약학회지 제42권 제 1 호 59~69(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 1

퀘르세틴의 가용화, 퀘르세틴 및 루틴의 토끼 십이지장 점막 투과성

전인구# · 서은하
동덕여자대학교 약학대학
(Received November 6, 1997)

Solubilization of Quercetin, and Permeability Study of Quercetin and Rutin to Rabbit Duodenal Mucosa

In Koo Chun# and Eun Ha Seo
College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract—To increase the solubility of quercetin, which is a practically insoluble flavonoid of *Ginkgo biloba* leaf, the effects of nonaqueous vehicles, their cosolvents, water-soluble polymers and modified cyclodextrins (CDs) were observed. Polyethylene glycols, diethyleneglycol monoethyl ether, and their cosolvents with water showed a good solvency toward quercetin. Also the aqueous solutions of povidone, copolyvidone and Cremophor RH 40 was effective in solubilizing quercetin. Complex formation of quercetin with β-cyclodextrin (β-CD), dimethyl-β-cyclodextrin (DMCD), 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) and β-cyclodextrin sulfobutyl ether (SBCD) in water was investigated by solubility method at 37°C. The addition of CDs in water markedly increased the solubility of quercetin with increasing the concentration. A_L type phase solubility diagrams were obtained with CDs studied. Solubilization efficiency by CDs was in the order of SBCD≫DMCD〉HPCD〉β-CD. The dissolution rates of quercetin from solid dispersions with copolyvidone, povidone and HPCD were much faster than those of drug alone and corresponding physical mixtures, and exceeded the equilibrium solubility (3.03±1.72 μg/ml). The permeation of quercetin through duodenal mucosa did not occur even in the presence of enhancers such as bile salts, but the permeation was observed when the mucus layer was scraped off. This was due to the fact that quercetin had a strong binding to mucin (58.5 μg/mg mucin). However rutin was permeable to the duodenal mucosa. The addition of enhancer significantly increased the permeation of rutin in the order of sodium glycocholate ≤ sodium deoxycholate〈ammonium glycyrrhizinate.

Keywords □ Quercetin, rutin, solubilization, cosolvents, cyclodextrins, duodenal permeation, bile salts, mucin binding.

퀘르세틴은 은행나무 잎 등 식물계에 널리 분포된 천연의 플라보노이드로서 quercitrin, 루틴 및 다른 배당체들의 aglycon으로서 항알러지 작용,[1] 항염증 작용,[2,3] 시클로옥시게나제/리폭시게나제 저해작용,[4,5] 임파구 침윤억제,[6] 모세혈관 저항성의 효과적 강화, 항혈전 작용,[7,8] 항산화작용, 유리 라디칼 소거작용,[9-12] 항암작용[13] 등이 보고되었다. 루틴은 퀘르세틴의 배당체로서 모세혈관 저항성의 효과적 강화, 심장수축의 증강, 이뇨작용,[14] hyaluronidase의 억제작용, 모세혈관벽의 합성, 아스코르빈산과의 상승작용, 방사성 상해에 의한 궤양의 방지[15] 등이 보고되어 왔다.

이들 플라보노이드류의 체내 동태에 관해서도 다수의 보고가 있다. 페놀성 히드록실기가 수식된 플라보노이드류는 장내 박테리아에 의한 분해성이 낮고, 물과 유기용매에 대한 높은 용해도로 인해 흡수가 현저히 증가한다.[16,17] 또 경구투여된 플라보노이드류의 대부분은 장내에서 aglycon으로 존재하며 이들이 담즙산염과 미셀을

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-940-4523 (팩스) 02-941-7652

형성하여 흡수되고[18] 주로 간에서 대사된다고 보고되어 있다.[19] 플라보노이드 배당체는 포유류의 조직에는 존재하지 않는 장내세균의 glycosidase에 의해 가수분해되어 aglycon으로 된다. Brown[20]과 Tamura 등[21]은 bacterial glycosidase가 플라보노이드 aglycon을 유리시킨다고 보고하였고, Plouvier[22]는 루틴이 rhamnodiastase에 의해 가수분해되어 퀘르세틴과 rutinose가 생성된다고 하였다. 플라보노이드류는 장내미생물에 의해 가수분해될 뿐만 아니라 산화, 환원, methylation, glucuronidation, sulfation의 형태로 대사될 수도 있다. 또한 Gheng 등[23]과 Kirshnamurty 등[24]은 소의 반추위로부터 분리한 *Butyrivibrio spp.* 균주가 루틴과 퀘르세틴의 C-ring을 개열시킴을 밝혔고, Winter 등[25]이 사람의 장내 세균총으로부터 플라보노이드 C-환의 개열을 일으키는 *Clostridium spp.* 균주를 분리하였다.

이상과 같이 플라보노이드류의 치료적 효과와 체내동태 등이 연구되어 왔으나, 이들의 물리화학적 성질과 위장관 점막 투과 특성에 관한 보고는 별로 없다.

따라서 이 연구에서는 플라보노이드류의 aglycon류가 물에 난용성인 점에 착안하여 모델 aglycon으로 퀘르세틴을 택하여 이의 용해성을 향상시키고자 비수성용제 및 이들과의 공용매, 수용성 고분자 수용액에서의 용해도를 측정하고 시클로덱스트린(CD)류[26]와의 복합체 형성에 의한 가용화를 검토하였다. 수용성 담체류간의 고체분산체를 제조하여 퀘르세틴의 용출성을 조사하였다. 또한 퀘르세틴과 이의 배당체인 루틴의 소장내거동을 조사하기 위해 토끼 십이지장 추출액 중 분해 거동, 십이지장 점막 투과성과 투과에 미치는 CD류 및 투과촉진제들의 영향을 검토하였다.

실험방법

시료 및 시약 – 퀘르세틴, 루틴(수화물), 카페인산, β-시클로덱스트린(β-CD), 디메칠-β-시클로덱스트린(DMCD), 글리실리진산암모늄(GAA), 글리코콜린산나트륨(SGC), 데옥시콜린산나트륨(SDC), 우르소데옥시콜린산(UDCA), 뮤신(Type I-S)(Sigma Chemical Co., MO, USA), 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPCD, American Maize-Products Co., USA), β-시클로덱스트린설포부틸에텔(SBCD, 7 나트륨염, Captisol, CyDex Inc., USA), 폴리에칠렌글리콜 300 및 400 (Shinyo Pure Chemicals Co., Japan), 디에칠렌글리콜모노에칠에텔(DEG, Transcutol(R), Gattefossé, France), 코폴리비돈(Kollidon VA 64), 포비돈(Kollidon 30 및 90), 폴리옥실에필렌경화피마자유(Cremophor RH 40)(BASF, Ludwigshafen, Germany) 등을 사용하였으며 기타 시약은 시판 일급 또는 특급을 사용하였다.

