Kor. J. Food Hygiene 5 (1, 2), 7-12 (1990)

천연색소 Brazilin의 체내동태에 관한 연구

문창규 · 황지원 · 김지영 · 원현순 · 윤여표*
서울대학교 약학대학 *충북대학교 약학대학

Studies on the Disposition of Brazilin in rats

Chang-Kiu Moon, Ji-Won Hwang, Ji-Young Kim
Hyeon-Soon Won and *Yeo-Pyo Yun
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 551-742, Korea
**College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea*

ABSTRCT-The disposition of Brazilin including plasma concentration-time profiles, excretions via urine and bile, and plasma protein binding was investigated after intravenous or oral administration of radiolabeled Brazilin (^{3}H-Brazilin) to male Wistar rats.

The main pharmacokinetic parameters were as follows; $t_{1/2}$, 13.71 hr; AUC, 53.38 μg·hr/ml; AUMC, 1013.4 μg·hr^2/ml, MRT, 18.95 hr; Vss, 17778 ml/kg and CL, 936.77 ml/hr·kg.

The 2nd peak was found in the plasma concentration-time profiles indicating potential enterohepatic circulation. The enterohepatic circulation was supported by the bile excretion. After oral administration, about 64.4% of administered radioactivity was excreted into the bile within 10 hours and its excretion rate reached maximum at 3 hours after administration.

The Vss was extremely high, 17.8 l/kg indicating distribution of brazilin in most organs (tissues) with high concentration of brazilin in some organs. Brazilin was distributed into most of organs (spleen, adrenal, pancreas, kidney, thymus, lung, heart, liver, prostate, epididymus, testis, fat, muscle and done) except brain. High concentration of Brazilin was detected especially in liver, kidney, epididymus and testis.

Approximately, 62.9% and 44.1% of the dose was excreted for intravenous and oral administration, respectively. About 80% of the dose eventually excreted into urine was excreted within 24 hr after dosing.

Plasma protein binding of brazilin resulted in 40±4% by ultrafiltration method.

Keywords□Brazilin, Disposition, Urinary excretion, Plasma protein binding.

Brazilin은 1928년 Perkin 등에 의해 구조가 밝혀진 Benz(b)-Indeno(2,1-d) pyran 유도체로 주로 염료나 산 및 알칼리 지시약 또는 식품첨가물 등으로 사용되어 왔다.[1] Brazilin은 rat 실험에서 저하된 모세관의 저항이 효과적으로 회복되었으며,[2,3] histidine decarboxylase 기능을 뚜렷이 억제하였고,[4] guinea pig의 직장과 rabbit의 자궁 그리고 cat의 세포막에서 adrenaline 효과를 증가시켰으며, cat의 혈압을 상승시켰다.[5] 또한 여러 화학물질에 의해 중독된 frog 심장의 활성을 회복시켰으며,[6] carrageninol 의한 급성염증을 강력하게 억제시켰다.[7] Brazilin은 여러 미생물에 대해 정균작용을 나타내었으며,[8,9] rabbit의 신장에서 뇨산의 배설을 증가시켰

Received for publication 25 July, 1990
Reprint request: Dr. C.K. Moon at above address

다.[10]

그외 *Caesalpinia sappan* 추출물에 대한 보고로서 cow의 심장에서 cyclic AMP phosphodiesterase의 활성을 억제하였다는 보고[11]가 있으며 문 등에 의해 Brazilin의 과산화지질 생성억제작용,[12] CCl_4 및 galactosamine으로 유발된 간장해에 대한 보호작용,[13] spontaneously hypertensive rats에서의 지질대사의 개선[14] 및 bovine lens aldose reductase의 억제작용 등의 생리활성이 검토 보고된 바 있다.[15]

본 실험에서는 다양한 생리활성을 갖는 Brazilin의 pharmacokinetic parameters를 얻기 위해 웅성 Wistar rat에서 ^{3}H-로 표지한 Brazilin을 이용하여 그것의 흡수, 분포 및 배설 그리고 plasma protein binding에 대해 실험을 행하였다.

재료 및 방법

실험동물－서울대학교 실험동물 사육장에서 구입한 체중 170～250g의 건강한 Wistar계 웅성 rats를 사용하였으며, 물과 사료는 제한하지 않았다.

사료는 삼양유지 사료사의 mouse 및 rat용 사료를 사용하였고, 음료수는 수도물을 사용하였다. 사육실의 조건은 온도 22±1℃, 습도 50～60%의 소음이 없는 곳이었으며, 동물은 사육장으로부터 수령하여 7일간 적응시킨 후 사용하였다.

