

2-Deoxy-2,3-dehydro-sialinsäuren, 3. Mitt.:

Hemmung der *Vibrio cholerae*-Neuraminidase
durch Oxidationsprodukte
der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure

Von

P. Meindl und H. Tuppy

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges.m.b.H.*
und dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Oktober 1969)

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester wurde mit Perjodsäure zu 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester oxidiert. Nach der Reduktion mit NaBH_4 erhielten wir 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester. *Vibrio cholerae*-Neuraminidase wird von 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure, deren *iso*-Nicotinoylhydrazon sowie von 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure gehemmt.

2-Deoxy-2,3-dehydro-sialic Acids, III: Inhibition of Vibrio Cholerae Neuraminidase by Oxidation Products of 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl-neuraminic Acid

Methyl 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuramate was oxidized with periodic acid to methyl 4-hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carboxylate. On treatment with carbonyl reagents the aldehyde gave the expected derivatives. Upon reduction with NaBH_4 methyl 4-hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carboxylate was formed. *Vibrio cholerae* neuraminidase was inhibited by 4-hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carboxylic acid, by its *iso*-nicotinoylhydrazone, and by 4-hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carboxylic acid.

Unter den 2-Deoxy-2,3-dehydrosialinsäuren, die wir kürzlich beschrieben haben¹, befanden sich wirksame Inhibitoren für *V. cholerae*-Neuraminidase². Die Hemmwirkung der untersuchten Verbindungen

* A-1121 Wien, Laskegasse 5—11.

¹ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **100**, 1295 (1969).

² P. Meindl und H. Tuppy, Z. physiol. Chem. **350**, 1088 (1969).

war von einer Reihe struktureller Eigenschaften abhängig: In den Molekülen mußten eine freie Carboxylgruppe, eine olefinische Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 sowie ein nicht zu umfangreicher N-Acylrest vorhanden sein; 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure hatte die größte Wirksamkeit. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Einfluß der Kohlenstoffatome 8 und 9 auf die Fermenthemmung.

Chemisch-präparative Versuche

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester läßt sich mit Perjodsäure oxidieren. Erwartungsgemäß werden 2 Mol Oxidationsmittel je Mol Ester verbraucht. Seinerzeit haben wir diese Reaktion als analytisches Hilfsmittel zur Bestimmung der Ringgröße herangezogen^{1, 3}. Nach dem Vorbild von Oxidationen anderer Neuraminsäure-Derivate⁴⁻⁶ konnte sie jedoch unschwer in den präparativen Maßstab übertragen werden. 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (**1**) gab in guter Ausbeute einen Aldehyd, 4-Hydroxy-5-acetyl-amino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (**2**). Aus diesem konnte mit Carbonylreagentien eine Reihe von Derivaten dargestellt werden (s. Tab. 1, 3—9). Der Aldehyd ließ sich in wäßriger Lösung mit NaBH₄ bei pH 8 glatt zu dem entsprechenden Alkohol, 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (**10**), reduzieren. Sowohl der Aldehyd (**2**) als auch der Alkohol (**10**) entwickelten mit Resorcin unter den Bedingungen der Farbreaktion auf Sialinsäurederivate⁷ eine starke Färbung. Das Absorptionsmaximum lag bei 635—640 nm; die Kurve hatte eine Schulter zwischen 600 und 620 nm. Die am Maximum gemessenen molaren Extinktionskoeffizienten betragen 12 630 bzw. 10 950 (Abb. 1). Die Färbungen wichen von jenen ab, die man mit einer äquimolaren Menge 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (**1**) erhält; dessen Absorptionsmaximum liegt bei 590 nm mit einer Schulter bei 620—640 nm (Abb. 1). Das UV-Spektrum des 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl- (**2**) und des 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylesters (**10**) zeigte eine Bande bei 240—245 nm (Abb. 2). Die olefinische Doppelbindung war der Hydrierung mit Pd als Katalysator zugänglich und nahm die theoretische Wasserstoffmenge auf; der aus 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxy-

³ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 816 (1965).

⁴ F. Weygand und H. Rinno, Z. physiol. Chem. **306**, 177 (1957).

⁵ R. K. Yu und R. Ledeen, J. Biol. Chem. **244**, 1306 (1969).

