

甘草 Alkaloidal Fraction 의 平滑筋에 對한 Acetylcholine 拮抗作用

—감초 알칼로이드에 관한 연구 (제 3 보)—

서울대학교 醫科大學 藥理學教室

金明石 · 吳鎮燮 · 洪思岳

Abstract=

Antimuscarine-like Action of Licorice Alkaloidal Fraction on Intestinal Smooth Muscle

—Studies of Alkaloid of Glycyrrhiza glabra L. III—

Myung Suk Kim, M.D., Jin Sup Oh, M.D. Ph.D. and Sa Ack Hong, M.D. Ph.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Antimuscarinic agent like antispasmodic actions of licorice alkaloidal fraction, obtained from the *Glycyrrhiza glabra* L., was compared with that of atropine quantitatively.

For this purpose, the author calculated the kinetic constants and ED_{50} for acetylcholine antagonism by these drugs on rat ileum and guinea-pig ileum longitudinal muscle according to Paton's theoretical equations describing the combination of an antagonist drug with its receptors.

The results are as follows.

1. On rat ileum.

a) Licorice alkaloidal fraction

$$K_1 \text{ (association rate constant)} = 4.078 \times 10^2 \text{ (s}^{-1} \text{ gm}^{-1} \text{ ml)}$$

$$K_2 \text{ (dissociation rate constant)} = 6.986 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

$$ED_{50}(K_2/K_1) = 1.772 \times 10^{-6} \text{ (gm/ml)}$$

b) Atropine

$$K_1 = 5.136 \times 10^6, K_2 = 7.714 \times 10^{-4}$$

$$ED_{50} = 1.408 \times 10^{-10}$$

2. On guinea-pig ileum longitudinal muscle

a) Licorice alkaloidal fraction

$$K_1 = 1.30 \times 10^2, K_2 = 1.25 \times 10^{-3}$$

$$ED_{50} = 9.58 \times 10^{-6}$$

b) Atropine

$$K_1 = 5.75 \times 10^6, K_2 = 1.54 \times 10^{-3}$$

$$ED_{50} = 2.68 \times 10^{-10}$$

Above results present that 1 r of licorice alkaloidal fraction has equal potency of acetylcholine antagonism with 8.5×10^{-5} r of atropine on rat ileum, 2.8×10^{-5} r on guinea-pig ileum longitudinal muscle.

This facts suggest that the site and numbers of licorice alkaloid receptors of guinea-pig ileum are different from that of rat ileum.

Besides, it also gives a suggestion that licorice alkaloidal fraction may be a partial antagonist on guinea-pig ileum in this experimental conditions.

I. 緒 論

甘草(Glycyrrhiza glabra L.)는 古來로 漢方에서 많이 사용되어온 藥材로서 本草綱目에 依하면 解毒作用 및 急迫症狀에 對한 緩解 鎮座作用의 記錄이 있고 獨逸에서는 胃病으로 因한 痙攣을 緩解하는 民間 藥으로 알려져 있다.

成分으로는 主甘味成分인 glycyrrhizin, glabric acid, flavon 配糖體에 속하는 liquiritin 과 isoliquiritin, sucrose, glucose, mannitol, asparagin, 其他 若干의 苦味質, 樹脂, 纖維 등을 含有하고 있다.

1948 年 Revers¹⁾가 胃 및 十二指腸潰瘍에 對한 甘草 extract 의 우수한 치료효과를 보고한 이래로 甘草에 對한 研究는 注目을 끌게 되었으며, 이의 antispasmodic activity 에 對해서도 많은 研究 報告가 있었다. 即 Neleman²⁾과 Stamperus 등은 甘草成分中 liquiritin 에 antispasmodic activity 가 있다했고, Shibata³⁾도 甘草의 antispasmodic activity 는 liquiritin 과 isoliquiritin 에 基因한다고 報告했다. 그리고 Takagi⁴⁾는 glycyrrhizin 을 除外한 甘草 extract 의 methanol fraction 이 guinea-pig ileum 에 對해서 弱한 antispasmodic action 을 나타내고 그 作用樣相은 腸管平滑筋에 對한 papaverine 樣 및 微弱한 antihistamine 樣, anti-acetylcholine 樣作用이라고 報告했으며 三橋⁵⁾는 甘草 total extract 에서 rat ileum 에 對한 筋弛緩作用을 觀察하고 이의 atropine unit 를 算出해 냈으나 그 作用物質을 指摘하지는 못했었다.

