

人蔘의 抗스트레스作用에 關한 研究

金洛斗 · 韓秉勳* · 李殷芳* · 孔宰洋 · 金明惠 · 秦昶培

서울大學校 藥學大學 · 서울大學校 生藥研究所*

Studies of Ginseng on the Antistress Effects

Nak Doo KIM, Byung Hoon HAHN*, Eun Bang LEE*,
Jae Yang KONG, Myoung Hae KIM and Chang Bae JIN

College of Pharmacy, Seoul National University and Natural Products Research Institute,
Seoul National University*

Two pure saponin components, Panax saponin C (protopanaxatriol derivative, ginsenoside Re) and Panax saponin E (protopanaxadiol derivative, ginsenoside Rb₁) were isolated from *Panax ginseng* root and their acute toxicities in mice and antistress effects in rats were investigated. Average lethal doses (LD₅₀) of ginsenoside Re were 130mg/kg (i.v.), more than 1,000mg/kg (i.p.) and more than 1,500 mg/kg (s.c.), respectively. Average lethal dose of ginsenoside Rb₁ was 243mg/kg intravenously. Adrenal ascorbic acid and cholesterol contents were significantly decreased when normal rats were exposed to heat (40°C) for 30 min. The reduction of the adrenal ascorbic acid and cholesterol contents in rats was partially prevented when the rats received the ginseng saponins prior to exposure to heat stress and most pronounced effects were observed in rats received ginsenoside Re. However, it was found that administration of ginseng alone, without stress, did not significantly change the ascorbic acid and cholesterol contents in adrenal glands. Eosinophil counts in the blood of the rats were elevated when the rats were exposed to the heat stress, and the elevation of the eosinophil counts were prevented with the ginseng saponins under the stress, but the changes were all insignificant statistically.

서 론

人蔘은 정상적인 조건에 있는 生體에는 별 영향을 미치지 않으나 각종 stress에 의한 有害反應에 대해서는 방어 또는 회복시키는 효과가 Brekhman¹⁾ 및 Petkov^{2,3)}에 의해 인정되어 있다. 物理的인 stress로서 추위 및 더위 또는 X-線에 대하여 人蔘이 저항력을 증가시키고⁴⁾ 사망율을

감소시키며 化學的인 stress로 strychnine 또는 microtoxin과 같은 藥物에 대하여 人蔘이 치사량을 증가시키며 또는 生命을 연장시키는 보고⁵⁾가 있는 외에 기타 stress로서 유해한 환경조건에 대하여서도 저항력을 나타낸이 보고되고 있다⁶⁾. 이러한 연구에 使用된 人蔘은 粉末이거나 alcohol 또는 水浸엑기스 등 人蔘의 抽出物을 使用한 실험결과이며 순수 saponin을 利用한 실험은 없다¹⁾. 저자들은 본 연구에서 국내 인삼에서 얻은

protopanaxatriol계 또는 protopanaxadiol계 saponin을 利用하여 動物의 stress에 미치는 保護 効果를 검토하여 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 인삼의 총 사포닌 분리 : 홍삼 20kg을 粗切하고 methanol 50l로 3회 5시간씩 가열 추출한 後 농축하여 約 2.5kg의 엑기스를 얻었다. 이 엑기스를 물 약 3l에 죽상으로 현탁시킨 다음에 ether 5l씩으로 4회 추출하고 水層을 butanol로 3l씩 3회 추출하여 butanol층을 취하고 감압 농축하여 약 500g의 粗 saponin 분획을 얻었다.

2) Ginsenoside Re의 分離 : 粗 saponin분획 500g을 methanol 1l에 용해시킨 다음 chloroform 3l를 가하여 混合하고 소량의 물을 가하여 混合하여 chloroform 층과 methanol 층으로 분리시킨 후 chloroform층을 농축하여 ginsenoside Rg₁의 함량이 큰 분획 잔사를 약 120g 얻었다. 이를 다시 chloroform:methanol(3:1)로 만든 silicagel column(5×65cm, 1 Lb)에 매회 30g씩 부하시켜 chromatography하여 먼저 溶出된 ginsenoside Rg₁을 얻었고 계속하여 展開시켜 ginsenoside Re가 主成分인 분획을 얻었다. 이 분획을 감압 농축한 다음에 殘渣를 소량의 물에 가온하여 용해시킨 다음에 방치하여 석출된 ginsenoside Re 결정을 얻었다. Glass filter로 여과한 다음에 소량의 물로 씻고 다시 소량의 acetone 및 ether로 씻은 다음에 減壓乾燥시켜 ginsenoside Re의 결정성 백색 분말 21.5g을 얻었다. m. p. 198°C. 이 성분은 보관중인 ginsenoside Re 표준품과 그 TLC가 一致하였다.

