

은행잎 유래 살충성분 bilobalide와 그 분해물의 살충활성

양은영* · 홍수명 · 안용준¹ · 권오경

농업과학기술원 작물보호부 농약안전성과, ¹서울대학교 응용생물화학부

요약 : 은행잎함유 살충성분인 bilobalide의 활성부위를 조사하기 위해 bilobalide를 가수분해 및 산화를 시킨 후 구조를 확인하고 살충활성을 검정하였다. 분해물의 분석 결과, 염기에 의한 가수분해물은 cyclopentenone 계열의 화합물로 밝혀졌고, 산화물은 trilactone 형태를 유지한 sesquiterpene 구조로써 dehydration된 형태로 추정되었다. 분해물의 살충활성을 검정한 결과, 살충력의 크기는 bilobalide, monoacetyl 유도체, ginkgolide C, 산화분해물, diacetyl 유도체, 가수분해물의 순으로 감소하여 bilobalide의 살충력을 나타내는데에는 trilactone의 구조를 유지하는 것이 중요한 것으로 나타났다.(2001년 2월 12일 접수, 2001년 3월 8일 수리)

Key words : *Ginkgo biloba*, bilobalide, insecticidal activity, hydrolysis product, oxidation product.

서 론

“살아있는 화석”이라 불리는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 약 2억년전부터 지구상에 존재했던 Ginkgoales로 알려진 식물군 중 지금까지 살아남은 유일한 식물이며(Randolph, 1967), 암·수나무가 각각 다른 낙엽성 교목으로서 그 수명은 1,000년을 넘는 장수목으로 알려져 있다. 이와 같이 은행나무는 곤충, 박테리아, 바이러스, 곰팡이와 같은 다양한 해충에 대한 저항성이 보고되어 왔다(Randolph, 1967). 은행나무 잎은 flavonoids, terpenes, organic acids 및 기타 다양한 화합물들을 함유하고 있으며(Defeudis, 1991), 이에 대한 화학적 고찰과 많은 약리학 적 연구들이 수행되어 왔다(Braquet, 1988; van Beek와 Lelyveld, 1992). 은행잎의 약리 작용에 대해서는 많은 연구와 보고가 되어 있으나, 살충 활성에 대해서는 많이 알려지지 않았는데, *Pieris rapae crucivora* 유충에 대한 섭식저해물질로 ginkgolide A, ginkgolide B 및 bilobalide 등이 보고되었으며(Matsumoto와 Sei, 1987), 벚말구에 대한 강력한 살충성분으로 bilobalide와 ginkgolide A, B와 C를 분리·동정하였다(Ahn 등, 1997). 또한 제약폐기은행잎 중의 생리활성물질로서 벚말구 살충성분인 bilobalide, 타감물질인 catechol과 gibberellin을 분리 동정하였으며, 토양처리시 작물생육에 미치는 영향 등이 보고된 바 있다(성, 1996).

Bilobalide와 ginkgolides의 chromium trioxide에 의한 산화는 이들의 화학구조를 밝히는데 이용되었고(Weinges와 Bähr, 1972), ginkgolide A에 acetic acid와 toluene-*p*-sulfonic acid와 CrO₃를 넣어 산화시킨 후 여과하여 모은 결정을 기기 분석한 결과 tert-butyl기 중 하나를 잃은 C₁₉H₂₁O₉이었다(Okabe 등, 1972). 이들 trilactone terpene 화합물에 대한 유기합성(Crimmins 등, 1993)이나

추출법(Wada 등, 1993), 그리고 bilobalide의 22단계 전합성과정이 밝혀졌으며(Corey와 Su, 1987), 계절이나 빛의 영향에 의한 각 성분의 조성변화(van Beek와 Lelyveld, 1992; Fleisch 등, 1992) 등과 같은 생리·화학적 측면의 연구가 진행되고 있다.

Bilobalide는 실내시험에서 감수성 및 저항성 계통 벚말구에 대하여 기존의 벚말구 방제용 살충제인 fenobucarb나 carbofuran 보다 월등한 살충효과를 보일 뿐만 아니라, 안전성 측면에서도 우수하기 때문에 실제 포장에서의 이용 가능성이 매우 높은 것으로 기대되고 있다(Ahn, 1997).

