

# Aflatoxin B<sub>1</sub> Charge-transfer Complex에 관한 研究

## 第 1 報 Benzene과의 Charge-transfer Complex

盧 益 三 · 李 康 洽

仁 荷 大 學 校

(1974. 5. 29 수리)

## Studies on the Charge-transfer Complex including Aflatoxin B<sub>1</sub>

### Part I. Charge-transfer Complex with Benzene

Icksam Noh and Kang Heup Lee

Inha University

(Received May 29, 1974)

### Summary

The interaction of the carcinogenic mycotoxin, Aflatoxin B<sub>1</sub>, with the electron-donating molecule, benzene, was studied spectrophotometrically.

The formation of charge-transfer complex between Aflatoxin B<sub>1</sub> and benzene in the presence of zinc chloride was observed and the apparent equilibrium constant of this charge-transfer complex was found to be 0.198 (liter mole<sup>-1</sup>).

It is assumed that, as the result of this study, some charge-transfer complexes could be formed between the weak electron-accepting Aflatoxin B<sub>1</sub> and strong electron-donating molecules, and the spectral changes occurred in the binding of Aflatoxin B<sub>1</sub> with proteins or DNA is attributed to the existence of charge-transfer type interaction.

### 緒 論

醫藥, Toxin, Hormone類, 癌誘發物質等과 같은 生化學的 活性物質이 人體組織內에서 어떻게 結合이 이루어지고 어떻게 機能을 나타내느냐에 對해서는 여러說은 있지만, 어느것이나 確固한 體系는 이루어지지 않고 있다. Mycotoxin의 1種인 Aflatoxin은 쌀, 콩, 옥수수, 밀等 穀物類에 寄生

하는 곰팡이인 *Aspergillus flavus*의 代謝生成物로서 人體에 對하여 매우 큰 毒性을 나타내며 特히 肝機能의 低下와 더불어 肝癌을 誘發시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup>

Aflatoxin의 動物體內에서의 作用에 관한 研究는 주로 *in vitro* 研究로서 特히 Aflatoxin B<sub>1</sub> 및 G<sub>1</sub>의 蛋白質, DNA等과의 結合에 對한 物理化學的인 研究가 大部分으로서 Sporn<sup>3)</sup>, Clifford<sup>4)</sup>等은

Aflatoxin B<sub>1</sub>과 DNA와의 결합 연구에서 DNA와 결합하므로써 RNA 합성을 저해한다고 보고하고 있고, 그외 여러報告者들에 의해서 Aflatoxin B<sub>1</sub> 및 G<sub>1</sub>의 DNA 및 Nucleotide,<sup>5-10)</sup> Histone,<sup>11)</sup> Deoxyribonuclease,<sup>12)</sup> Serum protein<sup>13-16)</sup> 등에 대한 결합에 대해定性 및 定量的인 연구가 報告되어 있으며, *in vivo* 연구도 일부 報告되어 있다.<sup>17,18)</sup>

그러나 이들의 연구는 Aflatoxin의 결합 Mechanism에 對하여는 別로 言及이 없고 Spectrum의 變化, 結合常數의 決定 등에 對해서만 論하고 있다.

著者는 Aflatoxin B<sub>1</sub>과  $\pi$ -electron 供與分子와의 作用을 研究하여 Aflatoxin과 生體高分子物質과의 結合이 Charge-transfer Complex 形成에 基因하는 것 이라고 이미 報告한 바 있다.<sup>19)</sup>

本 연구는 鹽化亞鉛 存在下에서  $\pi$ -electron 供與分子인 Benzene 과 Aflatoxin B<sub>1</sub>의 Charge-transfer Complex 形成을 定量的으로 追究, 平衡常數를 決定하여 Aflatoxin B<sub>1</sub>의 電子受容體로서의 作用을 再 確認하였다. 따라서 Aflatoxin과 DNA의 結合은  $\pi$ -electron potential 이 큰 Purin base와의 電荷移動作用이며, 또 蛋白質과의 結合도 亦是 electron donability가 큰 Indole, Imidazole環을 가진 아미노酸部分에 電荷移動作用으로 이루어진다는 推定을 더욱 뒷받침해주고 있다.

