

효소처리에 의한 은행잎 중 활성성분 추출에 관한 연구(I).

김보영* · 이창걸 · 황완균 · 허재두

광동제약(주) · 중앙연구소

Studies on the Extraction of Active Components in *Ginkgo biloba* Leaves by Enzyme Treatments (I).

Bo Young Kim, Chang Gurl Lee, Wan Kyunn Whang and Jae Doo Huh

Central Research Institute, Kwang Dong Pharmaceutical Co. Ltd., Seoul, 152-053, Korea

Abstract—An attempt was made to increase the yield of extraction of ginkgoflavonglycosides from leaves of *Ginkgo biloba* by treatments of with Cellulase C and macerating enzymes. The yield of dried extract and its contents of ginkgoflavonols, when treated only with cellulase C, were analyzed to be 1.99% and 0.38%, respectively. The contents of ginkgoflavonglycosides in the dried extracts were calculated to be 25.28%. By the treatment with a mixture of three enzymes, cellulase C: cellulase NC and macerosin (1:1:2), the yield of the dried extract, ginkgoflavonols as well as their glycoside were determined to be 2.48%, 0.48% and 24.16%, respectively.

Keywords—*Ginkgo biloba* · ginkgoflavonols · ginkgoflavonglycosides · cellulase C · cellulase NC · macerosin

은행나무 *Ginkgo biloba* Linné(Ginkgoaceae)는 극동 아시아 地方이 原産地인 多年生 喬木으로¹⁾ 우리나라에는 거의 全國에 自生하고 있는 植物이다.

이것의 잎에는 脂肪族 alcohol類 및 ketone類, ginkgolide類, flavonoid類가 含有되어 있으며, flavonoid類로는 calocatechin, epicalocatechin, flavonglycoside, biflavone이 含有되어 있다.²⁻⁶⁾ 은행 잎에는 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 等種類의 flavonol이 glycoside 形態로 存在하고 있으며,^{5,7,8,9)}이 ginkgoflavonglycoside는 心臟과 血管에 作用하여 血壓降下, 血流增加 및 平滑筋에 대한 鎮座作用 등 末梢動脈 血行障害에 대해 改善效果가 있어¹⁰⁻¹⁶⁾ 이미 여러 會社에서 商品化가 되어 있다.

한편 1965年 小川 等은 各種細胞分解酵素를

使用한 植物 細胞壁 分解性에 대하여 報告하였고¹⁷⁾, 外山 等은 1962년에 紅藻類의 enzyme 處理에 의한 agar-agar 生産法을¹⁸⁾, 1965년에 野茶나 果實에의 細胞分解酵素의 應用을 報告하였으며,¹⁹⁾ 1966년에 細胞分解酵素에 의한 綠茶成分의 抽出에 대하여 報告하였다.²⁰⁾

잎은 주로 纖維素로 構成되어 있으므로 이들은 植物細胞分解酵素에 의해 分解될 수 있다.

著者等은 여기에 着眼하여 은행잎의 有効成分인 ginkgoflavonglycoside 抽出에 있어 植物細胞分解酵素를 使用함으로써 收率의 増大를 볼 수 있었기에 이에 報告하는 바이다.

實 驗

實驗材料 및 試藥

1988년 8월경 경기도 수원 소재 서울대학교 농과대학 임업시험장에서 채취한 녹색의 은행잎을 음건후, 조말로 하여 실험에 사용하였다.

Enzyme은 Kyowa Chemical Co.로부터 제공받은 cellulase[®] C (1,500 μ /g), cellulase[®] NC(2,000 μ /g) 및 macerosin[®] (4,000 μ /g)을 사용하였으며, amberlite[®] XAD-2는 Sigma Co. 것을 사용하였다. High performance liquid chromatography (이하 HPLC)에 사용된 용매는 모두 HPLC용을 사용하였으며, 그 외 시약은 일급시약을 사용하였다.

實驗機器

본 실험에 사용한 HPLC는 Shimadzu LC-6A로서 그 분석조건은 Table I에 표시하였다.