⁶ R. Kuhn und A. Gauhe, Chem. Ber. **98**, 395 (1965).

⁷ L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

methyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (10) in guter Ausbeute erhaltene 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethylpyran-2-carbonsäure-methylester (11) gab mit Resorcin überraschenderweise keine Färbung.

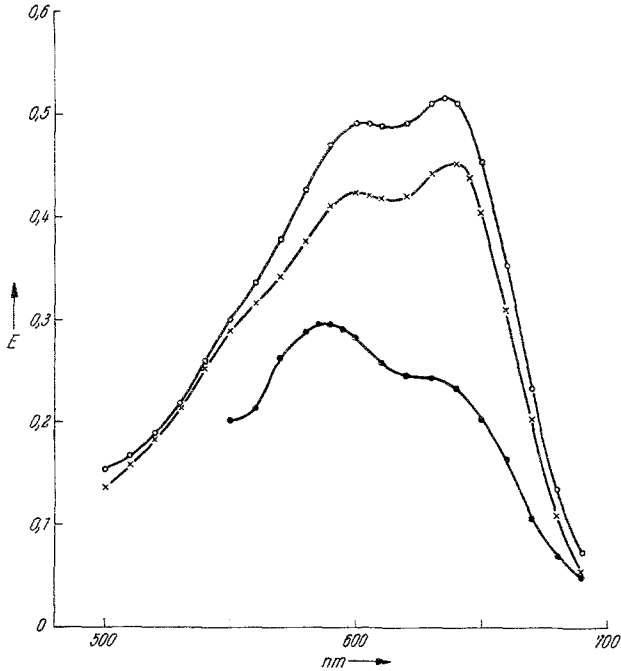


Abb. 1. Farbreaktion von 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (10) ($-\circ-\circ-\circ-$, $c = 10 \mu\text{g/ml}$), 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (2) ($-\times-\times-\times-$, $c = 10 \mu\text{g/ml}$) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (1) ($-\bullet-\bullet-\bullet-$, $c = 11 \mu\text{g/ml}$) mit Resorcin nach *Svennerholm*. Zur Messung der Extinktionen dienten Küvetten mit 1 cm Schichtdicke.

Versuche mit *V. cholerae*-Neuraminidase

Sowohl 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure (2 A) als auch 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure (10 A) hemmen *V. cholerae*-Neuraminidase. Die beiden Substanzen sind jedoch wesentlich weniger wirksam als 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (1 A)². Für 50proz. Enzymhemmung sind bei $2 \cdot 10^{-3}m$ -Konzentration des Substrates, des Phenyl- α -ketosides der N-Acetylneuraminsäure, $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$

2 A bzw. $1,9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l 10 A erforderlich. Unter gleichen Versuchsbedingungen wird die Aktivität der *V. cholerae*-Neuraminidase schon durch $1,3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l 1 A auf 50% herabgesetzt.

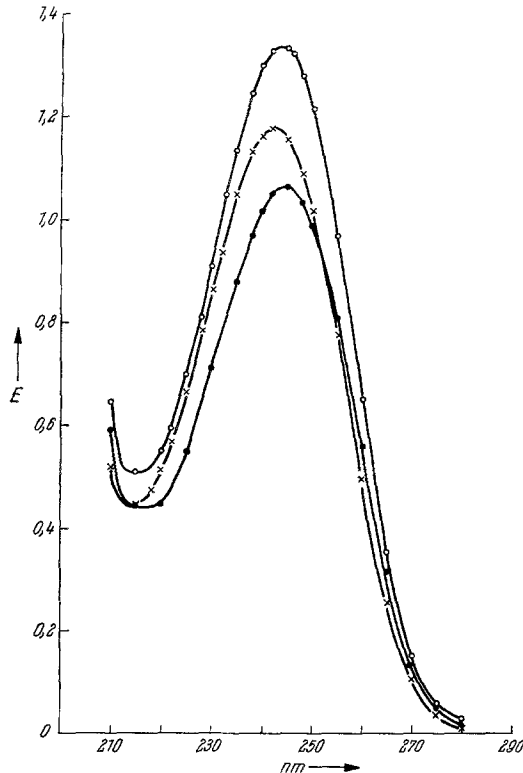
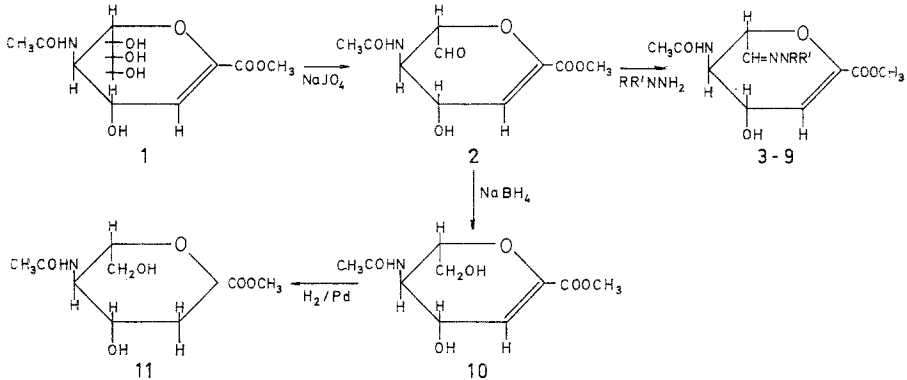


