

207. Auftrennung der sauren Anteile von Extrakten aus Bienenköniginnen (*Apis mellifica* L.); Isolierung des als Königinnen-Substanz bezeichneten Pheromones

von M. Barbier, E. Lederer, T. Reichstein und O. Schindler

(11. VIII. 60)

Die Bienenkönigin vermag verschiedene biologische Wirkungen auf die Arbeiterinnen des Stockes auszuüben¹⁾. Bisher konnten mindestens drei dieser Wirkungen auf Pheromone²⁾ der Bienenkönigin zurückgeführt werden: a) eine besonders auf junge Arbeiterinnen gerichtete anziehende Wirkung³⁾; b) die Hemmung der Entwicklung der Ovarien bei den Arbeiterinnen^{3) 4) 5)}; c) die Hemmung der Bildung von Weiselzellen^{4) 6)}. Diese drei Wirkungen lassen sich auch experimentell verfolgen und auf diese Weise angenähert quantitativ erfassen.

Wir beschreiben im folgenden die Isolierung des Pheromones, welches für die unter c) erwähnte Hemmung der Bildung der Weiselzellen verantwortlich ist. Die Isolierung dieser Substanz erfolgte im Laufe einer allgemein gerichteten Untersuchung der Inhaltsstoffe von Bienenköniginnen, wobei die einzelnen Stufen der Extraktion mit der anziehenden Wirkung getestet wurden. Über die Isolierung von 24-Methylencholesterin aus den neutralen Anteilen der Extraktstoffe haben wir früher berichtet^{7) 8)}.

Als Ausgangsmaterial dienten alkoholische Extrakte aus Bienenköniginnen⁹⁾. Die acetonlöslichen Teile dieser Extrakte wurden nach der früher beschriebenen Methode⁸⁾ getrennt. Die mit Pentan, Äther und Chloroform ausschüttelbaren Anteile wurden weiter in neutrale und saure Stoffe zerlegt (Ausbeute vgl. Tab. 2 im exper. Teil). Von den auf diese Weise erhaltenen sechs Fraktionen waren die pentanlöslichen Säuren in der verwendeten Testierungsmethode¹⁰⁾ mit 0,3 γ aktiv; die ätherlöslichen

¹⁾ Vgl. hierzu die zusammenfassende Darstellung durch CH. VERHEIJEN-VOOGD, Z. vergleich. Physiol. *41*, 527 (1959).

²⁾ P. KARLSON & A. BUTENANDT, Annu. Rev. Entomol. *4*, 39 (1959); P. KARLSON & M. LÜSCHER, Naturwiss. *46*, 63 (1959).

³⁾ J. PAIN, Arch. int. Physiol. *59*, 203 (1951); M. BARBIER & J. PAIN, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. *250*, 3740 (1960); C. VOOGD, Experientia *11*, 181 (1955).

⁴⁾ C. G. BUTLER, Proc. Royal Soc. [London] *177B*, 275 (1957); hier ist auch eine Zusammenstellung der früheren Literatur zum Thema enthalten.

⁵⁾ J. PAIN, C. r. Soc. Biol. *145*, 1505 (1951); Chem. Abstr. *46*, 8276 i (1952); Insectes sociaux *1*, 59 (1954); C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. *240*, 670 (1955); Chem. Abstr. *49*, 7762 f (1955); A. P. DE GROOT & ST. VOOGD, Experientia *10*, 384 (1954); ST. VOOGD, *ibid.* *12*, 199 (1956).

⁶⁾ C. G. BUTLER, Trans. Roy. Entomol. Soc. [London] *105*, 11 (1954); Proc. Roy. Entomol. Soc. [London] *31A*, 12 (1956); Chem. Abstr. *51*, 15024a (1957).

⁷⁾ M. BARBIER, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER & E. LEDERER, Nature *184*, 732 (1959).

⁸⁾ M. BARBIER & O. SCHINDLER; Helv. *42*, 1998 (1959).

