

파모인산베르베린의 生體內 利用率에 관한 研究 (I)

梁 在 憲

전주우석대학 약학과

(1986년 4 월 25일 접수)

Studies on Bioavailability of Berberine Pamoate (I)

Jae Heon Yang

Department of Pharmacy, Jeonju Woosouk University

(Received July 25, 1986)

Berberine is one of alkaloids extracted from *Phellodendri Cortex* or *Coptidis Rhizoma* and has extensively used as an antibacterial and antidiarrheal drug. In order to increase the bioavailability of berberine preparation, berberine pamoate was synthesized and investigated on its usage *in vitro* and *in vivo*.

Berberine was more rapidly extracted from herbal plants by hot water extraction method than soxhlet extraction method. Berberine pamoate was easily synthesized from berberine hydrochloride and potassium pamoate solution and identified using the infrared spectrum. Quantitative analysis of berberine was possible in methanol solution by fluorometric determination. The dissolution rate of berberine pamoate was more decreased than that of berberine hydrochloride in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. The remaining proportion of berberine pamoate in the small intestine of rat was maintained at high concentration for a long time as compared with that of berberine hydrochloride.

berberine은 황백 및 황련등의 생약에 함유되어 있는 alkaloid의 일종으로서 심근에 작용하여 관동맥 혈류량을 증가시키고 점막 및 피하에 적용할 때에는 가벼운 국소마취작용을 나타내며 동물실험에서는 혈압강하작용, 항빈혈작용 및 적출장관에 대한 긴장증대작용이 알려져 있다¹⁻⁵⁾.

또한 대장균, 콜레라균, 티브스균, 적리균 및 임균 등에 대한 살균작용과 말라리아등 열대병원기생충에 대한 살충작용이 보고되어 있다^{6,7)}.

부작용으로서는 대량투여에 의하여 부교감신경 흥분상태를 일으키고 심기능저하, 장관연동항진, 기관지경련 및 호흡억제 현상이 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾.

berberine 제제로서는 황백 및 황련 등의 생약을 분쇄하여 환제를 만들어 정장지사제로 사용하고 있는데 한방에서는 삼황사심탕, 황련해독탕 등으로 하여 복용되어 왔으며 최근에는 생약으로부터 berberine을 추출하여, berberine hydrochloride (이하 Ber-HCl로 약함)로 만든 다음 정제를 제조하여 사용하기도 한다. 따라서 생약분말을 직접 제제원료로 사용할 경우 위생관리에 난점이 있을 뿐만 아니라 Ber-HCl을 사용하는 경우에도 생약으로부터의 추출 및 제조과정에 어려움이 있으므로 제품의 품질관리에 큰 지장을 초래하고 있다.

沢田등¹²⁾은 Ber-HCl의 methanol 용액에 tannic acid를 가하여 berberine tannate를 합성

함으로서 Ber-HCl의 고미를 제거하였고 배합 변화를 줄일 수 있었다고 보고하였다.

Hatchuel 등¹³⁾은 pyrantel pamoate에 관한 연구에서 pyrantel pamoate를 합성하여 인체에 투여한 결과 체내에서 높은 구충효과를 나타내고 반면 독성은 낮았다고 보고하였다.

Saias 등¹⁴⁾은 noscapine pamoate, papaverine pamoate, promethazine pamoate, piperazine pamoate 등을 합성하여 이들을 rabbit에 경구투여시킨 결과 체내작용시간이 염산염에 비하여 1.5배 정도 연장되었다고 보고하였다.

저자는 생약 중 berberine의 추출 및 제조방법을 개선하고 berberine 제제의 생체내 이용률을 높이기 위하여 생약으로부터 berberine의 추출, berberine pamoate(이하 Ber-pam로 약함)의 제조, 분석, 용출 및 장내흡수 등에 관한 실험을 통하여 우수약품개발에 도움이 될 만한 새로운 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

재료 및 기기

berberine HCl(E. Merck), pamoic acid(E. Merck), *Phellodendri Cortex*(시중구입), *Coptidis Rhizoma*(시중구입) 등을 사용하였다. 기기로는 infrared spectrophotometer(Perkin-Elmer), freeze dryer-8(Labconco), spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-250), fluorescence spectrophotometer(Hitachi 650-40), dissolution tester(Tokyo Rikakikai Co.) 등을 사용하였다.

실험동물

dd계 rat 수컷을 24시간 절식시킨 후 사용하였다.