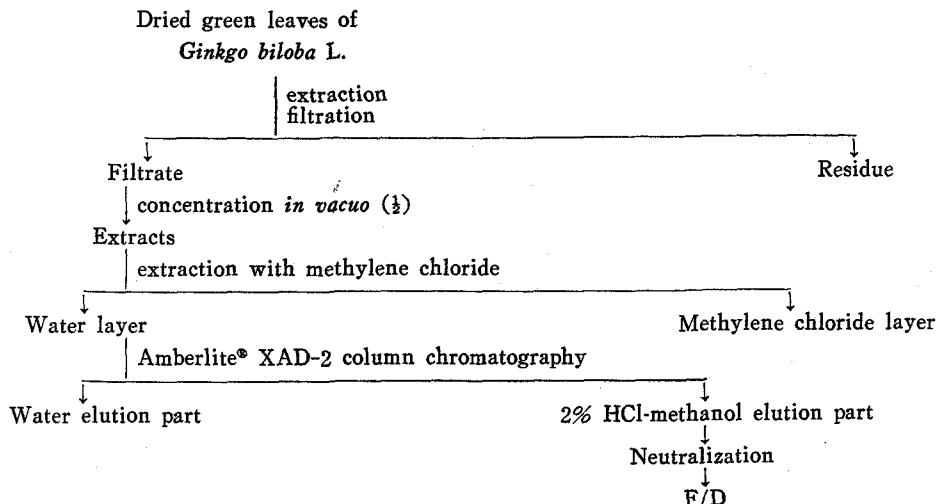
Table I. Instruments and conditions of HPLC

Instrument	; Shimadzu LC-6A
Column	; Shim-pack CLC-ODS(6.0 mm ϕ ×15 cm)
Mobile phase	; Methanol : H ₂ O : HAc(52 : 48 : 2.4)
Flow rate	; 1.5 ml/min
Sensitivity	; 0.16 AUFS at 365 nm
Chart speed	; 3.5 mm/min

實驗方法

1) 열수추출에 의한 sample의 조제

시료 100 g에 정제수 1 l를 가하여 100°에서 4시간 열수추출한 후, 여과한 여액을 Scheme 1의 방법으로 처리하여 Sample 1을 조제하였다.



Scheme 1. The preparation of samples.

2) 50% Ethanol 추출에 의한 sample의 조제
시료 100 g에 50% ethanol용액 1 l를 가하여 90°에서 4시간 추출한 후, 여과한 여액을 Scheme 1의 방법으로 처리하여 Sample II를 조제하였다.

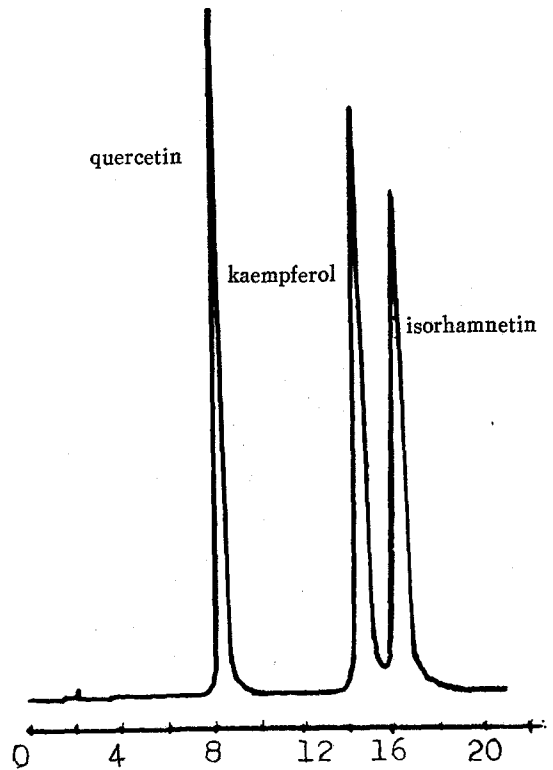


Fig. 1. HPLC chromatogram of standards.

