

쥐 우유중의 Myo-Inositol 생성에 관한 연구

변 시 명

한국과학원 생물공학과
(1970년 2월 20일 수리)

Myo-Inositol Synthesis in the Milk of Lactating Rats

Si-Myung, Byun

Department of Biological Engineering & Science
Korea Advanced Institute of Science

(Received Feb. 20, 1976)

SUMMARY

A high concentration of *myo*-Inositol in rat's milk was observed (61-91mg. of *myo*-Inositol per 100g of milk) by gas-liquid chromatographic method, using a 3% SE-52 column.

Feeding experiments showed that approximately 85% of *myo*-Inositol in milk was from dietary origin: the rest was considered to be synthesized by 1L-*myo*-Inositol-1-phosphate lyase. Results suggested that the biosynthesis was not sufficiently high to permit the maintenance of its *myo*-Inositol level in milk. However, study using (¹⁴C)-glucose injection into lactating female rats confirmed biosynthesis of *myo*-Inositol from glucose in mammary gland. This biosynthesis reached a maximum within an hour after (¹⁴C)-glucose injection intraperitoneally as lactose biosynthesis did.

Study using (³H)-*myo*-Inositol confirmed that most of the *myo*-Inositol in milk was transported from blood plasma *myo*-Inositol against a concentration gradient. About four hours after the beginning of the injection of (¹⁴C)-glucose, the specific radioactivity of *myo*-Inositol in milk was 8% of that of glucose in the blood. When (³H)-*myo*-Inositol was injected, the specific radioactivity of *myo*-Inositol in milk was about 26% of that of blood six hours after injection.

머 리 말

유리 *myo*-Inositol의 함량이 여러 동물의 精液중
에 많다는 사실이 알려져 있고 더욱이 이 *myo*-
Inositol은 epididymis에서 생성된 것이 아니고
accessory gland에서 유래된다는 결과가 발표된 바
있다(1)(2)(3)(4). 예를들면 돼지(boar) 精液 100
ml에 대하여 *myo*-Inositol의 양은 2gm. 내지 3gm.

경도로 많이 함유되어 있다. 이것은 동물의 정액
뿐 아니라 주요기관인 thyroid (5)나 뇌 및 신장
(6)(7)에도 함유되어 있다는 보고가 있다.

반면 동물의 종류에 따라 차이는 있지만 lactating
mammary gland에도 함량이 높으며 Dawson과
Freinkel (8)은 소의 우유에 비하여 쥐의 우유가
훨씬 많은 양의 *myo*-Inositol을 함유하고 있음을 보
고하였다. 이와 반면 동물의 糞丸 (9)(10)이나

mammary gland (11)에는 glucose에서 *myo*-Inositol을 생합성하는 효소계, 특히 1L-*myo*-Inositol-1-Phosphate lyase (E.C.No. 5.5.1.4)가 존재하여서 glucose에서 생성된 glucose-6-phosphate를 cyclization시켜 *myo*-Inositol-1-phosphate를 만들며 생성된 이 화합물은 다시 *myo*-Inositol-1-phosphatase (E.C.No. 3.1.3.25)에 의해 *myo*-Inositol이 생성된다는 것이 알려져 있다.

따라서 우유중에 *myo*-Inositol이 많이 함유되어 있다는 사실은 이것이 혈액에서 active transport에 의해 되었는지 또는 조직내에서 생합성되어 분비되었는지의 문제를 제시하게 되는 것이다. 본 실험은 쥐우유 중에 존재하는 *myo*-Inositol의 생성유래를 규명하기 위해 행하였다.

실험재료 및 방법

동물

실험실 흰쥐인 *Rattus norvegicus* Holtzman strain을 사용하였다. 먼저 인공수정시킨 암쥐(우)를 구하여 분만 후 새끼쥐를 8마리씩 남기게 했다 해산 후 제7일째 (^{14}C)-glucose (U, 0.05mCi, New England Nuclear)나 혹은 2-(^3H)-*myo*-Inositol (0.05m Ci, New England Nuclear)를 살균한 0.9% saline 용액에 희석하여 imperitoneally 주사하고 뒷부분의 Appendix I: Table A-1, Table A-3, 및 Table A-5의 방법으로 시료를 취했다.