⁹⁾ Die Bienenköniginnen wurden von GARON BEE Co., Donaldsonville, Louisiana, USA, mit Unterstützung der CIBA A.G. Basel bezogen. – Bei den hier beschriebenen Extrakten handelt es sich um solche, die mit Äthylalkohol bereitet wurden. Später⁸⁾ sind wir dazu übergegangen, mit t-Butanol zu extrahieren.

¹⁰⁾ Vgl. spätere Mitteilung von Frl. J. PAIN.

Säuren zeigten noch eine entsprechende Wirkung mit 12 γ , während sich die Neutralstoffe und die chloroformlöslichen Säuren als inaktiv erwiesen. Die weitere Auftrennung erfolgte nur mit der wirksamsten Fraktion, den pentanlöslichen Säuren. Diese zeigten im Papierchromatogramm in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und mit verschiedenen Entwicklungsmethoden (vgl. Tab. 1 und Fig. 1) mindestens vier Substanzen. Diese wurden mit den Buchstaben A, B, C und D unterschieden, wobei Subst. D im System der Fig. 1 am raschesten wanderte und Subst. A auf der Startlinie stehen blieb.

Tabelle 1. *Papierchromatographische Charakterisierung der pentanlöslichen Säuren*

Substanzen	Rf Chf/Fmd	UV.-Absorption ¹¹⁾	Phenolreaktion nach BARTON ¹³⁾	SbCl ₃ -Reaktion ¹⁴⁾	isoliert aus Zone der Fig. 1
A	0	(+)	+	–	I
B	0,50 \pm 0,05	+	+	–	III
C	0,80 \pm 0,07	+	–	–	V
D	0,95 \pm 0,05	+	+	+	VII

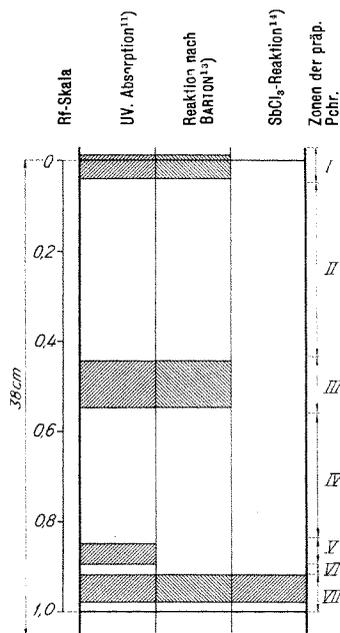


Fig. 1. *Papierchromatographische Trennung der pentanlöslichen Säuren*
System: Chloroform/Formamid; WHATMAN-No. 1-Papier

¹¹⁾ geprüft mit dem durchscheinenden UV.-Licht einer Quecksilberdampfampe auf Fluoreszenzschirm¹²⁾.

¹²⁾ E. von ARX & R. NEHER, *Helv.* 39, 1664 (1956).

¹³⁾ G. H. BARTON, R. S. EVANS & J. A. F. GARDNER, *Nature* [London] 170, 249 (1952).

¹⁴⁾ Z. B. R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* 34, 2278 (1951).

Für die Auftrennung des Gemisches verwendeten wir die präparative Papierchromatographie¹⁵⁾ im System der Fig. 1. Ausser den mit chemischen Methoden nachweisbaren Substanzen extrahierten wir auch die in Fig. 1 angegebenen Zwischenzonen.

Keines der nach üblicher Methode erhaltenen Eluate aus den verschiedenen Zonen bewirkte eine Anziehung von jungen Arbeiterinnen. Das künstlich bereitete Gemisch aller Eluate zeigte wieder die Wirksamkeit der rohen Fraktion, wenn auch bedeutend abgeschwächt.

Von den in Fig. 1 erwähnten Zonen wurden die Eluate aus III, V und VII durch Destillation im Molekularkolben bei 0,01 Torr gereinigt; auf diese Weise wurden die Substanzen B, C und D in einheitlichen Kristallen gefasst.

