

바이칼린 함유 생약의 제제화 및 생체이용률 (제3보) : 황금 및 황련 공침물의 포접화합물 제조 및 생체이용률에 관한 연구

양재현[†] · 신상철* · 류희두
우석대학교 약학대학, *전남대학교 약학대학
(1996년 12월 20일 접수)

Preparation and Bioavailability of Oriental Medicine Containing Baicalin (III) : Preparation of Inclusion Complex and Bioavailability of Coprecipitated Product of *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*

Jae-Heon Yang[†], Sang-Chul Shin* and Hee-Doo Yoo

College of Pharmacy, Woosuk University, Cheon-ju 565-800, Korea
*College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Received December 20, 1996)

Precipitation was formed during the preparation of decoction from a mixture of *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*. Baicalin and berberine were identified in this coprecipitated product (CPP) and these components were the active ingredients of two herbal medicine. We extracted respectively crude baicalin and berberine in *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* and prepared coprecipitate of crude baicalin-berberine. To increase the stability and bioavailability of coprecipitate of crude baicalin-berberine(CBB), which is slightly soluble drug, its inclusion complex was prepared and studied in this experiment. Inclusion complex of CBB with β -cyclodextrin(CBB- β -CD) was prepared by freeze drying method and its characteristics were ascertained by means of solubility test, differential thermal analysis(DTA) and scanning electron microscope(SEM). The type of CBB- β -CD is classified as A₁-type on phase solubility diagram, and the stoichiometric ratio of CBB(baicalin in CBB) : β -CD complex is 1:1 and formation constant is 151 M⁻¹. The solubility, dissolution, in situ absorption and serum concentration of CBB- β -CD were significantly increased when compared to CBB. Therefore enhanced bioavailability of CBB by inclusion complexation with β -cyclodextrin might be useful for dosage form design of active ingredients of two herbal medicine.

Keywords—*Scutellariae Radix*, *Coptidis Rhizoma*, Coprecipitate, Baicalin, Berberine, Inclusion complex, β -cyclodextrin.

황금에 함유되어 있는 유효성분인 바이칼린은 플라보노이드의 일종으로 주된 약리작용은 담즙 배설 촉진 작용, 이뇨작용, 항알러지작용, 항균작용, 항진균작용, 위액분비억제작용, 혈압강화작용 등이 알려져 있다.¹⁾ Takagi 등²⁾은 황금의 수용성 성분에 관한 연구에서 바이칼린 외에 새로운 5종의 플라보노이드를 분리하여 확인하였고, Tomimori 등³⁾은 황금의 메탄올 엑스로부터 20여 종의 플라보노이드를 분리하여 보고하였다. Takino 등⁶⁾은 주성분인 바이칼린외에 7종의 플라보노이드를 분리 정량하였으며, Choi 등⁷⁾은 「황금 지표

성분의 확인 및 바이칼린의 정량」에서 박층크로마토그래피 및 고속액체크로마토그래피에 의하여 바이칼린 및 wogonine 등을 분리 동정하였다. Kimura 등⁸⁻¹⁰⁾은 황금 성분이 흰쥐의 간에서 지질 산화 작용을 억제함으로써, 혈청 중 중성 지방과 유리 지방산의 함유량을 감소시키고, 에탄올 섭취에 의하여 유발된 고지혈증에도 효과가 있음을 보고하였다.

베르베린은 황련, 황백 및 히드라스티스 등과 그 동속 식물에 함유되어 있는 isoquinoline계 alkaloid¹¹⁾로서 그람 양성 및 음성균과 곰팡이, 원충류 등에 대한 광범위한 항균 작용¹²⁾을 가지고 있으며 항염증작용, 혈압강화작용, 지혈작용, 고미건위작용, 정장·지사작용

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

및 항암작용 등¹³⁻¹⁷⁾이 있는 것으로 알려져 있다. No-guchi 등¹⁸⁾은 황련의 주성분인 베르베린이 glycyrrhizin과 이온결합을 하여 berberine glycyrrhizinate를 생성함으로써 베르베린의 약리작용에 변화를 초래한다고 보고하였으며, Mori 등¹⁹⁾은 berberine glycyrrhizinate를 무고미 위장관 치료제로, Hayashi 등²⁰⁾은 항염증, 항궤양 치료제로 사용할 수 있음을 보고하였다.

澤田 등²¹⁾은 베르베린제제의 생체내 이용률을 향상시키기 위하여 berberine chloride의 메탄올 용액에 tannic acid를 가하여 염산염의 강한 쓴맛을 없앤 berberine tannate를 합성하였으며, Yang 등²²⁾은 berberine pamoate를 합성하여 베르베린의 장내농도를 높게 유지시킴으로써, 장내 살균 및 지사효과를 증대시키고자 하였다.

황금과 황련 배합 처방의 한방탕제에서는 다량의 침전이 생성되는데 이 침전의 주요 성분은 전보고²³⁾에서 바이칼린과 베르베린으로 확인되었으며 주요 활성 물질이다. 이 침전물은 물에 난용성이며 에탄올에 약간 녹는다. 이 침전물 중 바이칼린과 베르베린은 1대1 몰비로 침전을 생성하는 것으로 보고된 바 있다.

Cyclodextrin은 환상화합물로 난용성 약의 용해성 향상²⁴⁾, 용출속도의 증가²⁵⁻²⁷⁾ 및 생체이용률의 향상^{28,29)} 등에 사용되어 왔다.

본 연구의 목적은 황금-황련 배합 처방의 생체이용률을 높이기 위해 황금과 황련 중 바이칼린과 베르베린을 각각 고농도로 추출한 후 조 바이칼린-베르베린 공침물(이하 CBB로 약함)을 제조하였으며, 이를 β -cyclodextrin과 포접화합물을 제조하였다.

따라서, CBB를 β -cyclodextrin과 동결건조법으로 포접화합물을 제조한 후 포접화합물 형성을 용해도법, 결합조성비, DTA, SEM 등으로 확인하고, 유수분배계수와 pKa를 측정하였다. 또한 용출실험, 소장흡수 실험 및 혈중농도로부터 포접화합물의 생체이용률을 상호 비교하였다.

실험방법

시약 및 기기

시료생약으로는 우리 나라에서 흔히 재배되고 있는 황금(*Scutellaria baicalensis* Georg.), 황련(*Coptis japonica* Makino)을 시중 전채상에서 구입하여 사용하였고 berberine hemisulfate (Sigma Chem. Co.)

와 baicalin(Wako Chem. Co.) 및 β -cyclodextrin (Sigma Chem. Co.)은 표준품을 사용하였으며 기타 시약은 특급 혹은 일급 시약을 사용하였다.

