KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 10, *No.* 1 (1978)

*Penicillium islandicum*에 의한 黃變米毒 Luteoskyrin의 生成

金 容 華 · 李 瑞 來
韓國原子力研究所 環境化學研究室
(1977년 11월 17일 수리)

Formation of Luteoskyrin by *Penicillium islandicum*

Yong-Hwa Kim and Su-Rae Lee
Environmental Chemistry Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul
(Received November 17, 1977)

Abstract

One of yellowed rice toxins, luteoskyrin, was investigated with respect to its identification, quantitation and producibility by *Penicillium islandicum* isolated from deteriorated rice.

1) Luteoskyrin was best resolved by thin-layer chromatography with silica gel G plate impregnated with 0.5 N oxalic acid and acetone : n-hexane : water (6 : 3 : 1.5, upper layer) solvent system. The isolated yellow spot showed maximum absorption bands at 426 and 448 nm and changed to purple color upon exposure to sunlight for 2~3 hours.
2) Detection limit for luteoskyrin was 4 ppm in elution-colorimetry and 0.1 ppm in densitometry after TLC. Assuming that the tolerance for luteoskyrin in rice is set below 3.68 ppm, densitometry is usable for its screening in grain samples
3) Producibility of luteoskyrin by *Pen. islandicum* was shown to be 11 mg/g mycelial mat in liquid culture and 40 mg/g autoclaved rice.

서 론

食糧이나 飼料로 이용되는 곡류에 곰팡이가 오염되면 변질에 따른 경제적 손실을 가져오는 동시에 mycotoxin이 생성되면 국민보건 및 가축위생상의 문제가 될 수 있다. 곰팡이독소인 mycotoxin에 관한 연구는 크게 세가지로 볼 수 있는 바, *Fusarium*屬에 의한 fusarinogenin, *Penicillium*屬에 의한 黃變米毒 그리고 *Aspergillus flavus*에 의한 aflatoxin이 있다.

黃變米毒은 일본에서 1940년대에 문제되었는데, 1944년 Gilolo island의 주둔병력이 輸入米에 의하여 anasarica 증세를 보였고 그 원인은 오염된 *Pen. islandicum*에 의함이 밝혀졌다.[1] 또 1954년까지 일본으로의 輸入米중 10만톤에 달하는 양이 곰팡이 오염을 이유로 食糧으로의 使用不可처분이 내려짐으로서 경제적 문제가 제기된 바 있고, 이를 계기로 황변미독에 관한 집중적인 연구가 착수되었다.[2] 또한 1963년 일본 長野縣에서 병아리 2,891首가 폐사한 사건의 원인도 오염된 *Pen. islandicum*의 毒成分에 의한 것으로 추정된 바 있다. 이러한 일련의 黃變米사건과 관련하여 우리나라에서는 1960년 일본으로 3만톤의 쌀을 수출시 황변미독을 생성하는 곰팡이가 오염되지 않았다는 보증을 요구하여 정부의 관심사가 된 적이 있다.[3]

*Pen. islandicum*이 생성하는 黃變米毒에는 含鹽素 環狀 peptide인 親水性의 islanditoxin과(Marumo, 1959)[4], anthraquinone系인 親油性의 luteoskyrin이 있다. (Uraguchi, 1961 ; Shibata, 1968).[5,6] Uraguchi등[5]은 이들 독소의 mice에 대한 급성독성(LD_{50}) 시험 결과, islanditoxin은 0.3 mg/kg (iv), 0.47 mg/kg (sc), 6.5 mg/kg

(oral), luteoskyrin은 6.6 mg/kg (iv), 147 mg/kg (sc), 221 mg/kg (oral)로 밝힌 바 있고 조직병리학적 검사에서 肝의 necrosis가 나타남을 밝혔다. 또한 만성독성 시험에서[7] 주요장해 器官은 肝이며 최저 투여량인 50 μg /day(luteoskyrin), 40 μg/day (cyclochlorotine : islanditoxin과 유사하나 구조가 약간 다름)에서 모두 良性 및 惡性腫瘍을 유발함을 밝혔으나 최대무작용량에 관한 자료는 얻지 못했다.

