

자두 Anthocyanin의 構造確認에 關한 研究

安 承 堯

서울大學校 家政大學 食品營養學科

(1973. 3. 24 수리)

Studies on the Identification of the Anthocyanins in Plum.

Seung-yo Ahn

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Economics, Seoul National University

(Received, March 24, 1973)

Summary

The anthocyanins in *Santa rosa* plum (widely growing var. in Korea) were extracted with 0.5% methanolic HCl and purified with Amberlite IRC-50 cation exchange resin. The individual pigments were separated by paper chromatography. The two pigments were identified as cyanidin-3-monoglucoside and cyanidin-3-xyloglucoside based on the following evidence: Rf values in various solvents, partial acid hydrolysis, stepwise hydrolysis, sugar moiety, alkaline degradation, and absorption spectra in the visible region. Cyanidin-3-monoglucoside was the abundant pigment of the plum.

緒 言

植物界에 存在하는 anthocyan色素의 分布와 化學構造에 關하여 일찍이 Willstätter(1913~1916) 및 Robinson(1922~1934)等의 徹底的인 研究가 있었 다. 最近 이分野의 研究에 關하여는 Bate-Smith¹⁾, Geissman²⁾, Hayashi³⁾, Harborne⁴⁾等의 文獻들이 있다. Bate-Smith⁵⁾에 의하여 anthocyan色素研究에 paper chromatography가 처음으로 導入되면서 色素의 分離操作은 迅速하고 簡便化되었으며 微量의 分離色素로서 同定確認이 可能하게 되었다. Hayashi⁶⁾等은 配糖體色素의 部分加水分解法과 paper chromatography를 利用하여 結合糖의 残基數와 結合形態를 쉽게 確認하였다. Harborne⁷⁾은

anthocyanin의 化學構造와 配糖體의 形態에 따라 spectral curve에 關하여 特徵이 있음을 發見하고 構造確認法으로 利用하였다.

자두의 anthocyanin에 對한 研究는 稀小하며 Dickinson⁸⁾ 및 Khr⁹⁾等의 報告를 찾아 볼수있 다. Dickinson等은 英國栽培種 Victoria 자두 中에 cyanidin-3-monoglucoside¹⁰⁾ 含有된다고 報告하였고, Khr은 블가리아의 두 자두品種에서 cyanidin-monoglucoside, cyanidin-rhamnoglucoside, peonidin-rhamnosido-glucoside等을 分離確認하였으며 그中 主色素는 cyanidin-rhamnoglucoside였다고 報告하였다.

anthocyanin의 合成은 植物體中에서 遺傳的으로 統制됨으로 品種에 따라 差異가 있다는 見地에서

여기에 우리나라 栽培種의 하나인 *Santa rosa* 자두 中에 含有된 anthocyanin의 確認實驗을 하였다. 分離된 두 가지 色素에 對하여 部分加水分解, 加水分解, paper chromatography 및 spectrophotometry等 試驗을 거쳐서 結合糖을 確認하였고, 알카리分解 및 TLC에 의하여 aglycone을 確認하였다.

實驗材料 및 方法

供試자두

우리나라에서 넓이 栽培되고 있는 자두 品種 *Santa rosa*를 市場에서 구입하였으며 充分히 成熟하여 果肉 전체에 걸쳐 色素가 풍부히 含有된 果實만을 골라서 使用하였다.

色素의 抽出 및 精製

자두로부터 씨를 除去하고 果肉과 果皮만을 等容의 0.5% HCl methanol과 함께 브렌다로 磨碎하였다. 磨碎液에 소량의 Celite (Johns-Manville 545)를 混合하고 吸引濾過하였다. 깔대기의 残渣를 0.5% HCl methanol로 여러번 洗滌하여 色素를 完全히 抽出하였다.

色素抽出液을 40°C以下에서 減壓濃縮하여 methanol을 除去한 다음 濃縮液中の 有機酸, 糖類등을 除去하기 위하여 Morris¹⁰⁾等의 方法에 따라 弱陽이온 交換樹脂管을 通過시켰다. 이온 交換樹脂은 Rhom and Haiss社의 Amberlite IRC-50으로서 4cm × 40cm의 管에 充填하고 使用前에 5% HCl 溶液 500ml를 注入하여 H⁺型으로 만들어 使用하였다.