기기로는 분광광도계(Shimadzu, Model UV-250), 용출시험기(Tokyo Rikakikai Co.), 회전감압건조기(Eyela Co.), 동결건조기(Labconco Co. USA), 고속액체크로마토그래프(YoungIn, Model M 720), 주사형 전자 현미경(Hitachi S-510형), SSC 5200 Thermal Analysis System (Seiko Co.), 장환기(Samsung Pharm. Co.), 제환기(Samsung Pharm. Co.) 및 원심분리기(Vision scientific Co.) 등을 사용하였다.

실험 동물

랫트는 SD계 수컷으로 체중 200 ± 20 g, mouse는 ICR계 수컷으로 체중 20 ± 2 g를 사용하였으며 고휘사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시료의 제조

황금-황련 공침물의 제조—황금 및 황련 50 g씩을 조절로 하여 각각 플라스크에 넣고 증류수 500 ml씩을 넣어 1시간 동안 가열 추출한 후 온시 여과하고 양쪽 여액을 혼합시킨 다음 실온에서 하룻밤 방치하였다. 생성된 침전을 여과지를 사용하여 여과하고 침전을 취하여 동결건조기 (-66°C , 10 mmHg)내에서 24시간 건조시켜 황갈색 분말(이하 CPP로 약함)을 얻었다.

황금-황련 Ex. 추출액의 공침물 제조—황련 Ex. 10 g을 취하고 soxhlet추출기로 메탄올(100 ml) 침출을 4시간 하고 원통여지에 석출된 물질을 취한다. 황금 Ex. 10 g을 취하고 soxhlet추출기로 메탄올(100 ml) 침출을 5시간동안 하고 원통여지에 석출된 물질을 취하여 메탄올로 재결정하였다. 조 바이칼린에 교반하면서 10% KOH용액을 1적씩 가하여 징명하게 된 용액과 조 베르베린 용액을 가온 혼합한 후 0.1N H_2SO_4 용액을 가지고 pH 3.0으로 조절하여 24시간 실온 방치 후 상정액을 따르고 농축하여 동결건조(-66°C , 10 mmHg)시켜 분말을 얻었다.

바이칼린-베르베린 표준액의 공침물 제조 및 확인—표준품 베르베린 $\cdot 1/2\text{SO}_4$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4 \cdot 1/2\text{SO}_4$) 17.2 mg과 표준품 바이칼린($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$) 20 mg을 각각 20 ml의 증류수에 용해하고 표준품 바이칼린 용액에 교반하면서 10% KOH용액을 1적씩 가하여 징명하게 한 다음 가온 혼합한 후 0.1N H_2SO_4 용액을 가지고 pH 3.0으로 조절하여 24시간 실온 방치 후 상정액을 따르고 동결 건조(-66°C , 10 mmHg)시켜 분말로 하였다.

생성된 바이칼린-베르베린 표준액 공침물의 확인을

위해 TLC 및 흡광도 측정을 하였다. TLC는 전개용매를 부탄올·빙초산·물(7:1:2) 혼합용매를 사용하였고 박층은 Kieselgel 60 F₂₅₄, 반점의 확인은 UV Lamp (254 nm, 356 nm)를 사용하였고 Rf치를 구하였다.

흡광도측정에 의한 확인은 베르베린·1/2SO₄, 바이칼린 및 바이칼린-베르베린 표준액 공침물 (베르베린·1/2SO₄를 기준)을 10 µg/ml농도에서 200 nm에서 500 nm까지의 흡수스펙트럼을 비교측정하였다.

HPLC에 의한 주성분의 정량

시료 CPP와 CBB중에 함유되어 있는 바이칼린과 베르베린의 확인 및 정량은 Choi 등⁷⁾의 HPLC 정량법을 이용하였다.

각 시료 20 mg을 달아 가온하여 녹이고 전량을 200 ml로 한 후 검액으로 하였으며 따로 표준품 바이칼린-베르베린 20 mg을 200 ml에 녹인 후 표준액으로 사용하였다. 검액 및 표준용액에 내부 표준물질로써 phenol을 가한 후 HPLC에 주입하여 크로마토그램을 얻었으며 내부 표준 물질과 각각 바이칼린 및 베르베린의 peak면적비를 구하여 작성한 검량선으로부터 시료 중 바이칼린과 베르베린의 함량을 정량하였다. 칼럼은 µ-Bondapak C₁₈(Waters, ID 3.9 mm×30 cm), 검출기는 UV-detector(272 nm), 이동용매로는 acetonitrile : 0.5% phosphoric acid(27 : 73 v/v)를 사용하였다.

포접화합물 형성에 따른 특성시험

용해도 시험—β-cyclodextrin(이하 β-CD로 약함) 용액을 1×10⁻³~9×10⁻³M범위에서 여러 가지 농도로 제조한 후 10 ml씩 취하고 여기에 각각 CBB 10 mg을 정확히 칭량하여 넣고 1시간 진탕한 후 25°C에서 7일간 방치시켜 평형에 도달하게 한 다음, 이 용액을 membrane filter(0.45 µm)로 여과하고 적당히 희석하여 최대흡수파장 272 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검량선으로부터 CBB의 용해량을 산출하였다.

안정도 정수의 산출—Higuchi 등³⁰⁾의 방법에 따라 용해도 diagram으로부터 최소사승법에 의해 다음 식에 따라 용해도법에 의한 겉보기 안정도 정수 K를 산출하였다.

$$K = \frac{(St - So)}{[St - (St - So)][Lt - (St - So)]}$$

$$= \frac{\text{slope}}{\text{intercept}(1 - \text{slope})}$$

여기서, Lt는 β-CD의 첨가 농도이고, St는 β-CD 첨가시의 약물의 포화농도이며, So는 약물 자체의 용해도이다.

결합조성비 결정—Otagiri 등³¹⁾ 연속 변화 비법에 의해 CBB(1×10⁻³ M 바이칼린 in CBB)와 β-CD(1×10⁻³M)를 사용하여 각각의 몰비를 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1의 비율로 조제하여 1시간 진탕시킨 다음 25°C에서 7일간 방치시켜 평형에 도달하게 한 다음, membrane filter (0.45 µm)로 여과하고 적당히 희석하여 최대흡수파장 272 nm에서 UV흡광도를 측정하였다.

포접화합물의 제조—Kurozumi 등³²⁾의 방법에 따라 CBB(5×10⁻⁴M 바이칼린 in CBB)와 β-CD(5×10⁻⁴M)를 증류수 35 ml에 가하고 여기에 28% 암모니아수 7적을 가하여 용해시킨 후 동결 건조시켰다.

