

## Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간기능 장애에 미치는 당귀의 효과

윤수홍 · 조수열\* · 이윤경\* · 하두현\*\*

효성여자대학교 약학과, \*영남대학교 식품영양학과

\*\*영남대학교 환경대학원

## The Effect of Angelicae gigantis Radix on the Benzo(a)pyrene-induced Hepatotoxicity in Rats

Soo-Hong Yoon, Soo-Yeul Cho\*, Yoon-Kyung Lee\*, Do-Hyun Ha\*\*

*Dept. of Pharmacy, Hyosung Women's Univ.*

*\*Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam Univ.*

*\*\*Graduate School of Environmental Studies, Yeungnam Univ.*

### ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of Angelicae gigantis Radix extract on the hepatic detoxifying enzyme activities and lipids. Male sprague-dawley rats were administrated the extracts with benzo(a)pyrene, a hepatotoxic agent, inducing liver damages.

Results obtained from this study were as follows:

1. The markedly increased enzyme activities (AST, ALT, LDH, ALP,  $\gamma$ -GTP, GSH-Px) in B(a)P induced groups tended to be decreased by the treatment of the Angelicae gigantis Radix extract.
2. Liver GSH content and lipid peroxide activity were decreased by the administration of the extracts.
3. It tended that the curative effects were better than the protective effects of the extracts.

### 서 론

현대 산업사회가 발달하고 각종 생산활동이 활발해짐에 따라 인류의 건강을 위협하는 여러가지 오염

물질들이 증가하고 이에따라 각종 질병 특히 간장질환이 급증하고 있다.

Benzo(a)pyrene(이하 B(a)P로 약칭함)은 건강 위협 요소들인 유해산업 부산물, 식품오염물질중 가장 강력한 hepatotoxic agent로써 탄소화합물의

불완전 연소 및 열분해에 의해 생성되는 다환방향족 화합물<sup>1)</sup>로 환경중 어디에나 존재하는 강력한 발암 물질이며 체내로 들어오면 간장을 target organ으로 독성을 발현하는 것으로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. B(a)P 중독으로 간조직에서 효소계가 파괴 또는 손상될 뿐만 아니라<sup>4)</sup> 간세포의 microsome이 심한 손상을 입게 되어 MFO의 disorganization이 일어난다<sup>5)</sup>.

참당귀 (*Angelica gigantis* Nakai, Umbelliferae)의 꽃피기 전에 채취한 2년생 뿌리를 당귀 (*Angelicae gigantis* Radix)라 하며<sup>6)</sup> 예로부터 진통, 진정, 보혈, 활혈, 정혈, 강장제로 빈혈증과 부인병약으로 널리 이용되었고 산후요약으로 쓰인다. 또한 esculetin 유도체에 의한 담즙분비 촉진작용<sup>7)</sup>을 나타내어 여러가지 간기능 보호처방에 이용된다.

본 연구에서는 간질환 치료에 유효한 새로운 물질을 개발하기 위해 간장 발암물질인 B(a)P를 당귀로 전처리한 실험동물에 투여하고 간기능의 지표로 사용되는 효소활성도의 변화를 측정하여 간독성의 발현에 미치는 당귀의 간장해 예방효과 및 치료효과를 밝히고자 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험재료

당귀는 1990년 대구시내 약령시장에서 구입하여 세정, 음건한 후 실험재료로 사용하였다.

#### 2. 실험동물 및 약물투여

체중  $150 \pm 30$  g, S.D.계 male rat 56마리를 1주일간 고형사료로 자유급식시키며 실험실 환경에 적응하도록 예비 사육시킨 후 난괴법에 따라 군당 8마리

씩 분리하여 실험하였다.

처치군은 다음과 같다.

투여방법은 당귀의 water ext.(0.5 g/kg)와 methanol ext.(0.5 g/kg)를 1주일 동안 1일 1회 일정시간에 경구투여하였으며 B(a)P 0.1 mg/kg은 당귀의 간장해 치료효과를 보기 위해서는 최초 당귀 ext. 투여시 동시에 복강주사하여 1주일 후에 도살하였으며 간장해 예방효과를 보기 위해서는 최종 당귀 ext. 투여시 동시 투여하여 12시간 후에 도살하였다.

