

**45. Rudolf Lemberg, David B. Morell, William H. Lockwood,  
Maureen Stewart und Barry Bloomfield: Spektrophotometrische  
Bestimmung der Hämin-a-Derivate (Cytochromoxydase und Cytochrom a)  
in tierischen Geweben**

[Aus dem Institut für medizinische Forschung, Royal North Shore Hospital,  
Sydney, Australien]

(Eingegangen am 27. September 1955)

*Herrn Professor Freudenberg zum 70. Geburtstage gewidmet*

Der Gehalt verschiedener tierischer Gewebe an Cytochromoxydase und Cytochrom a kann durch spektrophotometrische Bestimmung des fast verlustlos und in spektroskopisch nahezu reiner Form extrahierbaren Porphyrins a erfaßt werden. In den Organen der Ratte ist der Gehalt an Hämin a proportional der Gewebsatmung und dem Cytochrom-c-Gehalt.

Es ist oft wünschenswert, ein Enzym (oder eine Gruppe naheverwandter Enzyme) nicht nur durch Bestimmung enzymatischer Aktivität, sondern auch durch die chemische Bestimmung einer charakteristischen Gruppe quantitativ zu erfassen. Dies ist von besonderem Interesse für Enzyme, die in organisierten Partikelsystemen der Zelle so fest eingebaut sind, daß sie sich nicht ohne Veränderung ihrer Aktivität loslösen lassen, und deren Bestimmung durch enzymatische Aktivität in den Geweben daher besondere Schwierigkeiten bietet. Cytochromoxydase (Cytochrom  $a_3$ ) und Cytochrom a finden sich in den Mitochondrien tierischer Zellen in dieser Form, zusammen mit den Cytochromen b, c, e und anderen Enzymen. Die quantitative Trennung und Isolierung der Cytochrome selbst muß aussichtlos erscheinen, und auch die direkte spektroskopische Bestimmung in der Zelle ist ein Problem, das nur mit sehr komplizierter Technik und unter Heranziehung von gewissen unbewiesenen Annahmen teilweise gelöst werden kann.

Die Zellcytochrome (und andere tierische Zellhämoproteine) enthalten dagegen nur zwei lipoidlösliche Zellhämine, nämlich Protohämin und Hämin a. Das letztere ist, wie wir gezeigt haben<sup>1)</sup>, die eisenfreie prosthetische Gruppe von beiden Cytochromen, a und  $a_3$ . Das zu lösende Problem ist daher erstens die quantitative Extraktion der Zellhämine aus den Geweben, und zweitens die quantitative Trennung der beiden Hämene, entweder direkt, oder nach Umwandlung in die entsprechenden Porphyrine. Wenn die spektroskopischen Eigenschaften der beiden Hämene in reiner Form bekannt sind, sollte schließlich ihre spektrophotometrische Bestimmung im Gemisch ohne Trennung möglich sein; vorerst erfordert aber eine solche Methode noch weitere Erforschung der optimalen Bedingungen. Sie ist auch erst möglich, nachdem die Trennung der Porphyrine bewiesen hat, daß keine anderen Hämene vorhanden sind, und daß sich sekundäre Veränderungen, insbesondere von Hämin a, vermeiden lassen. Die Hämene lassen sich zwar mit einer ziemlich

<sup>1)</sup> R. Lemberg, Nature [London] 172, 619 [1953]; Suomalaisen Tiedekatemian Toimituksia [Ann. Acad. Sci. fennicae], Sarja A. II., Chemica, No. 6 [1955].

langwierigen Methodik<sup>2)</sup> weitgehend trennen, doch sind nach unseren Erfahrungen<sup>3)</sup> die Ausbeuten nur klein. M. Morrison und E. Stotz<sup>4)</sup> haben kürzlich über eine Trennung von Protohämin und von zwei Komponenten des Hämins a durch Chromatographie an Kieselsäuregel berichtet. Ihr Ausgangsmaterial war ein Cytochromoxydase-Präparat, das sich nicht quantitativ aus Herzmuskel isolieren lässt. Wir konnten mit ihrer Methode weder eine Trennung von Protohämin und Hämin a in Extrakten der Hämme von Herzmuskel, noch eine Trennung von reinem Hämin a in zwei Komponenten erzielen.

