

## Effects of Vitamin C on Residual Aflatoxin B<sub>1</sub> in Rat Sera Treated with Radiation and Aflatoxin B<sub>1</sub>

Doyoung Chung<sup>1</sup>, Hansoo Kim<sup>2</sup> and Jin-Soon Kang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>3</sup>Department of Food & Nutrition, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

### Vitamin C가 방사선과 Aflatoxin B<sub>1</sub>을 투여한 흰쥐의 혈청 중 Aflatoxin B<sub>1</sub> 잔류량에 미치는 영향

정도영<sup>1</sup> · 김한수<sup>2</sup> · 강진순<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 식품공학과, <sup>2</sup>부산대학교 식품공학과, <sup>3</sup>한국국제대학교 식품영양학과

#### Abstract

Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is a potent hepatotoxic and hepatocarcinogenic mycotoxin in humans. It is also well-known to be accumulated in animal tissues via various metabolic pathways. This study was conducted to determine the effects of vitamin C on the residual AFB<sub>1</sub> in rat sera that were treated with radiation and AFB<sub>1</sub>. Six week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: a control group, AFB<sub>1</sub>-treated group, the group treated with AFB<sub>1</sub> and vitamin C, the group treated with X-ray and AFB<sub>1</sub>, and the group treated with X-ray and AFB<sub>1</sub> with vitamin C. On the first day of the experiment, only one dose of X-rays was exposed to the entire liver at 1,500 cGy. Next, vitamin C was injected at 10 mg/kg body weight via intraperitoneal injection, followed 1 hr later by the administration of 0.4 mg/kg of AFB<sub>1</sub> via intraperitoneal injection. These treatments were then administered every three days over a period of 15 days. On the 16th day of treatments, the animals were sacrificed. The contents of AFB<sub>1</sub> in rat sera were determined via indirect competitive ELISA and HPLC method. In the quantitative analysis of AFB<sub>1</sub> in rat sera via ELISA, 5.17±0.34 ng/mL of AFB<sub>1</sub> was detected in the AFB<sub>1</sub>-treated groups, but the amount more significantly decreased to 3.23±0.76 ng/mL in the groups treated with AFB<sub>1</sub> and vitamin C ( $p < 0.01$ ) than in the AFB<sub>1</sub>-treated groups. The AFB<sub>1</sub> contents of the rat sera of the groups treated with X-ray and AFB<sub>1</sub> did not significantly decreased with the administration of vitamin C. The AFB<sub>1</sub> content of the rat sera that was analyzed via HPLC showed a tendency similar to that of the content that was analyzed via ELISA. With regard to these data, vitamin C was very effective in reducing AFB<sub>1</sub> residue in rat sera.

Key words : vitamin C, aflatoxin B<sub>1</sub>, quantitative analysis, ELISA, HPLC

#### 서 론

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus* 및 *Aspergillus parasiticus*에 의해 생성되며 사람이나 가축에 생리적 장애를 일으키는 물질이며 탄수화물이 풍부한 쌀, 보리, 밀 및 옥수수 등의 곡류에서 가장 흔하게 노출될 수 있는 곰팡이 독소(mycotoxin)이다(1,2).

체내에 섭취된 AFB<sub>1</sub>은 간 독성 유발 물질로서 발암성, 돌연변이성, 기형발생성 등이 있으며, 생활환경에서 그 생성 균주의 자연오염이 용이하고 열에 대하여 저항성이 커서 280~300℃에서 분해되므로 일반 식품과 같은 가공, 처리로는 제거가 불가능하여 더욱 위생상의 문제가 중요시되고 있다(3). 이러한 Aflatoxin 분석에 있어서 초기에는 주로 TLC와 자외선을 이용한 분석기법(4,5)이 적용되어 왔으며, 이후 mini column을 이용한 방법(6), HPLC (High Performance Liquid Chromatography (7,8) 및 GLC (Gas Liquid Chromatography (9)등을 이용한 분석이 시도되었다. 또한

\*Corresponding author. E-mail : jskang-8075@hanmail.net  
Phone : 82-55-751-8314, Fax : 82-55-751-8329

Morgan 등(10)을 중심으로 특정 mycotoxin에 대해 감도 높은 항체를 이용한 방법으로 최초에는 방사성 면역분석법(radiimmunoassay; RIA) (11)이 시도되었으나 방사성 피폭상의 안전성과 폐기물 문제가 대두되었고 이어 개발된 각종의 경쟁적 면역 분석법(competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) (12,13)은 종래의 mycotoxin 분석에서 나타난 문제점을 상당히 극복하게 되었다. 최근에는 분자생물학의 발전과 더불어 생물체의 genomic DNA로부터 DNA polymerase의 반응을 이용하여 특정의 DNA 단편만을 선택적으로 증폭, 복제함으로써 단시간 내에 특정유전자를 탐색하고 확보 할 수 있는 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 방법이 많이 활용되고 있다. 1986년 Warner(14)가 mycotoxin의 일종인 zeralenone을 검색하기 위해서 효소 면역 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)을 개발하여 종전의 검사법들이 가졌던 여러 가지 시간적 소비와 시설적 복잡성 등을 해소하게 되었고 또한 곰팡이 독소 분석을 위하여 TLC (Thin Layer Chromatography)도 여전히 널리 사용되고 있으나 HPLC (High performance Liquid Chromatography)가 보다 경제적이며 한꺼번에 많은 시료를 처리할 수 있는 이점이 있기에 aflatoxin 분석에 활용되고 있다. aflatoxin의 대사는 주로 간에서 일어나는데 간의 탄수화물, 지방, 단백질 대사 활동을 억제하기도 하며(15) 간의 microsome에서 NADPH 의존성 lipid의 지질과산화반응이 일어나는 산화적 과정을 거치면서 독성을 일으켜 간암을 유발한다고 보고(16)되었다. 이러한 간암을 치료하는 방사선 요법은 수술, 항암약물요법과 더불어 환자의 생존율을 증가시키는데 크게 기여하고 있는 치료방법으로 현재 임상에서 널리 이용되고 있다. 그러나 방사선이 정상조직에 조사될 경우 창상치유가 늦어지고 조직 내에서 산소결핍, 국소적 부종, 조직괴사 및 염증반응의 소실 등을 일으키고 혈관손상을 통한 조직 저산소증 등을 유발하기도 한다(17,18). 세포에 방사선을 조사하였을 때 방사선과 세포내의 물분자가 반응하여 이온 라디칼을 생성하고 생성된 이온 라디칼이 또 다른 물분자와 반응하여 반응성이 높은 활성산소와 과산화라디칼(OH·)을 생성하게 된다. 이러한 과도한 산화 반응물은 혈장 내 vitamin C, E, coenzyme Q 10, β-carotene 등의 항산화비타민을 소모시키고 지질의 과산화와 DNA 손상을 유도하여 노화 및 암을 비롯한 여러 질병의 발병 및 진행에 매우 큰 영향을 준다고 보고(19)되고 있으며 또한 이것은 aflatoxin에 의해서 생성된 과산화물과 동일한 조직 손상을 일으킨다. 그러므로 AFB<sub>1</sub>과 방사선 조사로 인한 독성 유발 기전이 oxygen free radical에 의한 산화적 손상이 원인이라는 관점에서 볼 때 항산화제 투여로 인한 산화 억제작용을 기대할 수 있음에 따라 최근 aflatoxin으로 인한 세포손상 및 암 발생 과정을 방어할 수 있는 항산화제의 적용에 대한 관심이 높아지고 있다. 그중 vitamin C는 수용성 항산화제로서 독소를 포함한 여러 가지 promutagen

