

食品中 有毒性 代謝產物에 關하여(第 1 報)

數種의 韓國 大豆醸酵食品中

Aflatoxin 有無의 檢索에 關하여

서울大學校 師範大學 化學科

李 泰 寧·李 相 圭*

(1969年 5月 1日 受理)

Studies on Toxic Metabolites Occurring in Foods (I)

Screen test of Aflatoxin in Some Korean Fermented Soybean Foods

by

Tai Young Lee and Sang Kyu Lee*

Department of Chemistry, College of Education,

Seoul National University, Seoul

(Received May 1, 1969)

Abstract

An attempt has been made to investigate the possible occurrence of aflatoxins, a group of micotoxin which are toxic metabolites produced by *Aspergillus flavus*, and aflatoxin like substances in fungal fermented soybean products such as meju and soybean paste.

Chloroform extracts from 15 samples which has been defated with petroleum ether are subjected to separations with thin-layer chromatography on silica gel washed with methanol prior to film coating, improves the chromatographic separation and ultraviolet absorption spectral identification.

In addition to fluorescing spot having an R_f value which is same as aflatoxin B₁, many of the fluorescing spots have been occurred in every sample examined.

Each fluorescing spot is scratched and the ethanol extracts are subjected to further separation with thin-layer chromatography.

Each fluorescence substance is eluted with ultra violet transparent absolute ethanol and the ultra-violet absorption spectra are checked.

None of the absorption curve of eluates shsow accordance with the curve of aflatoxin. 2,4-Dinitrophenyl hydrazine reagent, Tollen's reagent and ninhydrin reagent are applied on the chromatogram. The data show that aflatoxin is not present in any of the fungal preparations examined.

*陸軍技術研究所, Army Research and Testing Laboratory, Seoul

But ultra violet absorption spectra data and reactions show that every spots from the samples are almost different from each other inspite of same Rf values. This implies that variety of degradation products or fungal metabolites may be involved in fermentation process.

The toxicity and physiological activity of many fluorescence substances isolated from the fungal preparations examined are opened to further investigation.

緒 言

落花生 油粕을 飼料로 한 家畜類의 대량 참사事件이 1960 年 英國에서 發生된 後⁽¹⁾ 飼料에 오염된 *Aspergillus flavus oryzae* 가 生產한 Micotoxin 에 의한 중독임이 알려졌다. 그후 형광성을 가진 이 중독물질은 Aflatoxin 이라 명명되고 형광의 色 및 Chromatogram 上의 Rf 치의 순서에 따라 Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, 라 불리 우게 되었다. 1962 年 張等⁽⁴⁾과 기타 공동 연구자에^(3, 5, 6, 7) 의하여 이들 4 종의 Aflatoxin 的 構造가 결정되었으며 Ambrecht⁽⁸⁾ 및 기타 연구자^(2, 5, 6, 9, 10) 들에 의하여 이들의 화학적 및 物理的 성질이 상세히 연구되었으나 그외의 Aflatoxin 類似物질들에 對하여는 아직 構造 및 성질등이 규명되지 못하고 있다.

가축류의 肝에 치명적인 기능 및 기질적 손상을 줌으로써 알려지게 된 Aflatoxin 이 그후 뜻하지 않게 가지의 어떤 發癌性物質 보다도 強力한 發癌性物質임이 발표된 후^(8, 10, 11, 12) 사료는 물론 양곡이나 여러 식품이 이 Aflatoxin 生산군에 의해 汚染될 가능성에 對해 비상한 관심이 집중되고 있다.

한국을 위시한 東洋 各國에서는 古來로 酒 및 酿類의 제조에 미생물이 利用되고 있으나 이들의 제조에 자주 使用되는 菌類中의 *Aspergillus oryzae* 는 Aflatoxin 을 生산하는 것으로 판명된 *Aspergillus flavus* 와 近緣관계에 있는 Strain 임으로 種麵으로 使用되는 곡균에 혹시 Aflatoxin 生產能이 있는 곰팡이類이거나 혹은 自然污染에 依해 上記 酿酵食品들中에 Aflatoxin 이 含有될 疑惑이 짙어지고 있다.