## 實驗方法

### 試藥

Aflatoxin B<sub>1</sub> (Af. B<sub>1</sub>)은 Chu의 方法<sup>20)</sup>으로 만들어진 것을 Wisconsin 大·食品研究所에서 提供받아, Chloroform/*n*-Hexane 溶媒에서 2회, Chloroform/Methanol 溶媒에서 1회 再結晶, 眞空乾燥後 使用하였다. 本品는 Thin-layer Chromatography (TLC) 上에서 單一 Spot를 나타내었으며, 定량을 爲한 물 吸光係數는 Chloroform 溶媒下 波長 362nm에서 22,400으로 하였고, 容量比 Benzene 90/Chloroform 10의 溶媒에서의 물 吸光係數는 (濃度既知之의 Chloroform 溶媒에 一定量의 Benzene을 加하여 逆試算으로 求한 값 20,400을 使用하였다.

各溶媒 및 Zinc chloride는 試藥 1級을 精製하지 않고 그대로 使用하였다.

### 分光 및 其他分析

Af. B<sub>1</sub>의 濃度測定 및 錯物의 可視 및 紫外部에서의 分光分析은 Beckman DU spectrophotometer 및 Perkin-Elmer model 202 recording spectrophotometer를 使用하였으며, 測定 cell은 1cm Silica

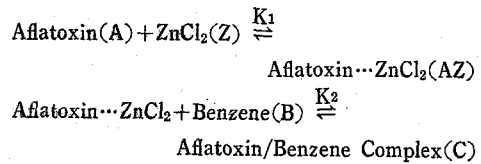
cell, 溫度는 20~22°C에서 測定하였다. 또 모든 測定은 溶液 調製後 24hrs後에 行하였다.

錯物의 螢光分析은 Aminco spectrophotofluorometer를 使用하였다.

TLC의 展開液은 Chloroform 97/Methanol 3 또는 Benzene 140/Methanol 10의 混合溶液을 使用하였고, Af. B<sub>1</sub>의 初濃度는  $2 \times 10^{-6}$  mole/l, Spot 當試料은 10 $\mu$ l을 使用하였으며, 展開後 Spot의 位置는 UV light 下에서 發生하는 螢光으로 判別하였다.

### 平衡常數의 計算

Af. B<sub>1</sub>이 ZnCl<sub>2</sub> 存在下에서 electron donor인 Benzene과 錯物을 形成하는 平衡을 다음과 같이 생각할 수가 있다.



여기에서 平衡常數 K<sub>1</sub> 및 K<sub>2</sub>는 다음과 같이 된다.

$$K_1 = \frac{AZ}{(A-AZ)(Z-AZ)} \cdots \cdots \textcircled{1}$$

$$K_2 = \frac{C}{(AZ-C)(B-C)} \cdots \cdots \textcircled{2}$$

萬一,  $Z \gg A$ 로 하면 AZ는 Z에 對하여 無視할 수 있고,  $AZ \ll B$ 로 한다면 C는 B에 對하여 無視할 수 있으므로 ①, ②式은 各各 ③, ④式으로 된다.

$$K_1 = \frac{AZ}{(A-AZ)Z} \cdots \cdots \textcircled{3}$$

$$K_2 = \frac{C}{(AZ-C)B} \cdots \cdots \textcircled{4}$$

④式을 AZ에 對하여 풀면

$$AZ = C \left( 1 + \frac{1}{K_2 B} \right) \cdots \cdots \textcircled{5}$$

⑤式을 ③式에 代入하면

$$K_1 = \frac{C \left( 1 + \frac{1}{K_2 B} \right)}{\left\{ A - C \left( 1 + \frac{1}{K_2 B} \right) \right\} Z} \cdots \cdots \textcircled{6}$$

⑥式을 풀어서 整理하면 ⑦式이 얻어지며

$$\frac{A}{C} = \left( \frac{1}{BK_1 K_2} + \frac{1}{K_1} \right) \frac{1}{Z} + \left( 1 + \frac{1}{K_2 B} \right) \cdots \cdots \textcircled{7}$$

A/C를 1/Z에 對하여 plot하면 直線이 얻어질 것이고,

$1 + \frac{1}{K_2 B}$ 는 切片,  $\left( \frac{1}{BK_1 K_2} + \frac{1}{K_1} \right)$ 은 直線의 기울기가 된다.

