

188. C. N. Ionescu und A. Kizyk: Die Spezifität der β -Glucosidase und enzymatische Gleichgewichte.

[Aus d. Biolog.-chem. Laborat. d. Pharmazeut. Fakultät, Bukarest.]

(Eingegangen am 9. April 1934.)

In vorliegender Arbeit wollen wir einige Anomalien, die man bei der Anwendung des Massenwirkungs-Gesetzes auf die durch β -Glucosidase katalysierten Reaktionen beobachtet, erklären. Besonders haben wir die Synthese des β -Methyl-glucosids studiert. Bourquelot¹⁾ hat zum erstenmal diese Synthese auf biochemischem Wege erzielt, indem er die β -Glucosidase des Emulsins aus Mandeln auf eine Lösung von Glucose in Methanol einwirken ließ. In Zusammenarbeit mit Verdon²⁾ hat Bourquelot diese Synthese systematisch studiert, indem er 9 Lösungen bereitete, von denen jede je 1 g Glucose, 0.40 g Emulsin und 10–90 % Methanol enthielt. Bourquelot und Verdon stellten fest, daß die prozentuale Menge der kombinierten Glucose in jedem Falle mit der Alkohol-Konzentration ansteigt. Mit diesen experimentell gefundenen Resultaten berechnen H. von Euler und Josephson³⁾ die Gleichgewichtskonstante nach dem Massenwirkungs-Gesetz gemäß der Gleichung:

$$(\text{Alkohol})(\text{Glucose}) = K'(\text{Glucosid})(\text{Wasser}) \quad (1)$$

Die für K' gefundenen Werte steigen mit der Alkohol-Konzentration an (s. Tab. I). v. Euler und Josephson glauben, daß dieses Ansteigen der gefundenen Werte einer Inaktivierung des Emulsins durch den Alkohol zuzuschreiben sei, was zu einem falschen Gleichgewicht führe. Als Mittelwert für die Lösungen bis zu 50 % Methanol kann man 0.25 annehmen.

Tabelle I. (Nach Bourquelot-v. Euler-Josephson).

Konzentrat. d. Methylalkohols		Konzentrat. d. Wassers	Konzentrat. d. Glucose	Konzentrat. d. Glucosids	K'
%	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	
10 g	3.13	49.4	0.0439	0.0116	0.240
20 g	6.25	43.8	0.0355	0.0200	0.253
30 g	9.38	38.3	0.0278	0.0277	0.246
40 g	12.50	32.7	0.0216	0.0339	0.244
50 g	15.63	27.2	0.0172	0.0383	0.258
60 g	18.75	21.7	0.0133	0.0422	0.272
70 g	21.88	16.1	0.0100	0.0455	0.299
80 g	25.00	10.6	0.0067	0.0488	0.324
90 g	28.13	5.0	0.0033	0.0522	0.356

Dieser Wert unterscheidet sich aber wesentlich von dem der Gleichgewichtskonstanten, die v. Euler und Josephson aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten berechnen. In einem anderen Versuch hat Bourquelot⁴⁾ festgestellt, daß wenn man 2 Lösungen von 30.2 % Methanol

¹⁾ E. Bourquelot u. M. Bridel, Journ. Pharmac. Chim. [7] **6**, 60, 97 [1912].

²⁾ ibid. [7] **7**, 377; Compt. rend. Acad. Sciences **156**, 957 [1913].

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **136**, 30 [1924].

⁴⁾ Journ. Pharmac. Chim. [7] **10**, 361, 393 [1914].

bereitet, von denen die eine 1 g Glucose und die andere die entsprechende Menge, d. i. 1.077 g, β -Methyl-glucosid enthält, in diesem Falle unter der Einwirkung derselben Mengen Emulsin, die Geschwindigkeit der Hydrolyse des β -Methyl-glucosides in jedem Moment gleich ist der Geschwindigkeit der Synthese in der Lösung mit 1 % Glucose, und daß beide Lösungen dasselbe Gleichgewicht in derselben Zeit erreichen (s. Tab. II).

Tabelle II.

Hydrolyse bzw. Synthese des β -Methyl-glucosids nach Bourquelot.

