

STANOVENÍ KYSELINY PYROHROZNOVÉ V KYSELINĚ MLÉČNĚ

PETR ZUMAN

Ústřední ústav polarografický v Praze

PRÍŠLO DO REDAKČIE 13. II. 1952

V literatuře byly popsány četné metody ke kvalitativnímu důkazu i ke kvalitativnímu stanovení kyseliny pyrohroznové. Z fermentativních metod má význam manometrický způsob, popsaný *W a r b u r g e m* [1, 2]. Z chemických metod je to zvláště tvorba hydrazonů, které byly stanoveny buď vázkově [3-7], nebo po rozpuštění v louhu kolorimetricky, jak popsal *C a s e* [8], jehož metoda v modifikaci podle *L u* [9] je nejčastěji užívána v novějších pracích. Tvorby addičních sloučenin s kyselým siřičitanem a retitrace nadbytku činidla jodem užíli *C l i f t* a *C o o k* [10], důkaz po redukcí na kyselinu mléčnou popisuje *E g r i w e* [11]. V jiných metodách užívá se oxydace kyseliny pyrohroznové buď peroxydem [12-14], nebo chloraminem [15], manganistanem [16], cerisulfátem [17] nebo jodistanem [18]. Z četných barevných reakcí, sloužících především k důkazu kyseliny pyrohroznové, je nutno uvést reakci s nitroprussidem podle *S i m o n a* a *P i a u x* [19] a kondensaci se salicylaldehydem podle *C s o n k a* [20] a *S t r a u b a* [21].

V poslední době *S l a v í k* a *M i c h a l e c* [22] modifikovali metodu *F r i e d e m a n o v u* a *H a u g e n o v u* [23], při níž rušící kyseliny oxalocetovou a ketoglutarovou převedli v heterocyklické látky působením hydrazinu v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Stanovili intenzitu zbarvení sodné soli dinitrofenylhydrazonu, který byl extrahován sodou z organického rozpouštědla.

Žádné z uvedených metod nebylo však užito k stanovení kyseliny pyrohroznové vedle nadbytku kyseliny mléčné. Proto byla obrácena pozornost k polarografickému stanovení.

Kyselina pyrohroznová poskytuje redukční polarografické vlny [24-28]. Závislost těchto vln na pH sledovali *M ü l l e r* a *B a u m b e r g e r* [29]. Tito autoři vykládali vznik dvou vln, jejichž vzájemný poměr se mění s pH základního roztoku a jejichž suma zůstává konstantní a odpovídá dvouelektronovému ději, ketoenol tautomerií. Jejich závěry vyvrátil *B r d i č k a* [30], když ukázal, že kyselina fenylgloxylová, u níž je enolisace vyloučena, se chová stejným způsobem. Přesto však *Z a m b o t t i* a *F e r r a n t e* [31] připisují dvě vlny na polarografické křivce kyseliny pyrohroznové keto- a enol-formě, podobně jako *K u z i n* a *E l p i n e r* [32], kteří předpokládají, že přítomnost aminokyselin podporuje enolisaci. Ve své další práci podal *B r d i č k a* [33] výklad elektrodových dějů při redukcí podobných kyselin, kdy ve vlně při pozitivnějších potenciálech dochází k redukcí nedisociované kyseliny, v druhé vlně k redukcí amiontu. Výška první vlny je zvyšována tvorbou nedisociovaných molekul rekombinací [33] v okolí elektrody. K reduk-

ci amiontu dojde při negativnějším potenciálu tehdy, až reakční rychlost nestačí vytvářet nedisociované molekuly.

K analytickým účelům užil vln kyseliny pyrohroznové jediné Š a n t a v ý [34], který sledoval polarografický vznik kyseliny pyrohroznové během alkoholického kvašení. — V této práci byly redukční vlny kyseliny pyrohroznové použity k stanovení ve vzorcích kyseliny mléčné a mléčnanu vápenatého různé čistoty.