여기에서 A는 Aflatoxin의 初濃度, Z는  $ZnCl_2$ 의 初濃度, C는 Charge-transfer Complex의 濃度로서 A에서 錯物形成으로 減少된 濃度를 取하면 된다. 왜냐하면, AZ는 Spectrum上, A와 區別이 되지않고 同一波長上에 있으므로 減少된 A는 바로 C로 볼수가 있으며, 이의 妥當性에 對하여는 考察에서 다시 言及할 것이다.

B는 Benzene의 濃度로서 모든 溶液이 90 Vol.% Benzene 溶液이므로 여기서는 constant (10.13 mole/l)가 된다.

따라서 切片에서  $K_1$ 을 計算할수가 있고  $K_1$ 을 알면 기울기에서  $K_2$ 를 求할수가 있다. A/C 對 1/Z plot는 거의 直線이나, 最少自乘法으로 直線式을 計算하였다.

### 結果 및 考察

Af.  $B_1$ 은 그 構造로 보아 coumarin環에 存在하는 極性이 큰 ketone型 carbonyl이 中心의 芳香族環과 conjugate 되어있어, 電子受容性이 클것이라는 것을 豫測할수가 있다. Aflatoxin과 DNA 및 蛋白質과의 作用에 있어서 共通의인 것은 Af.  $B_1$ 의 最大吸收波長인 362nm에서의 吸光度의 減少와 더불어 380~400nm 領域에서의 吸光度의 增加를 볼수가 있다.<sup>8,4,6,7,8,9,15)</sup>

이 結合이 一次結合이 아니라는 것은 잘 알려져 있는 事實로서 가장 可能性이 큰 結合은 Charge-transfer interaction 이라고 볼수가 있다. 이에 水素結合의 可能性을 提示한 사람도 있으나, 萬一水素結合을 이룬다면 近赤外部 또는 赤外部의 Spectrum 變化가 일어날 것이고, 紫外 또는 可視部에서의 吸收 Spectrum 變化는 없어야 할것이다. 著者는 前報<sup>10)</sup>에서 electron donability가 큰 Hexamethyl benzene, Dimethyl aniline이 Af.  $B_1$ 과 Charge-transfer Complex를 形成함을 밝혔고 아미노酸中에서도 Tryptophane이 Af.  $B_1$ 과 同一한 錯物을 形成함을 밝힌 바 있어, Benzene, Toluene, Xylene等과 같은  $\pi$ -electron donor도 Af.  $B_1$ 과 Charge-transfer Complex를 形成할 것이라는 것을 推測할수가 있다. 그러나 Spectrum上에서의 觀察은 어려워져서, 다만 Af.  $B_1$ 의 最大吸收波長이 芳香族 溶媒內에서만 350nm 前後로 移動하며, Af.  $B_1$ 의 水吸光係數가 Chloroform, Ethanol, 물 等の 溶液에서 보다, 約 20% 낮다는 것뿐이다.<sup>21)</sup> 그러나 이러한 事實만으로 錯物形成을 斷定할수는 없는 것이다. Benzene, Toluene, Xylene

의 報告된 Ionization potential은 各各 9.24, 8.82, 8.4~8.6<sup>22)</sup>으로서 萬一, Af.  $B_1$ 과 Charge-transfer Complex를 形成하였다 하더라도 錯物의 吸收波長은 短波長쪽으로 移動하여 芳香族環의 강한 吸收가 일어나는 300nm 以下로 내려갈 것이다. 이렇게 된다면 錯物의 吸收波長은 Spectrum上에서 區分하기 困難해질 것이며, 또 錯體의 平衡常數가 적다면 더욱 觀察할수 없게 될 것이다.

一方,  $ZnCl_2$ 와 같은 Lewis 酸은 弱한 電子受容體의 電子受容能을 높이는 效果가 있다고 報告되어 있다.<sup>23-25)</sup> 따라서 Af.  $B_1$ /Benzene系에  $ZnCl_2$ 를 加한다면, ketonic carbonyl基의 lone pair electron에  $Zn^{2+}$ 이 coordination 되어 Af.  $B_1$ 中心에 있는 芳香族環에 電子密度가 적어져서 Af.  $B_1$ 은 강한 電子受容體로 되어 Benzene等과 같은 電子供與體와 Charge-transfer Complex를 만들수가 있을 것이다.

