J. Fd Hyg. Safety 13(3), 252 - 257(1998)

죽염의 특성 분석과 항위궤양효과

김승희† · 강석연 · 정기경 · 김태균 · 한형미 · 류항묵 · 문애리*
*식품의약품안전청 국립독성연구소 약리부, *덕성여자대학교 약학대학*

Characterization and Anti-Gastric Ulcer Activity of Bamboo Salt

Seung Hee Kim†, Seog Youn Kang, Ki Kyung Jung, Tae Gyun Kim, Hyung-Mee Han, Hang Mook Rheu and Aree Moon*
Department of Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea
**College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea*

ABSTRACT — Bamboo salt has been used as a traditional remedy for gastric ulcer and gastro-intestinal disorders. It is produced by baking the salt packed in bamboo cylinder nine times under the fire of pine tree. Three of commercially available bamboo salt products (bamboo salt A, B, and C) were characterized by qualitative and quantitative analyses using inductively coupled plasma (ICP) spectrometer, ion chromatograph (IC), X-ray diffractometer (XRD), and electron microscope (EM). Compared with crude salt, the contents of iron, silicon, potassium, and phosphate in the bamboo salt products were higher whereas the sulfate content was lower. Water-insoluble fraction of bamboo salts contained the following compounds; MgO, SiO_2, Mg_2SiO_4, and $CaMgSiO_4$. The study on the microscopic structures of the bamboo salts were shown to have smooth surface and fused shape compared with crude salt. Among the three bamboo salt products, product A was used to test a possible inhibitory effect on gastric acid secretion. Each test material (bamboo salt A, crude salt, and reagent-grade NaCl) was given orally to Sprague-Dawley rats at doses of 0.2, 1.0, and 2.0 g/kg for 28 days before pyrolus ligation. Twenty four hours after the last administration of the test materials, volume, pH, total acidity, and pepsin activity of gastric juice were measured by the Shay-ligation method. No significant differences were observed in the secretion of gastric acid between treated groups (bamboo salt-, crude salt- and reagent-grade NaCl-treated groups) and control group (distilled water-treated group). This result demonstrated that bamboo salt did not exert anti-ulcer activities in experimental animals used in the present study.

Key words □ Bamboo salt, Characterization, Gastric acid secretion, Anti-ulcer effect

죽염은 엷은 회색을 띠고 있으며, 삶은 계란의 노른자 맛이 약간 나는 가공염으로 우리 나라에서는 전래 민간 의방(醫方)의 하나로 체했을 때나 소화가 잘 안될 때, 상처가 났을 때의 치료 목적으로 사용되어 왔다. 죽염은 과학적으로 입증되지 않은 상태에서 예로부터 민간요법에서 민속약으로 사용된 바 현재까지 건강보조식품 및 기타 제품의 부원료로 널리 사용되고 있다. 죽염의 제조 원료는 천일염, 대나무, 소나무, 진흙으로 우선 대나무 통속에 천일염을 넣고 진흙으로 봉한 후 소나무 장작불로 구워서 제조한다고 한다.[1] 이렇게 아홉번을 거듭 구워서 만든 죽염은 구죽염(九竹)이라 하여 시중에 많이 유통되는 제품이다. 그러나 일반 소금과 비교한 규격도 별도로 설정되어 있지 않고 가공에 의해 변화된 최종 성분의 기준도 설정되어 있지 않다. 중국의 이[2]는 죽염이 랫드의 미란성위염에 대하여 예방 및 개선효과가 있다고 발표하였으며, 그 약리기전은 세포 보호 작용을 나타내는 prostaglandin I_2(PGI_2)의 합성과 thromboxane A_2의 생산을 촉진하여 free radical 형성을 억제하고 lipoxygenase의 농도를 낮추는 것이라고 주장하였다. 본 연구에서는 현재 민간 가공염인 죽염에 대한 특성 분석 연구와 더불어 주된 약성으로 광고되고 있는 소화기질환에 대한 치료효과 중 위산분비에 미치는 영향을 측정하여 항위궤양에 관한 효능을 과학적으로 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

