

Glycyrrhetic Acid가 간 Morphine-6-Dehydrogenase 활성에 미치는 영향

허근·김학성*·김영문**·신억섭

영남대학교 약학대학, *충북대학교 약학대학, **포항간호전문대학

(Received October 19, 1988)

Effect of Glycyrrhetic Acid on the Hepatic Morphine-6-Dehydrogenase Activity

Keun Huh, Hak-Sung Kim,* Young-Moon Kim* and Uk-Seob Shin

College of pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 632,

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763 and

**Pohang Junior College of Nursing, Pohang 795-940, Korea

Abstract—The biologically active component of licoris(Glycyrrhizae Radix L.) is considered to be glycyrrhetic acid, an aglycone of glycyrrhizin, on the basis of chemical and pharmacological studies. The present study was undertaken to investigate the effect of glycyrrhetic acid on the hepatic morphine-6-dehydrogenase activity, which catalyze morphine to morphinone. Morphine-6-dehydrogenase was further purified by centrifugation, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, sephadex G-100, hydroxyapatite column. Hepatic morphine-6-dehydrogenase activity was significantly decreased by the treatment of glycyrrhetic acid. When effect of glycyrrhetic acid on the hepatic morphine-6-dehydrogenase was investigated in vitro, it was powerfully inhibited the enzyme activity with dose-dependent manner. From the above results, glycyrrhetic acid inhibits hepatic morphine-6-dehydrogenase activity and decreases the morphine induced harmful side effects.

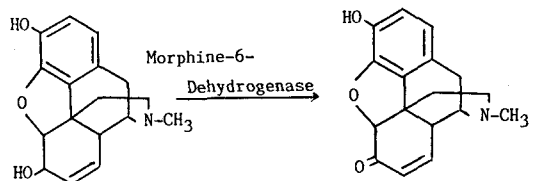
Morphine은 Sertüner에 의해서 opium에서 분리, 명명된 이래 Gulland와 Robinson¹⁾에 의해 그 구조가 밝혀졌으며 morphine에 의한 진통, 위장관운동억제 및 오심, 구토 등 다양한 약리 작용이 보고²⁻¹⁰⁾ 되어진 후 많은 연구과정을 거쳐 현재 임상에서 진통제로 사용되어지고 있다. 그러나 좋은 진통효과를 갖고 있으면서도 습관성 내지는 탐닉성유발때문에 morphine을 사용함에 있어 많은 제한을 받고 있으며 또한 안전성이 절실히 요구되어지고 있다.

이와 같은 배경을 토대로하여 EcKenhoff¹¹⁾ 등에 의해 morphine중독에 대한 해독제연구가 시작되기에 이르렀다.

Morphine은 opiate receptor 중 μ receptor에 작용하여 진통효과를 나타낸다고 밝혀져 있으며^{12,13)} endorphin, enkephalin과 같은 endogenous

compound가 morphine receptor에 작용할 것으로 생각되어지고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾

체내에 투여되어진 morphine은 주로 간에서 glucuronide포합 또는 N-demethylation되어 배설되어지며^{17,18)} 일부는 간장중의 cytosol분획에 존재하는 morphine-6-dehydrogenase에 의해 산화되어 morphinone으로 된 다음 이것이 비단백성 sulfhydryl화합물과 포함하여 뇨중으로 배설되어진다.^{19,20)}



Scheme. 1—Formation of Morphinone from Morphine by morphine-6-dehydrogenase.

투석시켰다. 투석시켜 얻은 효소액을 sephadex G-100 column에 주입하고 0.05M Na·P buffer (pH 8.0, 100mM 2-mercaptoethanol 함유)로 유출시킨다음 이 유출액을 다시 45% (NH₄)₂SO₄ 포화, 농축시킨 후 0.05M Na·P buffer (pH 8.0, 100mM 2-mercaptoethanol 함유)로 12시간 투석시킨다음 부분정제된 효소액을 hydroxyapatite column에 주입하고 stepwise gradient 방법으로 0.05M, 0.075M, 0.1M Na·P buffer (pH 8.0, 100mM 2-mercaptoethanol 함유)로 유출시켰다. 각 단계의 유출액은 단백질을 정량하면서 효소의 활성을 측정하여 정제율을 비교하였다.