3) Enzyme 추출에 의한 sample의 조제

시료 각 100 g씩을 cellulase® C 단독으로, cellulase® C와 cellulase® NC를, 그리고 cellulase® C, cellulase® NC 및 macerosin®을 복합사용하여 정제수 1 l를 가하여 40°에서 계속 교반하면서 2시간 추출하였다. 이 세 추출액을 90°에서 30초간 가열하여 불활성화시킨 후, Scheme 1의 방법으로 처리하여 Sample III, IV 및 V를 조제하였다.

4) HPLC에 의한 분석

각 Sample을 1.5 N-HCl로 가수분해하여 비배당체인 flavonol의 형태로 함량시험을 실시하

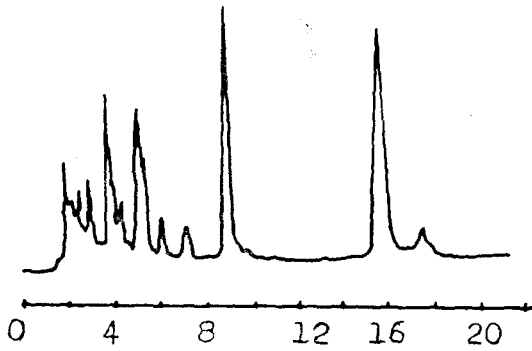


Fig. 2. HPLC chromatogram of sample I.

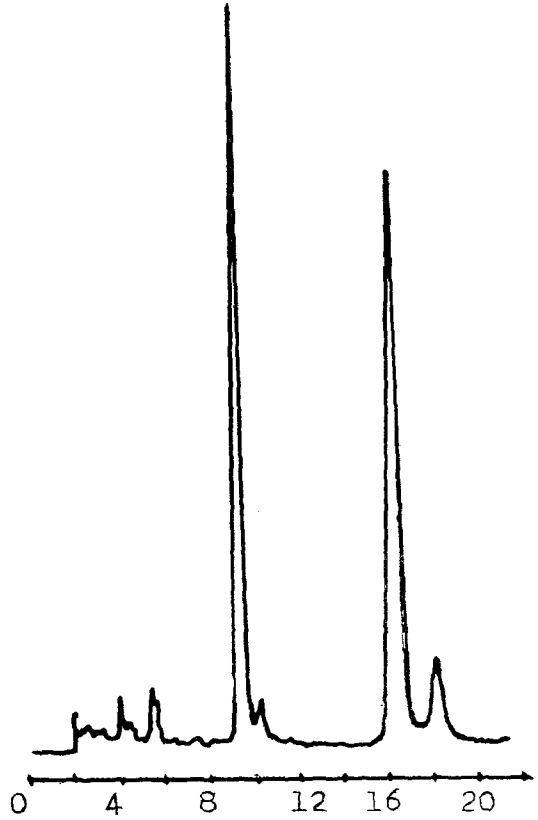


Fig. 4. HPLC chromatogram of sample III.

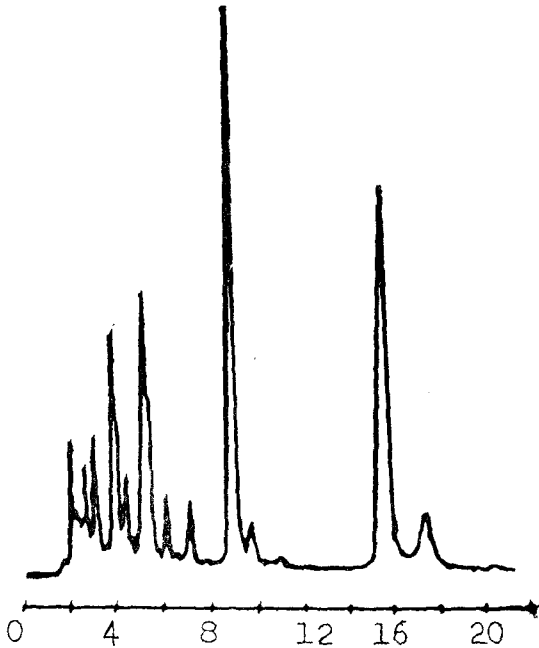


Fig. 3. HPLC chromatogram of sample II.