그러나, 기존의 살충제의 구조와 상이한 bilobalide는 trilactone sesquiterpene 이라는 복잡한 구조로 인하여 실제 합성을 통한 살충제로의 적용과 유도체 합성을 통한 새로운 살충제로의 개발이 어려우므로, bilobalide의 단순화된 구조로 전환된 화학적 분해물과 그 유도체의 살충 활성 측정을 통하여 살충활성을 나타내는데 있어서 bilobalide 모핵구조의 단순화를 통한 새로운 살충제로의 적용가능성, 필수성을 파악하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

벚말구(*Nilaparvata lugens* Stål, Brown planthopper)는 1985년부터 살충제로 도태시키지 않고 추청벼(*Oryza sativa* L.) 유묘로 온도 27±1°C, 광조건 16 L : 8 D의 사육실에서 누대 사육하였으며, bilobalide와 ginkgolide C는 (주)SKI 중앙연구소에서 분리 정제한 것을 사용하였으며, 화학구조는 그림 1에 나타내었다. 분리 정제한 물질의 분자량 결정을 위해서는 Finnigan MAT 사의 TSQ 7000을 사용하여 분석하였으며 이 때의 조건은 ion voltage 70eV에서 EI-mode로, column은 DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)을 사용하였다. ¹H-NMR spectrum은 tetramethylsilane(TMS)을 내부표준물질로 하여 Varian 사의 Inova 300 모델을 사용하였다.

*연락처자

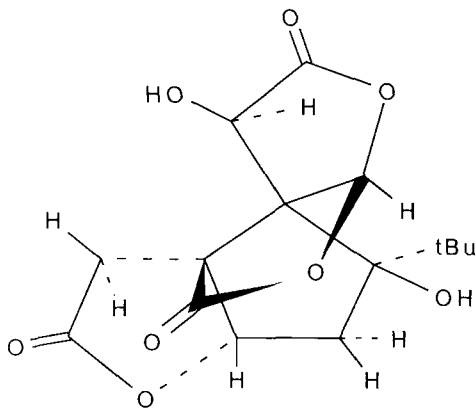


Fig. 1. Structure of bilobalide.

Bilobalide의 가수분해

둥근 플라스크에 bilobalide를 ethanol : water (1:1, v/v) 용액으로 녹인 후 25% KOH 용액을 넣어 가열 환류시켜 30분 간격으로 반응 여부를 확인하였고, 다른 경우는 sodium ethoxide를 넣어 교반시키면서 12시간동안 반응시켰다. 반응 여부는 반응물을 n-hexane : ethyl acetate (3:4, v/v) 혼합용매를 이용하여 박층크로마토그래피하고 phosphomolybdic acid (PMA) solution으로 spray한 후 hot plate에서 가열하여 TLC plate (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) 상에서 확인하였다. 반응 용액은 회전진공농축기를 이용하여 농축한 후에 증류수 10 mL를 넣어 녹인 후, 10% 염산 용액으로 산성화시켜 확인하였다. 이를 250 mL 분획여두에 넣고 ethyl acetate 70 mL를 넣은 후 마개를 닫고 잘 섞이도록 흔들어 물층과 ethyl acetate층으로 분리한 후 ethyl acetate층을 취하였으며, 이를 2번 반복 추출하여 감압 농축하였다.

산화 분해

둥근 플라스크에 chromium trioxide를 넣고 80% acetic acid로 녹인 후, 얼음과 소금 혼합물로 채운 bath에 플라스크를 넣고 교반기상에서 교반시키면서 온도를 측정하여 0°C 내외 (0~5°C)가 되면 acetic acid 20 mL에 bilobalide 1 g과 p-toluene sulfonic acid 0.5 g를 용해시킨 용액을 조금씩 떨어뜨렸다. 이때, 내부 온도는 10°C 이상 되지 않도록 하였다. 시간 간격을 두고 n-hexane : ethyl acetate (3:4, v/v) 혼합 용매로 TLC하여 PMA solution을 spray한 후 hot plate에서 가열하여 TLC plate상에 전개된 spot의 양상을 확인하였으며, 새로운 spot이 나타날 때까지 반복하였다.

반응 용액은 회전진공농축기를 이용하여 농축시킨 후 아세톤으로 용출시킨 다음 이를 실리카겔(silica gel 60, 70-230 mesh) 25 g을 넣고 감압 농축하여 고체흡착시켰고, n-hexane : ethyl acetate (3:4, v/v) 혼합용매로 컬럼크로마토그래피를 수행하여 잔류된 chromium trioxide를 제거하였다.

