

# 肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質에 관한 研究

## V. 잉어 體表粘液內 殺蟲性物質의 化學的 性狀

全北大學校 獸醫寄生蟲學教室

李 宰 求 · 李 相 福

忠南大學校 藥學科

安 丙 浚

### 緒 論

일찍이 田(1964c)은 잉어, 붕어 등의 體表面 粘液內에 肝吸蟲을 죽일 수 있는 物質이 있다는 事實을 生物學的으로 立證한 바 있으며 最近에 이르러 著者 등은 붕어, 잉어, 금붕어, 메기, 가물치 및 이스라엘잉어(香魚) 등의 體表面 粘液 에테르抽出物로부터 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質을 分劃하였다(李 등, 1979, 1980a & 1983b).

이번에 著者 등은 淡水魚類 體表面 粘液內의 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質 糾明에 관한 研究의 一環으로 잉어 體表面 粘液의 에테르抽出物로부터 보다 純粹한 分劃物質을 얻어 이에 대한 化學分析을 試圖하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 1. 잉어 體表粘液의 에테르抽出

1982年 3月부터 7月 사이에 잉어(*Cyprinus carpio*) 5~10kg씩을 10회에 걸쳐 裡里市內 商人으로부터 구입, 實驗室로 옮겨 表皮와 眞皮단을 剝離하여 에테르에 24시간 浸漬시킨 다음 이를 減壓 濃縮시킨 抽出物(以下 에테르抽出物이라 略함)을 5°C의 冷藏庫에 保管·使用하였다.

#### 2. 에테르抽出物의 分劃

컬립크로마토그래피: 直徑 3cm, 높이 45cm의 컬럼에 100g의 실리카 겔(Merck製, Art. 7733, 粒子크기 0.2~0.5mm, 35~70메쉬)을 벤젠과 混合, 充填시킨 다음 1회에 약 15g의 에테르抽出物 또는 第四分劃段階의 에테르抽出物을 넣어 약 300ml의 벤젠을 流速 약 60滴/分으로 흘러 보내면서 溶出液 2~3ml씩을 한 分劃으로 모았다.

薄膜크로마토그래피: 실리카 겔(Merck製, TLC用, Art. 7730, Type 60)을 蒸溜水로 混合, 20×20cm의 유리판에 0.25mm 두께로 塗布하여 24시간 熟成시킨 다

음 110°C에서 1시간 정도 活性化시켜 사용하였다. 展開溶媒는 各 分劃段階에 따라 石油에테르/클로로포름: 30/70 및 벤젠/아세톤: 90/10의 混合溶媒를 사용하여 약 15cm 높이까지 展開시킨 다음 室溫에서 乾燥시켜 요오드 發色槽에 넣어 斑點을 發色시켰다.

最終分劃段階에서 分劃物質의 純粹성은 실리카 겔이 塗布되어 있는 플라스틱판(Merck製, Art. 5735, 25 Folien 20×20cm)에 物質을 적은 다음 展開溶媒로서 前段階의 混合溶媒 以外에 石油에테르/아세톤: 90/10, 石油에테르/에테르: 90/10 및 四鹽化炭素/아세톤: 90/10 등의 混合溶媒를 사용하여 15cm 높이까지 展開, 室溫에서 乾燥시켜 요오드 發色槽에 넣어 單一斑點으로 이를 確認하였다.

#### 3. 各分劃段階別 分劃物質의 殺蟲試驗

1982年 7月 金海 湖水에서 採集한 왜우렁(*Parafossarulus manchouricus*)으로부터 自然 遊出法으로 遊出시킨 直後의 有尾幼蟲을 사용하였다. 純粹한 殺蟲性物質을 索出하기 위하여 各分劃段階에서 얻은 各 分劃物質의 에테르 100倍 稀釋液 1ml(10mg)를 시계접시에 取하여 溶媒를 蒸發시키고 여기에 20마리 以上の 幼蟲이 遊泳하고 있는 常水 0.5ml를 注加하여 幼蟲이 完全히 죽을 때까지의 時間을 實體顯微鏡下에서 觀察하였으며 이 試驗을 3反復하였다. 對照로서 20마리 以上の 幼蟲이 遊泳하고 있는 常水 0.5ml만을 取하여 觀察하였다.

#### 4. 最純分劃 殺蟲性物質의 殺蟲試驗

前述한 有尾幼蟲과 1982年 7月 金海 湖水에서 採集한 참붕어(*Pseudorasbora parva*)를 人工胃液으로 處理하여 分離한 被囊幼蟲을 人工腸液으로 脫囊시킨 다음 사용하였다. 最終分劃物質의 에테르 100倍 稀釋液 1ml(10mg)를 시계접시에 取하여 溶媒를 蒸發시키고 여기에 20마리 以上の 有尾幼蟲이 遊泳하고 있는 常水 0.5ml를, 그리고 30마리 以上の 脫囊幼蟲과 生理食鹽水 0.5ml를 各各 넣어 幼蟲들이 完全히 죽을 때까지 實體顯微鏡下에서 觀察하였다.

成蟲은 참붕어를 人工胃液으로 處理하여 얻은 被囊

幼蟲을 家兎에 感染시켜 2個月後에 그 膽管으로부터 얻은 것을 사용하였으며, 最終分劃物質의 에테르 100배 稀釋液 1ml(10mg)를 시계 접시에 取하여 溶媒를 蒸發시키고 여기에 10마리의 成蟲과 生理食鹽水 0.5ml를 넣어 成蟲이 完全히 죽을 때까지 實體顯微鏡下에서 觀察하였다. 이들 試驗을 3反復하였다.

