

## 은행잎중 Biflavone의 계절별 함량 변화에 관한 연구

장 수 경·염 정 록·강 삼 식\*  
중앙대학교 약학대학, \*서울대학교 천연물과학연구소

### Seasonal Variations of Biflavone Content from *Ginkgo biloba* Leaves

Soo Kyung Chang, Jeong Rok Youm and Sam Sik Kang\*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756 and

\*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract**—The seasonal variations of five biflavones from *Ginkgo biloba* leaves from May to November were investigated by a reversed phase HPLC method. The total amount of biflavones was increased with time to reach its maximum in yellow autumnal leaves. Each biflavone showed a similar tendency. It increased rapidly about 3.1-fold from May to June and thereafter gradually increased about 2.5-fold. The ratio of each biflavone content to the total amount of biflavones was in the order of as follows: isoginkgetin > sciadopitysin > bilobetin > ginkgetin > amentoflavone.

**Keywords**—*Ginkgo biloba* • Ginkgoaceae • seasonal variations • biflavones • HPLC

Flavonoid성분의 일종인 biflavone류는 flavanol glycoside 등 다른 flavonoid류에 비해 자연계에서 밝혀진 것이 많지 않으며 함유량도 적은편이어서 주목을 받지 못하였다.<sup>1,2)</sup> 그러나 최근들어 biflavone의 약리작용에 대한 새로운 연구결과가 보고 되고 있다.<sup>3-5)</sup> Huguet 등<sup>6)</sup>은 amentoflavone이 염증성 면역질환, 암 및 동맥경화증의 진행에 관여하는 superoxide anion에 대해 scavenging activity가 있음을 발표하였고, Wleklík 등<sup>7)</sup>은 mouse에 amentoflavone투여 후 interferon-inducing activity에 의한 antiviral activity 기전을 보고하였다. 이 등<sup>8)</sup>도 권백에서 분리한 amentoflavone이 P<sub>388</sub> tumor cell의 생존율을 강하게 억제하는 유효성분임을 보고 한 바 있다. 또한 Tokuda 등<sup>9)</sup>은 bilobetin이 virus genome을 불활성화시켜 항암 및 항virus제로 사용할 수 있음을 보고하였다. 이와같이 biflavone류의 생물활성이 밝혀지면서 다른 식물에 비해 biflavone의 종류와 양이 많은 은행잎에 대한 관심이 높

아지고 있다.<sup>10)</sup> 따라서 전보<sup>11)</sup>에 이어 은행잎중에 함유되어 있는 biflavone의 계절별 함량변화를 검토한 결과를 보고하고자 한다.

### 실 험

식물재료, 실험기기, 시약 및 은행잎 추출 등은 전보<sup>11)</sup>와 동일하다. 다만 HPLC용 column은 Spheri-5 RP-18(5 $\mu$ , 4.6mm×220mm, Spectra-Physics, Inc., USA)을 사용하였으며 UV detector는 330nm에서 측정하였다. 이동상은 MeOH 및 0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 0~17 min까지 7:3으로 isocratic elution 시킨 후 32min까지 9:1로 gradient elution시켜 분석을 행하였다. 이후 1min 동안 7:3으로 한후 계속해서 40 min까지 isocratic elution시켜 column을 평형시킨 후 새로운 분석을 반복하였다.

**표준검량선의 작성**—본 실험에서 사용한 지표 물질은 은행잎에서 분리한 표품을 사용하였다.<sup>12)</sup>

Amentoflavone 5.0 mg을 정밀히 달아 소량의 pyridine으로 녹인후 MeOH을 가해 25 ml로 한다. 이 용액을 일정량 취한후 MeOH을 가해 2, 4, 8, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 희석하였다. Bilobetin 및 sciadopitysin 12.5 mg을 정밀히 달아 소량의 pyridine으로 녹인후 MeOH을 가해 bilobetin은 5, 10, 25, 50 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , sciadopitysin은 10, 20, 50, 100 및 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 희석하였다.

Ginkgetin 및 isoginkgetin 6.0 mg을 정밀히 달아 소량의 pyridine으로 녹인 후 MeOH을 가해 25 ml로 한다. 이 용액을 일정량 취한후 MeOH을 가해 ginkgetin은 4.8, 9.6, 24, 48 및 96  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , isoginkgetin은 9.6, 24, 48, 96 및 192  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 희석하였다.

