

Paper Chromatography 法에 의한 SH 化合物間의 水銀에 對한 親和力 比較

金 玲 希 · 李 萬 正

曉星女子大學 食品營養學科

Affinity of Mercury to SH Compounds Compared by Using the Paper Chromatography

Young-Hee Kim, Man-Jeang Lee

*Dept. of Food Science and Nutrition,
Hyo Sung Women's College*

Abstract

By using the paper chromatograph technique affinity of amino acids to the mercury was compared with that of sodium thiosulfate, 2,3-dimercaptopropanol(BAL) and inosinic acid.

Among the amino acids of testment three acids (Cysteine, Cystine and Methionine) which posses sulfide or disulfide radical exhibited a spot which combined more apparently with the mercury than other amino acids. However, in the mixed solutions of thiosulfate, BAL or inosinic acid with those amino acid and mercury, the mercury was moved into thiosulfate, BAL or inosinic acid spot.

It was clear from the results that affinity of sodiume thiosulfate, BAL and inosinic acid to the mercury is higher than that of amino acids.

I. 緒 論

2 價의 重金屬에 屬하는 水銀은 蛋白質 또는 核酸과 같은 生體 高分子物質과 容易하게 結合하여 中毒現像을 나타내는 物質로 널리 알려져있다.¹⁻³⁾ 特히 水銀은 Sulfide 또는 disulfide의 構造를 가지는 物質과 쉽게 結合하여 Mercaptide를 形成 하므로서 BAL (British Anti Lewsite, 2,3-dimercapto

propanol), D- Penicillamine 等과 같은 Sulfide 基를 가지는 物質이 水銀中毒의 治療劑로 使用되고 있다.⁴⁻⁷⁾

이런 觀點에서 生體高分子의 構成要素가 되는 含硫黃 아미노산類와 이노신酸, Sodium thiosulfate 및 水銀中毒 治療劑인 BAL 相互間의 水銀에 대한 親和力의 強度를 paper chromatography 法으로 比較하였다.

II. 材料 및 方法

1. 試料溶液

가. 水銀溶液: 鹽化第二水銀(半井化學)의 0.1 M 水溶液을 使用하였다.

나. 아미노酸, 이노신酸 및 Sodium thiosulfate : 아미노酸 試料로서는 Methionine과 Cystine을 主로 使用하였으며 이들 아미노酸과 이노신酸 및 Sodium thiosulfate는 모두 0.1 M 水溶液을 使用하였다.

다. British Anti Lewsite: British Anti Lewsite (以下 BAL로 略함)은 使用 直前에 choroform에 溶解하여 0.1% 溶液으로 調製하여 供試하였다.

라. 水銀과 試料 溶液과의 複合: 前記한 各試料 溶液에 等量의 水銀溶液을 加하여 5分間 급격히 振盪하고 2時間 放置한 후 試料로 하였다.

2. Paper Chromatography

가. 展開法: 東洋濾紙 No 51을 使用하여 二次元 展開하였으며 展開 거리는 約 20 cm로 하였다.

나. 展開溶媒: 一次展開에는 n-Butanol:Acetic acid: H₂O(4:1:2) 溶液을 使用하였고 二次展開에는 n-Butanol: Ethanol: 28% Ammonium (8:1:3) 溶液을 使用하였다. 展開溶媒로 使用된 n-Butanol은 2N-HCl로 飽和시킨 것이다.

다. 發色劑: 水飽和 n-Butanol에 溶解한 0.2% Ninhydrine과 Chloroform에 溶解한 0.1% Dithizone의 두가지 溶液을 發色劑로 使用하였다. 卽, 먼저 Ninhydrine 溶液을 噴霧하여 乾燥하고 Dithizone 溶液을 다시 噴霧하여 乾燥 發色시켰다.

라. Spot量: 各 試料 供히 microsyringe를 使用하여 10μl 씩 Spot 하였다.

III. 結果 및 考察

1. 水銀과 混合한 各個 化合物의 Paper Chromatography

가. 아미노酸과의 反應

Cysteine, Cystine 및 Methionine을 除한 나머지 아미노酸類는 水銀 溶液과 混合하여 Paper chromatography했을 때 Fig. 1로 表示한 Glutamic acid의 例와 같이 添加한 아미노酸과 水銀의 2個의 Spot로 分離되었으나,

Cysteine Cystine Methionine은 Fig. 2와 같이 아미노酸과 水銀으로 分離되지 못하고 單一-spot로 나타났다.

本 結果는 水銀이 普通의 아미노酸 과는 잘 結合되지 못하나 合硫黃 아미노酸과는 쉽게 結合됨을 나타내는 것으로서 蛋白質과 水銀의 結合에 있어서 S-Hg-S의 結合樣式을 提示한 Furukawa⁸⁾ 鈴江綠衣郎⁹⁾ 등의 報告와도 一致하고 있다.