한편 本教室에서 洪, 康^{6,7)} 등은 甘草 ethanol extract 中 alkaloid 一般抽出法에 依하여 chloroform 에 移行되는 部分을 paper partition chromatography 했을때 R_f值가 0.91, 0.85, 0.71, 0.67 및 0.53 인 다섯개의 spot 로 檢索되는 알려지지 않았던 alkaloidal fraction 을 分離해 냈고 이를 guinea-pig 摘出腸管 등에 對해 實驗한 結果, 현저한 腸管筋弛緩作用을 招來한다고 했으며 이런 弛緩作用은 acetylcholine 에 의하여 拮抗될 뿐 아니라 反對로 acetylcholine 에 의해서 일어나는 收縮作用은 이 alkaloidal fraction 이 억제 한다고 했다. 또한 腸管平滑筋에 직접 作用하는 barium chloride 에 依해서 招來되는 收縮作用에는 別變化를 가져오지 않는 것을 觀察했다.

상기한 結果들을 종합하여 洪, 康 등은 이와 같은 甘草 alkaloidal fraction 의 腸管平滑筋에 對한 作用樣相을 antimuscarinic 한 것이라고 示唆하였다.

著者들은 今般 이런 腸管平滑筋에 對한 甘草 alkaloidal fraction 의 antimuscarine 樣作用을 보다 定量的으로 추궁할 目的下에 Paton⁸⁾이 記述한 拮抗藥物이 receptor 와 combination 할 때 成立되는 理論式에 의거하여, 甘草

alkaloidal fraction 의 acetylcholine 에 對한 拮抗藥物로서 의 kinetic constant 및 ED₅₀를 算出해 냈으며, 이를 既知 antimuscarinic agent 中 가장 著明한 atropine 과 比較 檢討하였다.

Paton 이 記述한 理論式은 다음과 같으며 이때 藥物과 腸管組織 사이에 diffusion delay 는 없는 것으로 看做한다.

i) 拮抗藥物과 receptor 간에 equilibrium 이 成立됐을 때의 receptor occupancy P_e는

$$P_e = \frac{x}{x + K_x} \quad (1)$$

x(gm/ml): 拮抗藥物의 濃度

K_x(gm/ml): equilibrium constant

ii) equilibrium 이 이루어지기 前, onset of antagonism 時의 receptor occupancy P_t는

$$P_t = P_e - P_e e^{-(K_1x + K_2)t} \quad (2)$$

K₁(s⁻¹gm⁻¹ml): association rate constant

K₂(s⁻¹): dissociation rate constant

t: 拮抗藥物과 receptor 간의 접촉시간

iii) 拮抗藥物의 濃도가 零으로 됐을 때 即 decline of antagonism 時의 receptor occupancy

$$P_t = P_e e^{-K_2t} \quad (3)$$

iv) 一般的으로 어떤 때에 서고간의 receptor occupancy 는

$$P = \frac{DR - 1}{DR} \quad (4)$$

DR: Dose Ratio

拮抗藥物을 넣지 않았을 때 一定 standard response 를 나타내는 agonist 의 dose 對 拮抗藥物 첨가후에 그 standard response 와 같은 反應을 나타내게 하는 agonist dose 와의 比

式 (1)에서 equilibrium constant K_x는 K₂/K₁로서 receptor occupancy 가 0.5(50%)일 때의 antagonist concentration 即 ED₅₀가 이 K₂/K₁과 같은 것이다.

式 (2)에서 P_t는 time t 의 exponential function 이므로 P_e - P_t를 t 에 對해서 semilogarithmic paper 에 그리면 直線으로 나타내게 되고 이때의 slope 는 antagonism onset 의 time constant(Kon)인 K₁x + K₂가 된다. 마찬가지로 式 (3)에서도 P_t를 t 에 對해서 그리면 直線이 되고 slope 가 dissociation rate constant 인 K₂이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

甘草 alkaloidal fraction: 甘草(Glycyrrhiza glabra L.) 100 kg 에서 洪, 康^{6,7)} 등의 方法으로 alkaloidal fraction

3 gm 을 얻어 實驗에 使用했다.