黃變米毒에 관한 생화학적인 연구로서 luteoskyrin은 mitochondria에 영향을 주는 것으로 알려졌고[8], 산화적 인산화작용의 uncoupler로서 작용함을 밝혔다[9]. DNA 및 DNA histone과 결합하며[10], Ehrlich ascites tumor에서 RNA합성저해를 밝힌 바도 있다[11]. 또 암세포인 Chang's liver cell 및 HeLa cell에 독성을 나타내었다는 보고도 있다.[12] Islanditoxin은 *in vivo*에서 glycogen 분해를 촉진하며 glycogen생성을 저해하는 것으로 알려져 있다.[13] 이들에 대한 미생물학적인 연구로서는 Kurata등[14]이 1965년도 일본산 백미에 대한 곰팡이 분포조사에서 219시료중 1점에서 *Pen. islandicum*을 발견한 바 있고, Miyaki등[15]은 2개 현의 현미 258시료, 백미 376시료 중 6개의 현미시료, 15개의 백미시료에서 *Pen. islandicum*을 분리하고, 이에 대한 급성독성 및 조직병리학적인 결과를 보고하였다.[16,17] Ueno등[18]은 배양조건에 따른 luteoskyrin을 포함한 quinoid색소의 생성능을 검토한 바 있다. 우리나라에서는 曺등[19,20]이 국내산 및 수입된 쌀 중 變質米시료 89점 중 6점에서 *Pen. islandicum*을 분리, 동정하였으며 비록 그 출현빈도는 낮으나 생육밀도로 볼 때 다른 독소 생성균과는 달리 생육조건 여하에 따라 문제가 될 수 있음을 示唆하였다. 한편 鄭·金[21]은 *Pen. islandicum*을 접종한 쌀이 흰쥐의 營養生理에 미치는 영향을 시험한 결과 그 毒性을 示顯하지 못하였다.

현재까지의 연구를 개괄하면 黃變米毒에 관한 毒性學的, 生化學的 및 菌學的인 기초연구가 진행되고 있으며, 실제 식품에서의 황변미독 존재與否에 관해서는 별로 연구되지 못하고 있다. 따라서 곡류의 저장에 따른 곰팡이의 오염과 mycotoxin생성과의 상관관계와 아울러 毒性學的 평가에 의한 食品의 安全性 확보라는 見地에서의 연구가 요청되고 있다.

그러므로 본 연구는 곡류에서의 黃變米毒 존재 가능성을 추구하기 위한 첫 단계로서 luteoskyrin의 分離, 定量法을 검토하였고, 국내 변질미에서 분리한 *Pen. islandicum*을 쌀에 接種時 luteoskyrin의 生成과정을 추구하였으며, 이 때 생성된 luteoskyrin量이 갖는 毒性學的 意義에 관하여 考察하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 미생물균주 및 시약

본 실험에 사용한 곰팡이는 曺등[19,20]이 국내의 변질미에서 분리 동정한 *Pen. islandicum*으로서 PDA배지에서 繼代, 保存하였다. Luteoskyrin 표준품은 Yoshio Ueno 박사로부터 분양받은 것이고 사용한 용매는 Merck제 E.P. 및 G.R.급 시약이었다.

2. 미생물의 接種 및 培養방법[18,22]

균주는 Czapek agar 사면배지에 27°C, 7일간씩 3회 연속 繼代하여 활성화시킨 것을 사용하였다. 이들을 접종하기 위해서는 상기 사면 배양물에 살균수 5 ml를 넣어 "Super mixer"(Curtin Scientific Co.)로 1분간 격렬히 진탕하여 胞子를 분산시킨 것을 가아제로 여과한 후 다시 5 ml의 살균수로 분산시킨 것을 여과하여 균일한 胞子 현탁액을 얻었다.

고체배양에서는 50 g의 백미(품종: 아끼바레)를 300 ml 삼각 후라스크에 취한 후 증류수를 20 ml씩 가하고 가끔 흔들어 주면서 두시간 경과후 15 psi에서 15분간 가압 살균하였다. 여기에 胞子현탁액 0.5 ml(2.4~3.6×10^6 포자)를 접종하고 27°C에서 靜置배양하면서 3일 간격으로 2개씩의 삼각 후라스크를 취하여 대형 페트리 접시에 고르게 편 후 60°C에서 24시간 건조시킨 反復시료에 대하여 供試하였다. 배양 도중에는 3일에 1회씩 2 ml의 멸균수를 무균적으로 撒水하고 가볍게 흔들어 주었다. 액체 배양에서는 50 ml의 Czapek 액체배지에 14일간 배양 후 4겹가제로 여과한 균사체를 얻어서 상기와 같은 방법으로 건조 후 供試하였다.