시료 및 시약조제－투여액은 비표지 Brazilin(Aldrich Chem. Co)으로 ^{3}H-Brazilin을 희석하여 그 비율을 100 μCi/50 mg되도록 하였고, 10% ethanol, 40% propylene glycol 및 50% saline에 녹여 사용하였다.

방사능 측정시약으로 사용한 Dioxane Base Scintillant는 PPO 10g, POPOP 80 mg, naphthalene 80 g을 dioxane 88%, methanol 10%, ethylene glycol 2%의 혼합용매 1 *l*에 용해한 것으로 이에 사용한 시약 모두는 특급시약이었다.[16]

Brazilin의 혈장농도 추이에 관한 실험－24시간 절식시킨 200～250g rat를 필요시 ether로 마취시키면서 고정시키고 혈액채취를 위해 대퇴부 동맥을, 약물주입을 위해 대퇴부 정맥을 polyethylene tube 50 tube로 삽입하고 동맥으로의 tube에는 heparin (20 Units/m*l*)을, 정맥으로의 tube에는 saline을 채워두었다.[17] 마취가 완전히 깨었을 때 50 mg/kg Brazilin을, 경구투여의 경우 stomach tube을 이용하여 1 m*l*로 1분간 투여하고 정맥투여의 경우 0.4 m*l*를 1분간 주사하고 saline을 소량 주입하였다. 혈액 약 0.4 m*l*를 약물투여전(control) 및 투여 후 0.5, 1.5, 3.5, 7.5, 10.5, 14.5 hr 그리고 20.5 hr에 polyethylene tube에 채취하여 원심분리하고 plasma 0.1 m*l*씩을 얻었다.

위에서 얻은 plasma는 combustion pad에 넣고 1일 건조 후 combustion시킨 후 cocktail을 넣고 radioactivity를 측정하여 그것을 plasma 1 m*l*당 μg으로 환산하였다. 이 때 정맥투여는 2 rats를 사용하였고 경구투여의 경우 3 rats를 사용하였다.

Brazilin의 담즙 중 배설에 관한 실험－24시간 절식시킨 200～250g rat를 ether로 마취시켜 고정시킨 후 PE 10 tube를 담도에 삽입하였다. 50 mg/kg의 Brazilin 1 m*l*를 경구투여하고 투여 후 24시간까지 30분 간격으로 담즙을 채취하였다.[19] 그 과정을 Scheme 2에 도시하였다. 본 실험은 2 rats를 사용하였다.

Brazilin의 조직 중 분포에 관한 실험－24시간 절식시킨 rat에 50 mg/kg Brazilin을 경구투여하고 투여전(control) 및 투여 후 0.5, 1, 3, 8, 24 hr 및 72 hr 후에 각각 2～3 rats를 ether로 희생시킨 후 spleen, adrenal, pancreas, kidney, thymus, lung, heart, liver, prostate, epididymus, testis, epididymal adipose tissue, femoural muscle, thigh bone 그리고 brain을 취하였다.

각 장기 습윤중량 약 300 mg을 정확히 평량한 후 combustion cone에 두어 3일간 건조시킨 후 sample oxidizer로 약 30초간 완전연소시킨 후 cocktail을 넣고 그 radioactivity를 측정하였다.[20]

Brazilin의 뇨중 배설에 관한 실험－Coprophase를 막기 위해 철망으로 바닥을 한 metabolic cage에 rat 1마리씩 각각 넣고, 약물을 투여전(control) 및 투여 후 24시간, 48시간 및 72시간 뇨를 분리하여 수집하였다. 50 mg/kg Brazilin을 경구투여하고 정맥투여의 경우 0.4 m*l* 용량을 대퇴부정맥으로 주입하였다. 이 경우 각각 3마리의 rats를 사용하였다. 뇨는 수집하여 methanol을 가해 50 m*l* 되게 하고 그 중 500μ*l*를 취해 counting 하였다.[21]

Brazilin의 혈장단백결합에 관한 실험－한외 여과법을 사용하였다. 2마리의 rats에 50 mg/kg의 Brazi-

Table 1. Some pharmacokinetic parameters of Brazilin after intravenous administration of ^{3}H-Brazilin to Rats A and B.

