

# Glycyrrhizin 誘導體인 2-Acetoxy 11-Keto $\Delta^{12:13}$ 30-Acetoxy methyl Keto Oleanenic Acid와 副腎皮質 Hormone 分泌와의 關係

Relation between Pharmacological Effects of 2-Acetoxy 11-Keto  $\Delta^{12:13}$

30-Acetoxy methyl Keto Oleanenic Acid and Adrenocortical Secretions.

서울大學校 醫科大學 藥理學敎室

<指導 吳 鎮 燮 敎授>

李 喆 和

## 目 次

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 實驗方法
- III. 實驗成績
- IV. 總括 및 考察
- V. 結 論

## I. 緒 論

Glycyrrhizin(以下 Gly 로 略記함)은 甘草의 成分으로서 一種의 saponine 이며 그 含量은 5~10%이다. 이 化學構造는 1分子의 Glycyrrhetic acid에 2分子의 glucuronic acid가 結合되어 있다.

이 aglycone 인 glycyrrhetic acid는 polyterpene Compound로서 그 化學構造가 steroid hormone 系의 phenanthrene 核과 類似하다. Gly 과 Gly 誘導體인 2-acetoxy 11-keto  $\Delta^{12:13}$  30-Acetoxy methyl keto oleanenic acid(以下 AMKOA 로 略記함)<sup>1)</sup> 및 副腎皮質 hormone 系인 cortisone, desoxycorticosterone acetate (以下 DCA 라 略記함) 등의 構造式은 다음과 같다.

甘草가 生體에 미치는 作用은 steroid hormone 과 密接한 關聯性이 있어 各方面으로 研究가 展開되어 왔다. 甘草를 長期間服用하면 往往 浮腫을 일으킨다는 事實이 近代에 이르러 究明되었다. 卽 Revers<sup>2)</sup>는 消化性潰瘍患者 治療에 있어서 甘草를 投與한 結果 其中 20%의 患者에서 浮腫 高血壓 또는 心臟性喘息이 發生하였음을 觀察하였고 Molhuysen<sup>3)</sup> 등은 甘草 또는 甘草水浸液가 健康人에 對하여 尿中水分, sodium, chloride 의

排泄을 抑制하고 potassium 의 排泄을 促進하는 DCA 類似作用이 있음을 1950年에 처음으로 發表하였다. Borst<sup>4)</sup> 등은 甘草 extract에는 sodium을 貯溜하고 potassium을 喪失시키는 DCA 類似作用의 物質이 含有되었다고 報告하였다.

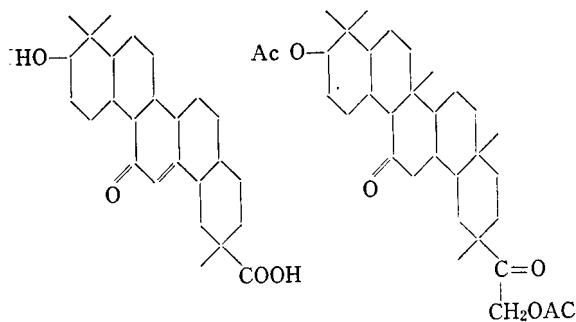
이 甘草의 corticoid 類似作用을 利用하여 Groen<sup>5)</sup> 등은 Addison 氏病 患者에 DCA를 前處置한 다음 每日 甘草 extract를 投與함으로써 電解質均衡을 充分히 維持할 수 있었으나 一但 投與를 中止하면 非正常血液의 濃縮과 다시 臨牀的 症狀이 나타났다고 하였다. 또 Card<sup>6)</sup> 등은 Addison 氏病 患者에 glycyrrhetic acid를 投與한 結果 體重의 增加 및 電解質變化가 DCA 또는 cortisone 投與時와 類似함을 밝혔다. 또 Calvert<sup>7)</sup>도 Addison 氏病 患者에 甘草엑스의 長期投與로서 治療效果를 期待할 수 있었다고 하였으며 Hennenmann<sup>8)</sup> 등은 1例報告에서 甘草엑스 長期投與時 DCA 大量投與와 같은 急性中毒이 發生되었음을 報告하였다.

其後 甘草의 電解質代謝에 關한 作用은 Gly 自體에 起因된다는 것이 Groen<sup>5)</sup>, Hudson<sup>9)</sup>, Louis<sup>10)</sup>, Elmadjian<sup>11)</sup> 등에 依하여 認定되었다.

卽 Groen<sup>12)</sup>은 Addison 氏病 患者에 DCA 投與를 中止한 後 3~4 gm의 ammonium glycyrrhizinate를 投與함으로써 電解質代謝의 均衡을 維持하였다고 報告하였으며 이 作用은 甘草 成分中の Gly에 起因한다고 밝혔다.

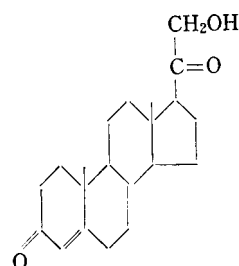
한편 Hudson<sup>9)</sup> 등은 兩側副腎을 剔出한 Addison 氏病 患者에서 Gly 單獨으로는 電解質均衡維持는 充分치 못하고 subminimal dose 以下の cortisone을 3~8週日

本論文의 要旨은 1964年 第16回 大韓藥理學會 學術大會에서 發表하였음.

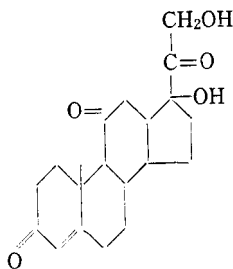


Glycyrrhetic Acid

2-Acetoxy 11-keto  
12:13 30-Acetoxy methyl keto oleanenic Acid



Desoxycorticosterone Acetate



Cortisone

間 投與함으로써 그 維持가 可能하다고 指摘하였다. Card<sup>6)</sup> 및 Galal<sup>13)</sup>는 副腎을 剔出한 rat에서는 電解質 均衡維持가 不可能하다고 하였다. 그러나 Kraus<sup>14)</sup>는 正常 rat 또는 副腎剔出 rat에서 sodium 및 水分이 蓄積됨을 觀察하였다.