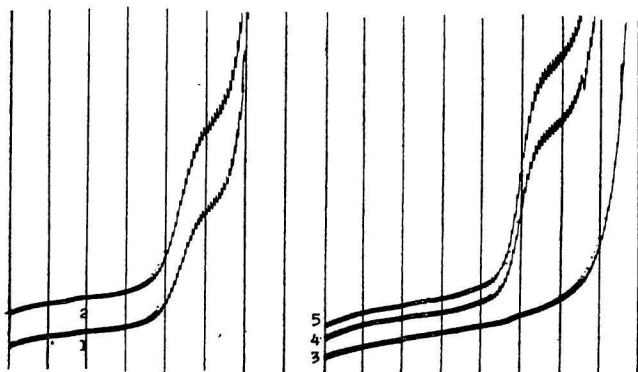
Experimentální část

Bylo použito obvyklého polarografického zařízení spolu s derivačním zapojením podle V o g e l a a Ř í h y [35]. Polarografická stanovení byla prováděna v nádobkách bez odděleného dna a jen tam, kde přítomnost silně povrchově aktivních látek bránila průchodu proudů adsorpci na anodě, bylo užito Kalouskovy nádoby s oddělenou kalomelovou elektrodou, která byla před každým stanovením vypláchnuta analysovaným roztokem. Kyslík byl odstraňován dusíkem. K vyhodnocení křivek bylo užito metody standardního přidání, umožňující jednotné odčítání při vlnách, někdy značně protažených. Jako standardu bylo používáno sodné soli kyseliny pyrohroznové, Merckova preparátu, přechistěného krystalisací z ethanolu, který laskavě poskytl Dr K. Slavík.

K identifikaci kyseliny pyrohroznové byla zjišťována závislost vln na pH a srovnávána se závislostí, nalezenou B r d i č k o u [33].

Stanovení kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné a meziproduktech její výroby mohlo být prováděno různými způsoby:

1. 1 g kyseliny mléčné byl rozpuštěn v 10 ml vody a zaznamenána křivka v tomto roztoku. Při napětí 0,8 až 1,0 V byla pozorována vlna kyseliny pyrohroznové. (Obr. 1 vlevo.)

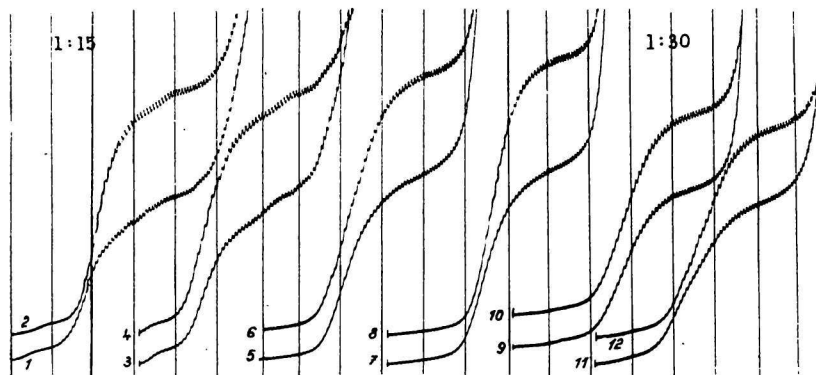


Obr. 1. Stanovení kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné v kyselém prostředí. křivka (1) 9,5 ml vody + 0,5 ml kyseliny mléčné „Všetečka“; křivka (2) dtto + 0,5 ml 0,005m roztoku sodné soli kyseliny pyrohroznové; křivka (3) 9,5 ml acetátového pufru (1,0m) pH 4,7; křivka (4) dtto + 0,5 ml 0,005m roztoku sodné soli kyseliny pyrohroznové. — Křivky byly zaznamenány při citlivosti 1:10 od 0 V, h = 55 cm, Hg X dno.

