

최 종  
연구보고서

정유성분을 Lead 화합물로한 환경친화형 살균제 개발

Development of a new environmentally-sound fungicide  
with the chemical moieties derived from natural essential oil

연구기관

한국신농약개발연구조합((주)동부한농)

농림자료실



0012298

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “정유성분을 Lead 화합물로 한 환경친화형 살균제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주 관 연구 기 관 명 : 한국신농약개발연구조합  
( ( 주 ) 동 부 한 농 )

총괄 / 세부연구책임자 : 장 성 식

연 구 원 : 명을재 , 김영권 , 이한영  
양규완 , 이인기 , 권희준  
조래홍 , 엄대용

협 동 연구 기 관 명 : 순 천 향 대 학 교

협 동 연구 책임자 : 최 원 식

연 구 원 : 장도연 , 차경민 , 최경길,  
남석우 , 신현창 , 어진용

# 요 약 문

## I. 제 목

정유성분을 Lead 화합물로 한 환경친화형 살균제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

새로운 작물보호제로서의 탐색대상은 인공화합물을 넘어 천연물에까지 확대되어 왔다. 세계적으로 천연물에서 유래한 다수의 작물보호제가 개발되었으며, 앞으로도 신물질 탐색대상으로 천연물이 주목받고 있는 추세이다. 본 연구는 식물병원균에 대해 살균효과를 나타내는 essential oil(식물정유)을 lead structure로 한 저독성 신규 살균제 개발을 목표로 환경친화적인 새로운 작물보호제 개발의 토대를 마련하는데 기여하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 1차적으로 식물체에서 추출한 42종의 정유성분(essential oil)으로부터 식물성 병원균에 대한 생리활성이 큰 정유성분을 찾아 선도물질로 선정하고 선도물질로부터 다양한 유도체들을 합성하여 새로운 친환경 살균제를 개발하고자 하였다. 또한, 합성된 유도체들을 1,2차 screening을 통한 생물활성검정 결과를 토대로 선발하여 최적화 후 포장시험, 제형화 가능성 및 특허 가능성을 검토하여 환경친화적인 신규 살균제를 개발하는데 목표를 두었다. 본 연구과제에서 수행하고자 하였던 주요 연구 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

구분	연구개발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 ( 2003 )	살균 효능을 지닌 천연물 및 유도체 합성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Thymol, carvacrol의 ester, sulfonyl ester 화합물합성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ester 유도체의 R 그룹의 alkyl, heterocyclic 및 phenyl 그룹의 aryl, benzyl 기 치환을 통한 유도체 변경.</li> <li>- Sulfonyl ester 유도체의 R 그룹의 alkyl, phenyl 그룹의 aryl, benzyl기 치환을 통한 유도체변경</li> </ul> </li> <li>- 천연화합물보다 spectrum이 넓고 효과 증진된 물질 합성</li> <li>○ 합성된 유도체들의 petri-dish 검정을 통한 유도체 특성별 효과검정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합성된 유도체를 petri-dish 실험을 통해 각 작용기별 식물병에 대한 효과 검정.</li> <li>- 위 시험을 통해 1차 screenning 대상물질을 선발</li> </ul> </li> </ul>
	합성된 유도체 의 1, 2차 screen ing을 통한 효과 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 5가지 주요 식물병에 대한 1차 screening               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 합성된 각 작용기별 유도체에 대해 식물병에 대한 효과를 온실 또는 생육상을 통해 검정</li> <li>- 효과 확인을 통한 효과적인 작용기를 확인</li> </ul> </li> <li>○ 2차 합성유도체에 대한 방향 결정</li> <li>○ 선발된 유도체의 2차 screening               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차 screening을 통해 선발된 유도체에 대해 처리농도별로 식물병에 대해 효과 확인</li> <li>- 저농도에서 효과를 나타내는 유도체에 대해 치료 및 예방 효과 검정.</li> </ul> </li> </ul>
2차년도 ( 2004 )	최적 화합물 합성, 선정 및 작용기 의 집중적 인합성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1차년도 유도체 합성을 통해 효과적인 작용기 합성을 통한 작용기 변환               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효과발현 작용기의 탐색을 통한 효율적인 추가합성</li> <li>- 추가합성된물질의 효과 발현 구명을 petri-dish 시험을 통해 확인, 선발</li> </ul> </li> <li>○ 유도체들의 합성 방향 결정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포장시험 가능한 유도체선정 및 합성</li> </ul> </li> </ul>

구분	연구개발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 ( 2004 )	선정된 최 적 화합물 의 포장 시 험 , 제형화 검 정 및 특허 가능성 검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선정된 최적 화합물의 포장시험 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 화합물의 포장, 온실시험을 통해 개발가능성 확인</li> <li>- 개발가능 식물병 선정을 통해 효과 재확인</li> </ul> </li> <li>○ 제형화 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적용 가능한 제형을 액상, 분상, 입상 등 여러 형태의 제제 기법을 도입 기초연구진행</li> <li>- 선발된 제형으로 생물시험 효과 기초연구 검토</li> </ul> </li> <li>○ 급성독성 확인 및 특허가능성 검토 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적화합물중 휘발성이 낮은 물질에 대한 급성독성 기초연구 진행</li> <li>- Derwent사의 특허관련 주간지 Fast Alert, STN 통신망을 이용하여 정보를 수집 후 특허가능성 검토</li> </ul> </li> </ul>
3차년도 ( 2005 )	최적화 합물의 집 중 합성을 통한 신규 살균제 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선정된 화합물의 이화학적 특성 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50개이상의 추가 최적화합을 합성하여 신규 살균제 선정</li> <li>- 최적화합물을 집중적인 합성을 통한 화합물 선정</li> <li>- 선정된 화합물의 이화학적, 물리적 특성 규명</li> </ul> </li> <li>○ 대량생산 공정 기초 연구 진행 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 신규 살균제의 대량 생산 공정개발 및 대량 생산 기초 연구 실시</li> <li>- 공정 연구를 통해 대규모 포장 시험 실시를 위한 시료 확보</li> </ul> </li> </ul>
	대규모 포장 시험 확인, 제형 개발, 및 등록 시험 1년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대규모 포장시험 및 제형 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대규모 포장시험 및 농가 적응성 시험을 통한 개발 가능성 확인</li> </ul> </li> <li>○ 제형 개발 및 제형의 안정성 시험 실시 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포장시험을 위한 최적 제형 개발</li> <li>- 제품화를 위한 개발된 제형의 물리적 성질 및 안정성 자료 확보</li> </ul> </li> <li>○ 급성독성 시험 확인 및 특허 출원 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 급성독성 시험 결과 안전성등을 확인</li> <li>- 안전성 확보된 물질에 대한 특허 출원</li> </ul> </li> </ul>

	진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농약등록 시험 1년차 진행</li> <li>- 국내 농약 등록시험 1년차 진행을 통한 국내 등록자료 확보</li> </ul>
--	----	--

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 제 1 절 연구개발 결과

본 연구는 식물정유라는 천연물질로부터 환경 친화적이고 안전한 신규 살균제를 찾아 상품화 하는데 그 목적을 두고 수행되었다. 연구 목적을 달성하기 위해 살균활성을 가지는 천연물을 탐색하였다. 10개의 주요 식물병원균에 대해 42종의 식물 정유성분을 검정하였고 가장 뛰어난 활성을 보인 thyme oil을 선발하였다. thyme oil은 carvacrol, thymol, borneol 등의 성분으로 구성되어 있었다. 그 중 thymol 성분이 *in vitro* 상에서 가장 뛰어난 활성을 보였고 이를 포함한 6물질을 출발물질로 하였다. 146종의 화합물을 합성하여 *in vitro* 시험을 수행하였고 최종적으로 활성을 보인 12개의 물질을 얻을 수 있었다. 이 12 물질을 주요 식물병원균인 고추 역병균 (*Phytophthora capsici*), 오이 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*), 오이 탄저병균 (*Colletotrichum orbiculare*), 오이 잿빛곰팡이균(*Botrytis cinerea*), 벼 도열병균 (*Magnaporthe grisea*), 벼 문고병균(*Rhizoctonia solani*)에 대해 *in vivo* screening을 수행한 결과 ester와 sulfonyl ester기를 갖은 화합물에서 이 작용기들이 없는 화합물보다 활성이 증진됨을 알 수 있었다. 이러한 판단에 따라 ester와 sulfonyl ester기를 포함한 162종의 화합물을 추가 합성하였고 *in vivo* screening을 수행하였다. 이 시험결과를 통하여 fluoro기의 결합위치와 결합수가 화합물의 방제활성에 영향을 주는 주요 요소라는 점을 알 수 있었다. 4종의 화합물이 포장시험을 위해 선발되었다. 고추 탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)과 고추 역병(*Phytophthora capsici*)에 대한 포장시험 대상물질로 *in vivo* 시험에서 가장 우수한 활성을 보인 각각 2개의 물질이 선발되었다. 포장시험 결과 고추 탄저병에 선발된 2종의 화합물은 포장에서 대조물질보다 우수한 방제활성을 보이지는 못하였으나 대조물질

이 보인 방제활성의 80%에 해당하는 활성을 확인할 수 있었다. 포장시험 후, 123종의 화합물을 추가 합성하여 구조활성관계를 분석하였다. 본 시험의 성과는 다음과 같이 요약될 수 있다.

1. 천연물 유래의 선도 물질을 이용한 환경친화적인 살균제 개발경험이 없는 국내 상황에서 천연물에서 유래한 선도화합물을 screening 할 수 있는 기초를 확립하였다. *in vivo*, *in vitro* 상으로 473개의 물질을 screening하면서 체계적인 screening 시험법을 확립하였다.

2. 탄저병균과 잿빛곰팡이병균에 높은 활성을 보이는 추후 개발가능성이 있는 선도물질을 확보하였다.

식물병명: 화합물 코드명(100 ppm 에서의 방제가%)

오이 탄저병: DBF 12078(92.9%), DBF 12079(92.9%), DBF 12075(96.4%),  
DBF 12080(96.4%), DBF 12098(90.9%), DBF 12192(94.2%),  
DBF 12203(90%)

오이 잿빛곰팡이병: DBF 12086(93.6%), DBF 12114(98.0%)

3. 오이 탄저병에 대한 방제활성을 갖는 작용기중 fluoro기를 비롯한 특정작용기의 방제활성을 파악하였다.

4. 안정적인 screening 체계를 확립하였다.

가. 시험에 필요한 주요 식물병원균의 균주를 확보유지

나. 접종과 병진전에 대한 최적화 방법 습득

다. 병 평가의 표준화

## 제 2 절 연구결과 활용에 대한 건의

기존의 작물보호제가 가지고 있는 환경과 독성문제로 인해 최근 안전하고 환경친화적인 작물보호제의 개발이 강조되어 왔다. 보다 효과적이고 저독성인 살균제를 개발하기 위해 체계적인 screening 체계와 수행능력이 필요하다. 본 연구는 상품화라는 최종목표를 달성하지는 못하였지만 9종의 선도물질을 확보하였고 이러한 연구성과는 앞으로 새로운 친환경 살균제를 개발하는데 있어 유용한 기초자료로 활용되어 질 수 있다. 본 연구과제 수행으로 획득한 신물질 살균제 개발을 위한 screening의 기술과 경험을 효율적으로 활용한다면 향후 독자적이고 지속적인 고효율 저독성 신규 살균제 개발의 밑거름이 될 것이며 과제수행에 따른 활용가능성은 다음과 같다.

1. 과제 수행시 확립한 screening 체계는 추후 신물질 살균제를 개발하는데 기초자료로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
2. 신규 살균제 개발시 활용 가능한 9종의 화합물을 선별하였다.

이상의 결과는 새로운 고효율 저독성 작물보호제의 개발과 관련한 연구로서 신규 살균제 개발시 유용한 참고자료가 될 것이며, 신제품 개발의 현실화를 위해서는 생리·생화학에 대한 폭넓고 깊은 기초를 바탕을 추가적이고 지속적인 연구가 요망된다.



# SUMMARY

## I. Title

Development of a new environmentally-sound fungicide with the chemical moieties derived from natural essential oil

## II. Object and Significance of Research

Researches on the target materials for developing new fungicides have been very widely extended to natural substances today, beyond synthetic chemical compounds. So far, there have been many fungicides developed from nature substances internationally, and in the future researchers will pay more attention to them for new fungicide development. In this study, we tried to develop a new low-toxic fungicide modified by a lead structure from the essential oil, and we intended to lay the foundation for developing a new environmentally-sound fungicide.

## III. Contents and Scope of Research

We selected lead compounds for new fungicides from 42 essential oils, which are most fungicidal to 10 pathogens. In addition, we were planing to develop a new pesticide by synthesizing a variety of derivatives from these lead

compounds. After testing fungicidal activity of those synthesized compounds through primary and secondary screening, we selected again the best of them, optimized the selected compounds, conducted field tests, examined various formations and took patent possibilities into consideration. The major contents and scope planned first in this research may be summarized as follows.

1. Synthesizing derivatives which has fungicidal activity
  - a) Synthesize ester and sulfonyl ester derivatives of thymol, carvacrol
  - b) Making Activity-advanced and broad spectrum derivatives than natural substance
  - c) *In vitro* test of synthesized derivatives
  
2. 1st and 2nd screening of selected derivatives
  - a) 1st screening for 5 important plant pathogens(*in vivo*)
  - b) 2nd screening of selected compounds at multi concentration(*in vivo*)
  
3. Synthesizing and selecting optimized compound by modification of functional groups
  - a) Modification of functional groups based on former experiments
  - b) Decision of synthesis direction
  
4. Check for commercialization
  - a) Field test of selected compounds
  - b) study on Formulation
  - c) Simple acute toxicity test and patent applying possibility

#### 5. Selection of optimized compounds

- a) Study on physico-chemical characteristics of optimized compounds
- b) Fundamental study on mass production

#### 6. Research for Commercialization

- a) Large scale field test and optimized formulation
- b) formulation and stability test
- c) Acute toxicity test and application for patent
- d) Registration

### IV. Results and Recommendation

#### 1. Results

This research was carried out to find new environmentally-sound and safe fungicides from natural substance of essential oil and finally commercialize it.

To achieve a purpose, we tried to find nature substances which have fungicidal activity. 42 plant essential oil were tested on important 10 pathogens and "Thyme" oil which show remarkable fungicidal activity was selected. Thyme oil was consist of carvacrol, thymol, borneol and etc. we detect that "thymol" has fungicidal activities from a series of *in vitro* tests and take it as a starting compound with other some chemicals. At first, we synthesized 146 compounds and carried out *in vitro* test and finally obtained 12 compounds which show activity at *in vitro* test. These compounds were continuously applied to major 6 pathogens; *Phytophthora capsici*, *Sphaerotheca fusca*, *Colletotrichum orbiculare*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*. From this test, we knew

that compounds which have "ester group" or "sulfonyl ester group" are more active than the others. According to this judgement, we synthesized additionally 162 compounds involving "ester group" or "sulfonyl ester group" and carried out *in vivo* experiment. We could also know key factor from this *in vivo* test result. The position and binding number of "Fluoro" can influence compound's fungicidal activity. 4 compounds were selected for field test. Two of them are for pepper anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and the others are for pepper blight caused by *Phytophthora capsici*. Efficacy of compounds for pepper anthracnose were not superior to that of commercialized product. But it was identified that our compound tested for pepper anthracnose had the fungicidal activity in proportion to 80% of commercialized product's activity. After this field test, we synthesized 123 compounds more and analyzed structure activity relationship. The result of this research may be summarized as follows.

1. Without any experience in developing or commercializing environmentally-sound fungicides derived from nature substance, we laid the foundation of screening a lead compound from nature substance. systematic screening methods was settled by screening of 473 compounds.
2. We secured 9 candidates which have fungicidal activity for anthracnose and gray mold pathogen.  
plant disease : compound code name (efficacy at 100 ppm)  
anthracnose : DBF 12078(92.9%), DBF 12079(92.9%), DBF 12075(96.4%),  
DBF 12080(96.4%), DBF 12098(90.9%), DBF 12192(94.2%),  
DBF 12203(90%)  
gray mold : DBF 12086(93.6%), DBF 12114(98.0%)

3. We detected the fungicidal activity of fluoro for cucumber anthracnose.

4. We formulated a stable screening system.

The maintenance of important pathogens

The learning of optimized conditions for inoculation methods and disease development

The standardization of disease assessment

## 2. Recommendation

The safe and environmentally-sound pesticides have been emphasized because many presently used pesticides have environmental and toxic problems. To develop more effective and low-toxic fungicides, it was necessary to establish a good screening system and operation ability. Although we didn't attain our ultimate object from this research, we think that this research could be good resource for developing new fungicides as follows.

a. Screening system established by this research could be usefully applied to other research for development of new environmentally-sound fungicides

b. 9 lead compounds which is can be applied for development of new fungicides were selected

The results of this research could be useful reference for development of new fungicides. To realize commercialization of new fungicides, more researches deeply based on physico-chemistry are necessary.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	17
1. Objectives and necessity -----	17
Chapter 2. The trend of internal external technical development -----	21
1. The trend of internal external technical development -----	21
Chapter 3. Selection of lead compounds and derivatives synthesis -----	23
1. Introduction -----	23
2. Synthesizing derivatives and screening natural compounds which have fungicidal activity -----	23
3. 1st and 2nd screening of derivatives -----	36
4. Results and discussion-----	39
Chapter 4. Synthesizing derivatives and screening-----	71
1. Introduction -----	71
2. Synthesizing and selecting optimized compounds by modification of functional groups-----	71
3. Field test, formulation, toxicity test and patent applying of selected compounds-----	78
4. Results and discussion-----	88
Chapter 5. Searching candidate compound and fungicidal activity test-----	100
1. Introduction -----	100
2. Synthesizing and selecting optimized compound by modification of functional groups -----	100
3. Results and discussion-----	112

Chapter 6. The achievement and devotion-----	130
1. The achievement of objects -----	130
2. Devotion to related Fields -----	132
Reference -----	133

# 목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	8
contents	13
목차	15
제 1 장 서론	17
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	17
제 2 절 국내외 기술개발 현황	21
제 1 절 국내외 기술개발 현황	21
제 3 장 선도화합물의 선정 및 유도체 합성	23
제 1 절 서론	23
제 2 절 살균 효능을 지닌 천연물 및 유도체 합성	23
제 3 절 합성된 유도체의 1, 2차 screening을 통한 효과 검정	36
제 4 절 결과 및 고찰	39
제 4 장 유도체 화합물의 합성 및 생물활성검정	71
제 1 절 서론	71
제 2 절 최적화합물 합성, 선정 및 작용기의 집중적인 합성	71
제 3 절 선정된 최적화합물의 포장시험, 제형화, 독성시험 및 특허 출원	78
제 4 절 결과 및 고찰	88
제 5 장 후보물질 탐색 및 활성평가	100
제 1 절 서론	100



제 2 절	최적화합물의 집중합성을 통한 신규 살균제 후보물질의 탐색	-----100
제 3 절	결과 및 고찰	-----112
제 6 장	목표 달성도 및 관련분야 기여도	-----130
제 1 절	목표 달성도	-----130
제 2 절	관련분야 기여도	----- 132
참고문헌		----- 133

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

식물들은 1차 대사산물의 생합성 과정을 통하여 미량의 2차 대사산물 즉, 식물의 자기 보호, 자신의 생활지역 보호 그리고 화분 및 종자를 확산시키는 역할 등을 하는 물질들을 생성한다. 인간은 이러한 2차 대사산물들을 장기간 섭취하여 왔으며, 현재는 식품, 약용 및 음료 등으로 다양하게 이용되고 있다. 이런 성분들은 현재까지 약 18,000 여종이 보고되었다. 식물종마다 각기 독특한 물질을 가지고 있다고 가정해 볼 때 지금까지 보고된 2차 대사산물의 비율은 식물이 만들어내는 전체 대사산물의 약 3~4% 정도로 추정된다. 식물성분들은 2차 대사산물인 alkaloids, terpenoids와 phenol 등으로 구성되어 있으며 식물오일은 향(aroma)의 치료(therapy)를 의미하는 아로마세라피(aromatherapy)를 통해 근래에 대중에게 본격적으로 알려지기 시작했다. 식물오일은 수증기 증류법에 의해 얻거나, 과실의 과피로부터 얻어지는 천연물을 말하며, 식물의 광합성에 의해 전환된 성분이 생화학적 반응에 의해 1차 대사산물을 생성하고 축합, 산화, 환원 및 고리화 등의 여러 반응에 의해 생성된 “plant essence”로 정의할 수 있다. 식물의 잎, 꽃, 껍질, 뿌리, 과피 등의 일부분이나 식물 전체로부터 추출된 식물오일은 휘발성이 강한 mono 및 sesquiterpenoid가 다량 함유되어 있다. 이러한 식물에서 얻어지는 오일은 동서양을 막론하고 아주 오래 전부터 종교 의 식용, 의학용 이외에도 미용을 목적으로 이용되어 왔으며, 근래에는 식품첨가제, 화장품, 향료와 의약품 등으로 생활필수품이 될 정도로 다양한 용도로 사용되고 있다.