Substanz B (aus Zone III) ist auf Grund der Farbreaktion nach BARTON¹³⁾ und des pK-Wertes 9,1 ein Phenol. Die Substanz liess sich mit p-Hydroxybenzoesäuremethylester (I) identifizieren. Die Identität wurde sichergestellt durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, vergleichendes Papierchromatogramm (System der Fig. 1), UV.- und IR.-Spektren (vgl. Fig. 2 und Fig. 4), sowie Verlauf der potentiometrischen Titrationskurve (vgl. Fig. 3). Subst. B entstammt möglicherweise der Zucker-Lösung, mit welcher die Bienenköniginnen ernährt wurden und ist somit wahrscheinlich ein Kunstprodukt, das nicht von den Bienenköniginnen selbst produziert wird¹⁶⁾.

Substanz C (aus Zone V) zeigte negative Phenolreaktion nach BARTON¹³⁾. Auf Grund der potentiometrischen Titration (vgl. Fig. 3) muss es sich bei Subst. C um eine Carbonsäure vom Äquiv.-Gew. 183,1 und dem pK-Wert 5,8 handeln. Im UV.-Spektrum in Alkohol (vgl. Fig. 2) zeigte die Substanz bei 208,5 m μ eine intensive Bande ($\log \epsilon = 4,216$)¹⁸⁾, was gut mit der Annahme einer α, β -ungesättigten Carbonsäure übereinstimmt¹⁹⁾. Dementsprechend zeigte das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 5) bei 5,92 und 6,08 μ zwei intensive Banden. Ausserdem war eine Carbonylbande bei 5,85 μ sichtbar. Die letztere liegt als Methylketon vor, wofür zwei zusätzliche Banden bei 8,1 und 8,65 μ sprechen²⁰⁾. Die Methylgruppe ist durch eine Bande bei 7,27 μ sichtbar. Aus dem IR.-Spektrum lässt sich ausserdem folgern, dass die Substituenten an der Doppelbindung *trans* gelagert sein müssen. Eine entsprechende sehr deutliche Bande liegt bei 10,07 μ . Als Vergleichsstoffe haben wir *cis*- und *trans*-Octadecen-(2)-säure²¹⁾ beigezogen. Von diesen zeigte die letztere in KBr die betr. Bande bei 10,20 μ ;

¹⁵⁾ in der von E. VON ARX & R. NEHER¹²⁾ beschriebenen Ausführungsform.

¹⁶⁾ Es ist bekannt, dass solchem Zuckersirup oft etwas p-Hydroxybenzoesäuremethylester (Nipagin) zur Konservierung zugesetzt wird. – Um dies zu belegen, wurde 1 kg Bienenarbeiterinnen, die nur mit Blüten-Pollen aufgezogen und ernährt wurden, in der gleichen Art extrahiert. I konnte nicht nachgewiesen werden¹⁷⁾.

¹⁷⁾ Wir danken Herrn Dr. R. CHAUVIN, Station de Recherches apicoles, Bures-sur-Yvette, France, für die Bereitstellung der Bienen.

¹⁸⁾ Es wurde unterlassen, das Spektrum im Gebiete der langwelligen Carbonylabsorption (270–310 m μ) in 1 cm dicker Schicht aufzunehmen, so dass aus dem UV.-Spektrum nicht auf die An- oder Abwesenheit einer Keto- bzw. Aldehyd-Gruppe geschlossen werden kann.

¹⁹⁾ H. E. UNGNADE & I. ORTEGA; J. Amer. chem. Soc. 73, 1564 (1951); J. CASON & G. SUMRELL; J. org. Chemistry 16, 1181 (1951).

²⁰⁾ Hs. H. GÜNTHARD & L. RUZICKA; Helv. 32, 2125 (1949); M. ROTH, G. SAUCY, R. ANLIKER, O. JEGGER & H. HEUSSER, Helv. 36, 1908 (1953); C. ASSELINEAU, Diss. Paris 1955, S. 142.

²¹⁾ G. S. MYERS, J. Amer. chem. Soc. 73, 2100 (1951).

