

腦下垂體 後葉홀몬에 관한 研究 (I) 後葉홀몬의 調製와 그 力價檢定

金 泳 垠 · 李 相 燮 · 鄭 在 亨

Young Eun Kim* Sang Sup Lee* Jae Hyong Chung* : Studies on the Posterior Pituitary Hormones I.

The Preparation and Assay of the Posterior Pituitary Hormones

(* College of Pharmacy, Seoul National University)

Oxytocin and vasopressin were extracted from bovine posterior pituitaries and assayed, in many ways. On the assay of oxytocic active substance, it was found the depression method of blood pressure in a chicken was the easiest one among possible methods. The potency of oxytocin which was extracted with glacial acetic acid was 14.2 I.U./mg. On the assay of vasopressin for pressor activity, a full grown healthy male rat was used. Applying a simple artificial respiratory apparatus, the assay could be carried out successfully. The potency of vasopressin was 13.2 I.U./mg.

(Received April 5, 1962)

I. 緒 言

腦下垂體後葉抽出물이 子宮收縮作用이 있다는 것은 1906年 Dale¹⁾에 의하여 처음으로 報告되었다. 이보다 먼저 Oliver & Schafer²⁾는 腦下垂體抽出물이 血壓上昇作用이 있음을 發見하였고 곧 이어 Schafer & Vincent³⁾ 및 Howell⁴⁾는 이 作用이 後葉에서 由來한다는 것을 證明하였다.

이에 對한 製劑가 臨床의으로는 産婦人科 領域에서 Foges u. Hofbauer⁵⁾ 등이 弛緩性出血及 妊娠 第一期와 第二期에 應用한 것이 最初였다. 그後 Kamm & Aldrich⁶⁾는 後葉中の 活性物質인 Oxytocin (子宮收縮因子)과 Vasopressin (血壓上昇因子)을 化學的處理에 의하여 最初로 分離하였다.

그러나 後葉抽出물의 臨床應用時에 가끔 惹起되는 副作用이 Vasopressin에 依한다는 것을 알게된 以來 이의 使用이 制限되어 왔으나, 後葉粉末抽出물의 不純蛋白質을 除去하여 一部 高血壓患者를 除外하고는 一般産婦에 그대로 使用되고 있다.

그後 Pierce & du Vigneaud⁷⁾及 Livermore & du Vigneaud⁸⁾ 등에 의하여 高單位 Oxytocin이 單離되어 나와 그 應用範圍가 넓어졌다. 繼續하여 du Vigneaud^{9, 10)} 등에 의하여 Oxytocin及 Vasopressin의 化學的構造及 合成이 이루어졌다. 이로서 後葉홀몬研究는 偉대한 發展을 보게되었다. 그러나 Oxytocin의 合成은 原料의 高價로 實際工業的 合成段階에 이르지 못하고 있으며 아직 歐美各國에서도 食用獸의 腦下垂體로부터 直接抽出되고 있다. 瞥見컨대 우리나라에서는 天然資源이 豊富히 存在함에도不拘하고 臟器藥品에 관한 研究는 아직 未開拓狀態에 놓여 있다. 이에 著者들은 韓國에서 比較的 豊富히, 容易하게 採集할 수 있는 食用畜牛의 腦下垂體로부터 Kamm & Aldrich⁶⁾의 方法을 檢討應用하여서 後葉中の 活性物質을 抽出精製하고, 子宮收縮因子及 血壓上昇因자의 力價檢定方法의 檢討와 그 力價檢定을 하여 이에 報告하여 微弱하나마 홀몬研究發展에 寄與하고자 한다.