3. Luteoskyrin의 抽出 및 分析

Ueno등[18]의 방법에 Uraguchi등[5], Ogihara등[23]의 방법을 보완하여 luteoskyrin을 抽出, 分析하였다. 즉 건조된 시료를 막자사발에서 30 mesh이하로 마쇄한 후 고체배양의 경우는 1~20 g을, 액체배양의 경우는 0.1 g 정도를 취하여 aluminum foil로 싸서 빛을 차단시킨 Soxhlet 추출장치에서 n-hexane으로 18시간 지방분을 추출, 제거한 후 殘渣를 추출액의 황색이 보이지 않을 때까지(약 24시간) acetone으로 추출하였다. Acetone 추출액을 70°C의 水浴상에서 건고한 후 일정량(0.3-4 ml)의 acetone에 녹인 것을 ice bath에 보존하였다. 이 용액 일정량(최대 20 μl)을 0.5 N oxalic acid로 impregnation시킨 silica gel G TLC plate(0.25 mm)에 點滴한 후 acetone : n-hexane : water(6:3:1.5, upper layer)로 10 cm정도 전개시켰다. 전개된 thin-layer chromatogram

은 그대로 densitometer(Toyo製 Densitorol DMU-33C型, wavelength:440 nm)에 의하여 densitogram을 얻었으며 peak area를 측정한 후 luteoskyrin 표준품으로부터 같은 조작에 의하여 작성한 표준곡선에서 luteoskyrin의 농도를 계산하였다. 다른 한편 thin-layer chromatogram중 luteoskyrin 표준품과 Rf치가 일치하는 spot를 긁어내어 glass filter(Corning glass No. 36060, pore size. ASTM 4~4.5 μ)상에서, 吸入하면서 1 ml씩의 acetone으로 3회 색소를 溶出시켜 눈금이 새겨진 시험관에 받아 4 ml로 定容한 것을 Beckman DU-2 spectrophotometer에 의하여 448 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 luteoskyrin 표준품 2.0 mg을 20 ml에 녹여 순차적으로 2배씩 희석한 것을 같은 조작을 거쳐 작성하였으며 흡광도 측정시의 blank는 전개 안된 부분의 silica gel을 긁어 acetone에 녹인 여액을 사용하였다.

색소물질의 흡수 스펙트럼을 얻기 위해서는 Varian recording spectrophotometer(Cary-17 model)를 사용하여 400 nm에서 600 nm까지 scanning하였다.

결과 및 고찰

1. Luteoskyrin의 同定

곰팡이 培養物 중 luteoskyrin을 분리, 同定하는데 세가지 방법을 사용하였다. 첫째는 TLC에서의 Rf값을 표준품과 비교하는 것으로서 Ogihara등[23]이 제시한 0.5 N oxalic acid를 impregnation시킨 silica gel G plate에서 여러가지 溶媒系를 시도하였다. 즉 acetone : n-hexane : methanol(6:3:3), acetone : n-hexane : water (6:3:1.5, upper layer), benzene : n-hexane(1:1), benzene : acetone(20:1), benzene : acetone(4:1)등을 시도하였으나 acetone : n-hexane : water系의 分離能이 가장 좋았으며 각 용매의 배합비율을 달리하여(5:5:0), (6:3:0), (8:2:1), (6:3:1.5, upper layer), (5:2.5:0.5, upper layer)등을 시도하였으나 역시 Ueno등[18]이 제시한 용매계인 acetone : n-hexane : water(6:3:1.5, upper layer)가 가장 우수함을 재확인하였다. 따라서 선정된 전개용매로 곰팡이 배양물에서의 추출물을 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. 이에서 Rf값 0.4~0.5에 해당하는 부분에 뚜렷한 황색을 보이는 성분은 luteoskyrin 표준품과 일치함을 확인할 수 있었다.

둘째는 전개된 chromatogram을 태양광선에 노출시켰을 때의 變色과정으로서 luteoskyrin은 다른 주위의 색소들과는 달리 2~3시간 이내에 황색에서 자주색으로 변해가는 것을 관찰할 수 있었고 이 자주색 물질을 溶出후 re-chromatography한 결과 Rf값 0.1을 나타내었다.

