

This article was downloaded by:

On: 30 January 2011

Access details: Access Details: Free Access

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

PHOSPHORORGANISCHE VERBINDUNGEN 117¹, EINE NEUE METHODE ZUM NACHWEIS DER FUNKTIONELLEN GRUPPEN: OH, NH₂ UND SH DURCH AUSLOSUNG VON FLUORESZENZ

Leopold Horner^a; Manfred Vogt^a; Michael Rocker^a

^a Institut für Organische Chemie der Universität Mainz, Mainz

To cite this Article Horner, Leopold, Vogt, Manfred and Rocker, Michael (1987) 'PHOSPHORORGANISCHE VERBINDUNGEN 117¹, EINE NEUE METHODE ZUM NACHWEIS DER FUNKTIONELLEN GRUPPEN: OH, NH₂ UND SH DURCH AUSLOSUNG VON FLUORESZENZ', *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 32: 3, 91 – 97

To link to this Article: DOI: 10.1080/03086648708074266

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03086648708074266>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

PHOSPHORORGANISCHE VERBINDUNGEN 117¹, EINE NEUE METHODE ZUM NACHWEIS DER FUNKTIONELLEN GRUPPEN: OH, NH₂ UND SH DURCH AUSLÖSUNG VON FLUORESZENZ

LEOPOLD HORNER,^{*)} MANFRED VOGT und MICHAEL ROCKER

*Institut für Organische Chemie der Universität Mainz, Johann-Joachim-Becher-
Weg 18-20, D6500 Mainz*

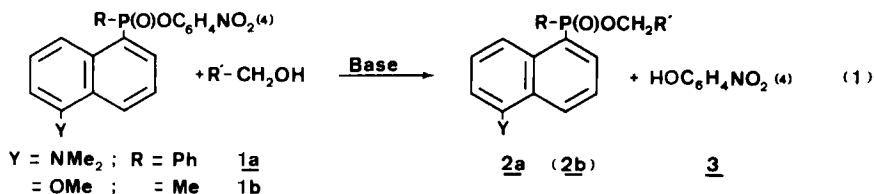
(Received November 20, 1986)

Covalently with a fluorescence support linked nitroarylester groups quench the fluorescence. The substitution of the fragment with the quenching group by an other functional group initiates fluorescence. If this substitution reaction is chemoselective, a reagent for the selective detection of a special functional group is available.

The non fluorescent compounds **1a** and **1b** are OH-(resp. F⁽⁻⁾) selective; the compounds **5** and **7** are NH-selective and the compounds **8** and **9** are SH-selective. Dansyl-nitroimidazolid **7a** discriminates between neutral and basic α -amino acids.

Covalent mit einem Fluoreszenzträger verknüpfte Nitroarylestergruppen löschen die Fluoreszenz. Verdrängt man das Molekülfragment mit der löschenden Nitrogruppe durch eine andere Gruppe, dann tritt Fluoreszenz auf. Verläuft diese Umsetzung chemoselektiv, d.h. gruppenspezifisch, dann hat man Reagentien zum selektiven Nachweis unterschiedlicher funktioneller Gruppen. Die nicht fluoreszierenden Verbindungen **1a** und **1b** sind OH-(bzw. F⁽⁻⁾) selektiv; die Verbindungen **5** und **7** sind NH-selektiv und die Verbindungen **8** und **9** sind SH-selektiv. Das Dansyl-nitroimidazolid **7a** diskriminiert zwischen neutralen und basischen α -Aminosäuren.

