

## Capsaicin 0| 白鼠 肝의 Cytochrome P<sub>450</sub>에 미치는 影響

金明惠·金洛斗·李相燮

서울大學校 藥學大學

(Received May 19, 1979)

Myoung Hae Kim, Nak Doo Kim and Sang Sup Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Effects of Capsaicin on Liver Cytochrome P<sub>450</sub> in the Rat

**Abstract**— It was previously reported that cytochrome P<sub>450</sub> content in liver was increased when *Capsicum* acetone extract was given chronically to rats. The present study is aimed to investigate the effect of capsaicin, a principal component of red pepper, on the drug metabolizing enzymes in rat liver. Capsaicin (5mg/kg) was given intraperitoneally once a day for seven days and zoxazolamine paralysis time and hexobarbital sleeping time were determined 24 hrs after the last dose of capsaicin. Plasma hexobarbital concentration was also determined five and 15 min after hexobarbital administration to rats. Zoxazolamine paralysis time and hexobarbital sleeping time were shortened by 31.6% and 37.1%, respectively, compared with control group. Plasma hexobarbital concentration was lowered by 26.2% after five min and by 35.2% after 15 min, respectively, compared with control group. However, administration of single dose of capsaicin did not affect the zoxazolamine paralysis time and hexobarbital sleeping time. Microsomal cytochrome P<sub>450</sub> content and NADPH-cytochrome C reductase activity were increased by 14.6% and 11.6%, respectively in the rats pretreated with capsaicin for seven days, while cytochrome b<sub>5</sub> content was not changed. These results suggest that treatment with capsaicin for seven days may induce the drug metabolizing enzyme in rat liver.

苦椒가 肝의 藥物代謝 機能에 미치는 영향에 대해 鄭等<sup>1)</sup>이 苦椒 아세톤抽出物을 慢性 投與時 肝의 藥物代謝가 증가됨을 示唆한 바 있으며 그 후 孔等<sup>2)</sup>은 역시 苦椒 아세톤抽出物을 흰쥐에 慢性 투여한 경우 肝의 microsomal fraction의 cytochrome P<sub>450</sub> 함량이 증가함을 관찰한 바 있다.

이와같이 苦椒액기스가 肝의 藥物代謝酵素를 유도함으로 著者들은 苦椒액기스의 主成分인

capsaicin 을 만성적으로 투여한 후 zoxazolamine 麻痺時間, hexobarbital 睡眠時間 및 hexobarbital 血漿濃度를 對照群과 비교 측정하였고 이의 藥物代謝를 담당하는 肝의 藥物代謝 酵素중 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub> 및 NADPH cytochrome C reductase活性을 대조군과 비교함으로써 capsaicin 이 간의 약물대사 효소에 대하여 誘導效果가 있는지를 규명하고자 하였다.

### 實驗方法

**實驗材料** 1) capsaicin(Merck) : Kosuge 等이 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 混合物임을 보고한 바와 같이 Merck 製 capsaicin 을 methyl化 시켜 gas chromatography로 측정한 결과 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 약 1:1로 혼합되어 있었으며 이 capsaicin을 생리식염수로 제조한 0.5% CMC 용액에 혼탁시켜 사용하였다.

2) CO gas : 온도계, 적하여두, 안전관 및 가스도출관을 갖춘 丸底플라스크에 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 水溶上에서 60~70°C가 되도록 하여 적하여두로 부터 90% HCOOH를 소량씩 滴加하였다. CO가스가 발생되어 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 중으로 통과시켜 脱水시키고 공기의混入을 막기 위해 약 5分동안 가스를 날려 보냈다. 點火하면 담청색 불꽃을 내며 연소함을 보아 CO를 확인하였으며 가스捕集瓶에 물과 치환하여捕集하였다.捕集瓶을 hood 안에 설치된 수도꼭지와 연결시켜 매분 120ml의 일정량의 수도물을 유입시켜 이 압력으로 방출되는 CO 가스를 실험에 사용하였다.<sup>2,3)</sup>

3) 試藥 : bovine serum albumin(fr. V)(Nakarai Chemicals, Ltd.), 0.1M ammonium oxalate<sup>4)</sup>·(ammonium oxalate (Sarabhai M. Chemicals) 1.42g을 0.7% saline에 녹여 全量 100ml로 하여 사용하였다.