2. 1 g kyseliny mléčné byl rozpuštěn v 10 ml acetátového pufru pH 4,7. V tomto prostředí byla vlna kyseliny pyrohroznové u napětí 0,9 až 1,1 V. (Obr. 1 vpravo.)

3. 2 g kyseliny mléčné bylo rozpuštěno ve 20 ml vody. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 5 ml a ztitrováno 1n NaOH za použití thymolové modře jako indikátoru. Tak bylo stanoveno množství volné kyseliny.

K dalším pěti mililitrům původního roztoku bylo přidáno stejné množství louhu bez indikátoru, kapkou roztoku byla na indikátorovém papírku ověřena alkalická reakce roztoku a roztok doplněn na 10 nebo 25 ml. Takto připravený vzorek byl převeden do elektrolytické nádoby a byla zaznamenána křivka. Vlna aniontu kyseliny pyrohroznové je u napětí 1,3 V. (Obr. 2.)



Obr. 2. Stanovení kyseliny pyrohroznové v různých vzorcích kyseliny mléčné v alkalickém prostředí.

Křivka (1) a (3) kyselina mléčná od firmy Dříza, citl. 1:15; (5) a (7) Merck DAB 6; (9) a (11) kyselina mléčná od firmy Vsetečka, citl. 1:30. Sudé křivky zaznamenány vždy po přidání 1 ml 0,001m roztoku sodné soli kyseliny pyrohroznové k 10 ml odpovídajícího roztoku. Každá analýza je vždy dvakrát opakována. — Křivky od — 1,0 V, h = 28 cm, Hg × dno.

4. 1 až 2 g kyseliny mléčné byly rozpuštěny v 25 ml 0,5n Na_2CO_3 a roztok po uniknutí kyslíčnicku uhličitého a ochlazení byl polarografován. Vlna aniontu kyseliny pyrohroznové byla pozorována opět u napětí 1,3 V.

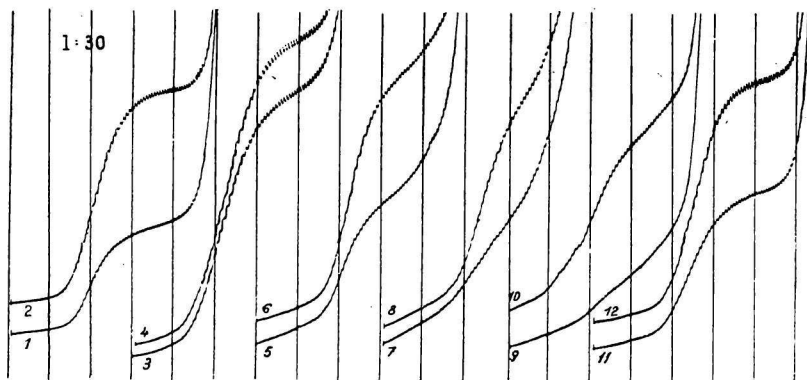
Výsledky, získané těmito čtyřmi způsoby, byly shodné. Různá pH byla zvolena proto, aby mohl být případ od případu eliminován vliv rušících látek. Nejlépe měřitelné vlny byly získávány způsoby 3 a 4, z nichž 4 byl podstatně rychlejší a je proto nejvhodnější. Zatím co v kyslejších roztocích neruší látky, běžně přicházející v biologickém materiálu, nelze použít stanovení v alkalických prostředích v přítomnosti aldehydických látek a cukrů.

U vzorků mléčnanu vápenatého bylo postupováno tak, že 0,5 g až 1 g vzorku bylo rozpuštěno v 10 ml vody třiminutovým záhřevem při 80° C. Bylo zjištěno, že takový záhřev nemá na obsah kyseliny pyrohroznové žádný vliv. Po vychladnutí byl roztok polarografován a vlna kyseliny pyrohroznové byla mezi 1,3 až 1,5 V.

Při stanovení kyseliny pyrohroznové v láku z okurek a kyselého zelí byly polarografovány přímo tyto tekutiny za použití derivačního zapojení podle Vo-gela a Říhy [35].