분취 시료를 prep-TLC plate에 n-hexane : ethyl acetate (2 : 3, v/v) 혼합용매로 microapplicators를 이용하여 전개시킨 후, graifhold blade를 이용하여 bilobalide spot이외의 새로운 spot을 긁어내어 아세톤으로 용출시켰다.

Bilobalide의 acetylation

50 mL 둥근 플라스크에 bilobalide 0.5 g와 pyridine : acetic anhydride (1:1, v/v) 용액 8 mL를 넣어 교반시키면서 12시간동안 반응하여 mono-acetylation화 하였고, 100 mL 둥근 플라스크에 bilobalide 0.5 g과 acetic acid 50 mL, acetic anhydride 20 mL를 넣은 후, oil bath에 플라스크를 넣은 상태로 교반시키면서 hot plate 상에서 가열 환류시켜 di-acetylation화 하였다. 반응여부는 n-hexane : ethyl acetate (3:4, v/v) 혼합용매를 이용한 박층크로마토그래피로 확인하였고 반응액을 진공 농축하였다.

Bilobalide 분해물과 acetylation 치환체의 분석

Bilobalide의 lactone 구조와 2개의 OH기로 인하여 GC 분석을 위해 TMS 유도체를 합성하였다. 아세톤에 일정 농도로 희석된 시료 1 mL를 2 mL screw-top v-vial에 취하여 50°C heating block상에서 질소(N₂) 가스로 용매를 제거하였다. 시료에 유도체 시약 BSTFA (N,O-bis(trifluoromethyl) acetamide, Sigma) 300 μL, TMCS (Chlorotrimethylsilane, Sigma) 5 μL와 DMF (Dimethyl formamide) 250 μL를 넣고 120°C 오븐에서 60분간 열처리하여 식힌 후 증류수와 ethyl acetate를 넣어 잘 섞이도록 흔든 다음 상층액을 취하였다. Bilobalide와 가수분해물과 산화물의 GC/MS 분석 조건은 DB-5MS (30 m(L) × 0.25 mm(D) × 0.25 μm(film두께))컬럼을 사용하였으며, ion voltage는 70 eV, carrier gas로 He (1.0 mL/min) gas를 사용하였고, injection temp.는 230°C, column temp.는 210°C에서 1분, 분당 5°C씩 260°C까지 증가시키고 5분간 유지하였다.

살충활성 측정

추정벼 유묘(5일묘) 12본의 뿌리부위를 솜으로 말아서 약간의 물이 들어 있는 유리시험관(직경 2.8 × 높이 18 cm) 속으로 밀어 넣은 유묘 시험관을 준비하였다. 우화 후 3일 된 벼묘구 암컷 성충(평균무게 0.00196 g) 25마리를 잡아 탄산가스로 20초간 마취시킨 후 흉부배판에 미량국소처리기(Burcard Scientific, UK)를 사용하여 아세톤에 각 농도 별로 희석시킨 시료를 총량 0.2 μL씩 2반복 처리하였다. 처리 24, 48시간 후에 사충수를 조사한 후, Abbott(1925)의 probit 분석법에 따라 반수치사약량(LD₅₀)을 산출하였다.

결과 및 고찰

가수분해물의 분석

KOH 용액에 의한 bilobalide의 가수분해는 반응 용액을 30분 간격으로 TLC plate에 전개하여 확인한 결과 분해되지 않고 bilobalide spot이 나타나 KOH에 의해서는 분해되지 않는 것으로 판단하였다.

