

Butane gas가 흰쥐 혈청과 조직의 Lactatedehydrogenase 및 Cholinesterase에 미치는 영향

윤수홍 · 박은주 · 조수열 · 최현태*

효성여자대학교 약학과, *영남대학교 환경대학원

The Effect of Butane gas on Rat Cholinesterase and Lactatedehydrogenase

Soo-Hong Yoon, Eun-Ju Park, Soo-Yeul Cho and Choi Hyun Tai*

College of Pharmacy, Hyosung Women's University

**Graduate School of Environmental Studies, Yeungnam University*

ABSTRACT

Acute poisoning with organic solvents and other volatile compounds now usually follows deliberate inhalation (volatile substance abuse) or ingestion of these compounds.

The effect of butane gas inhalation was analyzed for serum, liver, brain, lung and muscle.

And the observations are revealed on rat cholinesterase activity, lactatedehydrogenase activity and electrophoretic pattern of lactatedehydrogenase isozyme.

The results are as follows:

1. The rat cholinesterase activity on serum, liver and muscle show the decreased by increasing of inhalation time of butane gas in particular the lung cholinesterase activity was greatly affected.

2. Butane gas inhalation brought out the lactatedehydrogenase activity increased of the serum and the tissues and had an important effect especially in both the liver and muscle lactatedehydrogenase activities.

3. Each tissue was found to have a characteristic distribution of lactatedehydrogenase isozymes on celluloseacetate electrophoresis and the development of inhalation time is shown the disappearance and diffusion of band. The toxicity of butane gas inhalation was most prominence in the liver and lung toxicity was occurred also.

緒 論

세계 각국마다 통계적으로 약 3.5~10%의 젊은 이들이 휘발성 물질 흡입의 경험을 가지고 있으며 그에 의한 사망률이 해마다 약 100%씩 증가하고 있어 정신건강의 측면에서 큰 우려를 낳고 있다¹⁾. 이들 흡입성 물질은 대부분 접착제, 연료용 gas, 타이프라이터 수정제, 드라이클리닝 용제, 분무형 방향제 등에 사용되는 유기용매 및 휘발성 물질들로 시중에서 값싸고 쉽게 구할 수 있는 공업 생산물들이 주종을 이루고 있기 때문에 흡입자가 날로 증가해가고 또 흡입의 남용으로 인한 정신건강상의 문제 뿐 아니라 우발적 범죄를 자행하는 등 심각한 청소년 문제 및 사회적 문제로까지 야기되고 있으나 사실상 흡입을 규제하기가 어려운 실정이다.

이들 휘발성 물질 남용의 임상적 특징으로는 빠른 흥분의 발현 및 회복을 꿈꿀 수 있으며 환각, 이명, 운동실조, 혼미, 혐오감, 구토에 이은 도취감과 해방감을 들 수 있다. 그러나 이들의 남용으로 인한 부정맥, 산소결핍, 호흡부진 및 미주신경 흥분에 의한 심장정지로 사망하는 경우가 의학적으로 보고되고 있으며, 장기간 남용시에는 중추신경계, 심장, 간장, 신장과 폐의 영구적 손상을 초래한다고 알려져 있다^{1,2)}.

한편 glycolysis 과정에서 혐기적 대사의 최종 산물인 pyruvate와 lactate 사이의 가역적 산화 환원 반응에 관여하는 lactatedehydrogenase(E.C : 1.1.1.27 이하 LDH)³⁾와 조직중의 acetylcholine 및 이외의 다른 ester를 분해시키는 cholinesterase(이하 ChE)가 포유동물의 각 조직에 광범위하게 분포하고 있으며^{4~7)} 작용 저해시 체내 활성의 변화, isozyme pattern의 변화 등 다양한 독성의 발현이 일어난다.

이렇듯 LDH와 ChE는 병적상태시 체내 분포 및 활성 변화가 현저하기 때문에 임상적 진단의 목적에 많이 이용되므로 청소년 문제 및 나아가서는 사회적 문제로 대두되고 있는 butane gas의 흡입이 생체에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐에 butane gas

를 흡입시킨 뒤 각 조직 중 이들 효소에 미치는 영향을 검토하였다.

實驗材料 및 方法

1. 시약

1) 효소활성 측정용 시약

본 실험에서는 ChE와 LDH의 활성을 측정하기 위하여 일본 Wako Co.의 pyruvic acid와 2,4-dinitrophenylhydrazine, 미국 Sigma Co.의 NADH₂, 서독 Merck사의 sodium barbital, 영국 BDH chemical Ltd.의 acetylcholine chloride, 일본 Junsei chemical Co.의 phenol red 등의 시약을 사용하였다.

2) Electrophoresis용 시약

LDH isozyme의 pattern을 관찰하기 위하여 미국 Sigma Co.의 NAD, 서독 Merck사의 barbital, sodium barbital, tris, nitrobluetetrazolium, phenazinemethosulfate 등의 시약을 사용하였다.