II. 實 驗 之 部

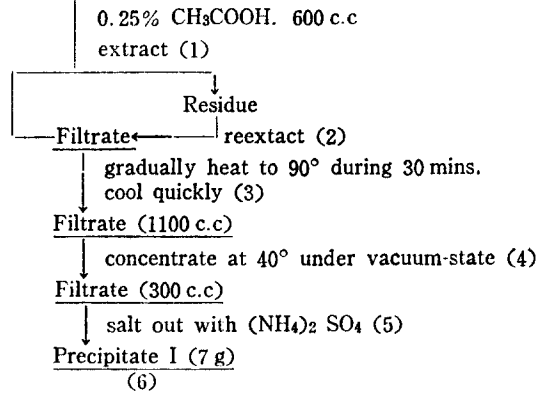
1. 腦下垂體後葉粉末

食用牛를 屠殺後 30分以內에 50個씩의 腦下垂體를 約 4倍量의 精製 Acetone에 採取하고 約 3時後 後葉을 前葉과 分離하고 細切하여 다시 100 c.c Acetone으로 1時間 間隔으로 3回 脫水及 脫脂하고 無水磷酸을 넣은 desiccator中에 넣고 3時間마다 2回 吸引乾燥한 다음 5時間後 粉末로 만든다. 이 粉末는 上記 desiccator中에 吸引保存한다. 이와같이 處理하여 牛腦下垂體 800個로 부터 後葉粉末 30~35 톨 얻는다.

2. 後葉粉末의 弱酸抽出

牛腦下垂體 170個로 부터 얻은 後葉粉末 5.5 g을 Mortar中에 넣고 0.25% 酢酸溶液 (PH 3.7~4.4)을 少量씩 加하여 粥狀으로 한 다음 抽出容器에 옮기고 Mortar를 다시 0.25% 酢酸液으로 洗滌하여 前液과 合하고 여기에 0.25% 酢酸液을 追加하여 全量이 600 c.c가 되게 한 다음 Table 1과 같은 操作으로 抽出한다.

Table 1
Acetone dried Posterior pituitary powder (5.5 g)

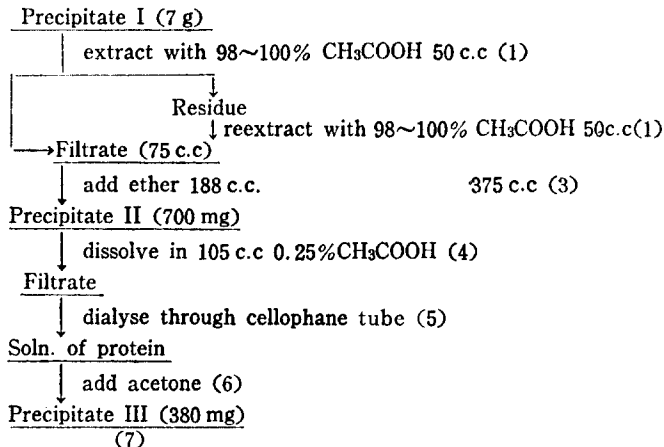


- (1) : 後葉粉末 5.5 g 에 600 c.c 0.25% 酢酸液 (PH 3.7~4.4) 으로 氷冷下에서 6時間抽出한 다음 遠心分離한다. (3000 r.p.m. 5分間)
- (2) : 위의 殘渣는 200 c.c 0.25% 酢酸液으로 2時間씩 3回抽出한다. 遠心分離하고 殘渣는 廢棄하고, 抽出液은 (1)의 것과 合併한다.
- (3) : 以上 合併液은 水浴上에서 徐徐히 加熱하여 30分以內에 95°C 가 되게한 다음, 急冷하여 遠心分離하고 溶液을 取한다.
- (4) : 遠心分離한 液 (1100 c.c)은 40°에서 減壓蒸溜하여 300 c.c가 되게한다. 이때 注意할 것은 氣泡가 生成되므로 이를 防止하기 爲하여 N-Octyl alcohol 을 途中數滴씩 加한다.
- (5) : 여기서 (NH₄)₂SO₄ 165 g 을 加하여 2/3 飽和시킨 다음 一夜放置한다.
- (6) : 沈澱을 遠心分離한 다음 Acetone 으로 一回, ether 로 二回 洗滌한다. 다음에 吸引乾燥하여 無水磷酸을 넣은 desiccator 中에 貯藏한다. 鹽의 存在如何로 그 重量이 相異하다. 收得量이 期待한 量보다 많은 것은 이때 문이며 이 鹽의 存在는 다음 操作에 支障이 없다.