Leo J. Dendult⁽¹³⁾ 等은 食品에 使用되는 美國의 市販酵素剤에 對해 Aflatoxin 을 檢索한 結果를 報告하고 있으며 橫塙⁽¹⁴⁾ 等은 日本에서 現在 酿酵食品에 使用되고 있는 種麴菌에 對해 Aflatoxin 的 生產有無를 檢索한 바 檢索한 種中에서는 檢出치 못하였음을 發表하고 Chromatogram 上에서는 Aflatoxin 들과 類似한 Rf值를 갖는 融光性物質은 여러個 分離하였으나 Aflatoxin 이 아닌 Pyrazine 系의 新化合物임을 '報告하고 酿酵食品의 Aflatoxin 分析에 있어서 注意를 喚起하고 있다.

醣酵工程에 있어 微生物學의 管理를 받지 않고 있는

우리나라 例주나 在來式 醬類 또는 科學的 管理가 徹底하지 못한 市販工場製品의 醬類는 여러 雜菌에 依한 汚染의 機會가 많으므로 이에 對한 Aflatoxin 的 檢索은 食品衛生 및 國民保健上 時急한 것이다. Aflatoxin(以下 AF로 表示)의 分析法으로는 Paper chromatography 法⁽²⁰⁾ 및 Thin-layer chromatography 法^(13, 16~18) 으로 分離하여 Spectrophotometry로 定量하는 方法^(18, 19) 等이 發表되고 있다.

實 驗

1. 器具 및 裝置

抽出裝置로는 Soxhlet 와 Extractor(250ml) 와 Wehlei type의 Downward-displacement liquid-liquid continuous extractor 를 使用하였으며 Liquid-liquid extraction 時 加熱用으로는 Fisher 製 250ml Flask 用 Heating mantle を 使用하였다.

分離에는 日本 Yamato 製 Thin-layer chromatography apparatus 를 使用하였고 分離된 融光物質은 西獨製 紫外線燈(250V 用)을 使用 觀察하였다(Chromatogram 的 Scrap에는 Fisher 製의 Spatula 를 使用).

Ultraviolet absorption spectra의 測定에는 Beckman Model D. B의 Recording spectrophotometer 를 使用하였다.

2. 試 藥

T. L. C.에 使用한 吸着劑는 E. Merck Co. 製 T. L. C. 用 Kiesel gel G 를 使用하였으며 Ultraviolet(以下 U. V 라 略함) Spectra 測定用 Ethanol 은 U. S. Industrial Chemical Co. 製 Dehydrated analyzed reagent 를 使用하였다. 使用한 Aflatoxin B₁ 標準品 및 Aflatoxin B₁ Petroleum ether 沈澱物은 日本 Kikkoman 醬油中央研究所로 부터의 分譲品이다.

Spray reagent로 使用한 Ninhydrin 및 Silver nitrate는 Warner-Chilcott Lab. Inst. 製 Chromatography spray reagent 用을 使用하였으며 2, 4- Dinitrophenyl hydrazine 은 Eastman Organic Chem. Co. 製를 使用하였다.

그外 特別히 說明하지 않은 모든 試藥은 C. P. 또는 Analytical reagent grade의 것을 使用하였다.

3. 實驗方法

1) 試料의 處理

서울을 비롯한 몇개 地區의 工場, 市場(商會) 또는 家庭으로부터 菲集한 試料中 麻주 및 된장은 水分含量 10% 内外로 天日乾燥하여 10mesh 以下로 粉碎하여 使用하였으며 液體試料인 간장 諸味는 磁製濾斗에 加塞를 깔고 1次 濾過하여 써끼를 除去한 후 다시 濾紙를 오려 깔고 吸引濾過하였다.

Table I. Sample

No.	Sample	Sample	source
1	Meju 1	Seoul D	market
2	" 2	Taegu J	"
3	" 3	Kwangjoo X	"
4	" 4	Seoul N	market
5	" 5	Taejon J	"
6	" 6	Seoul A	home
7	Koji (Soybean) 1	Taegu S	meju center
8	" 2	Seoul K	meju manuf.
9	Soybean paste	1	Army
10	" 2	Seoul A	home
11	" 3	" B	"
12	" 4	" C	"
13	Molomi	1	" M manuf. Co.
14	" 2	"	"
15	" 3	Kwangjoo M	

2) 抽出

乾燥粉碎한 試料(3回에 걸쳐 60g)를 圓筒濾紙에 넣어 Soxhlet extractor 中에서 Petroleum ether(b. p. 40~60°C)로 沸溫 70°C 的 水浴上에서 6時間 抽出한 후 圓筒濾紙中의 殘渣를 乾燥하고 Methanol 로서 85°C 的 水浴上에서 6時間 再抽出하여 얻은 Methanol extract 를 磁製蒸發皿에 取하여 約 50ml 되도록 蒸發濃縮하여 同量의 蒸溜水와 混合한 後 Liquid-liquid Extractor⁽²⁵⁾에 注入하여 250ml flask 用 Heating mantle 內에 장치해 놓은 250ml Soxhlet bottle 中에 約 100~150ml 의 Chloroform 을 加한 後 Transformer 的 Scale 을 70 으로 돌린 후 連續的으로 6時間 抽出하였다. 液體試料는 等量의 蒸溜水와 混合한 後 이와 同一한 方法으로 抽出하였다.

