Journal of the Korean Chemical Society
Vol. 35, No. 6, 1991
Printed in the Republic of Korea

N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea 유사체의 전기화학적 거동 및 N-aminourea의 합성

元美淑 · 金正均 · 沈允輔†
부산대학교 자연과학대학 화학과
(1991. 5. 28 접수)

Electrochemical Behaviors of N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea Analogous and Synthesis of N-aminourea

Mi Sook Won, Jack C. Kim, and Yoon Bo Shim†
Department of Chemistry, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Received May 28, 1991)

요 약. 수은 pool 전해조를 사용하여 (5 : 3) EtOH/4 N-HCl 용액계에서 선택적인 -N-N=O기의 전기화학적 환원에 의해 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea로부터 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-aminourea를 합성하였다. 전기화학적 환원에 앞서 반응의 최적조건을 검토하기 위하여 몇 가지 N′-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea 유사체에 대하여 pH변화에 따른 환원전위를 순환전압전류법으로 조사한 결과 pH에 따라 E_p값이 "−"쪽으로 이동하였으며 aryl기의 치환기 효과는 -N-N=O기의 환원 전위에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 용액계의 pH에 따른 반응성을 조사한 결과 강산성 용액(pH<1)에서 반응이 가장 잘 진행되며 −0.7 V *vs.* As/AgCl 4 N-HCl에서 N-N=O기의 선택적인 4전자 환원반응에 의해 N-NH_2가 생성됨을 확인하였다.

ABSTRACT. N′-phenyl-N-(2-chioroethyl)-N-aminourea has been prepared from N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea by means of the electrochemical reduction with the mercury pool electrolytic cell. In order to find out the optimum condition of the reaction, the voltammetric behaviors for N′-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea derivatives have been investigated by the cyclic voltammetry and polarography. The peak potentials was shifted to the negative direction as the pH value of the solution decrease. The substituent effects of phenyl ring on the peak potential were not observed in this case. (5:3) EtOH/4 N-HCl mixed solution was employed for the electrolysis. The applied potential was −0.7 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl electrode. The number of electrons participated to the reduction process was 4, respectively. The product was identified by FT-IR, NMR, mass and/or elemental analysis data.

서 론

1950년대 이후 지방족, 환지방족 및 방향족 N-nitrosamine 유사체에 관한 연구가 여러 방면에서 활발하게 진행되어 왔다. 예를들면 이들의 분석적 특성 뿐만 아니라 생화학적 특성, N-N=O기의 전기화학적 메카니즘 및 이러한 작용기의 환원성에 미치는 분자구조의 영향 등에 관하여 연구되어 왔다[1~6]. N-N=O기의 전기화학적 거동에 관한 연구에서 Lund[7]는 N-dinitrosopiperidine, N-nitrosomorphorine, N-nitroso-N-methylaniline 등에 대하여 여러가지 다른 pH조건하에서 얻은 폴라로그라피에 바탕을 두어 전기화학적 유기물의 합성을 행한 결과 산성용액에서는 4전자 환원반응이 진행되어 히드라진유사체가 생성되며 염기성 용액에서는 2전자 환원반응을 통하여 N_2O생성과 함께 2차 아민이 생성됨을 확인하였다. 또한 Holleck[8] 등은 10% EtOH/H_2O 용액에서 여러가지 지방족 N-nitrosoamine에 대한 전류-전압 곡선법을 실시하여 환원반응에 대한 메카니즘을 제

시하였다. 이러한 전기화학적 반응들은 화학적 제법보다 간편하고 인체에 해가 적은 동시에 부생성물이 적게 생기는 이점이 있으므로 nitroso기나 nitro기의 환원에 의한 amine기의 제법에 널리 이용되고 있다[9~12].

Magee와 Barnes[13]에 의하여 N-nitrosoamine 유사체가 강력한 발암물질로 알려지면서 생화학적 반응성이 활발히 연구되어져 왔으며 1963년 Mongomery[14] 등에 의하여 N-nitrosourea 유도체의 일부가 항암작용을 나타낸다는 사실이 발견된 후 새로운 항암제의 개발을 위하여 이 유사체들이 수없이 합성되었고 그 구조와 활성관계가 계속 연구되어져 왔다. 실제로 Mongomery 등이 초기연구에서 합성한 몇 가지 N-nitrosurea 유사체는 최근 항암제로서 암치료에 크게 기여하고 있다[15~18]. 이 화합물들은 혈관-뇌장벽을 통과할 수 있는 낮은 이온화도, 작은 분자크기, 그리고 강한 지질 용해도 등의 물리적 특성으로 뇌종양에 선택적인 효과가 있다고 보고되어 있다. 항암성에 필수적인 작용기는 methyl nitrosoureido기와 2-chloroethyl nitrosoureido기 임이 밝혀졌고 R-기는 운반기(carrier group)로 밝혀졌다[18].