Glucocorticoid의 類似作用에 對하여 德澤等<sup>15)</sup>은 Gly을 主成分으로하는 neominophagen-C는 mineral corticoid에 關한 作用보다 glucocorticoid 類似作用이 顯著함을 報告하였으며 其外에 抗알레르기 作用 抗炎症作用 등의 glucocorticoid 類似作用 등의 報告가 많다. 柴田等<sup>16)</sup>은 Gly 製劑인 strong neominophagen-C로서 馬杉腎炎의 發生을 抑制할 수 있고 또 顯著한 治療效果가 있었다고 報告하였다. 反面 Louis<sup>10)</sup>는 Gly는 DCA 類似作用만 있을 뿐이고 糖質代謝에 關한 作用은 別로 認定되지 않았다고 하였으며 態谷等<sup>17)</sup>은 Gly이 肝에서 cortisone의 代謝를 抑制하는 것을 in vitro에서 證明하였으며 一便 Kraus<sup>18)</sup>는 Gly 또는 glycyrrhetic acid는 ACTH의 分泌를 抑制한다고 하였다. 또 李<sup>19)</sup>는 Gly은 分泌된 副腎皮質 hormone에 作用하여 間接的으로 그 作用을 增強시킴으로서 나타난다고 推定하였다. 金<sup>1)</sup>은 glycyrrhetic acid는 DCA와 類似한 作用이 있으며 DCA의 mineralocorticoid 作用은 C<sub>17</sub>位置에 있는 acetoxy methyl-keto 基로 因하여 增強된다는 點과 glycyrrhetic acid 自體가 DCA와 類似한 藥理作用이 있다는 點에 着眼하여 glycyrrhetic

acid의 30 位置에 있는 carboxyl 基와, Gly과 類似構造인 oleanenic acid의 28 位置에 있는 carboxyl 基를 acetoxy methyl-keto 基로 置換함으로써 DCA 類似作用이 發現할 것을 豫測하여 이에 關한 數種의 化合物을 合成하여 그 作用을 比較한 바 있었다. 今般 著者는 그 誘導體中 가장 藥理作用이 強할 것이라고 認定되는 AMKOA가 副腎皮質 hormone에 미치는 影響에 關하여 實驗한 바 있어 그 成績을 茲에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 實驗方法

### A. 實驗材料

實驗動物은 體重 200~300 gm 雄性 rat를 同一條件에서 一定期日 stock diet<sup>20)</sup>로 飼育한 것을 使用하였다. 實驗에 使用한 glycyrrhizin 誘導體는 白色結晶性粉末 \*2-acetoxy 11-keto 12:13 30-acetoxy methyl keto oleanenic acid(m.p; 301~302°C)를 使用하였으며 cortisone acetate와 DCA는 nutritional biochemical corporation 製劑, histamine diphosphate는 Abbot Laboratories, U.S.A 製劑를 使用하였다.

### B. 實驗方法

#### 1. Rat 血液像에 關한 實驗

體重 250 gm 內外의 健全한 雄性 rat를 使用하였으며 一群을 7匹로 하였다.

每日 AMKOA 1.0 mg/kg 連 7日間注射後 斬首하여 赤血球, 白血球 及 白血球의 百分率을 計算하여 對照群과 比較觀察하였다.

#### 2. 循環好酸球 測定

體重 250 gm 內外의 成熟健全한 雄性 rat를 使用하였으며 實驗期間中 溫度 및 光線等的 影響에 留意하였다. Rat中 一部는 正常狀態에서 實驗하였고 一部는 兩側副腎을 剔出한 後 3日부터 實驗하였다. 副腎剔出方法<sup>21)</sup>은 ether 麻醉下에 脊椎最下肋骨附着部에서 皮膚를 切開하여 兩側의 後腹壁를 通하여 腎臟上端部의 乳白色인 兩側副腎을 眼科用 “핀셋”로 鈍的으로 剔出한後 縫合하였다. 이때 實驗은 兩側副腎을 剔出한 後 3日에 하였으며 完全剔出 與否를 確認코져 生存期間 20日以上の 것은 實驗成績에서 除外하였다. 採血은 可及的 stress를 避하기 爲하여 ether 麻醉下에서 足背靜脈을 銳利한 面刀날로서 切開하여 流出하는 血液을 白血球 melandieur pipett 0.5 까지 吸入하고 Dunger-Thorn 變法<sup>22)</sup>의 Dunger's-Thorn solution을 11까지 吸入稀釋한 後 計算은 spencer haemocytometer를 使用하여 全區劃內의 血球數를 合計하여 다음式에 依하여 ;

$$\frac{** \text{ corpuscles} \times \text{dilution} \times 10}{\text{number of 1 mm squares counted,}} \text{ eosinophile 網}$$

\* 金京鎬先生 指導下에 合成한 理研合成化學研究所 製劑

對數를 計算하여 平均値를 算出하였고 “田多井”의 好酸球推計學的 方法<sup>23)</sup> 으로 檢討하였다. 藥物投與 및 採血은 一定한 時間에 行하였다. 正常 rat 를 3 群으로 나누어 各群을 8 匹로 하였다. 每日 AMKOA 를 A 群에는 1.0 mg/kg, B 群에는 0.3 mg/kg 連 7 日間 皮下注射하였다. 循環好酸球 算出은 藥物投與前, 藥物投與 4 時間後, 8 時間後, 連 3 日注射後 連 7 日注射後에 各各 施行 하였으며 對照群 C 와 比較觀察하였다. 副腎을 剔出한 rat 도 上記와 同一한 方法으로 循環好酸球數를 算出하였다.

### 3. 尿中糖 및 窒素 排泄量 測定

Rat 는 體重 250 gm 內外的 雄性 rat 를 使用하였으며 各群을 10 匹로하여 實驗群은 每日 AMKOA 1.0 mg/kg 을 連 7 日間 皮下注射하였다.

尿採取는 連 3 日注射後 및 連 7 日注射後에 各各 12 時間 集尿하여 尿糖値는 somogyi-Nelson 氏法<sup>24)</sup>에 依하여 測定하였고 尿窒素値는 Micro-Kjedahl 氏法에 依하여 測定하였다.

### 4. 副腎 ascorbic acid 및 cholesterol 含量 測定

前記 AMKOA 連日注射한 採尿 rat 및 DCA 0.5 mg/kg 連日注射한 rat 를 使用하였으며 連 7 日間皮下注射한 後 histamine 0.5 mg/kg 을 腹腔內로 注射하고 1 時間後 斬首하여 兩側副腎을 剔出한 다음 洗滌하여 重量을 測定하고 一側은 副腎 ascorbic acid 를 測定, 他側은 副腎 cholesterol 測定에 各各 使用하였다.

Ascorbic acid 는 indophenol 光度法(AVC 法)<sup>25)</sup>에 依하여 測定하였고 副腎 cholesterol 은 Yasuda<sup>26)</sup> 및 Schoenheimer-Sperry 方法<sup>27)</sup>을 應用하여 抽出하고 그 抽出物을 處理하여 Sideny pearson 方法<sup>28)</sup>으로 測定하여 副腎重量 100 mg 當 含量의 平均値를 比較觀察하였다.

### 5. 尿中 sodium 및 potassium 排泄量 測定

前記 尿中糖 및 窒素測定 rat 와 DCA 投與 rat 를 兼用하였으며 尿中 sodium 및 potassium 排泄量을 連 3 日注射後, 連 7 日注射後의 2 회에 亶하여 測定하였다. 이때 對照群 및 DCA 投與群과 比較觀察하였다. 前記 採尿는 12 時間 集尿한것을 使用하였으며 200 倍稀釋하여 sodium 는 589 m $\mu$ , potassium 766 m $\mu$  의 波長에서 baird-atomic flame photometer 로 各各 測定하였다.