죽염 제품으로는 A사 제품(죽염 A), B사 제품(죽염 B) 및 C사 제품(죽염 C)를 사용하였으며 천일염은 죽염 A의 원료를 사용하였다. 시약급 NaCl은 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)로 부터 구매하여 사용하였으며 그 외 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

실험동물

식품의약품안전청 실험동물관리실로부터 5주령의 수컷 Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 받아 1주일간 순화시킨 후 발육 상태가 양호하고 건강한 동물을 실험에 사용하였다. 동물 사육 조건은 온도 23±1°C, 상대 습도 55±5%, 명암 교대 12시간(조명시간 06:00~18:00)으로 하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였다.

무기원소분석

죽염 및 천일염 각각의 물가용분과 물불용분을 다음과 같이 얻었다. 물가용분 시료의 제조에 있어서는 죽염 및 천일염 약 10 g을 증류수에 용해하여 여과지(Whatmann filter paper 40, Whatman International Ltd., Maidstone, U. K.)로 여과하고 110°C에서 항량이 될 때까지 증발 건조시켰다. 이 중 0.2 g을 정확히 달아 100 m*l* volumetric flask에 옮기고 질산 2 m*l*를 첨가한 후 증류수로 표정하였다. 물불용분 시료의 제조에 있어서는 죽염 약 100 g을 증류수에 용해한 후 여과지로 여과하고 잔류물을 증류수로 수 회 씻은 다음, 110°C에서 항량이 될 때까지 증발 건조시켰다. 이 중 0.002 g을 정확히 달아 질산 2 m*l*와 증류수 10 m*l*를 넣고 약간 가열하여 녹인 후 100 m*l* volumetric flask에 옮기고 증류수로 표정하였다. 대나무의 무기원소분석을 위한 시료 제조에 있어서는 대나무 20 g을 사기 도가니에 넣고 800 °C에서 2시간 가열하여 회분을 얻은 후 질산 2 m*l*와 증류수 5 m*l*를 가하여 가열하면서 회분을 녹여 100 m*l* volumetric flask에 넣고 증류수로 표정하였다. 이 액을 여과지로 여과하여 분석에 사용하였다. 황토의 무기원소분석을 위한 시료 제조에 있어서는 황토 20 g을 volumetric flask에 담고 질산 2 m*l*을 넣은 후 증류수로 100 m*l*를 만든 용액을 0.22 M Milipore membrane filter(type GV)로 여과하여 제조하였다. 이들 각각의 제조된 시료에 대하여 Inductively coupled plasma spectrometer(ICP, Model JY 38LUS, Jobin Yvon Co., France)를 사용하여 무기원소의 함량을 분석하였다.

인산염 및 황산염 분석

시료는 물가용분 시료 전처치와 동일하게 처리하였으나 질산은 가하지 않은 상태에서 제조하였으며 Ion Liquid Chromatograph(ILC, Model Waters 510, Millipore Co., USA)와 IC-Pack A컬럼을 사용하여 분석하였다.

물불용분 함량 분석

여과지를 항량이 될 때까지 110°C에서 건조시킨 후 무게(W1)를 측정하였다. 죽염 20 g(W2)을 200 m*l*의 증류수에 녹인 후 미리 건조 중량을 재었던 여과지로 여과하였다. 여과지에 남는 불용분을 증류수로 세척하는 과정을 7차례 반복하였다. 이 여과지를 110°C에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 무게(W3)를 측정하여 건조된 초기 여과지의 무게(W1)를 빼줌으로써 불용분의 무게를 구하고 이 값으로 다음과 같이 불용분의 함량을 결정하였다.

$$\text{불용분 함량}(\%) = (W3 - W1)/W2 \times 100$$

X-ray를 사용한 화합물 분석

죽염을 증류수에 녹인 후 0.42 Nylon membrane filter로 여과하여 불용분을 얻어 X-ray diffractometer(XRD, Model D-Max-IIIC, Rigaku Co., Japan)를 이용하여 화합물 분석을 하였다.

