

# 은행잎 추출물 유래 Ginkgetin 및 Isoginkgetin의 융복합 특성 연구

민경남  
건국대학교 생물공학과

## Physicochemical properties of Ginkgetin and Isoginkgetin extracted from Ginko leaves

Kyung-Nam Min  
Department of Bioengineering, Konkuk University

요 약 은행잎의 Biflavonoid인 ginkgetin과 isoginkgetin을 화장품 소재로 이용 가능성 여부를 확인하기 위해 이를 분리하여 화학 구조 및 물리화학적 특성을 규명하고자 하였다. 음건한 은행나무 단풍잎 1 kg을 순차적으로 ethanol, n-hexane, ethylacetate 및 normal butyl alcohol로 분획 추출하여 최종 ginkgetin과 isoginkgetin을 확보하였다. 두 화합물은 모두 HPLC를 통해 99% 이상 고 순도로 나타났고 MS spectrum을 통한 분자량은 566, 분자식은  $C_{32}H_{22}O_{10}$ 로 동일한 이성질체적 구조를 나타냈다. UV spectrum으로 flavonoid의 골격과 NMR로 aromatic proton의 존재와 탄소 수 및 구성비를 측정된 결과 문헌에 보고된 flavonoid 화합물의 정보와 일치하였다.

주제어 : 은행잎, 후라보노이드, 바이후라보노이드, 긴게틴, 이소긴게틴, 이성질체.

**Abstract** To confirm the feasibility as raw materials for cosmetic formulation, ethanol, n-hexane, ethylacetate and normal butyl alcohol were extracted from 1kg of Ginko leaves. Ultimately, investigated chemical structure and physicochemical properties of ginkgetin and isoginkgetin. The purity of those two components have been evaluated higher than 99%. They are isomers with molecular weight as 566 and a molecular formular,  $C_{32}H_{22}O_{10}$ . Flavonoid's frame and NMR spectrum exhibited the existence of aromatic proton and the proper ratio of the carbon, which were expected structures exactly corresponded to the reported references.

**Key Words** : Ginkgo biloba Leaves, Flavonoid, Biflavonoid, Ginkgetin, Isoginkgetin, isomer.

## 1. 서론

### 1.1 서론

은행잎은 예로부터 혈액 순환 촉진 및 혈관 확장 작용을 가진 혈행 개선제로 알려져 있고, 은행잎 추출물은 현재 30개국 이상에서 순환장애, 뇌혈관 질환 등의 의약품으로 판매되고 있다[1].

은행잎의 주성분은 flavonoid계, terpene계, polyphenol

계, polysaccharide계[2-7] 등으로 분류되고, 이 중 flavonoid계 화합물은 은행잎 추출물의 50%를 차지하는 주요 성분이다. Flavonoid는 polyphenol에 속하는 수용성 식물색소로 주로 밝은 노란색을 나타내고 15개 탄소 골격의 일반적인 구조를 가지고 있으며, 천연 항산화제로 활성산소 제거 및 산화적 스트레스를 억제하여 노화 예방 및 지연 효과가 보고되고 있다. 또한 항염증, 항혈전 및 항알러지 등의 약리적 작용으로 건강 증진에 도움이

\*본 논문은 민경남 박사 학위 논문을 명시합니다.

\*Corresponding Author : Min Kyung Nam(mkn0793@hanmail.net)

Received February 6, 2018

Revised May 31, 2018

Accepted June 20, 2018

Published June 20 28, 2018

되는 것으로 알려져[8-10], 다수의 식물에서 추출하여 총 함량 분석 및 활성산소 소거능을 시험하고 정제방법을 개발하는 연구가 진행되고 있다[11-12].

은행잎 추출물은 혈행 개선 및, 지질대사 조절에 관한 연구[13]와 항암[14] 항염[15] 연구에 집중되어 있고 항균 [16], 항산화[17]에 대한 의학적 연구가 보고되고 있다. 은행잎에서 유래된 Biflavonoid인 ginkgetin과 isoginkgetin 도 항암, 및 항바이러스, 항산화 등의 의학적인 약리 작용이 보고되고 있으나[18], 피부 미용학적 측면에서 화장품 소재로서의 효능 연구는 아직까지 미미한 실정이다.

이에 본 연구는 국내에 자생하는 은행잎의 Ginkgetin 과 isoginkgetin을 화장품 소재로 이용 가능성 여부를 연구하기 위해 은행잎에서 Ginkgetin과 isoginkgetin을 분리 정제하여 그 화학 구조 및 물리화학적 특성을 규명하고자 한다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1 재료 및 기기

#### 2.1.1 재료

본 실험에서 사용된 은행잎은 2013년 대전광역시 유성구에서 10월 말부터 11월 초 까지 채집하여 음건 후 분쇄하여 사용하였다.

#### 2.1.2 Ginkgetin과 isoginkgetin의 추출 전처리

음건한 은행잎 (*Ginkgo biloba* L.) 1.0 kg을 ethanol (20 L)로 상온에서 3회 반복 추출한 후 여과·농축하였다. Ethanol 추출물을 증류수 2 L에 현탁 시킨 후 각 2 L의 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol로 순차적 3회 반복 용매 분획을 실시하여 최종적으로 n-hexane 분획물 (35 g), ethyl acetate 분획물(28 g), n-butanol분획물(45 g)의 함유를 확인하였다.