Atropine: Merck 社製

Acetylcholine Chloride: Merck 社製

Albino rat: 體重 200 gm 內외의 Sparguedowley 系

Guinea-pig: 雌雄區別 없이 體重 400~500 gm 의 健康體

2. 實驗方法

i) Rat: 摘出 ileum 에 對한 實驗

體重 200 gm 內외의 健康한 albino rat 를 斷頭失血死 시키고 ileum 을 摘出하여 營養액으로 洗滌한 후 5~6 cm 의 切片을 만들어 37°C 恒溫을 維持한 10 ml magnus 장치에 현수하여 kymography 煤煙紙上에 記錄했다. 使用한 營養液은 Krebs solution(NaCl: 113 mM, KCl: 4.7, CaCl₂: 2.5, KH₂PO₄: 1.2, NaHCO₃: 25, Dextrose: 11.5)이고, 95% O₂+5%CO₂를 連續 流入시켰다. Lever 는 load 를 0.25 gm/cm deflexion, 擴大率 8.3 倍로 되게 한 pendulum auxotonic lever⁹⁾를 使用했다.

ii) Guinea-pig ileum longitudinal muscle 에 對한 實驗
 體重 400~500 gm 의 guinea-pig 을 역시 斷頭 失血死 시킨후 即時 ileum 을 摘出하여 mesentery 를 깨끗히 除去하고 Ambache¹⁰⁾가 記述한 方法에 依하여 longitudinal muscle layer 만을 分離해냈다. 即 摘出 ileum 을 Krebs solution 으로 세척한후 약 10 cm 길이로 잘라 직경 0.6 cm 의 유리막자에 끼우고 腸管의 一端 및 mesentery 부 착부위를 따라 incision 을 加한 후에 一端에서부터 cotton pellet 또는 끝이 둔한 forceps 로 longitudinal muscle layer 만을 若干 分離하여 弱한 tension 을 加하면서 넓은 sheet 로 박리해 냈다.

이중 7~8 cm 을 잘라내어 rat 에 대한 實驗에 서와 同一條件으로 해준 magnus 장치에 현수, 기록했다. 단

pendulum auxotonic lever 의 load 를 0.15 gm/cm deflexion 으로 한것만이 달랐다.

以上 두 實驗에서 magnus 장치의 營養槽內에 agonist 인 acetylcholine 은 1分 간격으로 注入하여 腸切片과 20~30 秒 동안 접촉케 했으며 세척후 即時 antagonist 인 atropine 또는 甘草 alkaloidal fraction 을 0.1ml 以下의 容量으로 注入했다.

Kymography 上 deflexion 은 基底線에서부터 頂點까지의 길이를 재고 이것을 antagonist 注入前의 acetylcholine 에 의한 dose-response curve 에 挿入하여 DR 을 定한 다음 이로부터 receptor occupancy P 를 求했다.

Table 1. Kinetic constants for acetylcholine antagonism by atropine and licorice alkaloidal fraction on rat ileum

Antagonist	K_1 ($S^{-1} g^{-1}ml$)	K_2 (S^{-1})	$K_2/K_1(ED_{50})$ (g/ml)
Atropine	5.585×10^6	9.084×10^{-4}	1.626×10^{-10}
	4.556×10^6	6.716×10^{-4}	1.474×10^{-10}
	5.267×10^6	7.342×10^{-4}	1.394×10^{-10}
Mean	5.136×10^6	7.714×10^{-4}	1.498×10^{-10}
Licorice Alkaloidal Fraction	3.145×10^2	7.721×10^{-4}	2.455×10^{-6}
	5.545×10^2	1.079×10^{-3}	1.946×10^{-6}
	3.483×10^2	5.368×10^{-4}	1.541×10^{-6}
	3.388×10^2	6.670×10^{-4}	1.978×10^{-6}
	3.062×10^2	5.394×10^{-4}	1.762×10^{-6}
	4.140×10^2	7.013×10^{-4}	1.694×10^{-6}
Mean	4.078×10^2	6.986×10^{-4}	1.772×10^{-6}
S.E.	0.465×10^2	0.771×10^{-4}	0.180×10^{-6}

