

고속액체크로마토그래피에 의한 은행잎중 Flavonoid Glycoside의 확인 및 정량

姜三植* · 金周善* · 郭義宗 · 金起協

서울대학교 生藥研究所, * 서울특별시 중로구 연건동 28, 110-460
鮮京인더스트리 生命科學 研究所, 水原市 長安區 亭子洞 600, 440-745

Identification and Quantitative Analysis of Flavonol Glycosides from *Ginkgo biloba* Leaves by High Performance Liquid Chromatography

Sam Sik Kang,* Ju Sun Kim,* Wie-Jong, Kwak and Ki-Hyup, Kim

Natural Products Research Institute, Seoul National University,* Seoul 110-460 and Life Science Research Center, Sunkyong Industries, 600 Jungja-Dong, Changan-Ku, Suwon-Si 440-745, Korea

Abstract—Seven flavonol glycosides from the EtOAc fraction of *Ginkgo biloba* leaves were identified by high performance liquid chromatography. Separation by reversed phase chromatography on Lichrosorb® RP-18 column was achieved by isocratic elution. The content of the major acylated flavonol glycoside, kaempferol 3-O-[6'''-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnoside] was about 8.0% and 0.55% for EtOAc fraction and MeOH extract, respectively.

Keywords—*Ginkgo biloba* · Ginkgoaceae · analysis of flavonol glycoside · HPLC · kaempferol 3-O-[6'''-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnoside]

은행잎으로부터 얻은 「*Ginkgo biloba* extract」는 심장혈관의 각종 질환에 매우 유용하며 현재 국내외에서 시판되고 있다.¹⁾ 이 엑기스중에 함유된 성분중에는 flavonoid 성분이 대략 50% 정도 함유되어 있으며 주로 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 glycoside 혼합물로써 일부는 식물로부터 흔히 발견되는 물질들이다.²⁾ 그러나 kaempferol 및 quercetin의 coumaroyl glucosyl rhamnoside는 은행잎에만 존재하는 특이성분들이다.^{3,4)} 이들 flavonoid 성분의 HPLC 분석법은 은행잎에 존재하는 화합물 자체로 분석하지 않고 현재까지는 이들 혼합물을 산 가수분해 시켜 얻은 aglycone의 HPLC법을 쓰고 있으나, 이들 aglycone들이 각종 식물에 遊離 및 結合型으로 흔히 存在하는 물질들이므로 이 分析法은 은행잎 엑기스에 特異的인 분석법이 될 수 없다. 저자

등은 은행잎에 존재하는 flavonol glycoside 중 특이성분들을 포함해서 7종의 flavonol glycoside를 단리 보고한 바 있으므로⁵⁾ 이들 성분을 지표로 하여 HPLC chromatogram상에 나타난 각각의 peak를 확인한 후 이를 이용한 새로운 분석법을 개발하였으므로 보고한다.

실 험

식물재료—경기도 광주에서 8월말부터 9월초에 채집한 은행잎을 건조해서 사용하였다.

분석기기—HPLC 분석기기는 Waters Associates의 분석용 Liquid chromatograph로써 Model 450 variable wavelength detector 및 M730 data module이 부착된 것을 사용하였다. column은 Merck의 Lichrosorb® RP-18 (10 μ m; 10 mm i.d.

×25 cm)를 사용하였다.

시약—분석용시약은 특급시약을 사용하였고 분석전에 HPLC용 여과기로 여과 시켜 사용하였다. 분석에 사용한 flavonoid glycoside들은 저자 등에 의해 은행잎으로부터 분리, 구조가 확정된 순수 화합물들을 사용하였으며 내부 표준물질로 사용한 oxypeucedanin methanolate는 강활(*Angelica koreana*)에서 분리한⁶⁾ 것을 사용하였다.

분석조건—이동상으로는 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H₃PO₄-H₂O(=145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)을 사용해서 isocratic elution시켰다. 분석은 실온에서 실시하였으며 용매의 유속은 1 ml/min, U.V. detector는 350 nm를 사용하였고 감도는 0.04 AUFS, chart speed는 0.5 cm/min으로 하였다.