3. 後葉粉末의 氷酢酸抽出

鹽析되어 나온 Precipitate I. (7g)을 98~100% 氷酢酸 90 c.c 로 Table II 의 操作과 같이 抽出한다. 이때 空氣中의 水分의 溶入을 防止하기 爲하여 三頸 flask 를 使用한다.

Table II



- (1)(2) : Precipitate I. (7g)을 500 c.c 三頸 flask 에 넣고 常溫에서 氷酢酸 50 c.c 를 加하여 空氣中의 濕氣를 完全히 遮斷하여 攪拌하면서 5時間 抽出한다. 殘渣는 40 c.c 氷酢酸으로 再抽出한다.
- (3) : 抽出溶液에 精製 ether 188 c.c 를 加한 다음 即時 石油 ether 375 c.c 를 追加하여 蛋白沈澱을 完結시키

고 冷却下에서 一夜放置한다. 沈澱을 遠心分離하고 ether 로 2回 洗滌한 다음 吸引乾燥시킨다. Precipitate II. 700 mg).

(4): 上記 Precipitate II 中에는 硫酸이 少量 存在하므로 105 c.c 의 0.25% 酢酸液에 充分히 溶解시킨 다음 遠心分離하고 未溶解物을 廢棄한다.

(5)(6)(7): 이 溶液을 Cellophane 袋을 使用하여 透析한 다음 그 內容液을 稱量하여 Acetone 을 攪拌하면서 滴加하여 80%의 濃度가 되게 한다. 冷却下에서 一夜放置後 生成된 蛋白沈澱을 遠心分離하고 ether 로 二回 洗滌하여 다시 吸引乾燥시킨 다음 稱量한다. 이 粉末은 灰白色粉末이다. (Precipitate III. 380 mg).

4. 子宮收縮因子의 力價檢定^{11, 12)}

A) 後葉標準液의 調製

牛腦下垂體를 屠殺後 30分以內에 Acetone 中에 採取하고 前記後葉粉末의 處理方法으로 處理한 것을 前葉과 完全히 分離하고 粉末로 만든다. 充分히 吸引乾燥시킨 다음 이것을 正確히 100 mg 內外量을 稱量하여 小 glass mortar 中에 取하고 0.25% 酢酸液을 5~10 c.c 加하여 Spoid 를 使用하여 200 c.c 三角 flask 中에 移取하고, Glass mortar 와 유리棒은 同液으로 充分히 洗滌하여 舍하고 再次 0.25% 酢酸液을 追加하여 本液 1 c.c 中에 後葉粉末 1 mg 가 含有되도록 한다. 이것을 小 funnel 로 濾고 1分間, 沸騰할 程度로 加熱한 다음 急冷하여 常溫으로 한 다음 濾紙로 濾過後 防腐劑로서 Chlorobuthanol 을 0.5% 濃度가 되도록 加하여 溶解시키고 이것을 吸引濾過한 다음 ampule 中에 充填하고 100°에서 30分間 加熱滅菌시킨다. 이 溶液 1 c.c 는 正確히 2 oxytocin 國際單位 및 2 血壓上昇單位 (Interatinal Vasopressin unit)를 含有하고 있다.

B) 氷酢酸 抽出物 (Precipitate III)의 子宮收縮因子의 力價檢定

檢定方法: 白色레공의 血壓下降을 利用하는 方法으로 計算은 2-2用量法 (4 Point assay)에 依한다.

稀標準液: 上記調製後葉標準液을 0.2u./c.c 가 되도록 稀釋한다.