3) Ginsenoside Rb₁의 分離 : 粗 saponin을 chloroform과 methanol로 분획하여 얻은 methanol층을 감압 농축하여 syrup狀 고형물 약 400g을 얻었다. 이 固形物中에는 panaxadiol系 glycoside가 주로 함유되어 있다. 이 固形物 약 30g을 chloroform:methanol:H₂O(15:10:2.6)용매 소량에 용해하고 이 용매로 만든 silicagel column (75×5cm, 1Lb)을 통과시켜 먼저 panax saponin

D를 얻었으며 계속하여 展開하여 ginsenoside Rb₁이 主成分인 분획을 얻었다. 이 分劃을 감압 농축하고 얻은 잔사를 소량의 물에 녹여 장시간 냉장고에 방치하여 ginsenoside Rb₁의 석출된 결정을 얻었다. glassfilter로 여과하고 소량의 물로 씻은 다음 acetone으로 脫水하고 다시 ether로 씻은 다음에 減壓 건조하여 ginsenoside Rb₁의 결정성 백색 분말 1.5gm을 얻었다. m. p. 205~9°C. 보관 중인 ginsenoside Rb₁ 표준품과 TLC가 一致하였다.

2. 실험 방법

1) 순수 saponin의 급성 독성 시험 : 體重 21~25g의 dd系 雄性 마우스를 使用하여 LD₅₀을 求하였다. ginsenoside Re 및 ginsenoside Rb₁를 0.5% CMC에 현탁시켜 정맥내, 복강내 또는 피하 주사 하였으며 生死判定은 약물 투여 후 72시간으로 하였다. LD₅₀은 Litchfield 및 Wilcoxon의 方法으로 산출하였다.

2) 흰쥐의 부신 ascorbic acid 및 cholesterol 함량에 미치는 人蔘 saponin의 실험 : 體重이 120~200g 범위의 건강한 雄性 Sprague-Dawley系 흰쥐를 사용하였으며 이 흰쥐를 밀폐 dry ice 상자에 넣어 죽인 후 左右 副腎을 적출 하였으며 左側 부신은 Roe⁷⁾의 方法으로 ascorbic acid량을 측정하였으며 右側부신은 Sidney Pearson⁸⁾의 方法으로 cholesterol 함량을 측정하였다. 부신 ascorbic acid 함량의 측정은 적출한 부신을 5% metaphosphoric acid로 3회 抽出하여 ascorbic acid함량이 24μg/ml이 되도록 총량 20ml를 사용하였으며 이 중의 1ml와 발색 시약 용액(2,6-dichlorophenol indophenol) 9ml를 혼합 후 UV spectrophotometer(Unicam)를 사용하여 520nm에서 吸光度를 측정하였다. 부신 cholesterol 함량의 측정은 적출한 부신을 acetone:ethanol:ethyl ether(4:4:1 by volume)용매로 抽出하고 이 증발 잔사에 glacial acetic acid 0.2ml, 12% p-toluene sulfonic acid 용액 1ml 및 acetic anhydride 3ml를 加한 후 濃黃酸으로 발색시켜 UV spectrophotometer를 사용하여 550nm에서 吸光度를 測定하였다.

본 실험에 사용한 실험군은 다음과 같다.

(1) 정상군(생리적 식염수 투여군)

(2) ginsenoside Rb₁ 10mg/kg 및 ginsenoside Re 5mg/kg 투여군

(3) stress군(고온노출군)은 대조군(생리적 식염수군)과 인삼 saponin 투여군으로 하고 다시 saponin 투여군은

i) 총 인삼 saponin 5, 20 및 50mg/kg 투여군

ii) ginsenoside Rb₁ 10mg/kg 투여군

iii) ginsenoside Re 5, 10, 20mg/kg 투여군 등으로 나누어 실험에 제공하였다.

