Journal of the Pharmaceutical Society of Korea
8, 80—85 (1964)

人蔘中 Vitamin B 群의 微生物學的檢定 I

Vitamin B_{12}, Nicotinic acid 및 Folic acid 의 檢定

金泳垠・田桂秀・安丙俊*

(Received September 14, 1964)

Young Eun Kim, Kye Soo Juhn, Byoung Jun An: Microbiological Assay of Vitamin B group in *Panax Ginseng* Root I. Assay of Nicotinic acid and Folic acid roots

The purpose of this investigation is to observe the variation of vitamin B_{12}, nicotinic acid and folic acid contents in relation to the growing years of *Panax Ginseng* roots. The contents of the vitamins were estimated microbiologically with *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus arabinosus* and *Streptococcus faecalis*, respectively. It is found that the content of vitamin B_{12} in *Panax Ginseng* roots somewhat increases according to their growing years except 3-year-old roots. It is probable that the lower content in these roots should be due to the cultivating soil. The content of nicotinic acid in all the roots is not significantly different. The result of paper chromatography using the concentrated extract of the roots suggests that there exists some other substance besides nicotinic acid and nicotinamide, of which Rf value is 0.5 in comparison with the Rf 0.75 of nicotinic acid and nicotinamide. It is thought that this substance stimulate the growth of *L. arabinosus*. The content of folic acid is significantly different. The content level is the highest in the 4-year-old roots and the lowest in the 6-year-old roots.

渡邊等[1,2]은 當歸, 人蔘等 強壯劑의 生藥類에 微量作用物質로 生體內에서 重要한 生化學的作用을 나타내고 있는 vitamin B_{12}, nicotinic acid 및 folic acid가 含有되어 있음을 微生物學的으로 檢討하여 이를 報告하고 있으며 李[3]中屋等[4]은 人蔘에서 生化學 및 生理的으로 重要한 意義를 가지고 있는 cobalt 等의 微量元素를 定量한 結果를 報告하고 있다.

著者等은 이러한 研究에 關心을 가지고 옛날부터 漢方에서는 勿論 오늘날 아직도 神秘의 靈藥으로 널리 愛用되고 있는 우리나라 特産物인 人蔘의 強壯效果와 關聯하여 人蔘中의 vitamin B_{12}, nicotinic acid 및 folic acid의 含量이 人蔘栽培地에서 成長하는 동안에 어떠한 含量變化가 나타나는가를 檢討하고저 直接 人蔘栽培地(扶餘)에서 採取한 2年生, 3年生, 4年生, 5年生 및 6年生의 水蔘을 試料로 하여 *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus arabinosus* 및 *Streptococcus faecalis*에 依한 vitamin B_{12}, nicotinic acid 및 folic acid의 含量變化에 對한

* College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea.

微生物學的 檢定結果를 報告하는 바이다.

實 驗

1. 試料.——本實驗에서 使用한 人蔘試料는 1963年 11月 12日 忠淸南道 扶餘郡 所在 專賣廳 人蔘栽培試驗場에서 著者等이 直接 採掘한 2年生, 3年生, 4年生, 5年生, 및 6年生의 水蔘이며 採掘翌日 水蔘을 물에 잘 洗滌하고 一夜 放置하여 表面의 水分을 없앤 다음 使用하였다.

2. Vitamin B_{12} 定量用 人蔘抽出液.——尾蔘을 除去한 各年根水蔘을 5개以上 取해 50 g씩 秤量하여 Waring blendor에서 75% ethanol 150 ml(pH 4.5~4.6)로 20分間 抽出하여 이것을 吸引濾過하고 殘渣는 다시 50% ethanol 50 ml로 洗滌하여 吸引濾過하였다. 濾液을 合하여 溫浴上에서 約 40 ml가 되도록 減壓濃縮, ethanol을 溜去하고, 遠心分離하여 上淸液에 물을 加하여 50 ml로 한 다음 ether 50ml을 加하여 脫脂한 後, ether層은 버리고 水層에 溶存하는 ether을 吸引하여 除去하였다. 여기에 물을 加해 全量 50 ml로 하여 vitamin B_{12} 定量用 人蔘抽出液으로 冷藏庫에 保存하였다.