Fig. 1은 Af.  $B_1$ 의 Chloroform 및 Benzene에서의 UV Spectrum을 나타낸 것이며, Fig. 2는 Af.  $B_1$ 의 Benzene 溶液에  $ZnCl_2$ 를 加하였을때의 UV Spectrum을 各波長에서의 水吸光係數로 plot한 것이다. 이와같은 Spectrum의 變化는 Benzene, Toluene, Xylene等과 같은 芳香族 溶液에서만 일어났으며 Af.  $B_1$ 의 Chloroform, Ethanol, Methanol, 물 溶液에서는 아무런 Spectrum의 變化도 나타나지 않았다.

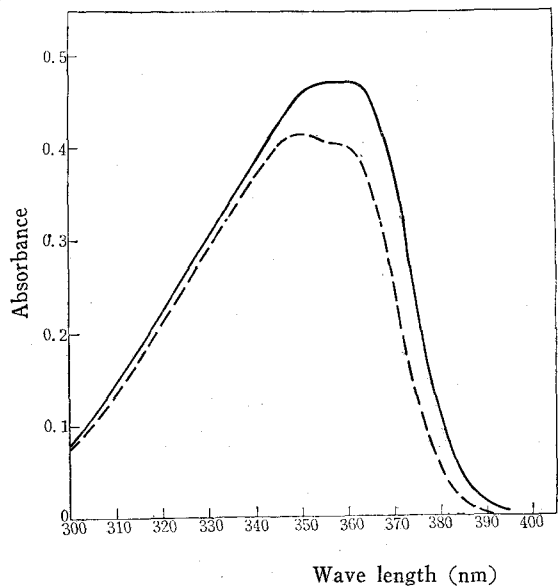


Fig. 1 UV spectra of Aflatoxin  $B_1$  in chloroform (solid line) and benzene (dotted line).

또  $ZnCl_2$ 가 존재하지 않는 Af.  $B_1$ /Benzene系에서는 濃도에 따른 吸光度係數의 變化를 전혀 볼수 없지만,  $ZnCl_2$ 存在下에서는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 濃度依存性을 나타내었다. 이는 Af.  $B_1$ /Benzene의 Charge-transfer Complex가 形成되며, 이의 平衡常數는 그리 크지않다고 생각할수 있다.

興味있는 事實은 Af.  $B_1$ /Benzene系에  $ZnCl_2$ 를 加하여 吸光度가 減少할때 300~350nm 範圍에서는 各波長마다 減少比率이 一定하며, 350nm 以上에서는 그렇지 않는데 이는 다음과 같이 說明할수가 있을 것이다. 即  $ZnCl_2$ 가 들어가서 錯物을 形成하면 Spectrum의 最大吸收 peak는 350nm에서 365nm로 移動하지만, 實은 385nm附近에 最大吸收 peak를 갖는 새로운 Spectrum이 생기고, 이것과 殘存하는 Af.  $B_1$ 의 吸收 Spectrum이 350nm 以上에서 重疊되어 있다고 생각할수가 있다. 따라

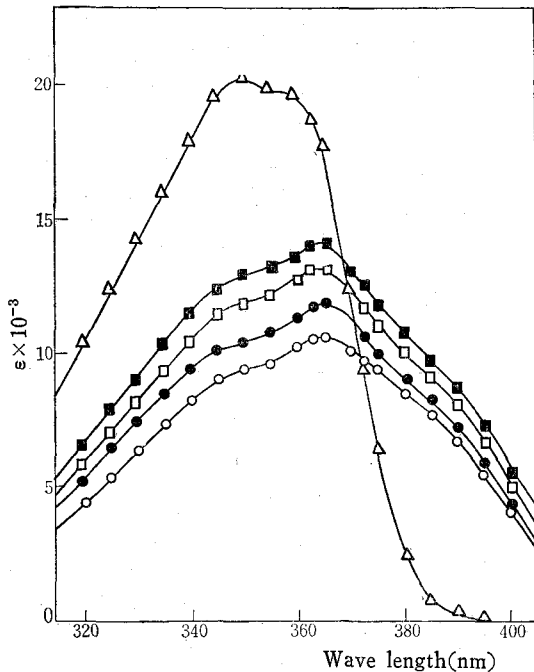


Fig. 2 Concentration dependence of zinc-coordinated Aflatoxin  $B_1$  spectra in benzene. The concentration of Aflatoxin  $B_1$  were  $1.5 \times 10^{-5}$  (■),  $2.0 \times 10^{-5}$  (□),  $3.0 \times 10^{-5}$  (●), and  $4.0 \times 10^{-5}$  mole/l (○). The concentration of zinc chloride was 50 times greater than Aflatoxin  $B_1$ . The open triangles (△) represent the absorption spectrum of Aflatoxin  $B_1$  alone as determined in the above range of Aflatoxin  $B_1$  concentration ( $1.5 \sim 4.0 \times 10^{-5}$  mole/l).