濃縮된 色素水溶液을 이온 交換樹脂管에 注入하여 色素를 吸着시킨 다음 多量의 蒸溜水를 流下시켜 流出液이 無色이 될 때까지 洗滌하였다. 다음 300ml의 0.5% HCl ethanol을 注入하여 色素를 溶出시켰다. 얻은 色素溶出液을 40°C에서 減壓濃縮하여 -10°C에 贯藏하였다.

個別色素의 分離

이온 交換樹脂管을 通過시켜 精製한 混合色素溶液을 30cm × 30cm 크기의 Whatman No. 3MM 濾過紙의 한쪽 3cm되는 거리에 棒狀으로 塗付하고 water-conc HCl-acetic acid (82 : 3 : 15) 溶媒系로 展開分離하였다. 5~6時間後에 展開完了된 濾過紙를 꺼내어 風乾하였다. 分離된 色素帶를 上端으로 부터 I, II 記號로 區別하고 각色素帶를 오려내어 三角后ラスク에 넣고 0.3% HCl methanol로 여러번 抽出하였다. 抽出液을 모아 40°C以下에서 減壓濃縮하여 더욱 精製의 目的으로 色素 I, II를 각각 따로 앞의 方法과 같이 Whatman No. 3MM 濾

過紙에 다시 크로마토그래피하였다.

두 번째 分離된 色素帶를 오려내어 0.3% HCl methanol로 抽出하여 40°C 以下에서 減壓濃縮하였다.

water-conc HCl-acetic acid (82 : 3 : 15) 溶媒系 하나로만 分離한 色素帶中에 異種의 色素가 重複되어 混入될 憂慮가 있으므로 그與否를 silica gel TLC로 確認하였다. 앞의 paper chromatography로 分離精製한 色素 I, II를 각각 TLC板에 塗付하고 ethyl acetate-formic acid-water (80 : 15 : 15) 溶媒系로 展開하여 原斑點으로부터 異種色素가 分離되는지 與否를 調査하였다. 이와같이 각色素의 純度를 確認한 後에 다음과 같이 配糖體色素의 結合糖과 aglycone의 確認試驗을 하였다.

結合糖의 確認

部分酸加水分解(partial acid hydrolysis): 精製된 각色素 약 0.5mg를 試驗管에 넣고 Smith¹¹⁾等의 方法에 따라 1N HCl 2ml와 함께 brine bath中에서 還流下에 加熱하여 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15分間隔으로 毛細管으로 反應溶液을 取하여 3枚의 Whatman No.1 濾過紙(30cm × 40cm)에 塗付하고 n-butyl alcohol-2N HCl 1 : 1 上層), water-conc HCl-acetic acid (82 : 3 : 15), formic acid-water-conc HCl (5 : 3 : 2) 溶媒系들로 각각 크로마토그래피하였다.

結合糖(Sugar moiety): 精製된 각色素 약 1mg 을 試驗管中에서 5ml의 1N HCl과 함께 brine bath中에서 30分間 還流下에 加熱하여 加水分解시켰다. 加水分解液을 冷却한後 Amberlite IRC-50 이온 交換樹脂管(1cm × 10cm)에 通過시키고 蒸溜水 100ml를 流下시켜 遊離糖을 溶出하였다. 溶出液을 活性炭으로 脱色하여 50°C에서 0.5~1ml 되게끔 減壓濃縮하였다. 이 糖溶液을 50cm × 40cm 크기의 Whatman No. 1 濾過紙에 既知糖 rhamnose, xylose, arabinose, glucose 等과 함께 塗付하고 n-butyl alcohol-pyridine-water (6 : 3 : 3) 溶媒系로 16時間 展開시켰다. 이 溶媒系에 의하여는 glucose와 galactose의 位置가 接近하여 識別이 어려움으로 分離效果를 增進시키기 위하여 風乾한 다음 같은 溶媒에 의하여 같은 方向으로 세번 테풀이 展開하였다. 分離된 糖의 斑點은 aniline hydrogen phthalate 試藥¹²⁾을 (0.93g aniline, 1.66g phthalic acid 및 100ml 水饱和 n-butyl alcohol) 噴霧하고 100°C에서 10分間 加熱하여 發色시켰다.