얻어진 분말을 진공 하에서 건조시켜 검체(이하 CBB-β-CD로 약함)로 하였다. 검체 중의 암모니아 이온 유무를 네슬러 시약을 사용하여 확인하였다 (Scheme IV).

시차 주사 열량 분석(DTA)—시료 10 mg을 10°C/min의 승온 속도로 130~280°C의 온도 범위에서 표준 물질로 alumina를 사용하여 질소 가스를 70 ml/min로 주입하면서 CBB와, β-CD단독, CBB와 β-CD의 물리적 혼합물(1:1몰비) 및 동일 몰비의 포접화합물의 DTA thermogram을 측정하여 비교하였다.

주사형 전자현미경 관찰—CBB와 CBB-β-CD시료를 200 mesh체를 통과시킨 다음 금 증착기(ID-3, Eiko Engineering Ioncoater)에 넣고 진공도 0.15 Torr 및 6-7 mA의 조건에서 입자표면을 7분간 순금으로 피복한 후에 시료를 주사형 전자현미경 본체(Hitachi S-510형)내에 장착하고 가속 전압 15 kV에서 각 입자를 관찰하였다.

유수분배계수 측정 및 pKa산출

CPP, CBB 및 CBB-β-CD의 유수분배계수실험은 Higuchi 등³³⁾의 방법에 의하여 실험하였다. 진분배계수(Pm)는 CPP, CBB 및 CBB-β-CD를 수상으로 각각 0.1N HCl용액에 1×10⁻³M이 되도록 용해시키고, 이를 각각 분액 깔대기에 10 ml씩 넣고, 유상으로 n-octanol, CHCl₃를 10 ml씩 가한 다음 실온에서 1시간 진탕시켜 평형에 도달시킨 다음 24시간 방치하여 수상을 취하여 pH를 측정한 후 3000 rpm으로 15분간 원심분리시킨 후 희석하여 최대흡수파장 272 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의하여 진분배계수를 산

출하였다.

$$K_o/w = \frac{A_s - A_w}{A_w} = \frac{C_s - C_w}{C_w}$$

여기서 A_s 및 A_w 는 평형에 도달하기 전후의 수층에서의 약물의 흡광도를, C_s 및 C_w 는 평형에 도달하기 전후의 수층에서의 약물농도를 각각 나타낸다.

겉보기 분배계수(P_{app})는 CPP, CBB 및 CBB- β -CD를 각각 0.1M 인산염 완충액(pH 6.8)으로 1×10^{-3} M이 되도록 용해시키고 위와 같은 방법으로 조작한 후 pH를 측정하고 적당히 희석하여 최대흡수파장 272 nm에서 흡광도를 측정하여 분배농도를 구하고 위 식에 따라 계산하였다. P_m 과 P_{app} 값을 구한 후 다음 식에 따라 pKa를 산출하였다.

$$pKa = pH + \log \frac{P_{app}}{P_m - P_{app}}$$

환제의 제조 및 용출시험

분쇄하여 50호체를 통과시킨 CPP, CBB 및 CBB- β -CD 20 mg을 정확히 취하여 각각 lactose 와 starch paste를 넣고 혼합 반죽하고, 장환기를 사용하여 pill pipe를 만든 다음 제환기 및 성환기를 이용하여 환을 제조하고 kaolin으로 환의를 입힌 후 50°C에서 3시간 열풍건조하여 중량 100 mg의 환제를 제조하였다.

제조한 환제를 Miyazaki 등³⁴⁾의 방법에 따라 용출 시험을 시험하였다. 각 환제를 sinker에 넣어 미리 온도를 조절한(37±0.5°C) 용기 중의 0.1N HCl 용액(pH 1.2) 및 인산염 완충액(pH 6.8)의 바다에 놓은 다음 paddle을 100 rpm으로 회전시키면서 시간별로 용출액을 채취하여 여과한 후 최대흡수파장 272 nm에서 흡광도를 측정하여 용출률을 계산하였다.

In situ 흡수시험

Barr's method³⁵⁾를 변형하여 시험하였다. 랫트를 24시간 절식시킨 후 회복하여 위, 십이지장 및 공장 부위를 각각 10 cm씩 잘라내고 생리식염수를 가하여 장내 이물을 제거한 다음 공기를 주입하여 남아 있는 생리식염수를 제거하였다. CPP, CBB 및 CBB- β -CD를 바이칼린 기준으로 5 mg/ml가 되도록 0.5% Na-CMC로 현탁시켜 잘라낸 장에 1 ml씩 가하고 양단을 묶은 후 생리식염수 100 ml속에 넣고 37±0.5% 수욕상에서 95% O₂-CO₂가스를 공급하며 10, 20, 40, 80, 100, 120분 후에 생리식염수 1.5 ml를 취하고 여과해서 HPLC로 분석하였다.

혈중농도 측정

Mouse를 24시간 동안 절식시킨 후 CPP, CBB 및 CBB- β -CD를 베르베린 기준으로 8 mg/ml가 되도록 0.5% sodium CMC에 현탁시켜 0.5 ml(20mg/kg)씩 경구투여 하였다. 30, 60, 90, 120, 150 및 180분 경과 후 단두하여 혈액을 채취하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 메탄올을 가하고 다시 원심분리하여 상정액을 membrane filter(0.45 μ m)를 통과시킨 다음 HPLC로 피크의 면적비를 측정하여 혈중 베르베린 농도를 구하고 약물동태학적 파라미터를 산출하였다.

실험결과

바이칼린-베르베린 표준액의 공침물 확인

베르베린 · 1/2SO₄, 바이칼린 및 표준품 바이칼린-베르베린 공침물의 TLC실험에 의하여 나타난 반점의 Rf치는 베르베린 · 1/2SO₄가 0.40, 바이칼린이 0.29였으며 표준품 바이칼린-베르베린 공침물의 Rf치는 0.37로 상이한 위치에서 나타났다.

또한 UV흡수 스펙트럼에서 흡수극대가 베르베린 · 1/2SO₄는 425 nm, 343 nm, 262 nm 및 226 nm였고 바이칼린은 317 nm, 276 nm 및 213 nm인 반면 표준품 바이칼린-베르베린의 공침물은 425 nm, 330 nm, 272 nm 및 215 nm에서 흡수극대를 나타냈다(Figure 1).