Als Ergebnis einer systematischen Suche nach chemoselektiven Reagentien,^{1,2} haben wir die Beobachtung gemacht, daß der nicht fluoreszierende 1-(5-Dimethylaminonaphthalin)-phenylphosphinsäure-4-nitrophenylester **1a** und das entsprechende 5-Methoxynaphthalinderivat **1b** α -Chymotrypsin inhibiert, wobei gleichzeitig Fluoreszenz auftritt. Heute wissen wir aufgrund eines größeren Erfahrungsmaterials, daß covalent mit dem in 5-Stellung donorsubstituierten Naphthalinringgerüst seitenkettenverknüpfte Nitrogruppen die Fluoreszenz löschen.³ Werden die Molekülfragmente mit den Nitrogruppen nukleophil austretende Gruppe nach (1) verdrängt, dann tritt Fluoreszenz auf. Die Geschwindigkeit der Umsetzung (1) hängt auch von der Art der Base ab.⁴

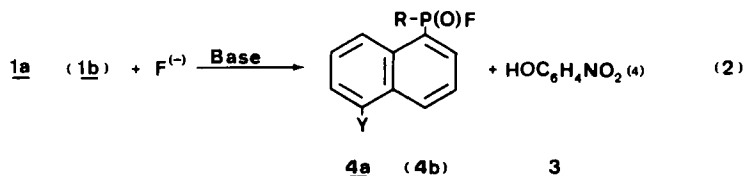


^{*)} Dem ehemaligen Mitarbeiter, dem Kollegen und Freund, dem erfolgreichen Industriechemiker in Praxis und Organisation, Herrn Professor Dr. Hellmut Hoffmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

Triethylamin ist gut; 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) ist aber deutlich besser.

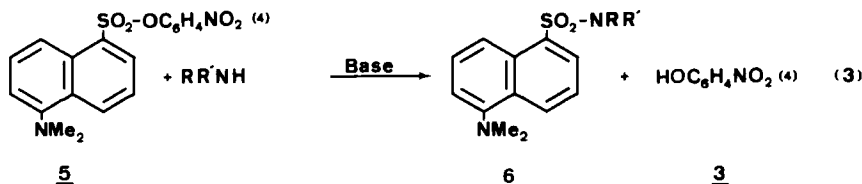
Verbindungen vom Typ 1a (bzw. 1b) als OH(bzw. F⁻) selektive Reagentien

Die von uns beschriebene durch die $\text{>P(O)—OC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -Gruppe gesteuerte Chemoselektivitätsbeziehung⁵ gilt auch für die Verbindungen **1a** und **1b**. **1a** und **1b** sind OH-selektiv, d.h. in Verbindungen oder Verbindungsgemischen, die OH-NH- oder SH-Gruppen enthalten, reagiert nur die alkoholische Funktion nach (1) im Sinne einer nukleophilen Verdrängung der *p*-Nitrophenyloxy-Gruppe zum fluoreszierenden Ester **2**. (**2a** fluoresziert grün; **2b** fluoresziert blau). Zu beachten ist, daß die Verbindungen **1a** (bzw. **1b**) auch relativ schnell nach (2) mit schwach solvatisierten Fluoridionen reagieren, wie sie etwa im Tetrabutylammoniumfluorid vorhanden sind. Es entstehen *p*-Nitrophenol **3** und das entsprechende Phosphylfluorid **4**, das sich wieder durch seine Fluoreszenz verrät. (**4a** grün; **4b** blau). Fluoridionen in stark wasserhaltigen organischen Solventien reagieren aber nur langsam mit anschließender Hydrolyse zur Phosphinsäure.

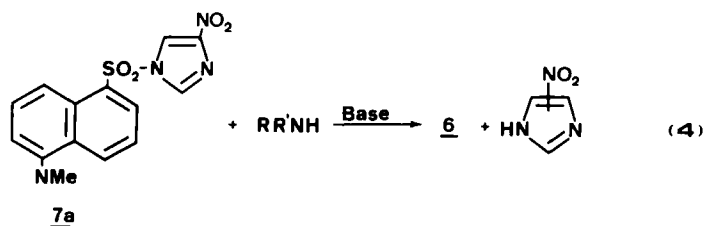


Der 1-(5-Dimethylamino-naphthalin)-sulfonsäure-4-nitrophenylester 5 als NH-selektives Reagenz

Der bereits beschriebene "Dansyl-4-nitro-phenylester" **5**⁶ hat die willkommene aber vor uns noch nicht ausgewertete Eigenschaft, nicht zu fluoreszieren, aber nach selektiver Umsetzung mit NH-Verbindungen zu **6** eine grüne Fluoreszenz auszustrahlen. Verbindungen mit OH- bzw. SH-Gruppen reagieren dagegen nicht mit **5** in den zum Nachweis von OH-Gruppen üblichen Zeiten. Die Verbindung **5a** (bzw. seine 5-Methoxyverbindung **5b**) ist daher im Sinne der Beziehung (3) NH-selektiv.