Morphine-6-dehydrogenase의 활성측정—Toki 등²⁶⁾의 방법에 준해 0.1M glycine·NaOH·NaCl buffer (pH 9.7) 일정량에 β -nicotinamide adenine dinucleotide 1.5 μ mole 및 기질인 morphine 1.5 μ mole과 적당량의 흰쥐 Cytosol분획 또는 정제효소액을 첨가하고 25°C에서 20분간 반응시켰다. 반응종료 후 생성된 NADH를 파장 340nm에서 흡광도의 변화를 읽고 검량선에 준해 산정하였다.

효소의 활성도는 1시간당 1g의 단백질이 생성한 NADH의 양을 n moles로서 표시하였다.

혈청 aminotransferase의 활성측정—Reitman과 Frankel의 방법²⁷⁾에 준해 조제된 Kit를 사용하여 측정하였다.

즉 ALT(100ml당 DL-alanine 1,780mg 및 α -Ketoglutaric acid 29.2mg함유), AST(100ml당 L-aspartic acid 2,660mg 및 α -Ketoglutaric acid 29.2mg함유) 기질액 1.0ml를 가하고 37°C에서 5분간 가온한 다음 혈청 0.2ml를 넣어 37°C에서 ALT는 30분, AST는 60분간 반응시킨 후 반응을 종료시킬 목적으로 정색시약(2,4-dinitrophenylhydrazine: 100ml당 19.8mg함유) 1.0ml를 첨가한 다음 0.4N-NaOH용액을 10ml를 가해 잘 혼합하여 10분간 방치하고 파장 505nm에서 흡광도를 측정한 다음 표준곡선에 의거해 그 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 혈청 1ml당 Karmen unit²⁸⁾로 표시하였다.

단백질의 정량—단백질정량은 Lowry 등²⁹⁾의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으

로하여 측정하였다. 한편 실험결과와 통제처리 는 student t-test를 이용하였다.

실험 결과

Sephadex G-100 column을 통한 morphine-6-dehydrogenase의 정제—흰쥐 간 cytosol을 ammonium sulfate fractionation단계를 거친 다음 부분정제된 morphine-6-dehydrogenase를 sephadex G-100 column에 주입하고 0.05M Na·P buffer (pH 8.0, 100mM 2-mercaptoethanol함유)로 유출시켜 단백 및 효소의 활성을 나타내었다.

그림에서 볼 수 있듯이 단백질은 주로 25ml에서 60ml 사이에서 유출되었으며 morphine-6-dehydrogenase의 활성은 단백질이 많이 유출되어 나오는 25ml에서 50ml 사이에서 높게 나타남을 알 수가 있다. 그러므로 25ml에서 50ml사이 유출액을 모아 농축하여 다음 정제단계에 사용하였다(Fig. 1).

Hydroxyapatite column을 통한 morphine-6-dehydrogenase의 정제—Sephadex G-100 column을 통해 유출된 활성부분을 모아 농축, 투석시킨다음 hydroxyapatite column에 주입하고 Na·P buffer (pH 8.0, 100mM 2-mercaptoethanol함유)를 0.05M에서 0.1M까지 stepwise

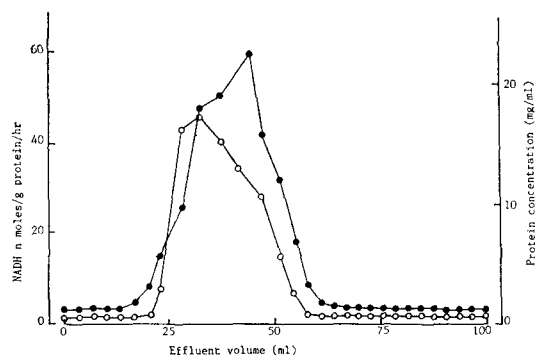


Fig. 1—Elution profile of protein and morphine-6-dehydrogenase from sephadex G-100 column. The assay was described in the experimental methods. Column diameter: 2.2cm, column length: 10cm, flow rate: 3ml/hr, ●—●; protein, ○—○; morphine-6-dehydrogenase activity.