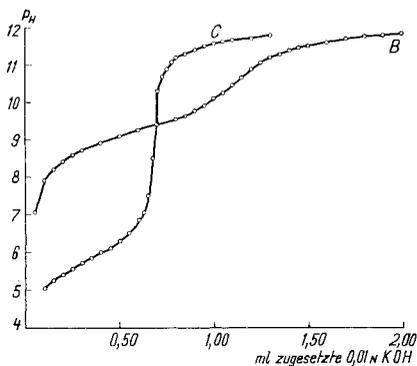


Fig. 3. Potentiometrische Titration der Substanzen B und C mit 0,01N KOH²⁵⁾

B: 1,520 mg Subst. B; Verbrauch 1,106 ml 0,01N KOH; Äquiv.-Gew. Gef. 164,6; pK: 9,15
 C: 1,260 mg Subst. C; Verbrauch 0,688 ml 0,01N KOH; Äquiv.-Gew. Gef. 183,1; pK: 5,8

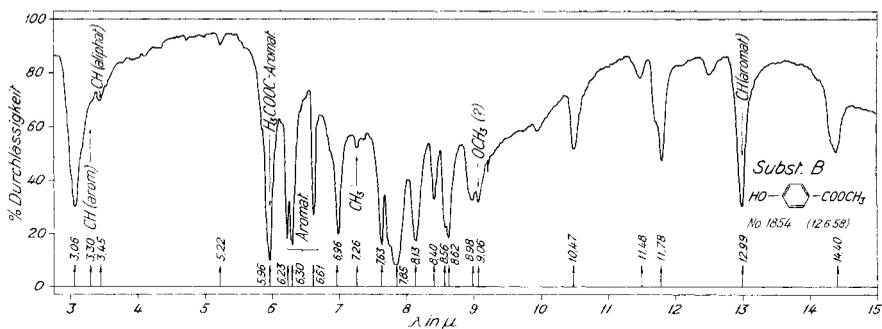


Fig. 4. IR.-Absorpt.-Spektrum von Substanz B (*p*-Hydroxybenzoesäure-methylester (I)²⁶⁾ aus Bienenköniginnen, 0,64 mg in KBr gepresst

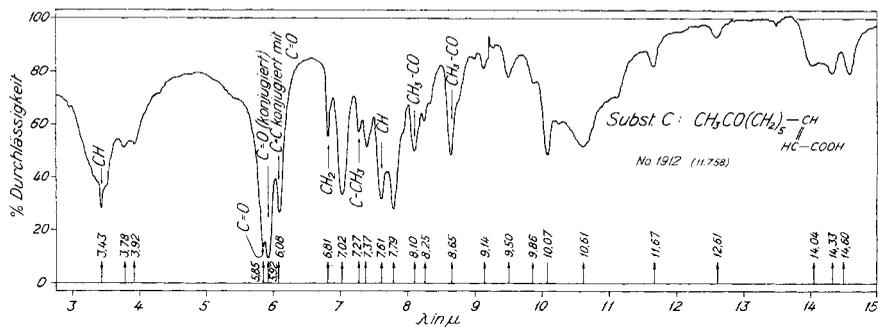


Fig. 5. IR.-Absorpt.-Spektrum von Substanz C (II), 0,96 mg in KBr gepresst²⁵⁾

²⁵⁾ Wir danken Herrn E. FLURY, Mikroanalytisches Laborat. für die Ausführung der Titrations.

²⁶⁾ Aufgenommen von Herrn K. STICH in einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrographen Modell 21, mit NaCl-Prismen.

substance»²⁷⁾ zu vergleichen. Die beiden Spektren zeigten dabei zwischen 900 und 2000 cm^{-1} keine signifikanten Unterschiede²⁸⁾.

Die Konstitution der Subst. C ist bemerkenswert, da der ihr in der Konstitution nahestehende Alkohol III aus dem Weiselzellen-Futtersaft, dem Futtersaft der Bienenarbeiterinnen²⁹⁾ und den Mandibulardrüsen der Bienen³⁰⁾ isoliert werden konnte. Die Konstitution des Alkoholes III ist sowohl durch Abbau³¹⁾ als auch durch Synthese³²⁾ sichergestellt.

