

은행잎엑스 수용액 중 Ginkgoflavonglycoside 의 안정성

김종국[†]·박만기·이은진·황성주

서울대학교 약학대학, 물리약학연구소

(1989년 12월 5일 접수)

Stability of Ginkgoflavonglycoside in Ginkgo Extract Aqueous Solution

Chong-Kook Kim[†], Man-Ki Park, Eun-Jin Lee and Sung-Joo Hwang

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 5, 1989)

To formulate the stable preparation of Ginkgo extract injection and to evaluate the stability of the preparation, Ginkgo extract aqueous solutions having various pH values were prepared and the stability of ginkgoflavonglycoside (GFG) was investigated by high performance liquid chromatography. The stability of GFG decreased as pH increased, while the water solubility of Ginkgo extract decreased as pH decreased. The optimal pH of the Ginkgo extract aqueous solution was found to be pH 6.5. The shelf life ($T_{90\%}$) of the Ginkgo extract aqueous solution of pH 6.5 at 20°C was extrapolated to be four years.

Keywords—Ginkgo extract, ginkgoflavonglycoside, stability, log k-pH profile, shelf life

은행나무(*Salisburia adriantifolia* Smith) 잎의 추출물인 복합성분체는 지속적인 뇌 및 말초혈관 확장작용, 뇌혈류 촉진작용 등이 있으며,¹⁻⁴⁾ 임상적으로는 뇌기능 촉진 및 뇌혈류 개선효과, 급만성 뇌혈류 순환장애 및 뇌순환 부전증 치료효과 등이 확인된^{5,6)} 생약추출물이다. 이러한 은행황색잎으로부터 Fisel[®]은 flavonol 비배당체를 추출하였고, Geiger 등⁷⁾은 7종의 배당체를 확인하였으며, Petter 등⁸⁾은 이들 배당체 중 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 이 30%까지 함유되어 있는 복합성분체를 투여하였을 때 약효가 가장 우수하며 이들 성분 이외의 다른 천연성분은 그 같은 약효가 없는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 은행잎엑스 주사제 처방 설계를 위하여 프로필렌글리콜 및 소르비톨 등을 보조용

매로 사용하여 은행잎엑스 수용액을 조제한 후, 현재 은행잎엑스 제제의 품질관리에 지표물질로 사용되고 있는 quercetin 및 kaempferol 배당체 함량의 경시변화를 반응속도론적으로 연구하여, 이들 배당체의 총합인 ginkgoflavonglycoside (GFG)의 20°C에서의 shelf life($T_{90\%}$)를 구함으로써 은행잎엑스 수용액의 경시 안정성을 예측하였다.

실험방법

시약 및 기기

은행잎엑스(주사제용 24% GFG)는 동방제약으로부터 기증받았다. 소르비톨, 프로필렌글리콜, 초산에칠, 메탄올, 이소프로판올, 아세트니트릴

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

등의 용매는 시판 1급 시약을 사용하였다.

기기로는 고속액체크로마토그래프장치 (Hitachi 638-50), 자외흡광광도계 (Hitachi 655A), 회전식 감압증발기 (Tokyo Rikakikai Co., LTD., Eyla Type N-1), vortex mixer (Thermolyne type 37600), pH 측정기 (Corning Model 7), 항온조 (Grant SS 12/74) 등을 사용하였다.

은행잎엑스의 가용화

은행잎엑스 350 mg 과 소르비톨 4g 및 프로필렌 글리콜 3ml 를 주사용 증류수 약 90 ml 에 가하여 1 시간 동안 교반한 후 0.1 N 수산화나트륨을 가하여 pH 6.5, 7.5 또는 8.5로 조절하고 다시 주사용 증류수를 가하여 총 100 ml 로 만든 다음 멤브레인 필터 (0.45 μm) 로 여과하여 앰플에 일정량씩 취하여 용봉하였다.

안정성 시험

앰플에 용봉한 은행잎엑스 수용액을 40, 50, 70 및 90°C 항온조에 각각 보관하여 일정시간 간격으로 채취한 후 경시변화를 관찰하였다.

Quercetin 및 Kaempferol 배당체의 정량

각 항온조에서 일정시간 간격으로 채취한 검액을 마개달린 시험관에 0.5 ml 씩 취하고 4% 염산 수용액을 1.0 ml 가한 뒤 100°C 수욕에서 30분간 가수분해시켰다. 생성된 비배당체를 초산에칠 2.0 ml 를 가하여 1분간 vortexing 하면서 3회 반복 추출한 다음 용매를 증발시켜 얻은 잔사에 메탄올 2.0 ml 를 가하여 다시 용해시키고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 액을 다음 조건에서 액체크로마토그래프법으로 정량하였다.