Synthese 1 g Glucose pro 100 ccm			Hydrolyse 1.077 g Glucosid pro 100 ccm		
Zeit in Tagen	Drehung	Drehungs- Änderung	Zeit in Tagen	Drehung	Drehungs- Änderung
0	+64'	0'	0	-42'	0'
1	+58'	6'	1	-36'	6'
2	+48'	16'	2	-26'	16'
4	+40'	24'	4	-18'	24'
8	+28'	36'	8	-6'	36'
13	+16'	48'	13	+6'	48'
18	+12'	52'	18	+10'	52'
—	Endwert	—	—	Endwert	—

Auf Grund dieses Versuches behaupten v. Euler und Josephson, daß wenn die Geschwindigkeit der Hydrolyse gleich ist der der Synthese, das Verhältnis der respektiven Geschwindigkeitskonstanten, also die Gleichgewichtskonstante, = 1 ist⁵⁾: „Offenbar ist die Geschwindigkeit für die Synthese dieselbe wie für die Hydrolyse. Für die Gleichgewichts-Lage ergibt sich also:

$$K' = k_1:k_2 = 1'' \quad (2)$$

Um den Unterschied zwischen der mittels der Formeln (1) und (2) berechneten Gleichgewichtskonstanten zu erklären, bedienen sich v. Euler und Josephson einer älteren Hypothese über die Verbindung des Enzyms mit dem Substrat, welche v. Euler⁶⁾ mathematisch entwickelt. Nach diesem Autor bilden die enzymatischen Reaktionen eine Ausnahme vom Massenwirkungs-Gesetz in dem Sinne, daß das Gleichgewicht nicht nur von den Konzentrationen der aktiven Substanzen abhängt, wie die gewöhnlichen chemischen Reaktionen, sondern auch noch durch die verschiedenen Affinitäten, welche das Enzym für die beiden Substrate besitzt, bedingt ist. — Nach v. Euler wird die Affinität des Enzyms zum Glucosid nach dem Massenwirkungs-Gesetz bestimmt durch die Gleichung:

$$(\text{Glucosid-Enzym}): (\text{Glucosid}) (\text{Enzym}) = K_1 \quad (3)$$

und für die Glucose durch:

$$(\text{Glucose-Enzym}): (\text{Glucose}) (\text{Enzym}) = K_2 \quad (4)$$

⁵⁾ v. Euler u. Josephson, loc. cit.

⁶⁾ v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. 52, 146 [1907].

Die Geschwindigkeit der Synthese und der Hydrolyse wird also nicht den Konzentrationen der Glucose und des Glucosides proportional sein, sondern den Konzentrationen der Verbindung (Enzym-Substrat). Beim Gleichgewicht können wir also schreiben:

$$k_1 (\text{Glucosid-Enzym}) (\text{Wasser}) = k_2 (\text{Glucose-Enzym}) (\text{Alkohol}) \quad (5)$$

Aus (3), (4) und (5) erhalten wir:

$$\frac{(\text{Glucose}) (\text{Alkohol})}{(\text{Glucosid}) (\text{Wasser})} \times \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_1}{k_2} = K' \quad (6)$$

Aus der Gleichung (6) ergibt sich, daß das Gleichgewicht in einer enzymatischen Reaktion nur dann vom Massenwirkungs-Gesetz beherrscht wird, wenn $K_1 = K_2$, also wenn die Affinitäten des Enzyms für die Glucose und das Glucosid einander gleich sind. Auf Grund dieser Theorie ziehen v. Euler und Josephson den Schluß, daß der Unterschied zwischen der Konstante 0.25, die sich aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht nach der Gleichung (1) berechnet, und dem Werte 1, der sich für dieselbe Konstante aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten, gemäß der Gleichung (2) berechnet, sich durch den Umstand erklären läßt, daß das Enzym eine 4-mal größere Affinität zur Glucose als zum β -Methyl-glucosid hat.

Wir wollen nun versuchen, für die von v. Euler und Josephson beobachteten Anomalien eine Erklärung zu geben. Zuerst werden wir zeigen, weshalb die Gleichgewichtskonstante ansteigende Werte hat.

Wir wiederholten den Versuch Bourquelots mit 10–90 % Methanol und erhielten fast identische Resultate, konnten indessen keine bedeutende Inaktivierung des Emulsins selbst in 100-proz. Methanol beobachten.