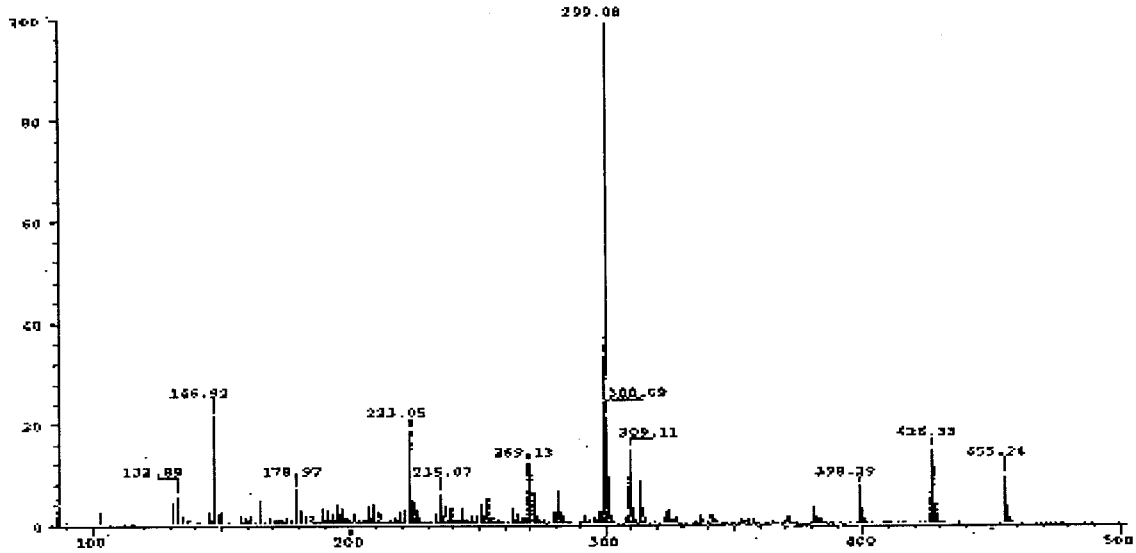


Fig. 2. Mass spectrum of TMS-derivative of bilobalide.

Sodium ethoxide에 의한 bilobalide의 가수분해 반응은 분해시킨 지 5시간 후에 TLC plate 상에 bilobalide의 spot이 나타나지 않아 bilobalide가 분해된 것으로 판단하였다. Bilobalide와 이의 분해물을 TMS로 유도체화한 후 GC/MS 분석을 한 결과 그림 2와 같은 mass spectrum을 얻었다. Bilobalide는 15.27분대의 retention time에서 peak가 나타났다. Bilobalide의 질량분석스펙트럼은 분자량 455.24로 나타났으나, 실제 TMS 유도체화된 bilobalide의 분자량은 470으로 ginkgolide계 화합물의 이온화 특징인 methyl기가 탈락된 형태로 나타났다 (Chauret 등, 1991).

가수분해물은 retention time 7.25분에서 peak가 나타났고 이의 TIC는 그림 3과 같으며, TIC의 상대적 면적비에서 순도는 95% 이상인 것으로 판명되었으며, 이때의 수율은 7% 이었다. 질량분석스펙트럼은 그림 4와 같고, 이온화 질량조각패턴으로 보아 가수분해물의 구조는 bilobalide의 기본골격인 trilactone의 구조가 분해된 분자량 164의 cyclopentenone 구조로 판명되었다.

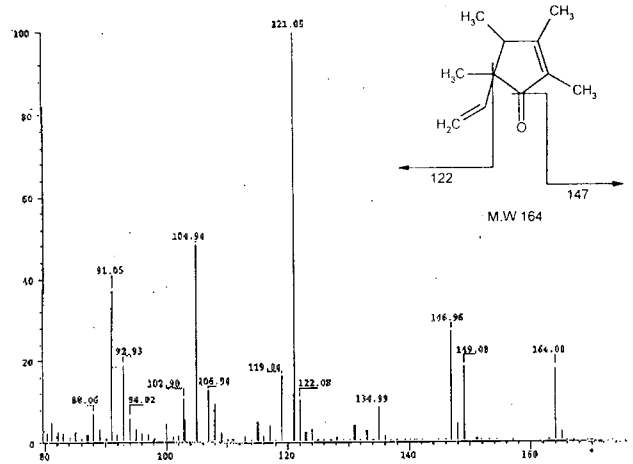


Fig. 4. Electron impact mass spectrum and structure of hydrolysis product.

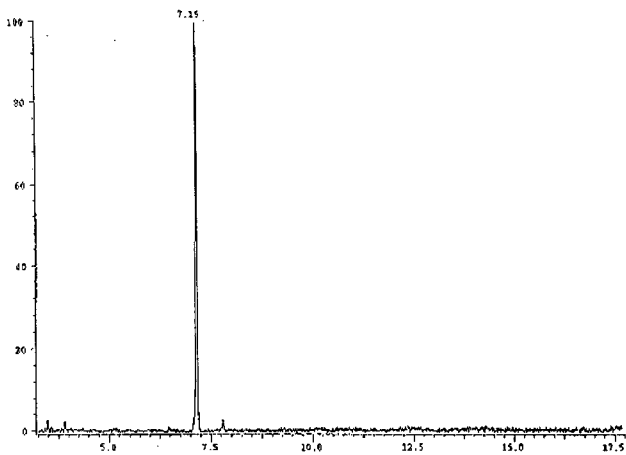


Fig. 3. Total ion chromatogram of hydrolysis product of bilobalide.

