

은행잎중 Flavonol Glycoside 성분의 계절별 함량 변화에 관한 연구

강규선 · 염정록 · 강삼식*
중앙대학교 약학대학, *서울대학교 천연물과학연구소

Seasonal Variations of the Flavonol Glycoside Content from *Ginkgo biloba* Leaves

Gyu-Sun Kang, 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 the major six flavonol glycosides(kaempferol 2,6-dirhamnosyl glucoside, quercetin 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-rutinoside, isorhamnetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-coumaroyl glucorhamnoside and kaempferol 3-O-coumaroyl glucorhamnoside) in *Ginkgo biloba* leaves were investigated. The contents were determined by HPLC on reversed phase C₁₈ column. This result showed that the percentage of six flavonol glycosides decreased during the season from 1.57% in May to 0.39% in November. The content of each flavonol glycoside indicated a similar tendency to decrease. However, the contents of rutinosides of kaempferol, quercetin and isorhamnetin fluctuated markedly than those of coumaroyl glucorhamnosides of kaempferol and quercetin and kaempferol 2,6-dirhamnosyl glucoside.

Keywords—*Ginkgo biloba* · Ginkgoaceae · seasonal variations · flavonol glycosides · HPLC

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 은행나무과(Ginkgoaceae)에 속하는 낙엽교목으로 은행나무과 중에서 유일하게 현존하는 식물로써¹⁾ 이미 수 많은 성분들이 밝혀졌다. 과실에서 ginkgol, bilobol 및 ginkgolic acid가 밝혀졌고, 종자에서 cyanogenetic glycoside, amino acid³⁾ 및 4-O-methyl pyridoxine²⁾이 밝혀졌으며, 잎에서 ginnol, ginnon, *n*-hexenal, shikimic acid 및 ginkgetin³⁾ 등이 밝혀졌고, 심재로부터 *D*-sesamin 및 bilobanone³⁾이 밝혀졌다. 최근에는 화분으로부터 fatty acid, *p*-coumaric acid, hydrocarbon, 및 docosanol, ginnol, β -sitosterol, stigmasterol, afzelin, populnin, pinitol 및 sequoyitol 등의 성분이 분리, 확인되었으며⁴⁾, 외종피살로부터

antitumor activity가 있는 long-chain phenol을 분리, 보고된 바 있다.⁵⁾

그러나 이러한 성분들 이외에 은행잎의 주성분은 flavonoid계 화합물과 terpene계 화합물(bilobalide⁶⁾, ginkgolide A, B, C, D, M, J^{3,7,8)}임이 밝혀졌으며 이들 성분들의 다양한 생리활성과 약리작용이 속속 밝혀지므로써^{9~13)} 현재 이들 성분을 주성분으로 한 의약품이 전 세계적으로 크게 각광을 받고 있는 실정이다. 은행잎의 flavonoid 성분은 화학적으로 flavonol glycoside류와 biflavone류로 분류할 수 있다. Biflavone계 화합물로서는 amentoflavone¹⁴⁾, 5-methoxybilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, sciadopitysin 및 bilobetin 등 6종의 화합물이 분리, 보고되었으

더^{15,16)} flavonol glycoside계 화합물들은 22종이 밝혀졌으며¹⁷⁾ 이를 크게 3종류의 subgroup으로 분류할 수 있다. 즉 aglycone의 종류에 따라 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 glycoside로 대별할 수 있다.¹⁸⁻²²⁾ 이들 외에도 은행잎으로부터 6-hydroxykynurenic acid²³⁾, (Z, Z)-4, 4'-(1, 4-pentadiene-1, 5-diyl) diphenol²⁴⁾, betulaprenoltype의 polyprenol²⁵⁾ 및 polysaccharide²⁶⁾ 등이 보고되었다. 주성분인 flavonoid 성분 중 특히 kaempferol 및 quercetin의 coumaroyl glucorhamnoside (5 및 6)가 가장 중요한 유효 생리활성 물질로 알려져 있다.