Berberine의 추출

생약 중 berberine의 추출은 soxhlet 추출법과 열탕추출법의 2 가지 방법을 사용하였다¹⁵⁻²⁰⁾. 황백분말 20g을 조말로 하여 원통여지에 넣고 benzene 100ml를 넣어 soxhlet추출장치를 이용하여 3 시간동안 수욕상에서 추출·탈지시킨 다음 benzene을 버리고 methanol 200ml를 가

하여 추출액이 거의 무색으로 될 때까지 연속 추출시킨 다음 methanol추출액을 수욕상에서 증발시킨다. 여기에 증류수 100ml를 가하고 d-HCl 10ml 및 talc 10g을 넣어 10분간 수욕상에서 가온한 다음 여과하고 여액을 24시간 방치시킨 후 Ber-HCl의 황색결정이 석출되면 온수로 재결정시킨다. 열탕추출법으로서는 ethyl ether로 탈지조작 후 추출용매로서 methanol대신 열탕 300 ml를 가하여 수욕상에서 4시간 동안 가온한 후 온시 여과시킨다. 여액에 d-HCl 100ml 및 talc 10g을 넣어 이하 soxhlet추출법과 동일조작을 시행하였다.

Ber-pam의 제조

Ber-HCl 2g에 methanol 10ml를 가하여 가온 용해시키고 d-HCl을 적가하여 pH 3.0으로 만든다. 따로 pamoic acid 1.2g에 10% pot. hydroxide 용액 6 ml 및 증류수 200 ml를 가하여 pot. pamoate 용액을 만든다. Ber-pam 용액에 pot. pamoate 용액을 교반하면서 서서히 가해 주면 황색침전이 생성된다. 용액이 중성에 가까워지면 반응을 중지시키고 침전을 여취한 후 증류수 및 methanol로 세척하고 freeze dryer를 사용하여 동결건조(-66°C, 10micron Hg)시켰다(Fig. 1).

Ber-pam의 확인

황백색으로부터 추출 제조한 Ber-pam의 확

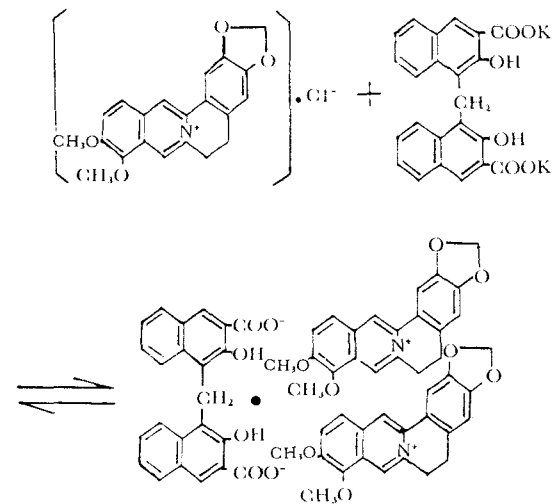


Figure 1 — Structure of berberine pamoate.

인은 적외부 흡수 spectrum, 자외부 흡수 spectrum 및 유기용매에 대한 용해도를 Ber-HCl 및 pamoic acid와 비교 확인하였다.

Berberine의 정량

berberine의 정량은 비색정량법이 널리 알려져 있으나 저자는 형광측정법으로 실시하였다²¹⁻²³⁾. 먼저 Ber-pam 100mg을 정밀히 취하여 acetic acid에 용해하고 전량을 100ml로 한다. 그 중 10ml를 취하여 methanol을 가하고 전량을 100ml로 하여 검액으로 한다(1 μ g/ml). 따로 Ber-HCl 표준품 100mg을 취하여 methanol에 용해시킨 다음 이하 검액과 동일하게 조작하여 표준액으로 한다(1 μ g/ml).

표준액과 검액을 취하여 여기파장 353 nm와 형광파장 535nm에서 나타나는 형광강도를 측정 한 후 다음 식에 의하여 berberine의 함량을 산출한다.

$$\text{Berberine의 함량(\%)} = \frac{FI_p}{FI_b} \times 1.423$$

FI_b : berberine hydrochloride의 형광강도

FI_p : berberine pamoate의 형광강도

1.423 : berberine hydrochloride에 대한 berberine pamoate의 분자량 비

Ber-pam의 용출시험

Ber-pam 50mg을 취하여 3호 캡셀에 충전한 다음 K. P. IV의 용출시험법중 회전검체통법에 의하여 실험을 실시하였으며 Ber-HCl과 그 용출율을 비교하였다. 먼저 Ber-HCl 또는 Ber-pam 1캡셀을 basket에 넣고 용출용매로서 인공위액, pH 4.5 완충액 및 인공장액을 사용하여 회전속도 100rpm, 용매의 온도를 37 \pm 0.1 $^{\circ}$ C로 유지하면서 시간별로 용출액 5ml씩을 취하여 이것의 형광강도를 측정하여 Ber-HCl 및 Ber-pam의 누적용출량을 구하였다.

