

紫外線 照射에 의한 8週齡 브로일러 병아리 등皮膚에서의 비타민 D₃ 및 그의 類似物質 合成

蔣潤煥 · 全珍錫* · 李殷澤

慶北大學校 農科大學

(1991. 9. 19 接受)

Synthesis of Vitamin D₃ and It's Analogues in Dorsal Skin of 8 Week-Old Broiler Chicks Irradiated by UV Light

Y.H. Chiang, J.S. Cheon* and E.T. Lee

College of Agriculture, Kyungpook National University

(Received September 19, 1991)

SUMMARY

This study was conducted to investigate the synthesis of previtamin D₃ (PreD₃), lumisterol₃ (L₃) and vitamin D₃ (D₃) in dorsal skin of 8 week-old broiler chicks irradiated by UV light. The Hubbard line day-old broiler chicks were fed with vitamin D-depleted ration for 3 weeks and with medium broiler diet for 5 weeks. The 3×3cm area of dorsal skin was defeathered one day before the experiment. The 310nm UV light was utilized to irradiate the dorsal skin, which was separated into epidermis and dermis after irradiation. The irradiated epidermis was extracted with 60% ethyl acetate in n-hexane and PreD₃, L₃, D₃ and 7-dehydrocholesterol (7-DHC) were analyzed by HPLC. When UV light was treated for 0, 90 or 150 min, the L₃ content in the separated epidermis was 219, 298 or 248 ng/cm², respectively. The irradiation for 90 min produced 79 ng/cm² of L₃, and the synthesizing rate was 0.9 ng/cm²/min. The PreD₃ content was 23, 33 or 12 ng/cm² when exposed for 0, 60 or 150 min. The 10 ng/cm² of PreD₃ was produced for 60 min. The D₃ was generated by 27 ng/cm² when exposed for 90 min. The 7-DHC contents were decreased gradually from initial 123 to 35 ng/cm² when exposed for 150 min, showing the rate of disappearance as 0.6 ng/cm²/min.

(Key words : broiler chicks, epidermis, back, UV irradiation, vitamin D₃, previtamin D₃, lumisterol₃, 7-dehydrocholesterol)

*畜産業協同組合 中央會 (Livestock Cooperatives Federation)

“本 研究는 韓國科學財團 및 韓國學術振興財團의 研究費에 依하여 遂行되었음”

I. 緒論

Rosenheim 과 King(1953)은 ergosterol 또는 7-dehydrocholesterol(7-DHC)을 光으로 處理함으로서 tachysterol, lumisterol 및 9,10-secosteroid 가 만들어지며, 9,10-secosteroid 는 5,6-*cis*-triene 構造를 가졌고, 이것이 抗佝僂病 活性을 갖고 있으며 ergosterol 또는 7-DHC 에 紫外線을 照射하면 이들은 直接 vitamin D₂ 또는 D₃로 轉換된다고 發表하였다. 그후 Velluz 等(1949)은 6,7-*cis* 異性體가 그 中間產物이라는 것을 밝혔고 이것을 previtamin D₃ (PreD₃)라고 불렀으며 PreD₃가 相異한 溫度에 따라 여러가지 速度로 vitamin D₃ (D₃)로 轉換되고 이때의 平衡은 D₃便에 있다고 보고하였다.

Havinga 등(1955)은 石英접시를 利用하여 7-DHC 에 紫外線을 照射하여 PreD₃, lumisterol₃ (L₃) 및 tachysterol₃ (T₃)을 合成하였으며 Holick 等(1979)은 PreD₃를 熱處理함으로써 5,6-*cis* 異性體인 D₃를 合成하였고 다른 研究者들에 의해서도 7-DHC로부터 PreD₃, L₃, T₃, D₃ 등이 만들어진다는 것이 밝혀졌다(Okano 等, 1978; Takada, 1982).