표준검량선의 작성—내부표준물질(IS)인 oxypeucedanin methanolate 100 mg을 정량하여 MeOH 100 ml에 용해시켜 1000 µg/ml의 표준액을 조제하였다. 표준물질(ST)은 kaempferol 3-O-[6'''-O-p-coumaroyl-β-D-glucosyl(1→2)-α-L-

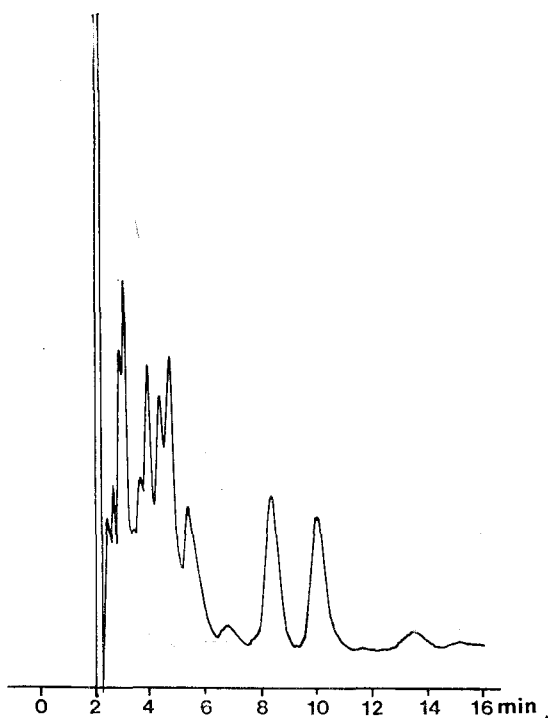


Fig. 1. HPLC chromatogram for MeOH extract from *Ginkgo biloba* leaf.

rhamnoside)](1) 100 mg을 정량하여 MeOH 100 ml에 용해시킨 용액을 stock solution으로 해서 이를 일정량씩 취한 후 각각에 MeOH을 가해 100, 200, 300, 400 및 500 µg/ml가 되게 조제하였다. 이 두 표준액 IS와 ST를 각각 1 : 1로 혼합해서 만든 용액을 각각 10 µl씩 취하여 chromatogram을 얻고 각각의 chromatogram으로부터 IS와 ST의 area ratio를 구하여 검량선을 작성하였다.

EtOAc분획중 화합물 1의 정량—건조한 EtOAc분획 250 mg을 정량하여 이를 MeOH 50 ml에 용해시키고 이 용액과 IS를 1 : 1로 혼합하여 얻은 액 10 µl를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area ratio값을 구하였다.

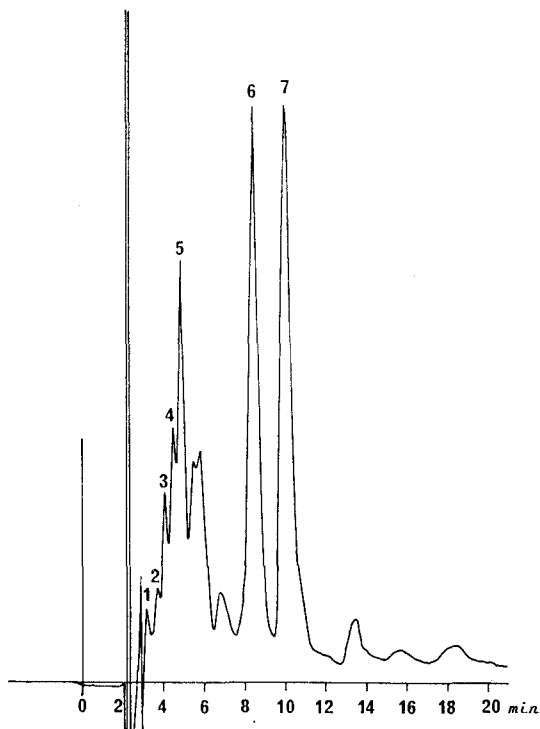


Fig. 2. HPLC chromatogram for EtOAc fraction from *Ginkgo biloba* leaf extract.

- 1 : kaempferol 2,6-dirhamnosyl glucoside
- 2 : laricitrin 3-O-rutinoside
- 3 : rutin
- 4 : isorhamnetin 3-O-rutinoside
- 5 : kaempferol 3-O-rutinoside
- 6 : quercetin 3-O-[6'''-O-p-coumaroyl-β-D-glucosyl (1→2)-α-L-rhamnoside]
- 7 : kaempferol 3-O-[6'''-O-p-coumaroyl-β-D-glucosyl(1→2)-α-L-rhamnoside]

MeOH 엑기스중 화합물 1의 정량—건조 MeOH 엑기스 1g을 정평하여 MeOH 25 ml에 용해시킨 후 여과하여 불용물을 제거하였다. 여액과 IS를 1:1로 혼합한 후 이 혼합액 10 μ l를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area ratio값을 구하였다.