전자현미경을 이용한 구조 관찰

죽염은 구경 74 μm 크기의 체로 걸러 통과한 고운 입자만을 시료로 사용하였고 천일염과 시약급 NaCl은 건조 후 약주발에 먼저 간 다음 위와 같은 방법으로 시료를 얻었다. 각 시료를 알루미늄 시료 고정대에 고르게 살포하여 부착시킨 후 금이온 증착기(SEM Coating Unit PS3, Bio-Rad, UK)로 3회 금이온 증착을 실시하여 8~10 kV 하에서 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope, Model SEM 515, Philips Co., Netherland)으로 관찰하였다.

위액의 채취

SD계 수컷 랫드를 1군당 10마리씩 4군으로 나누어서 죽염, 천일염, 시약급 NaCl, 증류수를 1일 1회씩 28일 동안 각 0.2, 1.0, 2.0 g/kg으로 경구 투여하였으며 위액 채취는 Shay 등[3]의 방법에 의해 실시하였다. 마지막 투여후 24시간 절식시켜 ether 마취하에서 개복한 후 위의 유문을 결찰하고 다시 복부를 봉합하였다. 양성 대조 물질인 omeprazole 투여는 개복하여 유문을 결찰하고 십이지장으로 투여한 후 복부를 봉합하였다. 절식, 절수 상태에서 5시간 지난 후에 ether로 마취하여 치사시키고 위를 적출하여 위에 모인 위

액을 원심분리하여 4,000 g에서 15분동안 원심분리하였으며 침전물을 제거한 후 상등액의 양, pH, 총산도, 펩신활성도를 측정하였다.

펩신활성도 측정[4]

채취한 위액 0.01 m*l*(또는 0.02 m*l*)에 25°C의 hemoglobin 기질 용액(hemoglobin 2 g을 0.06 N-HCl에 녹여 100 m*l*로 하고 pH 1.8로 맞춘 후 4,000 g에서 15분간 원심 분리한 상등액) 5 m*l*와 0.01 N-HCl 0.99 m*l*(또는 0.98 m*l*)를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 5% trichloroacetic acid 10 m*l*를 가하여 반응을 종결시켰다. 반응액을 4,000 g에서 20분간 원심분리하여 상등액 5 m*l*를 취한 후, 상기 상등액에 0.5 N-NaOH 10 m*l*를 가하고, 3배로 희석된 Folin-Ciocalteau's agent 3 m*l*를 가하여 5~10분 후에 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액은 0.2 N-HCl에 용해시킨 0~1 M tyrosine 용액 1 m*l*에 0.2 N-HCl 4 m*l*를 가하여 조제하였고, 0.5 N-NaOH 10 m*l*를 가하는 단계부터는 위액 sample에서와 같은 방법으로 처리하였다. 측정된 pepsin 활성도는 mg tyrosine/hr로 표기하였다.

총산도 측정

채취한 위액 1 m*l*를 취하여 0.01 N-NaOH액으로 중화 적정함으로써 산도(μEq/m*l*)를 측정하고 총 위액량을 고려하여 총위산 분비량(μEq/5hr)를 계산한 후 단위 시간(μEq/hr)으로 환산하여 표기하였다.

통계처리

시험결과는 Student's t-test를 사용하여 통계처리 하였고 $p<0.05$를 유의성 있는 차이로 간주하였다.

결과 및 고찰

특성분석

천일염 및 죽염제품 A, B, C의 pH, NaCl, 물불용분, 무기원소, 황산염 및 인산염 함량 분석결과를 Table 1에 표기하였다. 죽염은 성상으로 볼 때 어두운 회색의 고운가루이며 제조과정에서 대나무 성분 등 다른 성분을 포함하게 됨으로써 유황냄새가 나는 것이 특색이며 천일염은 백색 내지 회백색으로 입자가 더 굵다. 10% 죽염 수용액의 pH는 9.7~10.9로 천일염의 7.1보다 높았으며 NaCl의 함량은 91.2~93.7%로 천일염(92.4%)과 비슷하였다. 죽염은 천일염에 비하여 칼륨, 규소, 철 및 인산염의 함량이 높았으며, 황산염의 함량은 낮았다. Table 2의 결과에 의하면 죽염 제조시 사용한 대나무에 칼륨이 다량 함유되어 있음을 알 수 있었다. 천일염 가용분, 황토 및 죽염 제품 A, B, C의 물불용분에 함유된 화합물을 XRD로 분석한 실험결과를 살펴보면 (Fig. 1), 죽염제품 A, B, C 모두 에서 천일염 및 황토에 비하여 MgO(피크 36.7°, 43°, 62.3°)가 많이 함유된 것으로 나타났으며 죽염제품 C, A, B의 순서로 많았다. $CaMgSiO_4$ (33.5°)와 Mg_2SiO_4(35.5°) 피크가 죽염 B에서 확인되었다. 황토에서는 주성분인 SiO_2가 커다란 피크(26.5°)로 나타났

