N-methylation. The chromatographic contributions of ribosyl and deoxyribosyl groups were different and suggest gel-solid interaction for these compounds, too.

The additivity of the  $\Delta \log V_e^0$ -values exists for a part of compounds and can be used to predict elution volumes.

### EINLEITUNG

In der thermodynamischen Beziehung

$$\Delta G^0 = - RT \ln K. \quad (1)$$

ist ein linearer Zusammenhang zwischen der freien Energie  $\Delta G^0$  und einer Gleichgewichtskonstanten zweier Zustände gegeben. Durch Einbeziehung des  $R_F$ -Wertes als substanzspezifische Grösse einer chromatographischen Anordnung in diese Gleichung schuf MARTIN<sup>1</sup> eine thermodynamische Formulierung der Chromatographie:

$$\Delta G^0 = RT \ln \left( \frac{1}{R_F} - 1 \right) \cdot \rho \quad (2)$$

bzw.

$$\frac{\Delta G^0}{2.3 RT} = \log \left( \frac{1}{R_F} - 1 \right) + \log \rho \quad (3)$$

$R_M$  eingeführt. Der  $R_M$ -Wert setzt sich nach MARTIN<sup>1</sup> additiv aus dem  $R_M$ -Beitrag einer Grundkonstanten ( $R_M^0$ ) und den  $R_M$ -Beiträgen einzelner Teile eines Moleküls ( $\Delta R_M$ ) zusammen:

$$R_M = R_M^0 + m\Delta R_{M1} + n\Delta R_{M2} + \dots \quad (4)$$

Der Betrag der Grundkonstanten  $R_M^0$  enthält hierbei die meist nicht zu bestimmende Systemkonstante.

Der Vorteil der MARTIN'schen Beziehung liegt in der Möglichkeit, aus relativ einfachen, mit geringstem Substanzverbrauch tätigen chromatographischen Verfahren Hinweise auf die Struktur der Verbindungen zu erhalten. Die Gleichung 4 stellt eine Näherung dar, von der u.a. durch sterische Beeinflussung benachbarter Gruppen, intramolekulare Wasserstoffbrücken, verschiedene Dissoziations- oder Tautomeriegleichgewichte sowie Substanz-Träger-Wechselwirkungen Abweichungen auftreten<sup>1,3</sup>. Hier wird die  $R_M$ -Wertbeziehung als indirekte Methode für die Erfassung derartiger struktureller Grössen nützlich. Ihre erfolgreiche Anwendung ist an eine hohe Reproduzierbarkeit des  $R_F$ -Wertes und des chromatographischen Systems ( $\log 1/\rho$ ), nicht aber an klassische Verteilungsverfahren gebunden<sup>4</sup>.

Bei unseren Untersuchungen zur säulenchromatographischen Trennung von Pyrimidinen und Purinen an Sephadex G-10 erwies sich der Trennprozess als strukturabhängiger Adsorptionsvorgang<sup>5,6</sup>. Das Trennverfahren liefert substanzspezifische reproduzierbare Elutionskonstanten ( $V_e^0$ , relativer Fehler 2 %), die bei hohem Trennvermögen der Säule infolge "reversibler Adsorption" der Verbindungen an der starkvernetzten Gelmatrix über einen grösseren Wertebereich verteilt sind, als das für Gelfiltrationsvorgänge entsprechend der Molekülgrösse der Fall ist.

Als substanzspezifische Grösse wurde die Elutionskonstante  $V_e^0$  als Quotient aus der Differenz von Elutionsvolumen der Verbindung  $V_e$  minus Ausschlussvolumen  $V_0$  und dem Ausschlussvolumen  $V_0$  ermittelt. Ihre Verwendung besitzt mehrere Vorteile<sup>6,7</sup>. Da sie als

$$V_e^0 = \frac{V_e - V_0}{V_0} = \frac{1}{R_F} - 1$$

nach Logarithmierung mit dem  $R_M$ -Wert identisch ist, kann sie als  $\log V_e^0$  in die Gleichung 3 eingesetzt werden:

$$\frac{\Delta G^0}{2.3 RT} = \log V_e^0 + \log \rho$$

und die Additivität der chromatographischen Beiträge von Molekülteilen liefern.

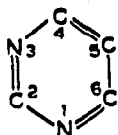
Im Rahmen unserer Untersuchungen über Pyrimidine prüften wir die Gültigkeit der MARTIN'schen Beziehung für eine gelchromatographische Anordnung sowie die Verbindungsklasse der Pyrimidine. Über die Ergebnisse hierzu soll im folgenden berichtet werden.

#### MATERIAL UND METHODEN

Bei der Ermittlung der Gelchromatographiekonstanten  $V_e^0$  der  $\alpha$ -140- $\alpha$ -

Die Messwerte sind Mittelwerte aus 3–6 Bestimmungen.

Die Bezeichnung der Verbindungen erfolgte nach BROWN<sup>8</sup> bzw. PFLEIDERER<sup>9</sup> unter Verwendung folgender Ringnummerierung:



Die Herkunft der Substanzen ist durch Abkürzungen gekennzeichnet\*. Es bedeuten:

Arco	= Arcochemie (Berlin-West)
AWD	= Arzneimittelwerk Dresden (D.D.R.)
BCh	= Berlin-Chemie (D.D.R.)
Bu	= Dr. BUDJEČINSKY (Prag, C.S.S.R.)
Cal	= Calbiochem (Los Angeles, V.S.A.)
Ch	= Chemapol (Prag, Tschechoslowakei)
Fe	= Ferak (Berlin-West)
Fl	= Fluka (Buchs, Schweiz)
La	= Dr. LAMBEIN (Ghent, Belgien)
Li	= Koch-Light Lab. Ltd. (London, Grossbritannien)
M	= Merck (Darmstadt, B.R.D.)
Pi	= C. PINNOW (Berlin-West)
Pr	= Dr. PRYŠTAS (Prag, C.S.S.R.)
Re	= Reanal (Budapest, Ungarn)
S	= Schuchardt (München, B.R.D.)
Sa	= Dr. SAMPSON (Bracknell, Grossbritannien)
Sch	= Prof. Dr. SCHELLENBERGER (Halle, D.D.R.)
Ser	= Serva (Heidelberg, B.R.D.)
Si	= Sigma (St. Louis, V.S.A.)
Sp	= Spora (Prag, C.S.S.R.).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle I sind die  $V_e^0$ -Werte und ihre Logarithmen der geprüften Verbindungen in vier Gruppen in der Reihenfolge steigender  $V_e^0$ -Werte zusammengestellt. Der Messfehler der  $V_e^0$ -Werte liegt ab  $V_e^0 = 0.30$  bei 2 %.