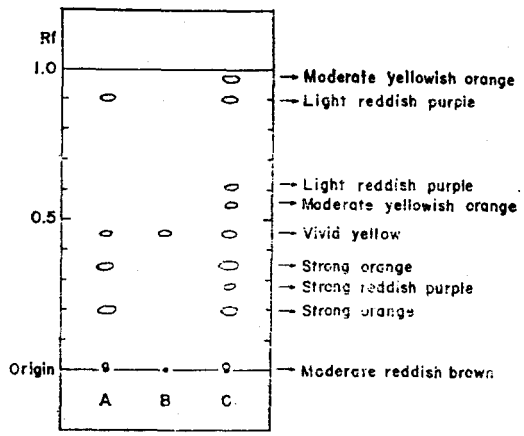

Fig. 1. Thin-layer chromatogram of pigments produced by *Pen. islandicum*
Plate:silicagel G impregenated with 0.5 N oxalic acid
Solvent : acetone : n-hexane : water (6:3:1.5, upper layer)
Sample: A, pigments from Czapek liquid culture
B, authentic luteoskyrin
C, pigments from inoculated autoclaved rice
Color expression : according to the Munsell Book of Color

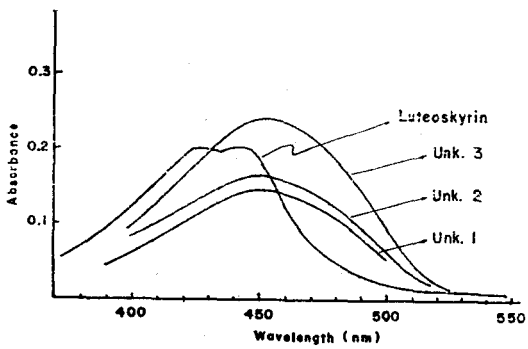

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectra of some pigments produced by *Pen. islandicum*

이는 luteoskyrin의 acetone용액이 수시간 내에 光化學的으로 자주색으로 변한다는 Uraguchi등[5]의 관찰(Tatsuno는 이 물질을 irradiated luteoskyrin이라 命名한 바 있음)과 相通되는 바 본 실험에서 관찰된 자주색 물질이 Uraguchi등이 관찰한 것과 同一物인지는 확인되지 않았다. 그러나 이러한 현상은 TLC plate를 直射光線에 노출시키므로서 luteoskyrin을 확인하는 매우 간단하고 有用한 방법이라 생각된다.

셋째는 TLC plate에서 luteoskyrin spot를 acetone으로 溶出후 spectrophotometer로서 최대 吸收帶를 관찰하는 방법이다. 그 결과를 보면 Fig. 2와 같이 육안으

로는 TLC plate상에서 서로 유사한 황색을 띠우는 luteoskyrin 주위의 색소들이 450 nm에서 단일 peak를 갖는데 반하여 luteoskyrin은 426 nm 및 448 nm에서 吸光度가 비슷한 두개의 peak를 나타내었다. 이는 Ueno[24]가 마우스의 肝추출액 중 luteoskyrin을 동정하는데 사용한 有用한 방법이다.

이상과 같은 세가지 방법으로 액체 또는 고체 배양물 중 luteoskyrin의 존재를 확인하였다.

2. Luteoskyrin의 定量

TLC후 溶出比色法에 의한 정량을 위하여 luteoskyrin 표준품으로 만든 표준곡선은 Fig. 3과 같이 luteoskyrin의 농도 2~20 μg/ml까지 비례관계가 성립되었다.

곡류중 luteoskyrin의 最低檢出限界値를 계산해 보면 곡류 시료 20 g에서 추출액의 최종 용량을 0.1 ml로 만들고 TLC에 10 μl 點滴, 溶出후 4 ml의 absorption cell에서 0.1의 吸光度를 읽을 때 4 ppm 정도가 된다.