한편 이온 交換樹脂管에 吸着殘留되어 있는 agly-

cone은 0.5% HCl ethanol로 溶出하여 aglycone을 確認試驗에 使用하였다.

Disaccharide의 結合順序: 色素 I은 xylose, glucose로 이루어진 二糖類配糖體인데 다음과 같은 操作에 의하여 그 結合順序를 確認하였다. 精製된 色素 I 約 2mg를 5ml의 1N HCl과 함께 試驗管에 取하여 brine bath中에서 正確히 2分間 加熱한 다음 곧 冷却시켰다. 이 加水分解液을 數枚의 Whatman No 3MM (30cm×30cm) 濾過紙에 棒狀으로 塗付하고 water-conc. HCl-acetic acid(82 : 3 : 15) 溶媒系로 크로마토그래피하였다. 展開가 끝난後 分離된 세 色素帶中 monoside 配糖體인 中間의 色素帶만을 오려내어 0.5% HCl methanal로 抽出하였다. 抽出液을 50°C에서 減壓濃縮하여 methanal을 除去하고 5ml의 1N HCl에 溶解시켰다. 이 溶液을 brine bath中에서 30分間 加熱하여 加水分解시켰다. 加水分解物中의 逆離糖은前述된 操作에 따라 paper chromatography로 確認하였다.

Aglycone의 確認

色素 I, II의 aglycone의 構造를 Karrer等의 alkali 分解法⁽¹³⁾ 및 TLC⁽¹⁴⁾에 의하여 確認하였다. 結合糖 確認試驗을 위하여 色素를 加水分解하여 이온交換樹脂管에 通過시켰을 때 管中에 吸着되었는 aglycone을 0.5% HCl ethanol로 溶出하여 使用하였다. 이 溶出液을 減壓下에 蒸發시키고 10% Ba(OH)₂ 溶液 5ml와 함께 brine bath中에서 窒素氣流下에 30分間 還流加熱하였다. 分解物을 冷却시킨 後 2ml의 濃 HCl을 加하고 10ml의 ethyl ether로 抽出하였다. ether 抽出液을 0.5ml까지 濃縮하여 silica gel TLC板에 既知化合物 phloroglucinol, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, 等과 並行하여 塗付하고 benzene-methanol-acetic acid (90 : 16 : 8)溶媒系로 展開하였다. 分離된 斑點에 diazo化한 p-nitroaniline試藥⁽¹⁵⁾을 噴霧하여 發色시켰다. (2N HCl 0.3% p-nitroaniline을 녹인 溶液 10ml, 5% NaNO₂ 溶液 1ml 및 20% CH₃COONa 溶液 20ml를 使用前에 混合하였다)

Anthocyanin 및 Aglycone의 Paper Chromatography

色素 I, II 및 이들의 加水分解에 의하여 얻은 aglycone(anthocyanidin) I, II를 각각 Whatman No. 1 濾過紙(30cm×50cm)에 塗付하고 n-butyl alcohol-2N HCl (1 : 1), water-conc. HCl-acetic acid(82 : 3 : 15), 15% acetic acid, water-conc

HCl (97 : 3) 및 water-acetic acid-conc. HCl(10 : 30 : 3)으로 展開하였다.

Spectrophotometry⁽⁷⁾

色素 I, II를 각各 0.01% HCl methanal에 溶解시켜 Beckman DK-2 Spectrophotometer로 吸收曲線을 求하였다. 그리고 AlCl₃에 의한 吸收極大波長의 移動與否를 調查하기 위하여 色素溶液이 들어있는 吸收 cell에 5% 無水 AlCl₃의 ethanol 溶液 3滴을 加하고 吸收曲線을 求하였다.