Ber-pam의 소장흡수실험

Ber-pam의 소장내흡수실험은 Doluisio법^{34,35)}에 준하여 실험하였다. 먼저 Ber-HCl 및 Ber-pam을 각각 10mg씩 취하고 3% methyl cellulose 100ml씩을 가하여 현탁액으로 하였다.

rat는 ethyl ether로써 흡입마취시키고 개복한 후 소장부위를 밖으로 꺼낸 다음 십이지장,

공장 및 회장을 각각 10cm 길이로 양단을 묶은 후 장내부에 생리식염수를 3회씩 주입하여 세척하고 공기를 주입하여 생리식염수를 제거한 다음 Ber-HCl와 Ber-pam를 주입시켜 일정시간 방치시켰다. 십이지장, 공장 및 회장의 각 부위에서 장액 1ml씩을 취하고 methanol을 가하여 전량 100ml로 한 후 여과하고 여액 5ml를 취하여 다시 methanol을 넣어 전량 50ml로 만든 다음 나타나는 형광강도를 여기파장 353nm, 형광파장 535nm에서 측정함으로써 Ber-HCl와 Ber-pam의 소장내 잔존율을 비교 검토하였다.

실험결과 및 고찰

Berberine의 추출

생약의 탈지조작 과정에서 日本藥局方에 명시된 soxhlet 추출법에서는 ethyl ether를 사용한 결과 ethyl ether의 강한 휘발성으로 인하여 탈지조작이 잘 이루어지지 않았으므로 benzene를 전처리 용매로 사용하였고, 열탕추출법에서는 ethyl ether를 사용하였는데 ethyl ether를 사용하는 것이 benzene를 사용하는 것보다 조작이 간편하였고 시간도 단축되었다.

Berberine 추출용매로서는 soxhlet 추출법에서 methanol을 사용하였고 열탕추출법에서는 온수를 사용하였는데 수지성물질이 주성분과 같이 추출되었으므로 talc를 사용하여 흡착시켰

Table I - Yields of Berberine by Soxhlet Extraction and Hot Water Extraction in Herbal Plants.

Experimental number	Phellodendri Cortex		Coptidis Rhizoma	
	Soxhlet	Hot water	Soxhlet	Hot water
1	0.78*	1.19	2.67	3.38
2	0.86	1.29	2.53	3.14
3	0.89	1.13	2.63	3.42
4	0.81	1.17	2.57	3.18
5	0.97	1.21	2.43	3.25
Mean	0.86	1.20	2.57	3.27

*Yield of berberine(%)

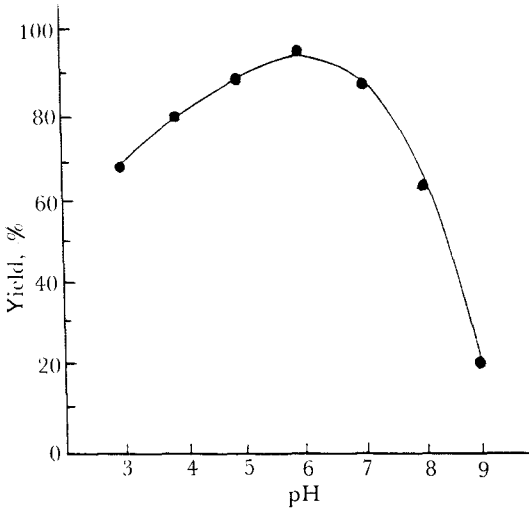


Figure 2 — Yields of synthesis of berberine pamoate under various pH conditions.

으며 특히 열탕추출법에서는 수지성 물질이 많았으므로 talc사용량을 2배 이상으로 늘려 사용하였다.

생약에서 추출된 berberine의 수율을 추출방법에 따라 비교해 보면 황백을 사용한 것은 soxhlet 추출법이 평균 0.86%인데 비하여 열탕추

출법에서는 1.20%이었고, 황련을 사용한 것은 soxhlet 추출법이 평균 2.57%인데 비하여 열탕추출법에서는 3.27%로서 열탕추출법이 훨씬 양호한 추출양상을 보여 주었다(Table I).

Ber-pam의 제조

Ber-HCl의 산성용액에 pot. pamoate 용액을 서서히 가해주면 pH가 상승하면서 황색침전이 생성되기 시작하였는데 이 혼합용액의 pH는 합성수율에 크게 영향을 주었다. pH 3.0에서 72.1%의 수득율을 보여 주었고 pH 4.0에서 82.8%, pH 5.0에서 92.1%이었는데 pH 6.0에서 98.1%로서 가장 높은 수득율을 보여 주었으며 pH 7.0에서 84.5%, pH 8.0에서 62.6%로 나타났다. 즉 pH 5.0~7.0에서 비교적 높은 수득율을 나타낸 반면 pH 8.0 이상으로 되면서 수득율이 떨어졌으며 pH 9.0 이상에서는 점조성 물질이 생성되면서 갈색으로 변색되었다(Fig. 2).