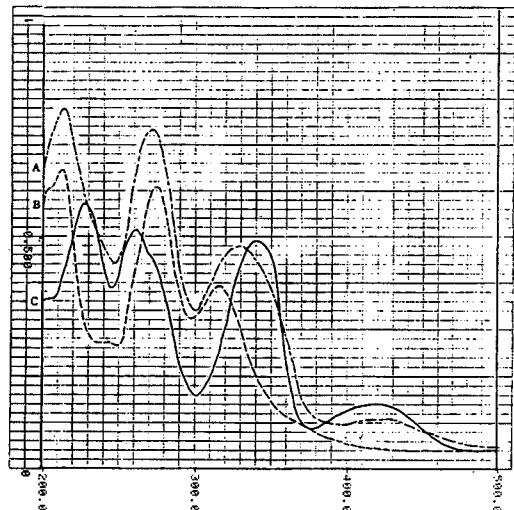


Figure 1— Absorbance spectra of baicalin, berberine and coprecipitate of baicalin-berberine. key : A : coprecipitate of baicalin-berberine, B : baicalin, C : berberine

HPLC 확인 및 정량

바이칼린-베르베린 표준액의 공침물 수용액을 HPLC에 주입하였을 때 internal standard인 phenol 은 6.2분에 peak가 나타났고 바이칼린은 8.4분에 나타났으며, 베르베린은 14.9분에 나타났다(Figure 2). 이로 부터 CPP와 CBB중에 함유되어 있는 바이칼린 및 베르베린을 정량하였을 때 CPP중에 바이칼린은 23.0%, 베르베린은 26.7%가 함유되었고 CBB 중에는 바이칼린이

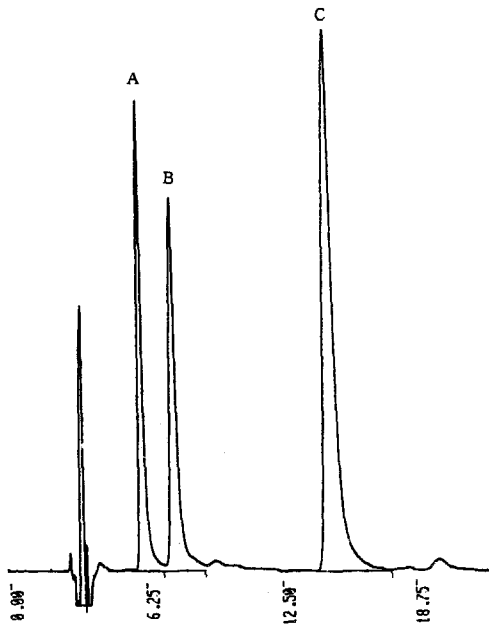


Figure 2—HPLC chromatograms of baicalin and berberine in coprecipitate of baicalin -berberine. key : A : internal standard B : baicalin C : berberine Column : μ -Bondapak C_{18} Detector : UV-detector 272 nm Mobile phase : acetonitrile:0.5% phosphoric acid=27:73 v/v Temp. : room temp. Flow rate : 1.0 ml/min.

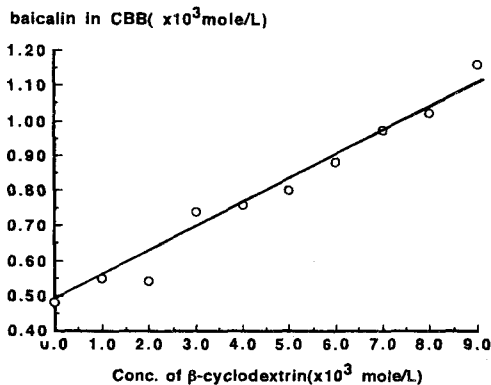


Figure 3—Phase-solubility diagram of CBB- β -CD systems in water at 37°C

36.2%, 베르베린이 41.9%가 함유되어 있었다.

포접화합물 형성에 따른 특성시험

용해도와 안정도 정수— β -CD의 양이 증가함에 따라 CBB의 용해도가 직선적으로 증가하였다(Figure 3). Figure 3의 직선에 대하여 최소자승법으로 구한 결과 $Y=0.070X+0.0005(r=0.991)$ 의 직선을 구할 수 있었다. 안정도 정수를 구한 결과 $K=151M^{-1}$ 의 값을 얻었다.

결합 조성비—연속변화비법에 의하여 최대흡수파장 272 nm에서 흡광도 수치를 비교해 보면 CBB(바이칼린 기준)와 β -CD의 몰비가 5:5일 때 흡광도가 극대이므로 CBB와 β -CD간의 결합조성비는 1:1 몰비임을

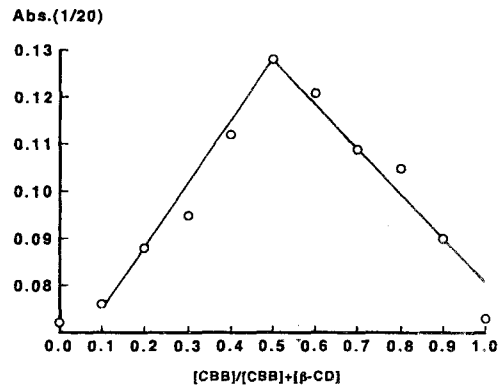


Figure 4—Continuous variation plots of CBB- β -CD systems

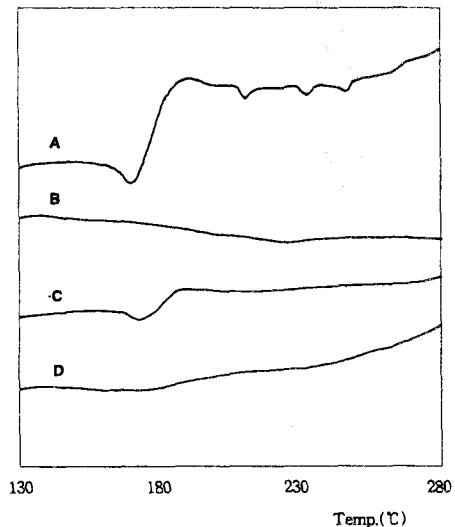


Figure 5—DTA thermograms of CBB- β -CD system. key : A : CBB, B : β -cyclodextrin, C : physical mixture of CBB and β -cyclodextrin in a molar ratio of 1:1, D : CBB- β -CD

알 수 있었다(Figure 4).

시차주사열량분석(DTA)—DTA curve 상에서 보면 172°C에서 CBB의 endothermal peak가 나타나는 반면, CBB-β-CD는 β-CD의 동공 내로 유입된 CBB가 열에 대해 β-CD의 보호를 받게 되므로 포접 화합물의 DTA curve에서는 endothermal peak를 볼 수가 없었으며, 물리적 혼합물은 176°C에서 약한 endothermal peak가 나타났다(Figure 5).

주사형 전자현미경(SEM) 관찰—CBB와 CBB-β-CD의 입자를 주사형 전자현미경으로 관찰하였을 때 CBB는 표면이 거칠고 불규칙적이며 결정형인 반면 CBB-β-CD는 표면이 다소 매끄럽고 단조로운 무정형인 입자가 많음을 관찰할 수 있었다(Figure 6).

