

Pteridine, LXII¹⁾

Isolierung, physikalische Eigenschaften und alkalischer Abbau der Augenpigmente Neodrosopterin und Aurodrosopterin aus *Drosophila melanogaster*

Katharina Rokos und Wolfgang Pfeleiderer*

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,
D-7750 Konstanz, Postfach 7733

Eingegangen am 10. Februar 1975

Neodrosopterin (3) und Aurodrosopterin werden aus *Drosophila*-Augen isoliert und durch Bestimmung verschiedener physikalischer Daten charakterisiert. Die Struktur von 3 wird aufgrund von Abbaureaktionen, seiner optischen Inaktivität und Isomerisierbarkeit zu Iso- (2) und Drosopterin (1) als symmetrische Form dieser beiden Enantiomeren erkannt. Aurodrosopterin stellt ein Racemat dar, dessen Auftrennung in optisch aktive Antipoden durch Chromatographie an Cellulose gelingt. Strukturell muß es ebenfalls zu den Dipterinylmethan-Farbstoffen gezählt werden und unterscheidet sich von 1–3 sehr wahrscheinlich nur in der Seitenkette.

Pteridines, LXII¹⁾

Isolation, Physical Properties, and Alkaline Degradation of the Eye Pigments Neodrosopterin and Aurodrosopterin from *Drosophila melanogaster*

Neodrosopterin (3) and aurodrosopterin are isolated from *Drosophila* eyes and characterized by means of various physical data. The structure of 3 has been elucidated as the symmetrical form of iso-(2) and drosopterin (1) on the basis of its optical inactivity, of degradation reactions, and of the isomerization to 1 and 2. Aurodrosopterin represents a racemate which was separated into two optical active forms by chromatography on cellulose. Aurodrosopterin belongs structurally to the dipterinylmethane dyestuffs and differs from 1–3 most likely only in the C–C side-chain.

Die roten Augenpigmente der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* werden seit einer Reihe von Jahren untersucht, wobei Viscontini et al.^{2–5)} als ersten die Isolierung der Pigmente und eine Trennung in drei Komponenten, Drosopterin, Isodrosopterin und Neodrosopterin genannt, gelang. Durch Abbau der Pigmente zur Pterin-6-carbonsäure wurde bewiesen, daß die Drosopterine Pterinabkömmlinge sind, was schon Lederer⁶⁾, auf den der Name Drosopterine zurückgeht, vermutete. Die Struktur von Drosopterin (1) und Isodrosopterin (2) konnte kürzlich geklärt und im Sinne enantiomerer, dimerer Pterinpigmente festgelegt werden⁷⁾. Die Struktur wurde durch Synthese untermauert;

¹⁾ LXI. Mitteil.: H. J. Schneider und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 107, 3377 (1974).

²⁾ M. Viscontini, E. Hadorn und P. Karrer, Helv. Chim. Acta 40, 579 (1957).

³⁾ M. Viscontini und P. Karrer, Helv. Chim. Acta 40, 968 (1957).

⁴⁾ M. Viscontini, Helv. Chim. Acta 41, ^{a)} 922, ^{b)} 1299 (1958).

⁵⁾ M. Viscontini und E. Möhlmann, Helv. Chim. Acta 42, ^{a)} 836, ^{b)} 1676 (1959).

⁶⁾ M. Lederer, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 15, 273 (1940).

⁷⁾ H. Schlobach und W. Pfeleiderer, Helv. Chim. Acta 55, ^{a)} 2518, ^{b)} 2525, ^{c)} 2533, ^{d)} 2541 (1972).

die so erhaltenen Isomeren Isodrosopterin und Drosopterin sind mit dem aus *Drosophila melanogaster* isolierten Material identisch.

