

원통평판법을 이용한 비타민 B₁₂의 정량

이성호 · 조진성 · 송영준[†]

종근당(주) 품질관리부
(1991년 5월 5일 접수)

Determination of Vitamin B₁₂ by Agar Diffusion Method

Sung-Ho Lee, Chin-Sung Cho and Young-Joon Song[†]

Chong Kun Dang Corp.
(Received May 5, 1991)

The agar diffusion method using *Escherichia coli* was investigated for determination of Vitamin B₁₂ instead of turbidimetric method using *Lactobacillus leichmannii* (USP XXII method). The turbidimetric method is difficult to control the test organism and it has complicated procedure. From this study, it was found that the agar diffusion method on the determination of Vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparation is simple and convenient as compared with turbidimetric method. Also we found that the coefficient of variation in reproducibility and the standard error in recovery were 2.18% and 1.83%, respectively.

Keywords—Agar diffusion method, Vitamin B₁₂, *Escherichia coli*.

비타민 B₁₂(C₆₃H₈₈GON₁₄O₁₄P, M.W. 1355.40)의 정량방법에는 생물학적 방법으로 병아리를 사용하는 방법,^{1,2)} 생리학적 방법으로는 쥐에 빈혈을 유발시켜 비타민 B₁₂ 투여에 의한 적혈구수의 증가를 측정하는 방법³⁾이 있으며 물리화학적 방법으로는 흡광도법,⁴⁻¹⁸⁾ 원자흡광도법,¹⁹⁾ 방사능 동위원소법,²⁰⁾ 박층 크로마토그래프법,^{21,22)} 여지크로마토그래프법⁷⁾이 있다. 미생물학적 방법은 시험균주의 각종 발육소 중 비타민 B₁₂를 제거한 배지에서 배양하면 이를 자체 생합성 할 수 없는 미생물은 증식하지 못하기 때문에 이 배지에 비타민 B₁₂를 첨가하면 균의 발육정도는 일정농도 까지는 첨가한 비타민 B₁₂의 농도에 비례하는 성질을 이용한 것으로 시료취급의 간편성, 선택성, 높은 감도 등에 의해 많이 이용되고 있으며 사용하는 균주로는 *Euglena gracilis*,²³⁾ *Lactobacillus lactis* Dorner,⁶⁾ *Lactobacillus leichmannii*²⁴⁻²⁶⁾ 등

이었다. *Euglena gracilis*를 이용한 방법은 높은 감도를 갖는 특이성이 있으나 배지조성 후 균의 발육이 늦어서 정량까지는 5일이 소요되는 단점이 있다. *Lactobacillus lactis*를 이용한 분석법은 *Lactobacillus leichmannii*를 이용한 분석법보다 재현성이 나쁘고 균주의 취급이 어려우며 *Lactobacillus leichmannii*를 이용한 비탁법이 USP XXII에 수재되어 의약품 중의 비타민 B₁₂ 정량시험방법으로 많이 응용되고 있다. 그러나 이 시험방법은 시험조작이 복잡하고 시험용 균의 배양 및 균액을 조절해야 하는 단점을 갖고 있다. *Escherichia coli* 변이주와 disk를 이용한 한천평판법이 검토된 바 있으나 실험이 불편하여 실험조작이 용이한 원통평판법으로 비타민 B₁₂ 분석방법을 검토하여 다음과 같은 지견을 얻었다.

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Table 1—Composition of Various Preparations