### 3. 생화학적 검사

#### ① 효소 시료 조제

최종투여 후 12시간 절식시킨 동물을 도살하여 복부대동맥으로 채혈하고 실온에서 1시간 방치한 후 원심분리(3,600 rpm, 15분)하여 혈청을 분리하였다. 관류(0.9% NaCl)시킨 간장을 적출하여 간조직 1g당 빙냉의 0.25 M sucrose buffer solution을 4배량 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하여 균질액을 얻었다. 이 균질액을 600xg에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상정액을 얻고 이것을 다시 10,000xg에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. Mitochondrial fraction을 제거시킨 상정액을 cytosolic fraction으로 하여 glutathione peroxidase의 활성 측정의 효소원으로 사용하였으며 효소활성은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 법<sup>8)</sup>에 준하여 측정된 단백질 mg당의 specific activity로 나타내었다.

#### ② 지질함량 측정용 시료 조제

간조직은 0.9% NaCl로 10배 homogenate한 후 Folch법<sup>9)</sup>에 준하여 chloroform : methanol(2 : 1)

Group	Treatment	Group	Treatment
A Normal	무처리	E 예방처치군	쑥 수침액 + B(a)P
B Toxicant control	B(a)P 1회 복강주사	F Drug control	쑥 methanol 추출액 1주일 투여
C Drug control	쑥 수침액 1주일 투여	G 예방처치군	B(a)P + 쑥 methanol 추출액
D 치료처치군	B(a)P + 쑥 수침액	H 치료처치군	쑥 methanol 추출액 + B(a)P

혼액으로 지질을 추출하여 지질측정용 시료로 사용하였다.

③ 효소 활성도 측정

ALT, AST 활성은 Reitman-Frankel법<sup>10)</sup>, alkaline phosphatase(ALP) 활성은 Kind-King법<sup>11)</sup>,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GTP) 활성은 Orłowski변법<sup>12)</sup>을 이용한 kit에 의하여 lactate dehydrogenase(LDH) 활성은 Berga-Broida법<sup>13)</sup>에 준하여 비색정량하였으며 glutathion peroxidase(GSH-Px)의 활성은 Paglia와 Valentine의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 측정하였다.

④ 간장의 glutathione(GSH) 함량 측정

Ellman의 방법<sup>15)</sup>에 따라 비색정량하였다.

⑤ 간장의 과산화지질 함량 측정

Ohkawa 등의 방법<sup>16)</sup>에 따라 TBA 방법을 이용하여 생성된 malondialdehyde양을 측정하였다.

⑥ 지질 함량 측정

Total cholesterol은 효소(cholesterol esterase)법<sup>17)</sup>, triglyceride는 Muller법<sup>18)</sup>, phospholipid은 효소(phospholipase)법<sup>19)</sup>을 사용한 Kit에 의하여 비색정량하였다.

⑦ 통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 유의성은 PCS(pharmaceutical calculation system) program을 이용한 T-test에 준하여 검정하였다.

실험결과 및 고찰

1. 혈청의 aminotransferase 활성변화

당귀로 전처리한 실험동물의 복강내로 B(a)P를 투여하였을 때의 혈청 ALT 및 AST 활성변동을 상호 비교한 성적은 표 1에 나타내었다.