기타 시약은 특급 및 1급을 사용하였다.

2. 동물실험

1) 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 250±30g의 Sprague-Dawley계 숫쥐 80마리를 1주일간 예비사육하여 사육실 조건에 적응시킨 후 난괴법에 따라 군당 8마리씩 나누어 실험하였다. 실험기간 동안 사육실 온도는 20±2°C를 유지하였으며 식이는 자유 급식하였다.

2) 실험계획

실험은 무처치군인 control군을 대조로 하여 130.19 ml/m³.min의 butane gas 유출 속도를 가지는 chamber 안에서 실시하였다. 실험군은 gas 노출 시간에 따라 3군으로 구분하였으며 각 군마다 격일제로 일정시간 반복하여 gas를 노출시켜 6일간 실험하였다.

각 실험군은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. Experimental conditions.

군	가스유출속도	노출시간	실험기간
C (Control)			
I-1	130.19 ml/m ³ .min	1 min./day.	2일
I-2	130.19 ml/m ³ .min	1 min./day	4일
I-3	130.19 ml/m ³ .min	1 min./day	6일
II-1	130.19 ml/m ³ .min	3 min./day	2일
II-2	130.19 ml/m ³ .min	3 min./day	4일
II-3	130.19 ml/m ³ .min	3 min./day	6일
III-1	130.19 ml/m ³ .min	5 min./day	2일
III-2	130.19 ml/m ³ .min	5 min./day	4일
III-3	130.19 ml/m ³ .min	5 min./day	6일

3) 효소활성도 측정

(1) 효소 시료 조제

최종 gas 노출 후 12시간 절식시킨 실험 동물을 ether 마취 후 복부대동맥으로 채혈한 뒤 0.9% NaCl 용액으로 관류시킨 간장을 적출하고 폐, 뇌, 신장, 근육을 적출하였다. 채취한 혈액은 상온에서 약 1시간 방치 후 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 간장 및 기타 장기는 0.9% NaCl homogenate (×10)로 하여 시료로 사용하였다.

(2) 효소활성도 측정

시료중의 LDH 활성도는 Berga-Broida method⁸⁾, ChE 활성도는 Reinhold method⁹⁾에 준하여 측정하였다.

(3) LDH electrophoresis

시료중의 LDH isozyme pattern을 관찰하기 위해서 Cohn's method¹⁰⁾에 따라 cellulose acetate electrophoresis를 실시하였다. 관찰된 각 isozyme의 명칭은 Wieland와 Pflieder¹¹⁾의 방법에 따라 양극으로의 이동속도가 가장 빠른 순서대로 LDH₁에서 LDH₅로 명명하였다.

(4) 유의성 검정

모든 실험 결과는 mean±standard deviation으로 나타내었으며 각 군간의 유의성은 SAS program을 이용한 ANOVA (analysis of variance)에 의하여 통계처리하였다. 이때 유의 수준은 P < 0.05로 하였다.

實驗結果 및 考察

1. Butane gas의 흡입에 의한 혈청 중의 효소활성 변화

혈청 중 ChE의 활성은 C군은 정상범위인 1.98 michel unit를 나타낸 반면 butane gas 투여군인 I-3, II-3, III-3 군은 각각 0.74, 0.63, 0.94 michel unit를 나타내었다 (Table 2). Butane gas 투여군의 혈청 ChE는 gas의 흡입시간이 길어짐에 따라 그 활성이 점차 감소되었는데 특히 II군에서의 활성 감소가 가장 현저하였다 (Fig. 1).

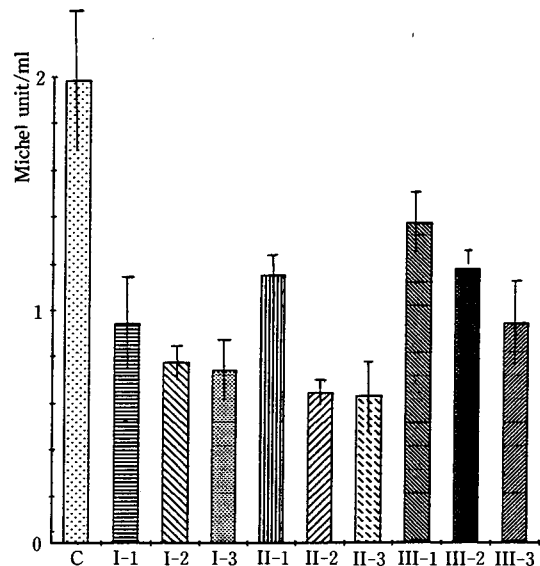


Fig. 1. The activity of serum ChE in butane gas treated rats.

*Each bar represents mean±S.D.