기기 및 장치 – 고속액체크로마토그래프(HPLC, Perkin-Elmer, Series 410, U.S.A.), 흡광도 측정기(Jasco V-530, Japan), Valia-Chien 투과시스템(Biocrown Glass Co., USA), 항온 진탕 수욕장치(D-6072, Karl Kolb, Germany), 용출시험장치(DST-300, Fine Scientific Instrument Co., Korea), 투석 튜브(250-9U, Sigma Chemical Co., MO, USA) 등을 사용하였다.

실험동물 – 위장관 투과실험용으로는 서울대병원동물실에서 구입한 체중 2.5~3.5 kg의 건강한 New Zealand White계 자성 토끼를 사용하였다.

퀘르세틴의 용해도 측정 – 수용액중 PEG 300, PEG 400, DEG의 농도를 0, 20, 40, 60, 80, 100%로 변화시켜 조제하고 각각의 액 1.0 m*l*에 퀘르세틴 일정과량을 넣어 항온진탕 수욕장치에 넣고 37±0.2°C를 유지하면서 용해평형에 도달할 때까지 72시간 이상 진탕하였다. 다음에 이 액을 1회용 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하고 처음 여액 5 방울을 버리고 다음 여액 100 μ*l*를 필요하면 메탄올로 희석하여 파장 375 nm에서 흡광도를 측정하여 퀘르세틴 표준액(10 μg/m*l*)의 흡광도와 비교하여 용해량을 산출하였다. 또한 수종의 수용성 고분자 수용액 중 퀘르세틴의 용해도를 측정하기 위해 수용액중 Kollidon VA 64, Kollidon 30 및 Kollidon 90, Cremophor RH 40의 농도를 0.5, 1, 2, 3 및 5%로 변화시켜 조제하고 각각의 액 1.0 m*l*에 퀘르세틴 일정 과량을 넣어 항온진탕 수욕장치에 넣고 37±0.2°C를 유지하면서 용해평형에 도달할 때까지 72시간 이상 진탕하였다. 다음에 이 액을 1회용 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하고 처음 여액 5 방울을 버리고 다음 여액 200 μ*l*를 50% 메탄올 5 m*l*에 희석하여 위에서와 같이 조작하여 용해량을 산출하였다.

CD류에 의한 퀘르세틴의 가용화 시험 – CD류(β-CD, DMCD, HPCD 및 SBCD)를 각각 달아 물에 녹여 각 CD의 농도가 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 및 2.0×10^{-2} M 용액이 되도록 만들고 1.0 m*l*씩 바이알에 넣은 후 일정

과량의 퀘르세틴을 넣고 밀전한 다음 항온진탕수욕장치에 넣어 37±0.2℃를 유지하면서 용해평형에 도달할 때까지 72시간 이상 진탕하였다. 1시간 이상 정치하고 여과한 다음 처음 여액 5 방울은 버리고 다음 여액 200 μl를 취하여 적절히 희석하고 파장 375 nm에서 흡광도를 측정하여 퀘르세틴 표준액(10 μg/ml)의 흡광도와 비교하여 용해량을 산출하였다.

복합체의 안정도 산출 - Higuchi 등[27]의 방법에 따라 용해도 상도의 초기 직선 부분의 기울기 및 절편으로부터 겉보기 안정도정수 K_c를 다음 식에 의하여 산출하였다. 이 식에서 slope 및 intercept는 각각 상도의 초기 상승 직선부분의 구배 및 절편의 값을 나타낸다.

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

퀘르세틴의 물리적혼합물 및 고체분산체의 제조 - 퀘르세틴과 코폴리비돈, 포비돈 및 HPCD 간의 물리적 혼합물은 약물과 담체류를 각각 1:10 무게비로 달아 유발에서 가볍게 혼화하여 섞고 차광하여 실리카겔 데시케이터에 보관하였다. 고체분산체는 퀘르세틴과 담체를 1:1, 1:5 및 1:10의 무게비로 달아 용매증발법에 의해 제조하였다.[28,29] 1:10 퀘르세틴-코폴리비돈 고체분산체의 경우, 퀘르세틴 100 mg과 코폴리비돈 1 g을 메탄올 30 ml에 녹이고, 50℃에서 감압농축시키고 80호체를 통과시켜 차광하여 실리카겔 데시케이터에 보관하였다.

용출시험 - 물 900 ml를 시험액으로 하여 퀘르세틴 단독, 물리적 혼합물(1:10 무게비) 및 고체분산체(1:1, 1:5, 1:10 무게비)에 대해 100 rpm 및 37±0.5℃의 조건에서 대한약전 용출시험법 제2법(paddle법)에 따라 용출시험을 행하였다. 시료는 퀘르세틴으로서 10 mg에 해당하는 양을 정밀하게 달아 넣었다. 용출 개시 5, 10, 15, 30, 60 및 90 분마다 면전 피펫으로 5.0 ml씩 취하여 멤브레인필터로 여과한 여액을 파장 375 nm에서 흡광도를 측정하여 퀘르세틴 표준액(10 μg/ml)의 흡광도와 비교하여 용출량을 산출하였다.

십이지장 점막 추출액 중 루틴의 분해거동 - 토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨 후 정중선을 따라 개복한 다음 십이지장 점막을 적출하여 생리식염수로 가볍게 씻고 Valia-Chien 투과시스템의 half-cell 사이에 점막측이 donor cell을, 장막측이 receptor cell을 향하도록 마운팅하였다. donor cell측에는 pH 7.2 등장인산염 완충액을 3.5 ml 넣고, receptor cell측에는 pH 7.4 등장인산염완충액 3.5 ml를 넣은 후 37℃ 항온을 유지하면서 7시간 동안 magnetic star-head bar를 600 rpm 으로 교반하여 추출하고, 각 추출액을 15 ml 마개 달린 시험관에 각각 넣어 냉장고에 보관하였다. 다시 신선한 완충액을 cell에 채우고 반복 추출하였다. 이 조작을 3회 반복하여 21시간 동안 10.5 ml의 추출액을 얻었다. 이 추출액 900 μl에 생리식염수에 녹인 루틴 용액(100 μg/ml) 100 μl를 넣고 60 rpm으로 흔들면서 37℃에서 incubation하였다. 경시적으로 각각의 액 100 μl씩을 취하여 내부표준액(카페인산 50 μg/ml in 72.5% 메탄올, 인산으로 pH를 2.2로 조절) 400 μl에 섞어 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 μl를 HPLC에 주입하여 루틴의 잔존량과 생성 가능한 퀘르세틴을 아래의 HPLC법으로 정량하였다.