Ingredient	C company (Tablet) per tablet	G company (Syrup) per ml	H company (Granule) per 1.5 g	Y company (Tablet) per tablet	Y company (Injection) per 2 ml
Cyanocobalamin	5 µg	2 µg	5 µg	5 µg	10 µg
Vitamin A	—	—	1500 I.U.	—	—
Thiamine HCl	—	—	1.55 mg	—	10 mg
Thiamine nitrate	—	—	—	15 mg	—
Fursultiamine	50 mg	—	—	—	—
Riboflavine	2 mg	—	1.5 mg	10 mg	—
Riboflavine sodium phosphate	—	—	—	—	5.47 mg
Pyridoxine HCl	2 mg	0.4 mg	1.5 mg	5 mg	5 mg
Ascorbic acid	60 mg	—	60 mg	600 mg	—
Cholecalciferol	—	—	400 I.U.	—	—
Tocopherol acetate	50 mg	—	60 mg	—	—
Nicotinamide	—	2 mg	13.5 mg	100 mg	40 mg
Folic acid	—	22.2 µg	0.3 mg	—	—
Dexpanthenol	—	0.67 mg	—	20 mg	5.17 mg
Biotin	—	—	0.1 mg	—	—
Liver extract	—	3.33 mg	—	—	—
Ferrencholate	—	10 mg	—	—	—
Ferrous fumarate	—	—	15.21 mg	—	—
Magnesium oxide	—	—	33.17 mg	—	—
Calcium hydrogen phosphate	—	—	85 mg	—	—
Zinc oxide	—	—	12.45 mg	—	—
Manganese sulfate	—	—	6.2 mg	—	—
Sodium fluoride	—	—	1 mg	—	—

실험 방법

표준품 및 시료

비타민 B₁₂ 표준품은 상용표준품을 사용하였고 시료는 시판하고 있는 C사, H사, Y사의 제품을 사용하였으며 각 제품의 성분조성은 Table I과 같다.

시험용 균주

Escherichia coli ATCC 11105를 사용하였다.

원통

바깥지름 7.2~8.1 mm, 안지름 5.9~6.1 mm, 높이 9.9~10.1 mm의 스텐레스강재의 원통을 사용하였다.

배지의 조제

정량용 한천배지

Potassium phosphate monobasic 6.0g

Potassium phosphate dibasic	14.0g
Sodium citrate dihydrate	1.0g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2g
DL-Asparagine monohydrate	8.0g
L-Arginine monohydrochloride	0.2g
L-Glutamic acid	0.2g
Glycine	0.2g
L-Histidine	0.2g
L-Tryptophan	0.2g
L-Proline	0.2g
Ammonium sulfate	2.0g
Glucose	10.0g
Agar	15.0g
을 달아 2차 증류수를 넣어 1l로 하고 멸균 후의	

Table II—Diameter of Growth Zone for Each Standard Concentration (mm)

Plate No.	Standard solution concentration (μg/ml)							
	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35
1	10.4	13.6	16.2	19.0	19.9	20.6	21.6	22.4
	10.2	13.1	15.7	17.1	18.6	20.9	21.9	22.0
2	10.1	13.5	16.0	17.8	18.7	20.5	21.5	22.7
	10.3	13.3	16.1	16.9	19.5	20.2	22.0	22.6
3	10.4	13.2	15.8	18.1	19.3	20.2	21.9	22.6
	10.2	13.3	16.3	17.4	19.2	20.9	22.1	21.9
Mean	10.3	13.3	16.0	17.7	19.2	20.5	21.8	22.4
± SD	± 0.12	± 0.19	± 0.23	± 0.77	± 0.49	± 0.37	± 0.23	± 0.34

pH가 6.8~7.2이 되도록 하였다.

시험균 이식용 한천배지

펩톤 10.0g
 육액가스 5.0g
 염화나트륨 2.5g
 한천 14.0g

을 달아 2차 증류수를 넣어 1l로 하고 멸균 후의 pH가 6.5~6.6이 되도록 하였다.

시험균 용액의 조제

시험균을 사면으로한 시험균 이식용 한천배지에 37°C에서 18~20시간 계대배양 후 이 사면 시험균 이식용 한천배지에 생리식염수 10 ml를 넣어 발육한 균을 모아 부유시켜 균액으로 하였다.

상용표준액의 조제

상용표준품 25 mg(역가)을 정확히 취하여 25% ethanol로 용해시켜 1.0 μg/ml의 표준용액을 만들고 이를 2차 증류수로 희석하여 0.1 μg/ml 및 0.2 μg/ml이 함유하도록 하여 상용표준액으로 하였다.

검액의 조제

검체를 정확히 취한 후 1차 증류수를 넣어 진탕 여과후 희석하여 상용표준액과 같은 농도를 함유하도록 하여 검액으로 하였다.

