

브로일러 병아리의 등 피부에 310nm 紫外線 照射時 相異한 線量 이 血漿內 비타민 D₃ 含量에 미치는 影響

蔣潤煥 · 元志雄 · 姜熙錫 · 金剛秀 · 呂永壽

慶北大學校 農科大學

(1992. 2. 10 접수)

Effect of Different Dose of 310nm UV Light Irradiating the Dorsal Skin on Plasma Vitamin D₃ Contents of Broiler Chicks

Y. H. Chiang, J. W. Won, H. S. Kang, K.S. Kim and Y. S. Yeoh

College of Agriculture, Kyungpook National University

(Received February 10, 1992)

SUMMARY

This study was carried out to determine the plasma vitamin D₃(D₃) of 3 weeks old broiler chicks(Hubbard line), whose dorsal skin was exposed to different dose of 310nm UV light. The irradiated doses were 0~0.79 J /cm²(6 doses × 5 replica=30 chicks). The blood samples were collected 2 days after exposure. The lipid in plasma isolated was extracted with ethyl acetate. The D₃ was purified by C₁₈ cartridge and analyzed by HPLC. The average D₃ content in plasma of control chicks was 20 ng /ml. When 0.32 J /cm² of dose was treated, the highest amount of 43 ng /ml was found among those of chicks experimented, corresponding to 2.15 times that of control. However, When more doses than 0.32 J /cm² were exposed to the skin, D₃ contents were decreased gradually. The similar to control level of D₃ was observed when 0.79 J /cm² was applied.

[Key words: UV light, dose, chick skin, plasma D₃]

I. 緒 論

Velluz 等(1949)은 7-dehydrocholesterol(7-DH-C)과 vitamin D₃(D₃)의 中間物質인 previtamin D₃ (PreD₃)를 發見하였으며 皮膚에서 紫外線에 依하여 合成된 D₃는 24~48時間後 血液으로 移送된다고 發表하였다(Adams 等, 1982). Shepard 等(1979)은 正常人과 腎臟切除患者의 血漿中 D₃ 含量은 2.3 및 1.4 ng /ml이었는데 이 正常人에게 強한 日光浴을 시킨 結果 26.1 ng /ml의 水準으로 增加되었다고 報告하였다.

Holick(1981)은 24歲 白人 女子에게 紫外線을 照射하였던 바, 최초의 血淸內 D₃ 含量 5 ng /ml이 照射後 2日에 60 ng /ml까지 上昇하였다가 그 後 계속 減少되어 21日에 최초의 水準으로 복귀하였다고 發表하였다.

Clemens 等(1982a)은 1.5 또는 3.0MED(minimal erythematol dose)의 紫外線을 全身에 照射한 結果, 2日後에 45 또는 80 ng /ml의 最高値를 보였다고 하며 Clemens 等(1982b)은 白人 2人과 黑人 1人의 全身에 0.054 J /cm²(=1 MED)의 紫外線을 照射한

結果, 着色되지 않은 白人의 경우 2日째에 最高值 45 ng/ml에 달했으며 가볍게 着色된 白人은 1日後에 最高值인 60 ng/ml까지 增加하였다가 2日째에 15 ng/ml까지 急速히 減少하였으나 3日째에 다시 25 ng/ml까지 增加하였고 그후에는 계속 減少하였으며, 黑人의 경우 紫外線 照射에 거의 反應을 보이지 않았다고 報告하였다.

Adams 等(1982)은 4, 3, 1.5 또는 1 MED의 紫外線을 照射한 結果, 血清內의 D_3 濃도가 各各 2日後에 14 ng/ml, 1日後에 80 ng/ml, 2日後에 45 ng/ml 또는 2日後에 20 ng/ml의 最高值에 到達하였다고 한다. Lo 等(1986)은 아시아인과 코카시아인에게 1.5MED를 照射하였더니 다같이 1日後에 最高值에 이르렀으며 各各 40 및 30 ng/ml이었다고 發表하였다.