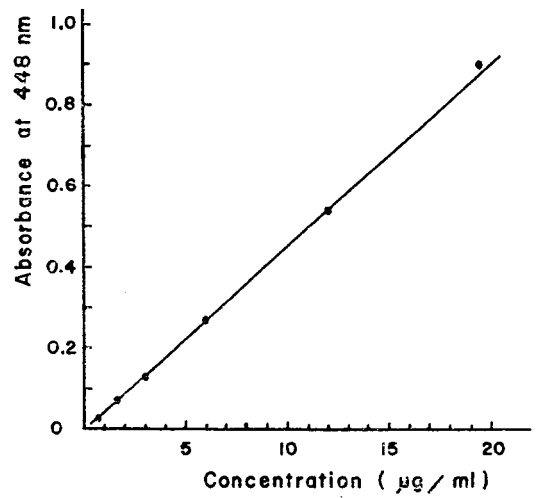

Fig. 3. Standard curve for luteoskyrin by colorimetry

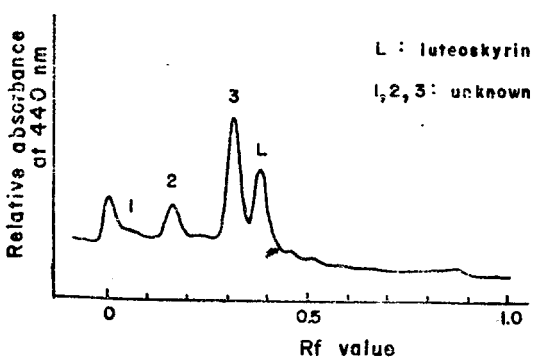

Fig. 4. Densitogram of thin-layer chromatogram for pigments produced by *Pen. islandicum*

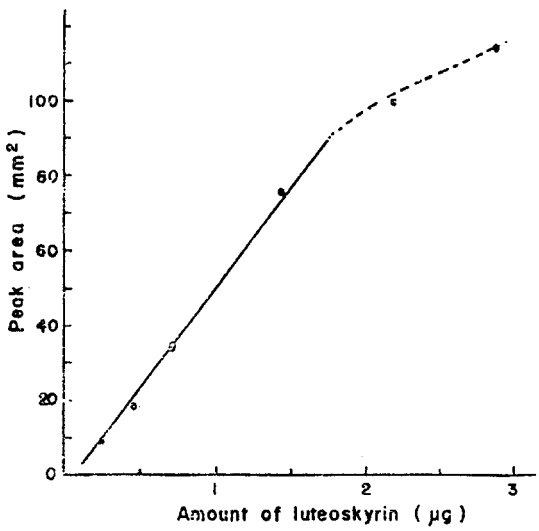

Fig. 5. Standard curve for luteoskyrin by densitometry of thin-layer chromatogram

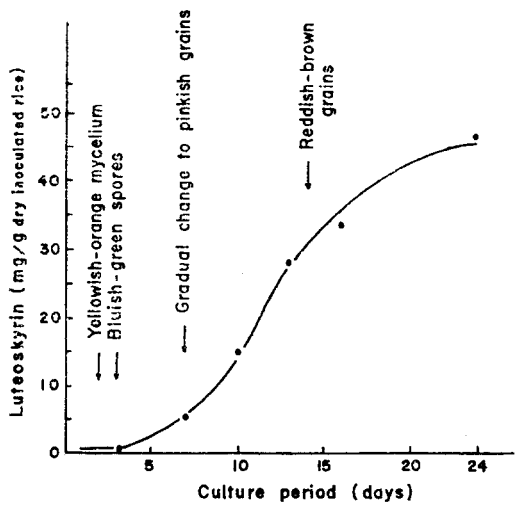

Fig. 6. Time course of luteosykrin production and color change in cooked rice inoculated with *Pen. islandicum*

곡류중 미량의 luteoskyrin을 검출하기 위해서는 좀 더 感度가 좋은 방법이 필요하게 되는데, 溶出比色法에 있어서는 cell 용량의 한정과 조작상의 불편이 있으므로 TLC plate자체를 scanning하여 정량하는 densitometry를 시도하였다.

Thin-layer chromatogram을 그대로 densitometer에 의하여 얻은 densitogram은 Fig. 4와 같으며 여기에서 작성한 표준곡선은 Fig. 5와 같다. 溶出比色法과는 달리 검출농도가 매우 낮으며 peak area의 계산 또는 肉

眼的 관찰을 위한 최저농도를 0.2 μg으로 볼 때 곡류시료에 대한 最低檢出限界値는 0.1 ppm이 된다.