Rats	A	B	mean±S.D.
Body weight (kg)	0.25	0.25	0.25±0.0
Dose (μg eq.)	12500	12500	12500±0.0
t1/2 (hr)	12.38	15.38	13.71±2.12
AUC (μg eq.·hr^2/ml)	59.03	47.73	53.38±7.99
AUMC (μg eq.·hr^2/ml)	1142.0	884.8	1013.4±0.86
MRT (hr)	19.34	18.55	18.95±0.56
Vss (ml/kg)	16380	19437	1778.04±0.62
CL (ml/hr·kg)	846.9	1048.0	936.77±0.19

시간에 따른 혈장 중 농도변화곡선의 면적(AUC)은 trapezoidal rules extrapolation method를 이용하여 다음과 같이 구했다.[18] Rising phase는 linear trapezoidal rule을, declining phase는 logarithmic trapezoidal rule을 사용하였으며, 마지막 혈액농도부터 ∞까지는 extrapolation method를 사용하였다.

$$AUC=\int_0^t Cp\,dt+Cp_{last}/k_{last}$$

여기에서 Cp_{last}는 마지막 혈장농도이고 k_{last}는 terminal phase의 elimination rate constant이다. 시간이 0일 때의 약물농도는 0으로 하였다.

The first movement of AUC(AUMC)는 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

$$AUMC=\int_0^t t\cdot Cp\,dt+\int_t^\infty t\cdot Cp\,dt$$
$$=\int_0^t t\cdot Cp\,dt+Cp_{last}\cdot t_{last}/k_{last}$$
$$+Cp_{last}/(k_{last})^2$$

여기에서 $\int_0^t t\cdot Cp\,dt$는 trapezoidal rule을 사용하였다.

Mean Residuence time(MRT), total body clearance (CL), apparent volume of distribution at steady state (Vss) 및 half-life($t_{1/2}$)는 다음과 같이 측정하였다.

$MRT=AUMC/AUC$
$CL=Dose/(AUC\cdot Body\ weight)$
$Vss=CL\cdot MRT$
$t_{1/2}=0.693/k_{last}$

lin을 경구투여하고 30분 후 heart puncture하여 혈액을 얻은 후 centrifuge하여 plasma를 취했다. 그 중 0.5 ml를 MPS-1(Amicon, YMT membrane)에 넣고 2,000g로 10분 동안 centrifuge하고 그 한외여과액 100 μl와 처음의 plasma 100μl를 각각 취해 counting하여 그 radioactivity 비율로써 결합율을 측정하였다.[22]

결과 및 고찰

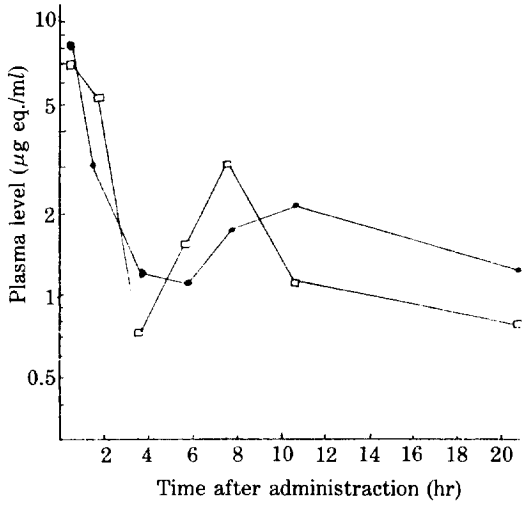

Fig. 1. Plasma concentration (radioactivity)-time profiles of Brazilin after intravenous administration of ^{3}H-Brazilin (100 μCi/50 mg/kg) to Rats A (●) and B (□).

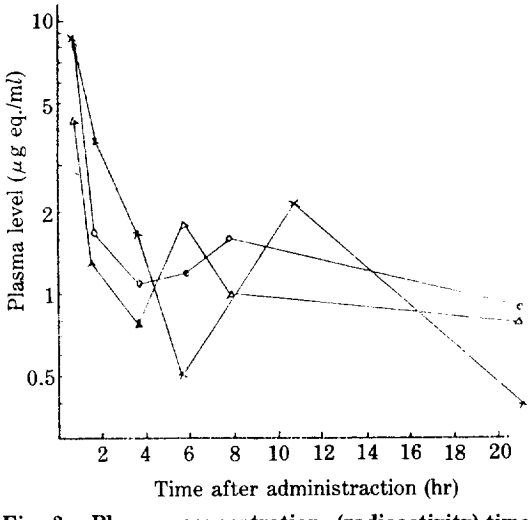

Fig. 2. Plasma concentration (radioactivity)-time profiles of Brazilin after oral administration of ^{3}H-Brazilin (100 μCi/50 mg/kg) to Rats C (△), D (○) and E (×).