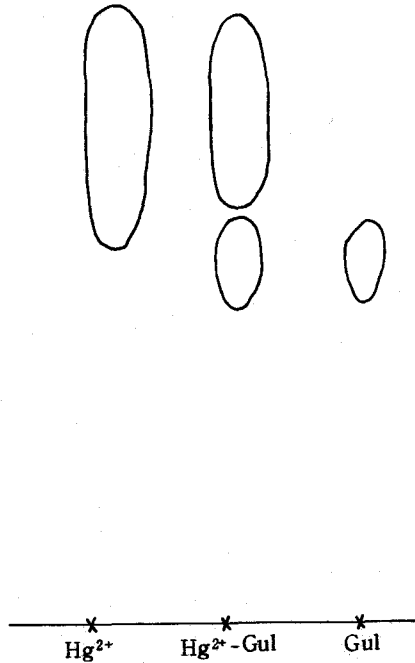


Fig. 1. Paper chromatogram of mercury and glutamic acid solution

나. Sodium thiosulfate 와의 反應

Sodium thiosulfate와 水銀과의 混合溶液은 Fig. 3과 같이 水銀의 位置에는 Spot가 檢出되지 아니하고 Sodium thiosulfate의 位置에 單一 Spot로 나타났다.

이로 미루어 水銀은 Sodium thiosulfate와는 쉽게 結合할 뿐만 아니라, Sodium thiosulfate와의 結合에 의하여 展開되지 못하고 Rf≒ 0.10의 Sodium thiosulfate의 位置에 停止된 것으로 判斷되었다.

(註: 水銀의 Rf≒ 0.64).

다. 이노신酸과의 反應

이노신酸과 水銀의 混合溶液도 Fig. 4와 같이 單一 Spot로 나타났다. Sodium thiosulfate와는 逆으로 Inosin 酸(Rf≒ 0.14)의 位置에서는 Spot