Holick(1987)은 腸에서의 脂肪吸收 不良患者와 正常人에게 50,000 IU(1.25 mg)의 D_3 를 經口投與하였더니 患者의 경우 12時間後에 60 ng/ml의 數値를 보였다고 하며 Matsuoka 等(1987)은 日光遮蔽劑인 paraaminobenzoic acid ester를 全皮膚에 바른 4인과 對照區 4人을 1 MED의 紫外線으로 全身을 處理한 結果, 前者의 경우 0, 1, 2, 3, 8 및 15日後 5, 4, 8, 3, 8 및 3 ng/ml의 血清內 D_3 含量을 보였으며 對照區에서는 各各 3, 25, 21, 14, 5 및 2 ng/ml의 濃도를 보였다고 한다.

Hines 等(1986)은 山羊에게 Ca과 D_3 添加 代用乳를 계속 給與하였더니, 血清內 D_3 含量이 5週後에 對

照區의 100倍, 10週後에 50倍, 15週後에 75倍, 20週後에 100倍로 增加되었다고 報告하였다.

한편 波長에 따른 D_3 生成 研究를 보면, Bunker와 Harris(1937)는 紫外線 波長 296 nm가 구루병 치료에 가장 效果的이었다고 하며 小林 等(1976)은 ethanol에 녹인 7-DHC를 D_3 로 轉換시킬 때 295 nm가 가장 좋았다고 報告하였다.

Takada 等(1979)은 흰쥐의 皮膚에 紫外線 照射時 303 nm가 가장 有效하였다고 하며 蔣 等(1990)은 병아리 등 皮膚에 254, 310 또는 365 nm의 紫外線을 照射하였더니 310 nm가 가장 많은 $PreD_3$, lumisterol₃ (L_3) 및 D_3 가 合成되었다고 發表하였다.

따라서 本 研究에서는 여러가지 線量的 310 nm 紫外線을 병아리 등 皮膚에 照射하고 아직까지 試圖된 바 없는 血清內 D_3 濃도를 測定코자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼料

육용 Hubbard 系統 1日齡 병아리 30首를 新基農場에서 購入하여 D_3 缺乏飼料(A.O.A.C., 1984; Table 1)로 3週間 飼養하였으며 肉鷄舍의 유리창에는 검은 비닐(차광막) 2枚를 부착하여 어둡게 하였다. 3週齡 1日前に 肉鷄의 등 3×3cm의 털을 뽑고 다음 날 紫外線을 照射하였다.

2. 實驗設計

Table 1. Ingredients and chemical composition of vitamin D deficient diet for 0~3 weeks old broiler chicks

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

310 nm의 單一紫外線을 0, 30, 60, 90, 120 또는 150分間 照射하고 2日後에 血漿을 採取하여 D₃ 含量을 測定하였다.(6處理 × 5反覆=30首).

3. 紫外線 照射

310 nm의 紫外線燈(三共電機, Tokyo, GL-6 Model)을 12.5 cm위에서 (照射強度 88 μW/cm²) 0分, 30分, 60分, 90分, 120分 또는 150分(照射線量 0, 0.16, 0.32, 0.48, 0.63 또는 0.79 J/cm²) 照射하였다.

4. 血液採取 및 保管

紫外線 照射後 2日을 經過시키고 心臟穿刺採血法에 依하여 肉鷄로부터 2~5 ml의 血漿을 採取하고 0.2 mg/ml의 heparin을 處理하여 凝固를 防止하였다. 採取한 血漿을 1,500 rpm으로 遠心分離하여 上層 血漿을 다른 試驗管에 옮겼다. 이를 分析時까지 -20℃에서 保管하였다.

5. 脂質抽出 및 精製

먼저 1 ml 以上の 血漿이 모인 試驗管으로부터 過剩의 血漿을 별도 試驗管에 모으고 잘 混合한 다음 비타민 D₃의 回收試驗에 利用하였다. 이때 血漿 1 ml씩 10개 試驗管에 나누어 넣고 5개 試驗管에는 100 μl의 4 ppm 비타민 D₃-hexane 溶液을, 나머지 5개에는 運搬體인 hexane 100 μl를 첨가하고 下記와 같이 脂質을 抽出하였다.