칼럼 : LiChrosorb® RP 18 (10 μm), 유속 : 2.0 ml/min, 검출기 : UV (365 nm), 감도 : 0.02 AUFS, 이동상 : H₂O : Acetonitrile : Isopropanol : Citric acid (500 : 250 : 30 : 5)

피이크 측정은 약전 액체크로마토그래프법 중 반치폭법으로 피이크 면적을 측정하였으며 quercetin 및 kaempferol 표준품을 사용하여 절대검량선을 작성하여 검액 중의 quercetin 및 kaempferol 의 농도를 구한 후 아래 식과 같이 환산하여 각각의 배당체의 농도 및 총 GFG 를 구하였다.

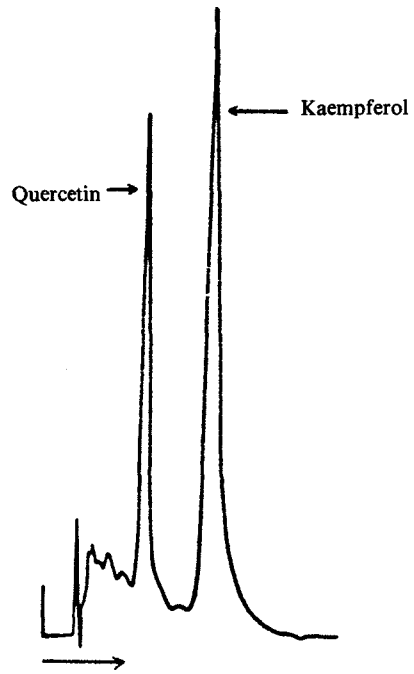


Figure 1—High performance liquid chromatogram of quercetin ($t_R = 3.8$ min) and kaempferol ($t_R = 6.4$ min).

quercetin 배당체의 농도 (mg/100 ml)

$$= \text{quercetin의 농도 (mg/100 ml)} \times \frac{\text{quercetin 배당체의 분자량 (756.7)}}{\text{quercetin의 분자량 (302.2)}}$$

kaempferol 배당체의 농도 (mg/100 ml)

$$= \text{kaempferol의 농도 (mg/100 ml)} \times \frac{\text{kaempferol 배당체의 분자량 (740.9)}}{\text{kaempferol의 분자량 (286.2)}}$$

총 GFG 의 농도 (mg/100 ml)

$$= \text{quercetin 배당체의 농도} + \text{kaempferol 배당체의 농도}$$

실험결과

액체크로마토그래프법에 의한 정량

검액 중 분해되지 않고 남아 있는 quercetin 과

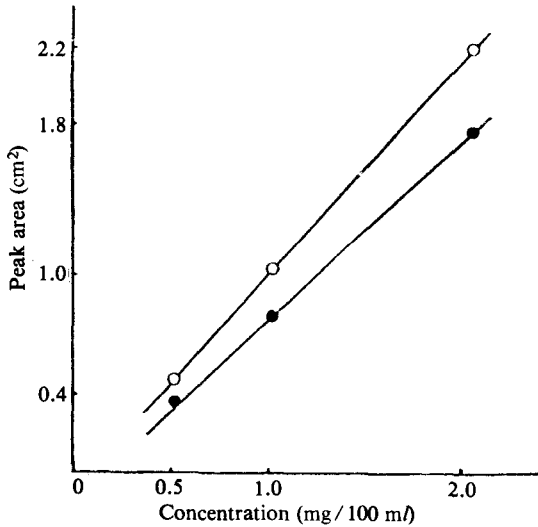


Figure 2—Calibration curve of quercetin ($r = 0.9998$) and kaempferol ($r = 0.9908$).
Key: ●, quercetin; ○, kaempferol.

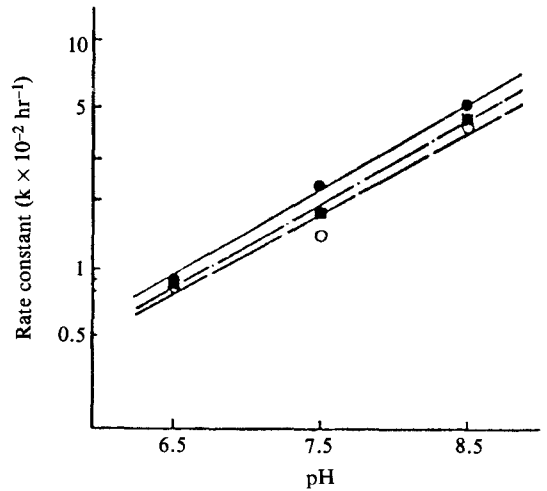


Figure 4—Effect of pH on the degradation rate constant of each glycoside in Gingko extract solution at 70°C.
Key: ●, quercetin glycoside; ○, kaempferol glycoside; ■, total GFG