結果 및 考察

자두로부터 抽出한 色素溶液을 whatman No. 3MM 濾過紙에 water-conc. HCl-acetic acid(82 : 3 : 15) 溶媒系 하나로만 2回 되풀리 크로마토그래피함으로서 純粹한 두 가지 色素 I, II를 分離 할 수 있었다. 一般으로 하나의 溶媒系로 分離한 色素帶中에는 異種色素가 重複되어 混入될 可能성이 있

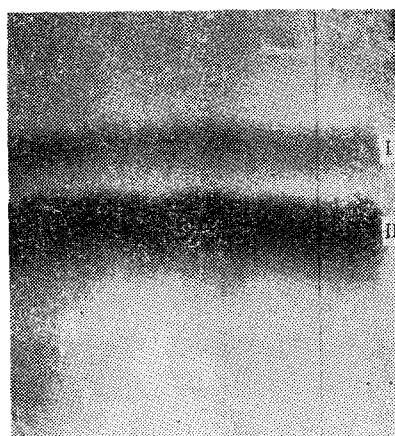


Fig.1 Paper Chromatogram of anthocyanins in plum. Paper: Whatman No. 3MM. Solvent: Water-concHCl-HOAc (82 : 3 : 15).

다. 그러나 濾過紙로 分離한 이 個別色素들에는 silica gel TLC로 確認하여 본結果 異種色素가 混入되지 않았다는 것을 알았다.

자두 中의 두 가지 色素는 Fig 1에서와 같이 約 5 : 1의 比로 含有되어 있었다. 30cm×30cm 크기의 濾過紙 1枚로 分離한 色素로서는 結合糖 및 aglycone 等의 化學試驗에 不足하기 때문에 數枚의 濾過紙로서 充分한 量을 얻어 使用하였다.

配糖體色素의 部分加水分解에 의하여 얻어지는 生成物의 數에 의하여 結合糖의 殘基數와 結合狀態를 알 수 있다. Fig.2에서와 같이 色素 I은 原配糖體와 aglycone만이 얻어진 것으로 보아 mo-

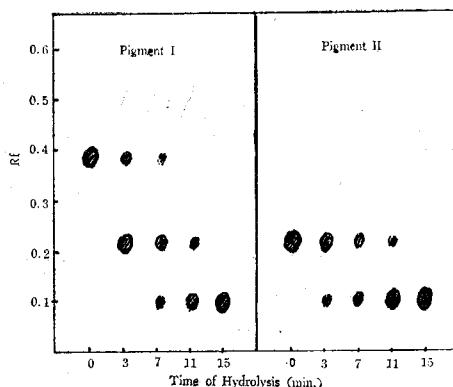


Fig. 2. Partial acid hydrolysis of anthocyanin pigments isolated from plum. Hydrolyzed with 1N HCl, developed with water-conc. HCl-HOAc (82 : 3 : 15) on Whatman No. 1 Paper.

noside 임을 알 수 있고, 色素 II 는 原配糖體, 中間體인 monoside 配糖體 및 aglycone 을 生成하는 것으로 보아 disaccharide 配糖體임을 알 수 있다.

色素 I, II 를 加水分解시켜 遊離된 糖을 既知糖과 並行하여 paper chromatography 한 결과를 Fig. 3 과 Table 1 에 들었다. 色素 I 에서는 glucose 와 xylose 가 檢出되었고, 色素 II 로부터는 glucose 만이 檢出되었다. 이結果는 部分加水分解에서 얻은 data 와 一致한다. 即 色素 I 은 xylose 와 glucose 로 이루어진 二糖類의 配糖體라는 것을 알 수 있고 色素 II 는 glucose 의 配糖體임을 알 수 있다.

自然界에 存在하는 flavonoid 化合物들 中에는 여러 가지 二糖類 配糖體들이 있다. 二糖類의 確認方法으로 보통 10% acetic acid 溶液中에서 2時間加水分解시킬 때 sugar-sugar 結合보다 aglycone-

Table 1. Paper Chromatography of sugar moiety in plum anthocyanins.