各 병아리의 血漿으로부터 1 ml씩 取하고 100 μl의 hexane을 加한 다음 vortex mixer로 混合시켰다. 그 후 6 ml ethyl acetate를 加하여 vortex mixer로 다시 混合시키고 水平진탕기에서 진탕시킨 다음 遠心分離하여 上層液을 取하고 다른 試驗管에 옮겼다. 下層에 다시 6 ml의 ethyl acetate를 處理하여 vortex mixer로 섞은 후 진탕시켜 遠心分離하고 上層液을 取하여 위의 上層液에 合하였다.

위에서 얻은 上層液을 窒素下에서 乾固시킨 다음 methanol 1 ml로 녹인後 再蒸溜水 1 ml를 加하여 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 通過시켰는데 C₁₈ cartridge에는 試料를 通過시키기 前에 아래와 같은 試藥으로 洗滌하였다.

5 ml Hexane
↓
5 ml Isopropanol
↓
5 ml MeOH
↓
5 ml H₂O (distilled water)

洗滌後 C₁₈ cartridge에 試料를 通過시키고 流出液을 버린 다음 10 ml 70% methanol을 加하여 流出시키고 流出液을 버렸다. 다시 5 ml의 acetonitrile을 加하여 계속 流出시키고 流出液을 버렸다. 이에 5 ml methanol을 加하여 流出液을 모으고 窒素下에서 乾固시켜 1 ml isopropanol로 녹이고 14時間 0℃에 保管한 다음 다시 窒素下에서 乾固시키고 100 μl HPLC 溶媒로 녹였다.

6. HPLC에 依한 비타민 D₃ 含量 分析

HPLC의 Detector는 Waters Associates(Milford, MA)의 Model 440을 使用하였고 Pump는 Waters의 Model 510, Injector는 Waters의 Model L16K, Column은 Waters의 μ Porasil(4 × 300 mm), Recorder는 BBC(Austria)의 Model SE 120을 使用하였다.

HPLC의 使用條件

Solvent : Hexane-Isopropanol(100:0.5)

Flow rate : 1.8 ml/min.

Chart speed : 0.5 cm/min.

AUFS : 0.005

Chart width : 20 cm

Detector wavelength : 254 nm

試料溶液을 HPLC에 注入하여 chromatogram을 얻고 비타민 D₃에 該當하는 peak의 높이를 測定하였으며 標準曲線에 依하여 비타민 D₃ 含量을 찾고 試料溶液 中 비타민 D₃의 含量을 測定한 다음 各 回收率에 따르는 補正을 하고 HPLC 注入量에 따르는 原液中의 含量을 求하였다. 本 研究室에서 使用한 含量 計算式

은 아래와 같다.

血液中の D₃ 含量(ng/ml) =

$$A(\text{ng}) \times \frac{100}{\text{回收率}(\%)} \times \frac{100 \mu\text{l}^{**}}{80 \mu\text{l}} / \text{血漿量}$$

* HPLC의 chromatogram peak 높이에 따르는 비타민 D₃의 含量(ng).

** HPLC 注入時 100 μl 中 80 μl를 取하였음.

Ⅲ. 結果 및 考察

310 nm의 紫外線을 0, 0.16, 0.32, 0.48, 0.63 또는 0.79 J/cm² 照射하고 48時間 後에 採取한 血漿內의 D₃ 含量을 調査하였다. (Fig. 1). 0.32 J/cm² 照射時 血漿內의 D₃ 含量이 43.32 ng/ml로서 가장 높은 값을 보였으며 無處理區의 20 ng/ml에 比하여 2.15배에 해당하는 數值이었다. 0.48 J/cm² 照射時 D₃ 含量은

32.80 ng/ml로서 0.32 J/cm²照射時 보다 減少된 水準을 보였으나 0.63 J/cm² 照射時에는 39.99 ng/ml로서 다시 上昇하는 傾向을 보였으며 0.79 J/cm² 照射時에는 18.94 ng/ml의 낮은 含量을 보였다. 이와 같이 紫外線 0.48 J/cm² 以上 照射로 血漿內 D₃ 含量이 減少된 것은 皮膚에서 生成된 D₃의 一部가 紫外線의 過量照射로 5,6-transvitamin D₃, suprasterol I 및 II로 置換되었으며(Webb 等, 1989), 다른 一部는 PreD₃를 거쳐 toxisterol로 變換되었기 때문이라 생각된다(Norman, 1979).