사료실험

표준사료는 미국 Purina Laboratory Chow를 사용하였고 無 *myo*-Inositol 및 *myo*-Inositol 함유사료는 Appendix II: Table A-7, Table A-8과 같은 방법으로 제조하였다. 각 사료는 새끼를 잉태한 쥐에게 수정을 시킨날부터 실험이 끝날 때까지 계속하여 주었다.

사료제조

우유: 약 1~2ml의 우유에 20% TCA 용액 1ml를 가하여 단백질을 침전시키고 침전물은 International Model B-35의 SB-269 rotor를 사용하여 100,000×g에서 1시간 원심 분리시켜 제거하였다. 상등액을 IR-120(H^+) 및 IR-45(OH^-)로 된 mixed bed 이온교환수지를 사용하여 ion 물질을 제거하였다. 수지에서 나온 용離液(eluant)을 적열등 아래서 건조시킨 후 0.5ml~1.0ml로 만들고 이 중 25~50 microliter를 Eastman Kodak Cellulose Chromatogram (6065)에 spot하여 1-BuOH: Pyridine: H_2O (6:4:3 v/v) 용매를 사용하여 ascending 방

법으로 전개시킨 후 필요한 glucose, *myo*-Inositol 및 lactose를 분리하였다. 분리된 화합물을 chromatogram plate에서 조심히 긁어내어 放射能 측정용 vial에 넣고 Bray 방법(12)에 의해 Beckman LS-235 Liquid Scintillation Counter로 방사능을 측정하였다. 화합물의 同定은 표준 glucose, *myo*-Inositol, 및 lactose를 시료와 같이 같은 chromatogram plate에서 전개한 후 행하였다. 또한 표준 (^{14}C)-glucose, (^3H)-*myo*-Inositol 및 (^{14}C)-lactose를 시료와 동일한 방법으로 thin layer chromatography를 행하고 방사능을 측정하여 standard calibration curve를 자기 얻은 후 시료의 방사능을 이 curve에서 보정하였다.

적열등 아래서 건조시켜 남은 시료는 0.5mg의 표준 ribitol을 넣어 internal standard로 하고 이 시료를 다시 45°C에서 하룻밤 감압건조하여 완전 건조를 행하였다. 건조된 시료를 G.L.C.로 분석하였다.

혈액; 쥐에서 시간별로 채취한 혈액 1~2ml에 5% perchloric acid 용액 10~20ml를 가한 후 침전물을 우유시료에서와 같이 원심분리로 제거하였다. 5N-KOH를 사용하여 상등액의 pH를 0°C에서 5.0으로 조절한 후 다시 침전물을 제거하고 우유시료처럼 이온교환수지를 사용하여 염(鹽)을 제거한 후 방사능을 측정하였다.

Gas-Liquid Chromatography; glucose, *myo*-Inositol 및 lactose의 정량을 위하여 Hewlett-Packard 5750 Research Gas Chromatograph를 사용하였다. 6ft×3mm 크기의 구리관에 Silicone GE SE-52 (methyl phenyl substituted silicone gum)를 electric vibrator로 충전시켰다. 이 충전물질은 silane을 처리한 Gas Chrom Q(80-100mesh)을 3% SE-52로 coating시켜 제조하였다. 시료는 완전히 건조시킨 후 pyridine 1ml에 녹이고 여기에 hexamethyldisilazane (HMDS) 0.2ml를 가하고 끝이여 trimethylchlorosilane (TMCS) 0.1ml를 가하여 혼든다음 정치시켰다. 상등액 2microliter를 주입하고 100°C에서 10분 전개시킨 다음 6°C/min의 비율로 temperature program을 행하였다. 각 화합물의 同定은 표준화합물을 spike하여 동시에 G.L.C.를 행하였다. 우유시료의 gas chromatogram은 (Fig.1)과 같다. gas chromatogram에서 각 peak의 면적을 planometer로 측정한 다음 다음식에 의해 정량하였다.

$$\text{mg. Sugar} = \left(\frac{\text{Asugar}}{\text{Aribitol}} \right)_{\text{sample}} \times \left(\frac{\text{Aribitol/mg. ribitol}}{\text{Asugar/mg. sugar}} \right)_{\text{standard}} \times (\text{mg. ribitol})_{\text{sample}}$$

여기서 A는 chromatogram에서 각 peak의 면적이다.