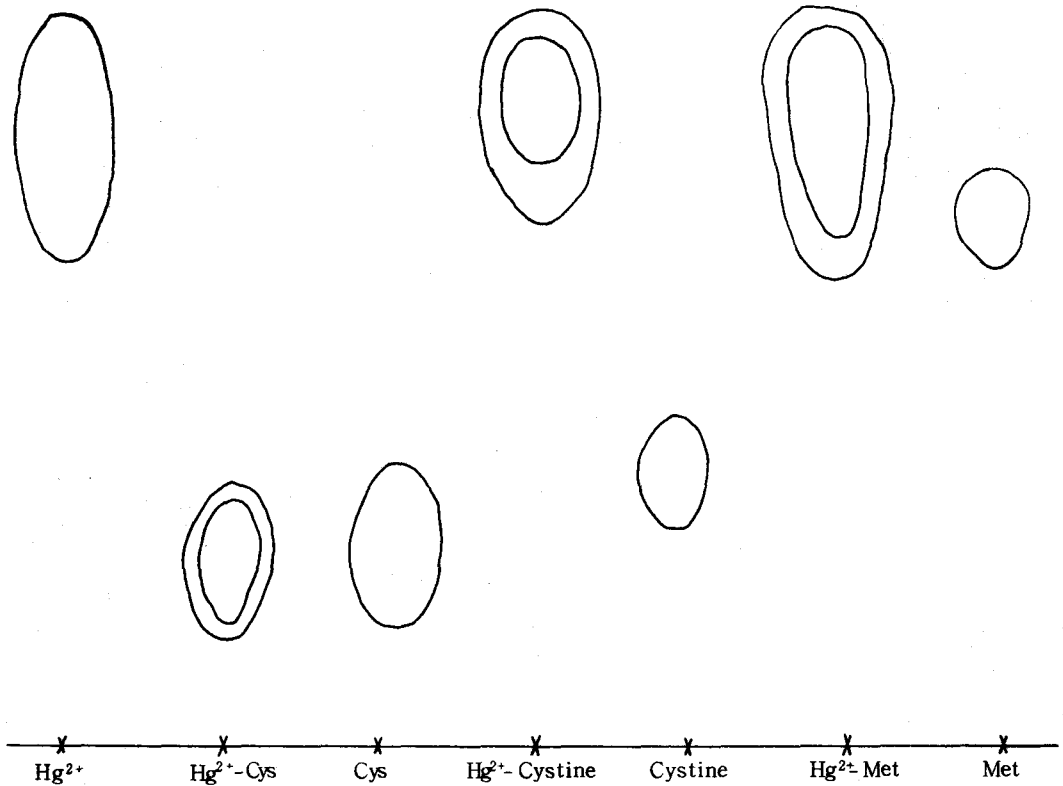


Fig. 2. Paper chromatogram of mercury, cysteine, cystine and methionine solution

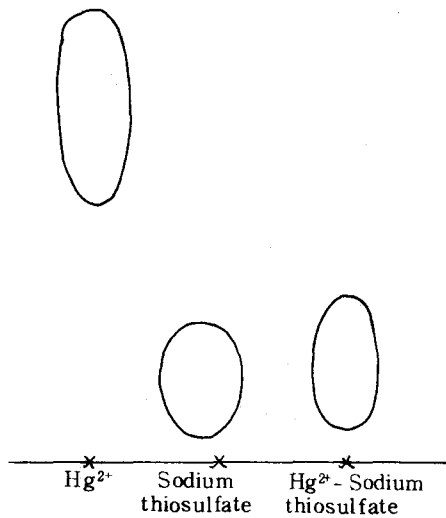


Fig. 3. Paper chromatogram of mercury and sodium thiosulfate solution

가 檢出되었다.

本結果 또한 水銀과 이노신酸이 쉽게 結合함을 나타내고 있는 것으로서 含硫黃 아미노酸이나 Sodium thiosulfate와는 달리 -SH基를 가지게 아니 하는 이노신酸과 結合하였다는 點에서 多少 特異하다고 할 수 있겠으나 Deoxyribonucleic acid (DNA)의 경우에도 水銀과의 結合이 報告¹⁰⁾되어 있는 바 DNA 構成 鹽基의 前驅物質이 되고 있는 이노신酸도 이와 비슷한 경우라 할 수 있을 것이다.

라. BAL과의 反應

BAL과 水銀의 混合溶液도 Fig. 5와 같이 單一 Spot로 나타났으며 이노신酸의 경우와 같이 水銀의 位置에서 Spot가 檢出되었다.

2. 化合物 相互間의 結合力 比較

가. 아미노酸과 Sodium thiosulfate

아미노酸과 Sodium thiosulfate 및 水銀의 세가지 物質의 混合溶液을 Chromatography 한 結果 Fig. 6 (Hg^{2+} - Methionine - Sodium thiosulfate) 및 7 (Hg^{2+} - Cystine - Sodium thiosulfate)로 表

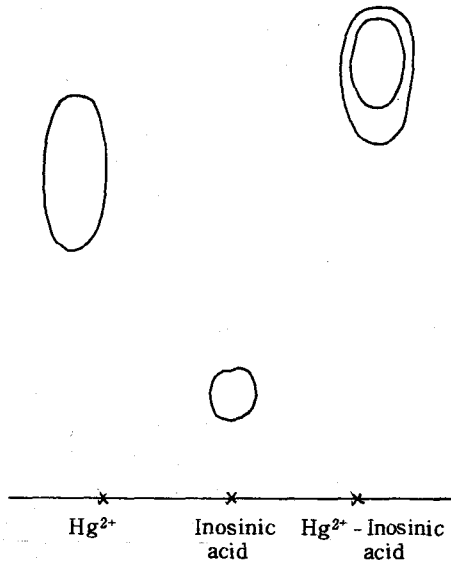


Fig. 4. Paper chromatogram of mercury and inosinic acid solution

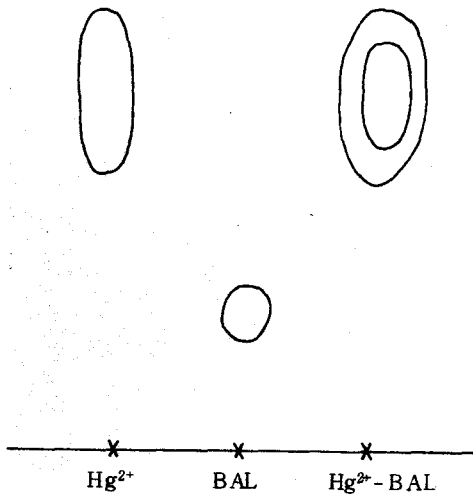


Fig. 5. Paper chromatogram of mercury and 2,3-dimercaptopropanol (BAL) solution

示한 바와 같이 각각 2개의 Spot만이 검출되었다. Methionine과 수은의 혼합溶液은 수은과 Methionine의 위치($R_f \approx 0.64 \sim 0.62$)에 걸쳐서 분산된 Spot로 나타났으나 Sodium thiosulfate까지 혼합한 溶液에서는 Methionine은 분리되어 標準試料의 위치($R_f \approx 0.62$)에서 검출되었다. 한편, 수은과 S-

odium thiosulfate는 분리되지 못하고 Sodium thiosulfate의 위치에서 單一 Spot로 나타났으며 이 Spot는 二次展開에 의하여서는 분리되지 못하고 Fig. 8과 같이 Sodium thiosulfate의 위치에서 單一 Spot로 검출되었다.