(註 1) 25g 을 秤量하여 蒸溜水 50ml 를 미리 넣어놓은 100ml Beaker 中에 조금씩 넣어주면서 氣泡가 생기지 않도록 유리棒으로 잘 저어주면서 混合하여 均一한 gel 狀態로 만들어 랜시보드 板上에 미리 깔아놓은 5×20×0.3cm 및 20×20×0.3cm 의 Glass plate에 0.25mm Thickness 的 Aplicator 로서 均一하게 Coating 하여 板上에서若干 용고되기까지 방치한 後 乾燥用架臺에 깨워 넣은 後 100~105°C 的 電氣乾燥器中에서 7時間동안 乾燥하여 活性化시켰다. 冷却後 貯藏箱中에 넣어 保有하며 使用하였다. Kiesel gel G 自體에 Alcohol に 可溶性인 青色 螢光成分이 含有되어 있음을 確認하여 Methanol 로 씻어 螢光性物質을 除去하였다.

(註 2) 미리 깨끗이 물로 닦아 말린 直徑 0.7mm 的 硝子管을 6cm 길이로 펼라 下端을 가늘게 뽑아준 管(0.7×6.0cm)을 少量의 Alcohol 用 Washing 한후 그 下端을 Glass wool 用 tight하게 plug 하여 알맞게 구멍을 뚫은 뱃빳한 단판지를 깨워 試驗管上에 끊을수 있도록 만들어 使用하였다.

3) 濃縮

100~150ml 的 Chloroform extract 를 모은 Bottle 中에 Sodium sulfate anhydride(無水芒硝) 約 5g 을 넣어 혼들면서 脱水하고 濾斗에 절어놓은 濾紙內에도 無水芒硝 約 2g 을 넣어 脱水濾過하여 Vacuum evaporator 用 濃縮하여 小型의 Pyrex 製 吸引濾斗로 濾過하여 全量을 5ml 用 한 後 Screw cap test tube (1.5×12 cm)에 넣어 마개를 잘 막은 後 5°C 的 冷所에 保存하고 AF 檢索用으로 삼았다.

4) AF 標準品 및 Chloroform 抽出 濃縮液의 T. L. C.

(1) Chromatoplate의 製作 및 塗沫

미리 Methanol 用 Washing 한 Kiesel gel G(註1) 30g 을 秤量하여 下端을 Glass filter 用 連結한 3×40cm 的 Column에 packing 한 後 約 60ml 的 Methanol 用 씻고 Kiesel gel G 가 吸收하고 있는 Methanol 用 吸引하여 뽑아준 後 Kiesel gel G 를 Column 用 부터 꺼내어 濾紙에 薄게 펼쳐 100~105°C 的 電氣乾燥器內에서 約 2時間동안 乾燥하여 冷却한 後 Mortar 內에서 均一하게 잘粉碎하여 Coating 用으로 使用하였다.

上記와 같이 製作한 5×20×0.3cm 및 20×20×0.3cm 的 Plate의 下端으로부터 約 1.5cm 的 上位에 가늘게 뽑은 Capillary 用 Ethanol 用 녹인 AF 標準品과 Petroleum ether 用 沈澱物 및 各試料의 抽出液을 Spot 또는 Band 形으로 번지지 않도록 잘 塗沫하였다.

(2) 展開溶媒의 選定 및 展開

AF의 分離에 가장 適合한 展開溶媒를 選定하기 爲하여 AF 標準品 및 AF의 Petroleum ether 沈澱物의 Ethanol 溶液을 14個의 Solvent system에 對하여 實施하였으며 (Fig. 1) 이들중 Chloroform : Methanol(95/5, V/V)의 System이 分離能이 가장 優秀하였음으로 展開溶媒로 選定하였고 이 溶媒로 各試料 Chloroform extract 를 標準品과 同時に 展開하여 比較하였는데 그 結果 紫外線 照射에 依해 나타난 螢光物質 및 그 Rf 値은 Fig 1에 圖示한 바와 같다.