### 6. 17-KS 排泄量 測定

Rat 體重 200 gm 內外的 雄性 rat 를 使用하였으며 各群을 12 匹로하여 2 個群을 만들어 實驗群은 AMKOA 1.0 mg/kg 을 連 7 日間皮下注射하였다. 採尿는 連 3 日注射後 및 連 7 日注射後에 各各 24 時間 集尿한것을 使用하였다. 採尿法<sup>29,30)</sup>은 rat 는 1 日排泄量이 적기 때문에 4 匹을 1 採尿群으로 하였다. 一採尿群의 總尿量에서 10 ml 을 擇하여 神田川氏法<sup>31)</sup>에 依하여 Bausch & Lomb

340 型光電比色計를 使用하여 比色(定量)測定하고 測定値는 Allen 式에 依하여 補正하여 17-KS 量을 測定하여 總尿量, 排尿時間 及 動物匹數에서 1 匹當 24 時間의 排泄量을 算出하여 對照群과 比較하였다.

### 7. 副腎剔出 rat 의 histamine stress 로 因한 血壓 下降 測定

兩側副腎을 剔出한 平均體重 170 gm 內外的 雄性 rat 48 匹을 stock diet 와 1.0% 食鹽水로 飼育하면서 副腎剔出 3 日後부터 各各 12 匹式 A,B,C 群으로 3 區分하고 A 群은 AMKOA 1.0 mg/kg, B 群은 cortisone 2.0mg/kg 와 DCA 0.2 mg/kg, C 群을 對照群으로하여 皮下에 連 7 日間注射後 Byron U. Wilson 의 非觀血의 血壓 測定 方法의 變法<sup>32)</sup>에 依하여 ether 麻醉下에 尾部에서 最高血壓을 一次測定하고(3 回測定平均値를 測定值로함) 곧 이어 histamine 1.0 mg/kg 을 腹腔內에 注射한 後 10 分에 同一한 方法으로 二次로 血壓을 測定하여 stress 前後의 血壓平均値 및 stress 로 因한 血壓下降率을 各群別로 比較觀察하였다.

### 8. Paperchromatography 로 因한 肝內 corticoid 代謝에 關한 實驗

Flask 1: Hydrocortisone 1.0 mg 을 加한 rat 肝에 homogenate(rat 肝에 同量의 Krebs's Phosphosaline 의 buffer 를 加한것) 6 ml 에 다시 buffer 10 mg 을 넣었다. Flask 2: Flask 1 homogenate 에 glycyrrhizin 10 mg, 또 Flask 3: Flask 1 homogenate 에 AMKOA 10 mg 을 加하여 3 時間 incubate 하고 acetone 25 ml 으로 抽出 5 drops 의 飽和 magnesium chloride 溶液을 加하여 1 夜放置하고 그 濾液에 물 25 ml 를 添加하고 hexane 25 ml 로서 2 回洗滌後 그 hexane 을 50% acetone 水溶液 25 ml 로 再抽出하여 순한 全抽出液을 45°C 以下에서 減壓濃縮으로 acetone 을 蒸發시킨 後 水層을 醋酸 ethyl 25 ml 로 2 回抽出, 이 抽出液을 sodium sulfate 로 脫水한 後 그中 10 ml 을 取하여 減壓乾固하고 이를 5 ml methanol 로 溶解시켜 各各 1 ml 을 sample 로 하였다. sample 1 ml 을 取하여 低溫(40°C) 乾固시킨 後 0.5 ml methanol 에 溶解시켜 0.4 ml 을 paper 에 點滴한 後 Zaffaroni<sup>33,34)</sup>法에 依하여 toluene(glycohol 飽和)로서 72 時間下降展開시킨 다음 paper 를 6 時間 乾燥시켜 triphenyltetrazolium chloride(TPTZ)로 發色시켜 그 紅色度의 強弱을 比較觀察하였다.

## III. 實驗 成績

### 1. Rat 血液像에 미치는 影響

Table I에 表示된 바와 같이 AMKOA 1.0 mg/kg 連 7 日投與群은 對照群에 比하여 赤血球는 增加하고 白血球는 減少하는 傾向이 있으며 白血球百分率에 있어서 淋

**Table 1.** Effects of AMKOA upon rats hemogram

Group	R.B.C. mil/c.m.m.			W.B.C./c.m.m.			W.B.C. Analysis					
	Mean, S.D.	Comparison with control(%)	P	Mean, S.D.	Comparison with control(%)	P	Band. (%)	Neut. (%)	Lymp. (%)	Mono. (%)	Eos. (%)	Baso. (%)
A	8.34 ±1.20	10.75	N.S.	7,686 ±1,127.80	-23.62	<0.02	1.00	37.29	60.29	0.71	0.71	0
B	7.53 ±1.18			10,064 ±1,667.01			0.57	23.00	69.57	0.43	1.43	0

A : 1.0 mg/kg AMKOA

B: control

N.S.....No Significance

P.....Probability

Rats.....For each group 7 animals were used.

바구와 호산구는 減少되었고 中性구는 增加되었다.

**2. 循環好酸球에 미치는 影響**

Table 2, Fig. 1에 表示된 바와 같이 正常 rat 에서는 AMKOA 1.0 mg/kg 投與로서 注射後 4時間, 8時間까지 有意性있는 變化를 認定치 못하였으나, 連 3日 投與

後부터 循環好酸球數의 減少現象이 招來되었고 連 7日 後에는 53.70%의 顯著한 減少率을 招來하였다. AMK-OA 0.3 mg/kg 投與로서는 連 7日 後에서도 有意性있는 變化는 認定되지 않았다. Table 3, Fig. 2에 表示된 바와 같이 副腎剝出 rat群에 있어서 循環好酸球數는 AMKOA

**Table 2.** Effects of AMKOA upon numbers of circulating eosinophils in intact rats

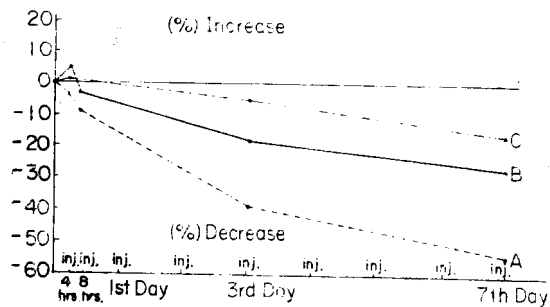
Group	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	A	B	C
		Pre-injections status	402 ±158.37	321 ±108.12
4 hours after injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	374 ±236.85	314 ±102.03	294 ±138.42
	Comparison with pre-inj. status(%)	-3.83 (N.S.)	3.47 (N.S.)	3.01 (N.S.)
8 hours after injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	358 ±155.18	296 ±89.81	
	Comparison with pre-inj. status(%)	-9.33 (N.S.)	-3.15 (N.S.)	
After 3 days of successive injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	244 ±154.15	239 ±68.32	278 ±101.27
	Comparison with pre-inj. status(%)	-38.37 0.01>	-16.09 (N.S.)	-3.87 (N.S.)
After 7 days of successive injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	205 ±140.20	226 ±40.30	266 ±97.62
	Comparison with pre-inj. status(%)	-53.70 0.001>	-23.16 (N.S.)	-12.83 (N.S.)

