(昭和46年5月12日受理)

Bucherer-Bergs 法によるホルムアルデヒドよりの反応生成物[†]

白 井 忠*・竹 井 征 夫*

Studies on the Products from Formaldehyde by the Bucherer-Bergs Synthesis.

Studies on Amino Acids. I.

Tadashi SHIRAI* and Yukio TAKEI*

In order to have a quantitative information about the products from formaldehyde by the Bucherer-Bergs synthesis, the reaction mixture was treated on a strong cation exchange resin and the major products were determined about the effluent and eluate.

In the effluent: there was relatively large amount of hydantoic acid together with hydantoin and hydantoin amide. On heating, the former was increased while the latter two were decreased.

In the eluate: glycine was found together with a little amount of aminoacetonitrile and glycynamide.

The synthetic route of hydantoin is, of course, through the aminoacetonitrile, during the addition of carbon dioxide, some parts of aminonitriles was directly hydrolyzed to glycynamide and further to glycine.

概 要

従来、ホルムアルデヒドを用いる Bucherer-Bergs 反応は何となく釈然としないまま放置されてきた感があり、反応生成物についての報告もわづかである。

この反応生成物についての検討を、強酸性陽イオン交換樹脂で処理した流出部分と樹脂の溶出部分に分けて行ない、それぞれの主な生成物を確認した。

また、それらの定量法を検討し、樹脂処理混合物よりの分別定量を試みた。

[†] アミノ酸の研究(第1報)とする

* 日本化薬(株), 医薬部, 薬品研究所()

* Research Laboratories, Pharmaceutical Division, Nippon Kayaku Co., Ltd. ()

反応生成物の樹脂による変化について若干の検討を行ない、また得られる化合物の生成経路について多少の考察を加えた。

緒 言

アルデヒドまたはケトン, シアンアルカリ, および炭酸アンモニウムよりヒダントイン類を得る反応は, 一般に Bucherer-Bergs 法といわれ多くの報告がある¹⁻⁴⁾。

Henze ら⁵⁾は本反応を各種カルボニル化合物の確認に用いたが, その一般法は, カルボニル化合物(1モル), シアンカリ(2モル), 炭酸アンモニウム(4モル)を50% アルコール中2時間加熱反応後冷却してヒダントイン類を得るものである。シアンカリの代りに青酸を用いる方法も報告されている⁶⁾。

しかしこの反応はホルムアルデヒドに適用できないと

いわれ⁹⁾, ヒダントインを得るにはアミノアセトニトリルと炭酸アンモニウムを水溶液中, 66~79°C に加圧反応させる方法が報告されている⁷⁾。

さらに White ら^{8,9)}はパラホルムアルデヒド, シアンソーダおよび重炭酸アンモニウムを反応させ, 40%の収率でヒダントインを合成した。また, ヒダントインを分離することなく, 初期の反応混合物を少なくとも2モルのカセイアルカリで加水分解すると 83% の収率でグリシンが得られたと報告している。すなわち, 反応混合物中にはヒダントインは 40% しか含まれていないが, 加水分解により 83% の収率でグリシンが得られることから, グリシンになる中間体がさらに 40% 以上含まれていることになる。

筆者らは上記の結果に興味をもち, ホルムアルデヒドでの Bucherer-Bergs 反応の生成物を解明し, 反応経路を推定したので報告する。

本 論

1. 反応中間体の検討 White らは, パラホルムアルデヒド (1.1モル), シアンソーダ (1.04モル) および重炭酸アンモニウム (2.2 モル) の混合水溶液を 18~30°C で1時間以上かくはん溶解した後, 80~85°C で3時間, 還流器下で加熱反応した。この反応液を内温 102°C になる迄常圧において加熱蒸発し, 強酸性陽イオン交換樹脂を通過させ, その流出液よりパラホルムアルデヒドに対し 40% の収率でヒダントインを得た。

筆者らは, パラホルムアルデヒドの代りに 37% ホルマリン水溶液を用い, 密閉容器中 80°C, 3時間反応を行ない, 以下同様に樹脂処理し, 中間体検討の原液とした。

i. TLC による分離

生成物の分離に良好なシリカゲル TLC を用い, 展開溶媒として *n*-BuOH : AcOH : H₂O = 90 : 5 : 10 を用いて検討した。

結果は 図 1 に示す如く I₂ 発色により上から主として a, b, c の3種の化合物の生成を認めた。

a はヒダントインと同じ 図 1 樹脂流出液の TLC Rf を示した。b, c はヒダントイン類似物質であろうと推測されたので, ウレイド基の存在を示す Ehrlich 試薬による発色を試みたところ, 何れも黄色に強く発色した。