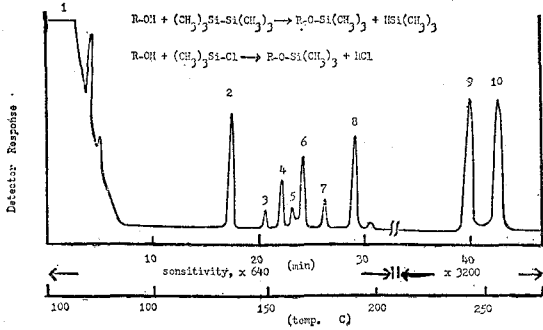


Fig. 1. Gas Chromatogram of Deionized Rat Milk Dialysate. Run on 6 ft. \times 3mm i.d. 3% SE-52 column. The column temperature was programmed to increase at 6.0°C/min. from 100°C 10min. after injecting sample to 300°C; the baseline was adjusted to zero after 10 min. The identified components are 1: solvent-TMS reagents, 2: ribitol, 3: γ -galactose, 4: α -galactose, 5: α -glucose, 6: β -galactose, 7: β -glucose, 8: *myo*-Inositol, 9: α -lactose, 10: β -lactose. The one following *myo*-Inositol was not identified.

Internal standard인 ribitol과 각 표준화합물의 response ratio는 5번 반복한 실험에서 평균치를 구해 사용하였으며 그 값은 다음과 같다.

$$\left(\frac{\text{Aribitol/mg. ribitol}}{\text{Aglucose/mg. glucose}} \right) = 1.36,$$

$$\left(\frac{\text{Aribitol/mg. ribitol}}{\text{Ainositol/mg. inositol}} \right) = 1.2 \text{ 및}$$

$$\left(\frac{\text{Aribitol/mg. ribitol}}{\text{Alactose/mg. lactose}} \right) = 2.09$$

결과 및 고찰

Feeding 실험

분만 후 7일째 우유를 짜서 *myo*-Inositol을 G.L.C로 정량하였다. 사료는 각각 다른 양의 *myo*-Inositol을 함유한 사료를 수정을 시킨날부터 계속해서 먹었으며 어미쥐와 새끼쥐는 실험 중 정상적이었다. 각 짝마다 두마리의 쥐로 구성되었으며 우유는 두마리분을 합쳐 시료로 사용하였다. *myo*-Inositol의 정량결과는 (Table 1)과 같다. 이 Table 1에서 보듯 바와 같이 대부분의 우유 *myo*-Inositol (평균치

Table 1. Content of *myo*-Inositol in Rat Milk on Different Diets

Group	<i>Myo</i> -Inositol in Diet (mg/kg diet)	<i>Myo</i> -Inositol (mg/100g milk)		
Control (Lab Chow)	510*	84.7	61.3	91.7
A	40	13.4	13.1	15.1
B	200	—	21	28.6
C	400	—	65	66
Inositol-free	0	9.1	10.5	11.6

*Lab Chow has no free inositol; its inositol content is in the form of inositol phosphatide.

85%)은 사료에서부터 유래된 것으로 판명되었으며 Inositol-free diet群에서 얻은 양(9.1-11.6mg/100g. milk)은 체내의 생합성반응에 의해 생성된 것으로 인정된다. Freinkel과 Dawson (13)은 germ-free 상태로 사육한 쥐가 *myo*-Inositol을 생성한 것을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 얻은 Inositol-free diet群의 *myo*-Inositol은 장내 세균에 의해 합성된 후 우유로 이동되었다고 볼 수 없고 체내에서 생성된 것으로 판명된다. 이것은 또한 mammary gland에서 *myo*-Inositol을 생합성하는 효소가 존재한다는 보고(14)에 의해서도 쉽게 이해할 수가 있다.