Ethyl acetate 분획물(28 g)에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(70-230 mesh,  $\varnothing 12 \times 25$  cm,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100:1 \rightarrow 0:1$ )를 실시하여 6개의 1차 분획물로 나누었다 (Fr.1-Fr.6). 이 중 3번째 분획물인 Fr.3에 대하여 C-18 충진제를 사용한 역상 컬럼 크로마토그래피( $40-63 \mu\text{m}$ ,  $\varnothing 4 \times 50$  cm,  $\text{Methanol}/\text{H}_2\text{O} = 20:80 \rightarrow 80:20$ )를 실시하여 3개의 2차 분획을 진행하였다 (Fr.3-1-Fr.3-3). Fr.3-1에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피( $\varnothing 1.5 \times 50$

cm,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 70:30$ )를 실시하여 bilobetin을 분리하였고 Fr.3-3에 대해서도 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피( $\varnothing 1.5 \times 50$  cm,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 70:30$ )를 실시하여 최종적으로 amentoflavone을 분리하였다. 또한 5번째 분획물인 Fr.5(2.5 g)에 대하여 C-18 충진제를 사용한 역상 컬럼 크로마토그래피( $40-63 \mu\text{m}$ ,  $\varnothing 4 \times 50$  cm,  $\text{Methanol}/\text{H}_2\text{O} = 20:80 \rightarrow 80:20$ )를 실시하여 4개의 2차 분획을 진행하였다 (Fr.5-1-Fr.5-4). 이 중 Fr.5-1 (800 mg)에 대하여 C-18 컬럼 크로마토그래피( $40-63 \mu\text{m}$ ,  $\varnothing 2 \times 50$  cm,  $\text{Methanol}/\text{H}_2\text{O} = 40:60 \rightarrow 80:20$ )를 실시하여 2개의 3차 분획을 진행하였다 (Fr.5-1-1-Fr.5-1-2). Fr.5-1(200 mg)에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피( $\varnothing 1.5 \times 50$  cm,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 60:40$ )를 실시하여 ginkgetin을 분리하였다. Fr.5-1-2(350 mg)에 대해서도 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피( $\varnothing 1.5 \times 50$  cm,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 60:40$ )를 실시하여 isoginkgetin을 분리하였다.

Fr.5-3에 대하여 C-18 컬럼 크로마토그래피( $40-63 \mu\text{m}$ ,  $\varnothing 2 \times 50$  cm,  $\text{Methanol}/\text{H}_2\text{O} = 20:80 \rightarrow 60:40$ )를 실시하여 1개의 3차 분획을 진행하였다 (Fr.5-3). Fr.5-3에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피( $\varnothing 1.5 \times 50$  cm,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 60:40$ )를 실시하여 sciadopitysin을 분리하였다. Fig. 1

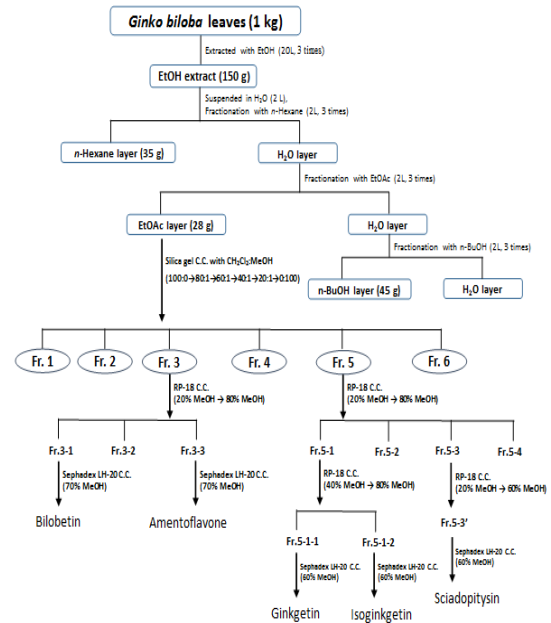


Fig. 1. Extraction and isolation of flavonoids from the leaves of *Ginkgo biloba*.

### 2.1.3 HPLC를 통한 순도 측정

추출 정제된 은행잎의 ginkgetin과 isoginkgetin의 순도 분석을 위해 Agilent 1200 series와, 분석용 컬럼 Luna C18 column (phenomenex, 250×4.6 mm, 5 μm)을 사용하여 HPLC 분석을 시행하였다.

### 2.1.4 MS spectrum을 통한 분자량 측정

물질의 구조를 정확히 규명하고 분자량을 확인하고자 Electron-Impact mass spectrophotometer (EI-MS) 스펙트럼을 이용해 측정하였다.

### 2.1.5 UV spectrum을 통한 흡수 극대 파장 측정

Ginkgetin과 isoginkgetin의 특징적인 분자 구조적 골격을 확인하기 위하여 UV spectrum을 이용해 최대 흡수 피크를 측정하였다.

### 2.1.6 Nuclear Magnetic Resonance을 통한 구조 동정

정확한 구조를 동정하기 위해 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 및 DEPT 스펙트럼 측정을 통해 분자 내 수소-탄소의 골격구조를 분석하였다.