원통한천평판의 조제 및 계산

정량용 한천배지 300 ml에 조제된 시험균 용액 10 ml를 넣어 혼합한 후 페트리 접시(안지름 100 mm)에 20 ml씩 분주하여 평판을 만들고 4개의 원통을 이 평판위에 정치시켰다. 원통한천평판 5개를 1군으로 하며 각 원통한천평판의 제 1원통에는 고농도의 표준용액(S_H), 제 2원통에는 저농도의 표준용액(S_L)을 넣었다. 나머지 2개의 원통에는 고농도 검체(U_H) 및 저농도 검체(U_L)를 각각 넣고 32~37

°에서 16~18시간 배양하였다. 배양 후 각각의 성장환의 지름(mm)을 0.1 mm까지 측정하였다. 검체 중의 역가는 다음 식에 의해 계산하였다.

채취한 검체의 역가=A×고농도 상용표준액 1 ml 중의 역가×고농도 검액의 희석비율

$$\text{단, } \log A = \frac{IV}{W}$$

$$I = \log \frac{S_H \text{의 역가}}{S_L \text{의 역가}}$$

$$V = (\Sigma U_H + \Sigma U_L) - (\Sigma S_H + \Sigma S_L)$$

$$W = (\Sigma U_H + \Sigma S_H) - (\Sigma U_L + \Sigma S_L)$$

S_H, S_L, U_H 및 U_L 각 원통평판의 성장환 지름(mm)의 합을 각각 ΣS_H, ΣS_L, ΣU_H 및 ΣU_L로 한다.

S_H; 고농도 상용표준액

S_L; 저농도 상용표준액

U_H; 고농도 검액

U_L; 저농도 검액

실험 결과

농도별 성장환 검토

비타민 B₁₂ 상용표준용액의 농도별(0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 μg/ml) 시험용균(*E. coli*)의 성장환을 측정된 값은 Table II와 같고 비타민 B₁₂의 농도를 X축, 성장환의 크기를 Y축이라 하였을 때 표준액으로부터 구한 이들의 정량범위는 0.05~0.3 μg/ml이었고 최소자승법으로 구한 직선의 방정식은 Y=32.68X+12.32(r=0.9892)이었으며 검량선은 Fig. 1과 같이 양호한 직선관계임을 알 수 있었다.

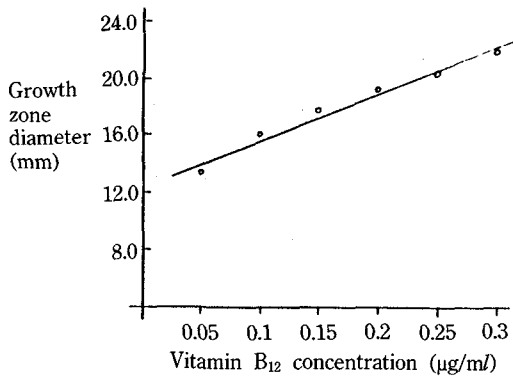


Figure 1—Calibration curve of vitamin B₁₂.

재현성

Table III은 상기 원통평판조제 및 계산방법으로 비타민 B₁₂ 표준용액을 조제하여 고농도 0.2 µg/ml, 저농도 0.1 µg/ml로 한후 5회 동일조작 정량하여 얻은 측정값의 평균값은 102.4%, 표준편차는 2.18%이었다.

회수율

실험과정의 회수율을 측정하기 위해 표준용액을

Table V—Content of Vitamin B₁₂ in Various Preparations

Test No.	C company (labeled content)	H company (syrup)	Y company (granule)	Y company (tablet)	Y company (injection)
	2.0 µg/ml	5.0 µg/1.5g	5.0 µg/Tab.	5.0 µg/2 ml	
1	100.7%	110.3%	109.2%	114.4%	
2	101.6%	109.5%	111.5%	118.9%	
3	103.6%	112.8%	110.3%	112.8%	
Mean	102.0	110.9	110.3	115.4	
± SD	± 1.48%	± 1.72%	± 1.15%	± 3.16%	

조제한 후(25 µg/ml) 시료에 5~25 µg/ml씩 첨가하여 비타민 B₁₂의 회수율을 검토한 결과 Table IV와 같았다. Table IV에서처럼 제제에서의 비타민 B₁₂ 회수율은 100.94%이었고 표준오차(standard error)는 1.83%로 나타나 회수율이 양호함을 알 수 있었다.