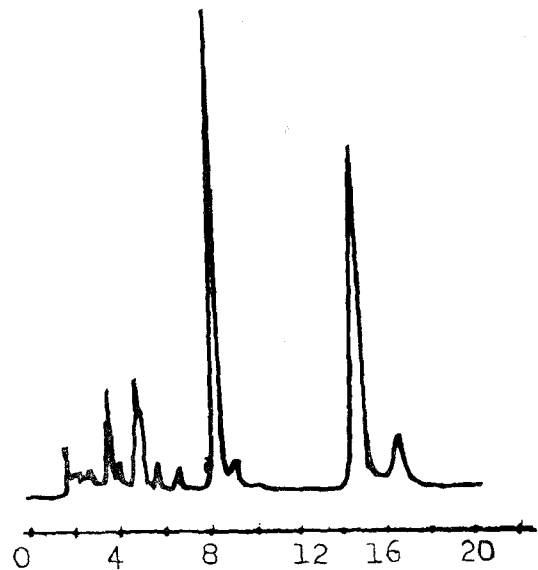


Fig. 5. HPLC chromatogram of sample IV.

Table II. Yield of dried extracts and contents of ginkgoflavonol and ginkgoflavonglycoside

Sample No.	Yield of dried extract (%)	Ginkgoflavonol*(%)		Ginkgoflavonglycoside**(%)	
		Whole plant	Dried extract	Whole plant	Dried extract
I	1.92	0.10	0.20	0.26	13.44
II	2.03	0.14	0.28	0.35	18.87
III	1.99	0.20	0.38	0.50	25.28
IV	1.67	0.14	0.23	0.36	21.20
V	2.48	0.19	0.46	0.48	24.16

* Contents of ginkgoflavonol; sum of contents of kaempferol, isorhamnetin and quercetin.

** Calculated values from equations of $\frac{\text{molecular weight of ginkgoflavonglycoside}}{\text{molecular weight of ginkgoflavonol}} \times \text{contents of ginkgoflavonol in } 1\text{g} \times 100$

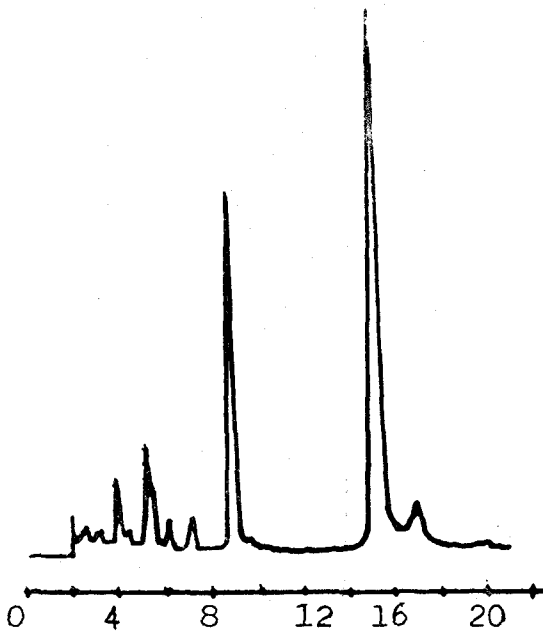


Fig. 6. HPLC chromatogram of sample V.

였으며, quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 standard로 하였다. 전형적인 표준물질의 HPLC chromatogram은 Fig. 1과 같으며 그 t_R 은 8.39 min(quercetin), 14.55 min(kaempferol) 및 16.23 min(isorhamnetin)이었다. Sample I~V의 chromatogram은 Fig. 2~6와 같다.