Table 1. Quantitative analysis for bamboo salt products

	Crude salt		Bamboo salt A		Bamboo salt B		Bamboo salt C	
Water-insoluble fraction (%)	1.11		3.36		1.96		3.58	
pH (10% solution)	7.1		9.7		10.9		10.6	
NaCl (%)	92.4		92.8		93.7		91.2	
Constituents (%)	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble	Soluble	Insoluble
Mg	1.285	–	0.011	1.415	0.009	0.517	0.059	1.396
K	0.830	–	1.700	–	2.650	<0.001	1.250	–
Ca	0.170	–	0.136	0.125	0.036	0.160	0.300	0.101
Si	0.017	–	0.040	0.119	0.030	0.216	0.020	0.059
Zn	0.003	–	0.001	–	0.005	0.002	0.002	0.008
Cu	0.002	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001
Mn	<0.001	–	<0.001	0.008	<0.001	0.003	<0.001	0.003
Fe	0.001	–	0.009	0.089	0.002	0.151	0.008	0.082
Pb	<0.001	–	<0.001	–	<0.001	–	<0.001	–
Ni	<0.001	–	<0.001	0.004	<0.001	0.003	<0.001	0.001
SO_4	1.850	–	0.775	NA	0.340	NA	1.300	NA
PO_4	–	–	0.005	NA	0.193	NA	0.005	–

– : Below detectable limit
NA: Not analyzed
The following elements were below detectable limit: As, Cd, Be, Sb, Li, V, Ag.

Table 2. Quantitative determination of inorganic elements contained in bamboo and soil used for the production of bamboo salts

	Bamboo (%)	Soil (%)
Mg	0.027	0.016
K	0.263	0.007
Ca	0.003	0.003
Si	0.021	0.005
Zn	0.001	0.001
Cu	<0.001	<0.001
Mn	0.001	0.001
Fe	0.001	0.003
Pb	–	–
Ni	0.006	0.047
SO_4	0.040	–
PO_4	0.040	–

–: Below detectable limit

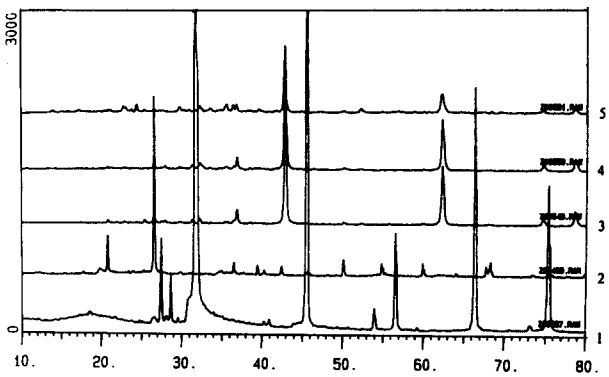

Fig. 1. XRD chart for crude salt (1), soil (2) and water-insoluble fractions of bamboo salt C (3), bamboo salt A (4) and bamboo salt B (5).

다. 천일염의 경우 보여진 피크들은 거의 모두 NaCl 피크들이었으며 KCl 피크가 약간 관찰되었다. 죽염 물불용분의 성분 화합물의 경우 천일염의 Mg이 가열에 의하여 MgO로 산화되고 이것이 또한 Ca과 황토의 SiO_2와 반응하여 $CaMgSiO_4$, Mg_2SiO_4 등의 화합물로 변화한 것으로 생각된다. 이 외에도 여러 금속의 산화물이 존재할 것으로 예상되나 워낙 미량이라 XRD에 의해 검출되지는 않았다.