치와 비교하여 ginkgetin (18 mg)과 isoginkgetin (23 mg)으로 결정하여 확보하였다. Fig. 2

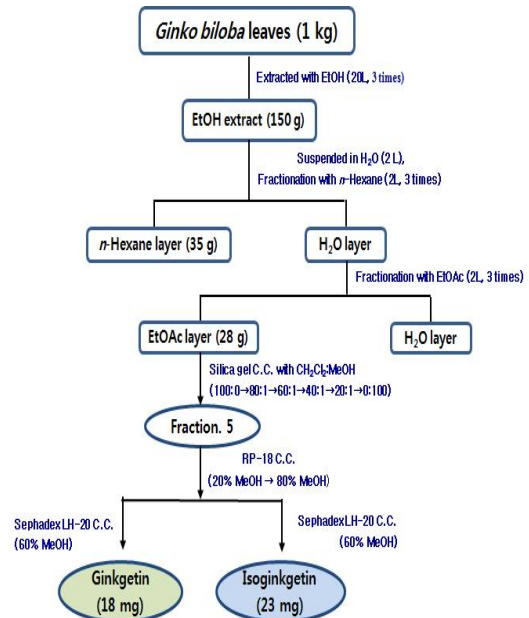


Fig. 2. Extraction and isolation of flavonoids from the leaves of *Ginkgo biloba*.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 재료 및 기기

#### 3.1.1 Ginkgetin과 isoginkgetin 추출

음건한 은행잎 1.0 kg을 상온에서 3회 반복 추출하여 얻은 ethanol 추출물에 대해 용매 분획을 실시하여 n-hexan 분획물(35 g), ethyl acetate 분획물(28 g)을 확보하였다. Ethyl acetate 분획물(28 g)에 대하여 6개의 1차 분획물을 확보하였고, 이 중 3번째 분획물에서 bilobetin과 amentoflavone을 분리하였으며, 5번째 분획물에서 또다시 4개의 2차 분획물을 확보하였다. 이 4개의 2차 분획물 중 Fr.5-3에서는 sciadopitysin을 분리하였고, Fr.5-1에서는 2개의 3차 분획물을 확보하여 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과 최종적으로 2 mole의 flavone 유도체가 B ring의 C-3'와 D ring의 C-8"가 직접 결합된 2종의 순수한 biflavonoid계 화합물을 확보하였다. 이 두 화합물들의 이화학적 성질 및 spectral data를 종합하고 이 data를 문헌

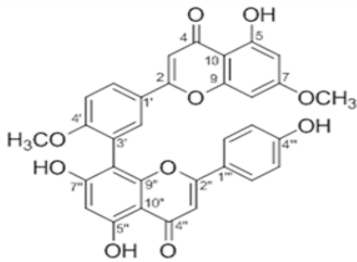
### 3.2 Ginkgetin과 isoginkgetin의 화학구조 분석

#### 3.2.1 Ginkgetin과 isoginkgetin의 물리화학적 특성

Ginkgetin과 isoginkgetin은 모두 2 mole의 flavone 유도체가 B ring의 C-3'와 D ring의 C-8"가 직접 결합되어 이중량체적 구조를 지닌 황색의 biflavonoid계 화합물이다.

두 화합물의 분자량은 566이며, 분자식은  $C_{32}H_{22}O_{10}$ 로 동일하고 270 nm와 330 nm 부근에서 UV 최대 흡수파장을 갖는다. 또한 두 화합물 내에 특징적인 관능기(functional group)로 수산기(OH)와 공유 카르보닐기(conjugated carbonyl)가 존재하며, flavonoid의 aromatic ring에 결합한 특징적인 proton을 갖고 있으며 2개의 메톡시(methoxy) 치환기들을 포함하여 총 32개의 탄소가 존재한다. Fig. 3

## A. ginkgetin



## B. isoginkgetin

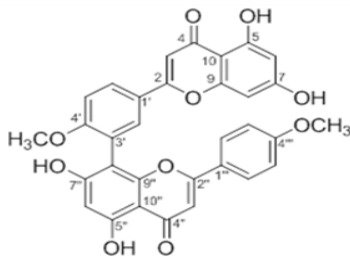


Fig. 3. The chemical structure of the compound.  
(A) ginkgetin, (B) isoginkgetin.

## 3.2.2 HPLC를 통한 순도 측정

HPLC 분석법은 유도체 과정을 거치지 않고 신속하게 직접 분석할 수 있어 순도 측정을 위해 많이 이용되고 있다.

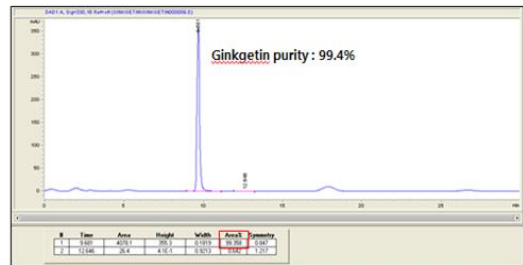
통상적으로 자외선 분광 흡광기, 음이온 교환 크로마토그래프, 가스크로마토그래프, 가스크로마토그래프-질량분석기, 고속액체크로마토그래프, 이온크로마토그래프 등의 분석법이 보고되어 있는데 이중 HPLC는 UV 260 nm에서 동시 분석이 가능하고, 타 분석법에 비해 방해 물질이 적고 범용적으로 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 추출 정제된 은행잎의 ginkgetin과 isoginkgetin의 순도 분석을 위해 Agilent 1200 series와, 분석용 컬럼 Luna C18 column (phenomenex, 250×4.6 mm, 5 μm)을 사용하여 HPLC 분석을 시행하였다. 이동상의 gradient 조건을 포함한 분석 조건은 아래의 Table 1과 같으며 HPLC 분석으로 두 시료의 순도를 측정하였다. 그 결과 각각 동일한 분석 조건에서 측정하여 ginkgetin은 순도 99.4%, isoginkgetin은 순도 100%로 나타나 두 화합물 모두 99% 이상의 고 순도로 확인되어 본 연구의 생리활성 측정에 사용하였다. Fig. 4

Table 1. HPLC analysis of the conditions of ginkgetin and isoginkgetin.