본 실험에서는 radiolabeled compound를 측정하였으므로 parent compound와 metabolites가 함께 측정되었다. ^{3}H-Brazilin을 Wistar Rat에 정맥주사 및 경구투여 후 나타난 plasma concentration-time profiles가 각각 Fig. 1 및 2에 있고 이들의 pharmacokinetic parameters는 Table 1에 나타나 있다. 정맥투여 후 plasma level은 처음 blood sampling

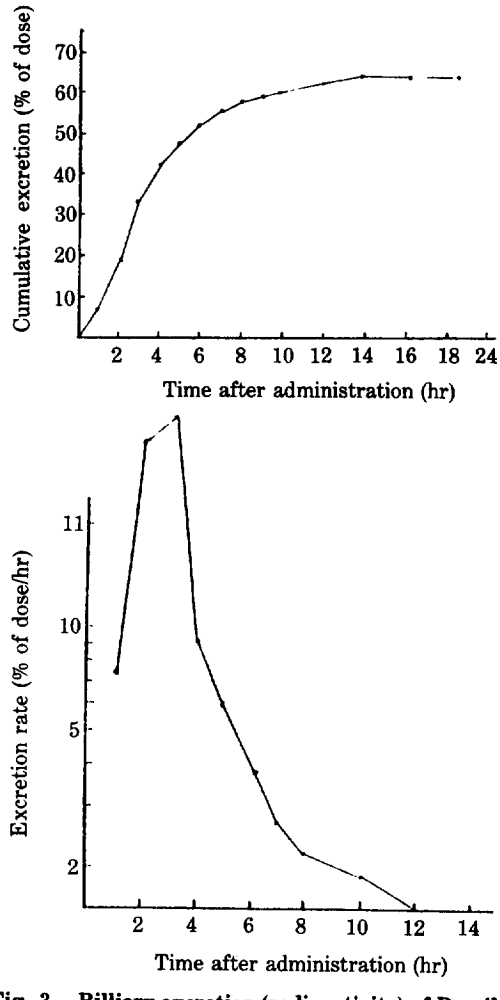

Fig. 3. Billiary excretion (radioactivity) of Brazilin after oral administration of ^{3}H-Brazilin (100 μCi/50 mg/kg). Each point is a mean of two rats.

time인 30분에 최고 농도인 7~9μg eq./m*l*에 달한 후 감소하여 3시간 후에는 약 1 μg eq./m*l*가 되었다가 6~10시간에 2nd peak(2~3 μg eq./m*l*)가 나타났다(Fig. 1). 경구투여 후 30분 이내에 최고 농도인 5~9 μg eq./m*l*에 달했는데 이 수치는 i.v. 투여시의 최고 농도와 유사했다. 따라서 Brazilin은 경구투여 후 아주 빨리 흡수된다고 생각된다. 경구투여 후 30분에 최고 농도에 달한 다음 i.v.시와 같이 급격히 감소하였으며 그 다음에는 2nd peak(2~3 μg)을 나타내었다(Fig. 2).

이상과 같이 2nd peak는 enterohepatic circulation을 강력히 시사하는 것으로 이것을 확인하기 위해 담즙으로 배설되는 量을 측정하였다. 담즙으로 배설되는 量은 12시간에 경구투여량의 62.3%가 배설되었으며 그 후 steady-state를 유지하였고, 24시간 동안에 배설되는 量은 경구투여량의 64.4%였다. 그 배설속도는 3시간째에 최고에 달하였다(Fig. 3).

Vss는 아주 큰 값인 17.7781 *l*/kg이었는데 이것도 다음 두 가지 이유로 설명이 가능하다. 첫째, Brazilin이 모든 조직에 광범위하게 분포되든지, 둘째, 몇몇 특정장기에 고농도로 분포되었을 것이다. 따라서 Brazilin의 조직내 분포를 알아보았다(Table 2). 예상대로 Brazilin은 brain을 제외한(detect limit 이하) 모든 장기, 즉 spleen, adrenal, pancreas, kidney, thymus, lung, heart, liver, prostate, epididymus, testis, fat, muscle, bone에 널리 분포되었으며, 특히 kidney, liver, epididymus와 prostate에 고농도로 분포되었다(Table 2).