Shepard 等(1979)은 正常人의 維生素 D₃ 濃度は 平均 2.3 ng/ml이었으며 이들에게 強한 日光浴을 處理한 結果, 26.1 ng/ml의 높은 값을 보였다고 하므로 本 研究水準보다는 낮은 값이다. 本 研究의 0.32 J/cm²는 Clemens 等(1982b)의 MED 單位로 환산하면, 6MED에 該當하는 높은 값이다.

Shepard 等(1979)은 몇 J/cm² 또는 MED의 日

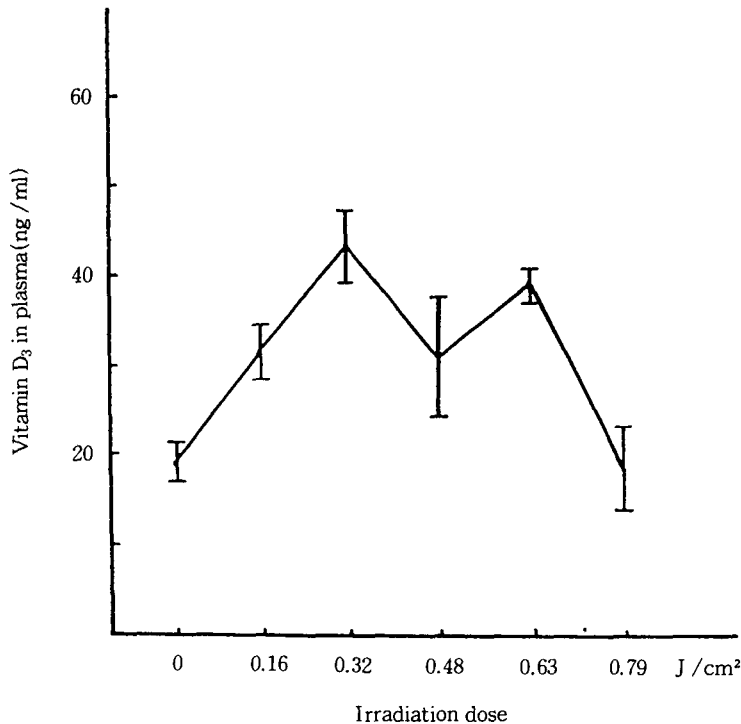


Fig. 1. Plasma vitamin D₃ of broiler chicks irradiated by 310 nm UV light with different irradiation dose

光浴을 適用하였는지 記述하지 않았기 때문에 本 研究에서보다 더 낮은 紫外線量이 아니었다 推測될 뿐이다. 그리고 日光浴으로 維生素 D₃ 濃度가 높아진 것은 本 研究의 紫外線 照射 0.32 J/cm²으로 增加한 傾向과 같다.

Holick(1981)은 24歲 白人 女子의 全身에 3MED의 UVR을 處理하였을 때 最初의 血清內 維生素 D₃ 5 ng/ml로부터 2日後의 60 ng/ml까지 上昇되었다고 報告하였으므로 本 研究結果보다 조금 높다. Holick(1981)의 3MED는 本 研究의 6MED보다 낮은 값이나, 그들은 女子의 全身에 紫外線을 照射하였기 때문에 더 많은 維生素 D₃ 含量을 보이지 않았나 생각된다.

Clemens (1982a)은 1.5 또는 3.0 MED의 紫外線을 正常兒의 全身에 照射한 結果, 2日後에 最高值인 45 ng/ml 또는 80 ng/ml에 到達하였다고 하므로 本 研究結果보다 높게 나타났다. 1.5MED는 本 研究의 6MED에 比하여 25%에 該當하나, 그들은 幼兒의 全身에 照射하였기 때문에 높게 나타났다고 사료된다.