Abb. 2. UV-Spektren des 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylesters (10) (—○—○—), 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylesters (2) (—x—x—) und des 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylesters (1) (—●—●—) in 0,005proz. methanol. Lösung (1 cm Schichtdicke).

Die inhibierende Wirkung der 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure (10 A) wurde in der gleichen Weise einer kinetischen Analyse⁸ unterzogen, wie es in einer kürzlich erschienenen Arbeit von uns für 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (1 A) beschrieben worden ist². Aus den gewonnenen Ergebnissen (Abb. 3) darf geschlossen werden, daß *V. cholerae*-Neuraminidase durch 10 A kompetitiv gehemmt wird. Die Inhibitor-konstante beträgt

⁸ H. Lineweaver und D. Burk, J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).

$1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l und liegt somit in der Größenordnung der für das Phenyl- α -ketosid der N-Acetylneuraminsäure als Substrat bestimmten *Michaëlis—Menten*-Konstanten von $2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. Da diese Konstanten ein Maß für die Festigkeit der Bindung zwischen Ferment und Inhibitor bzw. Ferment und Substrat sind, entspricht die Affinität der 4-Hydroxy-



Derivat	R	R'
3	C ₆ H ₅	H
4	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅
5	NO ₂ C ₆ H ₄	H
6	C ₆ H ₅ CO	H
7	C ₅ H ₄ NCO	H
8	C ₆ H ₅ SO ₂	H
9	C ₆ H ₅ CH ₂ NHCS	H

Die aus den Methylestern 1 bis 11 durch Verseifung erhaltenen Carbonsäuren werden im Text mit 1A bis 11A bezeichnet.

5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure (10 A) zu *V. cholerae*-Neuraminidase etwa jener des Substrates. Sie ist jedoch wesentlich kleiner als die Affinität der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure, deren K_i $1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l beträgt². Die oxidative Abspaltung der Kohlenstoffatome 8 und 9 der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure hat demnach zu Verbindungen, die weniger wirksam als ihre Stammsubstanz sind, geführt. Von den in Tab. 1 beschriebenen Derivaten der 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure war nur das *iso*-Nicotinoylhydrazon (7 A) wirksam; es hemmte *V. cholerae*-Neuraminidase in $1 \cdot 10^{-3}m$ -Konzentration zu 50%. Ebenso wie der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (1) und deren Hydrierungsprodukt², sind auch der Methylester der 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-

2-carbonsäure (10) sowie die aus dieser Verbindung durch katalytische Hydrierung und anschließende alkalische Verseifung zugängliche 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethylpyran-2-carbonsäure (11 A) gegen *V. cholerae*-Neuraminidase vollkommen unwirksam.