Die Struktur von Neodrosopterin, des dritten von *Viscontini* isolierten Pigments, war bis jetzt noch ungeklärt, da seine Isolierung größte Schwierigkeiten bereitet. Auch erschien es fraglich, ob Neodrosopterin tatsächlich ein Naturprodukt ist, da durch die Instabilität der Drosopterine in Lösungen bei der chromatographischen Auftrennung der Pigmente rötlich gefärbte Umwandlungsprodukte entstehen können ^{7c)}. Das chromatographische Verhalten dieser Verbindungen stimmte mit den von *Viscontini* ²⁾ gefundenen R_F -Werten recht gut überein, und ihre UV/VIS-Spektren waren den angegebenen sehr ähnlich ³⁾.

Wir konnten inzwischen jedoch Neodrosopterin (3) durch verbesserte Aufarbeitungsmethoden mit relativ konstanten, allerdings sehr geringen Ausbeuten aus *Drosophila melanogaster* isolieren. Es unterscheidet sich entgegen der früheren Annahme deutlich von den Umwandlungsprodukten ^{7c)} aus Isodrosopterin und Drosopterin sowohl chromatographisch als auch durch seine UV-Spektren (Tab. 1).

Tab. 1. UV-Absorptionsmaxima von Neodrosopterin (3)

	UV-Absorptionsspektren				pH-Wert
	λ_{\max} (nm)				
Neodrosopterin	262	475			1.0
	265	335	507		13.0
Neodrosopterin (<i>Viscontini</i> ³⁾)	268	310	499		1.0
	268	340	514		13.0
Umwandlungs- produkt D ₁ ^{7c)}	215	268	309	499	4.5
	215	264	512		13.0
Umwandlungs- produkt I ₁ ^{7c)}	215	268	309	499	4.5
	215	264	512		13.0

Die UV/VIS-Spektren sind gegenüber den von *Viscontini* ³⁾ angegebenen Werten beträchtlich hypsochrom verschoben, die Lage der Absorptionsmaxima gleicht denen von Isodrosopterin und Drosopterin sehr. Die jetzt festgelegten Werte basieren auf mehreren UV/VIS-Spektren, die mit auf verschiedene Weise isolierten Neodrosopterinen reproduzierbar erhalten wurden. Darüber hinaus wurde chromatographisch geprüft, daß bei Aufnahme der Spektren keine Veränderung der Substanz eingetreten ist.

Neodrosopterin ist im Gegensatz zu Isodrosopterin und Drosopterin nicht nur im Bereich 600–550 nm, wie früher schon festgestellt ³⁾, sondern auch zwischen 550 und 220 nm optisch nicht aktiv. Es läßt sich chromatographisch auf keine Weise in zwei Enantiomere wie 1 und 2 trennen, so daß dieses Augenpigment entweder ein durch Chromatographie nicht auftrennbares Racemat darstellt, was sehr unwahrscheinlich ist, oder aber als Molekül mit mindestens einer Symmetrieebene zu betrachten ist.

Chromatographisch reines Neodrosopterin verändert sich in Lösung, vor allem in sauren Ammoniumsalzlösungen, aber auch in Wasser, bereits nach kurzer Zeit weitgehend und läßt Produkte entstehen, die sich chromatographisch wie Drosopterin (1) und Isodrosopterin (2) verhalten. Diese Umwandlung verläuft in geeigneten Pufferlösungen in 2–3 Tagen mit etwa 30% Ausbeute. Die entstehenden Substanzen konnten durch präparative Chromatographie über Celluloseplatten isoliert und durch

Vergleich ihrer UV/VIS-Spektren mit denen von authentischem 1 und 2 eindeutig identifiziert werden. Beide Substanzen sind optisch aktiv, und auch ihre CD-Spektren stimmen sehr gut mit denen von natürlichem Drosopterin und Isodrosopterin überein. Die geringeren Elliptizitäten beim Drosopterin sind dabei darauf zurückzuführen, daß es bei chromatographischer Auftrennung sehr kleiner Mengen infolge der ungünstigen R_F -Werte nie ganz isomerenrein erhalten werden kann.