고온에 노출시키지 않은 군은 생리적 식염수(정상군) 또는 人蔘 saponin(saponin 투여군)을 9日間 복강내로 투여하고 최종투여 한시간 후에 부신을 적출 하였으며 고온에 노출시킨 군은 생리적 식염수(대조군), 또는 人蔘 saponin(saponin 투여군)을 9日間 복강내로 투여하였으며 제7일째 부터 3일간 1日 1回 40°C의 가온 상자에 30분간씩 노출시켰으며 가온 노출 후 2시간 후에 부신을 적출하였다. 각 군의 동물 수는 6~8마리를 사용하였다.

3) 흰쥐의 혈액내 好 eosin 細胞數에 미치는 人蔘 saponin의 실험: 흰쥐를 2군으로 나누어 고온노출군과 비노출군으로 나누었으며 비노출군은 다시 2군으로 나누어 생리적 식염수 또는 총인삼 saponin(20mg/kg)을 10日間 복강내로 투여하고 최종 투여후 한 시간에 斷頭해서 얻은 血液을 利用하여 常法으로 好 eosin 세포 수를 산정하였다. 고온 노출군은 다시 4군으로 나누어 생리적 식염수, 총 인삼 saponin 20mg/kg, ginsenoside Rb₁ 10mg/kg 및 ginsenoside Re 10mg/kg을 복강내로 10日間 투여 하였다. 실험 8일째 부터 3日間 1日 1回 40°C의 고온에 30分間 노출시킨 후 2시간 후에 단두하여 얻은 혈액을 利用하여 常法으로 好 eosin 세포수를 산정하였다.

실험 결과

1. 순수 saponin의 급성 독성

Ginsenoside Re 및 ginsenoside Rb₁의 平均致死量은 다음과 같다(Table I). 마우스는 死亡時

호흡마비 및 間代性 痙攣을 일으켰다.

Table I. LD₅₀ of Ginsenoside Re and Ginsenoside Rb₁

Compounds	Route of administration	LD ₅₀ (mg/kg)
Ginsenoside Re	iv	130(117.1~144.3)*
	ip	1,000<
	sc	1,500<
Ginsenoside Rb ₁	iv	243(225.6~261.7)*

* Numbers in parentheses are confidence limits.

2. 흰쥐의 부신 ascorbic acid 含量에 대한 人蔘 saponin의 영향

1) 정상군에 대한 인삼 saponin의 영향: 정상 흰쥐의 부신 ascorbic acid 含量은 322.8±9.3mg/100g이었으며 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Re 투여군은 각각 294.4±17.1mg/100g 및 292.2±10.5mg/100g로 감소하는 경향이 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다(Table II).

부신의 중량은 정상군 21.4±1.2mg에 비하여 ginsenoside Rb₁ 투여군은 15.0±0.4mg, ginsenoside Re군은 20.1±1.2mg으로 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다(Table II).

2) 고온 노출군에 대한 인삼 saponin의 영향: 생리적 식염수군(대조군)과 인삼 saponin 투여군의 실험을 병행하여 그 실험치를 비교하였다. 정상군의 부신 ascorbic acid 함량에 비하여 고온에 노출된 백서군(대조군)의 ascorbic acid 함량은 현저히 감소되었다. 총 인삼 saponin 투여군에서 stress로 인한 감소가 억제되는 경향을 나타내었다. 총인삼 saponin 50mg/kg 투여군에서 정상군의 ascorbic acid 함량은 322.8±9.3mg/100g이었으며 고온 stress로 203.8±19.2mg/100g로 감소되었으나 saponin의 전 처리로 263.2±17.4mg/100g로 유의성있는 억제 効果가 있었다 (Table III). Ginsenoside Rb₁ 투여실험에서도 stress로 因하여 ascorbic acid 함량이 대조군은 238.3±16.2mg/100g로 감소되었으나 saponin 전처리로 274.9±10.9mg/100g로 감소가 억제되었다(Table IV).