유수분배계수 및 pKa 산출

CPP, CBB 및 CBB-β-CD의 진분배계수와 겉보기 분배계수를 비교한 결과 CBB-β-CD의 Pm값은 CBB보다 저조하였으나 Papp값은 훨씬 높아졌다 (Table I). CPP, CBB와 CBB-β-CD의 pKa값은 유상이 n-octanol일 때 3.31, 3.56과 4.27이었고 유상이 CHCl₃일 때 3.93, 3.67과 5.46이었다(Table II).

용출 실험

CPP, CBB 및 CBB-β-CD를 환제로 만들어 용출

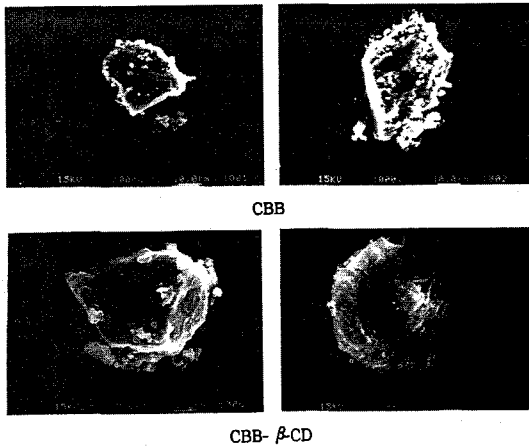


Figure 6—Scanning electron micrographs of CBB and CBB-β-CD

실험을 실시한 결과 용출률이 180분 후에 0.1N HCl (pH 1.2) 용액에서 CPP는 57.4%로 CBB의 54.2%보다 약간 높았으며 CBB-β-CD는 98.3%로 훨씬 더 높

Table II—Comparison of pKa of CPP, CBB and CBB-β-CD by Liquid-Liquid Partition Method

Solvent	pKa		
	CPP	CBB	CBB-β-CD
n-octanol	3.31	3.56	4.27
CHCl ₃	3.93	3.67	5.46

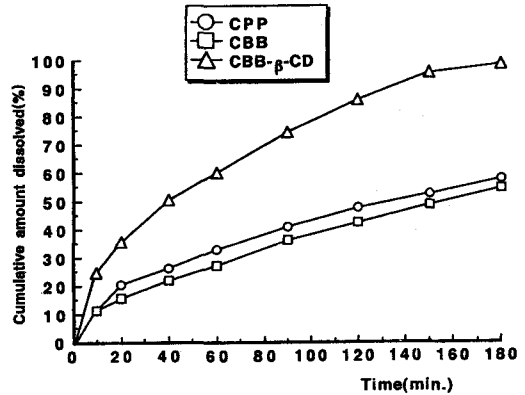


Figure 7—Dissolution profiles of berberine in CPP, CBB and CBB-β-CD under 0.1N HCl (pH 1.2) at 37 ± 0.5°C

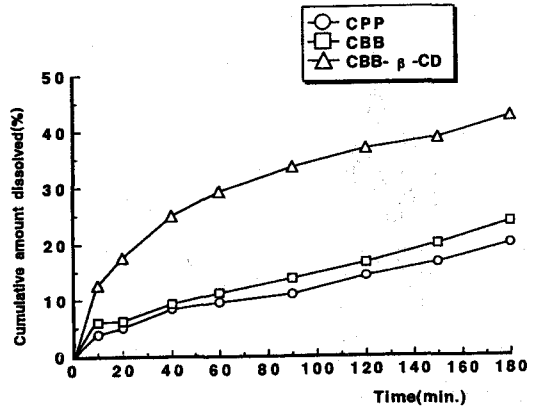


Figure 8—Dissolution profiles of berberine in CPP, CBB and CBB-β-CD under phosphate buffer solution (pH 6.8) at 37 ± 0.5°C

Table I—Comparison of True and Apparent Partition Coefficients of CPP, CBB and CBB-β-CD

Solvent	True partition coefficient			Apparent partition coefficient		
	CPP	CBB	CBB-β-CD	CPP	CBB	CBB-β-CD
n-octanol	1.114	1.541	1.428	0.299	0.205	0.295
CHCl ₃	0.699	1.382	0.720	0.487	0.229	0.578

Table III—Gastrointestinal Absorption rate(%) of Baicalin in CPP, CBB and CBB-β-CD in Rat

organ	class	20	40	60	80	100	120(min)
Stomach	CPP	3.98±0.93	5.5±0.87	7.3±1.72	8.4±1.32	9.48±1.34	12.0±1.95
	CBB	1.4±1.41	3.3±0.99	3.8±1.21	4.6±0.57	7.9±1.14	10.6±0.55
	CBB-β-CD	3.5±1.23	4.8±1.95	6.0±0.92	6.4±1.34	10.4±0.62	13.7±1.28
Duodenum	CPP	3.6±1.88	6.6±2.25	8.7±2.45	10.3±1.76	12.6±1.26	13.7±0.86
	CBB	5.1±1.74	7.7±1.28	9.1±0.46	11.6±0.58	13.5±1.30	15.8±1.46*
	CBB-β-CD	2.4±0.34	4.9±1.31	7.0±0.42	11.8±1.25	27.2±0.93**	34.5±1.72**
Jejunum	CPP	2.4±0.98	5.3±0.53	6.0±1.35	8.8±1.96	10.6±1.67	14.1±2.83
	CBB	3.9±0.50	5.7±1.38	6.2±0.89	9.5±1.76	12.2±0.62	15.2±0.78
	CBB-β-CD	3.9±1.06	5.5±0.87	9.3±1.63*	9.8±0.91	13.0±1.64*	20.6±1.26**

key : Each value represents the mean±SE of 4 assays. *Significantly different from CPP group(*p<0.05, **p<0.01)

Table IV—Gastrointestinal Absorption rate(%) of Baicalin in CPP, CBB and CBB-β-CD in Rat

organ	class	20	40	60	80	100	120(min)
Stomach	CPP	1.±0.18	2.4±0.25	2.9±1.69	3.9±1.46	4.4±0.39	5.2±1.75
	CBB	1.8±0.30	2.4±0.72	3.0±1.23	4.0±0.55	4.9±0.52	5.4±1.80
	CBB-β-CD	2.1±0.51	2.8±1.43	3.5±0.34	4.2±0.76	5.1±1.30	5.8±1.69
Duodenum	CPP	5.2±1.95	6.4±0.68	8.9±1.29	10.8±0.63	13.2±1.51	18.1±1.47
	CBB	6.2±1.53	7.7±0.60	12.7±0.94*	14.6±1.45*	17.1±0.68*	21.4±1.73*
	CBB-β-CD	7.1±1.24	9.3±2.78*	14.2±1.08**	21.9±1.36**	27.2±2.37**	32.8±1.84**
Jejunum	CPP	4.4±0.30	5.7±1.35	7.0±0.41	9.7±1.55	10.6±1.41	12.2±1.71
	CBB	5.3±1.72	6.9±2.40	8.0±1.09	10.7±1.25	15.0±2.20*	16.7±1.39*
	CBB-β-CD	6.7±0.73	10.1±1.40*	13.8±2.57*	16.72±1.09	21.1±1.05**	28.7±1.29**

key : Each value represents the mean±SE of 4 assays. *Significantly different from CPP group(*p<0.05, **p<0.01)

았다(Figure 7).