실험 결과 및 고찰

은행잎 엑기스중 flavonoid glycoside들을 순수 분리하고 이들의 화학구조를 화학적 및 spectral data를 종합해서 결정하여 보고한 바 있으며 이중 acylated flavonol glycoside인 kaempferol 및 quercetin의 3-O-[6'''-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnoside]가 주성분임을 보고한 바 있다.⁵⁾ 건조 은행잎을 MeOH로 추출해서 얻은 은행잎 엑기스를 Lichrosorb® RP-18 column을 사용하여 여러가지 용매를 사용해서 HPLC를 실시하고 이들의 분리능을 검토한 결과 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H₃PO₄-H₂O의 혼합용매를 사

용해서 isocratic elution할때 가장 좋은 결과를 얻었으며 이때의 chromatogram을 Fig. 1에 표시하였다. 또한 이 은행잎 엑기스를 먼저 CHCl₃로 분획하고 수층을 EtOAc 및 BuOH로 분획하여 얻은 EtOAc 및 BuOH fraction도 같은 조건으로 HPLC를 실시하였다. 이때 얻은 chromatogram을 Fig. 2 및 3에 표시하였다. 이들 chromatogram에서 볼 수 있는 바와 같이 EtOAc 분획에 대부분의 flavonol glycoside가 이행되며 BuOH 분획에는 이들 화합물중 극성이 강한 물질들이 일부 함유되어 있음을 알았다. 따라서 이들 flavonol glycoside를 분석하기에는 EtOAc 분획이 가장 적합함을 알았으며 이 EtOAc 분획을 HPLC를 실시해서 얻은 chromatogram상에 나타나는 각 peak들을 저자 등이 은행잎 엑기스에서 얻은 flavonol glycoside의 표준물질을 사용해서 spike test를 실시해서 확인한 결과 Fig. 2에서와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이 chromatogram에서 볼 수 있는 바와 같이 주성분이며 은행잎의 특이성분인 kaempferol 3-O-[6'''-O-*p*-coumaroyl- β -D-

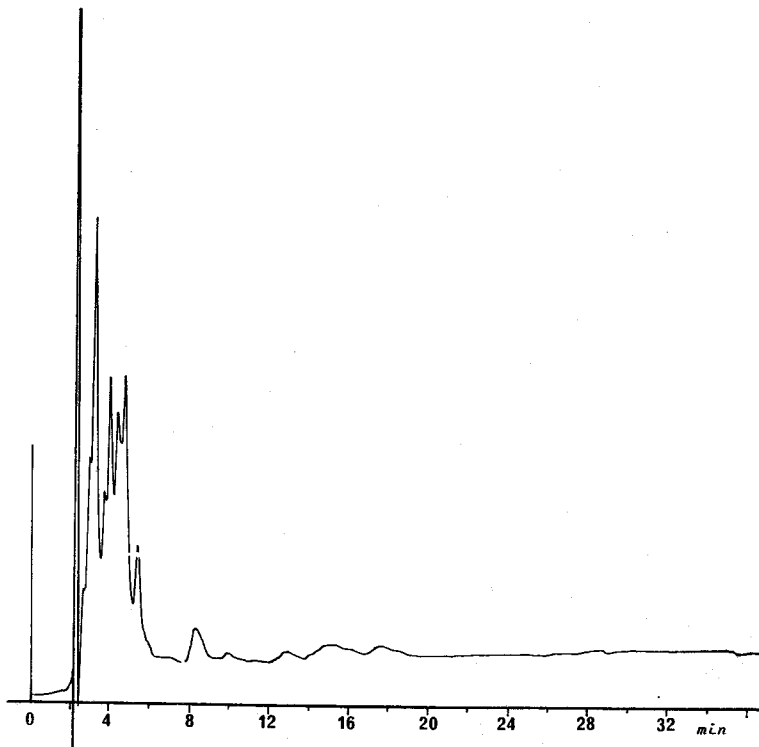


Fig. 3. HPLC chromatogram for BuOH fraction from *Ginkgo biloba* leaf extract.