Table. I—Purification of rat liver morphine-6-dehydrogenase

Purification step	Total protein(mg)	Total activity*	Specific activity**	Purification (fold)	Yield(%)
105,000xg centrifugation	12,144.8	137.0	11.28	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	4,084.8	80.1	19.62	1.7	58.5
Sephadex G-100 column	931.0	44.6	47.94	4.3	34.0
Hydroxyapatite column	15.0	2.8	188.88	16.8	2.1

*; NADH n moles/hr, **; NADH n moles/g protein/hr

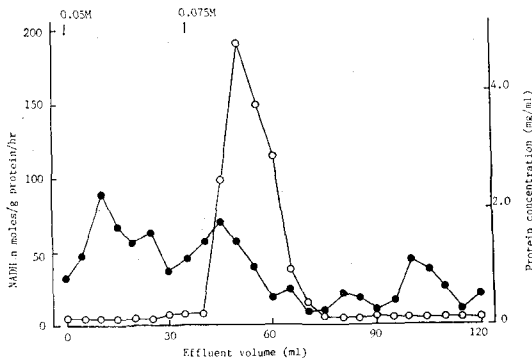


Fig. 2—Elution profile of protein and morphine-6-dehydrogenase from hydroxyapatite column. The assay procedure was described in the experimental methods. Column diameter; 1.2 cm, column length; 10cm, flow rate; 3ml/hr, ●—●, protein, ○—○; morphine-6-dehydrogenase activity.

gradient 방법으로 유출시켜 단백 및 효소의 활성을 나타내었다.

단백질은 0.05M에서부터 0.1M까지 계속적으로 유출되었으나 morphine-6-dehydrogenase의 활성은 0.075M 분획에서 높게 나타남을 알수가 있다. 그러므로 0.075M Na·P buffer로 용출되어 나온 분획을 모아 이하의 in vitro 실험에 사용하였다(Fig. 2 참조).

정제 단계별 morphine-6-dehydrogenase 활성—Cytosol 분획중에 함유되어 있는 morphine-6-dehydrogenase의 총활성치는 137.0n moles/hr이었으며 최종단계인 hydroxyapatite로 정제하였을 때는 효소의 총활성이 2.8n moles/hr로서 약 2.0%의 수율을 나타내었다. 한편 가용성분획에 함유되어 있는 morphine-6-dehydrogenase의 specific activity는 11.28n moles/g protein/hr이

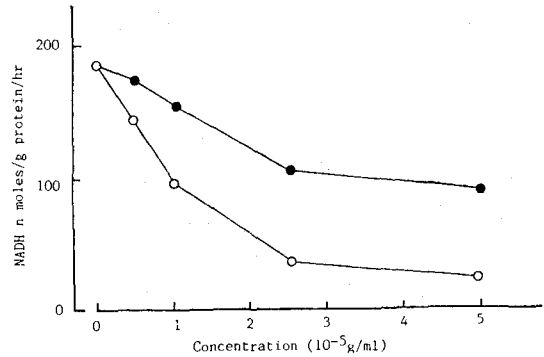


Fig. 3—Effect of glycyrrhetic acid and naloxone on the hepatic morphine-6-dehydrogenase activity in vitro.

The assay procedure was described in the experimental methods. Each point represents the means of 3 experiments. ○—○; glycyrrhetic acid, ●—●; naloxone.

있으며 hydroxyapatite column을 통과시켜 얻은 morphine-6-dehydrogenase의 specific activity는 188.88n moles/g protein/hr으로서 약 17배 정도 부분정제되었음을 알 수가 있다(Table 1 참조).

Morphine-6-dehydrogenase 활성에 미치는 glycyrrhetic acid 및 naloxone의 영향—Glycyrrhetic acid 및 morphine-6-dehydrogenase inhibitor로 알려진 naloxone을 시험관내에 농도를 달리하여 첨가하였을 때 첨가농도에 따라서 효소의 활성이 억제되어 glycyrrhetic acid를 5×10^{-5} g/ml를 첨가하였을 때는 대조치인 188.0 n moles/g protein/hr에 비해 26.0n moles/g protein/hr으로서 약 90% 정도 현저하게 억제되었으며 naloxone을 5×10^{-5} g/ml로 첨가하였을 때는 89.3n moles/g protein/hr로서 약 50%정도

억제되었다(Fig. 3 참조).

Glycyrrhetic acid 투여용량에 따른 간 morphine-6-dehydrogenase활성변화—In vitro 실험에서 glycyrrhetic acid는 효소활성을 현저하게 억제하고 있음이 관찰되었으므로 실험동물에 용량(5, 10, 20, 40mg/kg)별로 glycyrrhetic acid를 투여하면서 효소의 활성을 측정하였을 때 PEG 400만을 투여한 대조군의 효소활성이 11.3 n moles/g protein/hr인데 비해 5mg투여군은 약간 억제되었으나 유의한 것은 아니었다. 반면 10, 20, 40mg을 투여하였을 때는 효소활성이 7.6, 5.3, 3.2n moles/g protein/hr로서 대조군에 비해 약 35%, 55%, 70%정도 현저하게 억제되었다. 그러므로 이하의 실험에서는 glycyrrhetic acid를 10mg/kg을 투여한 다음 실험을 행하였다(Fig. 4 참조).