Gas의 흡입에 따라 혈청 LDH의 활성 변화는 C군은 정상범위를 나타낸 반면 gas 투여군에서는 현저한 활성의 증가가 일어났다 (Table 3). LDH 활성의 변화는 gas 투여시간이 증가함에 따라 I군에서는 활성이 감소하는 반면 II, III군에서는 증가했다가 감소하는 경향을 보였으며 특히 II군에서의 활성 변화가 현저하였다 (Fig. 2).

Table 2. The activities of rat serum and several tissues ChE by butane gas treatment.

Group	Organ	Serum	Liver	Brain	Lung	Muscle
C		1.98±0.04	0.71±0.05 ⁶	0.28±0.02	0.79±0.05 ^{2,3,4,5,6,7,8,9}	0.57±0.04
I-1		0.94±0.03 _{B①C①D①E②}	0.56±0.06 ⁶ _{A①C①D①}	1.02±0.02 ⁷ _{A①B①D①}	0.41±0.08 ¹	0.42±0.06 _{A②}
I-2		0.77±0.06 ^{5,7} _{C③}	0.47±0.03	0.36±0.07 _{A③}	0.28±0.02 ¹	0.38±0.08
I-3		0.74±0.07	0.44±0.05 ⁶	0.21±0.08	0.18±0.07 ¹	0.37±0.07
II-1		1.15±0.05 ^{5,7}	0.50±0.01	1.00±0.04	0.45±0.07 ¹	0.34±0.06
II-2		0.64±0.01 ^{2,4,6,8} _{B①D②}	0.25±0.06 ^{1,2,4} _{A①C①D①}	0.33±0.04 _{A②B①D①}	0.37±0.06 ¹	0.25±0.05
II-3		0.63±0.03 ⁵	0.27±0.02	0.26±0.01	0.28±0.02 ¹	0.23±0.02
III-1		1.37±0.06 ^{2,4,8} _{E③}	0.39±0.05 _{C②}	0.65±0.04 _{B②}	0.43±0.05 ¹	0.35±0.01 _{A③}
III-2		1.17±0.08 ^{5,7} _{C②}	0.32±0.08 _{D①E②}	0.52±0.08 _{A②}	0.31±0.01 ¹ _{B①D①E③}	0.32±0.04 _{B②D③}
III-3		0.94±0.01	0.18±0.05	0.41±0.03	0.19±0.03	0.30±0.03

*Values are mean±standard deviation (n=16)

*unit : Michel unit

*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference C: Group C vs other group 1: Group I-1 vs other group 2: Group I-2 vs other group 3: Group I-3 vs other group 4: Group II-1 vs other group 5: Group II-2 vs other group 6: Group II-3 vs other group 7: Group III-1 vs other group 8: Group III-2 vs other group 9: Group III-3 vs other group.

*Within the same column with different subscripts letters (marked lower left site) represent significant difference A: serum vs other organ B: liver vs other organ C: brain vs other organ D: lung vs other organ E: muscle vs other organ ①: P<0.001 ②: P<0.01 ③: P<0.05.

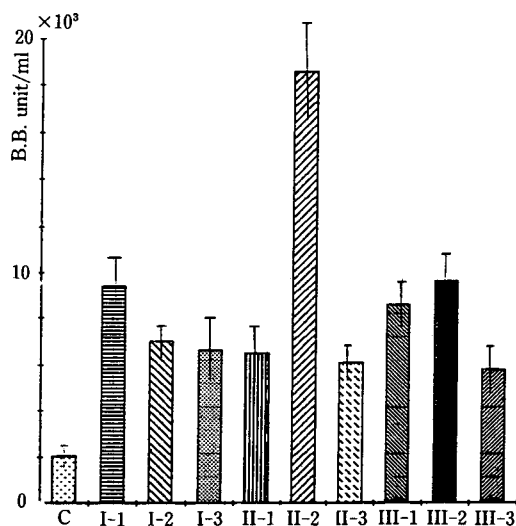


Fig. 2. The activity of serum LDH in butane gas treated rats.

*Each bar represents mean±S.D.

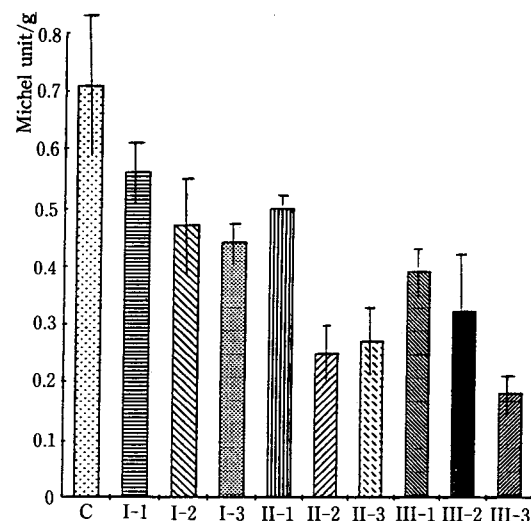


Fig. 3. The activity of liver ChE in butane gas treated rats.

