

구속스트레스를 가한 흰쥐에서 Cholate류의 항스트레스작용에 관한 연구

박 인 · 김양일 · 이선미 · 조태순*
성균관대학교 약학대학

Anti-stress Effect of Cholic acid Derivatives in Restraint Stress Induced Rats

In PARK, Yang Il KIM, Sun-Mee LEE and Tai Soon CHO*
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-776, Korea

Abstract—This study was done to investigate whether cholic acid derivatives have anti-stress activity and what is a cause of this anti-stress effect. Seven cholic acid derivatives (cholic acid, taurocholic acid, ursodeoxycholic acid, tauroursodeoxychoic acid, chenodeoxy cholic acid, dehydrocholic acid, hyodeoxycholic acid) were used, silymarin and valproic acid were used as positive controls. Stress was induced by restraint immobilization technique plus water immersion (24hrs) and adrenal weight, spleen weight, adrenal ascorbic acid, serum cholesterol, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), adrenal cholesterol, glucose and corticosterone levels were measured as stress indicators. Most cholic acid derivatives markedly decreased the adrenal weight, and TUDCA and DHCA increased the spleen weight. The restraint stress induced increments in serum LDH, ALP and cholesterol were attenuated by most cholic acid derivatives. Cholic acid, taurocholic acid and tauroursodeoxycholic acid only increased the content of adrenal ascorbate. While valproic acid showed an inhibitory effect against stress, silymarin did not. Our findings suggest that most cholic acid derivatives have anti-stress effect and that their anti-stress effect is, in part, related to choleric activity.

Keyword □ restraint stress, cholic acid derivatives, anti-stress effect, choleric activity.

일반적으로 스트레스란 생체에 미치는 환경적, 정신적, 신체적 자극으로, 생체는 이러한 자극에 대하여 항상성을 유지하기 위해 여러 저항반응을 나타내게 된다. 즉 스트레스는 중추신경계(Glavin 등, 1985)를 비롯한 면역계(David 등, 1990), 소화기계 및 심혈관계(Selye, 1983) 등에 작용하여 긴장성 두통, 편두통, 피로, 소화불량, 위궤양, 고혈압 등과 같은 비특이적 전신적 증후군(general adaptation syndrome)을 일으키지만(Selye, 1958) 이는 환경변화에 대한 항상성 유지를 위한 생체의 조절과정이라 할 수 있다.

스트레스의 유발 기전과 이것이 신체에 미치는 영향에 대해서는 아직 정확히 알려져 있지 않지만 스트레스에 의한 반응들은 주로 시상하부-뇌하수체-부신계를 통하여 이루어지며(Selye, 1950; Chowers 등, 1967; Hodges 등, 1976; Laurel 등, 1989) 상호 복잡하게 연관되어 서로에게 영향을 주게 된다. 외부로부터의 자극은 대뇌의 변연계(limbic sys-

tem)에 영향을 주며 이는 뇌하수체로부터 ACTH의 분비를 자극하고, 이것은 부신피질을 자극하여 ascorbic acid의 소비와 corticosteroid의 생합성을 촉진하게 된다(Selye, 1936).

최근 이러한 스트레스를 억제시키는 약물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 그중 현재 간질환에 널리 사용되고 있는 ursodeoxycholic acid가 스트레스에 의해 유발된 궤양과 위점막의 지질과산화물을 억제시킨다고 한다(Kawamura 등, 1989; Cho 등, 1995)고는 하나 이에 대한 기전 연구는 매우 미약한 실정이다.

