

ZUR KENNTNIS DES MECHANISMUS DER ALLOXANWIRKUNG

I. MITTEILUNG:
DER EINFLUSS VON ALLOXAN AUF EIWEISSTOFFE

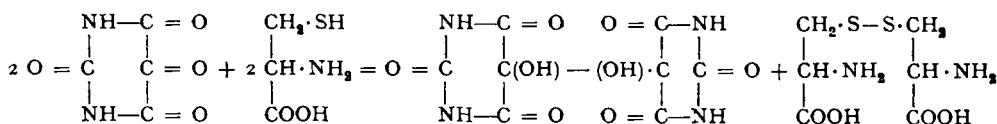
von

ZBYNĚK BRADA

*Forschungsabteilung des Masaryk Radiumtherapeutischen Institutes,
Brno (Tschechoslowakei)*

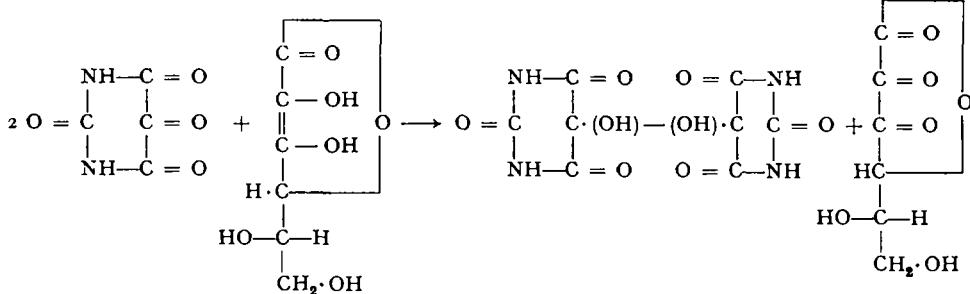
Die Frage der Wirkung des Alloxans bei der Hervorrufung des experimentellen Diabetes wurde schon von manchen Autoren erwähnt^{1,2}. Auf Grund der Beobachtungen³, dass das Glutathion nach der Alloxaneinspritzung im Blut verschwindet, meint ABDERHALDEN, dass Alloxan nicht direkt wirkt, sondern sofort mit Cystein, Glutathion und Ascorbinsäure reagiert. *In vitro* verlaufen diese Reaktionen auf folgende Weise:

Alloxan mit Cystein:



ABDERHALDEN stellte auch fest, dass Alloxantin diabetogen wirkt, allerdings nicht so intensiv als Alloxan.

Alloxan mit Ascorbinsäure:



Tatsächlich fand auch KARRER⁴ und unabhängig von ihm fanden auch LEECH UND BAILEY⁵ und TIPSON⁶, im Vergleich zu gesunden Personen, keine Erhöhung der vorhandenen Alloxanmenge in Leichen von Diabetikern. Jedenfalls ist die Menge aber zu gering, um den Diabetes hervorzurufen.

Es gelang ABDERHALDEN und auch anderen Autoren⁷ nachzuweisen, dass Tiere die vorher mit Cystein behandelt wurden, gegen die Alloxanwirkung resistent bleiben.

Dieser Befund wurde auch von anderen Autoren bestätigt, die beobachteten, dass durch Fütterung mit einer speziellen Diät, die viel Cystein enthält (Casein usw.) eine analoge Resistenz zu erzielen ist.

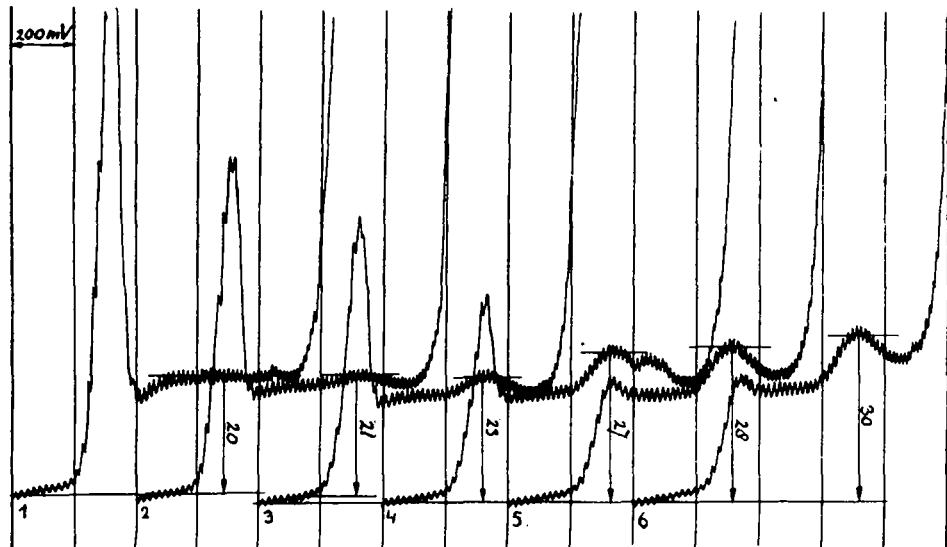


Fig. 1. Kathodische Reduktion der Mischung: /Kobalt (II)-puffer, Alloxan. Empfindlichkeit des Galvanometers 1/300, Akkumulator 4.0 V. Anfang der Reduktion -0.8 V.