따라서 이들 유효 생리활성 물질의 분석 방법은 원료인 은행잎의 채집시기, 제품의 품질관리나 약효성분의 평가 등에 있어서 매우 중요한 요소가 되고 있다. 은행잎 중의 flavonoid 성분의 분석 방법으로는 현재까지 이들 flavonoid 성분을 산가수분해 시켜서 얻은 aglycone을 HPLC 법으로 MeOH/H₂O 용매로 gradient elution시켜 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 함량을 각각 결정한 후 이들 flavoglycoside로 환산하는 분석 방법을 사용하여 왔다.^{17,27,28)} 그러나 이러한 분석방법은 flavonoid glycoside 그 자체보다 aglycone으로 정량하기 때문에 이들 생리 활성물질 각각의 함량을 평가할 수 없다는 결점을 가지고 있다. 따라서 현재까지 보고된 분석방법을²⁹⁻³⁴⁾ 비교 검토한 후 가장 분리능이 좋은 Verotta 등의 분석조건을³²⁾ 사용하여 은행잎의 flavonol glycoside중 주성분이며 지표물질이 확보된 6종의 표품을³⁵⁾ 사용하여 각각의 peak들을 확인하고 월별로 채집한 은행잎 중에 함유된 각 성분의 함량변화를 검토하였으므로 보고한다.

실험재료 및 방법

실험 재료—본 실험에 사용한 은행잎은 서울대학교 연건캠퍼스에서 자라는 10여 그루의 동일한 은행나무로부터 1991년 5월부터 11월까지 매달 1일에 각각 채집하여 음건한 후 desiccator에서 항량이 되게 건조시켜 실험재료로 사용하였다.

시약—분석용 시약은 특급시약을 사용하였고

분석전에 HPLC용 여과기(0.45 μm membrane filter)로 여과시켜 사용하였다.

기기—HPLC 분석 기기는 Spectra-Physics의 분석용 liquid chromatograph로써 Spectra 100 variable wavelength detector 및 SP 8800 ternary HPLC pump, SP 4270 integrator, Rheodyne injection valve(10 μl)가 부착된 것을 사용하였다. Column은 Applied Biosystems의 Brownlee™ RP-18(5 μm : 4.6 mm i.d. × 22 cm)을 사용하였다.

분석 조건—이동상으로는 MeOH과 0.4% H₃PO₄(w/v)의 3 : 7 혼합용매를 38 min동안 6 : 4로 gradient elution시켰다. 분석은 실온에서 실시하였으며 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector는 350 nm를 사용하였고 감도는 0.05 AUFS, chart speed는 0.5 cm/min으로 하였다.

표준 검량선—표준 검량선은 은행잎으로부터 분리, 구조가 확정된 6종의 표품³⁵⁾을 사용하여 작성하였다. Kaempferol 3-O-rutinoside(3), kaempferol 3-O-[2'', 6''-α-L-dirhamnopyranosyl-β-D-glucopyranoside(1), isorhamnetin 3-O-rutinoside(4)는 각각 12.5 mg씩 칭량하여 MeOH 25 ml에 용해시킨 용액을 stock solution으로 하고 이를 일정량씩 취한 다음 각각에 MeOH을 가해 100, 200, 250 및 500 μg/ml가 되게 조제하였다. 이 용액을 각각 10 μl씩 injection하여 chromatogram을 얻고 각각의 평균 peak area로부터 검량선을 작성하였다. 또한 kaempferol 3-O-6'''-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-rhamnopyranoside(6), quercetin 3-O-rutinoside(2), quercetin 3-O-6'''-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-rhamnopyranoside(5)는 각각 25mg씩 칭량하여 MeOH 50 ml에 용해시킨 용액을 stock solution으로 하고 일정량씩 취한 다음 각각에 MeOH을 가해 100, 200, 400, 및 500 μg/ml가 되게 조제하였다. 이 용액을 각각 10 μl씩 injection하여 chromatogram을 얻고 각각의 평균 peak area로부터 검량선을 작성하였다.