3. Nicotinic acid 및 Folic acid 定量用人蔘抽出液.——各年根 水蔘 10 g씩을 秤量하여 mortar에 넣고 잘 磨碎한 다음 0.1*N*NaOH 50 ml로 mortar를 잘 洗滌하여 erlenmeyer flask에 넣고 棉栓하여 autoclave中에서 10 Lbs. 1時間 加壓抽出하였다. 冷却後 pH 6.5로 修正하여 無水 ethanol 10 ml씩으로 3回 洗滌하여 洗滌液을 合하고 減壓濃縮한 다음 pH 7.0으로 다시 修正하여 물을 加해 全量 100 ml로 하여 nicotinic acid 및 folic acd定量用으로 冷藏庫에 保存하였다.

4. 定量用 基礎培地.——著者等은 Vitamin B_{12} 定量用 基礎培地의 調製時 使用菌株의 發育感度를 增加시키기 爲하여 Thompson[5], Skeggs[6] 및 Hoffman[7]等의 報告를 檢討하여 tomato juice preparation[b]를 調製添加하였으며 別途로 Difco製 vitamin B_{12} assay medium[8]을 入手하여 使用하였다. 入手가 困難한 pyridoxal hydrochloride 및 pyridoxamine dihydrochloride는 Capps[8]等에 依해 添加하지 않았으며, Nicotinic acid定量用基礎培地는 N.F. 方法으로는 發育이 良好하지 못하여 folic acid 5*r*를 添加하였다. 使用한 基礎培地組成은

TABLE I.—Composition of B_{12} Assay Medium(Double Strength).

Acid-hydrolyzed casein soln.	25 ml	Pyridoxine HCl	1000 *r*
Tomato juice preparation b	50 〃	Thiamine HCl	250 〃
Dextrose, anhydrous	10 g	Nicotinic acid	500 〃
Sodium acetate, anhydrous	5 〃	*p*-Aminobenzoic acid	500 〃
Ascorbic acid	1 〃	Ca-pantothvnate	250 〃
L-Cystine	0.1 〃	Biotin	2.5 〃
DL-Tryptophan	0.1 〃	Folic acid	50 〃
1*N*-HCl	10ml	Polysorbate 80	500 mg
Asparagine	50mg	KH_2PO_4	250 〃
Adenine sulfate	5 〃	K_2HPO_4	250 〃
Guanine hydrochloride	5 〃	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 〃
Uracil	5 〃	NaCl	5 〃
Xanthine	5 〃	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 〃
Riboflavine	250 *r*	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5 〃

After adjusting pH 6.0 with 10% NaOH soln., add water to make 250 ml.

Table Ⅰ, Ⅱ 및 Ⅲ과 같다.

(a) Acid-hydrolyzed casein soln[9,10]. ——市販 milk casein을 約 5倍量의 ether로 脫脂한 다음 75~80%의 ethanol 4~5倍量을 加하여 約 10時間 還流시켜 可溶性成分을 除去하고 乾燥시켜 vitamin-free casein을 만들고 鹽酸(1:2)으로 加水分解하였다.

(b) Tomato juice preparation[9,10]. ——市販의 新鮮한 tomato를 물로 洗滌한 다음 Waring blendor에서 homogenation한 後, 遠心分離하여 大部分의 cellulose를 除去하고 精製硅藻土[7]를 加하여 濾過한 다음 *N*-HCl로 pH3.5(BPB試驗紙)로 調節하고 活性炭 1.2~1.5%를 加하여 20~30分間 攪拌한 다음 遠沈하여 上淸液을 精製硅藻土[11]를 濾過補助劑로 使用하여 減壓濾過하고 toluene數滴을 加하여 冷藏庫에 保存하면서 使用하였다.

TABLE II.—Nicotinic acid Assay Medium (Double Strength).

Acid-hydrolyzed casein soln.	25 ml	Dextrose, anhydrous	10 g
DL-Tryptophan	100 mg	Sodium acetate, anhydrous	5 〃
L-Cystine	50 〃	Riboflavin	200 *r*
Guanine hydrochloride	5 〃	Folic acid	5 〃
Adenine sulfate	5 〃	KH_2PO_4	250 mg
Uracil	5 〃	K_2HPO_4	250 〃
Thiamine hydrochloride	100 *r*	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 〃
Biotin	0.4 〃	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5 〃
p-Aminobenzoic acid	100 〃	NaCl	5 〃
Pyridoxine hydrochloride	400 〃	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 〃
Ca-pantothenate	500 〃		
pH 6.8, add water to make 250 ml			

TABLE III.—Folic acid Assay Medium (Double Strength).