분석 실례

제형에 따른 분석방법의 적용가능성을 검토하기 위하여 시판품 중에서 제형별로 1개 제품을 선정하여 1개 시료에 대해 3회 분석한 결과는 Table V와 같았다.

Table III—Reproducibility of Vitamin B₁₂ in Preparation

Test No.	**S _H	* Growth zone diameter (mm)				Vitamin B ₁₂ (%)
		S _L	U _H	U _L		
1	86.4	77.8	86.7	78.6	104.7	
2	87.5	79.0	86.6	79.7	99.1	
3	84.6	74.4	85.8	74.4	103.9	
4	90.5	78.8	90.4	79.7	102.5	
5	84.8	72.9	85.7	72.6	101.7	
					Mean ± SD : 102.4 ± 2.18	

*mean diameter of 5 plate

**S_H; standard high concentration (0.2 µg/ml); S_L; standard low concentration (0.1 µg/ml); U_H; sample high concentration (0.2 µg/ml); U_L; sample low concentration (0.1 µg/ml)

Table IV—Recovery of Vitamin B₁₂ in Preparation

Test No.	Growth zone diameter (mm)				Add (µg/ml)	Found (µg/ml)	Recovery (%)
	S _H	S _L	U _H	U _L			
1	91.0	78.9	93.0	77.4	5.0	5.13	102.60
2	90.1	76.5	90.8	75.9	10.0	10.04	100.38
3	90.8	75.9	91.8	75.3	15.0	15.18	101.20
4	91.2	75.3	90.1	76.2	20.0	19.62	98.10
5	89.4	76.4	90.4	76.0	25.0	25.61	102.44
						Mean	100.94
						S.E	1.83

S_H; standard high concentration (0.2 µg/ml); S_L; standard low concentration (0.1 µg/ml); U_H; sample high concentration (0.2 µg/ml); U_L; sample low concentration (0.1 µg/ml)

결 론

원통평판법에 의한 비타민 B₁₂의 정량분석을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 0.01 µg/ml부터 정량은 가능하였으나 0.05 µg/ml부터 0.30 µg/ml까지 직선성이 양호하였다.

2) 재현성을 검토한 결과 평균값은 102.4%, 표준편차는 2.12%으로 양호하였다.

3) 5개 농도에서 회수율을 검토한 결과 회수율은 100.94%이었으며 표준오차는 1.83%으로 양호하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 원통평판법을 이용한 비타민 B₁₂의 정량분석법은 복잡한 조작 및 표준관리의 어려움이 있는 비탁법을 대신하여 비타민 B₁₂ 함유제제에서 비타민 B₁₂를 간편하게 분석할 수 있는 방법이라 사료된다.