對照로서 20마리의 有尾幼蟲이 遊泳하고 있는 常水 0.5ml 그리고 30마리 以上の 脫囊幼蟲과 10마리의 成蟲에 各各 生理食鹽水 0.5ml를 넣어 觀察하였다.

그리고, 肝吸蟲의 幼蟲과 成蟲이 거의 죽을 때 2ml의 常水 또는 生理食鹽水를 시계 접시에 注加하며 運動性 與否로 生死를 判定하였다.

5. 最終分劃 殺蟲性物質의 化學的 分析

赤外線 分光分析: Beckman spectrophotometer를 사용하여 溶媒를 사용치 않고 試料 自體를 AgBr-window

에 塗布하여 필름層을 만들어 波長 4,000~600cm<sup>-1</sup>, 速度 300cm<sup>-1</sup>/min, Gain 1.5, Period 1 sec, Slit width 0.33mm의 條件下에서 測定하였다(Rao, 1963, Colthup et al., 1975).

核磁氣共鳴 分光分析: Varian 60T NMR spectrophotometer를 사용하여 測定範圍 0~8ppm, Spectrum amplitude 25, Sweep time 250 sec, Sweep width 500 Hz, Filter 2, Solvent CDCl<sub>3</sub>의 條件下에서 測定하였다(Günther, 1980).

結 果

1. 殺蟲性物質 分劃

잉어의 에테르抽出物로부터 殺蟲性物質의 分劃過程은 Fig. 1에 表示한 바와 같다. 즉, 第一段階로서 3kg

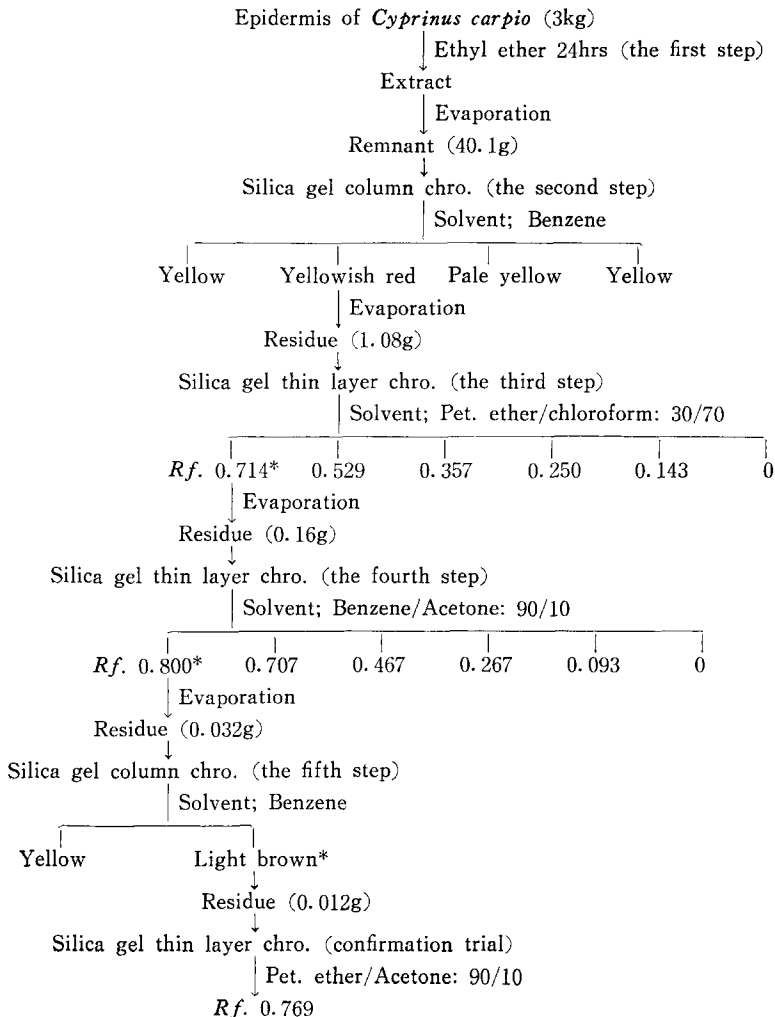


Fig. 1. Fractionation method of clonorchicidal substance from *Cyprinus carpio*  
\*: Clonorchicidal activity

의 잉어로부터 얻은 에테르抽出物을 벤젠을 溶媒로 使用하여 第二段階로서 킨텀크로마토그래피한 바 4個의 分割으로 나누어졌는데 그 중 第二分割(赤黄色部分)에서 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 強力하였으므로 第三段階로서 이를 다시 濃縮시켜 石油에테르/클로로포름 : 30/70의 混合溶媒를 사용하여 薄膜크로마토그래피하였다.