(3) 分離된 螢光物質의 Scrap 및 溶出

紫外線 照射에 依해 나타난 螢光性物質들을 各 Band別로 Spatula 用 가늘게 금을 긋고 Spatula 用 Scrap 用에서 얻은 Kiesel gel 을 本實驗에서 考案한 溶出管(註2)

의 上端으로부터 조심하여 넣어준 후 試驗管臺上에 꽂아놓은 小形試驗管($1.0 \times 6.0\text{cm}$)에 꽂은 다음 Methanol 5ml 씩으로서 溶出하였다. 完全溶出 與否를 確認하기 為하여 일단 溶出을 마친 溶出管을 他 試驗管에 꼽고 Methanol 2ml로 溶出하여 紫外線照射에 依해 溶出液 溶出管中의 Kiesel gel 및 plug 한 Glass wool等의 融光의 殘餘를 確認하였다.

(4) 溶出液의 再展開, Scrap 및 再溶出

Methanol 溶出液을 硝子製 小形 減壓濃縮器(Fisher製)로 約 0.5ml 程度 되도록 濃縮하여 上記와 如히 展開, Scrap 하여 Dehydrated ethanol로 溶出하여 U. V. absorption spectra 測定用으로 삼았다.

5) 溶出液의 U. V. Absorption Spectra 測定

(1) AF 類似螢光物質의 U. V. absorption spectra 測定

Chromatogram 上 AF 와 그 Rf 値 및 螢光色이 類似한 物質의 Ethanol 溶出液을 AF 標準品 및 AF의 Petroleum ether 沈澱物의 展開 溶出液과 比較하여 Beckman D. B Model의 Recording spectrophotometer에 依해 그 Absorbancy 를 測定하여 Absorption spectra (Fig. 4)를 比較하였다.

(2) 其他螢光性物質들의 U. V. absorption Spectra 測定

Chromatogram 上에 나타난 試料中의 7個의 螢光性物質들의 Ethanol 溶出液의 U. V. absorption spectra (Fig. 5)를 上記와 如히 測定하였다.

6) Chloroform 可溶螢光性物質의 呈色反應

試料의 Chloroform extract 를 T. L. C.로 分離한 螢光物質에 對하여 2,4-Dinitrophenyl hydrazine reagent, (21) Tollen's reagent⁽²²⁾ 및 Ninhydrin reagent⁽²³⁾들을 Chromatogram 上에 Spray 하여 呈色反應을 檢討(Fig. 6)하였다.

結果 및 考察

1. Aflatoxin의 T. L. C.

AF의 T. L. C.에 가장 適合한 展開溶媒를 選定하기 為하여 14個의 Solvent system에 對한 實驗結果는 Fig. 1과 같으며 吸着劑로 使用한 Silica gel의 Washing與否가 U. V. absorption spectra에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 1의 結果로 보아 檢討한 14個의 Solvent system에 依한 AF의 分離가 거의 可能하였으며 J. Nabney^(16,19) 橫塚⁽¹⁴⁾ 및 B. H. Ambrecht⁽⁸⁾ 等이 報告한 Chloroform: Methanol의 System이 AF의 分離能이 優秀함을 確認하였으며 그中에도 Chloroform: Methanol (95/5, V/V)의 System이 AF의 分離能이 가장 優秀하고 Rf 値의 再現性이 높음을 確認하여 AF分離用 展開溶媒로 選定하였다.

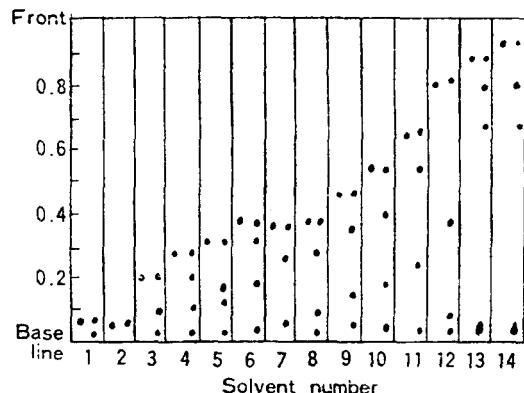


Fig. 1. Variation of Rf value of aflatoxin according to different solvent systems

Adsorbent; Kiesel gel G(Methanol washed), 0.2mm thickness
Sample; AF-B₁ (left side), AF-B₁ Crude (right side)
Solvent No.; (1) Benzene:Aceton (3/1)