Operation conditions	
HPLC system	Agilent 1200 series
Detector	UV 270 nm
Column	Luna C18 (Phenomenex, 250×4.6 mm, 5μm)
Column oven	40 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	5 μL
Mobile phase	55% Acetonitrile in H <sub>2</sub> O

## A. ginkgetin



## B. isoginkgetin

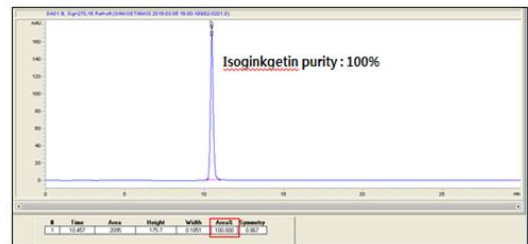


Fig. 4. Purity analysis of HPLC chromatogram of compound. (A) ginkgetin, (B) isoginkgetin.

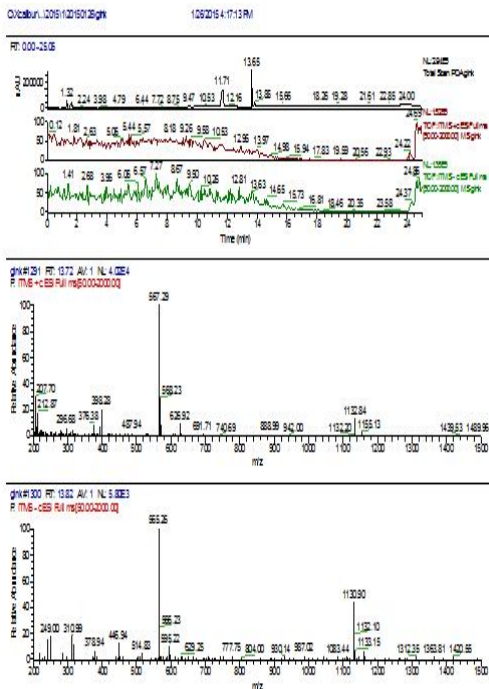
## 3.2.3 MS spectrum을 통한 분자량 측정

물질의 구조를 정확히 규명하기 위한 질량 분석(MS)법은 유기 분자의 분자식과 분자량을 알아내기 위한 중요한 분광법이다. 질량 분석 분광기(mass spectrometer)는 고진공 상태에서 기체 상태의 분석시료에 높은 에너지의 전자빔이나, 레이저 또는 기체를 충돌시켜 분석하고자 하는 시료를 이온화시켜 전하를 띤 시료를 만든 후 분자의 질량을 알아낸다. 이때 시료를 이온화 시키는데 사용되는 전자빔의 에너지는 대략 70 eV (1600kcal) 정도 된다. 질량 분석장치는 대부분 이온화법을 사용하는데 기체상 이온화법이 가장 일반적이고, 시료를 이온화 시

키는 방법은 5가지로 분류된다. 전자 충격 이온화 (electron impact, EI), 화학적 이온화(chemical ionization, CI), 고속 원자 충돌 이온화(Fast Atom Bombardment Ionization, FAB), 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화 (matrix assisted laser desorption, MALDI) 및 전기 분무 이온화 (electrospray ionization, ESI)가 이용된다. 이 중 ESI는 1984년에 Fenn(미국 예일 대학의 명예교수, ESI 질량 분석법을 개발한 공로로 2002년 노벨 화학상 공동 수상) 등에 의해 개발된 이온화법으로 고전압이 걸린 미세 관에 시료를 통과시켜 선단부터 대기압에 노출시키는 방법이다.

Ginkgetin과 isoginkgetin의 분자량을 확인하고자 Electron-Impact mass spectrophotometer (EI-MS) 스펙트럼을 이용해 측정하였다. 그 결과, Ginkgetin은 EI-MS 스펙트럼 통해 관찰된  $[M + H]^+$ 의 567에서의 peak 와  $[M - H]^-$ 의 565에서의 peak로부터 566의 분자량을 갖는 화합물임을 확인하였다. Isoginkgetin 역시 EI-MS 스펙트럼 통해  $[M + H]^+$ 와  $[M - H]^-$ 에서 ginkgetin과 동일한 mass peak가 관측됨으로써 ginkgetin과 isoginkgetin이 같은 분자량을 갖는 이성질 체임을 확인하였다. Fig. 5

#### A. ginkgetin



#### B. isoginkgetin

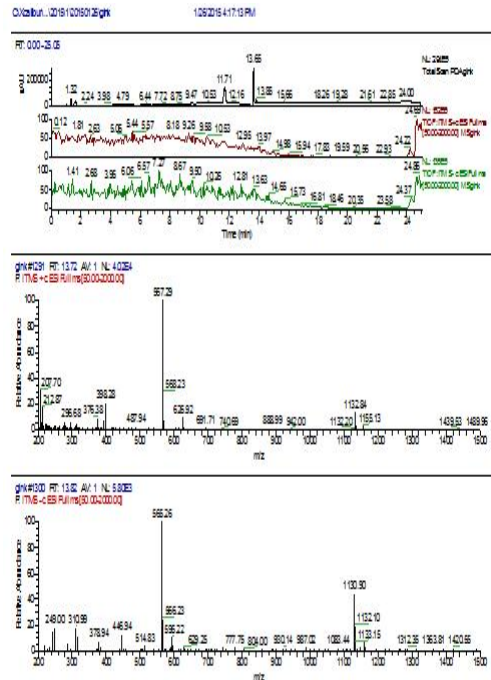


Fig. 5. EI-MS spectrum of the compound.  
(A) ginkgetin, (B) isoginkgetin.