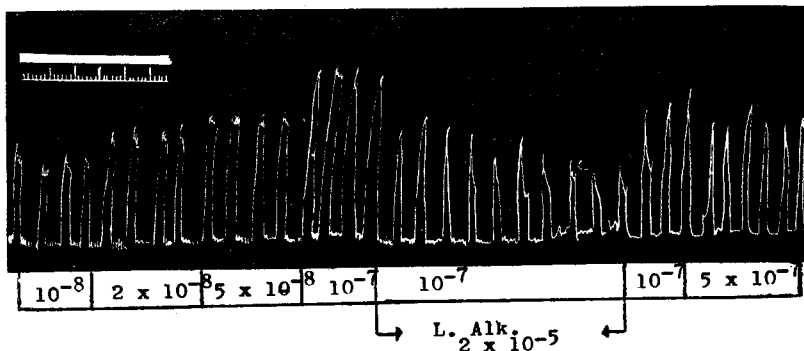


Fig. 1. Record of contractions of rat ileum, in response to acetylcholine. Figures below tracing indicate the concentration of acetylcholine in 10 ml bath. Licorice alkaloidal fraction(10^{-5}) was present between arrows. Time mark: 60 sec.

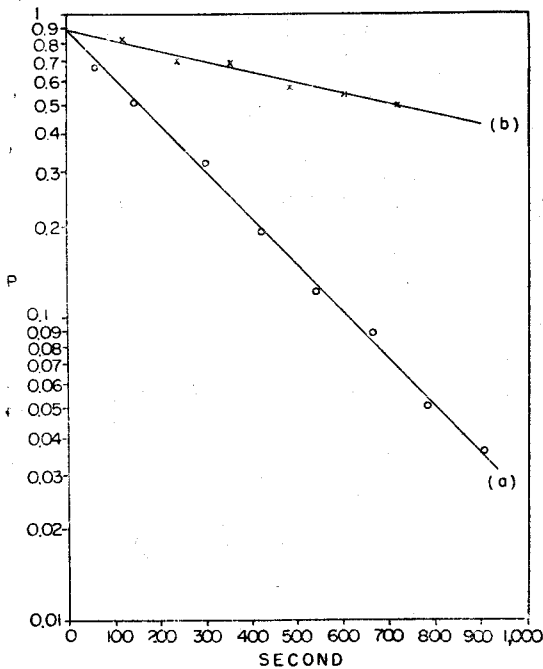


Fig. 2. Kinetic analysis of (a) onset and (b) decline of antagonism to acetylcholine on the rat ileum produced by exposure to licorice alkaloidal fraction 10^{-5} for 25 min.

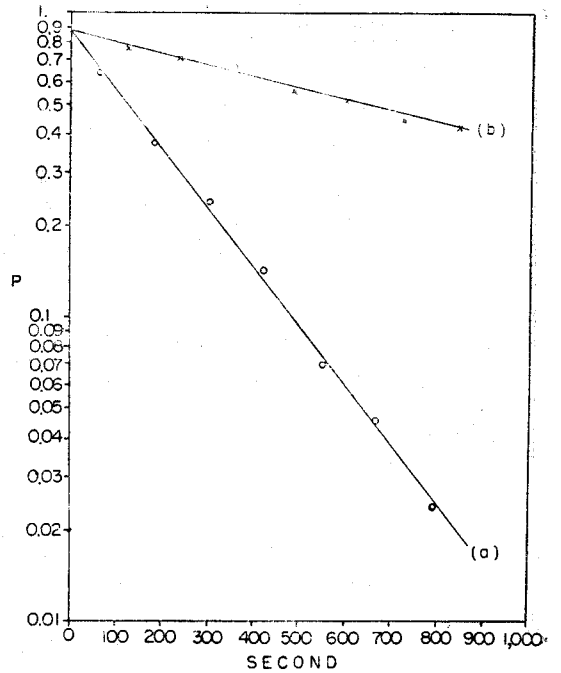


Fig. 4. Kinetic analysis of (a) onset and (b) decline of antagonism to acetylcholine on the rat ileum produced by exposure to atropine 10^{-9} for 15 min.