Ginsenoside Re 투여군에서 10 및 20mg/kg의 복강내 투여로 stress만을 받은 군에 비하여 유의

Table II. The Effect of Ginseng Saponins on the Adrenal Ascorbic Acid Contents in Normal Rats.

Indices	Normal (8) ^b	Ginsenoside Rb ₁ (6)	Ginsenoside Re (6)
Adrenal gland (mg)	21.4±1.2 ^a	15.0±0.4	20.1±1.2
Ascorbic acid (mg/100g)	322.8±9.3	294.4±17.1	292.2±10.5

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

Table III. The Effects of Total Ginseng Saponin on the Adrenal Ascorbic Acid Contents in Rats Exposed to Heat.

Indices	Without stress (8) ^b	Stress					
		Control (7)	5mg/kg (8)	Control (6)	20mg/kg (6)	Control (6)	50mg/kg (6)
Adrenal gland(mg)	21.4±1.2 ^a	16.1±0.6	16.4±0.8	15.9±0.6	18.4±0.9	16.7±1.6	17.8±1.7
Ascorbic acid (mg/100g)	322.8±9.3	229.7±13.8	251.2±8.4	231.3±13.5	231.9±7.0	203.8±19.2	263.2±17.4*

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used

* p<0.05

Table IV. The Effects of Ginsenoside Rb₁ and Ginsenoside Re on the Adrenal Ascorbic Acid Contents in Rats Exposed to Heat.

Indices	without stress (8) ^b	Stress					
		Ginsenoside Rb ₁		Ginsenoside Re			
		Control (13)	10mg/kg (13)	Control (6)	10mg/kg (6)	Control (6)	20mg/kg (6)
Adrenal gland (mg)	21.4±1.2	18.2±0.7	18.3±0.9	17.0±0.6	16.8±1.4	17.9±0.6	16.5±0.7
Ascorbic acid (mg/100g)	322.8±9.3	238.3±16.2	274.9±10.9*	154.3±15.9	217.2±29.3*	234.2±13.1	279.4±15.7*

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

* p<0.05

성 있는 증가를 나타내었다. 즉 ginsenoside Re 10mg/kg 투여군에서 stress로 인해 154.3±15.9mg/100g으로 저하되었던 ascorbic acid 함량이 saponin 투여군에서는 217.2±29.3mg/100g으로 유의성 있는 감소의 역제를 나타내었으며 20mg/kg 투여군에서는 대조군이 234.2±13.1mg/100g이고 saponin 투여군이 279.4±15.7mg/100g로 역시 유의성 있는 감소의 역제를 나타내었다(Table IV).

부신의 중량은 人蔘 saponin의 투여로 그의 변화를 認定할 수 없었다.

3. 흰쥐의 부신 cholesterol에 대한 人蔘 saponin의 영향

1) 정상군에 대한 인삼 saponin의 영향: 정상 흰쥐의 부신 cholesterol 함량은 32.5±0.81mg/kg이었으며 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Re 투여군이 각각 32.72±2.82 및 30.45±3.49mg/kg으로 변화가 없었다(Table V). 부신의 중량은 정상군 18.66±0.60mg에 비하여 ginsenoside Rb₁군은 13.5±0.44mg, Ginsenoside Re 투여군은 17.17±0.68로서 역시 유의성 있는 차이가 없었다.

2) 고온 노출군에 대한 인삼 saponins의 영향: 생리적 식염수군(대조군)과 인삼 saponin 투여군

Table V. The Effects of Ginseng Saponins on the Adrenal Cholesterol in Normal Rats.

Indices	Control ^b	Ginsenoside Rb ₁ (10mg/kg)	Ginsenoside Re (5mg/kg)
Adrenal gland (mg)	18.66±0.60 ^a	13.5 ±0.44	17.17±0.68
Cholesterol (mg/g)	32.5 ±0.81	32.72±2.82	30.45±3.49

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

Table VI. The Effects of Total Ginseng Saponin on the Adrenal Cholesterol Contents in Rats Exposed to Heat.