이에 본 연구에서는 이미 보고된 ursodeoxycholic acid의 항스트레스작용의 기전규명의 일환으로 여러 cholic acid 유도체의 항스트레스작용을 검색하고, 다음으로 비콜린산성 이담제인 valproic acid와 비이담성/간장치료제인 silymarin을 대조약물로 하여 cholic acid 유도체의 항스트레스작용이 cholic acid 유도체의 모핵구조에 기인되는 것인지, 또는 그들이 가지고 있는 이담작용에 의한 것인지를 알아보고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

실험재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 190-220 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 제일상사로부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 대학 동물사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 동물실 내의 명암을 12시간으로 자동조절시켰으며 온도는 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 14\%$ 로 유지하였고 제일제당(주)의 사료를 급식하였으며 물은 자유롭게 섭취토록 하였다.

스트레스의 부과

24시간 동안 절식시킨 흰쥐를 stress cage(Natume, Japan)에 넣고 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 물에 1/3정도 담근 후 실온($24 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 24시간 절식절수 상태로 방치하였다. Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 구입한 cholic acid 유도체(cholic acid, CA; taurocholic acid, TCA; chenodeoxycholic acid, CDCA; ursodeoxycholic acid, UDCA; tauroursodeoxycholic acid, TUDCA; dehydrochoic acid, DCA; hyodeoxycholic acid, HDCA) 들은 0.07 mmole/kg, 비콜린산성 이담제(non-cholic acid choloretics)인 valproic acid(Searl Ciba-Geigy)는 150 mg/kg, 비이담성 간장치료제인 silymarin(Dae Woong Co.)은 25 mg/kg의 용량을 1% carboxy methyl cellulose에 현탁하여 사용하였으며 투여간격은 스트레스 부과 2시간 전, 스트레스 부과 후 4, 19시간에 경구투여 하였다. 스트레스 부과 24시간 후에 동물을 ether로 마취하여 복부대동맥으로 혈액을 채취한 후 장기를 적출하여 실험에 사용하였다.

장기 무게의 측정

흰쥐의 복부를 절개하여 비장을 적출하고 장기 주위를 둘러싸고 있는 지방조직을 제거한 후 무게를 측정하였다. 부신도 적출한 후 피막을 완전히 제거하였으며 양쪽 부신을 합하여 무게를 측정하였다.

부신내 ascorbic acid 함량 측정

무게가 측정된 부신을 5% TCA(trichloroacetic acid) 용액 1 ml에 넣고 약 30초간 균질화 시킨 다음, 이 용액을 원심 분리용 튜브에 넣어 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 정량반응을 위하여 5% TCA 용액에 상등액 0.5 ml를 혼합하고 0.1 ml H_3PO_4 (85%), 0.8 ml di-pyridyl(1 w/v%), 0.1 ml ferric chloride(3 w/v%)를 차례로 첨가하였다. 시약을 완전히 섞고 상온에서 15분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 부신중의 ascorbic acid 함량을 측정하였다(Zannoni 등, 1974).

혈액과 부신 내 cholesterol 함량 측정

혈청 0.5 ml를 취하여 초산 에틸-에탄올(1:1) 혼합용액 5 ml과 잘 섞은 후 5분 동안 원심분리한다. 상등액 0.5 ml를 취하여 FeCl_3 (0.07 w/v%, acetic acid) 1.0 ml를 가한 다음 진한 황산(98%) 1.0 ml를 가한 후 상온에서 냉각시킨 다음

550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 부신에서의 cholesterol 함량은 부신을 PBS(phosphate buffered saline) 1.0 ml에 넣고 약 30초간 균질화시킨 후 혈청 중에서의 측정과 같은 방법으로 하였다(Flegg, 1973).

혈액 분석

복부 정중선을 따라 흰쥐를 개복한 후 복부대동맥에서 혈액을 채취한 다음 상온에서 약 30분 동안 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 혈청은 Sigma kit (Sigma Chemical Co., USA.)를 이용하여 혈액생화학적 분석을 시행하였으며 혈액의 분석항목은 스트레스와 관련이 있다고 생각되는 lactate dehydrogenase(LDH), alkaline phosphatase(ALP), glucose를 선정하여 스트레스 지표로서 사용하였다(Bowers와 McComb, 1973).