- (2) Benzene: Ethyl Acetate (3/1)
- (3) Chloroform; " (3/1)
- (4) Hexane: " (1/3)
- (5) Benzene: Ethanol (9/1)
- (6) Chloroform: " (60/38/2)
- (7) " : Aceton (9/1)
- (8) Chlroform: Methanol (98/2)
- (9) " : " (97/3)
- (10) " : " (96/4)
- (11) " : " (95/5)
- (12) " : Aceton (3/1)
- (13) Ethyl Acetate: Methanol(3/1)
- (14) Aceton: Hexane (3/1)

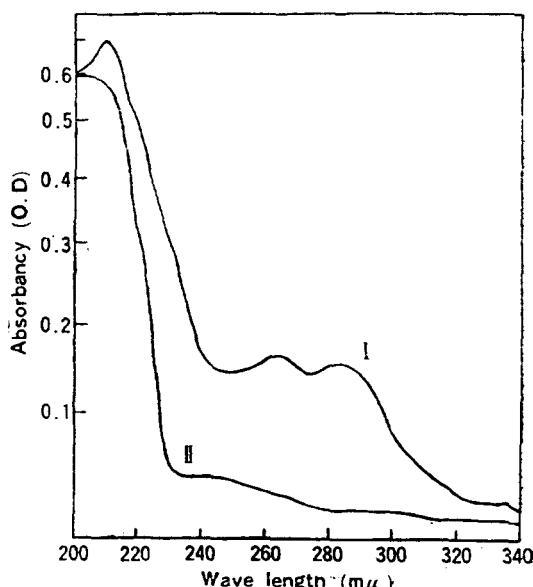


Fig. 2. The change of U.V. absorption spectra by silica gel washing with methanol

Solvent; Ethanol
I, Non washed silica gel eluate
II, Washed silica gel eluate

吸着剤로 使用한 Silica gel 的 Washing 與否가 U.V. absorption spectra에 미치는 影響을 檢討한바 Washing 을 하지 않으면 Silica gel 自體의 融光에 依해 短波長 264 및 284m μ 에서 吸收가 생김을 確認하였으며 따라서 U.V. Absorption 测定에 依한 AF의 同定을 為解선 必히 Silica gel 을 Washing 할 必要를 確認하였고 Washing 함으로 因해 J. Nabney⁽¹⁸⁾ 等이 報告하고 있는 Ether との 事前 展開에 依한 不純物 除去의 不便性 및 時間의 浪費를 防止할 수 있었다. Silica gel 自體의 融光이 front 附近으로 展開되므로 front 附近에서 나타나면 分離할 수 없었던 融光性 物質도 分離할 수 있는 効果를 볼 수 있었다.

分離된 AF Spot의 U.V. absorption spectra 测定을 為한 溶出에 있어서는 著者가 考察해 使用한 Elution column을 使用하여 J. Nabney⁽¹⁸⁾가 報告한 바와 같이 試驗管內에서 溶出하여 濾過를 하는 等의 複雜性을 免할 수 있으며 溶出後 溶出管內의 Silica gel과 plug 한 Glass wool 中의 融光性 物質의 残餘나 吸收與否를 紫外線燈下에서 確認하여도 融光을 全혀 볼 수 없어 本溶出管 使用으로 完全溶出이 可能함을 알 수 있었다.

2. 各試料의 T.L.C.

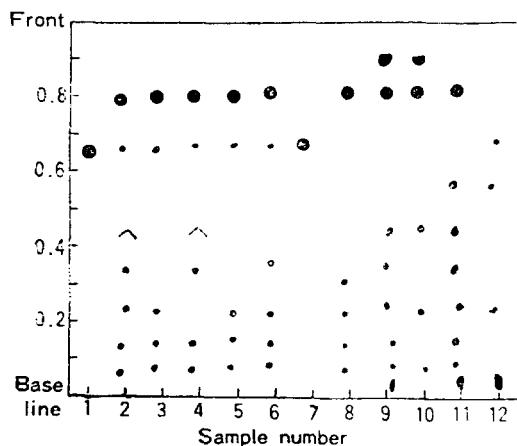


Fig. 3. Typical chromatogram of fluorescence substances in fermented soybean products compared with Aflatoxin