B(a)P 투여는 ALT 활성을 유의성있게 증가시켰으며 당귀 추출물을 병용투여한 군에서는 water ext.의 경우와 methanol ext.의 경우 모두 유의성 있게 감소하였다. AST 활성 역시 B(a)P 단독 투여로 유의성 있는 증가를 보였고 당귀 추출물 병용 투여시 유의성 있게 활성이 감소하였다. ALT와 AST의 경우는 당귀 추출물의 치료 효과가 예방효

Table 1. Effect of *Angelicae gigantis Radix* on Serum Transaminase Activity in B(a)P treated Rats. (Karmen unit/ml)

Groups	AST	ALT
A	20.26 ± 1.93	22.42 ± 3.04
B	79.29 ± 8.92 <sup>1a</sup>	54.10 ± 5.69 <sup>2a</sup>
C	21.96 ± 7.36 <sup>1b</sup>	23.44 ± 7.41 <sup>1b</sup>
D	56.96 ± 13.82 <sup>2b</sup>	38.60 ± 3.97 <sup>1b, 1c</sup>
E	42.42 ± 3.40 <sup>1a, 1b, 1c, 1d</sup>	28.38 ± 6.69 <sup>1b, 1c, 1d</sup>
F	50.64 ± 4.12 <sup>1a, 1b</sup>	24.34 ± 1.80 <sup>1b, 1e</sup>
G	72.16 ± 14.74 <sup>1c, 2d</sup>	34.08 ± 4.45 <sup>1b, 1c, 1e, 1f</sup>
H	43.20 ± 9.94 <sup>1a, 1b, 1d, 1e, 1f</sup>	31.04 ± 2.57 <sup>1b, 1e, 2f</sup>

\*Values are Mean±S.D. (n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1; P<0.01, 2; P<0.05.

과보다 더 좋은 경향을 나타내었다.

2. 혈청의 LDH 활성 변화

당귀 추출물과 B(a)P 투여에 따른 혈청 LDH 활성 변동은 표 2와 같다.

당귀추출물 단독 투여군들은 거의 활성변동을 보이지 않았고 B(a)P 투여로 인한 활성증가는 유의적이었으며 이 증가는 당귀 수침액 투여의 경우가 methanol 추출액 투여시 보다 회복 효과가 더 좋을 것을 보였다.

3. 혈청의 ALP 활성변화

혈청 ALP 활성의 변화는 표 2와 같다.

당귀추출물 단독 투여로 약간의 활성증가를 보였고 B(a)P 단독투여로 인한 활성의 증가를 당귀추출물 병행 투여로 현저히 감소시켰으나 정상 수준에는 미치지 못하였다.

**Table 2. Effect of Angelicae gigantis Radix on Serum LDH and ALP Activity in B(a)P treated Rats.**

Groups	LDH ( $\times 10^2$ ) (Berga-Broida unit/ml)	ALP (King-Armstrong unit/ml)
A	5.28 $\pm$ 2.19	16.21 $\pm$ 3.37
B	15.45 $\pm$ 1.79 <sup>1a</sup>	37.09 $\pm$ 9.40
C	6.63 $\pm$ 2.27	21.39 $\pm$ 3.61
D	7.61 $\pm$ 2.12 <sup>1b</sup>	26.89 $\pm$ 2.00 <sup>2a, 1c</sup>
E	7.20 $\pm$ 2.27 <sup>2e</sup>	25.46 $\pm$ 3.61 <sup>1d</sup>
F	5.20 $\pm$ 8.21 <sup>1a, 1b, 1c, 1d, 1e</sup>	17.55 $\pm$ 3.80 <sup>1a, 2c, 1e</sup>
G	10.11 $\pm$ 4.76 <sup>2b, 2f</sup>	29.36 $\pm$ 2.65 <sup>1e</sup>
H	13.17 $\pm$ 6.64 <sup>2b, 2g</sup>	17.51 $\pm$ 5.71

\*Values are Mean $\pm$ S.D. (n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1; P<0.01, 2; P<0.05.

#### 4. 혈청의 $\gamma$ -GTP 활성변화

당귀 추출물과 B(a)P 투여에 따른 혈청  $\gamma$ -GTP의 활성변화는 표 3과 같다.

B(a)P 투여로 인한  $\gamma$ -GTP 활성증가는 당귀 추출물 투여로 수침액과 methanol 추출액군 모두 유의있게 감소되었다. 이로써 당귀에는 간조직 손상에 대한 예방 및 치료인자가 있을 것으로 사료된다.

#### 5. 간장의 GSH-Px 활성 변화

표 3은 당귀 추출물과 B(a)P 투여에 따른 GSH-Px 활성 변화를 나타낸 것이다.