Přehled výsledků

Kyselina pyrohroznová byla nalezena v množstvích od 0,2% do 0,007% v kyselině mléčné různého původu a čistoty. (Tab. 1, obr. 2 a 3.)



Obr. 3. Stanovení kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné různé čistoty v prostředí uhličitánů.

Vzorky byly dodány cukrovarem v Seredi, n. p. Křivka (1) 2 ml roztoku kyseliny, označené „Potravinářská 50%“; (2) dtto + 0,2 ml 0,002m roztoku sodné soli kyseliny pyrohroznové (NaP); (3) 2 ml roztoku kyseliny, označené „Potravinářská 80%“; (4) dtto, + 0,1 ml 0,002m NaP; (5) 2 ml roztoku kyseliny mléčné označené „Technická I“; (6) dtto + 0,2 ml 0,002m NaP; (7) 2 ml roztoku kyseliny označené „Technická II“; (8) dtto + 0,2 ml 0,002m NaP; (9) 2 ml roztoku matečného louhu; (10) dtto + 0,2 ml 0,002m NaP; (11) roztok kyseliny mléčné DAB 6. l. č.; (12) dtto + 0,2 ml 0,002m NaP. — Křivky byly zaznamenány od 1,0 V při citl. 1:30, h = 28 cm, Hg × dno.

Tab. 1. Stanovení kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné různého původu

Označení	% kys. pyrohroznové	% kys. mléčné	‰ kys pyrohroznové na kyselinu mléčnou
Mallinckrodt I	0,0156	79,2	0,02
Mallinckrodt II	0,0155	78,0	0,02
Mallinckrodt iII	0,0156	79,0	0,02
Merck DAB 5	0,016	78,0	0,02
Původ neudán	0,025	74,0	0,03
Dříza — napaden plísní	0,02	52,5	0,04
Merck DAB 6	0,04	75,5	0,05
Původ neudán	0,04	79,1	0,055
Všetečka	0,06	74,5	0,09
Vignatti I	0,05	51,8	0,10
Vignatti II	0,08	52,5	0,16
Kahlbaum — Schering	0,15	77,2	0,195
„Milchsäure“	0,22	79,0	0,28

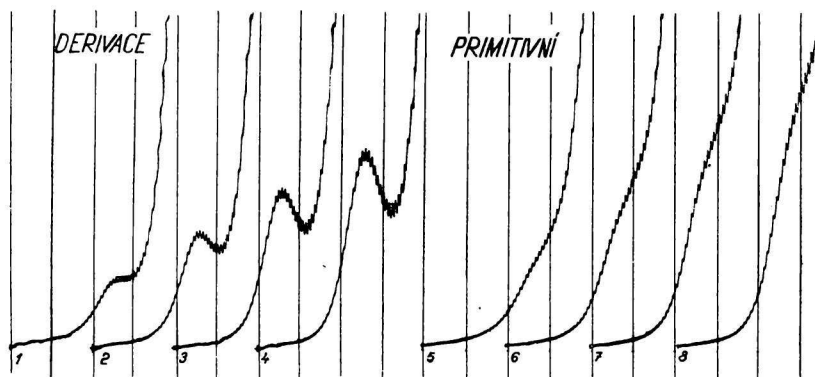
Dále byla stanovena koncentrace kyseliny pyrohroznové ve vzorcích kyseliny mléčné různé čistoty a v meziproduktech výroby, které byly laskavě poskytnuty cukrovarem v Seredi, n. p. Výsledky jsou shrnuty v tab. 2.