Ber-pam의 확인

Ber-HCl 으로부터 합성한 Ber-pam을 KBr 법으로 적외부 흡수 spectrum을 측정 한 결과 Ber-HCl의 흡수 spectrum에서 볼 수 없는

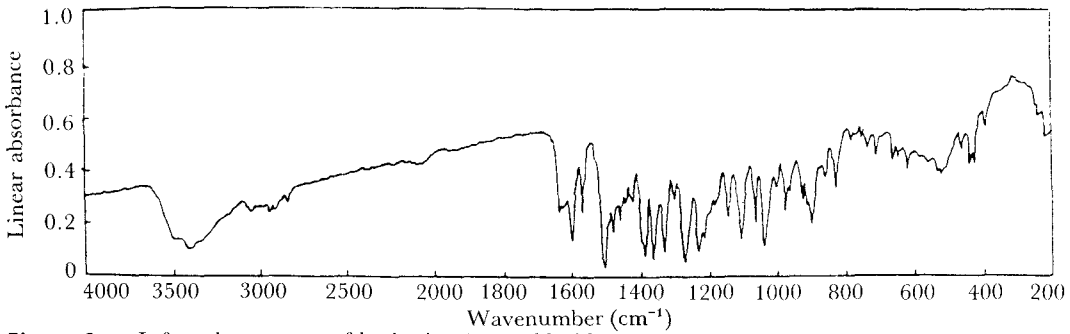


Figure 3 — Infrared spectrum of berberine hydrochloride.

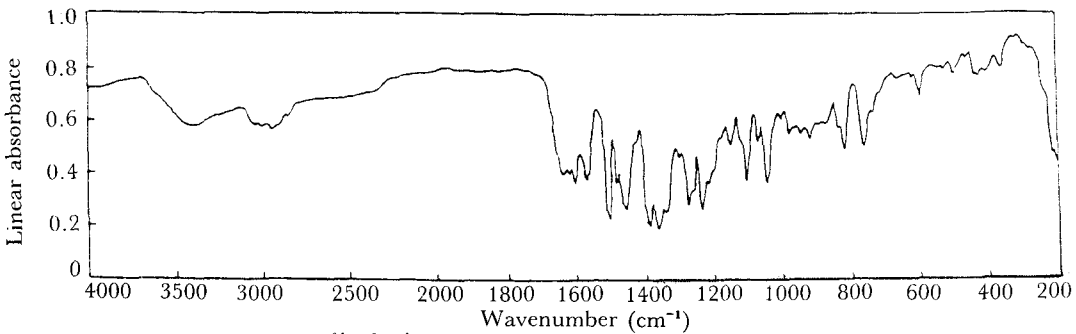


Figure 4 — Infrared spectrum of berberine pamoate.

carboxyl기의 새로운 흡수 spectrum이 나타났는데 berberine의 $-OCH_3$ 기가 $2850\sim 2950\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났고 pamoic acid의 $-COOH$ 기가 1650cm^{-1} 에서 나타났다(Fig. 3 및 Fig. 4).

Ber-HCl의 자외부 흡수 spectrum을 관찰해 보면 350, 295 및 280nm부근에서 흡수극대를 보여 주었고 pamoic acid는 380 및 235nm 부근에서 흡수극대가 나타났는데 Ber-pam은 350 및 235nm에서 흡수극대가 나타나므로 Ber-HCl 및 pamoic acid의 특징이 모두 확인되었다(Fig. 5 및 6).

Ber-HCl과 Ber-pam의 각 용매에 대한 용해도를 비교해 보면 Ber-HCl은 methanol 및 ethanol에 용해되는 반면, Ber-pam은 acetic acid에 용해되었으나 acetone, benzene 및 ether에는 모두 난용성이었다.

Ber-HCl의 물에 대한 용해도는 온도에 따라 큰 차이를 보여 주었는데 20°C 에서 1.4mg/ml , 30°C 에서 2.16mg/ml , 37°C 에서 2.3mg/ml 씩 용해되었으나 50°C 에서는 10.4mg/ml 으로 용해도가 높아졌다.

한편 Ber-pam은 물에 난용성이었으며 온도에 따른 영향도 거의 없는 것으로 나타났다.

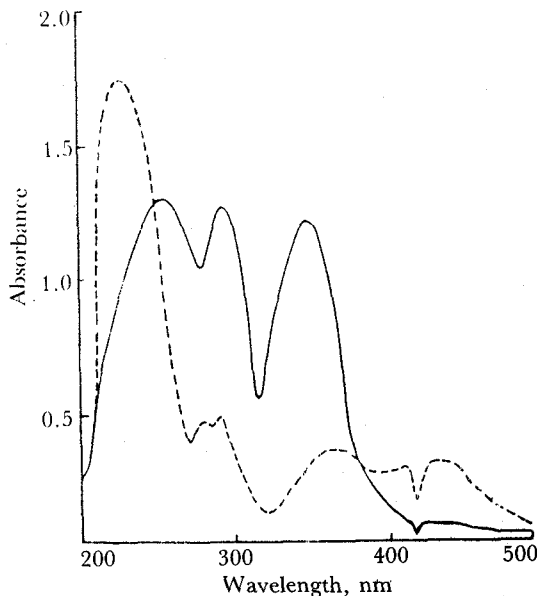


Figure 5 — Absorption spectra of pamoic acid and berberine hydrochloride.