당귀 추출물 단독 투여는 수침액과 methanol 추출액군 모두 약간의 독작용을 나타내었으나 강력한 독성물질인 B(a)P와 병용투여시에서는 오히려 그 작용을 완화시켰다.

#### 6. 간장의 GSH 함량

당귀 추출물과 B(a)P 투여로 인한 간조직 중의 GSH 함량을 측정된 결과는 표 3과 같다.

**Table 3. Effect of Angelicae gigantis Radix on Serum Glutathione, Glutathione-peroxidase &  $\gamma$ -GTP Activity in B(a)P treated Rats.**

Groups	Glutathione	Glutathione-peroxidase	$\gamma$ -GTP (mg/ml)
A	2.51 $\pm$ 0.19	6.53 $\pm$ 0.53	2.55 $\pm$ 1.44
B	3.27 $\pm$ 0.40 <sup>2a</sup>	20.44 $\pm$ 1.34	6.90 $\pm$ 3.84
C	2.72 $\pm$ 0.19	11.04 $\pm$ 1.30	4.01 $\pm$ 1.86
D	2.93 $\pm$ 0.40	15.04 $\pm$ 3.87	4.26 $\pm$ 1.36 <sup>1a, 1b, 1c</sup>
E	2.97 $\pm$ 0.28 <sup>1a, 2c</sup>	12.33 $\pm$ 3.37	4.01 $\pm$ 0.59 <sup>1d</sup>
F	2.78 $\pm$ 0.37 <sup>1a, 2c</sup>	11.78 $\pm$ 1.47	2.72 $\pm$ 1.05 <sup>1a, 1b, 1e</sup>
G	3.22 $\pm$ 0.28 <sup>2a</sup>	17.74 $\pm$ 2.84	2.98 $\pm$ 0.90 <sup>2b, 1d, 2e, 1f</sup>
H	3.01 $\pm$ 0.38 <sup>2a</sup>	12.98 $\pm$ 1.96	3.55 $\pm$ 1.87 <sup>1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 1g</sup>

\*Values are Mean $\pm$ S.D. (n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1: P<0.01. 2: P<0.05.

GSH 함량은 당귀 추출액 급여군이 대조군에 비해 모두 증가하는 경향이였다. B(a)P 단독 투여군에서는 유의성 있게 증가하였으나 당귀 추출물과 병용 투여시 수침액과 methanol 추출액 모두 GSH 함량을 감소시키는 경향을 보였다.

7. 간장의 과산화지질 함량

당귀 추출물과 B(a)P 투여가 간조직 과산화지질 함량 변동에 미치는 영향을 관찰한 결과를 표 4에 나타내었다.

과산화지질의 함량은 당귀 추출액 투여군에서 증가하였으며 B(a)P 단독 투여군 역시 유의적인 증가를 보였다. 당귀 추출물과 B(a)P를 병용하여 투여할 경우 당귀 추출물 단독 투여군보다 더 낮은 함량을 보일만큼 현저한 감소 경향을 보였다.

Table 4. Effect of *Angelicae gigantis Radix* on Serum Lipid Peroxide and Total Cholesterol Level in B(a)P treated Rats.

Groups	Lipid peroxide (nM/g of tissue)	Total cholesterol (mg/dl)
A	7.63±4.45	46.26±9.31
B	29.42±3.95	70.45±6.79
C	13.74±2.40 <sup>2a</sup>	48.53±7.47
D	10.62±3.00 <sup>1a, 1b, 2c</sup>	52.94±2.42 <sup>1b, 2c</sup>
E	9.51±5.92 <sup>1d</sup>	57.35±5.97 <sup>2b</sup>
F	10.77±2.68 <sup>1a, 1b, 1c, 1d, 1e</sup>	47.62±9.48 <sup>2d</sup>
G	27.72±3.82 <sup>2b, 1f</sup>	63.11±20.34 <sup>2a, 1b, 2c, 2e, 2f</sup>
H	18.24±7.81 <sup>1a, 1b, 1c, 1d</sup>	58.41±7.29

\*Values are Mean±S.D. (n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1; P<0.01, 2; P<0.05.