주사전자현미경을 이용하여 시약급 NaCl, 천일염 및 죽염 제품 A, B, C의 구조 관찰 결과는 Fig. 2에 나타나 있다. 시약급 NaCl과 천일염의 경우 표면이 울퉁불퉁하고 각진 모양을 나타내는 것에 비하여 죽염들은 각 제품들간에 구조적인 차이를 보이긴 하나 대체적으로 표면이 용융되어 매끄러운 포도송이 형태를 이루고 있음이 관찰되었다. 죽염 A와 죽염 B의 소성 횟수별 구조의 차이를 주사전사현미경을 이용하여 관찰하였으나 현저한 차이는 관찰되지 않았다(자료 미첨부).

항위궤양시험

죽염은 소화기 계통의 질병에 치료 효과가 있다고 알려짐으로 인하여 점차 장기 복용하는 환자가 늘어가고 있는 추세이다. 따라서 죽염에 의한 항위궤양효과를 과학적으로 규명하고자 죽염이 위산 분비에 미치는 영향을 측정하였다. 죽염의 투여 용량은 사람에서의 위염 치료 용량으로 보고된 0.2 g/kg의 10배를 고용량군(2.0 g/kg)으로 하고 중간용량군(1.0 g/kg)과 저용량군(0.2 g/kg)을 설정하였으며 투여기간은 장기 복용되고 있는 점을 고려하여 28일간 1일 1회 경구 투여하였다. 죽염에 의한 효과를 비교 분석하기 위하여 죽염의 원료가 되는 천일염, 시약급 NaCl, 용매인 증류수 투여군을 설정하여 각 용량마다 동일 조건하에 시험 물질을 경구투여하였다. 유문결찰 실험을 실시할 때 뚜렷한 위산 분비 효과를 나타낸다고 알려진 omeprazole을 양성대조물질로 선정하여 수행한 실험 결과를 다른 투여물질 실험 결과와 비교하였다.

실험결과 측정된 위액량, pH, 총산도, 펩신활성도는 Table 3에 표기하였다. 0.2, 1.0, 2.0 g/kg의 세용량 투여군에서 용매투여군인 대조군의 위액량은 약 8.3~8.5 ml/hr이었으며 죽염, 천일염, 시약급 NaCl 투여군은 용매 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며 죽염과 천일염 또는 시약급 NaCl 투여군 상호간에도 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 pH, 총산도, 펩신 활성도의 경우에도 각 용량의 죽염, 천일염, 시약급 NaCl 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않았다 (Table 3). 그러나 위의 세 용량별 시험에서 양성대조군으로 사용한 omeprazole(0.1 g/kg)은 위액량, pH, 총산도, 펩신활성도를 용매대조군에 비하여 모두 유의하게($p<0.01$) 억제시켰다. 이상의 실험결과로 볼 때 죽염은 천일염과 마찬가지로 28일간 투여하였을 때 위산분비에 미치는 영향이 거의 없는 것으로 나타났다. 죽염을 분석한 성분화합물 중에서 천일염에 비해 많이 함유되어 있는 MgO, Mg_2SiO_4 등이 제산제로 작용하여 위통경감 등에 주효할 것으로 예측하였으나 Table 3에 표기된 실험결과에 의하면 위액의 pH나 총위산도에 영향이 없었으며 이는 죽염에 존재하는 상기 화합물이 워낙 미량이라 그 효과가 나타나지 않았으리라 생각된다. 그러나 죽염의 만성 투여에 의한 제산효과의 가능성을 규명하기 위해서는 추가실험이 요구된다고 사료된다. 위궤양의 발생은 위산이나 펩신 등의 공격인자의 병적 과잉에 의한 경우와 위산으로부터 위세포를 보호하는 방어인자의 약화에 기인하며 위궤양 치료제도 공격인자를 제어하는 방법과 방어인자를 강화하는 접근방법으로 나누어 질 수 있다. 이[2]의 연구결과는 죽염의 세포보호작용의 PGI_2 합성을 증가시킴을 보고하였다. 위궤양 치료에 있어서 1차적