*Each bar represents mean±S.D.

Table 3. The activities of rat serum and several tissues ChE by butane gas treatment.

Organ Group	Serum	Liver	Brain	Lung	Muscle
C	2075.40 ± 672.10 ^{1,2,7,8}	119339.18 ± 10971.99	25455.07 ± 3310.65	33911.45 ± 2408.34	14853.56 ± 7218.53
I-1	9379.67 ± 389.82 ^{c,3,4,5,6,9}	182332.66 ± 96942.08 ^{C③}	59865.44 ± 4354.90 ^{B③}	62843.17 ± 1127.38	23203.48 ± 6320.71
I-2	6963.74 ± 177.23	168235.25 ± 11391.56	70696.12 ± 3719.08	64700.83 ± 1412.52	20562.67 ± 8702.34
I-3	6622.88 ± 130.08 ¹	177076.64 ± 11290.12	69539.52 ± 3385.29	82649.50 ± 3434.71	21832.12 ± 7366.19
II-1	6510.46 ± 147.69 ¹	186593.90 ± 10300.73 ^{C①}	69658.37 ± 3556.65 ^{B①}	107430.33 ± 5786.02	22805.68 ± 5123.58
II-2	18606.70 ± 3238.96 ¹	139697.16 ± 81172.79 ^{1③}	79471.38 ± 5362.68	92107.29 ± 1563.87	16624.09 ± 5358.84
II-3	6072.96 ± 200.35 ¹	119038.86 ± 10162.91	65985.03 ± 5423.05	89015.35 ± 3511.80	13594.21 ± 1111.93
III-1	8582.84 ± 359.41 ^C	152315.53 ± 12432.96	89178.44 ± 4765.24	83995.77 ± 1758.49	18616.03 ± 1106.08
III-2	9654.46 ± 256.08 ^{C,9}	98112.81 ± 8057.00	82803.19 ± 3675.16	109799.50 ± 2379.10	10846.61 ± 6853.46
III-3	5726.09 ± 155.04 ^{1,8}	197558.45 ± 12411.04	63212.84 ± 5050.83	94994.09 ± 1564.64	25293.28 ± 7386.31

*Values are mean ± standard deviation (n=16)

*unit : B.B. unit

*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference C: Group C vs other group 1: Group I-1 vs other group 2: Group I-2 vs other group 3: Group I-3 vs other group 4: Group II-1 vs other group 5: Group II-2 vs other group 6: Group II-3 vs other group 7: Group III-1 vs other group 8: Group III-2 vs other group 9: Group III-3 vs other group

*Within the same column with different subscripts letters (marked lower left site) represent significant difference A: serum vs other organ B: liver vs other organ C: brain vs other organ D: lung vs other organ E: muscle vs other organ ①: P<0.001 ②: P<0.01 ③: P<0.05

2. Butane gas의 흡입에 의한 간장 중의 효소 활성 변화

간장 중 ChE의 활성은 Table 2에서 보는 바와 같이 C군의 0.71 michel unit가 gas 투여군인 I, II, III군에서는 모두 감소하는 경향이 나타났다. 활성의 감소는 gas 흡입시간이 길어질수록 그리고 흡입 gas의 농도가 강해질수록 그 변화가 현저한 것으로 나타났다(Fig. 3).

간장중 LDH 활성 변화는 정상 범위를 나타낸 C군에 비하여 gas 흡입군에서는 모두 현저한 활성의 증가가 일어났다(Table 3). 활성의 증가는 I, III군에서는 시일의 경과에 따라 활성이 감소했다가 증가한 반면 II군에서는 시일의 경과에 따라 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 4).

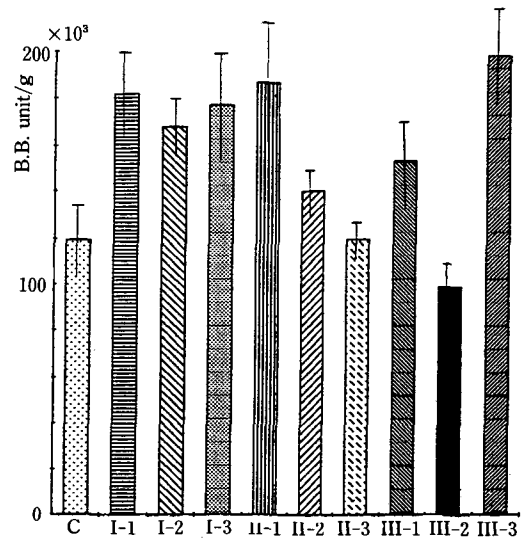


Fig. 4. The activity of liver LDH in butane gas treated rats.

*Each bar represents mean ± S.D.