퀘르세틴의 십이지장 점막투과 시험 - 적출한 십이지장 점막을 Valia-Chien 투과시스템에 마운팅하고, donor cell에는 pH 7.2 등장인산염완충액 3413.5 μl, 퀘르세틴의 메탄올 용액(2000 μg/ml) 87.5 μl를 넣어 50 μg/ml로 하고, receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액과 PEG 400 과의 혼합액(6:4 v/v) 3500 μl를 넣어 37℃ 항온을 유지하면서 24시간 동안 교반하면서 투과시험을 행하였다.

따로 donor cell에서 퀘르세틴의 용해성을 확보하기 위해 가용화제로 SBCD, DMCD 및 HPCD를 각각 2×10^{-2} M 함유시켜 동일 조작을 행하였다. 또 Cremophor RH 40을 2% 함유시켜 동일조작을 행하였다. 경시적으로 receptor cell에서 각각 100 μl씩을 취하여 내부표준액(카페인산 50 μg/ml) 400 μl을 넣고 vortexing하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 μl를 HPLC에 주입하고 receptor측으로의 투과량을 구하였다.

또한 투과촉진제가 퀘르세틴의 십이지장 점막투과에 미치는 영향을 검토하기 위해 donor cell에 퀘르세틴의 메탄올용액(1000 μg/ml) 175 μl 및 pH 7.2 등장인산염완충액과 PEG 400의 혼합액(8:2 v/v)에 담즙산류 또는 글리실리진산암모늄을 녹인 용액 3,325 μl를 넣어 촉진제류의 농도가 5 mM이 되도록 하고 퀘르세틴의 농도를 50 μg/ml로 하였다. Receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액 및 PEG 400의 혼합액(8:2 v/v) 3500 μl를 넣어 37℃ 항온을 유지하면서 24시간 동안 교반하면서 투과시험을 행하였다.

점액층 제거 십이지장 점막 투과시험 - 적출한 십이지장 점막을 생리식염수로 씻은 후 Niibuchi 등[30]의 방법에 따라 점막측 표면을 slide glass로 가볍게 긁어내고 생리식염수로 세척하여 점액층을 제거한 후 투과시스템에 마운팅하고 위에서와 같은 방법으로 투과촉진제를 넣고 투과시험을 행하였다.

루틴의 십이지장 점막투과 시험 - 적출한 십이지장 점막을 투과시스템에 마운팅하고 루틴의 메탄올 용액(2,000 μg/ml) 175 μl 및 pH 7.2 등장인산염완충액에 투과촉진제를 녹인 액 3,325 μl를 donor cell에 넣어 촉진제의 농도를 5 mM이 되도록 하고 루틴의 농도를 100 μg/ml로 하였다. Receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액 3,500 μl를 넣어 37°C 항온을 유지하면서 24시간 동안 위에서와 같이 투과시험을 행하였다.

퀘르세틴 및 루틴의 십이지장 점막 흡착 시험 - 적출한 십이지장 점막의 점막측이 양측 cell을 향하도록 알루미늄 포일을 개재하여 두 겹으로 투과시스템에 마운팅하고 퀘르세틴 및 루틴 용액(200 μg/ml)을 각각 175 μl 및 pH 7.2 등장인산염완충액 3325 μl를 양측 cell에 넣어 플라보노이드의 농도를 10 μg/ml로 하고, 37°C를 유지하면서 8시간 동안 교반하였다. 경시적으로 양측 cell에서 각각 100 μl씩을 취하여 위의 내부표준액 400 μl씩을 넣어 섞었다. 이 액 20 μl를 HPLC에 주입하고 퀘르세틴 및 루틴의 잔존량을 구하였다.

퀘르세틴 및 루틴의 뮤신과의 결합시험 - Niibuchi 등[30]의 방법에 따라 평형 투석법을 이용하여 뮤신과의 결합시험을 하였다. 뮤신을 10 mM 인산염 완충액(pH 6.5)과 PEG 400의 혼합액(8:2 v/v)에 1 mg/ml 농도로 녹이고 퀘르세틴은 같은 용액에 100 μg/ml 농도로 녹였다. 전처리한 직경 25 mm dialysis tubing 안에 퀘르세틴 용액 1 ml와 뮤신 용액 1 ml를 담아 봉합사로 잘 묶은 후 위의 혼합액 50 ml 담은 비이커에 반투막의 내용물이 충분히 잠기도록 넣어 4°C에서 때때로 가볍게 흔들어 주면서 24시간 방치하였다. 24시간 후 반투막 외부의 액을 100 μl 취하여 HPLC에 주입하여 유리형 퀘르세틴의 양을 정량하였다.

루틴의 뮤신과의 결합시험은 뮤신을 10 mM 인산염 완충액(pH 6.5)에 1 mg/ml 농도로 녹이고 루틴은 같은 완충액에 100 μg/ml 농도로 녹였다. 전처리한 투석튜브 안에 뮤신 용액 1 ml 및 루틴 용액 1 ml를 넣어 가볍게 섞고 봉합사로 잘 묶은 후 완충액을 담은 50 ml 비이커에 반투막의 내용물이 충분히 잠기도록 하여 위에서와 같은 방법으로 조작하여 유리형 루틴의 양을 정량하였다.

HPLC법에 의한 퀘르세틴 및 루틴의 정량 - HPLC (Perkin-Elmer series 410) 및 검출기 LC 90 UV 검출기, 데이터 처리장치 Varian 4290 integrator를 사용하고 칼럼으로는 Guard Pak insert(Bondapak C18, Waters, USA)가 장착된 Bondapak C18 column (Waters, U.S.A., 3.9×300 mm, 10 μm)을, 이동상으로는 메탄올 · 물 · 초산혼합액(58:42:2.4 v/v)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 375 nm의 조건에서 20 μl를 주입하였다. 얻은 크로마토그램으로부터 내부표준물질(카페인산)에 대한 퀘르세틴 또는 루틴의 피크면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 정량하였다.