Sugar	n-Butyl alcohol-pyridine-water (6 : 3 : 3) three-fold development
	Rg value
Pigment I	1.00 (Glucose) 1.35 (Xylose)
Pigment II	1.00 (Glucose)
Rhamnose, authentic	1.70
Xylose, authentic	1.35
Arabinose, authentic	1.20
Glucose, authentic	1.00
Galactose, authentic	0.85
Mannose, authentic	1.14

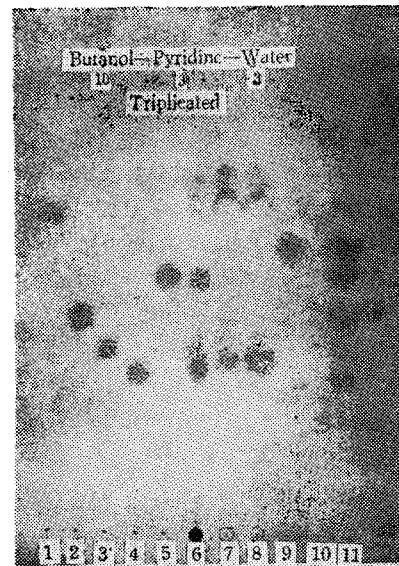


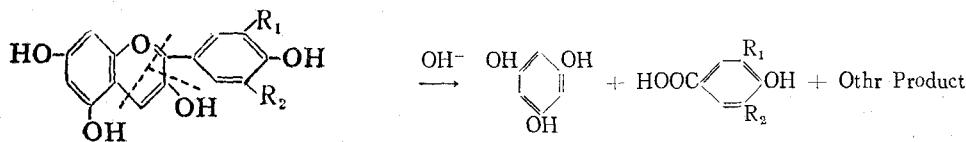
Fig. 3. Paper chromatogram of sugar moiety in plum anthocyanins. Developed three-fold with n-butyl alcohol-pyridine-water (6:3:3).
 1. Rhamnose; 2. Arabinose; 3. Glucose; 4. Galactose; 5. Xylose; 6. Sugars in pigment I; 7. Sugar directly attached to aglycone of pigment I; 8. Sugars in Pigment I; 9. Ribose; 10. Sorbose; 11. Mixture of authentic Sugars.

sugar 結合이 우선적으로 加水分解되어 生成되는 二糖類를 檢出하는 Chandler¹⁶⁾ 等의 方法이 利用되고 있다. 그러나 이 方法으로는 flavonoid 化合物들에 結合되어 있는 各種 二糖類들의 authentic 化合物를 求하기 어려울 뿐만 아니라 어느쪽 糖殘基가 aglycone 과 結合되어 있는지 알 수 없다.

本實驗에서는 色素 I 的 二糖類配糖體分子의 未端糖으로부터 糖을 順次的으로 除去하여 그 結合順序를 確認하였다. 色素 I 을 1N HCl 中에서 2 分間 加熱한 다음 곧 Whatman No. 3 MM 濾過紙에 塗付하고 크로마토그래피 分離하였다. 分離된 세 色素帶中 中間色素帶는 未端糖이 除去된 monoside 配糖體이다. 이 加水分解 中間體만을 溶出하여 完全加水分解하였을 때 Fig. 3에서와 같이 glucose 가 檢出된 것으로 보아 色素 I 的 aglycone이 直接的으로 結合된 糖은 glucose임을 알 수 있다.

anthocyanidin(aglycone)을 10% Ba(OH)₂ 溶液으로 分離하면 A環으로 부터는 phloroglucinol, B環으로 부터는 安息香酸誘導體가 生成된다(Fig. 4). aglycone의 構造의 差異에 따라 B環으로 부터 다른 安息香酸 誘導體가 生成됨으로 이것을 檢出하여 aglycone의 構造를 確認할 수 있다. 色素 I, II

Fig.4. Alkaline degradation products of anthocyanins



Anthocyanin	Substituent	Degradation Products
Delphinidin	R ₁ =R ₂ =OH	Gallic acid, Phloroglucinol
Cyanidin	R ₁ =OH, R ₂ =H	Protocatechuic acid, Phloroglucinol
Pelargonidin	R ₁ =R ₂ =H	p-Hydroxybenzoic acid, phloroglucinol
Peonidin	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =H	Vanillic acid, Phloroglucinol
Petunidin	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH	3-O-Methylgallic acid, Phloroglucinol
Malvidin	R ₁ =R ₂ =OCH ₃	Syringic acid, Phloroglucinol

의 alkali 分解에 의하여 얻어진 安息香酸誘導體들을 thin-layer chromatography하여 얻은 Rf值 및 發色試藥에 의하여 나타난 色을 Table 2에 表示하였다. 色素 I, II에서 모두 phloroglucinol, protocat-

echuic acid가 檢出된 것으로 보아 두 色素의 aglycone은 같게 cyanidin임을 알 수 있었다.