그 結果 6個斑點으로 分割되었는데 그 중 第一斑點(Rf. 0.714)에서 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 가장 強力하였으므로 第四段階로서 이 物質의 純粹性を 確認하기 위하여 다시 벤젠/아세톤 : 90/10의 混合溶媒로 薄膜크로마토그래피한 바 다시 6個斑點으로 分割되었다. 그 중 第一斑點(Rf. 0.800)에서 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 強力하였으므로 第五段階로서 이를 다시 集量, 濃縮하여 킨텀크로마토그래피한 바 2個分割으로 나누어졌다. 그 중 第二分割(淡褐色部分)에서 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 強力하였으므로 이를 前述한 混合溶媒 등으로 單一物質인가를 確認한 結果 一個斑點(Rf. 0.769)으로 分割되어 이를 最終分割 殺蟲性物質로 하였으며 이 最終物質의 量은 0.012g이었다.

2. 第二段階 分割物質의 殺蟲試驗

잉어의 體表粘液 에테르抽出物을 第二段階로서 벤젠을 溶媒로 사용하여 킨텀크로마토그래피하여 얻은 各 分割物質의 有尾幼蟲에 대한 殺蟲時間을 觀察한 結果는 Table 1에 表示한 바와 같다. 즉, 잉어 體表粘液 에테르抽出物은 4個로 分割되었는데 그 중 幼蟲에 대한

Table 1. Time required for killing cercaria in the second step fractions from epidermal mucus Solvent; Benzene

Fractions Colour	First Yellow	Second Yellowish red	Third Pale yellow	Fourth Yellow
Time for wormicide	>500	125	>24 hrs	>24 hrs

殺蟲力이 가장 強力한 것은 第二分割으로서 125分/10mg에 죽었으며 이 分割物質을 大量 集量하기 위하여 上述한 킨텀크로마토그래피를 반복하였다.

3. 第三段階 分割物質의 殺蟲試驗

킨텀크로마토그래피하여 얻은 殺蟲力이 가장 強力한 第二分割物質로부터 더욱 純粹한 殺蟲性物質을 찾아내기 위하여 第三段階로서 石油에테르/클로로포름 : 30/70의 混合溶媒를 사용하여 薄膜크로마토그래피하여 얻은 分割物質別 殺蟲試驗을 遂行한 結果는 Table 2에 表示한 바와 같다. 즉, 6個斑點으로 分割되었는데 그 중 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 가장 強力한 것은 第一斑點으로서 80分/10mg에 죽었으며 이 殺蟲性斑點을 大量으로 集量하기 위하여 上述한 薄膜크로마토그래피를 반복하였다.

4. 第四 및 五段階 分割物質의 殺蟲試驗

薄膜크로마토그래피에서의 第一斑點(Rf. 0.714)을 第四段階로서 다시 벤젠/아세톤 : 90/10의 混合溶媒로

Table 2. Time required for killing cercaria in the third step spots from epidermal mucus

Spot Rf. value	First 0.714	Second 0.529	Third 0.357	Fourth 0.250	Fifth 0.143	Sixth 0
Time for wormicide	80	160	200	200	220	130

薄膜크로마토그래피한 바 6個斑點으로 分割되었는데 그 중 第一斑點(Rf. 0.800)에서 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 가장 強力하였으므로 이를 再確認하기 위하여 같은 溶媒로 다시 薄膜크로마토그래피한 바 第一斑點에서 역시 같은 殺蟲力이 觀察되었다 (54分/10mg에 죽음).

上記 物質(Rf. 0.800)의 純粹性を 確認하기 위하여 石油에테르/아세톤 : 90/10의 混合溶媒로 薄膜크로마토그래피한 바 單一物質이 아니었으므로 이를 다시 純粹

Table 3. Time required for killing Clonorchis in the final fraction from epidermal mucus

Time for wormicide	Cercaria	Excysted metacercaria	Adult
Final wormicidal substance	26	115	443
Control	>200	>600	>24 hrs

하게 集量하기 위해서 第五段階로서 벤젠을 溶媒로 사용하여 킨텀크로마토그래피하였다. 이리하여 얻은 2個 分割物質의 有尾幼蟲에 대한 殺蟲效果를 檢討한 結

Table 4. Purification of clonorchicidal substance from Cyprinus carpio

Steps	Total amount* (mg)	Specific activity** (Min./10mg dry weight)	Purity (-fold)	Yield (%)
1	40,100	378	1	100
2	1,080	125	3	2.70
3	160	80	5	0.40
4	32	54	7	0.08
5	12	26	15	0.03

\*; Clonorchicidal activity

\*\*; Time(Min.) required to kill cercaria

果 第二分割(淡褐色部分)에서 殺蟲效果가 認定되었으므로 이 物質을 前述한 方法으로 確認한 다음 最終分割 殺蟲物質로 確定하였다.

5. 最終分割 殺蟲性物質의 殺蟲試驗

前述한 바와 같이, 複雜한 分割段階를 거쳐 最終적으로 分離된 殺蟲性物質의 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 대한 殺蟲所要時間은 Table 3에 表示한 바와 같이 有尾幼蟲 26分, 脫囊幼蟲 115分 그리고 成蟲 443分이었다.

그리고, 以上の 모든 殺蟲試驗에 있어서 對照로서 使用한 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲의 生存時間은 各 各 200分, 600分 및 24時間 以上이었다.

6. 各段階別 殺蟲性物質의 精製度 및 收率

各段階別 殺蟲性物質의 精製度 및 收率は Table 4에 表示한 바와 같이 잉어 體表粘液 에테르抽出物 40.1g 으로부터 最終分割段階에서 12mg이 回收되었으며 그 收率は 0.03%, 그 精製度は 15倍이었다.