A: 1.0mg/kg AMKOA

B: 0.3 mg/kg

C: Control

Rats.....For each group 8 animals were used.



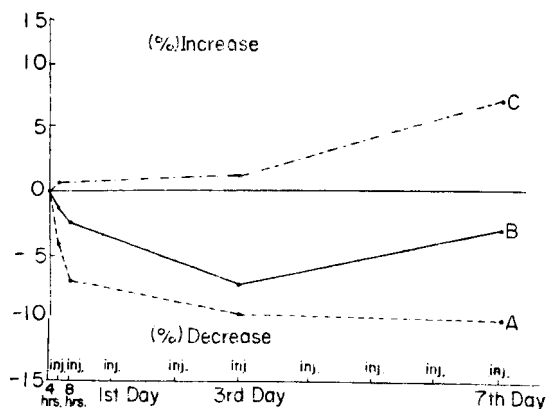
**Fig. 1.** Percentage decrease in circulating eosinophils following injection of AMKOA. into intact rats.

A: 1.0 mg/kg AMKOA.

B: 0.3 mg/kg //

C: Control

Rats.....For each group 8 animals were used



**Fig. 2.** Percentage decrease in circulating eosinophils following injection of AMKOA. into adrenalectomized rats.

A: 1.0 mg/kg AMKOA.

B: 0.3 mg/kg //

C: Control

Rats.....For each group 8 animals were used

**Table 3.** Effects of AMKOA upon number of circulating eosinophils in adrenalectomized rats

Group		A	B	C
Pre-injection status	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	324 ±85.98	328 ±78.33	328 ±87.11
	Comparison with pre-inj. status(%)	-3.81 (N.S)	-1.36 (N.S)	0.45 (N.S)
4 hours after injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	294 ±45.30	318 ±88.17	331 ±69.38
	Comparison with pre-inj. status(%)	-6.68 (N.S)	-2.34 (N.S)	
8 hours after injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	285 ±42.39	291 ±115.08	
	Comparison with pre-inj. status(%)	-6.68 (N.S)	-2.34 (N.S)	
After 3 days of successive injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	271 ±27.24	285 ±25.65	330 ±100.06
	Comparison with pre-inj. status(%)	-9.49 (N.S)	-7.43 (N.S)	0.86 (N.S)
After 7 days of successive injection	Mean, S.D. /mm <sup>3</sup>	265 ±72.66	282 ±144.10	337 ±103.96
	Comparison with Pre-inj. status(%)	-9.41 (N.S)	-2.02 (N.S)	7.30 (N.S)

A: 1.0 mg/Kg AMKOA

B: 0.3 mg/Kg //

C: Control

Rats.....For each group 8 animals were used.

**Table 4.** Effects of AMKOA upon glucose contents of rat urine

Group	After 3 days of successive injection			After 7 days of successive injection		
	Mean, S.D. mg/dl	Comparison with control (%)	P	Mean, S.D. mg/dl	Comparison with control (%)	P
A	116.2 ±19.85	15.97	N.S.	128.6 ±18.54	24.01	<0.02
B	100.2 ±16.64			103.7 ±18.59		

A: 1.0mg/kg AMKOA      B: Control  
Rats.....For each group 10 animals were used.

**Table 5.** Effects of AMKOA upon nitrogen contents of rat urine

Group	After 3 days of successive injection			After 7 days of successive injection		
	Mean, S.D. mg/dl	Comparison with control (%)	P	Mean, S.D. mg/dl	Comparison with control (%)	P
A	213.0 ±22.64	3.44	N.S.	236.3 ±23.17	13.26	N.S.
B	205.9 ±45.78			208.6 ±41.32		

A: 1.0mg/kg AMKOA      B: Control  
Rats.....For each group 10 animals were used.

**Table 6.** Effects of AMKOA on adrenal ascorbic acid in stressed rats

Group	Treatment	No.	B.W. gm.	Weight adr. gls mg.	Ascorbic Acid		Difference from control
					Microgram /100 mg	Mean. S.D.	
A	AMKOA 1.0 mg/kg i.m. inj. for 7 days Histamine stress: 0.5 mg/kg i.p. inj. 1 hr. before killing	1	260	28	440.14	332.32 ±79.67	98.63 (A-C) P<0.02
		2	200	31	276.77		
		3	220	22	437.86		
		4	205	44	305.80		
		5	350	16	255.94		
		6	265	28	341.25		
		7	240	24	268.54		
B	DCA 0.5 mg/kg i.m. inj. for 7 days Histamine stress: 0.5 mg/kg i.p. inj. 1 hr. before killing	1	200	40	403.65	343.84 ±57.00	110.15 (B-C) P<0.01
		2	300	30	388.70		
		3	355	32	363.78		
		4	270	23	252.65		
		5	250	44	405.07		
		6	255	50	306.54		
		7	255	20	286.50		
C	control Histamine stress: 0.5 mg/kg i.p. inj. 1 hr. before killing	1	200	23	237.39	233.69 ±39.17	
		2	230	37	279.32		
		3	270	28	188.64		
		4	280	18	229.12		
		5	310	32	170.62		
		6	215	50	248.04		
		7	180	28	232.75		

Note: Weight of adrenal gland is in terms of weight of unilateral adrenal gland.

1.0 mg/kg 의 連 7 日 投與에 있어서도 有意性있는 變化는 認定되지 않았다.

**3. 尿中糖 及 窒素排泄量에 미치는 影響**

Table 4, 5 에 表示된 바와같이 AMKOA 1.0 mg / kg 投與群에 있어서 連 7 日 投與로서 尿中糖量은 增加하였으나 尿中窒素量은 有意性있는 變化를 認定치 못하였다.

**4. 副腎 ascorbic acid 및 cholesterol**

含量에 미치는 影響

Table 6, 7 에 表示된 바와 같이 AMKOA 1.0 mg/kg

을 連 7 日 投與한 後 histamine stress 를 附與한 副腎 ascorbic acid 및 cholesterol 含量(副腎 重量 100 mg當)은 對照群에 比하여 增加하였으나 DCA 投與群에서와 같이 顯著히 增加되지는 않았다.