3. Butane gas의 흡입에 의한 뇌중의 효소 활성 변화

Butane gas의 흡입에 뇌조직 중의 ChE 활성 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 gas의 흡입에 의하여 증가한 활성이 시일이 지남에 따라 차츰 감소하는 경향을 나타내었으며 그 감소 정도는 III군에 비하여 I, II군에서 보다 현저하게 나타났다(Fig. 5). Butane gas의 최초 흡입에 의한 활성의 증가 현상은 의외의 결과로 나타난 것으로 차후 세부적인 실험을 통하여 보다 자세한 원인 구명이 있어야 할 것으로 사료된다.

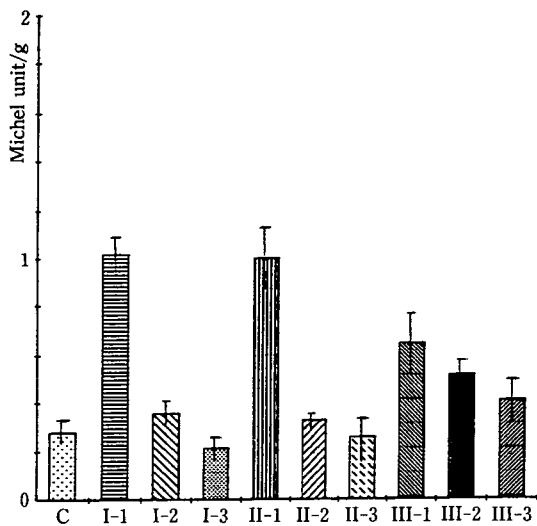


Fig. 5. The activity of brain ChE in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

뇌중의 LDH 활성은 gas의 흡입에 의하여 활성이 현저하게 증가했는데 I, II군에서는 증가했다가 감소한 반면 III군에서는 시일의 경과에 따라 지속적인 감소 경향을 나타내었다(Table 3, Fig. 6).

4. Butane gas의 흡입에 의한 폐중의 효소 활성 변화

Butane gas 흡입이 폐조직의 ChE 활성에 미치는 영향은 Table 2에서 보는 바와 같이 gas의 흡입

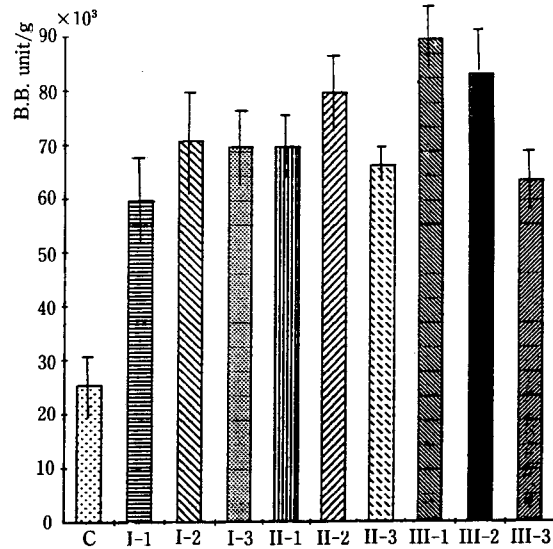


Fig. 6. The activity of brain LDH in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

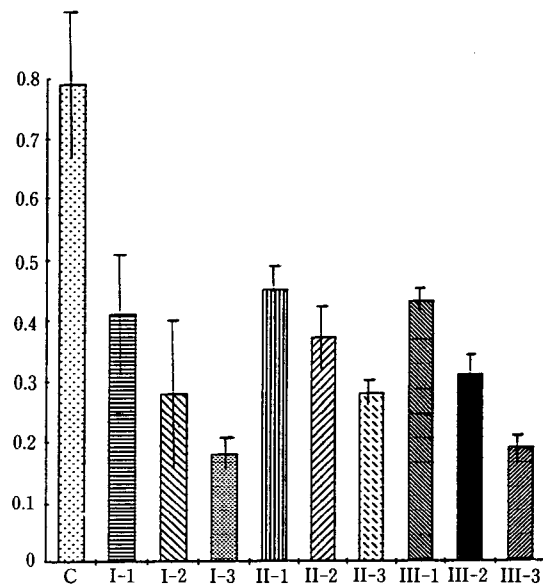


Fig. 7. The activity of lung ChE in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

에 의해 I, II, III군 모두 흡입 시간이 길어짐에 따라 활성이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7).