또한 근래에 식물오일들이 지니는 독특한 향기를 활용하기 위한 목적 이외에도 기능성 식품, 기능성 화장품, 향기요법치료제와 환경개선용 방향제 등으로도 용도가 확대되고 있다. 이에 발맞춰 식물오일을 구성하고 있는 각종 구성성분들의 생리활성 규명을 위한 연구도 많이 수행되고 있다. Rosemary, lavender, eucalyptus,

lemongrass 및 peppermint 오일에 대한 항균활성실험 결과 대부분의 식물오일에서 활성이 보고되고 있으며, 인체에 대해서도 많은 약리 활성이 보고되고 있다. 예를 들어 clove 오일의 경우는 사람의 혈소판 응집 억제효과가 있고, lomonene은 체장, 유도 및 전립선 종양에 대한 항종양효과가 보고되고 있다. Thymol, carvacrol, *p*-cymene 및 *r*-terpinene등을 다량 포함하는 oregano 오일의 경우는 살충 및 유전독소 효과가 있어 관심의 대상이 되고 있으며, 향기치료에 대한 연구로 garlic, camomile 오일의 살균작용, rosemary 오일의 진해작용, thymol 및 sage 오일 등의 이뇨작용, basil 오일의 진정작용, lemon 오일의 해독 및 항독 작용, lavender 오일의 편두통 치료 등에 대해 효과가 있다고 보고된 바 있다. 이러한 다양한 식물오일의 종류 및 주요성분 차이에 의해서 현재 상업적으로 개발된 식물오일의 종류에는 eucalyptus 오일 등 수백 가지 이상이다. 식물오일 자체의 활성연구와 각 오일의 성분 분리, 분석 등을 통해 각 성분에 대한 연구들이 진행되어지고 있으며 이러한 연구들 중 식물이 자기방어 물질로 생산되는 2차 대사산물 및 그 주성분을 이용하여 식물에 발생하는 병충해를 방제하는 새로운 환경친화적 작물보호제 개발연구로 이어지고 있다.

## 1. 기술적 측면

새로운 작물보호제의 개발은 미국, 영국, 독일, 프랑스, 스위스, 일본 등의 선진국에서 주로 이루어져왔다. 국내 작물보호제 산업은 외국기술에 의존도가 매우 높고, 취약한 실정이며, 향후 신물질을 소유하지 않고서는 선진국에 의한 기술적 종속을 피하기 어렵다. 신 작물보호제 개발을 위한 독창적인 선도물질의 확보는 그 물질의 화학구조를 논리적으로 변형하고 유기합성으로 많은 화합물을 대량 확보하여 생물에 대한 활성이 높은 화합물을 선별하고, 단점을 개선한 최적화합물을 도출하는데 매우 중요하다. 생리활성 천연물들은 기원전부터 의약품으로 이용되기 시작하였으며 18세기말부터 천연물의 분리가 본격적으로 시도되었다. 지구상에는 약 40만종의 식물이 존재한다고 알려져 있고 이들 식물체내에는 수많은 2차 대사산물이 포함되어 있으

며 이들을 대별하여 보면 terpenoid, alkaloid, phenol화합물과 flavonoid계 물질 등으로 나눌 수 있다. 천연물(이차 대사산물) 유래 작물보호제는 농업 생산성 향상에 매우 큰 기여를 하였는데, 유기 합성제에 비하여 생분해성, 작물 선택성, 독특한 작용기작, 저독성 등에서 많은 장점이 있으므로 천연 선도물질은 신 작물보호제 개발에 있어서 중요한 출발 물질이며, 이런 구조를 이용한 경쟁력을 지닌 합성물질(유도체 포함)의 개발이 절실히 필요하다. 천연물로부터 새로운 살충제 또는 살균제들에 대한 연구는 전 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있으며, 천연물로부터 이 분야에 새로운 선도물질을 도출하여 친환경적이며 생리활성이 매우 큰 새로운 작물보호제의 개발이 시급히 요구되고 있는 실정이다.

## 2. 경제·산업적 측면

우리나라에서 판매되는 작물보호제의 원제는 대부분 선진국으로부터 수입되고 있으며, 1987년 물질특허제도 도입으로 신물질을 도입하는데는 막대한 기술료를 지불해야 한다. 게다가 선진외국기업들은 국내 작물보호제 회사를 적극적으로 인수하여 사업하는 양상으로 바뀌고 있어 국내 작물보호제 산업 시장은 더욱 어려워져 국내 자체적으로 신 작물보호제 개발은 점점 어려워지고 있는 실정이다. 외국 다국적 작물보호제 원제회사들의 국내 제조회사 인수로 원제 수급상 변화가 예상되며 이에 따라 독자적인 제품 개발이 더욱 중요해지고 있다. 유망한 천연 선도물질의 독자적인 발견, 유도체 합성, 신공정 개발 등의 신 작물보호제 개발은 정밀화학 산업발전에 상승효과가 기대되며, 고부가가치 신 작물보호제의 개발은 수입대체효과 뿐만 아니라 외국에 수출효과도 있어서 국가이익에 공헌할 수 있다. 본 연구개발은 직접적으로는 국내 작물보호제 산업의 활성화, 간접적으로는 관련 유기, 무기화학, 정밀화학 분야, 종자산업 등에 고용창출과 산업발전에 기여할 것으로 기대된다.

### 3. 사회·문화적 측면

환경오염에 관한 규제가 점점 심화됨에 따라 천연자원에서 유래한 물질의 개발이 더욱 중요시 되고 있다. 천연물 유래 작물보호제는 일반유기화합물의 잔류 독성 및 자연 환경 오염 등의 많은 부작용과는 달리, 생분해성이 높고, 동식물 및 자연환경 독성이 매우 낮은 환경친화형 물질로 환경보호에 이바지할 수 있다. 21세기는 자원을 무기화시키는 경쟁체제가 예상되므로 농업용 작물보호제의 개발은 식량자원보호를 위한 기술 자립화에 매우 중요하다 할 수 있다. 본 연구는 대학의 기초지식과 연구기능, 실용성을 추구하는 산업계의 상업화 기술 등을 유기적으로 연결하고 상호 보완하여 신제품을 개발하고자 하는 것이므로 이상적인 산학협동의 관계 형성에 크게 기여할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 전 세계적으로 시판되고 있는 여러 종류의 식물 essential oil(thyme oil의 41종)들을 사과점무늬낙엽병(*Alternaria alternata f. sp. mali*)등 10종의 식물성 병원균에 미치는 효과를 조사한 결과 몇몇 essential oil들에서 매우 탁월한 효과가 있음을 알았다. 생리활성이 있는 essential oil들의 주성분들을 Gas chromatography, GC/MS 등 여러 분석기기들을 이용하여 확인하고 이들 주성분(단일성분)들의 생리활성을 연구하여 효과가 높은 화합물들을 몇 개의 선도물질로 결정하고 화학적으로 여러 가지 유도체들을 합성하여 식물에서 유래된 새로 살균제를 개발하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 기술개발 현황

최초의 유기합성 작물보호제인 DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane)가 실용화된 1938년 이후부터 작물보호제의 중요성이 입증되었으며, 그 후 유기염소, 유기인 및 카바메이트계 등의 수많은 작물보호제가 개발 및 시판되었다. 그러나 인구증가로 농업생산성 향상 및 위생해충의 구제를 위해 질병퇴치정책으로 유기합성 작물보호제를 적극 사용 권장한 결과 많은 문제점들이 발생하였다. 식량증산과 보건향상에 커다란 효과는 올렸으나, 이러한 결과로 인하여 천적, 유용균 및 곤충의 개체수 감소, 야생동물 및 어류에 대한 악영향, 인축독성, 토양 및 식품 잔류, 그 이외의 각종 환경 오염문제 등의 부작용이 점차 나타나기 시작했다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 작물보호제의 역기능에 대하여 새롭게 개발되는 신 작물보호제는 좀 더 친환경적인 제품을 요구하고 있으며, 등록기준 또한 점점 까다롭게 바뀌고 있다. 대략 1980년대 이후 개발된 신물질 작물보호제들은 고효성, 저독성, 저잔류를 특징으로 하는 환경친화적 제품들이다. 그러나 이들 개발 물질들 또한 현재에는 많은 문제점들 야기하고 있다. 최근 신 작물보호제 개발에 대하여 살펴보면 기존의 화학 작물보호제의 단점들을 보완하기 위하여 천연에 존재하는 물질을 이용하거나 화학 작물보호제와 병용 혹은 천연물을 선도화합물로하여 유도체 개발등을 통하여 새로운 환경친화적인 작물보호제의 연구가 활발히 진행되고 있다. 고효성, 저독성, 안전성, 경제성 등을 갖는 환경 친화적인 물질로서 작물보호제의 기능은 최대화하고 역기능은 최소화한 환경친화적 신물질 작물보호제만이 개발가치를 가지고 있다고 할 수 있다. 이를 통해 최근 연구되어지고 있는 신물질의 탐색대상으로 천연물이 주목받고 있다. 작물보호제 산업에서 대부분의 합성원료나 원제개발은 선진국의 대규모 다국적기업(예: FMC, Bayer, BASF, DowAgro Science, Dupont 등)에 의하여 독점되고 있다.

이에, 국내 신 작물보호제 개발의 기술수준은 선진국과 상당한 격차(특히 중간체 및 신물질개발능력)를 보이고 있으며 발전단계상으로 볼 때 선진국인 경우 성장기에서 성숙기로 이행하는 과정에 있으나 우리나라는 도입기말 또는 성장초기에 해당된다고 볼 수 있다. 국내 작물보호제 개발상황을 살펴보면 1996년 한국화학연구소에서 개발하여 정보화학에 양도한 배추좀나방을 방제하는 KH-502가 국내 신물질 연구사상 처음으로 등록되었으며, 1997년에는 LG화학에서 신물질 제초제 피안커(LGC-40863, Pyribenzoxim)가 등록과 동시에 국내 판매되기 시작하였고, 1999년에는 신물질 살균제 가디언(LGC-30473, Ethaboxam)이 등록을 마치고 판매되기 시작했다. 따라서 국내 신물질 작물보호제 개발은 아직 미흡한 상황이며 천연물에서 유래된 살균제 신물질 개발은 전무한 실정이다. 선진 각국, 특히 일본을 중심으로 선도물질을 천연자원에서 찾는 연구가 매우 활발한데, 천연물로부터 신 작물보호제 개발은 개발 기간이 오래 걸리고 비용이 많이 드는 단점이 있으나, 독창적인 활성 선도물질을 창출해 낼 수 있고, 환경친화적이므로 일단 개발하면 장기간 매우 유리한 여건에서 기존의 작물보호제에 대해 경쟁 우위를 점할 수 있다. 천연물을 이용한 신 작물보호제 연구를 살펴보면 다음과 같다. Terpenoid계 화합물의 대표적인 살충성분으로는 pyrethrin을 들 수 있으며 pyrethroid는 제충국의 꽃에 함유된 살충성분이다. pyrethrin을 모핵 화합물로 하여 최초로 그 계열의 합성 작물보호제인 allethrin이 개발되었으며, 그 후 살충성이 뛰어난 bioresmethrin, fenvalerate가 개발되었다. Phenol계 화합물들 역시 높은 살충활성을 보이며 이들 물질들은 살충 및 살어성 물질로 이용되고 있으며, rotenone은 포유동물에 대한 독성이 극히 낮은 반면 곤충에 대해서는 높은 살충력을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 식물체로부터 분리된 아미노산계 화합물들이 높은 살충효과를 나타내는 tricholomic acid와 isotenic acid가 각각 분리되었으며 이들로부터 isoxathion 살충제가 개발되었다. Physostigmine은 아프리카 식물에서 발견되는 독성성분으로 carbamate 계열의 살충제를 개발하게 되었다. 또한 버섯에서 strobilin 이라는 물질을 분리 동정하여 이 구조를 이용하여 strobilurin 계열의 약제인 azoxystrobin, trifloxystrobin 등이 개발되었다.

## 제 3 장 선도화합물의 선정 및 유도체 합성

### 제 1 절 서 론

환경친화적인 신 작물보호제 개발의 토대를 마련하기 위하여 본 연구에서는 식물오일로부터 식물병원균에 대한 생리활성을 검증하였다. 여러 식물오일 중 활성을 보인 식물오일의 성분을 분석하고, 각 성분들에 대하여 생리활성실험을 실시하였다. 활성을 나타내는 성분과 유도체들에 대한 생리활성실험을 통하여 친환경적인 살균활성을 갖는 새로운 살균제를 개발하거나 선도물질로 이용가능성을 제시하고자 한다.

### 제 2 절 살균 효능을 지닌 천연물 및 유도체 합성

#### 1. 살균 효능을 지닌 천연물의 선별

새로운 친환경적인 살균제를 개발하기 위하여 식물에서 추출한 식물오일 42종을 대상으로 사과 점무늬낙엽병균 (*Alternaria alternata* f. sp. *mali*)의 10종에 대한 생리활성을 실험하였다.

#### 가. 재료 및 방법

식물병원균에 대한 생리활성실험은 제조된 PDA(potato dextrose agar) 배지 중심에 5 mm의 식물병원균 코어를 배지면과 균사면이 맞닿도록 접종한 후 접종균이 일정 크기만큼 성장하도록 배양하였다. 일정크기까지 배양된 식물병원균에 각기 다른 4개의 시험약제 80  $\mu$ l를 paper disc에 점적하여 균사생장부위로부터 15 mm가량 떨어진 곳에 3, 6, 9와 12시 방향으로 치상하였다. 시험약제는 thyme 오일 외 42종의 식물오일을 DMSO 2.4 ml에 식물오일 0.6ml를 희석하여 20%농도의 시료로 만들어 사용하



였다. 위와 같이 약제처리 후 병원균의 성장속도시간(48~96h)에 따라 배양시간을 달리하여 군사생장지름이 80 mm가 될 때까지 배양하고 생육저지원의 지름을 측정하여 생리활성실험을 수행하였다.

## 2. Thyme 오일과 그 주요성분들의 생리활성실험

식물병원균에 대한 생장억제가 가장 우수한 식물오일인 thyme 오일을 GC/MS-spectrum을 이용하여 주요성분들을 분석하고 thymol, carvacrol, borenol, *p*-cymene 과 linalool의 5가지 화합물이란 것을 확인하고 thyme 오일과 5가지 주요성분에 대해 생리활성을 측정하였다.

### 가. 재료 및 방법

Thyme 오일과 주성분들의 생리활성효과를 측정하기위해 thyme 오일과 주성분을 PDA 배지에 250 ppm과 50 ppm의 농도가 되도록 혼합하여 배지를 제조하였다. 제조된 배지에 5 mm의 식물병원균 원형 코아를 배지면과 맞닿도록 접종한 후 병원균의 성장속도시간(48~96)에 따라 배양시간을 달리하여 군사생장지름이 80 mm가 될 때까지 배양하고 군사생장지름을 측정하여 생리활성실험을 하였다.

## 3. 포자발아율 측정 실험

Thyme 오일 주성분 중 가장 생리활성이 우수한 thymol과 carvacrol의 포자발아 시험을 수행하였다.

### 가. 재료 및 방법

Thyme 오일 주성분 중 가장 생리활성이 우수한 thymol과 carvacrol의 포자발아에 대한 생리활성을 관찰하기위해 50, 100 및 250 ppm의 약제혼합배지 제조 후 포자를 도말하여 포자발아율을 측정하였다. 계대배양한 식물병원균에서 포자를 멸균수로 분리하여 hemacytometer를 이용하여  $1.0 \times 10^5$  unit/ml씩 포자 현탁액을 제조하고 약제혼합배지에 100 $\mu$ l씩 도말하였다. 15시간동안 배양 후 저온실험상 (4 $^{\circ}$ C)에 보관하며

광학현미경( $\times 1000$ )으로 포자발아율을 측정하였다. 총 포자수 중 발아관의 길이가 포자길이의 2배 이상인 포자수를 총 포자수에 비례하여 포자 발아율 (%)로 측정하였다.

#### 4. Thymol과 carvacrol 유도체들의 생리활성실험

##### 가. 재료 및 방법

Thymol이나 carvacrol과 유사구조를 갖는 alkylphenol 유도체들인 2-*tert*-butyl-5-methylphenol, 2,5-dimethylphenol, *m*-cresol, 2-isopropylphenol, 3-isopropylphenol, 4-isopropylphenol, 4-isopropyl-3-methylphenol 및 5-isopropyl-3-methylphenol과 alkyraniline 계 유도체인 2-isopropylaniline, 4-isopropylaniline 및 2-isopropyl-6-methylaniline들에 대하여 250 ppm 농도의 PDA혼합배지를 사용하여 생리활성실험을 하였다.

#### 5. Alkylphenol계 유도체 합성

선정된 thymol과 carvacrol, 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropylphenol과 4-isopropylphenole을 선도물질로 하여 ester, sulfonyl ester, carbamate, ether와 phosphoyl ester 계 유도체 146종을 합성하였다. 합성의 확인은 IR,  $^1\text{H-NMR}$ , GC/MS-spectrum을 이용하였다. 이들 유도체들에 대하여 식물병원균의 생장억제 실험은 위 식물오일실험에서 사용한 식물병원균과 동일한 방법으로 실시하였다.

##### 가. 재료 및 방법

##### Alkylphenol계 유도체 합성

Thymol(I), carvacrol(II), 4-isopropyl-3-methylphenol(III), 5-isopropyl-3-

methylphenol (IV), 2-isopropylphenol(V)과 4-isopropylphenol(VI)을 출발물질로 하여 phenol의 OH기를 ester, sulfonyl ester, carbamate, ether와 phosphoyl ester 계열의 화합물로 변화된 여러 유도체들을 합성 하였다. 각 유도체들의 합성방법은 1)~5)에 나타내었다.

#### 1) Ester 화합물의 합성

Alkylphenol들에 대한 ester 유도체들에 대한 합성방법의 한 예는 다음과 같으며 다른 화합물들도 유사한 방법으로 합성하였다.

#### 2-Isopropyl-5-methylphenyl acetate 합성방법

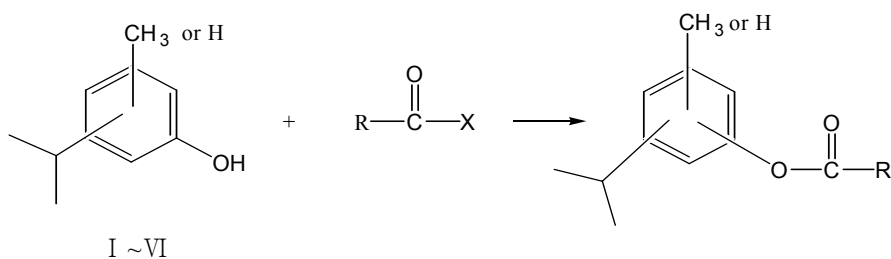
Thymol 1.5 g(9.98 mmol)을 acetonitrile 20 ml에 용해시키고 triethylamine 2.27 ml을 가하여 실온에서 30분간 교반하였다. 온도를 0℃로 조절하고, acetyl bromide 2.34 ml(1.88 mmol)을 0~5℃에서 20분간 천천히 적가 하였다. 온도를 실온으로 올리고 3시간 동안 반응하였다. 반응이 완결된 후 이 반응액에 염화메틸렌 30 ml와 증류수 20 ml를 가하고 30분간 교반시키고 유기층을 증류수로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산 마그네슘 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 목적물 1.7g (I-1a)를 얻었다. 그 외 다른 ester 계 화합물 또한 위와 유사한 방법으로 합성하였다.

IR (KBr disk,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1750(-OCO-)  
GC/MS (m/e) : 192( $M^+$ ), 135(base peak)  
RT (min.) : 11.2

#### 합성결과

합성여부의 확인은 IR, GC/MS-spectrum과 필요한 경우  $^1\text{H-NMR}$ -spectrum을 이용하였다. 한 예로 2-isopropyl-5-methylphenyl acetate(I-1a)의 확인은 GC/MS-spectrum에서 GC-크로마토그램의 R.T(retention time) 11분에서 단일 peak

를 나타남으로 순수한 물질로 합성되었음을 확인 할 수 있었다. mass-spectrum에서 분자량이 192(M<sup>+</sup>)로 이론치와 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었으며 전하량(m/e)이 177, 150, 135(base peak)인 특징적인 peak 들을 확인 할 수 있었다. 또한 IR-spectrum에서 1750 cm<sup>-1</sup>에서 C=O의 특징적인 peak를 확인하였다. (I-1a)의 다른 ester계 유도체들도 같은 방법으로 합성이 되었음을 확인하였다.



I : Thymol, II : Carvacrol, III : 4-isopropyl-3-methylphenol,  
IV : 5-isopropylphenol, V : 2-isopropylphenol, VI : 4-isopropylphenol

R : -CH<sub>3</sub>(I-1a, II-1a, III-1a, IV-1a, V-1a, VI-1a)

-CH<sub>2</sub>Cl (I-2a, III-2a, IV-2a, V-2a, VI-2a)

-CH<sub>2</sub>Br (I-3a, III-3a, IV-3a, V-3a, VI-3a),

-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(I-4a, III-4a, IV-4a, V-4a, VI-4a)

-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(I-5a, III-5a, IV-5a, V-5a, VI-5a),

(I-6a, III-6a, IV-6a, V-6a, VI-6a)

(I-7a, II-3a, III-7a, IV-7a, V-7a, VI-7a),

-CH<sub>2</sub>- (I-8a, II-2a, III-8a, IV-8a, V-8a, VI-8a),

-CH<sub>2</sub>- (I-9a, III-9a, IV-9a)

-CH<sub>2</sub>- (I-10a, III-10a, IV-10a)

## 2) Sulfonyl ester 유도체의 합성

Alkylphenol들에 대한 sulfonyl ester 유도체들에 대한 합성방법의 한 예는 다음과 같으며 다른 화합물들도 유사한 방법으로 합성하였다.