また, 樹脂流出液は pH 1.8 を示し酸性物質の可能

性が強く考えられたので, ヒダントイン酸の合成試料と比較した結果, b が Rf 値で一致した。

かくして反応生成物のうち a はヒダントイン, b はヒダントイン酸であると推定した。

ii. 分別結晶法 ホルマリン 0.15 モルより出発し, 樹脂処理した原液を 50 ml まで真空濃縮し冷却すると, 白色結晶 4 g を得た。この結晶は TLC で先の a と一致する。本品を蒸留水より再結晶し, 3.4 g の結晶を得たが, その融点は 218~20°C (Lit. 220°C) で標準品と混融して融点降下を示さず, IR, N 分析値も一致し, ヒダントインと確認された。N 分析値 27.85%, C₃H₄N₂O₂ としての計算値 N 27.99%。次にヒダントイン母液をさらに真空濃縮し, 約 3.4 g の結晶を得た。その TLC は a, b, c を含んでいる。この2番晶の母液は2番晶より相対的に b, c 成分を多く含んでいるので, 分別結晶による精製を検討したが成功しなかった。

iii. 弱塩基性陰イオン交換樹脂法 すでに 1.i において, 酸性物質の存在が暗示されたので, その分離を弱塩基性陰イオン交換樹脂で行なうことを試み次の処理を行なった。

それぞれの結晶を TLC で検討すると

E₁ : a (少量) + b, E₂ : b, E₃ : a

となったので, E₂ を検討した。その融点 147°C (発泡) で, 90% アルコールより再結晶して, 融点 159~160°C (発泡) (Lit. 160~1°C) となり, 標準品と混融して融点降下を示さず, また, IR, TLC も一致し, ヒダントイン酸と確認された。

注) E₃ は b が塩酸で溶出, 濃縮中に変化をうけたものと考えられる。

iv. カラムクロマトグラフィー c の分離のため, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。原料は 1.iii の乾固物 2.54 g より 1.0 g を使用した。処理は次の如く行ない, 各フラクションより内容物を検出した結果, ①は a, b 成分であり, ②は c に相当する成分を含むことを認めた。

1.0 g
 $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 5 : 10$
 20 ml に溶解 (不溶分 0.2 g 分離)
 ↓
 シリカゲル カラムクロマトグラフィー
 ワコーゲル C-200, 80 g (約 200 ml)
 ↓
 $\text{SV} = 0.1$ で同じ溶媒で展開
 5 ml づつのフラクションを分取
 ↓
 ① fr. 42~57
 V. Conc. to dry 0.35 g
 ② fr. 65~81
 V. Conc. to dry 0.15 g

②より得られた結晶は、融点 $171 \sim 1.5^\circ\text{C}$ を示し、80% (Vol) 含水エタノールより再結晶したものの融点は $196.5 \sim 7^\circ\text{C}$ を示した。

本品は元素分析の結果、N 35.78% を示し、ヒダントイン酸アミドとよく一致する結果を得られたので、グリシンエステルとシアン酸ソーダ、アンモニアでヒダントイン酸アミドを合成した。先の分離精製品は標準品と混融して融点降下を示さず、また IR, TLC 共に一致した結果、ヒダントイン酸アミドと確認された。

2. 中間体の定量法

i. ヒダントイン ヒダントインの定量は Siggia¹⁰⁾ により示される如く、エノールの定量法¹¹⁾を用いることにより行なうことができる。すなわち、非水溶媒中でアルコラートによる直接滴定であり、具体的にはジメチルホルムアミド溶媒中でソディウムメトキサイド-ベンゼン溶液でアゾバイオレット指示薬を用い滴定する。

ii. ヒダントイン酸および同アミド ヒ

ダントイン酸の定量法として biacetyl 試薬を用いる方法¹²⁾があるが、筆者らは一般にカルバミド基を持つ化合物は尿素の定量法¹³⁾を応用できると考え、ヒダントイン酸および同アミドについて Ehrlich 試薬である *p*-dimethylaminobenzaldehyde/1 N HCl による発色を行ない、その吸収スペクトルを測定した。ヒダントイン酸のスペクトルは 図 2 に示す如く、410~440 m μ に吸収極大を示すが、ヒダントイン酸アミドもほぼ同様な吸収曲線を与える。