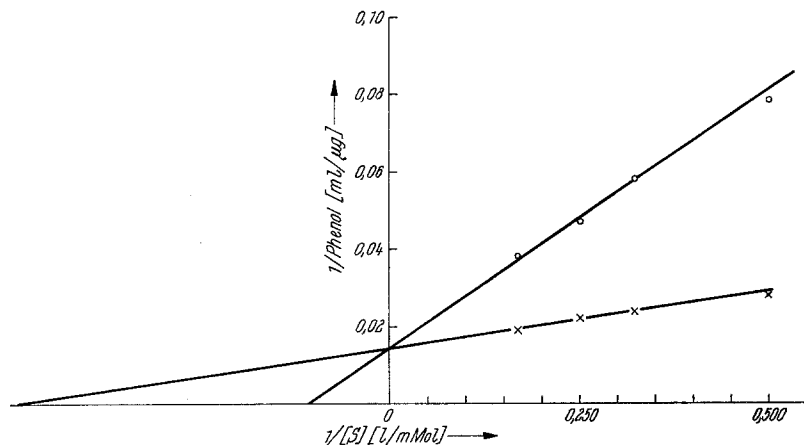


Abb. 3. Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung des Phenyl- α -ketosides der N-Acetylneuraminsäure von der Substratkonzentration in Abwesenheit des Inhibitors (—x—x—) und in Gegenwart der 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure (—●—●—, 5 μ Mol/ml). Es wurde bei pH 6,4 und 37° inkubiert. Ordinate: Reziprokwert der Menge des enzymatisch freigesetzten Phenols. Die abgebildeten Meßwerte stellen das Mittel aus mehreren Bestimmungen dar.

Für vorzügliche technische Mitarbeit danken wir Fräulein *T. Frisch* und Frau Ing. *H. Wocelka*.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heiẗtischmikroskop nach *Kofler* bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Dr. *J. Zak*, Univ. Wien, ausgeführt; die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus den Ergebnissen einer Doppelbestimmung.

Die optischen Drehungen wurden mit einem lichtelektrischen *Perkin-Elmer*-Polarimeter in 1-dm-Polarimeterrohren gemessen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G nach *Stahl* und das Laufmittel n-Butanol—n-Propanol—0,1n-HCl (1 : 2 : 1, v/v/v) verwendet. Um die Substanzen sichtbar zu machen, wurden die Chromatogramme mit konz. H₂SO₄—Wasser (1 : 1, v/v) besprüht und erhitzt⁹.

Die Ultraviolett-Spektren der Substanzen wurden in methanolischer Lösung mit einem Zeiss-PQ M-II-Spektralphotometer aufgenommen.

⁹ *K. Randerath*, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, 1962.

Tabelle 1. Derivate des 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylesters

Derivat	Summenformel	Elementaranalyse				Schmp., °C (Zers.)	[α] _D , (c in MeOH)	λ _{max.} [nm] (ε _{max.})
		C	H	N				
Phenylhydrazon, 3	C ₁₆ H ₁₉ O ₅ N ₃	Ber. 57,65	5,74	12,61	151—153	+ 197,7° (1,75)	279,5 (22 700)	
		Gef. 57,63	5,70	12,39				
Phenyläthylhydrazon, 4	C ₁₈ H ₂₃ O ₅ N ₃	Ber. 59,82	6,41	11,63	165—169	+ 185,2° (0,25)	282,0 (24 600)	
		Gef. 59,97	6,23	11,69				
Nitrophenylhydrazon, 5	C ₁₆ H ₁₈ O ₇ N ₄ · ½ H ₂ O	Ber. 49,61	4,94	14,47	180	+ 224,6° (0,35)	373,0 (24 600)	
		Gef. 49,79	4,93	14,64				
Benzoylhidrazon, 6	C ₁₇ H ₁₉ O ₆ N ₃	Ber. 56,51	5,30	11,63	203—205	+ 94,9° (1,75)	250,5 (25 100)	
		Gef. 56,57	5,25	11,44				
Isonicotinylhydrazon, 7	C ₁₆ H ₁₈ O ₆ N ₄	Ber. 53,04	5,01	15,46	162—168	+ 89,1° (1,70)	254,0 (17 500)	
		Gef. 52,55	4,99	15,01				
Benzolsulfonylhidrazon, 8	C ₁₆ H ₁₉ O ₇ N ₃ S · ½ H ₂ O	Ber. 47,29	4,96	10,34*	163—167	+ 86,4° (1,67)	232,0 (17 600)	
		Gef. 47,54	4,86	10,61				
4-Benzylthiosemicarbazon, 9	C ₁₈ H ₂₂ O ₅ N ₄ S · 1 H ₂ O	Ber. 50,93	5,70	13,20**	128—133	+ 52,7° (1,5)	275,5 (25 000)	
		Gef. 50,61	5,50	12,82				

Die für Schwefel ermittelten Analysenwerte betragen 7,80% (Ber. 7,98%)* bzw. 7,64% (Ber. 7,55%)**.