Das gleiche gilt auch für das nicht fluoreszierende 1-(5-Dimethylamino-naphthalin)-sulfonsäure-nitroimidazolid ("Dansyl-nitroimidazolid") **7a**, das dem entsprechenden *p*-Nitrophenylester **5a** an Reaktivität überlegen ist. (Die Stellung der Nitrogruppe in **7a** ist nicht bewiesen).



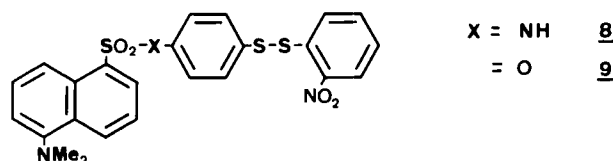
Die Verbindung **5** reagiert nach unseren bisherigen Erfahrungen nur mit primären und sekundären aliphatischen Aminen (z.B. *n*-Butylamin und Piperidin, auch Imidazol), nicht dagegen mit Anilin und dem sterisch anspruchsvollen Di-*i*-propylamin.

Das Dansylnitroimidazolid **7a** setzt sich in Lösung (Chloroform) spontan mit *n*-Butylamin und Piperidin um. Mit Imidazol und Di-*i*-propylamin zeigt sich die Fluoreszenz erst nach 30 min.

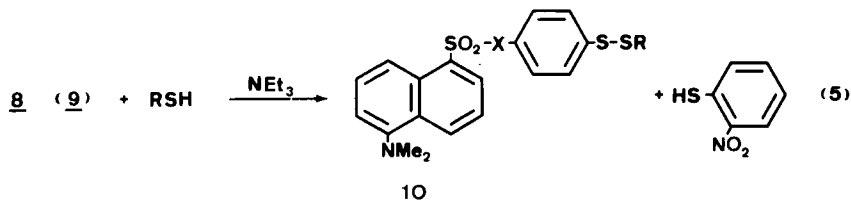
In Dünnschichtchromatogrammen kann zwischen basischen und neutralen Aminosäuren unterschieden werden. Erstere reagieren mit **7a** sofort, letztere langsamer erst in Gegenwart von Triethylamin.

SH-selektive Reagenzien auf Dansylbasis

Zum selektiven Fluoreszenznachweis der SH-Funktion haben sich die Verbindungen **8** und **9** bewährt.



Die o-ständige Nitrogruppe in **8** und **9** löscht die Fluoreszenz. Wird der endständige Rest in **8** bzw. **9** durch ein anderes Thiol nach (5) verdrängt, dann tritt Fluoreszenz auf.



Überprüfte Beispiele für SH sind: *n*-BuSH, Cysteamin, Cysteinmethylester und Glutathion (red.).

Für den praktischen Einsatz kommt nur die Verbindung **8** infrage. **9** reagiert wohl mit SH-Verbindungen nach (5) zum Sulfonsäureester **10** (X=O), der aber in Gegenwart von NH-Verbindungen, z.B. *n*-Butylamin, schließlich zum Sulfonamid abreagiert.

Diese Folgereaktion ist im Dünnschichtchromatogramm leicht zu erkennen. Es bildet sich das 1-(5-Dimethylamino-naphthalin)-sulfonsäure-*n*-butylamid, das als zweiter fluoreszierender Fleck in Erscheinung tritt.

