子牛胸腺のオクタデセン酸

精製と構造研究および抗腫瘍活性

土橋 紘一*・大沢 由男*・難波 脩一*・柳下 弘毅**

* 帝国臓器製薬株式会社化学研究部（川崎市高津区下作延 1604）

** 日本大学農獣医学部（東京都世田谷区下馬町 3-34-1）

Purification, Chemical Structure and Antitumor Activity of Octadecenoic Acid from Calf Thymus

Kōichi DOBASHI*, Yoshio ŌSAWA*, Shūichi NAMBA* and Kōki YAGISHITA**

* Chemical Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.
(1604, Shimosakunobe, Takatsu-ku, Kawasaki)

** College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University
(3-34-1, Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo)

A lipid fraction having an inhibitory activity against Ehrlich mouse ascites carcinoma was isolated from calf thymus. Thymus tissue was hydrolyzed under N_2 with 20% NaOH and the active material was extracted with ether after the hydrolysate was acidified with HCl. The crude material thus obtained was purified by the difference in solubility of its metal salts in organic solvents.

The growth of the tumor in mice was inhibited by the administration of either the crude material or the purified one in a dose of 5 mg/mouse/day or 2 mg/mouse/day respectively for 10 days.

Further purification was subjected to a silica gel column chromatography as the Hg-complex of an active lipid fraction, and the chemical analyses were made on the fractions with TLC, GLC, and IR. The results indicated that the main component of the most purified fraction was a *cis*-octadecenoic acid.

This fatty acid was similar to oleic acid but it was far more active than oleic acid against Ehrlich ascites carcinoma. The GLC-MS and the result of oxidative cleavage suggested that the principle of the anti-tumor substance from calf thymus might be *cis*- Δ^{10} - or *cis*- Δ^{11} -octadecenoic acid differing from oleic acid in the location of the double bond.

1 緒 言

胸腺の脂質成分中に抗腫瘍活性を示す物質が存在することは、Potop ら¹⁾によって報告されているが、その本体はステロイドあるいはステリンよう物質であると推定されている。われわれもまた、子牛胸腺のアルコールおよびアセトン抽出物中にマウス Ehrlich 腹水腫瘍を抑制する物質が存在することを見だしている²⁾が、このものはアルカリ加水分解によって失活せず、その加水分解物の諸性質から、またある種の脂肪酸に抗腫瘍作用のあることが知られている³⁾ ことなどから考えて、この活性は脂肪酸によるものと推定した。さらにこれを精製し、種々の分画物の活性を見ることにより、その作用の本体は $C_{18:1}$ 脂肪酸画分にあることが推定された。そこで本報では子牛胸腺を直接加水分解し、脂肪酸混合物を抽出して

$C_{18:1}$ 脂肪酸を精製することを試みた。ラット胸腺の脂質成分については、Abramson ら⁴⁾がすでに詳細な分析を行なっているが、脂肪酸の二重結合位置についてはなお不明である。われわれは子牛胸腺からの脂肪酸混合物をカリウム塩およびリチウム塩として、有機溶媒に対する溶解度を利用して分別した後、メチルエステルの水銀付加物としてシリカゲルカラムで分画し、 $C_{18:1}$ 脂肪酸を高純度を含む画分を得た。このものはマウス Ehrlich 腹水腫瘍に対して抑制作用を示し、その活性はオレイン酸に比較すると明らかに強力であった。そこでいくつかの化学分析、機器分析を行なってこの $C_{18:1}$ 脂肪酸の構造について推定したので報告する。

2 実 験

2.1 実験材料

Fig.-1 Summary of extraction procedure of the lipid fraction from calf thymus.

