

S³⁵(1,2-dichloro vinyl) L-Cysteine의

소에 의한 代謝物의 分離

金 載 勛

서울대학교農科大學

(1961年12月 1日 受理)

緒 論

大豆는 重要農産物의 하나이며 그 많은 量이 大豆油의 原料로 消費되며 기름을 짜고난 所謂 “콩개묵”은 家畜의 飼料 또는 사람의 食品等의 原料로 쓰인다.

大豆에서 기름을 얻는 方法에는 機械的인 壓搾法과 溶媒를 써서 抽出하는 方法이 있는데 後者가 기름의 收率이 더 좋은 까닭에 歐美各國에서는 漸次 이 抽出法이 發達하게 되었다.

大豆油抽出에 使用하는 溶媒에는 benzene Naphtha 및 Hexan 등이 있으나 引火性 인 까닭에 作業中 特別한 注意를 하여야 한다. 그러나 Trichloroethylene은 引火性이 아니고 廉價인 故로 가장 有利한 大豆油抽出溶媒인 것이다.

故로 美國을 비롯한 여러 나라에서 한때 이 方法이 發達되었으나 이 方法으로 大豆油를 抽出한 大豆粕이 家畜飼料로서 소에 毒性(I)을 이르는 故로 現在는 그다지 使用되고 있지 않다.

大豆粕抽出에 Trichloroethylene이 쓰이기 始作한 數年後에 Stockman (2)은 이 大豆粕을 소에 먹으면 食慾缺乏 (Anorexia) 呼吸困難 (dyspnea), 可視粘膜에 出血이 되고 鼻孔 및 直腸에서 流血이 되고 泌乳양소의 量이 中斷되며 이들 症狀이 나기 始作하며 17日以內에 斃死한다고 報告하였다. 또 그는 가장 顯著한 症狀으로는 血液이 여러 組織內에 滲出되는 것이라고 하고 詳細한 研究의 結果 이러한 症狀은 모다 Trichloroethylene 으로 기름을 抽出한 大豆粕에 起因하는 것을 밝혔다.

또 Stang et. al (3)은 leuko penia, Prichard et. al (4)은 thrombocytes가 減少한다는 것을 報告하였다.

그後 여러 사람이 有毒成分을 밝히기 爲한 研究를 거듭하여 Schlitz et al(5)은 S-(1,2-dichloro vinyl) L-cysteine (DCVC)를 소에 먹으면 Trichloroethylene으로 大豆油를 抽出한 大豆粕을

먹었을때와 같은 症狀을 이르는 것으로 보아 DCVC를 이 大豆粕飼料의 有毒性分으로 推定하였다.

Derr (6)는 DCVC의 代謝를 研究하기 爲하여 S³⁵-DCVC를 合成하며 소에 먹인後 排泄되는 소의 大便, 小便을 받아 小便中の S³⁵-放射性化合物을 Moore, Stein 法으로 分離를 試圖하며 Inorganic sulfate를 包含하는 8 fraction으로 分離하였다.

그러나 Moore stein法(7)에서는 Citrate buffer를 쓰야 하는데 極微量의 S³⁵-化合物이 除去하기 힘든 많은 量의 Citrate buffer 속에 있는 故로 S³⁵-代謝化合物의 構造等을 研究하기에 大端히 不利한 것이다.

故로 本人은 蒸發等으로 쉽게 除去할 수 있는 Propanol-water (70:30V/V)로 Cellulose powder Column에 吸着된 試料를 elute하여 S³⁵-化合物을 分離하였다.

또 兼하여 소의 糞中の S³⁵-代謝化合物의 數를 알기 爲하여 Moore, Stein法(7)을 써서 分離하였다.

實驗方法

1. 試料

Derr (8)가 合成한 S³⁵-DCVC를 Holstein양소에 注射한後 排泄되는 糞과 尿를 모아 冷藏庫에 保存했던것을 使用하였다.

이 尿試料를 녹여 濾過한 것을 6ml 取하여 Vacuum desicator로 五酸化磷을 써서 乾燥시킬 다음 約 2ml의 Propanol-water (70:30V/V)에 녹였다.

또 糞試料도 이것을 녹여 4gm을 取하여 遠心分離한後 Ultrafiltration 하였다.