### 2-Isopropyl-5-methylphenyl methansulfonate( I -1b) 합성방법

Thymol 1.5 g (9.98 mmol) 을 acetonitrile 20 ml에 용해시키고, triethylamine 2.27 ml을 가하여 실온에서 30분간 교반 하였다. 온도를 0℃로 조절하고, methanesulfonyl chloride 1.18 ml (11.4 mmol)을 0~5℃에서 10 분간 서서히 적가 하였다. 온도를 실온으로 조절하여 3시간 동안 교반 하였다. 반응이 완결된 후, 이 반응액에 염화 메틸렌 30 ml 와 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하고, 30 분간 교반 시키고 유기층을 분리한다. 분리한 유기층에 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하여 30분간 유기층을 H<sub>2</sub>O로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산 마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 목적물 2.09 g을 얻었다. 그 외 다른 sulfonyl ester 계 화합물 또한 위와 유사한 방법으로 합성하였다.

IR (KBr disk, cm<sup>-1</sup>) : 1375, 1182 (-SOO-O-)

GC/MS (m/e) : 228(M<sup>+</sup>), 213(base peak)

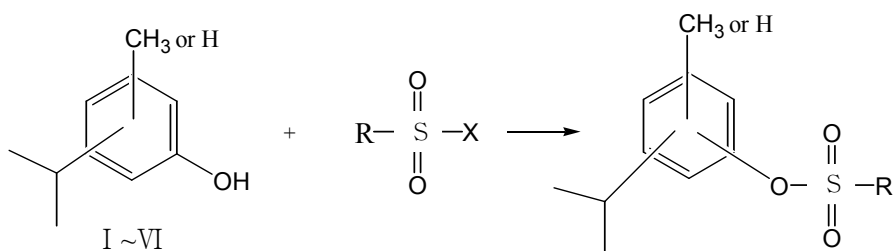
(R.T: min) : 15.7

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) ppm : 1.0-1.1 (dd, 6H), 2.1-2.2 (s, 3H), 3.0-3.1 (s, 3H), 3.2-3.3 (m, 1H), 7.2-7.3 (aromatic H)

### 합성결과

합성의 확인은 IR, GC/MS-spectrum과 필요한 경우 <sup>1</sup>H-NMR-spectrum을 이용하였다. 한 예로 2-isopropyl-5-methylphenyl-methansulfonate( I -1b)의 확인은 <sup>1</sup>H-NMR-spectrum을 보면 1.0-1.1 ppm (dd, 3H -CH<sub>3</sub>), 2.1-2.2 ppm (s, 3H -CH<sub>3</sub>), 3.0-3.1 ppm (s, 3H -CH<sub>3</sub>), 3.2-3.3 ppm (m, 1H -CH<sub>3</sub>)과 7.2-7.3 ppm (aromatic H)의 peak 들을 나타내었다.


GC/MS-spectrum을 보면 GC-크로마토그램에서 R.T(retention time) 15분대의 단일 peak를 나타냄으로 순수한 물질로 합성되었음을 알 수 있었다. Mass-spectrum에서는 분자량이 228(M<sup>+</sup>)로 이론치와 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었으며 전하량(m/e)이 213(base peak), 149, 135인 특징적인 peak들을 확인 할 수 있었다. 또한, IR-spectrum에서 1750 cm<sup>-1</sup>(-OCO-), 1213 cm<sup>-1</sup> (C-O)의 특징적인 peak를 확인하였다. (I-1b)와의 다른 sulfonyl ester계 유도체들도 같은 방법을 이용하여 합성이 되었음을 확인하였다.





I : Thymol, II : Carvacrol, III : 4-isopropyl-3-methylphenol,  
IV : 5-isopropylphenol, V : 2-isopropylphenol, VI : 4-isopropylphenol

R : -CH<sub>3</sub>( I -1b, II-1b, III-1b, IV-1b, V-1b, VI-1b),  
-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>( I -2b, III-2b, IV-2b, V-2b, VI-2b)

 ( I -3b, II-2b, III-3b, IV-3b, V-3b, VI-3b),

-Cl( I -4b, III-4b, IV-4b, V-4b, VI-4b)

-CH<sub>3</sub>( I -5b, III-5b, IV-5b, V-5b, VI-5b),

-O-CH<sub>3</sub>( I -6b, III-6b, IV-6b, V-6b, VI-6b)

-NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>( I -7b, III-7b, IV-7b)

### 3) Carbamate 유도체의 합성

Alkylphenol들에 대한 carbamate 유도체들에 대한 합성방법의 한 예는 다음과 같으며 다른 화합물들도 유사한 방법으로 합성하였다.

#### 4-Isopropylphenyl carbamate 합성방법

Chlorosulfonyl isocyanate 1.3 ml(14.68 mmole)와 염화메칠렌 15 ml를 혼합하고 반응온도를 0°C로 조절한다. 이 반응액에 4-isopropylphenol 1 g(7.34 mmole)과 염화메칠렌 15 ml의 혼합액을 0°C에서 서서히 적가한다. 같은 온도에서 2시간 반응시킨다. 반응액에 증류수 20 ml을 가하여 30 분간 교반하였다. 수층을 분리하여 상온에서 방치하면 결정이 생성된다. 생성된 결정을 여과하고 증류수로 세척하고 건조하여 목적물을 얻었다. 그 외 다른 ether 계열 화합물 또한 위와 유사한 방법으로 합성하였다

IR (KBr disk,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1706 (-C=O), 1245 (C-O)

GC/MS (m/e) : 179( $M^+$ ), 136, 121(base peak)

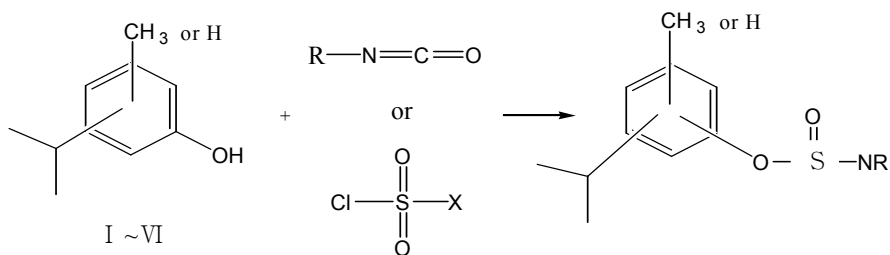
RT (min) : 14.2

$^1\text{H-NMR}$  (ppm) : 7.07 (4H, m), 2.90 (1H, m), 1.53 (2H, s), 1.25 (6H, d)

#### 합성결과

합성여부의 확인은 IR, GC/MS-spectrum과 필요한 경우  $^1\text{H-NMR}$ -spectrum을 이용하였다. 한 예로 2-isopropyl-5-methylphenyl carbamate(I-1c)의 합성확인용 GC/MS-spectrum을 보면 GC-크로마토그램에서 R.T(retention time) 14분대 단일 peak를 나타냄으로 순수한 물질로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 또한 mass-spectrum에서 분자량이 193( $M^+$ )로 이론치와 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었으며, 전하량(m/e)이 149, 135(base peak), 91, 77, 65인 특징적인 peak들을 확인할 수 있었다. IR-spectrum에서 1706  $\text{cm}^{-1}$  (carbamate, -C=O), 1245 $\text{cm}^{-1}$  (C-O)의 특징적인 peak를 확인하였다. (I-1c)외의 다른 carbamate계 유도체들도 같은 방법을 이

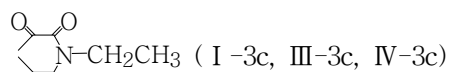
용하여 합성이 되었음을 확인하였다.



I : Thymol, II : Carvacrol, III : 4-isopropyl-3-methylphenol,  
 IV : 5-isopropylphenol, V : 2-isopropylphenol, VI : 4-isopropylphenol

R : -H<sub>2</sub>( I -1c, II-1c, III-1c, IV-1c, V-1c, VI-1c)

-H-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>( I -2c, II-2c, III-2c, IV-2c),



#### 4) Ether 유도체의 합성

Alkylphenol들에 대한 ether 유도체들에 대한 합성방법의 한 예는 다음과 같으며 다른 화합물들도 유사한 방법으로 합성하였다.

#### 2-Isopropyl-5-methoxytoluene 합성방법

Thymol 1.5 g (9.98 mmol)과 KOH 0.67 g (4.47 mmol) 과 tetrabutylammonium bromide 0.65 g (4.43 mmol)을 용매 염화 메틸렌 20 ml에 가하여 실온에서 1 시간 교반 하였다. 1 시간 교반 후에 iodomethane 3 ml (2.8 mmol)을 10분 동안 적가하여 실온에서 3시간 교반 하였다. 반응이 완결된 후, 이 반응액에 염화 메틸렌 30 ml 와 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하고, 30 분간 교반 시키고 유기층을 분리한다. 분리한 유기층에 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하여 30분간 유기층을 H<sub>2</sub>O로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산



마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 목적물을 얻었다. 그 외 다른 ether계 화합물 또한 위와 유사한 방법으로 합성하였다.

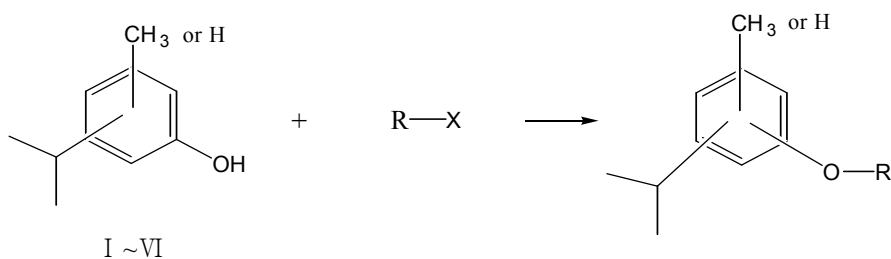
IR (KBr disk, cm<sup>-1</sup>) : 1250, 1150 (C=C-O-)

GC/MS (m/e) : 164(M<sup>+</sup>), 149(base peak)

(R.T: min) : 7.2

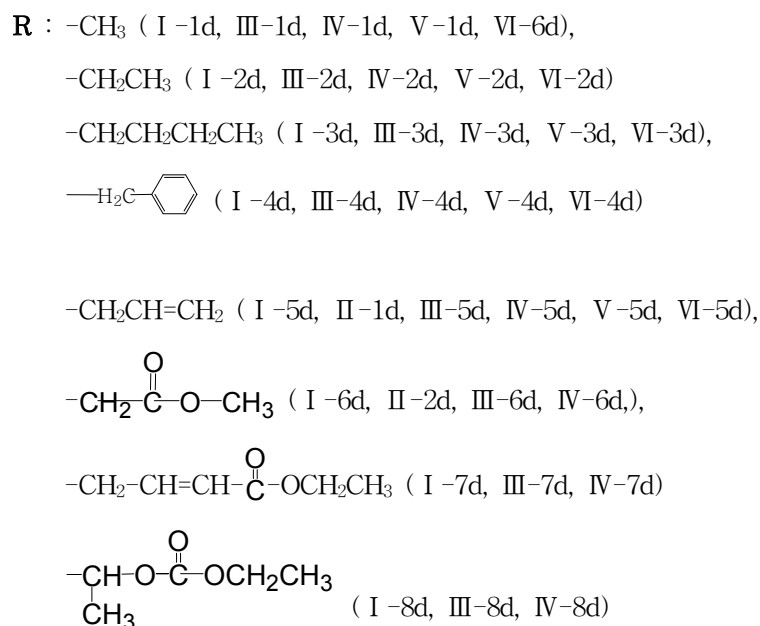
#### 합성결과

합성의 확인은 IR, GC/MS-spectrum과 필요한 경우 <sup>1</sup>H-NMR-spectrum을 이용하였다. 한 예로 2-isopropyl-5-methoxytoluene (I-1d)의 합성확인은 GC/MS-spectrum의 GC-크로마토그램에서 R.T(retention time) 7분대 단일 peak가 나타남으로 순수한 물질로 합성되었음을 확인할 수 있었으며 mass-spectrum에서 분자량이 164(M<sup>+</sup>)로 이론치와 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었다. 전하량(m/e)이 149(base peak), 135, 121의 특징적인 peak들을 확인할 수 있었으므로 합성이 되었음을 알 수 있었다. 또한, IR-spectrum에서 1250 cm<sup>-1</sup>, 1150 cm<sup>-1</sup>Aryl ether의 특징적인 peak들을 나타내었다. (I-1d)의 다른 ether계 유도체들도 같은 방법을 이용하여 합성이 되었음을 확인하였다.



I : Thymol, II : Carvacrol, III : 4-isopropyl-3-methylphenol,

IV : 5-isopropylphenol, V : 2-isopropylphenol, VI : 4-isopropylphenol



5) phosphoyl ester 유도체의 합성

Alkylphenol들에 대한 phosphoyl ester 유도체들에 대한 합성방법의 한 예는 다음과 같으며 다른 화합물들도 유사한 방법으로 합성하였다.

**Diethyl (4-isopropyl-3-methylphenoxy)phosphate의 합성방법**

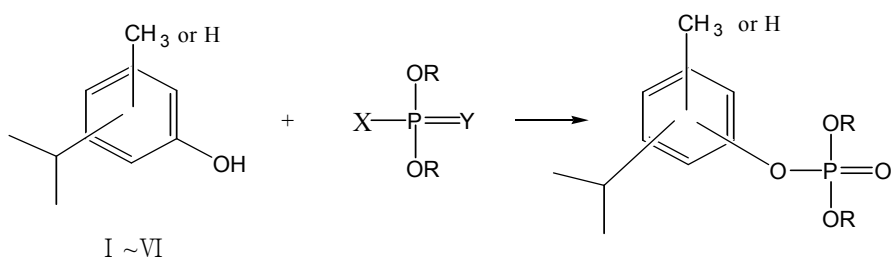
Acetonitrile 15 ml에 4-isopropyl-3-methylphenol(I) 2 g (13.31 mmol)을 용해시킨 후, 이 용액에 triethylamine 2.22 ml (15.97 mmol)과 diethyl chlorophosphate 2.32 ml (15.97 mmol)를 적가 하여 상온에서 5시간동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 이 반응액에 염화 메틸렌 30 ml 와 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하고, 30 분간 교반 시키고 유기층을 분리한다. 분리한 유기층에 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하여 30분간 유기층을 H<sub>2</sub>O로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산 마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 목적물을 얻었다. 그 외 다른 phosphoyl ester 계 화합물 또

한 위와 유사한 방법으로 합성하였다.

IR(KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1289(P=O) 1023,984(C-O) 790(P-O)  
GC/MS(m/e) : 286( $\text{M}^+$ ), 271(base peak)  
(RT, min) : 17.8

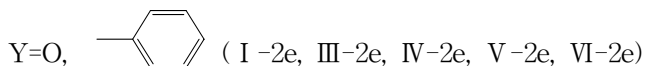
#### 합성확인

합성여부의 확인은 IR, GC/MS-spectrum과 필요한 경우  $^1\text{H-NMR}$ -spectrum을 이용하였다. 한 예로 diethyl 2-isopropyl-5-methylphenoxyphosphate( I -1e)의 합성 확인은 GC/MS- spectrum을 보면 GC-크로마토그램에서 R.T(retention time) 17분대 단일 peak를 나타냄으로 순수한 물질로 합성되었음을 확인하였다. mass-spectrum에서 분자량이 286( $\text{M}^+$ )로 이론치와 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었으며 전하량이 279, 259, 246, 229, 197, 149(base peak)인 특징적인 peak들을 확인할 수 있었다. 또한 IR- spectrum 에서  $1290\text{ cm}^{-1}$ (P=O),  $1030\text{ cm}^{-1}$ (P-O)의 특징적인 peak들을 나타내었다. ( I -1e)외의 다른 phosphoyl ester계 유도체들도 같은 방법을 이용하여 합성이 되었음을 확인하였다.



I : Thymol, II : Carvacrol, III : 4-isopropyl-3-methylphenol,  
IV : 5-isopropylphenol, V : 2-isopropylphenol, VI : 4-isopropylphenol

R : Y=O, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>( I -1e, II -1e, III-1e, IV-1e, V -1e, VI-1e)



Y=S, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>( I -3e, III-3e, IV-3e)

## 6. Alkylphenol계 유도체의 생리활성실험

합성한 alkylphenol계 유도체의 생리활성 시험을 다음과 같이 수행하였다.

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 식물병원균의 계대배양

분양받은 식물병원균 사과 점무늬낙엽병(*Alternaria alternata f. sp. mali*), 고추 역병균(*Phytophthora capsici*), 입고병(*Pythium ultimum*), 감자 역병균(*Phytophthora infestans*), 고추 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 잔디 브라운팻치병균(*Rhizoctonia solani*), 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 오이 탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*), 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*)과 푸른곰팡이(*Trichoderma virens*)에 대하여 PDA 고체배지에 계대배양 하였다. PDA 고체배지의 제조는 PDA 3.9 g을 물 100 ml 용해하여 고온멸균기에서 15분간 1.5 기압에서 121℃로 멸균하였다. 그 후 배지온도를 60℃까지 낮추고 페트리디쉬에 균일하게 분주하여 계대배양 배지로 사용하였다. 제조한 배지에 분양받은 식물성병원균들의 원형코아를 5 mm씩 접종하여 암실조건, 20-25℃, 습도 70%에서 균주에 따라 4~7 일간 계대배양하여 생리활성측정실험에 사용하였다.

#### 2) 식물병원균의 생장억제 실험

식물병원균에 대한 생리활성을 측정하기 위하여 각종 시료는 다음과 같이 제조하였다. 대조군의 시료는 DMSO 0.1 ml, 유도체 시료는 유도체 0.1 g을 DMSO 0.9 ml에 용해시켜 제조하고, 사과점무늬낙엽병(*Alternaria alternata f. sp. mali*)의 공시약제시료인 폴리옥신 수화제(순도 10%)의 경우 1 g을 증류수 0.9 ml로 용해시켜 제조하였다. 시험에 사용된 공시약제와 합성유도체의 최종실험농도는 100 ppm 으로 일

치시켰다. PDA 고체배지의 제조는 PDA 3.9 g을 증류수 100 ml에 용해시키고, 고온 멸균기에서 15 분간, 1.5 기압에서 121℃로 멸균하였다. 그 후, 배지 온도를 60℃까지 낮추고 위에서 제조한 시료를 각 10  $\mu$ l를 가하여 혼합한 후, 페트리디쉬에 균일하게 분주하여 대조군, 유도체 그리고 공시약제배지를 제조하였다. 제조한 배지에 계대배양된 식물성병원균의 원형 코아를 접종하여 암실조건, 20-25℃, 습도 70%에서 4일간 배양하여 균주의 병반크기를 측정하였다.

### 제 3 절. 합성된 유도체의 1,2차 Screening을 통한 효과 검정

기존의 screening 매뉴얼보다 체계화된 screening방법을 이용하여 *in vitro* 1차 시험에서 선발된 신규합성물질 12종에 대하여 다음과 같이 와 같은 실험을 수행하였다.

#### 1. 오이 잿빛곰팡이병 방제효과

##### 가. 재료 및 방법

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고무 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 잿빛곰팡이균(*Botrytis cinerea*)의 접종은 병원균의 분생포자를 수확하여 potato dextrose broth에  $1 \times 10^5$  spores/ml의 밀도로 희석액을 준비하여 1.3엽기 오이의 잎에 고르게 spray하였다. 접종된 오이는 23℃의 Dew chamber에서 48시간 발병유도한 후 항온항습실(25℃)로 옮겨 3일후 결과를 조사하였다. 잿빛곰팡이병에 상대적으로 저항성 유발가능성이 적은 dichlofluanid를 대조약제로 사용하였다.

#### 2. 오이 탄저병 방제효과시험

##### 가. 재료 및 방법

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도

는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 오이 탄저병(*Colletotrichum orbiculare*)의 접종은 병원균의 분생포자를 수확하여  $1 \times 10^5$  spores/ml의 밀도로 희석액을 준비하여 1.3엽기 오이의 잎에 고르게 spray하였다. 특히 오이 탄저병균의 배양기간이 길어지면 포자의 내부가 비는 현상이 나타나므로 접종원은 7일 이내의 것으로 사용하는 것이 적절하다. 접종된 오이는 25°C의 Dew chamber에서 48시간 발병유도한 후 항온항습실(25°C)로 옮겨 2일 후 결과를 조사하였다.

### 3. 오이 흰가루병 방제효과시험

#### 가. 재료 및 방법

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한 후 최종 농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 오이 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)의 접종은 이병주의 포자를 붓으로 수거하여 직접 시험작물에 접종하는 방법을 이용하였고, 흰가루병균은 순환물기생균이므로 오이 유묘를 계대배양하면서 접종원을 유지하였다. 접종된 오이는 28°C의 온실에서 발병유도하여 6일 후 병반면적율을 조사하였다.

### 4. 토마토 잎마름역병 방제효과시험

#### 가. 재료 및 방법

크로미스타계 균류에 속하는 난균문(역병, 노균병)에 대한 약효를 검증하기 위하여 약제 처리 24시간 후 병원균을 접종하여 병반면적율 조사하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한 후 최종농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 토마토 잎마름역병(*Phytophthora infestans*)은 주키니 호박의 표면에 칼집을 내어 그 사이에 역병균의 disc를 삽입한 후 명상태의 20°C 항온기에서 3일간 배양한 후 표면에 형성된 유주자낭을 광학현미경으로 확인한다.  $1 \times 10^4$  sporangia/ml

의 농도로 본엽 2-3엽의 작물체 경엽에 고루 살포하여 23°C Dew chamber에서 3일간 발병을 유도한 후 병반면적율을 조사하였다.