Key: —, Ber-HCl; -----, pamoic acid

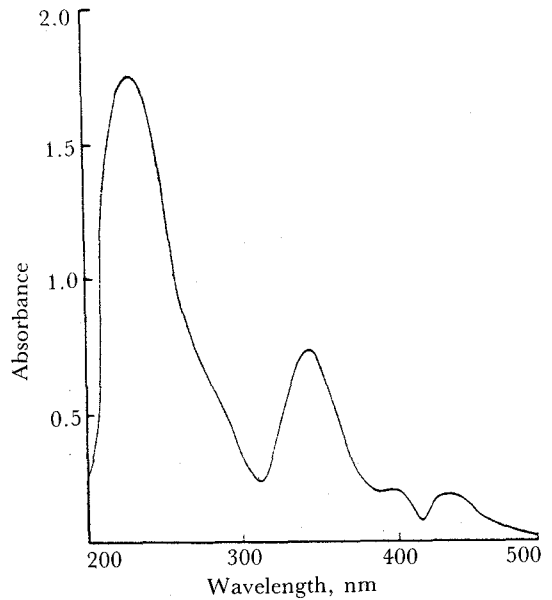


Figure 6 — Absorption spectrum of berberine pamoate.

Berberine의 정량

Ber-HCl의 methanol용액은 형광을 나타내었으며 $1\mu\text{g/ml}$ 용액의 형광강도를 측정하 결과 여기파장 353nm, 형광파장 535nm에서 최대형광강도를 나타내었다(Fig. 7 및 8).

pamoic acid의 methanol용액에서는 형광이 검출되지 않았으므로 Ber-pam의 정량도 Ber-HCl을 표준품으로 사용하여 용이하게 이루어

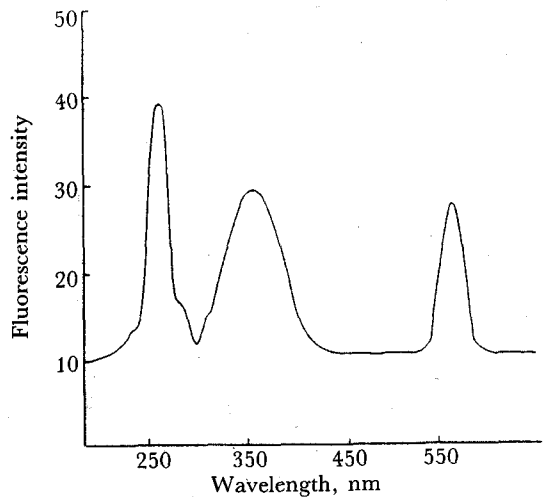


Figure 7 — Fluorescence spectrum of berberine hydrochloride at emission max. 535 nm.

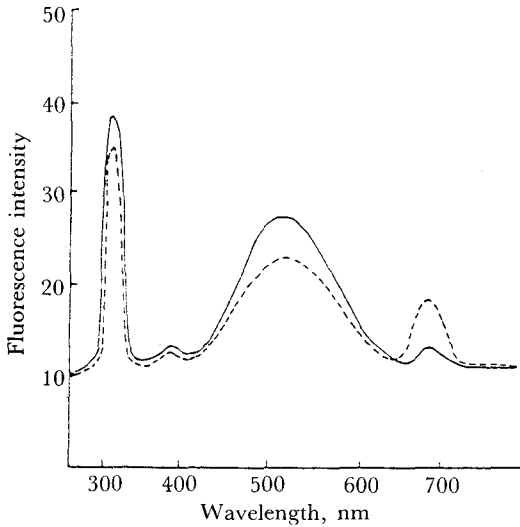


Figure 8 — Fluorescence emission spectra of berberine hydrochloride and berberine pamoate at excitation max. 353 nm.

Key : —, Ber-HCl; - - - - , Ber-pam

질 수 있었다.

Ber-pam의 methanol에 대한 용해도가 낮았으므로 먼저 acetic acid에 용해시킨 후 methanol로서 희석하여 측정하였는데 Ber-HCl과 동일한 형광 spectrum을 보여 주었다(Fig. 8).

한편 Ber-HCl 및 Ber-pam의 검량선은 3 $\mu\text{g/ml}$ 까지 모두 양호한 직선성을 보여 주었다(Fig. 9).