**5. 尿中 sodium 및 potassium 排泄量에**

미치는 影響

Table 8, 9 에 表示된 바와 같이 AMKOA 1.0 mg/kg 連 7 日 投與로서 尿中 sodium 含量의 減少 및 potassium 含量의 增加가 認定되었다. 이때 DCA 投與群에서는 더

**Table 7.** Effects of AMKOA on total adrenal cholesterol in stressed rats

Group	Treatment	No.	B.W. gm.	Weight adr. gls mg.	Total cholesterol		Difference from control mg/100mg
					mg/100mg	Mean. S.D.	
A	AMKOA	1	260	42	3.48	3.12±0.27	0.70 (A-C) P<0.02
	1.0mg/kg. i.m.	2	200	32	2.72		
	inj. for 7 days	3	220	27	3.40		
	Histamine	4	205	50	2.81		
	0.5mg/kg i.p	5	350	35	3.27		
	inj. 1 hr. before	6	265	30	3.17		
	killing	7	240	22	2.96		
B	DCA	1	200	23	3.33	3.25±0.19	0.85 (B-C) P<0.01
	0.5mg/kg i.m.	2	300	20	3.15		
	inj. for 7 days	3	355	22	3.09		
	Histamine	4	270	27	3.12		
	0.5mg/kg	5	250	24	3.19		
	i.p. inj. 1 hr.	6	255	40	3.18		
	before killing	7	255	25	3.69		
C	Control	1	200	35	3.03	2.42±0.52	
	Histamine	2	230	40	2.33		
	0.5mg/kg i.p.	3	270	23	2.47		
	inj.	4	280	35	1.92		
	1 hr. before	5	310	23	3.18		
	killing	6	215	25	2.26		
		7	180	22	1.81		

Note: Weight of adrenal gland is in terms of weight of unilataraal adrenal gland.

**Table 8.** Effects of AMKOA upon sodium contents of rat urine

Group	After 3 days of successive injection			After 7 days of successive injection		
	Mean, S.D. mEq/L	Comparison with control (%)	P	Mean, S.D. mEq/L	Comparison with control (%)	P
A	64.3±19.08	-18.60	N.S.	52.7±11.25	-29.45	<0.02
B	62.3±17.96	-21.14	N.S.	49.3±14.51	-34.00	<0.01
C	79.0±22.48	—	—	74.7±22.12	—	—

A: 1.0 mg/kg AMKOA

B: 0.5 mg/kg DCA

C: Control

Rats.....For each group 10 animals were used.

**Table 9.** Effects of AMKOA upon potassium contents of rat urine

Group	After 3 days of successive injection			After 7 days of successive injection		
	Mean, S.D. mEq/L	Comparison with control (%)	P	Mean, S.D. mEq/L	Comparison with control (%)	P
A	89.4±16.83	11.19	N.S.	105.6±13.37	27.69	<0.02
B	93.3±13.86	16.04	N.S.	108.5±14.26	31.20	<0.01
C	80.4±19.66	—	—	82.7±20.87	—	—

A: 1.0 mg/kg AMKOA  
 B: 0.5 mg/kg DAC  
 C: Control  
 Rat.....For each group 10 animals were used.

속 顯著的 sodium 의 減少 및 potassium 增加가 認定 되었다.

**6. 尿中 17-KS 排泄量에 미치는 影響**

Table 10에 表示된 바와 같이 AMKOA 1.0 mg/kg 當連 7日 投與群에서 17-KS 排泄量은 對照群에 比하여 多少 減少되는 傾向이 있었으나 有意性 있는 變化는 認定되지 않았다.

**7. 副腎剔出 rat의 histamine stress로 인한 血壓下降에 미치는 影響**

Table 11에 表示된 바와같이 AMKOA 1.0 mg/kg 連 7日 注射한 A 群은 對照群 C와 類似하게 stress 附與前에도 低血壓를 呈하였으며 histamine stress를 加한 10分 後에는 34.14(mmHg)의 血壓下降率을 나타내어 對照群과 類似한 下降率을 나타내었으나 cortisone 2.0 mg/kg 과 DCA 0.2 mg/kg 을 兼用注射한 B 群에서는 17.73(mmHg)로 顯著히 血壓下降 作用이 抑制되었다.

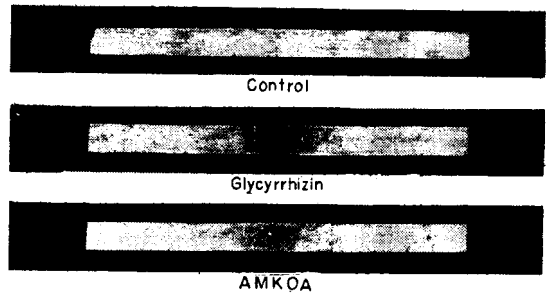
**Table 10.** Effects of AMKOA upon 17-ketosteroid contents of rat urine

Group	After 3 days of successive injection						After 7 days of successive injection											
	Number of rats by urine group	Time for collecting urine (hr.)	Amounts of urine (c.c.)	Total amounts of 17-KS(r)	Value of 17-KS in per capita (r/a)	Mean Value of 17-KS in per capita (r/a)	Number of rats by urine group	Time for collecting urine (hr.)	Amounts of urine (c.c.)	Total amounts of 17-KS(r)	Value of 17-KS in per capita (r/a)	Mean Value of 17-KS in per capita (r/a)						
A	4	24	28	21.2	5.3	5.1	4	24	48	14.4	3.6	4.4						
	4	24	20	19.6	4.9	±0.20							4	24	28	20.8	5.2	±0.80
Difference from control						-0.4 (N.S.)	-0.5 (N.S.)											
B	4	24	28	22.0	5.5	5.5	4	24	40	25.2	6.3	5.9						
	4	24	32	20.4	5.1	±0.29							4	24	46	23.6	5.9	±0.33
	4	24	20	23.2	5.8								4	24	32	22.0	5.5	

A: 1.0 mg/kg AMKOA  
 B: Control

**8. Paperchromatography로 인한 肝內 corticoid 代謝에 관한 影響**

Fig. 3에 圖示된 바와같이 Gly 및 AMKOA 를 加하여 paper chromatography 한 成績은 對照群에 比하여 紅色이 顯著하였다. 이 結果는 Gly 이나 AMKOA 가 肝內에서 corticoid 의 分解를 抑制하는 것을 意味한다.



**Fig. 3** Paper-chromatogram of incubated glycyrrhizin and AMKOA with rat liver homogenate



**Table 11.** Effects of AMKOA on depletion of blood pressure following histamine stress in adrenalectomized rats

Group	No.	B.W. gm	Pre-Treatment	Systolic Blood Pressure			
				Just before stress	10 min. after stress	Depletion	Percent, decrease
A	1	120	1.0 mg/kg AMKOA i.m. daily inj. for 7 days	65	40	25	-38.46
	2	130		62	41	21	-33.87
	3	120		72	30	42	-58.33
	4	130		67	45	22	-32.84
	5	160		87	70	17	-19.54
	6	130		92	65	27	-29.35
	7	120		80	53	27	-33.75
	8	130		77	55	22	-28.57
	9	105		75	50	25	-33.33
	10	130		60	40	20	-33.33
Mean, S.D.				73.7±9.97	48.9±11.63	25.7	-34.14±9.35
B	1	115	DCA 0.2 mg/kg cort. 2.0 mg/kg i.m. daily inj. for 7 days	105	85	20	-19.05
	2	145		102	80	22	-21.57
	3	100		90	75	15	-16.67
	4	125		95	75	20	-21.05
	5	100		105	80	25	-23.81
	6	115		110	100	10	-9.09
	7	165		92	82	10	-10.87
	8	195		98	75	23	-23.47
	9	100		108	90	18	-16.67
	10	115		100	85	15	-15.00
Mean, S.D.				100.5±6.39	83.2±7.48	17.80	-17.73±4.78
C	1	120	Control	80	53	27	-33.75
	2	120		75	50	25	-33.33
	3	90		60	35	25	-41.67
	4	120		75	55	20	-26.67
	5	120		65	35	30	-46.15
	6	100		78	50	28	-35.90
	7	126		90	60	30	-33.33
	8	180		65	40	25	-38.46
	9	120		78	45	33	-42.31
	10	100		53	30	23	-43.40
Mean, S.D.				71.9±10.40	45.3±9.38	26.6	-37.50±5.66

Note: Histamine stress is expressed in terms of 1.0 mg/kg i. p. inj.