Cystine - Sodium thiosulfate - Hg^{2+} 의 混合溶液에서도 Methionine의 경우와 같이 Hg^{2+} -Cystine의 Spot가 없어지고 Cystine만이 獨立된 Spot로 나타났으며 수은과 Sodium thiosulfate의 Spot는 二次展開에서도 분리되지 아니 하였다.

以上の 結果는 수은이 아미노酸과 Sodium thiosulfate의 共存下에서는 Sodium thiosulfate와 特異的으로 結合하여 Sodium thiosulfate의 위치에 移動 향을 나타내는 것으로서 이로 미루어 수은과의 結合力은 Sodium thiosulfate가 Methionine 또는 Cystine 보다 큰 것으로 判斷된다.

나. 아미노酸과 이노신酸

Methionine과 이노신酸 및 수은의 混合溶液을 Chromatography한 結果 Fig. 9와 같이 이노신酸의 위치에서는 Spot가 確認되지 아니 하였고 $R_f \approx 0.60$ 부근(Hg^{2+} 또는 Hg^{2+} -이노신酸 위치)에서 擴散된 Spot가 檢出되었다. 그러나 이 Spot의 위치와 Methionine의 R_f 值가 近似하여 Methionine의 分離 與否는 確認하기 困難하였다.

따라서 이 部分은 二次展開하였으며 그 結果 Fig. 10과 같이 Methionine만이 分離되었고 이노신酸과 수은은 분리되지 아니하고 單一 Spot로 나타났다.

Cystine의 경우에는 보다 明確하여 Fig. 11로 表示한 바와 같이 一次展開에서도 Cystine의 Spot로 나타났다.

以上の 結果는 수은은 이노신酸의 存在下에서는 Methionine이나 Cystine과 結合하지 아니하고 이노신酸과 結合함을 나타내는 것으로서 수은과 이노신酸과의 結合力이 이들 아미노酸 보다 크기 때문인 것으로 判斷되었다.

다. 아미노酸과 BAL

Methionine과 BAL 및 수은의 混合溶液은 Chromatography한 結果 Fig. 12와 같이 $R_f \approx 0.62$ 의 위치에 單一 Spot가 檢出되었으나 이것을 二次展開한 結果(Fig. 13) Methionine의 Spot가 分離되고 BAL 및 수은은 複合되어 單一 Spot로 나타났다.

한편 Cystine, BAL 및 수은과의 混合溶液에서는 Fig. 14와 같이 一次展開에서 Cystine의 Spot가 分離되었고, BAL 및 수은은 수은의 위치에서 檢出