본 실험실에서는 새로운 함암제의 개발을 위하여 Mongomery 등이 항암제로 개발한 N-nitrosourea 유사체와 비슷한 분자구조를 가진 N′-aryl-N-alkyl-N-nitrosurea 유사체들을 합성하였다.[19]

본 연구에서는 이러한 화합물들의 환원성을 조사하기 위하여 2-chloroethyl nitrosoureido기를 가진 몇 가지 화합물들에 대하여 폴라로그래피 및 순환전류-전압법으로 전기화학적 특성을 조사하였다. 그리고 이러한 결과를 바탕으로 분리형 수은 pool 전해조를 사용하여 대표적인 화합물로 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea를 택하여 전기화학적 환원반응을 행하여 N′-(2-chloroethyl)-N-aminourea를 합성하였다.

실 험

시약 및 기기. 2-chloroethyl isocyanate와 aniline은 Aldrich Chem. Co.제 특급시약을 사용하였으며 $NaNO_2$ 및 용매로 사용한 CH_2Cl_2, $CHCl_3$, EtOH 및 완충용액의 제조에 사용한 다른 시약들은 시약용 특급시약을 그대로 사용하였다. Mattson사의 Polaris FT-ir spectrometer로 IR 스펙트럼을 얻었으며 Bruker 300 MHz FT nmr spectrometer로 NMR 스펙트럼을 얻었다. 질량 스펙트럼은 Kratos 25-RSA mass spectrometer를 사용하여 얻었다. 폴라로그래피는 Yanaco P-8형 DC 폴라로그래프를 사용하였고 순환 전류-전압 곡선법 및 전기량 측정법은 EC & G사의 Model 273 Potentiostat/Galvanostat를 사용하였으며 전기적 환원시에는 분리형 수은 전극 전해조를 사용하였다.

실험방법. 1. N′-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea 유사체의 합성은 아닐린 유도체를 CH_2Cl_2 용액에 녹인 후 이를 얼음 수조상에서 교반시키면서 당량의 2-cloroethyl isocyanate를 천천히 적가하여 N′-aryl-N-(2-chloroethyl) urea 결정을 얻어낸 후 재결정하였으며 urea들을 HCOOH에 녹인 후 얼음 수조상에서 교반시키면서 $NaNO_2$를 소량씩 첨가하여 N′-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea들을 합성하였다[20].

2. 각 물질들의 폴라로그램 및 순환 전류-전압 곡선 측정시 Ag/AgCl/4 N-HCl을 기준전극으로, 백금선을 대극으로 사용하였으며 작업전극으로는 DME 및 유리탄소전극을 사용하였다. 4 N-HCl 및 Robinson-Britton 완충용액으로 용액의 액성을 조절하여 pH변화에 따른 각 물질들의 반응성을 조사하였다.

3. N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea의 전기화학적 환원시 0.3g의 화합물을 EtOH 100 ml에 녹이고 4 N-HCl 60 ml을 첨가하여 용액을 제조하였다. 이 용액을 실험실에서 제조한 분리형 수은 전극 전해조에 넣고 얼음 수조상에서 질소를 통기하면서 −0.7 volts *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl의 일정 전압하에서 전기화학적 환원을 행하였다. 전류값이 바탕값이 될 때까지 반응시킨 후 순환 전압-전류 곡선으로 NO기의 환원파가 사라진 것을 확인하여 반응을 멈추었다. 회전 진공 증발기를 이용하여 용매를 날려 보낸 후 TLC로 분리하여 생성물을 얻었다. 이때 사용한 용리액은(10 : 1) CH_2Cl_2/Ether을 사용하였으며 Rf치는 0.40이었다. 회수한 물질은 EtOH-H_2O 혼합 용매로 재결정하여 mp, IR, NMR, mass spectra 및 원소분석 결과로 구조를 확인하

였다.

결과 및 고찰

몇 가지 N'-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea 유사체를 합성하였으며 *Table* 1에 나타낸 바와 같이 mp, IR 및 NMR 스펙트라로 확인하였다.