용액 1: NADPH (Sigma Chemical Company) 5.7mg, nicotinamide (和光純藥) 366mg을 0.05M phosphate buffer (10<sup>-3</sup>M EDTA, pH7.6)에 녹여 全量을 100ml로 하여 사용하였다.

용액 2: Cytochrome C (Sigma Chemical Company) 3.68mg을 증류수에 녹여 전량을 1ml로 하여 사용하였다).

4) 實驗動物 : 1) 마우스—동일 조건에서 飼育한 20g 内外의 건강한 雄性 마우스 (A strain)을 사용하였다. 2) 흰쥐—동일 조건에서 飼育한 100g 内外의 건강한 雌性 Sprague-Dawley系 흰쥐를 사용하였다. 3) 飼料—본 실험실에서 제조한 飼料를 사용하였으며 성분 및 함량(%)은 다음과 같다. (밀 46.2, 육수수 23.1, 콩 14.1, 멜치 8.3, 전지분유 4.2, 미강유 3.0, 원기소 0.4, 소금 0.4, 칼슘 0.1, 철분 0.1, 마그네슘 0.1)

**實驗方法** 1) Capsaicin의 LD<sub>50</sub> (i. p.) 측정 : 11마리의 마우스를 사용하여 等比의 容量 (10mg/kg, 20mg/kg, 40mg/kg)으로 나누고 12시간 絶食後에 capsaicin을 腹腔內에 투여하여 Up and Down method<sup>5)</sup>를 이용하여 LD<sub>50</sub>를 계산하였다.

2) capsaicin 투여가 zoxazolamine 麻痺時間에 미치는 效果 : Capsaicin 1回 投與效果—20g 内外의 마우스에 capsaicin 5mg/kg을 복강내 투여하고 대조군은 0.5% CMC 액을 투여하였다. (以下 對照群은 0.5% CMC 液을 투여함). 2時間後에 zoxazolamine 150mg/kg (0.5% CMC)<sup>6)</sup>液을 복강후 투여하여 麻痺時間을 대조군과 비교 측정하였다.

Capsaicin 7日 투여 효과—20g 内外의 마우스에 capsaicin 5mg/kg을 7日間 복강내 투여하여 마지막 投與後 24시간 후에 zoxazolamine 150mg/kg (0.5% CMC 液)을 투여하여 마비시간을

대조군과 비교 측정하였다.

3) Capsaicin 投與가 hexobarbital 수면시간에 미치는 효과 : 100g 内外의 건강한 雄性 흰쥐에 capsaicin 5mg/kg을 복강내 투여하여 capsaicin 1回 및 7日 투여 효과를 對照群과 비교 측정하였다.

4) Capsaicin 投與가 hexobarbital 血漿濃度에 미치는 效果 : 100g 内外의 흰쥐에 capsaicin 5mg/kg을 7日間投與하고 마지막 投與後 24時間 後에 hexobarbital sodium 80mg/kg을 복강내 투여하였다. Hexobarbital sodium 투여후 5分 및 15分후에 頭部에 타격을 가해 致死시킨 후 목을 切開하여 頸動脈에서 血液을 채취하여 Gold baum法<sup>7)</sup>에 의해 hexobarbital 血漿濃度를 대조군과 비교하였다(Fig. 1).