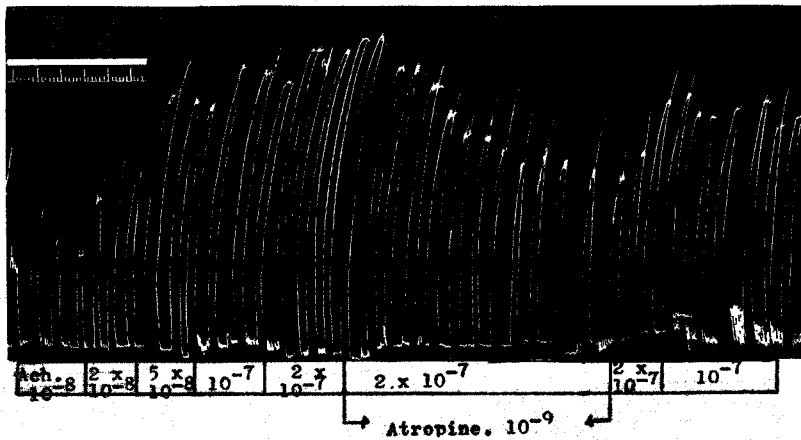


Fig. 3. Record of contractions of rat ileum, in response to acetylcholine. Figures below tracing indicate the concentration of acetylcholine in 10 ml bath. Atropine(10^{-9}) was present between the arrows. Time mark: 60 sec.

II. 實驗成績

1. Rat ileum

a) 甘草 alkaloidal fraction 의 營養槽內 濃度가 10^{-5} (gm/ml) 때 Kymography 상에서 測定하기 좋은 antagonism 을 나타냈으며 이때의 kinetic constant 는 $K_1 = 4.078 \times 10^2 (S^{-1} \text{ gm}^{-1} \text{ ml})$, $K_2 = 6.986 \times 10^{-4} (S^{-1})$, $K_2/K_1 =$

$K_1 = 1,772 \times 10^{-6} (\text{gm/ml})$ 이고 [Table 1] K_{on} 는 $4.8 \times 10^{-3} (S^{-1})$, equilibrium dose ratio 는 7 이었다. Fig. 1 과 2 에 실제 kymography 상 記錄 및 kinetic analysis 를 圖示했다.

b) Atropine 은 $10^{-9} (\text{gm/ml})$ 濃度로 했으며 Kinetic constant 는 $K_1 = 5,136 \times 10^6$, $K_2 = 7,714 \times 10^{-4}$, $K_2/K_1 = 1,498 \times 10^{-10}$ (Table 1), $K_{on} = 5.9 \times 10^{-3}$, equilibrium

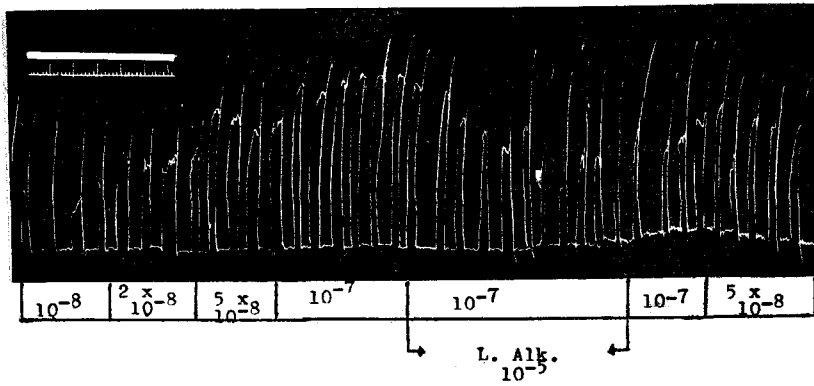


Fig. 5. Record of contractions of guinea-pig ileum longitudinal muscle, in response to acetylcholine. Figures below tracing indicate the concentration of acetylcholine in 10 ml bath. Licorice alkaloidal fraction (2×10^{-5}) was present between arrows. Time mark: 60 sec.

dose ratio는 8이었다.

Kymography 상 기록 및 kinetic analysis는 Fig. 3, 4와 같다.