(¹⁴C)-glucose로부터 *myo*-Inositol 생성;

위의 사료실험결과 대부분의 우유 *myo*-Inositol은 사료에서 유래된 사실을 알았다. 한편 Inositol-free diet群에서도 *myo*-Inositol을 얻었으므로 실제로 glucose에서 *myo*-Inositol이 생성되는지 여부를 확인하기 위해 (¹⁴C)-glucose를 Lab. Chow diet群 쥐에 주사한 후 우유에서 분리한 *myo*-Inositol과 lactose의 방사능을 Appendix: Table A-1에서 기술한대로 측정하였다. 이 실험을 위하여 5群的 쥐에게 주사하고 각각의 쥐에서 시간별로 우유를 얻었다. 이 실험에서 이론적 근거는 (i) 만일 *myo*-Inositol의 합성이 체내에서 일어나지 않으면 방사능이 *myo*-Inositol에 나타나지 않을 것이고, (ii) 이 합성이 mammary gland 내에서 일어나면 방사능은 *myo*-Inositol과 lactose에 같은 비율로 나타날 것이며, (iii) 이 합성이 mammary gland 이외의 다른 기관이나 조직에서 합성된 후 우유로 이동된다면 *myo*-Inositol에 나타나는 방사능은 lactose의 방사능 보다 느리게 나타난다는 점이다. (Fig.2)

와 Appendix: Table A-2에서 보는 바와 같이 실험결과 *myo*-Inositol의 방사능은 lactose의 방사능과 비슷하게 주사 후 1시간 이내에 최고치에 달하였다. 이 결과는 *myo*-Inositol은 mammary gland에서 glucose로부터 생성되어 우유로 분비되는 것을 시사해 준다.

우유 *myo*-Inositol의 유래;

위의 두 실험에 의해서 우유 *myo*-Inositol은 mammary gland에서 생성됨과 동시에 또한 많은 양이 사료에서 유래된 사실을 알았다.

이와 같이 서로 상반한 결과는 Dawson과 Freinkel(8), Nixon (15)에 의해서도 보고되었다. 따라

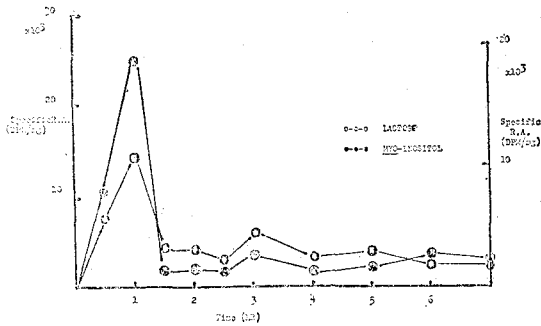


Fig. 2. Incorporation of Radioactivity of (^{14}C) -Glucose into Lactose and *Myo*-Inositol in Rat Milk

서 전술한 feeding 실험에서 대부분의 우유 *myo*-Inositol이 active transport에 의해 일어났다는 결과를 얻었으므로 이 active transport가 우유 *myo*-Inositol의 주공급원인지를 확인하기 위하여 D- $(\text{U-}^{14}\text{C})$ -glucose와 2- (^3H) -*myo*-Inositol을 실험방법에서 기술한데로(Appendix I: Table A-3, Table A-5) lactating rat에 8시간동안 피하주사를, 분만 후 7제일째에 행하고 우유와 혈액을 취하여 *myo*-Inositol과 glucose의 방사능을 측정하였다. (Fig. 3-a) 및 (Fig.3-b)와 Appendix I: Table A-4, Table A-6은 이 실험결과를 보여 준다. 즉 우유 *myo*-Inositol에 나타난 방사능은 (^3H) -*myo*-Inositol을 주사하였을 경우가 (^{14}C) -glucose를 주사했을 때 보다 훨씬 많이 나타난 현상은 우유 *myo*-Inositol의 대부분은 혈액에서 active transport에 의해 유래된다는 것을 의미하는 것으로 위의 feeding 실험과 서로 일치되는 결과로 나타났다.