Auf Grund dieser Beobachtungen können wir vielleicht auch endlich aufklären, wie es in Literaturangaben^{9, 10, 11, 12, 19} über die diabetogene Wirkung der Diallursäure zu manchen Differenzen kam. Durch die Reaktion des Alloxans kommt es nach der Meinung mancher Autorer zur Änderung des Redoxpotentials des Blutes. Dies hat die Zersetzung der β -Zellen der Pankreasdrüse zur Folge. Andere Autoren glauben, dass diese spezifische Wirkung durch eine andere Substanz, die aus Alloxan, oder durch die Alloxanwirkung im Organismus entsteht, verursacht wird.

Die besprochenen Ergebnisse der bisherigen Forschung zwingen uns geradezu nachzuprüfen, ob und in welchem Masse auch Eiweißstoffe durch Alloxanwirkung beeinflusst werden und ob die Wirkung reversibel oder irreversibel ist.

BERNHARD¹³ und seine Mitarbeiter versuchten diese Frage zu lösen. Sie prüften ob Alloxan mit dem Bluteiweiß in Reaktion tritt, indem sie den Reststickstoff (RN) im Blut und Serum vor und nach Zugabe bekannter Alloxanmengen bestimmten. Sie stellten fest, dass RN dabei nicht abnimmt, sondern bei höheren Konzentrationen zunimmt.

Die Autoren betrachteten diese Tatsache als Beweis dafür, dass Eiweißkörper durch Alloxan nicht beeinflusst werden.

Die polarographische Methode gibt uns eine Möglichkeit, verschiedene Änderungen in Eiweißmolekülen durch Änderung gewisser physikalisch-chemischer Eigenschaften zu verfolgen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Der polarographische Teil dieser Arbeit wurde mit dem Polarographen System SHIKATA-HEYROVSKY durchgeführt.

In der ersten Untersuchungsreihe wurden allgemeine polarographische Eigenschaften des Alloxans studiert. Es wurde festgestellt, dass Alloxan unter gewissen Bedingungen polarographisch reduzierbar ist. Die Ergebnisse dieser Versuche werden an anderer Stelle veröffentlicht.

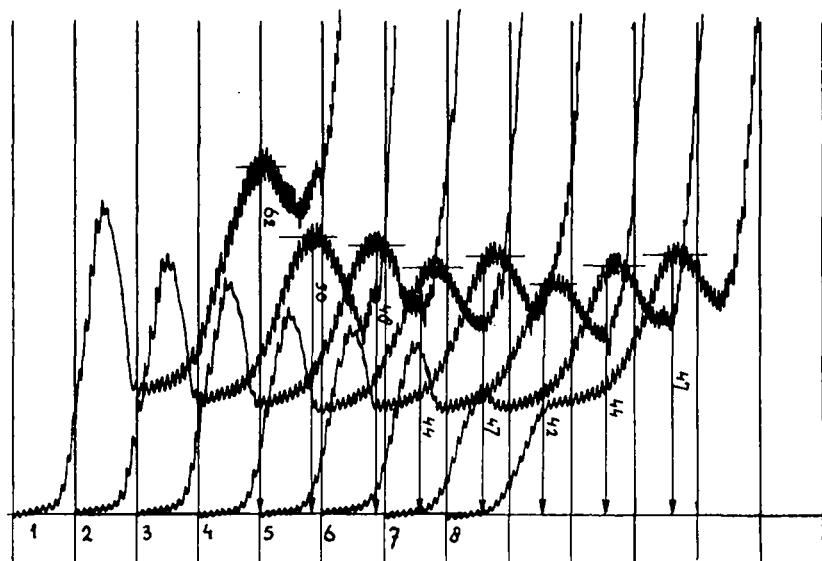


Fig. 2. Polarographische Verfolgung des Einflusses von Alloxan auf die Cystinstufe. Empfindlichkeit des Galvanometers 1/300, Akkumulator 4.0 V. Anfang der Reduktion -0.8 V.

EINWIRKUNG VON ALLOXAN AUF KOBALT (II)-PUFFER

Die Zusammensetzung des Puffers war: 1 ml N/100 CoCl_3
0.50 ml N NH_4Cl
0.50 ml N NH_4OH

Die untersuchte Lösung wurde hinzugefügt und auf 5 ml aufgefüllt. Siehe Fig. 1 für die erhaltenen Stromspannungskurven.