N'-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea 유사체의 환원성을 조사하기 위하여 폴라로그라피 및 순환 전압 전류법을 이용하였다. N-nitrosourea들의 환원 반응에서 aryl기의 치환기가 반응성에 미치는 효과와 pH영향을 검토하기 위하여 N'-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea ; PCNU, N'-(3-methylphenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea ; 3-methyl PCNU, N'-(3-bromophenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea ; 3-bromo PCNU 및 N'-(4-methoxyphenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea ; 4-methoxy PCNU에 대하여 순환 전압-전류법을 행하여 *Table* 2에 나타내었다. *Table* 2에서와 같이 aryl기의 치환기 효과는 환원전위의 변화에 일정한 경향성을 나타내지 않았으며 이러한 현상은 환원이 일어나는 N-NO기와 aryl기의 치환기가 멀리 떨어져 있어서 직접적인 효과를 나타내지 않는 것으로 생각할 수 있다. pH 5 이하인 용액에서는 pH가 높아짐에 따라 각 물질에 대한 환원전위는 "−"쪽으로 직선적으로 이동하는 현상이 나타났으며 pH 6 이상이 되면 직선성에서 벗어나는 동시에 파의 높이가 줄어드는 경향이 나타났다. 용액의 액성이 산성이 강할수록 H^+ 이온의 제공이 용이해지므로 산성용액에서는 환원반응이 쉽게 일어나는 것으로 볼 수 있으며 pH 6 이상의 용액에서는 물질의 분해반응이 서서히 진행되며 PCNU의 경우 pH 7 이상에서는 분해반응이 거의 완결됨을 폴라로그라피에서 확인할 수 있었다.

Table 2에 나타낸 결과로부터 N-NO기의 환원에 의한 N-NH_2 합성을 시도하였으며 기초 작업으로 패널기에 치환기가 없는 PCNU를 택하여 순환 전압-전류 곡선법 및 폴라로그라피를 행하여 전기화학적 특성을 조사하였다. *Fig.* 1에 (5 : 3)EtOH : 4 N-HCl 용액에서 얻은 PCNU의 순환 전압-전류 곡선을 나타내었으며 작업 전극은 유리 탄소 전극을, 기준 전극으로는 Ag/AgCl/4 N-HCl을 사용하였다. −0.51 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl 전극의 환원파는 N-NO기의 4전자 환원에 의해 나타나는 비가역적인 파이며 이때의 전자수는 실제로 행한 환원반응의 전하수로부터 확인하였다. PCNU의 pH변화에 따른 폴라로그래피를 행한 결과 순환 전압-전류 곡선에서와 같이 pH 5 이하의 용액조건에서 $E_{1/2}$은 pH에 따라 직선적으로 "−"쪽으로 이동이 일어났으며 $E_{1/2} = -0.304 - 0.074$ pH의 관계식을 얻었다. 이 관계식으

Table 2. Dependence of E_{pc} of N'-aryl-N-(2-chloroethyl)-N-nitroso urea on pH. Concentration; 5×10^{-4} M, Scan rate; 100 mV/sec

E_{pc}	Compounds			
pH	PCNU	3-methyl PCNU	3-bromo PCNU	4-methoxy PCNU
1.5	−0.54	−0.54	−0.61	−0.60
2.4	−0.58	−0.57	−0.67	−0.71
3.3	−0.62	−0.66	−0.75	−0.82
4.0	−0.73	−0.72	−0.83	−0.91
5.0	−0.83	−0.83	−0.86	−0.92
6.0	−0.84	−0.85	−0.87	−0.91
7.0	−0.89	−0.86	−	−0.94

PCNU, N-phenyl-N-(2-chloroethy)-N-nitrosourea; 3-methyl PCNU, N'-(3-methylphenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea; 3-bromo PCNU, N'-3-bromophenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea; 4-methoxy PCNU, N'-4-methoxyphenyl)-N-(2-chloroethyl)-N-nitroso-urea.