은행잎 엑스의 제조 및 정량—건조한 은행잎을 월별로 각각 10 g씩 달아 MeOH로 수욕상에서 3 시간씩 4회 반복하여 추출하고 이 추출액을 합하여 감압 농축하여 용매를 제거한 후 냉동 건

조시켜 MeOH 엑스를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 MeOH 100 ml에 용해시킨 후 여과하여 불용물을 제거하고 여액 10 μ l를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻은 다음 flavonol glycoside 표준물질을 사용하여 spike test를 하여 각 peak를 확인한 후 각각의 검체중의 각 성분의 평균 peak area를 구한 후 이를 각 성분의 검량선으로부터 이들 성분을 각각 정량하였다.

결과 및 고찰

은행잎 엑스의 생리활성 성분과 그 생리활성에 대하여서는 많은 연구가 진행되어 왔으며 현재까지 다양한 활성이 보고되었다. 이들 은행잎 성분 중 생리활성을 나타내는 물질은 terpene계와 flavonoid glycoside로 알려지고 있으나 이 중 flavonoid glycoside가 주성분이다. Flavonoid glycoside 성분은 현재까지 22종이 보고되어 있으며 이들 성분 중 주성분은 유효 활성물질로 보고된 kaempferol 및 quercetin의 3-O-*p*-coumaroyl glucorhamnoside이다. 그러나 이들 flavonoid glycoside의 분석 방법으로는 주로 이들 성분을 산가수분해시켜 얻은 aglycone 중 주성분인 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 함량을 HPLC 법으로 분석 정량한 후 이 값에 이들 3종의 aglycone과 주성분의 일종인 quercetin-3-O-*p*-coumaroyl glucorhamnoside(5)과의 분자량비(kaempferol 2.64, quercetin 2.51, isorhamnetin 2.39)의 평균값인 2.51을 곱하여 은행잎 중의 총 flavonglycoside량으로 계산하는 분석법을 사용하고 있다.^{17,27,28)} 그러나 이 방법은 최근에 새로운 flavonol glycoside 성분이 속속 보고되고 있으며, 이들 flavonoid glycoside중 일부는 추출 조건에 따라 분해되어 그 함량에 심한 차이를 나타내고 있으며³¹⁾ 또한 약품의 안정성³⁶⁾에도 문제가 제기되고 있으므로 은행잎 중에 존재하는 flavonoid glycoside 그 자체를 지표물질로 하여 분석하는 분석방법이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 그러나 은행잎 중에는 많은 수의 flavonol glycoside가 함유되어 있어 순수한 지표물질의 확보가 어렵고 각 성분들간의 분리능이 좋은 분석조건을 개발하는 일은 결코 쉬운 일이 아니다.

현재까지 보고된 분석방법으로는 역상 column을 사용하여 다양한 용매계를 사용하여 isocratic이나 또는 gradient elution시켜 분석하는 방법이 보고되고 있다.^{17,19-34)} 이들 분석조건 가운데 최근에 Verotta 등³²⁾이 보고한 MeOH과 0.4% H₃PO₄ 용액을 gradient elution시키는 방법이 가장 좋은 분리능을 보여주고 있으므로 본 실험에서는 이 용매계를 사용하여 분석하였다. Fig. 1에 은행잎 엑스의 전형적인 HPLC chromatogram을 나타내었다. 이 chromatogram에서 나타내고 있는 바와 같이 peak의 강도가 큰 9개의 peak중에서 6개의 peak를 지표 물질과 직접 spike test를 실시하여 각각의 peak들을 확인할 수 있었다. 다음에 월별로 채집하여 건조한 은행잎을 일정량씩 취하여 MeOH로 추출한 후 농축하고 이를 냉동 건조시켜 얻은 각 엑스의 양을 측정할 때 Table I와 같다.