Der zur Trennung notwendige Abstand zweier Verbindungen, als  $\Delta V_e^0$  aus ihren  $V_e^0$ -Werten formuliert, wurde aus den Fraktogrammen und Tabelle I ermittelt.

Im Bereich von  $V_e^0 = 0.50$ – $2.0$  können zwei Verbindungen bei einer durchschnittlichen theoretischen Bodenhöhe  $H = 0.12$  und der verwendeten Säulenlänge von 235 cm mit einem  $\Delta V_e^0 = 0.20$  quantitativ getrennt werden. So lassen sich die Substanzpaare Uiacil–Cytosin, Uridin–Thymidin, Orotidin–6-Azauridin, Cytosin–Thymin usw. vollständig trennen (vgl. Fig. 2a und 2b in Lit. 5). Qualitative Auftrennungen werden zwischen  $V_e^0 = 0.50$ – $2.0$  bei einem  $\Delta V_e^0$  von 0.08–0.12 noch erreicht. Über  $V_e^0 = 2.0$  sind zu einer quantitativen bzw. qualitativen Trennung zweier Verbindungen grössere  $\Delta V_e^0$ -Werte erforderlich (0.9 und 0.6), weil die Zunahme der Bandenbreite sich störender bemerkbar macht.

TABELLE I

USAMMENSTELLUNG DER ERMITTELTEN  $V_e^0$ -WERTE UND LOG  $V_e^0$ -WERTE DER DERIVATE DES URACILS, 6-AZURACILS, PYRIMIDINS UND PURINS, JEWEILS NACH STEIGENDEM  $V_e^0$ -WERT GEORDET

Nr.	Verbindung (Trivialname und Nomenklaturname)	Herkunft	MG	$V_e^0$ -Wert	Log $V_e^0$ -Wert	
					Ermittelt	Errec
<i>Uracil-Derivate</i>						
1	UMP(5'); Uridin-5'-monophosphat	Si	324	0.11	-0.963	—
2	CMP(5'); Cytidin-5'-monophosphat	Si	323	0.13	-0.903	—
3	TMP(5'); Thymidin-5'-monophosphat	Si	322	0.30	-0.519	—
4	Orotidin; 1- $\beta$ -D-Ribofuranosidoorotsäure	Ser	288	0.35	-0.452	-0.4
5	5-Carboxyuracil	Pr	156	0.42	-0.379	-0.3
6	2-Alanyl-3-isoxazolin-5-on	La	172	0.43	-0.366	—
7	1,3,5-Trimethyl-2-thiouracil	Pr	180	0.47	-0.328	—
8	Willardiin; 1-Alanyluracil	La	199	0.48	-0.319	-0.3
9	5-Hydroxyuridin	Si	260	0.52	-0.284	—
10	5-Fluordesoxyuridin	Cal	246	0.55	-0.257	-0.2
11	5,6-Dimethyl-2-thiouracil	Pr	154	0.58	-0.237	—
12	Isowillardiin; 3-Alanyluracil	La	199	0.60	-0.222	-0.2
13	3,6-Dimethyluridin	Pr	272	0.78	-0.108	-0.1
14	Pseudouridin, 5- $\beta$ -D-Ribofuranosidouracil	Si	244	0.86	-0.066	-0.0
15	5-Hydroxymethyldesoxyuridin	Si	258	0.90	-0.046	-0.0
16	3-Benzoyl-6-methyluracil	Pr	230	0.96	-0.018	-0.0
17	4-Amino-5,6-dimethyluridin	Pr	273	0.96	-0.018	-0.0
18	6-Methyl-5-fluormethyluracil	Pr	158	0.96	-0.018	-0.0
19	Uridin; 1- $\beta$ -D-Ribofuranosidouracil	Si	244	0.98	-0.011	-0.0
20	5-Aminouridin	Pi	259	1.02	0.007	—
21	Orotsäure; 2,4-Dihydroxy-6-carboxypyrimidin	Ch	156	1.03	0.011	—
22	2-Thiouracil	S	128	1.04	0.018	-0.0
23	5-Bromdesoxyuridin	Ser	307	1.04	0.018	0.0
24	Desoxyuridin; 1- $\beta$ -2'-Desoxy-D-ribofuranosidouracil	Ser	228	1.06	0.025	0.0
25	1,3-Dimethyluracil	Si	140	1.08	0.033	-0.0
26	1,3,6-Trimethyluracil	Pr	154	1.09	0.038	0.0
27	5,6-Dimethyluridin	Pr	272	1.09	0.039	0.0
28	5-Fluoruracil	Ser	130	1.10	0.041	0.0
29	Thyminribosid; 1- $\beta$ -D-ribofuranosidothymin	Cal	258	1.11	0.041	0.0
30	5-Bromuridin	Fe	333	1.12	0.049	0.0
31	3-Methylcytidin	Cal	370	1.15	0.061	0.0
32	Cytidin; 1- $\beta$ -D-ribofuranosidocytosin	Si	243	1.20	0.078	0.0
33	Thymidin; 1- $\beta$ -2'-Desoxy-D-ribofuranosidothymin	Si	242	1.23	0.091	0.0
34	1,3-Dimethyl-5-phenylbarbitursäure	Pr	232	1.25	0.097	0.1
35	1,6-Dimethyluracil	Si	172	1.25	0.097	0.0
36	5-Methyldesoxycytidin	Cal	268	1.27	0.104	0.1
37	6-Carbmethoxypyrimidin	Pr	184	1.29	0.111	—
38	Desoxycytidin; 1- $\beta$ -2'-Desoxy-D-ribofuranosidocytosin	Cal	227	1.31	0.117	0.0
39	1-Methyl-5-nitrouracil	Pr	155	1.39	0.143	0.3
40	Barbitursäure; 2,4,6-Trihydroxypyrimidin	Si	128	1.45	0.163	—
41	5-Diazauracil	Si	138	1.50	0.176	—
42	Isobarbitursäure; 2,4,5-Trihydroxypyrimidin	Si	128	1.54	0.188	—
43	Uracil; 2,4-Dihydroxypyrimidin	Ch	112	1.55	0.190	—
44	6-Methyluracil	Si	126	1.73	0.238	0.2
45	5-Joduridin	Cal	370	1.76	0.246	0.2
46	Cytosin; 4-Amino-2-hydroxypyrimidin	Si	111	1.77	0.248	—
47	5-Methylcytosin	Fl	125	1.79	0.253	—
48	5-Joddesoxyuridin	Cal	354	1.83	0.263	0.3

TABELLE I (fortgesetzt)