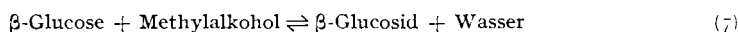
Tabelle III.

Synthese von β -Methyl-glucosid (Glucose = 1 g %; Emulsin = 0.20 g %).

Methyl- alkohol	Wasser	α_0 Anfangs- Drehung,	Drehung des Emulsins	α korri- giert. End- drehung	gebunden. Glucose	$[\alpha]_D$	$K_1 = \frac{Gl \beta}{Gl t}$	K'_t	K'_β
ccm	ccm	1 = 2	1 = 2	1 = 2	g				
10	90.0	+1.06	—0.070	+0.75	0.172	+53.0	0.628	0.237	0.1487
20	80.2	+1.07	—0.062	+0.50	0.315	+53.5	0.619	0.240	0.1488
30	70.7	+1.08	—0.050	+0.29	0.437	+54.0	0.614	0.242	0.1486
40	61.6	+1.10	—0.040	+0.11	0.538	+55.0	0.603	0.247	0.1488
50	52.5	+1.12	—0.032	—0.05	0.627	+56.0	0.591	0.252	0.1488
60	42.3	+1.15	—0.026	—0.19	0.711	+57.5	0.577	0.255	0.1474
70	32.1	+1.17	—0.020	—0.33	0.785	+58.5	0.563	0.264	0.1489
80	21.2	+1.20	—0.010	—0.47	0.860	+60.0	0.549	0.272	0.1493
90	10.7	+1.23	—0.000	—0.60	0.929	+61.5	0.529	0.283	0.1496

Wir glauben, daß der steigende Wert der Gleichgewichtskonstanten sich erklären läßt, wenn man die folgenden Tatsachen im Auge behält: 1) Auf Grund ihrer Spezifität wirkt die β -Glucosidase nur auf die isomere (β -) Form der Glucose ein. 2) Das Verhältnis zwischen der β -Glucose und der Gesamtmenge Glucose, die sich in der Lösung befindet, ändert sich mit der Natur des Lösungsmittels, in dem sich das Gleichgewicht: Glucose $\beta \rightleftharpoons$ Glucose α

in konz. Alkohol-Lösungen gegen die α -Form verschiebt, was ein Wachsen des spezif. Drehungsvermögens zur Folge hat (s. Tab. III, Reihe $[\alpha]_D$). Bei der Synthese des β -Methyl-glucosids werden wir also zwei sich überdeckende Gleichgewichte haben:



Schreiben wir nun das Massenwirkungs-Gesetz für (7), so erhalten wir:

$$(\beta\text{-Glucose}) (\text{Alkohol}) : (\text{Glucosid}) (\text{Wasser}) = K_\beta \quad (9)$$

(K_β = Gleichgewichtskonstante im Verhältnis zur Konzentration der β -Glucose).

Für (8) erhalten wir $(\beta\text{-Glucose}) = K_1(\alpha\text{-Glucose})$, oder:

$$\frac{\beta\text{-Glucose}}{\text{Gesamt-Glucose}} = \frac{K_1}{K_1 + 1} = K_2 \quad (10)$$

setzen wir den Wert für die β -Glucose aus (10) in (9) ein, so erhalten wir:

$$\frac{(\text{Gesamt-Glucose}) (\text{Alkohol})}{(\text{Glucosid}) (\text{Wasser})} = \frac{K_\beta}{K_2} = K_t \quad (11)$$

(K_t = Konstante für die Gesamt-Glucose, wie sie von v. Euler und Josephson berechnet wurde.)

Mit dem Wachsen der Alkohol-Konzentration verringert sich das Verhältnis β -Glucose : Gesamt-Glucose = K_2 , und K_t wird ansteigen, was auch der Fall ist. Die Konstante K_β für die Glucose kann man sowohl direkt aus der Gleichung (7), wie auch einfacher aus der Gleichung: $K_\beta = K_t \cdot K_2 = K_t \frac{Gl\beta}{Gl\alpha}$ berechnen; die für K_β erhaltenen Werte steigen nicht mehr an, sondern sind wirklich konstant (s. Tab. III, Reihe K_β). Das Massenwirkungs-Gesetz kann man also sehr gut für das Gleichgewicht β -Glucose + Alkohol \rightleftharpoons β -Glucosid + Wasser anwenden, doch unter der Bedingung, daß man die Spezifität des Enzyms und die Verschiebung des Gleichgewichtes β -Glucose \rightleftharpoons α -Glucose berücksichtigt.