각 표준액을 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻은 후 peak area와 표준액 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 단, amentoflavone은 peak area가 작아 integrator의 계산방법에 따라 편차가 크므로 중량법으로 무게를 달아 계산하였다.

### 결과 및 고찰

은행잎 성분중 biflavone 성분들은 현재까지 amentoflavone<sup>13)</sup>, 5'-methoxybilobetin, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin 및 sciadopitysin의 6종이 보고되었다.<sup>14,15)</sup> 지금까지 보고된 은행잎 biflavone분석법으로는 acetonitrile-10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5% HOAc in CH<sub>3</sub>CN-5% HOAc in H<sub>2</sub>O 및 MeOH-THF-0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용매를 사용하여 gradient elution시켜 분석하는 역상분석법<sup>16-18)</sup>과 Diol column을 사용하여 THF-CHCl<sub>3</sub>, hexane/CHCl<sub>3</sub>(24 : 75)-THF 용매를 사용한 순상분석법<sup>17,19)</sup> 등이 보고되었다. 본 실험에서는 역상 C<sub>18</sub> column을 사용하여 여러가지 용매조건에서 HPLC 분석을 실시하여 분리능을 검토한 결과 MeOH-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용매를 실험부에서 기술한 조건으로 gradient elution 시켰을 때 가장 좋은 분리능을 얻을 수 있었다. Fig. 1에 5종의 biflavone standard mixture의 HPLC chrom-

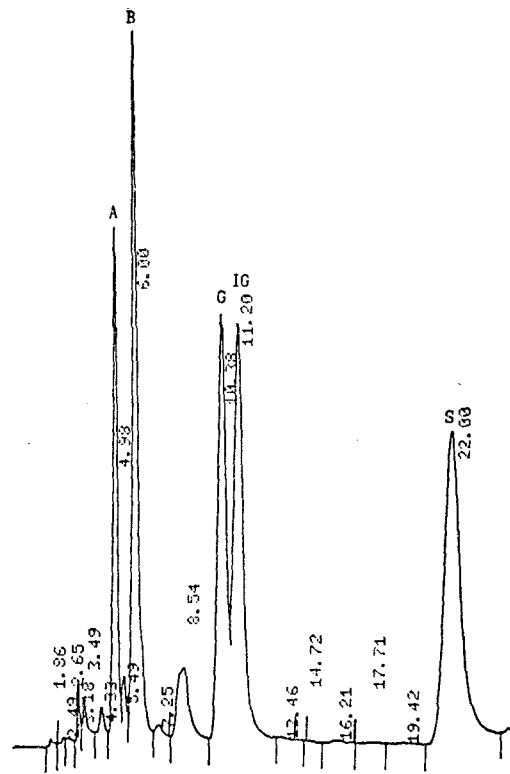


Fig. 1. HPLC chromatogram of a mixture of amentoflavone(A), bilobetin(B), ginkgetin (G), isoginkgetin(IG) and sciadopitysin(S)

Table I. Equations of the least-squares regressions for biflavone standards obtained from *Ginkgo biloba*

Substance	Regression equation	Correlation coefficient
Amentoflavone	$y=0.23199x-0.1336$	0.9996
Bilobetin	$y=13167.8x-1644.6$	0.9991
Ginkgetin	$y=16714.3x-17719.1$	0.9999
Isoginkgetin	$y=12831.9x-18369.5$	0.9999
Sciadopitysin	$y=11151.2x-39906.1$	0.9999

atogram을 나타내었다. 이 chromatogram상에 나타나는 각 peak들을 biflavone 지표물질로 spike test를 실시한 결과 amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin 및 sciadopitysin 등 5종의 biflavone을 확인할 수 있었다.

이 chromatogram에서 볼 수 있는 바와 같이 amentoflavone, bilobetin, 및 sciadopitysin은 각각 baseline separation되나 ginkgetin 및 isogink-