LDH의 활성은 gas의 흡입에 의하여 현저한 활성

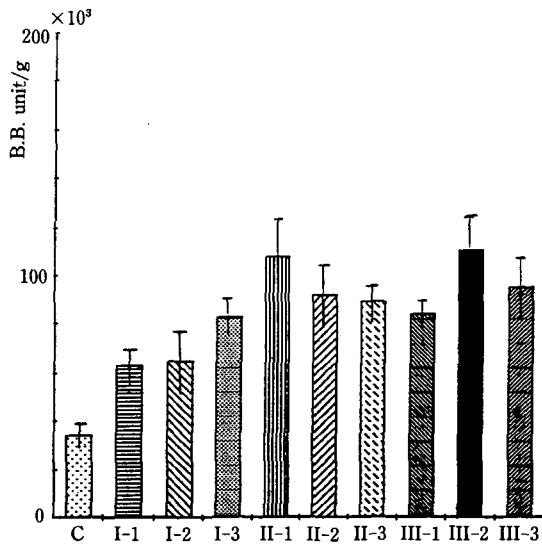


Fig. 8. The activity of lung LDH in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

증가를 일으켰으며 흡입 시간의 경과에 의하여 III 군에서는 증가한 반면 II군에서는 활성의 감소를 나타내었다(Table 3, Fig. 8).

5. Butane gas의 흡입에 의한 근육중의 효소 활성 변화

근육중의 ChE 활성은 Table 2에서 보는 바와 같이 butane gas의 흡입에 의해 활성의 감소를 일으켰다. 각군 모두 gas의 흡입 시간이 길어질수록 활성이 감소하는 경향을 보였으며 그 정도는 II군에서 가장 현저하였고 최종 활성치 역시 II군에서 가장 낮아 II군의 독성 발현이 가장 큰 것으로 나타났다(Fig. 9).

Gas의 흡입에 의한 LDH의 활성 변화는 Table 3에서 보는 바와 같이 각군 모두 C군에 비해 현저한 활성의 증가를 나타내었다. I, III군에서는 gas의 흡입시간의 경과에 따라 활성이 감소하다가 증가한 반면 II군에서는 시일의 경과에 따라 큰 폭으로 활성의 감소가 일어났다(Fig. 10).

6. Celluloseacetate electrophoresis에 의한 LDH isozyme의 분포 변화

Fig. 11는 electrophoresis를 이용한 LDH isozyme 분포를 나타낸 것이다. Fig.에서 보는 바

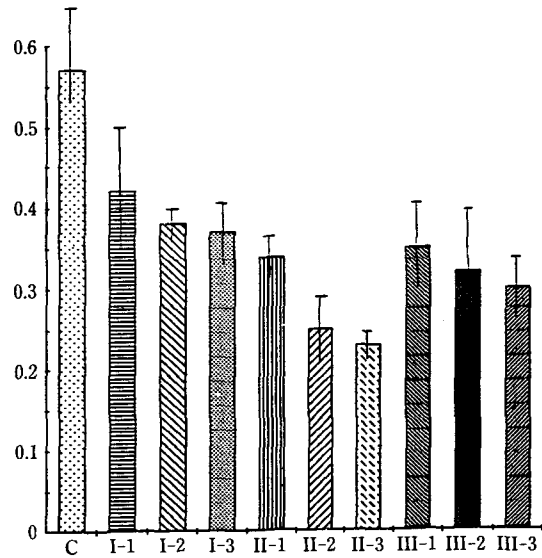


Fig. 9. The activity of muscle ChE in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

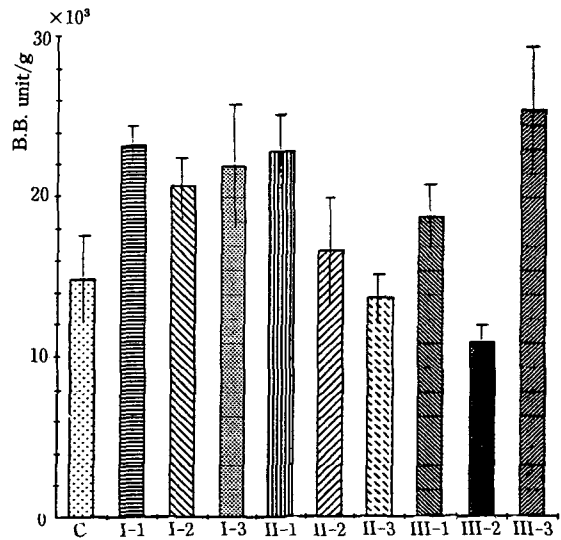


Fig. 10. The activity of muscle LDH in butane gas treated rats.
*Each bar represents mean ± S.D.

와 같이 전조직에서 예외없이 1개 이상의 isozyme 이 분리되었으며 혈청과 호기적 조직인 뇌, 폐에서는 LDH₁부터 LDH₅까지 5개의 band가 분리된 반면, 혐기적 조직인 간에서는 LDH₄와 LDH₅의 2개, 근육에서는 LDH₂에서 LDH₅까지의 4개의 band가 분리되었다. C군에 비하여 butane gas를 흡입시킨 group에서의 LDH isozyme 분포는 Fig.에서 보는