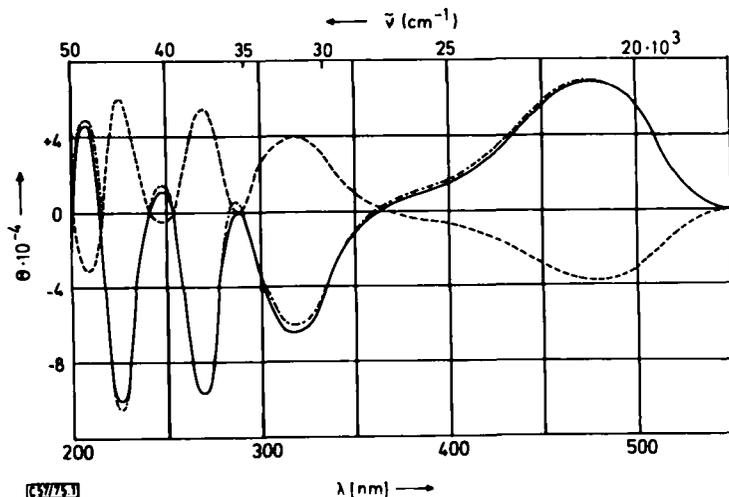


Abb. 1. Isomerisierung von Neodrosopterin (3) in Droso- (1, - - - -) und Isodrosopterin (2, - · - · - ·). Zum Vergleich: Synthetisches 2 (—). CD-Spektren in Wasser

Neodrosopterin (3) isomerisiert also bereits unter sehr milden Bedingungen (bei Raumtemperatur und im Dunkeln) in Drosopterin (1) und Isodrosopterin (2). Strukturell muß demzufolge eine sehr enge Beziehung zwischen diesen drei Verbindungen bestehen.

Ein Schwermetallkomplex – von *Viscontini*^{4b)} wurde ein Kupferkomplex vermutet – konnte ausgeschlossen werden, da eine Analyse am Atomabsorptionsspektrometer nicht einmal Spuren von Cu, Co, Cr, Fe, Mn und Ni zeigte.

Die Molekülmasse von Neodrosopterin wurde analog zu Isodrosopterin und Drosopterin^{7a)} mit der analytischen Ultrazentrifuge nach *Svedberg*⁸⁾ bestimmt. Der gefundene Wert von 487 ist dabei etwas zu hoch ausgefallen, was seine Ursache möglicherweise im Fehlen geeigneter Modellsubstanzen zur Ermittlung des spezifischen Auftriebsvolumens haben könnte. Die Molekülmassebestimmung bestätigt jedoch eindeutig wieder das Vorliegen eines dimeren Pterin-Derivates.

Die UV/VIS-Spektren von Neodrosopterin hängen wie die von 1 und 2 stark vom pH-Wert der Lösung ab; auch die auf spektrophotometrischem Wege im normalen pH-Bereich erhaltenen vier pK-Werte unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der beiden Hauptpigmente.

⁸⁾ T. Svedberg und K. O. Pederson, *The Ultracentrifuge*, Clarendon Press 1940, Photochem. Nachdruck Johnson Reprint Co., New York 1960.