稀檢體液: 1 mg/c.c 檢體溶液을 調製한 다음 이것을 50倍로 稀釋한다.

實驗動物: 1.8 kg 雄白色레공.

注射量: 標準液高用量 (SH)—稀標準液 0.2 c.c

標準液低用量 (SL)—SH 의 2倍稀釋液 0.2 c.c

檢體液高用量 (TH)—稀檢體液 0.15 c.c

檢體液低用量 (TL)—TH 의 2倍稀釋液 0.15 c.c

操作: 雄白色레공 (1.8 kg)에 Pentobarbital (50 mg/c.c)을 注射(1 c.c/kg body weight)하여 筋肉痙攣을 이 르키지 않도록 深麻醉시킨 다음 注意하면서 坐骨動脈을 露出시킨 다음 心臟에 가까운 支動脈을 約 2 cm 의 距離로 結紮하여 Cannula 를 挿入하고 抗凝固劑로 8.5% Sodium Citrate Solution 을 使用하여 水銀 Manometer 에 連結한 Kymograph 에 血壓을 記錄한다. 抗凝固劑와 血液과의 交換을 最少로 하게 하되 Kymograph 上에 血壓變化가 明確히 記錄되도록 Manometer 를 調節한다. 檢體는 羽下靜脈을 露出하여 注射한다.

實驗動物의 感度: 稀標準液을 注射할 時 血壓下降感度가 一過性으로 20~40 mmHg 程度가 되도록 調節하고 0.15~0.5 c.c 以內의 注射量이 되도록 濃度를 稀釋한다. 注射途中 血壓의 急激한 變化가 있으며는 이 動物은 廢棄한다. 藥物의 投與는 SH TL SL TH TH SL TL SH 를 一組로하여 二組投與하고 投與는 任意의 順序로 한다.

Table I. A 2:2 dose Assay for reducing the chicken blood pressure with precipitate III soln. and standard soln.

doses	Couple I			Couple II			Couple III			Couple IV			ΣYi
	SH	TL	Y ₁	TH	SL	Y ₂	TH	SL	Y ₃	SH	TL	Y ₄	
group I	48	32	16	46	27	19	56	40	16	47	33	14	65
group II	44	29	15	39	22	17	46	29	17	40	28	12	61
ΣYr			31			36			33			26	

Yi: 高用量血壓에서 低用量血壓을 뺀 값

I=log SH/SL=log 2=0.3010

Y_a=-Y₁+Y₂+Y₃-Y₄=12

Y_b=Y₁+Y₂+Y₃+Y₄=126

M=I×Y_a/Y_b=0.0286

本檢體 1 cc 中 Oxytocin Unit=Antilog M×SH lml 中의 Oxytoncin Unit×b/a=14.244

b: 檢體採取量을 生理食鹽水로 稀釋하여 TH 를 調製했을 때의 全容量

a: 檢體採取量

이 實驗值의 信賴限界值 $L=0.04317$ 으로

藥典規定의 $L=0.15$ 值以內에 存在함으로 5% 危險率로 本檢體 Precipitate III. 1 mg 는 14.24 Oxytocin 單位가 含有되어 있다고 본다.

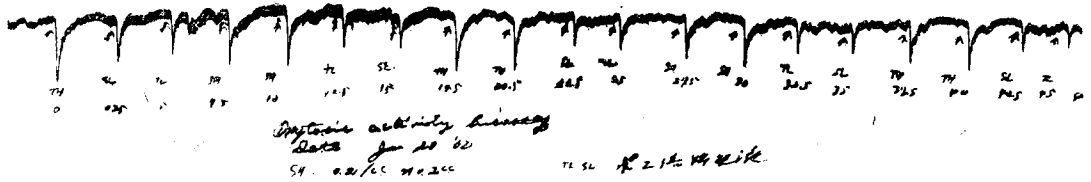


Fig. I: The Kymograph of the reducing chicken blood pressure with precipitate III.