Nr.	Verbindung (Trivialname und Nomenklaturname)	Herkunft	MG	V <sub>e</sub> <sup>0</sup> -Wert	Log V <sub>e</sub> <sup>0</sup> -Wert	
					Ermittelt	Errecl
50	5,6-Dimethylcytosin	Pr	139	1.85	0.268	0.325
51	4-Amino-5,6-dimethyluracil	Pr	155	1.89	0.276	0.221
52	Thymin; 2,4-dihydroxy-5-methylpyrimidin	Si	126	1.92	0.283	—
53	4-Methoxy-5,6-dimethyluracil	Pr	156	1.96	0.298	0.378
54	5-Carboxymethylcytosin	Pr	171	1.96	0.298	0.264
55	5-Chloruracil	Pr	147	2.04	0.310	—
56	5,6-Dimethyluracil	Pr	140	2.06	0.313	0.267
57	5-Aminouracil	Si	127	2.28	0.358	—
58	Dimithirimol; 2-Dimethylamino-4-methyl-5-butyl-6-hydroxypyrimidin	Sa	161	2.61	0.417	—
59	2-Phenylbarbitursäure	Pr	190	2.85	0.455	—
60	5-Bromuracil	Re	190	2.86	0.456	—
61	6-Chloruracil	Pr	147	2.86	0.456	—
62	3-Methyl-5-nitrouracil	Pr	159	3.09	0.490	0.461
63	6-Methyl-5-chlormethyluracil	Pr	175	3.20	0.505	0.478
64	5-Joddesoxycytidin	CaI	353	3.23	0.509	0.409
65	5-Nitrouracil	Li	157	3.33	0.522	—
66	5-Methyl-6-chlormethyluracil	Pr	175	3.64	0.561	0.524
67	Ethirimol; 2-Äthylamino-4-methyl-5-butyl-6-hydroxypyrimidin	Sa	161	4.38	0.641	—
68	6-Amino-2-thiouracil	Pr	141	4.48	0.651	—
69	5-Joduracil	Ch	237	4.70	0.676	—
<i>1,2a-Derivate</i>						
70	6-Azauridin; 1-β-D-ribofuranosido-6-azauracil	Sp	246	0.45	-0.345	—
71	2-Thio-6-azathymin	Pr	143	0.47	-0.328	—
72	2-Thio-6-azauracil	Pr	129	0.63	-0.201	—
73	1-Methyl-6-azauracil	Pr	127	0.68	-0.166	—
74	3-Benzoyl-6-azauracil	Pr	317	0.87	-0.082	—
75	6-Azauracil; 1,3,6-Triazin	Si	113	0.89	-0.052	—
76	6-Azathymin; 5-Methyl-1,3,6-triazin	Fl	127	0.89	-0.052	—
77	4-Methylmercapto-6-azauracil	Pr	143	0.93	-0.032	—
78	1,3-Dimethyl-6-azauracil	Pr	141	0.98	-0.010	—
79	5-Chloräthyl-6-azauracil	Pr	175	0.98	-0.010	—
80	1,3-Dibenzoyl-6-azauracil	Pr	321	1.04	0.015	—
81	5-Azauracil; 1,3,5-Triazin	Si	113	1.06	0.025	—
82	5-Azacytosin; 4-Amino-1,3,5-triazin	Pr	113	1.07	0.031	—
83	5-Phenyl-6-azauracil	Pr	189	1.28	0.010	—
84	3-Methyl-6-azauracil	Pr	127	1.39	0.143	—
85	2-Mercapto-6-azauracil	Pr	129	2.33	0.367	—
86	5-Amino-6-azauracil	Pr	128	2.63	0.419	—
87	4-Thio-6-azauracil	Pr	129	3.44	0.537	—
88	1,3-Dimethyl-2-thio-6-azauracil	Pr	157	3.80	0.580	—
89	8-Azaxanthin; 2,4-Dioxotetrahydro-v-triazolo-[d]-pyrimidin	Ch	153	4.50	0.653	—
90	8-Azaguanin, 2-Amino-4-oxodihydro-v-triazolo-[d]pyrimidin	Ch	152	4.60	0.663	—
91	3-Methyl-4-thio-6-azauracil	Pr	143	5.57	0.747	—
92	8-Azaadenin; 4-Amino-v-triazolo-[d]pyrimidin	Fl	136	7.88	0.897	—
<i>Pyrimidin-Derivate</i>						
93	2-Methyl-5-carbomethoxy-6-äthoxy-pyrimidin	Bu	196	0.45	-0.347	—
94	2-Methyl-5-carbäthoxy-6-hydroxy-					

TABELLE I (fortgesetzt)