0.5~1 オの子牛胸腺を、ト殺場より入手し、直ちに -30°C に凍結保存したものを使用した。

2.2 抽出および精製

抽出法の概略を **Fig.-1** および **Fig.-2** に示す。子牛胸腺 1 kg をミンチし、三口フラスコ中で 20% 水酸化ナトリウム水溶液 800 ml を加え、窒素ガスを流通しつつ 5 hr 室温でかくはんした後、濃塩酸を加えて pH 2.0 とし、ろ過補助剤としてハイフラスーパーセル 50 g を混合してろ過し、沈殿に エーテル 2 l を加えて 4 hr かくはんする。上層液を分離し、再びエーテル 2 l を加えて 2 hr 抽出し、エーテルを合わせて中性になるまで水洗し、無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧乾固する。乾固物をエチルアルコール 50 ml に溶かし、10% エタノールカリ 250 ml を加え、生じた沈殿を除いてろ液を乾固する。これに水 200 ml を加えて溶かし、エーテル 500 ml ずつ 2 回分配してエーテル層に転溶した中性物質を除き、水層を 6 N-塩酸で pH 2.0 としてエーテル 50 ml ずつ 2 回分配抽出する。エーテル層を脱水、濃縮乾固し粗抽出物 (CE) 21.2 g を得た。この CE 17.0 g に 20% 水酸化リチウム水溶液 20 ml を加えて均一に練り合わせ、アセトン 180 ml を加えて室温で 20 min かくはん後ろ過して沈殿を取る。沈殿に 50% エチルアルコール 100 ml を加えて 60°C で溶かした後、20°C に冷却して生じた沈殿を集める。沈殿に水 50 ml を加え 6 N-塩酸で pH 2.0 としてエーテル 100 ml ずつ 2 回で分配抽出し、エーテル層を水洗、脱水、減圧乾固して精製物 (PE) 7.46 g を得た。

2.3 Ehrlich 腹水腫瘍抑制効果の判定

体重約 20 g の dd 系マウスを使用し 1 匹あたり Ehrlich 腹水腫瘍細胞 250 万個、または 2,000 万個を腹コウ内に接種後、直ちに試料投与を開始した。試料は Tween 40 0.5%, ベンジルアルコール 1.5% を含む水溶液で乳化し、1 日 1 回 0.2 ml ずつ、10 日間腹コウ内に投与し、腫瘍増殖の抑制を体重変化と延命効果で判定した。試料を除いた同溶媒で処置した群を対照群とした。**Table-1** で示した活性の強さは、生存日数によって次のように表示した。

++>30 日, +20~30 日,
±15~20 日, -<15 日

2.4 メチルエステル化および水銀付加物の調製

試料 1 g にメチルアルコール 20 ml を加えて溶かし、三フッ化ホウ素・エチルエーテル 1 ml を加えて 65°C, 20 min 加熱し、メチルアルコールを減圧留去した後、エーテル 50 ml に溶かし、水 10 ml 次いで 0.5 N-水酸化ナトリウム 10 ml、さらに水洗を充分行なった後脱水し、減圧濃縮乾固してメチルエステルを得た。二重結合への水銀付加は、Mangold ら⁹⁾の方法を用いて行ない、アセトキシマーキュリメトキシ誘導体を得た。

2.5 シリカゲルクロマトグラフィー

2.5.1 TLC

Camag 社製シリカゲルを用い 0.25 mm に作製し、105°C 2 hr 活性化した。展開溶媒は、*n*-ヘキサン-エーテル-酢酸 (60:40:1)、*n*-ヘキサン-エーテル-酢酸 (40:60:1)、酢酸-アセトニトリル (1:1) (*n*-ドデカン含浸プレートに使用)を用いた。

2.5.2 カラムクロマトグラフィー

メチルエステル水銀付加物のシリカゲルカラムクロマトは次の条件で行なった。クロマト用シリカゲル (Tōkai-gel) を *n*-ヘキサン-エーテル (75:25) に懸濁し、2×30 cm カラムに詰め、試料を *n*-ヘキサンに溶かして添加し、溶媒の混合比を変えて段階的に溶出してフラクションコレクターに集めた。流出液は試験管 1 本あて 0.1 ml ずつ小型試料ビンに採取し、減圧乾固して重量を測定して流出位置を確認した。また毛细管で一定量ずつろ紙上にスポットして 0.2% *sym*-ジフェニルカルバゾンのエチルアルコール溶液をスプレーし、自記濃度計 (Ozumor-7, アタゴ) で 570 mμ の吸収を測定した。

2.6 IR および GLC

日立 EPI-G 2 型回折格子赤外分光光度計を使用し、クロホルム中、KRS-5 セル (0.5 mm) で測定した。GLC は 3 mm×2 m ステンレスカラムに、15% ポリエチレングリコールサクシネート (担体 Shimalite) を充てんし、日立 KGL-2 B 型ガスクロマト装置を使用し