의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며, 산화 환원 완충제에서 유해한 free radical을 제거하여 부가체 형성을 저지시켜 항산화효과를 발휘한다(20). 또한 vitamin C는 나이트로 화합물(nitrocompound)에 의한 세균에서의 돌연변이를 억제(21)하고 *Salmonella typhimurium*에서 Aflatoxin B<sub>1</sub>로 인한 돌연변이를 억제 시킨다(22). Benedict 등(23)은 3-methyl-cholanthrene에 의해 시작된 C3H10T<sub>1/2</sub>Cell의 형태학적 변형을 vitamin C가 억제한다는 것을 처음으로 보고하였고 Yasukawa 등(24)은 ascorbic acid가 X선을 조사한 세포에서 종양발생을 억제한다는 것을 보고하기도 하였다. 따라서 곡류를 주식으로 하는 우리나라 사람들의 경우 AFB<sub>1</sub>에 노출되기 쉽고 이들 중 일부는 위, 간, 담도 암과 같은 상복부 암으로 진단되어 간을 포함하는 부위에 대해 방사선 치료를 받을 수 있는 경우를 생각하여 환자에게 AFB<sub>1</sub> 투여 혹은 방사선과 AFB<sub>1</sub>을 병합처리한 시험군을 대상으로 vitamin C가 혈중잔류 농도에 미치는 영향을 살펴보고자 환자의 혈청 중에 존재하는 AFB<sub>1</sub> 잔류량을 ELISA 및 HPLC 법으로 정량하고 통계처리 하여 얻은 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 사육방법

Sprague Dawley 계통의 생후 6주, 평균무게 150±20 g의 수컷 흰쥐를 대한실험동물 센터에서 구입하여 동물 사육장에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 실내온도 20±5°C, 습도 55~60%를 유지하였으며 명암주기는 자연채광으로 하고 고품사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험사육기간 중 매일 오전 중에 체중을 측정하고 사료 섭취량은 매일 사료전량을 측정하였다.

### 실험군의 구성 및 투여농도 및 용량

실험군은 5군(n=6)으로 나누어 Table 1과 같이 처리 하였다. X-ray 조사는 실험 기간 내 단 1회로 실험사육기간 첫 일에 조사 하였고 X-ray 조사 후 vitamin C를 투여하였으며 vitamin C 투여 1시간 후 AFB<sub>1</sub> 을 투여하였다. Vitamin C와 AFB<sub>1</sub> 은 모두 복강투여 (intraperitoneal injection)로 실험 사육 첫일부터 1회 시작하여 3일에 한번씩, 5회 반복 투여하며 실험동물 사육기간은 총 15일로 하였다. 대조군인 제 1군의 경우에 용매인 DMSO 0.1 mL, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 0.1 mL를 함께 투여하였다. 제 2군의 경우는 아급성용량인 0.1 mL AFB<sub>1</sub> 와 용매 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 0.1 mL를 투여하였으며, 제 3군은 2군에 대한 항산화비타민의 효과를 보기위해 0.1 mL의 vitamin C를 투여한 후 2군과 동량의 AFB<sub>1</sub>을 투여하였다. 제 4군은 X-ray 조사 후 0.1 mL의 AFB<sub>1</sub>을 투여하였으며, 제 5군은 4군에 대한 항산화비타민의 효과를 보

기위해 X-ray 조사 후 0.1 mL의 vitamin C와 동량의 AFB<sub>1</sub>을 투여 하였다. 실험동물에 투여된 AFB<sub>1</sub>와 vitamin C는 Sigma 제품을 사용하였고 ELISA에 사용된 항체는 본 실험실에서 제작한 단일클론 항체(AF78 MAb)를 사용하였다.

Table 1. Treatments of experimental animal

Groups	Content	Injection dose	No. of animals
G1	0.1 M NaHCO <sub>3</sub> + DMSO	a + b	6
G2	0.1 M NaHCO <sub>3</sub> + AFB <sub>1</sub>	b + d	6
G3	AFB <sub>1</sub> + Vitamin C	c + d	6
G4	AFB <sub>1</sub> + X-ray	b + d	6
G5	AFB <sub>1</sub> + X-ray + Vitamin C	c + d	6

a : 0.1 mL of DMSO                      b : 0.1 mL of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>  
c : 10 mg/kg of Vt. C (=0.1 mL)      d : 0.4 mg/kg of AFB<sub>1</sub> (=0.1 mL)

#### 방사선조사

경상대학교병원 치료방사선과에 설치된 Co-60 Teletherapy unit를 사용하여 방사선 조사를 실시하였다. 흰쥐의 복부 조사 시 움직이지 못하도록 고정 시킨 후 동장치에서 방출되는 X선을 이용하여 6 Mv 방사선을 1.5 cm 깊이에 1,500 cGy (radiation/min) 선량률로 1회 조사하였다.

#### 실험동물의 처리

실험사육 최종일에는 7시간 절식시킨 후 ethyl ether를 사용하여 마취시키고 해부하여 실험을 실시하였다. 혈액은 심장에서 채혈하였으며 간장조직은 50 mL 주사기를 사용하여 차가운 phosphate buffer (PBS, 0.1 M, pH 7.4)를 문맥을 통해 주입하여 혈액을 제거한 다음 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 다시 제거한 후 간 무게를 측정하였고 혈액은 -70°C에 보관하면서 실험을 수행하였다.