3.2.4 UV spectrum을 통한 흡수 극대 파장 측정 자외선 영역 (약 200-400 nm)은 빛 에너지 흡수 시, 전자가 기저상태에서 여기상태로 변화되므로 구조 중 여기상태로 되기 쉬운  $\pi$  전자나 n 전자들이 존재하는 경우 (chromophore를 가진 경우) 특징적인 UV 흡수 곡선을 나타낸다. 유기화합물에 있어서의 치환 또는 구조 변화는 흡수대의 파장 및 흡수강도에 변화를 가져온다. UV spectrum의 효과는 흡수극대 파장이 장파장 쪽으로 이동하는 적색이동의 심색효과 (bathochromic effect, red shift)와 단파장 쪽으로 이동하는 청색이동의 천색효과 (hypsochromic effect, blue shift)가 있다. 또한 파장의 변화 없이 흡수 강도만 증가하는 것은 농색효과의 흡광 증가 효과(Hyperchromic effect) 및, 흡수 강도만 감소하는 담색효과의 흡광 감소 효과 (Hypochromic effect)로 분류된다.

Ginkgetin과 isoginkgetin의 특징적인 분자 구조적 골격을 확인하기 위하여 UV spectrum을 이용해 최대 흡수 피크를 측정하였다. Fig. 6



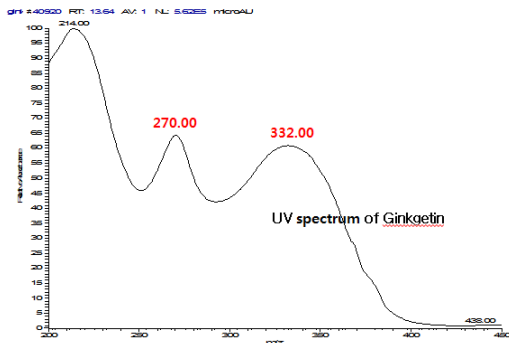


Fig. 6. UV spectrum of compound.

Flavonoid 화합물은 UV spectrum으로 측정 시, 270 nm와 330 nm 부근에서 특징적인 UV 최대 흡수 파장을 갖는다. Ginkgetin과 isoginkgetin 모두 UV 스펙트럼 측정 시 270 nm와 330 nm 부근에서 최대 흡수파장을 나타내므로, 두 화합물 모두 flavonoid 화합물의 골격을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.2.5 Nuclear Magnetic Resonance을 통한 구조 동정

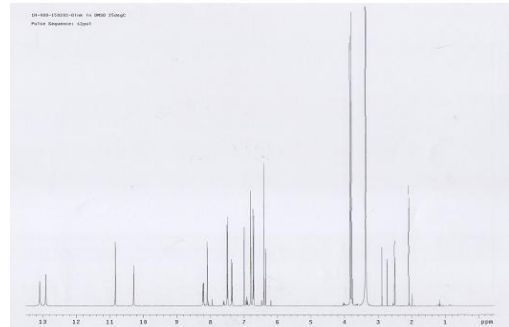
Nuclear Magnetic Resonance (NMR)은 핵자기 공명 분광법으로 흡수하는 에너지 영역은 다르지만, 또 하나의 흡수 분광법(absorption spectrometry)으로 유기화합물의 구조를 결정하는 데에 필수 불가결한 방법이다. 알맞은 조건의 자기장(magnetic field) 가운데에 분자를 두고, 라디오파(radio frequency, rf) 영역의 전자기파를 쬐어주면, 시료는 분자 내에 존재하는 원자핵(nuclei)의 자기적인 성질로 인해 라디오파를 흡수하게 된다. NMR 스펙트럼은 이 양성자의 흡수피크(absorption peak)의 주파수(frequency)와 피크강도(peak intensity)를 그림으로 나타내며, 복잡한 천연물 및 기타 유기화합물의 구조를 결정하기 위해 이용된다. 일반적으로 양성자 NMR과 탄소 NMR이 널리 쓰이며  $^1\text{H}$  NMR(양성자 NMR)은 분자 내에 존재하는 양성자의 종류와 수 및, 이들의 대략적인 연결방식을 알아내는 데 주로 사용된다. 또한,  $^{13}\text{C}$  NMR(탄소 NMR)은 분자 내에 존재하는 탄소의 종류와 수 및, 연결방식을 알아내는 데 사용된다.