Glycyrrhetic acid 투여기간에 따른 간 morphine-6-dehydrogenase 활성변동—Glycyrrhetic acid(10mg/kg)를 투여하면서 경시적으로 효소의 활성을 관찰하였을 때 대조군의 효소활성이 11.3n moles/g protein/hr인데 비해 1일 및 2일 투여군에서는 약간 억제되는 경향은 보였으나 유의성은 없었다. 그러나 3일 투여군에

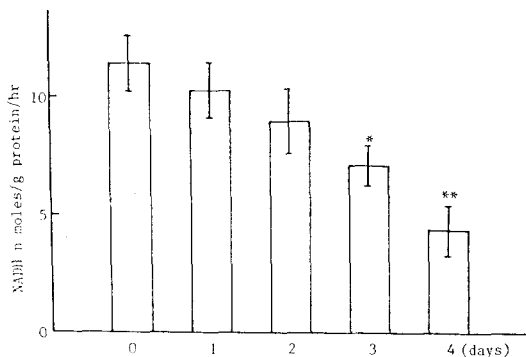


Fig. 4—Dose response of glycyrrhetic acid on the hepatic morphine-6-dehydrogenase activity in rats.

Glycyrrhetic acid(5, 10, 20 and 40mg/kg) was injected to rats intraperitoneally daily for 3 days. Rats were decapitated 24hr after the last administration. Values are means \pm S.E. of 5 animals in each group. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

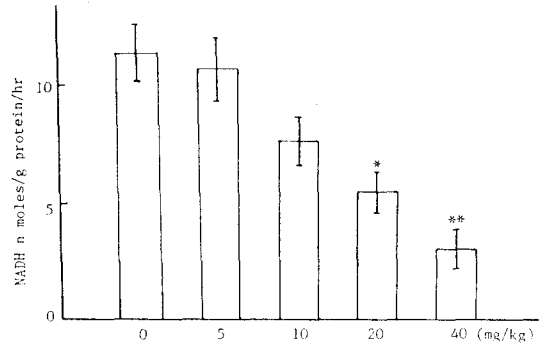


Fig. 5—Change of hepatic morphine-6-dehydrogenase activity in glycyrrhetic acid-treated rats. Glycyrrhetic acid (10mg/kg) was injected intraperitoneally in various time course before sacrifice. Rats were decapitated 24hr after the last administration. Values are means \pm S.E. of 5 animals in each group. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

서는 효소활성이 7.0n moles/g protein/hr로서 대조군에 비해 약 40%정도 유의하게 억제되었으며 4일 투여군에서는 4.2n moles/g protein/hr로서 65%정도 현저하게 억제됨을 관찰할 수 있었다. 그러므로 이하의 실험에서는 glycyrrhetic acid를 3일간 투여한 다음 실험을 행하였다(Fig. 5 참조).

Glycyrrhetic acid 투여가 morphine-6-dehydrogenase의 반응속도에 미치는 영향—Glycyrrhetic acid(10mg/kg)을 투여한 실험군과 PEG 400만을 투여한 대조군의 간으로부터 얻은 효소의 활성을 각각 측정하는 반응액에 기질의 첨가농도를 달리하면서 morphine-6-dehydrogenase의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot로 나타내었을 때 glycyrrhetic acid 투여군의 V_{max} 치는 대조군에 비해 약 1.2배 정도 감소됨을 관찰할 수 있었으나 K_m 치는 별 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 6 참조).