한편 0.1M phosphate buffer용액(pH 6.8)에서는 CPP는 20.0%였고 CBB는 그보다 약간 높은 23.7%였으며 CBB-β-CD는 그보다 훨씬 높은 42.5%이었다(Figure 8).

In situ 흡수 실험

CPP, CBB 및 CBB-β-CD의 위, 십이지장 및 공장에서 흡수율을 비교한 결과 120분 후 바이칼린은 위에서 CBB-β-CD는 13.7%로 CPP, CBB의 12.0%, 10.6% 보다 약간 높았으며 십이지장에서 CBB-β-CD는 34.5%로 CPP, CBB의 13.7%, 15.8% 보다 훨씬 흡수율이 높았고 공장에서는 CBB-β-CD가 20.6%로 CPP, CBB의 14.1%, 15.2% 보다 높은 편이었다. 장기별로 비교할 때 십이지장에서 가장 흡수율이 높았고 그다음은 공장, 위 순이었다(Table III).

베르베린은 위에서 CBB-β-CD는 5.8%로 CPP, CBB의 5.2%, 5.4% 보다 약간 높았으며 십이지장에서 CBB-β-CD는 32.8%로 CPP, CBB의 18.1%, 21.4% 보다 훨씬 높았고 공장에서 CBB-β-CD는 28.7%로 CPP, CBB의 12.2%, 16.7%에 비하여 상당히 높은 편

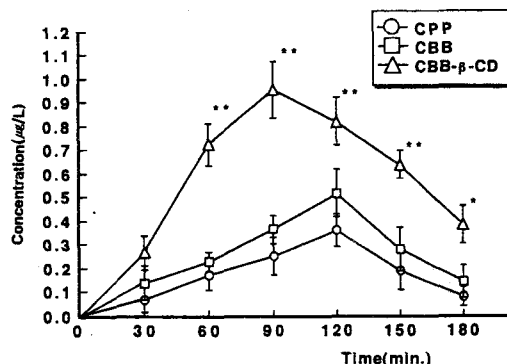


Figure 9—Berberine concentrations in serum of mouse(n=4) after oral administration of CPP, CBB and CBB-β-CD. Each point represents the mean±SE of 4 assays *: significantly different from CPP group (*p<0.05, **p<0.01)

이었다. 장기별로 비교할 때 십이지장과 공장에서 흡수율이 높았으며 위에서는 흡수율이 저조했다. CBB-β-CD는 대체적으로 CPP와 CBB에 비하여 월등히 흡수율이 높았다(Table IV).

혈중 농도

Table V—Pharmacokinetic Parameters of Berberine Contents in Serum of Mouse After Oral Administration of CPP, CBB and CBB- β -CD

	CPP	CBB	CBB- β -CD
C_{max}	0.360 \pm 0.073	0.515 \pm 0.084	0.952 \pm 0.107
K_a	1.98413 \pm 0.0007	1.72506 \pm 0.0009	1.55443 \pm 0.0006
$t_{1/2}$	0.349 \pm 0.052	0.402 \pm 0.076	0.446 \pm 0.034
AUC	0.522 \pm 0.103	0.766 \pm 0.091	1.728 \pm 0.11
K_e	1.72999 \pm 0.0006	1.34389 \pm 0.0008	0.76651 \pm 0.0009
RB	100.0	146.7 \pm 0.062	331.0 \pm 0.037

Each value represents the mean of four assays

C_{max} : the maximum blood concentration(μ g/ml)

K_a : absorption rate constant(hr $^{-1}$)

$t_{1/2}$: biological half life(hr.)

AUC : area under the blood level curve by trapezoidal rule(μ g \cdot ml $^{-1}$ \cdot hr)

K_e : elimination rate constant(hr $^{-1}$)

RB : relative bioavailability to CPP

CPP, CBB 및 CBB- β -CD의 지표물질인 베르베린의 혈중농도를 HPLC로 정량한 결과 CBB- β -CD는 90분 후 0.897 μ g/ml로 최고혈중농도에 도달하였으며 전반적으로 훨씬 높은 혈중농도를 유지하였다(Figure 9).

CBB와 CPP는 이 보다 늦은 120분 후에 각각 0.655, 0.539 μ g/ml로 최고혈중농도에 도달하였으며, CBB가 약간 높게 혈중농도를 유지하였다. 소실속도정수 K_e 는 CBB- β -CD는 0.77이었고 CPP와 CBB는 1.73, 1.34이었으며 AUC값은 CBB- β -CD는 1.728이었고 CPP와 CBB는 0.522, 0.766이었다(Table V).

고 찰

황금과 황련을 각각 가운추출하여 혼합시 다량 생성되는 침전의 주성분은 바이칼린과 베르베린으로 확인되었으며 이들 주성분을 단독으로 혼합할 때 침전이 생성되지 않았지만 이들을 각각 수산화칼륨과 묽은 황산으로 액성을 조절하여 pH 3으로 하였을 때 침전이 발생되었다. 이것으로 바이칼린의 glucuronic acid 중 $-COO^-$ 기와 베르베린의 $-N^+$ 가 산-염기 반응으로 염이 형성되는 것을 예측할 수 있었다.

이 바이칼린-베르베린공침물을 TLC로 분석한 결과 바이칼린과 베르베린의 Rf치인 0.29, 0.40과 다른 Rf치 0.37을 나타냈다. 흡광도를 측정한 결과 Figure 1와 같이 바이칼린-베르베린공침물의 극대흡수파장은 4곳에서 나타났으며 그 중 276 및 213 nm파장은 바이칼린과 425 nm파장은 베르베린과 유사하나 바이칼린

(317 nm)과 베르베린(343 nm)의 중간정도에서 새로운 흡수극대를 나타냄으로서 염형성의 가능성을 보여 주었다. 그러나 공침물에 대하여 acetonitrile과 0.5% phosphoric acid를 이 동상으로 HPLC분석을 한 결과 각각 바이칼린과 베르베린의 위치에서 peak를 나타내고 새로운 peak가 나타나지 않는 것으로 보아 생성된 염이 불안정하여 mobile phase에 의하여 쉽게 가수분해되는 것으로 추측된다. HPLC로 분석시 전보²³⁾에서는 바이칼린과 베르베린의 이동상을 별도로 사용하였는데 이동상을 acetonitrile : 0.5% phosphoric acid = 27:73%로 전개할 때 Rf가 바이칼린은 8.402분이고 베르베린은 14.897분으로 동시에 정량할 수 있었다.