そこで定量の目的で 435 m μ における吸収について、Beer の法則についての適否を求めた。この結果は 図 3 に示す如くよく適合することを認めた。

図 2 ヒダントイン酸の Ehrlich 試薬による吸収スペクトル (1.5 mM/100 ml)

図 3 ヒダントイン酸および同アミドの検量線

ヒダントイン酸と同アミドによる吸収値の差は僅少であるが、さらに酸とアミドの分別定量のため酸アルカリ滴定を併用し、アルカリ水溶液での滴定値よりヒダントイン酸を求めた。この値より換算して Ehrlich 吸収値より差し引いた残りをアミドの値とした。

〔定量法〕試料液 5 ml を試験管にとり、これに Ehrlich 試薬 (*p*-dimethylaminobenzaldehyde 1 g を 1 N 塩酸 100 ml に溶解したもの) 5 ml を加え振盪する。5 分後、435 m μ の吸光度を測定する。試料液の代りに蒸留水を用いたものをブランクとする。混合後の時間は 5 分でも 10 分でも吸光度にはほとんど差を認めない。

iii. 分別定量法の検討 先の分析法を標準サンプル

について行ない、混合物中の定量誤差を求めてみた。方法は下記の如くであり、表1に分析結果の1例を示す。

方法

- ① アルコラート滴定 $a+b$
- ② アルカリ滴定 b
- ③ Ehrlich 比色定量 $b+c$
- ①-② より a
- ② より b
- ③-② より c を求める。

表1 標準混合サンプルの定量結果

	理論値 (g)	分析値 (g)	分析値/理論値 (%)
ヒダントイン	0.9911	1.006	103.0
ヒダントイン酸	0.2997	0.298	99.6
ヒダントイン酸アミド	0.2885	0.290	100.4

3. パラホルムアルデヒドでの反応中間体 以上の結果を用いて、パラホルムアルデヒド、シアンソーダおよび重炭酸アンモニウムを用いる White らの追試を行ないその中間体を検討した。

反応は 80°C, 3 時間行ない、次いで内温が 102°C になるまで煮沸を行ない、樹脂よりの流出液を外温 50°C で真空濃縮乾固後定量した。結果は表2の如くである。

表2 パラホルムアルデヒドよりの反応中間体分析結果

反 応	生 成 物	収 率 (%)
No. 1	ヒダントイン	28.1
	ヒダントイン酸	36.9
	ヒダントイン酸アミド	2.2

合計 67.2%

文献値ではヒダントインが 40% 得られているが、筆者らの結果では 28% であり、一方ヒダントイン酸が 37% も認められたことより、さらに検討を加えた。

i. ヒダントイン酸定量値の検討 ヒダントイン酸は試料をアルカリ滴定で求めているので、当然他の酸性成分の影響を受ける恐れがある。そこで次の方法にしたがって検討を加えた。

試料: 3 の反応 No. 1 と同じ

- ① アルカリ水溶液滴定 $b+a$
- ② Ehrlich 比色定量 $b+c$
- ③ Dowex 44 (OH) 流出液の Ehrlich 定量 c
- ④ ヒダントイン酸誤差: $\alpha = ① - (② - ③)$

検討の結果、① 36.9%, ②-③ 36.0% より誤差は 0.9% であったが、直接のアルカリ滴定でも差程問題ないことを認めた。

ii. 加熱による影響 反応中間体にはヒダントインより多量のヒダントイン酸が存在することが判明したので、反応および後処理中の熱的变化も考えられた。そこで反

応後の加熱は極力低温で行うこととし、102°C になるまでの加熱を中止し、外温 60°C での真空濃縮に切換えて生成物の定量を行なった。結果は表3の如くである。

表3 パラホルムアルデヒドよりの反応中間体分析結果

反 応	生 成 物	収 率 (%)
No. 2	ヒダントイン	41.1
	ヒダントイン酸	18.2
	ヒダントイン酸アミド	6.0

合計 65.3%

すなわち、No. 1 と比較し、1) ヒダントインが 13.0% 増加して 41% になり、2) ヒダントイン酸が 18.7% 減少した。3) ヒダントイン酸アミドは 4% 弱増加した。