EINFLUSS VON ALLOXAN AUF DIE CYSTINSTUFE

Zur 0,5 ml Cystin M/1000, in n/100 HCl gelöst, wurde 1 ml Alloxanlösung verschiedener Konzentrationen hinzugefügt (siehe bei dem folgenden Versuch die Konzentrationsangaben). Die Mischung wurde eine Stunde stehen gelassen, dann mit Kobalt(II)-puffer vereinigt, auf 5 ml aufgefüllt und polarographiert (Fig. 2).

EINFLUSS VON ALLOXAN AUF EIWEISSSTOFFE

a) Einfluss auf Ovoalbumin

Die Ovoalbuminlösung wurde auf folgende Weise dargestellt: 5 g Eieralbumin wurden in 100 ml Wasser suspendiert und nach eintägigem Stehen zentrifugiert. Diese Grundlösung wurde dann noch zehnmal verdünnt; also entspricht 1 ml dieser Lösung 0,0025 g Trockensubstanz.

0.25 ml dieser Lösung (0.0005 g Eiweiß entsprechend) wurden in Reagensgläser abpipettiert und dann 1 ml Alloxan in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

Versuchsnummer	Alloxankonzentration	Versuchsnummer	Alloxankonzentration
1	1.00 ml Wasser	5	1.00 ml M/50
2	1.00 ml M/200 All.	6	1.00 ml M/20
3	1.00 ml M/100	7	1.00 ml M/10
4	1.00 ml M/75		

Nach einstündigem Stehen wurden diese Reaktionsgemische mit Kobalt(II)-puffer vermischt und sofort polarographiert (Fig. 2).

b) Einfluss von Alloxan auf Bluts serum

0.25 ml eines normalen menschlichen Blutserums wurden abpipettiert und 1 ml Alloxanlösung der oben angeführten Konzentrationen hinzugefügt. Nach einer Stunde Stehen wurde diese Lösung zum Kobalt(II)-puffer hinzugefügt. Dann wurde sofort polarographiert. Wir erhielten gleiche Resultate wie mit Eiweißalbumin.

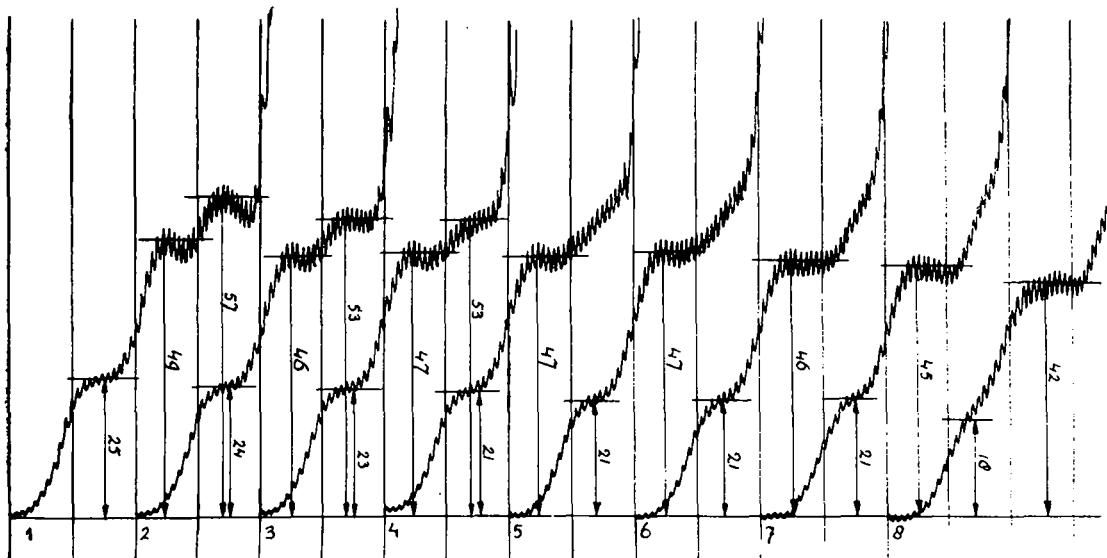


Fig. 3. Polarographische Verfolgung des Einflusses von Alloxan auf Ovalbuminlösung. Akkumulator 4.0 V. Empfindlichkeit des Galvanometers 1/300. Anfang der Reduktion -0.8 V.

POLAROGRAPHISCHE EIGENSCHAFTEN DES DURCH ALLOXAN DENATURIERTEN EIWEISSES NACH DIALYSE

Die folgenden Lösungen wurden hergestellt:

- | | | |
|---|--|--|
| a. 2.50 ml Albuminlösung (der oben angeführten Konzentration) | b. 2.50 ml Albuminlösung 10.00 ml M/50 Alloxan | c. 2.50 ml Albuminlösung 5.00 ml Wasser 5.00 ml M/10 Alloxan |
| 5.00 ml Wasser | | |
| 5.00 ml M/50 Alloxan | | |

Diese Lösungen wurden eine Stunde stehen gelassen und dann 48 Stunden im Dunkeln bei Anwendung von Cellophan als Membran gegen dest. Wasser dialysiert. Dann wurden die Mischungen auf ein Endvolumen von 12.50 ml aufgefüllt, gut durchgemischt, mit Kobalt(II)-puffer vereinigt und sofort polarographiert.