一般으로 anthocyanidin의 alkali 分解反應으로生成되는 安息香酸誘導體의 收率은 낮을 뿐만 아-

Table 2. Thin-layer chromatography of phenolic compounds from alkaline degradation of plum anthocyanins

Phenolic compounds	Identification	Rf Benzene-MeOH-HOAc (90 : 16 : 8)	Color of spot after spray
Pigment I	Phloroglucinol	0.29	Yellow brown
	Protocatechuic acid	0.40	Brown tan
Pigment II	Phloroglucinol	0.29	Yellow brown
	Protocatechuic acid	0.40	Brown tan
Phloroglucinol		0.30	Yellow brown
Protocatechuic acid		0.41	Brown tan
Vanillic acid		0.62	Orange gray
Gallic acid		0.23	Tan

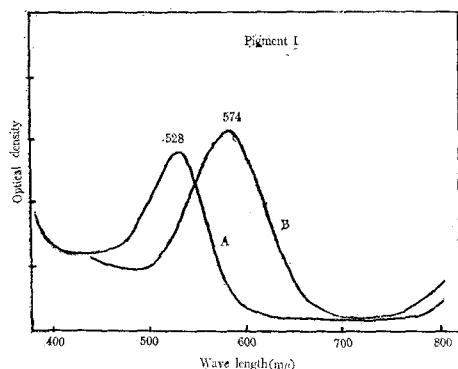


Fig.5. Absorption spectra. Curve A, Pigment I in 0.01% methanolic HCl; Curve B, Pigment I with AlCl₃.

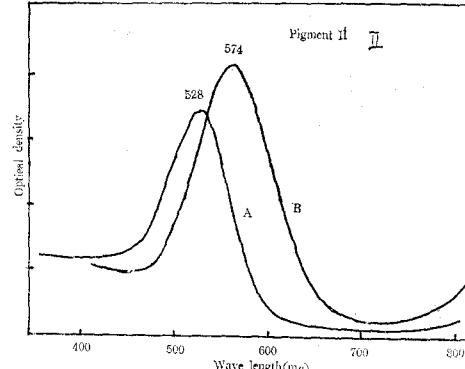


Fig.6. Absorption spectra. Curve A, Pigment II in 0.01% methanolic HCl; Curve B, Pigment II with AlCl₃.

나라 많은 着色物質 生成이 同伴됨으로 普通 使用되는 paper chromatography로는 檢出이 困難하였다. 그러나 silica gel TLC에 의하여 共存하는 着色物質의 防害 없이 쉽게 分離檢出할 수 있었다.

anthocyanin의 spectral curve의 特徵과 化學構造와의 關係가 Harborne⁷⁾에 의하여 밝혀진 다음 確認方法으로 利用되고 있다. 그리고 B環에 ortho位置로 phenol OH基 둘 個以上을 갖는 anthocyanin 들은 AlCl₃ 存在下에 吸收極大波長이 長波長쪽으로 移動한다.

色素 I, II의 0.01% HCl methanol 溶液의 可視部吸收曲線들은 Fig. 5 및 6과 같다. 두 色素의 吸

收極大波長은 모두 528m μ 였으며, 5% AlCl₃ ethanol 溶液 3滴을 加熱을 때 두 色素 모두 吸收極大波長이 574m μ 으로 移動하였다. 이 結果는 alkali 分解試驗에서 얻은 結果와 잘一致하고 있다.

自然界에 存在하는 anthocyanin 分子中에 糖의 結合은 거의 大部分이 3位置와 5position에 限定되어 있다. Harbone은 그의 研究⁷⁾에서 440m μ 에서의 吸光度와 吸收極大波長(λ_{max})에서의 吸光度의 比는 3位配糖體 와 5位配糖體 間에 顯著한 差異가 있다고 報告하였다. 一般으로 5位配糖體의 이 比은 遊離狀態의 5-OH基를 갖는 같은 anthocyanidin의 比의 約 半이 된다고 하였다.