#### 혈청 속의 Vitamin C 함량 측정

혈액을 심장 채혈법으로 채취한 후 혈액 약 1 mL를 취하여 즉시 보존제인 dithiothreitol (10 mM/L)용액 50 µL을 첨가하였다. 4°C, 3000×g 원심조건에서 15~20분 동안 혈청을 분리하여 -80°C로 냉동 보관하여 사용하였다. Vitamin C 측정은 ferric acid ion (Fe<sup>3+</sup>)이 산성용액에서 525 nm에서 특징적인 흡광도를 가지는 complex를 형성하기 위해 α, α-dipyridyl과 coupled된 형태인 ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>)으로 환원되는 원리를 이용한 α, α-dipyridyl method (25)에 의해 측정하였다.

#### 혈청 조직의 AFB<sub>1</sub> 정량방법

혈청 전처리 방법: 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 함량을 검색하기 위해서 Kawamura 등(26)의 방법을 응용하여 소량의 시료에서 분석하는 법을 확립하였다. 즉, 혈청 200 µL에 chloroform 200 µL를 가하고 1분 동안 강하게 교반시킨 후 10,000 rpm에서

10분간 원심 분리하여 유기용매 층을 회수하였다. 회수된 유기 용매층중에서 100 µL를 microcentrifuge tube에 취해 질소가스로 유기용매를 날려 보낸 후 10% methanol-PBS를 100 µL를 가하여 ELISA 분석에 이용하였고, 50 µL 유기용매 층을 취하여 질소농축 시킨 후 HPLC 이동상용매(water : methanol : acetonitrile =50 : 25 : 25) 50 µL 재 용해시켜 HPLC 분석을 실시하였다.

#### 항체의 특성

흰쥐에게 aflatoxin B<sub>1</sub> 단독투여 혹은 방사선과 aflatoxin B<sub>1</sub>을 병합처리한 시험군에 vitamin C를 투여 한 후 혈중 AFB<sub>1</sub>의 잔류정도를 indirect competitive ELISA법으로 조사하기에 앞서 ELISA에 사용된 항체의 특이성을 aflatoxin analogue와의 교차반응성(cross-reactivity)으로 나타내었다. 즉, Liu 등(27)의 방법으로 aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 및 sterigmatocystin 과의 교차반응을 실험하여 항체의 항원에 대한 특이성을 검토하였는데, 각 표준물질의 농도 별로 항체에 대한 반응을 조사하고, 그 결과 나타난 optical density(OD)로 표준곡선을 작성하였다. 이때 최대 OD값의 1/2에 해당하는 analogue의 양에 대한 aflatoxin B<sub>1</sub>의 양에 대한 비를 퍼센트로 나타내었다.

#### Aflatoxin B<sub>1</sub>의 표준 곡선 및 회수율 측정

혈청 중의 잔류 AFB<sub>1</sub>을 ELISA법으로 정량하기 위하여 먼저 표준곡선과 회수율을 측정하였다. 표준 AFB<sub>1</sub>을 농도 별로 반응시켜 각 well의 발색정도를 ELISA reader 405 nm에서 측정 후 MPM software를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 아울러 표준 AFB<sub>1</sub>을 각각 10, 50, 100 ng/mL로 정상 혈청에 인위적으로 투여하여 얻은 흡광치를 표준곡선에 대응시켜 농도를 구하고, 혈청에서의 회수율을 구하였다.

#### ELISA에 의한 AFB<sub>1</sub>의 정량

혈청 중 AFB<sub>1</sub> 함량은 indirect competitive ELISA법(28)을 이용하여 검색하였다. 먼저, AFB<sub>1</sub>-BSA (Bovine Serum Albumin) conjugate를 coating buffer (carbonate buffer, pH 9.6)에 녹여 microtiter plate에 100 µL (100 ng AFB<sub>1</sub> /well)씩 분주한 다음 4°C에서 overnight하여 well coating 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척 후 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 인산 완충용액에 녹인 1% BSA를 가하여 overnight 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 AFB<sub>1</sub> 또는 분석용 시료 30 µL 및 본 실험실에서 생산하여 보관중인 것 중 역가가 높은 AFB<sub>1</sub> 항체(AF78)를 1:500으로 희석하여 30 µL well에 주입하고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 세척용 완충액으로 3회 세척하고, 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, 1:4,000)를 100 µL씩 넣어 37°C에서 30분 반응 후 세척용 완충액으로 6회 세척하여

였다. 여기에 기질로 ABTS 100  $\mu$ L와 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 37°C에서 30분 발색시킨 후 ELISA reader (Bio RAD model 550, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 MPM software(Bio RAD, version 4.0)를 이용하여 표준곡선을 작성하고 AFB<sub>1</sub> 함량을 계산하였다.

### HPLC에 의한 AFB<sub>1</sub>의 정량

ELISA에 의해 얻은 혈중 AFB<sub>1</sub>의 함량과 비교 확인하기 위하여 HPLC법에 의한 함량측정을 실시하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다. 먼저 AFB<sub>1</sub>의 retention time을 알아보기 위해 표준 AFB<sub>1</sub> 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng을 주입하여 얻은 결과로 표준 AFB<sub>1</sub>의 정량적 area 및 retention time을 얻은 다음 직선의 회귀방정식에 의해 혈청 속의 AFB<sub>1</sub> 량을 측정하였다.

**Table 2.** The analytical conditions of HPLC for the detection of AFB<sub>1</sub>

Items	Conditions
Instrument	Waters associate, Inc(Model 600E)
Column	PepMap-C18 column : 4.6 mm × 250 mm/ Perseptive Biosystems
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase	water : methanol : acetonitrile (50:25:25)
Pressure	1.0 × 10 <sup>5</sup> Pa
Detector	Waters 474 Scanning Fluorescence Detector (EA 364 nm, EM 440 nm)

### 통계처리

분석 결과의 통계처리는 실험군당 평균치와 표준편차로 표기(mean±S.D.)하고 이들에 대한 통계처리는 SAS (version 6.12 program)를 이용하여 one-way ANOVA분석을 실시한 후 유의성이 있는 경우 사후 분석으로 다중비교의 하나인 Duncan (29)의 다중 범위 검증을 실시하여 통계적 차이를 검증하였다. 각 군의 유의성은 p<0.01수준에서 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### 간조직의 무게, 식이섭취량, 체중증가량, 식이효율

간조직의 무게, 식이섭취량, 체중증가량, 식이효율을 측정 한 결과는 Table 3과 같다. 간장의 무게는 대조군을 포함한 전군에서 유의적인 차이는 없었다. Park (30)는 CCl<sub>4</sub>로 간독성을 유발시켜 1주일동안 사육한 흰쥐의 간장의 무게는 정상 쥐가 4.0±0.4 liver/body weight (%)인데 비하여 시험군에서는 4.5±0.3 liver/body weight (%) 증가하였다고 보고하였고 Bannasch 등(31)은 간세포 암 초기에 간조직의 국소적 변형에 따라 탄수화물 변화가 일어나 과량의 glycogen과