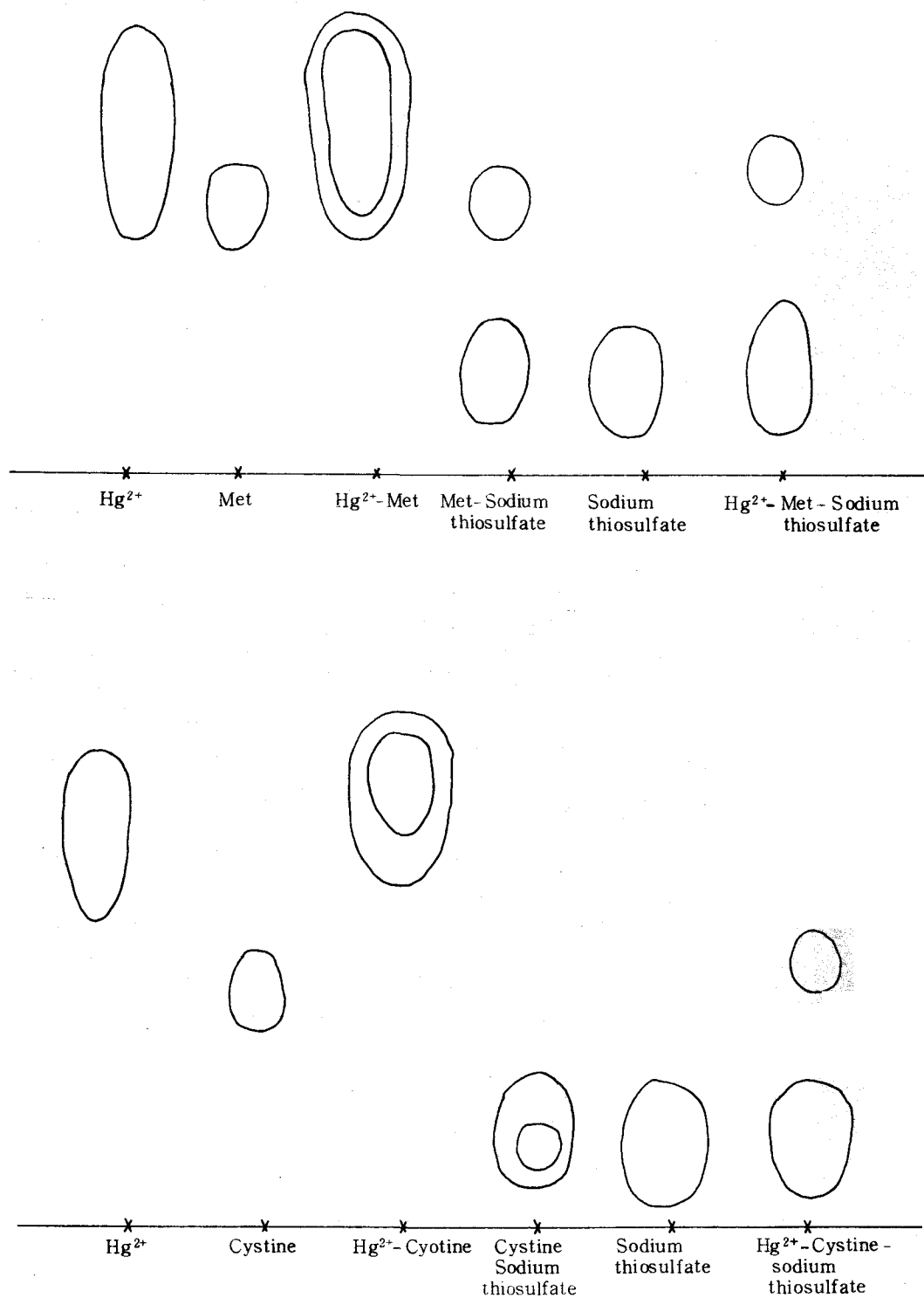


Fig. 7. Paper chromatogram of mercury, cystine and sodium thiosulfate solution

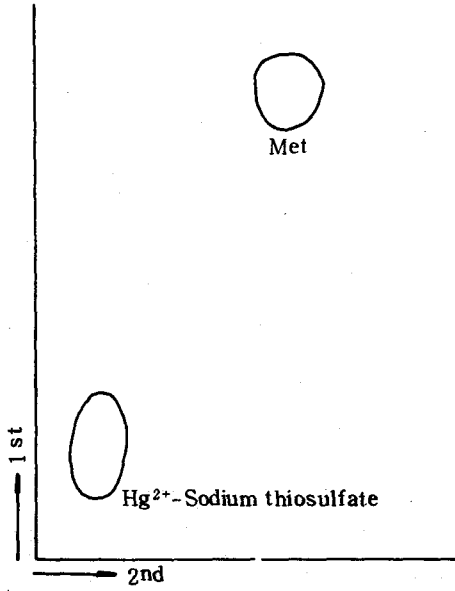


Fig.8. Paper chromatogram of mixed solution of mercury, methionine and sodium thiosulfate

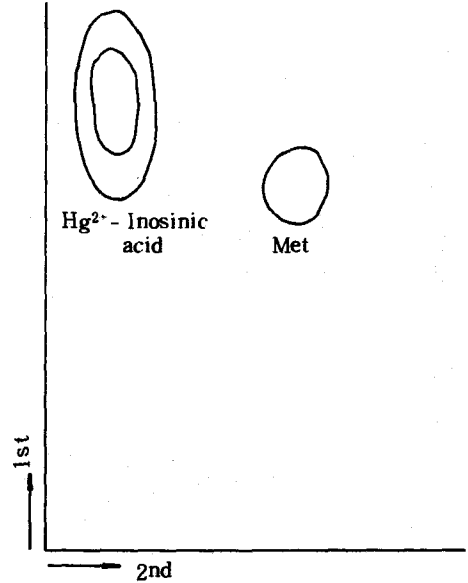


Fig.10. Paper chromatogram of mixed solution of mercury, methionine and inosinic acid