이 표에서 볼 수 있는 바와같이 은행잎을 추

Table I. The weight of MeOH extract from *Ginkgo biloba* leaves*

Collection date	Weight of extract
May 1	3.54
June 1	3.00
July 1	2.80
August 1	2.73
September 1	2.99
October 1	2.83
November 1	2.45

* Weight of extract was expressed in g/10 g of dried leaves.

Table II. Equations of the least-squares regressions for flavonol glycoside standards obtained from *Ginkgo biloba*

Compound No.	Regression equation	Correlation coefficient
1	$y=3646.65x-8219.2$	0.9999
2	$y=4265.63x+2616.8$	0.9995
3	$y=4405.54x+2961.6$	0.9999
4	$y=4667.82x-27190.8$	0.9998
5	$y=3187.78x-38779.6$	0.9936
6	$y=2926.95x+1217.4$	0.9998

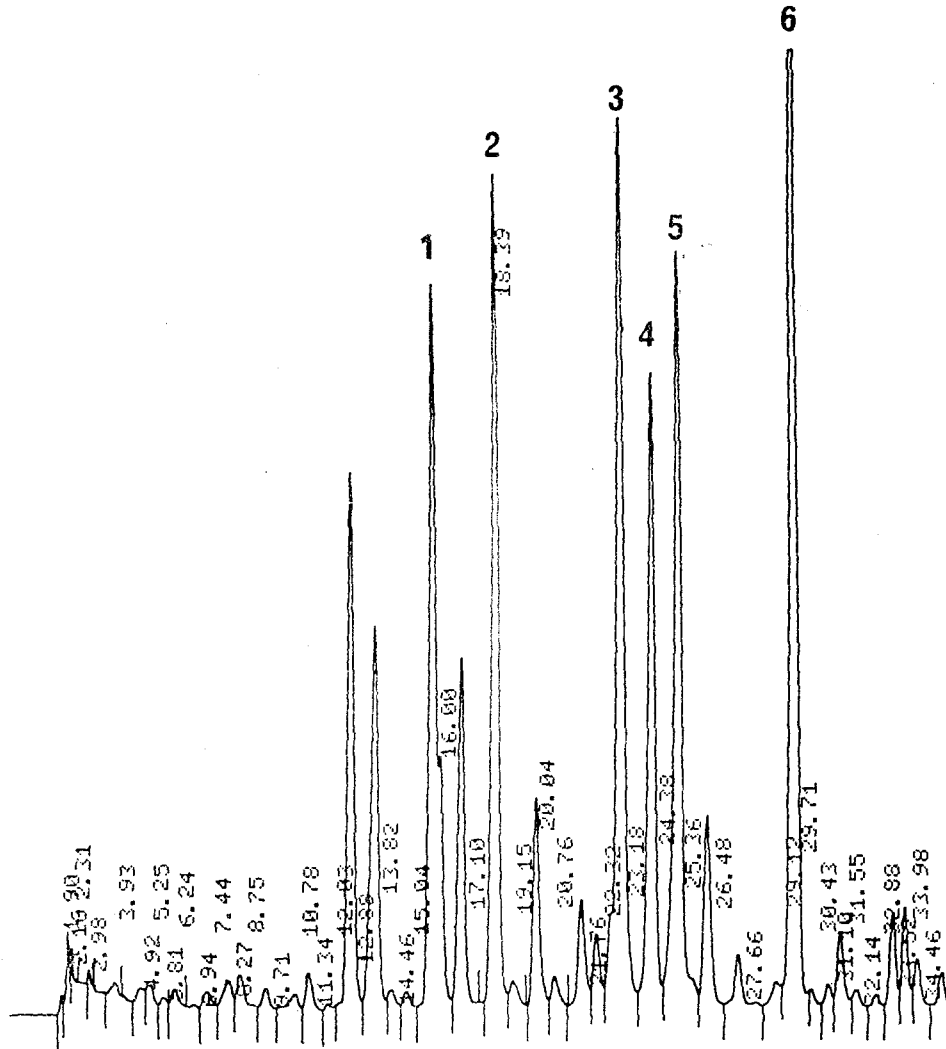


Fig. 1. HPLC chromatogram of MeOH extract from *Ginkgo biloba* leaves collected in May