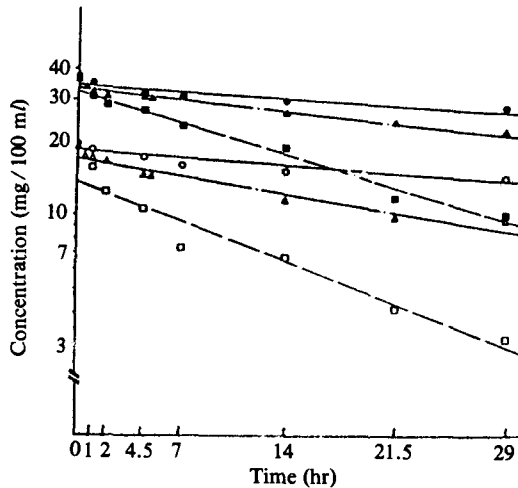


Figure 3—Degradation profile of quercetin glycoside (opened) and kaempferol glycoside (closed) at 70°C.
Key: ○ and ●, pH 6.5; □ and ■, pH 7.5; △ and ▲, pH 8.5.

kaempferol의 농도를 액체크로마토그래프법으로 측정하였으며, 각 성분의 유지시간은 quercetin이 3.8분, kaempferol이 6.4분으로서 Fig. 1과 같이 각각 잘 분리되었다. Fig. 2는 quercetin 및 kaempferol 표준품의 메탄올 용액에 대하여 작성한 검량선이다.

GFG의 경시 안정성에 대한 pH의 영향

은행잎엑스의 물에 대한 용해도는 pH가 감소함에 따라 감소하여, pH 6 이하에서는 제제로서 유효농도를 얻을 수 없었으므로 이 이상의 pH로 조제한 은행잎엑스 수용액에 대하여 70°C에서의 경시변화를 관찰하였다. 그 결과 pH 6.5, 7.5 및 8.5인 은행잎엑스 수용액에 있어서 분해반응 속도정수가 quercetin 배당체의 경우 각각 9.02×10^{-3} , 2.31×10^{-2} , $5.21 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$, kaempferol 배당체의 경우는 각각 8.37×10^{-3} , 1.44×10^{-2} , $4.19 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$, 이를 총 GFG로 환산하면 각각 8.60×10^{-3} , 1.72×10^{-2} , $4.48 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 로서 pH가 증가함에 따라 분해반응 속도가 증가하였다 (Fig. 3 및 4). 따라서 용해도와 안정성을 함께 고려할 때 은행잎엑스를 주사제로 제제화하고자 할 경우 pH 6.5가 바람직하다고 생각된다.

은행잎엑스 수용액 중 GFG의 경시 안정성

pH 6.5로 은행잎엑스 수용액을 조제하여 40, 50, 70 및 90°C에서 시간에 따른 quercetin 및 kaempferol의 농도변화를 관찰하여 각각의 배당체 및 총 GFG의 분해반응 속도정수를 구한 후 (Table I) 이를 Arrhenius plot (Fig. 5)하여 분해반응의 겉보기 활성화에너지를 구한 결과 que-

Table I—Degradation Rate Constant, Apparent Activation Energy of Degradation and $T_{90\%}$ (20°C) of Quercetin Glycoside and Kaempferol Glycoside in Gingko Extract Aqueous Solution of pH 6.5.

Parameter	Temperature	Quercetin glycoside	Kaempferol glycoside	total GFG
Degradation rate constant, k (hr ⁻¹)	90 °C	3.466×10^{-2}	3.003×10^{-2}	3.226×10^{-2}
	70 °C	9.230×10^{-2}	1.191×10^{-2}	1.096×10^{-2}
	50 °C	3.192×10^{-4}	3.130×10^{-4}	3.149×10^{-4}
	40 °C	1.930×10^{-4}	6.567×10^{-5}	6.694×10^{-5}
	20 °C*	2.893×10^{-6}	2.929×10^{-6}	2.874×10^{-6}
Ea (kcal/mol)		29.93	29.92	30.02
$T_{90\%}$ (year), 20 °C		4.2	4.2	4.2

*extrapolated.