Von Substanz D (aus Zone VII) standen nur 2,6 mg zur Verfügung, weshalb die Möglichkeiten der Untersuchung der Substanz beschränkt waren. Die Substanz gab eine positive Phenolreaktion nach BARTON¹³⁾. Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 6) zeigte jedoch zwischen 1600 und 1410 cm^{-1} nicht die charakteristischen Banden eines Aromaten. Eine relativ starke Bande bei 5,87 μ dürfte einer Carbonylfunktion zuzuschreiben sein. Weitere Untersuchungen konnten damit bisher nicht durchgeführt werden.

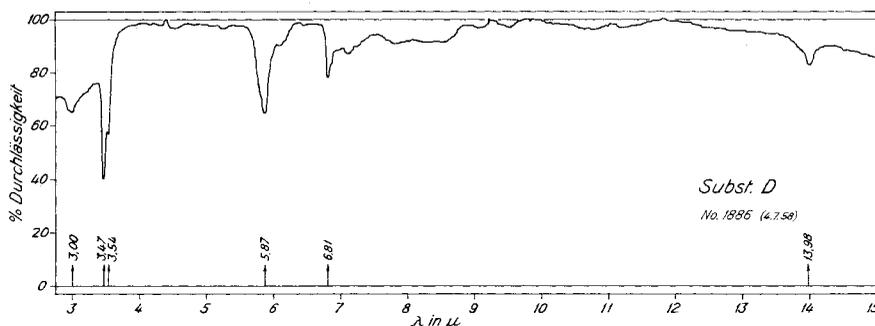


Fig. 6. IR.-Absorpt.-Spektrum von Substanz D, in KBr gepresst (0,36 mg)²⁶⁾

Wir danken dem Centre de la Recherche scientifique, Paris, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Der chemische Teil dieser Arbeit war im Oktober 1958 abgeschlossen. Die Veröffentlichung wurde zurückgestellt bis die biologischen Testierungen eindeutige Resultate geliefert hatten.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze in der benützten Ausführungsform ca. $\pm 2^\circ$. Die Substanzproben zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren, sowie zur potentiometrischen Titration wurden 2 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

Für Lösungsmittel usw. wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: Ae = Diäthyläther; Alk = 95-proz. Äthylalkohol; An = Aceton; Chf = Chloroform; Fmd = Formamid; Pn = n-Pentan; W = Wasser; ML = Mutterlauge und Mutterlauge Rückstand; Pchr = Papierchromatographie.

Extraktion der Bienenköniginnen: Vorreinigung der Extrakte. – 1300 nicht zerkleinerte Bienenköniginnen wurden 9mal mit je 300 ml 95-proz. Alk bei 20° während ca. 24 Std. extrahiert. Hierauf wurden die Bienen im Turmix in Gegenwart von Alk fein zermahlen und noch

²⁷⁾ a) C. G. BUTLER, R. K. CALLOW, N. C. JOHNSTON; *Nature* **184**, 1871 (1959); b) R. K. CALLOW & N. C. JOHNSTON, *Bee World* **41**, 152 (1960).

²⁸⁾ Vgl. auch das publizierte IR.-Spektrum der «Queen-substance» in Lit. ^{27a)}.

²⁹⁾ G. F. TOWNSEND & C. C. LUCAS, *Biochem. J.* **34**, 1155 (1940).

³⁰⁾ R. K. CALLOW, N. C. JOHNSTON & J. SIMPSON, *Experientia* **15**, 421 (1959).

³¹⁾ A. BUTENANDT & H. REMBOLD, *Z. physiol. Chem.* **308**, 284 (1957).

³²⁾ G. I. FRAY, R. H. JAEGER & SIR ROBERT ROBINSON, *Tetrahedron Letters* **4**, 15 (1960).

6mal unter den gleichen Bedingungen mit je 300 ml Alk extrahiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden getrennt im Vakuum eingedampft; Rückstand der Extraktion der ganzen Bienen: 15,8 g; aus den zerriebenen Bienen 12,7 g.

Der erstere Extrakt (15,8 g) diente für Vorversuche. 12,7 g der Extrakte aus den zerriebenen Bienen wurden 10mal mit je 80 ml An kurz ausgekocht, von den ungelösten Teilen (8,32 g) abdekantiert, und die An-Lösungen im Vakuum zur Trockne gebracht: 3,29 g.