2. 分離

a. 尿中の S³⁵-化合物의 分離

Propanol-water (70:30 V/V)에 Gennine Watman Cellulose powder (W. and R. Balston, LTD, England)를 約 3晝夜 浸漬하면서 가끔 攪拌

하여 空氣를 完全히 除去하며 直徑 2.3cm의 glass column에 부어 한번에 約 5cm씩 沈澱시킨 다음 rod로서 上部에서 強하게 눌러 可及的均一하게 93 cm의 기리가 되게끔 Packing 한後 約 5日間 蒸溜水를 通過시키고 다음에 Propanol-water (70:30 V/V)를 通過시켰다.

이 Column이 Propanol-water (70:30 V/V)로 完全히 平衡되었을때 上記와 같이 調製한 試料를 이 Column의 上部에 注意하여 붓고 그 試料의 上端이 이 Cellulose column의 上端에 이르렀을때 Propanol-water (70:30 V/V)을 부어 約 10cm의 水銀柱差의 空氣壓力으로 加壓하며 Elute 하여 fraction Collector를 써서 2.74ml式 試驗管에 받았다.

b. 糞中の S³⁵化合物의 分離

Downen 50×5 Resin Column을 써서 Moore, Stein 法으로 分離하였다.

分離操作은 Citrate buffer의 pH와 Inoic strength를 變化시키는 同時에 Water-jacket의 溫度를 30°C에서 50°C로 올려가며 elute하며 fraction collector를 써서 5.37ml式 試驗管에 받았다.

3. 放射能의 測定

各 試驗管에서 一定量의 eluente를 直徑 3cm의 Aluminum planchet에 pipetting하고 다시 蒸溜水로서 均一하게 퍼지게 한다음 赤外線燈을 써서 完全히 乾燥시켜 放射能을 測定하였다.

放射能은 Nuclear-Chicago Model D-47 Gas flow Counter를 Nuclear-Chicago Model C-110B

Automatic Sample Changer Model 182 Scaler 및 Model 11B Printing timer와 連結시켜 Counting 하였다.

Counter의 氣體는 98.7%의 helium와 1.3%의 butane이 드리있는 Geiger Q-gas (Matheson)를 使用하고 約 1400 Volt, 10×128 Scal로서 Counting 하였다. 이 Counting 前後에는 C¹⁴-Solid-standard로서 check하였다.

4. 各 fraction의 Homogeneity.

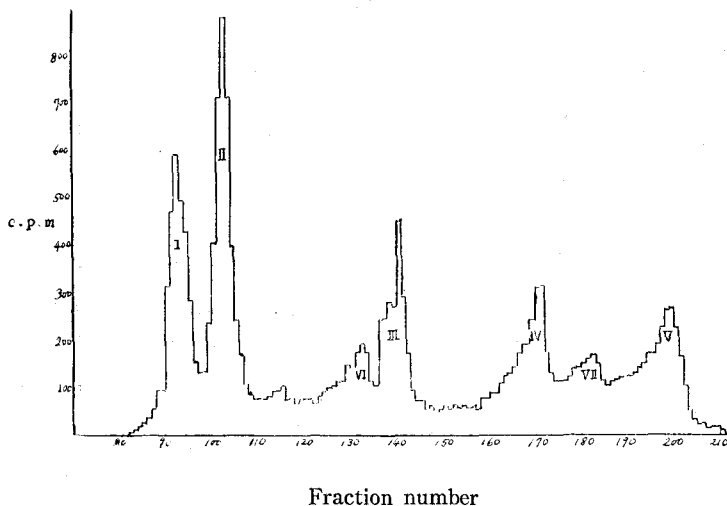
各 peak에서 가장 放射能이 높은 fraction에서 約 3000 Counts per minute가될 eluente量을 取하여 Watman paper No. 1에 spotting하여 Propanol-water (70:30V/V)를 써서 約 16時間 展開시켜 乾燥한것을 約 3cm 넓이의 strip로 만들어 Vanguard automatic chromatogram Scanner Model 800 Auto scanner를 써서 Scanning하였다. Scanning의 Scale은 1000, 1cm로 놓고 Chart speed는 1時間當 3/4 inch, time constant는 5sec로하였다.