매우 난용성인 황금-황련 Ex.추출액의 공침물(CBB)을 β -cyclodextrin과 포접물을 제조하여 가용화시키기 위한 시도로 β -cyclodextrin의 농도에 따른 CBB의 용해도 실험을 한 결과 Figure 3와 같이 β -cyclodextrin의 양이 증가함에 따라 CBB의 용해도가 직선적으로 증가하였다. 이것은 T. Higuchi and K. A. Connors의 용해도 상도의 분류³³⁾에 의하면 AL-type의 가용성 복합체를 형성한 것으로 분류되며, CBB의 용해도가 증가하는 현상은 host화합물인 β -cyclodextrin과 guest화합물인 CBB사이의 상호작용으로 복합체를 형성하는 것으로 추정된다.

연속변화비법에 의하여 CBB와 β -cyclodextrin의 결합조성비를 구한 결과 Figure 4에서 보이는 것처럼 1:1 몰비로 결합하였으므로 Kuruzumi 등³²⁾의 방법에 따라 동결건조법으로 포접화합물을 제조하였다. 제조한 포접화합물을 확인하기 위해 시차주사열량분석(DTA) 결과 CBB의 172°C등에서 보인 endothermal peak가 포접화합물에서는 나타나지 않아 포접화합물이 생성된 것으로 확인되었다. 또한 주사형 전자현미경(SEM) 관찰 결과 생성된 포접화합물에서 무정형 입자가 많이 관찰되었는데 이를 통해 생체이용률의 율속단계인 용해도가 상당히 증가할 것으로 예측할 수 있었다.

공침물의 pH는 5.0~6.0으로서 약한 산성을 보여 주었으며 유상으로 n-octanol 및 $CHCl_3$ 을 사용했을 때 CBB- β -CD의 pKa값이 4.27 및 5.46으로서 CBB에 비하여 증가됨으로서 흡수가 증진될 것으로 예측되었다.

용출실험 결과 CBB- β -CD가 0.1N HCl에서 98.3%의 용출률을 나타냄으로서 0.1M phosphate buffer(pH 6.8)의 42.5%보다 훨씬 높게 나타났으며 일반적으로 포접화합물의 용출률이 CPP와 CBB에 비해 2배정도 증가된 것을 알 수 있었다.

그러나 *In situ* 흡수실험에서 CBB- β -CD의 흡수율은 위에서 보다 소장에서 흡수율이 높았는데 이것은 위에서 용출률이 높더라도 상대적으로 소장의 표면적이 크고 위내 체류시간이 짧은 것에 기인되는 것으로 사료된다. 바이칼린의 *In situ* 흡수율은 CBB- β -CD가 십이지장에서 CBB에 비하여 2배 이상 높아졌고 베르베린의 흡수율은 50%정도 향상되었다.

혈중농도실험 결과 CBB- β -CD는 CBB에 비하여 30분 정도 빨리 C_{max} 에 도달하여 서서히 소실되었고 전반적으로 포접물의 혈중농도가 높게 유지되어서 AUC가 2.5배정도 높았고 상대생체이용률은 CPP를 100%로 하였을 때 331%로 향상되었다.

결 론

황금과 황련을 각각 전제로 하여 혼합시켰을 때 다량의 침전이 생성되었고 주성분인 황금 중 바이칼린과 황련 중 베르베린을 추출하여 공침시킨 물질과 이 공침물을 가용화시키기 위해 β -cyclodextrin과 포접화합물을 만들어 확인 실험, 용해도 실험, 결합 조성비 결정, 유수분배 계수, 환제의 제조 및 용출 실험, *In situ* 흡수실험, 혈중농도실험 등을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 표준품 바이칼린-베르베린 공침물을 TLC로 확인한 결과 바이칼린과 베르베린의 반점과 다른 위치에서 반점이 나타났으며, 흡광도를 비교하였을 때 흡수 극대가 다른 파장에서 나타나는 것을 확인하였다.

2. CBB와 β -cyclodextrin가 용해도, DTA 및 주사형 전자현미경관찰 결과 CBB가 β -cyclodextrin의 소수성 동공 내로 유입되어 inclusion complex가 형성됨을 알 수 있었다.

3. CBB- β -CD complex형성 양상은 용해도 실험 결과 Higuchi와 Connors 등³³⁾의 분류에 의하면 AL-type에 속하였으며 안정도정수는 $151M^{-1}$ 이었으며 결합조성비는 CBB: β -CD=1:1 이었다.

4. CPP, CBB 및 CBB- β -CD 중에 함유된 베르베린의 용출률은 0.1N HCl(pH 1.2) 용액에서는 CPP와 CBB가 비슷한 양상을 보인 반면, CBB- β -CD는 50% 정도 높게 나타났으며 0.1M phosphate buffer에서는 0.1N HCl(pH 1.2) 용액보다 낮은 용출률을 나타내었지만 상대적으로 CBB- β -CD가 높은 용출률을 나타내었다.

5. CPP, CBB 및 CBB- β -CD 중에 함유된 바이칼린은 위 및 공장에서 CBB- β -CD가 CPP, CBB보다 약간

흡수율이 높았고 십이지장에서는 CBB- β -CD가 CPP, CBB에 비하여 2배정도 흡수율이 높았다. 베르베린은 위에서 각 시료의 흡수율이 저조했으나 CBB- β -CD가 CPP, CBB에 비해 약간 높았고 십이지장 및 공장에서 CBB- β -CD가 CPP, CBB보다 훨씬 높게 나타났다.

6. Mouse에 각 시료를 경구투여시 CPP, CBB 및 CBB- β -CD중에 함유된 베르베린의 혈중 농도는 CBB- β -CD가 CPP와 CBB에 비하여 2배 이상 높은 혈중 농도를 유지하였으며 CPP, CBB가 120분 후 최고 혈중 농도에 도달한 반면 CBB- β -CD는 90분 후 최고혈중농도에 도달하였으며 소실속도정수 K_e 는 CBB- β -CD는 0.77이었고 CPP와 CBB는 1.73, 1.34 이었다.

이상의 실험결과 황금과 황련의 난용성 공침물의 생체이용률을 높이기 위하여 β -cyclodextrin과 포접화합물을 제조하는 것이 유용한 것으로 사료되었다.