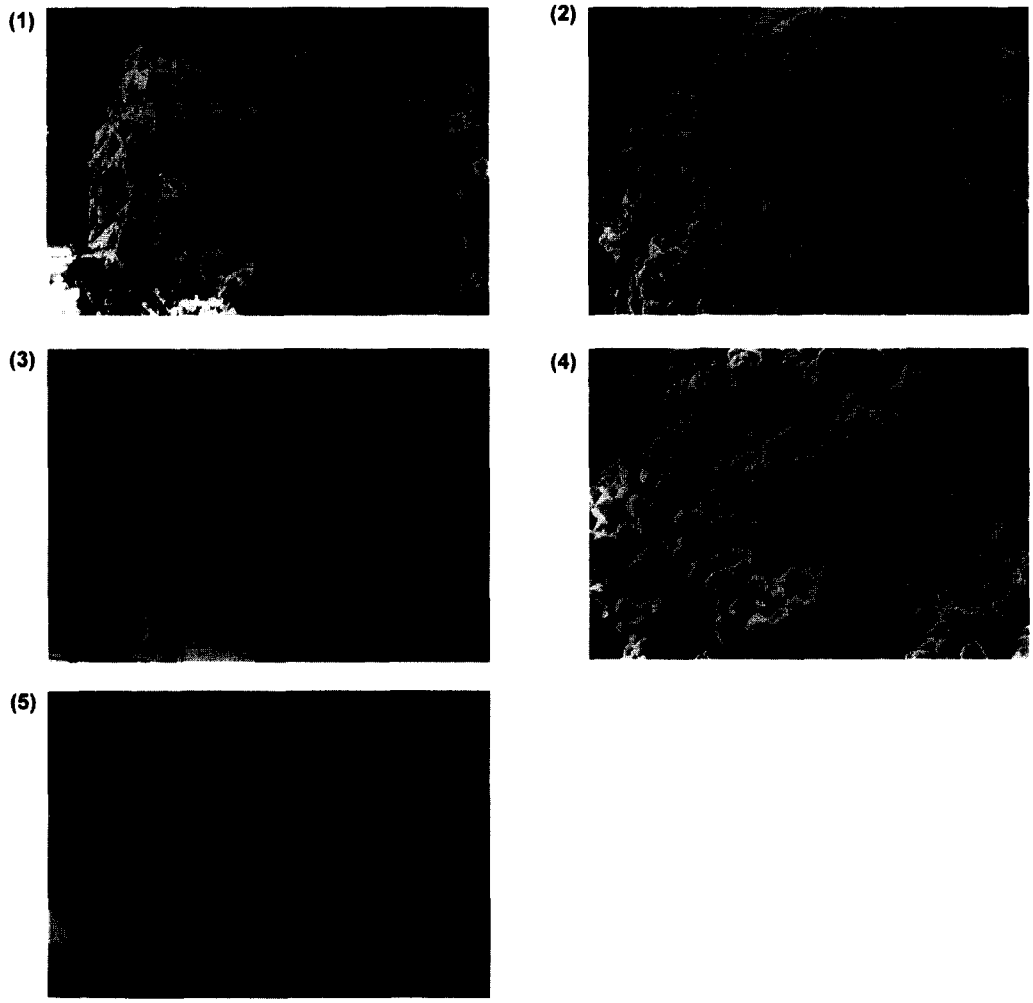

Fig. 2. Scanning electron micrographs of NaCl (1), crude salt (2), bamboo salt A (3), bamboo salt B (4) and bamboo salt C (5). Magnified by 1550.

