

## 노란은행잎의 성분분석

강삼식 · 고영민\* · 김주선 · 이명환\* · 이동선\*  
서울대학교 천연물과학연구소, 서울여자대학교 자연과학대학\*

### Phytochemical Analysis of *Ginkgo biloba* Yellow Leaves

Sam Sik Kang, Young-Min Koh\*, Ju Sun Kim, Myung Whan Lee\*  
and Dong Sun Lee\*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460 and  
\*College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

**Abstract**—6-Hydroxykynurenic acid and ginkgolide B together with flavonol glycosides and biflavonoids were isolated from the yellow leaves of *Ginkgo biloba* and identified by means of spectroscopic methods. The correctness of Hölzl's  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments for 6-hydroxykynurenic acid was confirmed by HMQC and HMBC techniques. Based on our present findings, it may be considered that the yellow *Ginkgo* leaves may contribute to be a source of high medicinal values.

**Keywords**—*Ginkgo biloba* · Ginkgoaceae · yellow leaves · flavonoid · 6-hydroxykynurenic acid ·  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments of 6-hydroxykynurenic acid

은행잎의 성분으로서는 주성분인 flavonoid계 화합물과 terpene계 화합물외에 polyprenol, polysaccharide 등 수많은 화합물이 밝혀졌으며<sup>1)</sup> 이중 flavonoid glycoside류와 terpene류는 다양한 생리활성이 보고되어, 1-7) 이들 성분들을 주성분으로하는 의약품이 개발되어 전세계적으로 크게 각광받고 있다. 이들 의약품의 원료로는 여름철 특히 8월에 채집한 은행잎에 유효성분의 함량이 높아 제약원료로서 주로 사용되고 있으나,<sup>2)</sup> 저자 등이 국산은행잎의 월별함량을 HPLC을 이용하여 비교분석한 결과에 의하면 노란은행잎에도 상당량의 flavonoid성분이 함유되어 있으며<sup>8,9)</sup> 특히 푸른은행잎에서는 거의 나타나지 않는 강한 intensity를 갖는 peak가 존재함을 보고<sup>9)</sup> 한 바 있다. 따라서 이 특이성분을 분리하여 그 화학구조를 구명하고 아울러 지금까지 보고된 바 없는 노란은행잎중에 함유된 flavonoid 성분 및 ginkgolide B를 분리하여 이를 구명하였기에 보고하고자 한다.

### 실험방법

**재료** - 본 실험에 사용한 노란은행잎은 경북 안동대학교 교정에서 1992년 11월에 채집한 후 음건하여 사용하였다.

**기기 및 시약** - 용점은 Mitamura-Riken의 미량용점측정장치를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. UV는 Gilford 2600, IR은 JASCO의 FT/IR 5300, NMR은 Varian FT-80A (80MHz), Unity 500 (500MHz), 또는 Bruker AM-300 (300MHz) 을 사용하여 측정하였으며, Mass는 Hewlett-Packard 5985B 질량분석기를, HPLC는 Spectra-Physics, Inc. (SP 8800 ternary pump, SP 4270 integrator, Spectra 100 UV-VIS variable wavelength detector) 제품을 사용하여 측정하였다. TLC는 Merck의 Kieselgel 60 및 60 F<sub>254</sub>를 사용하였으며, 기타시약은 특급시약을 사용하였다.

추출 및 분획 - 검체(17 kg)에 MeOH을 가한 후 수욕상에서 3시간씩 3회 추출한 후 농축하여 얻은 MeOH엑스(4 kg)에 증류수 및 CHCl<sub>3</sub>을 거의 동량 가하여 진탕방치하여 얻은 CHCl<sub>3</sub> 층을 농축하여 CHCl<sub>3</sub> 분획(1.1 kg)을 얻고 수층에 EtOAc 및 BuOH를 각각 순차적으로 가해 진탕 방치하여 얻은 유기용매층을 감압농축하여 EtOAc 분획(440 g) 및 BuOH분획(726 g)을 얻었다.