Ber-pam의 용출

인공위액 (pH 1.2)에서 Ber-HCl과 Ber-

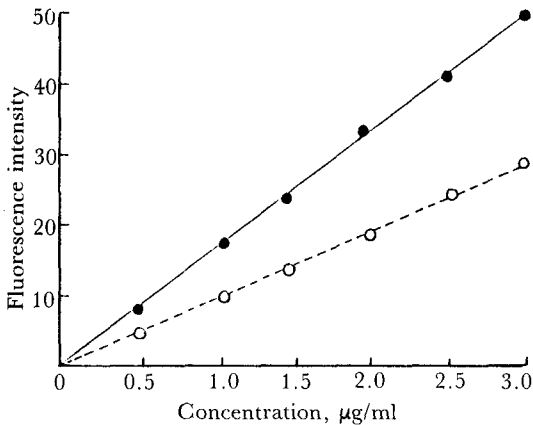


Figure 9 — Calibration curve for Ber-HCl and Ber-pam in methanol.

Key: —, Ber-HCl; - - - - , Ber-pam

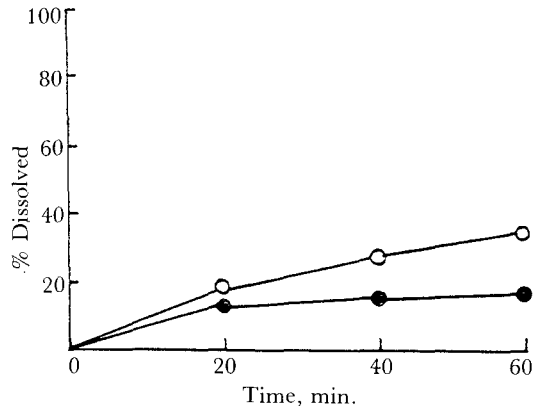


Figure 10 — Dissolution profile of berberine hydrochloride and berberine pamoate in artificial gastric fluid (pH 1.2).

Key: ○—○, Ber-HCl; ●—●, Ber-pam

pam의 용출 양상을 비교해 보면 20분 후의 용출율은 Ber-HCl 15.7%, Ber-pam 10.6%로서 큰 차이는 없었으나 60분 후의 용출율은 Ber-pam이 12.2%인데 비하여 Ber-HCl은 30.8%의 높은 용출율을 보여 주었다(Fig. 10).

pH 4.5 완충용액에서의 용출양상을 비교해 보면 20분 후의 용출율은 Ber-HCl 71.4%, Ber-pam 11.2%로서 큰 차이를 보여 주었으며 60분 후의 용출율은 Ber-pam이 22.3%인데 비하여 Ber-HCl은 88.2%로서 약 4배 정도의 높은 용출율을 나타내었다(Fig. 11).

인공장액에서 Ber-HCl과 Ber-pam의 용출

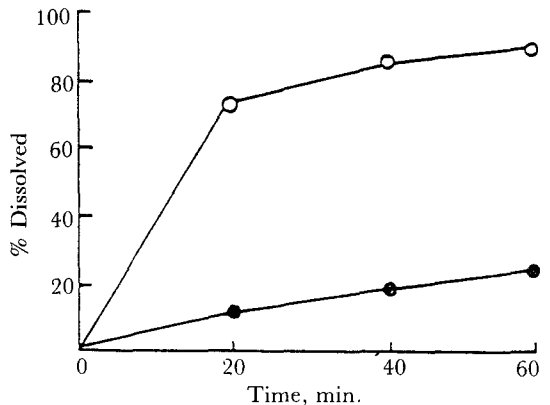


Figure 11 — Dissolution profile of berberine hydrochloride and berberine pamoate in acetate buffer solution (pH 4.5).

Key: ○—○, Ber-HCl; ●—●, Ber-pam

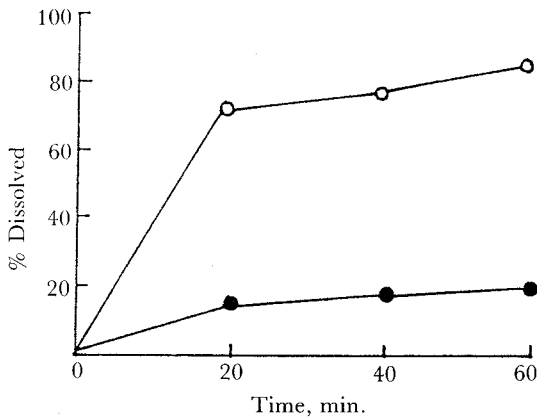


Figure 12 — Dissolution profile of berberine hydrochloride and berberine pamoate in artificial intestinal fluid (pH 6.8).
Key: ○—○, Ber-HCl; ●—●, Ber-pam

양상을 비교해 보면 20분 후의 용출량은 Ber-HCl 71.3%, Ber-pam 14.8%로서 역시 큰 차이를 보여 주었으며 60분 후의 용출율은 Ber-pam이 17.7%인데 비하여 Ber-HCl은 83.8%로서 약 5배 정도의 높은 용출율을 나타내었다 (Fig. 12).