Adsorbent; Kiesel gel G (Methanol washed)
0.25 mm Thickness
Samples; Chloroform:Methanol (95:5)
(1) AF-B₁ (7) AF-B₁
(2) meiu 1 (8) Koji
(3) " 2 (9) Soybem paste 1
(4) " 3 (10) " 2
(5) " 4 (11) " 3
(6) " 5 (12) AF-B₁ (Crude)

選定한 展開溶媒에 依해 各試料의 Chloroform 抽出物 들로부터 分離한 融光性物質 및 그 Rf 値는 Fig. 3 과 같다. 예주 및 된장으로 부터 各各 6~7 個 및 5~6 個의 融光性物質들을 分離하였으며 15 個試料中 6 個試料에서 AF-B₁ 과 同一한 Rf 値(0.65)를 갖는 AF-B₁ 類似物質을 分離하였다.

展開할 때 溶媒를 담아놓은 展開槽의 内部에 종이를 溶媒에 浸기도록 하여 完全飽和시킴으로써 周緣現象 (Marginal phenomenon, 註3)을 防止하고 Rf 値의 再現性를 높일 수 있었다.

3. 分離物質의 同定

Chromatogram 上 AF-B₁ 과 同一한 Rf 를 갖는 AF-B₁ 類似物質의 AF의 真否를 同定하기 為해 U.V. absorption spectra 를 测定比較 檢討한 結果는 Fig. 4 과 같다. 各 試料들로부터 얻은 其他 融光性物質들의 U.V absorption spectra 测定 結果는 Fig. 5 및 Table 2 과 같다. 分離된 融光性 物質들을 몇 가지 Reagent를 適用시켜 AF 와 比較検討한 結果는 Fig. 8 과 같다.

以上的 結果들을 考察해 볼 때 AF-B₁ 및 Crude AF-B₁ 의 λ_{max} 는 265, 362 m μ 인데 반해 AF-B₁ 과 同一한 Rf 를 갖는 AF-B₁ 類似物質의 λ_{max} 는 230, 270, 280 m μ 이기 때문에 AF 와 別個의 物質로 認定되어 適用한 몇 가지 呈色反應에 있어서도 AF-B₁ 및 AF-B₁

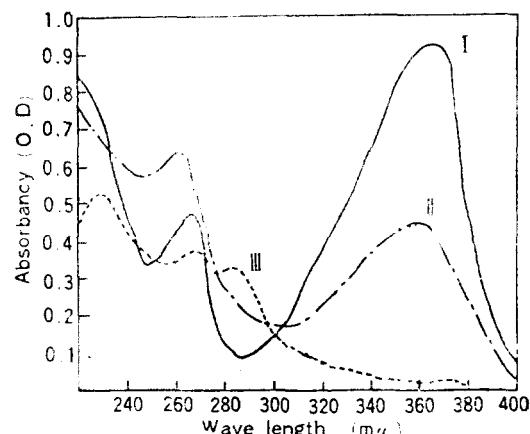


Fig. 4. U.V. absorption spectra of AF-B₁ like substances in meju compared with AF

Solvent; Ethanol
Sample; I, AF-B₁
II, AF-B₁ (crude)
III, AF-B₁ like substance
 λ_{max} ; I, (265, 362 m μ)
II, (265, 362 m μ)
III, (230, 270, 280 m μ)

(註 3) 展開槽內의 溶媒蒸氣의 不均一한 蒸發로 因해 그 Rf 値가 中央部는 낮고 양단은 增大되는 現象을 周緣現象이라 한다.