바와 같이 특이한 분포를 나타내었다. 즉 gas의 흡입시간의 경과에 의해 serum에서는 isozyme의 분포에 별 영향을 미치지 않았으나 폐에서는 가장 큰 독성을 나타내어 LDH₁과 LDH₂의 band만이 보존되었을 뿐 나머지 band의 소실이 일어났고 뇌에서도 band의 소실이 일어났다. 혐기 조직인 간에서는 LDH₄가 소실되면서 LDH₅의 존재가 두드러졌고

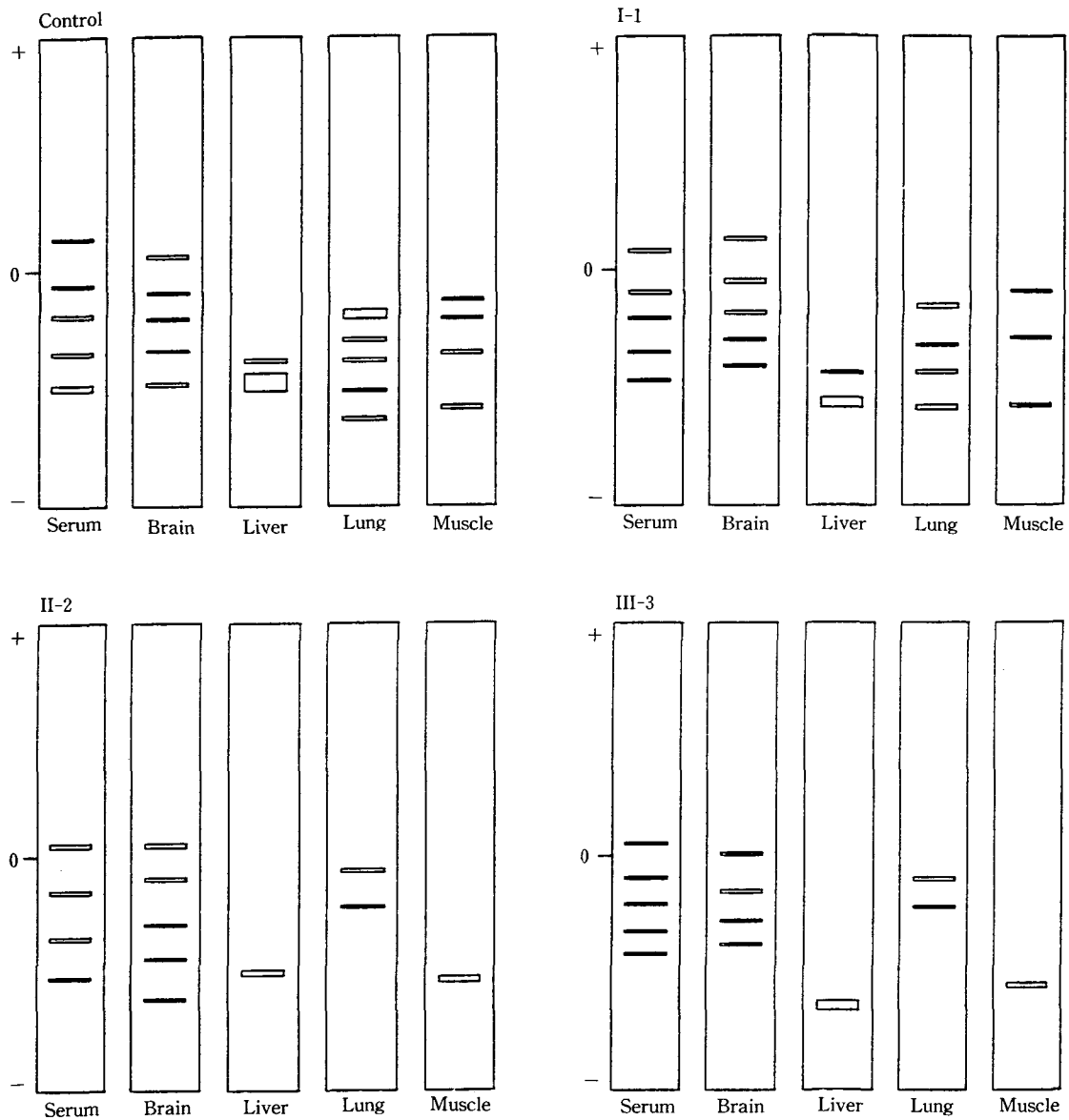


Fig. 11. Electrophoresis pattern of LDH isozyme.

근육에서도 LDH₅만이 보존되었다.

가장 대표적인 hydrocarbon계 휘발성 용매로 사용되는 butane gas를 이용하여 휘발성 물질의 흡입이 생체에 미치는 영향을 관찰하기 위해 rat에 일정 농도의 butane gas를 일정시간 흡입시킨 뒤 각 장기에 대하여 효소생화학적 시험을 실시하였다.