Holick 等(1981)은 사람 皮膚를 表皮와 眞皮로 分離하여 PreD₃ 合成量을 比較하였던 바, 眞皮보다 表皮에서 더 많이 生成되었다고 發表하였다.

Takada 等(1979)은 흰쥐 皮膚에 波長 260~350 nm의 紫外線을 照射한 결과, 波長 303nm에서 가장 많은 D₃를 合成하였다고 報告하였다. Bunker와 Harris(1937)는 紫外線 波長 250~303nm의 單色光을 照射한 결과, 波長 296nm가 佝僂病 治療에 가장 有效하였다고 報告하였다.

Kobayashi 等(1976)은 ethanol에 7-DHC을 녹여 230~350nm의 單色光을 照射한 결과, 295nm에서 가장 많은 D₃가 合成되었다고 하며 MacLaughlin 等(1982)은 사람 皮膚에 模擬太陽光線 또는 259 nm 紫外線을 照射하였던 바, PreD₃ 및 T₃의 生成에 있어서 295nm 紫外線이, L₃의 合成에 있어서는 模擬光線이 더 效果的이었다고 發表하였다.

蔣 等(1990)은 3週齡 브로일러 병아리의 등 皮膚에

254, 310 또는 365nm의 紫外線을 照射한 결과, 310 nm가 가장 많은 PreD₃를 合成케 하였다고 發表하였다.

本 研究에서는 現在까지 試圖된 바 없는 8週齡 브로일러 병아리의 등에 310nm의 紫外線을 照射하여 D₃ 및 그의 類似物質이 어떻게 生成되는지 調査코자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼料

大邱直轄市 신기孵化場에서 孵化한 Hubbard 系統 브로일러 1日齡 병아리 18首를 維生素 D₃ 缺乏飼料 (A.O.A.C., 1984; Table 1)로 3週間 飼養하였으며 그 飼料의 成分은 粗蛋白質 18.84%, Ca 0.94%, P 0.71%였다. 그後 大邱畜産業協同組合 飼料

Table 1. Ingredient and chemical composition of vitamin D-deficient diet for 0~3week-old broiler chicks

Item	Composition
Ingredient	%
Yellow corn, ground	58
Wheat flour	25
Casein, acid-treated	12
Yeast, 7% N	2
Tricalcium phosphate	2
Salt	1
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.22
Total	100.22
Chemical analysis	%
Crude protein	10.07
Crude protein	18.84
Ether extract	2.34
Nitrogen-free extract	64.31
Crude fiber	0.30
Crude ash	4.14
Calcium	0.94
Phosphorus	0.71

Table 2. Chemical composition of diet fed to 3~8 week-old broiler chicks.

Composition	Moisture	Crude protein	Ether extract	Nitrogen free extract	Crude fiber	Crude ash	Calcium	Phosphorus
Percentage	13.69	16.03	5.00	58.61	3.17	3.50	1.16	0.48

工場の 브로일러 中期飼料 (Tale 2)로 5週間 飼育한 다음 試驗에 使用하였으며, 中期飼料는 粗蛋白質 16.03%, Ca 1.16%, P 0.48%를 含有하고 있었다. 8週齡 肉鷄의 平均體重은 2,325±188g 이었다.

2. 飼養管理

試驗에 使用된 肉鷄는 1989年 7月 28日 부터 1989年 9月 22日까지 慶北大學校 農科大學 動物飼育場에서 飼育하였는데 0~8週까지의 병아리들은 유리창에 검은 비닐 2매를 附着하여 어둡게 만든 (0 lux) 鷄舍에서 育成하였으며 其他 管理方法은 一般慣行法에 準하였다.

3. 紫外線 照射

310nm의 紫外線燈은 三共電氣 (Tokyo)의 Model GL-6이었으며 試料와 燈과의 距離, 照射強度, 時間 및 線量은 Table 3과 같이 하였다. 照射時間은 0, 30, 60, 90, 120 또는 150分으로 하였으며 各 處理에 3首씩 (3反覆) 供試하였다.