た。

2.7 不飽和脂肪酸の酸化分解

カラムクロマトで分離した $C_{18:1}$ 画分の酸化分解は、過マンガン酸カリウム-過ヨウ素酸法⁹⁾ によって行なった。酸化分解によって得られたモノカルボン酸、ジカルボン酸混合物に *n*-ヘキサンを加え、可溶のモノカルボン酸を分離し、*n*-ヘキサンを減圧留去してメチルエステル化して GLC にかけた。

2.8 メトキシ誘導体の合成

不飽和脂肪酸メチルエステルの二重結合位置にメトキシ基を導入して MS にかけて、二つのメトキシ基の間に開裂しやすいことが Niehaus ら⁷⁾ によって報告されているので、カラムクロマトによって得られた $C_{18:1}$ 脂肪酸をメトキシ誘導体として MS で分析した。

2.8.1 ヒドロキシ脂肪酸

アルカリ性過マンガン酸カリウム法⁹⁾ によって水酸化した。遊離酸とした試料の 100 mg に 1% 水酸化ナトリウム水溶液 10 ml を加え、90 ml の氷冷水で希釈し、氷冷した 1% 過マンガン酸カリウム水溶液 8 ml を加え、氷冷下に 10 min 放置後、亜硫酸ガスを通じて脱色する。3 ml の濃塩酸を加えて氷冷下に 1 hr 放置し、生じた沈殿を口取して氷冷水で洗浄後、乾燥してジヒドロキシ脂肪酸を得た。

2.8.2 メトキシ化

箱守ら⁹⁾ の方法にしたがってメトキシ化した。20 ml のジメチルスルホキシドに 500 mg の水素化ナトリウムを加え、窒素気流中 65°C, 45 min 加熱し、冷却して得られたメチルスルフィニルカルバニオンを、100 mg のジヒドロキシ脂肪酸の 10 ml ジメチルスルホキシド溶液に加え、窒素気流中で 15 min 室温に放置後、ヨウ化メチル 4 ml を滴下し、窒素気流中 10 min 放置

Fig.-3 Effect of thymic extracts on the survival of Ehrlich ascites tumor cell inoculated dd-mice.

Fig.-4 Effects of extract (PE) on the survival and the body weight of mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells.

後 50 ml のエーテルで抽出した。エーテルを水 25 ml ずつ 5 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水し、減圧乾固してジメトキシ脂肪酸メチルエステルを得た。

2.9 GLC-MS 連結装置による分析

日立 K-53 型ガスクロマト装置と日立 RMU-6 E 型質量分析装置を連結したものを用いた。カラムは **2.6** に示したものを、MS は 70 eV で行なった。

3 結 果

3.1 抽出物の活性

マウス Ehrlich 腹水腫瘍に対する粗抽出物 (CE), 精製物 (PE) および対照群の延命効果と体重変化を、**Fig.-3, 4** に示した。**Fig.-3 a, 3 b** に示すように、CE 5 mg/day 投与群、PE 2 mg/day 投与群では著明な延命効果が認められた。また **Fig.-4 a, 4 b** に示すように接種細胞数を 2,000 万個に増し、PE 5 mg/day 投与した例では、全例が 50 日以上生存し、正常な体重増加を示した。

3.2 TLC

3.2.1 CE, PE の TLC

CE および PE を、オレイン酸を対照として TLC で分析した結果を **Fig.-5 a** に示した。この条件で CE, PE ともにオレイン酸と同じ R_f 値を示した。さらに **Fig.-5 b** に CE, PE 各メチルエステルを逆相 TLC で分析した結果を示した。CE メチルエステルは 4 スポット、PE メチルエステルはかなり純化されて 2 スポットが検出された。この条件の逆相 TLC では、脂肪酸メチルエステルを炭素数によって分離できることが知られている¹⁰⁾ ので、対照のオレイン酸メチルエステルと比較することにより、CE, PE ともに主成分は C_{18} であり、ほかに C_{14} , C_{16} , C_{20} の成分が含まれていることがわかった。

(1) Crude extract (CE) (2) Purified extract (PE) (3) Oleic acid
 Detected with I_2 vapor
 Solvent: (a) n-hexane-ether-acetic acid (60:40:1)
 (b) Acetic acid-acetonitrile (1:1)
 n-dodecane impregnated plate

Fig.-5 TLC of thymic extracts, oleic acid and the derivatives.