4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (2)

3,75 g 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester¹ (1) wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst und mit 125 ml 0,4*m*-HJO₄ portionenweise versetzt. Die Reaktion war nach 75 Min. bei Zimmertemp. beendet (Dünnschichtchromatogramm). Das Reaktionsgemisch brachten wir zur Entfernung der nicht umgesetzten Perjodsäure sowie der gebildeten Jodsäure auf eine mit Dowex 1 × 8 (Formiat-Form) beschickte Chromatographiesäule auf. Die mit Resorcin positiv reagierenden Eluatfraktionen wurden gesammelt und mit einem Rotationsverdampfer bei 40° auf ein kleines Volumen eingedampft. Das nach dem Lyophilisieren amorphe **2** kristallisierte aus 10 ml Methanol; für die Analyse wurde nochmals aus 15 ml heißem Methanol umgelöst; Ausb. 2,27 g (76% d. Th.), Schmp. 144—148° (Zers.). $[\alpha]_D^{26} + 19^\circ$ (*c* = 2,00, H₂O).

C₁₀H₁₃O₆N. Ber. C 49,38, H 5,39, N 5,76.

C₁₀H₁₃O₆N · CH₃OH. Ber. C 48,00, H 6,22, N 5,09.

Gef. C 47,95, H 5,96, N 5,20.

Die Elementaranalyse zeigt, daß **2** mit 1 Mol Methanol pro Mol Aldehyd, möglicherweise als Halbacetal, kristallisiert vorliegt.

Derivate (3—9) des 4-Hydroxy-5-acetylamino-6-formyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylesters (2) (s. Tab. 1)

Die Formylgruppe wurde mit einer Reihe von Carbonylreagentien auf folgende Weise umgesetzt:

2 mMole **2** wurden in 50 ml Methanol gelöst, mit 0,4 ml Eisessig versetzt und in Gegenwart einer äquivalenten Menge des Carbonylreagens unter Rückfluß gekocht. Empfindliche Hydrazinderivate wurden unter N₂-Atmosphäre und Lichtausschluß dargestellt. Das Ende der Reaktion ließ sich dünn-schichtchromatographisch ermitteln.

Die Derivate **3** und **4** wurden aus Benzol, **5**, **6** und **7** aus Methanol/Äther, die Derivate **8** und **9** aus Methanol kristallisiert erhalten. Die Ausb. lagen zwischen 50 und 80%.

4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-2,3-dehydropyran-2-carbonsäure-methylester (10)

1,20 g **2** in 65 ml destill. H₂O wurden nach Zugabe von 1 ml 0,01*n*-NaOH mit 346 mg NaBH₄ in 30 ml destill. Wasser portionenweise versetzt. Nach 4 Stdn. bei 25° war die Reduktion beendet (Dünnschichtchromatogramm). Das überschüssige Reduktionsmittel wurde mit 5 ml Eisessig zersetzt und die Lösung nach Entfernung der Na⁺ mittels eines Austauschers (Dowex 50 × 8, H⁺-Form) im Vak. bei 40° zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen, mit überschüssigem CH₂N₂ in Äther versetzt und die Borsäure (als Methylester) durch Destillation entfernt. Der amorphe, farblose Eindampfrückstand (1,17 g) ließ sich aus Methanol (25 ml), Äther (320 ml) und Petroläther (100 ml) zur Kristallisation bringen. Das Kristallisat, 762 mg **10**, mußte zur weiteren Reinigung noch 2mal aus Methanol und Äther umgelöst werden. Ausb. 548 mg (45% d. Th.), Schmp. 173—176° (Zers.). $[\alpha]_D^{23} + 45,4^\circ$ (*c* = 5,00, H₂O).

C₁₀H₁₅O₆N. Ber. C 48,98, H 6,17, N 5,71.