분리 및 정제 - EtOAc분획(150 g)을 silica gel column에 걸고 CHCl<sub>3</sub>-MeOH로 gradient elution (1%~5%) 시켜 5종의 biflavonoids [sciadopitysin (6.2 g), ginkgetin (1.7 g), isoginkgetin (1.3 g), bilobetin (1.0 g) 및 amentoflavone (0.3 g)과 ginkgolide B (1 g)를 단리하였다. 이들 화합물들은 mp, IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR 및 mass data를 종합하여 각각의 표준품<sup>10)</sup>과 직접적으로 대조확인 하였으며 각각의 순도는 전보의 방법<sup>8,11)</sup>에 따라 HPLC로 확인하였다.

BuOH분획(410 g)도 silica gel column에 걸고 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (26:14:5)로 용출시킨 후 얻은 subfraction을 MeOH로 재결정을 반복 실시하여 3종의 순수한 flavonoid glycosides을 얻었으며 HPLC에서 특징적으로 나타나는 peak ( $t_R = 5$  min)인 화합물 4는 subfraction 4를 다시 silica gel column에 걸고 EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:16.5:13.5)로 용출시켜 얻은 분획을 MeOH로 재결정을 반복하여 미황색분말인 화합물 4 (500 mg)을 얻었다. Flavonoid glycosides는 각각의 mp, IR, UV, <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR data을 종합한 후 표준품<sup>10)</sup>과 비교하여 각각 rutin (12 g), kaempferol 3-O-2'', 6''-di-O-rhamnopyranosyl glucopyranoside (550 mg) 및 quercetin 3-O-2'', 6''-di-O-rhamnopyranosyl glucopyranoside (700 mg)로 확인하였다.

화합물 4 - mp 319~320°; IR,  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3459 (NH), 3169 (OH), 1736 (C=O), 1599 (aromatic C=C), 1491 (NH); UV,  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ) 242 (sh, 3.75), 253 (sh, 3.82), 258 (3.83), 297 (2.75), 351 (3.39), 361 (3.37);  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH+HCl}}$  nm 262 (3.93), 312 (2.89), 323 (2.93), 364 (3.24); MS,  $m/z$  (rel. int., %) 205[M]<sup>+</sup> (4.7), 161[M-COOH]<sup>+</sup> (21.5), 133[M-

(COOH+CO)]<sup>+</sup> (5.2); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.63 (1H, s, H-3), 7.22(1H, dd,  $J = 2.8, 9.0$  Hz, H-7), 7.41(1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-5), 7.87 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-8); <sup>13</sup>C-NMR(75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : Table I 참조.

## 결과 및 고찰

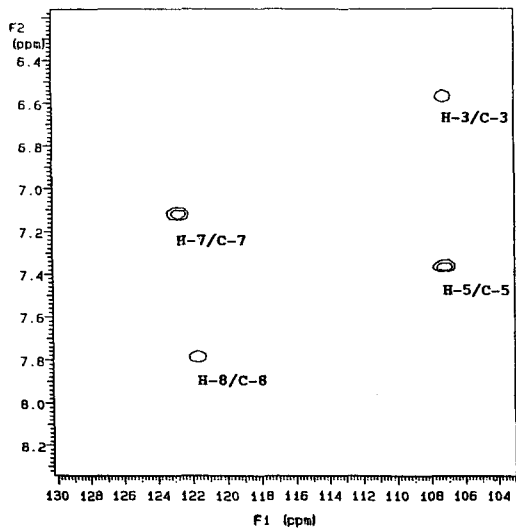
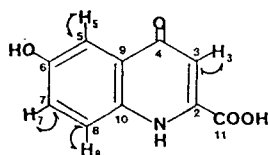
은행잎에 함유된 total flavonoid glycosides를 산가수분해시켜 얻은 aglycone은 8월에 채집한 검체에 가장 함량이 많으므로, 은행잎은 주로 8월에 채취하여 의약품의 원료로 사용되고 있으나, 순수 flavonol glycoside들을 지표물질로 하여 HPLC분석을 하면 11월에 채취한 노란은행잎에도 상당량의 flavonoid성분이 함유되어 있음을 알았으며 이외에도 푸른은행잎에는 거의 나타나지 않는 강한 intensity를 갖는 peak ( $t_R = 5$  min)가 나타남을 알았다. 이 성분은 분획시 BuOH 분획에 나타나므로 BuOH 분획을 column chromatography을 실시하여 주성분인 3종의 flavonol glycoside와  $t_R = 5$  min에서 나타나는 화합물 4을 순수분리하였다. 3종의 flavonol glycoside는 각종 분광학적 data를 종합한 후 표준품과 직접적으로 대조하여 각각 rutin, kaempferol 3-O-2'', 6''-di-O-rhamnopyranosyl glucopyranoside 및 quercetin 3-O-2'', 6''-di-O-rhamnopyranosyl glucopyranoside로 확인 하였다. 화합물 4는 미황색분말로 IR을 보면 3459 cm<sup>-1</sup>에서 NH, 3169 cm<sup>-1</sup>에서 OH, 1736 cm<sup>-1</sup>에서 C=O 및 1599 cm<sup>-1</sup>에서 aromatic C=C로 추정되는 band들이 나타나고 있으므로 질소를 함유하는 aromatic 화합물로 추정할 수 있었다.