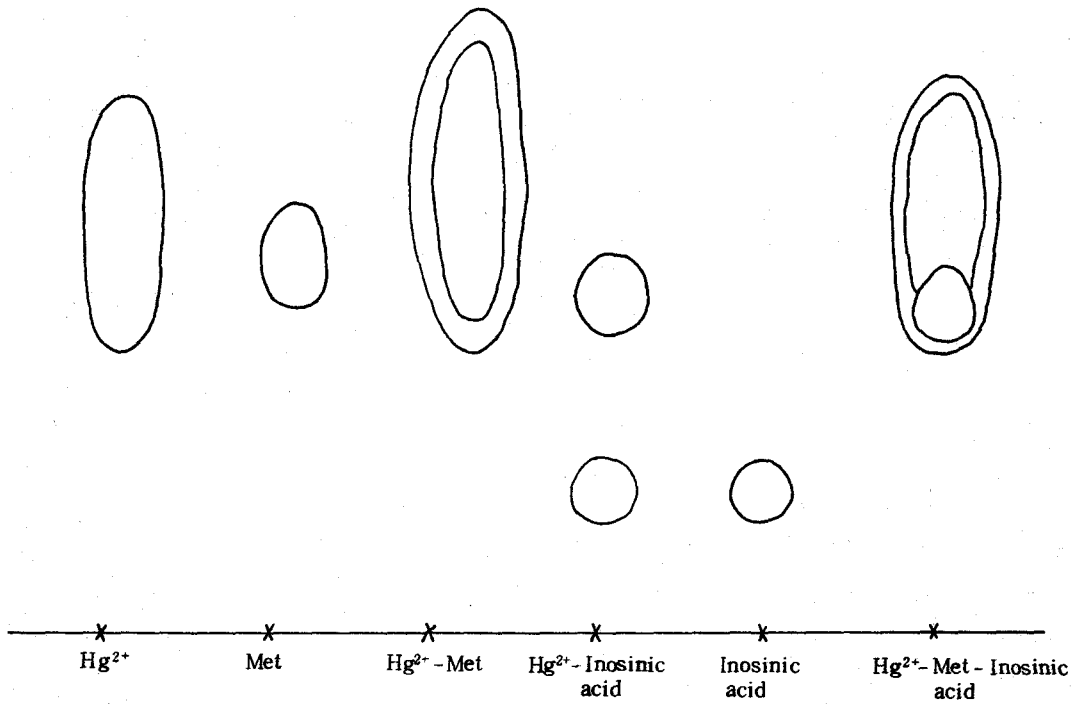


Fig. 9. Paper chromatogram of mercury, methionine and inosinic acid solution

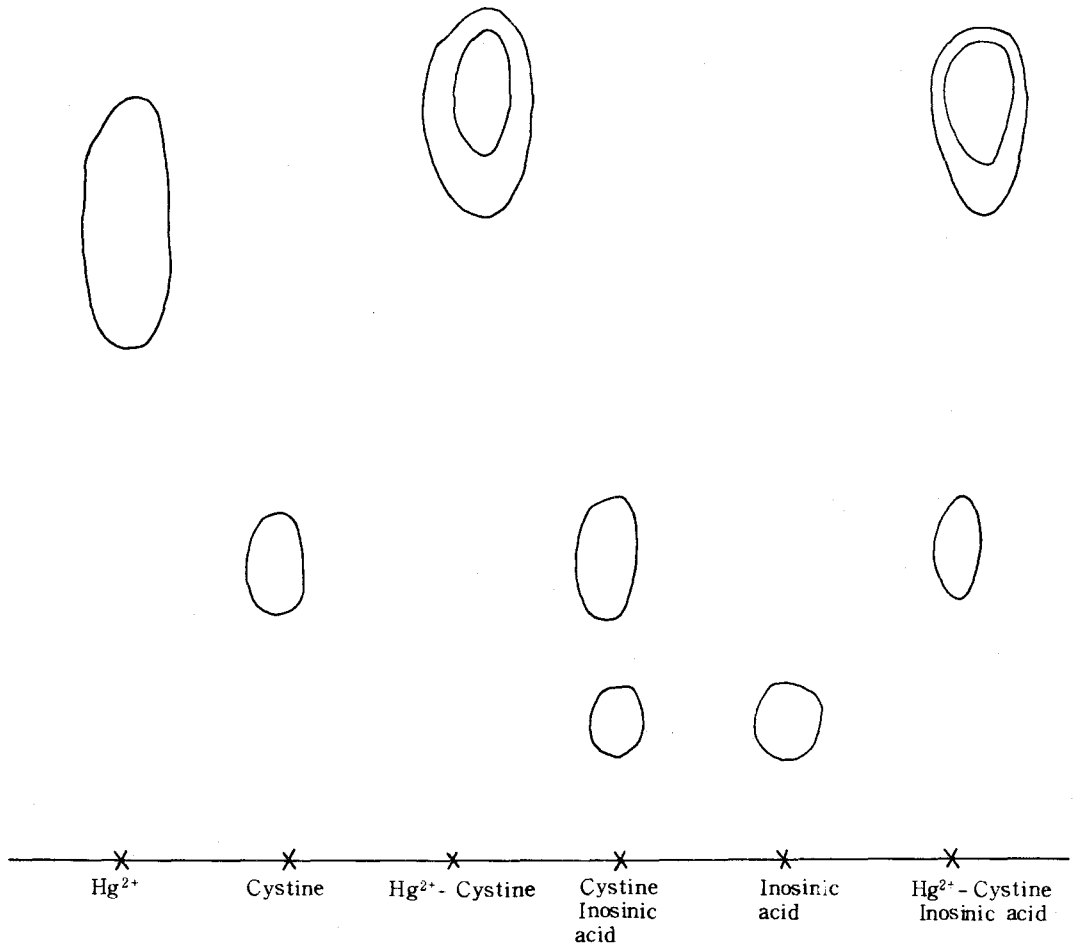


Fig.11. Paper chromatogram of mercury, cystine and inosinic acid solution

되었다.