Nr.	Verbindung (Trivialname und Nomenklaturname)	Herkunft	MG	$V_e^0$ -Wert	Log $V_e^0$ -Wert	
					Ermittelt	Errec.
95	2,6-Dihydroxy-4-carboxy-5-fluorpyrimidin	Bu	174	0.73	-0.137	—
96	1-Methyl-4-methoxypyrimidin	Pr	126	1.08	0.033	—
97	2,4-Dimethoxy-5-methyl-6-chlorpyrimidin	Pr	189	1.08	0.033	—
98	5-Hydroxypyrimidin	Bu	96	1.21	0.083	—
99	2-Mercapto-5-methoxypyrimidin	Bu	142	1.44	0.158	—
00	2-Amino-5-methoxy-6-hydroxypyrimidin	Bu	141	1.53	0.185	—
01	2,4-Dichlor-5,6-dimethylpyrimidin	Pr	177	1.91	0.281	—
02	2-Chlorpyrimidin	Fl	128	1.96	0.291	—
03	2-Methyl-4-amino-5-äthoxymethyl- pyrimidin	Sch	167	1.99	0.299	—
04	6-Methyl-4-Chlorpyrimidin	Pr	129	2.01	0.303	—
05	2-Äthyl-4-amino-5-äthoxymethylpyrimidin	Sch	181	2.17	0.337	—
06	2-Methyl-4-methylamino-5-hydroxy- methylpyrimidin	Sch	152	2.35	0.371	—
07	2-Aminopyrimidin	Fl	97	2.41	0.383	—
08	2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin	Arco	143	2.50	0.398	—
09	2-Amino-4,6-dimethyl-5-hydroxypyrimidin	Bu	145	2.54	0.405	—
10	4,6-Dichlorpyrimidin	Pr	144	2.72	0.435	—
11	2,6-Dihydroxy-5-brompyrimidin	Bu	191	2.74	0.438	—
12	2,4-Dimethoxy-6-methylpyrimidin	Pr	154	2.78	0.444	—
13	2,4-Dimethoxy-5-methylpyrimidin	Pr	154	2.79	0.446	—
14	2-Amino-5-methoxypyrimidinsulfat	Bu	226	2.86	0.456	—
15	4-Aminopyrimidin	Sch	95	3.54	0.540	—
16	2-Amino-5-methoxy-6-chlorpyrimidin	Bu	159	3.71	0.569	—
17	4,6-Dihydroxypyrimidin	Bu	112	4.20	0.643	—
18	2-Amino-4-chlor-5-methoxypyrimidin	Bu	148	6.69	0.825	—
19	2,6-Dichlor-5-methoxypyrimidin	Bu	144	8.19	0.913	—
<i>Purin-Derivate</i>						
120	XMP(5'); Xanthosin-5'-monophosphat	Si	364	0.08	-1.081	—
121	IMP(5'); Inosin-5'-monophosphat	Re	348	0.09	-1.032	—
122	GMP(5'); Guanosin-5'-monophosphat	Re	363	0.22	-0.666	—
123	NADP; Nicotinamidadenindinucleotid- phosphat	AWD	743	0.22	-0.666	—
124	AMP(5'); Adenosin-5'-monophosphat	Si	347	0.22	-0.666	—
125	FAD; Flavinadenindinucleotid	Ser	785	0.26	-0.620	—
126	FMN; Flavinadeninmononucleotid	Ser	456	0.28	-0.553	—
127	NAD; Nicotinamidadenindinucleotid	AWD	663	0.31	-0.509	—
128	Inosin; 9- $\beta$ -D-Ribofuranosylhypoxanthin	Si	268	1.28	0.107	0.142
129	Riboflavin; 6,7-Dimethyl-9-(D-1'-ribityl)- isoalloxazin	M	376	1.38	0.140	—
130	Harnsäure; 2,4,8-Trioxohexahydropurin	Si	168	1.53	0.186	0.127
131	6-Chlorpurinribosid	Ser	296	2.20	0.342	—
132	Xanthin; 2,4-Dioxotetrahydropurin	Re	152	2.43	0.385	—
133	Hypoxanthin; 4-Oxodihydropurin	Arco	136	2.51	0.400	0.387
134	Guanosin; 9- $\beta$ -D-Ribofuranosylguanin	Re	283	2.60	0.416	—
135	2-Desoxyguanosin; 9-(2'-Desoxy- $\beta$ -D- ribofuranosyl)-guanin	Ser	267	2.80	0.447	—
136	Purin; Imidazolo-[4,5-d]-pyrimidin	S	120	3.29	0.517	—
137	2-Desoxyadenosin; 9-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribo- furanosyl)-adenin	Ser	251	4.05	0.608	0.66
138	Allopurinol	Cal	136	4.80	0.681	—
139	Adenosin; 9- $\beta$ -D-Ribofuranyl adenin	Si	267	4.99	0.698	0.57
140	Guanin; 2-Amino-4-oxo-dihydropurin	Re	151	5.11	0.708	0.57
141	2-Chlorpurin	Si	154	7.25	0.863	—
142	Adenin; 6-Aminopurin	M	135	8.13	0.910	0.82

Es konnte keine Beziehung zwischen dem  $\log V_e^0$ -Wert einer Substanz und dem Molekulargewicht (Tabelle I), den HAMMETT-Konstanten oder  $pK_a$ -Werten<sup>10,11</sup> festgestellt werden. Das Fehlen einer negativen Korrelation zwischen dem  $V_e^0$ -Wert und dem Molekulargewicht<sup>5</sup>, und die Adsorption als vorrangiges Trennprinzip<sup>6</sup> sind für die folgenden Strukturchromatographiebetrachtungen eine Voraussetzung.

Für Nukleotide ist die Gelchromatographie ohne hinreichende Auflösung, während bei  $V_e^0 > 0.40$  die Substanzen durch ausreichend hohe Elutionskonstanten einer strukturchromatographischen Auswertung zugänglich sind.

Die auf der Grundlage der MARTIN'schen Beziehung ermittelten  $\Delta \log V_e^0$ -Werte für bestimmte Substituenten oder Molekülteile sind in Tabelle II zusammengestellt. Sie waren Ausgangspunkt für die Berechnung der  $\log V_e^0$ -Werte ("log  $V_e^0$  errechnet").

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG DER  $\Delta \log V_e^0$ -WERTE VERSCHIEDENER SUBSTITUENTEN

Substituent	Stellung	Verbindung	$\Delta \log V_e^0$	
			Einzel	Gemittelt
Ribosyl	N-1	6-Azauridin	-0.293	-0.245
	N-1	Uridin	-0.201	
	N-1	Cytidin	-0.170	
	N-1	5,6-Dimethyluridin	-0.274	
	N-1	4-Amino-5,6-dimethyluridin	-0.296	
	N-1	Thyminribosid	-0.238	
	N-1	Orotidin	-0.463	
	N-1	5-Joduridin	-0.422	
	N-1	5-Bromuridin	-0.407	
	N-1	5-Aminouridin	-0.351	
	C-5	Pseudouridin	-0.256	
		Inosin	-0.293	-0.257
		Guanosin	-0.292	
		Adenosin	-0.212	
	6-Chlorpurinribosid	-0.230		
Desoxyribosyl	N-1	5-Fluordesoxyuridin	-0.298	-0.158
	N-1	5-Bromdesoxyuridin	-0.441	
	N-1	5-Joddesoxyuridin	-0.409	
	N-1	Desoxycytidin	-0.131	
	N-1	Desoxyuridin	-0.165	
	N-1	Thymidin	-0.188	
	N-1	5-Methyl-desoxycytidin	-0.149	
		Desoxyguanosin	-0.261	
	Desoxyadenosin	-0.090		
Methyl	N-1	1-Methyl-5-nitrouracil	-0.379	-0.136
	N-1	1,6-Dimethyluracil	-0.140	
	N-1	1-Methyl-6-azauracil	-0.114	
	N-1	1,3-Dimethyl-6-azauracil	-0.154	
	N-3	3-Methyl-5-nitrouracil	-0.022	-0.069
	N-3	1,3,6-Trimethyluracil	-0.060	
	N-3	1,3-Dimethyl-6-azauracil	-0.156	
	N-3	3-Methyl-6-azauracil	-0.091	
	N-3	3-Methylcytidin	-0.017	
	(h) N-3	3,6-Dimethyluridin	-0.118	
(h) N-3	1,3-Dimethyluracil	-0.021		

TABELLE II (fortgesetzt)