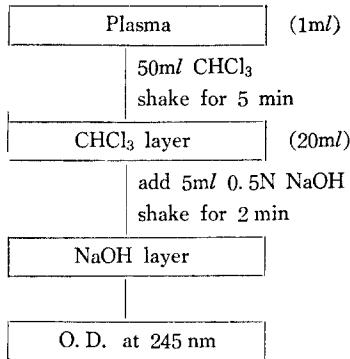


Fig. 1—Determination of plasma level of hexobarbital.

5) Capsaicin 투여가 肝 microsome 의 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub> 및 NADPH cytochrome C reductase에 미치는 효과 : Microsome 分割의 製造—100g 内外의 흰쥐에 capsaicin 5mg/kg을 7日間 투여하고 마지막 투여후 microsome 分割 分離를 쉽게하기 위해 24시간 絶食시킨 다음 頭部에 타격을 가해 致死시킨 후 목을 切開하여 피를 일부 제거한 다음 신속하게 開腹하여 1.15% KCl(0°C)로 肝을 관류하여 혈액을 제거한 후 肝을 적출하였다. 적출한 肝을 細切하고 肝重量의 4 vol. 的 0.25M sucrose 용액을 加하여 Potter type homogenizer를 사용

하여 25초간 2번 homogenize 시켰다. Homogenate를 2°C에서 12,000g로 15分間 원심분리 시키고 syringe로 상동액 (supernatant)을 취하고 지방층과 非分散結合組織잔해 (undispersed connective tissue residue)를 제거하기 위해 거즈 여과시켰다. 여과액 8ml를 취하여 2°C에서

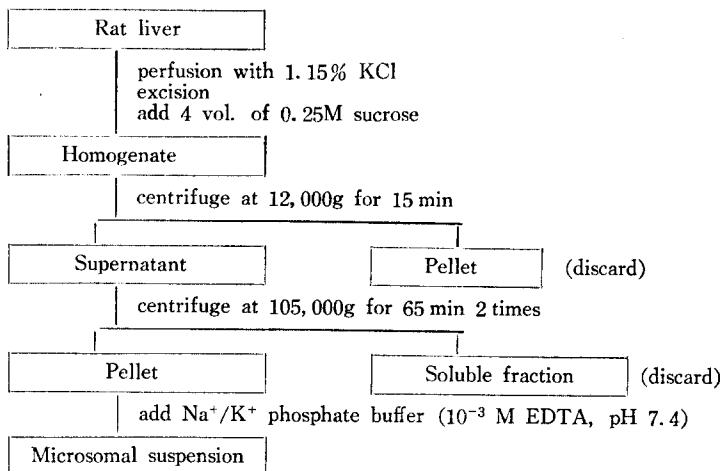


Fig. 2—Preparation of microsomal fraction.

105,000g로 65分間 원심 분리시켰다. 상등액은 버리고 pellet를 취하여 0.2M phosphate buffer ( $10^{-3}$ M EDTA, pH 7.4) 12ml를 가해 homogenize 시키고 이중 8ml를 취하여 다시 2°C에서 105,000g로 65分間 원심 분리시켜 상등액은 버리고 pellet(microsome)를 취하였다(Fig. 2).

Cytochrome P<sub>450</sub>: 위의 방법으로 얻은 microsomal pellet에 0.2M phosphate buffer( $10^{-3}$ M EDTA, pH 7.4) 20ml를 加하여 mirosomal suspension을 만들었다.

Stanton 等<sup>8)</sup>의 方法과 Takashi 等<sup>9)</sup>의 方法을 混用하여 microsomal suspension 10ml를 취해 CO gas를 1分間 bubbling 시킨후 3分後 sample cell에 환원제 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 少量 (30mg) 加하고 1分後에 400~500 nm에서 cytochrome P<sub>450</sub> · CO complex의 dithionite difference spectrum을 기록하였다(Fig. 3A). 450nm와 500nm의 吸光度 차이를 Takashi 等<sup>9)</sup>의 방법을 이용하여 molar extinction coefficient를  $104\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하여 cytochrome P<sub>450</sub>活性을 계산하였다.

cytochrome b<sub>5</sub>—Microsomal suspension에 환원제 dithionite를 少量(30mg) 가하고 1分後에 400~450nm에서 reduced와 oxidized cytochrome b<sub>5</sub>의 difference spectrum을 기록하였다. 426nm와 411nm의 흡광도 차이를 Rogers 等<sup>10)</sup>의 방법을 이용하여 molar extinction coefficient를  $119\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하여 cytochrome b<sub>5</sub>의活性을 계산하였다.