3,29 g acetonlösliche Teile wurden nach der in der früheren Arbeit⁸⁾ beschriebenen Methode zerlegt; Ausbeuten s. Tab. 2.

Tabelle 2. Ausbeuten bei der Fraktionierung der acetonlöslichen Anteile (3,29 g)

	Säuren in g	Neutrales in g
in Pn löslich	0,092	2,16
in Ae löslich	0,188	0,255
in Chf löslich	0,014	0,018

Trennung der in Pentan löslichen Säuren durch präparative absteigende Papierchromatographie. – 92 mg der in Pn löslichen Säuren wurden auf 45 19 cm breiten WHATMAN-*No. 1*-Papierbogen im System Chf-Fmd durch präp. Pchr zerlegt. Die Bogen wurden herausgenommen bevor das Lösungsmittel den untern Papierrand erreichte. Nach dem Trocknen wurden auf ausgeschnittenen Streifen die in Fig. 1 angegebenen Zonen lokalisiert.

Zur Eluierung wurden die Zonen in ca. 0,5 cm² grosse Stücke zerschnitten und mit je 40–50 ml W zu einem Brei zerrieben, mit dem gleichen Volumen An versetzt, abgenutscht und in der gleichen Art noch 6mal mit reinem An extrahiert. Aus den vereinigten Auszügen wurde das An im Vakuum abdestilliert. Die verbliebene wässrige Lösung wurde mit 0,6 M H₃PO₄ auf pH3 gestellt und 4mal mit je ca. 100 ml Ae ausgeschüttelt. Die Ae-Auszüge wurden 2mal mit je 10 ml W gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Ausbeuten s. Tab. 3.

Tabelle 3. Ausbeuten aus den verschiedenen Zonen der präp. Pchr von 92 mg in Pn löslichen Säuren

	Ausbeuten in mg	weitere Verarbeitung
Zone I	6,5	nicht gereinigt
Zone II	2,1	nicht gereinigt verworfen
Zone III	41,5	Isolierung von Subst. B
Zone IV	3,0	nicht gereinigt verworfen
Zone V	43,0	Isolierung von Subst. C
Zone VI	4,5	nicht gereinigt verworfen
Zone VII	15,5	Isolierung von Subst. D

Aufarbeitung der Eluate aus Zone III: 34 mg der aus Zone III erhaltenen Eluate wurden im Molekularkolben bei 0,01 Torr destilliert. Es wurden dabei die folgenden Fraktionen abgetrennt:

Badtemperatur 20–60°: 21 mg amorphes farbloses Öl
60–80°: 1. Dest. 11,5 mg kristallines Destillat
 2. Dest. 1,0 mg
 3. Dest. ca. 0,5 mg

Die bei 60–80° Badtemperatur erhaltenen ersten beiden Destillate wurden aus An-Pn kristallisiert: Smp. 117–119°; nach dem Umkristallisieren aus An-Pn resultierten 5,8 mg farblose Prismen, Smp. 121–128°. Optisch inaktiv (geprüft in Chf, *c* = 0,68). Nach Pchr (System Chf/Fmd) einheitlich, R_f = 0,5; UV.: +; Phenolreaktion nach BARTON¹³⁾ positiv. 1,82 mg Subst. verbrauchten bei der potentiometrischen Titration 1,106 ml 0,01N KOH, Äquiv.-Gew. Gef. 164,6; Ber. C₈H₈O₃: 152,12; pK = 9,15; UV.-Spektrum vgl. Fig. 2. Die Substanz ist nach Misch-Smp., UV.- und IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3), pK-Wert und Farbreaktionen identisch mit p-Hydroxybenzoesäure-methylester (I).