3. 人工接種米에서의 luteoskyrin 生成

쌀을 가압살균한 후 *Pen. islandium*의 胞子를 人工接種하고 27°C에서 배양중 미생물의 발육상태와 luteoskyrin의 生成量을 추적한 결과는 Fig. 6과 같다. 즉, 배양후 3일째부터 luteoskyrin이 생성되기 시작하여 15일후에는 1 g 시료당 40 mg이 생성되었다. 이를 Czapek 액체배지의 경우 균사체 1 g 당 (230 mg mycelium/50 ml liquid medium) 11 mg의 luteoskyrin이 생성된 것과 비교하여 볼 때 액체배지 보다는 고체배지인 쌀에서 luteoskyrin이 훨씬 많이 생성됨을 알 수 있었다.

4. Luteoskyrin의 許容量과 檢出方法

*Pen. islandicum*이 생성하는 黃變米毒 luteoskyrin과 islanditoxin의 毒性을 비교하여보면 經口急性毒性(LD_{50})으로서 luteoskyrin은 221 mg/kg, islanditoxin은 6.5 mg/kg이므로 islanditoxin이 luteoskyrin보다 34배나 有毒하다. 한편 동일 배지에서의 두 독소의 생성량을 보면, Ueno등[18]과 Ishikawa등[25]이 培地 1 L에서 islanditoxin은 0.001 g, luteoskyrin은 0.75 g을 분리하였으므로 luteoskyrin이 약 750배의 생성능을 보여주었다. 또한 두 독소의 생성비에 대하여 Tsukioka[26]는 1 : 100~300, Uraguchi등[5]은 1 : 1000이라고 하였다. 이와 같은 相異한 결과는 정량상의 오차 및 菌株의 차이에 의하는 것으로 생각되지만 대체적으로 보아 luteoskyrin은 islanditoxin보다 200~1000배 더 생성되는 것으로 간주된다. 여기에 두 독소의 毒性値를 감안한다면, 실제 곡류시료에서의 危險性은 luteoskyrin이 islanditoxin보다 5~30배 더 클 것으로 추정된다.

이와 같이 luteoskyrin을 비롯한 mycotoxin의 독성 評價에 있어서 유독성분 자체의 독성 뿐만 아니라, 배지(食品)에서의 생성능을 시로 비교하는 일은 食品毒性學的인 견지에서 매우 有用한 방법이라 생각된다.

Uraguchi등[7]의 마우스를 사용한 장기독성실험에 의하면 luteoskyrin은 50 μg/day에서 肝腫瘍을 유발하였는 바 이 양은 등 실험에서의 최소량이었으므로 최대무작용량은 50 μg/day 이하로 생각된다.

여기에 安全係數 100, 실험동물체중 17g과 사람체중 50 kg을 감안하여 인체허용 1일 섭취량을 계산하면 1.47 mg/day/person 이하가 된다. 또한 미곡 1인 1일 섭취량을 0.4 kg으로 간주하면 미곡 중 luteoskyrin의 허용량은 3.68 ppm이하로 설정되어야 할 것이다.

이를 본 연구에서의 정량범위와 비교하여 보면 검출한계 4 ppm인 溶出比色法에 의해서는 허용량 수준을 검출하기 어려우며, 검출한계 0.1 ppm인 densitometry에 의해서만 검출이 가능할 것이다. 이러한 luteoskyrin의 許容量 水準은 곡류의 곰팡이 오염상태를 육안으로 인정할 수 있기 이전에 발생할 것으로 추정된다.

따라서 자연상태의 곡류저장중 곰팡이 오염에 따른 luteoskyrin의 생성과정 추구와 아울러 미곡에서의 전국적인 오염상태를 檢索할 필요가 있다고 생각된다. 그리하여 mycotoxin이 食糧의 保存 및 安全性에 미치는 영향이 점차적으로 규명되어갈 것이다.

요 약

黃變米毒의 일종인 luteoskyrin의 同定 및 定量法을 검토한 후 변질미에서 분리된 *Pen. islandicum*의 luteoskyrin 生成能을 추구한 결과는 다음과 같다.

1) Luteoskyrin은 0.5 N oxalic acid impregnated silica gel G plate로서 acetone : n-hexane : water(6:3:1.5, upper layer)를 전개용매로하는 TLC방법에서 分離가 가장 좋았다. 분리된 황색물질의 최대吸收波長은 426, 448 nm이었으며 chromatogram을 태양광선에 2~3시간 노출시 紫色으로 변하였다.