NADPH cytochrom C reductase—0.05M phosphate buffer ( $10^{-3}$ M EDTA)를 cytochrome C의活性이 가장 높은 pH 7.6으로 하여 NADPH cytochrome C reductase活性 측정의 suspension液(20ml)으로 사용하였다. incubation medium은 Table I과 같다. 溶液 1(NADPH 有)과 溶液 3(NADPH 無)을 각각 2 ml 취하여 25°C에서 8分間 incubation시키고 溶液 2를 0.5 ml加하였다. 이混合物을 다시 25°C에서 2分間 incubation시키고 0.5ml의 microsomal suspension을加하여 total volume을 3ml로 하고 재빨리 혼화시켜 각각 sample cell, reference cell로 하여 550 nm에서 吸光度의 변화를 측정하였다(Fig. 3).

Table I—Composition of incubation medium

	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Composition	NADPH 5.7mg KCN 9.75mg Nicotinamide 366mg	Cytochrome C 3.68mg	KCN 9.75mg Nicotinamide 366mg
Total volume	100 (0.05M phosphate buffer, $10^{-3}$ M EDTA, pH 7.6)	1 (water)	100 (0.05M phosphate buffer, $10^{-3}$ M EDTA, pH 7.6)

산화형 cytochrome C는 NADPH에 의해 환원형 cytochrome C로 되며 환원되는 반응율은 microsomal suspension의 NADPH cytochrome C reductase 量에 따른다. 반응률이 일정하게 될 때 1分間의 550nm에서의 吸光度의 차이를 Mazel<sup>11)</sup>의 방법을 이용하여 molar extinction coefficient를  $19.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하여 NADPH cytochrome C redutase 활성을 계산하였다.

Protein 定量 (Lowry 法)<sup>12)</sup>—Microsomal suspension 0.5ml를 취하여 4.5ml의 중류수를 가하여 회석하고 이중 1ml를 취하였다. 使用 直前에 alkali 성 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>액과 sodium potassium tartarate-CuSO<sub>4</sub>액을 容量比 50 : 1로 混合하여 5ml 취하여 1ml 회석액에 가하였다. 10分以上 방치후 Folin 시약 0.5ml를 가하여 발색시켜 30分後 750nm에서 吸光度를 측정하여 단백질을定量하였다. 試料(microsomal suspension)의 protein 함량은 1.1mg/ml이었다.

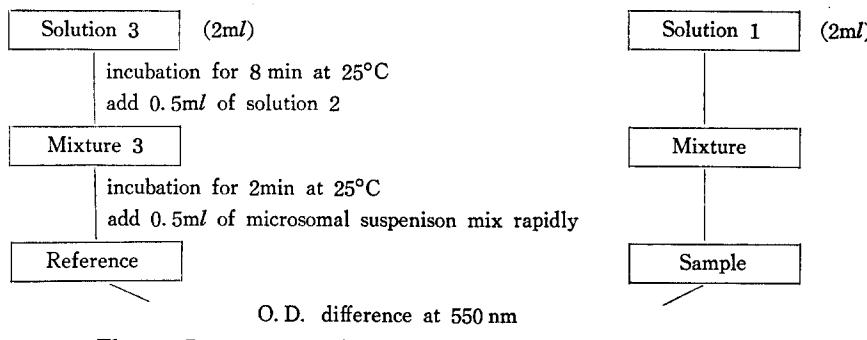


Fig. 3—Determination of activity of NADPH cytochrome C reductase.