Methionine 또는 Cystine의 共存下에서도 水銀이 BAL과 結合하여 水銀의 位置에 複合된 Spot를 나타내는 以上の 結果로 부터 水銀과의 結合力은

BAL이 Methionine 또는 Cystine 보다 큰 것으로 判斷되었으며, BAL의 水銀中毒에 대한 治療效果가 바로 蛋白質 보다 더욱 큰 水銀에 대한 親和性에 基因하고 있는 것으로 推察된다.

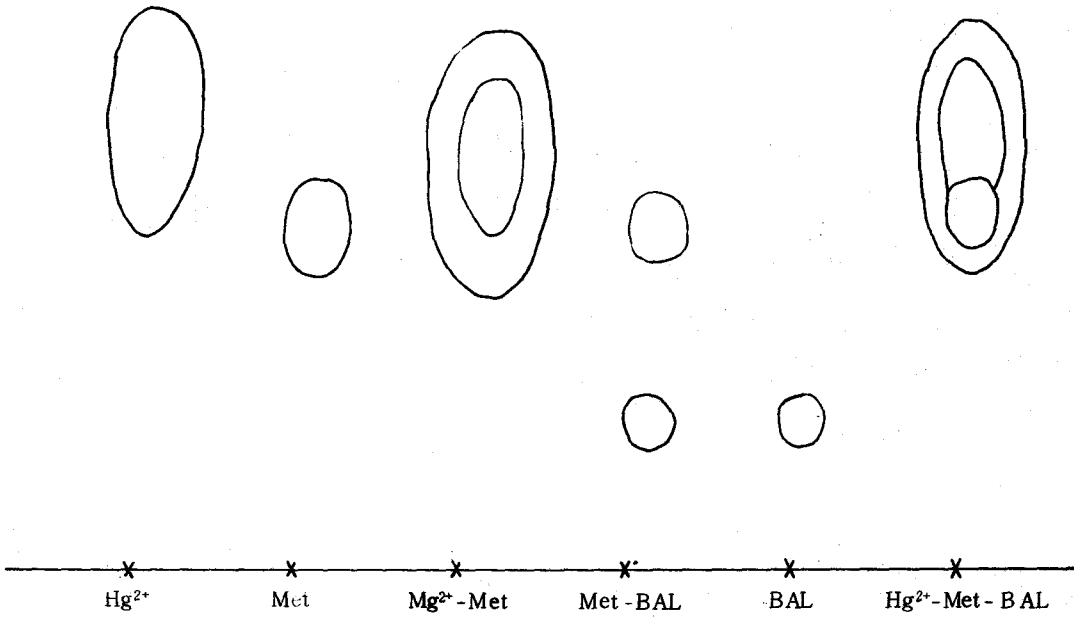


Fig.12. Paper chromatogram of mercury, methionine and 2,3- dimercaptopropanol solution

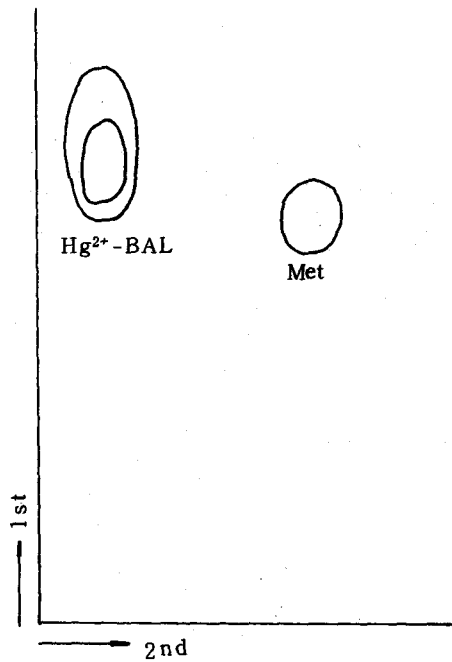


Fig.13. Paper chromatogram of mixed solution of mercury, methionine and 2,3-dimercaptopropanol