1: Oleic acid 2: CE
3: PE 4: Elaidic acid
Solvent: *n*-hexane-ether-acetic acid (40:60:1)
Detection: *sym*-diphenylcarbazone in EtOH

Fig.-6 TLC of the acetoxymercury methyl esters. R_f 値を示し、また *trans* 型のエライジン酸誘導体と異なる R_f 値を示すことから、PE, CE の主成分は二重結合 1 個を持つ *cis* 型の脂肪酸であることが推定された。

3.3 IR

PE メチルエステルの IR スペクトルは **Fig.-7** に示されるように典型的な脂肪酸メチルエステルのパターンを示しており、遊離酸型においても同様に脂肪酸のパターンを示した。また、*trans* 型二重結合を持つ脂肪酸に特有な 970 cm^{-1} に吸収が認められないことから、PE の主成分は *cis* 型であると考えられ¹¹⁾、また枝鎖の吸収

Fig.-7 IR of PE methyl ester.

Eluants
(1) *n*-Hexane-ether (75:25) 50ml
(2) *n*-Hexane-ether-acetic acid (50:50:1) 50ml
(3) *n*-Hexane-ether-acetic acid (25:75:1) 100ml
(4) *n*-Hexane-acetone-acetic acid (40:60:1) 200ml
(5) Acetone-acetic acid (100:1) 200ml
(6) MeOH-conc.HCl (75:1) (fraction D) * (150ml)
Column length: 2×50cm
Fraction volume: 5ml/tube
—: Dried weight from 0.1ml of each tube
-----: O.D. at 570mμ by *sym*-diphenylcarbazone

Fig.-8 Silica gel column chromatography of Hg-complex of PE methyl ester.

3.2.2 水銀付加物の TLC

CE, PE の各メチルエステルのアセトキシマーキュリメトキシ誘導体およびオレイン酸、エライジン酸の各メチルエステルの同上誘導体の TLC を **Fig.-6** に示した。この条件での TLC においては、不飽和脂肪酸の二重結合数、*trans*, *cis* 異性体を分離できることが報告されている⁵⁾。

Fig.-6 に示すように PE, CE の誘導体はメインスポットがオレイン酸誘導体と同じ R_f 値を示し、また *trans* 型

Solvent: *n*-Hexane-ether-acetic acid (40:60:1)
Detection: ①: vapor
②: *sym*-Diphenylcarbazone in EtOH

Fig.-9 TLC of fraction (A-D) obtained by column chromatography.

mg, B: 784.0 mg, C: 54.0 mg, D: 10.5 mg であった。ただし D は塩酸を含むメタノールで溶出したため、水銀付加物がはずれて元の二重結合にもどった型で回収された。この画分 A~D の TLC を **Fig.-9** に示す。A および D からは水銀の検出はされなかった。B はモノエン酸、C はジエン酸の誘導体であることを示している。各画分 A~D をおのおの 50 ml のメチルアルコールに溶かし、濃塩酸 3 ml を加えて 10 min 放置後、減圧でメチルアルコールを留去し、50 ml のエーテルに溶かして水洗、脱水後減圧乾固してそれぞれのメチルエステルにもどした。画分 A~D に対応する塩酸-メチルアルコール処理したものを画分 a, b, c, d とする。収量および各画分の重量比率を次の表に示したが、この結果から PE の主成分は 70% 以上がモノエン酸であることがわかった。この主成分の b 画分を 10% エタノールカリ中で加水分解して遊離酸とした後、**2.3** の方法で活性テストを行なった結果は、2 mg/day の投与で 5 匹中、+4 匹、+1 匹、±0 匹、-0 匹であった。活性収率からみて大部分の活性は b 画分にあると考えられる。

画分	二重結合数	収量 (mg)	比率 (%)
a	0	92.5	21.5
b	1	306.5	71.4
c	2	19.8	4.6
d	3 以上	10.2	2.4

3.5 GLC

3.5.1 シリカゲルカラム分画物の GLC

画分 a, b, c, d の GLC の結果を **Fig.-10** に示した。これらの結果から PE の主成分であり、また主活性画分でもある b 画分は、98% 以上が $C_{18:1}$ 脂肪酸であることが明らかとなった。b 画分の retention time はオレイン酸メチルエステルに一致した。

3.5.2 b 画分の酸化分解物の GLC

酸化分解によって得られたモノカルボン酸、ジカルボン酸混合物のうち、ジカルボン酸は *n*-ヘキサンで分別

Apparatus: Hitachi KGL-2B
Column: 15% DEGS on Shimalite (60-80 mesh)
Column length: 3mm×2m
Column temp.: 150°C isothermal

Fig.-10 GLC of fractions (a-d) from silica gel column chromatography.