지질의 축적으로 인해 일시적으로 간 무게가 증가한다고 하였으나 본 연구는 유의적인 차이를 볼 수 없었는데 이것은 방사선조사 혹은 AFB<sub>1</sub>투여로 인해 간세포의 증식 및 비대화가 일어났으나 그 정도는 미미하며 vitamin C가 간세포 증식과 비대화를 억제시키는 것에 영향을 미칠 것이라고 생각된다. 식이섭취량은 대조군에 비하여 각 처리군에서 감소하였으며 AFB<sub>1</sub> 처리군(2, 3군)에 비하여 방사선과 AFB<sub>1</sub> 병합처리한 4,5군에서 유의적으로 더 낮았다. 그러나 AFB<sub>1</sub>(2군) 혹은 방사선처리(4군)에 대한 vitamin C 첨가(3,5군)에 따른 유의적인 차이는 볼 수 없었다. 체중증가량은 식이섭취량에 따라 비교적 증가하는 경향이였다. 특히 방사선과 AFB<sub>1</sub> 병합처리한 4군에서 식이 섭취량과 체중이 가장 적은 것으로 보아 시험동물 처리 시 과도한 스트레스가 그 원인으로 작용했을 것으로 생각된다. 비록 유의적인 차이를 볼 수 없으나 4군에 비해 4군에 vitamin C를 투여한 5군에서 식이섭취량과 체중 증가량이 다소 많았으므로 향후 사육기간 연장 시 그 효과를 볼 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 실험 시 마취제에 의한 실험쥐의 간독성으로 생길 수 있는 영향을 배제하는 것이 필요하였으므로 실험쥐를 마취를 시키지 않은 상태에서 고정시키고 방사선 조사를 시행하였다. 이때 방사선 조사는 1,500 cGy를 1회 조사하였으며 실험쥐 모두 이것을 잘 견뎌낸 것으로 보아 1,500 cGy 선량은 실험쥐의 간이 견딜 수 있는 선량으로 생각된다.

**Table 3.** Liver weight, food intake, body weight gain and FER of the rats fed the diet for 15days

Groups <sup>1)</sup>	Liver weight(g)	Food intake(g)	Body weight gain(g)	FER <sup>2)</sup> (%)
G1	11.17±1.45 <sup>3)NS</sup>	285.51±19.10 <sup>4a</sup>	49.97±12.55 <sup>5a</sup>	0.18
G2	11.93±1.62	272.72±27.53 <sup>d</sup>	60.91±10.76 <sup>d</sup>	0.22
G3	11.26±0.92	260.48±10.35 <sup>d</sup>	55.20±8.09 <sup>d</sup>	0.21
G4	12.09±0.92	204.47±28.14 <sup>b</sup>	12.40±4.65 <sup>b</sup>	0.06
G5	11.83±0.76	216.76±23.92 <sup>b</sup>	27.54±8.03 <sup>b</sup>	0.12

<sup>1)</sup>Treatments of animals are shown in detail on Table 1,

<sup>2)</sup>FER= [body weight increased during experimental period(g)/total food intake during experimental period(g)]×100,

<sup>3)</sup>NS: not significant at p<0.01,

<sup>4)</sup>Mean ± S.D.(standard deviation),

<sup>5)</sup>Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.01.

### 혈청의 비타민 C의 함량

15일 동안 사육한 후 혈청의 vitamin C 농도를 측정 한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 각 처리군이 유의적으로 낮았으며(p<0.01) 대조군을 제외한 전군사이에서의 유의적인 차이는 없었으나 vitamin C를 투여하지 않은 2, 4군보다 vitamin C를 투여한 3, 5군에서 더 vitamin C 농도가 낮은 경향이였다. 혈청의 vitamin C 함량이 대조군에 비해 각 처리 군에서 유의적으로 낮게 나타난 것은 방사선조사와 AFB<sub>1</sub>투여 시 vitamin C의 흡수를 감소시키거나

대사 전환을 증대시킨 것으로 생각된다. 또한 대조군을 제외한 전군에서의 유의적인 차이는 없었으나 vitamin C를 투여하지 않은 2, 4군보다 vitamin C를 투여한 3, 5군에서 더 vitamin C 농도가 낮은 것은 방사선조사와 AFB<sub>1</sub> 투여의 치명적인 산화 stress로 수용액 상에서 free radical이 형성되면서 이에 대응해 vitamin C가 가장 먼저 방어 작용에 사용되어(32) 일시적으로 소모량이 많아졌을 것으로 여겨진다. 그러나 본 실험과는 달리 정상 흰쥐에게 이들에 한번씩 2주간 100 mg/100 g 체중 수준으로 과량으로 복강 내 투여한 Im & Lee(33)의 연구와 흰쥐에게 300 mg/100 g 체중 수준으로 과량의 vitamin C를 4주간 경구 투여한 Lee 등(34)의 연구에서는 대조군에 비해 혈장의 vitamin C 수준이 유의적으로 현저히 높았다고 보고한 것으로 보아 투여된 vitamin C 농도, 기간 및 동물 처리 방법 등에 따라 그 영향을 받는 것으로 생각된다.

**Table 4. Vitamin C concentration of the serum in each group (mg/dL)**

	Vitamin C
G1 <sup>1)</sup>	0.067±0.01 <sup>2a</sup>
G2	0.011±0.00 <sup>3b</sup>
G3	0.008±0.01 <sup>b</sup>
G4	0.014±0.01 <sup>b</sup>
G5	0.008±0.02 <sup>b</sup>
p	0.000

<sup>1)</sup>Treatments of animals are shown in detail on Table 1

<sup>2)</sup>Mean ± S.D.,

<sup>3)</sup>Values with different superscripts within the same row are significantly different at p<0.01.

**혈청 중 AFB<sub>1</sub>의 함량**

**사용항체의 특성**

항체의 항원에 대한 특성을 검토한 결과, Table 5에서와 같이 AFB<sub>1</sub>의 교차반응성이 100%로 나타났으며, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>에 대한 교차반응성이 각각 23%, 16%로 나타났지만 그 외 aflatoxin B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, sterigmatocystin과는 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다.