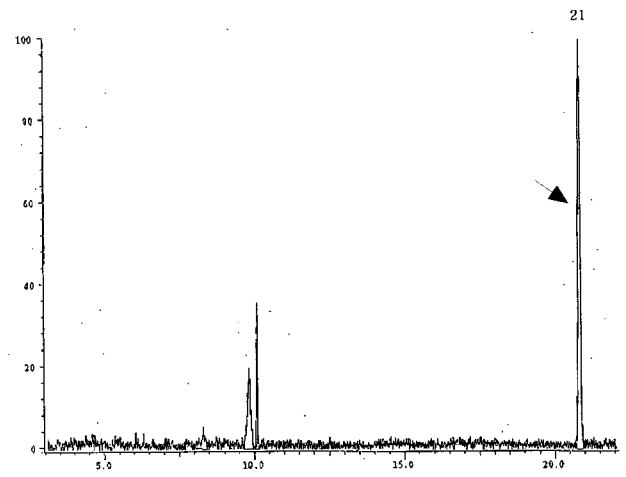


Fig. 5. Total ion chromatogram of oxidation product.

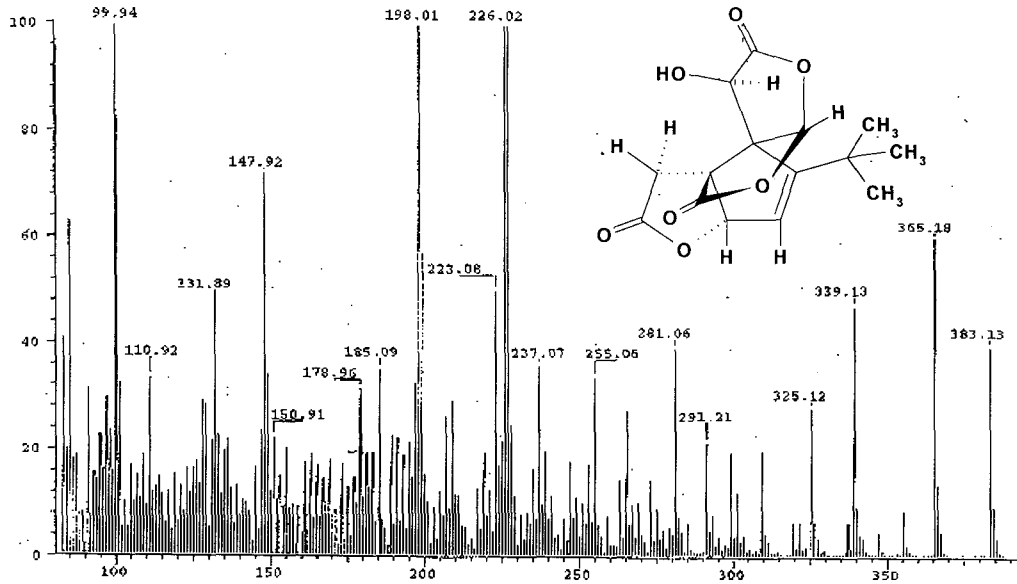


Fig. 6. Electron impact mass spectrum and structure of oxidation product.

산화물의 분석

Chromium trioxide로 산화 반응시킨 용액은 10일 후에 n-hexane : ethyl acetate (2:3, v/v) 혼합용매로 박층크로마토그래피를 실시한 결과 bilobalide의 spot (Rf 0.514)보다 위쪽에 반응물의 spot (Rf 0.595)이 나타났다. 같은 용매조건으로 Prep-TLC plate에 전개하여 반응산물의 spot만을 분리하여 아세톤으로 용출시켰으며, 수율은 0.2%이었다. 분리 정제한 물질의 GC/MS 분석 결과 그림 5와 같은 TIC를 얻었으며, retention time이 21분대인 peak가 나타났으며 상대적 적분비에 의한 순도는 74%로 계산되었다. 이의 질량분석스펙트럼은 그림 6과 같으며, 분자량의 최대 질량이 383으로 나타났지만 ginkgolide계 화합물의 이온화 특징인 methyl기가 탈락된 상태로 추정되어 이 화합물의 실제 분자량은 398로 추정되며, 질량 조각 패턴으로 보아

bilobalide의 trilactone 형태를 유지한 sesquiterpene 구조로써 tert-butyl기가 부착되어 있는 cyclopentanol 위치에서 dehydration된 형태로 해석되었다.