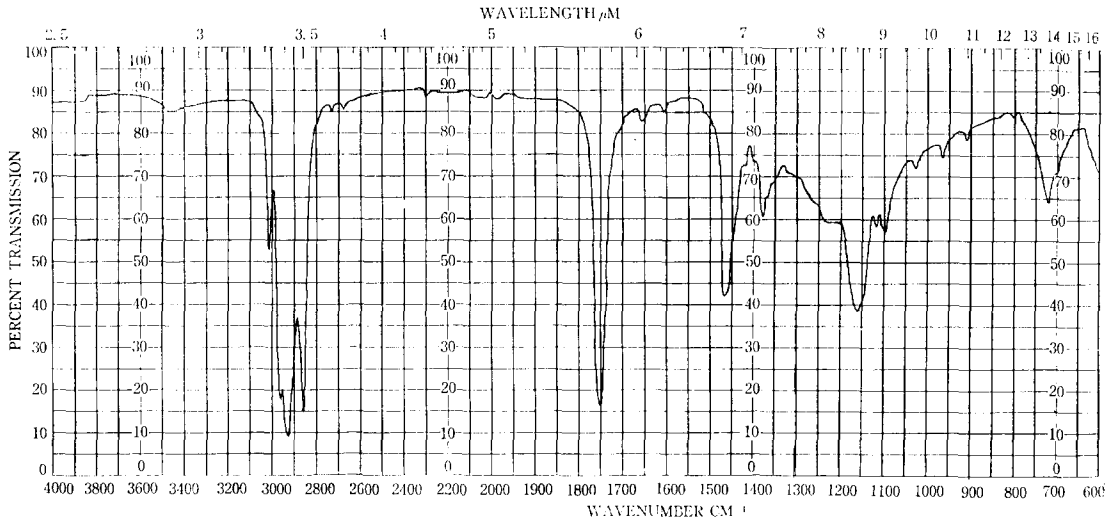


Fig. 2. IR-spectrum of the final clonorchicidal substance of *Cyprinus carpio*

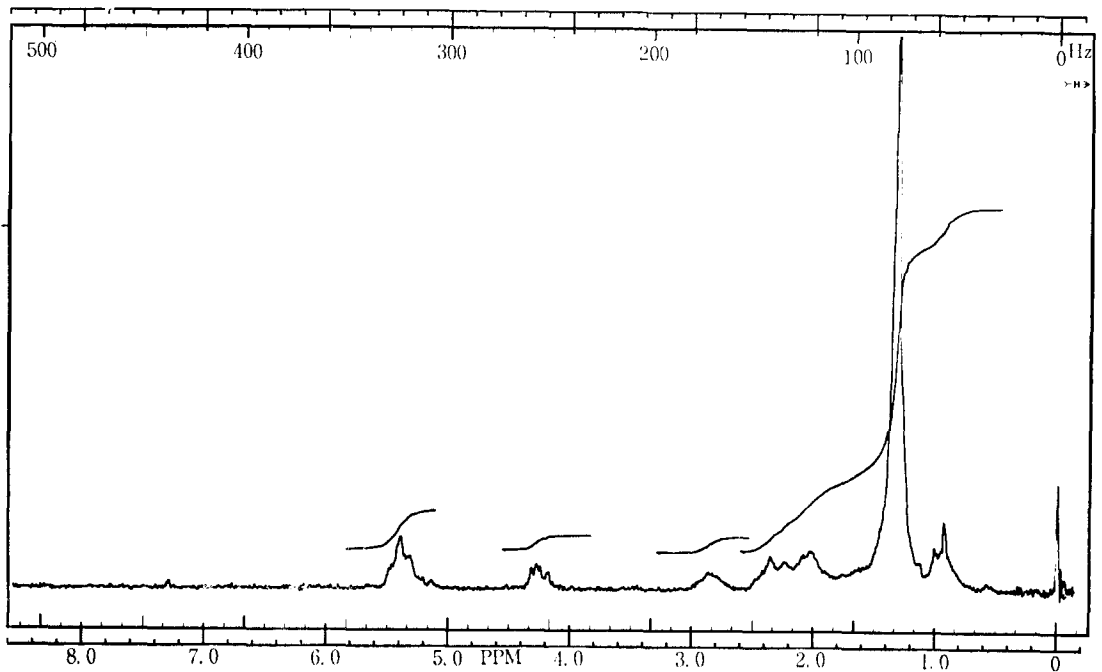


Fig. 3. NMR spectrum of the final clonorchicidal substance from *Cyprinus carpio*

7. 最終分割 殺蟲性物質의 化學分析

赤外線 分光分析: 赤外線 分光分析 結果는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 -OH基, -NH基 및 芳香族基가 없는 것을 알 수 있다. 3,017cm<sup>-1</sup>에 alkene의 C-H stretching absorption(peak)이 있으며 이는 1,655cm<sup>-1</sup>의 작은 peak를 보아서도 알 수 있다. 3,000~2,800cm<sup>-1</sup>사이에 alkane C-H stretching absorption을 볼 수 있으며 이의 存在는 1,470cm<sup>-1</sup> 및 1,380cm<sup>-1</sup>의 peak를 보고 確認 할 수 있다. 1,750cm<sup>-1</sup>의 強한 absorption은 carbonyl 基에 緣由하며 1,160cm<sup>-1</sup>의 peak와 聯關되는 것으로서 이는 ester carbonyl group인 것으로 생각된다. 그리고, 720cm<sup>-1</sup>의 peak는 적어도 4個의 methylene group이 連續的으로 結合되어 있는 것을 意味한다(Rao, 1963; Colthup et al., 1975).