2) Luteoskyrin의 정량법으로서 TLC展開후 溶出比色法에서는 4 ppm, densitometry에서는 0.1 ppm이 檢出限界이었다. 미곡 중의 許容量을 3.68 ppm이하로 정설할 경우 곡류시료 중 luteoskyrin의 檢索에는 densitometry가 적합할 것이다.

3) *Pen. islandicum*에 의한 luteoskyrin 생성능은 Czapek 액체배지에서는 菌系體 1 g당 11 mg, 가압살균한 쌀에서는 1 g당 40 mg이었다.

본 실험에 사용한 luteoskyrin 표준품을 分讓하여 주신 日本 東京理科大學藥學部 微生物化學科 上野芳人 박사에게 謝意를 표한다.

참 고 문 헌

1) Morooka, N.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **12**, 459 (1971).
2) Uraguchi, K., Tatsuno, T., Tsukioka, M., Sakai, Y., Sakai, F. and Kobayashi, Y.: *Japan. J. Exp. Med.*, **31**, 1 (1961).
3) 曺惠鉉 : 常綠(서울大 農大), 9, 46 (1960).
4) Marumo, S.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 428 (1959).
5) Uraguchi, K., Tatsuno, T., Sakai, F., Tsukioka, M., Sakai, Y., Yonemitsu, O., Ito, H., Miyaka,

M., Saito, M., Enomoto, M., Shikata, T. and Ishiko, T.: *Japan. J. Exp. Med.*, **31**, 19 (1961).

6) Shibata, S., Ogihara, Y., Kobayashi, N., Seo, S. and Kitagawa, I.: *Tetrahedron Letters*, **27**, 3179 (1968).

7) Uraguchi, K., Saito, M., Noguchi, Y., Takahashi, K., Enomoto, M. and Tatsuno, T.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **10**, 193 (1972).

8) Ueno, I., Ueno, Y., Tatsuno, T. and Uraguchi, K.: *Japan. J. Exp. Med.*, **34**, 135 (1964).

9) Ueno, I.: *J. Japan. Biochem. Soc.*, **38**, 741 (1966).

10) Ueno, Y., Ueno, I. and Mizumoto, K.: *Japan. J. Exp. Med.*, **38**, 47 (1968).

11) Ueno, Y., Ueno, I., Ito, K. and Tatsuno, T.: *Experientia*, **23**, 1001 (1967).

12) Umeda, M., *Acta Pathol. Japan*, **14**, 373 (1964).

13) Ueno, Y., Kaneko, M., Tatsuno, T., Ueno, I. and Uraguchi, K.: *J. Japan. Biochem. Soc.*, **35**, 38 (1963).

14) Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaki, Y., Takada, M., Tazawa, M., Koizumi, A. and Tanabe, H.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **9**, 23 (1968).

15) Miyaki, K., Yamazaki, Y., Horie, Y. and Udagawa, S.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **11**, 373 (1970).

16) Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaki, Y., Tazawa, M., Tanaka, T. and Takada, M.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **9**, 379 (1968).

17) Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaki, Y., Tazawa, M., Tanabe, H. and Okudaira, M.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **9**, 385 (1968).

18) Ueno, Y. and Ishikawa, I.: *Appl. Microbiol.*, **18**, 406 (1969).

19) 曺惠鉉, 全在根, 金永培：한국농화학회지, **15**, 193 (1972).

20) 金永培, 曺惠鉉：한국농화학회지, **17**, 54 (1974).

21) 鄭鎭恩, 金淑喜：韓國營養學會誌, **6**, 275 (1973).

22) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D. and Sorenson, W. G.: *Appl. Microbiol.*, **14**, 425 (1966).

23) Ogihara, Y., Kobayashi, N. and Shibata, S.: *Tetrahedron Letters*, **15**, 1881 (1968).

24) Ueno, I.: *Japan. J. Pharmacol.*, **25**, 171 (1975).

25) Ishikawa, I., Ueno, Y. and Tsunoda, H.: *J. Biochem.* (*Tokyo*), **67**, 753 (1970).

26) Tsukioka, M.: *Folia Pharmacol. Japan*, **55**, 1367 (1959).