Aufarbeitung der Eluate aus Zone V: 43,0 mg der aus Zone V erhaltenen rohen Eluate wurden in Ae gelöst und 3mal mit kleinen Portionen 2N Na_2CO_3 , 1mal mit W, 1mal mit 2N Na_2CO_3 und noch 1mal mit W ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Ae-Lösungen über Na_2SO_4 wurde im Vak. eingedampft; Rückstand 3,3 mg farbloses Öl (nicht untersucht). Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden mit 2N HCl gegen Kongo sauer gestellt, und 4mal mit Ae ausgeschüttelt. Die Ae-Lösungen wurden 2mal mit wenig W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft; Rückstand 28,2 mg. Diese wurden im Molekularkolben bei 0,01 Torr destilliert und dabei die folgenden Fraktionen aufgefangen:

Badtemperatur	20–80°:	6,1 mg farbloses Öl
	80–100°:	4,6 mg farbloses Öl
	100–120°:	11,2 mg kristallin
	120–150°:	1 mg
Dest.-Rückstand	:	5 mg

Die kristalline, zwischen 100 und 120° destillierende Fraktion (roher Smp. 45–50°) wurde aus An-Pn kristallisiert; 6,3 mg farblose Platten, Smp. 52–55°. UV.- und IR.-Spektren vgl. theoret. Teil. 1,260 mg Subst. verbrauchten bei der potentiometrischen Titration 0,688 ml 0,01N KOH, Äquiv.-Gew. Gef. 183,1; Ber. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$:184,23. Die Substanz ist im UV. besonders deutlich mit dem Fluoreszenzschirm sichtbar. Phenolreaktion nach BARTON¹³⁾ und Farbreaktion mit SbCl_3 ¹⁴⁾ negativ.

Aufarbeitung der Eluate aus Zone VII. 15,5 mg der Eluate aus Zone VII wurden mit 50 mg analogem Material aus der Aufarbeitung von 200 Bienenköniginnen³³⁾ vereinigt, in Ae gelöst und 3mal mit 2N Na_2CO_3 , 1mal mit W, 1mal mit 2N Na_2CO_3 und noch einmal mit W ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Ae-Lösungen über Na_2SO_4 wurden diese im Vak. eingedampft; Rückstand 17,5 mg. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden mit 2N HCl gegen Kongo sauer gestellt und 4mal mit Ae ausgeschüttelt. Die Ae-Lösungen wurden 2mal mit wenig W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft; Rückstand 14,2 mg. Diese wurden in Ae aufgenommen und noch einmal in der gleichen Art getrennt; dabei wurden erhalten 9,3 mg in 2N Na_2CO_3 lösliche Säuren und 4,5 mg neutrale Anteile.

Die sauren Anteile wurden im Molekularkolben bei 0,01 Torr destilliert und dabei die folgenden Fraktionen aufgefangen:

Badtemperatur	20– 60°:	1 mg farbloses Öl, nicht untersucht
	60– 80°:	1,5 mg farbloses Öl, nicht untersucht
	80–100°:	2,6 mg kristallin
	120–150°:	Spuren
Dest.-Rückstand	:	4 mg

Die zwischen 80 und 100° destillierenden Anteile wurden aus An-Pn kristallisiert und dabei farblose Körner, Smp. 89–93°, erhalten. UV.-Absorption auf dem Fluoreszenzschirm positiv (dunkler Fleck); Phenolreaktion nach BARTON¹³⁾ positiv; SbCl_3 -Reaktion¹⁴⁾ schwach rosa; IR.-Spektrum vgl. Fig. 6.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Trennung der pentanlöslichen Säuren aus äthanolischen Extrakten von Bienenköniginnen beschrieben. Durch papierchromatographische Analyse konnten darin mindestens vier Komponenten nachgewiesen werden, von denen durch präparative Papierchromatographie drei in Kristallen gefasst werden konnten. Eine davon erwies sich als p-Hydroxybenzoesäure-methylester. Eine weitere Komponente verhindert an Arbeiterinnen die Bildung von Weiselzellen im Bienenstock. Die Konstitution dieser Substanz ist 9-Oxo-decen-(2)-säure.

Organisch-chemische Anstalt der Universität, Basel;
Institut de Biologie physico-chimique, Paris

³³⁾ Die Bienenköniginnen wurden in diesem Falle mit tert.-Butanol an Stelle von Alk extrahiert.