문 헌

- 1) W.H. Ott, E.L. Rickes and T.R. Wood, 'Activity of crystalline vitamin B₁₂ chick growth', *J. Biol. Chem.*, **174**, 1047 (1948).
- 2) W.H. Ott, 'Further studies on the activity of crystalline vitamin B₁₂ for chick growth', *Poultry Sci.*, **30**, 86 (1951).
- 3) D.V. Frost, H.H. Fricke and H.C. Spouth, 'Rat growth assay for vitamin B₁₂', *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **72**, 102 (1949).
- 4) M.M. Marsh and N.R. Kuzel, 'Separation and determination of crystalline vitamin B₁₂ in synthetic vitamin mixtures', *Anal. Chem.*, **23**, 1773 (1951).
- 5) P.J. VanMelle, 'A chemical method for vitamin B₁₂ concentration in liver injection', *J. Am. Pharm. Assoc.*, **45**, 26 (1956).
- 6) J. Lens, H.G. Wijmenga, R. Wolff, R. Karlin, K.C. Winkler and P.G.D. Hann, 'Vitamin B₁₂, III. The assay of vitamin B₁₂', *Biochem. Biophys. Acta.* **8**, 56 (1952).
- 7) H. Cords and O.T. Ratycz, 'The quantitative determination of cyanocobalamin', *Drug Standard*, **27**, 132 (1959).
- 8) C.F. Bruening and O.L. Kline, 'Rapid determination of the relative purity of vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) in pharmaceutical products', *J. Pharm. Sci.*, **50**, 537 (1961).
- 9) Pharmacopoeia of the United States XVIII, Mack Printing Co., Easton, Pa., 1970, pp. 153, 887.
- 10) G.O. Rudkin and R.J. Taylor, 'Chemical method for determining vitamin B₁₂', *Anal. Chem.*, **24**, 1155 (1952).
- 11) R.K. Mitra, P.G. Bose, G.K. Ray and Mukerji, 'A colorimetric method for estimation of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparation', *Indian J. Pharm.*, **24**, 152 (1962).
- 12) M.A.H. Sharif, 'Estimation of vitamin B₁₂ by colorimetric determination of cobalt', *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **1**, 160 (1958).
- 13) D. Monnier, Y. Ghalioungi and R. Saba, 'Determination of traces of vitamin B₁₂', *Anal. Chim. Acta.*, **28**, 30 (1963).
- 14) D. Monnier and Y. Ghalioungi, 'Measurement of traces of vitamin B₁₂', *Ghimia (Switz.)*, **16**, 340 (1962).
- 15) G.E. Boxer and J.G. Rickards, 'Chemical determination of vitamin B₁₂. II. The quantitative isolation and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide', *Arch. Biochem.*, **30**, 372 (1951).
- 16) G.E. Boxer and J.C. Rickards, 'Chemical determination of vitamin B₁₂. III. Methods for the quantitative and specific release of the cyano group of vitamin B₁₂', *Arch. Biochem.*, **30**, 382 (1951).
- 17) G.E. Boxer and J.C. Rickards, 'Chemical determination of vitamin B₁₂. IV. Assay of vitamin B₁₂ in multivitamin preparations and biological materials', *Arch. Biochem.*, **30**, 392 (1951).
- 18) D. Monnier, R. Saba and Y. Ghalioungi, 'Determination of traces of vitamin B₁₂ by means of its GN group', *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2558 (1963).
- 19) D.G. Berge, R.T. Pflaum, D.A. Lehman and G.W. Frank, 'Indirect determination of organic compounds by atomic absorption spectrophotometry. The study of vitamin B₁₂ in pharmaceutical dosage forms', *Anal. Letters*, **1**, 613 (1968).

- 20) F.A. Bacher, A.E. Boley and C.E. Shonk, 'Radioactive tracer assay for vitamin B₁₂ and other cobalamin in complex mixtures', *Anal. Chem.*, **26**, 1146 (1964).
- 21) L. Cima and R. Mantivan, 'Cyanocobalamin and hydroxycobalamin separation by thin-layer chromatography', *Farmaco (Pavia). Ed. Part.*, **17**, 473 (1962).
- 22) L. Cima, C. Levorato and R. Mantovan, 'Qualitative and quantitative analysis of cobalamins in hepatic extracts and pharmaceutical preparation', *Farmaco (Pavia), Ed. Part.*, **21**, 244 (1966).
- 23) T. Elsasser and J. Adler, 'A contribution to vitamin B₁₂ determination with *Euglena*', *Pharmazie*, **8**, 984 (1953).
- 24) H.R. Skeggs, H.M. Nepple, K.A. Valentik, J.W. Huff and L.D. Wright, 'Observations on the use of *Lactobacillus leichmannii* 4797 in the microbiological assay of vitamin B₁₂', *J. Biol. Chem.*, **184**, 211 (1950).
- 25) H.T. Thompson, L.S. Dietrich and C.A. Elvehjem, 'The use of *Lactobacillus leichmannii* in the estimation of vitamin B₁₂ activity', *J. Biol. Chem.*, **184**, 175 (1950).
- 26) The National Formulary, and 13th ed., American Pharmaceutical Association, Washington, D.C. 20037, 1970. pp. 892, 793.
- 27) J.E. Ford, 'The microbiological assay of vitamin B₁₂. The specificity of the requirement to *Ochromonas malhamensis* for cyanocobalamin', *Brit. J. Nutrition*, **7**, 299 (1953).
- 28) Frederick, Kavanagh, *Analytical Microbiology*, 2nd ed. Academic Press, p. 527-546 (1963).
- 29) Joon-Yong Sohn, Song-Ja Lee, 'A study on micro-bioassay of vitamin B₁₂', *Annual Report of NIH, Korea*, 1963.
- 30) 항생물질의약품 기준 1986. 보건사회부.