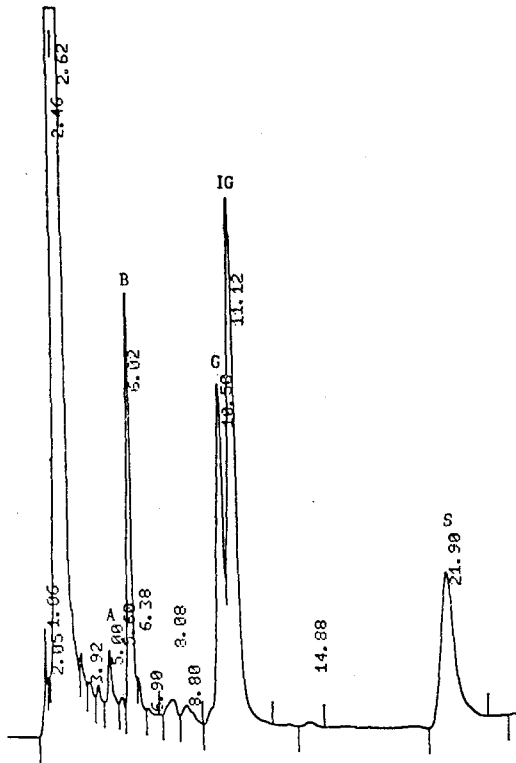


Fig. 2. HPLC chromatogram of MeOH extract from *Ginkgo biloba* leaves collected in October

getin은 partial separation됨을 알 수 있었다. 다음에 각 biflavone의 함량을 분석하기 위하여 각각 일정량씩 취하여 표준검량선을 작성한 후 각 지표물질에 대한 회귀직선 방정식과 그 상관계수를 구하여 Table I에 나타내었다.

이와같이 각 지표물질에 대한 상관계수가 모두 1.0에 접근하므로 표준물질의 농도(x)와 peak area(y) 간에 각각 2~200 µg/ml 농도 범위에서 직

선성이 인정되었다.

다음에 월별로 채집하여 얻은 은행잎을 MeOH로 추출하여 얻은 MeOH엑스를 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻었다(Fig. 2). 이들 chromatogram으로부터 5종의 biflavone peak의 평균 peak area를 각각 구하여 표준 검량선에서 얻은 회귀직선 방정식에 대입하여 함량을 계산한 결과를 Table II에 나타내었다.

이 표에서 볼 수 있는 바와 같이 은행잎중 총 biflavone 함량은 flavonol glycoside 함량과는 달리 채집시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보여줌에 늦가을에 채집한 노란 은행잎에서 최대치를 나타내고 있으며, 각각의 biflavone들도 유사한 경향을 보여주고 있다. 단, amentoflavone의 경우 MeOH 엑스중 함량은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보이나 건조 은행잎중 함량으로 환산했을 때는 거의 변화가 없었다.

총 biflavone 양은 5월에서 6월사이에 약 3.1배 급격히 증가한 후, 6월에서 11월까지의 약 2.5배로 완만한 증가를 보였다. 또한, 은행잎의 flavonol glycoside 함량변화와 같이 biflavone에 있어서도 봄철에서 여름 및 가을철로 변화하는 환절기(6월말 및 9월말)의 총 biflavone 함량이 약간 감소하는 경향을 나타내고 있다. 본 실험에서 정량한 5종의 biflavone 총량에 대한 개개 biflavone의 함유비를 보면 isoginkgetin이 약 37.7%로 가장 높았다.

Briançon-Scheid 등<sup>19)</sup>은 은행잎 성분중 biflavone의 계절적 변화를 보고하였다. 이들의 연구결과와 비교할 때 총 biflavone 함량변화는 우리나라 은행잎과 유사하여 마찬가지로 시간이 지

Table II. Results of the quantitative determination of the biflavones in *Ginkgo biloba* leaves\*

Time of harvest (month)	Amento-flavone	Bilobetin	Ginkgetin	Isoginkgetin	Sciadopitysin	Total
5	0.10	0.10	0.03	0.16	0.06	0.45
6	0.09	0.18	0.21	0.40	0.38	1.26
7	0.11	0.21	0.20	0.38	0.13	1.03
8	0.10	0.35	0.34	1.05	0.66	2.50
9	0.10	0.41	0.46	1.03	0.74	2.74
10	0.12	0.38	0.41	0.99	0.61	2.51
11	0.10	0.46	0.43	1.00	0.80	2.79

\* The results were expressed in mg/g of dried leaves.