Table 5. Effect of *Angelicae gigantis Radix* on Serum Phospholipid and Triglyceride Level in B(a)P treated Rats.

Groups	Phospholipid	Triglyceride
A	39.52±4.44	43.38±9.84
B	201.38±25.67	108.09±28.46
C	66.16±7.33	48.84±5.25
D	75.48±8.24 <sup>1a, 1c</sup>	74.26±3.14 <sup>1a, 1c</sup>
E	79.68±4.58 <sup>1d</sup>	54.82±9.79 <sup>1d</sup>
F	46.45±8.90 <sup>2c, 1d</sup>	58.27±8.14 <sup>2c, 1d</sup>
G	73.71±10.44 <sup>1a, 1c, 1e, 1f</sup>	70.36±8.46 <sup>1c, 1d</sup>
H	87.87±9.85	65.97±10.78 <sup>1a, 1c, 1e, 2f</sup>

\*Values are Mean±S.D. (n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1; P<0.01, 2; P<0.05.

8. 지질 함량 변화

당귀 추출물과 B(a)P 투여에 따른 혈청 중의 total cholesterol, phospholipid, triglyceride 함량 변동은 표 4, 5에 나타나 있다.

Total cholesterol, phospholipid, triglyceride 함량은 B(a)P 투여로 현저한 증가를 보였으며 당귀 추출물 병용투여군에서는 그 증가치가 감소됨을 볼 수 있었고 특히 total cholesterol치의 감소 효과가 가장 현저하게 나타났다.

간조직 중의 지질 함량 변동은 표 6과 같다.

Total cholesterol 함량은 당귀 추출물 단독 투여시는 별변동이 없었으나 B(a)P 단독 투여에서는 그 함량이 훨씬 증가되는 경향이였다. 당귀 추출물과 B(a)P 병용 투여시에는 이를 감소시키는 경향을 보였다. Phospholipid 함량은 B(a)P 단독투여와 함께 당귀 추출물의 단독투여시에도 함량을 증가시키는 경향을 보였으며 B(a)P와 병용 투여시 B(a)P 단

**Table 6. Effect of Angelicae gigantis Radix on Liver Lipid Accumulation in B(a)P treated Rats.**

Groups	Triglyceride	Total cholesterol	Phospholipid
A	43.38± 9.84	43.06±9.30	46.45± 8.26
B	108.09±28.64	70.45±5.90	82.58±14.52
C	48.84± 4.25	47.61±5.98	79.68± 4.57
D	58.47± 8.05 <sup>1a, 1c</sup>	52.94±2.42 <sup>1b, 3c</sup>	75.48± 9.24 <sup>1a, 1b, 1c</sup>
E	54.82± 9.79	58.42±7.47 <sup>1b</sup>	66.13± 7.33 <sup>1d</sup>
F	74.26± 3.14 <sup>1a, 2b, 1c, 1e</sup>	46.26±7.28 <sup>2d</sup>	59.52±10.44 <sup>2c, 1d</sup>
G	70.36± 6.44 <sup>1f</sup>	63.71±8.34 <sup>2a, 1b, 3c, 3e, 2f</sup>	65.97± 9.78 <sup>1c, 1d</sup>
H	87.87± 9.85 <sup>1a, 1c, 2e</sup>	57.35±7.48 <sup>2b</sup>	73.77± 8.90

\*Values are Mean±S.D.(n=6).

\*Within the same horizontal row with different subscripts letters (marked upper right site) represent significant difference.

a; A vs each groups, b; B vs each groups, c; C vs each groups, d; D vs each groups, e; E vs each groups, f; F vs each groups, g; G vs each groups, h; H vs each groups.

1; P<0.01, 2; P<0.05.