C) 市販品の Oxytocin 單位檢定

市販되고 있는 腦下垂體後葉注射劑中 任意로 輸入品 1種 (A液), 國產品 1種 (B液)을 選擇하여 Oxytocin 單位含量을 檢定하였다.

i) A液의 Oxytocin 單位

檢定方法: (B)의 方法에 準한다.

Table II. A 2-2 dose Assay for reducing the chicken blood pressure with Posterior pituitary injection of A soln., a market sample

doses	Couple I			Couple II			Couple III			Couple IV			ΣYi
	SH	TL	Y ₁	TH	SL	Y ₂	TH	SL	Y ₃	SH	TL	Y ₄	
group I	41	24	17	44	27	17	44	27	17	46	28	18	69
group II	44	26	18	48	30	18	38	22	16	39	23	16	68
ΣYr			35			35			33			34	

檢體 A 液 1 cc 中 Oxytocin unit = $\text{antilog}(-0.00219) \times 0.2 \times 30 = 5.970 \text{ u/c.c}$ (標記單位는 10 u/c.c) L 値는 0.042 임으로 5% 危險率로 10 u/cc 로 標記된 本檢體는 實際 5.97 u/cc 의 力價밖에 없다고 본다.

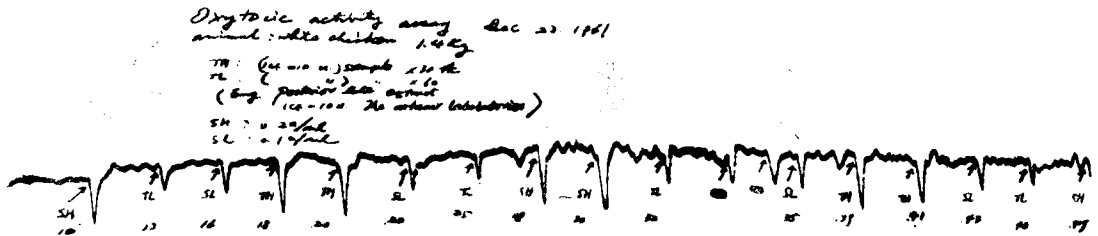


Fig 2. The kymograph of the reducing Chicken blood pressure with A soln., a market sample.

ii) B液의 Oxytocin 單位檢定

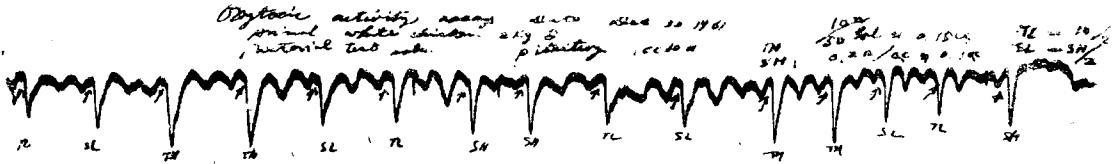
檢定方法: (B)의 方法에 準한다.

Table 3. A 2-2 dose Assay for reducing the chicken blood pressure with Posterior Pituitary injection of B Soln., a market sample

doses	Couple I			Couple II			Couple III			Couple IV			ΣYi
	SH	TL	Y ₁	TH	SL	Y ₂	TH	SL	Y ₃	SH	TL	Y ₄	
group I	44	28	16	44	30	14	46	30	16	40	28	12	58
group II	40	28	12	42	29	13	41	28	13	40	26	14	52
ΣYr			28			27			29			26	

檢體 B 液 1 cc 中 Oxytocin Unit=6.75 u/c.c

L 値는 0.0932 임으로 10 u/c.c로 標記되어 있는 檢體 B는 實際 5.97 u/c.c의 力價밖에 없다고 본다.