간에서 생합성되어 신경 자극 전달에 관여하는 cholinesterase의 활성은 gas의 흡입에 의하여 혈청과 각 조직중에서 현저한 활성의 감소를 나타내었는데 특히 폐와 간장, 혈액에서 독성발현이 가장 현저하였다. 이는 cholinesterase의 활성은 체내 독성물질에 의하여 감소한다는 Schmidt¹²⁾의 보고와 일치하는 결과이며 폐를 통하여 유입된 butane gas가 일단 간장을 거쳐 혈액으로 유입되고, hepatic monooxygenase에 의해 산화 대사된 뒤 그 대사물이 뇨로 배설된다는 것을 감안한다면²⁾ 간에서 합성된 ChE가 혈액으로 유입되기 전에 butane gas에 의해 비활성화 되는 것으로 생각되어진다.

해당대사에 관여하는 LDH의 활성은 gas의 흡입에 의하여 그 활성이 현저하게 증가하였는데 이는 여러가지 병적 상태에 따라 조직 중 특히 간장과 심장의 LDH 활성의 분포가 변화한다는 Dawson 등¹³⁾의 보고와 일치한다. LDH의 isozyme 분포 역시 celluloseacetate electrophoresis에 의하여 각 조직마다 1개 이상의 isozyme이 분포되었는데 이는 Wieland¹¹⁾의 보고와 일치하는 결과이며 LDH isozyme의 수와 이동속도는 Markett와 Moller¹⁴⁾의 설과 같이 각 조직마다 특이한 electrophoresis mobility를 가진 band로써 발견되었다. Gas의 흡입에 의해서 각 조직중에서 LDH isozyme의 분포는 현저한 변화를 일으켰는데 Plummer¹⁵⁾의 보고와 같이 뇌, 폐에서는 호기적 대사에 관여하는 LDH의 isozyme 분포가 유지되었고 간장과 근육에서는 독성 발현이 가장 현저하여 LDH₅의 band만이 유지될 뿐 나머지는 소실되었다. 이는 gas의 흡입에 의한 2차적 산소부족 상태에서 energy를 방출시키기 위해 혐기 조직에서는 해당과정을 통해 lactic acid를 생성하여 energy를 공급받아야 하므로 혐기적 특성이 강한 LDH₅의 활성이 계속 유지되는 것으로 생

각되어진다.

結 論

가장 대표적인 hydrocarbon계 휘발성 용매로 사용되는 butane gas를 이용하여 휘발성 물질의 흡입이 생체에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 rat에 일정 농도의 butane gas를 일정 시간 흡입시킨 뒤 각 조직에 대하여 효소생화학적 시험과 celluloseacetate electrophoresis를 실시하였다.

1. Butane gas의 흡입은 시간이 증가함에 따라 혈청, 간장, 근육의 ChE 활성을 억제하였으며 특히 폐의 ChE 활성에 가장 큰 영향을 나타내었다.
2. Butane gas의 흡입에 의하여 혈청 및 각 조직중에서 LDH 활성이 증가되었으며 특히 폐와 간에서 그 영향이 현저히 나타났다.
3. Celluloseacetate electrophoresis를 통한 각 조직의 LDH isozyme pattern에는 큰 차이가 나타났으며 gas의 흡입에 의해 band의 소멸과 선명도의 감소가 일어났는데 특히 간장에 대한 독성이 가장 현저했으며 폐에 대한 독성도 큰 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Ramsley J.D., Anderson H.R., Bloor K. and Flanagan R.J.; *Hum. Toxicol.*, 8, 261 (1989)
2. Flanagan R.J., Ruprah M., Meredith T.J. and Ramsley J.D.; *Drug. Saf.*, 5, 359 (1990)
3. Straub F.B.; *Biochem. J.*, 34, 483 (1940)
4. Adams D.H. and Wittaker V.O.; *Biochem. Biophys. Acta.*, 3, 357 (1949)
5. Auguatinsson K.B.; *Acta. Physiol. Scand.*, 15, 1 (1948)
6. Witter R.F.; *Arch. Environ. Health.*, 6, 537 (1963)
7. William F.D. and Wayland J.H.; *Arch. Environ. Health.*, 5, 31 (1962)
8. Berga L. and Broida D.; *Sigma Tech. Bull.*, 500 8-60 (1960)

9. Reionhold J.G. *et al.*; *Amer. J. Clin. Path.*, **23**, 645 (1953)
10. Cahn R.D., Kaplan N.D. and Levin E.Z.; *Science*, **136**, 962 (1964)
11. Wieland Th. and Pflider G.; *Biochem. Z.*, **329**, 112 (1957)
12. Schmidt E. and Schmit F.W.; Brief guide to practical, **95**, 1572 (1975)
13. Dawson D.M., Goodfriend T.L. and Kaplan N. O.; *Science*, **143**, 929 (1964)
14. Markert C.L. and Moller F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **45**, 753 (1959)
15. Plummer D.T., Elliott B.A., Cooke K.B. and Wilkinson J.H.; *Biochem. J.*, **87**, 416 (1963)