glucosyl(1→2)- α -L-rhamnoside]는 t_R 이 9.8 min에서 강하게 나타나고 다른 성분들과 떨어져서 peak가 나타나므로 이 화합물을 분석의 지표물질로 하였다. 내부표준물질을 선정하기 위해서 각종 화합물들을 동일조건에서 HPLC를 실시한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 t_R 13.4 min에서 peak가 나타나는 oxypeucedanin methanolate⁶⁾가 가장 적합함을 알았다. 은행잎의 EtOAc 분획과 이 내부표준물질과를 혼합하여 HPLC를 실시해서 얻은 chromatogram을 Fig. 5에 나타내었다. 다음에 지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준검량선을 작성하여 Fig. 6에 표시하였다. 이 검량선의 회귀직선의 방정식은 $y=1.308x-0.0166$ 이며, 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.9996으로써 1.0에 접근하므로 표준물질(ST)와 내부표준물질(IS)의 중량비(x)와 peak area ratio(y)간에 직선성이 인정되었다. EtOAc 분획중 화

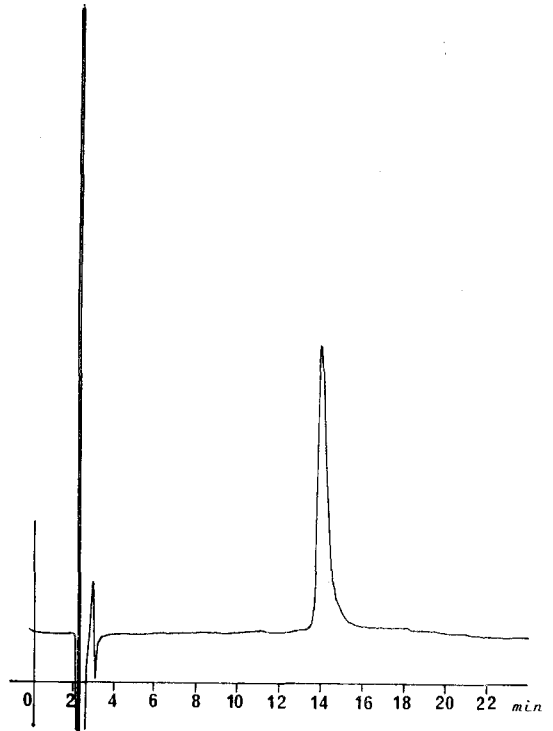


Fig. 4. HPLC chromatogram for oxypeucedanin methanolate as an internal standard.

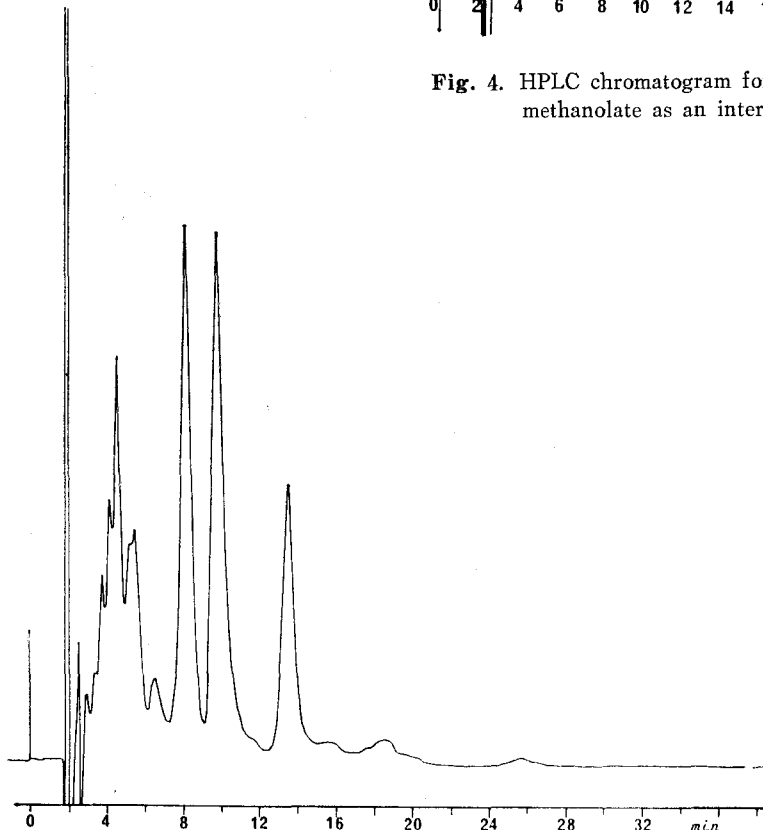


Fig. 5. HPLC chromatogram for EtOAc fraction from *Ginkgo biloba* leaf extract in the presence of an internal standard.