CL value는 0.937 *l*/kg이었으며, MRT는 Vdss가 아주 큼으로써 18.95 hr로 비교적 긴 시간을 나타

Table 2 Tissue levels of radioactivity after oral adminsration of ^{3}H-Brazilin to rats (100 μCi/50 mg/kg).

Tissue	Time after administration (hr)					
	0.5	1	3#	8#	24	72#
Spleen	1.5±0.6	5.1±2.2	1.3±0.0	0.3±0.0	*	*
Adrenal	10 ±1.7	19.0±0.2	8.0±0.2	2.2±0.3	1.3±0.1	*
Pancreas	1.2±0.7	19.7±0.1	10.5±7.0	1.7±0.9	0.4±0.3	*
Kidney	21.8±11.1	64.9±41.8	11.0±2.33	2.0±0.7	1.0±0.2	*
Thymus	2.5±1.1	7.1±1.9	1.6±0.1	*	*	*
Lung	1.2±0.3	9.8±5.3	2.8±0.1	0.7±0.2	0.3±0.1	*
Heart	4.4±1.8	7.2±2.8	3.3±0.1	0.5±0.1	*	*
Liver	31.8±2.7	20.8±0.1	17.9±4.0	2.3±0.3	0.3±0.1	*

Table 2. continued

Prostate	12.9±1.4	29.8±0.6	2.8±1.8	1.1±0.4	0.3±0.1	*
Epididymus	13.5±5.7	29.0±0.4	7.8±1.4	1.5±0.4	0.7±0.1	*
Testis	2.0±0.7	4.8±2.4	2.4±0.3	1.3±0.9	*	*
Fat[a)]	5.2±4.5	11.4±0.8	1.8±1.4	1.4±0.3	*	*
Muscle[b)]	1.8±1.3	9.8±2.4	0.9±0.2	0.4±0.2	*	*
Bone[c)]	1.9±0.4	4.0±1.9	0.8±0.2	*	*	*
Brain	*	*	*	*	*	*

(μg eq./g tissue)

Values are means of 2-3# rats±S.E.

*; (<0.4); Sample radioactivity was less then 66 dpm (under detect limit).

a); Epididymal adipose tissue

b); Femoral muscle

c); Thigh bone

Table 3. Urinary excretion (radioactivity) of Brazilin intravenous and oral administration of ^{3}H-Brazilin to rats (100 μCi/50 mg/kg).

	p.o	i.v.
0-24 hr	36.3±9.3	50.0±0.0
24-48 hr	6.7±0.9	11.7±3.3
48-72 hr	1.1±0.5	1.2±0.3
Total period	4.1%	62.9%

Each value is a mean of 3 rats±S.E.

내었다(Table 1). 경구투여량의 44% 및 i.v. 투여량의 62.9%가 투여 후 72시간까지 뇨를 통해 배설되는 것으로 알려졌으며, 배설된 量의 대부분(80%)이 24시간 동안에 배설되었다.

혈장단백에 대한 결합은 그리 크지 않아서, 한외여과법으로 측정한 결과 40±4%였다.

국문요약

Radiolabeled Brazilin(^{3}H-Brazilin)을 웅성 Wistar Rats에 투여하여 plasma concentration-time profile, urine 및 bile로의 배설, 조직분포 및 plasma protein에 대한 결합률을 살펴보았다.

1. Pharmacokinetic parameters는 다음과 같았다. $t_{1/2}$은 13.7 hr, AUC는 53.38 μg·hr/ml, AUMC는 1013.4 μg·hr^2/ml MRT는 18.95 hr, Vss는 17.778 l/kg 그리고 CL은 936.77 ml/hr·kg였다.

2. Plasma concentration-time profile에서 enterohepatic circulation을 시사하여 2nd peak가 발견되었고, 담즙배설 실험으로 확증할 수가 있었다. 경구투여 후 담즙배설은 투여량의 64.4%가 10시간에 걸쳐 배설되었고, 3시간째 그 배설속도는 maximum을 이뤘다.

3. Vss는 17.8 l/kg으로 큰 값을 나타냈고, 따라서 뇌를 제외한 대부분의 조직에 Brazilin은 분포하였고 특히 liver와 kidney, epididymus 그리고 testis에 고농도 분포함을 알 수 있었다.

