

## 은행잎 플라보놀배당체에 대한 셀룰라제류의 영향

배기환 · 민병선 · 백흥영\* · 안병준  
충남대학교 약학대학, \*동방제약  
(Received June 19, 1991)

### The Effect of Cellulases on Flavonolglycosides of Ginkgo Leaf

Ki Hwan Bae, Byung Sun Min, Hum Young Baek\* and Byung-Zun Ahn  
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 302-764, Korea  
\*Dongbang Pharmaceutical Co., Seoul 135-280, Korea

**Abstract**—The extractability and stability of ginkgo flavonolglycosides under presence of several cellulase preparations were investigated. The enzymes used were macerosin, cellulase C and cellulase NC. The content variation of the glycosides was measured with HPLC method, using caffeic acid as an internal standard. The methanol extract of ginkgo leaf, containing the total flavonolglycosides of 4.46%, was used for the content comparison. By extraction with the enzymes, each or mixed, the peak levels of all the glycosides began to decrease after 1 or 2 hours. After 24 hour extraction, most of the glycosides were degraded to minor components. The flavonolglycosides in ginkgo leaf were also hydrolysed simply by the water extraction. After 24 hour extraction with water at 40°C, the peak levels of major glycosides were distinctly decreased. Rutin was hydrolysed by enzyme treatment or by ginkgo leaf itself. As a result, it was concluded that the commercially available cellulases and the ginkgo leaf itself contain the activities of  $\beta$ -glycosidase and  $\alpha$ -rhamnosidase. Kaempferol-3-O-(6''-O-*p*-coumaroylglucosyl)-rhamnoside and four other ginkgo flavonolglycosides were not hydrolysed under the same condition.

**Keywords** □ *Ginkgo biloba*, macerosin, cellulase C, cellulase NC, hydrolysis of flavonolglycosides.

셀룰로오스를 가수분해시키는 셀룰라제는 고등식물의 싹, 푸른곰팡이, 목재부패균 및 토양세균 등 자연계에 널리 분포되어 있는 효소군이다. 식물의 잎이나 줄기 등의 세포막은 주로 cellulose와 lignin으로 구성되어 있고, 자연상태의 cellulose는 cellulase에 의하여 분해되어 당의 공급원으로 이용되고 있음은 잘 알려진 사실이다. 세포막 섬유소는 식물세포 내용물, 특히 고형물의 유출을 막고 있으며, 세포막으로부터 섬유소를 제거하면 특정세포 내용물의 유출이 용이하게 되리라는 생각은 지극히 논리적이다. 실제로 cellulase류의 섬유소 분해능을 이용하여, 식물로부터 유효성분을 추출함에 있어서 수율을 높일 수 있었다는 보고들이 있다. 外川 등<sup>1)</sup>은 홍조류의 효소처리에 의한 agar-agar 생산 및 녹차성분의 추출에 응용하였고,

최근에 김 등<sup>2)</sup>은 은행잎의 효소처리에 의한 은행잎 활성성분 추출에 관한 연구결과를 보고하였다. 그러나 추출된 유효성분들이 이들 효소들에 의해 화학적으로 안정한가에 관한 검토는 보고되어 있지 않다.

잘 알려진 바와 같이 은행잎은 혈류촉진, 혈관개선 등의 목적으로 제제화되어 있으며, 이러한 약효성분은 13여종의 flavonolglycosides<sup>3-6)</sup>와 6종의 terpenelactone<sup>7,8)</sup>으로 알려져 있다. 은행잎의 약효는 이들 각개 성분의 상승작용에 기인함을 고려할 때, cellulase류 처리에 의한 활성성분들의 성공적인 추출을 위하여는 화학적 안정성에 관한 연구가 필수적이라 생각된다. 실제로 cellulase류는 그 자체가 단일활성을 갖지 않으며, 결정성 섬유를 액화시키는 C<sub>1</sub> 활성, exoglucanase 및 endoglucanase 활성 그리고 알의 활성들에

의해 생성된 2탄당을 분해하는  $\beta$ -glucosidase의 활성 등 복합적 기능을 갖는 효소군이다. 따라서, cellulase류는 그 자체가 당의 결합( $\alpha$ -결합 및  $\beta$ -결합)을 분해하리라는 개연성은 배제할 수가 없다. 또한 은행잎 중에는 역시 당의 분해를 촉진시키는 효소가 존재할 것이므로 은행잎 자체의 flavonolglycosides에 대한 가수분해능을 확인해 보는 것도 중요하다고 사료된다.

본 연구는 cellulase류 효소 존재하에서 은행잎의 약효성분을 추출할 때 이들이 flavonolglycosides에 어떠한 영향을 미치는 가를 검토하고, 나아가 물로 장시간 추출할 때 은행잎 자체에 함유되어 있는 효소에 의한 거동을 조사하고자 본 연구에 착수하였다.

### 실험방법

**실험재료 및 시약**—은행잎은 동방제약(주)에서 제 약원료로 사용하는 것을 공여받았고, macerosin(4,000  $\mu$ g), cellulase C(1,500  $\mu$ g) 및 cellulase NC(2,000  $\mu$ g)는 Kyowa Chemical Co.의 것을 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

**기기 및 분석조건**—HPLC(Waters model 484), mobile phase : acetonitrile-0.6% citric acid gradient, flow rate : 1.0 ml/min., column :  $\mu$ -Bondapac C18, detector : UV 365 nm, injection volume : 20  $\mu$ l, chart speed : 0.5 cm/min.

**표준엑스의 조제**—은행잎 10g과 메탄올 30 ml를 소형추출기에 가한 후, 2시간 동안 환류시킨다. 메탄올 용액을 여과하고, 남은 잔사는 동일량의 메탄올로 한번 더 추출한다. 합한 메탄올 용액은 감압하에 농축하고 여기에 물 30 ml를 가한 후 클로로포름 20 ml씩으로 2회 추출한다. 물층을 건고한 다음 남은 엑스를 표준엑스로 사용하였다.

**물추출에 의한 flavonolglycosides 함유 엑스의 조제**—음건한 은행잎 1g에 증류수 10 ml를 가하여 5분간 혼든 후, 40 $^{\circ}$ C 수욕에서 시간별로 추출하였다. 추출액을 감압여과하여 여액을 얻고, 잔사에 다시 증류수 5 ml를 가하여 혼들어 감압여과, 여액을 앞의 것과 합하여 농축했다. 얻어진 엑스에 메탄올 20 ml를 가하여 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 환류시키고, 냉각, 여과하였다. 여액을 감압농축, 감압펌프로 완전히 용매를 제거한 엑스를 평량하였다.

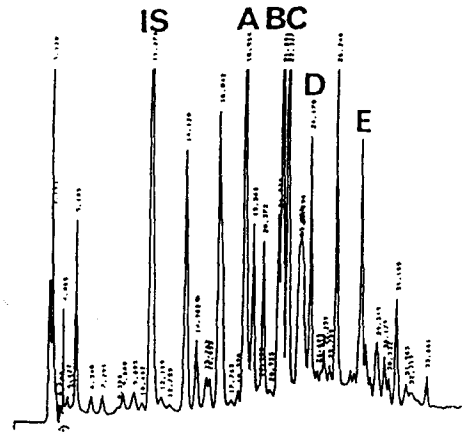


Fig. 1—HPLC chromatogram of methanol extract of Ginkgo biloba leaf

Waters model 484, mobile phase: acetonitrile-0.6% citric acid gradient, flow rate: 1.0 ml/min., column:  $\mu$ -Bondapac C18, detector: UV 365 nm, injection volume: 20  $\mu$ l, chart speed: 0.5 cm/min.

IS: internal standard (caffeic acid)

A: rutin, B and C: unidentified flavonolglycosides, D: kaempferol-glucorhamnoside, E: kaempferol-3-O-(6'''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

**0.2% cellulase류 처리에 의한 flavonolglycosides 함유 엑스의 조제**—표준엑스의 조제와 동일한 조작을 하였다. 그러나, 추출용매로 증류수 대신 세포벽 용해효소인 macerosin, cellulase C 및 cellulase NC를 5 : 3 : 1의 조성비로 만든 0.2% 수용액, 효소 각개 처리를 하기 위하여 0.11% macerosin 수용액, 0.07% cellulase C 수용액 및 0.02% cellulase NC 수용액 각 10 ml씩을 사용하였다. 시간별로 추출한 뒤, 90 $^{\circ}$ C의 수욕에서 30초간 가열시키므로서 효소를 불활성화시켰다.

**HPLC 분석**—비교엑스 및 cellulase 처리에 의한 엑스 10 mg을 methanol 10 ml에 녹인 액에 따로 내부표준물질로 사용한 caffeic acid 10 mg을 methanol 100 ml에 녹인액 1 ml를 취하여 합한다. 이 중에서 20  $\mu$ l를 취하여 HPLC에 주입하였다. 표준엑스 및 cellulase 처리에 의한 활성물질의 정량은 내부표준물질에 대한 비를 계산하는 방법을 사용하였다. 표준엑스는 동방(주)의 4.5% flavonolglycosides를 사용하

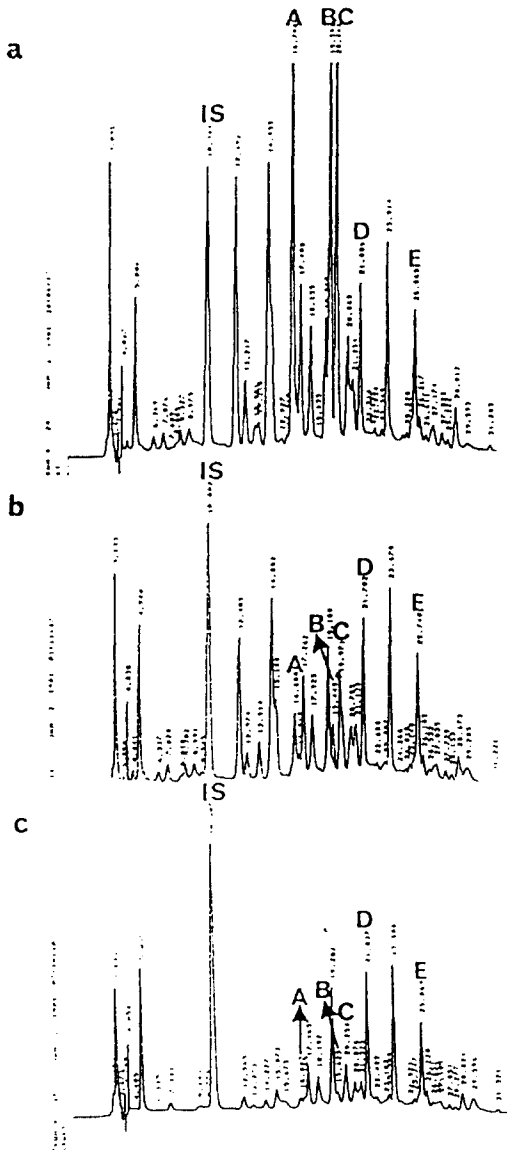


Fig. 2—Content variation of ginkgo flavonolglycosides extracted with water

All legends are same as shown in Fig. 1  
 a: after 1/2 hour extraction, b: after 12 hours extraction, c: after 24 hours extraction

였다.

#### 실험결과 및 고찰

은행잎 자체효소가 flavonolglycosides에 미치는 영

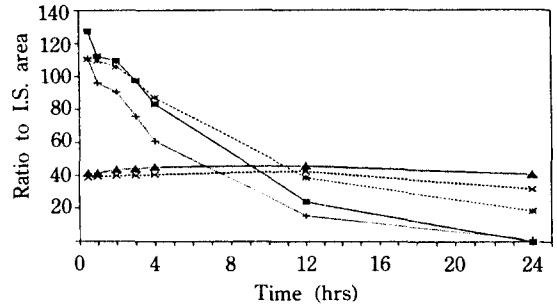


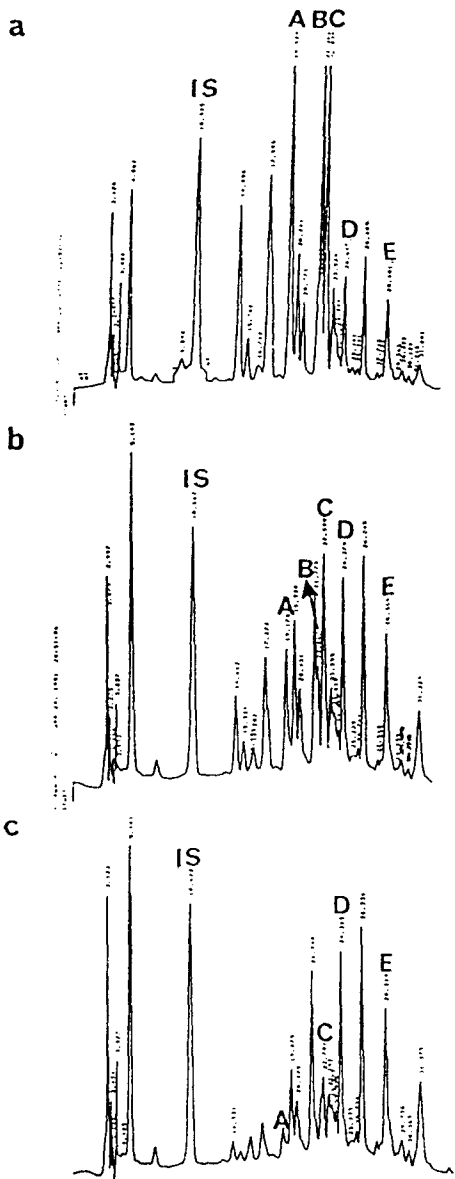
Fig. 3—The changes of ginkgo flavonolglycosides content with extraction time using water as solvent.

The ratio of area indicates the percentage of each content of component compared with that of internal standard, caffeic acid.

—■— A: rutin, ---+--- B and ---\*--- C: unidentified compounds, ---▲--- D: kaempferol-glucorhamnoside, ---×--- E: kaempferol-3-O-(6''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

향—flavonolglycosides의 양 및 조성의 변화는 HPLC pattern으로 판정하였다. 비교 pattern은 은행잎의 methanol 추출물의 그것을 사용하였다(Fig. 1).

은행잎을 물로 40°C에서 경시별로 추출할 때, 은행잎 자체에 함유되어 있는 효소들이 flavonolglycosides에 어떤 영향을 미치는 가를 HPLC chromatogram으로 비교 검토하였다(Fig. 2). 그리고 경시별 함량비를 내부표준물질로 사용한 caffeic acid를 100으로 하여 그 면적비로 하여 Fig. 3에 나타냈다. Fig. 2a의 chromatogram에서 보는 바와 같이 추출 30분에 추출량이 최대였고 chromatogram도 Fig. 1과 거의 같은 양상을 보였다. 30분 이후부터는 그 양상이 달라지기 시작하여 12시간이 되면 현저한 차이를 볼 수 있었으며(Fig. 2b), 24시간이 지나면 완전한 차이가 나타났다(Fig. 2c). 상세히 설명하면, Fig. 2의 b와 c 그리고 Fig. 3에서 보는 바와 같이 retention time(rt) 18.9~19.3에 나타나는 rutin(peak A)은 추출 30분에 최고치를 나타냈으나, 그 이후에는 급속도로 분해되고 있음을 볼 수 있었다. rt 21.9~22.2(peak B)와 rt 22.3~22.6(peak C) 그리고 rutin 왼쪽의 두 peak(rt 12.4~12.6과 14.9~15.1) 물질들은 12시간이 경과하면 그 면적이 대폭 감소하고 24시간 후에는 거의 무시할 수 있을 정도로 작아졌다. rt 28.0~28.5(peak E)는 kaempferol-3-O-(6''-O-p-coumaroylglucosyl)-



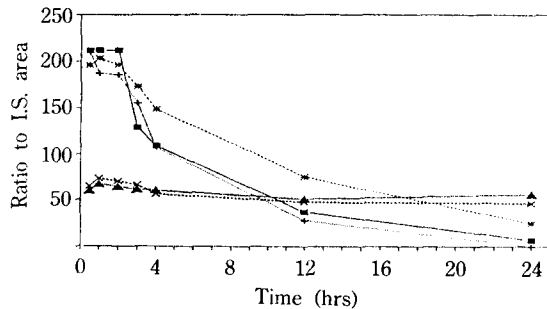
**Fig. 4**—HPLC chromatograms on content variation of ginkgo flavonolglycosides after extraction with 0.2% cellulases solution.

The cellulases were composed of macerosin, cellulase C and cellulase NC (5 : 3 : 1).

a: after 1/2 hour extraction, b: after 12 hours extraction, c: after 24 hours extraction

rhamnoside(KCGR)에 해당하는데, 이의 넓이는 추출에 의하여 변화하지 않음을 볼 수 있었다.

이상과 같이 은행잎을 물만으로 40°C에서 장시간



**Fig. 5**—The changes of ginkgo flavonolglycosides content with extraction time using 0.2% cellulases solution as solvent.

—■— rutin, ---+--- and ---\*--- unidentified compounds, ---▲--- kaempferol-3-O-glucorhamnoside, ---×--- kaempferol-3-O-(6''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

추출하면 대다수의 유효성분이 변한다는 사실을 발견했다. 이러한 사실로부터 미루어 볼 때 은행잎 중에는 β-glucosidase의 활성은 물론 rutinoidase나 rhamnosidase 등의 효소가 함유되어 있음이 틀림이 없다. flavonolglycosides를 함유하는 은행잎 엑스를 제조할 때 항상 이 점을 유의하지 않으면 안될 것이다.

**Cellulase류 효소처리가 은행잎 flavonolglycosides에 미치는 영향**—사용한 효소 중 macerosin은 pectinase의 활성을 주로 발휘하는 효소로서 은행잎 세포 사이를 채우고 있는 pectin질을 분해시켜 세포의 유리를 용이하게 하고, cellulase C는 cellulose를, cellulase NC는 hemicellulose를 주로 분해함으로써 이들을 혼합하여 사용하면 세포벽의 분해속도는 cellulase만을 사용할 때 보다 더 빨라지리라 기대된다고 주장하고 있다.<sup>2)</sup> 본 실험에서도 이에 흥미를 갖고 김등<sup>2)</sup>이 최적이라고 생각하는 효소혼합물을 만들었다. 조성비를 5 : 3 : 1로한 0.2% cellulase류 수용액을 용매로 하여 경시별로 추출, HPLC에 의한 chromatogram은 Fig. 4와 같다. 이 chromatogram 중에서 peak A의 rutin, peak B와 peak C의 물질들, peak D의 kaempferol-3-O-glucorhamnoside(KGR) 그리고 peak E의 kaempferol-3-O-6''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside(KCGR)의 경시별 함량비를 내부표준물질로 사용한 caffeic acid를 100으로 하여 그 면적비로 계산한 것을 Fig. 5에 나타냈다. 비교 HPLC chromatogram(Fig. 1)과 비교 검토한 결과, 추출 1 시간에 추출물의 함량이 가장 높았고, 2시간까지는

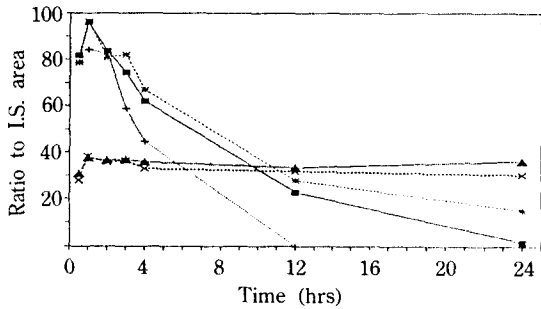


Fig. 6—The changes of ginkgo flavonol glycosides content with extraction time using 0.11% macerosin solution as solvent.

—■— rutin, ---+--- and ---\*--- unidentified compounds, ---▲--- kaempferol-3-O-glucorhamnoside, ---×--- kaempferol-3-O-(6'''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

큰 변화가 없었다. 2시간 이후부터 chromatogram의 양상이 변화하기 시작하였다. rutin(peak A)은 추출 2시간 까지는 추출량이 증가하다가 2시간부터는 점차 감소하였고, 12시간에 이르면 현저히 감소하였으며, 24시간에 이르면 거의 감지되지 않았다. peak C의 물질도 rutin과 같은 양상을 보였다. peak B의 물질은 추출 30분에 추출량이 최대였고 이후 감소하는 양상이 rutin과 거의 같았다. peak D의 KGR와 peak E의 KCGR는 추출 1시간 까지는 약간씩 추출량이 증가하고 추출 24시간까지 변화가 거의 없었다.

물추출에 의한 경시별 rutin의 HPLC chromatogram(Fig. 3)과 효소류 처리에 의한 경시별 그것(Fig. 5)을 비교해 보면, 물추출에 있어서는 추출 30분에 추출량이 최대치에 도달하였고, 효소류 처리에 있어서는 추출 1시간에 최대치에 도달하였다. 그리고 물추출에 있어서는 추출 최대치를 보인 30분이 지나면 감소하기 시작하여, 추출 4시간까지 서서히 감소하는데 비하여, 효소류 처리에 있어서는 추출 2시간이 지나면 감소하기 시작하여 추출 4시간까지 급격히 감소하는 양상을 보이고 있다. 이러한 사실은 효소류 중에서도 강한 rutinosidase의 활성이 존재함을 시사한다.

0.11% macerosin 추출에 있어서는(Fig. 6), rutin과 peak C의 물질은 추출 1시간에 추출량이 최대였고, 이후 시간이 지남에 따라 감소하기 시작하여 24시간 지나면 현저히 감소되었다. peak B의 물질은 추출 1

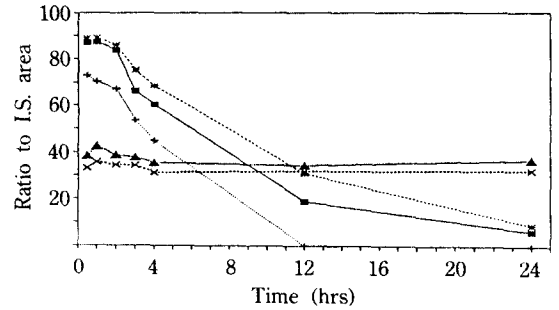


Fig. 7—The changes of ginkgo flavonol glycosides content with extraction time using 0.07% cellulase C solution as solvent.

—■— rutin, ---+--- and ---\*--- unidentified compounds, ---▲--- kaempferol-3-O-glucorhamnoside, ---×--- kaempferol-3-O-(6'''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

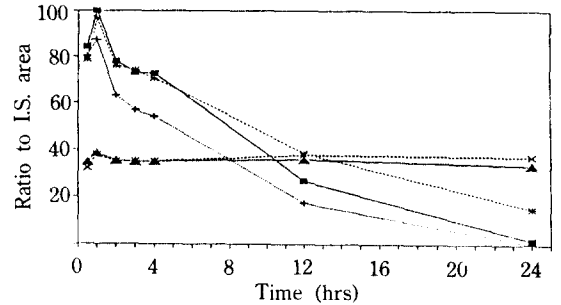


Fig. 8—The changes of ginkgo flavonol glycosides content with extraction time using 0.02% cellulase NC solution as solvent.

—■— rutin, ---+--- and ---\*--- unidentified compounds, ---▲--- kaempferol-3-O-glucorhamnoside, ---×--- kaempferol-3-O-(6'''-O-p-coumaroylglucosyl)-rhamnoside

시간에 최대치를 보였고, 이후 감소하기 시작하여 추출 12시간에는 사라졌다. 그러나 KGR와 KCGR는 추출 1시간부터 24시간까지 추출량의 변화가 거의 없었다.

0.07% cellulase C 추출(Fig. 7)과 0.02% cellulase NC 추출(Fig. 8)에 있어서는 0.11% macerosin 추출의 양상과 유사하였다. 그런데, 0.11% macerosin과 0.07% cellulase C의 추출에 있어서 12시간 경과 후에 사라진 peak B의 물질이 0.02% cellulase NC-종류수 추출에 있어서는 24시간 추출에도 소량이지만 나타났다. 각개 효소간의 rutin의 함량변화에 미치는 영

향은 거의 유사하였다. 즉, 이들 효소에 혼재하는 rutosidase의 활성에는 큰 차이가 없었다.

이상과 같이,  $\beta$ -linked flavonolglycosides가 파괴된다는 사실은 명백하므로 macerosin, cellulase C 및 cellulase NC 등 cellulase류 공업용 효소로서 이들 물질을 추출하는 것은 부적당하다고 생각된다.

## 결 론

1. 은행잎을 40°C에서 물로 추출하였더니, kaempferol-3-O-glucorhamnoside와 kaempferol-3-O-(6'''-O-*p*-coumaroylglucosyl)-rhamnoside를 포함한 5종을 제외한 8여종의 배당체는 모두 가수분해되었다. 그러므로 은행잎을 물만으로 장시간 추출하는 경우 전처리로서 효소의 불활성화 과정이 필요 불가결하다.

2. macerosin, cellulase C, cellulase NC 각각 및 이들로 구성된 복합효소(macerosin-cellulase C-cellulase NC=5:3:1)로 추출하였을 때도 물추출의 경우와 유사한 경과를 보였다. 이들 효소를 사용하는 경우 rutin의 분해가 훨씬 잘 일어나는 것으로 보아 이들 효소 중에는 rutosidase의 활성이 존재하는 것으로 생각된다. 비교엑스의 HPLC상의 물질 C는 macerosin과 cellulase C에 더욱 민감하며, 12시간 추출하면 완전히 분해된다. 이들 효소 및 복합효소 존재하의 추출의 공통점은 24시간 추출 후, kaempferol-3-O-glucorhamnoside와 kaempferol-3-O-(6'''-O-*p*-coumaroylglucosyl)-rhamnoside를 포함한 5개 이외의 배당체는 모두 분해되었다.

3. cellulase NC 및 macerosin을 사용할 경우, 1내지 2시간 안에 rutin, 물질 B 및 kaempferol-3-O-glucorhamnoside, kaempferol-3-O-(6'''-O-*p*-coumaroylglucosyl)-O-rhamnoside의 수율을 다소 향상시켰다.

## 감사의 말씀

귀중한 표준품 kaempferol-3-O-(6'''-O-*p*-coumaroylglucosyl)-rhamnoside를 보내주신 서울대학교 생약연구소 강삼식 교수님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) 外山信男: 發工 4, 199(1962).
- 2) Kim, B.Y., Lee, C.G., Whang, W.K. and Huh, J.D.: Studies on the extraction of active components in *Ginkgo biloba* leaves by enzyme treatments (I). *Kor. J. Pharmacogn.* 20, 43(1989).
- 3) Nasr, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A. and Anton, R.: Kaempferol coumaroyl glucorhamnoside from *Ginkgo biloba*. *Phytochem.* 25, 770(1986).
- 4) Nasr, C., Lobstein-Guth, A., Haag-Berrurier and Anton, R.: Quercetin coumaroyl glucorhamnoside from *Ginkgo biloba*. *Phytochem.* 26, 2869(1987).
- 5) Victorie, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A., Balz, J.P. and Anton, R.: Isolation of flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Medica*, 245 (1988).
- 6) Oberpichler, H., Beck, T., Abdel-Rahman, M.M., Bielenberg, G.W. and Krieglstein, J.: Effects of *Ginkgo biloba* constituents related to protection against brain damage caused by hypoxia. *Pharmacological Research-Communication* 20, 349(1988).
- 7) Sakabe, N., Takada, S. and Okabe, K.: The structure of ginkgolide A, a novel diterpenoid trilactone. *J. Chem. Soc. Chemical Communications* 259(1967).
- 8) Okabe, K., Yamada, K., Yamamura, S. and Takada, S.: Ginkgolides. *J. Chem. Soc. (C)*, 2202(1967).