서 實驗方法에서 前述한 바와 같이 Af.  $B_1$ /Benzene/ $ZnCl_2$ 系에서 나타나는 吸收 Spectrum中 350nm의 吸收는 Af.  $B_1$ (또는 Af.  $B_1$ / $ZnCl_2$  Complex)만의 吸收로 볼수가 있다.

이와같이 생각한다면, 平衡常數의 計算이 쉽게 이루어질수가 있다.

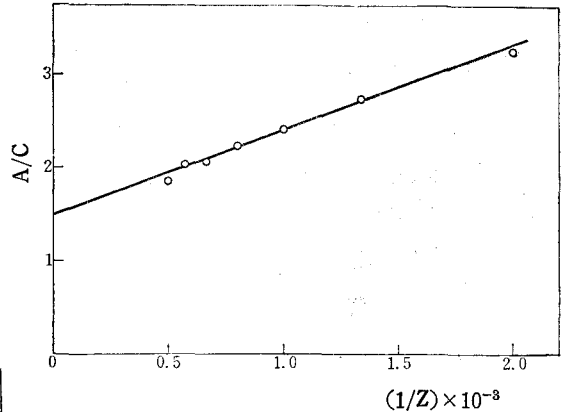


Fig. 3 Determination of apparent equilibrium constant ( $K_1$  and  $K_2$ ) for Aflatoxin  $B_1$ -benzene complex. The concentration for Aflatoxin  $B_1$  varied from  $4.0 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-5}$  mole/l and for zinc chloride from  $2 \times 10^{-3}$  to  $5 \times 10^{-4}$  mole/l.

Fig. 3은 ⑦式에 따라  $A/C$ 를  $1/Z$ 에 對하여 plot한 것이며 여기서 얻은 直線의 切片과 기울기에서  $K_1$ ,  $K_2$ 를 求하여 各各  $1.67 \times 10^3$  및  $0.198$  (l/mole)의 값을 얻었다.

$K_1$ 은  $K_2$ 보다 매우 큰 값으로서 Af.  $B_1$ 과  $ZnCl_2$ 는 大部分이 Af.  $B_1 \cdots ZnCl_2$ 의 Coordinated Complex의 形態로 存在한다고 볼수가 있다. 그러나 이 Coordinated Complex는 Spectrum上에서 아무런 變化도 나타내지 않았으며, Af.  $B_1$ 과 同一한 吸收 Spectrum을 나타내기 때문에 區別이 되지않았다. 따라서 Af.  $B_1$ /Benzene의 Charge-transfer Complex는 이루어지기는 하지만  $K_2$ 의 값은 그리 크지않다.

이 實驗에서 使用한 Af.  $B_1$ 은  $4 \times 10^{-5}$  mole/l의 적은 濃도이기때문에 여기서 生成된 錯物은 그보다도 더욱 작은 濃도임으로 이 錯物의 特性을 檢討하는데 매우 困難하다. Af.  $B_1$ /Benzene/ $ZnCl_2$ 溶液은 모든 成分을 混合한 即時로 Spectrum 變化를 나타내었고, 적어도 1週日 以內에서는 吸光度는 一定하였다. 그러나 10日~2週日後 溶液의 吸光度를 測定하여보면  $ZnCl_2$ 의 濃도에 따라 差異는 있지만, 처음 溶液의 1/4까지 減少하였다.