Tab. 2. Stanovení kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné různé čistoty

Označení	% kys. pyrohroznové	% kys. mléčné	% kys. pyrohroznové na kyselinu mléčnou	% sušiny	% kys. pyrohroznové na sušinu
Potravinářská	0,0083	53,0	0,016	19,5	0,042
Potravinářská	0,0198	78,5	0,025	50,8	0,039
Technická I	0,010	51,0	0,021	34,7	0,030
Technická II	0,019	52,0	0,037	45,1	0,043
Ca-laktát	0,0042			20,0	0,021
Matečný louh	0,0052			14,7	0,035
Zápara	0,0041			20,6	0,020
Kys. mléčná podle DAB 6, l. č.	0,0215			58,5	0,037

V tabulce je udáno procentické množství kyseliny pyrohroznové na váhové množství vzorku kyseliny jako průměr z několika souběžných analys. Vzorky matečného louhu, zápara a Ca-laktátu byly konzervovány přidavkem 0,5% fenolu, když bylo zjištěno, že přítomnost fenolu nemá na polarografické chování kyseliny pyrohroznové vliv. Touto konzervací bylo dosaženo toho, že obsah kyseliny pyrohroznové se ve vzorku neměnil ani během několika měsíců.

V láku z okurek bylo nalezeno asi 1,5 mg%, v láku z kyselého zelí asi 5 mg% kyseliny pyrohroznové.

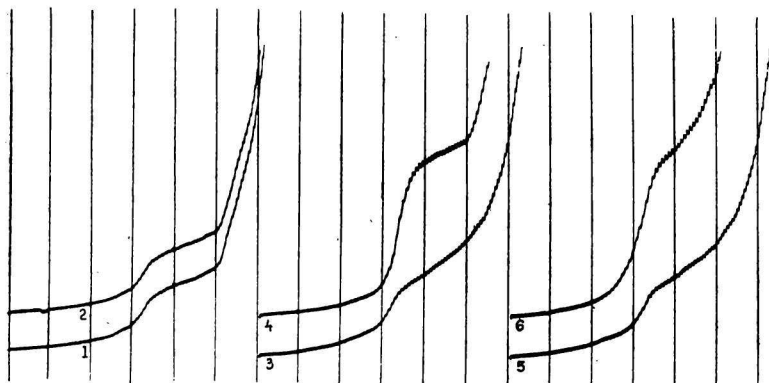


Obr. 4. Stanovení kyseliny pyrohroznové v láku z kyselého zelí pomocí derivační metody podle Vogela a Říhy.

Křivky 1 — 4 při zapojení derivačním, křivky 5 — 8 při zapojení normálním. Křivka 1 a 5 vzorek láku, křivky 2 — 4 a 6 — 8 po postupném přidávání 0,3 ml 0,01m roztoku sodné soli kyseliny pyrohroznové k 10 ml vzorku. — Křivky zaznamenávány od 0,6 V při citl. 1:2 při zapojení derivačním a s citl. 1:30 při zapojení normálním. $h = 42$ cm, otáčka kola 45 sec.

Dále bylo sledováno, zda kyselina pyrohroznová nevzniká z kyseliny mléčné oxidací během skladování. Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny pyrohroznové se nemění, ponecháme-li sledovanou kyselinu mléčnou volně na vzduchu. Ke změnám nedošlo ani po několikahodinovém probublávání kyslíku v kyselém ani v alkalickém

prostředí a to ani v koncentrovaných ani ve zředěných roztocích. Na rozdíl od tvrzení G a n a s s i n i h o [36] nedošlo v roztoku ke změnám, ať bylo zavádění plynu prováděno potmě, či na slunečním světle. Zato v přítomnosti katalysátorů, jakými jsou soli železa, lze pozorovat — ve shodě s pracemi N e u b e r g a [37] — značný vzrůst vlny kyseliny pyrohroznové. (Obr. 5.)



Obr. 5. Vliv katalysátoru na oxydaci kyseliny mléčné.

0,45% roztok mléčnanu vápenatého byl bublán 2 hod. na slunci kyslíkem. Liché křivky: před osvětlením, sudé křivky: po osvětlení. Křivka (1), (2) bez katalysátoru, křivka (3), (4) s 10^{-5} m FeSO_4 ; křivka (5), (6) s 10^{-5} m FeCl_3 . Druhá vlna u negativnějších potenciálů nebyla zde registrována. — Křivky byly zaznamenávány od 0,6 V při citl. 1:15, h = 70 cm.