Dagegen gelingt die quantitative Trennung der freien Porphyrine leicht mit der Salzsäure-Äther-Methode von Willstätter. Es ist nur notwendig, sekundäre Veränderungen des Porphyrins a bei der Entfernung des Eisens sorgfältig zu vermeiden (siehe Versuchsteil). Die sehr charakteristischen Absorptionskurven der Porphyrine erlauben es, sekundäre Veränderungen viel leichter zu erkennen, als das mit den weniger charakteristischen Absorptionskurven der Hämme möglich wäre. Solche Veränderungen setzen nicht nur die Ausbeute an Porphyrin a herab, sondern lassen sich auch qualitativ feststellen. Abgesehen von dem Auftreten eines neuen Porphyrins (Kryptoporphyrin a) in wechselnden Mengen, das sich durch Salzsäurefraktionierung leicht entfernen lässt, zeigt auch das Porphyrin in der Porphyrin-a-Fraktion dann Zeichen einer Veränderung, bemerkbar durch eine Verringerung des Maximums III relativ zum Maximum IV im Absorptionsspektrum der Ätherlösung. Beide Veränderungen lassen sich durch Einhalten der im Versuchsteil beschriebenen Methode weitgehend vermeiden, obwohl vorerst noch nicht in allen Geweben.

Die Methode unterscheidet sich von der bereits beschriebenen<sup>5)</sup> durch die vollständigere Entfernung von Lipoiden und gelben Farbstoffen vor der Extraktion der Hämme. Sie gibt zwar für Herzgewebe nur ein wenig höhere Porphyrin-a-Werte als die frühere, hat aber zwei andere Vorteile. Erstens werden alle Trennungen und Waschungen sehr erleichtert durch die Entfernung stark emulgierender Substanz. Zweitens enthält die ätherische Lösung, die nach Entfernung der anderen Porphyrine zurückbleibt (Porphyrin-a-Fraktion), ein spektroskopisch reineres Porphyrin a, und dies ist von besonderer Bedeutung für die Bestimmung in Geweben, die weniger Hämin a enthalten und aus denen sich Porphyrin a schwerer rein isolieren lässt als aus Herzmuskel.

Porphyrin a hat in äther. Lösung folgende Absorptionsmaxima: I 647 II 583 III 558.5 IV 517 V 412 mμ, mit den relativen Extinktionen I:II:III:IV:V = 0.175:1.15:2.1:1:18. Für die Konzentrationsbestimmung verwenden wir die höchste Absorptionsbande im sichtbaren Gebiet und benutzen als spezif. Extinktion ( $E$ , 0.1 %, 1 cm) den Wert 20. Präparate dieses Reinheits-

<sup>2)</sup> M. Kiese u. H. Kurz, Biochem. Z. **325**, 299 [1954].

<sup>3)</sup> R. Lemberg u. M. Stewart, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **33**, 451 [1955].

<sup>4)</sup> J. biol. Chemistry **213**, 373 [1955].

<sup>5)</sup> Siehe I. c.<sup>1)</sup> und R. Lemberg, B. Bloomfield, P. Caiger u. W. H. Lockwood, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **33**, 435 [1955].

grades wurden mit der von uns anderswo beschriebenen Methodik<sup>1,3)</sup> regelmäßig erhalten. Diese Präparate sind aber noch amorph, und es ist wahrscheinlich, daß die spezif. Extinktion des reinen Porphyrins a, das wir jetzt in geringen Mengen gut kristallisiert erhalten haben, noch etwas höher ist. Mit der neuen hier beschriebenen Methodik als erste Stufe der Isolierung wurden kürzlich Präparate mit  $\epsilon_{sp}^{558} = 22-23$  erhalten. Es ist daher möglich, daß die in Tafel 1 und 2 angegebenen Porphyrin-a-Konzentrationen der Gewebe etwas zu hoch sind, aber geringe unvermeidbare Verluste bei der Isolierung gleichen diesen Faktor wahrscheinlich aus.

Die Messung der Extinktion bei 517 m $\mu$  (Bande IV) und des Verhältnisses  $\epsilon_{558}/\epsilon_{517}$  (*R* III/IV) gibt eine Kontrolle des Reinheitsgrades von Porphyrin a. Selbst geringe Mengen (10%) von Protoporphyrin oder Kryptoporphyrin a würden dieses Verhältnis von 2.1 auf 1.75 bzw. 1.86 herabsetzen.