EINFLUSS VON ALLOXAN AUF KOBALT(III)-PUFFER

Darstellung des Puffers: $0.2675 \text{ g } \text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 75.0 ml 25% NH₃ (Sp. G. 0.91)
 $5.35 \text{ g } \text{NH}_4\text{Cl}$ ad 1000 ml Wasser

Es wurden 4 ml der Pufferlösungen abpipettiert und dann 1 ml der Alloxanlösung folgender Konzentrationen: 1. 1 ml Wasser, 2. 1 ml M/200, 3. M/100, 4. M/75, 5. M/20, 6. M/10 zugesetzt. Dann wurden die Lösungen sofort polarographiert.

DARSTELLUNG VON EIWEISSFREIEN SERUMFILTRATS

Zu 2 ml eines menschlichen Serums wurde 1 ml Alloxanlösung folgender Konzentrationen hinzugefügt: 1. 1 ml Wasser, 2. M/200, 3. M/100, 4. M/75, 5. M/50, 6. M/20, 7. M/10, eine Stunde stehen gelassen und dann 2 ml 20%-iger Sulfosalicylsäure zugegeben. Nach 45 Minuten wurde es zweimal durch dasselbe Filter filtriert.

POLAROGRAPHISCHE REDUKTION DES SERUMFILTRATS BEI VERWENDUNG DES KOBALT(III)-PUFFERS

0.3 ml Serumfiltrat wurde mit 4 ml Kobalt(III)-pufferlösung vermischt und von -0.8 V polarographiert.

POLAROGRAPHISCHE REDUKTION DES SERUMFILTRATS BEI VERWENDUNG DES KOBALT(II)-PUFFERS

0.3 ml Filtrat wurde mit Kobalt(II)-puffer vereinigt, auf 5 ml aufgefüllt und polarographiert. Siehe Fig. 4.

Literatur S. 435.

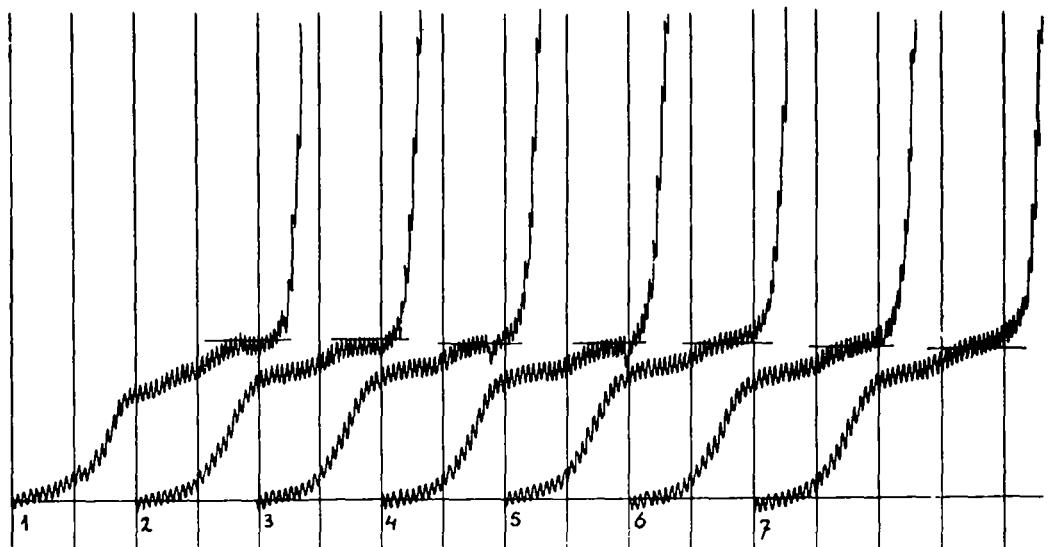


Fig. 4. Polarographische Reduktion des Serumfiltrats (aus einem durch Alloxan behandelten Serum) mit Kobalt(II)-puffer. Akkumulator 4.0 V, Empfindlichkeit des Galvanometers 1/300. Anfang der Reduktion -0.8 V.

EINFLUSS VON MONOJODESSIGSÄURE AUF DIE POLAROGRAPHISCHE FILTRATREAKTION MIT DEM KOBALT(II)-PUFFER

Zu 0.3 ml Filtrat wurden 0.20 ml Wasser, und 0.20 ml 1%-iger Monojodesigsäure zugegeben. 0.3 ml dieser Lösung wurden mit der Pufferlösung vermischt und polarographiert. Siehe Fig. 5.