**Aflatoxin B<sub>1</sub>의 표준 곡선 및 회수율**

면역분석법에 의한 혈청 AFB<sub>1</sub>의 농도를 측정하기 위하여 0.5 ng/mL에서 500 ng/mL의 농도범위에서 이 반복으로 표준곡선을 작성한바 Fig. 1과 같은 표준곡선을 얻을 수 있었다. 표준 AFB<sub>1</sub>의 농도가 높아짐에 따라 O.D값의 수치가 상대적으로 낮아지는 경향으로 나타나는 전형적인 면역분석법에서의 표준곡선을 보였다. 아울러 표준 AFB<sub>1</sub>를 10, 50, 100 ng/mL 량으로 정상 혈청에 spike하여 얻은 흡광치를 표준곡선에 대응시켜 농도를 구하고, 혈청에서의 회수율을

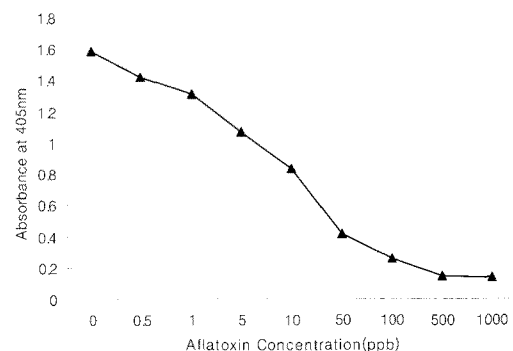
구한 결과 Table 6에서와 같이 76~91%로 나타났다. 이는 혈청 중에 존재하는 특정성분이 ELISA에 영향을 미친 것으로 생각되나 AFB<sub>1</sub> 정량에 크게 문제가 없을 것으로 판단되었다.

**Table 5. Cross reactivity of AFB<sub>1</sub> and analogues by indirect competitive ELISA<sup>1)</sup>**

Analogues	Cross reactivity (%) <sup>2)</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	100
Aflatoxin B <sub>2</sub>	-
Aflatoxin G <sub>1</sub>	23
Aflatoxin G <sub>2</sub>	16
Aflatoxin M <sub>1</sub>	-
Aflatoxin M <sub>2</sub>	-
Sterigmatocystin	-

<sup>1)</sup>Represents means of triplicate trials

<sup>2)</sup>Defined as a ratio of the amounts of Aflatoxin B<sub>1</sub> required to give 50% inhibition of maximal binding to the amount of test compound able to do the same(expresses as a percentage)



**Fig. 1. Indirect competitive ELISA standard curve for Aflatoxin B<sub>1</sub>.**

**Table 6. Recovery rate of the AFB<sub>1</sub> in serum after spiking of AFB<sub>1</sub>**

Concentration (ppb) <sup>1)</sup>	Absorbance (405 nm)	Standard deviation	Detected concentration (ppb)	Recovery rate (%)
10	0.418	±0.036	7.629	76
50	0.256	±0.052	44.212	84
100	0.138	±0.054	91.094	91

<sup>1)</sup>The standard curve originated in 0.5~500 ng/mL concentration of AFB<sub>1</sub> standard and represent means duplicate trials

**ELISA에 의한 혈청 중 유리 AFB<sub>1</sub>의 함량**

혈청 중의 AFB<sub>1</sub> 함량을 ELISA로 측정된 결과는 Table 7에서와 같이 AFB<sub>1</sub>을 단독 투여한 2군에서의 혈청 중 AFB<sub>1</sub>의 함량은 5.17±0.34 ng/mL이었다. 2군에 비해 2군에

vitamin C를 투여한 3군에서는  $3.23 \pm 0.76$  ng/mL로 나타나 유의적으로 약 38% 정도의 현저한 감소를 볼 수 있었다. 또한 X선 조사와 AFB<sub>1</sub> 병합 처리한 4군은  $5.62 \pm 0.44$  ng/mL 이었으나 4군에 vitamin C를 투여한 5군에서는  $4.84 \pm 0.36$  ng/mL로 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 이런 결과는 HPLC 측정법에서 얻은 결과와 같은 경향을 나타내었다.

Table 7. Concentration of AFB<sub>1</sub> in rat serum which detected by ELISA and HPLC methods

Groups <sup>1)</sup>	(ng/mL)	
	ELISA	HPLC
G2	$5.17 \pm 0.34^{2b}$	$4.82 \pm 0.17^{3b}$
G3	$3.23 \pm 0.76^a$	$2.77 \pm 0.23^a$
G4	$5.62 \pm 0.45^b$	$5.36 \pm 0.42^b$
G5	$4.84 \pm 0.36^b$	$4.33 \pm 0.14^b$

<sup>1)</sup>Treatments of animals are shown in detail on Table 1.

<sup>2)</sup>Mean  $\pm$  S.D.

<sup>3)</sup>Values with different superscripts within the same column are significantly different (ng/mL) among the groups by one way ANOVA. Each sample repeated three times.

#### HPLC에 의한 혈청 중 유리 AFB<sub>1</sub>의 함량

ELISA 분석에서 얻은 혈청 중 유리 AFB<sub>1</sub>의 분석신뢰성을 확인하기 위해 HPLC법에 의한 함량측정을 실시하였다. Fig. 2에서와 같이 표준 AFB<sub>1</sub> 1,000 ng/mL을 주입하였을 때 얻은 peak와 측정 시료에 표준 AFB<sub>1</sub> 500 ng/mL을 spiking 하여 얻었을 때의 peak가 동일한 retention time (4.92 min.)을 나타내었으며 그 경우 AFB<sub>1</sub> 단독투여군보다 peak area가 증가된 chromatogram으로 나타나 본 실험의 HPLC 분석 조건이 AFB<sub>1</sub> 분석에 적합한 것임을 확인하였다. HPLC에 의한 AFB<sub>1</sub> 함량계산은 표준 AFB<sub>1</sub>의 농도별 peak area의 직선회귀방정식에 의해 산출하였으며 그 결과는 Table 7과 같다. AFB<sub>1</sub> 단독 투여한 2군에서는  $4.82 \pm 0.17$  ng/mL이었으며 2군에 vitamin C를 투여한 3군은  $2.77 \pm 0.23$  ng/mL로 나타나 유의적으로 43% 정도의 현저한 감소를 볼 수 있었

다. 또한 X선 조사와 함께 AFB<sub>1</sub>을 처리한 4군에서는  $5.62 \pm 0.44$  ng/mL이었으며, 4군에 vitamin C를 함께 투여한 5군에서는  $4.33 \pm 0.14$  ng/mL로 유의적인 차이는 없지만 약간 감소하는 결과를 나타내었다. 이 결과는 AFB<sub>1</sub>의 잔류 농도 측정을 위해 사용한 ELISA와 같은 경향을 나타내었다.