은행잎에서 분리한 ginkgetin Fig. 7과 isoginkgetin (Fig. 8)의 정확한 구조를 동정하기 위해  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR 및 DEPT 스펙트럼 측정을 통해 분자 내 수소-탄소의 골격구조를 분석하였다. 두 개의 화합물 모두

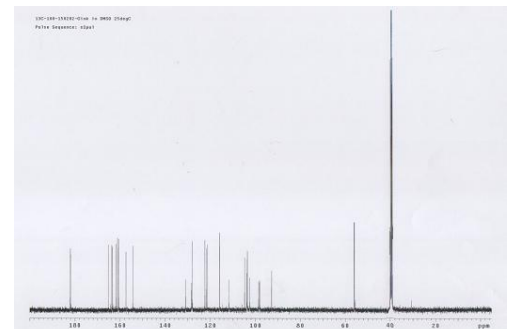
$^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 관찰되는 6~8 ppm 사이의 다수의 aromatic proton 피크들로부터 flavonoid 화합물의 특징적인 aromatic proton의 존재를 확인하였다. Flavonoid 화합물의 기본 탄소 수가 15개이며, flavonoid 두 단위가 결합한 biflavonoid의 기본 탄소의 수는 30개이다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에서 두 화합물 모두 각 32의 탄소가 확인되었으므로, ginkgetin과 isoginkgetin이 biflavonoid 골격을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 2개의 추가적인 탄소는 biflavonoid에 결합한 치환기들로서, 2개의 methoxy기가 biflavonoid에 추가로 결합되어 있음을 확인하였다. DEPT 스펙트럼을 통해  $^{13}\text{C}$ -NMR에서 관찰된 32개의 탄소들의 1차 ( $\text{CH}_3$ ), 2차 ( $\text{CH}_2$ ), 3차 ( $\text{CH}$ ), 4차 ( $\text{C}$ ) 탄소의 정확한 구성비를 확인할 수 있었다.

이상의 데이터를 보고된 문헌과 비교했을 때, 두 화합물은 문헌에 보고된 ginkgetin (Table 2)과 isoginkgetin (Table 3)의 정보와 정확히 일치함을 확인하였다.

#### A. ginkgetin $^1\text{H}$ -NMR data.



#### B. ginkgetin $^{13}\text{C}$ -NMR data.



C. ginkgetin DEPT data.

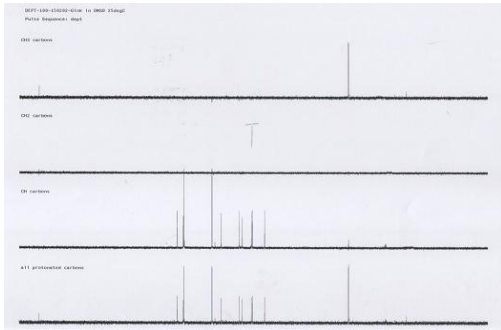
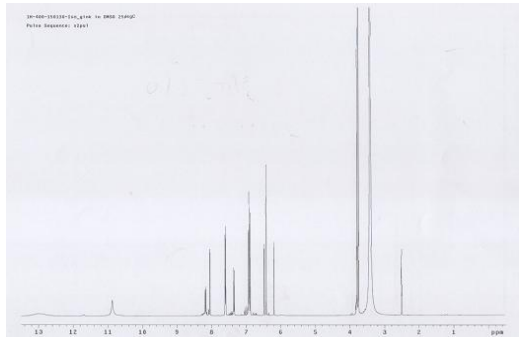


Fig. 7. NMR data of ginkgetin. (A)  $^1\text{H}$ -NMR, (B)  $^{13}\text{C}$ -NMR, (C) DEPT spectra.

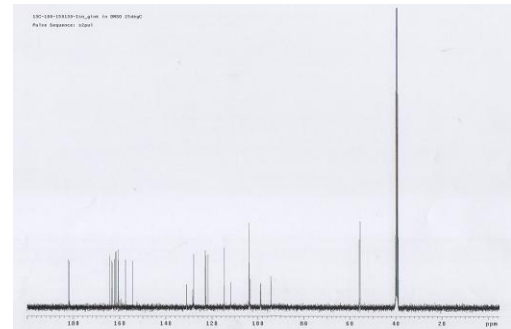
Table 2. H (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data for ginkgetin (in DMSO- $d_6$ ).

Carbon	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$
2		163.5
3	6.79 s	103.6
4		181.9
5		161.7
6	6.36 d (2,2)	98.1
7		165.2
8	6.80 s	92.7
9		157.3
10		104.7
1'		122.3
2'	8.10 d (2,2)	128.3
3'		121.6
4'		160.6
5'	7.36 d (8,8)	111.7
6'	8.22 dd (2,2, 8,8)	130.9
2''		163.6
3''	7.00 s	102.5
4''		182.0
5''		160.5
6''	6.41 s	98.6
7''		161.1
8''		103.8
9''		154.3
10''		103.5
1'''		121.2
2'''	7.50 d (8,8)	128.0
3'''	6.72 d (8,8)	115.8
4'''		161.0
5'''	6.72 d (8,8)	115.8
6'''	7.50 d (8,8)	128.0
7-OCH <sub>3</sub>	3.79 s	56.0
4'-OCH <sub>3</sub>	3.82 s	55.9

A. isoginkgetin  $^1\text{H}$ -NMR



B. isoginkgetin  $^{13}\text{C}$ -NMR



C. isoginkgetin DEPT data

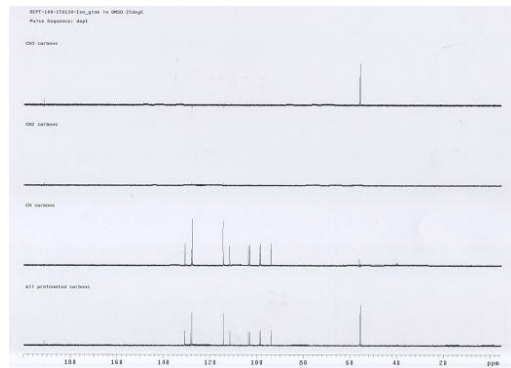


Fig. 8. NMR data of isoginkgetin. (A)  $^1\text{H}$ -NMR, (B)  $^{13}\text{C}$ -NMR, (C) DEPT spectra.