(^{14}C) -glucose를 주사했을 때 주사 후 1시간(Fig. 2 참조) 즉 (^{14}C) -glucose를 한번 주사했을 때 *myo*-Inositol의 방사능이 최고에 달한 시간에 있어서 *myo*-Inositol의 比放射能은 혈액 glucose 比放射能의 4%였고 4시간 후엔 8%에 달하였다. 반면 (^3H) -*myo*-Inositol을 주사하였을 경우는 주사 후 6시간에 우유 *myo*-Inositol 比放射能은 혈액 *myo*-Inositol 比放射能의 26%에 달하였다.

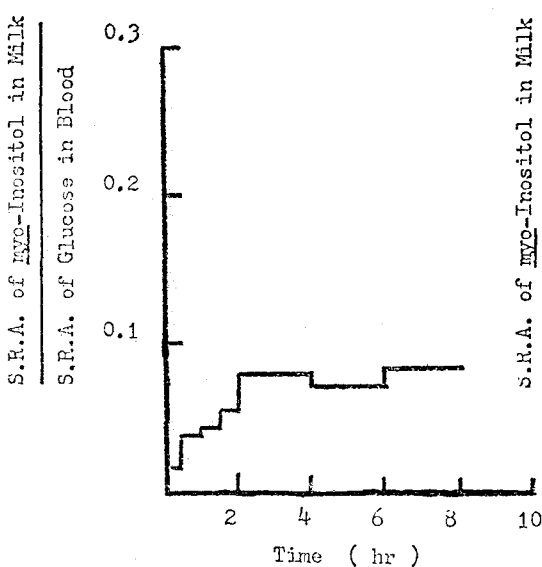


Fig. 3-a: The Ratio of the Specific Radioactivity of *Myo*-Inositol in Milk to the Specific Radioactivity of Blood Plasma Glucose During Injection as a Function of Time from the Beginning of (^{14}C) -Glucose Injection.

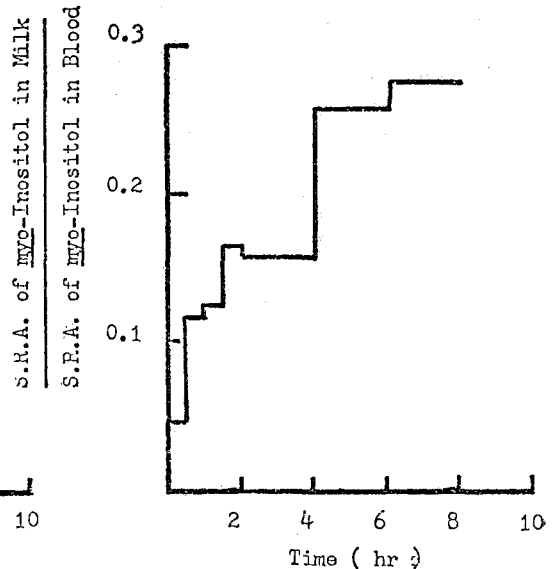


Fig. 3-b: The Ratio of the Specific Radioactivity of *Myo*-Inositol in Milk to the Specific Radioactivity of Blood Plasma *Myo*-Inositol During Injection as a Function of Time, from the Beginning of (^3H) -*Myo*-Inositol Injection.

이러한 일련의 실험결과로서 우유 *myo*-Inositol의 대부분은 사료에서 유래되며 *myo*-Inositol-1-phosphate lyase에 의한 *myo*-Inositol 생성은 소극적으로 기여한다는 것을 알 수 있다. 그러나 Middleton과 Setchell (16)은 ram testis 경우 이 효소의 작용에 의하여 glucose에서 대부분의 *myo*-Inositol이 생성된 것을 보고하였다. 한편 이 효소의 역가는 testis 것이 mammary gland 것보다 굉장히 높은 것을 Eisenberg와 Bolden(17)이 관찰한 사실로 보아 쉽게 이해할 수 있다.