Tab. 2. Physikalische Daten von Drosopterinen

Verbindung	pK-Wert in Wasser	UV/VIS-Absorptionsspektren				pH	Mole- kül- art
		λ_{\max} (nm)	$\frac{E_{\text{langwellige Bande}}}{E_{\text{kurzwellige Bande}}}$				
Drosopterin (1) + Isodrosopterin (2)	} 0.45 ± 0.1 1.24 ± 0.02 8.27 ± 0.04 9.33 ± 0.02 > 10	262	[295]	455	1.26	-1.5	+++
		267	[325]	470	1.74	0.8	++
		273	[324]	478	2.00	5.0	+
		265	[330]	485	1.95	8.8	± (0)
		264	[330]	493	1.86	10.0	-
		265	337	502	2.00	13.0	--
Neodrosopterin (3)	-0.19 ± 0.06 1.22 ± 0.04 8.51 ± 0.1 9.82 ± 0.04	262	[295]	467	1.3	0.4	++
		273	[325]	482	1.8	6.0	+
		267	[325]	490	1.7	9.0	± (0)
		266	335	503	1.6	12.0	--
Aurodrosopterin	0.56 ± 0.1 1.26 ± 0.02 10.02 ± 0.2	258		456	1.0	-1.0	
		258	[325]	466	1.25	0.8	
		265	[325]	480	1.55	7.0	
		265	340	497	1.40	12.0	

+++ = Trikation; ++ = Dikation; + = Monokation; ± (0) = Zwitterionisches Neutralmolekül; - = Monoanion; -- = Dianion.

[] Schulter.

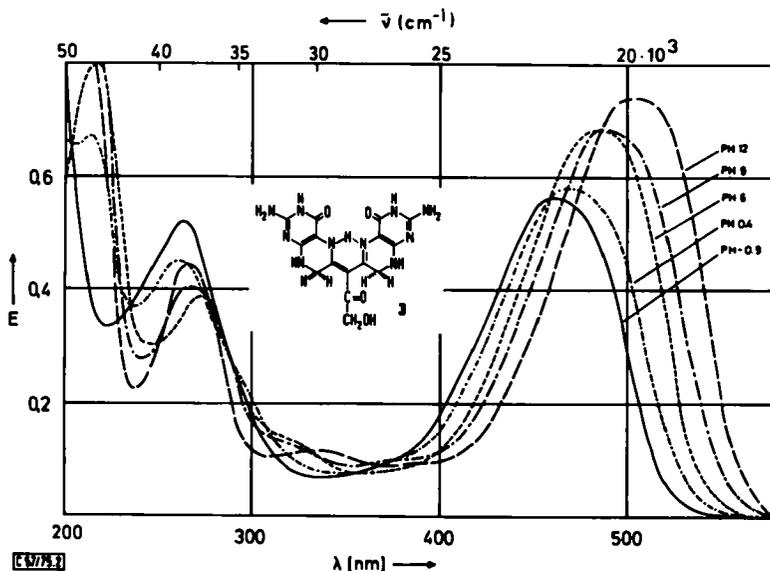


Abb. 2. UV/VIS-Spektren von Neodrosopterin (3) in Pufferlösungen: Trikation (pH -0.89) ———, Dikation (pH 0.4) - - - - -, Monokation (pH 6.0) - - - - -, Neutralmolekül (pH 9.0) — · — · — und Dianion (pH 12.0) — — — —

Der alkalische Abbau von Neodrosopterin führt zu den gleichen Produkten wie beim Isodrosopterin und Drosopterin ^{7a)}. Beim oxidierenden Abbau mit 5 N NH₃ und 30proz. Wasserstoffperoxid konnten durch Chromatographie und anschließende Aufnahme