實驗結果

a. 尿中の S³⁵化合物分離

fraction collector로 받은 eluente의 各 fraction에서 0.3ml式을 取하며 上記와 같은 方法으로 放射能을 測定한 結果를 fraction Number VS. C. P. M.로 plotting한 것은 다음 Fig. 1 "Cellulose powder Column separation of Calf urine"과 같다.

Fig. 1 Cellulose powder column separation of calf urine
(Urine excreted after administration of S³⁵-DCVC)



全試料의 總放射能에 對한 Recovery는 90.7%
 였으며 各 peak의 放射能의 %는 다음 Table I.
 "Radioactivity % each peak fractions from urine"
 과 같다.

Table I. Radioactivity % of each fractions
 from urine

Peak No.	% of Radioactivity
I	16.1%
II	20.9%
III	12.8%
IV	15.7%
V	15.4%
VI, VII 其他	19.1%

各 fraction의 Homogeneity를 알기 爲하여 主要
 한 5個의 peak fraction에 對하여 上記의 方法으
 로 Scanning한 結果는 다음 Fig. 2 "Homogeneity
 of S^{35} -Component in each fraction"와 같다.

또 이들에 對한 Rf 値는 Table 2 " S^{35} -
 Components in each peak fraction"과 같다.

Fig. 2 Homogeneity of S^{35} -component in
 each fraction

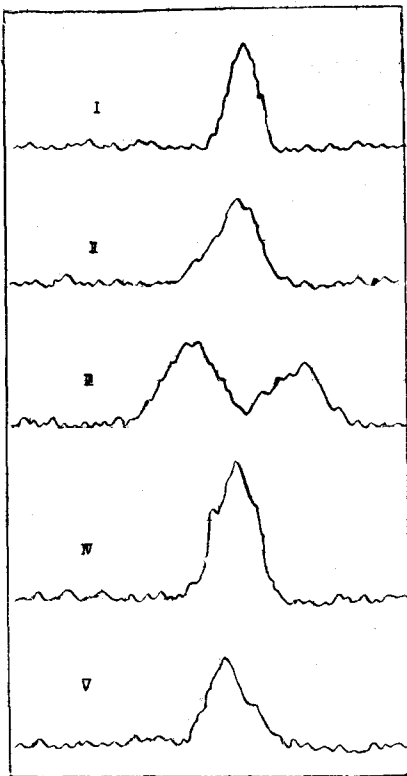


Table 2. Rfs of S^{35} -Components in each
 peak fractions

Peak No.	Rf value
I	0.815
II	0.447
III	0.090, 0.171
IV	0.142
V	0.084

b. 糞中の S^{35} -化合物의 分離

fraction Collector로 받은 各 fraction에서 elu-
 ent 0.5ml 式을 取하여 放射能을 測定한 結果는
 fig. 3 "Ion-exchange separation of Calf feces"
 와 같다.

各 peak 中 가장 높은 Radioactivity를 가진
 fraction을 上記와 같은 方法으로 Homogeneity를
 檢討하였든바 各 分明한 一個式의 peak를 나타냈
 다.

各 peak의 總放射能에 對한 %는 다음 Table 3
 "Radioactivity % of each peak fraction from
 feces"와 같다.

Fig. 3 Ion-exchange separation of calf feces
 (Feces excreted after administration
 of S^{35} -DCVC)

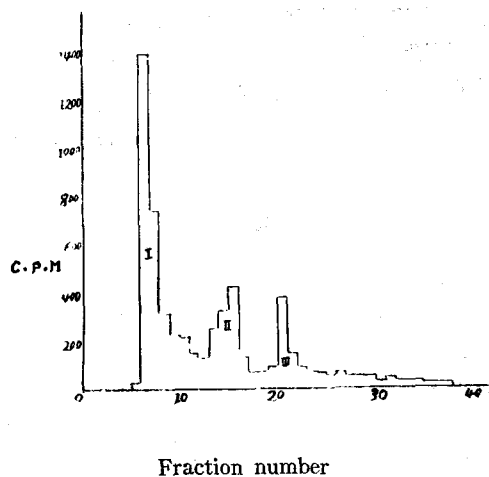


Table 3 Radioactivity % of each peak fra-
 ction from feces

peak No	% of Radioactivity
I	60.4%
II	26.1%
III	13.5%

考 察

a. 尿中の S^{35} -化合物

Fig. 1에서 分명한 5개의 peak와 2개의 적은 peak를 볼수 있는데 이 5개의 peak의 Homogeneity를 檢討한 Fig. 2는 peak I, II, IV과 V에는 各 1개의 S^{35} -化合物이 드러있고 peak III는 2개의 peak를 나타내는 故로 두가지 S^{35} -化合物이 들어 있는 것을 알 수 있다.