このことは 102°C までの加熱により、ヒダントインおよびヒダントイン酸アミドがヒダントイン酸に変化する傾向を暗示している。

4. ヒダントイン酸の生成条件 ヒダントインは一般に希アルカリ的作用によりヒダントイン酸に変化することは知られているが¹⁴⁾、ヒダントインおよびヒダントイン酸アミドの加熱によるヒダントイン酸への変化を知るため、次の如き組成での加熱の影響を検討した。

反応液組成

1. ヒダントイン (or ヒダントイン酸アミド) 0.025モル (0.01モル)
炭酸ソーダ 0.025モル
重炭酸アンモニウム 0.050モル
水 2.22 モル
2. ヒダントイン (or ヒダントイン酸アミド) 0.025モル (0.01モル)
重炭酸アンモニウム 0.075モル
水 2.22 モル

加熱反応後、減圧乾固し、一定量の Dowex 50W(H) に SV=1 で流し、流出液中の酸を 0.1N カセイソーダ水溶液で滴定した。なお、ヒダントインは樹脂による変化を認めないが、ヒダントイン酸アミドは同様条件で 6.7% ヒダントイン酸に変化するので、後者の場合はその補正を行なった。ヒダントイン酸の生成率を表4に示す。

表4 組成1および2における加熱によるヒダントイン酸生成率 (%)

組 成	1			2		
	80°C 3 hrs		Boil 2 hrs	120°C, 1 hr	80°C, 3 hr	120°C, 1 hr
原 料	加圧	常圧		加圧	加圧	加圧
ヒダントイン	15.2	18.0*	57.6	50.0	5.3	40.0
ヒダントイン酸アミド	5.0	9.9	68.7	15.1	0.7	10.0

* Glycine 生成率 0.5%

以上の結果より、両者ともに煮沸することにより、ヒダントイン酸への変化量が著増することが認められるが、これはヒダントイン合成反応後 102℃ まで加熱することの影響が大きいことを証明している。

5. 樹脂吸着物の検討 これまでの検討はすべて強酸性陽イオン交換樹脂処理の流出液について行ってきたが、樹脂吸着物にも塩基性基をもつ中間体が存在することも考えられるので、樹脂を希アンモニア水で溶出し真空濃縮して試料液とした。

i. TLC による分離と確認 ここに含まれる化合物は少なくとも塩基性あるいは塩基性基含有化合物である。そこでアミノ酸分離の一般的溶媒系として (1) n -BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 2 : 1, (2) phenol : H₂O = 7 : 3 についてシリカゲル TLC を行なったところ、図 4 に

図 4 2種の溶媒による溶出液の TLC 結果

示す如くそれぞれ3点を検出し、かつ、ニンヒドリン発色の場合上の2点はいずれも黄色に、下の1点は紫色に発色した。今フェノール系展開剤の場合のスポットを上から d, e, f とすると、ニンヒドリンで紫色に発色する f はアミノ酸である可能性が強く、黄色に発色する d, e は塩基成分とも考えられた。

本反応はホルムアルデヒドよりの Bucherer-Bergs 法の範疇に入るものと考えられ、一般にその反応機構はシアンヒドリン、アミノニトリルを経てヒダントイン形成に進むものと解釈されているので、本中間体にもこれら化合物の存在する可能性は予測される。

そこでアミノ酸としてはグリシンを、中間体の1つとしてはメチレンアミノアセトニトリル¹³⁾より得られるアミノアセトニトリル硫酸塩を標準品として同様にシリカゲル TLC を試みた。結果は図 5 に示す如くであり、溶媒はそれぞれ前回と同様である。

(2) で d はアミノアセトニトリルとほぼ同様な R_f を示し、ニンヒドリン発色も共に黄色となり、一方 f はグリシンとほぼ同様な R_f を示し、ニンヒドリン発色も

図 5 標準物質との TLC 比較結果

共に紫色である。(1) でもこの傾向は全く同様で、この結果、d はアミノアセトニトリル、f はグリシンとほぼ一致することを認めた。さらに e について、本品がニンヒドリンで d と同様に黄色に発色すること、d からグリシンが生ずるとすればその生成過程としてアミドを経なければならないことより、グリシニアミドである可能性が強く考えられたので、本品をグリシンより合成し比較検討した。