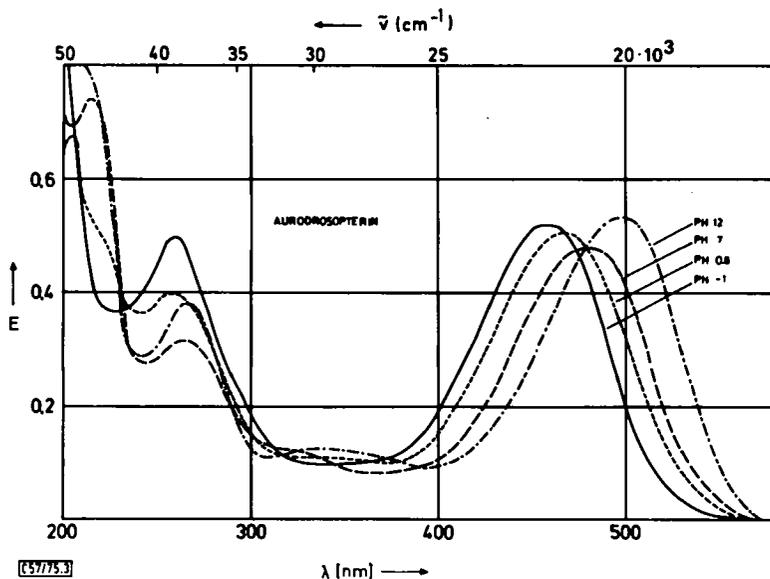


Abb. 3. UV-Absorptionsspektren des Dikations ——— (pH -1.0);
 Monokations - - - - (pH 0.8); Neutramoleküls — — — (pH 7.0) und
 Monoanions - · - · - (pH 12) des Aurodrosopterins

Bei der Chromatographie auf Cellulosefolien kommen dem Aurodrosopterin meist die größten und dem Neodrosopterin stets die kleinsten R_F -Werte zu (Tab. 3).

Tab. 3. Dünnschichtchromatogramme auf Cellulosefolien (Schleicher und Schüll F 1440)

Verbindung	R_F -Werte				
	1 proz. wäbr. Ammonium- chlorid	1 proz. wäbr. Natrium- citrat	1 M Essig- säure	n-Propanol/ 1 proz. wäbr. Ammonium- chlorid (1 : 1)	n-Propanol/ 1 proz. wäbr. Ammoniak (1 : 1)
Neodrosopterin (3)	0.04	0.03	0.05	0.06	0.03
Drosopterin (1)	0.14	0.14	0.19	0.19	0.09
Isodrosopterin (2)	0.18	0.17	0.23	0.23	0.11
Aurodrosopterin	0.22	0.14	0.32	0.23	0.17

In 1 proz. wäbrigem Ammoniumchlorid und n-Propanol/1 proz. wäbrigem Ammoniumchlorid (1 : 1) als Laufmittel beobachtet man auf Cellulosefolien bei längeren Laufstrecken eine weitere Aufspaltung des Aurodrosopterinflecks in zwei Flecken mit sehr ähnlichem R_F -Wert.

Es gelang, zwei ausreichend reine Fraktionen I und II für die Aufnahme von CD-Spektren zu erhalten. Die beiden Fraktionen waren optisch aktiv, und ihre CD-Spektren zeigen einen spiegelbildlichen Kurvenverlauf. Die Elliptizitäten sind allerdings bei der langsamer laufenden Fraktion II noch wesentlich geringer, da die Reinigung hier analog zum Drosopterin viel schwieriger ist und der Mangel an Substanz ein mehrfaches Chro-

matographieren bislang unmöglich machte. Die CD-Spektren von Aurodrosopterin I und II sind denen von Isodrosopterin (2) und Drosopterin (1) so ähnlich, daß ersterem die gleiche Stereochemie wie 2 und der Fraktion II die von 1 zu eigen sein dürfte.