### VI 總括 및 考察

Gly의 副腎皮質 hormone作用에 關한 研究로서 Groen 및 그 共同研究者들<sup>5)</sup>은 Glycyrrhetic acid와 DCA와의 構造上 類似點에 立脚하여 生體內에서 glycyrrhetic acid가 DCA와 類似한 物質로 變化할 것이라고 推測하였으나 Hudson<sup>9)</sup> 등에 依하여 否定되었

고 熊谷等<sup>17)</sup>은 Gly의 corticoid作用機轉은 corticoid가 肝에서 代謝되어 非活性化하는 것을 抑制하는 結果로 Corticoid hormone作用을 增強시킨다고 하였다. 今般 著者は glycyrrhetic acid로부터 DCA의 構造와 類似한 AMKOA를 合成하여 이 製劑와 副腎皮質 hormone과의 關聯性을 檢討하고자 前記 實驗을 試圖하였다. 그러나 副腎皮質 hormone自體와 ACTH의 分泌機轉 또

는 hypothalamus 를 爲始한 higher center 와의 關聯性等 複雜한 作用을 몇몇 實驗으로 簡單히 究明하기에는 困難하다고 生覺된다. 本實驗에서 rat 의 血液像은 AMKOA 連 7 日間投與로서 赤血球는 增加, 白血球는 減少하였으며 白血球 百分率에 있어서는 中性球는 增加하였고 淋巴球와 好酸球는 減少하였다. 또 循環好酸球는 正常 rat 에 있어서 AMKOA 投與에서 1 回投與로서는 變化가 없었고 連 3 日 投與後부터 減少를 招來하였다. 即 連續投與함으로서 循環好酸球의 減少를 認定할 수 있었으나 副腎剔出 rat 에 있어서는 循環好酸球의 減少는 認定되지 않았다.

循環好酸球 減少에 關하여서는 環境 個體差異 및 其他 여러가지 條件等으로 基因한 變動이 甚함을 考慮할 수 있다. Dougherty<sup>35)</sup> 는 副腎皮質 hormone 分泌로 因하여 淋巴組織이 顯著히 減少를 일으킨다고 하였으며 AMKOA 投與로 因한 循環好酸球減少 現象은 熊谷 및 矢野<sup>17)</sup>, 李<sup>19)</sup> 의 Gly 投與로 因한 循環好酸球減少 結果와 一致된다. 反面 AMKOA 를 投與한 副腎剔出 rat 에서 循環好酸球減少 現象이 나타나지 않는 것은 副腎皮質 hormone 存在下에서만 作用한다고 思料된다.

Rat 尿中 糖排泄量에 있어서는 連 7 日投與에서 平均値 128.6 mg/dl 로서 對照群에 比하여 增加되었다. Ashmore 等<sup>36)</sup> 은 corticoid 는 肝에서 glyconeogenesis 를 增加시킴으로서 glucose 放出量이 增加된다고 示唆하였다. 尿中 窒素의 排泄量에 있어서는 若干 增加하는 傾向이 있었으나 有意性있는 變化는 認定되지 않았다. Dolowitz<sup>37)</sup> 에 依하면 尿中窒素增加는 corticosteroid 또는 stress 로 因하여 體內淋巴組織 및 plasma-cell 의 破壞로서 放出된 protein 에 依한다고 하였다. AMKOA 投與群에 있어서 sodium 貯溜와 potassium 喪失을 觀察할 수 있었는데 이는 AMKOA 가 mineralocorticoid 類似作用과 密接한 關聯性이 있다는 것을 示唆하며 Gly 이 DCA 와의 類似作用은 化學構造上的 類似性에 起因한다는 Groen<sup>2)</sup> 의 報告와 sodium, 水分을 貯溜하고 potassium 을 喪失시킨다는 李<sup>19)</sup>, Borst<sup>4)</sup>, Molhuysen<sup>3)</sup>, Groen<sup>5)</sup>, Louis<sup>10)</sup> 等の 報告와 一致한다. 上述한 AMKOA 投與로 因한 循環好酸球의 減少, 尿中糖量의 排泄增加 및 電解質에 對한 効果는 副腎皮質 hormone 의 血中濃度 增加時와 類似하다. 그러나 이 作用이 副腎皮質 hormone 에 因한 것인지 또는 其他原因으로 招來되는 것인지를 確認코져 ACTH 의 效果에 特異하고 銳敏하게 反應하는 副腎 ascorbic acid 含量과<sup>38)</sup> 副腎 cholesterol 含量을 測定한 結果 AMKOA 1.0 mg/kg 投與群에 있어서 兩者 다같이 增加하였다. 그러나 ACTH 및 副腎皮質 hormone 의 分泌亢進으로 因하여 副腎 ascorbic acid 및 cholesterol 含量은<sup>39, 40)</sup> 減少됨에 反하여 前述한 AMKOA 投與로서

增加되었다는 것은 副腎皮質 hormone 의 排泄이 抑制된 것을 意味하는 것으로 上記 實驗結果로서 斷定키는 困難하나 腦下垂體—副腎系에 作用하여 所謂 Sayers<sup>11)</sup> 氏의 corticosteroid feed back 機轉에 因한다고 思料된다. 副腎剔出 rat 에 對한 血壓變動에서 DCA 와 cortisone 을 兼用前處置한 副腎剔出 rat 群에서는 副腎剔出로 因한 血壓下降도 阻止되었고 histamine stress 後에 있어서의 血壓下降率도 적었으나 AMKOA 를 前處置한 rat 群에서는 이와같은 作用은 認定되지 않았다. 即 副腎皮質 hormone 의 存在없이 AMKOA 의 corticosteroid 類似 効果는 認定되지 않았다. Perla<sup>12)</sup> 는 副腎 또는 腦下垂體를 剔出한 動物에 있어서 histamine 에 對한 抵抗性의 減少는 adrenocortico extract 로서 阻止할 수 있다고 하였으나 Girerd<sup>13, 14)</sup> 는 Gly 長期投與로서 副腎剔出 rat 의 生命延長이나 血壓上昇作用을 認定하지 못하였다고 報告하였다.