Wie Tafel 1 zeigt, enthält die mit der neueren Methode erhaltene Porphyrin-a-Fraktion des Rinderherzens spektroskopisch reines Porphyrin a (*R* III/IV > 2), während *R* III/IV der mit der älteren Methode isolierten Fraktion etwas geringer war ( $1.86 \pm 0.07$ ).

Die chromatographische Reinigung<sup>3)</sup> durch eine Säule von Cellulosepulver (Genuine Whatman Cellulose Powder, Standard Grade, Balston Ltd.) führt bei beiden Lösungen zu spektroskopisch reinem Porphyrin a, doch sind die Verluste für Porphyrin-a-Rohlösungen mit kleinerem *R* III/IV größer. Dasselbe gilt auch für eine Reinigung durch Extraktion des Porphyrins mit 20-proz. Salzsäure und Wiedereintreiben in frischen Äther. Solche Porphyrin-a-Fraktionen mit niedrigem *R* III/IV werden nun oft aus anderen Geweben mit kleinerem Porphyrin-a-Gehalt erhalten, und auch aus Herzmuskel, wenn nur kleinere Mengen zur Anwendung kommen (s. Tafel 2). In solchen Fällen gibt die Bestimmung nach Salzsäureextraktion oder Chromatographie einen Minimalwert. Die Tafeln zeigen, daß die Abweichung dieser Werte von den aus der Rohlösung berechneten klein ist, besonders wenn der unvermeidbare Verlust (5-10% für die Salzsäurefraktionierung und 10-15% für die Chromatographie reinen Porphyrins a) berücksichtigt wird. In einigen Geweben, z.B. Rinderleber und -niere ist jedoch *R* III/IV der Porphyrin-a-Fraktion viel kleiner (vergl. Tafel 1) und auch die Salzsäureextraktion ergibt kein reines Porphyrin a. In solchen Lösungen lassen sich oft weder Protoporphyrin noch Krypto-

Tafel 1. Hämin a der Rinderorgane

	Hämin a				Cytochrom c μ Mol/kg	Mol.- Verhältnis <sup>3)</sup> a/c
	in Porphyrin-a- Fraktion μ Mol/kg	<i>R</i> III/IV	nach weiterer Reinigung μ Mol/kg	<i>R</i> III/IV		
Herzmuskel					53	2.9 (2.5)
neuere Methode	154	2.02	131 <sup>1)</sup>	2.20		
ältere Methode	132	1.86	96 <sup>1)</sup>	2.04		
Niere .....	55	1.36	17 <sup>2)</sup>	1.60	12	4.6 (1.4)
Leber .....	11	1.0	4.5 <sup>2)</sup>	1.34	4	2.7 (1.1)
Skelettmuskel .	—	—	16.5 <sup>2)</sup>	1.83	18	(1.05)

<sup>1)</sup> durch Chromatographie.<sup>2)</sup> durch Salzsäureextraktion.<sup>3)</sup> Der erste Wert bezieht sich auf den Hämin-a-Gehalt der Porphyrin-a-Fraktion, der Wert in Klammern auf den Minimalwert des Porphyrins a nach weiterer Reinigung (ohne Berücksichtigung der Verluste).

porphyrin a auffinden<sup>6</sup>). Weitere Untersuchungen müssen feststellen, ob solche Gewebe ein andersartiges Porphyrin a enthalten, oder ob, was wahrscheinlicher ist, das Porphyrin bei der Isolierung aus diesen Geweben Veränderungen erleidet, die wir bei anderen Geweben vermieden haben.

Ein Vergleich des Gehalts der Rattengewebe an Hämin a mit ihrer respiratorischen Aktivität ( $Q_{O_2}$ ) und ihrem Cytochrom-c-Gehalt<sup>7</sup>) zeigt, daß diese einander annähernd proportional sind (Tafel 2). Die geringere Ausbeute

Tafel 2. Hämin der Rattenorgane

	Hämin a				$Q_{O_2}$	Cytochrom c μ Mol/kg	Mol.-Verhältnis a/c <sup>2</sup> )
	Porphyrin-a-Fraktion μ Mol/kg	R III/IV	nach weiterer Reinigung <sup>1)</sup> μ Mol/kg	R III/IV			
Herzmuskel . .	192	1.75	169	1.95	~25	149	1.3 (1.1)
Niere . . . . .	154	1.69	137	2.00	20	110	1.4 (1.25)
Leber . . . . .	65	1.60	50	1.91	~10	47	1.4 (1.1)
Skelettmuskel	24.5	1.70	15	1.94	6	29	0.85 (0.52)

<sup>1)</sup> durch Salzsäureextraktion.