적은 2개의 peak에 各 1개의 S^{35} -化合物이 드러 있다고 假定하면 全部 8개의 S^{35} -化合物이 드러 있는 것이된다.

이것은 Derr (6)가 Moore, stein 法으로 分離한 化合物의 數와 一致하는 것이다.

적은 2개의 peak가 그다지分明치 않은것과 peak III에 두가지 S^{35} -化合物이 겹쳐 있는 것으로 보아 Cellulose powder 를 써서 分離하는 이 方法은 Moore, stein法보다 Resolving power는 떨러진다고 할수 있으나 溶媒인 Propanol-water (70:30 V/V)를 容易하게 除去할수 있는 故로 peak I II IV V 中の S^{35} -化合物 檢索은 勿論peak III 中の 化合物도 그數가 不過 두가지 임으로 適當한 方法을 써면 直接 檢索을 遂行할수도 있는 것이다.

따라서 이 方法에 依한 尿中 S^{35} -化合物分離는 完全치는 못하나 그들 S^{35} -化合物의 構造等の 研究을 爲한 分離로서는 어느 程度 目的을 達成했다고 볼 수 있다.

b. 糞中の S^{35} -化合物

糞中の S^{35} -化合物은 純粹한 S^{35} -化合物을 하나씩 드러있는 세가지 peak 로서 세가지의 S^{35} -化合物이 드러 있는 것을 알 수 있다.

Summary

It has been ascertained that S-(1, 2-dichlorovinyl) L-cysteine (DCVC) is probably the toxic component in the trichloro-ethylene extracted soybean oil meal on the bovine.

For the study of the metabolites of DCVC, the components with radioactive S^{35} -in the urine of the calf, to which S^{35} -DCVC was administered, were separated using of cellulose powder with propanol-water (70:30 V/V) which is easily removable by evaporation.

As the results followings were obtained:

Peak I, which shows fractions containing

single S^{35} -radioactive components, whose Rf is 0.815

Peak 2, which shows fractions containing single S^{35} -radioactive component, whose Rf is 0.447

Peak 3, which shows fractions containing both S^{35} -radioactive components whose Rfs are 0.090 and 0.171

Peak 4, which shows fractions containing single S^{35} -radioactive component, whose Rf is 0.142.

Peak 5, which shows fractions containing single S^{35} -radioactive component, whose Rf is 0.084.

Besides these, two of small peak were obtained.

Although, the resolving power of the cellulose powder column is not sufficient, it is applicable for the study of the components of metabolites of DCVC conveniently with the respect of removable solvent easily.

Also the components with radioactive S^{35} in the feces of the calf were separated using citrate buffer gradient system of Moore and stein.

As the results:

three S^{35} -radioactive components were separated,

引用 文 献

1. Eckey, E. W., Hand book of Food and Agriculture, p 459 Reinhold publishing corp. New York, 1955
2. Stockman, S., J. comp. path therap., 29, 95(1916)
3. Stang, V., Noller, W., and C. Krause, Berl. Tierarztl. Wchnschr., 41, 215 (1925)
4. Pritchard, W. Y., Rehfeled, C. E., Mizuno N. S., Sautter, J. H. and M. O. Schultge, Am. Vet. Pesearch, 17, 425 (1956)
5. Schultze, M. O., Klubes, P., perman, V., Mizuno, N. S., Bates, p. W., and J. H. Sauter, Blood, 14 1015(1959)
6. Derr. R. F. P.H.D theses p. 112 (1960)
7. Moore, S., and stein, W. H., J. Bio. chem 211, 893 (1954)
8. Derr. R. F. P.H.D theses p. 92 (1960)