었다. 卽 one way Valve를 應用한 小管을 空氣의 交換管으로 하고 50 c.c의 注射器를 여기에 連結시켜 Piston 代用으로 하여 1분에 60~63回 運動하도록 Motor 에 連結했다. 空氣交換管에 雙支氣管 Cannula 를 이어서 Cannula 의 一方으로는 酸素供給을 할 수 있도록 했다.

檢體 (Precipitate III) 1 c.c 中の Vasopressin Unit=13.2 u/c.c

L 値는 0.038 이므로 5% 危險率로 本檢體 1 c.c 는 13.2 血壓上昇國際單位를 含有하고 있다고 본다.

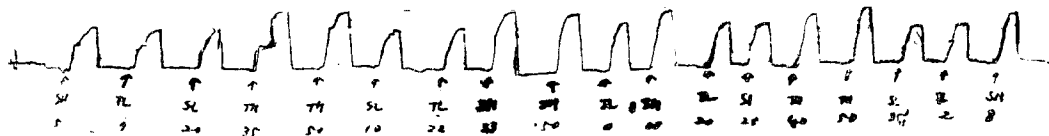


Fig. 5. The kymograph of the increasing rat blood pressure with precipitate III

III. 考 察

腦下垂體後葉혼몬에 抽出材料採取에는 長時日을 要했다. 卽 後葉粉末 2~3g 을 얻으려면 牛腦下垂體 50個를 處理해야 된다. 700~800個의 牛腦下垂體를 處理하여 約 30g 의 牛腦下垂體後葉粉末을 얻었다. 後葉粉末의 處理, 抽出方法에 있어서, 著者들은 다음 세가지 方法을 檢討해 보았다.

① Kamm & Aldrich 의 方法.

② ①의 方法中 減壓蒸溜濃縮 代身 硫酸鹽飽和를 代用하는 方法.

③ ①의 方法中 減壓蒸溜濃縮 代身 Semphadex 吸着劑를 使用하는 方法.

等이다. ②의 方法은 0.25% 醋酸으로 抽出한 溶液을 먼저 硫酸으로 全飽和시킨 다음, 析出된 蛋白質을 0.25% 醋酸溶液에 再次溶解시킨 다음 이를 다시 硫酸으로 飽和시키는 方法이다. 이 方法에는 全然加熱操作이 없으므로 加熱에 依한 蛋白質의 變性은 念慮되지 않으나 操作의 反覆으로 途中에 流失이 많고 長時間의 透折操作에 依한 腐敗가 일어나기 쉽다고 思料된다. ③의 方法은 0.25% 醋酸抽出物을 Sephadex 柱에 吸着시켜 이것을 0.25% 醋酸液으로 再抽出하여, 硫酸으로 2/3飽和시켜 Precipitate I 을 얻는 方法이다. 이 方法으로는 Sephadex 吸着層에 充分히 吸着되지를 않아서 所期의 果를 얻기가 困難했다.

蛋白沈澱의 洗滌은 恒常 ether 로 하는것이 좋았다. acetone 洗滌은 粘質狀態가 되어 不便하였다. 力價의 檢定에 있어서, 後葉혼몬의 標準液은 B.P 及 U.S.P 의 後葉標準粉末의 調製法에 準하여 調製했다. 이 標準液의 力價는 韓國標準液粉末의 것과 比較檢定이 要하나, 아직 韓國標準後葉粉末이 制定되어 있지않으므로 上記 藥典方法에 準하였다. 이 後葉標準液을 本實驗에 있어서, 血壓上昇因子와 子宮收縮因子의 標準單位로 使用하였다. Oxytocin 力價檢定 때에는 動物의 麻醉狀態의 如何에 따라 血壓의 變化가 左右되었으며, 藥物의 投與는 羽下靜脈에 고무 Cap 을 써운 Cannula 를 插入하여, 이 Cannula 를 通하여 投與하는 것이 便利했다. Vasopressin 의 力價檢定에는 人工呼吸을 시키는 것이 重要한 因子가 되었다. 著者들은 簡單한 人工呼吸裝置를 考案하여 實驗을 遂行하는데 成功하였다. 또 市販品을 任意로 選擇하여 檢定해 보았다. 이들의 力價가 商品標記單位보다 低下되어 있었는데 이것은 長期間의 貯藏에 基因한 것으로 思料된다. Oxytocin 力價檢定에는 다음 三方法이 있다.