Acid-hydrolyzed casein soln.a)	25 ml	Dextrose, anhydrous	10 g
DL-Tryptophan	100 mg	Sodium acetate, anhydrous	10 〃
L-Cystine	50 〃	Peptone treated with Norit*	0.5 g
Alanine	60 〃	Ca-pantothenate	200 *r*
Asparagine	50 〃	K_2HPO_4	250 mg
Adenine sulfate	5 〃	KH_2PO_4	250 〃
Guanine hydrochloride	5 〃	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 〃
Uracil	5 〃	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5 〃
Pyridoxine hydrochloride	400 *r*	NaCl	5 〃
Nicotinic acid	150 〃	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 〃
Riboflavin	200 〃	Biotin	0.4 *r*
Thiamine hydrochloride	100 〃	*p*-Aminobenzoic acid	100 〃
pH 6.8, add water to make 250 ml			

* Replaced with activated carbon made in Kanto Chemicals Co.

5. 微生物學的檢定.——vitamin B_{12}의 定量[9,10]은 Coleman universal spectrophotometer, model 14로 600 *mμ*에서 그 濁度를 %透過度로 測定하였으며, nicotinic acid[12] 및 folic acid의 定量[13]은 BTB를 指示藥으로 하여 0.1*N*NaOH로 滴定하였다.(Fig. 1.2 및 3).

6. 試料濃縮液의 PPC[14].——乾燥試料 50g을 秤取하여 nicotinic acid 및 folic acid定量用 人蔘抽出液과 同一하게 抽出하여 16 ml로 減壓濃縮하여 PPC(whatman No 4.2×30 cm)로 7hrs. 上昇展開(HAC:H_2O : *n*-C_4H_9OH=1:5:4)後 cyanogen bromide[14] 蒸氣中에서 1hrs. 放置後 1% *p*-aminobenzoic acid를 撒布하여 發色시켰다.