Substituent	Stellung	Verbindung	$\Delta \log V_a^0$	
			Einzel	Gemittelt
	C-5	Thymin	0.190	0.056
	C-5	5-Methylecytosin	0.005	
	C-5	Thymidin	0.102	
	C-5	5,6-Dimethyluracil	0.075	
	C-5	6-Azathymin	-0.019	
	C-5	5-Methyldesoxycytidin	-0.013	
	C-5	Thyminribosid	0.056	
	C-6	6-Methyluracil	0.048	0.021
	C-6	5,6-Dimethylcytosin	0.015	
	C-6	5,6-Dimethyluracil	0.030	
	C-6	5,6-Dimethyluridin	-0.006	
Phenyl	C-5	5-Phenyl-6-azauracil	0.161	
	C-2	2-Phenylbarbitursäure	0.294	
Benzoyl	N-3	3-Benzoyl-6-azauracil	-0.030	
	N-3	6-Methyl-3-benzoyluracil	-0.256	
	N-1	1,3-Dibenzoyl-6-azauracil	0.067	
Mercapto	C-2	2-Mercapto-6-azauracil	0.419	
Amino	(h) C-2	2-Aminopyrimidin	0.249	
	C-4	4-Amino-5,6-dimethyluridin	-0.056	
	(h) C-4	4-Aminopyrimidin	-0.406	
	C-4	4-Amino-6-methyluracil	-0.036	
	C-5	5-Aminouridin	0.018	
	C-5	5-Aminouracil	0.168	
	C-5	5-Amino-6-azauracil	0.471	
	C-6	5,6-Diaminouracil	-0.172	
	C-6	6-Amino-2-thiouracil	0.651	
Carboxyl	C-5	Uracil-5-carbonsäure	-0.569	
	C-6	Orotsäure	-0.179	
	C-6	Orotidin	-0.441	
	C-5	Carboxymethylcytosin	-0.040	
Hydroxyl	C-2	Barbitursäure	-0.460	
	C-5	Isobarbitursäure	-0.002	
	(h) C-5	5-Hydroxypyrimidin	-0.051	
	C-6	Barbitursäure	-0.027	
		Hypoxanthin	-0.117	
		Harnsäure	-0.199	
		Xanthin	-0.015	
Fluormethyl	C-5	6-Methyl-5-fluormethyluracil	-0.222	
Chlormethyl	C-5	6-Methyl-5-chlormethyluracil	0.267	
	C-6	5-Methyl-6-chlormethyluracil	0.278	
Fluor	C-5	5-Fluoruracil	-0.149	
	C-5	5-Fluordesoxyuridin	-0.246	
Chlor	(h) C-2	2-Chlorpyrimidin	0.184	
	(h) C-4	4,6-Dichlorpyrimidin	0.153	0.151
	(h) C-4	6-Methyl-4-chlorpyrimidin	0.148	
	C-5	5-Chloruracil	0.120	0.157



TABELLE II (fortgesetzt)

Substituent	Stellung	Verbindung	$\Delta \log V_e^0$	
			Einzel	Gemittelt
	C-6	6-Chloruracil	0.266	0.257
	(h) C-6	5-Methyl-6-chlormethyluracil	0.248	
		6-Chlorpurin	0.346	
Brom	C-5	5-Bromuracil	0.266	
Jod	C-5	5-Joddesoxyuridin	0.238	0.319
	C-5	5-Joduridin	0.257	
	C-5	5-Joddesoxycytidin	0.302	
	C-5	5-Joduracil	0.482	
Alanyl	N-1	Willardiin	-0.509	
	N-3	Isowillardiin	-0.412	
Nitro	C-5	5-Nitrouracil	0.332	
Aza	N-6	6-Azuracil	-0.242	-0.255
	(h) N-6	1-Methyl-6-azauracil	-0.220	
	N-6	6-Azathymine	-0.242	
	(h) N-6	5-Phenyl-6-azauracil	-0.319	
	N-6	2-Thio-6-azauracil	-0.219	
	N-6	6-Azuridin	-0.334	
	(h) N-6	3-Benzoyl-6-azauracil	-0.212	
	N-5	5-Azuracil	-0.165	
N-5	5-Azacytosin	-0.146	-0.157	

In den vier Gruppen der Tabelle I galten Pyrimidin (errechnet), Uracil, 6-Azuracil und Purin als "Grundsubstanz".

In Anbetracht der erheblich unterschiedlichen Elektronendichteverteilung im Pyrimidinring war eine Abhängigkeit des  $\Delta \log V_e^0$ -Wertes eines Substituenten von dessen Stellung am Ring zu erwarten. Diese Annahme wird in Tabelle II insbesondere an den  $\Delta \log V_e^0$ -Werten für die Methyl-Gruppe bestätigt. Die ermittelten chromatographischen Beiträge von Substituenten galten deshalb nur für eine bestimmte Stellung. Die Tabellen III und IV sind Beispiele für die erfolgreiche Verwendung der MARTIN'schen Beziehung bei Pyrimidinverbindungen.

TABELLE III

ERMITTLUNG VON  $\log V_e^0$  FÜR 3,6-DIMETHYLURIDIN

Bestandteil	$\log V_e^0$ -Wert	
	+	-
Uracil	0.190	
Ribosyl-		0.246
3-Methyl-		0.069
6-Methyl-	0.021	
	0.211	0.315
3,6-Dimethyluridin		0.104 (errechnet)

TABELLE IV

ERMITTLUNG VON  $\log V_e^0$  FÜR 5-PHENYL-1,3-DIMETHYLBARBITURSÄURE

Bestandteil	Log $V_e^0$ -Wert	
	+	-
Barbitursäure	0.163	
Phenyl-	0.161	
1-Methyl-		0.136
3-Methyl-		0.069
	0.324	0.205
5-Phenyl-1,3-dimethylbarbitursäure	0.119	(errechnet)
5-Phenyl-1,3-dimethylbarbitursäure	0.097	(ermittelt)

Es ergibt sich für eine Reihe von Verbindungen (vgl. unten) ein hinreichend additiver Zusammenhang, sofern für die einzelnen Inkremente gute Mittelwerte erreicht werden und sie positionsspezifisch in die Summe eingehen. Dabei ist die Natur des chromatographischen Prozesses unbedeutend. So liegt auch bei dünnschichtchromatographischen Trennungen an Cellulose bedingt ein additiver Zusammenhang vor<sup>11</sup>. Die adsorptionsverändernde Eigenschaft eines Substituenten und die Grösse seiner chromatographischen Beiträge ( $\Delta \log V_e^0$ ) werden aus chemischer Sicht erklärbar.