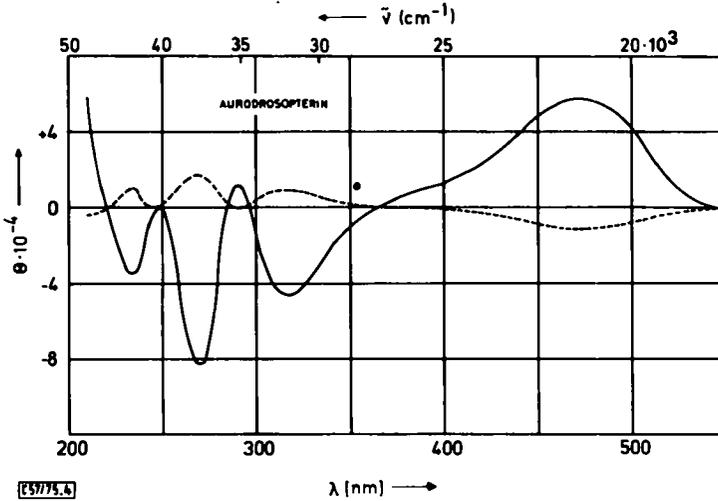


Abb. 4. CD-Spektren von Aurodrosopterin I (—) und II (---) in Wasser

Die spiegelbildlichen CD-Spektren lassen den Schluß zu, daß es sich bei Aurodrosopterin I und II in Analogie zu Isodrosopterin und Drosopterin um Enantiomere handelt. Aus den hohen Elliptizitäten leitet sich ferner ab, daß Aurodrosopterin wohl ebenfalls eine dissymmetrische Struktur, basierend auf einer Atropisomerie, besitzen wird. Auch die Molekülmasse, mit der Ultrazentrifuge zu 454 gefunden, unterstreicht die strukturelle Verwandtschaft von Aurodrosopterin zu 1–3.

Die präparative Trennung von Aurodrosopterin I und II ist wegen der äußerst ungünstigen R_F -Werte weder an Cellulosesäulen noch auf präparativen Celluloseplatten gelungen. Für alle weiteren Versuche wurde deshalb mit dem optisch inaktiven Racemat gearbeitet.

Bei alkalischen Abbauxperimenten erhält man wie bei Droso- und Isodrosopterin Pterin und Pterin-6-carbonsäure. Daneben tritt eine ganze Reihe anderer Abbauprodukte auf, die bei 1–3 nicht beobachtet wurden. Sie konnten jedoch noch nicht identifiziert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle fünf Drosopterinpigmente dimere Pterinderivate sein müssen, da beim chemischen Abbau in allen Fällen Pterin und Pterin-6-carbonsäure gefunden wird und die UV/VIS-Spektren außerordentlich ähnlich sind. Neodrosopterin steht darüber hinaus in besonders enger Beziehung zu den Enantiomeren Droso- und Isodrosopterin, da es beim chemischen Abbau noch weitere gleiche Abbauprodukte (Xanthopterin, 6-Aminopterin) ergibt und sich sehr leicht zu 1 und 2 isomerisiert. Aurodrosopterin ist von Droso-, Isodroso- und Neodrosopterin strukturell insofern etwas verschieden, als es einmal neben gleichen auch andere noch nicht identifizierte Abbauprodukte liefert, zum anderen die pK -Werte im alkalischen Bereich deutlich ver-

ändert sind und es sich schließlich in keines der drei anderen Pigmente 1–3 umwandeln läßt. Aufgrund der Ähnlichkeit vieler physikalischer Daten dürften die strukturellen Unterschiede im Aurodrosopterin wohl nur in der Seitenkette zu suchen sein.

Frau *M. Bischler* danken wir für die Bestimmung der pK-Werte, Frau *U. Markau* für die UZ-Molekülmassebestimmung und Herrn *H. Denzel* für die Aufnahme der CD-Spektren. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* gilt unser Dank für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Isolierung der Pigmente: 100 g *Drosophila melanogaster* Wildstamm werden nicht zerkleinert drei Tage in 300 ml Äthanol/Wasser (3 : 7), mit konz. Salzsäure auf pH 2 gebracht¹³⁾, im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösung färbt sich dabei orange. Man saugt ab und wäscht mit Äthanol, bis das Waschfiltrat fast farblos ist, und wiederholt den Extraktionsprozeß mit dem Rückstand noch mehrmals. Der Extrakt wird bei Raumtemp. i. Vak. einrotiert, wobei ein brauner, gelartiger Rückstand hinterbleibt. Dieser wird in möglichst wenig Wasser aufgenommen und die trübe Lösung über eine Sephadex G-10-Säule (40 × 7 cm) mit bidestilliertem Wasser chromatographiert. Man trennt auf diese Weise bereits einen großen Teil der Verunreinigungen ab. Die Drosopterinpigmente laufen ungetrennt als breites orangefarbenes Band durch die Säule. Diese Fraktion wird einrotiert, der Rückstand wieder in möglichst wenig Wasser aufgenommen und über eine Cellulosesäule (Whatman CF 11, 40 × 7 cm) chromatographiert. Man wäscht mit bidestilliertem Wasser, bis keine fluoreszierenden Verunreinigungen mehr im Eluat nachzuweisen sind. Die Drosopterine sitzen jetzt als breites orangefarbenes Band im oberen Drittel der Säule.