4. 試料 處理

8週齡 하루 前 肉鷄등 (背)의 3×3cm 넓이 皮膚에 있는 털을 뽑고 다음날 室溫에서 波長 310nm의 紫外線을 0, 30, 60, 90, 120 또는 150分 동안 照射한 後 1×1cm 넓이 皮膚를 採取하여 어름위의 유리판 위에서 皮下脂肪을 除去하고 Holick (1981)의 方法에

따라 60°C 溫水에 30秒間 담그었다가 꺼내어 어름 유리판 위에서 表皮와 眞皮를 分離하였다. 分離한 表皮는 16×125mm 試驗管에 넣고 60% ethyl acetate n-hexane 溶液 10ml를 加하여, -20°C의 冷凍庫에 14時間 保管하고 D₃ 類似物質을 抽出하였다.

5. 分析方法

抽出液과 表皮 組織은 濾紙 (Toyo No. 5A)로 濾過後 濾液을 다른 16×125mm 試驗管에 받았으며 60% ethyl acetate n-hexane 溶液 10ml로 3回 洗滌한 後 窒素 氣相下에서 溶媒를 날려 보내고 0.5% isopropanol n-hexane 溶液 100μl로 녹인 後 이 中에서 50μl를 取하여 HPLC에 注入하여 分析하였으며 그 分析條件은 다음과 같다.

HPLC: Detector-Waters Associates (Milford, MA)의 Model 440, Pump-Waters의 Model 510, Injector-Waters의 Model U6K, Column-Waters의 μPorasil (4×300mm), Recorder-BB (Austria)의 Model SE120을 使用하였다.

Solvent: 0.5% isopropanol in n-hexane

Flow rate: 1.8ml/min

Chart speed: 0.5cm/min

A.U.F.S.: 0.01

Detector wavelength: 254nm

Table 3. Wavelength, distance from epidermis, irradiation intensity, time and dose of UV light.

Wavelength	Distance from epidermis	Irradiation			
		Intensity	Time	Dose	Dose
nm	cm	μW/cm ²	min	J/cm ²	MED*
310	12.5	88	30~150	0.16~0.79	2.64~13.20

*Minimal erythral dose for human skin

試料溶液을 HPLC 에 注入하여 chromatogram 을 얻고 各 成分을 頂點높이를 測定하였으며 標準曲線에 의하여 試料溶液中의 各 成分 含量을 구한 後 各 回收率에 따르는 補正을 하고 HPLC 注入量에 대한 原液의 含量을 求하였다. 本 研究室에서 使用한 含量 計算式은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} & \text{試料中の 成分含量 (ng/cm}^2\text{)} \\ &= A(\text{ng}) \times \frac{100}{\text{回收率 (\%)}} \times \\ & \quad \frac{100\mu\text{l}^{**}}{500\mu\text{l}} / 0.5(\text{cm}^2) \end{aligned}$$

*HPLC의 chromatogram 頂點높이에 따르는 各 成分의 含量(ng)

**HPLC 注入時 100 μl 中 50 μl 를 取하였음.

6. 試驗設計

8週齡 肉鷄의 등皮膚에 波長 310nm의 紫外線을 0, 30, 60, 90, 120 또는 150分間 照射하여 PreD₃, L₃, D₃, T₃ 및 7-DHC의 經時的인 變化를 調査하였 으며 6處理×3反覆으로서 18首의 肉鷄를 使用하였다.

III. 結果 및 考察

털을 뽑은 등表皮에 波長 310nm의 紫外線을 照射한 後 抽出하고 分析한 結果 PreD₃, L₃, D₃의 合成成績은 Fig. 1과 같다. 즉, 紫外線 照射直前 7-DHC 含量은 123ng/cm² 이었으나 紫外線을 30, 60, 90, 120 또는 150分 照射하였을 때 7-DHC 含量은 各各 94, 65, 52, 40 또는 32ng/cm²로 減少하였는데 150分間의 平均 減少速度는 0.6ng/cm²/min 이었다.