#### 5. 벼 잎도열병 방제효과시험

##### 가. 재료 및 방법

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한 후 최종농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다.  $1 \times 10^5$  spores/ml의 농도로 접종원을 준비하고 일품벼 본엽 3-4엽시 고루 살포한다. 접종된 작물은 25°C Dew chamber에서 48시간 동안 발병을 유도한 후 항온항습실(RH 80% 이상)에 옮겨 4일후 병반 개수를 조사하였다.

#### 6. 벼 잎집무늬마름병 방제효과시험

##### 가. 재료 및 방법

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한 후 최종농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 밀기울배지를 조제하여 30분씩 2회 멸균한후 PDA배지에서 배양한 벼 잎집무늬마름병균의 균총을 10개정도 밀기울 배지에 접종한다. 27°C에서 5일간 배양한 밀기울배지 접종원을 본엽 3-4엽의 작물체 지제부에 접종한다. 접종된 작물체(추청벼)는 26°C Dew chamber에서 3일간 발병을 유도하여 26°C 항온항습실에 옮겨 4일후 잎집에 발생된 병반의 높이(병반고)을 조사하였다. 약제처리 24시간 후 병원균을 접종하였고 각 합성물질의 예방효과 결과는 체계화된 조사방법에 의해 조사하였다. 각 병원균에 의해서 발생하는 병징의 유형에 따라 병반면적율, 병반고 및 병반수중 효과과약이 용이한 방법을 선택하였으며, screening에 사용된 대조약제는 기존에 개발된 작물보호제중 대상병원균에 대해서 가장 효과가 우수하거나 저항성 유발이 보고되지 않은 약제를 사용하였다. *in vivo* screening의 처리농도는 예비시험을 통해 적정농도를 찾아 수행하였다.

## 제 4 절 결 과 및 고 찰

1. 살균 효능을 지닌 천연물의 선발시험 결과

Thyme 오일등 43종의 식물오일들의 식물병원균에 대한 생리활성 실험결과, hyme, clove bud, rose geranium과 sassafras 오일이 식물 오일 중 생리활성을 나타내었다(표 1).

표 1. 식물오일들의 생리활성 시험결과 (DMSO 20%)

식물오일	병원균									
	생육저지원 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추 탄저 병균	잔디 브라운 팻치병균	젯빛 곰팡이 병균	오이 탄저 병균	벼 도열병 균	푸른 곰팡이균
aniseed	-	-	-	-	18	16	-	-	-	-
arnica flower	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
citronella leaf	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-
clove bud	30	33	-	-	25	25	25	-	-	20
eucalyptus leaf	-	-	-	-	11	15	-	-	-	-
fennel seed	-	-	-	-	14	13	-	-	-	-
frankincens estem	13	12	-	-	-	-	-	-	-	10
grapefruit peel	-	-	-	-	12	-	10	15	-	-
hypericum herb	-	10	-	-	-	-	-	-	-	10
juniper beery fruit	-	-	-	-	12	-	-	-	20	-



표 1. 식물오일들의 생리활성 시험결과 계속 (DMSO 20%)

식물오일	병원균									
	생육저지원 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추 탄저 병균	잔디 브라운 팻치병균	젯빛 곰팡이 병균	오이 탄저병 균	벼 도열병 균	푸른 곰팡이균
lavender leaf	25	12	20	20	10	-	-	-	-	-
myrth	-	15	15	15	-	-	-	-	-	-
patchouli leaf	17	12	20	20	10	-	-	-	-	-
petitgrain amara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rosemary leaf	20	15	-	-	13	-	-	25	-	-
neem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rose geranium	37	20	50	30	15	-	-	50	40	15
turmeric	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
galangal	-	-	-	-	11	-	20	-	10	10
sandalwood	-	-	-	-	10	-	-	25	-	-
ravensara	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
anise star	-	-	-	-	11		20	-	-	10

표 1. 식물오일들의 생리활성 시험결과 계속 (DMSO 20%)

식물오일	병원균 생육저지원 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추 탄저병 균	잔디 브라운 패치병균	젓빛 곰팡이 병균	오이 탄저병 균	벼 도열병 균	푸른 곰팡이 균
tea tree	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mandarin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
black piper	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
petirgrain	-	-	-	-	11	-	20	-	-	10
sassafras	37	15	-	-	15	15	15	35	-	-
thuja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nutmeg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
thyme	30	30	-	-	40	12	30	-	-	20
ylang ylang	15	13	-	-	10	-	-	25	-	-
sweet orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jojoba	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
avocado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
almond oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
apricot kernel oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dong quai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
paumarco ext	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
white illow bark	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
wild yam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
yucca root	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

위의 활성을 나타낸 4종의 식물오일인 thyme, clove bud, rose geranium과 sassafras 오일을 2%농도로 하여 생리활성을 측정된 결과 표 2에서 보는 바와 같이 thyme 오일은 감자역병균(*Phytophthora capsici*)을 비롯하여 다른 식물병원균에 대해 광범위하게 활성을 나타내었다.

표 2. 생리활성 식물오일들의 살균력측정 결과 (DMSO 2%)

식물오일 병원균	생육 저지원 (mm)			
	clove bud oil	thyme oil	rose geranium oil	sassafras oil
사과점무늬 낙엽병균	11	15	11	11
고추 역병균	9	13	11	9
입고병균	9	15	11	9
감자 역병균	-	-	11	-
고추 탄저병균	-	15	11	-
잔디 브라운팻치 병균	-	-	9	9
잣빛곰팡이 병균	-	15	-	-
오이 탄저병균	11	9	-	11
벼 도열병균	-	-	13	9
푸른 곰팡이균	9	13	-	-

이중 thyme 오일이 상대적으로 여러 식물병원균에 활성을 나타내었다. Thyme 오일의 주성분을 GC/MS-spectrum으로 분석한 결과 thymol, carvacrol, borneol, linalool 및 *p*-cymene이 주성분인 것으로 확인되었다. 이들 화합물에 대해 동일한 방법으로 활성검증을 실시한 결과 thymol과 carvacrol이 높은 활성을 나타내었다.

## 2. Thyme 오일과 그 주요성분들의 생리활성실험 결과

Thyme 오일의 여러 성분들 중 단일화합물 성분이 더 좋은 생리활성을 나타낼 것으로 예상되었다. Thyme 오일의 성분을 GC/MS-spectrum을 이용하여 분석한 결과 thymol, carvacrol, borenol, *p*-cymene과 linalool의 5가지 화합물이란 것을 확인하였다. 위 5가지 화합물들의 식물병원균에 대한 생리활성 측정결과는 표 3과 그림 1에 나타내었다. 표 3에서 보는 바와 같이 borneol, linalool 및 *p*-cymene의 경우 무처리군과 비슷한 군사생장지름을 나타내며 식물병원균에 대해 낮은 활성을 나타내었다. 반면 thymol과 carvacrol은 250 ppm 농도에서 우수한 군사생장억제력이 있는 것으로 나타났다. 또한 푸른곰팡이병균의 경우 군사생장을 거의 나타내지 않는 우수한 생리활성을 나타내었다. 그림 1은 250 ppm 농도와 50 ppm 농도에서의 thyme 오일과 그 주성분들의 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)에 대한 생리활성을 측정한 그림이다. 그림에서 보는 바와 같이 thyme 오일의 주성분들중 thymol과 carvacrol의 경우 낮은 군사생장을 나타내며 우수한 군사생장억제력을 나타내었다. 그림 2는 250 ppm 농도에서 thymol과 carvacrol의 푸른곰팡이병균(*Trochoderma virens*)에 대한 생리활성을 측정한 그림이다. 그림에서 보는 바와 같이 thymol과 carvacrol에서 군사생장을 전혀 나타내지 않았다. 이를 통하여 thyme 오일의 주성분들중 thymol과 carvacrol이 광범위한 식물병원균에 대하여 우수한 군사생장억제력을 나타냄을 알 수 있었다

## 3. 포자발아율 측정 실험결과

Thymol과 carvacrol이 식물병원균에 대하여 우수한 군사생장억제력을 가짐으로서 식물병원균의 포자에 미치는 영향을 알아보았다. 측정결과는 표 4에 나타내었다. 표 4에서 보는 바와 같이 사과점무늬낙엽병균 (*Alternaria mali*)에 대하여 thymol의 농도가 50 ppm에서 90.1%, 100 ppm에서 67.9% 및 250 ppm에서 2.0%의 발아율을 나타내었으며, carvacrol은 50 ppm에서 93.5%, 100 ppm에서 88.6% 및 250 ppm에서 0.5%의 현저히 낮은 포자발아율을 나타내었다. 또한 잿빛곰팡이병균(*Botrytis*

*cinerea*)에 대하여 thymol은 50, 100 및 250 ppm 모두 2%이하의 낮은 발아율을 보였으며, carvacrol의 경우에는 50 ppm에서 13.0%, 100 ppm에서 4.4% 및 250 ppm에서 0.5%의 낮은 발아율을 나타내었다. 이와 같이 식물병원균에 대해 thymol과 carvacrol은 포자발아억제력이 우수한 것을 알 수 있었다.



(A) 250 ppm



(B) 50 ppm

그림. 1. 잿빛곰팡이병균에 대한 thyme oil과 주성분 화합물의 생리활성



그림. 2. 푸른곰팡이 병균에 대한 thymol과 carvacrol의 활성 (250 ppm)

표 3. Thyme oil과 주성분들의 생리활성검정 결과 (250 ppm DMSO)

병원균	thyme 주성분 생육균사 지름 (mm)						
	control	<i>p</i> -cymene	linanool	borneol	carvacrol	thymol	thyme oil
사과점무늬낙엽병균	60.3	34.7	35.3	30.3	0.0	0.0	0.0
고추역병균	61.0	70.7	61.7	0.0	0.0	0.0	0.0
잎짚무늬마름병	85.0	85	85	85	0.0	0.0	85.0
잣빛곰팡이균	42.3	42.3	42.3	48.7	0.0	0.0	44.0
벼도열병균	51.3	34.7	33.3	16.0	0.0	0.0	11.0

표 4. Thymol과 carvacrol 처리시 사과 점무늬낙엽병균과 잿빛곰팡이균의 포자발아율

병 원 균	대조군	포자 발아율 (%)					
		Thymol			Carvacrol		
		50 ppm	100 ppm	250 ppm	50 ppm	100 ppm	250 ppm
사과점무늬낙엽병	99.5	90.1	67.9	2.0	93.5	88.6	0.5
잿빛곰팡이병	92.8	1.5	1.0	0.0	13.0	4.4	0.5

이 두가지 화합물(thymol과 carvacrol)을 직접 작물에 적용한 결과 잿빛곰팡이병 등에서 좋은 방제효과를 나타내어 이 두 화합물을 친환경 살균제 개발의 선도물질로 정하였다. 또한 thymol, carvacrol과 유사구조를 갖는 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropylphenol과 4-isopropylphenol도 생리활성을 확인한 결과 비슷한 효과를 나타내어 이들 4종의 화합물도 선도물질로 선정하였다.

#### 4. Thymol과 carvacrol 유도체들의 생리활성실험

thymol과 carvacrol이 우수한 생리활성을 나타내므로 thymol이나 carvacrol과 유사한 구조를 갖는 alkylphenol 유도체들인 2-isopropylphenol, 3-isopropylphenol, 4-isopropylphenol, 2-tert-butyl-5-methylphenol, 2,5-dimethylphenol, *m*-cresol, 4-isopropyl-3-methylphenol 및 5-isopropyl-3-methylphenol과 alkylaniline 유도체들인 2-isopropylaniline, 4-isopropylaniline과 2-isopropyl-6-methylaniline 등에 대하여 250 ppm 농도에서 생장억제 효과 실험을 실시하였다. 실험결과는 표 5과 6에 나타내었다. 표 5는 thymol, carvacrol과 alkylphenol 유도체들의 식물병원균에 대한 생

리활성 실험결과를 나타낸 것이다. 표 5 에서 보는 바와 같이 thymol과 carvacrol은 식물병원균의 균사생장을 거의 억제하였다. 또한 alkylphenol 유도체들도 식물병원균의 균사생장을 거의 억제하거나 작은 균사생장을 나타내며 thymol과 carvacrol과 비슷한 균사 생장억제력을 나타내었다. 하지만 alkylaniline 유도체들의 경우 표 6에서 보는 바와 같이 낮은 균사생장억제력을 나타내었으므로 본연구의 출발물질로 thymol, carvacrol, 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropyl-phenol과 4-isopropylphenol을 선정하였다.

표 5. Thymol과 carvacrol의 alkylphenol계 화합물들의 생리활성

병원균 화합물	균사생육 지름 (mm)								
	사과점무 늑 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균
무처리	85.0	85.0	85.0	71.3	85.0	85.0	60.0	65.0	84.0
thymol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
carvacrol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-isopropylph enol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-isopropylph enol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-isopropylph enol	20.7	0.0	50.3	35.3	16.0	0.0	0.0	0.0	45.0
2-tert-butyl-5- methyl-phenol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,5-dimethylp henol	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>m</i> -Cresol	32.7	0.0	50.3	35.3	16.0	0.0	0.0	0.0	45.0
5-isopropyl-3- methyl-phenol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.6
4-isopropyl-3- methyl-phenol	0.0	0.0	0.0	0.0	10.3	0.0	0.0	15.0	0.0



표 6. Thymol과 carvacrol의 alkyraniline계 화합물들의 생리활성

화합물	병원균	균사생육 지름 (mm)								
		사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이 젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균
무처리		85.0	85.0	85.0	71.3	85.0	85.0	60.0	65.0	84.0
thymol		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
carvacrol		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-isopropyl-6- methylaniline		38.3	51.0	59.0	40.0	16.0	16.3	23.3	0.0	37.6
2-isopropylanili ne		45.0	53.0	81.3	45.6	21.0	16.3	30.0	18.6	81.6
4-isopropylanili ne		20.7	0.0	50.3	35.3	16.0	0.0	0.0	0.0	45.0

5. 유도체 합성 및 활성검정 실험결과

Thymol, carvacrol, 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 4-Isopropylphenol과 2-isopropylphenol로부터 제조한 ester, sulfonyl ester, carbamate, ether, phosphoyl ester 유도체 146종에 대하여 사과 점무늬낙엽병균 (*Alternaria alternata f. sp. mali*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 모잘록병균 (*Pythium ultimum*), 감자역병균(*Phytophthora infestans*), 고추탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 잔디 브라운팻치병균(*Rhizoctonia solani*), 젯빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 오이 탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*), 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*)와 푸른곰팡이(*Trichoderma virens*)들에 대하여 생리활성을 측정하였다. 그 결과는 표 7~11과 그림 3~8에 나타내었다.

표 7. Alkylphenol ester 유도체의 생리활성결과 (100 ppm DMSO)

병원군 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이 젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
무처리	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시 약제	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
<b><i>I-1a</i></b>	<b>46</b>	<b>60</b>	<b>66</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>80</b>	<b>37</b>	<b>48</b>	<b>52</b>	<b>85</b>
I-2a	85	59	85	79	67	85	84	61	85	85
I-3a	85	77	85	61	54	85	85	79	85	85
I-4a	67	85	85	85	85	85	80	82	85	70
I-5a	60	85	85	63	71	85	53	85	50	85
I-6a	60	85	85	85	67	85	85	85	85	57
I-7a	56	85	85	50	68	85	85	85	85	46
I-8a	72	85	85	74	60	85	51	85	60	55
I-9a	64	85	85	61	67	85	85	80	37	67
I-10a	85	85	85	85	50	85	85	82	35	85
II-1a	50	74	80	55	56	85	45	57	59	85
II-2a	77	85	85	79	69	85	57	85	69	85
II-3a	62	85	85	55	74	85	85	85	85	54
III-1a	85	63	85	57	85	85	85	47	85	85
III-2a	85	59	85	79	67	85	84	61	79	85
III-3a	85	77	85	61	54	85	85	54	85	85
III-4a	69	85	85	85	85	85	85	85	80	83
III-5a	60	85	85	65	74	85	57	85	62	80
III-6a	64	85	85	85	70	85	85	85	63	70
III-7a	73	85	85	57	64	63	85	85	85	85
III-8a	46	85	85	77	61	68	54	85	67	85
III-9a	65	85	85	64	70	85	85	85	37	69
III-10a	85	85	85	85	50	85	85	85	35	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포룸 수화제, 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포룸 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제, 잔디 브라운패 치병-몬세렌 수화제, 젯빛곰팡이병-유파렌 수화제, 오이 탄저병- 안트라콜 수 화제, 벼 도열병- 빔 수화제, 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 7. Alkylphenol ester 유도체의 생리활성결과 계속 (100 ppm DMSO)

병원군 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추 역병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이 젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰팡 이균
무처리	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시 약제 <sup>a</sup>	49	35	63	53	50	60	36	40	37	27
IV-1a	55	57	85	63	78	85	85	51	83	85
IV-2a	85	85	85	83	59	85	80	62	81	85
IV-3a	66	77	85	61	85	85	85	68	84	85
IV-4a	67	85	85	85	85	85	80	85	85	83
IV-5a	60	85	85	85	80	85	85	85	69	80
IV-6a	60	85	85	85	55	85	85	85	66	75
IV-7a	70	85	85	61	60	85	85	85	85	85
IV-8a	40	85	85	64	60	70	70	85	71	85
IV-9a	50	85	85	66	85	66	66	69	41	68
IV-10a	85	85	85	85	62	85	85	80	40	85
V-1a	64	61	71	64	74	85	85	85	85	85
V-2a	85	76	85	77	82	84	83	67	84	85
V-3a	77	83	85	85	67	63	67	84	85	85
V-4a	66	60	85	77	70	85	85	72	64	85
V-5a	60	60	70	75	53	85	85	80	63	85
V-6a	60	85	85	83	85	85	85	85	85	85
V-7a	85	85	85	55	85	85	85	85	85	85
V-8a	85	85	85	85	85	85	85	85	54	85
VI-1a	54	62	66	79	55	85	66	66	65	85
VI-2a	80	78	85	76	72	80	83	81	84	85
VI-3a	79	85	85	83	65	45	85	82	85	85
VI-4a	57	57	85	77	77	85	85	60	59	85
VI-5a	60	68	85	75	55	85	85	80	61	85
VI-6a	60	85	85	81	85	85	85	85	85	85
VI-7a	85	85	85	25	85	85	85	85	85	85
VI-8a	85	85	85	85	70	85	85	53	62	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포름 수화제, 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포름 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제 잔디 브라운패 치병-몬세렌 수화제, 젯빛곰팡이병-유파렌 수화제, 오이 탄저병- 안트라콜 수 화제, 벼 도열병- 빔 수화제, 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 8. Alkylphenol sulfonyl ester 유도체의 생리활성 (100 ppm DMSO)

병원균 화합물	생육균사 지름 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이젯 빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
무처리	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시 약제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
I-1b	73	85	85	74	55	85	40	57	54	85
I-2b	65	85	85	85	53	85	85	47	64	60
I-3b	68	85	80	81	52	85	39	37	53	85
I-4b	79	85	85	79	85	63	85	59	85	85
I-5b	52	85	85	82	75	85	50	60	52	85
I-6b	72	85	85	85	60	85	85	58	74	55
I-7b	85	85	85	42	57	85	85	77	72	85
II-1b	64	85	82	85	57	85	85	54	67	62
II-2b	70	85	80	83	55	85	46	55	59	79
III-1b	85	70	76	85	69	85	85	57	61	85
III-2b	65	85	85	85	56	85	85	50	65	85
III-3b	70	85	80	81	54	85	43	64	66	85
III-4b	85	85	85	60	61	59	85	71	63	85
III-5b	62	85	85	76	61	59	62	75	60	79
III-6b	72	85	85	85	64	85	85	85	79	57
IV-1b	85	77	85	85	73	85	85	60	64	85
IV-2b	60	85	85	85	51	85	85	51	61	85
IV-3b	67	85	85	80	57	85	79	40	63	85
IV-4b	85	85	85	51	67	74	85	55	65	85
IV-5b	60	85	85	74	69	65	85	62	62	83
IV-6b	70	85	85	85	61	85	85	56	85	60
V-1b	64	61	80	62	77	85	85	60	85	85
V-2b	70	85	85	85	60	85	85	85	85	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포룸 수화제,  
 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포룸 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 젯빛곰팡이병-유과렌 수화제,  
 오이 탄저병- 안트라콜 수화제,  
 벼 도열병- 빔 수화제, 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 8. Alkylphenol sulfonyl ester 유도체의 생리활성 계측 (100 ppm DMSO)

병원균 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이잿 빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
무처리	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시 약제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
V-3b	71	68	85	82	70	85	64	63	85	85
V-4b	85	85	85	85	85	85	85	80	85	85
V-5b	60	69	82	79	65	85	85	85	85	85
V-6b	65	72	85	85	85	85	85	85	85	85
VI-1b	57	62	85	80	75	85	80	79	85	85
VI-2b	70	85	85	85	52	85	85	85	85	70
VI-3b	64	55	77	84	76	85	62	60	85	85
VI-4b	85	85	85	65	59	85	85	42	60	85
VI-5b	55	70	83	85	85	85	81	61	85	85
VI-6b	65	85	85	72	59	85	85	34	70	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포름 수화제,  
 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포름 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 잿빛곰팡이병-유파렌 수화제,  
 오이 탄저병- 안트라콜 수화제, 벼 도열병- 빔 수화제,  
 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 9. Alkylphenol carbamate 유도체 생리활성 (100 ppm DMSO)