尿中 17-KS 는 AMKOA 投與로서 若干減少되는 傾向이 있으나 有意性있는 變化는 認定되지 않았다. 이에 對하여 熊谷<sup>17)</sup> 等은 Gly 投與로서 尿中 結合型 17-OHCS 의 顯著的한 排泄減少 및 游離型 17-OHCS 의 排泄增加를 認定하였으며 總 17-OHCS 의 排泄減少와 循環好酸球의 減少를 指摘하였다. 即 Gly 의 投與로서 生體內 steroid 가 腦下垂體刺戟으로 因하여 增加된다고 生覺하기는 困難하다. 換言하면 corticoid 分泌系의 變化로 因한 것이 아니고 代謝過程의 變化에 因한 것으로 思料되므로 AMK-OA 의 肝에서 corticoid 의 代謝에 미치는 作用을 觀察하고자 paperchromatography 로 檢討한 結果 in vitro 實驗에서 AMKOA 는 肝의 corticoid 代謝에 抑制的으로 作用하였음을 觀察하였다. 이는 Gly 이 肝에서 corticoid 代謝系에 抑制的으로 作用한다는 結果와 一致한다. 即 AMKOA 는 Gly 와 같이 corticoid 分泌系에 刺戟을 주는 것이 아니고 또 直接 corticoid 作用을 하는 것도 아니고 肝에서 corticoid 代謝過程을 抑制하여 間接的으로 corticoid 作用을 增強시킴으로서 나타나는 現象이라고 思料된다.

### V. 結 論

Gly 誘導體인 AMKOA 가 副腎皮質 hormone 分泌에 미치는 影響을 實驗하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. AMKOA 連 7 日間投與한 rat 의 血液像은 赤血球는 增加하고 白血球는 減少하는 傾向이 있었으며 白血球 百分率에 있어서는 淋巴球와 好酸球는 減少되었으며 中性球는 增加되었다.
2. 正常 rat 에 있어서는 AMKOA 連投與로서 3 日以後에 循環好酸球數의 減少가 招來되었으나 副腎剔出 rat

에 있어서는 이와같은 減少는 認定되지 않았다.

3. AMKOA 連 7日 投與로 인한 rat 尿中 糖排泄量은 對照群에 比하여 增加하였고 尿中 窒素排泄量은 有意性 있는 增加를 認定치 못하였다.

4. AMKOA 連 7日 投與한 rat 群의 histamine stress 로 인한 副腎 ascorbic acid 의 含量 및 副腎 cholesterol 의 含量은 對照群에 比하여 增加하였다.

5. AMKOA 連 7日 投與한 rat 尿中 sodium 및 potassium 排泄量에 있어서 sodium 은 減少하였으며 potassium 은 增加하였다.

6. AMKOA 連 7日 投與한 rat 尿中 17-KS 의 排泄量은 若干 減少하는 傾向이 있었으나 有意性 있는 變化는 認定치 못하였다.

7. AMKOA 連 7日 投與한 副腎 剔出 rat 群의 histamine stress 로 인한 血壓 下降度는 對照群에 比하여 別差異가 認定되지 않았으며 cortisone 과 DCA 로 前處置한 副腎 剔出 rat 群은 血壓 下降度가 顯著히 阻止되었다.

8. Paperchromatography 로 인한 剔出 肝中 AMKOA 의 corticoid 代謝에 미치는 作用은 AMKOA 는 肝에서 corticoid 의 代謝를 抑制하였다.

(摺筆함에 있어서 指導와 校閱을 하여 주신 吳鎭燮教授와, 始終 後援하여 주신 洪思岳 副教授, 林定圭 講師에게 謝意를 表하며 여러 가지로 協助하여 주신 金京鎬先生, 洪思澳先生, 金洛斗先生, 教室員 諸位에게 深謝하는 바입니다).

### ABSTRACT

#### Relation between Pharmacological Effects of 2-Acetoxy 11-Keto $\Delta^{12:13}$ 30-Acetoxy methyl Keto Oleanenic Acid and Adrenocortical Secretions

Chul Hwha Lee, M.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

(Director: Prof. Jin Sup Oh, M.D.)

It is a known fact that two molecules of glucuronic acid combined with glycyrrhetic acid make up the chemical structure of glycyrrhizin, main principle of "Kamcho" or Glycyrrhiza glabra, etc., while the structure of glycyrrhetic acid, a polyterpene compound, resembles that of phenantherene nucleus of steroid, hormone series. In view of the pharmacological similarity between glycyrrhetic acid and steroid hormones, the author conducted a series of experiment to confirm the pharmacological action of 2-Acetoxy 11-

Keto  $\Delta^{12:13}$  30-Acetoxy methyl Keto Oleanenic acid, a derivative of glycyrrhizin, which has an even more closer structure to steroid hormones, obtaining the following conclusions:

1. After a successive administration of AMKOA for 7 days, the blood picture of rats revealed an increase of red blood corpuscles and decrease of white blood corpuscles. It also revealed that lymphocytes and eosinophils were decreased, while neutrophils were increased.
2. In normal rats a successive administration of AMKOA for 3 days resulted in the decrease in the number of circulating eosinophils. No decrease was noticed in adrenalectomized rats.
3. After a successive administration of AMKOA for 7 days sugar content in rat urine appeared to be increased, while nitrogen content indicated no increase of any significance, in contrast with the control group.
4. A successive AMKOA administration seemed to produce under histamine stress an increase in adrenal ascorbic acid content and in adrenal cholesterol content, compared with the control groups.
5. A successive administration of AMKOA for 7 days resulted in an increase of potassium content in rat urine and a decrease of sodium content.
6. A 7 day administration of AMKOA was followed by a slight decrease in 17-Ketosteroid content of rat urine, with no significance recognizable in itself.
7. A 7 day administration of AMKOA produced no difference in hypotensivity of the adrenalectomized rats under histamine stress from the control group. In the group of adrenalectomized rats previously treated with cortisone and DCA an evident inhibition of hypotension was observed.
8. AMKOA had an inhibitory effect upon liver corticoid metabolism in isolated livers, by paper chromatography.