Um zu zeigen, daß dieses Phänomen allgemein gültig ist, haben wir denselben Versuch mit einem Alkohol mit großem Molekulargewicht wiederholt,

Tabelle IV.

Synthese von β -Äthylenglykol-monoäthyläther-glucosid.

(Glucose 1 g %; Emulsin 0.30 g %.)

Alkohol	Wasser	α_0 Anfangs- Drehung,	Drehung des Emulsins,	α korri- giert, End- drehung,	gebunden. Glucose	$[\alpha]_D$	$K_1 =$ $\frac{Gl\beta}{Gl\alpha}$	K'_t	K'_β
ccm	ccm	l = 2	l = 2	l = 2	g				
10	90.0	+1.06	—0.12	+1.00	0.0337	+53.0	0.6278	0.5941	0.37
20	80.2	+1.07	—0.10	+0.94	0.0726	+53.5	0.6222	0.5947	0.37
30	71.2	+1.08	—0.08	+0.87	0.1136	+54.0	0.6165	0.6136	0.38
40	62.4	+1.09	—0.07	+0.80	0.1602	+54.5	0.6109	0.6270	0.38
50	52.8	+1.10	—0.05	+0.70	0.2197	+55.0	0.6053	0.6275	0.38
60	42.4	+1.12	—0.04	+0.58	0.2934	+56.0	0.5941	0.6353	0.38
70	32.2	+1.14	—0.03	+0.43	0.3817	+57.0	0.5829	0.6565	0.38
80	21.8	+1.17	—0.02	+0.22	0.5026	+58.5	0.5661	0.6749	0.38
90	11.2	+1.20	—0.01	—0.11	0.6822	+60.5	0.5493	0.6930	0.38

der aber doch in allen Verhältnissen mit Wasser mischbar ist, d. h. mit dem Äthylenglykol-monoäthyläther.

Wir erhielten in analoger Weise für die Konstante K_t , die für die Gesamt-Menge Glucose berechnet wurde, Werte, die mit der Alkohol-Konzentration ansteigen (s. Tab. IV, Reihe K_t). Die für die β -Glucose nach der Gleichung (7) berechnete Konstante K_β aber ergibt übereinstimmende Werte.

Über die Verschiedenheit zwischen den Konstanten, die sich aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht berechnen, und denen, die sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten ergeben.

Wir glauben, daß der Unterschied zwischen dem Werte 0.25, der von v. Euler und Josephson aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht nach der Gleichung (1) berechnet worden ist, und dem Werte 1, der sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten nach der Gleichung (2) ergibt, nicht darin zu suchen ist, daß die Affinität des Enzyms für die beiden Substrate verschieden ist, wie die genannten Autoren glauben, sondern in der Art, wie die beiden Werte berechnet wurden.

Wenn die Geschwindigkeit der Synthese gleich ist der der Hydrolyse, so sind ihre Geschwindigkeitskonstanten in einem monomolekularen Prozeß einander gleich. Die untersuchte Reaktion ist aber bimolekular. Nach dem Massenwirkungs-Gesetz wird die Geschwindigkeit der Synthese, für die Lösung mit 1% Glucose im oben erwähnten Versuch Bourquelots, in jedem Moment der Reaktion proportional sein der Konzentration der Glucose und des Alkohols:

$$V_s = k_s [\text{Glucose}] [\text{Alkohol}] \quad (12)$$

und für die Hydrolyse gilt:

$$V_h = k_h [\text{Glucosid}] [\text{Wasser}]. \quad (13)$$

Bourquelot und Verdon haben festgestellt, daß bei der Konzentration von 30.2 % Methanol in gleichen Zeiten die Menge der gebundenen Glucose in der ersten Lösung gleich ist der hydrolysierten Menge β -Methyl-glucosid aus der zweiten (s. Tab. II); in diesem Falle können wir für jeden Moment der Reaktion die Gleichung schreiben $V_s = V_h$ und $(\text{Glucose}) = (\text{Glucosid})$; daraus läßt sich ableiten $k_s [\text{Alkohol}] = k_h [\text{Wasser}]$ oder:

$$\frac{k_h}{k_s} = \frac{[\text{Alkohol}]}{[\text{Wasser}]} = K_t \quad (14)$$

Infolgedessen ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten nicht gleich 1, sondern gleich dem Verhältnis der Konzentrationen (Alkohol):(Wasser). Für die Lösungen mit 30.2 % Methanol erhalten wir:

$$K_t = \frac{k_h}{k_s} = \frac{[\text{Alkohol}]}{[\text{Wasser}]} = \frac{30.2:32}{69.8:18} = 0.246 \quad (15)$$

Die Gleichgewichtskonstante, berechnet für diese Alkohol-Konzentration, ergibt:

$$K_t = \frac{[\text{Glucose}] [\text{Alkohol}]}{[\text{Glucosid}] [\text{Wasser}]} = \frac{0.0278 \times 9.3799}{0.0278 \times 38.301} = 0.244^7) \quad (16)$$

⁷⁾ Die in der Gleichung (16) angeführten Konzentrationen sind aus den Bestimmungen Bourquelots durch Interpolation von 30.2, zwischen 30 % und 40 % Methanol, abgeleitet.

Die Gleichgewichtskonstante, die sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten ergibt, ist also fast identisch mit der, die man aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht erhält, wie es auch normal ist.

Die von v. Euler und Josephson erhaltenen Resultate lassen sich dadurch erklären, daß die genannten Autoren angenommen haben, bei gleichen Geschwindigkeiten seien auch die Geschwindigkeitskonstanten gleich. Dies kann man aber nur dann behaupten, wenn man die Konzentration des Alkohols und des Wassers als unveränderlich für 1% Glucose betrachtet und diese Werte in die Konstante einsetzt. Dann können wir schreiben: $V_s = k_1$ (Glucose), wobei $k_1 = k_s$ (Alkohol), $V_h = k_2$ (Glucosid) und $k_2 = k_h$ (Wasser). In diesem Falle ist $V_s = V_h$ und (Glucosid) = (Glucose), und es ergibt sich $k_1 = k_2$, infolgedessen:

$$K'_1 = \frac{k_2}{k_1} = 1 \quad (17)$$

Dann muß man aber das Massenwirkungs-Gesetz für das Gleichgewicht auch in der einfachen Form schreiben: $K_1 = [\text{Glucose}]:(\text{Glucosid}) = 1$, wobei die Konzentrationen des Alkohols und des Wassers in der Konstante 1 einbegriffen sind. In dieser vereinfachten Form hat die Konstante K_1 identische Werte und ist = 1, gleichgültig, ob man sie aus Geschwindigkeitskonstanten oder aus den Konzentrationen beim Gleichgewicht berechnet. In keinem Falle aber kann man die Konstante K_1 , die aus dem Verhältnis der Geschwindigkeiten nach der monomolekularen Formel (17) berechnet wurde, mit der Konstante K_t (nach Formel (16)) vergleichen, wo die Reaktion als bimolekular betrachtet wurde, und diese Konzentrationen berücksichtigt wurden.

Die Konstante, die v. Euler und Josephson aus dem Verhältnis der Geschwindigkeiten berechnen und = 1 erhalten (17), ist also 4-mal größer als die Konstante 0.25, die aus den Konzentrationen berechnet wurde (16), nicht weil die Affinität der β -Glucosidase für die Glucose 4-mal größer ist als für das Glucosid, sondern weil die Molekularkonzentration des Wassers im Bourquelots Versuch 4-mal größer ist als die des Alkohols war.

Wir glauben, daß die Affinität der Glucosidase für die beiden Substrate nicht in dem Sinne eine Rolle spielt, wie die genannten Autoren annehmen. Aus dem von uns Gezeigten ergibt sich, daß in den untersuchten Fällen sich die allgemeinen Gesetze der Chemie sehr gut anwenden lassen, und daß diese Reaktionen mithin keine Ausnahme vom Massenwirkungs-Gesetz bilden. Auf die Affinität des Enzyms zum Substrat, wie auch auf eine Erklärung der durch α -Glucosidase katalysierten Reaktionen, ferner auf die β -Galaktosidase und einige Disaccharid-Synthesen werden wir in einem späteren Artikel zurückkommen.