核磁氣共鳴 分光分析: 核磁氣共鳴 分光分析 結果는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 芳香族基는 역시 存在하지 않은 것을 알 수 있다. 赤外線 分光分析에서 確認한 바와 같이 5.4ppm의 multiplett는 alkene의 H를 나타내며 1.35ppm의 큰 peak는 飽和 alkene의 H에 해당된다. 1.9~2.4ppm 사이의 multiplett는 carbonyl基 또는 double bond(alkene)에 隣接한 methylene group에, 4.23ppm의 quadraplett와 0.9ppm의 triplett는 ethyl group에 해당되며, 4.23ppm의 chemical shift로 보아 이는 O에 結合된 methylene group이므로 ethoxy group 이 存在한다. 2.8ppm peak의 크기는 4.23ppm의 methylene peak 크기와 같으므로 2個의 H가 있으며 그 chemical shift로 보아 2個의 double bond사이에 있는 methylene group인 것으로 생각된다. 4.23ppm의 peak는 methylene group이므로 이 peak의 크기는 2個의 H에 해당된다. 또한, 5.4ppm peak의 크기는 대략 4.23 ppm peak의 2배에 해당되므로 4個의 alkene-H가 있다고 볼 수 있다. 1.9~2.4ppm의 multiplett 크기는 4.23 ppm peak의 3배이므로 6個의 H가 있으며 1.35ppm의 peak는 4.23ppm peak의 12배이므로 24個의 H가 있다(Günther, 1980).

考 察

同一水系에 棲息하고 있는 淡水魚類라 하더라도 그 種類에 따라 肝吸蟲 被囊幼蟲의 檢出이 不可能한 것이 있는가 하면 多數의 被囊幼蟲이 寄生하고 있는 것도 있다. 그리고, 魚體內에 있어서 被囊幼蟲의 感染度와 그 壽命이 현저하게 다르다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.

즉, 田(1964a)은 우리나라에서 肝吸蟲 流行地로서 널리 알려진 여러 地域에서 744마리의 붕어를 채집하여 人工胃液으로 消化시켜 檢査하였으나 *Metorchis orientalis*를 비롯한 그밖에 吸蟲類의 被囊幼蟲만이 檢出되었다고 報告하였다.

最近에 이르러 李 등(1983c)은 萬頃江, 流域水系에서

채집한 60마리의 붕어에서는 肝吸蟲 被囊幼蟲을 전혀 檢出하지 못하였는데 반하여 참붕어에서는 31마리 중 30마리(97%)로부터 그 被囊幼蟲을 檢出하였으며, 魚體重 1g當 平均被囊幼蟲數를 計數한 바 참붕어 20.9, 왜물개 8.2, 돌고기 1.53, 줄물개 1.47, 버들매치 1.46, 흰줄납줄개 1.29, 버들치 0.83, 치리 0.76 등이라고 報告하였다.

李(1973)는 참붕어, 큰납지리 및 묵납자루에 肝吸蟲 有尾幼蟲을 人工感染시켜 被囊幼蟲의 變性死滅過程을 觀察한 바 참붕어 133日, 큰납지리 140日, 묵납자루 70일부터 變性死滅하기 시작하여 時日이 經過함에 따라 그 數가 증가되어 묵납자루 269日, 큰납지리 460日에 모두 變性死滅되었는데 반하여 770日의 참붕어에 있어서는 58個 중 2個만이 變性死滅되었을 뿐 나머지는 微弱한 運動性을 지니고 있었다. 그리고, 鈴木 및 小宮(1966)는 피라미에 있어서 30日後부터 被囊幼蟲이 變性死滅하기 시작하여 約 100日後에는 大部分이 死滅한다고 報告하였다.

한편, 肝吸蟲의 第二中間宿主에 대한 生態學的 知識을 解明하기 위한 機轉研究도 多樣하게 進行되고 있다. 일찌기 田(1964bc)은 붕어, 잉어, 금붕어 등에는 肝吸蟲 有尾幼蟲이 거의 侵入하지 못하며, 그 體表粘液內에는 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質이 포함되어 있다고 하였다. 李(1974)는 淡水産 26種 魚類의 表皮 및 眞皮를 組織學的으로 調査하고 특히 棍棒狀細胞의 分布狀況, 多寡有無, 核의 數 등을 詳細히 比較하였던 바 自然界에서 肝吸蟲 被囊幼蟲이 檢出되지 않는 미꾸리, 자가사리, 메기 등에서는 그 表皮가 大部分이 棍棒狀細胞로 되어 있는데 반하여 肝吸蟲의 適合한 第二中間宿主로 알려진 참붕어, 모래주사, 긴물개, 묵납자루, 치리, 모래무지 등에서는 이 細胞를 전혀 發見할 수 없었다. 그리고 잉어, 붕어와 같이 第二中間宿主로서 그다지 適合하지 않은 種類에서는 比較的 많은 數의 棍棒狀細胞를 觀察할 수 있었다. 이와 같은 事實로 미루어 보아 肝吸蟲 有尾幼蟲의 魚體內 侵入能力이 棍棒狀細胞의 多寡 또는 有無와 關聯된 것이 아닌가 推測케 한다고 하였다.