Diskuse

Protože kyselina pyrohroznová byla nalezena ve všech vzorcích kyseliny mléčné, které byly k dispozici, bylo sledováno, zda kyselina pyrohroznová vzniká již při výrobě kyseliny mléčné, nebo teprve při jejím skladování.

Z údajů, uvedených v tab. I je patrné, že kyselina pyrohroznová provází kyselinu mléčnou během celého výrobního procesu a při přípravě nejčistší vápenaté soli hromadí se v odpadních produktech. Kyselina pyrohroznová vzniká nejspíše enzymatickou oxydaci kyseliny mléčné. Taková reakce byla popsána za působení čisté kultury B. D e l b r ü c k i i [38] nebo kvasnic ethanolického kvašení [39] na mléčnan vápenatý. Vznik kyseliny pyrohroznové byl zjištěn při rozkladu kyseliny mléčné dehydrázou této kyseliny [40] a M a z é [41] isoloval dokonce 12 druhů mikroorganismů, které na půdě z mléčnanu vápenatého a minerálních látek tvořily kyselinu pyrohroznovou vedle některých jiných ketoláték.

Zdá se tedy, že kyselina pyrohroznová provází pravidelně produkty mléčného kvašení, pro což svědčilo též zjištění kyseliny pyrohroznové v láku z okurek a z kyselého zelí.

Výsledky pokusů o oxydaci vzdušným kyslíkem svědčí pro to, že oxydace kyseliny pyrohroznové by byla možná jen v přítomnosti stop těžkých kovů, které při této autoxydaci působí jako katalysátory. Pro-

tože nelze předpokládat přítomnost stopy katalyticky účinných těžkých kovů ve všech zkoumaných vzorcích za současného působení světla, zdá se, že oxydace během skladování není hlavním zdrojem kyseliny pyrohroznové v kyselině mléčné. Pro tento závěr svědčí také zjištění, že v přítomnosti katalysátorů při oxydaci na slunečním světle byla pozorována vedle vlny kyseliny pyrohroznové ještě další vlna u více negativních potenciálů, odpovídající redukci aldehydu. Dochází zde nejspíše k dalšímu rozkladu kyseliny pyrohroznové za vzniku acetaldehydu. Tato druhá vlna nebyla v analysovaných vzorcích pozorována a je tedy pravděpodobné, že vznik kyseliny pyrohroznové neprobíhal takto katalysováním oxydací vzdušným kyslíkem.

Konečně je třeba diskutovat přesnost stanovení, které plyne z tab. 3, v níž jsou shrnuty analýzy mléčnanu vápenatého různého původu a z prvních tří údajů v tab. 1, kde v různých vzorcích od firmy Mallinckrodt byla zřejmě kyselina téhož původu.

Tab. 3. Stanovení kyseliny pyrohroznové ve vzorcích mléčnanu vápenatého

	1	2	3	4	5	6	Průměr	Prům. chyba
Sered 2X kryst.	0,005	0,005	0,006	0,006			0,0055	9,1%
Guldewerke DA pV 4	0,013	0,014	0,014	0,013	0,015	0,013	0,0137	4,6%
Původ neudán	0,024	0,024	0,024	0,023	0,022	0,024	0,0233	3,5%
Medica	0,027	0,026	0,028	0,025			0,0265	3,8%
Ingelheim	0,035	0,07	0,035	0,036			0,0357	1,7%

Poznámka: V tabulce jsou udávány hodnoty ve váhových procentech kyseliny pyrohroznové na vzorek.