### REFERENCE

1) Keyung Ho Kim: *The Synthesis of 2-Acetoxy 11-Keto  $\Delta^{12:13}$ . 30-Oxymethyl Keto Oleanenic Acid and the others of Glycyrrhetic Acid Derivatives, the Pharmacological Studies of its Derivatives and DCA. The Korean Journal of Internal Med.*

- 6(4):189, 1963.
- 2) Revers, F.E.: *Behandeling Van Ulcus ventriculi Liquiritiae*. *Nederl. tijdschr. V.* 92:2968-2973 and 3567-3569, 1948. (*New Engl. J. Med.* 244:471, 1951에서 引用).
  - 3) Molhuysen, J.A., et al.: *Liquorice Extract with Desoxycortone-like Action*. *Lancet.* 2:381-386, 1950. (*Lancet*, April 4; 1953에서 引用).
  - 4) Borst, J.G.G., et al.: *De uitscheiding van water en electrolyten gedurende het etmaal en onder invloed von succus liquiritial*. *Acta Clin. belg.* 5: 405-409, 1950. (*New Engl. J. Med.* 244, 471, 1951에서 引用).
  - 5) Groen, J., et al.: *Extract of Licorice for the Treatment of Addison's Disease*. *New Engl. J. Med.* 244:471, 1951.
  - 6) W. I. Card, et al.: *Effects of Liquorice and Its Derivatives on Salt and Water Metabolism*. *Lancet.* April 4; 1953.
  - 7) Rowland J. Calvert.: *Liquorice Extract in Addison's Disease*. *Lancet.* April 17, 1954.
  - 8) Hennenmann, H. H., et al.: *Dtsch. Med. Wschr.* 79:1406, 1954, (日本臨狀. 15(3):583, 1957에서 引用)
  - 9) Perry B. Hudson., et al.: *Use of Glycyrrhizin after bilateral Adrenalectomy*. *New Engl. J. Med.* 251:641, 1954.
  - 10) Lawrence H. Louis., et al.: *Preparation of Glycyrrhizic Acid, The Electrolyte-active Principle of Liquorice: Its Effects upon Metabolism and upon Pituitary-Adrenal Function in Man*. *J. Lab. & Clin Med.* 47:20, 1956.
  - 11) Elmadjian, F., et al.: *The Action of Mono-Ammonium Glycyrrhizinate on Adrenalectomized Subjects and its Synergism with Hydrocortisone*. *J. Clin. Endocrinol.* 16:338, 1956.
  - 12) Groen, J., M. Frenkel, C.E. Kamminga and A. F. Willebrands: *Effect of Glycyrrhizic Acid on the Electrolyte Metabolism in Add. Disease*. *J. Clin. Invest.* 31:87, 1952.
  - 13) Galal, E.E., et al.: *Brit. J. Pharmacol.* 10:305, 1955 (*Am. J. Physiol.* 194(2):241, 1958에서 引用)
  - 14) Kraus, S. D.: *Desoxycorticosterone-mimetic Action of Ammonium Glycyrrhizin in Rats*. *J. Exp. Med.* 106:415, 1957.
  - 15) 德澤等: S.N.M.C(Neo-Strong Minophagen-C)의 臨狀的研究. 日本臨狀. 14:114, 1956.
  - 16) 柴田等: S.N.M.C, Cortisone, ACTH의 馬杉腎炎에 미치는 影響. *Allergy.* 3:197, 1954.
  - 17) Akira, Kumagai, Yano Saburo, et al.: *The Corticoid-like Action of Glycyrrhizin and the Mechanism of its Action*. *Endocrinol. Japan.* 4:17-27, 1957
  - 18) Kraus, S. D.: *Beta-Glycyrrhetic Acid on the Adrenal Ascorbic Acid of Un-stressed and Stressed Immature Female Rats*. *Nature.* 193:1082, 1962.
  - 19) Yong Chae Lee: *Experimental Studies on the Influence of Glycyrrhizin upon the Adrenocortical Effects*. *The Seoul. J. Med.* 4(3):171, 1963.
  - 20) 劉貞烈他: 白米食의 榮養學的研究(第一報). 中央化學研究所報告, 7:27, 1958.
  - 21) 李泰俊: 正常 및 副腎剔除 Rat에 있어서 *Eosinophil-level*과 *Stress* 負荷 및 *Cortisone* 投與量에 依한 變動率의 觀察. 航空醫學. 4(2):101, 1956.
  - 22) Thorn, G. W., et al.: *A test for Adrenal Cortical Insufficiency*. *J.A.M.A.* 137:1005, 1948.
  - 23) 田多井吉之助, 長田奉公共著: “好酸球의 動力學”
  - 24) Reinhold, J. G.: *Glucose. Standard Methods of Clin. Chemistry.* 1:65-70, 1953.
  - 25) The Association of Vit chemists: *Method of Vit. Assay. 2nd Ed. p 81, 1951.*
  - 26) Yasuda, M.: *J. Biochemi.* 24:429, 1936. 生化學實驗法定量篇 改 10 版: p. 382, 1957.
  - 27) R. Shoenheimer, & W.M. Sperry: *A Micro-method for the Determination of Free and Combined Cholesterol*. *J. Biol. Chem.* 106:745, 1934.
  - 28) Pearson, S.: *A Rapid Accurate Method for Determination of Total Cholesterol*. *Anal. Chem.* 23:813, 1953.
  - 29) 高島啓昌: 自律神經機能調節機構(XX), 諸生體反應時의 17KS 量의 變動에 對하여. 日本藥理學雜誌. 59:168, 1963,
  - 30) 戶木田菊次等: 癌斗 體質에 關한 實驗의 研究 (第7報) 癌斗 腦下垂體副腎機能. 日本藥理學雜誌. 60:1, 1964.
  - 31) 神田川明: (日本藥理學雜誌. 59:168, 1963에서 引用)
  - 32) 原口一廣: *Byron U, Wilson*의 非觀血의 血壓測定法의 變法. 久留米醫學會雜誌. 18:282, 1956.
  - 33) Zaffaroni, A., et al.: *Paper Chromatography of Steroids 11. Corticosteroids and Related Compounds*. *J. Biol. Chemi.* 188:763, 1950.
  - 34) Zaffaroni, A., et al.: *Identification of Corticosteroids of beef Adrenal Extract by Paper Chromatography*. *J. Biol. Chemi.* 193:749, 1951.

35. Dougherty, T. F. & White, A.: *Influence of Adrenal Cortical Secretion on Blood Elements. Science.* 98:367, 1943.
- 36) Ashmore., et al.: (中央醫學. 1:21, 1961에서 引用)
- 37) Dolowitz., et al.: (中央醫學. 1:21, 1961에서 引用)
- 38) Sayers, M. A. et al.: *The Assay of ACTH by the Adrenal Ascorbic Acid Depletion Method. Endocrinol.* 42:379, 1948.
- 39) Sayers, G., et al.: *Effects of Adrenotropic Hormone on Ascorbic Acid and Cholesterol Content of the Adrenal. Pro. Soc. Exp. Biol. & Med.* 55:238. 1944.
- 40) Sayer, G. & Sayers, M. A.: *Regulatory Effect of Adrenal Cortical Extracts on Elaboration of ACTH. Porc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 60:162, 1945.
- 41) Sayer, G.: *Physical. Rev.* 30:24, 1950. (中央醫學. 1:21, 1961.에서 引用)
- 42) Perla, D. & Gottesman, J. M.: *Effects of Cortin on Resistance of Adrenalectomized Rats to Histamine Poisoning. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 28:650 1931.
- 43) Girerd, R. J., et al.: *Production of Experimental Hypertension and Cardiovascular-Renal Lesions with Licorice and Ammonium Glycyrrhizin. Am. J. Physiol.* 194:241, 1958.
- 44) Girered, R. J., et al.: *Endocrine Involvement in Licorice Hypertension. Am. J. Physiol.* 198:718, 1960.
-