독 투여보다 함량이 감소됨을 볼 수 있었다. Triglyceride 함량 변동은 수침액군은 거의 변동이 없었으나 methanol 추출액군은 상당히 증가하는 경향을 보였으며 B(a)P 단독 투여군 역시 현저한 증가를 일으켰다. 당귀 추출물과 B(a)P 병용 투여시에는 수침액군이 methanol 추출액군에 비해 회복 효과가 더 큼을 볼 수 있었다.

## 결 론

아무런 이론적인 체계를 갖추지 못한채 그 효능에 대한 경험적 지식에 의해 민간에서 널리 사용되는 민간약물이 다수 전승되어 오고 있는 실정에서 이들 약물의 약효 및 안전성에 관한 과학적인 근거를 확립하기 위해 간기능의 보호 및 간장해 치료 효과가 현저하다고 알려진 당귀가 물질대사에 중요한 역할을 하는 효소 및 지질 성분 변화에 미치는 효과를 구명할 목적으로 간 독성물질인 B(a)P으로 간 손상을 유도한 실험동물에 당귀 추출물을 투여함으로써 간 해독 과정에 관여하는 효소의 활성 및 지질 성분에 미치는 영향을 고찰하였다.

1. B(a)P 투여로 혈청의 AST, ALT 활성 및 지

질과산화물의 함량이 현저히 증가하였으나 당귀 추출물 급여로 높아진 활성이 감소하였다.

2. B(a)P의 투여로 증가한 혈청의 LDH, ALP 및  $\gamma$ -GTP 활성은 당귀 추출물을 투여함으로써 감소하였으며 대체로 예방 효과보다는 치료 효과가 더 좋은 경향을 보였다.

3. 간 해독계 효소인 GSH-Px는 B(a)P를 투여함으로써 증가되었으나 당귀 추출물 투여로 활성이 낮아졌다.

4. 간장의 GSH 함량은 B(a)P 투여로 증가하는 경향을 보였다.

5. 혈청 total cholesterol, phospholipid 및 triglyceride 함량은 B(a)P 투여로 증가하였으며 당귀 추출물 투여로 감소하였다.

6. 간장의 total cholesterol, phospholipid 및 triglyceride 함량은 당귀 추출물 단독 투여시에는 증가하는 경향을 보이나 B(a)P와 병행 투여시에는 B(a)P 단독 투여로 현저히 높아진 함량이 감소되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1991년도 한국과학재단 목적기초 연구비 지원에 의해 일부 이루어졌으며 이에 감사를 드린다.

### REFERENCES

1. Frank, E.G. and Jerome, J.P.; Introduction to environmental toxicity. Elsevier North Holland, **27**, 360 (1978)
2. Okey A.B., Duba A.W. and Vella L.M.; *Cancer*, **44**, 1426 (1984)
3. Dorland's Illustrated medical dictionary, 27ed., Saunder company, 200 (1988)
4. A. Bindoli, L. Cavallini and N. Silirandi; *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2405 (1981)
5. 김영민 ; 독성학. 강담사, **8**, 249 (1984)
6. 보건사회부 ; 대한약전 II-1, 102 (1968)
7. 한덕룡 ; 대한약학회지, **10**, 20 (1968)
8. Lowry, O.H., Rose brough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.; *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
9. Folch J., Mee L. and Stanley G.S.H.; *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
10. Reitman, S. and Frankel, S.; *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58 (1957)
11. P.R.N. Kind and E.J. king; *J. Clin. Pathol.*, **7**, 322 (1954)
12. Orłowski M. and Szewczuk A.; *Clin. Chem. Acta.*, **5**, 680 (1960)
13. Berga, L. and Broida, D.; Sigma technical bullition, 500-8-60 (1960)
14. Paglia, E.D. and Valentine, W.N.; *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158 (1967)
15. Ellman, G.L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
16. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K.; *Anal. Biochem.*, **95**, 352 (1979)
17. Richmond, V.; *Clin. Chem. Biochem.*, **198**, 1350 (1973)
18. Takayama, M. *et al.*; *Clin. Chem. Acta.*, **79**, 93 (1977)
19. Muller P.H.; *J. Clin. Chem.*, **15**, 457 (1977)