병원군 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과 점무늬 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이젯 빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
무처리	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시약 제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
I-1c	49	85	85	60	70	85	44	85	39	85
I-2c	61	85	85	79	53	81	52	68	38	80
I-3c	49	85	85	62	85	69	85	85	85	85
II-1c	53	85	85	69	79	85	50	85	47	85
II-2c	65	85	81	75	59	85	57	79	40	85
III-1c	85	75	85	78	54	83	77	64	40	85
III-2c	61	85	85	85	56	85	85	85	43	85
III-3c	47	85	85	62	85	69	85	85	85	85
IV-1c	50	75	85	78	85	78	77	67	52	80
IV-2c	75	74	85	64	80	85	85	85	49	85
IV-3c	80	85	85	74	85	70	63	85	85	85
V-1c	49	61	85	78	70	85	85	72	56	85
VI-1c	56	65	85	78	45	85	85	71	50	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포름 수화제,  
 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포름 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 잿빛곰팡이병-유과렌 수화제,  
 오이 탄저병- 안트라콜 수화제, 벼 도열병- 빔 수화제,  
 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 10. Alkylphenol ether 유도체 합성의 생리활성 (100 ppm DMSO)

화합물	생육군사 지름 (mm)									
	병원균 사과 점무늬 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	오이 젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
대조군	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시약 제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
I-1d	85	85	85	77	72	85	60	77	51	85
I-2d	76	81	80	81	85	85	85	76	69	85
I-3d	85	85	85	50	85	85	85	77	80	85
I-4d	60	85	85	85	85	85	85	70	83	85
I-5d	59	85	85	85	52	85	85	85	85	45
I-6d	70	85	85	40	63	85	85	50	60	85
I-7d	46	85	85	85	85	85	85	80	59	85
I-8d	69	85	85	70	74	85	85	81	77	85
II-1d	62	85	85	85	56	85	85	85	85	57
II-2d	74	85	85	49	67	85	85	73	79	85
III-1d	85	85	85	85	74	85	85	85	67	85
III-2d	70	85	85	85	85	85	85	85	80	85
III-3d	85	55	77	54	80	84	80	80	81	85
III-4d	60	85	85	85	85	85	85	75	80	85
III-5d	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
III-6d	70	85	85	47	67	85	85	80	69	85
III-7d	50	85	85	85	85	85	85	85	62	85
III-8d	85	85	85	85	64	85	85	85	80	85
IV-1d	85	85	85	85	78	85	85	85	81	85
IV-2d	80	85	85	80	85	85	85	76	85	85
IV-3d	76	81	80	81	85	85	85	74	80	85
IV-4d	85	77	79	85	60	85	80	77	80	85
IV-5d	85	80	85	76	52	82	82	70	85	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포름 수화제,  
 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포름 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 젯빛곰팡이병-유과렌 수화제,  
 오이 탄저병- 안트라콜 수화제, 벼 도열병- 빔 수화제,  
 푸른곰팡이병-판마시 수화제

표 10. Alkylphenol ether 유도체 합성의 생리활성 계측 (100 ppm DMSO)

병원균 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과점무 늑 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	젯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
대조군	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시약 제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
IV-6d	67	85	85	47	70	85	85	80	74	85
IV-7d	54	85	85	85	85	85	85	85	71	85
IV-8d	72	85	85	62	68	85	85	85	80	85
V-1d	59	67	80	76	76	85	79	63	85	85
V-2d	54	57	79	81	78	85	83	85	85	85
V-3d	80	83	85	79	83	70	85	79	85	85
V-4d	85	85	85	85	60	85	85	52	62	85
V-5d	85	85	85	83	85	85	85	85	85	85
VI-1d	59	67	80	76	76	85	79	63	85	85
VI-2d	54	57	79	81	78	85	83	85	85	85
VI-3d	75	85	85	79	72	85	85	83	83	85
VI-4d	68	85	85	72	63	60	85	67	67	85
VI-5d	85	85	85	83	85	85	85	85	70	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포름 수화제,  
 입고병-안타 유제, 감자 역병-포름 수화제, 고추 탄저병-안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 젯빛곰팡이병-유과렌 수화제,  
 오이 탄저병-안트라콜 수화제, 벼 도열병-빔 수화제,  
 푸른곰팡이병-판마시 수화제



표 11. Alkylphenol phosphoyl ester 유도체의 생리활성 (100 ppm DMSO)

병원균 화합물	생육군사 지름 (mm)									
	사과점무 늑 낙엽병균	고추역 병균	입고 병균	감자 역병균	고추탄 저병균	잔디브 라운팻 치병균	갯빛곰팡 이병균	오이탄 저병균	벼도열 병균	푸른곰 팡이균
대조군	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
공시약 제 <sup>a</sup>	50	34	65	52	50	60	35	40	38	25
I	56	70	75	61	68	80	62	52	44	70
I-1e	50	60	85	43	57	85	85	55	52	85
I-2e	85	85	85	85	67	85	85	52	71	85
I-3e	85	85	85	85	79	85	85	62	73	85
II-1e	53	65	85	56	69	85	85	59	69	85
III-1e	62	85	85	78	85	85	85	50	85	85
III-2e	85	85	85	85	70	85	85	50	80	85
III-3e	85	85	85	85	80	85	85	67	77	85
IV-1e	79	85	85	79	85	85	85	55	85	85
IV-2e	85	85	85	85	74	85	85	50	85	85
IV-3e	85	85	85	85	85	85	85	70	85	85
V-1e	69	78	85	85	75	75	66	67	85	85
V-2e	75	83	85	74	61	67	85	85	85	85
VI-1e	70	85	85	85	76	84	85	85	85	85
VI-2e	70	85	85	82	60	79	85	79	79	85

a: 공시약제: 사과 점무늬병-포리옥신 수화제, 고추 역병-포룸 수화제,  
 입고병- 안타 유제, 감자 역병- 포룸 수화제, 고추 탄저병- 안트라콜 수화제  
 잔디 브라운패치병-몬세렌 수화제, 갯빛곰팡이병-유파렌 수화제,  
 오이 탄저병- 안트라콜 수화제, 벼 도열병- 빔 수화제,  
 푸른곰팡이병-관마시 수화제

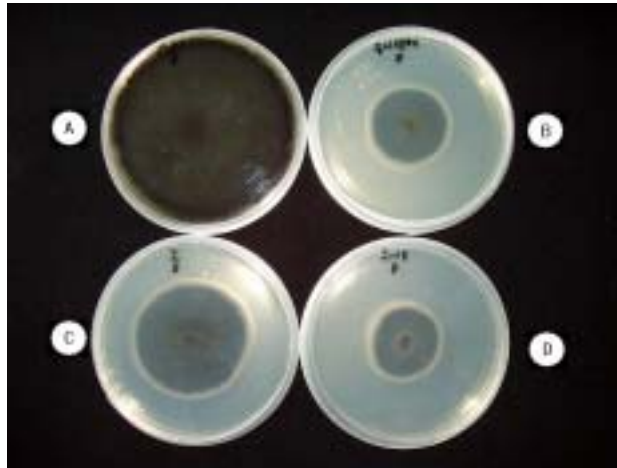


그림. 3. 오이탄저병균에 대한 2-isopropyl-5-methylphenyl benzenesulfonate( I -3b)의  
 생장억제 효과.(A : 무처리, B : 공시약제, C : thymol D :2-isopropyl-  
 5-methylphenyl benzenesulfonate(1-3b)).

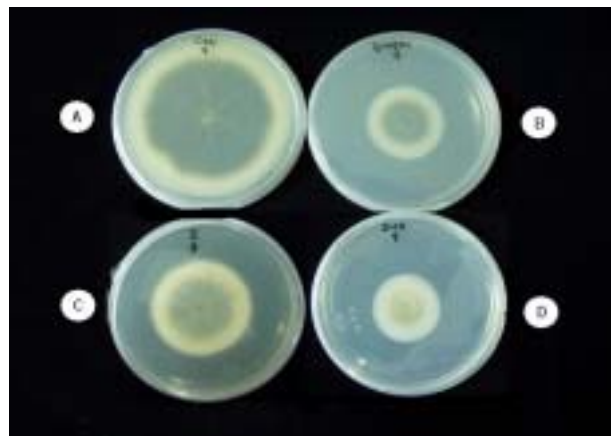


그림. 4. 벵도열병균에 대한 2-isopropyl-5-methylphenyl (2-aminothiazole-4-yl)  
 methoxyimino-acetate( I -10a)의 생장 억제 효과. (A : 무처리, B : 공시약제,  
 C : thymol D : 2-isopropyl-5-methylphenyl (2-aminothiazole-4-yl)  
 methoxyiminoacetate( I -10a).

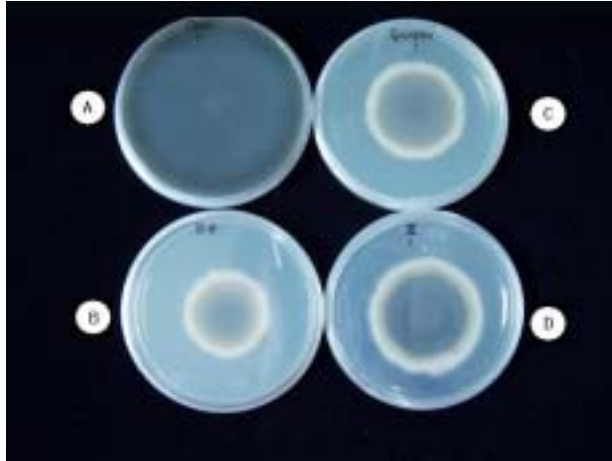


그림. 5. 사과점무늬낙엽병균에 대한 5-isopropyl-3-methylphenyl phenylacetate (II-8a)의 성장억제 효과. (A : 무처리군, B : 5-isopropyl-3-methylphenyl phenylacetate (II-8a), C : 공시약제, D : 5-isopropyl-3-methylphenol)

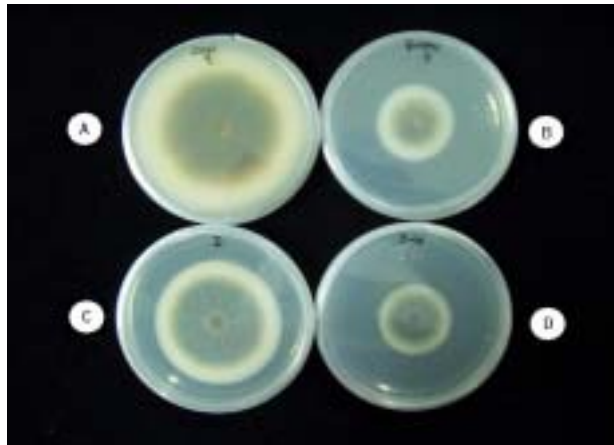


그림. 6. 벼도열병균에 대한 4-isopropyl-3-methylphenyl (2-amino- thiazole-4-yl) methoxyiminoacetate( I -10a)의 성장억제 효과 (A : 무처리, B : 공시약제, C : 4-isopropyl-3-methylphenol, D : 4-isopropyl-3-methylphenyl(2-amino thiazole-4-yl)methoxyimino acetate ( I -10a)).

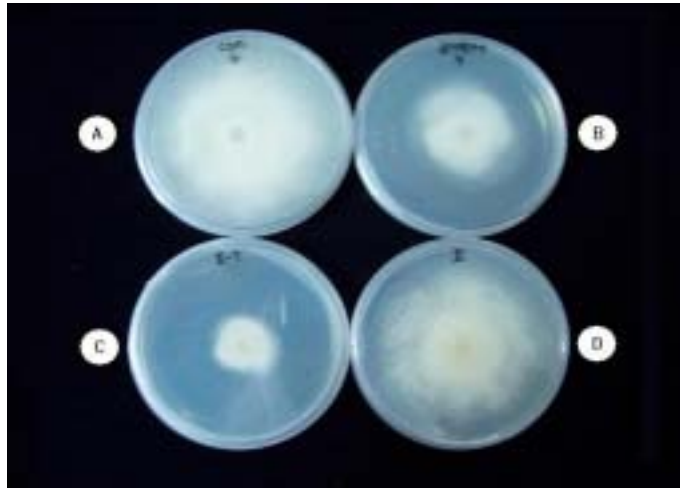


그림. 7. 감자역병균에 대한 2-isopropylphenyl piperonyloate(II-7a)의 생장억제 효과  
 (A : 무처리군, B : 공시약제, C : 2-isopropylphenyl piperonyloate(II-7a),  
 D : 2-isopropylpheol)

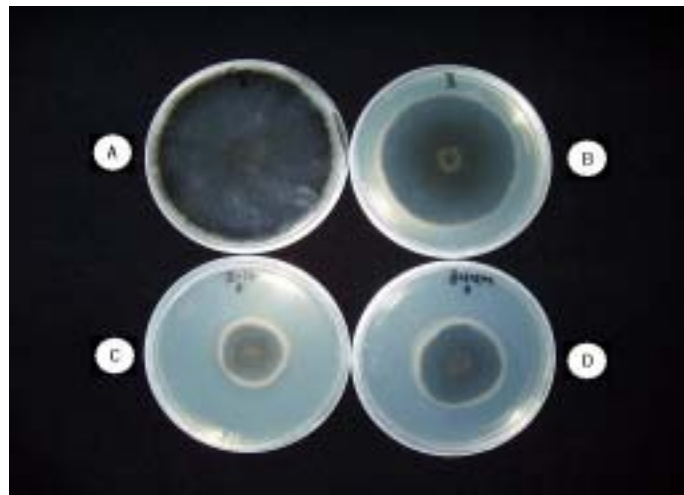


그림. 8. 오이탄저병균에 대한 2-isopropylphenyl-4-methoxybenzenesulfonate  
 (II-6b)의 생장억제 효과. (A : 무처리군, B : 2-isopropylphenol(II),  
 C : 2-isopropylphenyl-4-methoxybenzenesulfonate(II-6b),  
 D : 공시약제)

그 결과 *in vitro* 1차 screening에서 사과 점무늬낙엽병균(*Alternaria alternata f. sp. mali*)에서는 2-isopropyl-5-methylphenyl acetate(I-1a), ethyl 4-(2-methyl-5-isopropylphenoxy)crotonate(I-7d), 5-isopropyl-3-methylphenyl phenylacetate(IV-8a), 4-isopropylphenyl carbamate(V-1c), 감자역병균(*Phytophthora infestans*)에 methyl(2-isopropyl-5-methylphenoxy)acetate(I-6d), methyl(5-Isopropyl-3-methylphenoxy)acetate(IV-6d), 2-isopropylphenylpiperonyloate(VI-7a), 고추탄저병(*Colletotrichum gloeosporioides*)에 2-isopropylphenyl carbamate(VI-1c), 잔디 브라운펫치병(*Rhizoctonia solani*)에 2-isopropylphenyl bromoacetate(VI-3a)와 2-isopropylphenylbenzyl ether(VI-4d), 오이 탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*)에서 2-isopropyl-5-methylphenyl benzenesulfonate(I-3b), 2-isopropylphenyl 4-methoxybenzenesulfonate(VI-6b)와 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*)에서 2-isopropyl-5-methylphenyl (2-amino-thiazole-4-yl)methoxyiminoacetate(I-10a)와 4-isopropyl-3-methylphenyl (2-amino-thiazole-4-yl) methoxyiminoacetate(III-10a)는 대조약제보다 우수한 생장억제효과를 나타내었다. thymol과 carvacrol, 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropylphenol과 4-isopropylphenole을 출발물질로 하여 ester, sulfonyl ester, carbamate, ether와 phosphoyl ester 계 유도체 146종을 합성하였다. 합성의 확인은 IR, <sup>1</sup>H-NMR, GC/MS-spectrum을 이용하였다. 이들 유도체들에 대하여 식물병원균의 생장억제 실험은 위 식물오일실험에서 사용한 식물병원균과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과는 5개 유도체별로 아래와 같이 요약할 수 있다.

#### Ester 계열 유도체

표 7에서 보는 바와 같이 Alkylphenol의 ester 계열 유도체들에 대한 10종 식물병원균의 억제 효과는 2-isopropyl-5-methylphenyl acetate(I-1a)와 5-isopropyl-3-methylphenyl phenylacetate(IV-8a)가 사과 점무늬낙엽병균에 효과를 나타내었고 2-isopropylphenyl piperonyloate(VI-7a)가 감자 역병균에 효과를 나타내었다. 또한, 2-isopropyl-5-methylphenyl(2-aminothiazole-4-yl)methoxyiminoacetate(I-10a)와

4-isopropyl-3-methylphenyl(2-aminothiazole-4-yl)methoxy iminoacetate (Ⅲ-10a)가 벼 도열병균에 효과를 나타내었다.

#### Sulfonyl ester 계열 유도체

표 8에서 보는 바와 같이 Alkylphenol의 sulfonyl ester 계열 유도체들에 대한 10종 식물병원균의 억제 효과는 2-isopropyl-5-methylphenyl benzenesulfonate(I-3b)와 2-isopropylphenyl 4-methoxy-benzenesulfonate(VI-6b)가 오이 탄저병균에 효과를 나타내었다.

#### 다. Carbamate 계열 유도체

표 9에서 보는 바와 같이 Alkylphenol의 carbamate 계열 유도체들에 대한 10종 식물병원균의 억제 효과는 4-isopropylphenyl carbamate(V-1c)가 사과 점무늬낙엽병에 효과를 나타내었으며, 2-isopropylphenyl carbamate(VI-1c)가 고추 탄저병균에 효과를 나타내었다.

#### 라. Ether 계열 유도체

표 10에서 보는 바와 같이 alkylphenol의 ether 계열 유도체들에 대한 10종 식물병원균의 억제효과는 ethyl 4-(2-methyl-5-isopropylphenoxy)crotonate(I-7d)는 사과 점무늬낙엽병에서 효과를 나타내었고, methyl (2-isopropyl-5-methylphenoxy)acetate (I-6d)와 methyl (5-Isopropyl-3-methylphenoxy)acetate(IV-6d)가 감자 역병균에 효과를 나타내었다. 또한, 2-isopropylphenylbenzyl ether(VI-4d)는 잔디 브라운팻치병균에 효과를 나타내었다.

#### 마. Phosphoyl ester 계열 유도체

표 11에서 보는 바와 같이 alkylphenol의 phosphoyl ester 계열 유도체들에 대한 10종 식물병원균의 억제효과를 보았다. 하지만 모든 유도체들에 대하여 효과가 미약하거나 없었다.

2. 합성된 유도체의 1, 2차 Screening을 통한 효과 검정결과

가. *In vivo* screening시험 방법 및 결과

순천향대에서 *in vitro* screening을 통해 선발된 12개의 화합물(DH4001~DH4012)을 수령하여 6종의 식물병에 대해 500 ppm의 농도로 경엽처리한 후 당사 screening기준에 따라 1차 선발하였다.

1) *In vitro* 에서 선발된 12개 물질에 대한 오이 잿빛곰팡이병 방제효과 시험

실험결과: 시험약제들은 전체적으로 대조약제에 비해 약효는 떨어지나 ester계 화합물 DH4001, DH4011의 잿빛곰팡이병의 억제효과는 인정되었다. 일반적으로 ether 및 sulfonyl ester계 화합물보다 ester계 화합물이 잿빛곰팡이병 억제효과가 있는 것으로 파악되었다.(표 12)

표 12. 경엽처리에 의한 오이 잿빛곰팡이병 방제효과

NO.	Chemicals	병반면적율(%)	방제가(%)	약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	20.0	0.0	0	
2	DH4001(I-1a)	6.3	68.8	0	
3	DH4002(I-7d)	33.8	0.0	0	
4	DH4003(IV-8a)	37.5	0.0	0	
5	DH4004(I-6d)	12.5	37.5	0	
6	DH4005(III-6d)	7.5	62.5	0	
7	DH4006(V-7a)	20.0	0.0	0	
8	DH4007(I-10a)	28.8	0.0	0	
9	DH4008(III-10a)	25.0	0.0	0	
10	DH4009(I-3b)	25.0	0.0	0	
11	DH4010(VI-6b)	10.0	50.0	0	
12	DH4011(VI-3a)	6.3	68.8	0	
13	DH4012(VI-4d)	7.5	62.5	0	
14	Dichlofluanid(std)	2.5	87.5	0	60 ppm

2) *In vitro* 에서 선발된 12개 물질에 대한 오이 탄저병 방제효과 시험

ester계 화합물인 2-isopropylphenyl piperonyloate(DH4006)의 방제효과가 88.2%로 대조약제보다 우수하였으며, ester계 화합물인 DH4002의 오이 탄저병 억제효과가 인정되는 수준이었다. 나머지 화합물들은 억제효과가 없거나 대조약제보다 저조한 효과를 나타내었다.(표 13)

표 13. 경엽처리에 의한 오이 탄저병 방제효과시험

NO.	Chemicals	병반면적율(%)		약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	17.0	0.0	0	
2	DH4001(I-1a)	19.0	0.0	0	
3	DH4002(I-7d)	8.0	52.9	0	
4	DH4003(IV-8a)	18.0	0.0	0	
5	DH4004(I-6d)	14.0	17.6	0	
6	DH4005(III-6d)	16.0	5.9	0	
<b>7</b>	<b>DH4006(V-7a)</b>	<b>2.0</b>	<b>88.2</b>	<b>0</b>	
8	DH4007(I-10a)	25.0	0.0	0	
9	DH4008(III-10a)	14.0	17.6	0	
10	DH4009(I-3b)	56.0	0.0	0	
11	DH4010(VI-6b)	14.0	17.6	0	
12	DH4011(VI-3a)	22.0	0.0	0	
13	DH4012(VI-4d)	26.0	0.0	0	
14	Dithianon(std)	5.0	70.6	0	50 ppm



---

3) *In vitro* 에서 선발된 12개 물질에 대한 오이 흰가루병 방제효과 결과

시험약제중 Sulfonyl ester계 화합물인 2-isopropylphenyl 4-methoxy benzenesulfonate(DH4010)의 방제효과가 72.0%로 대조약제와 비등한 수준이었으나, 나머지 화합물들의 방제효과는 대조약제보다 저조하였다(표 14). 오이 흰가루병에는 일반적으로 sulfonyl ester계 화합물의 억제효과가 ester 및 ether계열 화합물보다 우수한 경향이였다. 그러나 DH4006, DH4007 및 DH4009는 고온시에 오이의 잎끝이 마르는 약해증상이 발생하여 약효나 약해 면에서 적용이 어려울 것으로 판단되었다.