Indices	Without stress (34) ^b	Stress					
		Control (8)	5mg/kg (8)	Control (7)	20mg/kg (7)	Control (8)	50mg/kg (8)
Adrenal gland(mg)	18.66±0.60	13.86±0.52	13.81±1.03	14.01±0.38	16.43±1.05	14.63±0.71	14.3 ±0.77
Cholesterol(mg/g)	32.5 ±0.81	23.5 ±0.90	22.9 ±1.03	19.17±1.22	25.57±2.91	19.53±1.94	19.81±1.69

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

Table VII. The Effect of Ginsenoside Rb₁ and Ginsenoside Re on the Adrenal Cholesterol Contents in Rats Exposed to Heat.

Indices	Without stress (34) ^b	Stress					
		Ginsenoside Rb ₁			Ginsenoside Re		
		Control (8)	10mg/kg (7)	Control (7)	5mg/kg (6)	Control (4)	20mg/kg (4)
Adrenal gland(mg)	18.7±0.60	14.8±0.84	13.3±0.63	15.4±0.5	19.7±1.06**	16.1±0.64	14.5±0.7
Cholesterol(mg/g)	32.5±0.81	18.9±1.57	21.6±1.86	25.3±1.83	34.0±2.59*	24.5±1.98	31.7±1.2

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

* p<0.05

** p<0.01

의 실험을 병행하여 그 실험치를 비교하였다. 정상군의 부신 cholesterol 함량에 비하여 고온에 노출된 흰쥐군의 cholesterol 함량은 현저히 감소되었다. 총인삼 saponin 투여로 stress로 인한 감소에 억제효과를 인정할 수 없었으며(Table VI) ginsenoside Rb₁ 투여군에서도 차이를 인정할 수 없었으나 ginsenoside Re 투여군에서는 5 및 20mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 각각 유의성있는 증가를 인정할 수 있었다. 즉 ginsenoside Re 5mg/kg 투여군에서 cholesterol 함량이 stress로 인해 25.33±1.83mg/g로 감소되었으나 saponin의 전투여로 34.02±2.59mg/g을 나타내 stress를 받기 이전의 값과 거의 유사하였다. Ginsenoside Re 20mg/kg 투여군에서도 대조군은 24.

55± 1.98mg/kg이였으며 saponin 투여군은 31.65± 1.2mg/kg이였다((Table VII).

4. 흰쥐 혈액 好 eosin 세포수에 미치는 인삼 saponin의 영향

정상군에서의 好 eosin 세포수는 81±7.66cells/mm³이였으며 총사포닌의 투여로 변화를 인정할 수 없었다. 고온에 노출시킨 stress군의 호 eosin 세포수는 정상군에 비하여 37.8% 증가하였으며 총사포닌 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Re의 전처리로 호 eosin 세포수는 16.7%, 28% 및 17.9% 증가하였다. 즉 정상군에서 보다 stress 받았을 경우 好 eosin 세포수가 증가하고 인삼 saponin의 전처리는 이 증가를 억제하는 경향이 있었으나 통계학적으로 유의성 있는 차이는 인

Table VIII. The Effect of Ginseng Saponins on the Eosinophil Cell in Rats Exposed to Heat.

Group	Without stress		Stress			
	Normal (saline)	Total Saponin	Control (saline)	Total Saponin (20mg/kg)	Ginsenoside Rb ₁ (10mg/kg)	Ginsenoside Re(10mg/kg)
Eosinophil Cell (cell/mm ³)	81±7.66 ^a (6) ^b	83.67±5.14 (6)	111.62±5.31 (13)	93.93±4.32 (14)	103.71±5.11 (7)	95.5±3.59 (12)

a: Mean±S.E.

b: The number in parenthesis indicates that of animals used.

정할 수 없었다(Table VIII).