Einige Beispiele der chemoselektiven Detektion von OH-, NH und SH-Gruppen

Verwendet werden ca. 0,1 m Lösungen von *L*-Serin und *L*-Alanin jeweils in Wasser und von *L*-Cysteinmethylester-hydrochlorid in Methanol. Zur Detektion dienen Lösungen von ca. 300 mg der Reagentien: **1a**, **5a**, **7a**, **8** und **9** in jeweils 100 ml Dioxan bzw. Tetrahydrofuran. Die oben genannten Aminosäuren werden getrennt auf eine Kieselgelplatte (auch Filterpapier ist geeignet) aufgetragen und die Flecke getrocknet. Besprüht man die Platte mit der das Reagenz **8** enthaltenden Lösung und hält die Platte kurz in eine Atmosphäre von Triethylamin, so gibt sich Cystein sofort durch Fluoreszenz zu erkennen.

Besprüht man nach dem Trocknen die Platte mit der THF-Lösung von **1a**, dann reagiert nur Serin, und die Fluoreszenz des entsprechenden Esters erscheint.

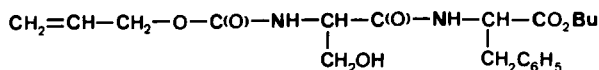
Nach erneutem Trocknen besprüht man die Platte mit der Lösung des Reagenz **5a** und stellt sie in eine Atmosphäre von Triethylamin. Nach ca. 1 h erscheint die durch Alanin verursachte Fluoreszenz. Auch in diesem Test ist das Nitroimidazolid **7a** dem 4-Nitrophenylester **5a** gegenüber überlegen.

Über den Einfluß der Basen auf die Geschwindigkeit der nukleophilen Verdrängung der *p*-Nitrophenyloxy-Gruppe aus **1a** durch alkoholische Gruppen orientiert Tabelle I. 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) ist die wirksamste Base, die wir bisher gefunden haben.

TABELLE I
Einfluß der Base auf den Fluoreszenznachweis von OH-Gruppen mit dem Phosphinsäure-*p*-nitrophenylester **1a**

Testalkohol	Base	Fluoreszenz	nach min
<i>n</i> -Butanol	Et ₃ N-Dampf	—	—
" "	Imidazol	grün	5
Serin	"	grün	5
Triethanolamin	—	grün	3
Serin	DMAP	grün	3
Ser-Phe	"	grün	1
Phenol	—	—	—
Phenol	NEt ₃ -Dampf	grün	2

Nachweis von OH- bzw. SH-Gruppen in komplexeren Verbindungen



hat auf einer Kieselgelplatte mit dem Laufmittel: Petrolether/Essigester 1:1 einen R_F -Wert von 0,35. Auf der Platte verrät sich die Position des Serinderivates

nach dem Besprühen mit einer Lösung von **1a** und DMAP sofort durch Fluoreszenz.

2.) Glutathion (in seiner reduzierten Form) zeigt in dem Laufmittel: Pyridin/Essigester/Butanol/Wasser 2:1:4:2 einen nur geringen R_F -Wert. Nach dem Besprühen der Platte mit einer Lösung von **8** tritt sofort Fluoreszenz auf.

Über den Einfluß von gelöstem Nitrophenol auf die Fluoreszenz

Da bei den Umsetzungen (1), (2) und (3) immer *p*-Nitrophenol **3** (bzw. Nitroimidazol) freigesetzt wird, haben wir geprüft, ob die Fluoreszenz des Sulfonamids **6** durch zugesetztes *p*-Nitrophenol verändert wird. Bereits bei einem Verhältnis von 1:0,5 für die Verbindungen **6** und **3** wird eine leichte Schwächung der Fluoreszenz beobachtet. Die Löschung ist aber bei einem Verhältnis 1:5 total. Arbeitet man jedoch im Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-5} Mol/l, dann tritt der Löscheffekt nicht mehr auf.

Die Grenze der nach der beschriebenen Methode durch Augenschein nachweisbaren Mengen an Alkoholen, Aminen und Thiolen liegt bei 10^{-7} bis 10^{-8} Mol. Diese Nachweisgrenze kann durch Kombination mit einem Fluoreszenzspektrometer sicher noch erniedrigt werden.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Personal- und Sachmittel.