實驗結果 및 考察

Table II에서 보는바와 같이 각 Sample의 수

율은 Sample V가 2.48%로 가장 높았으며, Sample II, III의 순으로 나타났다. 또한 은행잎 중의 flavonol 함량은 Sample III가 0.20%로 가장 높았고 Sample V, Sample II와 IV의 순으로 나타났으며, 그 건조 엑기스 중의 flavonol 함량은 Sample V, III, IV의 순으로 나타났다. 은행잎 중의 ginkgoflavonols의 함량으로 부터 계산된 유효성분인 ginkgoflavonglycoside 함량은 Sample III, V, IV의 순으로 나타났으며, 그 건조 엑기스 중의 ginkgoflavonglycoside 함량은 Sample III가 25.28%로 가장 높았고, Sample V는 24.16%, Sample IV는 21.20%로 나타났다. 그러므로 enzyme를 사용하여 추출하는 경우 cellulase® C만을 단독으로 사용한 Sample III에서 가장 좋은 효율을 볼 수 있었으며, cellulase® C, cellulase® NC 및 macerosin®을 복합 사용한 Sample V의 경우 ginkgoflavonglycoside 함량은 Sample III보다 다소 낮으나, 건조엑기스 수율면에서는 Sample III보다 높았으므로 Sample V도 좋은 추출 방법이라 생각된다. 이러한 결과는 cellulase 등의 효소가 식물세포조직을 유연하게 하여 단세포화하고, 또 세포벽을 붕괴시킴으로써 세포내 유효성분의 추출을 돕기 때문이라 사료된다.

結 論

Cellulase 등의 효소를 사용하여 은행잎의 조직을 유연하게 하고 붕괴시킴으로써 유효성분인 ginkgoflavonglycoside의 효과적인 추출을 시도하

였다.

그 결과, cellulase® C를 단독처리한 Sample III의 경우 건조 extract의 yield는 1.99%, ginkgoflavonglycoside 함량은 25.28%였으며, 여러 enzyme을 복합 사용한 Sample V의 경우는 각각 2.48%, 24.16%였다.

이상의 결과로부터 enzyme 추출은 다른 추출 방법보다 건조 엑기스 수율 및 그 유효성분의 함량이 높은 것으로 나타났다.

〈1989년 1월 13일 접수 : 2월 28일 수리〉

文 獻

1. 小學館編：中藥大辭典，上海科學技術出版社，4199，(1965).
2. Okabe, K., Yamada, K., Yamamura, S. and Tanaka, S.: *J. Chem. Soc. (London)*, 2201, (1963).
3. Weinges, K., Kaltenhäuser, W., Marx, H.D., Nader, F., Perner, J. and Seiler, D.: *Liebigs Ann. Chem.* 711, 184 (1968).
4. Kariyone, T.: *J. Pharm. Soc. Japan*, 80, 1488 (1985).
5. 渡邊力夫：特許 昭 62-25543 (1987).
6. Willmar Schwabe Co.: 特許 昭 46-28091 (1971).
7. 松本武：特許 昭 62-292794 (1987).
8. Geiger, H. & Beckman, S.: *Zeitschrift für Naturforschung* 20b, 1139 (1963).
9. Fisel, J.: *Naturwissenschaften* 52, 592 (1963).
10. Birkmayer, W., Danielczyk, W. and Zita, G. *Med. Klinik.* 421 (1967).
11. Hemmer, R., and Trayellas, O.: *Arzneim-Forsch.* 17, 27 (1967).
12. Krammer, F.: *Med. Welt*, 1524 (1966).
13. Muth, H.: *Dtsch. Med. Z.* 370 (1967).
14. Mußnug, G. and Allemann, J.: *Landarzt*, 42, 1156 (1966).
15. Peter, H., Fisel, J. and Weisser, W.: *Arzneim Forsch.* 16, 719 (1966).
16. The George, F. Strickley Company, U.S.A. *Natural Product Medicine* 309 (1988).
17. 小川喜入郎, 外出信男：酵工, 43, 661 (1965).
18. 外山信男：酵工, 40, 199 (1962).
19. 外山信男：酵工, 43, 683 (1965).
20. 外山信男, 大渡久行：酵工, 44, 830 (1966).