<sup>2)</sup> siehe Anm. <sup>3)</sup> der Tafel 1.

an Porphyrin a aus Skelettmuskulatur ist wohl dem größeren Verlust bei der Isolierung aus diesem cytochrom-armen Gewebe zuzuschreiben. Beim Vergleich der Hämin-a-Gehalte der Herzen verschiedener Tiere erhält man etwas höhere Werte für die Ratte, aber sehr ähnliche Werte für Rind, Schaf und Schwein<sup>5</sup>). Der Cytochrom-c-Gehalt des Rinderherzens<sup>8</sup>) ist jedoch anscheinend geringer als der des Rattenherzens, so daß das Mol.-Verhältnis Hämin a / Cytochrom c im Rinderherzen größer ist. Die Werte für den Hämin-a-Gehalt von Rinderleber und -niere, die noch mit der älteren Methode erhalten wurden, sind nur provisorisch und wegen des niedrigen R III/IV und der großen Verluste bei weiterer Reinigung wenig verlässlich. Im großen ganzen zeigt sich aber auch in Rinderorganen eine Parallelität von Hämin a und Cytochrom c.

Wir haben vorerst auf eine quantitative Messung des Protoporphyrins verzichtet, da ihre Anwendung zur Bestimmung der Cytochrome b die quantitative Entfernung anderer Hämoproteine (Hämoglobin, Myoglobin, Katalase) erfordert. Unser Herzmuskelbrei enthielt etwa äquivalente Mengen von Protohämin und Hämin a.

Wenn diese oder ähnliche chemische Methoden sich auch für andere Gewebe, Zellen und Zellpartikel als ausführbar erweisen, so eröffnet sich ein neuer Weg, die enzymatische Aktivität der Oxydasen mit dem Gehalt an Hämin a zu vergleichen. Die Frage nach der Natur der terminalen Oxydase in verschiedenen Geweben und Zellbestandteilen kann dann direkt geprüft werden.

<sup>6)</sup> In einem Versuche mit Rinderniere enthielt die Porphyrin-a-Fraktion einen Ester des Protoporphyrins, der durch Hydrolyse mit starker Salzsäure in freies Protoporphyrin übergeführt wurde. Aber auch nach Entfernung des Protoporphyrins bleibt R III/IV noch niedrig (1.6–1.8).

<sup>7)</sup> D. L. Drabkin in „Haemoglobin“, herausgegeben von F. W. Roughton u. J. C. Kendrew, Butterworth Scientific Publications, S. 35 [1949].

<sup>8)</sup> R. Junowicz-Kocholaty u. T. R. Hogness, J. biol. Chemistry 129, 569 [1939].

### Beschreibung der Versuche

**Vorbehandlung der Gewebe:** Die Gewebe werden nach grober Entfernung von Binde- und Fettgewebe mit der Fleischmaschine gemahlen, oder wenn nur kleine Mengen zur Verfügung stehen, ganz fein zerschnitten. Die Analyse erfordert nur 5–10 g frisches Herzgewebe oder 10–100 g anderer Gewebe. Nach Entfernung eines aliquoten Teils für die Trockengewichtsbestimmung wird der Gewebsbrei zur Entfernung des Hämoglobins mit kaltem dest. Wasser gewaschen. Bei Leber ist es notwendig, die Waschflüssigkeit nach Einstellung des  $p_H$  auf 5.5 zu zentrifugieren und das Sediment der Hauptmenge des gewaschenen Gewebes wieder zuzufügen. Der gewaschene Brei ist bei  $-15^\circ$  lange haltbar.