紫外線 照射直前의 등 表皮에서 7-DHC 含量이 123ng/cm²로 낮은 것은 8週齡 肉鷄는 羽毛로 덮여 있기 때문에 光線이 羽毛를 通過하기 어려운 條件이므로 D₃의 前驅體인 7-DHC이 처음부터 表皮에 적게 含有되어 있는 것이 아닌가 생각된다.

反面에 L₃含量은 當初의 219ng/cm²의 높은 水準에서 始作하여 90分 照射時까지 계속 增加하여 298ng/cm²에 到達하였으며 그 合成量은 79ng/cm²이었

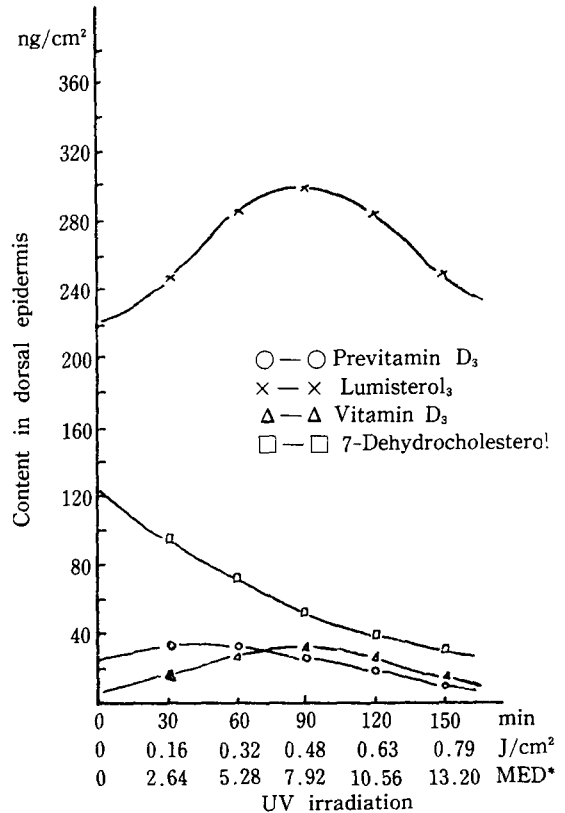


Fig. 1. Photosynthesis of lumisterol₃, previtamin D₃ and vitamin D₃ from 7-dehydrocholesterol in dorsal epidermis of 8wk-old broiler chick (*in vivo*) irradiated by 310nm UV light. *Minimum Erythral Dose

고 合成速度는 0.9ng/cm²/min 이었다. 그 後에는 減少하여 15分 照射時에는 248ng/cm²까지 내려갔다. 이와 같이 L₃含量이 一時 增加하였다가 減少되는 것은 光合成으로 增加되었던 L₃이 PreD₃를 거쳐서 D₃로 轉換되며 한편 紫外線의 過量照射로 toxisterol로 轉換되었기 때문이라 생각된다(Norman, 1979). Staberg 等(1984)이 말한 “紅斑病”을 일으킬 수 있는 最小處理量(minimum erythral dose)인 0.06 J/cm²에 비하면 本 研究의 90分 照射時의 0.48J/cm²는 7.92MED로서 매우 높은 水準이며, 따라서 L₃이 toxisterol로 轉換된 것 같다.

PreD₃含量은 0, 60 또는 150分間 照射時 23, 33 또는 12ng/cm²로 나타났으며 60分間 照射로 인하여 10ng/cm²의 合成을 나타냈는데 이때의 合成速度는 0.17ng/cm²/min 이었다.

D₃ 含量은 0, 90 또는 150分 照射時 5, 32 또는 15ng/cm²로서 90分 동안에 27ng/cm² 生成되었고 그 合成速度는 0.3ng/cm²/min 이었다.