Table 1. IR, mp and ^{1}H-NMR data of N'-(2-chloroethyl)-N-nitro soureas

G	recrystn.	mp (℃)	IR (cm^{-1})		NMR ($CDCl_3$)		
			CO	NO	-NH-	Ar-	$-CH_2CH_2-$
-H	hexane	94.0	1730	1545	8.72	7.68-7.00	4.38-3.38
3-CH_3	hexane	98.2	1730	1550	8.64	7.40-6.78	4.32-3.32
3-Br	hexane	111.2	1735	1535	8.75	7.80-6.70	4.31-3.38
4-OCH_3	−	89.0	1735	1505	8.55	7.48-6.70	4.34-3.32

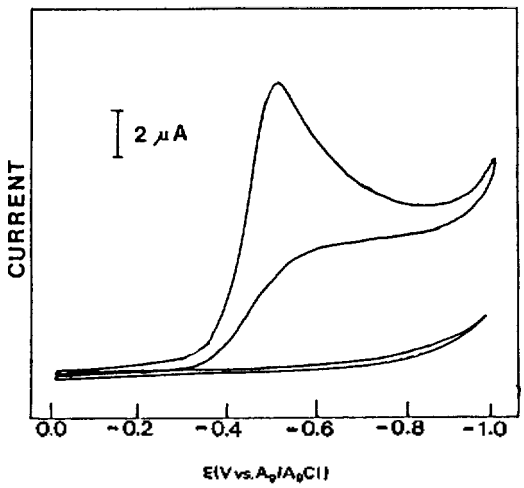


Fig. 1. Cyclic voltammograms of 1×10^{-3} M PCNU in (5:3) EtOH/4 N-HCl solution (pH = −0.32). a) before electrochemical reduction, b) after electrochemical reduction at −0.7 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl.

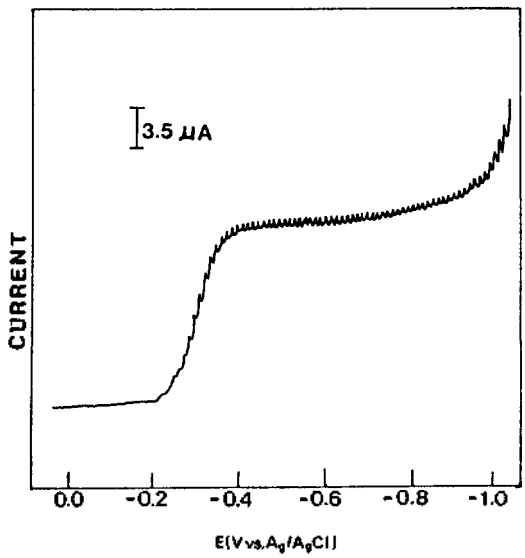


Fig. 2. Polarogram of 1×10^{-3} M PCNU in (5:3) EtOH/4 N-HCl solution.

로부터 환원반응에 참여한 H^+의 수는 4-5개임을 알 수 있었다. pH 값이 7 이상이 되면 전류치가 급격히 감소하는 현상으로부터 염기성 용액에서는 알킬 N-nitrosourea의 분해반응이 진행되는 것으로 판단된다.

대표적인 폴라로그램을 *Fig.* 2에 나타내었다. 전기화학적 환원반응은 완전한 비가역과정에 의하여 일어나는 반응에 쉽게 적용될 수 있으며 일반적인 화학반응보다 반응이 간편하고 인체에 해가 적고 반응시 가해주는 전위에 따라 기능기를 선택적으로 환원시킬 수 있다. 이와 같은 전기화학적 반응의 장점을 이용하여 앞에서 조사한 PCNU의 전기화학적인 거동을 바탕으로 N=O기의 선택적 환원반응을 행하였다. 전기화학적 환원시 가해준 전위는 수은전극표면에서 수소가 발생되지 않는 최대 전위인 −0.70 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl이며 용해도 및 반응성을 고려하여 0.3~0.5g 정도의 양을 (5 : 3) EtOH/4 N HCl에 녹여 사용하였다. 전류치가 바탕용액의 값으로 되면 *Fig.* 1(b)에서와 같이 −0.51 V의 파가 사라졌으며 이러한 현상으로부터 N=O기의 환원이 완전히 일어났음을 확인하였다. 이 때의 전자수는 4.6~4.8이었다. 반응 후 생성물은 회전 증발기를 이용하여 용매를 날려 보내고 EtOH/H_2O로 재결정하여 흰색의 환원 생성물을 72±5%의 수율로 얻었다. mp.는 113~115℃였으며 IR, NMR 및 mass 스펙트라, 그리고 원소 분석 결과로부터 생성물을 확인하였다. IR 스펙트라에서 3350 cm^{-1} 및 3310 cm^{-1}의 두개 강한 파는 NH_2의 신축 진동에 의한 것이며 C=O 신축 진동파가 1730 cm^{-1}에서 1680 cm^{-1}로 이동되었으며 NMR 스펙트라에서는 $CDCl_3$를 용매로 사용한 경우 3.3~3.5에서 나타나는 2개의 수소는 -N-NH_2에 의한 것이고 3.6~3.8에서 다중으로 나타나는 4개의 수소는 -CH_2CH_2-의 수소이며 6.8~7.4의 phenyl기의 수소 및 8.3~8.5에서 aryl-NH-를 확인하였다. 질량 스펙트라에서 질량 94 봉우리는 M+2에 상대강도가 32.5%인 봉우리를 가지므로 -N-(NH_2)(CH_2CH_2Cl)의 조각 무늬라 볼 수 있으며 C_6H_5에 의한 질량 77 봉우리, C_6H_5NH(CO)N(NH_2)-CH_2CH_2에 의한 질량 177 봉우리 및 분자량 213으로부터 N-N=O와 선택적 환원에 의하여 N-NH_2가 생성되어 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-aminourea가 합성되었음을 확인하였다. 원소 분석 결과에 의하면 C : 51.25%, H : 7.70%, N : 18.74%로 나타났으며 계산치는 C : 50.59%, H : 5.66% 그리고 N : 19.67%이다. 그리고 부생성물로 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)urea(mp. : 123~125℃)가