결과 및 고찰

수성 및 비수성 용제중 퀘르세틴의 용해성

물에서의 용해도(37°C)는 퀘르세틴이 3.03±1.72 μg/ml로 산출되어 용해도가 매우 낮았다. 용해도를 증가시키기 위해 수용액 중 PEG 300, PEG 400 및 DEG의 농도를 20, 40, 60, 80, 100%로 변화시킨 결과 Table I에서와 같이 PEG 300, PEG 400 또는 DEG의 농도가 증가함에 따라 퀘르세틴의 용해도가 급격히 증대하였으며 순수한 용제에서의 용해도는 각각 1 ml 당 0.405, 0.306 및 0.339 g이었다.

수용성 고분자류도 Table II에서와 같이 퀘르세틴의 의 용해도를 증가시켰다. 코폴리비돈, Kollidon 30, Kollidon 90 및 Cremophor RH 40을 각각 0.5, 1, 2, 3 및 5%로 변화시켜 용해도를 측정한 결과 Kollidon 90〈 Kollidon 30〈 Kollidon VA 64≪ Cremophor RH 40의 순으로 용해도를 향상시켰으며 5% 수용액 중 용해량은 각각 134.3, 168.5, 308.8 및 569.2 μg/ml이었다.

Table I — Solubility of quercetin in various vehicles and their cosolvents with water at 37°C

Concn. of solvent in water (%)	Solubility (mg/ml)		
	PEG 300	PEG 400	DEG
0	0.003	0.003	0.003
20	0.324	0.352	0.617
40	1.14	1.46	2.92
60	20.1	23.0	30.3
80	135.4	128.1	88.9
100	405.3	306.0	339.1

Table II — Solubility of quercetin in aqueous water-soluble polymer solutions at 37°C

Concn. of polymer (%)	Solubility (μg/ml)			
	Kollidon VA 64	Kollidon 30	Kollidon 90	Cremophor RH 40
0.5	22.8	21.1	30.2	55.6
1	60.8	35.8	33.4	125.6
2	106.1	79.5	56.4	242.1
3	163.8	114.1	97.4	376.4
5	308.8	168.5	134.3	569.2

CD류가 퀘르세틴의 용해성에 미치는 영향 – CD류가 퀘르세틴의 용해성에 미치는 영향을 알아보고자 37°C에서 β-CD, HPCD, DMCD 및 SBCD의 첨가농도를 변화시켜 용해도를 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 퀘르세틴의 용해도가 수용액 중에서 이들 CD류의 농도가 증가함에 따라 직선적으로 증가되었다. Higuchi 등[27]의 용해도상도의 분류에 따르면 첨가된 농도범위에서 4종 CD류 모두 A_L형(복합체 형성물질의 첨가농도 증가에 대해 가용성 복합체를 형성하여 약물의 용해도가 직선적으로 증가되는 형) 상도를 나타내었다. 또 CD류에 따른 퀘르세틴의 가용화효과는 SBCD≫DMCD〉HPCD〉β-CD의 순이었으며, 2.0×10^{-2}M 농도의 SBCD, DMCD, HPCD 및 β-CD 존재시 퀘르세틴의 용해도가 각각 303.6, 112.3, 92.3 및 13.6 μg/ml 이었으며, 이는 각각 퀘르세틴 단독의 용해도(3.04 μg/ml)에 비하여 약 100, 37, 30 및 4.5배 향상된 것이다. Fig. 1의 용해도 상도로부터 구한 안정도정수(K_c) 값을 Table III에 나타내었으며 가용화 효과의 크기는 안정도정수의 크기 순으로 나타났다. 종래 CD류는 난용성 약물의 가용화에 유용하게 이용되어 왔으나,[26] 이 연구에서와 같이 난용성인 플라보노이드 aglycon의 가용화에도 CD 유도체들이 효과적으로 이용될 수 있다고 생각된다.

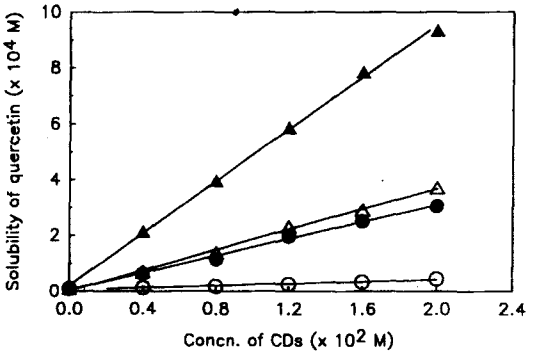

Fig. 1 — Phase solubility diagram of quercetin in the presence of various β-CDs in water at 37°C. Key: ○, β-CD, ●: HPCD, △: DMCD, ▲: SBCD

Table III — Apparent stability constants (K_c) for the complexation of quercetin with modified CDs in water at 37°C

Modified cyclodextrins	K_c (M^{-1})
β-CD	219
HPCD	1570
DMCD	2080
SBCD	4990

퀘르세틴 고체분산체의 용출특성 – 퀘르세틴의 용출성을 향상시키고자 Kollidon VA 64, Kollidon 30 및 HPCD 등의 수용성 담체와 1:1, 1:5 및 1:10 무게비로 고체분산체를 용매증발법으로 제조하여 약물 단독 및 물리적 혼합물과 용출성을 검토하였다. Figs. 2~4에서와 같이 물리적 혼합물은 약물 단독에 비해 퀘르세틴의 용출률을 상당히 증대시켰으나 고체분산체에 있어서는 매우 빠르고 높은 용출률을 나타내었다. 담체의 종류와 약물과의 무게비에 따라 다소 그 차이가 관찰되었다. 퀘르세틴과 Kollidon 또는 HPCD 간의 1:10 무게비의 고체분산체는 90분 후 약물 단독이 3.3%의 용출률을 나타낸 반면 Kollidon VA 64, Kollidon 30 및 HPCD는 각각 약 76%, 87%, 91%의 용출률을 나타내었다. 고체분산체는 약물 단독에 비해 약 30배 전후로 용출속도가 향상된 것이며, 고체분산체는 모두 퀘르세