#### Methylgruppe

Als Voraussetzung für eine Substanz-Gel-Wechselwirkung von N-heterozyklischen Verbindungen wurde bisher ein Stickstoffatom diskutiert, dessen H-Atom Wasserstoffbrücken bilden kann<sup>5,7,12</sup>. Nach den Untersuchungen von STREULI<sup>13,14</sup> an Sephadex LH-20 erfolgt Adsorption durch H-Brücken insbesondere in nichtplanaren und heterozyklischen Verbindungen. Nach unseren Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Trennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen an Sephadex G-10 liegt die Energie der Wechselwirkung zwischen Substanz und Gelmatrix für einige Verbindungen im Bereich schwacher H-Brücken<sup>6</sup>. Damit übereinstimmend erfolgt bei N-Methylierung eine Adsorptionserniedrigung. Sie wird als negativer  $\Delta \log V_e^0$ -Wert der Methylgruppe erkennbar (Tabelle II), wobei Methylierung am N-1 eines Uracilringes zu einer starken Adsorptionserniedrigung, d.h. einem beträchtlich negativen  $\Delta \log V_e^0$ -Wert der Methylgruppe führt. C-Methylierung in 5- oder/und 6-Stellung führt dagegen zu einem positiven  $\Delta \log V_e^0$ -Wert, d.h. einer Adsorptionserhöhung gegenüber der Grundsubstanz. Der  $\Delta \log V_e^0$ -Wert von Methylgruppen am Uracilring steigt in der Reihenfolge



so dass die Methylgruppe keinen sterisch bzw. räumlich bedingten Adsorptionsbeitrag liefert.

Die in dieser Reihenfolge nach links ansteigende Adsorption unterstreicht die besondere Bedeutung des heterozyklischen N-Atoms für die Adsorption, wobei im

N-1 und N-3 gegenüber Pyrimidinen vorliegt, so dass die Adsorption hier sinkt (vgl. 6-Azauracil in Tabellen I und II).

Die Adsorptionserniedrigung durch N-Methylierung tritt auch bei Purinen auf<sup>7,12</sup>. SWEETMAN UND NYHAM<sup>7</sup> nehmen an, dass Purine in der Lactimform (z.B. Adenin) vorwiegend über die ungeteilten Elektronenpaare der N-Atome H-Brücken zu den OH-Gruppen der Gelmatrix ausbilden, während Purine in der Lactamform (z.B. Hypoxanthin und Guanin) mit dem Wasserstoff ihres Lactamstickstoffs H-Brücken zum Sauerstoff der Dextranhydroxylgruppen bilden sollen. In jedem Falle scheint der Stickstoff für den Adsorptionsvorgang von Heterozyklen besondere Bedeutung zu haben, und seine Methylierung senkt diesen Prozess beträchtlich<sup>7,12</sup>. Dabei ist das N-1-Atom von Pyrimidinen angesichts eines  $\Delta \log V_e^0$ -Wertes von  $-0.136$  (Tabelle II) für die Methylgruppe in dieser Stellung den N-Atomen 3,7 und 9 im Purinring vergleichbar<sup>7</sup>.

*Ribosyl- und Desoxyribosylgruppe*

Der chromatographische Beitrag einer Ribosylgruppe am Purin bzw. Pyrimidinring ( $\Delta \log V_e^0$ ,  $-0.257$  bzw.  $-0.245$ ) gleicht den Befunden von SWEETMAN UND NYHAM<sup>12</sup> an Purinen ( $\Delta \log V_e^0$ ,  $-0.258$ ).

Die Elutionsreihenfolge eines Basengemisches von Nukleinsäurebausteinen bleibt auch bei der Gelchromatographie ihrer entsprechenden Nucleoside erhalten, so dass in einem  $\log V_e^0$ /MG-Diagramm die Basen/Nucleosidpaare durch Parallel-

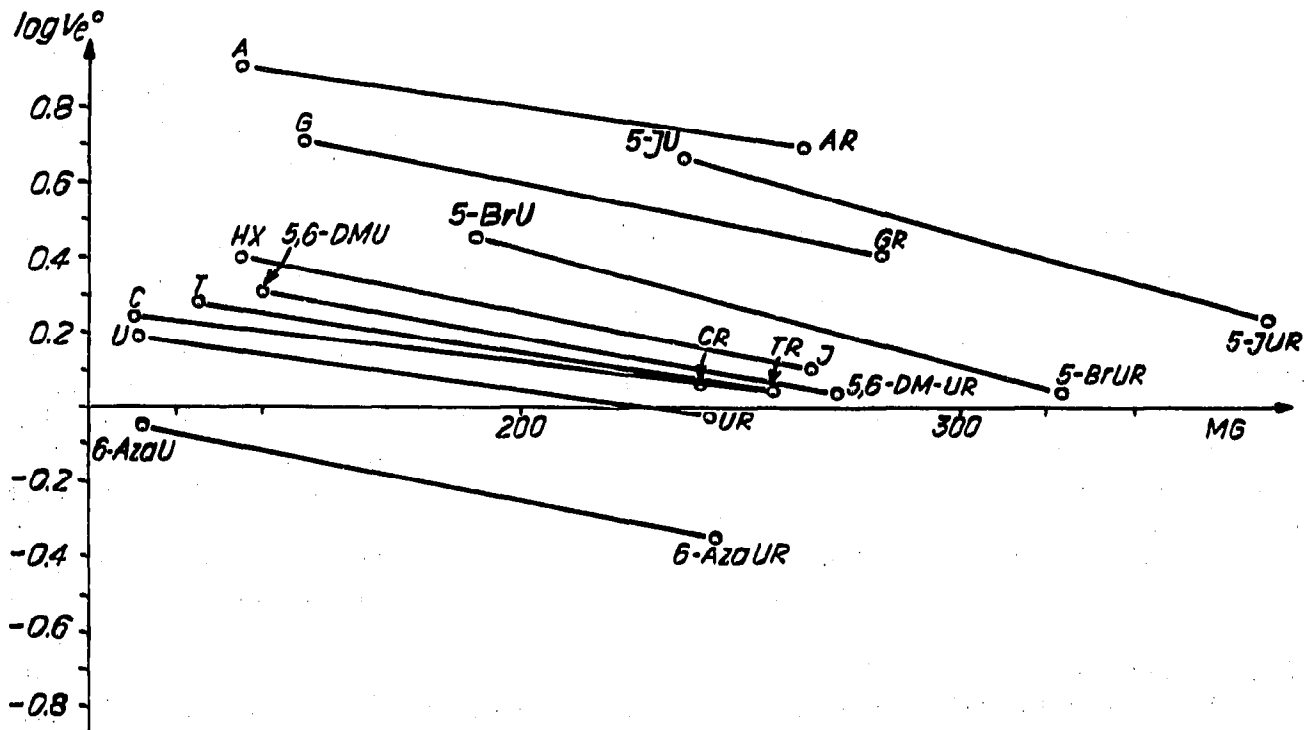


Fig. 1. Beziehung zwischen  $\log V_e^0$  und MG für Purin- und Pyrimidinbasen sowie ihre entsprechenden Nucleoside. A = Adenin, AR = Adenosin; 6-AzaU = 6-Azauracil, 6-AzaUR = 6-Azauridin; 5-BrU = 5-Bromuracil, 5-BrUR = 5-Bromuridin; C = Cytosin, CR = Cytidin; 5,6-DMU = 5,6-Dimethyluracil, 5,6-DM-UR = 5,6-Dimethyluridin; G = Guanin, GR = Guanosin; HX =

verschiebung unterschieden sind (Fig. 1). Der heterozyklische Kern erscheint als Zentrum der Gel-Substanz-Wechselwirkungen. Ribose sowie Desoxyribose wurden bei Molekulargewichtsbestimmungen von Oligonukleotiden als gleichwertig betrachtet<sup>15</sup>.