문 헌

- 1) 陸昌洙, 金成萬, 漢藥의 藥理成分臨床應用, 癸丑文化社, pp.403-406 (1982).
- 2) S. Takagi, M. Yamaki and K. Inoue, Studies on the water-soluble constituents of the roots of *scutellaria baicalensis*, *Yakugaku Zasshi*, **100**(12), 1220-1224 (1980).
- 3) T. Tomimori, Y. Miyaichi and Y. Imoto, Studies on the constituents of *scutellaria species* (2), *Yakugaku Zasshi*, **103**(6), 607-611 (1983).
- 4) T. Tomimori, Y. Miyaichi and Y. Imoto, Studies on the constituents of *scutellaria species* (3), *Yakugaku Zasshi*, **104**(5), 524-528 (1984).
- 5) T. Tomimori, Y. Miyaichi and Y. Imoto, Studies on the constituents of *scutellaria species* (4), *Yakugaku Zasshi*, **104**(5), 529-534 (1984).
- 6) Y. Takino, T. Miyahara and E. Arichi, Determination of some flavonoids in *scutellariae radix* by HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**(8), 3494-3497 (1987).
- 7) K. J. Choi, S. R. Ko and J. W. Yang, Identification of index components of *Scutellariae Radix* and quantitative determination of baicalin from crude drug preparation, *Kor. J. pharmacogn.*, **21**(2), 158-162 (1990).
- 8) Y. Kimura, M. Kubo and T. Tani, Studies on *Scutellariae Radix*(3), effects on lipid metabolism in serum, liver and fat cells of rat, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(8), 2308-2312 (1981).
- 9) Y. Kimura, M. Kubo and T. Tani, Studies on *Scutellariae Radix*(4), Effects on lipid peroxidation in rat liver, *Chem. Pharm. Bull.*,

- 29(9), 2610-2617 (1981).
- 10) Y. Kimura, M. Kubo and K. Kusaka, Studies on *Scutellariae Radix*(5), effects on ethanol-induced hyperlipemia and lipolysis in isolated fat cells, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(1), 219-222 (1982).
 - 11) 生藥學 研究會, 現代 生藥學, 學窓社, pp 179, 421 (1994).
 - 12) A. H. Amin, K. M. abbasi T. V. subbaiah, berberine sulfate, antimicrobial activity, bioassay and mode of action, *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1067-1076 (1976).
 - 13) T. Sawada, J. Yamahara, K. Goto and M. Yamamura, Studies on the evaluation of crude drugs by bioassay(IV), *Shoyakugaku zasshi*, **25**(2), 74-78 (1971).
 - 14) H. Fujimura, T. Sawada and M. Goto, Screening test of antiinflammatory action on the constituents of crude drugs and plants, *Yakugaku Zasshi*, **90**(6), 782-783 (1970).
 - 15) 陸昌洙, 金成滿, 漢藥의 藥理 成分 臨床應用, 癸丑文化社, pp 406-409 (1982).
 - 16) M. H. Akhter, M. Sabir and W. K. Bhide, Possible mechanism of antidiarrheal effect of berberine, *Indian J. med. Res.*, **70**, 233-241 (1979).
 - 17) W. A. Creasey, Biochemical effect of berberine, *Biochemical Pharmacology*, **28**, 1081-1084 (1979).
 - 18) M. Noguchi, Studies on the pharmaceutical quality of crude drug precipitations used in orient medicine "kampoo" (II), *Chem. Pharm. Bull.*, **26**(9), 2624-2629 (1971).
 - 19) N. Mori and T. Toyama, berberine glycyrrhizinate, Japan, 1394(67), (CI.30)(2). Jan. 23, Appl. 3 (1965).
 - 20) T. Hayashi, M. Kubo and E. Noguchi, Antiinflammatory and antiulcer berberine glycyrrhizinate, Japan kokai, 7862. 1817(Ce. Co 7D445/00), 05 (1978).
 - 21) 澤田弘ら, 日本公定書協會會報, 16, 7 (1966).
 - 22) J. H. Yang, Studies on bioavailability of berberine pamoate(1), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **16**(2), 78-84 (1986).
 - 23) J. H. Yang, Preparation and bioavailability of oriental medicine containing baicalin(I), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**(4), 233-243 (1994).
 - 24) M. Gibaldi, S. Feldman and T.R. Bates, Correlation of pharmacological activity and dissolution rates of reserpine-desoxycholic acid dispersions, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 708-712 (1968).
 - 25) K. Uekama, Y. Ikeda, F. Hiroyama, M. Otagiri and M. Shibata, Inclusion complexation of p-hydroxybenzoic acid ester with α - and β -cyclodextrins : Dissolution behaviors and antimicrobial activities, *Yakugaku Zasshi*, **100**, 994-1003 (1982).
 - 26) K. Uekama, K. Oh, F. Hiroyama, M. Otagiri, M. Shibata, Y. Ohtani, Y. Yamada and Y. Sugiyama, Improvements of some pharmaceutical properties of alkylalcohols by cyclodextrin complexation, *Yakugaku Zasshi*, **102**, 1141-1149 (1982).
 - 27) T. Tokunura, H. Ueda, Y. Tsushima, M. Kasai, M. Kayano, I. Amada and T. Nagai and solid state, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4179-4184 (1984).
 - 28) M. Tsuruoka, T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Ueno, T. Fujinaga, M. Otagiri and K. Uekama, Enhanced bioavailability of prednisolone by β -cyclodextrin complexation, *Yakugaku Zasshi*, **101**, 360-367 (1981).
 - 29) K. Uekama, M. Otagiri, Y. Uemura, T. Fujinaga, K. Arimori, N. Matsuo, K. Tasaki and A. Sugii, Improvement of oral bioavailability of prednisolone by β -cyclodextrin complexation in humans, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 124-127 (1983).
 - 30) T. Higuchi and J. L. Lach, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **43**, 349 (1954).
 - 31) M. Otagiri, K. Uekama and K. Ikeda, Inclusion complexes of β -cyclodextrin with tranquilizing drugs phenothiazines in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**(1), 188-195 (1975).
 - 32) M. Kuruzomi, N. Nambu and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975).
 - 33) T. Higuchi and K.A. Connors, Phase solubility technics, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 117-212 (1965).
 - 34) S. Miyazaki, M. Oshiba and T. Nadai, Dissolution properties of salt forms of berberine, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(3), 883-886(1981).
 - 35) W. H. Barr and S. Riegelman, Intestinal Drug Absorption and Metabolism I. Comparison of Methods and Models to study Physiological Factors of In Vitro and In Vivo Intestinal Absorption, *J. Pharm. Sci.*, **59**(2), 154-163(1970).