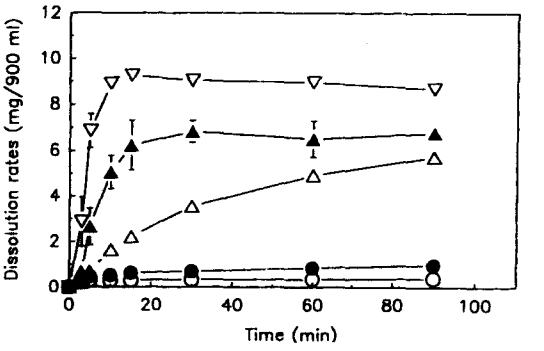

Fig. 2 — Dissolution profiles of quercetin-copolyvidone solid dispersions in 900 ml of water at 37°C. Each point represents the mean±S.D. (n=3). Key: ○: quercetin alone, ●: 1:10 physical mixture, △: 1:1 solid dispersion, ▲: 1:5 solid dispersion, ▽: 1:10 solid dispersion

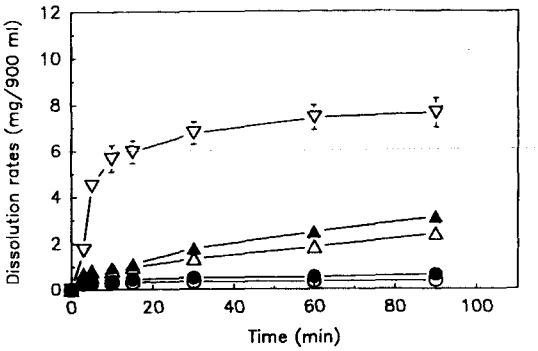

Fig. 3 — Dissolution profiles of quercetin-Kollidon 30 solid dispersions in 900 m*l* of water at 37°C. Each point represents the mean±S.D. (n=3).
Key: ○: quercetin alone, ●: 1:10 physical mixture, △: 1:1 solid dispersion, ▲: 1:5 solid dispersion, ▽: 1:10 solid dispersion

틴의 포화용해도(2.74 mg/900 m*l*) 이상 용출되어 과포화상태를 유지하였으며, HPCD 또는 Kollidon 30과의 고체분산체(1:10)의 경우는 현저한 과포화에 도달하여 침전형성으로 서서히 용해량이 시간의 경과와 함께 감소되었다. Badawy 등[31]은 danazol과 HPCD의 무게비를 1:3, 1:5 및 1:10으로 하여 공침물을 제조하여 분말 x선 회절분석에 의해 결정성을 검토한 결과 1:3에서는 결정성으로 남아 있었고, 1:5에서는 결정성이 둔화되어 부분적으로 비정질화되고, 1:10에서는 danazol이 모두 비정질화되어 비정질화 정도에 따라 용출속도가 증대되었음을 보여 주었다.

이와 같이 HPCD와의 고체분산체가 높은 용출률을

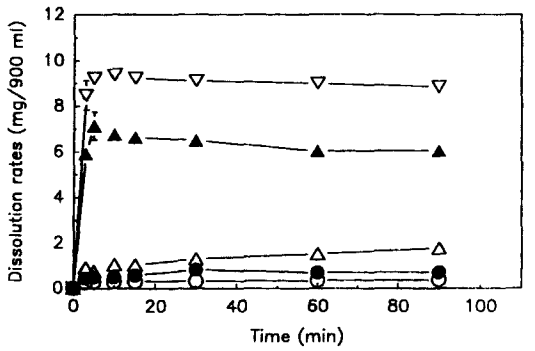

Fig. 4 — Dissolution profiles of quercetin-HPCD solid dispersions in 900 m*l* of water at 37°C. Each point represents the mean±S.D. (n=3).
Key: ○: quercetin alone, ●: 1:10 physical mixture, △: 1:1 solid dispersion, ▲: 1:5 solid dispersion, ▽: 1:10 solid dispersion

Table IV — Degradation of rutin in duodenal mucosal and serosal extracts

Time (min)	Rutin remaining (μg/m*l*)[a]			
	Mucosal ext.		Serosal ext.	
	Rutin	Quercetin formed	Rutin	Quercetin formed
30	9.47±0.61	-[b]	9.85±1.37	-
60	10.4±1.22	-	9.53±0.58	-
90	8.85±1.15	-	9.51±0.42	-
120	8.92±1.17	-	9.03±0.66	-
180	9.59±1.42	-	8.95±0.82	-
240	8.62±1.34	-	9.05±0.20	-
360	8.47±0.26	-	9.09±0.67	-

The initial concentration of rutin was 10 μg/m*l*.
[a] Mean±S.D. (n=3). [b] Not detected

나타내는 것은 복합체 형성에 의해 퀘르세틴이 비정질화되고 습윤성이 커지기 때문인 것으로 생각되며 수용성 고분자와의 고체분산체에서도 퀘르세틴의 비정질화와 입자경 감소 및 습윤성의 증대 등에 의해 용출이 향상된 것으로 생각된다.[32,33]

십이지장 점막추출액 중 루틴의 분해거동 - 십이지장 점막의 점막측 및 장막측 추출액에 루틴(10 μg/m*l*)을 넣어 6시간 동안 incubation하면서 경시적으로 루틴의 잔존량과 생성 가능한 퀘르세틴의 양을 측정하였다. Table IV에서와 같이 6시간까지 루틴의 잔존량에는 거의 변화가 없었으며 이의 분해로 생성될 수 있는 aglycon인 퀘르세틴은 전혀 검출되지 않았다. 이로 보아 루틴은 토끼의 십이지장 내의 분해효소에 대해 비교적 안정한 것으로 생각된다.

그러나 플라보노이드 배당체인 루틴의 비당체로의 분해에 대해서는 rhamnodiastase에 의해 퀘르세틴과 rutinose로 가수분해된다고 보고되었고,[22] Hay 등[34]은 토양균인 *Aspergillus flavus*가 루틴을 가수분해하는 glycosidase를 생성한다고 보고하였다. 또 사람의 장내 세균총으로부터 β-glucosidase 활성을 가진 *Bacteroides fragilis*가 분리되어 루틴이 가수분해되는 것이 밝혀졌다.[35,36] Brown[20]과 Tamura 등[21]은 플라보노이드 배당체는 bacterial glycosidase에 의해 aglycon으로 전환된다고 하였고, Yoon 등[31]은 naringin 및 poncirin이 조직중에서는 대부분이 대사되지 않고 장내세균에 의해 대사됨을 보고하였다. Kim 등[38]은 사람의 장내세균으로부터 이러한 배당체의 대사에 관여하는 *Bacteroides* JY-6 균주를 분리하였다.