혈중 corticosterone 측정

채취한 혈청을 Wei와 Wei(1992)의 방법에 따라 C_{18} Sep-pak cartridge에 처리한 다음 1.0 ml 메탄올로 추출하였다. 추출액 중의 corticosterone 함량은 다음과 같은 HPLC system 조건에서 측정하였다.

Column: Lichrospher[®] 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$, Merck)

Mobile phase: methanol/isopropanol/water (35:10:55)

Flow rate: 1.0 ml/min

Injection volume: 100 μl

internal standard: Fluocinonide

통계학적 분석

모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료 분석은 one-way ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

장기무게

Fig. 1에서 보는 바와 같이 스트레스 24시간 부과시 부신은 $16.4 \pm 0.4 \text{ mg}/100\text{g b.wt.}$ 에서 $20.4 \pm 0.4 \text{ mg}/100\text{g b.wt.}$ 로 현저하게 비대되었고 이는 대부분의 cholic acid 유도체와 valproic acid, silymarin의 투여로 유의적으로 억제되었으나 정상적인 흰쥐의 부신 무게까지는 감소시키지 못하였다. 그러나 이외는 달리 비장의 무게는 스트레스 부과에 의해 $364 \pm 13 \text{ mg}/100\text{g b.wt.}$ 에서 $138 \pm 5 \text{ mg}/100\text{g b.wt.}$ 로 현저한 감소를 보였으며 이러한 감소는 일부 cholic acid 유도체 즉, TUDCA, CDCA 및 DHCA 투여군에서만 억제되었다. 특히 valproic acid 투여군에 있어서는 스트레스로 유도된 비장위축에 거의 영향을 받지 않았다(Fig. 2).

부신내 ascorbic acid 함량

Fig. 3에서 보듯이 부신중 ascorbic acid 함량은 24시간 스트레스 유도에 의해 $217 \pm 7 \text{ mg}/100 \text{ g ad.wt.}$ 에서 181 ± 3

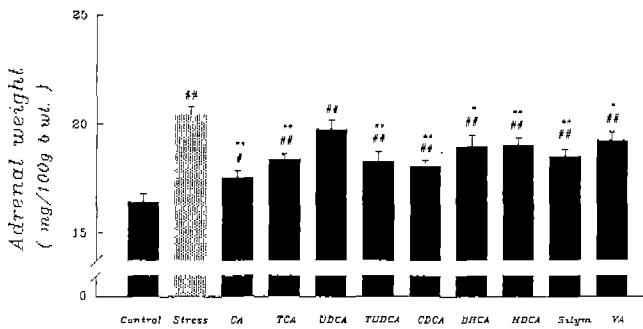


Fig. 1. Effect of cholic acid derivatives on adrenal weight in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ vs control group. $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ vs stress group. CA, cholic acid; TCA, taurocholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DHCA, dehydrocholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; silym, silymarin; VA, valproic acid.

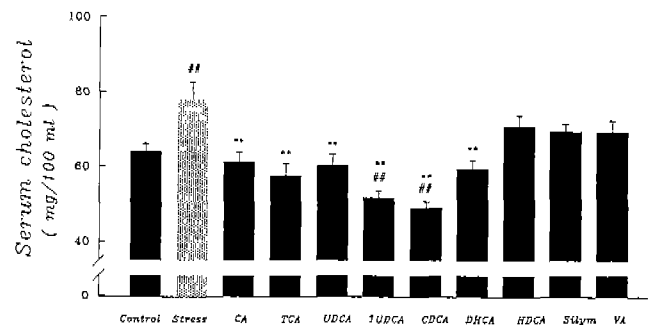


Fig. 4. Effect of cholic acid derivatives on serum cholesterol in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. $^{\#\#}p<0.01$ vs control group. $^{**}p<0.01$ vs stress group.