그 후 李 등(1979, 1980ab)은 붕어, 금붕어, 메기, 가물치, 잉어 등의 表皮 및 眞皮를 剝離하여 에테르에 浸漬시켜 그 體表粘液內에 含有되어 있는 物質을 抽出하여 石油에테르/클로로포름 : 30/70의 混合溶媒를 使用하여 けん錠 및 薄膜크로마토그래피하여 殺蟲性物質을 分割하고 붕어 粘液內에 포함되어 있는 殺蟲性物質이 季節的 變動을 함으로써 여름철에만 認定할 수 있는데 水溫과는 相關關係가 없다고 하였다. 最近에 이르러 Rhee et al. (1982) 및 李 등(1983ab)은 잉어의 한 變種인 이스라엘잉어(*Cyprinus carpio nudus*)에 대한 肝吸蟲 有尾幼蟲의 人工 및 自然感染試驗을 遂行한 바 一部 幼蟲은 魚體內로 侵入하였으나 그 大部分이 被囊치 못하고 被囊한 極少數도 48時間 以內에 完全히 죽었

으므로 自然界에서 肝吸蟲 第二中間宿主 役割을 할 수 없을 것이라고 報告하였다. 이의 機轉을 糾明하기 위한 一環으로 이스라엘어의 表皮를 에테르抽出한 다음 여러 단계의 剝離 및 薄膜크로마토그래피를 실시하여 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質을 純粹하게 分劃하였으며 또한 表皮를 組織學的으로 觀察하여 多數의 棍棒狀 細胞의 存在를 確認하였다.

田(1964c)은 잉어와 붕어의 體表粘液을 그대로 슬라이드그라스에 取한 다음 肝吸蟲 有尾幼蟲을 直接 接觸시켰던 바 6分 18秒와 7分 30秒에 죽었다고 報告하였다. 李 등(1980a)은 잉어와 붕어 體表粘液의 에테르抽出物을 石油에테르/클로로포름 : 30/70의 混合溶媒를 사용하여 薄膜크로마토그래피하여 *in vitro*에서 殺蟲性 第二斑點과 第一斑點을 肝吸蟲의 有尾幼蟲과 直接 接觸시킨 바 각각 28分과 26分에 죽었다고 報告하였으며, 李 등(1983b)은 이스라엘어의 體表粘液을 에테르로 抽出, 剝離크로마토그래피하여 殺蟲性物質을 分劃, 그 物質을 다시 薄膜크로마토그래피하여 얻은 第六斑點을 *in vitro*에서 肝吸蟲 有尾幼蟲과 直接 接觸시킨 바 5分에 死滅하였다고 報告하였다.

本 實驗에서 分劃된 最終殺蟲性物質의 肝吸蟲 有尾幼蟲, 脫囊幼蟲 및 成蟲에 대한 殺蟲時間은 각각 26分, 115分 및 443分이었던 바 有尾幼蟲에 있어서 田(1964c)이 報告한 잉어 6分 18秒, 李 등(1980a)이 報告한 잉어 28分 및 李 등(1983b)이 報告한 이스라엘어 5分 그리고 本 實驗에서의 26分과 比較 檢討할 것 같으면 李 등(1980a)의 성적과는 비슷하고 田(1964c) 및 李 등(1983b)의 성적보다는 길었는데 이는 本 實驗에 있어서의 여러 段階를 거쳐 最終적으로 分劃한 極少量의 殺蟲性物質 10mg을 사용하여 殺蟲試驗을 遂行하였기 때문이라고 생각된다.

이와 같이, 李 등(1979, 1980a, 1983b)이 붕어, 잉어, 가물치, 배기, 금붕어, 이스라엘어 등의 體表粘液으로 부터 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質을 分劃한 바 있는데 本 實驗에서는 그 殺蟲性物質의 化學構造를 把握하고자 一聯의 化學分析을 遂行하였다.

즉, infrared spectrum上에서는 -OH基, -NH基, 芳香族基 등을 確認할 수 없었으므로 이 物質의 構造에는 이들 基가 含有되어 있지 않다. Infrared spectrum에서 1,750cm<sup>-1</sup>의 carbonyl group과 1,160cm<sup>-1</sup>의 ester C-O stretching absorption과 聯關하여 생각하면 이 物質은 에스테르임을 알 수 있다(Rao, 1963; Colthup et al., 1975).

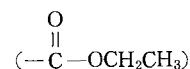
Nuclear magnetic resonance spectrum에 있어서 4.23 ppm의 peak와 0.9ppm의 peak는 ethoxy group에 해당되므로 이 物質은 어떤 酸의 ethyl ester임을 알 수 있다(Günther, 1980). 그리고, infrared spectrum上的 3,017cm<sup>-1</sup>과 1,655cm<sup>-1</sup>의 peak로 보아 이 에스테르는 double bond를 含有하고 있다. 더우기 nuclear magnetic resonance spectrum에 있어서 5.4ppm의 alkene-H

數가 4個이므로 2個의 double bond가 存在하는 것으로 생각되며(-CH=CH-.....-CH=CH-), infrared spectrum의 1,655cm<sup>-1</sup> peak로 보아 이 2個의 double bond는 서로 隣接하여 있지 않음을 알 수 있다.