표 14. 경엽처리에 의한 오이 흰가루병 방제효과

NO.	Chemicals	병반면적율(%)	방제가(%)	약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	52.5	—	0	
2	DH4001(I-1a)	45.0	14.3	0	
3	DH4002(I-7d)	33.8	35.7	0	
4	DH4003(IV-8a)	37.5	28.6	0	
5	DH4004(I-6d)	39.7	24.3	0	
6	DH4005(III-6d)	33.8	35.7	0	
7	DH4006(V-7a)	37.5	28.6	2	leaf blight
8	DH4007(I-10a)	32.2	38.6	2	leaf blight
9	DH4008(III-10a)	32.2	38.6	0	
10	DH4009(I-3b)	32.2	38.6	1	leaf blight
11	DH4010(VI-6b)	14.7	72.0	0	
12	DH4011(VI-3a)	48.8	7.1	0	
13	DH4012(VI-4d)	41.3	21.4	0	
14	Fenarimol(std)	15.3	70.8	0	10 ppm

4) *In vitro* 에서 선발된 12개 물질에 대한 토마토 잎마름병역병 방제효과 시험

시험약제 중 ester계 화합물인 2-isopropylphenyl piperonyloate(DH4006)이 토마토 잎마름병에 대하여 특이적으로 91.2%의 높은 방제효과를 나타내었다. 그러나 1차 조사 후 24시간 후에는 40%이하의 방제효과를 나타내었다. 이는 thyme oil의 높은 휘발력에 따른 잔효성 감소에 의한 활성감소로 파악되며, DH4010에 휘발억제제(Propylen glycol)을 첨가하여 첨가하지않은 시험구와 비교한 후 잔효력 및 효과증진에 관한 문제를 판단할 예정이다. 나머지 화합물들은 토마토 역병에 대한 방제효과는 대조약제에 비하여 미흡한 수준이었다(표 15).

표 15. 경엽처리에 의한 토마토 잎마름병의 방제효과

NO.	Chemicals	병반면적율(%) 방제가(%)		약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	50.0	0.0	0	
2	DH4001(I-1a)	62.0	0.0	0	
3	DH4002(I-7d)	54.0	0.0	0	
4	DH4003(IV-8a)	26.0	48.0	0	
5	DH4004(I-6d)	16.2	67.6	0	
6	DH4005(III-6d)	22.0	56.0	0	
7	DH4006(V-7a)	4.4	91.2	0	
8	DH4007(I-10a)	24.2	51.6	0	
9	DH4008(III-10a)	50.0	0.0	0	
10	DH4009(I-3b)	46.0	8.0	0	
11	DH4010(VI-6b)	46.0	8.0	0	
12	DH4011(VI-3a)	62.0	0.0	0	
13	DH4012(VI-4d)	54.0	0.0	0	
14	Dimethomorph(std.)	0.0	100.0	0	50 ppm

---

5) *In vitro* 에서 선발된 12개 물질에 대한 벼 잎도열병 방제효과 시험

시험약제중 sulfonyl ester계 화합물인 2-isopropylphenyl 4-methoxy benzenesulfonate(DH4010)의 방제효과가 93.3%로 특이적으로 높았다. 또한 ether계 화합물인 2-isopropylphenol benzyl ether(DH4012)가 80.0%로 벼 도열병에 대한 억제효과가 인정되는 수준이었고, 나머지 화합물들은 대조약제보다 미흡한 효과를 나타내었다(표 16).

표 16. 경엽처리에 의한 벼 잎도열병 방제효과

NO.	Chemicals	병반개수(개) 방제가(%)		약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	39.0	0.0	0	
2	DH4001(I-1a)	19.4	50.3	0	
3	DH4002(I-7d)	21.6	44.6	0	
4	DH4003(IV-8a)	31.2	20.0	0	
5	DH4004(I-6d)	17.4	55.4	0	
6	DH4005(III-6d)	21.2	45.6	0	
7	DH4006(V-7a)	13.8	64.6	0	
8	DH4007(I-10a)	41.8	0.0	0	
9	DH4008(III-10a)	10.0	74.4	0	
10	DH4009(I-3b)	31.6	19.0	0	
<b>11</b>	DH4010(VI-6b)	2.6	93.3	0	
12	DH4011(VI-3a)	36.8	5.6	0	
<b>13</b>	DH4012(VI-4d)	7.8	80.0	0	
14	Tricyclazole(std)	1.0	97.4	0	10 ppm

---

6) 선발된 12개 물질에 대한 벼 잎집무늬마름병 방제효과 시험

각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종 농도는 500 ppm이 되도록 조정하였다. 시험약제를 경엽에 고루 살포하고 24시간 경과 후 아래의 방법에 따라 조제한 접종원을 시험작물에 접종하였다. 밀기울배지를 조제하여 30분 썩 2회 멸균한후 PDA배지에서 배양한 벼 잎집무늬마름균(*Rhizoctonia solani*)의 균총을 10개 정도 밀기울 배지에 접종한다, 27°C에서 5일간 배양한 밀기울배지 접종원을 본엽 3-4엽의 작물체 지체부에 접종한다. 접종된 작물체(추청벼)는 26°C Dew chamber에서 3일간 발병을 유도하여 26°C 항온항습실에 옮겨 4일후 잎집에 발생된 병반의 높이(병반고)을 조사하였다.

시험약제중 sulfonyl ester계 화합물인 2-isopropylphenyl 4-methoxy benzenesulfonate(DH4010)는 벼 잎집무늬마름병에 대하여 85.3%의 방제효과를 나타내었고 벼 도열병에 대해서도 특이적인 억제효과를 나타내었다. 이는 수도전문약제로서의 개발가능성이 높은 것으로 예상되며, 나머지 화합물들은 대조약제보다 저조한 억제효과를 나타내었다(표 17).

Thyme oil의 주성분 중 활성이 있는 thymol과 carvacrol 구조를 변경한 6개 유도체 기본구조의 hydroxy기를 ester, ether, sulfonylester, phosphoyl ester 및 carbamate 계열로 치환된 146개 화합물을 합성하였다. 이들 화합물에 대한 *in vitro* 시험결과 ester 및 sulfonyl ester 그룹의 화합물이 생물활성이 있었으며, ester 및 sulfonyl ester 그룹의 치환기중 전자를 주는기(e-donating group)로 치환환 화합물의 활성이 뚜렷하였다. *in vitro* 시험결과를 기본으로하여 ester계 화합물 6종과 sulfonyl ester계 화합물 2종 및 ether계 화합물 4종에 대하여 *in vivo* 시험을 실시한 결과, 12개 합성물질중 ester계가 치환된 2-isopropylphenyl piperonyloate(DH4006)과 sulfonyl ester계가 치환된 2-isopropylphenyl 4-methoxybenzenesulfonate (DH4010)의 활성이 우수하였다.

표 17. 경엽처리에 의한 벼 잎집무늬마름병 방제효과 시험

NO.	Chemicals	병반고(cm)	방제가(%)	약해(0-5)	비고
		500 ppm			
1	Untreatment	6.8	0.0	0	
2	DH4001(I-1a)	6.8	0.0	0	
3	DH4002(I-7d)	6.4	5.3	0	
4	DH4003(IV-8a)	5.0	26.5	0	
5	DH4004(I-6d)	6.5	4.4	0	
6	DH4005(III-6d)	6.6	3.2	0	
7	DH4006(V-7a)	6.4	5.9	0	
8	DH4007(I-10a)	5.5	19.1	0	
9	DH4008(III-10a)	6.5	4.4	0	
10	DH4009(I-3b)	6.9	0.0	0	
11	DH4010(VI-6b)	1.0	85.3	0	
12	DH4011(VI-3a)	9.0	0.0	0	
13	DH4012(VI-4d)	8.0	0.0	0	
14	Validamycin-A(std)	0.2	97.1	0	50 ppm

- DH4006 방제효과(%): 오이 탄저병(88.2%), 토마토 잎마름역병(91.2%)
- DH4010 방제효과(%): 오이 흰가루병(72.0%), 벼 잎도열병(93.3%) 벼 잎집무늬마름병(85.3%)

*in vivo* 시험으로 위의 두 물질을 1차적으로 선발하였다. ester계가 치환된 2-isopropylphenyl piperonyloate(DH4006)는 주로 오이 탄저병과 토마토 잎마름역병에 억제효과가 우수하여 채소작물의 탄저병, 역병 및 노균병에 개발 가능성이 있는 것으로 예상되며, sulfonyl ester계가 치환된 2-isopropylphenyl 4-methoxybenzenesulfonate (DH4010)는 벼의 주요 병해인 도열병과 잎집무늬마름병에 대한 개발가능성을 파악해야 할 것으로 판단된다.

표 18. Target disease에 대한 12개 선발물질의 방제효과

No.	code	500 ppm					
		오이 잭빛 곰팡이병 병원균	오이 탄저병	오이 흰가루병	토마토 잎마름역병	벼 잎 도열병	벼 잎집무늬 마름병
1	무처리	—	—	—	—	—	—
2	DH4001(I-1a)	68.8	0.0	14.3	0.0	50.3	0.0
3	DH4002(I-7d)	0.0	52.9	35.7	0.0	44.6	5.3
4	DH4003(IV-8a)	0.0	0.0	28.6	48.0	20.0	26.5
5	DH4004(I-6d)	37.5	17.6	24.3	67.6	55.4	4.4
6	DH4005(III-6d)	62.5	5.9	35.7	56.0	45.6	3.2
7	DH4006(V-7a)	0.0	88.2	28.6	91.2	64.6	5.9
8	DH4007(I-10a)	0.0	0.0	38.6	51.6	0.0	19.1
9	DH4008(III-10a)	0.0	17.6	38.6	0.0	74.4	4.4
10	DH4009(I-3b)	0.0	0.0	38.6	8.0	19.0	0.0
11	DH4010(VI-6b)	50.0	17.6	72.0	8.0	93.3	85.3
12	DH4011(VI-3a)	68.8	0.0	7.1	0.0	5.6	0.0
13	DH4012(VI-4d)	62.5	0.0	21.4	0.0	80.0	0.0
14	대조약제	87.5	70.6	70.8	100.0	97.4	97.1

주1) 대조약제: 오이 잭빛곰팡이병 Dichlofluanid 60 ppm, 오이 탄저병 Dithianon 50 ppm, 오이 흰가루병 Fenarimol 10 ppm, 토마토 잎마름역병 Dimethomorph 50 ppm, 벼 잎도열병 Tricyclazole 10 ppm, 벼 잎집무늬마름병 Validamycin A 50 ppm

새로운 친환경적인 살균제를 개발하기 위하여 식물에서 추출한 식물오일 42종을 대상으로 사과 점무늬낙엽병균 (*Alternaria alternata* f. sp. *mali*)의 10종에 대한 생



리활성을 실험하였다. 이중 thyme 오일이 비교적 여러 식물병원균에 활성을 나타내었다. Thyme 오일의 주성분을 GC/MS-spectrum으로 분석한 결과 thymol, carvacrol, borneol, linalool 및 *p*-cymene이 주성분인 것으로 확인되었다. 이들 화합물에 대해 동일한 방법으로 활성검증을 실시한 결과 thymol과 carvacrol이 높은 활성을 나타내었다. 이 두가지 화합물(thymol과 carvacrol)을 직접 작물에 적용한 결과 잣빛곰팡이병 등에서 좋은 방제효과를 나타내어 이 두 화합물을 친환경 살균제 개발의 선도물질로 정하였다. 또한 thymol, carvacrol과 유사구조를 갖는 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropylphenol과 4-isopropylphenol도 생리활성을 확인한 결과 비슷한 효과를 나타내어 이들 4종의 화합물도 선도물질로 선정하였다. 이렇게 선정된 thymol과 carvacrol, 4-isopropyl-3-methylphenol, 5-isopropyl-3-methylphenol, 2-isopropylphenol과 4-isopropylphenol ester, sulfonyl ester, carbamate, ether와 phosphoyl ester 계 유도체를 1차년도에 146종과 2차년도 80여종을 합성하였다. 합성의 확인은 IR, <sup>1</sup>H-NMR, GC/MS-spectrum을 이용하였다. 이들 유도체들에 대하여 식물병원균의 생장억제 실험은 위 식물오일실험에서 사용한 식물병원균과 동일한 방법으로 실시하였다.

## 제 4 장 유도체 화합물의 합성 및 생물활성검정

### 제 1 절 서 론

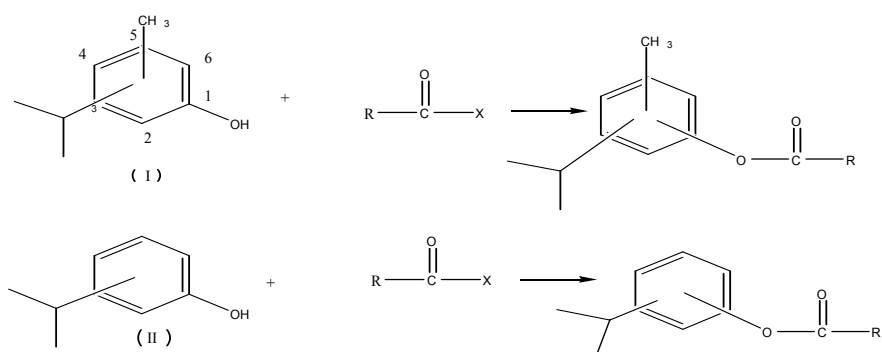
식물병원균과 합성물질과의 구조활성연구 결과, 선도물질에 ester group과 sulfonyl ester group이 치환될 경우 병원균에 대한 활성이 상대적으로 높았다. 이중 ester group에 methoxy, methyl 및 chloro기 등과 같은 e-donating group이 치환된 합성물질은 sulfonyl ester group보다 역병에 활성이 우수한 경향이였다. 또한 ester group에 fluoro기 치환될 경우 fluoro기의 수가 증가함에 따라 탄저병에 활성이 높은 경향이였다. 따라서 선도물질에 ester group만을 치환하기로 합성방향을 결정하고, 위에서 언급한 작용기들을 ester group에 고정시키고 선도물질에 methy기 및 methoxy기를 치환하여 합성물질을 최적화하려고 한다. 신규물질의 시장상황을 고려하여 target disease를 고추 역병과 오이 탄저병으로 결정하고 신규합성물질을 2개 병원균에 대하여 집중적인 screening을 진행하였다.

### 제 2 절 최적화합물 합성, 선정 및 작용기의 집중적인 합성

#### 1. 최적화합물의 합성방향

2차년도 연구결과 alkylphenol 유도체들의 ester계열과 sulfonyl ester 계열 화합물 162종을 합성하였다. Ester및 sulfonyl ester계열 화합물들의 합성과 합성된 각 유도체들의 구조는 scheme 1, 2와 같다.

**Scheme 1. Synthesis for ester derivatives**



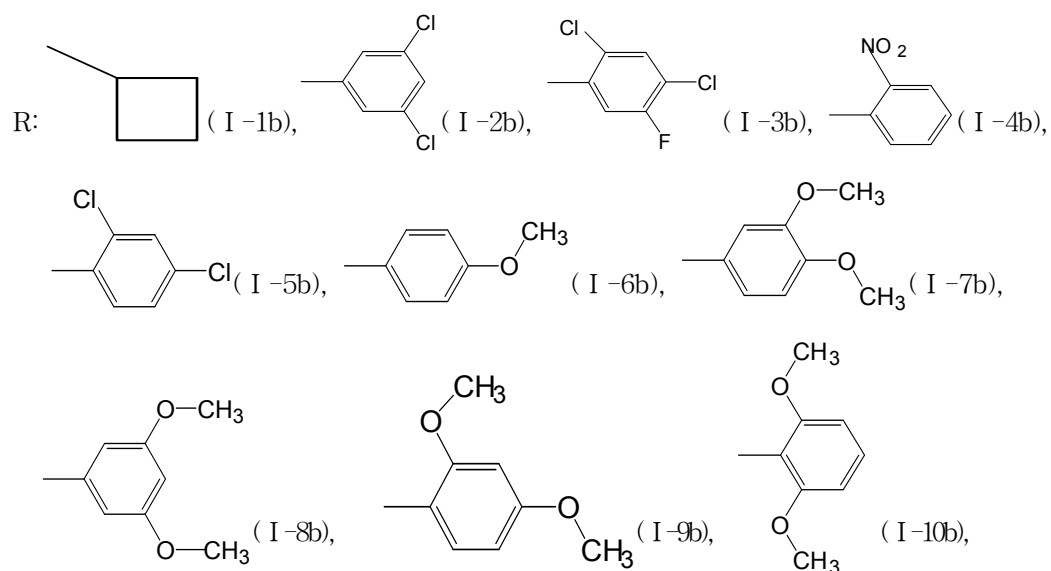
I: Thymol (2,isopropyl) (5.CH<sub>3</sub>)

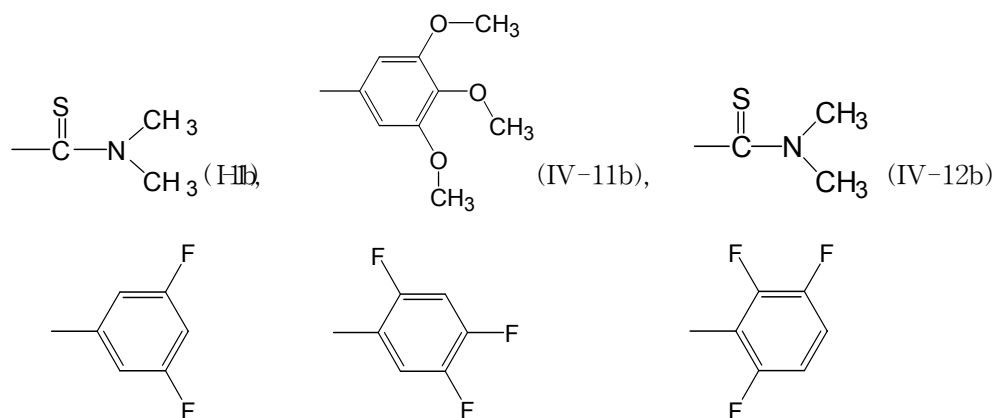
4-isopropyl-3-methylphenol (3,isopropyl) (4,CH<sub>3</sub>)

5-isopropyl-3-methylphenol (3,isopropyl) (5,CH<sub>3</sub>)

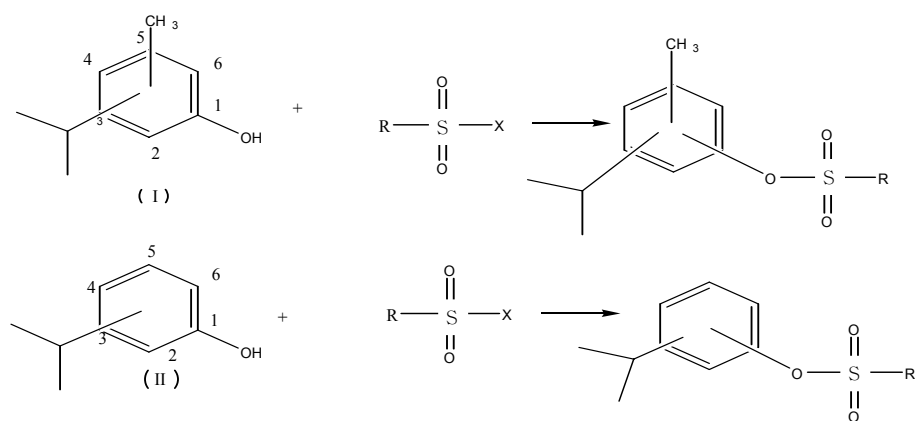
II: 2-isopropyl- (2, isopropyl)

4-isopropyl- (4, isopropyl)





Scheme 2. Synthesis for sulfonyl ester derivatives



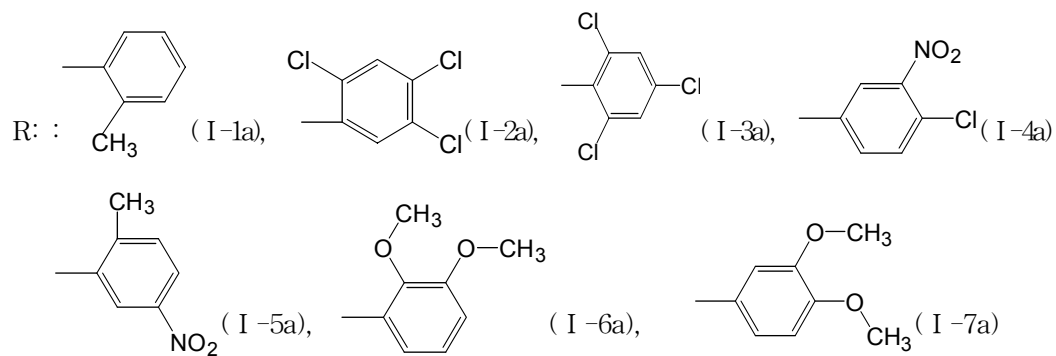
I: Thymol (2,isopropyl) (5.CH<sub>3</sub>)

4-isopropyl-3-methylphenol (3,isopropyl) (4,CH<sub>3</sub>)

5-isopropyl-3-methylphenol (3,isopropyl) (5,CH<sub>3</sub>)

II: 2-isopropyl- (2, isopropyl)

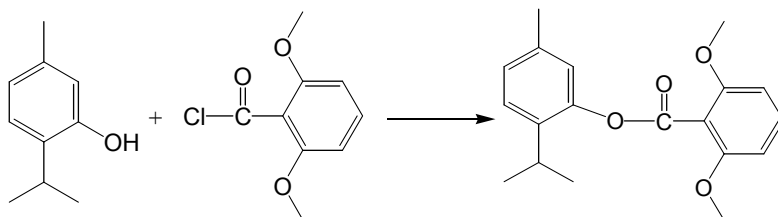
4-isopropyl- (4, isopropyl)



## 2. 유도체의 합성법 및 분석

### 가. Ester계열 화합물들

Ester계열 화합물들의 합성 방법은 다음과 같으며 한 예로 2-isopropyl-5-methylphenyl 2,6-dimethoxybenzoate(I-10b)의 제조 방법은 다음과 같다. Ester 계열의 다른 유도체들도 이와 유사한 방법으로 126종을 합성하였다.