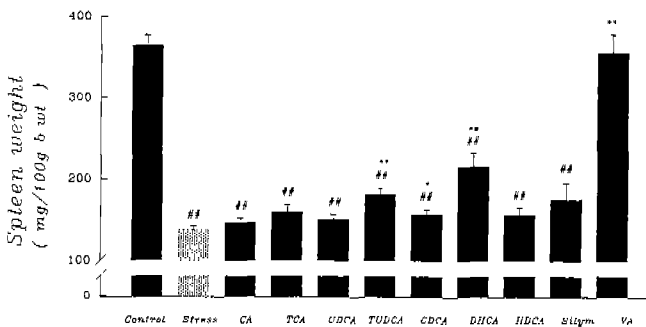


Fig. 2. Effect of cholic acid derivatives on spleen weight in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. $^{\#\#}p<0.01$ vs control group. $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ vs stress group.

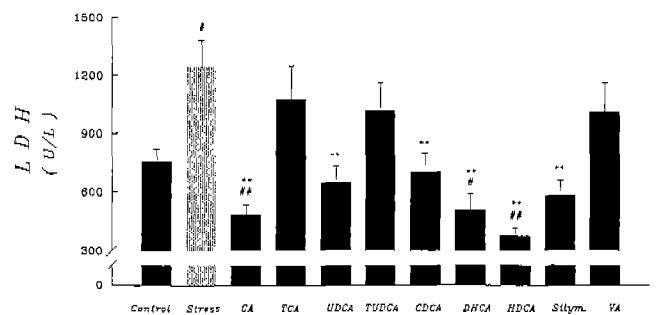


Fig. 5. Effect of cholic acid derivatives on lactate dehydrogenase in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ vs control group. $^{**}p<0.01$ vs stress group.

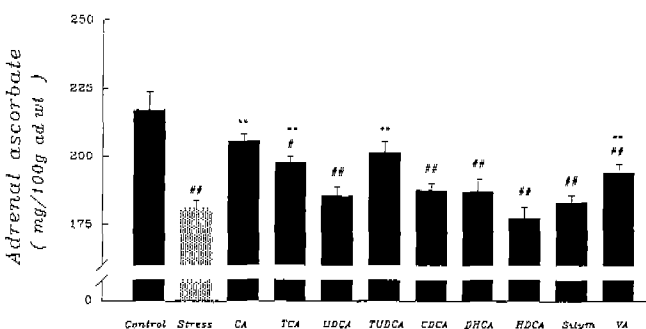


Fig. 3. Effect of cholic acid derivatives on adrenal ascorbate in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ vs control group. $^{**}p<0.01$ vs stress group.

mg/100 g ad.wt.로 현저히 감소하였으며 이러한 감소는 CA, TCA, TUDCA 및 valproic acid 투여군에서 유의성 있게 억제되었다.

혈중 cholesterol

Fig. 4에서 보듯이 스트레스에 의해 혈중 cholesterol은 64 ± 2 mg/100 ml에서 78 ± 5 mg/100 ml로 현저한 증가를 보였으며 이러한 증가는 HDCA를 제외한 모든 cholic acid 유도체에 의해 억제되었으며 valproic acid와 silymarin 투여군은 대조군과 차이가 없었다.

혈액 분석

Fig. 5에서 보는 바와 같이 스트레스 부과시 혈중 LDH가 유의성있게 증가하였으며 이는 CA, UDCA, CDCA, DHCA, HDCA와 silymarin에 의하여 감소되었다. ALP에 있어서도 스트레스에 의하여 유의성 있는 증가를 보였으며 대부분의 cholic acid에서 이러한 증가를 억제하였다(Fig 6).

혈중 corticosterone

스트레스의 부과는 혈중 corticosterone의 수치를 16 ± 3 μ g/100 ml에서 37 ± 5 μ g/100 ml로 증가시켰으며 이는 TUDCA 및 valproic acid 투여에 의해서도 영향을 받지 않았다(Table I).