이상의 결과에 대해 Park 등(35)은 AFB<sub>1</sub>을 투여한 후 vitamin E를 투여한 마우스 혈청 중의 AFB<sub>1</sub> 잔류량을 ELISA와 HPLC측정법으로 조사한 결과 각각 항산화제인 vitamin E를 투여함으로써 혈청 중 AFB<sub>1</sub>의 함량이 감소하였다고 보고한 바 있다. vitamin C는 독소를 포함한 여러 가지 돌연변이 전구물질(promutagen)의 산화적 대사 과정을 저해할 수도 있으며 산화 환원 완충계에서 유해한 자유기(free radical)를 제거하여 부산물(adduct) 형성을 저지시키는 것(20)으로 알려져 있다. 또한 vitamin C는 *in vitro*에서 활성산소를 포함하는 자유라디칼의 수용성 quencher로써 지질 과산화연쇄반응을 차단시키는 한편, 지용성 항산화제인  $\alpha$ -토코페롤 내지 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quencher인  $\beta$ -카로틴 등의 재생을 돕고, quencher dismutase에 대한 보호기능 등 강력한 항산화 효력을 나타내는 것으로 보고되고 있다(36,37). 또한 vitamin C는 항산화제로서 작용할 뿐만 아니라 prooxidant로도 작용한다고 Adlard(38)는 보고한 바 있다. George 등(39)은 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이 유발 및 발암에 대한 항산화효소에 대한 역할로서 AFB<sub>1</sub>은 cytochrome P-450에 의해서 저독성을 나타내는 AFQ<sub>2</sub>으로 대사되거나, carcinogenic AFB<sub>1</sub> epoxide를 형성하여 발암의 요인이 되는데 이때 AFB<sub>1</sub> epoxide는 세포 내의 glutathion (GSH)과 포함체를 형성하여 mercapturic acid 형태로 신속하게 배설되어 해독된다고 주장했다. 또한 돌연변이 형성 시 지질과산화에 의해 유도된 active oxygens, active free radical, carbonyl compound 등이 mutagenic initiation과 promotion 단계에 관여하며 이때 효과적인 항산화제가 돌연변이를 억제한다는 Mitsuo의 보고(40)도 있다. 이러한 보고에 따라 본 결과에서 vitamin C가 흰쥐의 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 잔류량을 감소시키는 것은 vitamin

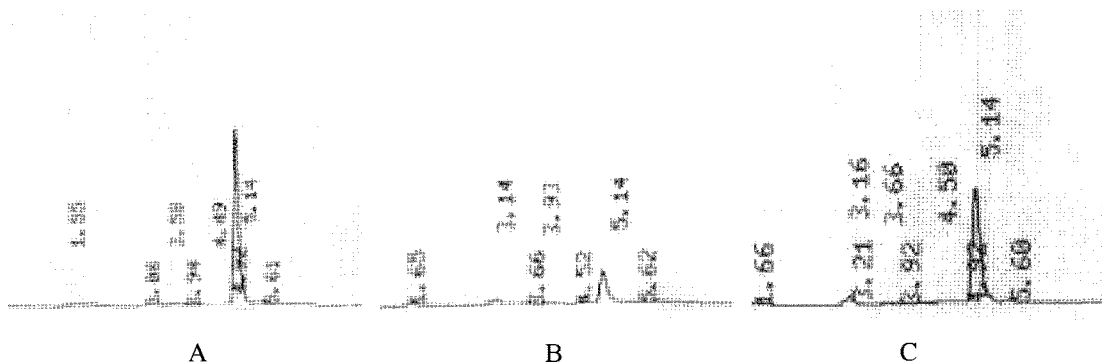


Fig. 2. Chromatogram of AFB<sub>1</sub> by HPLC analysis.

A; Standard AFB<sub>1</sub> (1000 ng/mL), B; The extracted sample from AFB<sub>1</sub> only treated rat serum C; B sample plus 500 ng/mL of standard AFB<sub>1</sub>.

C가 AFB<sub>1</sub>의 산화적 대사 과정인 산화 환원 완충계에서 유해한 자유기(free radical)를 제거하여 AFB<sub>1</sub> 부가체 형성을 저지시키는 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 항산화제 효소와의 synergist 역할로서 혈청중의 AFB<sub>1</sub> epoxide를 포함체로 형성하여 신속하게 배설하거나 돌연변이 생성단계인 initiation과 promotion에서 AFB<sub>1</sub> 생성을 억제하여 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 잔류량을 감소시키는 것으로 생각된다. 한편 X선 조사와 AFB<sub>1</sub> 병합 처리한 4군과 4군에 vitamin C를 투여한 5군과는 유의적인 차이를 볼 수 없었으나 다소 감소하였다. 이는 방사선과 AFB<sub>1</sub> 병합처리함으로 심한 조직 손상이 야기된 것으로 생각되며 이로 인해 vitamin C의 필요성이 더 증가된 것으로 생각된다. 또한 vitamin C의 용량에 따른 항산화 효과의 증가에 대한 논란이 있으므로 (41) vitamin C의 용량별 항산화 효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 Vitamin C의 투여에 따른 방사선 조사 시각에 따라 세포보호효과가 다르며(42) 방사선 조사 방법에 있어서 본 연구에서는 1회의 고용량의 방사선을 조사하였으나 실제 임상에서는 분할조사를 시행하게 되므로 분할 방사선 조사 시에 vitamin C의 항산화 효과가 어떻게 나타나는지에 대한 비교연구도 필요하리라 생각된다. 생체 시료에서 AFB<sub>1</sub>을 검출하기 위한 여러 분석법들이 수행되고 있으나 그 중 ELISA와 HPLC측정법을 비교해보면 ELISA법에 의한 아플라톡신의 분석은 특히 소량의 시료를 취급할 경우와 한 번에 많은 시료를 측정할 경우에 더욱 유용한 방법으로 인정되고 있으나 시료준비의 시간적소모와 기기분석의 복잡성을 배제하면 HPLC를 이용한 측정도 안전성이 있다고 판단된다. AFB<sub>1</sub>은 몇몇 동물실험에서 강력한 생물학적 활동성(LD50: 0.3~10.2 mg/kg)을 보이고 있으므로 미량의 독소가 존재하더라도 분석이 가능한 민감성있는 방법을 확립해야 할 필요성이 요구되고 있다(43). 국내에서는 임상 환자의 뇨중에서 ELISA법에 의하여 0.015 ng/mL의 AFB<sub>1</sub>이 검출되었다는 보고가 있다(44). Jung 등 (45)은 간질환자의 혈중에서 ELISA방법에 의하여 AFB<sub>1</sub>을 정량하였을 때 간경화군, 간암군 환자에서 각각 11.11%, 2.12%의 AFB<sub>1</sub>이 검출되었다고 보고하였다. 그러므로 AFB<sub>1</sub> 혈중 잔류량과 간암과의 관계를 알기 위해서도 이 독소를 민감하게 검출할 수 있는 물질과의 관계를 알아보는 것이 필수적이다. 본 실험에서는 소량의 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 독소를 정량할 수 있는 추출방법 및 검출조건의 확립과 vitamin C가 AFB<sub>1</sub>의 잔류정도에 미치는 영향을 조사하기 위해 이 용된 indirect competitive ELISA법은 매우 효과적이었고, 혈청 속 유리 AFB<sub>1</sub>의 잔류 농도를 0.001 ng/mL 까지 측정이 가능하였다. 이 방법은 사람의 혈청에서 혈청에 대한 pre-purification를 하지 않고 유사한 방법으로 측정하였을 때 0.05 ng/mL 까지 검출되었다는 Andrew (46)의 결과보다 더 민감도가 높았다. 또한 본 실험에 사용된 방법에서 나타난 AFB<sub>1</sub>의 회수율은 76~91%였으나 혈청을 메탄올로