남에 따라 증가하는 경향을 보여주고 있다. 또한 biflavone 총량에 대한 개개 biflavone 함유비는 sciadopitysin, ginkgetin, isoginkgetin, bilobetin 및 amentoflavone의 순서로 작아지며, 봄에 채집한 은행잎 중에 함유된 biflavone량이 여름에 채집한 biflavone량보다 많다고 보고하였다. 그러나 이들은 최근에 보고한 결과<sup>16)</sup>에서는 먼저 보고와는 달리 ginkgetin 및 isoginkgetin 혼합물의 양이 sciadopitysin의 양보다 많았다. 또, 여름에 채집한 은행잎의 총 biflavone량이 봄에 채집한 것보다 약 3.7배 많이 함유되어 있으며 여름과 늦가을 노란잎 사이에서 채집한 녹색 은행잎의 총 biflavone량이 여름에 채집한 은행잎의 총 biflavone량보다 작았다. 이와같은 결과는 본 실험 결과와 매우 유사함을 알 수 있었다.

### 결 론

1. 은행잎중 biflavone 성분들을 역상 C<sub>18</sub> column을 사용하여, MeOH-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용매 계로 gradient elution 시켜 HPLC 분리조건을 확립하여, amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin 및 sciadopitysin 등 5종의 biflavone을 분리 확인하였다. 또한, 5월에서 11월까지 월별로 채집한 은행잎의 MeOH 엑스를 HPLC를 실시하여 각 biflavone 함량을 정량하였다.

2. 은행잎중 총 biflavone 함량은 채집시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보여주어 늦가을에 채집한 노란 은행잎에서 최대치를 나타내고 있으며, 각각의 biflavone 들도 유사한 경향을 보여주고 있다. 단, amentoflavone은 건조 은행잎중의 함량이 거의 변화가 없었다. 월별로는 5월에서 6월 사이에 약 3.1배 급격히 증가한 후, 6월에서 11월까지의 약 2.5배의 완만한 증가를 보였다.

3. Biflavone 총량에 대한 개개 biflavone 함유비는 isoginkgetin이 약 37.7%로 가장 높았으며, sciadopitysin, ginkgetin, bilobetin 및 amentoflavone 순으로 감소하였다.

<1993년 2월 3일 접수 : 2월 8일 수리>

### 문 헌

1. Geiger, H. and Quinn, C.: "The Flavonoids:

*Advances in Research*", ed. by J.B. Harborne and T.J. Mabry, Chapman & Hall, London, pp. 505-534(1982).

2. Geiger, H. and Quinn, C.: "The Flavonoids: *Advances in Research since 1980*", ed. by J.B. Harborne, Chapman & Hall, London, pp. 99-124 (1988).

3. Chakravarthy, B.K., Rao, Y.V., Gambhir, S.S. and Gode, K.D.: *Planta Med.* 43, 64 (1981).

4. Ruckstuhl, M., Beretz, A., Anton, R. and Landry, Y.: *Biochem. Pharmacol.* 28, 535 (1979).

5. Hirono, I.: "Naturally Occurring Carcinogens of Plant Origin", ed. by I. Hirono, Elsevier, Amsterdam, pp. 53-85 (1987).

6. Huguet, A.I., Manéz, S. and Alcaraz, M.J.: *Z. Naturforsch.* 45C, 19 (1990).

7. Wleklík, M., Zahorska, R. and Luczak, M.: *Acta Microbiol. Pol.* 36, 151 (1987); *Chem. Abstr.* 107, 126702b.

8. Lee, I.R., Song, J.Y. and Lee, Y.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 132 (1992).

9. Tokuda, H. and Matsumoto, T.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 42, 426*[89 42, 426].

10. Kang, S.S., Son, K.H., Kim, H.P. and Chang, H.W.: Patent Pending, No. 19259 (1992).

11. Kang, G.-S., Youm, J.R. and Kang, S.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 24, 47 (1993).

12. Kang, S.S., Kim, J.S., Kwak, W.-J. and Kim, K.-H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 21, 111 (1990).

13. Lobstein-Guth, A., Briancón-Scheid, F., Victoire, C., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Planta Med.* 54, 555 (1988).

14. Joly, M., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Phytochem.* 19, 1999 (1980).

15. Baker, W., Finch, A.C.M., Ollis, W.D. and Robinson, K.W.: *J. Chem. Soc.* 1477 (1963).

16. Lobstein, A., Rietsch-Jako, L., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Planta Med.* 57, 430 (1991).

17. Briancón-Scheid, F., Guth, A. and Anton, R.: *J. Chromatogr.* 245, 261 (1982).

18. Hasler, A., Sticher, O. and Meier, B.: *J. Chromatogr.* 605, 41 (1992).

19. Briancón-Scheid, F., Lobstein-Guth, A. and Anton, R.: *Planta Med.* 49, 204 (1983).