Acetylation 치환체

Pyridine과 acetic anhydride (1:1, v/v) 용액으로 mono-acetyl 치환 유도체화 반응시킨 용액의 박층크로마토그래피를 실시한 결과 bilobalide spot (Rf 0.472) 보다 위쪽에 spot (Rf 0.556)이 나타났으며, 수율은 86%이었다.

Acetic acid와 acetic anhydride 용액으로 di-acetyl 치환 유도체화 반응시킨 용액의 박층크로마토그래피를 실시한 결과 bilobalide (Rf 0.459) 위쪽에 Rf 0.513의 spot이 나타나 2개의 -OH기가 모두 acetyl 기로 치환된 것으로 판단되었으며, 수율 90%이었다. ¹H-NMR spectrum 확인

Table 1. Insecticidal activities of bilobalide and its derivatives against *Nilaparvata lugens* Stål adults determined by topical application

Product	Time (hrs)	LD ₅₀ (ng/♀)	Slope (±SE)	95% FL	RT ^{a)}
Bilobalide	24	0.64	1.01 (±0.14)	0.42~1.09	1
	48	0.47	1.04 (±0.18)	0.31~0.76	1
Mono-acetate	24	1.94	2.19 (±0.44)	1.33~2.81	3.03
	48	1.27	2.11 (±0.45)	0.80~1.83	2.70
Ginkgolide C	24	2.39	1.78 (±0.33)	1.32~3.90	3.73
	48	2.07	1.90 (±0.34)	1.17~3.34	4.40
Oxidation product	24	36.67	2.21 (±0.48)	23.18~52.10	57.30
	48	22.74	2.35 (±0.60)	11.66~32.60	48.38
Di-acetate	24	46.15	2.41 (±0.58)	32.51~82.96	72.11
	48	19.14	1.61 (±0.41)	11.53~32.04	40.72
Hydrolysis product	24	240.46	2.23 (±0.37)	168.49~336.53	375.72
	48	167.30	1.99 (±0.43)	108.87~247.08	355.96

^{a)} Relative toxicity (LC₅₀ of each chemical/LC₅₀ of bilobalide(1.00)).

결과 (그림 7), mono-acetylation과 di-acetylation 유도체들로 판명되었다. Mono-acetylation 유도체의 경우, bilobalide의 주요 골격인 trilactone의 *sec*-hydroxyl proton이 6.43 ppm에서 doublet 형태로 존재한 반면, di-acetylation 유도체는 *sec*-과 *tert*-hydroxyl기 proton이 6.43, 4.55 ppm에서 나타나지 않았고, 2.11 ~ 2.24 ppm에서 나타난 singlet은 acetyl기가 가지고 있는 -CH₃의 proton인 것으로 판명되었다.

Bilobalide 분해물의 살충활성

벼멸구에 대한 bilobalide의 분해물의 살충력을 bilobalide와 ginkgolide C의 살충효과와 비교하였다. 미량국소처리법에 의하여 24, 48시간후의 반수치사농도를 조사하였다(표 1).

24시간의 경우 반수치사약량이 bilobalide는 0.62 ng/우로 가장 높은 살충활성을 나타내었으며, mono-acetyl 치환체가 1.94 ng/우, ginkgolide C가 2.39 ng/우, 산화물의

경우 36.67 ng/우, di-acetyl 치환체가 46.15 ng/우의 순으로 나타났다. 이들 화합물들은 trilactone의 형태를 유지하는 화합물들이었고, 가장 변형된 구조인 가수분해물의 반수치사약량은 240.46 ng/우으로 가장 낮은 살충활성을 나타내었다.