출하여 얻은 엑스의 양은 채집시기가 지남에 따라 감소하는 경향을 보여 주고 있다. 다음에 이들 지표물질의 함량을 구하기 위하여 지표물질에 대하여 표준 검량선을 작성하였다. 각 지표물질에 대한 회귀직선 방정식과 그 상관계수를 구하여 Table II에 나타내었다. 이를 graph로 나타내면 Fig. 2와 같다. 이와 같이 각 지표물질에 대한 상관계수가 모두 1.0에 접근하므로 표준 물질의 농도(x)와 peak area(y)간에 각각 100~500 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 직선성이 인정되었다. 월별로 측정된 각각의 chromatogram으로부터 화합물 각각에 대한 평균 peak area

를 구하고 이를 상기 회귀직선 방정식에 대입하여 채집 시기별로 각각의 화합물의 농도를 구하여 Table III에 나타내었다.

Table III의 결과를 graph로 표시하면 Fig. 3과 같다. 이들 결과로부터 은행잎 중에 함유되어 있는 총 flavonol glycoside 함량은 잎이 돌아나는 시기(4월말~5월 초순)에 가장 함량이 높았으며 이는 분석한 6종의 flavonol glycoside 모두 같은 결과를 나타내고 있음을 알았다. 이들 함량은 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 단순한 flavonol glycoside가 acylated flavonol glycoside 보다 계절별 함량에 있어서 더 심한 fluctua-

Table III. Results of the quantitative determination of the flavonol glycosides content from *Ginkgo biloba* leaves*

Collection date	Compound No.								
	1	2	3	4	Subtotal (1+2+3+4)	5	6	Subtotal (5+6)	Total
May 1	0.19	0.21	0.23	0.17	0.80	0.30	0.47	0.77	1.57
June 1	0.08	0.09	0.08	0.07	0.32	0.16	0.17	0.33	0.65
July 1	0.07	0.13	0.12	0.09	0.41	0.11	0.09	0.20	0.61
August 1	0.07	0.11	0.10	0.06	0.34	0.10	0.08	0.18	0.52
September 1	0.07	0.07	0.07	0.05	0.26	0.09	0.08	0.17	0.43
October 1	0.05	0.12	0.10	0.07	0.34	0.08	0.09	0.14	0.48
November 1	0.04	0.08	0.08	0.04	0.24	0.08	0.07	0.15	0.39

* Data were expressed in %/g of dried leaves.

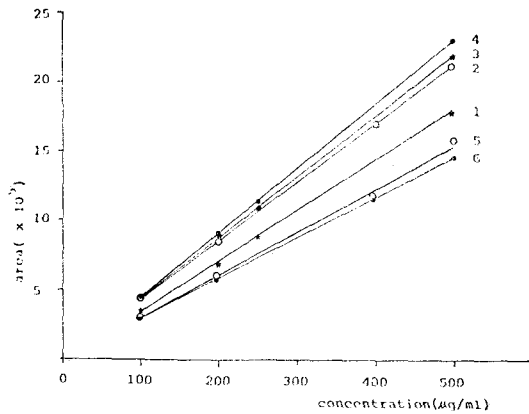


Fig. 2. Calibration curves for the flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves

tion을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 즉 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 rutinoside(3, 2, 및 4)는 모두 초여름 및 초가을에는 함량이 감소하다가 증가하는 경향을 보여주었으나 kaempferol 및 quercetin의 coumaroyl glucorhamnoside (6과 5)와 kaempferol 2,6-dirhamnosyl glucoside (1)는 하절기 이후 거의 일정한 함량을 나타내고 있음을 보여 주었다.

Lobstein 등은 최근 프랑스 Strasbourg에서 채취한 은행잎에 대하여 계절별로 flavonoid의 함량 변화를 보고한 바 있다.³⁰⁾ 이들의 연구 결과와 비교할 때 acylated flavonol glycoside의 함량 변화는 우리나라 은행잎과 매우 유사한 경향을 보여주고 있으나 단순한 flavonol glycoside의 함량은 잎이 돌아나는 3월에 채취한 검체보다 봄철인 4월에 채취한 검체에서 2배 이상 그 함량이 증

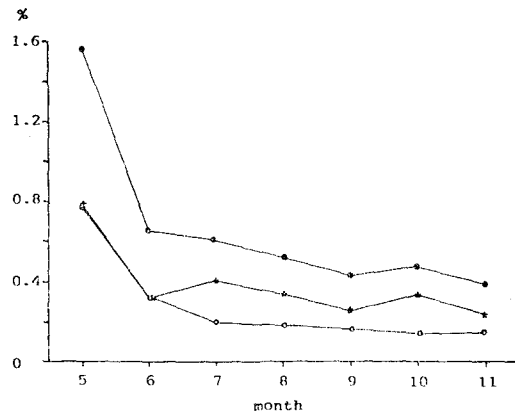


Fig. 3. Seasonal variation of the total flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves(%/g of dried leaves)

●—● : total flavonol glycosides
— : non-acylated flavonol glycosides
○—○ : acylated flavonol glycosides

가하다가 감소하는 경향을 보여주고 있는 것이 큰 차이점이라고 여겨진다.

결론

1. 은행잎 중의 주성분인 flavonol glycoside 성분을 역상 column을 사용하여 MeOH-0.4% H₃PO₄ 용매계로 gradient elution시켜 HPLC를 실시하여 6종의 flavonol glycoside를 분리, 확인한 후 5월부터 11월까지 월별로 채집한 은행잎 중의 각각의 flavonol glycoside를 정량하였다.

2. Kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의

rutinoside는 잎이 돌아나는 시기(5월 초순)에 가장 함량이 높았으며(5월에 0.23%, 0.21%, 0.17%) 이후 감소하였다. 그러나 초여름 및 초가을에는 함량이 다시 증가하다가 이후 점차 감소하는 경향(11월에 0.08%, 0.08%, 0.04%)이었다.

3. Kaempferol 및 quercetin의 3-O-coumaroyl glucorhamnoside와 kaempferol 2,6-dirhamnosyl glucoside는 잎이 돌아나는 시기(5월 초순)에 가장 함량이 높았으며(5월에 0.47%, 0.30%, 0.19%) 이후 점차 감소하는 추세로 하절기 이후 거의 일정한 함량(11월에 0.07%, 0.08%, 0.04%)을 나타냈다.

4. 은행잎 중에 함유되어 있는 총 flavonol glycoside의 함량은 잎이 돌아나는 시기(5월 초순)에 1.57%로 가장 함량이 높았으며 이후 점차 감소하는 추세로 11월에 0.39%를 나타냈다.

(1993년 2월 2일 접수 : 2월 8일 수리)

문 헌

- Major, R.T.: *Science* 157, 1270(1967).
- Wada, K., Ishigaki, S., Ueda, K., Take, Y., Sasaki, K., Sakada, M. and Haga, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1779(1988).
- Nakanishi, K.: *Pure Appl. Chem.* 14, 89(1967).
- Ohmoto, T., Yoshida, O., Kano, M. and Ikuse, M.: *Shoyakugaku Zasshi* 34, 145(1980).
- Itokawa, H., Totsuka, N., Nakahara, K., Takeya, K., Lepoittevin, J.P. and Asakawa, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3016(1987).
- Nakanishi, K., Habaguchi, K., Nakadaira, Y., Woods, M.C., Maruyama, M., Major, R.T., Alauddin, M., Patel, A.R., Weinges, K. and Bähr, W.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 3544(1971).
- Llabres, G., Baiwir, M., Sbit, M. and Dupont, L.: *Spectrochimica Acta* 45A, 1037(1989).
- Weinges, K., Hepp, M. and Jaggy, H.: *Liebigs Ann. Chem.* 521(1987).
- Agnoli, A., Rapin, J.R., Scapagnini, V. and Weitbrecht, W.V.: *Proc. Int. Symp.*, John Libbey & Company Ltd., pp.1-106(1984).
- Braquet, P.: *Drugs of the Future* 12, 643(1987).
- Hasler, A., Meier, B. and Sticher, O.: *Schweiz. Apotheker-Zeitung* 128, 342(1990).
- Huguet, F. and Tarrade, T.: *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 24(1992).
- Oberpichler, H., Beck, T., Abdel-Rahman, M.M., Bielenberg, G.W. and Krieglstein, J.: *Pharmacol. Res. Commu.* 20, 349(1988).
- Lodstein-Guth, A., Briançon-Scheid, F., Victoire, C., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Planta Med.* 54, 555(1988).
- Joly, M., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Phytochem.* 19, 1999(1980).
- Baker, W., Finch, A.C.M., Ollis, W.D. and Robinson, K.W.: *J. Chem. Soc.* 1477(1963).
- Hasler, A., Sticher, O. and Meier, B.: *J. Chromatogr.* 605, 41(1992).
- Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastre, R.: *J. Liq. Chromatogr.* 11, 2969(1988).
- Victoire, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A., Balz, J.P. and Anton, R.: *Planta Med.* 54, 245(1988).
- Hasler, A., Gross, G.A., Meier, B. and Sticher, O.: *Phytochem.* 31, 1391(1992).
- Nasr, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A. and Anton, R.: *Phytochem.* 25, 770(1986).
- Nasr, C., Lobstein-Guth, A., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Phytochem.* 26, 2869(1987).
- Schennen, A. and Hölzl, J.: *Planta Med.* 52, 235(1986).
- Plieninger, H., Schwarz, B., Jaggy, H., Huber-Patz, U., Rodewald, H., Irngartinger, H. and Weinges, K.: *Liebigs Ann. Chem.* 1772(1986).
- Ibata, K., Mizuno, M., Takigawa, T. and Tanaka, Y.: *Biochem. J.* 213, 305(1983).
- Kraus, J.: *Phytochem.* 30, 3017(1991).
- Hasler, A., Meier, B. and Sticher, O.: *J. Chromatogr.* 508, 236(1990).
- Meier, B., Hasler, A. and Keller, B.: *Planta Med.* 55, 639(1989).
- Kang, S.S., Kim, J.S., Kwak, W.-J. and Kim, K.-H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 21, 148(1990).
- Lostein, A., Rietsch-Jako, L., Haag-Berrurier, M. and Anton, R.: *Planta Med.* 57, 430(1991).
- Bae, K.H., Min, B.S., Baek, H.Y. and Ahn, B. Z.: *Yakhak Hoeji* 35, 271(1991).
- Verotta, L., Lolla, E. and Moggi, A.: *Fitoterapia* LXII, 339(1991).

33. Wagner, H., Bladt, S., Hartmann, U., Daily, A. and Berkulin, W.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 129, 2421(1989).
34. Pietta, P., Mauri, P., Bruno, A., Rava, A., Manera, E. and Ceva, P.: *J. Chromatogr.* 553, 223(1991).
35. Kang, S.S., Kim, J.S., Kwak, W.-J. and Kim K.-H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 21, 111(1990).
36. Kim, C.-K., Park, M.-K., Lee, E.-J. and Hwang S.-J.: *J. Kor. Pharm. Sci.* 19, 213(1989).