### 實驗結果

**Capsaicin 의 LD<sub>50</sub> (i. p.)**—Capsaicin 을 마우스 腹腔內에 투여하여 Up and Down method 를 측정하여 LD<sub>50</sub>를 측정한 결과 18.63mg/kg 이었다.

**Capsaicin 投與가 zoxazolamine 瘫瘓時間과 hexobarbital 睡眠時間에 미치는 効果—1)** Capsaicin 1 回 投與効果 : Capsaicin을 복강내에 투여하여 2 時間後에 zoxazolamine 150 mg/kg 및 hexobarbital sod. 80mg/kg을 복강내 투여하여 zoxazolamine 마비시간과 hexobarbital 수면시간을 측정한 결과 capsaicin 투여군은 대조군에 비해 별차이가 없었다(Table II).

Table II—Effect of single dose administration of capsaicin on zoxazolamine paralysis time and hexobarbital sleeping time

	Control, hr	Treated, hr
Zoxazolamine paralysis time	50.9±4.5 <sup>a</sup> (16) <sup>b</sup>	42.3±3.7(18)
Hexobarbital Sleeping time	50±2.8 (8)	54.8±4.8 (8)

a: Mean±S. E. ; b: Parentheses indicate number of animals.

2) Capsaicin 7 日 投與効果 : Capsaicin을 7 日間 복강내에 투여한 후, 마지막 투여후 24 시 간후 zoxazolamine 150mg/kg 및 hexobarbital sod. 80mg/kg을 복강내 투여하여 zoxazolamine 마비시간과 hexobarbital 수면시간을 측정한 결과 zoxazolamine 마비시간은 對照群이 51.6分,

Table III—Effect of capsaicin on zoxazolamine paralysis time in the mouse and hexobarbital sleeping time (min) in the rat

	Control, min	Treated <sup>c</sup> , min
Zoxazolamine paralysis time	51.6±6.3 <sup>a</sup> (8) <sup>b</sup>	35.3±2.3*(11)
Hexobarbital sleeping time	36.7±3.8 (7)	23.1±1.9* (9)

a: Mean±S. E. ; b: Parentheses indicate number of animals. ; c: Capsaicin was administered intra-peritoneally for 7 days. \*: Statistically significant ( $p<0.05$ ).

capsaicin 투여군이 35.3 分으로 대조군에 비하여 31.6% 감소 하였으며 hexobarbital 수면시간 대조군이 36.7 分, capsaicin 투여군이 대조군이 23.1 分으로 대조군에 비하여 37.1% 감소하여有意性 있는 효과를 나타내었다(Table III).

**Capsaicin 投與가 hexobarbital 血漿濃度에 미치는 效果**—capsaicin을 7日間 腹腔內 투여하고 마지막 투여후 24시간후에 hexobarbital sod. 80mg/kg 을 복강내 투여한 후 5分 및 15分後에 hexobarbital 血漿濃度를 측정한 결과 5分後의 血漿濃度는 대조군이 70.6mg/l, capsaicin 투여군이 52.1mg/l로 대조군에 비해 26.2% 감소되었고 15分後의 血漿濃度는 대조군이 53.4mg/l, capsaicin 투여군이 34.6mg/l로 대조군에 비해 35.2% 감소되어 有意性 있는 효과를 나타내었다(Table IV).