EXPERIMENTELLER TEIL

Literaturbekannte Verbindungen:

1-(5-Dimethylaminoaphthalin)-phenylphosphinsäure-4'-nitrophenylester **1a**; ⁷ 1-(5-Methoxynaphthalin)-methylphosphinsäure-4'-nitrophenylester **1b**; ⁷ 1-(5-Dimethylaminonaphthalin)-phenylphosphinsäurefluorid **4**; ⁷ 1-(5-Dimethylaminonaphthalin)sulfonsäure-4'-nitrophenylester **5**. ⁶

1-(5-Dimethylaminonaphthalin)sulfonsäure-4'-nitroimidazolid **7a**. Die Lösung von 5,4 g (20 mmol) Dansylchlorid, 1,25 g Nitroimidazol und 2 g Triethylamin in 150 ml Tetrahydrofuran/Ether/Aceton 1:1:1 wird 6 h unter Rückfluß gerührt. Nach 12 h weiterem Rühren bei Raumtemperatur wird von ausgefallenem Triethylaminhydrochlorid abgesaugt und eingengt. Orangefarbene Kristalle, Schmp. 46–47°C, Ausb.: 5,4 g, 78% d.Th..

*Dansylamid des 4-Amino-2'-nitrodiphenyl-1-1'-disulfids **8**.*

4-Amino-2'-nitro-diphenyldisulfid · HCl Zur Lösung von 6 g (48 mmol) 4-Aminothiophenol in 200 ml Ether tropft man langsam die Lösung von 9,1 g (48 mmol) *o*-Nitrophenylsulfenylchlorid in 150 ml Ether. Der entstandene Niederschlag (13 g) wird abgesaugt und gründlich mit Ether gewaschen. Das Rohprodukt wird in 300 ml siedendem Ethanol gelöst und der sich abscheidende Niederschlag nochmals aus 100 ml Ethanol umkristallisiert. Ausbeute 12 g (79%) Schmp. 193–195°Cu.Z.

Die Titelverbindung **8** erhält man, wenn man 3,2 g (10 mmol) 4-Amino-2'-nitro-diphenyl-1,1'-disulfid · HCl und 2,7 g (10 mmol) Dansylchlorid in 40 ml trockenem Pyridin 24 h unter Rühren auf 100°C erhitzt.

Ausbeute an Rohprodukt: 4,25 g (83%) Schmp. 142–144°C. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Aceton/Wasser, Schmp. 153°C. Ausbeute 1,2 g (23%).

$C_{24}H_{21}N_3O_4S_3$ (511,6)	Ber. C 56.34 H 4.14 N 8.21
MW 511.65	Gef. C 55.63 H 4.45 N 7.83

IR(KBr) 3210 (—NH—); 3075, 1560 (Aromat); 1300, 1140 (—SO₂); 725 (Aromat); 1480, 1505 (Nitro); 730, 830 subst. Arom.

UV (*i*-Propanol) $C = 2 \times 10^{-5}$ m; $5 \times 10^{-5} \lambda_1 = 560$ nm; $\kappa_1 = 8260$; $\lambda_2 = 247$ nm $\kappa_2 = 36\,300$.

Umsetzung von 8. a) mit *n*-Butylmercaptan/Triethylamin; Fluoreszenznachweis: $\lambda_A = 365$, $\lambda_E = 526$ nm (grün) $R_F = 0,87$ (Laufmittel: Benzol/Cyclohexan/Essigsäure 50:45:5).

b) mit Cysteaminhydrochlorid/Triethylamin. Fluoreszenznachweis:

$\lambda_A = 380$ nm; $\lambda_E = 525$ nm (grün)

Im DC sind 2 fluoreszierende Flecken zu erkennen: $R_{F1} = 0$; $R_{F2} = 0,24$ (nach 24 h).