① Guinea Pig 의 子宮收縮을 利用하는方法¹⁴⁾

② 白鼠의 子宮收縮을 利用하는 方法¹⁵⁾

③ 鳥類의 血壓上昇을 利用하는 方法

著者들은 이 세가지 方法을 比較檢討해 보았다. ①의 方法은 Guinea Pig 를 幼時부터 長期間에 걸쳐 雌雄隔離飼育, 또 檢定時檢定溫度의 嚴格한 規定等의 諸條件과 비록 이러한 條件을 具備하더라도, 五匹中一匹程度의 好結果를 얻을 수 있다는 難點이 있기 때문에, 매우 어려운 方法이었다.

②의 方法은 雌白鼠의 發情間期中의 子宮片을 利用하는 方法으로, 發情間期中의 子宮片을 利用하였을 때에도 自動收縮의 頻發 때문에 三匹中一匹程度의 好結果 밖에 얻을 수 없었다. ③方法은 最近 各國藥典에 收載된 方法으로 가장 좋은 結果를 얻을 수 있었다.

IV. 結 論

(1) 韓國產食用畜牛腦下垂體 800個로 부터 後葉粉末 30~35g 을 取得했다.

- (2) 後葉粉末 5.5 g 으로부터 冰醋酸抽出物 380 mg 을 收得했다.
- (3) 冰醋酸抽出物의 子宮收縮因子의 力價檢定은 鷄의 血壓下降을 利用하는 方法이 最良의 方法이 있으며 이 方法에 依하여 檢定한 同物質의 子宮收縮因子의 力價는 抽出物 1 mg 當 14.2 國際單位였다.
- (4) 冰醋酸抽出物의 血壓上昇因子에 對한 力價檢定時에는, 簡單한 人工呼吸裝置를 考案하여 使用하였으며 이 抽出物 1 mg 中 血壓上昇因子의 力價는 13.2 國際單位였다.
- (5) 市販後葉注射劑의 力價는 標記値보다 顯著히 下降되어 있는 것을 알았다.
- 本實驗에 많은 後援을 하여주신 天道醫藥品株式會社에 深甚한 謝意를 表하는 바이다.

(서울大學校 藥學大學)

文 獻

- 1) Dale; J. Physiol. **33**. 163. 1906
- 2) Oliver & Schafer; J. physiol. **18**. 277. 1895
- 3) Schafter & Vincent; *ibid.* **25**. 87. 1899
- 4) Howell; J. Exp. Med., **3**. 245. 1898
- 5) 日本產婦人科全書 **148**. 1月, 358. 1月
- 6) Kamm & Alderich; J. Am. Chem. Soc. **50**. 573. 1928
- 7) Pierce & du Vigneaud; J. Biol. Chem. **186**. 77. 1950
- 8) Livermore & du Vigneaud; *ibid.* **180**. 365. 1949
- 9) du Vigneaud et al.; *ibid.* **205**. 949. 1953
- 10) du Vigneaud et al.; J. Am. Chem. Soc. **76**. 3115. 1954
- 11) J. P. VII. 461
- 12) Coon; Arch. Internat. de pharmacodyn. et de Ther. **62**. 76. 1939
- 13) Landgrebe; Proc. Roy. Soc., Edinburgh. B. **62**. 202. 1946
- 14) Burn & Dale; Med. Res. Council. (Brit.). Sep. Rep. Ser. No. 69. 1922
- 15) J. H. Burn; "Biological Standardization" 180. Oxf. Univ. Press. London. B.P. VIII.. (1953). 822.