4. 경구투여량의 44.1%가, 정맥주사 후 투여량의 62.9%가 urine을 통해 배설되었다. Urine을 통해 배설되는 量의 대부분(80%)은 24시간 내에 배설되었다.

5. Plasma protein에 대한 결합율을 한외여과법으로 측정한 결과 40±4%가 결합하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. J. Bitskei and P. Moritz: Brazilin as an acid-base indicator. *Acta. Chim. Sci. Hung.*, **11**, 35 (1957).

2. M. Gabor: The effect of hematoxylin and

related compounds on capillary resistance. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 405 (1952).
3. M. Gabor: Antagonism of blood coagulation inhibitors and vitamin P like substance. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 195 (1952).
4. M. Gabor: Inhibitory effect of the members of the hematoxylin group on the action of histidine decarboxylase. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 595 (1952).
5. M. Gabor: Prolongation of the effect of adrenalines in surviving organs and *in vivo* produced by members of hematoxylin group. *Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 585 (1952).
6. M. Gabor: Plants pigment having vitamin P acting on the frog heart. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **95**, 69 (1953).
7. H. Hirach: Antiinflammatory principles of Caesalpinia sappan wood and of Hematoxylon campechianum. *Plant Med.*, **31**, 214 (1977).
8. A. Sanchels-Maroquin: Brazilin, antibacterial substance from hematoxylon braziletto. *Rev. Lattroam. Microbiol.*, **1**, 225 (1977).
9. O.G. Lima: Antibiotic substances from higher plants XVII; Antibiotic spectra of some flabonoid and Brazilin. *Rev. Int. Antibiot. Vniv. Recife.*, **3**, 81 (1961).
10. T. Iwamin: The effect of various flavone glycosides on the excretion of uric acid and the capillary stabilizing action. *Hirosak Igaku*, **12**, 83 (1960).
11. T. Nikaido: Inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase in medicinal plants. *Planta Med.*, **43**,18 (1981).
12. C.K. Moon, M.Y. Ahn and J.H. Chung: Pro tective effects of some phytobased polysaccharides on the acute hepatic damage of ICR mice induced by the administration of carbon tetrachloride and D-galactosamine. *J. Pharm. Soc. Kor.*, **29**, 43 (1985).
13. C.K. Moon and B.J. Haar: Studies on the antilipidperoxidation effect of Brazilin and hematoxyin. *Arch. Pharmac. Res.*, **7**, 63 (1984).
14. C.K. Moon, Y.P. Yun, J.H. Lee, H. Wager and Y.H. Shin: Inhibition of lens aldose reductase activity by Brazilin and hematoxylin, *Panta Med.*, **47**, 66 (1985).
15. C.K Moon, N.Y. Kang and J.H. Jung: Effect of Brazilin on plasma lipid levels in spontaneously hypertensive rats, *Fett. Seifen Anstrichmittel.*, **87**, 74 (1985).
16. S. Aonuma, Y. Kohama and S. Fujimoto: Studies on aspirin derivatives with very little side effects III, *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 252 (1982).
17. J. Higashi, N. Notoji, R. Yamajo and N. Yata: Effect of anesthesia on drug disposition in rat, *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 112 (1982).
18. M.L. Chen and W.L. Chiou: Pharmacokinetics of Methotraxate and 7-Hydroxy Methotrexate in rabbits after intravenvous administration, *J. Pharm. Biopharm.*, **11**, 499 (1983).
19. B. Maruhn, H.M. Siefert, H. Weber, K. Ramsch and D. Suwelack: Pharmacokinetics of Nimodipine, *Arzneim.-Forsch.*, **35**, 1781 (1985).
20. 藤井敏彦・^{14}C 標識 AT-2266の ウシトにあサふ體内動態, *Chemotherapy*, **32**, 2(1984).
21. H.Mijazaki, Y. Mastsunaga, K. Nambu, Y. Ohe, K. Yoshida and M. Hashimoto: Disposition and metabolism of [^{14}C]-Haloperidol in rats, *Arzneim. - Forsch.*, **36**, 443 (1983).
22. A. Yoshida, M. Fujita, E. Owada and K. Ito: Effect of Diltazem on plasma and tissue Digoxin levels in mice, *J. Pharm. Dyn.* **7**, 511 (1984).
23. R.T. Schillings and S.F. Sisenwine: Disposition of ^{5}H-Dibenzo [a,d]cyclohepten-5-y (idene) acetic acid in laboratory animals, *Drug Met. and Disp.* **14**, 405 (1986).