ÜBER DEN ABBAU DES DURCH ALLOXAN DENATURIERTEN EIERALBUMINS DURCH TRYPSIN

1 g Eieralbumin wurde in eine Reibschale gegeben, dann Alloxan zugefügt, gut durchgemischt, 30 ml Wasser zugegeben und 24 Stunden im Dunkeln stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurden 1 ml 10%-iger Lauge und 20 Tropfen Phenolphthalein hinzugefügt. Dann wurde soviel 1 n HCl zugesetzt, um die rote Farbe der Lösung auf rosa zu bringen (pH ungefähr 8.3). Diese Lösung wurde dann in einem Messkolben auf 100 ml aufgefüllt.

Versuchsnummer	Alloxanmenge	Versuchsnummer	Alloxanmenge
1	25 mg	4	100 ..
2	50 ..	5	150 ..
3	75 ..	6	kein Alloxan

0.5 g Trypsin (Merck) wurden in einigen ml destillierten Wassers aufgelöst, mit 10 bis 20 Tropfen Toluol der Lösung im Messkolben beigegeben, welche dann mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt wird.

Die beiden Lösungen wurden in einen 300 ml Kolben gebracht, in welchem die Lösung noch durchgeschüttelt wurde, um dann der Hydrolyse in einem Wasserbad von 37° unterworfen zu werden.

Die Farbe der Lösung soll nach dem Trypsinzusatz hellrosa sein. Ist dies nicht der Fall, so wird ihr bis zur richtigen Färbung tropfenweise 10%-ige Natronlauge zugegeben. Für die Aufrechthaltung eines geeigneten pH musste während der ganzen Dauer der Hydrolyse gesorgt werden. In bestimmten Zeitschnitten wurden Proben entnommen.

Die Spaltung des Albumins wurde durch das Freiwerden des Aminostickstoffs verfolgt. Die Aminostickstoffbestimmungen wurden nach C. G. POPE UND M. F. STEVENS⁴⁶ durchgeführt.

Die Resultate der Blindproben (sofort nach Zusatz von Trypsin) ergaben:

1. Ohne Alloxan	0.12 mg Amino-N in 100 ml Hydrolysat
2. 25 ..	0.56 100
3. 50 ..	0.56 100
4. 75 ..	0.56 100
5. 100 ..	0.89 100
6. 150 ..	1.12 100

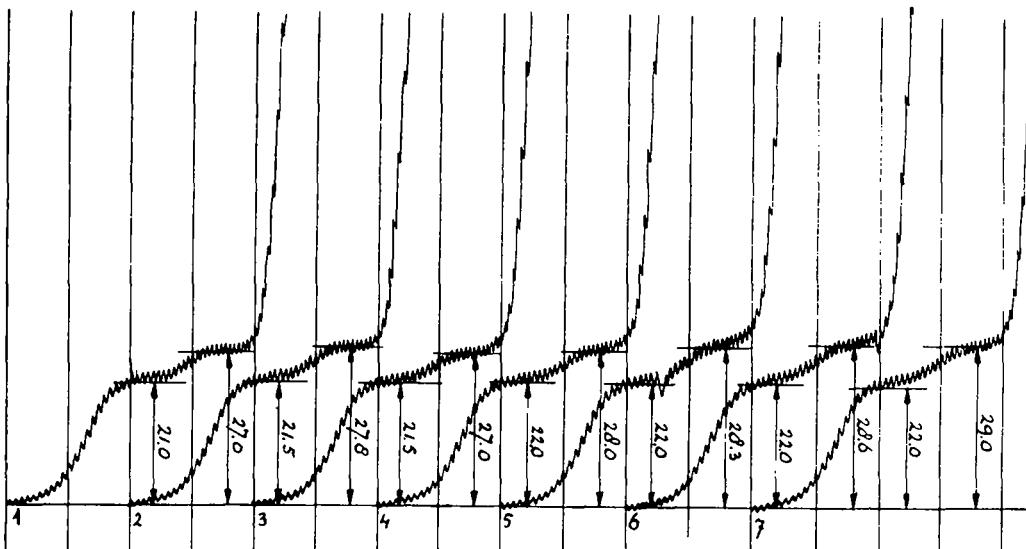


Fig. 5. Einfluss von Monojodessigsäure auf die polarographische Reduktion des Serumfiltrats mit dem Kobalt(II)-puffer. Akkumulator 4.0 V, Empfindlichkeit des Galvanometers 1/300. Anfang der Reduktion -0.8 V.

Proben aus den Hydrolysaten wurden in verschiedenen Zeitabschnitten von 15 Minuten bis 48 Stunden entnommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vor der Untersuchung des Einflusses von Alloxan auf Eiweißstoffe wurde das polarographische Verhalten des Kobaltpuffers und Alloxans im Gemisch geprüft. Es wurde festgestellt, dass Alloxan mit Kobalt(II)-puffer eine Stufe bildet. In der Fig. 6 ist die Abhängigkeit der Stufenhöhe von der Alloxankonzentration graphisch dargestellt.