Table 3. The effect of NaCl, crude salt, and bamboo salt on gastric acid secretion in pylorus ligated rats

Treatment	Dose (g/kg)	No. of animals	Gastric acid volume (ml/hr)	pH	Total acidity (μEq/hr)	Pepsin activity (mg tyrosine/hr)
Control	–	10	8.4±1.1	2.0±0.2	123.3±22.1	32.4±4.2
NaCl	0.2	10	8.9±1.1	1.9±0.1	115.7±18.2	28.7±3.3
	1.0	10	9.5±1.1	1.8±0.2	135.4±25.3	31.7±3.8
	2.0	10	9.9±1.1	2.0±0.2	127.5±17.9	36.2±6.3
Crude salt	0.2	10	9.1±1.3	2.0±0.1	118.0±24.9	31.9±3.7
	1.0	10	9.3±1.0	1.7±0.1	123.9±13.7	34.6±5.0
	2.0	10	9.4±1.4	2.1±0.2	114.7±23.3	29.1±5.4
Bamboo salt	0.2	10	9.4±1.1	2.1±0.1	120.9±15.3	31.0±2.7
	1.0	10	8.4±1.1	2.4±0.3	118.0±25.1	26.5±4.6
	2.0	10	9.9±1.0	1.6±1.0	129.1±22.6	28.6±3.4
Omeprazole	0.1	10	4.3±1.0**	7.2±0.4**	14.9±10.1**	15.3±2.3**

Each value represents the mean±S.D.
**: significantly different from control at $p<0.01$

으로 위산분비가 억제될 때 방어인자에 의한 위점막 재생 작용도 그 효과를 나타내기 때문에 항궤양제의 효력검색으로 위산분비에 미치는 영향을 우선적으로 검토하게 된다. 따라서 죽염은 본 실험 결과에 의하면 공격인자의 제어기전인 제산효과나 위산분비 억제효과는 없는 것으로 나타났으며 죽염에 의한 항위궤양효과는 28일간의 투여에 의해서는 기대하기 어려울 것으로 사료된다.

국문요약

죽염은 예로부터 위궤양 등의 소화기 질환에 민간요법으로 사용되어 왔으며 대나무 통속에 천일염을 넣고 소나무 장작불로 9번 구워서 만들어 진다. 본 연구에서는 죽염의 특성분석시험과 항위궤양시험 중 위산분비 억제도 시험을 실시하였다. 특성분석시험으로 ICP(Inductively Coupled Plasma) spectrometer, IC(Ion Chromatograph), XRD(X-ray Diffractrometer), 전자현미경을 이용하여 천일염과 죽염제품 A, B, C의 성분 및 구조분석을 실시하였다. 그 결과, 성분분석시험에서 죽염은 천일염에 비하여 칼륨, 규소, 철 및 인산염의 농도가 증가하였으며 황산염은 감소되었음을 알 수 있었다. 죽염 중 물불용분에 포함된 화합물은 MgO가 가장 많았고, SiO_2, Mg_2SiO_4 및 $CaMgSiO_4$ 등도 확인되었다. 구조분석에서 죽염은 천일염에 비하여 대체로 표면이 매끄럽고 용융되어 있는 것으로 나타났다. 죽염제품 A, B, C 중 A를 사용하여 위산분비에 미치는 영향을 측정하였다. SD계 랫드에 죽염, 천일염, 시약급 NaCl, 증류수를 1일 1회 28일 동안 각 0.2, 1.0, 2.0 g/kg으로 경구투여하여 마지막 투여 후 24시간 절식시켜 Shay 유문 결찰법을 이용하여 채취한 위액의 총량, pH, 총위산도, 펩신활성도를 측정하였다. 실험결과 각 투여용량군에서 용매대조군에 비하여 통계학적으로 유의성있는 차이를 나타내지 않았으며 죽염을 포함한 여러 가지 염투여는 위산분비에 영향을 주지 않았다. 따라서 28일간의 죽염투여에 의한 위궤양 치료효과는 기대하기 어려울 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김윤세: 죽염요법, 광제원, pp. 58-60 (1993).
2. 이수민: 한국인산죽염에 의한 흰쥐 미란성 위염의 예방과 치료작용 관찰, 한국인산죽염 임상 및 기초실험 연구보고 논문집, pp. 79-85 (1993).
3. Shay, H., Kmoarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M. and Siplet, H.: A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.*, **5**, 43-61 (1945).
4. Anson, M.L.: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cetherpsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79-89 (1938).