Table IV—Effect of capsaicin on plasma levels of hexobarbital

		Control, mg/l	Treated <sup>c</sup> , mg/l
Plasma levels of Hexobarbital	5min	70.6±6.5 <sup>a</sup> (10) <sup>b</sup>	52.1±5.6*(10)
	15min	53.4±5.8 (4)	34.6±7.0* (4)

a: Mean±S.E.; b: Parentheses indicate number of animals; c: Capsaicin was administered intraperitoneally for 7 days to rats; \*: statistically significant ( $p<0.05$ )

**Capsaicin 投與가 肝 microsome의 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub> 및 NADPH cytochrome C reductase에 미치는 효과**—capsaicin을 7日間 복강내 투여하고 마지막 투여후 1日間 絶食시키고 肝에서 microsome을 분리하여 cytochrome P<sub>450</sub>, cytochrome b<sub>5</sub>, NADPH cytochrome C reductase 및 protein含量을 측정한 결과 protein과 cytochrome b<sub>5</sub>는 capsaicin 투여군이 대조군에 비해 별효과가 없었으나, cytochrome P<sub>450</sub>活性은 대조군이 20.0 nmole/g liver, capsaicin 투여군이 22.9 nmole/g liver로 대조군에 비해 14.6% 증가되었으며 NADPH cytochrome C reductase活性은 대조군이 1.81 μmole of cyt. C reduced/min/g liver, capsaicin 투여군이 2.02 μmole of cyt. C reduced/min/g liver로 대조군에 비해 11.6% 증가되어 각각 95%에 가까운 有意性을 나타내었다(Table V).

Table V—Effect of capsaicin on concentration of protein, cytochrome P<sub>450</sub>, b<sub>5</sub> and NADPH cytochrome C reductase

	Protein (mg/g liver)	Cytochrome P <sub>450</sub> (nmole/g liver)	Cytochrome b <sub>5</sub> (nmole/g liver)	NADPH cyt. C reductase (μmole of cyt. C reduced /min/g liver)
Control	12.51±0.56 <sup>a</sup> (20) <sup>b</sup>	20.01±1.05 (12)	12.98±1.17(7)	1.81±0.09 (8)
Treated <sup>c</sup>	12.60±0.55 (22)	22.93±1.05*(14)	12.74±1.18(7)	2.02±0.12*(8)
Differences (%)	—	+14.6	—	+11.6

a: Mean±S.E.; b: Parentheses indicate number of animals; c: Capsaicin was administered intraperitoneally for 7 days to rats; \*: Statistically significant ( $p=0.05$ ).

### 考 察

capsaicin 5mg/kg은 LD<sub>50</sub> (i. p.) 18.63mg/kg의 약 25%에 해당하는量이다. capsaicin을 7日間 投與時 zoxazolamine 마비시간, hexobarbital 수면시간이 대조군에 비하여 현저히 단축되었고 hexobarbital 血漿濃度 역시 대조군에 비하여 현저히 감소되었다. 그리고 이의 藥物代謝를 담당하는 肝 microsome의 cytochrome b<sub>5</sub>活性에는 별차이가 없었으나 cytochrome P<sub>450</sub>, NADPH cytochrome C reductase의活性이 대조군에 비하여 증가되었다.

그러나 鄭<sup>1)</sup> 및 孔等<sup>2)</sup>이 苦椒 아세톤抽出物의 1回 投與時 藥物代謝가 誘導되었음을 보고 한 바와는 다르게 capsaicin을 1회 투여시 zoxazolamine 마비시간, hexobarbital 수면시간에 별

효과가 없었으므로 苦椒 아세톤 抽出物중 capsaicin 외에도 다른 성분이 肝의 藥物代謝 酶素에 관여하지 않나 思料된다.

그리고 肝의 약물대사 효소중 cytochrome P<sub>450</sub> 活性 측정시 Omura 等<sup>13)</sup>의 방법을 이용한 孔等<sup>2)</sup>의 실험에서 5.0 nmole/g liver 보다 Stanton 等<sup>8)</sup>과 Takashi<sup>9)</sup>의 방법을混用한 실험에서 약 4 배 가량의 20.0 nmole/g liver로 많은量을 얻었다. 이것은 다음과 같은 이유로推定할 수 있다. Kato 等<sup>14)</sup>의 방법에서 보는 바와 같이 肝의 perfusion 液으로 NaCl 보다는 KCl 이 酶素活性을 높여 준다 하였고 超원심분리를 65分間 2번 하여 좀더 정제되었을 것이고 Takashi<sup>9)</sup>의 방법에서 보는 바와 같이 CO-difference spectrum 보다는 dithionite-difference spectrum에서 hemoglobin 등의 방해를 감소시킬 수 있다 하였다.