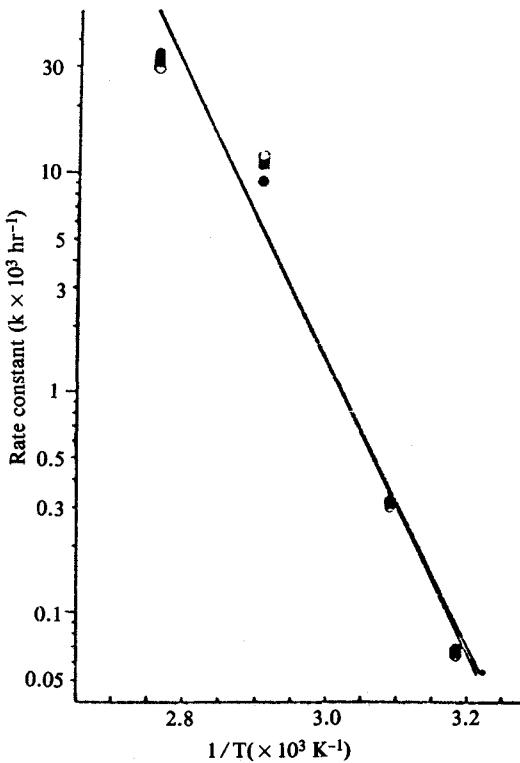


Figure 5—Arrhenius plot of the degradation rate constant of each glycoside in Gingko extract solution of pH 6.5. Key: ●, quercetin glycoside; ○, kaempferol glycoside; ■, total GFG

quercetin 배당체, kaempferol 배당체 및 총 GFG에 대해 각각 29.93, 29.92, 30.02 kcal/mol이었으며 이로부터 20°C에서의 shelf life ($T_{90\%}$, 20°C)를 외삽하여 구한 결과 모두 약 4.2년이 되

었다.

고 찰

은행잎엑스는 물에 대한 용해도가 작으므로 소르비톨과 프로필렌글리콜을 보조용매로 사용하여 가용화하였다. 용액의 pH가 감소함에 따라 은행잎엑스의 용해도가 감소하므로 제제로서 유효농도를 얻을 수 있는 pH인 pH 6.5 이상으로 용액을 제조한 후 경시 안정성 실험을 실시한 결과 pH가 증가함에 따라 지표성분인 quercetin 배당체와 kaempferol 배당체의 분해가 증가하였다. 따라서 용해도 및 안정성을 함께 고려하여 pH 6.5의 은행잎엑스 수용액을 제조한 후 제제로서의 안정성 실험을 실시한 결과 quercetin과 kaempferol 배당체 및 총 GFG의 분해반응의 겉보기 활성화에너지는 모두 약 30 kcal/mol로서, 그리고 $T_{90\%}$, 20°C를 외삽하여 구한 결과 모두 약 4년 정도로써 비교적 안정한 것으로 평가되었다.

본 연구를 통하여 은행잎엑스와 같이 아직까지 유효성분이 확실하게 확인되지 않은 다른 생약 제제에 있어서도, 품질관리에 지표물질로 사용되는 특정성분이 존재할 경우 지표성분의 경시변화를 반응속도론적으로 연구함으로써 제제의 경시 안정성을 간접적으로 예측하여 유효성분이 확인될 때까지 잠정적인 품질관리의 기준으로 사용하는 방안을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

- 1) T. Fukuda, The pharmacological effects of flavone groups, *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, **164**, 685 (1932)
- 2) A.V. Jeney and A. Czimmer, The action of quercetin and quercitrin on the uninjured and poisoned frog heart, *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, **183**, 571 (1936)
- 3) L. Armentano, Effect of flavone dyes on blood pressure, *Zschr. Gcs. Exp. Med.*, **162**, 219 (1938)
- 4) C.W. Murray, A.N. Booth, F.De Eds, and F.T. Jones, Adsorption and metabolism of rutin and quercetin in the rabbit, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **43**, 361 (1954)
- 5) H.V. Tronnier, Klinisch-pharmakologische Untersuchungen über den Effect eines Extraktes aus Ginkgo biloba L. beim postthrombotischen Syndrom, *Lehrbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten*. G. Tieme Voriag, Stuttgart (1965)
- 6) J. Fisel, Preparation of kaempferol, quercetin, and isorhamnetin from the green leaves of ginkgo biloba, *Naturwissenschaften*, **52**, 592 (1965)
- 7) H. Geiger and S. Beckmann, Occurrence of rutin and kaempferol 3-rhamnoglucoside in Ginkgo biloba, *Z. Naturforsch.*, **20b**, 1139 (1965)
- 8) H. Peter, J. Fisel and W. Weisser, Pharmacological study of the active substances of Ginkgo biloba, *Arzneimittel-Forsch.*, **16**, 719 (1966)
- 9) M. Allard, Treatment of old-age disorders with Ginkgo extract from pharmacology to clinical medicine, *Presse. Med.*, **15**, 1540 (1986)