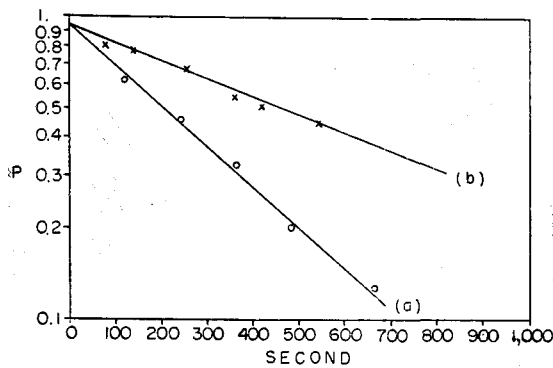


Fig. 6. Kinetic analysis of (a) onset and (b) decline of antagonism to acetylcholine on the guinea-pig ileum longitudinal muscle produced by exposure to licorice alkaloidal fraction 2×10^{-5} for 16 min.

Table 2. Kinetic constants for acetylcholine antagonism by atropine and licorice alkaloidal fraction on guinea-pig ileum longitudinal muscle

Antagonist	K_1 (S^{-1} ml.)	K_2 (S^{-1})	$K_2/K_1(ED_{50})$ (g/ml.)
Atropine	5.52×10^6	1.58×10^{-3}	2.86×10^{-10}
	6.64×10^6	1.67×10^{-3}	2.52×10^{-10}
	5.09×10^6	1.36×10^{-3}	2.67×10^{-10}
Mean	5.75×10^6	1.54×10^{-3}	2.68×10^{-10}
Licorice alkaloidal fraction	1.55×10^2	1.53×10^{-3}	9.87×10^{-6}
	1.11×10^2	1.03×10^{-3}	9.28×10^{-6}
	1.42×10^2	1.31×10^{-3}	9.23×10^{-6}
	1.28×10^2	1.04×10^{-3}	8.13×10^{-6}
	1.20×10^2	1.52×10^{-3}	1.27×10^{-5}
	1.38×10^2	1.28×10^{-3}	9.28×10^{-6}
Mean	1.30×10^2	1.25×10^{-3}	9.58×10^{-6}
S.E.	0.06×10^2	0.09×10^{-3}	0.61×10^{-6}

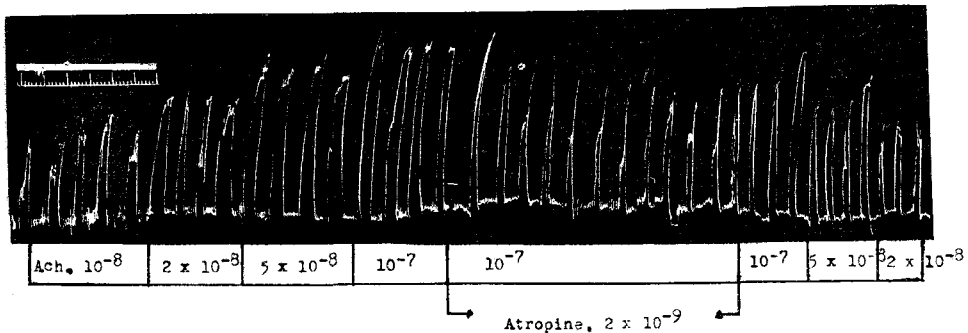


Fig. 7. Record of contractions of guinea-pig ileum, in response to acetylcholine. Figures below tracing indicate the concentration of acetylcholine in 10 ml bath. Atropine (2×10^{-9}) was present between the arrows.

2. Guinea-pig ileum longitudinal muscle

a) Rat ileum에서와는 달리甘草 alkaloidal fraction의 濃度를 2×10^{-5} (gm/ml)로 했을때 認知할 수 있는 antagonism을 나타냈고 이때의 kinetic constant는 Table 2에 나와 있는 것 같이 $K_1=1.30 \times 10^3$, $K_2=1.25 \times 10^{-3}$, $K_2/K_1=9.58 \times 10^{-6}$ 이고 $K_{on}=3.9 \times 10^{-3}$, equilibrium dose ratio는 3이었다.

실제 Kymography 상기록과 kinetic analysis가 Fig. 5, 6에 나와 있다.

b) Atropine 역시 rat에서와는 달리 濃度를 높여 2×10^{-9} 으로 했고 $K_1=5.75 \times 10^6$, $K_2=1.54 \times 10^{-3}$, $K_2/K_1=2.68 \times 10^{-10}$ (Table 2) $K_{on}=1.3 \times 10^{-2}$, equilibrium dose ratio 8의 結果를 얻었다. 역시 kymography 상기록 및 kinetic analysis는 Fig. 7, 8과 같다.