이상의 보고들로 볼 때 루틴은 장내 세균이 없는 십이

지장에서는 분해되기 어려우므로, 공장, 회장, 결장 등의 타부위에서의 분해여부가 검토될 필요성이 있다.

퀘르세틴의 십이지장 점막투과성 - 십이지장 점막을 통한 퀘르세틴의 투과에 미치는 CD류의 영향을 검토한 결과, 8시간이 경과한 후에도 약물 단독과 가용화제로 SBCD, DMCD, HPCD(2.0×10^{-2}M)를 첨가한 경우 어떤 조건에서도 십이지장 점막 투과가 일어나지 않았다. 미셀 가용화제로 알려진 Cremophor RH 40(2%)을 첨가한 경우에도 8시간 경과후 퀘르세틴은 점막을 투과하지 않았다. Cremophor RH 40의 첨가에 의한 용해성 확보도 퀘르세틴의 투과성에 영향을 주지 못하였다. 또한 투과촉진제로서 GAA, SGC, SDC 및 UDCA(5 mM)등의 담즙산염이나 글리실리진산염을 첨가한 경우에도 8시간 경과후 퀘르세틴은 점막을 전혀 투과하지 못하였고 점막면이 황색으로 착색되었다. 이는 퀘르세틴의 십이지장 점막의 점액층에 강하게 흡착됨을 나타낸다.

Havsteen[18]은 경구 투여된 대부분의 플라보노이드가 주로 aglycon의 형태로 장내에서 담즙산염과 미셀을 형성하여 상피세포를 통하여 혈액으로 흡수될 수 있으며 대부분 간에서 분해될 것이라고 했으나, 이는 본 연구의 투과 시험 결과와는 상반된 결과이다. 그러나 장관부위별 특성의 차이로 인하여 퀘르세틴이 투과될 가능성은 배제할 수 없으므로 위장관의 부위별 투과성은 더욱 검토해 볼 필요가 있다고 생각된다.[39]

점액층은 겔상 또는 높은 점성 용액으로 장표면에 부착되어, 상피세포를 산이나 효소공격, 기계적 손상, 병균으로부터 보호하는 역할을 하며,[40] 약물의 소화관 흡수에서 장벽이 되기도 하고, 그 장벽을 닦아내면 약물흡수는 현저히 증가된다.[41] 또한, 소장점막의 뮤신이 스트렙토마이신 및 4급 암모늄 화합물 등과 난흡수성 복합체를 형성한다는 보고가 있다.[30]

따라서, 퀘르세틴의 점막 흡착 가능성에 착안하여 점막을 slide glass로 가볍게 긁어내어 점액층을 제거한 후 투과촉진제를 넣어 투과시험을 행하였다. 그 결과 Table V에서와 같이 6시간부터 미량의 퀘르세틴이 투과되었다. 8시간후 투과량은 퀘르세틴이 단독으로 함유된 경우 5.3±0.6 μg/cm^{2}이었으며, GAA 첨가시 4.9±0.3 μg/cm^2, SGC 첨가시 10.5 2.3 μg/cm^2, SDC 첨가시는 10시간 경과시 미량이 투과되었다(6.1±3.0 μg/cm^2). GAA 와 SDC는 퀘르세틴의 투과에 별다른 영향을 미치지 못하였으나 SGC는 투과촉진효과를 보여 주었다.

이와 같이 퀘르세틴은 장관 투과성이 거의 없는 점으로 보아 이의 체내 수송을 위해서는 점액층이 없는 피부투과에 관한 연구와 가용화에 의한 비경구 제제의 설계가 요구된다.

Table V — Effect of enhancers on the permeation of quercetin through rabbit duodenal mucosa which mucus layer was scraped off

Time (hr)	Permeation rate of quercetin (μg/cm^2)[a]			
	Quercetin alone	GAA	SGC	SDC
0.5	–[b]	–	–	–
1	–	–	–	–
2	–	–	–	–
4	–	–	–	–
6	0.23±0.41	–	4.86±0.42	–
8	5.28±0.63	4.94±0.32	10.5±2.3	–
10	9.26±1.05	8.95±2.89	12.6±5.6	6.05±3.01
24	27.4±1.5	40.5±5.4	34.9±3.9	6.3±0.1

[a] Mean±SD (n=3). [b] Not detected.

루틴의 십이지장 점막투과

루틴의 십이지장 점막 투과에 미치는 촉진제의 영향을 검토하였다. Fig. 5에서와 같이 루틴은 투과촉진제가 첨가되지 않은 경우 지속적인 투과성을 나타내었고 10시간후의 투과량은 22.6±8.8 μg/cm^{2}이었다. 이와 같이 퀘르세틴의 히드록실기가 rutinose로 수식된 루틴이 상당한 투과성을 보인 것은 페놀성 히드록실기가 수식된 플라보노이드류는 장내 세균에 의해 덜 분해되고, 물과 유기용매에 대한 용해도가 좋기 때문에 상당한 양이 흡수될 수 있다고 한 보고[16,17]와 일치된다. 한편 투과촉진

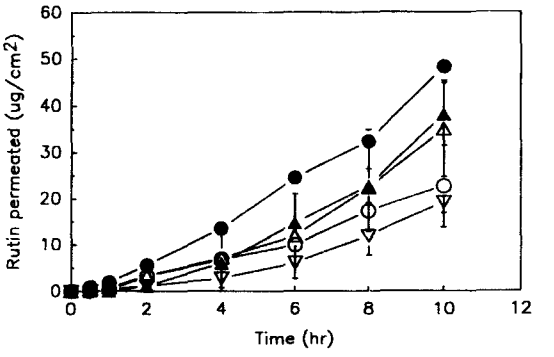

Fig. 5 — Effect of enhancers on the permeation of rutin through rabbit duodenal mucosa. Each point represents the mean±S.E. (n=3).
Key: ○: rutin alone, ●: GAA, △: SGC, ▲: SDC, ▽: UDCA

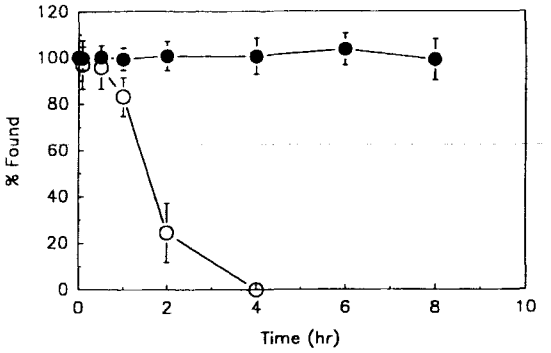

Fig. 6 — Disappearance of quercetin (○) and rutin (●) in the mucosal phase where the serosal side was blocked with aluminum foil. Each point represents the mean±S.D. (n=3).