Clemens 等(1982b)은 着色된 白人에게 1MED의 UVR을 全身에 處理한 結果, 1日後 60 ng/ml로 增加하였고, 2日後 15 ng/ml로 減少하였다고 하므로 2日後의 含量이 本 研究結果보다 낮게 나타났다. Adams 等(1982)은 紫外線 照射量을 달리하여 4, 3, 1.5 또는 1MED를 照射하였는데 各各 2日後에 最高值 140 ng/ml, 1日後에 最高值 80 ng/ml, 2日後에 最高值 45 ng/ml, 2日後 最高值 20 ng/ml를 보였다고 하므로 4 또는 3MED 照射時 本 研究結果보다 높게 나타났다. 역시 全身照射 때문이라 믿는다.

Lo 等(1986)은 아시아인과 코카시아인에 1.5MED를 處理하여 1日後에 最高值인 40 및 30 ng/ml의 血清內 維生素 D₃ 濃度를 보였다고 하므로 本 研究의 水準보다 낮게 나타났다. 아무리 全身照射를 하더라도 1.5MED는 本 研究의 等 皮膚에 6MED를 照射하는 것보다 덜 增加됨을 할 수 있다.

Holick(1987)은 腸에서 脂肪吸收不良患者와 正常人에게 50,000 I.U.(1.25mg)의 維生素 D₃를 經口投與하였더니 前者는 12時間後에 血清內 維生素 D₃ 含量이 60 ng/ml로 急增하였으나 後者 점차 減少하여 72時間 後에는 10 ng/ml로 되었고 正常人은 5~7 ng/ml의 範圍를 별로 벗어나지 않았다고 하므로 本 研究의

紫外線 照射時보다 빨리 增加되기는 하였지만 最高值가 本 研究結果보다 낮게 나타났다.

正常人에게 많은 量의 維生素 D₃를 經口投與해도 血清內의 維生素 D₃含量이 거의 增加하지 않았다고 하는 事實은 흥미있는 일이다. 왜냐하면 一般養鷄飼料에는 2,000 I.U/kg의, NRC(1984) 요구량의 10배에 該當하는 維生素 D₃가 含有되어 있으나 이것이 血中 維生素 D₃ 含量을 높이는데 얼마나 寄與하는지 모르기 때문이다.

Matsuoka 等(1987)은 日光遮蔽劑인 paraaminobenzoic acid ester를 處理한 後 1MED의 UVR을 適用한 結果, 15日까지 3~8 ng/ml의 維生素 D₃ 含量을 보였으며 對照區에서는 3, 25, 21, 14 ng/ml(0, 1, 2, 3日後)를 보였다고 하므로 本 研究結果보다 낮게 나타났다. 낮은 線量때문이라 믿는다.

上記한 바와 같이 사람에게 있어서도 個人差가 큰 것을 알 수 있으며 本 研究에 使用된 병아리의, UV 照射後의 血漿內 維生素 D₃ 濃度도 사람의 水準에 比하여 이렇다 할 만한 差異가 없는 것으로 나타났다. 그리고 D-缺乏 병아리의 등 3×3cm에 0.32 J/cm²의 UV를 照射했을 때 2日後에 對照區의 2.15배의 血漿內 D₃ 含量을 보였으므로 D-缺乏병아리에 紫外線을 照射하여 구루병을 防止하는 것이 좋은 것인지, 現在 各 農家에서 利用하고 있는 D₃의 經口投與方法이 바람직한 것인지, 앞으로 檢討 研究해야 할 課題라고 생각된다.

IV. 摘 要

本 研究은 3週齡 브로일러 병아리(Hubbard 系統)의 등 皮膚에 310nm 紫外線 照射時 相異한 線量에 따르는 血漿中 維生素 D₃(D₃) 含量을 測定코자 實施되었다. 紫外線 照射線量은 0~0.79 J/cm²으로 하였으며(5反覆) 2日後에 採血하고 血漿을 分離하여 脂質을 抽出, C₁₈ cartridge로 精製, HPLC로 D₃를 分析하였다.

無處理區 병아리의 血漿內 D₃ 含量은 20 ng/ml이었으며 0.32 J/cm²照射時 43 ng/ml로서 試驗한 모든 線量中 가장 높은 값을 보였다. 이 값은 無處理區에 比하여 2.15배에 該當한다. 그러나 0.48 J/cm² 以上 照射時에는 D₃ 含量이 漸次 減少되었으며 0.79

J/cm² 處理時에는 無處理區의 水準과 같이 되었다.