Bylo zjištěno, že polarograficky lze stanovit 0,0005 g kyseliny pyrohroznové při m. zř. 1:1,000.000. Při koncentracích 0,2% až 0,003% kyseliny pyrohroznové v původním vzorku (což byly pozorované meze) lze kyselinu pyrohroznovou stanovit s průměrnou chybou ± 2 až 10% na výsledek podle koncentrace a čistoty vzorku. Menší přesnost byla zjištěna hlavně u nejnižších koncentrací a v přítomnosti koloidních látek, které činily vlny obtížně měřitelné. Uvedená chyba znamená přesnost na 0,004% při nejvyšších a 0,0003% při nejnižších koncentracích.

Souhrn

Polarograficky byla stanovena kyselina pyrohroznová v kyselině mléčné a mléčnanu vápenatém. Ve vzorcích kyseliny mléčné různé čistoty a původu bylo nalezeno od 0,2% do 0,0003% kyseliny pyrohroznové. Protože při oxydaci kyseliny mléčné vzdušným kyslíkem je nutná přítomnost stop těžkých kovů a slunečního světla, bylo usouzeno, že kyselina pyrohroznová nevzniká z kyseliny mléčné oxydací při skladování, ale především fermentativně při výrobě kyseliny mléčné. Tento předpoklad byl potvrzen nálezem kyseliny pyrohroznové ve všech vzor-

cích meziproduktů výroby kyseliny mléčné a v některých produktech mléčného kvašení. Popsanou metodou lze stanovit 0,0005 g kyseliny pyrohroznové při mezním zředění 1:1,000,000 s chybou 2 — 10% podle koncentrace a čistoty vzorku.

Определение пировиноградной кислоты в молочной кислоте

Пётр Зуман

Центральный полярнографический институт в Праге

В ы в о д ы

Полярнографическим путем определена пировиноградная кислота в молочной кислоте и в молочнокислом кальции. В образцах молочной кислоты разной чистоты и разного происхождения найдено от 0,2% до 0,003% пировиноградной кислоты. Ввиду того, что при окислении молочной кислоты воздушным кислородом необходимо присутствие тяжелых металлов и солнечного света, заключено, что пировиноградная кислота не получается из молочной кислоты окислением при помещении в силатах, но прежде всего ферментационным путем при производстве молочной кислоты. Этот вывод подтвержден нахождением пировиноградной кислоты во всех образцах промежуточных продуктов производства молочной кислоты и в некоторых продуктах молочного брожения. Описанным методом можно определять 0,0005 г пировиноградной кислоты при предельном разбавлении 1:1,000,000 с ошибкой 2—10% в зависимости от концентрации и чистоты образца.

Получено в Редакцию 6 февраля 1952 г.

BESTIMMUNG VON BRENZTRAUBENSÄURE IN DER MILCHSÄURE

PETR ZUMAN

Zentralinstitut für Polarographie in Prag

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde polarographisch die Brenztraubensäure in Milchsäure und Calciumlactat bestimmt. In den Proben von Milchsäure verschiedener Reinheit und Herkunft wurden 0,2—0,003% Brenztraubensäure gefunden. Da bei der Oxydation von Milchsäure durch atmosphärischen Sauerstoff die Gegenwart von Spuren von schweren Metallen und Sonnenlicht notwendig ist, kam man zu der Schlussfolgerung, dass Brenztraubensäure aus Milchsäure nicht durch Oxydation während der Lagerung, sondern in erster Reihe fermentativ bei der Milchsäureerzeugung entsteht. Diese Voraussetzung wurde durch den Befund von Brenztraubensäure in allen Proben der Zwischenprodukte der Milchsäureerzeugung und in einigen Produkten der Milchgärung bestätigt. Mittels der angeführten Methode ist es möglich, 0,0005 g Brenztraubensäure bei einer Grenzverdünnung von 1:1.000.000 mit 2 — 10% Fehler je nach Konzentration und Reinheit der Probe zu bestimmen.

In die Redaktion eingelangt den 6. II. 1952

L I T E R A T U R A

1. Warburg O., Kubowitz F., Christian W., Biochem. Z. 227, 250 (1930)
2. Warburg O., Christian W., Biochem. Z. 242, 210 (1931).
3. Allen C. F. H., J. Amer. chem. Soc. 52, 2955 (1930).