끝으로 다자란 쥐는 보통 *myo*-Inositol을 생장요구요소로 diet에서 요구하지 않는 것을 볼 때 이를 합성하는 효소에 의하여 체내에서 생성된 양으로 충분히 그 생리적 역할을 수행하지만 우유 *myo*-Inositol의 대부분을 사료에서 얻는 것은 새끼 쥐는 이 효소의 작용이 활발치 못하거나 또는 생장에 *myo*-Inositol을 많이 요구하게 되므로서 이를 충분히 공급해 주기 위한 것이 아닌가 생각되는 것으로 어린 쥐의 *myo*-Inositol 생합성 능력을 검토해 볼 필요가 있는 것으로 판단한다.

요 약

우유중에 상당량 존재하는 *myo*-Inositol의 생성을 알아보기 위하여 3% SE-52를 충전시킨 gas-liquid chromatography에 의해 *myo*-Inositol의 정량을 행하고 이 *myo*-Inositol의 유래를 feeding 실험과 (¹⁴C)-glucose와 (3H)-*myo*-Inositol을 쥐에 주사한 실험으로 알아 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 쥐우유를 G.L.C. 방법으로 분석하여 우유 100 gm.당 61-91mg.의 *myo*-Inositol (free)을 얻었다.
2. Feeding 실험 결과 우유 *myo*-Inositol의 85%는 diet에서 흡수되었고 나머지는 mammary gland에서 합성된 것으로 나타났다.
3. (¹⁴C)-glucose에서 (¹⁴C)-*myo*-Inositol 생성은 lactose의 생성과 비슷하게 한시간이내에 최고에 달하였다.
4. (3H)-*myo*-Inositol을 lactating rat에 주사하여 실험한 결과 우유 *myo*-Inositol의 대부분은 혈액 *myo*-Inositol에서 유래되었다. (¹⁴C)-glucose를 주사한 후 우유중에 나타난 *myo*-Inositol의 比放射能은 4시간 후에 혈액 glucose의 8%였다.

Appendix I:

Table A-1, Milking Schedule After (¹⁴C)-Glucose Injection. 1.5 ml. of (¹⁴C)-glucose (U) (10 mM, 3.56x 10⁷ DPM) in 0.9% saline solution was injected intraperitoneally into each lactating female on seventh day after parturition. Each group has two rats.

Milking time	Time interval (hr)	Group				
		A	B	C	D	E
9:00 AM	0	R	R	R	R	R
9:30	0-0.5	M _R				
10:00	0.5-1.0		M _R			
10:30	1.0-1.5			M _R		
11:00	1.5-2.0				M _R	
11:30	2.0-2.5					M _R
12:00	2.5-3.0	M _L				
1:00 PM	3.0-4.0		M _L			
2:00	4.0-5.0			M _L		
3:00	5.0-6.0				M _L	
4:00	6.0-7.0					M _L

R: (¹⁴C)-glucose injected

M_R: milked from the right-hand side nipples of 2 rats.

M_L: milked from the left hand side nipples of 2 rats.

Appendix I continued:

Table. A-2: Specific Radioactivity of *myo*-Inositol and Lactose in Milk

Time Interval (hour)	<i>myo</i> -Inositol (mg/g milk)	Lactose (mg/g milk)	Radioactivity		Specific Radioactivity	
			<i>myo</i> -Inositol (DPM/g milk)	Lactose (DPM/g milk)	<i>myo</i> -Inositol (DPM/mg)	Lactose (DPM/mg)
0-0.5	0.818	22.07	8.5×10^3	15.3×10^4	10.39×10^3	6.93×10^3
0.5-1.0	0.798	20.57	21.6	28.5	27.06	13.86
1.0-1.5	0.632	24.10	1	8.52	1.53	3.34
1.5-2.0	0.692	19.22	1.25	5.69	1.81	2.96
2.0-2.5	0.862	30.21	1.0	4.52	1.16	1.50
2.5-3.0	0.431	17.68	1.75	10.3	4.06	5.83
3.0-4.0	0.569	19.65	0.75	4.31	1.32	2.19
4.0-5.0	0.542	19.79	1.13	5.23	2.18	3.47
5.0-6.0	0.564	20.86	2.63	5.46	4.66	2.62
6.0-7.0	0.699	19.06	1.88	1.94	2.69	1.02

Appendix I continued:

Table. A-3: Milking Schedule After (^{14}C)-Glucose Injection. 1 ml. of (^{14}C)-glucose (10 mM, 1.75×10^7 DPM) in 0.9% saline solution was injected intraperitoneally each time.