cytochrome P<sub>450</sub>活性測定의 molar extinction coefficient는 Omura<sup>13)</sup>의方法에 의한 CO-difference spectrum의 값인  $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 와는 다르게 dithionite-difference spectrum의 값인  $104\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로하여 계산하였다.

NADPH cytochrome C reductase活性測定時 pH 7.6을 택한 것은 Phillips 等의<sup>15)</sup> 보고에서 보는 바와 같이 이 조건에서 cytochrome C가 가장 강력히作用할 수 있기 때문이다. cytochrome P<sub>450</sub> 및 NADPH cytochrome C reductase活性이 증가한 것으로 보아 capsaicin을 7日間 투여시 肝의 藥物代謝酶素가 유도되는 것으로思料되나 capsaicin投與量에 비해 이들酶素가 현저히 증가하지 못하였고 cytochrome b<sub>5</sub>의活性에는 별 차이가 없었으므로 capsaicin 15日 투여, 30日 투여, 등 더長期間의 capsaicin 투여에서 肝藥物代謝酶素의 변화를 관찰해야 할 것으로推定된다.

### 結論

1) capsaicin의 LD<sub>50</sub>(i. p.)는 18.63mg/kg이었다. 2) capsaicin을 7日間 투여시 zoxazolamine 麻痺時間 및 hexobarbital 睡眠時間은 대조군에비하여 각각 31.6% 및 37.1% 단축되어有意性 있는 효과를 나타내었다. 3) capsaicin을 7日間投與時 hexobarbital投與後 5分 및 15分後의 hexobarbital 혈장농도는 capsaicin 투여군이 대조군에비해 각각 26.2% 및 35.2% 감소되어有意性 있는 효과를 나타내었다. 4) capsaicin을 7日間投與時 肝 microsome의 cytochrome P<sub>450</sub> 및 NADPH cytochrome C reductase活性은 capsaicin 투여군이 대조군에비해 각각 14.6% 11.6% 및 증가되었다.

이상의 결과로 보아 苦椒중의 主成分인 capsaicin을 7일간投與時 肝의 藥物代謝酶素가誘導되는 것으로思料된다.

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 威山社會福祉事業財團의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊히 감사하는 바이다.

### 文獻

- 鄭海仙, 서울대학교 碩士學位論文(1976).
- 孔沫玉, 金昌洙, 金洛斗, 趙允成, 生藥학회지, 10, 17(1978).
- S. Kosuge, Y. Inagaki and H. Okumura, *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 35, 923(1961).
- B. Lemuel, J. R. Wingard and G. Levy, *Pharmacol. Exp. Ther.*, 184, 253(1972).

5. 高木敬次郎, 藥物學實驗, 南山堂, 東京, 138(1960).
6. J. R. Fouts, *Methods in Pharmacology*, **1**, 287(1971).
7. L. Goldbaum, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **94**, 68(1948).
8. R. H. Stanton and M. A. Q. Khan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, 668(1966).
9. M. Takashi, K. Masahiro, T. Akira, T. Yoshihiro and S. Koichi, *Anal. Biochem.*, **75**, 596(1976).
10. M. J. Rogers and P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.*, **249**, 895(1974).
11. P. Mazel, Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition, ed. by La Du, B. N., Mandel, H. G., and E. L. Way(1972).
12. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
13. T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370(1964).
14. R. Kato, P. Vassanelli, G. Frontino and E. Chiesara, *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 1037(1964).
15. A. L. Philips and R. G. Langdon, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2652(1962).