Der Gewebsbrei wird nun zur Entfernung von Fettsäuren und gelben Farbstoffen abwechselnd mit einem Gemisch aus 80 Vol.-Tl. methanolfreiem Aceton und 20 Vol.-Tl. Wasser und mit peroxydfreiem Äther solange extrahiert, bis die Flüssigkeit fast farblos bleibt, und schließlich wieder mit 80-proz. Aceton gewaschen. Die Hauptmenge der überstehenden Lösung kann dekantiert werden, der Rest wird durch kurzes Absaugen auf der Nutsche entfernt. Eine Herabsetzung des Wassergehalts des Acetons für diese Vorbehandlung wie für die Hämin-Extraktion führt zu weniger reinem Porphyrin a in schlechterer Ausbeute.

**Extraktion der Hämine:** Die Hämine werden nun mit eiskaltem 80-proz. Aceton, dem pro l 20 ccm konz. Salzsäure zugefügt werden, im Eisschrank extrahiert. Gewöhnlich genügen zwei Extraktionen über Nacht mit je 20 ccm Extraktionsflüssigkeit für je 10 g frischen Gewebes. Die Extrakte werden bei  $-15^\circ$  aufbewahrt und wenn nötig durch Faltenfilter klar filtriert. Die Hämine werden mit 1-proz. Salzsäure in Äther übergeführt und das Aceton durch gründliches Waschen mit der verd. Salzsäure entfernt.

**Überführung der Hämine in Porphyrine und Isolierung des Porphyrins a:** Die äther. Lösung der Hämine wird i. Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird sofort in 5–10 ccm Eisessig (für die Hämine aus 10–100 g frischen Gewebes) gelöst und dem Entzisernungsprozeß unterworfen.

Längeres Erhitzen der Hämine in Eisessig und ein großer Überschuß von Eisen(II)-acetat beeinträchtigen die Ausbeute und besonders Reinheitsgrad des Porphyrins a. Die übliche Eisen(II)-acetat-Salzsäure-Methode wurde daher modifiziert. Da Eisen(II)-acetat schwer zu dosieren ist, verwenden wir Eisen(II)-sulfat.

Zuerst fügten wir Natriumacetat der Eisessiglösung der Hämine zu, und schließlich, nach kurzer Einwirkung von Eisen(II)-sulfat, die Salzsäure. Die Reaktion geht aber ebenso rasch ohne Anwendung von Natriumacetat, und Eisen(II)-sulfat und Salzsäure können zusammen zugefügt werden.

Die Eisessiglösung der Hämine wird durch Eintauchen in ein kochendes Wasserbad in einem Kohlensäurestrom rasch auf  $80^\circ$  erhitzt. Zu je 5 ccm wird dann eine Mischung von 0.2 ccm einer 5-proz. Lösung von  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und 0.2–0.3 ccm konz. Salzsäure zugefügt. Die Farbe schlägt sofort nach Purpur um, und die Reaktion ist in etwa  $1/2$  Min. vollendet. Die Lösung wird sofort unter fließendem Wasser abgekühlt und in eine Mischung von 50–100 ccm Äther und verd. Natriumacetatlösung im Schütteltrichter eingetragen. Die wässr. Phase wird noch einmal mit ein wenig Äther extrahiert und der Eisessig durch gründliches Waschen der Ätherphase, zuerst mit verd. Natriumacetatlösung, dann mit dest. Wasser entfernt.

Zwei- bis dreimaliges Ausschütteln mit 5-proz. Salzsäure entfernt das Protoporphyrin; die letzten Reste von Protoporphyrin und die kleinen Mengen von Kryptoporphyrin werden mit 8-proz. Salzsäure extrahiert. Unter diesen Bedingungen bleibt das Porphyrin a quantitativ in der Ätherlösung.