부신내 cholesterol 함량

부신내 cholesterol 함량은 스트레스에 의해 521 ± 103 mg/100g ad.wt.에서 138 ± 13 mg/100 g ad.wt.로 유의성 있는 감소를 나타내었으며 이는 TUDCA 및 valproic acid 투

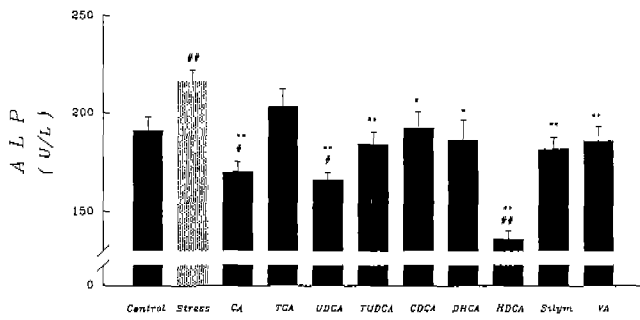


Fig. 6. Effect of cholic acid derivatives on alkaline phosphatase in restraint stress-induced rats. Each bar is expressed as means \pm S.E.M. for 20 rats per group. * p <0.05, # p <0.01 vs control group. * p <0.05, ** p <0.01 vs stress group.

Table I. Effects of TUDCA and valproic acid on corticosterone, adrenal cholesterol and glucose in restraint stress-induced rats

Index Group	Corticosterone (μ g/100 ml)	Adrenal cholesterol (mg/100 g ad.wt.)	Glucose (mg/dl)
Control	15.61 \pm 2.21	520.86 \pm 10.33	99.91 \pm 3.82
Stress	37.30 \pm 5.07 ^{##}	137.93 \pm 12.92 ^{##}	115.24 \pm 4.56 [#]
TUDCA	32.12 \pm 5.21 ^{##}	193.50 \pm 6.50 ^{##}	113.14 \pm 3.57 [#]
Valproic acid	31.04 \pm 5.31 ^{##}	183.58 \pm 23.08 ^{##}	81.49 \pm 5.84 ^{##, #}

Values are means \pm S.E.M. for 10 rats per group.

p <0.05, ## p <0.01 vs control group.

** p <0.01 vs stress group.

여에 의해서도 영향을 받지 않았다(Table I).

혈중 glucose

스트레스에 의해 혈중 glucose는 유의성 있는 증가를 나타내었으며 이는 TUDCA에 의해서는 별다른 차이를 보이지는 않았으나, valproic acid에 의하여는 이의 증가를 유의성있게 억제하였다(Table I).

고 찰

스트레스는 생체에 교감신경계 및 뇌하수체-부신계의 기능 향진에 의해 모든 반응이 매개되어 정동반응을 일으키는 것과 동시에 운동기능 및 자율기능에도 영향을 미친다고 알려져 있다(Brekhman 등, 1969). 최근 스트레스에 대한 반응을 억제시키는 약물의 검색이 활발하게 이루어지고 있고, 그 결과로서 인삼, *Ocimum sanctum*, *Tinospora malabarica* 등의 생약과 melatonin 등의 생체물질이 항스트레스 작용을 나타낸다고 보고되었으며(Brekhman 등, 1969; Sen 등, 1992) 더 나아가 최근에 간질환 치료에 가장 널리 쓰이고 있는 약물인 ursodeoxycholic acid도 항스트레스작용이 있다고 보고되어 현재 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kawamura 등, 1989; Cho 등, 1995).