한편 Miyazaki 등³⁶⁾의 「berberine 염에 대한 용출양상」에 의하면 Ber-HCl의 용출율이 산성 및 중성용액에서 모두 저조한 것으로 보고되어 있으나 본 실험결과 pH 4.5 완충용액 및 인공장액 (pH 6.8)에서는 양호한 용출양상을 보여 주었으며 Ber-pam의 용출율은 산성 및 중성용액에서 모두 낮은 것으로 나타났다.

Ber-pam의 소장흡수

Ber-HCl과 Ber-pam의 소장내 잔존율을 비

교하기 위하여 십이지장, 공장 및 회장별로 berberine의 농도를 각각 시간별로 측정된 결과 십이지장에서는 약물 주입 30분 후에 Ber-HCl이 84.6%이었는데 Ber-pam이 90.0%로서 5%정도 높았고, 180분 후에는 Ber-HCl이 62.0%인 반면 Ber-pam이 72.6%로 나타나 10%정도 높게 유지되었다.

공장에서는 약물 주입 30분 후 Ber-HCl이 86.1%, Ber-pam이 92.0%로서 6%정도 높게 유지되었다.

회장에서는 약물 주입 30분 후 Ber-HCl이 86.9%, Ber-pam이 92.6%로서 6%정도 높았고, 180분 후에는 Ber-HCl이 63.9%인 반면 Ber-pam이 76.9%로 나타나 13%정도 높게 유지되었다 (Table II).

시간 별로 각 장기에서의 잔존율의 평균치를 비교해 보면 Ber-pam이 Ber-HCl에 비하여

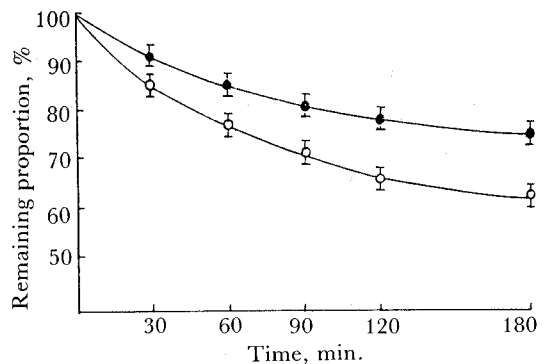


Figure 13 — Comparison of remaining proportion of Ber-HCl and Ber-pam in small intestine of rat.
Key: ○—○, Ber-HCl; ●—●, Ber-pam

Table II — Remaining Proportion of Berberine Hydrochloride and Berberine Pamoate in Duodenum, Jejunum and Ileum of Rat.

Time, min.	Duodenum		Jejunum		Ileum	
	Ber-HCl	Ber-pam	Ber-HCl	Ber-pam	Ber-HCl	Ber-pam
30	84.6 ± 2.1*	90.0 ± 2.3	86.1 ± 1.4	92.0 ± 1.2	86.9 ± 2.6	92.6 ± 1.7
60	75.2 ± 2.6	83.3 ± 1.7	77.5 ± 1.8	85.8 ± 1.1	79.5 ± 1.8	87.5 ± 2.3
90	68.5 ± 1.6	78.5 ± 1.5	70.4 ± 2.1	81.7 ± 3.1	73.7 ± 1.5	83.0 ± 2.2
120	64.4 ± 1.5	75.0 ± 1.6	65.0 ± 2.2	78.9 ± 1.4	68.8 ± 1.6	78.9 ± 1.6
180	62.0 ± 1.6	72.6 ± 1.8	60.0 ± 2.1	75.0 ± 1.9	63.9 ± 1.7	76.9 ± 1.8

*Mean ± S. E. (%)

약물 주입 30분 후에 5.6%, 60분 후에 8.1%, 90분 후에 10.2%, 120분 후에 11.5%, 180분 후에 12.8% 높게 유지되는 것으로 나타났다 (Fig. 13).

결 론

Berberine 제제의 생체내 이용율을 높이기 위하여 berberine 추출, Ber-pam의 제조, 분석 및 소장내 흡수실험을 실시한 결과 아래와 같이 결론을 얻었다.

1. 생약 중 berberine의 추출은 열탕추출법이 soxhlet 추출법에 비하여 훨씬 양호한 추출양상을 보여 주었다.

2. Ber-pam의 제조는 pH 5.0~7.0에서 비교적 높은 수득율을 나타내었다.

3. 합성된 Ber-pam은 적외부 흡수 spectrum 및 자외부 흡수 spectrum에 의하여 pamoic acid염이 확인되었다.