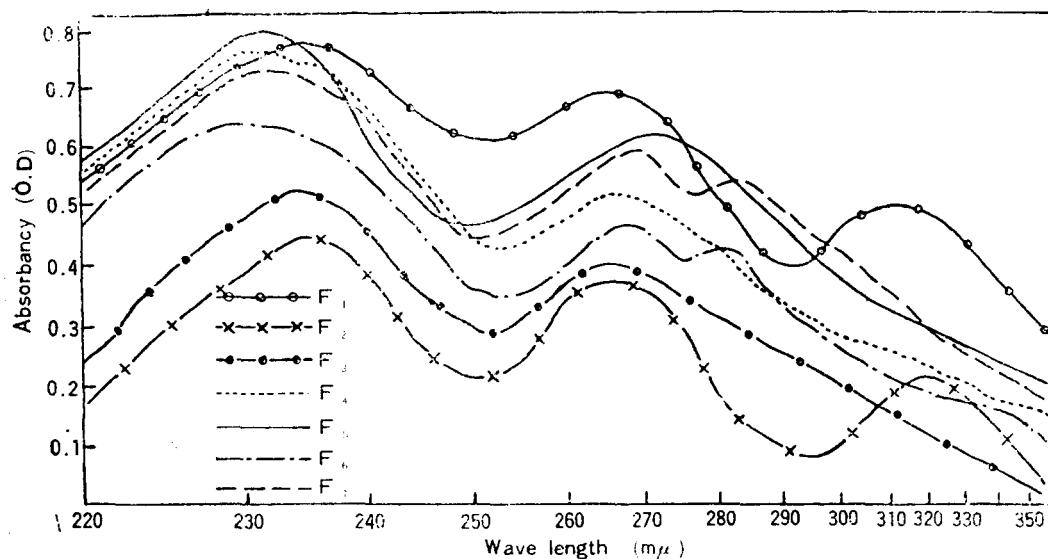


Fig. 5. U.V. absorption spectra of various fluorescence substances(F_1 — F_7)* found in meju extract
* F_1 — F_7 is fluorescence substance named in order of R_f value

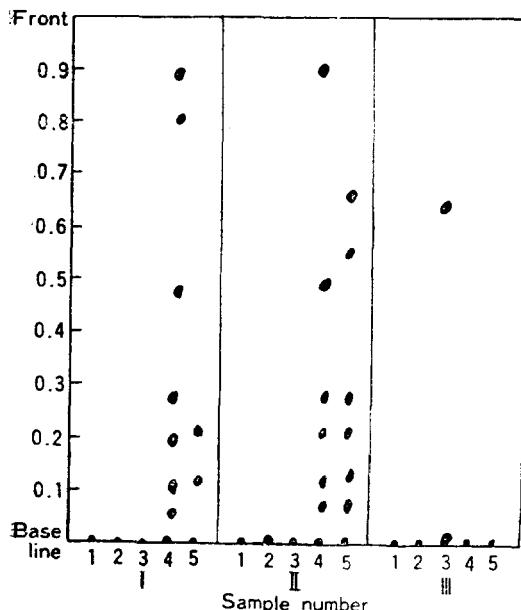


Fig. 6. Color reaction of fluorescence substances in fermented soybean products

Adsorbent; Kiesel gel G. (Methanol washed),
0.25 mm. thickness
Solvent; Chlorofon: Methanol (95/5)
Reagents; I, 2, 4-Dinitrophenyl hydrazin reagent
II, Tollen's reagent
III, Ninhydrin reagent
Samples; 1. AF— B_1
2. AF— B_1 (crude)
3. Meju
4. Soybean paste
5. Molomi

Table 2. maximum U.V. Absorption of fluorescence Substances found in Samples

Sample	λ_{max}							
	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8
Meju 1	236	236	236	230	230	230	230	—
	264	264	264	265	268	270	268	—
	308	316	—	—	—	280	280	—
Meju 2	224	240	—	230	230	270	—	—
	264	260	260	262	284	282	—	—
	308	—	—	—	290	—	—	—
Soybean paste	290	256	232	—	228	228	—	258
	362	286	264	262	280	200	292	288
	380	350	362	300	—	—	—	—

Crude 는 모두 隱性的인데 反하여 麻주, 된장, Molomi (諸味) 等 大豆醣酵製品들로부터 分離한 螢光物質들은 그 螢光이 나타난 位置에 一部 陽性反應을 나타내는 것으로 보아 AF 와 別個의 物質로 推定된다. 麻주나 諸味의 抽出物質들은 2,4-Dinitrophenyl hydrazine reaction 및 Tollen's reaction 이 다같이 陽性인 것으로보아 Carbonyl compound 및 Reducing compound이며 或 Aldehyde 일지도 모른다. Fig. 5 및 Table 2의 結果로 보아 Chromatogram 上 同一한 R_f 值를 갖는 物質들도 試料에 따라 各己 相異한 物質들임을 알수 있었다.

結局 著者가 處理한 試料의 範圍內에선 AF 가 檢索 되지 않았다. 그러나 分離한 여러개의 螢光物質들의

毒性與否는 現在로서는 確認되지 않았으며 더 研究해보아야 할 問題로 生覺된다.

結論

*Aspergillus flavus*에 依해 生産되는 有毒性 代謝產物인 Aflatoxin의 檢索을 錄す, 된장 等 韓國產 大豆 酿製品들을 對象으로 試圖하였다.