혈청 aminotransferase 활성에 미치는 glycyrrhetic acid의 영향—Glycyrrhetic acid (10mg/kg)을 3일간 투여한 실험군과 PEG 400만을 주사한 대조군의 혈청중 ALT 및 AST활성변화를 관찰하였을 때 ALT의 경우 대조군이 30.0 ± 2.4 Karmen unit/ml of serum이고 gly-

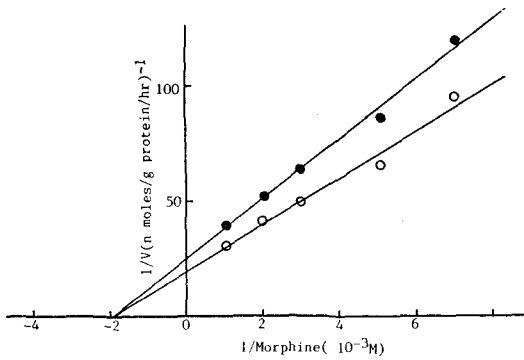


Fig. 6—Lineweaver-Burk plots of the hepatic morphine-6-dehydrogenase in glycyrrhetic acid-treated rats.

Rats were received glycyrrhetic acid intraperitoneally daily for 3 days. The reaction mixture contained 0.1M Glycine·NaCl·NaOH buffer (pH 9.7), β -nicotinamide adenine dinucleotide (1.5 μ mole) and various concentration of morphine, control or glycyrrhetic acid-treated enzyme solution. Points are the means of 3 separate experiments. \circ — \circ ; control, \bullet — \bullet ; glycyrrhetic acid (10mg/kg).

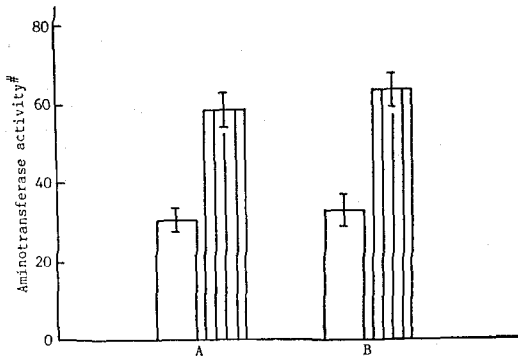


Fig. 7—Effect of glycyrrhetic acid on the serum alanine and aspartate aminotransferase (ALT, AST) activities in rats.

Glycyrrhetic acid (10mg/kg) was injected intraperitoneally daily for 3 days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means \pm S.E. of 3 experiments. #: Karmen unit/ml of serum. A; control group, B; glycyrrhetic acid-treated group. \square ; ALT, \blacksquare ; AST.

glycyrrhetic acid를 투여한 실험군이 35.2 \pm 3.2 Karmen unit/ml of serum으로서 대조군에 비해 별다른 영향을 관찰할 수 없었다.

한편 AST의 경우에 있어서도 대조군이 58.0 \pm 4.2 Karmen unit/ml of serum, glycyrrhetic acid를 투여한 실험군이 62.0 \pm 4.6 Karmen unit/ml of serum으로서 대조군에 비해 별 영향이 없다는 것을 알 수 있었다(Fig. 7 참조).

고찰

Morphine의 minor metabolic pathway의 중간 대사물인 morphinone은 양적으로는 소량이지만 독성이 강할²¹⁾뿐아니라 morphine의 중독증상과 관련이 있을 것으로 생각되어지고 있다.^{20,22,26)} morphine을 계속하여 투여하던가 다량 투여했을 경우 내성 내지는 탐닉성유발과 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각되어지므로 감초성분으로 해독작용이 있는 것으로 알려진 glycyrrhetic acid가 어떤 영향을 주는가를 관찰할 목적으로 morphinone생성효소인 morphine-6-dehydrogenase활성에 대한 작용을 비교 관찰하였다.

간 cytosol분획에 존재하는 본 효소를 부분정제하고 활성변동에 대한 glycyrrhetic acid의 영향을 관찰한 in vitro실험에서는 naloxone보다 더 강력하게 억제하였다. naloxone은 morphine의 가장 강력한 antagonist로 morphine중독의 진단 및 치료에 쓰이며³⁰⁾ morphine-6-dehydrogenase의 강력한 inhibitor임²⁵⁾을 고려할때 glycyrrhetic acid가 morphinone 생성효소를 강력하게 억제한다는 본 실험성적은 매우 흥미있는 것으로 생각된다.

Morphine-6-dehydrogenase를 정제하는 과정에서 Yamano 등²⁶⁾이 sephadex G-100 column에서 마지막 단계인 DE 32 cellulose column을 통과시켰을때 약 2배정도 정제되었는데 비해 DE 32 cellulose대신 hydroxyapatite를 사용한 본 실험에서는 전 단계에 비해 4배정도 정제되었으며 이것은 morphine-6-dehydrogenase를 정제할때 DE 32 cellulose대신 hydroxyapatite의 사용이 보다 효과적으로 정제할 수 있을 것임을 시사하여 주었다.