Das Sauerstoffmaximum wird durch Alloxan, wie das schon früher bei anderen Purinen beobachtet wurde, unterdrückt. Die Kobaltstufe ($\text{Co}^{II} \rightarrow \text{Co}$) nimmt mit zunehmender Alloxankonzentration ab (Fig. 7).

Dann wurde der Einfluss von Alloxan auf die Cystinstufe der Prüfung untergezogen (Tabelle I).

Die Verminderung der Cystinstufe nimmt bei kleineren Alloxankonzentrationen kontinuierlich ab, später aber, bei grösseren Alloxanmengen nimmt sie unregelmässig zu. Die unregelmässige Steigerung der Cystinstufe bei grösserer Alloxankonzentration als $M/250$ können wir durch die Bildung der Alloxanstufe erklären (Fig. 8).

In der Tabelle II sind Resultate wiedergegeben, die wir mit durch Alloxan behandelten Eiweißstoffen erhielten.

In der Fig. 9 ist die Abhängigkeit zwischen dem Reduktionspotential der ersten Eiweißstufe und der Alloxankonzentration graphisch dargestellt.

Wir haben also bewiesen, dass die Eiweissdoppelstufe durch Alloxan beeinflusst wird. Nun interessierte es uns zu erfahren, ob wir dasselbe auch bei Serum eiweißstoffen beobachten könnten. Die Ergebnisse stimmen mit dem Befund, der mit Eieralbumin gewonnen wurde, überein.

Um die Frage zu entscheiden, ob die Änderungen, die wir durch Alloxanwirkung auf die Eiweißstoffe erhalten, reversibel oder irreversibel sind, haben wir diese denatu-

rierten Eiweisslösungen gegen destilliertes Wasser dialysiert. Nach der Dialyse sind die Unterschiede im Vergleich mit einer normalen Probe noch deutlicher.

Wir wollten auch untersuchen, wie sich Filtrate, die aus Serum durch Eiweissfällung durch Sulfo-salicylsäure gewonnen wurden, polarographisch verhalten. Die Filtrate polarographierten wir mit Kobalt (II)-puffer und auch mit Kobalt (III)-puffer. Orientationsversuche zeigten, dass die Sauerstoffmaxima in gleicher Weise wie bei dem Puffer II auch bei der Anwendung des Kobalt (III)-puffer beeinflusst werden. Die Höhe der Kobaltstufe ($\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}$) bleibt aber unbeeinflusst. In dem Potentialbereich, wo sich die sogenannte Stufe der aktiven Sulphydrylgruppen bildet, ist eine Erniedrigung zu beobachten. Diese Erniedrigung hat folgende Werte:

Alloxankonzentration	Stufenhöhe-Änderung in mm
M/200	0
M/100	0
M/75	1
M/20	2
M/10	2

Bei der kathodischen Reduktion des Serumfiltrats mit Kobalt(III)-pufferlösung ist es uns nicht gelungen, Änderungen festzustellen.

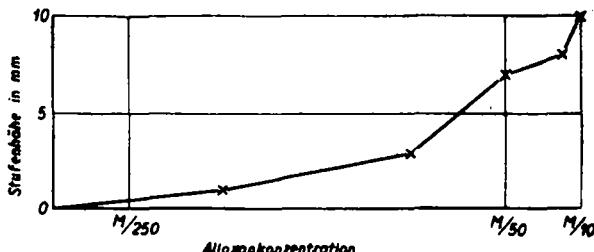


Fig. 6. Zusammenhang zwischen der Stufenhöhe und der Alloxankonzentration im Kobalt(II)-puffergemisch

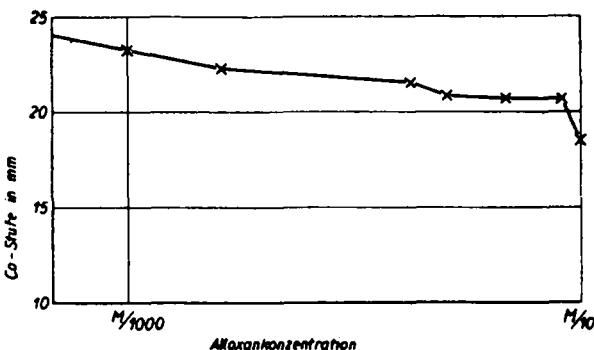


Fig. 7. Abhängigkeit der Höhe der Kobaltstufe von der Alloxankonzentration

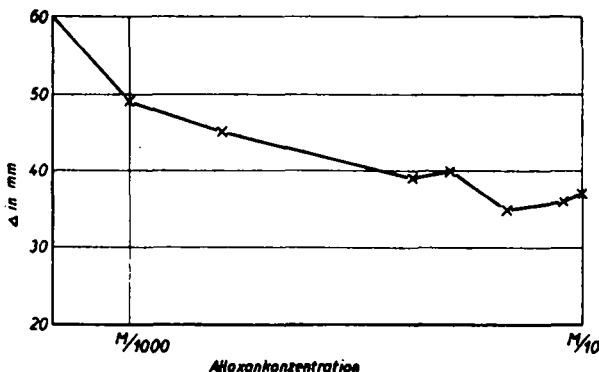


Fig. 8. Zusammenhang zwischen der Differenz Cystinstufe-Alloxanstufe und der Alloxankonzentration