제로 GAA 첨가시는 48.2±2.1 μg/cm^2, SDC 첨가한 경우는 38.1±6.7 μg/cm^2, SGC 첨가시 34.9±10.4 μg/cm^2 및 UDCA를 첨가한 경우는 19.1±5.5 μg/cm^{2}이었다. 이로 볼 때 퀘르세틴은 점막 투과가 일어나지 않았으나 이의 배당체인 루틴은 투과성이 비교적 높았으며 UDCA를 제외한 담즙산류나 글리실리진산염의 첨가는 루틴의 점막 투과성을 증진시키는 것으로 나타났다.

퀘르세틴 및 루틴의 점막흡착성 – 십이지장 점막을 투과시스템에 마운팅하고 점막측에 pH 7.2 등장인산염 완충액에 퀘르세틴 또는 루틴을 10 μg/m*l*로 함유시키고 교반하면서 경시적으로 시료를 취하여 약물농도를 측정하였다. Fig. 6에서와 같이 퀘르세틴은 120분후에는 전체 35 μg 중 25.6±2.0 μg이 잔류하였고, 240분 후에는 전혀 검출되지 않았다. 그러나 루틴은 8시간까지 초기농도가 거의 줄어들지 않았다. 퀘르세틴은 점막측이 황색으로 착색된 점과 초기농도가 급격히 감소함으로 보아 점막 표면에 강하게 흡착되는 것으로 생각되며, 십이지장을 포함한 점액층을 이루고 있는 위장관 전체에 걸쳐 투과가 일어나지 않을 것으로 생각된다. 루틴은 초기농도가 거의 줄어들지 않음으로 보아 강한 흡착성은 거의 없는 것으로 생각된다.

퀘르세틴 및 루틴의 뮤신과의 결합성 – 위장관 점막면을 덮고 있는 점액의 주요 구성분은 당단백질인 뮤신으로 알려져 있다.[42,43] 따라서 플라보노이드의 뮤신에 대한 결합성을 평형투석법으로 검토한 결과 퀘르세틴과 루틴은 모두 뮤신에 대한 친화성을 보였다(Table VI). 그러나 퀘르세틴은 특히 높은 친화성을 보여서 뮤신 1 mg당 58.5 μg이 결합하였다. 이는 겐타마이신의

Table VI — Binding of quercetin and rutin to mucin

Flavonoids	Binding of flavonoids (μg/mg mucin)[a]
Quercetin	58.5±8.2
Rutin	37.4±4.9

[a] Mean±S.D. (n=3)

뮤신 결합율이 30.9 g/mg mucin이었다는 보고[30]와 비교하면 매우 강한 결합성을 나타낸 것이다. 따라서 퀘르세틴의 점막 투과성이 없었던 점은 주로 뮤신과의 결합에 기인하는 것으로 생각된다. 루틴도 37.4 μg이 결합하여 높은 친화력을 보여 주었다. 이러한 높은 결합성에도 불구하고 Fig. 5에서와 같이 십이지장 점막 투과성이 높은 것은 흥미 있는 사실로 당의 결합이 점막투과를 용이하게 하는 것으로 생각된다.

결 론

이상의 실험 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 퀘르세틴은 물에서의 용해도가 3.03 μg/ml (37°C)로 극히 낮았으며, PEG 300, PEG 400, DEG 및 이들의 물과의 공용매 중에서 용해성이 현저히 증가하였다. 수용성 고분자류의 첨가도 퀘르세틴의 용해성을 향상시켜 5% Kollidon VA 64, Kollidon 30 및 Kollidon 90 수용액 중에서 퀘르세틴의 용해도는 각각 308.8, 168.5, 134.3 μg/m*l*이었다.

2. CD류는 퀘르세틴과 가용성 복합체를 형성하여 β-CD〈HPCD〈DMCD≪SBCD의 순으로 용해성을 향상시켰으며 안정도정수는 각각 219, 1565, 2076 및 4991 M^{-1}로 산출되었다.

3. 난용성인 퀘르세틴의 용출률이 3% 내외로 낮았으나 포비돈 및 HPCD와 고체분산체화 함으로써 약물 단독과 물리적 혼합물에 비하여 용출률을 현저히 증대시켰으며 퀘르세틴에 대한 담체의 무게비가 증대할수록 용출률이 증대되었다.

4. 퀘르세틴은 용해성 확보 및 투과촉진제의 첨가에도 불구하고 십이지장 점막 투과가 일어나지 않았다. 이의 배당체인 루틴은 상당한 투과성이 있었으며 글리코콜린산나트륨 ≤ 데옥시콜린산나트륨〈글리실리진산암모늄의 순으로 투과를 증진시켰다.

5. 퀘르세틴은 십이지장 점막표면에 강하게 흡착되었으나 루틴은 흡착현상을 나타내지 않았다. 퀘르세틴 및 루틴의 뮤신과의 결합률은 각각 58.5 및 37.3 μg/

mg mucin이었다. 루틴이 뮤신과의 친화성에도 불구하고 점막 투과성이 높은 것은 추후 연구과제가 된다고 생각된다.