Table 3.  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) data for isoginkgetin (in  $\text{DMSO}-d_6$ ).

Carbon	$^1\text{H}$ $\delta$ in Hz	$^{13}\text{C}$
2		163.4
3	6.91 s	103.7
4		181.8
5		161.8
6	6.20 d (2.2)	98.7
7		163.1
8	6.48 d (2.2)	94.1
9		157.4
10		103.7
1'		122.5
2'	8.04 d (2.2)	128.2
3'		121.6
4'		160.6
5'	7.35 d (8.8)	111.7
6'	8.18 dd (2.2, 8.8)	130.9
2''		164.2
3''	6.88 s	103.2
4''		182.1
5''		160.4
6''	6.42 s	98.9
7''		161.4
8''		103.8
9''		154.4
10''		103.6
1'''		122.8
2'''	7.60 d (8.8)	127.8
3'''	6.93 d (8.8)	114.5
4'''		162.2
5'''	6.93 d (8.8)	114.5
6'''	7.60 d (8.8)	127.8
4'-OCH <sub>3</sub>	3.75 s	55.5
4'''-OCH <sub>3</sub>	3.78 s	55.9

기기 분석을 통해 얻은 데이터들을 아래와 같이 종합하여 문헌에 보고된 ginkgetin과 isoginkgetin을 비교했을 때, 그 정보가 정확히 일치하였으므로 최종적으로 두 화합물을 ginkgetin과 isoginkgetin으로 동정하였다.

Ginkgetin : Yellow powder; Mp 230~233 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ) in MeOH, 270 (4.59), 332 (4.56); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ , 3100~3400 (OH), 1664 (conjugated C=O), 1446 (C=C); ESI-MS  $m/z$ , 567.29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 565.26  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calc. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ , 566.5110).

Isoginkgetin : Yellow powder; Mp 209~210 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ) in MeOH; 270 (4.59), 332 (4.49); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ , 3100~3400 (OH), 1664 (conjugated C=O); ESI-MS  $m/z$ , 567.29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 565.26  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calc. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ , 566.5110).

#### 4. 결 론

은행잎 추출물의 다양한 약리학적 효능을 나타내는 Biflavonoid의 단일 물질인 ginkgetin과 isoginkgetin을 분리하여 두 화합물의 화학 구조 및 물리화학적 특성을 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 두 화합물의 분자량은 566이며, 분자식은  $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ 로 동일하고 270 nm와 330 nm 부근에서 UV 최대 흡수 파장을 갖는다. 또한 두 화합물 내에 특징적인 관능기 (functional group)로 수산기(OH)와 공유 카르보닐기 (conjugated carbonyl)가 존재하며, flavonoid의 aromatic ring에 결합한 특징적인 proton을 갖고 있으며 2개의 메톡시(methoxy) 치환기들을 포함하여 총 32개의 탄소가 존재한다.
2. HPLC를 통한 순도 측정 결과 각각 동일한 분석 조건에서 측정하여 ginkgetin은 순도 99.4%, isoginkgetin은 순도 100%로 나타나 두 화합물 모두 99% 이상의 고 순도로 확인되었다.
3. MS spectrum을 통한 분자량 측정에서 Ginkgetin은 EI-MS 스펙트럼 통해 관찰된  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 의 567에서의 peak 와  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 의 565에서의 peak로부터 566의 분자량을 갖는 화합물임을 확인하였다. Isoginkgetin 역시 EI-MS 스펙트럼 통해  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 와  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 에서 ginkgetin과 동일한 mass peak가 관측됨으로써 ginkgetin과 isoginkgetin이 같은 분자량을 갖는 이성질체임을 확인하였다.
4. UV spectrum을 통한 흡수 극대 파장 측정 시 270 nm와 330 nm 부근에서 특징적인 UV 최대 흡수 파장을 갖는다. Ginkgetin과 isoginkgetin 모두 UV 스펙트럼 측정 시 270 nm와 330 nm 부근에서 최대 흡수파장을 나타내므로, 두 화합물 모두 flavonoid 화합물의 골격을 가지는 것을 확인할 수 있었다.
5. Nuclear Magnetic Resonance을 통한 구조 동정을 시행한 결과 두 개의 화합물 모두  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에



서 관찰되는 6~8 ppm 사이의 다수의 aromatic proton 피크들로부터 flavonoid 화합물의 특징적인 aromatic proton의 존재를 확인하였다. Flavonoid 화합물의 기본 탄소 수가 15개이며, flavonoid 두 단위가 결합한 biflavonoid의 기본 탄소의 수는 30개이다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 두 화합물 모두 각 32의 탄소가 확인되었으므로, ginkgetin과 isoginkgetin이 biflavonoid 골격을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 2개의 추가적인 탄소는 biflavonoid에 결합한 치환기들로서, 2개의 methoxy기가 biflavonoid에 추가로 결합되어 있음을 확인하였다. DEPT 스펙트럼을 통해 <sup>13</sup>C-NMR에서 관찰된 32개의 탄소들의 1차 (CH<sub>3</sub>), 2차 (CH<sub>2</sub>), 3차 (CH), 4차 (C) 탄소의 정확한 구성비를 확인할 수 있었다.

이상의 데이터를 보고된 문헌과 비교했을 때, 두 화합물은 문헌에 보고된 ginkgetin 과 isoginkgetin 의 정보와 정확히 일치함을 확인하였다.