(hr)		Rat							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	9:00 AM	R	R	R	R	R	R	R	M,B
0.5	0:30	M,B	R	R	R	R	R	R	
1.0	10:00		M,B	R	R	R	R	R	
1.5	10:30			M,B	R	R	R	R	
2.0	11:00				M,B	R	R	R	
	12:30					R	R	R	
4.0	1:00 PM					M,B	R	R	
	2:30						R	R	
6.0	3:30						M,B	R	
	4:30							R	
8.0	5:00							M,B	

R: (^{14}C) glucose injected

M: milking was taken place

B: Blood was taken

Appendix I continued:

Table. A-4: Specific Radioactivity of *myo*-Inositol in Milk and that of Glucose in Blood After (^{14}C)-Glucose Injection

Rat	Time (hr)	<i>myo</i> -Inositol (mg/g milk)	SRA (DPM/mg <i>myo</i> - Inositol) in Milk	Glucose (mg/ml Blood)	SRA (DPM/mg Glucose) in Blood	SRA of <i>myo</i> - Inositol in Milk
						SRA of Glucose in Blood
			$\times 10^4$		$\times 10^6$	
1	0.5	0.83	1.9	0.44	1.23	0.0154
2	1.0	0.716	3.6	0.56	0.96	0.0378
3	1.5	0.8	4.4	0.57	1.16	0.0381

4	2.0	0.772	5.93	0.52	1.08	0.0548
5	4.0	0.814	9.9	0.53	1.19	0.0810
6	6.0	0.81	9.27	0.49	1.32	0.0705
7	8.0	1.052	9.47	0.43	1.16	0.0816

SRA: Specific Radioactivity

Appendix I continued:

Table. A-5: Milking Schedule After (^3H)-*myo*-Inositol Injection. 1 ml. of ($2\text{-}^3\text{H}$)-*myo*-Inositol (10 mM, 1.47×10^7 DPM) in 0.9% saline solution injected intraperitoneally each time.

(hr)		Rat							
		11	12	13	14	15	16	17	18
0	9:00 AM	R	R	R	R	R	R	R	M,B
0.5	9:30	M,B	R	R	R	R	R	R	
1.0	10:00		M,B	R	R	R	R	R	
1.5	10:30			M,B	R	R	R	R	
2.0	11:00				M,B	R	R	R	
	12:30					R	R	R	
4.0	1:00 PM					M,B	R	R	
	2:30						R	R	
6.0	3:00						M,B	R	
	4:30							R	
8.0	5:00							M,B	

R: ($2\text{-}^3\text{H}$)-*myo*-Inositol injected

M: milking was taken place

B: blood was taken

Appendix I continued:

Table. A-6: Specific Radioactivity of *myo*-Inositol in Milk and that of *Myo*-Inositol in Blood After (^3H)-*myo*-Inositol Injection

Rat No.	Time (hr)	<i>myo</i> -Inositol (mg/g Milk)	SRA (DPM/mg <i>myo</i> -Inositol in Milk) $\times 10^4$	<i>myo</i> -Inositol (mg/ml Blood)	SRA (DPM/mg <i>myo</i> -Inositol in Blood) $\times 10^5$	RRA of <i>myo</i> -Inositol in Milk
						SRA of <i>myo</i> -Inositol in Blood
11	0.5	0.817	2.4	0.044	5.23	0.046
12	1.0	0.542	7.52	0.03	6.32	0.119
13	1.5	0.717	7.98	0.038	6.38	0.125
14	2.0	0.665	9.2	0.029	5.55	0.166
15	4.0	0.802	10.3	0.03	6.49	0.159
16	6.0	0.754	18.1	0.032	6.99	0.259
17	8.0	0.765	17.8	0.031	6.46	0.276

SRA: Specific Radioactivity

Appendix II

Table. A-7: Special Diets

	(g)	% by Weight
Vitamin free casein	400	20
Sucrose	740	37
Cellulose	540	27
Fat (Crisco*)	200	10
Salt mixture	80	4
Vitamin mixture	40	2
	2kg	100%

Sucrose; Ground reagent grade Sucrose

Fat; Crisco

Casein: Nutritional Biochemicals Corp.