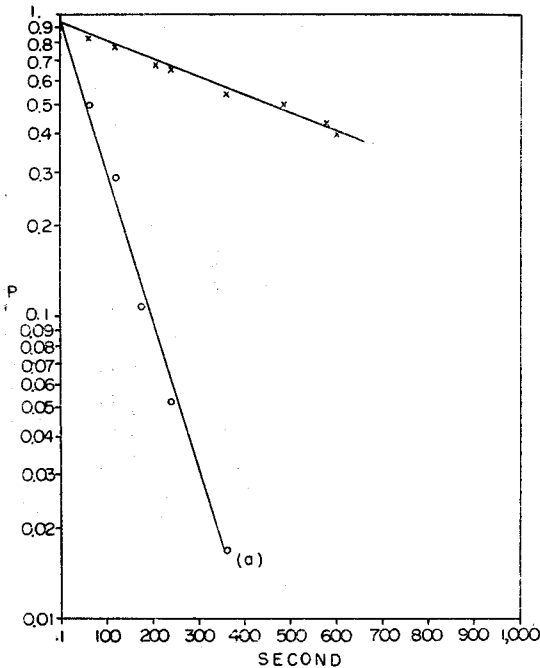


Fig. 8. Kinetic analysis of (a) onset and (b) decline of antagonism to acetylcholine on the guinea-pig ileum longitudinal muscle produced by exposure to atropine 2×10^{-9} for 5 min.

IV. 考 察

以上 實驗成績에서 제시한 kinetic constant들의 數值 및 analysis를 檢討해 볼 때 rat ileum에서甘草 alkaloidal fraction의 antagonism potency는 alkaloidal fraction 1r가 atropine 8.5×10^{-5} r에 해당한다.

이런 結果는 三橋⁵⁾가 算出한 atropine unit 即 rat jejunum에서甘草 total extract 1r가 atropine 6×10^{-3} r

와 同一한 收縮抑制效果를 갖는다는 報告와 比較해 볼 때 約 70倍의 差異를 나타내고 있다. 그러나 이와같은 potency上的 差異는 Shibata³⁾ 등이甘草의 antispasmodic activity는 flavon 配糖體에 屬하는 liquiritin과 isoliquiritin에 基因하며 그 作用樣狀은 papaverine樣이고, potency는 liquiritin이 papaverine의 14%, isoliquiritin이 136%에 해당한다고한 報告와 Takagi⁴⁾ 등이 guinea-pig 摘出 ileum과 rat stomach의 spontaneous movement 및 methacholine에 依해서 誘發되는 收縮을 atropine sulfate는 完全히 抑制하나甘草 F_M(Methanol fract.)은 그렇지 못한 것으로 봐서 F_M(Methanol fraction)의 antispasmodic activity는 주로 papaverine樣作用이고 fraction 중에 含有되어 있는 liquiritin과 isoliquiritin에 基因한다고 報告한 事實들을 想起할 때 三橋의 結果는甘草 total extract 중 atropine樣作用이 있는 fraction과 papaverine樣作用이 있는 liquiritin, isoliquiritin이 함께 나타내는 混合作用을 一括하여 atropine unit로서 算出한 때문이라고 여겨진다.

한편 guinea-pig lieum longitudinal muscle에서는甘草 alkaloidal fraction 1r가 2.8×10^{-5} r atropine과 그 potency가 同一하며 이것은 rat의 경우에 比해서 potency가 1/3 밖에 不되는 것이다. 이런 potency上的 차이에 대해서는 atropine의 동물체내 운명이 species에 따라 대단히 차이가 많다는 점¹¹⁾과 동물에 따라 atropine receptor가 서로 다르다는 說 등이 있는 것을 볼 때甘草 alkaloidal fraction에 effective한 receptor의 數 및 그 分布가 rat와 guinea-pig에서 相異할 것이라고 생각할 수도 있으며 또 한편으로는 어떤 種類의 antimuscarinic agent 중에 低濃度에서 agonist, 高濃度에서는 antagonist로서 2重作用을 나타내는 것이있다는 報告^{12,13)} 및 本實驗에서甘草 alkaloidal fraction의 dissociation rate constant가 rat(6.486×10^{-4})보다 guinea-pig(1.25×10^{-3})이 훨씬 큰 점 등으로 볼 때 本實驗에서 채택한 濃度(2×10^{-5})의甘草 alkaloidal fraction이 guinea-pig ileum longitudinal muscle에서는 partial antagonist일 可能性도 있다는 것을 示唆해주는 事實로 생각된다.