結果 및 考察

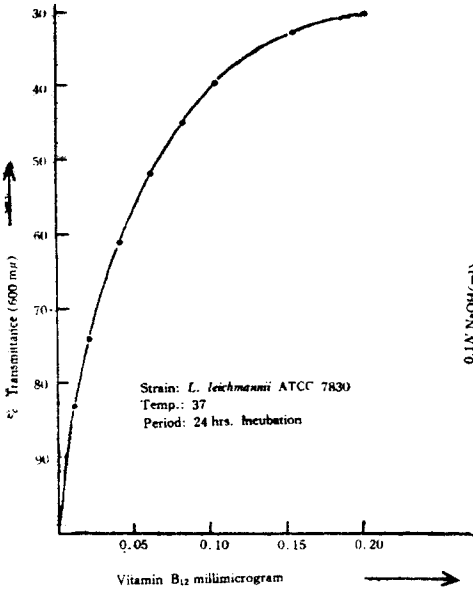

Fig.1.—Standard response curve of ritamin B_{12}

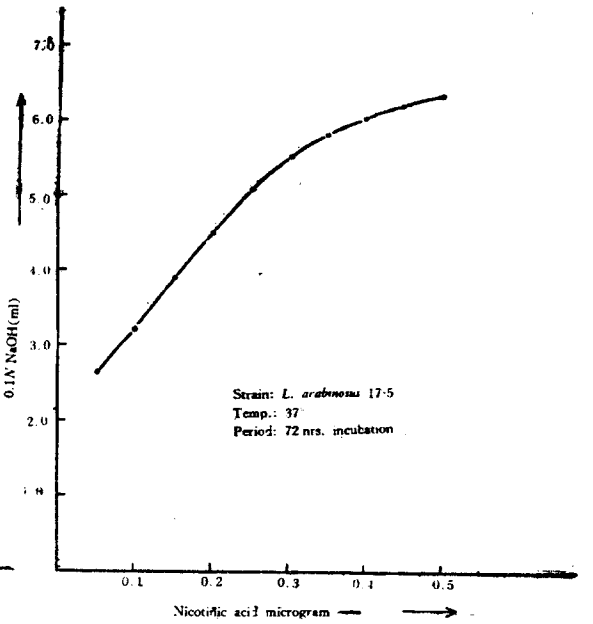

Fig.2.—Standard response curve of nicotinic acid

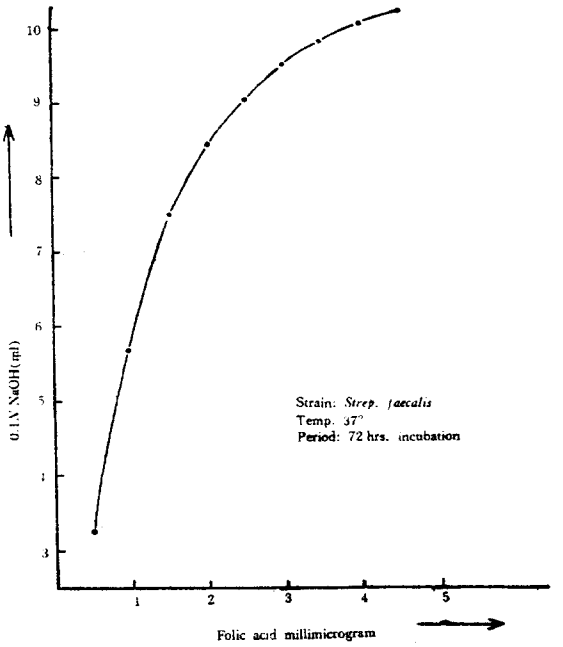

Fig.3.—Standard response curve of folic acid

1. 微生物學的定量: 各年根 水蔘 1 g 當含有된 vitamin B_{12}, nicotinic acid 및 folic acid의 含量은 TableⅣ과 같으며 vitamin B_{12} activity는 栽培年數에 따라 多少 增加를 보이고 있으나 3年根에 있어서는 오히려 減少하고 있으며 nicotinic acid는 何等의 差異를 볼 수 없고, 또 Folic acid는 4年根까지는 多少 增加를 나타내고 있으나 다시 減少함을 알 수 있다. 이

TABLE Ⅳ.—Contents of Vitaminsin Ginseng roots

Vitamin \ Age of roots (Yrs)	2	3	4	6	6
Vitamin B_{12} (mr/g)	0.40	0.37	0.50	0.57	0.60
Nicotinic acid (r/g)	13.7	15.96	15.0	15.4	15.5
Folic acid (mr/g)	50.69	51.56	67.91	63.76	39.98

와 같은 結果를 綜合해보면 이들 成分이 人蔘의 栽培年數에 依해 若干의 增減을 나타내는 것인지는 앞으로의 繼續檢討가 必要하며 또한 栽培地의 土壤等과 關係하고 있는 것이 아닌가 한다.

2. 試料의 PPC——試料濃縮液의 PPC 結果는 試料中에 nicotinic acid 및 nicotinamide 以外의 物質이 存在함을 알 수 있으며 nicotinic acid와 nicotinamide가 共히 Rf 0.75일에 비추어 이 物質은 Rf 0.5였고 또 *L. arabinosus*의 發育을 促進하였다.

끝으로 本實驗에 物心兩面으로 協助를 아끼지 않으신 天道製藥株式會社, 東京大學校應用微生物學研究所 國立防疫研究所 関昌弘先生, 서울農大 李春寧博士, 陸軍技術研究所 李啓湖先生 및 專賣技術研究所 洪淳根先生께 衷心으로 感謝하는 바이다.

REFERENCES

1. 渡 邊, *J. Pharm. Soc.*(Japan), **73**, 419(1953)
2. 渡 邊, *ibid*, **73**, 841(1953)
3. 李鍾珍, *et al.*, 大韓化學會誌, **7**, 13(1963)
4. 中 堅, 日本藥理學雜誌, 55. No.2(1959)
5. Thompson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **184**, 211(1950)
6. Skeggs *et al.*, *ibid.*, **184**, 175(1950)
7. Hoffman *et al.*, *ibid.*, **181**, 635(1949)
8. Capps *et al.*, *ibid.*, **178**, 517(1949)
9. 鈴 本, ビタミン アミノ酸の 微生物定量法, 南山堂
10. 新 村, 藥剤のビタミン定量法, 醫歯藥出版株式會社
11. Hubert Clauser *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4337(1954)
12. Snell *et al.*, *ibid.*, **139**, 675(1941)
13. Teply *et al*,, *J. Biol. Chem.*, **157**, 303(1945)
14. Block *et al.*, *Paper Chromatography and Paper Electrophoresis.*
15. Hoff-Jrgensen, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. I, p. 81.