**Spektrophotometrische Bestimmung:** Die äther. Lösung wird nach Messung des Volumens in geschlossenen 1-cm-Rohren des Spektrophotometers – wir verwenden das Uvispek Photoelectric Spectrophotometer von Hilger – bei  $558 \text{ m}\mu$  und bei  $517 \text{ m}\mu$  gemessen. Die Messung der höchsten Bande im sichtbaren Gebiet bei  $558 \text{ m}\mu$  gibt die Konzentration an Porphyrin a. Diese berechnet sich in mg pro kg Trockengewicht als  $1000 v \epsilon_{558} / 20 \text{ g}$ , wenn  $v$  das Trockengewicht des extrahierten Gewebes in g,  $v$  das Volumen der Porphyrin-a-Fraktion in ccm und  $\epsilon_{558}$  die optische Dichte der Lösung bei  $558 \text{ m}\mu$  in 1 cm Schichtlänge bedeuten. Der Wert 20 ist der der spezif. Extinktion (siehe oben). Bei der Berechnung der molaren Konzentration wurde für das Porphyrin ein Molekulargewicht von 780 angenommen.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades des Porphyrins a wird die Extinktion bei 517 m $\mu$  gemessen und das Verhältnis  $\epsilon_{558}/\epsilon_{517}$  (*R* III/IV) berechnet. Mit größeren Mengen von Herzmuskelgewebe erreicht dieses Verhältnis den Wert für reines Porphyrin a (2.1–2.3). Mit kleineren Mengen und mit anderen Geweben von niedrigerem Hämin-a-Gehalt ist dieser Reinheitsgrad nicht immer zu erreichen. Das Maximum III ist dann 1–2 m $\mu$ , das Maximum IV 3–4 m $\mu$  nach Blau verschoben. Die Ergebnisse weiterer Reinigung durch Extraktion mit 20-proz. Salzsäure aus Äther und Wiedereintreiben in frischen Äther durch gradweises Neutralisieren mit festem Natriumhydrogencarbonat (zuletzt unter Zufügung von verd. Phosphorsäure) oder durch Chromatographie an Celluloseulversäulen, zeigen, daß auch Porphyrin-a-Fraktionen mit *R* III/IV 1.6–1.8 noch genügend exakte Werte geben.

## 46. Burkhardt Helferich und Konrad Weis: Zur Synthese von Glucosiden und von nicht-reduzierenden Disacchariden<sup>1)</sup>

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn]

(Eingegangen am 28. September 1955)

*In Erinnerung an die gemeinsamen Jahre in Berlin und die seitdem 45 Jahre bestehende Freundschaft, Karl Freudenberg zu seinem 70. Geburtstag gewidmet von B. Helferich*

Es werden Orthoester-Derivate der Glucose beschrieben. Die Synthese von Glucosiden wird verbessert, ebenso die Synthese nicht-reduzierender Disaccharide vom Trehalose-Typ.

Die Umsetzung von Acetohalogenosen mit Alkoholen oder Phenolen unter Zusatz von Aminbasen, vorwiegend tertiären Basen, zu Glykosiden ist schon lange bekannt. Die Ausbeuten lassen aber meist zu wünschen übrig, ein Hinweis auf andere Möglichkeiten des Reaktionsverlaufs. Dabei spielen die Entstehung von Orthoester-Derivaten<sup>2)</sup> und von Ketenacetalen<sup>2)</sup> eine Rolle, ebenso Acetylwanderungen, die sogar intermolekular erfolgen können.

Benzoylreste sitzen am Zucker fester als Acetylreste; außerdem ist die Bildung von Ketenacetalen bei Benzoyl-zuckern nicht möglich. Es wurde daher Benzobromglucose mit Alkoholen bei Gegenwart von Kollidin als einer am Stickstoff sterisch behinderten tertiären Base umgesetzt.

Dabei werden hier bei Verwendung von Methanol und Benzylalkohol in erster Linie Orthoester-Derivate gebildet, so wie dies für die Umsetzung von Acetobromglucose mit Isopropylalkohol schon einige Zeit bekannt ist<sup>3)</sup>. Die in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen, die 3.4.6-Tribenzoyl-1.2-[ $\alpha$ -methoxy-benzyliden]-glucopyranose (I) und die entsprechende Benzyloxybenzyliden-Verbindung (II), sind nicht kristallin, unterscheiden sich aber deutlich von den echten Pyranosiden. Wie alle Orthoester-Derivate sind sie sehr empfindlich gegenüber Säuren und werden, bei Gegenwart von Wasser, durch diese schon nach wenigen Minuten hydrolytisch gespalten. Alkoholisches Alkali spaltet auch in der Hitze nur drei Benzoylreste ab.

<sup>1)</sup> Siehe Dissertation. K. Weis, Bonn 1955.

<sup>2)</sup> H. L. Frush u. H. S. Isbell, J. Res. nat. Bur. Standards 27, 413 [1941]; K. Freudenberg u. H. Scholz, Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 1969 [1930].

<sup>3)</sup> Dissertation. A. Doppstadt, Bonn 1953. B. Helferich, A. Doppstadt u. A. Gottschlich, Naturwissenschaften 40, 441 [1953].