Fig.-11 GLC of the mono carboxylic acid methyl esters obtained by oxidative cleavage.

I : Fraction b, II : Dihydroxy derivative, III Dimethoxy derivative
Solvent : *n*-hexane-ether-acetic acid (90:10:1) Detection : H_2SO_4 (heated at 120°C)

Fig.-12

TLC of fraction b and its derivatives

するとき、一部が *n*-ヘキサンに溶解して定量性を欠くので分析に用いなかった。*n*-ヘキサン可溶のモノカルボン酸をメチルエステル化して分析した結果は Fig.-11 に示すように、 C_7 , C_8 , C_9 モノカルボン酸エステルが検出され、それぞれの比率は C_7 13%, C_8 4%, C_9 83% であった。

3.6 b 画分の GLC-MS 連結装置による分析

主活性画分である b 画分は $C_{18:1}$ 脂肪酸の混合物であることがわかったので、さらに MS によって分析を試みた。b 画分 (I) を過マンガン酸カリウムで酸化して得られたジヒドロキシ脂肪酸 (II) を、メチルスルフィニルカルバニオンおよびヨウ化メチルと反応させてジメトキシ脂肪酸メチルエステル (III) とした。I, II, III の TLC を Fig.-12 に示した。III にはいくつかの副生物と思われるスポットが認められ、これは GLC で主生成物と分離できた。III を GLC にかけた結果を Fig.-13 に示した。主ピークのほかに $M^+ 294$ と微量の未同定ビ

Fig.-13 GLC of the dimethoxy derivative of fraction b.

Fig.-14 MS of dimethoxy derivative of the fraction b introduced from GLC.

ークが認められるが、これは III の合成時の副生物と思われる。主ピークを MS に導入して得られたスペクトルを Fig.-14 に示した。ジメトキシオクタデカン酸メチルエステルの二つのメトキシ基の間で、次の図のように開裂が起これると、 Δ^9 の誘導体では $a+b$ は 157+201、 Δ^{10} では 143+215、 Δ^{11} では 129+229 となるが、

Table-1 Effect of thymic extracts and C_{18} fatty acids on the survival of mice implanted Ehrlich ascites cells.

Sample	Dose mg/day	Number of survivors/ total number			
		++	+	±	-*
Thymic extract (CE)	5.0	5/5	0	0	0
	2.5	2/5	2/5	1/5	0
Thymic extract (PE)	5.0	5/5	0	0	0
	2.5	3/5	1/5	1/5	0
	1.25	0	3/5	1/5	1/5
Thymic extract (Fraction b)	2.0	4/5	1/5	0	0
Stearic acid	5.0	1/5	0	0	4/5
	2.5	0	0	0	5/5
Oleic acid	5.0	1/5	0	0	4/5
	2.5	1/5	0	0	4/5
Linolic acid	5.0	0	3/5	2/5	0
	2.5	1/5	0	3/5	1/5
Elaidic acid	2.5	0	0	2/5	3/5

* Survival time : ++ >30 days + 20~30 days
± 15~20 days - 15<days

これらの対ピークは、**Fig.-14** の質量スペクトル中に確認された。純粋な各脂肪酸誘導体の質量スペクトルと比較してピークの帰属を行っていないので、さらに詳細に検討する必要があるが、 d^7 , d^8 , d^{12} , d^{13} に相当する対ピークは見いだされなかった。

3.7 抗腫瘍活性の比較

各種の分析によって、マウス Ehrlich 腹水腫瘍を抑制する子牛胸腺の抽出物は、主成分がオレイン酸を主とするオクタデセン酸の混合物であることがわかったので、胸腺抽出物とオレイン酸、および数種の C_{18} 脂肪酸との活性の比較を試みた結果を **Table-1** に示した。表から明らかなように、子牛胸腺からの抽出物は、オレイン酸に比べて強い活性を示した。