Holick 等(1977)은 흰쥐의 등皮膚에 0.23J/cm²의 波長 280nm의 紫外線을 2時間 照射한 結果 7-DHC이 PreD₃로 轉換된 것을 確認하였다. Okano 等(1977)은 흰쥐 皮膚에 85μW/cm²의 紫外線을 照射한 結果, 120分까지 D₃의 含量이, 14.7 ng/cm²까지 계속 增加하였다고 한다. 이들은 皮膚의 表皮와 眞皮를 分離하지 않고 全體를 利用하였기 때문에 本 研究 結果와 直接 比較할 수는 없었다.

Holick 等(1981)은 白人 皮膚의 表皮에 赤道 模擬 太陽光線을 照射한 結果 當初 皮膚에 存在하였던 7-DHC은 照射 8時間까지 22% 水準으로 減少하였으나, L₃는 當初에 存在하였던 7-DHC의 0%에서 60%까지 增加되었고 PreD₃는 0分에서 始作하여 30分에 16%, 60分 20%까지 增加하였으며 그後 계속 그 水準을 維持하였고 T₃는 0%에서 始作하여 30分에 4%까지 增加하였으며 그後 繼續 그 水準을 維持하였다고 한다.

本 研究에서도 L₃과 D₃는 60분 또는 90分까지 增加하는 傾向을 나타내어 Holick 等(1981)의 報告와 비슷하였으나 頂點後에 減少하는 傾向은 다소 다르다. 이는 Norman(1979)이 報告한 바와 같이 D₃ 類似物質이 紫外線의 過量照射로 말미암아 toxisterol로 轉換된 것으로 생각된다.

Webb 等(1989)은 D₃에 日光을 照射하였을때 D₃가 光分解되어 5, 6-transvitamin D₃, suprasterol I 및 II로 轉換된다고 報告하였다.

蔣 等(1990b)은 3週齡 브로일러 병아리의 등에 310nm의 紫外線은 0~150分間 照射하였을때 L₃, D₃ 및 PreD₃가 合成되었으며 L₃와 PreD₃는 60分 照射時 最高値를 나타내었고 D₃는 90分 照射時 頂點을 보였다고 하므로 본 연구의 경향과 비슷하나 D₃합량에 있어서는 본 연구의 수준보다 낮게 나타났다.

IV. 摘要

本 研究는 8週齡 브로일러 병아리 등 皮膚에 紫外線을 照射하여 previtamin D₃(PreD₃), lumisterol₃(L₃) 및 비타민 D₃(D₃)의 合成量을 調査코자 實施하였다. Hubbard 系統 브로일러 병아리를 비타민 D 결핍사료(3週間)와 브로일러 中期飼料(5週間)로 飼育하고 털을 뽑은 등 피부에 310nm의 紫外線을 照射하였다. 照射時間은 0~150分間(0~0.79J/cm²)으로 하였고 照射가 끝난 試料는 60%ethyl acetate n-hexane 溶液으로 抽出하여 HPLC로 PreD₃, L₃, D₃ 및 7-dehydrocholesterol(7-DHC)을 分析하였다.

8週齡 브로일러 등皮膚에 波長 310nm의 紫外線을 0, 90 또는 150分間 照射하였을 때 L₃ 含量이 各各 219ng/cm², 298ng/cm², 또는 248ng/cm²이었으며 90分間 照射로 79ng/cm²量이 合成되었다. 이때의 合成速度(率)는 0.9ng/cm²/min 이었다. PreD₃ 含量은 0, 60 또는 150分間 照射時 23ng/cm², 33ng/cm² 또는 12ng/cm²이었으며 60分間 照射時 10ng/cm² 合成되었다. D₃含量은 0, 90 또는 150分間 照射時 5ng/cm², 32ng/cm² 또는 15ng/cm²로서 90分間 照射로 27ng/cm²量이 生成되었다. 7-DHC은 當初의 123ng/cm²으로부터 계속 減少되어 150분간 照射時에는 35ng/cm²量까지 내려갔다.