이와 같은 in vitro 실험성적을 토대로하여 glycyrrhetic acid를 실험동물의 복강내로 주사

하면서 관찰한 실험에서 5mg/kg을 3일간 투여한 실험군에서는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았으나 10mg/kg이상 투여시에는 morphine-6-dehydrogenase 활성이 대조군보다 40% 이상 감소되는 현저한 효소활성저해효과를 관찰할 수 있었다. 또한 morphine-6-dehydrogenase 활성을 현저하게 억제하는 용량인 10mg/kg의 glycyrrhetic acid를 4일간 계속 투여하면서 본 효소활성변동을 관찰한 실험에서 2일까지는 별다른 변동이 없었으나 3일 투여에서부터 유의성 있는 효소활성저해효과를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 효과는 glycyrrhetic acid(10mg/kg)를 3일간 투여한 후 간 cytosol 분획을 분리한 다음 ammonium sulfate fraction을 얻고 Lineweaver-Burk plots로 관찰하였을 때 얻어지는 성적으로 보아 glycyrrhetic acid는 생체내에서 morphine-6-dehydrogenase생합성에 관여하는 반응과정을 저해하기 때문에 본 효소활성을 억제할 것으로 생각되어진다.

Glycyrrhetic acid의 morphine-6-dehydrogenase활성억제작용이 간손상을 일으키는 간기능 저해작용 때문인지를 검토하기 위해 일반적으로 간기능검사의 지표로 널리 쓰이고 있는 serum aminotransferase활성변동을 관찰하였을 때 대조군의 정상치와 거의 일치하는 것으로 보아 glycyrrhetic acid가 간조직손상을 유발하기 때문에 이에 따라 morphine-6-dehydrogenase활성이 억제되었을 것이라고는 생각할 수 없었다. 뿐만아니라 pyridine으로 초래되었던 간손상이 glycyrrhetic acid에 의해 개선되었다는 보고³⁾를 고려하면 glycyrrhetic acid에 의한 효소활성억제작용은 간조직손상에 따른 작용이라고 간주할 수가 없다.

이상과 같은 실험성적을 한방고서에 앵숙과 감초가 같이 처방되어져 있다는 점과 감초가 해독제의 목적으로 이용되어지고 있음을 관련시켜 볼 때 감초성분인 glycyrrhetic acid의 morphine-6-dehydrogenase 활성억제작용을 관찰한 본 연구는 매우 흥미 있는 것으로 생각되어지며 앞으로 계속 연구를 진행하여 morphine 중독에 대한 morphinone 생성의 의의 및 이 중간대사물

생성억제작용에 대한 glycyrrhetic acid의 약리학적 평가가 기대된다.

결 론

감초성분 glycyrrhizin의 aglycone인 glycyrrhetic acid를 대상으로 하여 morphine 독성의 원인물질로 생각되는 morphinone생성효소인 morphine-6-dehydrogenase활성변동과 연관지어 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) In vitro 실험에서 glycyrrhetic acid 및 morphine-6-dehydrogenase inhibitor로 알려진 naloxone을 시험관내에 첨가하면서 morphine-6-dehydrogenase의 활성을 측정하였을 때 효소활성 억제현상을 관찰하였으며 naloxone보다 glycyrrhetic acid가 더 강력하게 억제시켰다.

(2) Glycyrrhetic acid를 용량별과 투여기간별로 실험동물에 주사하였을 때 10mg/kg을 3일간 투여한 경우가 간 morphine-6-dehydrogenase의 활성을 약 40% 정도 억제시켰다.

(3) Glycyrrhetic acid(10mg/kg)을 3일간 투여한 실험군의 혈청중 ALT 및 AST의 활성은 대조군과 별다른 차이가 없었다.

(4) Glycyrrhetic acid(10mg/kg)을 3일간 투여하여 morphine-6-dehydrogenase와 기질간의 친화력 및 반응속도를 관찰하였을 때 Km치는 별 차이가 없었으나 Vmax치는 1.2배 감소되었다.