Bilobalide의 분해물과 유도체들의 생물활성에 대한 연구는 지금까지 거의 수행되어 오지 않았는데 bilobalide의 산과 염기에 의한 분해물과 치환유도체의 살충활성을 조사한 결과, bilobalide와 비교하여 bilobalide의 구조가 비교적 가장 많이 보존되어 있는 mono-acetylation 유도체가 가장 높은 활성을 나타내었으며, ginkgolide C, 산화물, diacetate의 순으로 살충력의 크기가 나타났다. 또한 bilobalide의 trilactone 구조가 분해되어 가장 많이 변형된 가수분해물은 가장 낮은 살충력을 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 bilobalide의 구조가 살충력을 나타내는데에는 trilactone의 구조를 유지한 기본구조가 반드시 필요하다는 것을 알 수 있었다.

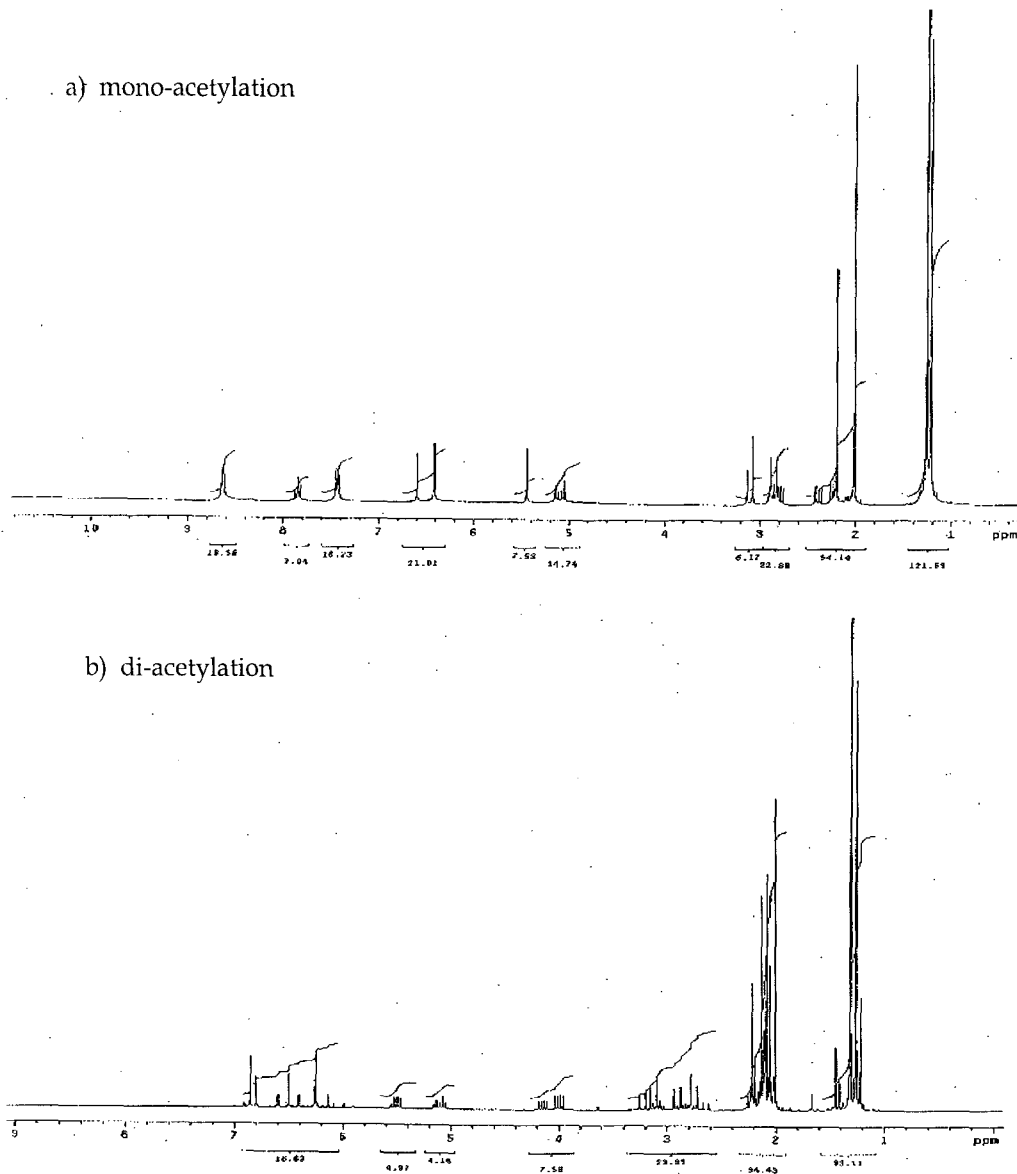


Fig. 7. ¹H-NMR spectra of acetylation derivatives of bilobalide.