Zur Isolierung von *Neodrosopterin* (3) wird mit sehr verdünntem Ammoniak (0.1 ml konz. Ammoniak/1 Liter Wasser) eluiert. Auro-, Iso- und Drosopterin erscheinen ungetrennt. Neodrosopterin wird als letzte Zone eluiert und enthält noch Verunreinigungen von Isodrosopterin und Drosopterin. Diese Mischfraktion wird bei Raumtemp. einrotiert, in wenig Wasser aufgenommen und auf eine präparative Celluloseplatte (20 × 20 cm, 0.05 cm Schichtdicke, Schleicher und Schüll) aufgetragen. Die Platte wird 4–6 mal in 1 proz. wäßr. Ammoniumchlorid entwickelt, anschließend noch einmal in Wasser, um das Salz zu entfernen. Die Neodrosopterinzone, die gut von Isodrosopterin und Drosopterin getrennt ist, wird abgekratzt, mit ca. 100 ml verd. Ammoniak (1 ml konz. Ammoniak/1 Liter Wasser) in mehreren Portionen eluiert und einrotiert. Man erhält chromatographisch reines Neodrosopterin. Die Ausbeute beträgt 0.8–1 mg Neodrosopterin/100 g Fliegen, wenn alle Arbeiten möglichst schnell und im Dunkeln ausgeführt werden.

Zur Isolierung von *Aurodrosopterin* wird die oben erhaltene Mischfraktion mit Isodrosopterin und Drosopterin auf ein kleines Volumen eingeeengt, auf eine Sephadexsäule G-10 (40 × 7 cm) gegeben und mit bidestilliertem Wasser entwickelt. Isodrosopterin und Drosopterin werden im oberen Drittel der Säule fest adsorbiert, während Aurodrosopterin langsam durch die Säule läuft und in sehr verdünnter wäßriger Lösung aufgefangen werden kann. Man rotiert bei Raumtemp. ein und reinigt durch nochmaliges Chromatographieren über eine Cellulosesäule (30 × 3 cm) mit 0.1 M Essigsäure als Laufmittel. Es wird so chromatographisch reines Aurodrosopterin in einer Ausbeute von 1.7 mg/500 g Fliegen erhalten.

Aurodrosopterin I und II: Zur Trennung der beiden Enantiomeren wird Aurodrosopterin auf eine analytische Cellulosefolie (20 × 20 cm, F 1440, Schleicher und Schüll) aufgetragen. Es wird viermal in n-Propanol/1 proz. wäßr. Ammoniumchlorid (1 : 1) entwickelt. Die R_F -Werte der beiden Komponenten unterscheiden sich nur sehr wenig. Die beiden Zonen werden abgekratzt, mit 0.1 M Essigsäure eluiert und einrotiert. Die langsamer laufende Zone wird noch einmal auf die gleiche Weise gereinigt. Anschließend werden die CD-Spektren aufgenommen.

¹³⁾ B. Ephrussi und J. L. Herold, *Genetics* 29, 148 (1944).

Bestimmung von Schwermetallen in Neodrosoplerin: Es wurde eine Lösung von 0.7 mg Neodrosoplerin in 10 ml Wasser verwendet. Die Bestimmung erfolgte an einem Atomabsorptionsspektrometer der Firma Perkin-Elmer Modell 300 S. Mit Mehrelementlampen wurden auch nicht Spuren von Co, Cr, Cu, Fe, Mn und Ni gefunden.