V. 引用文獻

1. Adams, J.S., T.L. Clemens, J.A. Parrish, M. F. Holick. 1982. Vitamin D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin D-deficient subjects. *N. Engl. J. Med.* 306:722-725.
2. A.O.A.C. 1984. Vitamin D₃ in poultry feed supplements chick bioassay. *Official Methods of Analysis*. Washington, D.C. p.876.
3. Bunker, W.M. and R.S. Harris. 1937. Precise evaluation of ultraviolet therapy in experimental rickets. *New England J. Med.* 216:165-169.
4. Clemens, T.L., J.S. Adams, J.M. Nolan and M.F. Holick. 1982a. Measurement of circulating vitamin D in man *Clinica. Chemica. Acta.* 121:301-308.
5. Clemens, T.L., J.S. Adams, S.L. Henderson and M.F. Holick. 1982b. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. *Lancet.* pp.74-76.
6. Hines, T.G., R.L. Horst, E.T. Littledike, D. G. Beitz and N.L. Jacobson. 1986. Vitamin D₃ and D₃ metabolites in young goats fed varying amounts calcium and vitamin D₃. *J. Dairy Sci.* 69:385-391.
7. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin and S.H. Doppelt. 1981. Regulation of cutaneous D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science.* 211:590-593.
8. Holick, M.F. 1981. The cutaneous photosynthesis of previtamin D: A unique photoendocrine system. *J. of Investigative Dermatology.* 76:51-58.
9. Holick, M.F. 1987. Vitamin D and the kidney. *Kidney International.* 32:912-929.
10. Holick, M.F., E. Smith and S. Pincus. 1987. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch. Dermatol.* 123:1677-1683.
11. Lo, C.W., P.W. Paris and M.F. Holick. 1986. Indian and Pakistani immigrants have the same capacity as Caucasians to produce vitamin D in response to ultraviolet irradiation. *Am. J. Clin. Nutr.* 44:683-685.
12. Matsuoka, L.Y., L. Ide, J. Wortsman, J.A. MacLaughlin and M.F. Holick. 1987. Sunscreen suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J. Clin. Endoc. & Metab.* 64:1165-1168.
13. Norman, A.W. 1979. Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone. *Academic Press*, pp.52, 58.
14. N.R.C. 1984. Nutrient Requirement of Poultry. *NAS-NRC*. Washington, D.C. pp. 1-71.
15. Shepard, R.M., R.L. Horst, A.J. Hamastra and H.F. Deluka. 1979. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. *Biochem. J.* 182:55-69.
16. Takada, K., T. Okano, Y. Tamura, S. Matsui and T. Kobayashi. 1979. A rapid and precise method for the determination of vitamin D₃ in rat skin by high-performance liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 25:385-398.
17. Velluz, L., G. Amiard and A. Petit. 1949. Le precalciferolses relations d'equilibre avec le calciferol. *Bull. Soc. Chem. Fr.* 16:501-508.
18. 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. Endocrin. Metab.* 68:882-887.
19. 小林正, 弘岡道子, 康村滿枝. 1976. 7-テヒトロコレステローレの紫外線照射反應に及ぼす照射波

長の影響 ヒタミソ 50:185-189.

20. 蔣潤煥, 全珍錫, 呂永壽. 1986. Aflatoxin과 비타민 D₃ 給與가 브로일러 병아리의 增體, 營養素利用率, 脛骨無機物 및 血清性狀에 미치는 影響. 慶北大 農科研究報. 2:68-76.
21. 蔣潤煥, 全珍錫, 呂永壽. 1986. Aflatoxin과 비타

민 D₃ 給與가 브로일러 병아리의 血清 및 臟器性狀에 미치는 影響. 韓畜誌. 28:419-425.

22. 蔣潤煥, 李殷澤, 李善行. 1990. 紫外線 照射에 依한 브로일러 병아리 皮膚에서의 維生素 D₃ 類似物質合成. 韓畜誌. 32:218-224.