4. Case E. M., Cook R. P., *Biochem. J.* 25, 1319 (1931).
5. Neuberg C., Kobel M., *Biochem. Z.* 210, 467 (1929); 216, 493 (1929); 219, 490 (1930). *Ber.* 63, 1986 (1930).
6. Dejong M. A., W. K., *Rec. Pays-Bas* 19, 280 (1900).
7. Kostýčev S., Soldatenkov S., *Z. physiol. Ch.* 168, 124 (1927) 176, 287 (1928).
Kostýčev S., Gvaladze V., Eliasberg P., *J. physiol. Ch.* 188, 127 (1930).
8. Case E. M., *Biochem. J.* 26, 753, 759 (1932).
9. Lu G. D., *Biochem. J.* 33, 249 (1939).
10. Clift F. P., Cook R. P., *Biochem. J.* 26, 1788 (1932).
11. Eegriwe E., *Z. anal. Chem.* 95, 323 (1933).
12. Quastel J. H., *Biochem. J.* 18, 365 (1924).
13. Fernbach S., Schoen N., *Compt. rend.* 157, 1478 (1913); 170, 764 (1920).
14. Levene R., Meyer A., *J. biol. Chem.* 17, 443 (1914).
15. Bleyer B., Braun W., *Biochem. Z.* 183, 310 (1927).
16. Evans W. L., Witzeman E. J., *J. Am. Chem. Soc.* 34, 1086 (1912).
17. Fromageot C., Desnuelle P., *Biochem. Z.* 279, 174 (1935).
18. Fleury P., Boisson R., *J. pharm. Chim.* 30, 307 (1939).
19. Simon L. J., Piaux L., *Bull. soc. chim. biol.* 6, 477 (1924).
20. Csonka E., *J. biol. Chem.* 27, 209 (1916).
21. Straub F. M., *Z. physiol. Chem.* 244, 117 (1936).
22. Slavik K., Michalec Č., *Chem. listy* 43, 102 (1949).
23. Friedman T. E., Haugen G. E., *J. biol. Chem.* 144, 67 (1942); 147, 415 (1943).
24. Heyrovský J., *Polarographie*, Springer, Vídeň 1941.
25. Schwaer L., *Collection* 7, 326 (1935).
26. Shikata M., Shoji K., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 4, 96 (1928).
27. Adkins H., Cox F. W., *J. Amer. chem. Soc.* 60, 1151 (1938).
28. Winkel A., Proske G., *Ber.* 69, 1917 (1936).
29. Müller O. H., Baumberger J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 61, 590 (1939).
30. Brdička R., *Chem. listy* 39, 35 (1945).
31. Zambotti V., Ferrante A., *Arch. Sci. biol. it.* 26, 51 (1940).
32. Kuzin A. M., Elpiner I. E., *Biochimija* 12, 509 (1947).
33. Brdička R., *Collection* 12, 212 (1947) item *Chem. listy* 40, 232 (1946).
Brdička R., Wiesner K., *Collection* 12, 138 (1947), item *Chem. listy* 39, 36 (1945).
34. Šantavý F., *Bull. Soc. chim. biol.* 31, 1211 (1949).
35. Říha J., *Chem. listy* 45, 189 (1951).
36. Ganassini D., *C. Z.* 1910-I-729; 1913-I-387.
37. Neuberg C., *Biochem. Z.* 39, 158 (1912).
38. Neuberg C., Kobel M., *Biochem. Z.* 216, 493 (1929); 219, 490 (1930).
39. Kayser E., *Bull. Soc. chim. biol.* 6, 345 (1924).
40. Hahn A., Fischbach E., Niemer H., *Z. biol.* 94, 58 (1933); 95, 155 (1934).
41. Mazé P., *Compt. rend. Soc. biol.* 81, 1150 (1918); *C. Z.* 1919-I-960.