4 考 察

子牛胸腺から得られた脂肪酸を、そのカリウム塩、リチウム塩の有機溶媒に対する溶解度を利用して分別し、水銀付加物のシリカゲルクロマトによって精製して高純度のオクタデセン酸を得た。この精製物はマウス Ehrlich 腹水腫瘍に対して、かなり強い効果を示した。精製物を酸分解して GLC で分析した結果、 d^9 -オクタデセン酸（オレイン酸）83%、 d^{10} -オクタデセン酸 4%、 d^{11} -オクタデセン酸 13% から成る混合物であることがわかり IR および TLC により直鎖の *cis* 型脂肪酸であろうと推定され、さらに二重結合位置にメトキシ基を導入して MS により分析し、3 種異性体の混合物であることを裏付けることができた。脂肪酸の二重結合位置の決定に MS を利用する方法は、Niehaus ら⁷⁾、Capella ら¹²⁾によって報告されており、その有用性が示されているが、本実験によって、脂肪酸の混合物のままでも定性的に二重結合位置を確認できることがわかり GLC にゴーレイカラムなどを用いることにより、さらに微量の脂肪酸についても適用できる可能性があると考えられる。脂肪酸に抗腫瘍作用のあることは以前から知られている³⁾が、数種の C_{18} 脂肪酸の活性と比較することにより、胸腺抽出物は明らかにオレイン酸と異なった強い活

性を示した。Demeyer ら¹³⁾は、C₁₈ 不飽和脂肪酸が *in vitro* で、rumen バクテリアのメタン生成を抑制することを報告しているが、各種異性体によって活性が異なり、C_{18:1} 脂肪酸では活性の強さが *cis*-*d*⁶ > *cis*-*d*⁹ > *trans*-*d*⁹であることを示し、脂肪酸の持つ生理活性は二重結合位置によって異なることのあることが示唆されている。われわれの得た抽出物については、オレイン酸の持つ抗腫瘍作用の弱いことから、その活性は *cis*-*d*¹¹-オクタデセン酸か *d*¹¹-オクタデセン酸によるものであろうと推察される。これらの脂肪酸の臓器存在特異性については、子牛肝臓およびヒ臓から **Fig. 2** の方法で得た抽出物にいくらか活性が認められた。したがって *cis*-*d*¹⁰-あるいは *d*¹¹-オクタデセン酸は胸腺特異の物質ではないと考えられるが、さらに肝臓、ヒ臓中の含量について検討の必要がある。

本報の一部は第 89 回、第 90 回日本薬学会（1969 年 4 月、1970 年 7 月、名古屋、札幌）にて報告した。本実験に際し御指導いただいた東大・山本正教授ならびに御鞭撻いただいた帝国臓器・安藤、宮田両部門長、和田、鈴木、松島、沢井各部長、実験に御協力いただいた漆戸、高橋、常田、川辺 各氏に感謝いたします。

(昭和47年7月27日受理)

文 献

- 1) I. Potop *et al.*, *Acta. Biol. et Med. Ger.*, **5**, 205 (1960); *idem.*, *Comun. Acad. Rep. Populare Romine*, **13**, 915 (1965); *idem.*, *Neoplasma*, **17**, 655 (1970)
- 2) 特許公報 昭43-17725; 昭 46-21907
- 3) P.G. Scholefield, *Cancer Res.*, **18**, 1027 (1958); S. Tolnai *et al.*, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 713 (1961); *ibid.*, **40**, 1367 (1962)
- 4) D. Abramson *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 117, (1965)
- 5) H.K. Mangold *et al.*, *Chem. & Ind.*, **1962**, 1032
- 6) D.K. Bloomfield *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 337 (1960); G. Scheurbrand *et al.*, *ibid.*, **237**, 2064 (1962)
- 7) W.G. Niehaus *et al.*, *Anal. Chem.*, **40**, 1840 (1968)
- 8) S. Hakomori, *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205 (1964)
- 9) K.Wiberg *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 2822 (1957)
- 10) H.P. Kawfmann *et al.*, *Fett-Seifen Anstrichmittel*, **61**, 631 (1959)
- 11) N.A. Khan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 247 (1953)
- 12) P. Capella *et al.*, *Anal. Chem.*, **40**, 1458 (1968)
- 13) D.I. Demeyer *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 484 (1967)