Cellulose; Nutritional Biochemicals Corp.

Salt (Mixture XIV) Nutritional Biochemicals Corp.

*Crisco; Possible maximum *myo*-Inositol content was found less than 0.0006% on the basis of phosphate content of Crisco.

Appendix II continued:

Table A-8: Vitamin Mixture

	<i>myo</i> -Inositol Ration (mg)	<i>myo</i> -Inositol Free (mg)
Thiamine HCl	25	25
Riboflavin	50	50
Pyridoxine HCl	25	25
Calcium panthothenate	250	250
Niacin	100	100
<i>myo</i> -Inositol	200*	—
Choline chloride	500	500
Folic acid	1	1
p-Aminobenzoic acid	50	50
2-Methyl-1, 4-naphtoquinone	25	25
B ₁₂	4	4
A	5	5
D	20	20
E	2	2
	1258.5mg	1058.5mg
Sucrose	98.75g	98.74g
Total	100g	100g

* Amount of *myo*-Inositol varies with rations as follows:

Appendix II.

Table. A-8: continued:

Ration	<i>myo</i> -Inositol mg/kg diet	<i>myo</i> -Inositol added in Vitamin Mixture mg.	Sucrose added
Group A	40	200	98.75
B	200	1000	97.94
C	400	2000	96.94

ControlPurina laboratory Chow. (510mg Inositol phosphatide/kg(diet).

Group A40mg *myo*-Inositol/kg diet.

B200mg *myo*-Inositol/kg diet.

C400mg *myo*-Inositol/kg diet.

Inositol freeno *myo*-Inositol.

인 용 문 헌

1. Setchell, B. P., R.M.C. Dawson, and R. W. White, J. Reprod. Fert., **17**, 219 (1998)
2. Mann, T., Proc. Royal Soc. Bull., **142**, 21 (1954)
3. Ahluwalia, B.S. and E.F. Graham, J. Reprod. Fert., **12**, 359 (1966)
4. Clark, J. B. K., E. F. Graham, B. A. Lewis, and F. Smith, J. Reprod. Fert., **13**, 189 (1967)
5. Meyer, A.E., Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., **62**, 111 (1946)
6. Hauser, G. and V. N. Finelli, J. Biol. Chem., **238**, 3224 (1963)
7. Kojima, Y., and H. Kusakabe, J. Sci. Res. Inst., Tokyo, **48**, 121, 284 (1954)
8. Dawson, R.M.C., and N. Freinkel, Biochem. J., **78**, 606 (1961)
9. Eisenberg, F. Jr., A. H. Bolden, and F. A. Loewus, Biochem. Biophys. Res. Comm., **17**, 521 (1964)
10. Barnett, J.E.G., and D.L. Corina, Biochem. J., **108**, 125 (1968)
11. Byun, S. M., R. Jenness, W. P. Ridley, and S. Kirkwood, Biochem. Biophys. Res. Comm., **54**, 961 (1973)
12. Bray, G. A., Anal. Biochem., **1**, 279 (1960)
13. Freinkel, N. and R.M. C. Dawson, Biochem. J., **81**, 250 (1961)
14. Byun, S. M., R. Jenness, W. P. Ridley, and

- S. Kirkwood, Biochem. Biophys. Res. Comm.,
54, 961 (1973)
15. Nixon, D. A., J. of Physiol., 120, 27p (19
53)
16. Middleton, A. and B.P. Setchell, J. Reprod.
Fert., 30, 473 (1972)
17. Eisenberg, F. Jr. and A.H. Bolden, Biochem.
Biophys. Res. Comm., 12, 72 (1963)