Af.  $B_1$ 은 360nm 附近의 UV light 下에서 強한

Table I Rf values of Aflatoxin B<sub>1</sub> and complex on TLC.

| Sample No. | Samples  | Rf Values             |            |                        |  |
|------------|--|-----------------------|------------|------------------------|--|
|            |  | Developing solution①* |            | Developing solution②** |  |
| 1          | Af. B <sub>1</sub> /Chloroform   | 0.78                  |            | 0.41                   |  |
| 2          | Af. B <sub>1</sub> /Benzene  | 0.75                  |            | 0.41                   |  |
| 3          | Af. B <sub>1</sub> /Toluene  | 0.75                  |            | 0.41                   |  |
| 4          | Af. B <sub>1</sub> /ZnCl <sub>2</sub> /Water                             | 0.75                  |            | 0.41                   |  |
| 5          | Af. B <sub>1</sub> /ZnCl <sub>2</sub> /Benzene                           | 0.68                  |            | 0.37                   |  |
| 6          | Af. B <sub>1</sub> /ZnCl <sub>2</sub> /Benzene→Precipitate/Chloroform*** | 0.22, 0.68            | 0.13, 0.36 |                        |  |
| 7          | Af. B <sub>1</sub> /ZnCl <sub>2</sub> /Benzene→Precipitate/Methanol***   | 0.22, 0.68            | 0.13, 0.36 |                        |  |
| 8          | Af. B <sub>1</sub> /ZnCl <sub>2</sub> /Benzene→Precipitate/Water***      | 0.25, 0.70            | 0.13, 0.36 |                        |  |

\* Chloroform 97, Methanol 3

\*\* Benzene 140, Methanol 10

\*\*\* Precipitate formed in Af. B<sub>1</sub>/ZnCl<sub>2</sub>/Benzene solution on the wall of test tube after 2 weeks since preparation of solution, dissolved in chloroform, methanol or water.

螢光을 나타내는데, Af. B<sub>1</sub>/Benzene溶液과 Af. B<sub>1</sub>/Benzene/ZnCl<sub>2</sub>溶液을 調製直後 및 調製 2週日後에 UV light에 비추어보면 後者는 螢光物質의 大部分이 試驗管壁에 붙어있고 溶液의 螢光是 極히 적었다. 이 試驗管에서 溶液을 버리고 이에 다시 Benzene을 넣어도 全히 溶解하지 않았는데, Chloroform, Methanol, 물에는 잘 溶解되었으며 이의 吸收 Spectrum의 모양은 처음 錯物의 吸收 Spectrum의 모양과 거의 같게 나타났다. 따라서 試驗管壁에 붙은 것은 錯物로 볼수 있고, 이 錯物은 처음에는 溶解된 狀態로 있으나, 溶解度가 적기때문에 時間이 흐를에 따라 管壁에 析出된 것이 아닌가 생각된다.

이를 좀더 檢討하기 위하여 TLC로 分析해 본바, 그 結果를 Table I에 綜合하였다.

Table I에서 分明히 알수 있는 事實은 ZnCl<sub>2</sub>存在下의 Af. B<sub>1</sub>은 Benzene과 어떤 다른 物質 即 錯物을 形成한다는 事實이다. Rf 0.22 또는 0.13에서 나타나는 Spot가 바로 錯物이라고 斷定하기는 困難하지만 充分히 推定할 수 있는 資料는 된다.

試料 No. 4와 No. 8을 Spectrophotofluorometer를 使用하여 螢光의 세기를 比較해 본바, activation light의 波長, λ<sub>act.</sub>를 365nm로 하고 Emission light의 波長, λ<sub>em.</sub> 440nm에서의 螢光의 세기는 No. 8이 No. 4의 15.6배나 크게 나타내었다. 이 結果에서도 Af. B<sub>1</sub>/ZnCl<sub>2</sub>/Benzene系에서는 分明히 Af. B<sub>1</sub>과 相異한 物質의 生成을 確認할 수 있다.

以上과 같은 結果에서 Af. B<sub>1</sub>은 강한 電子供與

性分子와는 Charge-transfer 型의 錯物을 形成한다는 前報<sup>19)</sup>의 內容을 뒷받침하며 同時에 Af. B<sub>1</sub>이 蛋白質 또는 DNA와 같은 生體高分子物質과의 結合도 그 Mechanism이 Charge-transfer interaction으로 이루어질수 있다는 可能性을 提示해 주는 것이다.