Beschreibung der Versuche.

Die Versuche wurden mit 1% Glucose, 0.20 g-% Emulsin und 10–90 Vol.-% Alkohol ausgeführt. Wir berücksichtigten die Kontraktion des Alkohols mit dem Wasser, indem wir für jede Alkohol-Konzentration die für 100 ccm zuzusetzende Menge Wasser bestimmten. Das spezif. Drehungsver-

mögen der Glucose in Methanol-Lösungen von 10–90 % wurde mit 2 % Glucose bestimmt. Ebenso bestimmten wir die Eigendrehung des Emulsins, die ja ganz beträchtlich ist, für jede Alkohol-Konzentration. Die polarimetrischen Bestimmungen wurden mit einem Polarisator nach Lippich mit einer Fehlergrenze bis zu $\pm 0.01^\circ$ durchgeführt. Die am Ende der Reaktion gefundene Drehung wurde in dem Sinne korrigiert, daß von ihr die Eigendrehung des Emulsins algebraisch abgezogen wurde. Die Menge der gebundenen Glucose wurde auf polarimetrischem Wege nach der Formel $x = a \frac{\alpha_0 - \alpha}{\alpha_0 - \alpha'_0}$ bestimmt, wo a die Menge Glucose bedeutet, die in 100 ccm aufgelöst wurde, α_0 die α Glucose entsprechende Drehung, α die beim Gleichgewicht abgelesene und α'_0 die Drehung, die sich ergeben würde, wenn α g Glucose sich gänzlich in β -Methyl-glucosid verwandeln würden. Die Adsorption der Glucose und ihres Glucosids an Emulsin ist bei diesen kleinen Mengen praktisch Null.

189. I. M. Gorski und S. P. Makarow. Über den Mechanismus der Kondensation von Nitro-methan mit Formaldehyd und die Darstellung des Nitro-äthanol.

(Eingegangen am 20. April 1934.)

Die Kondensation des Nitro-methans mit Formaldehyd ist bereits von verschiedenen Autoren bearbeitet worden. Schon Henry¹⁾, der die Umsetzung in Gegenwart von Alkali vornahm, wies darauf hin, daß sich das Nitro-methan dabei leicht mit 3 Mol. Formaldehyd unter Bildung von Nitro-isobutylglycerin verbindet. Die mutmaßlichen Zwischenprodukte dieser Umsetzung, die Kondensationsprodukte von 1 bzw. 2 Mol. Formaldehyd mit 1 Mol. Nitro-methan, d. h. das β -Nitro-äthanol und das Nitro-trimethylenglykol (2-Nitro-propandiol-1.3), konnte Henry jedoch trotz vieler Versuche nicht isolieren. Deswegen benützte er zur Gewinnung des Nitro-äthanol die von Demuth und Meyer²⁾ angegebene Methode, die von Äthylenjodhydrin und Silbernitrit ausgeht. Ferner wird in der Arbeit von Hofwimmer³⁾ darauf hingewiesen, daß bei der Darstellung des Nitro-isobutylglycerins geringe Mengen von Zwischenprodukten auftreten, deren Isolierung diesem Autor jedoch ebenfalls nicht gelang. Als E. Schmidt und Wilkendorf⁴⁾ im Jahre 1919 diese Reaktion unter verschiedenen Bedingungen studierten, versuchten sie, eine nur teilweise Kondensation zwischen Nitro-methan und Formaldehyd durchzuführen; es gelang aber auch ihnen nicht, die entsprechenden Produkte zu fassen. Auf Grund ihrer Ergebnisse kamen sie zu den gleichen Schlußfolgerungen wie Henry. Etwas später zeigten Wieland und Sakellarios⁵⁾

¹⁾ Bull. Acad. Belg. [3] **34**, 547 (C. **1898**, I 192); Compt. rend. Acad. Sciences **121**, 211 (C. **1899**, I 1154); Rec. Trav. chim. Pays-Bas [2] **16**, 256 (C. **1897**, II 1100).

²⁾ A. **256**, 28 [1889].

³⁾ C. **1912**, I 1265.

⁴⁾ B. **52**, 389 [1919].

⁵⁾ B. **53**, 201 [1920].