pre-purification할 경우 민감도가 더 증가 될 수 있다는 보고 (46)에 따라 혈청과 메탄올을 1:1 비율로 섞어서 pre-purification할 경우 비 특이적 방해물질로 작용하는 혈청 단백질이 제거되어 혈청 내 AFB<sub>1</sub>의 회수율을 현재의 76~91% 수준보다 높일 수 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과를 통해 vitamin C가 전체적인 생체 대사과정에서 AFB<sub>1</sub>를 투여한 흰쥐의 혈청 중 AFB<sub>1</sub>의 함량을 감소시키는 것으로 나타났으며 그 결과 지질과산화 작용을 포함한 세포 독성 및 간암발생과정을 유효하게 억제할 것으로 생각되며 이를 이론적으로 체계화 할 수 있는 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

Aflatoxin은 *Aspergillus*속 곰팡이로부터 생성되며 사람에게 있어서 간독성, 및 간암을 유발하는 잠재력을 가진 대표적 곰팡이 독소이며, 생체에 섭취된 AFB<sub>1</sub>은 여러 가지 대사경로를 거쳐 동물 조직 내에 축적되는 것으로 알려져 있다. 방사선은 수술, 항암약물요법과 더불어 임상 시 중요한 치료방법이나 정상세포에 방사선을 조사하였을 때 반응성이 높은 활성산소와 과산화라디칼(OH•)을 생성하여 세포막의 불포화 지방산을 지질 과산화물로 변성시켜 세포 산화적 손상을 일으킨다. 본 연구는 곡류를 주식으로 하는 우리나라 사람들의 경우 AFB<sub>1</sub>에 노출되기 쉽고 이들 중 일부는 위, 간, 담도 암과 같은 상복부 암으로 진단되어 간을 포함하는 부위에 대해 방사선 치료를 받을 수 있는 경우를 생각하여 흰쥐에게 AFB<sub>1</sub>을 투여하거나 방사선과 AFB<sub>1</sub>을 병합처리하여 vitamin C가 흰쥐의 혈청중의 AFB<sub>1</sub> 잔류량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다. X-ray 조사는 실험기간 내 단 1회로 실험사육기간 첫 일에 조사 하였고 X-ray 조사 후 vitamin C를 투여하였으며 vitamin C 투여 1시간 후 AFB<sub>1</sub>을 투여하였다. vitamin C와 AFB<sub>1</sub>은 모두 복강투여로 실험 사육 첫일부터 1회 시작하여 3일에 한번씩, 5회 반복 투였으며 실험동물 사육기간은 총 15일로 하였다. 실험이 끝난 마우스 혈청 중 AFB<sub>1</sub>은 indirect competitive ELISA와 HPLC법으로 측정 후 비교하였다. ELISA 법에 의한 흰쥐의 혈청 중 AFB<sub>1</sub>의 함량은 ELISA 실험에서 AFB<sub>1</sub> 단독 투여한 2군에서는 5.17±0.34 ng/mL였으며, 2군에 vitamin C를 투여한 3군에서는 3.23±0.76 ng/mL로 감소하는 경향이였다. 또한 X선 조사와 AFB<sub>1</sub> 병합처리한 4군의 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 함량은 5.62±0.44 ng/mL이었으며 여기에 vitamin C를 함께 투여한 5군에서는 4.84±0.36 ng/mL로 약간 감소하는 결과를 나타내었다. 한편 HPLC 결과에서도 ELISA와 같은 결과를 나타내었으며, AFB<sub>1</sub> 단독 투여군(2군)과 X선 조사와 AFB<sub>1</sub> 병합처리군(4군)에서의 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 함량은 각각 4.82±0.17 ng/mL,

5.36±0.42 ng/mL 이었으나 여기에 vitamin C를 함께 투여한 3군과 5군에서는 각각 2.77±0.23 ng/mL, 4.33±0.14 ng/mL로 유의적인 감소를 보여 vitamin C가 흰쥐의 혈청 중 AFB<sub>1</sub> 잔류량을 감소시키는 것으로 나타났다.