Dansylester des 4-Hydroxy-2'-nitro-diphenyl-1,1'-disulfids 9. Zur Lösung von 2 g (7,4 mmol) Dansylchlorid und 7,5 g Triethylamin in 150 ml Ether tropft man die Lösung von 2,1 g (7,4 mmol) 4-Hydroxy-2'-nitro-diphenyl-1,1'-disulfid in 50 ml Ether zu. Man arbeitet wie bei⁶ angegeben auf. Ausbeute: 1,5 g (40%) Schmp. 115°C (aus Methanol/Aceton).

$C_{24}H_{20}N_2O_5S_3$ (512,6) Ber. C 56.23 H 3.93 N 5.46
Gef. C 56.25 H 4.24 N 4.94

IR(KBr): 3080 (Aromat), 1570 (Aromat), 1310, 1155 (—SO₂—); 790 (Aromat); 1490, 1515 (Nitro); 1180, 1340, 1370

UV (*i*-Propanol) $C = 3 \cdot 10^{-5}$ Mol/1 $\lambda_1 = 347$ nm; $\kappa_1 = 6670$ $\lambda_2 = 246$ nm; $\kappa_2 = 29270$

Dansyl-nitroimidazolid- 7a als Nachweisreagenz für basische und neutrale α -Aminosäuren und andere Modellverbindungen. Über die Analyse von Aminosäuren nach Überführung in Dansylderivate in der HPLC, der Dünnschichtchromatographie und der Fluoreszenzspektroskopie ist wiederholt berichtet worden.⁹⁻¹⁴ In der vorliegenden Untersuchung haben wir geprüft: a) ob das Dansyl-nitroimidazolid 7a als Sprühreagenz zum Nachweis von Verbindungen mit NH-Funktionen in der Dünnschichtchromatographie geeignet ist und b) ob auf diese Weise zwischen basischen und neutralen Aminosäuren unterschieden werden kann.

Zwei Wege wurden beschritten:

A) die dünnsschichtgetrennten Verbindungen mit NH-Funktionen werden mit Lösungen von 7a besprüht und durch Fluoreszenz lokalisiert.

B) Das Gemisch der NH-Verbindungen wird auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, an der Startstelle mit Lösungen von 7a betupft, wobei die Reaktion (4) abläuft und dann die Reaktionsprodukte 6 mit einem geeigneten Laufmittel getrennt.

Analyse nach A. a) Testflecken nachstehender Verbindungen werden einzeln auf eine DC-Platte (Macherey-Nagel, Polygram Sil G/UV) unter Variation der Probenmengen und der Konzentration aufgetragen und mit Lösungen von 7a besprüht: *n*-Butylamin, Piperidin, Diethylamin, Lysin, Arginin, Glycin, Alanin, Phenylalanin, Imidazol und Anilin. Auf den getrockneten Platten sind im UV-Licht (365 nm) die primären und sekundären aliphatischen Amine aber auch die basischen Aminosäuren an ihrer sofort auftretenden Fluoreszenz zu erkennen. Bringt man die sorgfältig getrocknete Dünnschichtplatte mit den Testflecken in eine Atmosphäre von trockenem Triethylamin, dann verraten sich auch die neutralen Aminosäuren, Imidazol und Anilin durch Fluoreszenz. Das Dansylnitroimidazolid 7a hat allerdings den Nachteil, daß es auf der Dünnschichtplatte in der Triethylaminatmosphäre bei Gegenwart von Wasserspuren hydrolysiert und damit eine Fluoreszenz des gesamten Untergrundes verursacht.

b) Man trägt die oben genannten Aminosäuren nebeneinander auf der Startlinie auf und läßt sie mit dem üblichen Lösungsmittelgemisch: Eisessig:Pyridin:*n*-Butanol:Wasser (1:1:1:1 v:v) laufen. Man besprüht die bei 130°C im Trockenschrank getrocknete Platte mit der Lösung von Dansylnitroimidazolid 7a und betrachtet sie im UV-Licht. Die Flecken sind schlechter als im Falle Aa) zu erkennen. Offenbar stört Pyridin, das fest am Silicagel des Plattenmaterials fixiert ist.