Dieser Annahme widersprechen die hier ermittelten  $\Delta \log V_e^0$ -Werte beider Gruppen mit einem Unterschied von  $-0.100$ , der nicht durch die Molekulargewichtsdifferenz erklärt werden kann. Während Glucose bei Trennungen an Sephadex G-10 als Standard für eine wechselwirkungsfreie Gelchromatographie verwendet wurde<sup>16</sup>, sind mit Zuckern an Bio-Gel P-2 dem Molekulargewicht widersprechende Elutionswerte beobachtet worden<sup>17</sup>. Darüberhinaus zeigen Maltooligosaccharide bei der Chromatographie an Bio-Gel P-2 eine Temperaturabhängigkeit, die weitgehend eine Summe der Wechselwirkungen isochemischer Glucoseeinheiten darstellt<sup>18</sup>. Der Anteil dieser Wechselwirkung einer Glucoseeinheit steigt mit der Kettenlänge der Dextrine<sup>18</sup>.

Entgegen einer früheren Mitteilung<sup>15</sup> muss nach den Befunden auch für Sephadex G-10 eine Wechselwirkung von Zuckern mit dem Gel berücksichtigt werden. Die stärkere Adsorption von Desoxyribosylverbindungen gegenüber Ribosylverbindungen an Sephadex G-10 (Tabelle I) steht in Übereinstimmung mit dem Anstieg der  $K_D$ -Werte von Polyalkoholen an DVS-9 bei Vergrößerung des C/OH-Verhältnisses<sup>19</sup>. Bei der Erklärung der stärkeren Adsorption von Desoxyribosylverbindungen müssen sterische Faktoren sowie Wechselwirkungen der Zucker zum Gel und Lösungsmittel herangezogen werden<sup>19</sup>.

### Halogenatome

Die Elutionswerte 5-halogenierter Uracile steigen in der Reihenfolge  $F < Cl < Br < J$  (Tabelle I) und sind temperaturabhängig<sup>11</sup>. Analog nimmt die Adsorption bei einer nach DETERMANN UND WALTER<sup>16</sup> modifizierten Aufnahme der Adsorptionskinetik in der Reihenfolge  $J > Br > Cl > F$  ab (Technik vgl. Lit. 6).

In der Reihenfolge  $F < Cl < Br < J$  steigt die Polarisierbarkeit bei Abnahme der Elektronegativität, so dass eine direkte Wechselwirkung der Halogenatome zum Gel durch Dipol- und Dispersionskräfte in Betracht gezogen wird<sup>7</sup>. Damit stimmt eine starke Abweichung der HAMMETT-Geraden für Halogenphenole, -aniline und -benzoesäuren von der anderer Verbindungen dieser Substanzklassen überein<sup>20</sup>. Für Halogenuracile weicht die HAMMETT-Gerade ebenfalls von der übriger Uracilverbindungen ab<sup>11</sup>. Der Logarithmus der Elutionskonstante von 5-Halogenuracilen wächst annähernd proportional dem Radius des Halogenatoms<sup>11</sup> bzw. das Molekulargewicht von 6-Halogenpurinen korreliert direkt proportional mit dem  $\Delta \log V_e^0$ -Wert des Halogenatoms<sup>7</sup>.

In Anbetracht einer direkten Wechselwirkung der Halogenatome mit dem Gel kann eine Additivität im Sinne der  $R_M$ -Werttheorie nicht vorliegen.

### Hydroxylgruppe

Die Ermittlung des chromatographischen Beitrages der OH-Gruppe von Pyrimidinen wird durch die Lactam-Lactim-Tautomerie erschwert, weil sie massgeblich das Ausmass der Adsorption bestimmt<sup>7</sup>. Wie bei den Purinen adsorbiert bei den Pyrimidinen eine Lactim-Form stärker. So wird 2,4-Dihydroxy-5-methylpyrimidin (Thymin) mit  $V_e^0 = 1.02$  vor 2,4-Dimethoxy-5-methylpyrimidin mit  $V_e^0 = 2.70$  eluiert.

2.06) nahezu gleich adsorbiert werden. Auffällig ist die stärkere Adsorption bei symmetrischer Anordnung der Hydroxylgruppen (4,6-Dihydroxypyrimidin,  $V_e^0 = 4.20$ ) gegenüber unsymmetrischer Stellung (2,4-Dihydroxypyrimidin,  $V_e^0 = 1.55$ ).

Die intramolekularen Wechselwirkungen der Hydroxylgruppe bzw. ihr Einfluss auf die Adsorptionszentren im Molekül lassen keine Verwendung des hier vorgelegten Materials im Sinne der  $R_M$ -Werttheorie zu.

### *Aminogruppe*

Die Einführung einer Aminogruppe ausserhalb der 4-Stellung bewirkt eine Adsorptionserhöhung, weil mit der Aminogruppe eine wechselwirkungsaktive Gruppe mehr im Molekül vorliegt. Für Purine wurde aus der stärkeren Bindung von Adenin an Sephadex gegenüber Xanthin im Zuge der Gleichgewichtsdialyse eine Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Aminogruppe und dem Äthersauerstoff der Gelmatrix abgeleitet, weil beide Verbindungen bei der Gleichgewichtsdialyse an unvernetzten Dextransketten sich gleich verhielten<sup>7</sup>.

Eine Beteiligung der Aminogruppe am Trennprozess und die Möglichkeit intramolekularer Wechselwirkungen betrachten wir als Ursache für die Heterogenität der hier vorgestellten Aminogruppenwerte (Tabelle II). Deshalb existiert nach unseren Erfahrungen für die untersuchten Aminoverbindungen die  $R_M$ -Wert-Beziehung nicht, während für eine Reihe anderer Substituenten das vorliegende Zahlenmaterial unzulänglich ist (Phenyl-, Benzoyl-, und Mercaptogruppen).