스트레스에 의해 일어나는 생체의 여러 반응들은 시상하부-뇌하수체-부신계(hypothalamic -pituitary-adrenal axis)를 통하여 일어나며(Selye, 1950; Chowder 등, 1967; Hodges 등, 1976; Laurel 등, 1989), 이는 중추신경계의 외부자극에 대한 감지를 통하여 시작된다. 중추신경계의 변연계는 외부의 자극에 대한 생체의 적응현상을 나타내는데 있어 중요한 역할을 하는 기관으로 알려져 있으며, 대뇌 피질과 시상하부를 연결하는 장소이기도 하며 외부자극에 대한 감지는 시상하부의 CRF(corticotropin-releasing factor)의 분비를 자극하고 이는 뇌하수체의 ACTH의 분비를 자극하여 시상하부-뇌하수체-부신계의 일련반응들이 시작하게 된다. 이에 따라 혈중 catecholamine, corticosteroid의 증가, 부신의 비대 및 부신내 cholesterol과 ascorbic acid의 함량 감소, 비장을 비롯한 여러 면역기관들의 비대 및 면역세포들의 감소, LDH등의 혈중 효소의 변화들이 나타나는 것으로 알려져 있으며 따라서 현재는 이들을 항스트레스 평가지표로도 삼고 있다(Selye, 1950; Dallman 등, 1977; Conner 등, 1971; Christina 등, 1989).

예상했던 바와 같이 본 연구결과에서도 스트레스에 의하여 부신의 무게가 현저하게 증가하였으며 이는 cholic acid 유도체, valproic acid 및 silymarin에 의해 억제되었다. 스트레스에 의한 부신 비대는 호르몬의 영향을 크게 받아 스트레스 부과 초기에 부신비대 현상이 종료된다고 알려져있으므로(Cho 등, 1995) 이들 약물에 의한 부신무게의 감소는 스트레스 부과 초기의 호르몬의 증가와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 또한 스트레스는 현저한 비장의 위축을 유도하였으며 이는 일부 cholic acid 유도체와 valproic acid에 의해서만 억제되었다. 이는 cholic acid 유도체들이 부신과 면역계와 관련된 비장에 미치는 영향이 각기 다를 수 있음을 암시하며 valproic acid에 의한 현저한 비장무게의 증가는 이 약물이 호르몬과 면역계에 독특한 작용이 있음을 제시한다.

Ascorbic acid는 부신에서의 corticosteroid 합성과정에 관련된 것으로 알려져 있으며 부신내 ascorbic acid양은 스트레스 초기에 빠르게 감소하며 시간이 지날수록 호르몬의 분비가 감소함에 따라 다시 증가된다고 한다(Cho 등, 1995). 본 실험에서 스트레스의 유도는 이러한 부신의 ascorbic acid 함량을 현저히 감소시켰으며 이는 일부 cholic acid 유도체와 valproic acid에 의해서만 이의 감소를 회복시켰다.

스트레스에 의한 혈중 corticosteroid의 증가는 지질대사에 영향을 주어 혈중 cholesterol의 수치를 증가시킨다. 본 실험에서도 스트레스의 부과는 혈중 cholesterol을 증가시켰으며 이는 대부분의 cholic acid 유도체 투여군에서 감소되었다.

스트레스의 부과는 혈중 LDH와 ALP를 증가시켰으며

일부 cholic acid 유도체 투여군에서 이들을 현저하게 감소시켰으나 LDH의 경우 개체와 군간에 차이가 크게 나타났다. Cho 등(1995)에 따르면 혈중 LDH와 ALP는 ALT 및 AST 등 다른 효소에 비해 corticosteroid 영향을 많이 받는다고 한다.

스트레스에 의한 corticosterone, 부신의 cholesterol 함량, glucose에 있어서의 변화는 TUDCA와 valproic acid의 투여에 의해 유의성있게 억제되지 않았으나 corticosterone의 경우 스트레스 부과 후 시간이 경과함에 따라 생체의 적응현상에 의하여 차차 감소한다고 알려져 있고 약물투여군에 있어서 stress군과 그 수치가 크게 차이가 나지 않는 것으로 보아 이들이 이미 생체의 상당한 적응현상을 나타내었기 때문이 아닌가 사료된다.