Analyse nach B. Wäßrige Lösungen von Gly, Ala, Lys, Arg und His werden jeweils isoliert auf die Startlinie einer DC-Platte aufgetragen und trocken gefönt. Auf die einzelnen Aminosäureflecke läßt man lokal eine Lösung von Dansyl-nitroimidazolid in Aceton einwirken. Die so behandelte Dünnschichtplatte bringt man in eine Trennkammer mit Ethanol als Laufmittel.

Ergebnis: Lysin, Arginin und Histidin sind an einer schwachen Fluoreszenz mit R_F -Werten von 0,05–0,25 zu erkennen. Nicht umgesetzte Aminosäuren bleiben an der Startlinie sitzen (Jodkammer).

Nicht umgesetztes Dansyl-nitroimidazolid erscheint als gelber, nicht fluoreszierender Fleck bei $R_f = 0,8$.

In einer weiteren Versuchsreihe werden auf der Startlinie einer Dünnschichtplatte die folgenden Aminosäuren nebeneinander aufgetragen: Lys, Arg, His, His + Et₃N, Ala und Ala + Et₃N. Die Platten werden getrocknet, mit einer Lösung von Dansyl-nitroimidazolid betupft und mit Ethanol als Laufmittel behandelt. Die basischen Aminosäuren Lys und Arg aber auch die neutralen Aminosäuren His und Ala in Kombination mit Triethylamin werden in fluoreszierende Derivate mit unterschiedlichen R_f -Werten übergeführt.

Einige experimentelle Angaben zur Detektion von Aminosäuren: Verwendet wurden Lösungen von jeweils 10 mg Aminosäure in 10 ml Wasser. Davon werden jeweils ca. 2 µl mit einer Kapillare auf die DC-Platte aufgetragen. Dansyl-nitroimidazolid **7a**; als Sprühreagenz: 50 mg in 50 ml Aceton; als Tüpfelreagenz: 50 mg in 10 ml Aceton. Laufzeiten: a) mit dem Vierkomponentengemisch ca. 1 h; b) in Ethanol, ca. 15 min. R_f -Werte (Werte in Klammern) der fluoreszierenden Dansyl-aminosäurederivate in Ethanol; Lys (0,08); Arg (0,16) His (0,1) Die R_f -Werte sind identisch mit Referenzverbindungen, die durch Umsetzung der jeweiligen Aminosäure mit Dansylchlorid entstehen. Aus Arginin und **7a** entsteht eine 1:1 Verbindung. Die Verknüpfungsstelle des Dansylrestes mit dem Arginin ist noch unbekannt.

LITERATUR

1. 116. Mitteilung, L. Horner und H.-W. Flemming, *Phosphorus and Sulfur*, **22**, 161 (1985).
2. L. Horner und H.-W. Flemming, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**, 303 (1985).
3. Vergl. auch: E. L. Wehry und L. B. Rogers in Guetbault, *Fluorescence*, Marcel Dekker Inc New York 1967.
4. L. Horner und R. Gehring, *Phosphorus and Sulfur*, **12**, 295 (1982).
5. L. Horner und R. Gehring, *Phosphorus and Sulfur* **11**, 157 (1981).
6. C. M. Himel, W. G. Aboul-Saad und S. Uk, *J. Agr. Food, Chem.* **19**, (6) 1175 (1971).
7. L. Horner und H.-W. Flemming, *Phosphorus and Sulfur*, **19**, 345 (1984).
8. S. Magnusson, J. E. Christian und G. L. Jenkins, *J. Am. Pharm. Assoc.* **36**, 257, 260 (1947).
9. N. Seiler und J. Wiechmann, *Experientia* **20**, 559 (1964).
10. N. Seiler und J. Wiechmann, *J. Chromatography*, **28**, 351 (1967).
11. N. Seiler und B. Knödgen, *J. Chromatography* **131**, 109 (1977).
12. J. Wesenberg und R. J. Thibert, *Mikrochim. Acta* **1977**, I, 469.
13. B. Davis, *J. Chromatography* **151**, 252 (1978).
14. K. T. Wang und K. R. Woods, *Biochem. Biophys. Acta* **133**, 369 (1967).