4. Ber-pam의 정량은 형광측정법에 의하여 신속하고 정확하게 실시할 수 있었다.

5. Ber-HCl 및 Ber-pam의 용출양상을 비교한 결과 인공위액, pH 4.5 완충액 및 인공장액에서 Ber-pam이 Ber-HCl보다 용출시간이 훨씬 지연되었다.

6. Ber-HCl 및 Ber-pam의 소장내 잔존율을 측정한 결과 십이지장, 공장 및 회장에서 모두 Ber-pam이 Ber-HCl에 비하여 높은 장내 농도를 유지하였다.

따라서 Ber-pam이 Ber-HCl에 비하여 소장내 흡수율이 낮아 장내농도를 높게 유지함으로써 장내살균 및 지사효과가 더욱 강하게 나타날 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 1985년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었기에 문교당국에 감사드립니다.

문 헌

1) 山原條仁, 日藥理誌, 72, 899 (1976)

2) J. Koudelka, E. Smckal and J. Skorpikova, *Studia Biophysica*, 67 (S), 21 (1978)

3) S.M. Shanbhag, H.J. Kulkarni and B.B. Gaitonde, *Jap. J. Pharm.*, 20, 482 (1970)

4) Hidcomi Fukuda, Kazuo Watanabe and Yoshihisa Kudo, *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (7), 1299 (1970).

5) H. Fujimura, T. Sawada and M. Goto, *Yakugaku Zasshi*, 90 (6), 782 (1970).

6) A.H. Amine, T.V. Subbaiah and K.M. Abbasi, *Can. J. Microb.*, 15, 1067 (1969)

7) T.V. Subbaiah and A.H. Amine, *Nature*, 215, 29 (1967)

8) 日本公定書協會, 日本藥局方 第十改正解説書 C-338 (1981)

9) N.K. Dutta, P.H. Marker and N.R. Rao, *Br. J. Pharm.*, 44, 153 (1972)

10) Beileizhu and Franklin Ahrens, *European Journal of Pharmacology*, 96, 11 (1983)

11) S. Parelka and J. Kovar, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 40, 753 (1975)

12) 澤田弘ら, 日本公定書協會會報, 16, 7 (1966)

13) Hatchuel and Walter, *Cent. Afr. J. Med.*, 19(5), 102 (1973)

14) E. Saias and H. Kornowski, *France Patent* 1461407 (1966)

15) Donald C. Van Dyke, *Mendel. Bull.*, 1, 34 (1967)

16) Wu-Nan Wu, Lester A. Mitscher, Jack L. Beal., *Lloydia*, 39(4), 219 (1976)

17) Maric. E. Popova and Landislar Dolejs, *Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.*, 3(1), 95 (1981)

18) 富田眞雄, 国友順一, 藥学雜誌, 80, 1300 (1959)

19) Y. Kawashima, *Yakugaku Zasshi*, 89, 1386 (1969).

20) M. Sainsbury, D. W. Brown, S.F. Dyke and G. Hardy, *Tetrahedron*, 25, 1881 (1969)

21) Tadao Saki, *Analyst*, 108, 608 (1983)

22) R. Verpoorte, J. Srwon, *Journal of Natural Products*, 45, 5 (1982)

23) V. Mikes and J. Kovar, *Biochimica et Biophysica Acta*, 640, 341 (1981)

24) Tadao Sakai, *J. Pharm. Sci.*, 68 (7), 875

- (1979)
- 25) Tadao Hattori and Noritaka Kamiya, *Yakugaku Zasshi*, **97**(12), 1305 (1977)
- 26) Masao Tomita and Junichi Kunitomo, *Yakugaku Zasshi*, **80**(7), 880 (1959)
- 27) Takeo Ishiguro, Masami Yagku and Shoji Takahashi, *Yakugaku Zasshi*, **80**(2), 888 (1959)
- 28) 酒井忠雄, *Tadao Sakai*, **24**(7), 135 (1975)
- 29) Mamoru Noguchi and Kenshu Mochida, 衛生試験所報告, **93**, 90 (1975)
- 30) Goichi Kurono, Kiyo Ogura and Keisuke Sasaki, *Yakugaku Zasshi*, **85**(3), 262 (1965)
- 31) Tadao Hattori, Masahide Inoue and Masakatsu, *Yakugaku Zasshi*, **97**(11), 1263 (1977)
- 32) Mamoru Noguchi and Kenshu Mochida, *Syoyakugaku Zasshi*, **30**(1), 47 (1976)
- 33) Y. Hashimoto, K. Ando and M. Mizuno, *Syoyakugaku Zasshi*, **30**(2), 127 (1976)
- 34) J.T. Doluisio, N.F. Billups, L.W. Ditter and J.T. Swintosky, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1196 (1967)
- 35) William H. Barr and Sidney Riegelman, *J. Pharm. Sci.* **59**, 2 (1970)
- 36) S. Miyazaki and M. Oshiba, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(3), 883 (1981)