結果は図 6 に示す如くであり、溶媒はそれぞれ前回と同様である。ニンヒドリン発色で標準品も黄色とな

図 6 グリシニアミドとの TLC 比較結果

り、e はほぼグリシニアミドと一致した。d, e, f のそれぞれを確認する目的で試料液をさらに真空濃縮し、得られる固形物を含水メタノールより分別結晶を繰返した。最初に得られた結晶はグリシンであり、さらにグリシニアミドも得ることができた。アミノアセトニトリルはかかる処理に不安定であり、ここからは確認できなかった。

ii. 溶出物の定量 溶出液中の夫々の成分の定量を試みた。ここでアミノアセトニトリル、グリシニアミドは共に塩基であるので、アンモニア溶出液より脱アンモニ

アした後、塩基の合計として求め、一方グリシンはホルモール法による定量によることとした。

アミノアセトニトリルを除く標準品混合物での分析テストではほぼ良好な一致を認めることができた。そこで3のパラホルムアルデヒドより出発した反応 No. 1 および2の樹脂溶出液について定量を試みた。結果は表5の如くである。

表5 溶出液中の塩基とグリシンの分析結果

反 応	後 処 理	塩基 (%)	グリシン (%)
No. 1	内温 102°C まで加熱	0.5	9.0
No. 2	真空濃縮	2.8	7.1

すなわち、真空濃縮した No. 2 は塩基成分が多いが、逆にグリシンはほぼ同程度減少している。これは加熱により塩基中間体がグリシンに変化したと考えられる。

6. 強酸性樹脂の影響 1~5 における生成物の検討はすべて初期の加熱反応物を強酸性陽イオン交換樹脂, Dowex 50 W (H) を通過させて処理した場合についてであるが、樹脂処理による影響を知るためにさらに検討を加えた。

i. ヒダントインおよびヒダントイン酸 ヒダントインは酸性で安定に生成、存在するし、ヒダントイン酸もほとんど変化を示さないと考えられたが、念のため夫々水溶液として、Dowex 50 W (H) の9倍、37倍当量に SV=0.5 で通過させた。この際、流出液は何等変化を認めなかった。

ii. ヒダントイン酸アミド ヒダントイン酸アミドの水溶液を 0.2, 0.5, 2.0% に調製し、Dowex 50 W(H)

表6 ヒダントイン酸アミドの樹脂による変化

run	ヒダントイン酸アミド		生 成 ヒダントイン酸 (meq)	変化率 (%)
	濃度 (%)	(meq)		
1	0.2	0.718	0.105	14.6
2	0.5	1.79	0.312	17.4
3	2.0	7.18	0.900	12.5

50~100mesh, 25 ml に塔式で通過させ、その SV=0.36 とした。結果は表6の如くである。

ここで樹脂吸着容量はヒダントイン酸アミドに対し各実験において 59.2, 23, 7, 5.9 倍当量であり、かつその変化率を考慮すると最低でも 47.3 倍当量となっているので、少くも原料に対しては大過剰とみられる。その際、本反応はほぼ初濃度に比例する反応速度を示し、1次反応と解釈される。故に一定割合だけ反応

が進行するに要する時間は初濃度に関係なく一定である。変化の割合をグラフより求めてみると1時間当たり約3%の反応率と見なすことができる。

iii. アミノアセトニトリル アミノアセトニトリル硫酸塩 2.48 meq を 0.9% の水溶液とし、Dowex 50W (H) 25 ml に塔式で通過させ、十分水洗後アンモニアで溶出した。その濃縮液を TLC 上でニンヒドリン発色後デンシトメーターで測定した。SV は 0.67, 1.7 および 2.5 に変化させたが、グリシンアミドおよびグリシンへの変化はいずれも 0.5% に過ぎなかった。

iv. グリシンアミド グリシンアミド水溶液を Dowex 50 W (H) 25 ml で同様な処理を行ない、ホルモール定量でグリシンを測定した。結果は表7の如くであり、大幅なグリシンへの変化が見られる。

表7 グリシンアミドの樹脂による変化

グリシンアミド		SV	生 成 グリ シ ン	
濃 度 (%)	(meq)		(meq)	生成率 (%)
0.5	1.90	0.67	0.721	38.0

7. 樹脂処理前の反応生成物 反応中間体が樹脂により一部変化を示すことを認めたので、可及的変化の少ない反応生成物を知る目的で、直接シリカゲル TLC による検討を行なった。