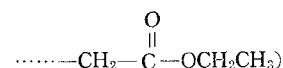
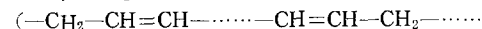
Nuclear magnetic resonance spectrum의 1.9~2.4 ppm 範圍에 있는 peak에는 6個의 H가 있으므로 이는 3個의 double bond에 隣接한 methylene group을 나타내며 2.8ppm에 나타나는 peak는 2個의 H에 해당되므로 이는 2個의 double bond 사이의 methylene group에 해당된다. 그리고, 1.35ppm peak의 모양으로 보아 直鎖의 alkane이 存在하며 더우기 그 크기로 보아서 24個의 H를 가지고 있으므로 이는 12個의 methylene group에 해당된다. 그러나, 末端에는 methyl group이 있어야 하므로 實際로는 11個의 methylene group이 存在한다.

그러므로, 이 物質에 관한 지금까지의 解析을 綜合하여 보면 다음과 같다.

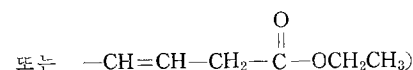
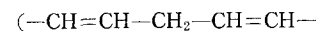
i. Ethyl ester group이 存在한다.



ii. 2個의 double bond에 隣接한 2個의 methylene group이 存在하고 carbonyl group에 隣接한 1個의 methylene group이 存在한다.



iii. 1個의 methylene group은 double bond사이 에 있다.



iv. Alkane의 直鎖는 CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-가 된다.

지금까지 言及한 方法 즉, 上述한 部分構造로부터 이 物質의 全體 構造를 確定할 수는 없으나 이 物質은 2個의 double bond를 含有하고 있는 不飽和脂肪酸의 ethyl ester인 것이 틀림없다.

앞으로, double bond의 位置設定이나 部分構造의 連結點을 確認하기 위하여는 더욱 詳細한 化學的인 研究가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

### 結 論

同一水系에 棲息하고 있는 淡水魚라 하더라도 그 種類에 따라 肝吸蟲 有尾幼蟲이 容易하게 侵入할 수 있는 것과 그렇지 않은 것으로 區別할 수 있고 또 魚體內에 있어서 被囊幼蟲 感染도와 그 壽命이 현저하게 다른데 이의 確實한 機轉에 대해서는 不明한 點이 많다.

最近에 이르러 우리나라에서 잉어와 붕어 등의 體表

粘液內的 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質이 分劃된 바 있는데 著者 등은 이 機轉을 闡明하기 위한 一環으로 잉어 體表粘液內에 含有되어 있는 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質을 分離하여 化學分析하였다.

1. 잉어 體表粘液的 에테르抽出物을 벤젠 溶媒를 사용하여 컬럼크로마토그래피한 바 4個로 分劃되었는데 이 4個分劃 중 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 가장 強力한 것은 第二分劃(赤黃色部分)으로 接觸 125分/10mg에 죽었다.

2. 이 赤黃色的 第二分劃으로부터 더욱 純粹한 殺蟲性物質을 얻기 위하여 石油에테르/클로로포름 : 30/70의 混合溶媒를 사용하여 薄膜크로마토그래피한 바 6個 斑點으로 分劃되었는데 이 중 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 가장 強力한 것은 第一斑點(Rf. 0.714)으로 接觸 80分/10mg에 죽었다.

3. 이 第一斑點(Rf. 0.714)物質을 벤젠/아세톤 : 90/10의 混合溶媒를 사용하여 薄膜크로마토그래피한 바 다시 6個 斑點으로 分劃되었는데 이 중에서 第一斑點(Rf. 0.800)이 有尾幼蟲에 대한 殺蟲力이 強力하여 接觸 54分/10mg에 죽었다.

4. 이 第一斑點(Rf. 0.800)物質을 벤젠을 溶媒로 사용하여 컬럼크로마토그래피한 바 二個物質로 分劃되었는데 有尾幼蟲에 대한 殺蟲效果를 檢討한 結果 第二分劃인 淡褐色部分에서 殺蟲力이 強力하였다.

5. 이 淡褐色 第二分劃物質(最終分劃 殺蟲性物質) 10mg을 사용하여 肝吸蟲에 대한 殺蟲時間을 觀察한 바 有尾幼蟲 26分, 脫囊幼蟲 115分 그리고 成蟲 443分에 完全 斃死하였다.

6. 以上과 같은 精製方法에 의하여 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質을 잉어 體表粘液 에테르 抽出物으로부터 10倍 精製하였으며 그 收率은 0.03%이었다.

7. 이 最終分劃 殺蟲性物質의 化學構造를 把握하기 위하여 赤外線 分光分析 및 核磁氣共鳴 分光分析 등의 化學分析을 試圖한 結果 이 物質에는 ethyl ester group 이 存在하고 2個의 double bond에 隣接한 2個의 methylene group 그리고 carbonyl group에 隣接한 1個의 methylene group이 存在하며 또한 1個의 methylene group은 double bond사이 에 있고 alkane의 直鎖는 CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>-가 된다. 이러한 部分構造로 보아 이 物質은 2個의 double bond, 15個의 methylene group 그리고 1個의 methyl group으로 構成된 不飽和脂肪酸의 ethyl ester로 判明되었다.

### 參 考 文 獻

田世圭(1964a) 肝吸蟲의 感染經路에 關한 實驗的 研究 第 I 篇. 淡水魚에 寄生하는 各種吸蟲의 被囊幼蟲 調查 및 肝吸蟲幼蟲의 魚體感染實驗. 釜山水產大學 研究報告, 6(1) : 1-14.