Molekülmassebestimmungen¹⁾: Es wurde eine Beckman-Ultrazentrifuge Modell E-IM-3 mit Doppelsektorzellen verwendet und bei Raumtemp. und 68 000 UpM gemessen. Die optische Dichte in Wasser betrug bei 480 nm für Neodrosoplerin 0.55 und für Aurodrosoplerin 0.48. Die Einstellung der Gleichgewichte zwischen Sedimentation und Diffusion dauerte etwa vier Tage. Ein nach weiteren 24 h aufgenommenes Ultrazentrifugendiagramm zeigt keine Veränderung.

Spektrophotometrische Methoden: Die UV/VIS-Spektren wurden mit einem Cary-15-Spektrometer und die CD-Spektren mit einem Cary-60-Spektralpolarimeter mit CD-Zusatz 6002 jeweils bei Raumtemp. aufgenommen. Für die Berechnung der Elliptizitäten wurde vorausgesetzt, daß Aurodrosoplerin die gleiche Molekülmasse wie Isodrosoplerin besitzt. Wegen der großen Ähnlichkeit der Verbindungen erschien diese Annahme vorerst berechtigt. Bei Neodrosoplerin wurde für spektrophotometrische Ausbeutebestimmungen ebenfalls gleiche Molekülmasse und gleicher Extinktionskoeffizient wie bei Isodrosoplerin angenommen.

Die Remissionspektren von Chromatogrammen wurden mit Hilfe eines Zeiss-Chromatogrammspektralphotometers PMQ II, M 4 Q 3 gemessen.

Bestimmung der pK-Werte: Die Bestimmung erfolgte nach der spektrophotometrischen Methode¹⁴⁾. Es wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, die im Verhältnis 1 : 10 mit den entsprechenden Pufferlösungen¹⁵⁾ verdünnt wurde. Die Pufferlösungen wurden mit einer Glaselektrode und einem pH-Meter Orion Research, Modell 801, auf den exakten pH-Wert eingestellt. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemp. durchgeführt. Die Spektren wurden im entscheidenden pH-Bereich in Intervallen von 0.2 pH-Einheiten aufgenommen.

Isomerisierung von Neodrosoplerin (3): In 10 ml einer Lösung von Ammoniumformiat (1 g/10 ml) in 1 M Essigsäure wurden 0.35 mg 3 2 Tage im Dunkeln stehengelassen, dann wurde über eine präparative Celluloseplatte (20 × 20 × 0.05 cm, Schleicher und Schüll, Trennsystem: 1 proz. wäbr. NH₄Cl-Lösung) aufgetrennt. Die Gesamtausbeute an Isodrosoplerin und Drosoplerin betrug 33.5%.

Alkalischer Abbau: Jeweils etwa 0.1 mg Substanz wurde in 3–5 Tropfen 5 N NH₃ gelöst. Beim oxidierenden Abbau wurde ein Tropfen 30proz. Wasserstoffperoxid zugegeben. Dann wurde verschlossen 1–2 Tage im Dunkeln stehengelassen. Die Abbauprodukte wurden durch zweidimensionale Chromatographie auf Cellulosefolien (F 1440, Schleicher und Schüll) durch Vergleich der R_F-Werte mit authentischem Material identifiziert. Es wurde zuerst in 1 M Essigsäure und dann in n-Propanol/1proz. wäbr. Ammoniumchlorid (1 : 1) entwickelt. Zusätzlich wurden Chromatogramm-Reflexionsspektren der Abbauprodukte aufgenommen und mit den Reflexionsspektren der Referenzsubstanzen verglichen.

¹⁴⁾ A. Albert und E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, S. 44, Chapman and Hall Ltd., London 1971.

¹⁵⁾ D. D. Perrin, Aust. J. Chem. 16, 572 (1963).