文 獻

- 1) Gilman, A.S., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F., *The pharmacological basis of therapeutics*, 7th edition, Macmillan publishing Co. INC, New York, 491 (1985).
- 2) Pasternak, G.W., Childer, S.R. and Snyder, S.H., Opiate analgesia: Evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptor, *Science* 208, 514 (1980).
- 3) Beaver, W.T. and Feise, G.A., Comparison of the analgesic effect of morphine, hydroxyzine

- and their combination in patients with postoperative pain. *In advances in pain Research and Therapy*, (Bonica, J.J. and Albe-Fessard, D., eds), Raven press, New Work, 1, 553 (1976).
- 4) Beaver, W.T., Feise, G.A. and Robb, D., Analgesic effect of intramuscular and oral nalbuphine on postoperative pain, *Clin. Pharmacol. Ther.* 29, 174 (1981).
 - 5) Kaiko, R.F., Age and morphine analgesia in cancer patients with postoperative pain, *clin. pharmacol. Ther.* 28, 823 (1980).
 - 6) Porreca, F. and Burks, T.F., The spinal cord as a site of opoid effects on gastrointestinal transit in the mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 22 (1983).
 - 7) Duggan, A.W. and North, R.A., Electrophysiology of opoids, *Pharmacol. Rev.* 35, 219 (1983).
 - 8) Lasagna, L., The clinical evaluation of morphine and its substitutes as analgesics, *Pharmacol. Rev.* 16, 47 (1964).
 - 9) Martin, W.R., pharmacology of opoids, *Ibid* 35, 283 (1983).
 - 10) Reynold, A.K. and Randall, L.O., *Morphine and Allied Drugs*, University of Toronto press, Toronto, (1957).
 - 11) Eckenhoff, J.E. and Oech, S.R., The effects of narcotics and antagonists upon respiration and circulation in man, *Clin. Pharmacol. Ther.* 1, 483 (1960).
 - 12) Simon, E.J. and Hiller, J.M., The opiate receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 371 (1978).
 - 13) Snyder, S.H., Drug and neurotransmitter receptors in the brain, *Science* 224, 22 (1984).
 - 14) Lord, J., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W., Endogenous opoid peptides: multiple agonists and receptors, *Nature* 267, 495 (1977).
 - 15) Terenius, L., Endogenous peptides and analgesia, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 189 (1978).
 - 16) Basbaum, A.I. and Fields, H.L., Endogenous pain control system: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry, *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 309 (1984).
 - 17) Mulè, S.J., in *Narcotic Drugs, Biochem. Pharmacol.* (Clouet, D.H., ed), p.99, plenum press, New York (1971).
 - 18) Scheline, R.R., *Mammalian Metabolism of plant xenobiotics*, Academic press, London, p.421 (1978).
 - 19) Richard, D.O., James, S.M., Chris, J.V., Robert, C.B., Raymond, D.H., Alfred, E.S., Richard, W.F. and John, A.O., Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of adriamycin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215, 450 (1980).
 - 20) Nagamatsu, K., Kide, Y., Terao, T., Ishida, T. and Toki, S., Effect of morphinone on opiate receptor binding and morphine-elicited analgesia, *Life Science* 31, 1451 (1982).
 - 21) Nagamatsu, K., Kido, Y., Terao, T., Ishida, T. and Toki, S., Effect of sulfhydryl compounds on acute toxicity of morphinone, *Life Science* 30, 1121 (1982).
 - 22) Ahlijanian, M.K. and Takemori, A.E., Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and-dependent Mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236, 615 (1985).
 - 23) 市川, 齊藤, 醫學と生物學 15, 5 (1949).
 - 24) 進藤, 芳賀, アレルギー 2, 332 (1954).
 - 25) Yamano, S., Nishida, F. and Toki, S., Guinea pig liver morphine-6-dehydrogenase as a naloxone reductase, *Biochem. Pharmacol.*, 4321 (1986).
 - 26) Yamano, S., Kageura, E., Ishida, T. and Toki, S., Purification and characterization of Guinea pig liver morphine-6-dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 260, 5259 (1985).
 - 27) Reitman, S. and Frankel, S., A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56 (1957).
 - 28) La Due, J.S., Wroblewski, F. and Karmen, A., Transaminase activity in human blood, *Science* 120, 474 (1954).
 - 29) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265

- (1951).
- 30) McNicholas, L.F. and Martin, W.R., New and experimental therapeutic roles for naloxone and related opoid antagonist, *Drugs* 27, 81 (1984).
- 31) 鄭丁錄, 甘草成分의 藥理作用에 관한 研究, 博士學位論文, 嶺南大, (1985).