V. 引用文獻

1. A.O.A.C. 1984. Vitamin D₃ in poultry feed supplements chick bioassay. Official Methods of Analysis, Washington, D.C. p. 876.
2. Bunker, W.M. and R.S. Harris. 1937. Precise evaluation of ultraviolet therapy in experimental rickets. New England J. Med. 216: 165-169.
3. Havinga, E., A.L. Koevoet and A. Verloop. 1955. Studies on vitamin D and

- related compounds. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Belg. 74 : 1230~1234.
4. Holick, M.F., J.E. Frommer, S.C. McNeill, N.M. Richtand, J.W. Henley and J.T. Potts. 1977. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76 : 107-114.
 5. Holick, M.F., N.M. Richtand, S.C. McNeill, S.A. Holick, J.E. Frommer, J. W. Henley and J.T. Potts. 1979. Isolation and identification of previtamin D₃ from the skin of rats exposed to ultraviolet irradiation. Biochemistry. 18 : 1003-1008.
 6. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin and S. H. Doppelt. 1981. Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: Skin pigment is not an essential regulator. Science. 211 : 590-593.
 7. Kobayashi, T., M. Hirooka and M. Yasumura. 1976. Effect of wavelength on the ultraviolet irradiation of 7-dehydrocholesterol. Vitamins 50 : 185-189.
 8. MacLaughlin, J.A., R.R. Anderson and M.F. Holick. 1982. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. Science. 216 : 1001 : 1003.
 9. Norman, A.W. 1979. Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone. Academic Press. p.53, 58.
 10. Okano, T., M. Yasumura, K. Mizuno and T. Kobayashi. 1977. Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skins. J. Nutri. Sci. Vitaminol. 23 : 165-168.
 11. Okano, T., M. Yasumura, K. Mizuno and T. Kobayashi. 1978. *In vivo* and *in vitro* conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skin by ultraviolet ray's irradiation. J. Nutri. Sci. Vitaminol. 24 : 47-56.
 12. Rosenheim, O. and H. King. 1935. Chem. Ind. (London) 54 : 671-699. In Holick, M. F., J.E. Frommer, S.C. McNeill N.M. Richtand, J.W. Henley and J.T. Potts. 1977. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. Biochem. Biophysic Res. Comm. 76 : 107-114.
 13. Staberg, B., C. Christiansen and N. Rossing. 1984. Serum vitamin D metabolites in normal subjects after phototherapy Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44 : 53-56.
 14. Takada, K., T. Okano, Y. Tamura, S. Matsui and T. Kobayashi. 1979. A rapid and precise method the determination of vitamin D₃ in rat skin by high-performance liquid chromatography. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 25 : 385-398.
 15. Takada, K. 1982. Biosynthesis of vitamin D. Biochemistry. 54 : 318-323.
 16. Velluz, L., G. Amiard and A. Petit. 1949. Le precalciferolses relations d'equilibre avec le calciferol. Bull. Soc. Chem. Fr. 16 : 501-508.
 17. Webb, A.R., B.R. Decosta and M.F. Holick. 1989. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. J. Clin. Endocrinol Metab. 68 : 882-887.
 19. 蔣潤煥, 李殷澤, 全珍錫. 1990a. 紫外線照射에 의한 vitamin D₃ 類似物質의 合成. 韓營飼報 14(2) : 50-53.
 20. 蔣潤煥, 李殷澤, 李善行, 1990b. 紫外線照射에 의한 브로일러 병아리 皮膚에서의 vitamin D₃ 類似物質 合成. 韓畜誌 32(4) : 218-224.
 21. 蔣潤煥, 李殷澤, 全珍錫. 1990c. HPLC에 의한 vitamin D₃ 및 그 類似物質 分析. 韓畜誌 32(5) : 257-263.