TABELLE I

Nr. der pol. Kurve (Fig. 2)	Alloxankonzentration im Puffergemisch	Höhe der Cystinstufe in mm h_1	Höhe der Alloxanstufe ohne Cystin in mm h_2	$h_1 - h_2$ in mm	Veränderung der Cystinstufe in mm
1	0	62	—	62	—
2	M/1000	50	1	49	13
3	M/500	48	3	45	17
4	M/375	44	5	39	23
5	M/250	47	7	40	22
6	M/200	42	7	35	27
7	M/100	44	8	36	26
8	M/50	47	10	37	25

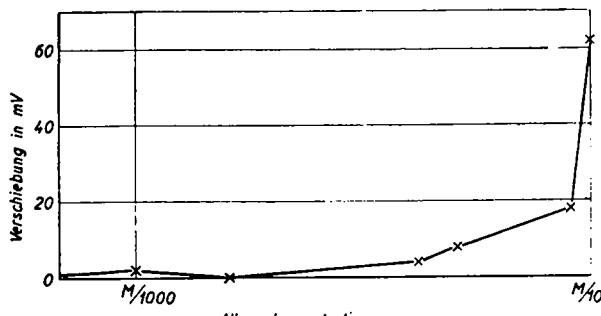


Fig. 9. Einfluss von Alloxan auf das Potential der ersten Eiweisstufe

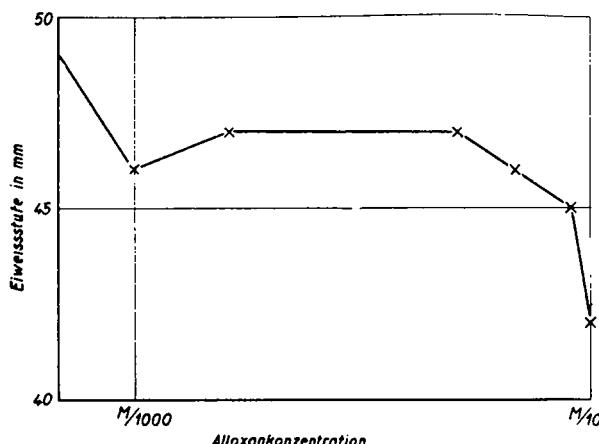


Fig. 10. Einfluss von Alloxan auf die Höhe der ersten Eiweisstufe

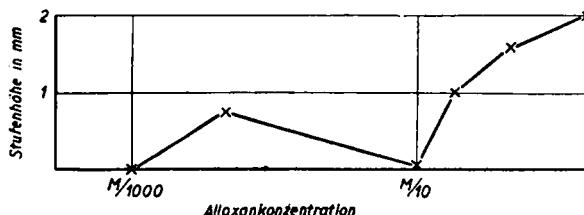


Fig. 11. Abhängigkeit der Stufe der sogenannten aktiven Sulphydrylgruppen von der Alloxankonzentration bei Anwendung von Monojodessigsäure

Die Verfolgung des Abbaus des Eieralbumins durch Trypsin zeigte, dass die Hydrolyse von Eiweiss, das durch Alloxan behandelt wurde, schwerer verläuft. Die Differenzen sind aber nicht sehr gross. Es wurde auch festgestellt, dass Aminostickstoff nach Alloxanzugabe ein wenig zunimmt. Im Vergleich zur zugesetzten Alloxanmenge handelt es sich nur um eine geringfügige Änderung.

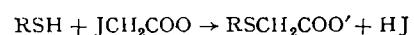
Literatur S. 435.

TABELLE II

Nr. der Kurve (Fig. 3)	Höhe der Eiweiss-doppelstufe		Verschiebung des Maximums der ersten Eiweisstufe in V
	S ₁	S ₂	
1	49	57	- - -
2	46	53	- - 0.001
3	47	53	- - 0.000
4	47		- - 0.005
5	47		- - 0.008
6	46		- - 0.008
7	45		- - 0.018
8	42		- - 0.063

Im Gemisch des Filtrates mit Kobalt (II)-pufferlösung beobachteten wir auch keine wesentlichen Änderungen.