Table 3. Rf values of anthocyanins and anthocyanidins isolated from plum.

Pigment	Rf values of pigments					
	BuOH- 2NHCl (1 : 1)	H ₂ O-HCl-H OAc (82 : 3 : 15)	HCOOH-H HCl-H ₂ O (5 : 2 : 3)	15% HOAc	H ₂ O-HCl (97 : 3)	HOAc-H ₂ O-H Cl (30 : 10 : 3)
Pigment I	0.26	0.37	0.74	0.49	0.12	—
Pigment II	0.24	0.21	0.58	0.31	0.05	—
Aglycone I	0.75	0.09	0.22	0.11	0.02	0.49
Aglycone II	0.75	0.09	0.22	0.11	0.02	0.49

Table 4. Absorption characteristics of anthocyanins isolated from plum.

Pigment	Identification	λ_{max} in 0.01% methanolic HCl (m μ)	λ_{max} after added AlCl ₃ (m μ)	E_{440}/E_{max} (%)
I	Cyaniden-3-xyloglucoside	528	574	29
II	Cyanidin-3-monoglucoside	528	574	22

色素 I 및 II의 E_{440}/E_{max} 比들은 Table 4.에서와 같이 각각 0.29, 0.02였다. 色素 I, II 및 그들로부터 얻은 aglycone I, II들을 各種 溶媒系로 paper chromatography 하였을 때 求한 Rf值들을 Table 3.에 表示하였다.

앞의 여러가지 實驗들에서 얻은 結果들로 미루어 Santa rosa 品種 자두의 anthocyanin 色系 I은 cyanidin-3-xyloglucoside이고 色素 II는 cyanidin-3-monoglucoside임을 確認하였다. 그中 主色素은 cyanidin-3-monoglucoside였다.

要 約

우리나라 栽培種 Santa rosa 자두 中에 含有된 두 가지 antocyanin 色素를 分離確認하였다. 자두

로부터 0.5% HCl methanol로 色素를 抽出하여 Amberlite IRC-50 이온 交換樹脂 column 으로 精製하고, paper chromatography에 의하여 個別色素을 分離하였다.

두 色素는 다음과 같은 實驗을 거쳐 얻은 結果들에 基礎하여 cyanidin-3-xyloglucoside 및 cyanidin-3-monoglucoside임을 確認하였다. 여러 溶媒系에 의한 paper chromatography의 Rf值, 部分酸加水分解, 結合糖의 paper chromatography에 의한 確認, 結合糖의 段階加水分解, aglycone의 alkali 分解, 및 可視部 absorption spectra.

자두中에 含有된 主色素은 cyanidin-3-monoglucoside였다.

참 고 문 헌

1. Bate-Smith E.C.: Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Eng.) No.3, 62 (1950)
2. Geissman T.A.: Modern Methods of Plant Analysis. Vol. III 1955, Springer-Verlag, Germ.
3. Hayashi K. The chemistry of Flavonoid Compounds (T.A.Geissman ed.) Macmillan Co., 1962
4. Harborne J.B.: J. Chromatog. 1, 473 (1958)
5. Bate-Smith E.C.: Nature, 161, 835 (1948)
6. Abe Y. and Hayashi K.: Botan. Mag (Tokyo) 69, 577, (1956)
7. Harborne J.B.: Biochem. J. 70, 22 1958)
8. Dickinson D. and Gawler J. H.: J. Sci. Food Agr. 5, 525, (1954)
9. Popov Khr: Chem. Abst. 71, 71 (10290z) (1969)
10. Morris Q. L., Gage T.B., Wender S. H: J.A. C.S. 73, 3340 (1951)
11. Smith. R. M., Luh B. S.: J. Food Sci. 30, 995 (1965)
12. Partridge S. M. Nature 164, 443 (1949)
13. Karrer P., Widmar R. Helv. Chim. Acta 10, 5 (1927)
14. Pastuska G. Z.: Anal. Chem. 179, 355 (1961)
15. Swain T.: Biechem. J. 53, 200 (1953)