Gef. C 48,69, H 6,25, N 5,67.

4-Hydroxy-5-acetylamino-6-hydroxymethyl-pyran-2-carbonsäure-methylester (11)

In einer Apparatur nach *Ogg* und *Cooper*¹⁰ wurden 43,6 mg **10** über Pd (aus 37 mg PdO) hydriert. Die Verbindung nahm 99% der ber. H₂-Menge auf. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat im Vak. bei 40° eingedampft und der Rückstand aus Methanol (3 ml) und Äther (30 ml) kristallisiert. Ausb. betrug 28,6 mg (66% d. Th.) **11**, Schmp. 199—201°. $[\alpha]_D^{26} = -18,6^\circ$ ($c = 1,4$, Wasser).

C₁₀H₁₇O₆N. Ber. C 48,58, H 6,93. Gef. C 48,49, H 6,79.

Versuche mit Neuraminidase

Der für unsere Versuche verwendete 0,1*m*-Maleat-Puffer¹¹, pH 6,4, enthielt $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l CaCl₂.

Neuraminidase aus *V. cholerae* (Behringwerk AG., Marburg/Lahn) war in einem 0,05*m*-Acetatpuffer (pH 5,5), der 9 mg/ml NaCl und 1 mg/ml CaCl₂ enthielt, gelöst und besaß laut Angabe der Erzeugerfirma eine Aktivität von 500 Einheiten/ml*. Diese Lösung wurde mit Maleat-Puffer auf eine Fermentkonzentration von 40 Einheiten/ml gebracht.

Eine Lösung des als Substrat dienenden Phenyl- α -ketosides der N-Acetylneuraminsäure wurde aus dessen Methylester¹² durch Verseifung mit 0,1*n*-Alkali (30 Min. bei Raumtemp.) erhalten und mit Puffer auf die gewünschte Konzentration gebracht. Auf entsprechende Weise wurden auch Lösungen der auf Neuraminidase-Hemmung geprüften Verbindungen **2A** bis **11A** aus deren Methylestern (**2—11**) gewonnen.

Der Bedarf an *V. cholerae*-Neuraminidase und dem als Substrat dienenden Phenyl- α -ketosid der N-Acetylneuraminsäure wurde dadurch wesentlich eingeschränkt, daß wir das bisher verwendete Testvolumen von 1,00 ml² auf 0,200 ml reduzierten.

V. cholerae-Neuraminidase (2 Enzymeinheiten, s. o.) und Inhibitoren wurden 10 Minuten bei 37° vorinkubiert und sodann die enzymatische Hydrolyse durch Zusatz von Substrat in Gang gesetzt. Das durch das Enzym aus dem Substrat freigesetzte Phenol bestimmten wir mit dem *Folin—Ciocalteu*-Reagens¹³. Die Reaktion wurde zunächst durch Zugabe von 0,800 ml Na₂CO₃-Lösung zum Stillstand gebracht. Sodann setzten wir 1,00 ml Wasser und 0,200 ml Reagens zu. Nach 30 Min. Stehen bei Raumtemp. wurde die Extinktion in MT-4 Mikroküvetten (1 cm Schichtdicke) bei 750 nm mit einem Zeiss-PMQ II Spektralphotometer gemessen. Die Bestimmungen der Neuraminidase-Hemmung durch **2A** und **7A** wurden dadurch erschwert, daß diese Verbindungen mit dem *Folin—Ciocalteu*-Reagens starke Färbungen mit hoher Extinktion bei 750 nm entwickelten.

* Die Zahl der angegebenen Enzymeinheiten entspricht der Menge der in 15 Min. bei 37° C in dem oben angeführten Lösungsmittel aus einem Glycopeptid-Substrat abgespaltenen Acetylneuraminsäure, ausgedrückt in μg .

¹⁰ C. L. Ogg und F. J. Cooper, Anal. Chem. **21**, 1400 (1949).

¹¹ Methods in Enzymology (Hrsg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan) **1**, 142, Academic Press, 1955.

¹² P. Meindl und H. Truppy, Mh. Chem. **98**, 53 (1967).

¹³ O. Folin und V. Ciocalteu, J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927); Methods in Enzymology (Hrsg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan) **3**, 448, Academic Press, 1957.