## REFERENCES

- [1] S. J. Nam, K. U. Kim, D. H. Shin, & S. J. Hwang. (1997). Identification of biologically active substances from *Ginkgo biloba* L. *Kor J, Weed Sci*, 17(4), 421-430.
- [2] Tang, C., X. Wei, & Y. Chunhua. (2003). Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33, 811-817. DOI : 10.1016/s0731-7085(03)00309-1
- [3] Deng, F. & S. W. Zito. (2003). Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of maker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations. *J. Chromatography A*. 986, 121-127. DOI : 10.1016/j.phytochem.2004.08.026
- [4] Jaracz, S., S. Malik, & K. Nakanishi. (2004). Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from *G. biloba* extracts. *Phytochemistry* 65, 2897-2902. DOI : 10.1016/j.phytochem.2004.08.026
- [5] Lee, W. K., Y. W. Ryu, S. Y. Byun, & H. G. Chun. (1993). Effect of nutrients and culture conditions on the cell growth and the flavonol glycosides production in cell culture of *Ginkgo biloba*. *korean J. Biotechnol. Bioeng.* 8, 55-61.
- [6] Goh, L. M. L. & P. J. Barlow. (2004). Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process. *Food Chemistry* 86, 195-202. DOI : 10.1016/j.foodchem.2003.08.035
- [7] Park, Y. G., S. J. Kim, H. Y. Jung., Y. M. Kang, D. T. Prasad., S. W. Kim, & M. S. Choi. (2004). Variation of Ginkgolides and Bilobalide Contents in leaves and cell cultures of *Ginkgo biloba* L. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 9, 35-40. DOI : 10.1007/bf02949319
- [8] J. W. Kim, J. S. Moon & T. B. Choe. (2014). Comparison of Antioxidant Activity of Kenaf Extract & its Flavonoids. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, 12(2), 203-210. DOI : 10.1016/j.foodchem.2015.06.006
- [9] J. S. Lee, M. H. Lee, C. I. Park, H. J. Lee, H. D. Hong, B. D. Lee, I. J. Sung, K. J. Chang & C. H. Park. (2016). The Content of Total Polyphenol, Total Flavonoid & the Antioxidant Activity in Different Origin and Parts of *Moringa olerifera* Cultivated in Cheorwon. *Journal of the Korean Society of International Agricultue*. 28(3), 385-389. DOI : 10.12719/ksia.2016.28.3.385
- [10] B. S Pak, S. H. Han, J. Y. Lee & Y. S Chung. (2016). Evaluation of in vivo Genotoxicity of Plant Flavonoids, Quercetin and Isoquercetin. *J. Food Hyg. Saf.* 31(5), 356-364. DOI : 10.13103/jfhs.2016.31.5.356
- [11] L. L. Wang, Kwang Soo Roh. (2013). Study of Total Polyphenol Content, Total Flavonoid Content, and ABTS<sup>+</sup> and DPPH Radical Scavenging Activity of Almond. *Korean Journal of Plant Resources*. 2013(10).
- [12] S. B. Ko. (2014). A Study on the Technology Evaluation of Development of Separation and Purification Techniques of Flavonoid in Citrus. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*. 15(1), 243-248. DOI : 10.5762/kais.2014.15.1.243
- [13] Kubota Y 1, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. (2006). Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol*. 58(2) : 243-9. DOI : 10.1211/jpp.58.2.0012

- [14] Zhi Y., Pan J, Shen W, He P, Zheng J. , Zhou X., Lu G, Chen Z. & Zhou Z. 243-9. (2016). Ginkgolide B Inhibits Human Bladder Cancer Cell Migration and Invasion Through MicroRNA-223-3p. *Cell Physiol Biochem*, 39 : 1787-1794.  
DOI : 10.1159/000447878
- [15] H. Y. Kwon, K. J. Chung & K. J. Cheong. (2015). Suppressive effects of Th2 cytokines expression and the signal transduction mechanism in MC/9 mast cells by flavonol derived from Ginkgo biloba leaves. *Journal of Digital Convergence*. 13(8), 503-514.  
DOI : 10.14400/jdc.2015.13.8.503
- [16] Vivek K. Bajpai, Ajay Sharma, Kwang-Hyun Baek. (2015). Antibacterial mode of action of Ginkgo biloba leaf essential oil: Effect on morphology and membrane permeability. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(2).  
DOI : 10.3329/bjp.v10i2.22546
- [17] Y. W. Lee, C. Y. Choi, J. H. Bae & J. M. Kim. (2014). The Effect of Anthocyanoside and Ginkgo Biloba Extract on Normal-Tension Glaucoma According to Presence of Diabetes. *Ophthalmological Society*, 55(8), 1174~1179.  
DOI : 10.3341/jkos.2014.55.8.1174
- [18] S. Y. Jang, S. M. Gangk & J. R. Yeom. (1993). Abstracts of the 23rd Annual Convention HPLC Quantitative determination and Seasonal variations of Biflavones Content from Ginkgo biloba Leaves. *Natural Product Sciences*, 24(1).

민 경 남(Min, Kyung Nam)

[정회원]



- 2010년 2월 : 가천대학교 경영학과 (경영학석사)
- 2015년 8월 : 건국대학교 생물공학과 (이학박사)
- 2016년 11월 ~ 현재 : 미즈코리아 (주) 연구소장

- 관심분야 : 바이오, 화장품, 신소재
- E-Mail : mkn0793@hanmail.net