이 화합물의 UV spectrum도 258 nm에서 극대 파장이 나타나며 이외에도 351~361 nm에서 multiple peak들이 나타나는데 이들 peak는 HCl 용액중에서는 364 nm에서 단일 peak로 장파장이 동합을 볼 수 있으므로 이 화합물은 4-quinolone계 화합물로 추정할 수 있었다.<sup>12,13)</sup>

Mass spectrum를 보면  $m/z$  205에서 분자이온 peak가 나타나고 이로부터 CO<sub>2</sub>가 탈리된 peak가  $m/z$  161에서 나타나며 이  $m/z$  161에서 CO가 탈리되어 생성된 peak가  $m/z$  133에서 나타나고

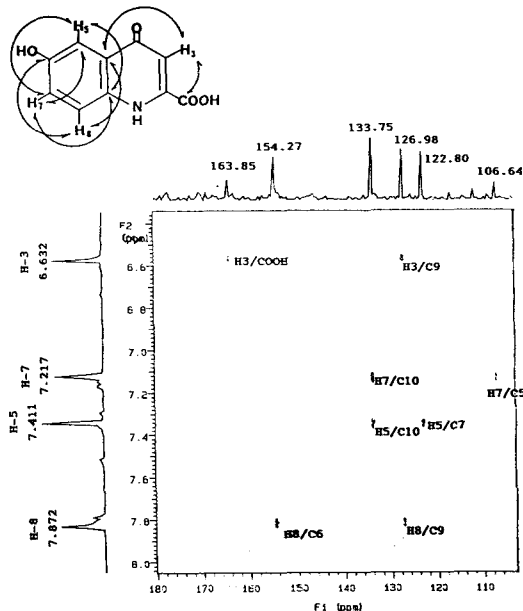
**Table I.** Comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts for 6-hydroxykynurenic acid(4) in  $\text{DMSO-d}_6$ .

Carbon No.	Our data	Data from Hölzl <sup>15)</sup>	Data from Anton <i>et al.</i> <sup>16)</sup>
C-2	140.14	138.5	107.06
C-3	107.31	107.5	141.90
C-4	176.22	175.6	176.65
C-5	106.64	106.5	121.35
C-6	154.27	154.4	122.44
C-7	122.80	122.9	153.99
C-8	121.57	121.7	106.88
C-9	126.98	126.9	127.01
C-10	133.75	134.0	133.60
C-11	163.85	163.7	163.86



**Fig. 1.** HMQC spectrum of 6-hydroxykynurenic acid

있으므로, 이 화합물에는 각각 하나의 COOH와 OH기가 결합되어 있으며 이들 group들은 같은 ring에는 서로 결합되어 있지 않음을 추정할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY-45 spectrum을 종합하여 이 화합물은 6-hydroxykynurenic acid