이와같이 species가 다른 동물들에서 이 alkaloidal fraction이 나타내는 antagonism potency의 差異에 대해서는 앞으로 더 究明해 봐야 될 문제라고 思料된다.

V. 結 論

甘草(Glycyrrhiza glabra L.)에서 分離해낸 alkaloidal fraction의 平滑筋에 對한 antimuscarine樣 弛緩作用을 atropine과 定量的으로 比較 檢討하였다.

Acteylcholine이 rat lieum 및 guinea-pig ileum longi-

tudinal muscle에서 招來하는 收縮作用에 對해서 이들 藥物이 나타내는 拮抗作用的 kinetic constants(K_1 , K_2) 및 ED_{50} 를 拮抗藥物의 receptor combination時 成立되는 理論式에 의거하여 求했다.

그 結果는 다음과 같다.

1. Rat ileum

a) 甘草 alkaloidal fraction

$K_1=4.078 \times 10^2 (S^{-1} gm^{-1} ml)$,

$K_2=6.986 \times 10^{-4} (S^{-1})$

$ED_{50}=1.772 \times 10^{-6} (gm/ml)$

b) Atropine

$K_1=5.136 \times 10^6$, $K_2=7.714 \times 10^{-4}$,

$ED_{50}=1.498 \times 10^{-10}$

2. Guinea-pig ileum longitudinal muscle

a) 甘草 alkaloidal fraction

$K_1=1.30 \times 10^2$, $K_2=1.25 \times 10^{-3}$

$ED_{50}=9.58 \times 10^{-6}$

b) Atropine

$K_1=5.75 \times 10^6$, $K_2=1.54 \times 10^{-3}$

$ED_{50}=2.68 \times 10^{-10}$

drugs. III., *Antispasmodic action of flavcnoids and anthraquinones*. *Yakugakuzasshi*, 80:620, 1960.

- 4) K. Takagi, K. Watanabe, Y. Ishi: *Peptic ulcer inhibiting activity of Licorice root*. *Proceedings of the second international pharmacological meeting*, Vol. 7, *pharmacology of oriental plants*. 1-15, 1963.
- 5) 三橋博: 日本藥劑師協會誌, 9, 4:25, 1955.
- 6) 洪思岳, 金濟勳, 康炯泰, 趙桓英: 甘草 alkaloid 에 관한 研究(제1보). *중앙의학*, Vol. 16, No.5, 1969.
- 7) 康炯泰: 甘草 alkaloid 에 관한 연구(제2보). *중앙의학*, Vol. 16, No. 6, 1969.
- 8) W.D.M. Paton, F.R.S.: *A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination*. *Proc. Roy. Soc. London*, 154:21, 1961.
- 9) W.D.M. Paton: *A pendulum auxotonic lever*. *J. Physiol.*, 137:35-36 p, 1957 a.
- 10) N. Ambache: *Separation of the longitudinal muscle of the rabbits ileum as a broad sheet*. *J.Physiol.*, 125:53-55 p, 1954.
- 11) J.C. Krantz, C.J. Carr: *Pharmacologic principles of medical practice*. 6th Ed. 606, 1965.
- 12) Averill, K.H., L.E. Lamb.: *Less commonly recognized actions of a tropine on cardiac rhythm*. *Am. J. Med. Sci.*, 237:304-318, 1959.
- 13) Ashford, A. Penn, G.B. Janet, W. Ross: *Cholinergic activity of atropine*. *Nature, London*, 193: 1082-1083, 1962.

參 考 文 獻

- 1) Revers, F.E.: *De Behandeling van ulcus Ventriculien. ulcus Duodemi met Succus Liquiritae*. *Nederl. Tijdschr.* 92, 2968-2973, 3567-3569, 1948.
- 2) Neleman: *Acta Physiol.* 1:198, 1950.
- 3) S. Shibata, M. Harada, W. Budidarmono: *Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude*