

## 계절, 성에 따른 은행잎 중의 Ginkgolides 함량의 변화

성상현 · 전순화 · 문영심 · 이흠숙<sup>0</sup> · 허 훈<sup>#</sup> · 김영중

서울대학교 약학대학, 서울산업대학교 식품공학과<sup>0</sup>

(Received January 10, 1994)

### Seasonal and Sexual Variation of Ginkgolides Contents in Ginkgo Leaves

Sang Hyun Sung, Soon Hwa Jeon, Young Shim Moon, Heum Sook Lee<sup>0</sup>,

Hoon Huh<sup>#</sup> and Young Choong Kim

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

<sup>0</sup>Seoul National Polytechnic University, Seoul 139-743 Korea

**Abstract**—The contents of ginkgolides were determined in the leaves of male and female *Ginkgo biloba* from late spring until mid-autumn. Ginkgolides were detected during the whole growing season in the leaves of each tree. Ginkgolides content was low in late spring, gradually increased to reach a maximum in august and decreased thereafter. The male trees have two or three times higher ginkgolides content than the female trees. Comparing our results with that of previously reported values, the sexual variation of ginkgolides content seemed not to be genetic.

**Keyword** □ *Ginkgo biloba*, ginkgolides.

은행잎 추출물은 심장과 혈관에 작용하여 지속적으로 말초 혈관을 확장시켜 혈류를 증가시키고 혈액 순환을 촉진하며 진경 작용이 있는 것으로 알려져 왔으며 1972년에 유럽에서 특허화 되어 (GBE 761) 심혈관계의 치료제로 널리 사용되고 있다. 이런 약리 작용은 은행잎 추출물에 가장 많이 함유되어 있는 flavonoid 성분에 의한 것으로 알려져 왔으나 최근에는 diterpene계 성분인 ginkgolides가 flavonoid 성분보다 더 많은 주목을 받고 있다.

Ginkgolides는 은행나무에만 존재하는 diterpene으로 혈소판 활성화 인자 (platelet activating factor, PAF)의 작용을 강력히 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 혈소판 활성화 인자는 immunoglobulin E 등이 관여하는 면역 반응시 각종 면역 세포에서 유리되고 혈소판 막에 존재하는 수용체와 결합하여 혈소판을 활성화시키고 혈액내 세포의 응집 반응 및 이와 관련된 다

양한 병리 현상과 깊이 관련되어 있음이 최근 연구에 의하여 밝혀지고 있다.<sup>2)</sup> 지금까지 알려진 ginkgolides는 A, B, C, M 및 J, 5종류로 그 중 ginkgolide B는 가장 강력한 PAF 길항 작용이 있어 이미 알리지 및 천식 치료제로 개발되어 현재 임상 시험 단계에 있다. 그러나 은행잎 중의 ginkgolides 함량이 매우 낮아 제제화 하기에 충분한 양을 확보하는데 많은 어려움이 따르고 있다.<sup>3-4)</sup>

또한 은행잎 중의 다양한 성분들은 계절에 따라 그 함량이 큰 차이가 있다는 것이 보고되고 있으며 특히 은행잎의 유효 생리 활성 성분으로 인식되고 있는 flavone glycosides의 계절별 함량 변화는 널리 연구되었다.<sup>5)</sup> 은행잎 중의 생리 활성 성분의 계절별 함량 변화에 관한 연구는 은행잎 제제를 생산함에 있어 높은 품질의 원료를 생산하기 위하여 필수적인 작업으로 여겨진다. 따라서 본 연구에서는 은행잎 중의 또다른 중요한 생리 활성 성분인 ginkgolides의 계절

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

에 따른 함량 변화와 아울러 性別 함량 차를 조사하였다.

### 실험재료 및 방법

**실험재료**—본 실험에서 사용한 은행잎은 서울 대학교 관악 캠퍼스 내에서 자라는 은행나무 중 나무의 높이와 줄기의 굵기가 비슷한 (높이 : 3 m, 줄기의 굵기 : 지상부에서 1 m 되는 곳의 둘레가 약 50~60 cm) 암, 수 각각 4그루의 나무로부터 매월 채취하였다.

**시약 및 기기**—Gas chromatography (GC) 분석에 의한 ginkgolides의 확인 및 정량을 위한 유도체화 시약인 Trisil/BSA in Dimethylformamide (DMF)는 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL., U.S.A.)에서 구입하였다. 표준 물질인 ginkgolide A, ginkgolide B는 독일 Heidelberg 대학의 H. Schick 박사로부터 제공받았다.

Ginkgolides를 정량하기 위하여 사용한 GC는 Hewlett-Packard Model 5890 series II이고 detector는 flame ionization detector, column은 DB-5 column (0.25 mm×30 m; J&W Scientific)을 사용하였다.

**Ginkgolides 분획의 추출 및 정제**—은행잎을 70°C에서 48시간 건조시킨 후 2g을 잘게 분쇄해서 (20 mesh) 증류수와 acetone (1 : 1, v/v) 혼합 용매 20 ml로 shaking water bath를 이용하여 1시간씩 5회 반복 추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압농축시켜서 acetone을 증발시키고 잔여 수층을 *n*-hexane 20 ml/씩으로 5회 추출하여 비극성 물질을 제거하였다. 다시 잔여 수층을 2N-HCl로 pH 2.0으로 산성화시킨 후 ethyl acetate 20 ml/씩으로 5회 추출하였다. Ethyl acetate 분획을 감압농축 시킨 후 증류수 20 ml에 현탁시키고 다시 diethyl ether 20 ml/씩으로 5회 추출하여 추출액을 합하였다. Diethyl ether 분획에 sodium sulfate를 첨가하여 수분을 제거한 후 감압농축시키고 0.45 μm 한외여과막을 사용하여 여과한 후 분석에 사용하였다.

**Gas chromatography (GC)에 의한 ginkgolides의 정량**—Ginkgolides의 정량은 Carrier 등의 GC 방법으로 분석하였다.<sup>3)</sup> 분리한 ginkgolides 분획을 반응용기(Reacti-Vial)에 옮겨 질소 가스 하에서 용매를 완전히 증발시킨 후에 Trisil/BSA in Dimethylforma-

mid (DMF) 100 μl을 가한 후 마개를 막고 반응액을 완전히 혼합시킨 후 73°C에서 1시간 반응시켜 GC로 분석하였다. GC분석 조건은 column 온도 295°C, detector 온도 310°C, 운반 기체는 질소 가스를 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min 이었다. Ginkgolides 함량은 ginkgolide A와 ginkgolide B 표준품을 분석하여 얻은 표준 검량선을 이용하여 결정하였다.

**GC/MS에 의한 ginkgolides의 확인**—은행잎 중의 ginkgolides 확인은 ginkgolide A와 ginkgolide B 표준 물질과 함께 GC/MS를 이용하여 확인하였다. Column의 온도는 100°C에서 300°C까지 분당 20°C씩 증가시켰으며 운반 기체의 속도는 0.89 ml/min였다. 크로마토그램은 selected ion monitoring 방법을 사용하여 확인하였다.

### 결과 및 고찰

은행나무에 은행잎이 돌아나기 시작하는 5월부터 낙엽이 지기 직전인 10월까지 매월 비슷한 크기의 암, 수 각각 4그루의 나무로부터 시료를 채취하여 ginkgolides의 함량을 측정하고 결과 ginkgolides의 함량은 암수에 상관없이 봄부터 서서히 증가하여 8월에 최고치에 이른 후 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1, 2). 이러한 ginkgolides의 계절별 변화는 이미 보고된 은행잎의 다른 성분들과 상이한 결과를 나타낸다. 즉 총 flavone glycosides는 이른 봄에 소량 존재하나 봄에 그 함량이 최고치에 달하고 서서히 감소하는 것으로 보고되었으며<sup>5)</sup> 은행잎 중 주 terpene계 화합물인 polyprenol은 봄부터 서서히 증가하여 가을에 잎이 떨어지기 직전에 최고치에 이르게 된다.<sup>6)</sup>

일찌기 Teng은<sup>7)</sup> 자세한 data없이 ginkgolides의 함량이 늦여름에 최고치에 이른 후 낙엽이 질 때까지 서서히 줄어든다고 보고하였으며 이후 허<sup>8)</sup>와 van Beek<sup>9)</sup>은 각각 미국산, 네덜란드산 은행잎 중의 ginkgolides의 계절별 함량 변화를 보고하였다. 이들의 보고와 본 연구의 결과는 잘 일치하여 그 함량은 초기에는 증가하여 8월 말이나 9월 초에 최고치에 이르고 이후 천천히 감소하는 것으로 나타났다. 즉 생육 환경에 있어서 일조량이나 온도가 ginkgolides의 함량에 가장 큰 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 또한 van Beek은 네덜란드산 암수 은행나무의 ginkgolides의 함량을 분석하여 시료 채취 전과정을 통하여

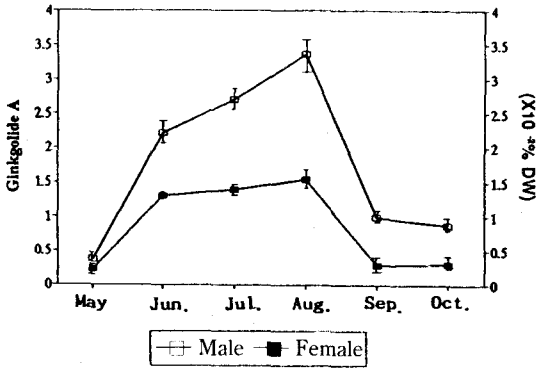


Fig. 1—Seasonal variation of the ginkgolide A content in the leaves of male and female *Ginkgo biloba*.

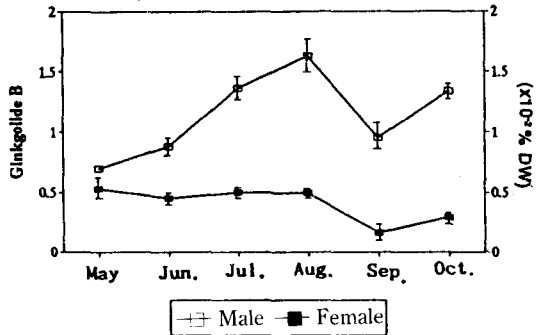


Fig. 2—Seasonal variation of the ginkgolide B content in the leaves of male and female *Ginkgo biloba*.

암나무의 ginkgolides 함량이 수나무의 ginkgolides 함량에 비해 높다고 보고하였다.<sup>9)</sup> 본 연구의 국산 은행나무의 암수 ginkgolides 함량 비교 결과에 의하면 수나무의 ginkgolides 함량이 암나무의 ginkgolides 함량에 비해 현저히 높으므로 서로 반대의 결과를 나타내었다. 따라서 나무의 성에 따른 ginkgolides의 함량차는 유전적인 것은 아니라고 여겨진다. 한편 본 실험에서 은행잎 중의 ginkgolides 함량 분석을 위해 사용한 은행나무는 높이 3 m 정도이며 약 30년생 전후의 것으로서 그 함량이 네덜란드산의 것 (60년생)에 비해 높은 것으로 밝혀졌는데 이는 어린 나무에서 채취한 은행잎에서 ginkgolides 함량이 더 높다는 결과와<sup>9)</sup> 잘 일치하고 있다. 본 실험의 결과와 이미 보고된 flavone glycosides의 채취 시기에 의한 함량 차의 결과를 종합하면 높은 품질의 은행잎 제제를

얻기 위해서는 은행잎 채취 시기를 적절히 선택해야 할 것으로 사료된다. 즉 높은 함량의 flavone glycosides를 얻기 위해서는 어린 은행잎을 채취하여야 하지만 이 경우에는 또다른 중요한 생리 활성 성분인 ginkgolides의 함량이 낮아질 것이므로 채취 시기에 신중을 기해야 할 것으로 여겨진다.

감사의 말씀

본 연구는 1992년도 학술진흥재단의 연구비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드리며 표준 물질인 ginkgolide A와 ginkgolide B를 제공하여 주신 독일 Heidelberg 대학의 H. Schick 박사에게도 감사드립니다.

문 헌

- 1) Braquet, P.: The ginkgolides; Potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.; Chemistry, pharmacology and clinical applications. *Drug of the Future* **12**, 643 (1987).
- 2) Braquet, P.: *Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Chemical perspectives*. J. R. Prous Science Pub., Barcellona, Vol **1**, p 9 (1988).
- 3) Carrier, O. J., Couloranbe, P., Mancini, M., Nenfeld, R., Weber, M. and Archambault, J.: Immobilized *Ginkgo biloba* cell culture In: *Nijkamp, H. J. J. Van der Plas, L. H. W. and van Aartrijk, J. eds Progress in Plant and cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, p 614 (1990).
- 4) van Beek, T. A., Scheeren, H. A., Rantio, T., Melger, W. C. and Lelyveld, G. P.: Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves, extracts and phytopharmaceuticals. *J. Chromatogr.* **543**, 375 (1990).
- 5) Lobstein, A., Rietsch-Jako, L., Hang-Berrurier, M. and Anton, R. Seasonal variation of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med.* **57**, 430 (1991).
- 6) Huh, H., Singh, J. and Staba, E. J.: Ontogenic aspects of Ginkgo polyphenols. *Planta Med.* **59**, 379 (1993).
- 7) Teng, B. P.: Chemistry of ginkgolides. In: Braquet,

- P. (ed.) *Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Chemical Perspectives*. J. R. Prous Science Pub., Barcellona, Vol 1, p 37 (1988).
- 8) Huh H. and Staba E. J.: Ontogenic aspects of Ginkgolides production in *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* **59**, 232 (1993).
- 9) van Beek, T. A. and Lelyveld, G. P.: Concentration of ginkgolides and bilobalides in *Ginkgo biloba* leaves in relation the time of year. *Plant Med.* **58**, 413 (1992).