인용문헌

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265~267.
- Ahn, Y. J., M. Kwon, H. M. Park and C. K. Han (1997) Potent insecticidal activity of *Ginkgo biloba* derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens*. pp. 90~105. *In* *Phytochemicals for Pest Control*. ACS Symp. Ser. No. 658, Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- van Beek, T. A. and G. P. Lelyveld (1992) Concentration of Ginkgolides and Bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year. *Planta Med.* 58:413~416.
- Braquet, P. (1988) Ginkgolides: Chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives. p. 794. J. R. Prous Science Publishers, Barcelona.
- Chauret, N., J. Carrier, M. Mancini, R. Neufeld, M. Weber and J. Archambault (1991) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of ginkgolides produced by *Ginkgo biloba* cell culture. *J. Chromatogr.* 588:281~287.
- Corey, E. J. and W. G. Su (1987) Total synthesis of a C₁₅ ginkgolide, (±)-bilobalide. *J. Am. Chem. Soc.* 109:7534~7536.
- Crimmins, M. T., D. K. Jung and J. I. Gray (1993) Synthetic studies on the ginkgolides: total synthesis of (±)-bilobalide. *J. Am. Chem. Soc.* 115:3146~3155.
- Defeudis, F. V. (1991) *Ginkgo biloba* Extract (EGb761). pp. 9~24, *In* *Chemical Composition of Ginkgo biloba Extract(EGb 761)*, Elsevier, Paris.
- Flesch, V., M. Jacques, L. Cosson, B. P. Teng, V. Petiard, and J. P. Balz (1992) Relative importance of growth and light level on terpene content of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry* 31:1941~1945.
- Matsumoto T: and T. Sei (1987) Antifeedant activities of *Ginkgo biloba* L. components against the larva of *Pieris rapae crucivora*. *Agric. Biol. Chem.* 51:249~250.
- Okabe, K., K. Yamada, S. Yamamura and S. Takada (1967) Ginkgolides. *J. Chem. Soc.(C)*. 2201~2206.
- Randolph T. Major (1967) The Ginkgo, the most ancient living tree. *Science* 157:1270~1273.
- Wada, K., K. Sasaki, K. Miura, M. Yagi, Y. Kubota, T. Matsumoto, and M. Haga (1993) Isolation of bilobalide and ginkgolide A from *Ginkgo biloba* L. shorten the sleeping time induced in mice by anesthetics. *Biol. Pharm. Bull.* 16:210~212.
- Weinges, K. and W. Bähr (1972) Naturstoffe aus Arzneipflanzen, XVI¹⁾ NMR-und Massenspektrometrischer vergleich des Bilobalids C₁₅H₁₈O₈ mit den Ginkgoliden C₂₀H₂₄O₉₋₁₁. *Liebigs Ann. Chem.* 759:158~172.
- 성기석 (1996) 폐기은행잎의 활성물질 분리동정 및 유기물 자원화. 영남대학교 박사학위논문.

Insecticidal Activities of Bilobalide from *Ginkgo biloba* Leaves and its Derivatives

Eun-Young Yang, Su-Myeong Hong, Young-Joon Ahn¹ and Oh-Kyung Kwon (*National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon, 441-707, Korea and ¹Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea*)

Abstract : This study was conducted to investigate insecticidal activities of *Ginkgo biloba* (L.) leaves-derived bilobalide and its hydrolysis and oxidation products against adults of *Nilaparvata lugens* Stål. To find out active insecticidal moiety of bilobalide, decomposed intermediates and derivatives of bilobalide were made by hydrolysis, oxidation, and acetylation. The structures of hydrolysis product by base and oxidation product by acid were identified as cyclopentenone analogues and trilactone sesquiterpene from dehydration of bilobalide, respectively. Insecticidal activities of the decomposed intermediates and the derivatives of bilobalide decreased in the order of bilobalide, monoacetate, ginkgolide C, oxidation product, diacetate, and hydrolysis product. Therefore, trilactone structure of bilobalide may be essential for its insecticidal activity.

*Corresponding author (Fax: +82-31-290-0521, E-mail : yey9@orgio.net)