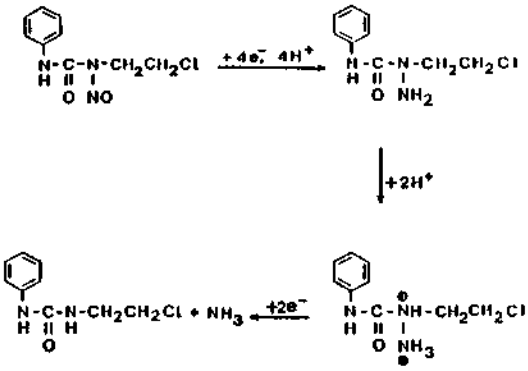
Table 3. Results from the electrolytic reduction of PCNU at the different pH on a mercury electrode

reduction product / pH	PCAU	PCU
0.0	72.5%	8.3%
3.0	46.4%	–
8.0	–	68.5%

*at pH=0.0, $E_{app.}=-0.5$ volts; pH=3.0, $E_{app.}=-1.0$ volts; pH=8.0, $E_{app.}=-1.7$ volts; **PCAU, N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-aminourea; PCU, N′-phenyl-N-(2-chloroethyl) urea.

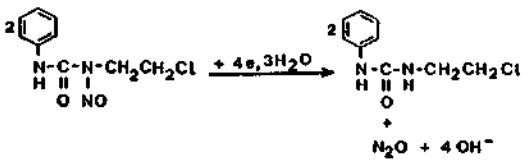
소량 생성됨을 IR 및 NMR 스펙트라로 확인하였다. IR : 3370 cm^{-1}(-NH, s), 1640 cm^{-1}(C=O), 1570(-NH, b). ^{1}H-NMR($CDCl_3$) : 3.4~3.6(4H, m, $-CH_2CH_2-$), 6.6~7.3(5H, m, Ar-), 8.30(1H, s, Ar-NH-).

확인된 환원 생성물과 전기적 환원시에 행한 전기량법에 의하여 계산된 전자수 4.6으로부터 반응의 경로는 아래와 같이 제시할 수 있으며 유사한 반응경로가 N-nitrosoamine의 환원반응에 대하여 적용된 바 있다[2].



반응조건의 검토를 위하여 용액계의 pH변화에 대한 반응성 및 촉매로 전이금속을 사용하였을 경우의 영향을 조사하기 위하여 전이금속 존재하에서 PCNU의 환원 전위를 조사하였다. 첫째, 용액계의 pH변화에 대한 반응성을 조사하기 위하여 아세트산 완충계로 용액의 pH를 3.0 및 8.0으로 조절하여 전기적 환원을 행한 후 생성물을 확인하고 결과를 *Table* 3에 나타내었다.

염기성 용액(pH 8.0)에서 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl) urea가 생성되는 것은 아래와 같은 메카니즘으로 설명할 수 있으며 반응에서의 전자수는 전기량법에 의하여 확인하였다.



pH 3.0인 용액에서는 N′-phenyl-N(2-chloroethyl)-N-aminourea의 수율이 낮아지는 반면 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl) urea는 나타나지 않았다. 이러한 결과에서도 위에서 제시했던 강산성 용액에서의 반응메카니즘이 타당하다는 결론을 얻었다.