Acetonitrile 30 ml에 thymol(I) 0.5 g(3.32 mmole)을 가하여 완전히 용해시킨다. Triethylamine을 1.1 ml를 가하여 30 분간 교반 후 0℃로 조절한다.

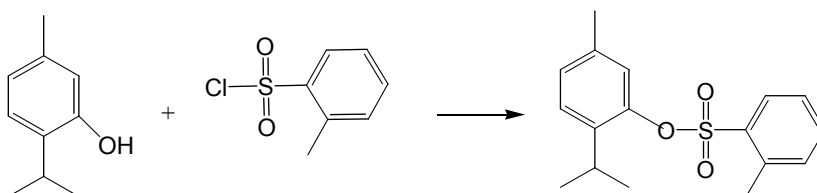
2,6-dimethoxybenzoyl chloride 0.80 g(3.98 mmole)를 0℃이하에서 서서히 적가 하였다. 온도를 실온으로 올리고 3 시간 동안 반응하였다. 증류수 20 ml와 염화메틸렌 30 ml를 첨가하고 20 분간 교반 시키고 유기층을 분리한다. 분리한 유기층에 H<sub>2</sub>O 20

ml을 가하여 30 분간 유기층을 H<sub>2</sub>O로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산 마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 silica gel 크로마토그래피법으로 정제하여 목적물 0.93 g(이론수율 : 89.3%)을 얻었다.

IR (KBr disk, cm<sup>-1</sup>) : 1748(C=O), 1257(C-O)  
 GC/MS (m/e) : 314(M<sup>+</sup>), 91(base peak)  
 RT (min.) : 21.2

#### 나. Sulfonyl ester계열

Sulfonyl ester계열화합물들의 합성 방법은 다음과 같으며 한 예로 2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-toluenesulfonate(I-1a)의 제조 방법은 다음과 같다. Sulfonyl ester계열의 다른 유도체들도 이와 유사한 방법으로 31종을 합성하였다.



Acetonitrile 30 ml에 thymol(I) 0.5 g(3.32 mmole)을 가하여 완전히 용해시킨다. Triethylamine을 1.1 ml를 가하여 30 분간 교반 후 0℃로 조절한다. 2-toluenesulfonyl chloride 0.76 ml(3.98 mmole)를 0℃이하에서 서서히 적가 하였다. 온도를 실온으로 올리고 3 시간 동안 반응하였다. 증류수 20 ml와 염화메틸렌 30 ml를 첨가하고 20 분간 교반 시키고 유기층을 분리한다. 분리한 유기층에 H<sub>2</sub>O 20 ml을 가하여 30 분간 유기층을 H<sub>2</sub>O로 세척한다. 유기층에 합하여 무수 황산 마그네슘(MgSO<sub>4</sub>) 1 g을 가하고, 여과하여 여액을 50℃ 이하에서 감압농축 시켜 silica gel 크로마토그래피법으로 정제하여 목적물 1.02 g(이론수율 : 98%)을 얻었다.

IR (KBr disk,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1359, 1172 (O=S=O)  
GC/MS (m/e) : 304( $\text{M}^+$ ), 91(base peak)  
RT (min.) : 22.8

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$  ppm : 1.0-1.1 (d, 6H,  $-\text{CH}_3$ ),  
2.1-2.2 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ),  
3.0-3.1 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ),  
3.3-3.4 (m, 1H,  $-\text{CH}$ ),  
6.7-6.8 (aromatic 3H)  
7.2-7.3 (aromatic 4H)

## 2. *In vivo* screening 시험 방법

순천향대에서 3차에 걸쳐 합성한 162종의 합성물질을 당사 screening 매뉴얼에 따라 100 ppm에서 screening 하였으며, 합성물질의 생리활성 spectrum과 시장상황을 고려하여 target disease를 고추 역병과 오이 탄저병으로 설정하였다.

### 가. 고추 역병 *in vivo* screening

#### 1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하여 실시하였다. 접종원으로 사용된 고추 역병(*Phytophthora capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200 ml,  $\text{CaCO}_3$  4.5g, agar 20g, D.W 800 ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100 ppm tween 20 용액에  $10^4$  sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 3-4엽의 작물체 경엽에 고루 살포하였다. 병원균 접종후 20°C Dew chamber로 이동하

여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 2일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

<sup>1</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ --- } \text{처리구}}{\text{무처리구의 병반 면적율\%}} \times 100$$

## 2) 오이 탄저병 *in vivo* screening

### 가) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Colletotichum orbiculae* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 오이 탄저병(*Colletotichum orbiculae*)은 PDA 배지에서 7일간 25℃로 배양한 후 분홍색의 포자를 붓으로 수거한 후 100 ppm tween 20 용액에 10<sup>5</sup> spores/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 분엽 2엽의 작물체 경엽에 고루 살포한다. 병원균 접종후 25℃ Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도한다. 접종 2일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

<sup>1</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ --- } \text{처리구}}{\text{무처리구의 병반 면적율\%}} \times 100$$



## 제 3 절 선정된 최적화합물의 포장시험, 제형화, 독성평가 및 특허출원

### 1. 1차 선정된 최적화합물의 제형화

제형화란 작물보호제의 원제에 적당한 부재료를 첨가하여 완전한 제품의 형태로 만드는 작업을 말한다. 제형화시 고려해야 할 점으로 약효, 약해, 가격, 비표적 생물에 대한 유해성 및 품질과 저장성, 혼용여부 등이 있다. 현재 개발되어 상품화에 쓰이고 있는 제형들에는 기존에 개발된 유제(Emulsifiable Concentrate), 수화제(Wettable Powder)에서부터 제제기술의 진보에 따라 근래에 개발된 수면부상성입제(Up Granule) 캡슐 현탁제(Capsule Suspension) 등과 같은 특수제형에 이르기까지 그 종류가 다양하다. 제제시에는 제제 가능한 원제의 선정 및 적절한 부재의 탐색, 계면활성제 및 용제에 대한 정확한 특성 분석, 약효의 증진, 약해의 경감 등의 효력을 지닌 적절한 부재의 탐색 등이 고려되어야 한다. 1차 선정된 최적화합물의 제형화에 있어서 이상의 사항을 고려하여 10% EC 제형으로 제제를 결정하였고 그 처방은 표 19와 같았다. EC 제형은 약효증진효과가 크고 균일한 용액을 형성하여 물리화학적 안정성이 높고 점도가 낮아 약제 제제 및 처리가 용이하다는 장점을 고려하였다.

### 2. 선정된 화합물의 소규모 생산공정 개발

#### 가. 소규모 생산 공정

최적화된 화합물 DBF 7018, DBF 7081, DBF 12075와 DBF 12080에 대하여 대량 포장시험을 위해 각 100 g을 제조하였다. 생산 공정은 4화합물 모두 alkylphenyl benzoate 방법에 준하여 실험하였으며 다음에 예로써 DBF 7018의 공정단계를 도식화 하였다(그림 9).

#### 나. DBF 7018 제조

5000 ml 반응기에 2-isopropyl-5-methylphenol 100g을 가한다. Acetonitrile 1000 ml를 가하여 완전히 용해시키고 triethylamine 195 ml를 가한다. 온도를 0℃로 온도

를 맞춘다. 3,4,5-trimethoxy benzoylchloride 155 g을 acetonitrile 200 ml에 녹여 mixture를 만든후 mixture를 반응기에 5℃ 미만으로 30분동안 적가하고 2시간동안 반응시킨다. 반응이 종결된후 methylene chloride 1000 ml와 H<sub>2</sub>O 1000 ml를 가하고 30분교반한다. 수층과 유기층을 분리하여 유기층에 magnesium sulfate anhydrous 20 g을 가하여 탈수 한 후 여과한다. 여액을 농축시켜 methylene chloride를 제거한다. 농축액에 acetonitrile 100 ml를 가하여 용해한후 Hexane 1500 ml를 1시간동안 천천히 적가하여 결정을 생성시킨다. 생성된 결정을 0~5℃에서 1시간동안 성숙시킨다. 결정을 여과하고 Hexane 200 ml로 세척한다. 여과된 결정은 50℃에서 5시간 감압 건조하여 388g 을 제조하였다.

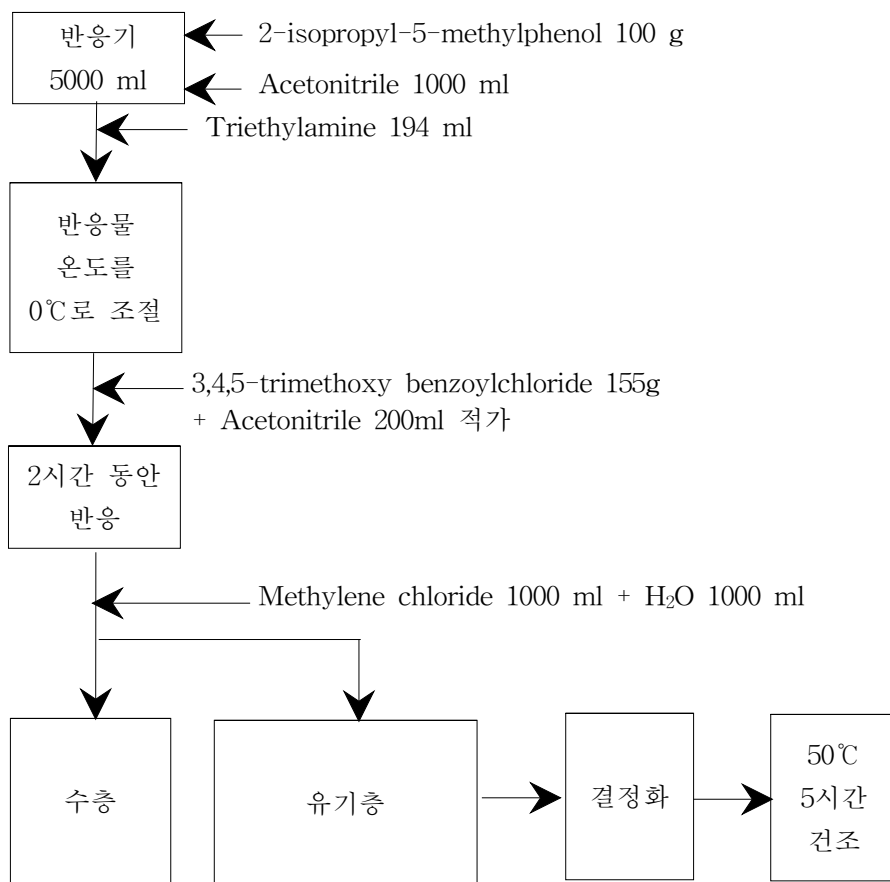


그림 9. DBF 7018의 소규모 생산 공정 모식도

표 19. 선발화합물의 포장시험을 위한 제제처방

(Role)	(Composition)	DBF 7018 EC	DBF 7081 EC	DBF 12075 EC	DBF 12080 EC
A.I	DBF 7018	10		-	-
	DBF 7081	-	10	-	-
	DBF 12075	-	-	10	-
	DBF 12080	-	-	-	10
Surfactant	Surfactant <sup>1)</sup>	20	20	20	20
Solvent	N-methyl-2-pyrrolidone	35	35	15	20
Solvent	Solvent naphtha(petroluem), heavy aromatic	35	35	55	50
(Total)		100	100	100	100
<sup>1)</sup> Surfactant : Dodecylbenzenesulfonic acid, calsium salt Polyoxyethylene tristyrylphenyl ether Solvent naphtha(petroluem), heavy aromatic의 blend 품					

## 2. 선정된 최적화합물의 포장시험

*In vivo* screening시 오이 탄저병에 대해 선발된 DBF 12075과 DBF 12080, 고추 역병에 대해 선발된 DBF 7018과 DBF 7081에 대한 포장시험을 각각 실시하였다. 포장은 경기도 화성시 정남면 보통리에 위치한 당사의 상습발병포장을 이용하였다.

### 가. 포장시험

#### 1) 재료 및 방법

*In vivo* screening시 최적화합물로 탄저병에 대해 1차 선발된 DBF 12075과 DBF 12080, 고추 역병에 대해 선발된 DBF 7018과 DBF 7081를 10% EC로 각각 제제하여 압출식 25L 동력분무기를 이용하여 접종 1일전을 기준으로 100 ppm, 200 ppm의 농도로 각각 3회 경엽처리하였다. 역병의 접종원으로는 2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 접종원으로하여 사용하였다. 역병의 접종원을 준비하기위해 균주를 V-8배지(V-8 juice 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800 ml)에서 7일간 배양하였고 기중균사를 제거한 후 24시간 20℃ incubator에서 광처리하여 형성된 다량의 유주자낭을 붓으로 수확하였고 100 ppm tween 20 용액에 첨가한 뒤 유주자낭의 최종농도를 10<sup>4</sup> sporangia/ml로 조절하여 접종하였다. 탄저병의 접종원은 상습발병포장의 발병양상이 양호하여 인공접종하지 않았다. 포장에 두 시험 모두 부자품종의 고추를 정식하였고 난괴법의 3반복으로 포장설계를 하여 시험하였다. 고추 역병의 각 처리구의 방제효과 산출은 전체 주수에 대한 발병주수의 비율인 이병주수율로 구하였고, 고추 탄저병에서의 각 처리구의 방제효과 산출은 시험구내의 전체 과실에 대한 이병과수인 이병과율로 구하였다. 각 약제의 방제효과는 처리구의 이병주율과 이병과율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다. 각 산출식<sup>1)</sup>은 다음과 같다.

1) 산출식

$$\text{이병주율(\%)} = (\text{처리구의 발병주수} / \text{처리구의 총 주수}) \times 100$$

$$\text{이병과율(\%)} = (\text{처리구의 발병과수} / \text{처리구의 총 과수}) \times 100$$

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병주[과] 율} - \text{처리구 이병주[과] 율}) / \text{무처리구 이병주[과] 율} \times 100$$

3. 독성시험

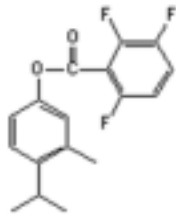
선발된 화합물들 중 오이 탄저병에 우수한 활성을 보였던 DBF 12080를 표준으로 삼아 독성시험을 실시하였다. 독성시험은 동부기술원 신약연구소 약리연구팀에 의뢰를 통해 실시하였다. 유전독성 실험 방법 중 하나인 "SOS Chromotest"를 이용하여 실시하였다.

가. 서론

시험 물질의 유전독성을 검사하기 위한 방법으로는 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험 (Ames test) 과 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험과 *in vivo* 소핵실험 등이 있다. 이들 시험 중, 본 실험에서 사용한 SOS chromotest는 E. coli PQ37 strain의 여러 gene을 mutation 시켜 만든 strain으로, Mutation 된 부분은 uvrA gene, rfa gene 그리고 lac Z gene 이다. UvrA gene mutation은 독성 물질들로부터 DNA damage agent를 증가시키는 역할을 하며, rfa gene mutation은 E. coli를 LPS deficient strain을 만들어 독성 물질을 cell 내로 더욱 잘 유입되게 하는 역할을 한다. 마지막으로 lac Z gene mutation은 lac Z gene region을 deletion 시킨 후, sfi A operon에 lac Z gene을 fusion 시켜 독성물질로 인한 DNA 손상을 받게 되면  $\beta$ -galactosidase activity 가 증가되는 역할을 한다. 이와 같은 원리의 SOS chromotest를 이용하여 신 작물보호제 후보 의뢰 물질들의 유전독성 여부를 확인하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 실험물질 및 시약



Chemical Formula : $C_{17}H_{15}F_3O_2$
Molecular Weight : 308.30
Color : Brown powder
Purity : >95%

가) 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxide, Sigma, N8141)

10mg 의 4NQO를 weighting 하여 1 ml의 DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma, C6164)에 녹여 stock을 만든 후, DMSO를 이용하여 사용 농도로 (50 ug/ml, 25 ug/ml, 12.5 ug/ml 6.25 ug/ml and 0ug/ml) 희석하였다. 완전히 녹은 4NQO는 LB broth (Difco, 240230)를 이용하여 1/10 로 희석하였다. 최종 농도는 166.7 ug/ml, 83.3 ug/ml, 41.7 ug/ml 20.8 ug/ml, 0 ug/ml으로 시험하였다.

나) DBF-12080

시료를 DMSO를 이용하여 100 mM의 stock으로 만든 후, 25 mM과 6.25 mM의 농도로 추가 희석하였다. 완전히 녹은 시료는 LB broth (Difco, 240230)를 이용하여 1/10 로 희석한 후, 최종농도 333.3 uM, 83.3 uM, 20.8 uM, 0 uM로 시험하였다.

다) LA media

증류수를 이용하여 제조한 10mg/ml의 ampicillin 1 ml 을 LB broth 500 ml에 첨가하여 사용하였다.

라) B buffer

$\beta$ -galactosidase assay에 사용되는 buffer로 제조방법은 증류수 1 liter에  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  16.1 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5.5 g, KCl 0.75 g,  $\text{MgSO}_4$  0.25 g, SDS 1 g 그리고 *b*-mercaptoethanol 2.7 ml을 넣어 완전히 용해한 후, pH 7.0으로 보정하여 사용하였다.

마) P buffer

Alkaline phosphatase assay에 사용되는 buffer로 제조방법은 1 liter에 tris base 121 g과 SDS 1 g 을 넣어 완전히 용해한 후, HCl을 이용하여 pH 8.8로 보정하여 사용하였다.

바) ONPG solution (4 mg/ml)

$\beta$ -galactosidase assay에 사용되는 substrate로 제조방법은 ONPG powder 40 mg 을 weighing 한 후, phosphate buffer 10 ml을 첨가하여 사용하였다.

사) PNPG solution (4 mg/ml)

Alkaline phosphatase assay에 사용되는 substrate로 제조방법은 PNPP tablet (8 mg/1ea tablet) 5개를 10 mL의 P buffer에 용해한 후, 사용하였다.

2) 시험방법

가) Overnight culture 한 *E. coli* PQ37 strain 을 loop를 이용하여 한 colony채취 하여 7 ml LA media에 넣은 후, 37°C shaking water bath에서  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml이 될 때까지 키운다. (약 2.5 ~ 3시간 소요, 600nm에서 O.D 값이 0.3~0.4)

나)  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml이 된 배양액 2 ml을 18 ml의 LB broth와 혼합한다.

다) Step 4.2.의 배양액 20 ml을 15 ml test tube에 각각 0.6 ml씩 분주한 후, LB broth를 이용하여 10배로 희석한 각각의 stock compound 20  $\mu$ L를 위의 test tube에 각각 떨어뜨린 후, 37°C shaking water bath에서 2시간 incubation 한다.

라) Step 다 에서 incubation이 끝난 각각의 sample 0.62 ml을 0.3 ml씩 두 개로 나누어 각각 새로운 test tube에 분주한다. (이때 만들어진 stock compound 각각에 대한 두 개의 sample 중 한가지는  $\beta$ -galactosidase assay에 쓰이고, 다른 하나는 alkaline phosphatase assay에 쓰인다.)

마) Step 라 에서 만들어진 sample 중  $\beta$ -galactosidase assay 용 tube에는 2.7 ml의 buffer B를 첨가하고, alkaline phosphatase assay용 tube에는 2.7 ml의 buffer P를 첨가한다. 각각의 assay tube는 37°C incubator에서 10 min incubation 한다.