分離는 Methanol washing에 依한 Silica gel의 精製 및 溶出管의 考案등 몇가지 分離條件를 改良한 Thin-layer chromatography法에 依하였으며 全國 各個 地區로부터 蒐集한 試料의 Chloroform extract 들로부터 Aflatoxin과 同一한 Rf 值를 갖는 Aflatoxin類似物質 및 其他 여리개의 融光性物質을 分離하였다.

分離한 各 融光性物質들을 Chromatoplate로부터 Scrap하여 U.V. 測定用 Dehydrated ethanol로서 展開한 eluate 들에 對하여 U.V. absorption spectra를 測定하여 AF와 比較檢討한바 그 Spectral curve가 AF와 相異하였고 2,4-Dinitrophenyl hydrazin reagent, Tollen's reagent 및 Ninhydrin reagent等에 依한 몇가지 呈色反應 亦是 相異한 反應을 나타냄으로보아 著者가 處理한 試料範圍內의 모든 酿製品中에는 AF가 檢索되지 않았다.

그러나 上記 酿製品들에서 分離한 多은 融光性物質의 毒性 및 生理的作用은 더 研究가 必要하다.

끝으로 AF標準品을 보내주신 日本 Kikkoman Shoyu 中央研究所長 橫塚保博士 및 佐佐木正興氏에게 感謝를 드리는바이다.

引用文獻

- (1) R. Allcroft, and R. B. A. Carnaghan; *Chem. Ind. (London)*, **50** (1963)
- (2) B. F. Nesbitt, J. O'Kelly, K. Sargeant, Ann Sheridan; *Nature*, **195**, 1062 (1962)
- (3) R. D. Hartleg, B. F. Nesbitt, J. O'Kelly; *Nature*, **198**, 1056 (1963)
- (4) S. B. Chang, M. M. Abdel-Kader, E. L. Wick, G. N. Wogan; *Science*, **142**, 1191 (1962)
- (5) T. Asao, G. Buchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick, G. N. Wogan; *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1706 (1963)
- (6) K. J. Vander Merwe, L. Fourie, De B. Scott; *Chem. Ind. (London)*, **4**, 1660 (1963)
- (7) E. L. Wick, G. N. Wogan, T. Asao, G. Buchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang; *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 882 (1965)
- (8) B. H. Ambrech, F. A. Hodges, H. R. Smith, A. A. Nelson; *J. Assoc. Offic. Arg. Chemists*, **46** (5), 805 (1963)
- (9) A. S. M. Vander Zijden, W. A. A. Blanch Kollensmid, J. Boldingh, C. B. Barrett, W. O. Ord, J. Philip; *Nature*, **195**, 1060 (1962)
- (10) G. N. Wogan; *Bac. Review*, **30**, 460 (1966)
- (11) F. Dickens, H. E. H. Jones; *Brit. J. Cancer*, **17** (4), 691 (1963)
- (12) R. B. A. Carnaghan, R. P. Hartley, J. O'Kelly; *Nature*, **200**, 1101 (1963)
- (13) Leo, J., Denault, L. A. U. Underkofler; *Cereal Chemistry*, **44**, 1 (1967)
- (14) 橫塚保, 佐佐木正興, 菊地忠昭, 淺尾保夫, 延原昭男; 日農化, **41**-1, 32 (1967)
- (15) T. J. Coomes, J. C. Sander; *Analyst*, **88** (1044), 209 (1963)
- (16) J. H. Broadbent, J. A. Cornelius, G. Shone; *Analyst*, **88** (1044), 214 (1963)
- (17) Stanley, Nesheim, Daniel Banes, Leonard Stoloff, A. D. Campbell; *J. Assoc. Offic. Arg. Chemists*, **47** (3), 586 (1964)
- (18) J. Nabney, B. F. Nesbitt; *Nature*, **203** (4947), 862 (1964)
- (19) J. Nabney, B. F. Nesbitt; *Analyst*, **90** (1968); 155 (1965)
- (20) Weisberger; *Technique of organic chemistry*, Vol III, part I, Separation and purification, p. 230 (1956)
- (21) Ralph L. Shriner; *The systematic identification of organic compounds*, (4th edition, John Wiley & Son's, Inc., New York, U.S.A.) p. 111 (1956)
- (22) Louis F. Fieser; *Experiments in organic chemistry*, (3rd edition, D. C. Heath and Company, Boston) p. 114 (1957)
- (23) Richard, J. Block; *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, (Academic Press, Inc. Publishers, New York, U.S.A.) p. 889 (1955)