### 참고문헌

1. Wang JS, Groopman JD (1999) *Mutat Res*, 424, 167-181
2. Hsieh DP, Atkinson DN (1990) Bisfuranoid mycotoxins: Their genotoxicity and carcinogenicity. In biological reactive intermediates IV(C.M. witmer. Ed). Plenum press, New York USA, p 525-532
3. Wilson BJ (1978) Hazards of mycotoxins to public health. *J Food Port*, 41, 375-384
4. Walkling, A.E, Bleffert G, Kiernan M (1968) An improved rapid physiochemical assay method for aflatoxin in peanuts and peanut products. *J Am Oil Chem Soc*, 45, 880-884
5. Walkling AE (1970) Collaborative study of three methods for determination of aflatoxin in peanuts and peanut products. *J Assoc off Anal Chem*, 53, 104-113
6. Pons WA, Jr LS, Li Lee, Stoloff L (1980) Revised method for aflatoxin in cottonseed products, and comparison of thin layer and high performance liquid chromatography determinative step: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, 63, 899-905
7. Romer TR, Ghouri N, Boling TM (1977) Minicolumn screening methods for detecting aflatoxin : state of art. *J Am Oil Chem Soc*, 56, 795-797
8. Campbell AD, Fransis OJ, Beebe RA, Stoloff L (1984) Determination of aflatoxin in peanut butter, using two liquid chromatographic method : Collaborative study. *J Am Oil Chem Soc*, 67, 312-316
9. Scott PM, Panalaks T, Kanhere S, Miles WF (1978) Determination of zearalenone in corn-flakes and other corn based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography/high resolution mass spectrometry. *J. Assoc Off Anal Chem*, 61, 593-600
10. Morgan MRA, Kang AS, Chan HS (1986) Aflatoxin determination in peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Sci Food Agric*, 37, 908-914
11. Langone JJ, Vunakis HV. 1976. Aflatoxin B<sub>1</sub>: Specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *J Natl Cancer Inst*, 56, 591-595
12. Pestka JJ, Li Lee, Harder WO, Chu FS (1981) Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *J Assoc Off Anal Chem*, 64, 294-301
13. EL-Nakid O, Pestka JJ, Chu FS (1981) Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in corn, wheat and peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase radioimmunoassay. *J Assoc Off Anal Chem*, 64, 1077-1082
14. Warner R, Ram BP, Hart CP (1986) Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agricul Food Chem*, 34
15. Siperstein MD (1970) Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr Top Cell Regul*, 2, 65-100
16. Rahimtula AD, Bereziat JC, Bussacchini GV, Bartsch H (1988) Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem Pharmacol*, 37, 4469-4477
17. Anderson RW, Warner NL (1976) Ionizing radiation and the immune responses. *Adv Immunol*, 24, 215-335
18. Boniver J, Aumblat C, Rongy A., Delvenne C, Delvenne P, Greimers R, Thiry A, Courtoy R, Defresne MP (1990) Cellular events in radiation-induced lymphomagenesis. *Int J Radiat Biol*, 57, 693-698
19. Diplock AT (1994) Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med*, 15, 293-376
20. Sato K, Niki E, Shimasaki H. 1990. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 279, 402-405
21. Guttenplan JB (1977) Inhibition by L-ascorbate of Bacterial Mutagenesis Induced by Two N-nitroso Compounds. *Nature*, 268, 368-370
22. Raina V, Gurtoo HL (1985) Effects of vitamin A, C and E on Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced Mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA-98 and TA-100. *Teratogenesis Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5, 29-40
23. Benedict WF, Wheatley WL, Jones PA (1980) Inhibition of chemically induced morphological transformation and reversion of the transformed phenotype by ascorbic acid in C3/H10T1/2 Cells. *Cancer Res*, 40, 2796-2801
24. Yasukawa M, Terasima T, Seki M (1989) Radiation-induced neoplastic transformation of C3H10T½ Cells is suppressed by ascorbic acid. *Radiation Res*, 120, 456-467
25. Margolis SA, Zeigler RG, Helzlsouer HJ (1991) Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurement in human serum and plasma. *Am J Clin Nutr*, 54, 1315-1320



26. Kawamura O, Maki S, Sato S, Ueno Y (1993) Ochratoxin A in livestock and human sera in japan quantified by sensitive ELISA. In human Ochrotoxicosis and its Pathologies(Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer GE) John Libby Eurotext INSERM, 231, 159-165
27. Liu MT, Ram BP, Hart LP, Pestka JJ (1985) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 50, 332-336
28. Kim DS (1994) Studies on the contamination in cereals and toxicity of ochratoxin A in mouse. PHD Thesis. Gyung Sang National university.
29. Duncan DB (1993) Multiple range test for correlated and heteroscedastic mean. *Biometrics*, 13, 164-176
30. Park SA (1993) Studies of sedum kamtschaticum fisch. on lipid peroxidation and hepatotoxicity. MS thesis. Sukmyung university.
31. Bannasch P, Mayer D, Hackre HJ (1980) Hepatocellular glycogenolysis and hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 605, 217-245
32. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costanini F, Riario-sforza G, Imbastaro T, Neri M, Cuccurullo F (1995) Vitamin E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis*, 112, 91-99
33. Im HS, Lee JW (1992) L-ascorbic acid administration on red blood cell hemolysis and tissue lipid peroxide levels in rats. *Kor J Gerontol*, 2, 153-158
34. Lee JW, Kim SY, Kwak CS (1997) Effects of excess vitamin C feeding on blood and liver lipid and its peroxidation levels and platelet thromboxane A2 formation in rats. *Korean J nutr*, 30, 639-649
35. Park SJ, Kim HK, Chung DH (2002) The effects of antioxidant vitamins on Residual Aflatoxin B1 in mice Serum. *J. Korean public health association*, 28, 81-88
36. Halliwell B, Foyer CH (1976) *Biochem J*, 155, 697
37. Varma S D, Srivastava VK, Richatds RD (1982) *Ophthal Res*, 14, 167
38. Adlard BPF (1974) *Biochem Soc. Transactions*, 2, 281
39. George H, Margaret M, Manson M, David J, Tanet L, Jonathan S, Lesley MF, Roland W, Gordon EN (1987) Metabolic basis for the protective effect of antioxidant ethoxyquin on aflatoxin B<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res*, 47, 5218-5223
40. Mitsuo, N (1990) Antioxidant/Antimutagens in food. A review, *food Sci Nutri*, 29, 273-300
41. Choi Jh, Yu BP (1989) The effect of food restriction on kidney membrane structure of aging rats. *American aging association*, 12, 133-136
42. Konopacka M, Rzeszowska-wolny J (2001). Antioxidant vitamin C, D and  $\beta$ -carotene reduce DNA damage before as well as after  $\gamma$ -ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*. *Muta research/Genetic toxi and enviro muta*, 494, 1-7
43. Newberne PM (1966) Effects of cirrhosis and other liver insults on induction of liver tumors by aflatoxin in rats. *Laboratory Investigation*, 15, 6
44. Lee YJ, Ha WS (1992) The Measurement of Aflatoxin B1 Urine of Some Korean. *J Korean Surg Soc*, 42, 376-391
45. Jung EC, Ha WS, Park ST, Choi SK, Hong SC, Han HS, Jung DH (1992) A Study on the Analysis of Aflatoxin B1 in Human Sera by ELISA, *J Korean Surg Soc*, 42, 419-428
46. Andrew PW, Denning DW, Michael RA (1988) An ELISA method for the rapid and simple determinatoin of aflatoxin in human serum. *Food Additives and Contaminants*, 5, 609-619

---

(접수 2010년 12월 9일 수정 2011년 4월 21일 채택 2011년 4월 29일)