Um zu entscheiden, ob es sich um Cystin oder Cystein handelt, lässt man nach R. BRDIČKA²⁴ die ammoniakalische Lösung mit Monojodessigsäure reagieren. Die Monojodessigsäure reagiert mit der Cystin SH-Gruppe:



Nach kurzer Zeit verliert Cystein seine polarographische Wirkung, während Cystin seine Reaktivität behält. Wir konnten dabei eine gewisse Erhöhung der Cystinstufe beobachten.

Wir glauben, dass diese Erhöhung mit der Umwandlung von Cystein in Cystin (nach der Auffassung von ABDERHALDEN) zusammenhängt (Siehe Tabelle III).

TABELLE III

Nr. der Kurve (Fig. 5)	Höhe der Stufe in mm
1	27.0
2	27.8
3	27.0
4	28.0
5	28.3
6	28.6
7	29.0

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluss von Alloxan auf Eieralbumin und Blutserum polarographisch verfolgt. Dabei wurde folgendes festgestellt:

1. Die Eiweissdoppelstufe wird durch Alloxan beeinflusst.
2. Die Beeinflussung ist irreversibel, wir können sie durch Dialyse nicht beseitigen.
3. Nach der Beseitigung der polarographischen Stufe von Cystein durch Monojodessigsäure, konnten wir eine Erhöhung der bleibenden Stufe beobachten. Diese Erscheinung schreiben wir dem Cystin zu.

Bei dem Abbau des Eieralbumins durch Trypsin konnten wir bei Alloxanzusatz eine kleine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit feststellen.

SUMMARY

The influence of alloxan on egg albumin and blood serum was examined polarographically. The following facts were established:

1. The double wave of protein is influenced by alloxan.
2. The influence is irreversible; it could not be eliminated by dialysis.
3. After elimination of the polarographic wave of cystein by addition of monoiodoacetic acid, a rise of the wave was observed. This is attributed to cystine.

During the degradation of egg albumin by trypsin and on addition of alloxan, a small reduction in the reaction velocity was noted.

RÉSUMÉ

L'étude polarographique de l'influence de l'alloxane sur l'albumine d'œuf et le sérum sanguin montre les faits suivants:

1. L'alloxane modifie la double onde des protéines.
 2. Cet effet est irréversible; il ne disparaît pas par dialyse.
 3. Après élimination par l'acide monoiodoacétique de l'onde polarographique correspondant à la cystéine, l'onde restant s'accentue; ce phénomène doit être attribué à la cystine.
- L'alloxane provoque un léger ralentissement de l'hydrolyse de l'albumine d'œuf par la trypsine.

LITERATUR

1. J. SHAW-DUNN, H. SHEEHAM, AND N. G. B. MCLETCHIE, *Lancet*, 244 (1943) 484.
2. J. S. DUNN AND N. G. B. MCLETCHIE, *Lancet*, 245 (1943) 384.
3. E. ABDERHALDEN, *Z. Vitamin-, Hormon-, und Fermentforsch.*, 1 (1947) 241.
4. P. KARRER, F. KOLLER, AND H. STÜRZINGER, *Helv. Chim. Acta*, 28 (1945) 1529.
5. R. S. LEECH AND C. C. BAILEY, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 525.
6. S. TIPSON AND J. A. RUTEN, *Arch. Biochem.*, 8 (1945) 1.
7. P. H. HIDY, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 307.
8. M. GRIFFITHS, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 853.
9. G. BRÜCKMANN AND E. WETHEIMER, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 241.
10. L. LASZT, *Experientia*, 1 (1945) 7.
11. M. G. GOLDNER AND J. GONDORI, *J. Endocrinol.*, 35 (1944) 241.
12. E. THOROGOOD, *Federation Proc.*, 3 (1944) 48.
13. K. BERNHARD, M. FAVARGER, A. RENOLD, AND O. SPÜHLER, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1666.
14. G. L. DUFF, *Am. J. Med. Sci.*, 210 (1945) 381.
15. A. LAZAROW, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 61 (1946) 441.
16. R. LABES AND H. FREIBURGER, *Arch. exptl. Path. Pharmakol.*, 156 (1936) 226.
17. F. LIEBER AND E. EDEL, *Biochem.*, 2, 244 (1931) 403.
18. E. E. ECKERT, R. KALINA, AND L. PILLEMER, *Enzymologia*, 7 (1939) 307.
19. L. DE CARO AND E. ROVIDA, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 12 (1937) 611.
20. G. BRÜCKMANN, *J. Biol. Chem.*, 165 (1946) 103.
21. H. R. JACOBS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 37 (1937) 407.
22. J. A. RUTEN AND K. GARDUMIAN, *J. Am. Clin. Path.*, 16 (1946) 257.
23. J. A. RUTEN AND K. Y. GURMIAN, *Science*, 103 (1946) 220.
24. R. BRDIČKA, *J. chim. phys.*, 35 (1938) 89.
25. R. BRDIČKA, *J. Gen. Physiol.*, 19 (1936) 843.
26. C. G. POPE AND M. F. STEVENS, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1070.