금속이온이 N-nitrosourea의 전기적 환원에 미치는 영향을 조사하기 위하여 과잉의 Cd(II), Cu(II) 및 Fe(II)를 용액계에 첨가하여 $E_{1/2}$을 측정한 결과 강 산성조건하에서 물질의 환원 전위에 아무런 영향을 미치지 못함을 확인하였다.

반응시간에 따른 생성물의 비율을 조사하기 위하여 −0.3 V, −0.5 V 및 −0.7 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl의 전위에서 환원반응을 행하면서 2시간마다 생성물을 확인하여 *Table* 4에 나타내었다. 0.3g의 PCNU를 환원시 가해준 전위가 "−"쪽으로 증가할수록 반응성이 좋아졌으며 −0.7 V의 전위에서 실험을 행했을 경우 반응 시작 후 4시간이면 전류가 감소하여 바탕전류값에 도달하여 반응이 거의 완결되었음을 확인할 수 있었다.

Table 4. The yields of PCAU according to the reduction time and the applied voltage in the (5:3) EtOH/4 N-HCl solution

time (hr.)	applied voltage (V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl)		
	−0.3 V	−0.5 V	−0.7 V
2	14.2%	15.0%	42.4%
4	15.9%	17.1%	72.0%
6	16.9%	20.8%	73.6%
8	18.7%	31.8%	–
10	19.2%	48.0%	–

결 론

(5 : 3) EtOH/4 N-HCl 용액계에서 분리형 수은전극 전해조를 사용하여 N′-phenyl-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea로부터 N′-phenyl-N-(2-chloro-

ethyl)-N-aminourea를 합성하였다. −0.7 V *vs.* Ag/AgCl/4 N-HCl 전위에서 0.3g 정도의 반응물을 4시간 정도 반응시키면 N-N=O기의 선택적인 4전자 환원반응에 의하여 $N\text{-}NH_2$기가 생성되었으며 수율은 72± 5%였다.

본 연구는 부산대학교 기성회 연구비(1991년도) 지원에 의한 것임.

인 용 문 헌

1. E. A. Dahaman, D. Vader *et al.*, *Anal Chem.*, **186**, 161 (1962).
2. O. G. Devik, *Acta. Chem. Scand.*, **21**, 2302 (1967).
3. H. Burghard, H. Jager *et al.*, *J. Electroanel. Chem.*, **17**, 191 (1968).
4. A. J. Dombroski, and L. Meites, *J. Electroanl. Chem.*, **137**, 67 (1982).
5. G. Jacob, C. Moinet and A. Tallec, *Electrochimica Acta.* **27**(10), 1417 (1982).
6. C. Nishimura and M. Kaise, *J. Electroanal. Chem.*, **149**, 287 (1983).
7. H. Lund, *Acta Chem. Scand.*, **11**, 990 (1957).
8. L. Holleck and R. Schinder, *Z. Electrochem.*, **62**, 942 (1958).
9. E. Laviron and P. Fournari, *Bull. Soc. Chim. France*, 518 (1966).
10. P. E. Iversen, *Acta. Chem. Scand.*, **25**, 2337 (1971).
11. P. E. Iversen, *ibid.*, **24**, 2459 (1970).
12. M. Cariou, R. Hazard, M. Jubault and A. Tallec, *J. Electroanal. Chem.*, **182**, 345 (1985).
13. P. N. Magee and J. M. Barnes, *Brit. J. Cancer*, **10**, 114 (1954).
14. T. P. Johnston, G. S. McCalab and J. A. Mongomery, *J. Med. Chem.*, **6**, 669 (1963).
15. P. Pademachcher and H. G. Glide, *J. Chem. Educ.*, **53**, 7757 (1976).
16. J. H. Weisburger and Raineri, Toxilogy and App. Pharmacology, **31**, 3669 (1975).
17. J. S. Wishnok, *J. Chem. Educ.*, **54**, 440 (1977).
18. T. P. Jhonston, G. S. Mccaleb and J. T. Montgomery, *J. Med. Chem.*, **6**, 669 (1963).
19. J. C. Kim, and I. S. Cho, *J. Pharm. Soc.* (Korea), **27**, 177 (1983).
20. J. C. Kim, I. S. Cho, and S. K. Choi, *J. Kor. Chem. Soc.*, **35**, 240 (1991).
21. H. Lund and S. K. Shama, *Acta. Chem. Scand.*, **26**, 2324 (1972).