**Fig. 2.** HMBC spectrum of 6-hydroxykynurenic acid

임을 알았다.<sup>14,15)</sup> 이 화합물의  $^{13}\text{C}$ -NMR data을 보면 Table I에서 볼 수 있는 바와같이 서로 상이함을 알았다. 따라서 이를 확실히 구명하기 위하여 Fig. 1 및 2에서와 같이 HMQC 및 HMBC spectrum을 측정하여 이를 해석하므로써 정확한 assignment를 할 수 있었다. 즉 HMQC spectrum에서 볼 수 있는바와같이 C-H one bond coupling에 의하여 protonated carbon들을 assignment 하고, HMBC spectrum에 의하여 각각의 proton과 long-range coupling을 하고 있는 quaternary carbon들을 정확히 assignment할 수 있었으며 그 결과는 Fig. 2의 상단에 도시하였다. 이상의 결과를 종합하여 Anton 등<sup>16)</sup>의  $^{13}\text{C}$ -NMR data는 수정되어야만 하며 Hölzl 등<sup>15)</sup>의 assignment가 정확함을 알았다.

EtOAc분획을 silica gel column chromatography을 실시하여 5종의 biflavonoid들과 ginkgolide B을 분리하여 표준품들과 직접적으로 대조하여 각각 확인하였다. 이들 biflavonoid성분들은 현재 다양한 생리활성물질들이 보고되고<sup>17-21)</sup> 있어 앞으로 이들 물질들을 획득하기 위한

자원으로서 노랑은행잎이 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀 - 본 연구의 일부는 보건복지부에서 지원한 신약개발연구지원사업(1994년)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

〈1995년 2월 4일 접수〉

### 참고문헌

1. Tang, W. and Eisenbrand, G.: *Chinese Drugs of Plant Origin*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 555-565 (1992).
2. Sticher, O.: *Planta Med.* **59**, 2 (1993).
3. Braquet, P.: *Drugs of the Future* **12**, 643 (1987).
4. Oberpichler, H., Sauer, D., Rossberg, C., Mennel, H.-D. and Krieglstein, J.: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 133 (1990).
5. Lamour, Y., Holloway, H.W., Rapoport, S.I. and Soncrant, T.T.: *Drug Develop. Res.* **23**, 219 (1991).
6. Petkov, V., Kehayov, R., Belcheva, S., Konstantinova, E., Petkov, V.V., Getova, D. and Markovska, V.: *Planta Med.* **59**, 106 (1993).
7. Wada, K., Sasaki, K., Miura, K.-I., Yagi, M., Kubota, Y., Matsumoto, T. and Haga, M.: *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 210(1993).
8. Kang, G.-S., Youm, J.R. and Kang, S.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 47 (1993).
9. 강규선: 은행잎의 Flavonol Glycoside 성분의 계절별 변화에 관한 연구, 석사학위논문(중앙대학교) (1992).
10. Kang, S.S., Kim, J.S., Kwak, W.-J. and Kim, K.-H.: *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 111 (1990).
11. Chang, S.K., Youm, J.R. and Kang, S.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 54 (1993).
12. Sangster, A.W. and Stuart, K.L.: *Chem. Rev.* **65**, 69 (1965).
13. Rapoport, H. and Holden, K.G.: *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4395 (1962).
14. Macnicol, P.K.: *Biochem. J.* **107**, 473 (1968).
15. Schennen, A. and Hölzl, J.: *Planta Med.* **52**, 235 (1986).
16. Victoire, C., Haag-Berrurier, M., Lobstein-Guth, A., Balz, J.P. and Anton, R.: *Planta Med.* **54**, 245 (1988).
17. Ruckstuhl, M., Beretz, A., Anton, R. and Landry, Y.: *Biochem. Pharmacol.* **28**, 535 (1979).
18. Chakravarthy, B.K., Rao, Y.V., Gambhir, S.S. and Gode, K.D.: *Planta Med.* **43**, 64 (1981).
19. Amellal, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R. and Landry, Y.: *Planta Med.* **16** (1985).
20. Huguet, A.Z., Manez, S. and Alcaraz, M.J.: *Z. Naturforsch.* **45C**, 19 (1990).
21. Kim, H.P., Choi, J.H., Lee, S.J., Son, K.H., Chang, H.W. and Kang, S.S.: Manuscript in preparation (1995).