고 찰

본 연구에서 흰쥐에 대한 stress로 물리적인 고온 노출 방법을 사용하였으며 Kim 등⁴⁾이 제시한 결과에서와 유사하게 부신 ascorbic acid 함량이 정상군에 비하여 현저히 감소함을 관찰하였다. Kim 등⁴⁾은 stress의 방법으로 고온 35°C에 한시간 노출시켰으나 본 연구에서는 40°C에서 30분 노출시켰으며 그 stress의 효과는 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 stress의 부가로 부신은 증량에 변화를 인정할 수 없었으며 그 열 자극은 부신 비대를 일으킬 만큼 충분한 stress가 아닌 것으로 생각된다. 정상군에 대하여 인삼 saponin은 부신 ascorbic acid 및 cholesterol 함량에 영향을 미치지 않으나 stress 받은 흰쥐에 대해서는 부신 ascorbic acid 및 cholesterol 함량을 정상 상태로 회복시키는 경향을 나타내었으며 이러한 현상은 cholesterol의 경우 人蔘 saponin 및 ginsenoside Rb₁에서 보다 protopanaxatriol系 saponin인 ginsenoside Re 투여로 cholesterol의 유의성 있는 증가를 관찰하였다. Ascorbic acid 함량의 경우는 총 saponin, ginsenoside Rb₁ 및 Re에서 모두 유의성 있는 방어 효과를 관찰하였으며 호산성 백혈구의 경우는 Petkov 등³⁾의 결과와 일치하는 경향을 얻었으나 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 Brekhman,¹⁾ Petkov²⁾ 및 Kim⁴⁾ 등이 제시한 바와 같이 stress下的 생체에 대하여 총人蔘 saponin 뿐만 아니라 순수 배당체가 방어 효과 내지 정상화 작용이 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

결 론

인삼으로 부터 총인삼 saponin, protopanaxadiol系 saponin인 ginsenoside Rb₁ 및 protopanaxatriol系 saponin인 ginsenoside Re를 분리하여 급성 독성 및 부신 ascorbic acid와 cholesterol에 미치는 효과와 好 eosin 세포수에 미치는 영향을 관찰하였다.

마우스에 대한 ginsenoside Rb₁의 평균致死량은 243mg/kg(i.v.)이었으며 ginsenoside Re의 평균치사량은 130mg/kg (i.v.), >1000mg/kg(i.p.) 및 >1500mg/kg(s.c.)였다.

正常 흰쥐의 부신 ascorbic acid 및 cholesterol 함량과 好 eosin 세포수는 40°C의 고온에 30분 노출시켰을 때 현저히 감소하였다. Total saponin, ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Re의 前處置로 stress로 인한 ascorbic acid의 감소를 억제하였으며 ginsenoside Re는 현저한 유의성 있는 감소의 억제를 나타내었다. 정상 백서에 대해서는 人蔘 saponin은 부신 ascorbic acid 함량에 영향이 없었다.

Cholesterol 함량은 stress를 가했을 때 현저히 감소되었으며 ginsenoside Re 투여군에서는 이 감소에 對하여 유의성 있는 억제를 나타내었다. 정상 흰쥐에 대하여 人蔘 saponin은 부신 cholesterol 함량에 영향이 없었다. 好 eosin 세포는 백서를 고온에 노출시켰을 때 감소되었으며 total saponin, ginsenoside Rb₁ 및 Re는 好 eosin 세포의 증가를 억제하는 경향을 나타내었다.

謝辭 본연구에 소요된 경비의 일부는 전매기술 연구소의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊이 감사하는 바이다.

문 헌

1. Brekhman, I. and Dardymov, I.V.: *Lloydia*, 32, 46 (1969).
2. Petkov, V and Staneva-Stoicheva, D: *Arzneimittelforschung*, 13, 1078 (1963).
3. Petkov, V. and Staneva-Stoicheva, D.: Preceeding of the 2nd international Pharmacological Meeting, Prague, 1963, Pergamon Press, Czechoslovak Medical Press, 7, 39(1963).
4. Kim, C., Kim, C.C., Kim, M.S., Hu, C.Y. and Rhee, J.S.: *Lloydia*, 33, 43 (1970).
5. Hong, S.A.: Pharmacological action of Ginseng in Korean Ginseng Symposium, Korean Society of Pharmacognosy p. 123 (1974).
6. Oh, J.S., Hong, S.A., Lym, J.K., Kim, N.D., Sung, N.E. and Han, D.S.: *Seoul Univ. J. (C)* 15, 20 (1964).
7. Roe, J.H.: Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids, In *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, Glick, D. ed. Interscience Publishers Inc. New York, p. 115 (1955).
8. Pearson, S., Stern, S. and McGavack, T.H.: *Analytical Chemistry*, 25, 13 (1953).