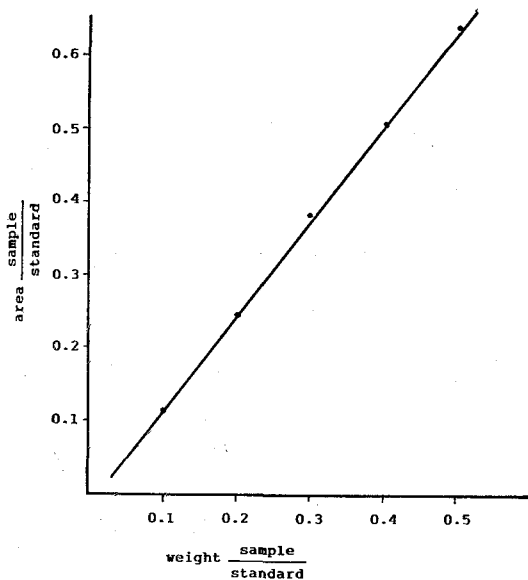


Fig. 6. Calibration curve for kaempferol 3-O-[(6'''-O-p-coumaroyl- β -D-glucosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnoside)]

합물 1의 함량을 결정하기 위해서 실험부에서와 같이 조제한 혼액 일정량을 취하여 HPLC를 실시하고 이로부터 얻은 평균 area ratio(y)값은 0.507이므로 이를 회귀방정식에 대입해서 weight ratio값(x)을 구하면 0.4이므로 화합물 1의 량은 400.3 $\mu\text{g/ml}$ 이다. 따라서 50 ml 중에는 20.0 mg이 함유되어 있으므로 EtOAc 분획중에는 8.01% (w/w)가 함유되어 있음을 알았다. 같은 방법으로 MeOH 엑기스중의 화합물 1의 함량을 결정하기 위해서 건조 MeOH 엑기스 1g을 취하여 실험부에서 같이 조제한 혼액 일정량을 취해 HPLC를 실시한 후 여기서 얻은 chromatogram으로부터 구한 평균 area ratio(y)값은 0.273이었

다. 회귀방정식으로부터 $x=0.221$ 이므로 화합물 1의 함량은 221 $\mu\text{g/ml}$ 이므로 25 ml 중에는 5.525 mg 함유되어 있고 은행잎의 MeOH 엑기스 1g 중에는 0.553%(w/w)가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험결과 저자 등은 은행잎의 flavonol glycoside들을 HPLC를 이용하여 확인할 수 있었으며, 이 중 은행잎중의 특이성분인 acylated flavonol glycoside를 지표물질로 해서 새로운 분석법을 확립하였다.

감사의 말씀—본 실험에서 내부 표준물질로 사용한 oxypeucedanin methanolate를 제공해 주신 본 연구소 申國鉉교수님께 사의를 표한다.

<1990년 4월 9일 접수 : 5월 7일 수리>

문 헌

1. Agnoli, A., Rapin, J.R., Scapagnini, V. and Weitbrecht, W.V.: Effects of *Ginkgo biloba* extract on Organic Cerebral Impairment: Proceedings of the International Symposium, John Libbey & Company Ltd., pp.1-106(1984).
2. Harborne, J. and Williams, C.A.: The Flavonoids, part 1, Academic Press, New York, pp.376-441 (1975).
3. Nasr, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A., and Anton, R.: *Phytochem.* 25, 770(1986).
4. Nasr, C., Lobstein-Guth, A., Haag-Berrurier, M., and Anton, R.: *Phytochem.* 26, 2869(1987).
5. Kang, S.S., Kim, J.S., Kwak, W.-J., and Kim, K.-H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 21, 111 (1990).
6. Woo, W.S., Lee, C.K. and Shin, K.H.: *Planta Med.* 48, 234(1982).