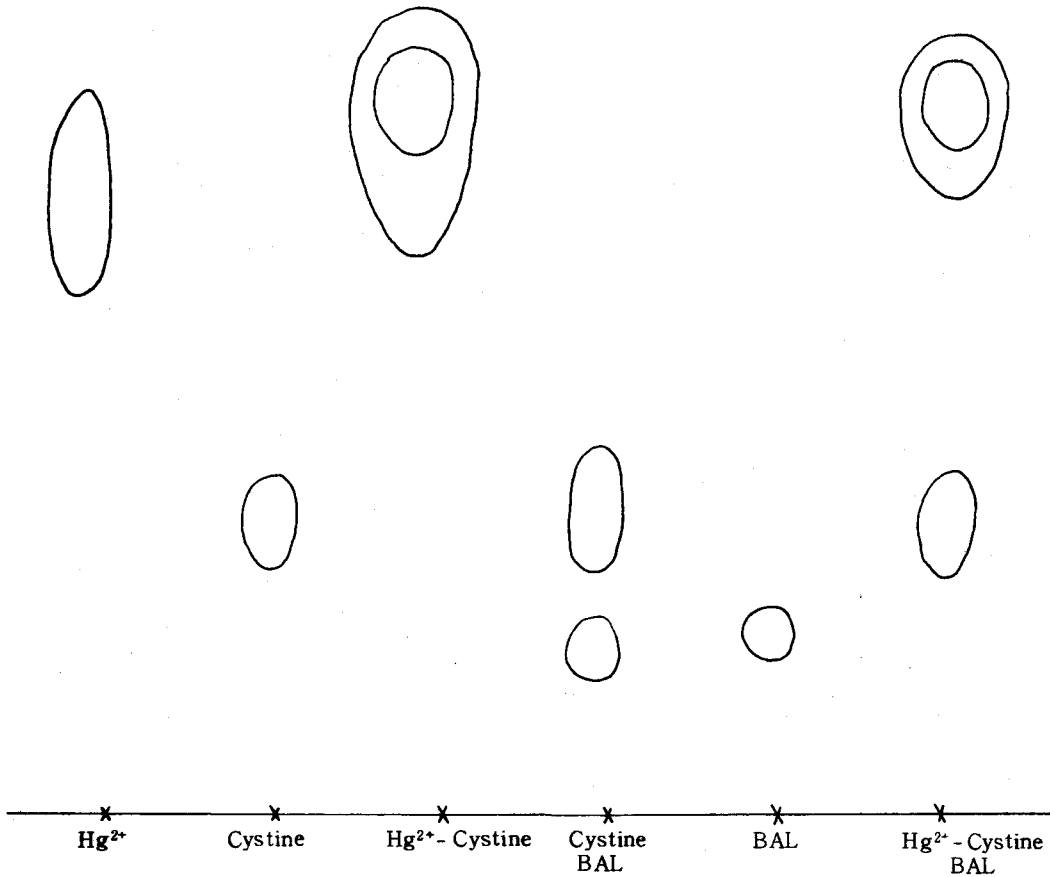


Fig. 14. Paper chromatogram of mercury, Cystine and 2,3-dimercaptopropanol.

IV. 要 約

Paper Chromatography 法으로 아미노酸類와 이노신酸 및 水銀中毒 治療劑인 BAL의 水銀에 對한 親和力의 크기를 比較하였다.

그 結果 Cysteine Cystine 및 Methionine의 3種의 含硫黃 아미노酸은 水銀과 쉽게 結合하였으나 다른 아미노酸들과의 結合은 確認하지 못하였다.

水銀은 SH基를 가지는 Sodium thiosulfate 및 BAL 과는 쉽게 結合하였으며 이노신酸과도 쉽게 結合하였다.

이들 含硫黃 아미노酸 類보다 큰 것으로 判斷되었다.

參 考 文 獻

1) 喜田村正次, 近藤雄臣, 瀧澤行雄, 藤井正美, 藤

木素士, (1976) 水銀, 講談社, 273-274.

2) 井村伸正, (1974) 有害金屬의 體內吸收と蓄積, 藥局, 25, 19-27.

3) Bakir, F. et al., (1973) Methyl mercury Poisoning in Iraq, Science, 181, 230-237.

4) Aposhain, H.V., (1958) Protection by D-Penicillamine against the lethal effects of mercuric chloride, Science, 128, 93.

5) 廣田 一, (1969) 메틸水銀의 臟器內動行と D-Penicillamine의 水銀排泄効果に關する研究, 臨床神經學, 9, 592-601.

6) Berlin, M., Rylander, R., (1964) Increased brain uptake of mercury induced by 2,3-dimercaptopropanol(BAL) in mice exposed to phenylmercuric acetate, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 146, 236-240.

- 7) 岡野實, (1953) BAL にする 急性水銀中毒症の
1 治療例, 臨床内科, 小兒科, 8, 291-293.
- 8) Furukawa, K. and Tonomura, K. (1972) Metallic
mercury-releasing enzymein mercury resistant
Pseudomonas Agri. Biol. Chem., 36(2) 217-226.
- 9) 鈴江緑衣郎, (1973) 水銀 カドミウム, 鉛の生
体内代謝に及ぼす作用, 栄養學雜誌, 31, 135-137
- 10) Gruenwedel, D.W. and Davidson, N. (1966)
Complexing and denaturation of DNA by methyl
mercuric hydroxide, I. Spectrophoto mertric
studies, *J. Mol. Biol.*, 21, 129-144.