田世圭(1964b) 肝吸蟲의 感染經路에 關한 實驗的 研究 第 II 篇. 特許 肝吸蟲 cercaria의 淡水稚魚에 대한 感染試驗. 寄生蟲학잡지, 12(2) : 101-110.

田世圭(1964c) 肝吸蟲의 感染經路에 關한 實驗的 研究 第 III 篇. 各種魚類 體表面粘液物質의 肝吸蟲幼蟲에 대한 殺蟲效力. 寄生蟲학잡지, 2(3) : 11-22.

Colthup, N.B., Daly, L.H. and Wiberly, S.E. (1975) Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy: 410-411, Academic Press, New York.

Günther, H. (1980) NMR Spectroscopy. 46-62, Wiley & Sons, New York.

Rao, C.N.R. (1963) Chemical Application of Infrared Spectroscopy. 445-451, Academic Press, New York.

李宰求(1973) 肝吸蟲의 第二中間宿主에 關한 實驗的 研究. II. 참붕어, 묵납자루 및 큰납자루 體內에 있어서 肝吸蟲 被囊幼蟲의 運命에 關하여. 大韓獸醫學會誌, 13(2) : 147-160.

李宰求(1974) 肝吸蟲의 第二中間宿主에 關한 實驗的 研究. III. 淡水魚類表皮의 棍棒狀細胞와 肝吸蟲 被囊幼蟲의 感染度에 對하여. 寄生蟲학잡지, 12(2) : 101-110.

李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1979) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 關한 研究 I. 붕어粘液으로부터 殺蟲性物質 抽出試驗. 寄生蟲학잡지, 17(2) : 121-126.

李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1980a) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 關한 研究 II. 各種淡水魚類로부터 殺蟲性物質 抽出試驗. 寄生蟲학잡지, 18(1) : 98-104.

李宰求, 白秉杰, 安丙浚, 朴永竣(1980b) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 關한 研究. III. 붕어粘液으로부터 抽出한 殺蟲性物質의 季節的 變化. 寄生蟲학잡지, 18(2) : 179-184.

Rhee, J.K., Kim, P.G., Baek, B.K., Lee, S.B. and Ahn, B.Z. (1982) Clavate cells of epidermis in *Cyprinus carpio nudus* with reference to its defence activity to *Clonorchis sinensis*. Korean J. Parasit., 20(2) : 201-203.

李宰求, 金平吉, 白秉杰, 李相福, 安丙浚(1983a) 肝吸蟲의 이스라엘잉어(香魚)에 대한 感染實驗. 寄生蟲학잡지, 21(1) : 11-19.

李宰求, 金平吉, 白秉杰, 李相福, 安丙浚(1983b) 肝吸蟲에 대한 殺蟲性物質에 關한 研究 IV. 이스라엘잉어(香魚) 表皮粘液으로부터 殺蟲性物質 分劃. 寄生蟲학잡지, 21(1) : 21-25.

李宰求, 白秉杰, 李相福, 高弘范(1983c) 萬頃江流域에 있어서 肝吸蟲症의 疫學的 調查. 寄生蟲학잡지, 21(2) : 157-166.

鈴木了司, 小宮義孝(1966) 肝吸蟲第二中間宿主의 再檢討 (1) オイカワへの肝吸蟲 cercaria の感染. 寄生蟲學雜誌, 15(3) : 215-226.

=Abstract=

**The Wormicidal Substance of Fresh Water Fishes on *Clonorchis sinensis***

**V. Purification and Chemical Characterization of Clonorchicidal  
Substance from Epidermal Mucus of *Cyprinus carpio***

Jae Ku Rhee, Sang Bork Lee

*Dep. of Veterinary Medicine, Jeonbug National University, Jeonju 520, Korea*

and Byung Zun Ahn

*Dep. of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 300, Korea*

As a series of studies to clarify clonorchicidal substances in body surface mucus of some fresh-water fishes, the substance in the epidermal mucus of *Cyprinus carpio* was isolated by silica gel column and thin layer chromatography and analyzed for its chemical nature. Wormicidal trial was done *in vitro*, and the results obtained are summarized as follows:

The mucus was extracted by ethyl ether and separated into 4 fractions by column chromatography using benzene as solvent. The second fraction with yellowish red colour among them showed the strongest clonorchicidal effect. The yellowish red fraction obtained by column chromatography was then fractionated into 6 spots by thin layer chromatography with petrol. ether/chloroform(30/70, v/v), and the *Rf.* 0.714 spot among the 6 spots showed the strongest effect.

The *Rf.* 0.714 spot was further fractionated into 6 spots by thin layer chromatography with benzene/acetone (90/10, v/v), and the *Rf.* 0.800 spot among the later 6 spots revealed the strongest effect. The *Rf.* 0.800 spot was chromatographed on column with benzene and 2 fractions were obtained. The second fraction of light brown colour represented the final purified fraction.

By these purification procedures, clonorchicidal substance was purified 15-fold with 0.03% yield from the mucus of *C. carpio*, and 10mg of the final fraction killed the cercaria in 26 min, the metacercaria in 115 min, and the adult in 443 min.

Infra red and nuclear magnetic resonance spectrometric analysis of the purified substance revealed that the substance belongs to an ethyl ester of unsaturated fatty acid with 2 double bonds, 15 methylene groups and 1 methyl group.