이상의 결과로 보아 대부분의 cholic acid 유도체는 동일한 효과를 나타내진 않았으나 항스트레스작용이 있는 것으로 보이며, 이중 이담작용이 비교적 강한 것으로 알려진 TUDCA가 가장 큰 효과를 나타내었고 이는 또한 비콜린산성 이담제인 valproic acid에 의해서는 현저하게 나타나나 비이담성 간장치료제인 silymarin에 의해서는 효과가 없는 것으로 보아 이같은 cholic acid 유도체의 항스트레스작용은 cholic acid 유도체의 보핵구조에 기인된다기보다는 그들이 가지고 있는 이담작용에 일부 관련되는 것 같다.

참고문헌

- Bowers, G. N. and McComb, R. B. (1975). Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.* **21**, 1988-1995.
- Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. (1969). Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and eleutherococcus. *Lloydia.* **32**, 46-59.
- Cho, T. S., Lee, S. M., Yeom, J. H., Yu, E. J., Lim, S. W., Jang, B. S., Kim, Y. H., Yu, Y. M. and Park, M. H. (1995). Anti-stress effects of ursodeoxycholic acid on the restraint stress in rats. *Yakhak Hoeji* **39**, 548-553.
- Chowers, I., Conforti, N. and Feldman S. (1967). Effect of corticosteroids on hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF) and pituitary ACTH content. *Neuroendocrinol.* **2**, 193-199.
- Christina, J., Hans, W. and Hans, M. (1989). Haematological changes during acute mental stress. *Br. J. Haemat.* **71**, 153-156.
- Conner, R. L., Vernikos-Danellis, J. and Levine, S. (1971). Stress, fighting and neuroendocrine function. *Nature* **2**, 564-566.
- Dallman, M. F., Engeland, W. C. and McBride, M. H. (1977). The neural regulation of compensatory adrenal growth. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **297**, 373-392.
- David, N. K., Anthony, J. M., and Robert, E. F. (1990). Effects of stress on the immune system. *Immunology today* **11**, 170-176.
- Glavin, G. B. (1985). Stress and brain noradrenaline : A review. *Neuro. Biobeh. Rev.* **9**, 233-241.
- Hodges, J. R. (1976). The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *J. Pharm. Pharmac.* **28**, 379-382.
- Kawamura, T., Koiaumi, F. and Ishimori, A. (1989). Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats. *Nippon-Shokakibyō-Gakkai-zasshi.* **24**, 2373-2378.
- Laurel, A. Ficher (1989). Corticotropin-releasing factor : endocrine and autonomic integration of responses to stress. *TIPS.* **10**, 189-193.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* **138**, 32.
- Selye, H. (1976). *Stress in health and disease.* Butterworths, Boston, MA.
- Selye, H. (1950). *The physiology and pathology of stress.* Acta Inc., Montreal.
- Selye, H. (1983). *Selye's guide to stress research.* Van Nostrand Reinhold Co., N.Y.
- Selye, H. (1958). *The stress of life.* Longmans Green and Co., Toronto.
- Sen, P., Maiti, P. C., Puri, S. and Ray, A. (1992). Mechanism of anti-stress activity of *Acimum sanctum* Linn, eugenol and *Tinospora malabarica* in experimental animals. *Ind. J. Exper. Biol.* **30**, 592-596.
- Ward, A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M. and Avery, G. S. (1984). Ursodeoxycholic acid: A view of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **27**, 95-131.
- Wei, Ji-Qing and Wei, Ji-Lu (1992). Serum steroid hormonal profiles by reversed phase liquid chromatography in patients with 17-hydroxylase deficiency and in an affected family. *Clin. Chem.* **38**, 72-82.
- Zannoni, V., Lynch, M., Goldstein, S. and Sato, P. (1974). A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. *Biochem. Med.* **11**, 41-48.