문 헌

1) Middleton, E., Jr., Drzewiecki, G., and Krishnarao, D. : Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J. Immunol.* **127**, 546 (1981).
2) Kim, H. P., Son, K. H., Kang, S. S. : Flavonoids: potential antiinflammatory agents. *Natural Product Sciences* **2**, 1 (1996).
3) Matzner, J., Bekemeier, H., and Weber, F. G. : Influence of flavonoids on capillary permeability, carrageenan edema and histamine and PGE_2 spasm. *Agents Action Suppl.* **10**, 129 (1982).
4) Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. and Halliwell, B. : Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1673 (1991).
5) Ferrandiz, M. L., Nair, A. G. and Alcaraz, M. J. : Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie* **45**, 206 (1990).
6) Berg, P. A. and Daniel, P. T. : Plant flavonoids in biology and medicine II, *Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties* (Cody et al. ed.), Alan & Liss, New York, 1988, pp.157-171.
7) Swies, J., Robak, J., Dabrowski, L., Duniec, Z., Michalska, Z. and Gryglewski, R. J. : Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxigenase and cyclooxygenase *in vitro*. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**, 455 (1984).
8) Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J. and Swies, J. : On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 317 (1987).
9) Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. : Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth. Enzymol.* **186**, 345 (1990).
10) Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. : Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1763 (1989).
11) Puppo, A. : Effect of flavonoids on OH radical formation by Fenton-type reactions: influence of iron chelator. *Phytochem.* **31**, 85 (1992).
12) Morrel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Pasdeloup, N., Brissot, P. and Cillard, P. : Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 13 (1993).
13) Middleton, E., Jr., and Kandaswami, C. : The impact of flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in Research since* 1986 (Harborne, J. B., ed.), Chapman & Hall, London, 1993. p.619.
14) Fukuda, T. : The pharmacological effects of flavone groups. Arch. *Exptl. Path. Pharmakol.* **64**, 685 (1932).
15) Griffith, J. Q., Krewson, C. F. and Naghski, J. : Rutin and Related Flavonoids. Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1954, p.5-44.
16) Gugler, R., Leschik, M. and Dengler, H. J. : Disposition of quercetin in human after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 229 (1975).
17) Middleton, E., Jr. : The flavonoids. *Trends Pharmacol. Sci.* **5**, 335 (1984).
18) Havsteen, B. : Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141 (1983).
19) Griffiths, L. A. and Smith, G. E. : Metabolism of myricetin and related compounds in the rat: metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem. J.* **130**, 141 (1972).
20) Brown, J. P. : A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat. Res.* **75**, 243 (1980).

21) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. : Fecalase: a model for activation of dietry glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4961 (1980).

22) Plouvier, V. : The presence of rutinoside in the flower of certain Magnolia. *Compt. Rend.* **216**, 459 (1943).

23) Gheng, K. J., Krishnamurty, H. G., Jones, G. A. and Simpson, F. J. : Identification of products produced by the anaerobic degradation of naringin by *Butyrovivrio* sp. C_3. *Can. J. Microbiol.* **17**, 129 (1971).

24) Krishnamurty, H. G., Gheng, K. J., Jones, G. A. and Simpson, F. J. : Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrovibrio* sp. C_3, *Can. J. Microbiol.* **16**, 759 (1970).

25) Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V.R. and Bokkenheuser, V. D. : C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1203 (1989).

26) Loftsson, T. and Brewster, M. E. : Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017 (1996).

27) Higuchi, T. and Connors, K. A. : Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* **4**, 117 (1965).

28) Sekikawa, H., Fukuda, N., Takada, M., Ohtani, K., Arita, T. and Nakano, M. : Dissolution behavior and gastrointestinal absorption of dicumarol from solid dispersion systems of dicumarol-polyvinylpyrrolidone and dicumarol-β-cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1350 (1983).

29) Pitha, J. and Hoshino, T., Torres-Labandeira, J. and Irie, T. : Preparation of drug: hydroxypropylcyclodextrin complexes by a method using ethanol or aquous ammonium hydroxide as cosolubilizers. *Int. J. Pharm.*, **80**, 252 (1992).

30) Niibuchi, J., Aramaki, Y. and Tsuchiya, S. : Binding of antibiotics to rat intestinal mucin. *Int. J. Pharm.* **30**, 181 (1986).

31) Badawy, S. I. F., Ghorab, M. M. and Adeyeye, C. M. : Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl β-cyclodextrin coprecipitates. *Int. J. Phram.*, **128**, 45 (1996).

32) Chun, I. K. and Park, I. S. : Solubilization and dissolution enhancement of benzimidazole antelmintic drugs by cyclodextrin complexation. *Yakhak Hoeji* **37**, 216 (1993).

33) Chun, I. K. and Yun D. S. : Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl-β-cyclodextrin in aqueous solution and in solid state, *Int. J. Pharm.* **96**, 91 (1993).

34) Hay, G. W., Westlake, D. W. S. and Simpson, F. J. : Degradation of rutin by *Aspergillus flavus* and characterization of rutinose. *Can. J. Microbiol.* **7**, 921 (1961).

35) McDonald, I. A., Mader, J. A. and Bussard, R. G. : The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosodase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. *Mutat. Res.* **122**, 95 (1983).

36) Bokkenheuser, V. D., Shackleton, H. L. and Winter, J. : Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem. J.* **248**, 953 (1987).

37) Yoon, W. G., Hyun, S. H., Kim, D. H., Kim, N. J. and Hong, N. D. : Metabolism of poncirin by intestinal bacteria. *Yakhak Hoeji* **37**, 262 (1993).

38) Kim, D. H., Jang, I. S., Kim, N. J. and Yoon, W. G. : Metabolism of poncirin and naringin by human intestinal bacteria. *Yakhak Hoeji* **38**, 286 (1994).

37) Zhou. X. H. and Li Wan Po, A. : Comparison of enzymic activities of tissues lining portals of drug absorption, using the rat as a model. *Int. J. Pharm.* **62**, 259 (1990).

40) Allen, A., Hutton, D. A., Person, J. P. and Sellers, L. A. : Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. In Mucus and Mucosa (Ciba Foundation Symposium 109), Pitman Press, London, 1984, pp. 137-156.

41) Tsuchiya, S., Aramaki, Y., Ozawa, S. and Matsumaru, H. : Effect of polyoxyethylene cetyl ether on the absorption of 3′,4′-dideoxykanamycin B from rat rectum. *Int. J. Pharm.* **14**, 279 (1983).

42) Forstner, J. F. and Forstner, G. G. : Gastroin-

testinal mucus. In L.R. Johnson (ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York, 1994, pp.1255-1276.

43) Filipe, M. I. : Mucins in the human gastrointestinal epithelium: A review. *Invest. Cell Pathol.* **2**, 195 (1979).