### KONKLUSION

Die Existenz von N-Atomen in 1,3-Stellung und 2 Oxogruppen im Uracilring verursacht eine beträchtlich ungleichmässige Elektronenverteilung in dieser "Grundsubstanz", und verschiedene Substituenten können intramolekulare Wechselwirkungen eingehen. Ein vom additiven Zusammenhang chromatographisch ermittelter Substituentenbeiträge abweichendes Verhalten kann hierbei eine Hilfe zur Strukturermittlung darstellen. So führt eine N-1-Methylierung im 5-Nitrouracil zu weitaus stärkerer Adsorptionserniedrigung ( $\Delta \log V_e^0 = -0.379$ ) als in anderen Verbindungen ( $\Delta \log V_e^0 = -0.136$ ). Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe und der benachbarten Oxogruppe könnten auch in der Uracil-5-carbonsäure die Ursache einer ungewöhnlich niedrigen Adsorption ( $\Delta \log V_e^0$  -5-COOH =  $-0.569$  gegenüber  $\Delta \log V_e^0$  -6-COOH =  $-0.179$ ) sein. Darauf weist die Abnahme einer derartigen Wechselwirkung bei grösserer Entfernung der Carboxylgruppe vom Ring (5-Carboxymethylcytosin,  $\Delta \log V_e^0$  -COOH =  $0.040$ ) hin.

Die Abhängigkeit der Adsorption von der Stellung und Art eines Substituenten scheint ein Widerspruch für die Additivität der Inkrementbeiträge nach der  $R_M$ -Werttheorie zu sein, der an dem starken Adsorptionsunterschied zwischen 1,3-Dimethyl-2-thio-6-azauracil ( $V_e^0 = 3.80$ ) und 1,3-Dimethyl-6-azauracil ( $V_e^0 = 0.98$ ) gegenüber 2-Thiouracil ( $V_e^0 = 1.04$ ) und Uracil ( $V_e^0 = 1.55$ ) deutlich wird.

Wir halten nach den vorliegenden Daten die  $R_M$ -Werttheorie für Pyrimidine bei der Gelchromatographie nur dort anwendbar, wo Stellung und Art des Substituenten bzw. weiterer am Ring substituierter Gruppen die N-Atome als Adsorptionszentren nur unwesentlich beeinflussen. Ihre Benutzung ist gegenüber Purinen ein-

hanges der Inkrementbeiträge stellt sie ein echtes Hilfsmittel dar. So können Elutionspositionen von Verbindungen bekannter Struktur vorausgesagt werden oder aus den Inkrementbeiträgen eine Strukturbestimmung unterstützen.

Die Natur der Verbindungsklasse bedingt durch die relativ grosse Anzahl von Zentren intra- und intermolekularer Wechselwirkungen eine Beschränkung, die gegebenenfalls die indirekte Erfassung jener Wechselwirkungen gestattet, die zur Strukturbestimmung beitragen.

Auch für die Beurteilung von Ursachen der Trennung niedermolekularer Verbindungen an Sephadex G-10 kann das vorgelegte Material dienen. Als Hauptursache der Adsorption erscheinen H-Brücken, die wahrscheinlich bei einigen Substanzen durch  $\pi$ -Bindungen verstärkt werden.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

DVS = Dextran, das durch Divinylsulfon vernetzt ist

$\Delta G^0$  = freie Energie

$H$  = theoretische Bodenhöhe = Länge der Säule/ $16 \cdot (V_e/V_B)^2$

$K$  = Gleichgewichtskonstante einer Reaktion

$k$  =  $\Delta \log V_e^0$  mit errechneter Grundsubstanz ermittelt

MG = Molekulargewicht

$\rho$  = Phasenverhältnis

$R$  = Gaskonstante

$R_F$  = Chromatographiekonstante, Verhältnis aus den Wanderungstrecken von Substanz und Laufmittelfront

$R_M$  =  $\log(1/R_F - 1)$

$V_e$  = Elutionsvolumen einer Substanz

$V_e^0$  = Elutionskonstante  $(V_e - V_0)/V_0 = 1/R_F - 1$

$V_0$  = Ausschlussvolumen

$T$  = absolute Temperatur.

#### DANK

Für wertvolle Hinweise bei der Abfassung des Manuskriptes danke ich den Herren Prof. Dr. H. REINBOHE, Dr. L. NOVER und Dr. G. FISCHER. Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Frau B. SAUER.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Adsorptionschromatographie an Sephadex G-10 wurde für die Trennung von Pyrimidinen und Purinen genutzt. Von über 140 Verbindungen wurde die substanzspezifische Elutionskonstante  $V_e^0$  bestimmt.

Beispiele für die Anwendung der MARTIN'schen Beziehung in der Säulenchromatographie von Pyrimidinen an Sephadex G-10 werden gegeben. Der Beitrag eines Substituenten zum chromatographischen Verhalten einer Verbindung war von seiner Position im Ring abhängig. Methylierung erhöhte die  $V_e^0$ -Werte in der Reihenfolge 1-CH<sub>3</sub> < 3-CH<sub>3</sub> < 6-CH<sub>3</sub> < 5-CH<sub>3</sub>. Die Adsorption am Gel wurde besonders durch N-Methylierung gesenkt. Der chromatographische Beitrag von Ribosyl- und Desoxyribosylgruppen war unterschiedlich und lässt auch für diese Ver-

Die Additivität der  $\Delta \log V_e^0$ -Werte existiert für einen Teil der untersuchten Verbindungen und kann zur Vorhersage von Elutionsvolumina dienen.

## LITERATUR

- 1 A. J. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symp.*, 3 (1950) 4.
- 2 E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- 3 I. E. BUSH, *Methods Biochem. Anal.*, 13 (1965) 357.
- 4 H. K. SCHAUER UND R. BULIRSCH, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 683.
- 5 C. WASTERNAK, *Pharmazie*, 25 (1970) 740.
- 6 C. WASTERNAK UND H. REINBOTHE, *J. Chromatogr.*, 72 (1972) im Druck.
- 7 L. SWEETMAN UND W. NYHAM, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 349.
- 8 D. J. BROWN, *The Pyrimidines*, Interscience, Wiley, N.Y., London, 1962.
- 9 W. PFLEIDERER, in H. M. RAUEN (Editor), *Biochemisches Taschenbuch I*, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964, S. 588.
- 10 C. WASTERNAK, *Pharmazie*, 27 (1972) 65.
- 11 C. WASTERNAK, unveröffentlicht.
- 12 L. SWEETMAN UND W. NYHAM, *J. Chromatogr.*, 32 (1968) 662.
- 13 C. A. STREULI, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 219.
- 14 C. A. STREULI, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 225.
- 15 T. HOHN UND H. SCHALLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 138 (1967) 466.
- 16 H. DETERMANN UND I. WALTER, *Nature*, 219 (1968) 604.
- 17 M. JOHN, G. TRÉNEL UND H. DELLWEG, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 476.
- 18 H. DELLWEG, M. JOHN UND G. TRÉNEL, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 89.
- 19 N. V. B. MARSDEN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 125 (1965) 428.
- 20 A. J. W. BROOK UND K. C. MUNDAY, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 1.

*J. Chromatogr.*, 71 (1972) 67-81