### 要 約

Aflatoxin B<sub>1</sub>은 電子受容性을 높여주는 鹽化亞鉛存在下에서 電子供與性分子인 Benzene과 Charge-transfer Complex를 만들며, 그 生成機構는 Aflatoxin B<sub>1</sub>이 鹽化亞鉛과 一次的으로 配位結合된 化合物을 거쳐, 이것이 Benzene과 結合하여 錯物을 形成한다.

이 錯物의 安定度常數 即 平衡常數는 0.198 / mole 이었다.

따라서 Aflatoxin B<sub>1</sub>은 弱한 電子受容體이나, Benzene 보다 강한 電子供與體와는 鹽化亞鉛이 存在하지 않아도 Charge-transfer Complex를 만들수 있다는 可能性을 提示해주는 것이며, Tryptophane, Histidine과 같은 강한 電子供與體를 含有한 蛋白質 또는 Guanine, Adenine과 같은 電子供與體를 含有한 DNA等과의 Aflatoxin B<sub>1</sub>의 結合은 그 結合 Mechanism으로서 Charge-transfer Complex 形成으로 이루어진다는 推定을 할수 있다.

끝으로 本研究를 遂行함에 있어서, 試料의 提供과 研究에 助言해주신 美國 Wisconsin 大·食品科學科教授 Dr. F.S.Chu, 實驗結果에 對해 討論을

같이 해주신 仁荷大 教授 金靈樺博士에게 感謝를 드리며, 研究費 一部를 支給해준 仁荷大 産業科學 技術研究所에 아울러 謝意를 表한다.

### 引用 文 獻

- 1) Goldblatt, L.A.: Aflatoxin, Scientific Background, Control and Implications (Academic Press, New York, 1969)
- 2) Barnes, J.M. and Butler, W.H.: Nature (London) **202**, 1016(1964)
- 3) Sporn, M.B., Dingman, C.W., Phelps, H. L. and Wogan, G.N.: Science **151**, 1539(1966)
- 4) Clifford, J.I. and Rees, K.R.: Nature(London) **209**, 312(1966)
- 5) Clifford, J.I. and Rees, K.R.: Biochem. J. **102**, 65(1967)
- 6) King, A.M.Q. and Nicholson B.H.: Biochem. J. **114**, 679 (1969)
- 7) Clifford, J.I., Rees, K.R. and Stevens, M.E.: Biochem. J. **103**, 258(1967)
- 8) Clifford, J.I. and Rees, K. R.: Biochem. J. **103**, 467(1967)
- 9) Neely, W.C., Lansden, J.A. and McDuffie, J.R.: Biochemistry **9**, 1862(1970)
- 10) Edward, G.S., Wogan, G.N., Sporn, M.B. and Pong. R.S: Cancer Res. **31**, 1943(1971)
- 11) Black, H.S. and Jirgensons, B.: Plant Physiol. **42**, 731(1967)
- 12) Schabert, J.C. and Pitout, M.J.: Enzymologia **41**, 201(1971)
- 13) Rao, V.N., Valmikinathan, K. and Verghese, N.: Biochim. Biophys. Acta **165**, 289(1968)
- 14) Wei, R.D. and Lee, S.S.: Experimentia **27**, 458 (1971)
- 15) Scoppa, P. and Marafanta, E.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **47**, 198(1971)
- 16) Scoppa, P. and Barle, W.O.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **47**, 201(1971)
- 17) Lijinsky, W., Lee, K.Y. and Gallagher, C.H.: Cancer Res. **30**, 2280 (1970)
- 18) Lillehoj, E.B. and Ciegler, A.: J. Gen. Microbiol. **54**, 185(1968)
- 19) Noh, I. and Chu, F.S.: Bioorganic Chem. **2**, 77 (1972)
- 20) Chu, F.S.: J. AOAC **54**, 1304(1971)
- 21) Rodricks, J.V., Stoloff, L., Pons, W.A. Jr., Robertson, J.A. & Goldblatt, L.A.: J. AOAC **53**, 96(1970)
- 22) Merrifield, R.E. and Phillips, W.D.: J. Am. Chem. Soc. **80**, 2778(1958)
- 23) Gaylord, N.G. and Takahashi, A.: J. Polymer Sci. Part B **6**, 743(1968)
- 24) Ikegami, T. and Hirai, H.: J. Polymer Sci. Part A-1 **8**, 195, 463(1970)
- 25) Gaylord, N.G. and Antropiusova, H.: J. Polymer Sci. Part B **8**, 183(1970)