反応：ホルマリン 0.15 モル、シアンソーダ 0.15 モル
重炭酸アンモニウム 0.35 モル、水

条件：80°C, 3 時間

処理：外温 60°C 以下で真空濃縮

結果は図7の如くである。

(1) $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 90 : 5 : 10$

(2) $\text{phenol} : \text{EtOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{c. NH}_4\text{OH} : \text{NaCN} =$
 $15\text{g} : 6.7\text{g} : 5\text{g} : 3.3\text{g} : 4\text{mg}$

共に I_2 でヒダントイン検出後、 I_2 を除き Ehrlich 発色

(3) $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 4 : 2 : 1$

(4) (2) と同じ

図7 ホルマリン反応生成物の直接 TLC 分析結果

共にニンヒドリン発色

以上の結果、強酸性陽イオン交換樹脂処理により得られる生成物と本質的には相違を認めないことが判明した。

考 察

パラホルムアルデヒド、シアンソーダおよび重炭酸アンモニウムを用いる Bucherer-Bergs 反応において、80°C、3 時間の反応生成物として樹脂処理流出液中に、ヒダントイン 41%、ヒダントイン酸 18%、ヒダントイン酸アミド 6% を認めた。後処理において内温 102°C まで煮沸することによりヒダントイン 28%、ヒダントイン酸 37%、同アミド 2% となり、またヒダントインおよびヒダントイン酸アミドの弱アルカリによるヒダントイン酸への変化も、特に煮沸により著しいことを知った。ゆえにヒダントイン酸はヒダントインあるいはヒダントイン酸アミドより加熱によって 2 次的に生成する可能性が強い。

Ingold ら¹⁶⁾はヒダントイン類の熱水酸化バリウム水溶液によるヒダントイン酸への変化を調べ、その変化の容易さは、ヒダントイン、5-メチル-, 5,5-ジメチル-, 5,5-ジエチル-ヒダントインの順であることを示したが、本報のヒダントインの場合にもその容易さがあるがえる。一方、溶出液中にアミノアセトニトリル、グリシンアミドと共にグリシンが存在したが、アミノアセトニトリルに二酸化炭素が付加してヒダントイン系化合物が得られる可逆的反應段階で、本反應の進行が幾分遅いため、一部のアミノアセトニトリルが直接加水分解を受け、グ

リシンアミドを生じさらに一部グリシンに変化したものと解釈できよう。

終りに、本研究発表を許可された医薬部薬品研究所長、常務取締役山中国夫博士に謝意を表する。また、実験の一部に協力された高橋利男氏に感謝する。

文 献

- 1) H. Bergs, *Ger. P* 566,094 (1929)
- 2) H.T. Bucherer, H. Barsch, *J. Prakt. Chem.* **140** 151 (1934)
- 3) H.T. Bucherer, W. Brandt, *ibid.* **140** 129 (1934)
- 4) H.T. Bucherer, H. Fishbeck, *ibid.* **140** 69 (1934)
- 5) H.R. Henze, R.J. Speer, *J. Am. Chem. Soc.* **64** 522 (1942)
- 6) A.O. Rogers, *USP* 2,391,799 (1945)
- 7) W.F. Gresham, C.E. Schweitzer, *USP* 2,402,134 (1946)
- 8) H.C. White, D.V. Wysong, *USP* 2,663,713 (1953)
- 9) H.C. White, D.V. Wysong, 日特公 昭 30-5965
- 10) S. Siggia, *Quantitative Organic Analysis via Functional Group*, 2nd Ed. (1954)
- 11) J.S. Fritz, *Anal. Chem.* **24** 674 (1952)
- 12) S.B. Koritz, P.P. Cohen, *J. Biol. Chem.* **209** 145 (1954)
- 13) cf. G.W. Watt, J.D. Chrisp, *Anal. Chem.* **26** 452 (1954)
- 14) E. Ware, *Chem. Rev.* **44** 403 (1950)
- 15) W.K. Anslow, H. King, *Org. Synth. Coll.* Vol. 1 292
- 16) C.K. Ingold, S. Sako, J.F. Thorpe, *J. Chem. Soc.* **121** 1177 (1922)