바) Step 4.5. 에서 incubation이 끝난 tube중  $\beta$ -galactosidase assay 용 tube에는 4 mg/ml ONPG 0.6 ml (final 0.4 mg/ml) 을 첨가하고, alkaline phosphatase assay용 tube에는 4 mg/ml PNPP 0.6 ml (final 0.4 mg/ml) 을 첨가한 후, 30 min 상온에서 방치해둔다. (이때 발색이 나타나게 된다.)

사) Step 4.6. 에서  $\beta$ -galactosidase assay 용 tube에는 1M의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution 2 ml을 첨가하여 반응을 정지 시킨다. 그리고 alkaline phosphatase assay용 tube에는 2.5 M의 HCl 1 ml을 첨가하고, 5 분 후 2 M의 Tris base 1 ml을 첨가하면서 모든 반응을 정지 시킨다.

아) 모든 assay가 끝난 sample 들은 Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 420 nm에서 reading 한다.



3) 시험 평가 방법

가) Enzyme Unit

$$\text{Enzyme Unit} = \frac{1000 \times A_{420}}{t}$$

A420 : 420 nm에서 읽은 Optical Density

t : Substrate (ONPG or PNPP)를 넣은 후의 incubation time (min)

◎ 본 소에서는 30 min으로 정하였음.

나)  $\beta$ -Galactosidase / Alkaline phosphatase unit (= ratio R)

$$\text{Ratio R} = \frac{\text{B-Galactosidase unit}}{\text{Alkaline phosphatase unit}}$$

다) Induction factor (= I)

$$I = \frac{R(Y)}{R(X)}$$

R (X) : 시험 시료의 농도가 "zero"일 때의 ratio R

R (Y) : 시험 시료의 해당 농도에서의 ratio R

#### 4. 특허출원

본 과제를 진행하면서 발견한 방제활성을 갖는 천연물 및 그 유도체에 관한 2건의 특허를 출원하였다.

가. 식물병원균의 생장억제활성을 갖는 티몰, 카바크롤 및그들의 유도체

- 1) 출원번호 10-2004-0049385
- 2) 출원일자 2004년 06월 29일
- 3) 공개번호 10-2006-0000496
- 4) 공개일자 2006년 01월 06일

나. 식물병원균의 생장억제활성을 갖는 알킬페놀 유도체

- 1) 출원번호 10-2004-0049388
- 2) 출원일자 2004년 06월 29일
- 3) 공개번호 10-2006-0000499
- 4) 공개일자 2006년 01월 06일

## 제 4 절 결과 및 고찰

### 1. *In vivo* screening 시험 결과

#### 가. 고추 역병 *in vivo* screening 실험결과

선도물질에 ester group과 sulfonyl ester group이 치환될 경우 병원균에 대한 활성이 상대적으로 높았다. 이중 ester group에 methoxy, methyl 및 chloro기 등과 같은 e-donating group이 치환된 합성물질은 sulfonyl ester group보다 역병에 활성이 우수한 경향이였다. 총 162종의 합성물질에 대하여 고추 역병 screening 결과 DBF 7018 및 DBF 7081은 100 ppm 처리구에서 90.0%의 방제효과를 나타내어, 대조약제인 dimethomorph의 95.6%보다 방제효과가 상대적으로 낮았으나 합성물질 중 가장 우수한 방제효과였다.

#### 나) 오이 탄저병 *in vivo* screening 실험결과

선도물질에 ester group과 sulfonyl ester group이 치환될 경우 병원균에 대한 활성이 상대적으로 높았다. 이중 ester group에 methoxy, methyl 및 chloro기 등과 같은 e-donating group이 치환된 합성물질은 sulfonyl ester group보다 오이 탄저병에 활성이 우수한 경향이였다. 총 162종의 합성물질에 대하여 오이 탄저병 screening 결과 DBF 12075 및 DBF 12080는 100 ppm 처리구에서 96.4%의 방제효과를 나타내어, 대조약제인 dithianon의 96.4%와 비등한 방제효과를 나타내었다. Fluoro기가 치환되는 경우 오이 탄저병에 특이적으로 활성이 있었으며, 치환개수 많을수록 방제효과가 증가하는 경향이 뚜렷하였다.

표 20. 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한 경엽처리 효과

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저병
DBF-7001	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-acetamido-4-methyl-5-thiazolesulfonate	100	26.7	16.3
DBF-7002	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,4,5-Trichloro benzenesulfonate	100	40	50
DBF-7003	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-Mesitylene sulfonate	100	0	20.4
DBF-7004	2-Isopropyl-5-methylphenyl 4-Chloro-3-nitro-benzenesulfonate	100	0	28.5
DBF-7005	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonate	100	0	0
DBF-7006	2-Isopropyl-5-methylphenyl m-Toluene sulfonate	100	17.8	26.5
DBF-7007	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,5-dimethoxy benzenesulfonate	100	0	27
DBF-7008	2-Isopropyl-5-methylphenyl 3,4-dimethoxy benzenesulfonate	100	70.4	77
DBF-7009	2-Isopropyl-5-methylphenyl Cyclobutane carbonate	100	4.4	60.3
DBF-7010	2-Isopropyl-5-methylphenyl 3,5-Dichloro benzoate	100	0	0
DBF-7011	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,4-Dichloro-5-fluorobenzoate	100	0	14.2
DBF-7012	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2-Nitrobenzoate	100	4.4	20.4
DBF-7013	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,4-Dichloro benzoate	100	0	40
DBF-7014	2-Isopropyl-5-methylphenyl 4-methoxy benzoate	100	69	41
DBF-7015	2-Isopropyl-5-methylphenyl 3,4-dimethoxy benzoate	100	0	53
DBF-7016	2-Isopropyl-5-methylphenyl 3,5-dimethoxy benzoate	100	24	31
DBF-7017	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,4-dimethoxy benzoate	100	64	27
DBF-7018	2-Isopropyl-5-methylphenyl 2,6-dimethoxy benzoate	100	90	34
DBF-7019	2-Isopropyl-5-methylphenyl 3,4,5-trimethoxy benzoate	100	57	34
DBF-7020	2-Isopropyl-5-methylphenyl dimethylthiocarbamate	100	38	32.6
DBF-7021	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2-acetamido-4-methyl-5-thiazolesulfonate	100	31.1	14.2
DBF-7022	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4,5-Trichloro benzenesulfonate	100	0	0
DBF-7023	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Mesitylene sulfonate	100	0	14.2
DBF-7024	4-Isopropyl-3-methylphenyl 4-Chloro-3-nitro-benzenesulfonate	100	50	10.1
DBF-7025	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonate	100	0	0
DBF-7026	4-Isopropyl-3-methylphenyl m-Toluene sulfonate	100	0	0
DBF-7027	4-Isopropyl-3-methylphenyl Cyclobutane carbonate	100	4.4	39.6
DBF-7028	4-Isopropyl-3-methylphenyl 3,5-Dichloro benzoate	100	26.7	96

표 20. 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한 경엽처리 효과 (표 20에서 계속)

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저 병
DBF-7029	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4-Dichloro-5-fluorobenzoate	100	0	0
DBF-7030	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Nitrobenzenoate	100	0	0
DBF-7031	4-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4-Dichloro benzoate	100	0	32.6
DBF-7032	5-Isopropyl-3-methylphenyl -acetamido-4-methyl-5-thiazolesulfonate	100	35.6	18.3
DBF-7033	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4,5-Trichloro benzenesulfonate	100	57	83.3
DBF-7034	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Mesitylene sulfonate	100	0	20.4
DBF-7035	5-Isopropyl-3-methylphenyl -Chloro-3-nitro-benzenesulfonate	100	4.4	10.1
DBF-7036	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonate	100	48	0
DBF-7037	5-Isopropyl-3-methylphenyl m-Toluene sulfonate	100	51	16.7
DBF-7038	5-Isopropyl-3-methylphenyl Cyclobutane carbonate	100	13.3	26.5
DBF-7039	5-Isopropyl-3-methylphenyl 3,5-Dichloro benzoate	100	0	0
DBF-7040	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4-Dichloro-5-fluorobenzoate	100	0	
DBF-7041	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2-Nitrobenzenoate	100	0	0
DBF-7042	5-Isopropyl-3-methylphenyl 2,4-Dichloro benzoate	100	86.7	0
DBF-7043	4-Isopropylphenyl 2-acetamido-4-methyl-5-thiazolesulfonate	100	8.9	20.4
DBF-7044	4-Isopropylphenyl 2,4,5-Trichloro benzenesulfonate	100	0	33.3
DBF-7045	4-Isopropylphenyl 2-Mesitylene sulfonate	100	22	32.6
DBF-7046	4-Isopropylphenyl 4-Chloro-3-nitro-benzenesulfonate	100	60.8	0
DBF-7047	4-Isopropylphenyl 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonate	100	0	0
DBF-7048	4-Isopropylphenyl m-Toluene sulfonate	100	4.4	47
DBF-7049	4-Isopropylphenyl 2,5-dimethoxy benzenesulfonate	100	20	61
DBF-7050	4-Isopropylphenyl 3,4-dimethoxy benzenesulfonate	100	50	22
DBF-7051	4-Isopropylphenyl Cyclobutane carbonate	100	0	12.2
DBF-7052	4-Isopropylphenyl 3,5-Dichloro benzoate	100	60.8	84
DBF-7053	4-Isopropylphenyl 2,4-Dichloro-5-fluorobenzoate	100	0	0
DBF-7054	4-Isopropylphenyl 2-Nitrobenzenoate	100	55.7	0
DBF-7055	4-Isopropylphenyl 2,4-Dichloro benzoate	100	23	0
DBF-7056	4-Isopropylphenyl 4-methoxy benzoate	100	0	90

표 20. 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한 경엽처리 효과(표 20에서 계속)

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저병
DBF-7057	4-Isopropylphenyl 3,4-dimethoxy benzoate	100	0	38
DBF-7058	4-Isopropylphenyl 3,5-dimethoxy benzoate	100	17	84
DBF-7059	4-Isopropylphenyl 2,4-dimethoxy benzoate	100	44.6	34
DBF-7060	4-Isopropylphenyl 2,6-dimethoxy benzoate	100	63	55
DBF-7061	4-Isopropylphenyl 3,4,5-trimethoxy benzoate	100	64	17
DBF-7062	4-Isopropylphenyl dimethylthiocarbamate	100	78	36
DBF-7063	2-Isopropylphenyl 2-acetamido-4-methyl-5-thiazolesulfonate	100	13.3	14.2
DBF-7064	2-Isopropylphenyl 2,4,5-Trichloro benzenesulfonate	100	85	0
DBF-7065	2-Isopropylphenyl 2-Mesitylene sulfonate	100	8.9	22.5
DBF-7066	2-Isopropylphenyl 4-Chloro-3-nitro-benzenesulfonate	100	0	38.8
DBF-7067	2-Isopropylphenyl 2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonate	100	63.7	16.7
DBF-7068	2-Isopropylphenyl m-Toluene sulfonate	100	17.8	0
DBF-7069	2-Isopropylphenyl 2,5-dimethoxy benzenesulfonate	100	36	10
DBF-7070	2-Isopropylphenyl 3,4-dimethoxy benzenesulfonate	100	45.4	0
DBF-7071	2-Isopropylphenyl Cyclobutane carbonate	100	0	26.5
DBF-7072	2-Isopropylphenyl 3,5-Dichloro benzoate	100	55.8	0
DBF-7073	2-Isopropylphenyl 2,4-Dichloro-5-fluorobenzoate	100	0	0
DBF-7074	2-Isopropylphenyl 2-Nitrobenzoate	100	8.9	32.6
DBF-7075	2-Isopropylphenyl 2,4-Dichloro benzoate	100	23	0
DBF-7076	2-Isopropylphenyl 4-methoxy benzoate	100	0	27
DBF-7077	2-Isopropylphenyl 3,4-dimethoxy benzoate	100	0	79
DBF-7078	2-Isopropylphenyl 3,5-dimethoxy benzoate	100	0	10
DBF-7089	2-Isopropylphenyl 2,4-dimethoxy benzoate	100	33.3	48
DBF-7080	2-Isopropylphenyl 2,6-dimethoxy benzoate	100	48	54
DBF-7081	2-Isopropylphenyl 3,4,5-trimethoxy benzoate	100	90	0
DBF-7082	2-Isopropylphenyl dimethylthiocarbamate	100	0	0
Dimethomorph (역병대조)	(E, Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl] morpholine	100	95.6	-
Dithianon (탄저병대조)	5,10-Dihydro-5,10dioxonaphtho-[2,3-b]-1,4-dithi-in-2,3-dicar bonitrile	100	-	96.4

표 21. Heterocyclic 및 fluoro compounds의 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한  
경엽처리 효과

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저
DBF-12001	2-[(2-Amino-thiazol-4-yl)-(2-isopropyl-5-methyl-phenoxy)carbonyl]-methyleneaminoxy]-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester	100	51.4	0.0
DBF-12002	2-[(2-Amino-thiazol-4-yl)-(2-isopropyl-5-methyl-phenoxy)carbonyl]-methyleneaminoxy]-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester	100	47.1	28.6
DBF-12003	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxyimino-acetic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	21.4	8.6
DBF-12004	(2-Amino-thiazol-4-yl)-tert-butoxycarbonyl-methoxyimino-acetic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	70.0	62.9
DBF-12005	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	5.7	28.6
DBF-12006	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	11.4	71.4
DBF-12007	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxyimino-acetic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	17.1	8.6
DBF-12008	2-[(2-Amino-thiazol-4-yl)-(4-isopropyl-3-methyl-phenoxy)carbonyl]-methyleneaminoxy]-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester	100	27.1	45.7
DBF-12009	(2-Amino-thiazol-4-yl)-tert-butoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	71.4	31.4
DBF-12010	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxyimino-acetic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	48.6	42.9
DBF-12011	(2-Amino-thiazol-4-yl)-tert-butoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	78.6	40.0
DBF-12012	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	5.7	45.7
DBF-12013	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	52.9	80.0
DBF-12014	2-[(2-Amino-thiazol-4-yl)-(3-isopropyl-5-methyl-phenoxy)carbonyl]-methyleneaminoxy]-2-methyl-propionic acid tert-butyl ester	100	37.1	74.3
DBF-12015	(2-Amino-thiazol-4-yl)-acetic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	14.3	71.4
DBF-12016	(2-Amino-thiazol-4-yl)-acetic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	24.3	62.9
DBF-12017	(2-Amino-thiazol-4-yl)-methoxycarbonylmethoxyimino-acetic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	18.6	31.4
DBF-12018	6-Chloro-2-(2-isopropyl-5-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	23.3	64.3
DBF-12019	6-Chloro-2-(2-isopropyl-5-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	51.1	59.5
DBF-12020	6-Chloro-2-(3-isopropyl-5-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	12.2	52.4
DBF-12021	6-Chloro-2-(3-isopropyl-5-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	24.7	45.7

표 21. Heterocyclic 및 fluoro compounds의 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한  
경엽처리 효과 (계속)

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저
DBF-12022	6-Chloro-2-(4-isopropyl-3-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	17.8	21.5
DBF-12023	6-Chloro-2-(4-isopropyl-3-methyl-phenoxy)-benzoxazole	100	53.3	22.9
DBF-12024	6-Chloro-2-o-tolyloxy-benzoxazole	100	6.7	42.9
DBF-12025	6-Chloro-2-(4-isopropyl-phenoxy)-benzoxazole	100	13.3	47.6
DBF-12026	2-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	15.6	33.3
DBF-12027	2-Fluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	8.9	33.3
DBF-12028	2-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	14.4	33.3
DBF-12029	2-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	6.7	52.4
DBF-12030	2-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	11.1	42.9
DBF-12031	3-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	55.6	19.0
DBF-12032	3-Fluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	14.4	47.6
DBF-12033	3-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	24.4	73.8
DBF-12034	3-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	27.8	33.3
DBF-12035	3-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	26.7	57.1
DBF-12036	4-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	28.6
DBF-12037	4-Fluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12038	4-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	2.8	14.3
DBF-12039	4-Fluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12040	4-Fluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12041	2,3-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12042	2,3-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12043	2,3-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	2.8	47.6
DBF-12044	2,3-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	13.9	38.1
DBF-12045	2,3-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	23.8
DBF-12046	2,4-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	38.1
DBF-12047	2,4-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	11.1	0.0
DBF-12048	2,4-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12049	2,4-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	9.5
DBF-12050	2,4-Difluoro-benzoic acid o-tolyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12051	2,5-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0
DBF-12052	2,5-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	0.0



표 21. Heterocyclic 및 fluoro compounds의 고추 역병 및 오이 탄저병에 대한  
경엽처리 효과 (계속)

code No.	Compound name	dose (ppm)	방제가 (%)	
			고추 역병	오이 탄저
DBF-12053	2,5-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	44.4	19.0
DBF-12054	2,5-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	58.3	0.0
DBF-12055	2,5-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	19.4	14.3
DBF-12056	2,6-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	8.3	19.0
DBF-12057	2,6-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	16.7	42.9
DBF-12058	2,6-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	38.9	33.3
DBF-12059	2,6-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	36.1	0.0
DBF-12060	2,6-Difluoro-benzoic acid o-tolyl ester	100	83.3	0.0
DBF-12061	3,4-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	25.0	33.3
DBF-12062	3,4-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	25.0	61.9
DBF-12063	3,4-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	19.4	23.8
DBF-12064	3,4-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	19.4	47.6
DBF-12065	3,4-Difluoro-benzoic acid o-tolyl ester	100	16.7	28.6
DBF-12066	3,5-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	19.4	19.0
DBF-12067	3,5-Difluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	25.0	0.0
DBF-12068	3,5-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	4.4	86.7
DBF-12069	3,5-Difluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	2.2	76.2
DBF-12070	3,5-Difluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	84.8
DBF-12071	2,5-Bis-trifluoromethyl-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	50.0
DBF-12072	3,5-Bis-trifluoromethyl-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	39.3
DBF-12073	2,4,5-Trifluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	0.0	67.9
DBF-12074	2,4,5-Trifluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenylester	100	0.0	35.7
DBF-12075	2,4,5-Trifluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	0.0	96.4
DBF-12076	2,4,5-Trifluoro-benzoic acid 4-isopropyl-phenyl ester	100	0.0	82.1
DBF-12077	2,4,5-Trifluoro-benzoic acid 2-isopropyl-phenyl -ester	100	0.0	46.4
DBF-12078	2,3,6-Trifluoro-benzoic acid 2-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	61.7	92.9
DBF-12079	2,3,6-Trifluoro-benzoic acid 3-isopropyl-5-methyl-phenyl ester	100	59.6	92.9
DBF-12080	2,3,6-Trifluoro-benzoic acid 4-isopropyl-3-methyl-phenyl ester	100	55.3	96.4
Dimethomorph (역병대조)	(E, Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl] morpholine	100	95.6	-
Dithianon (탄저병 대조)	5,10-Dihydro-5,10dioxonaphtho-[2,3-b]-1,4-dithi-in-2,3-dicarbonitrile	100	-	96.4

2. 1차 선발화합물의 포장시험 결과

고추 탄저병과 역병균 모두 최종 약제처리 10후 조사하였으며, 고추 탄저병은 이 병과율을 조사하였고, 고추 역병은 이병주율 조사하였으며 결과는 다음과 같았다.

가. 고추 탄저병 포장시험 결과

무처리 평균발병율이 23.1%로 약효평가에 충분하였다.

표 22. 고추 탄저병 포장시험 결과

처리구	약제	희석배수	ppm	이병과율			평균 이병과율	방제가
				R1	R2	R3		
1	Untreated	-	-	22.1	17.4	29.8	23.1	0.0
2	DBF 12075 10% EC	1,000배	100	17.9	10.1	18.1	15.4	33.2
3	DBF 12075 10% EC	500배	200	12.4	11.7	7.7	10.6	54.0
4	DBF 12080 10% EC	1,000배	100	5.3	19.3	15.0	13.2	42.7
5	DBF 12080 10% EC	500배	200	8.7	11.4	3.3	7.8	66.1
6	Dithianon 75% WP(대조)	1,000배	750	2.4	4.1	8.1	4.8	79.0
7	Tebuconazole 25% EC(대조)	1,000배	250	2.1	1.2	2.0	1.8	92.3

나. 고추 역병 포장시험 결과

무처리 이병주율이 100%로 약효평가에 충분하였다.

표 23. 고추 역병 포장시험 결과

처리구	약제	희석배수	ppm	이병과율			평균 이병주율	방제가
				R1	R2	R3		
1	Untreated	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0
2	DBF 7018 10% EC	1,000배		66.7	70.8	100.0	79.2	20.8
3	DBF 7018 10% EC	500배		70.8	70.8	83.3	75.0	25.0
4	DBF 7081 10% EC	1,000배		70.8	62.5	79.2	70.8	29.2
5	DBF 7081 10% EC	500배		83.3	75.0	79.2	79.2	20.8
6	Dimethomorph WP(대조)	1,000배		41.7	54.2	20.8	38.9	61.1

### 3. 독성시험 결과

표 24. DBF 12080의 유전독성검사 결과표

농도	의뢰물질	Induction Factor DBF-12080
0 uM		1.0
12.5 uM		1.0
83.3 uM		0.9
333.3 uM		0.9

DBF 12080 대해서 유전독성 여부를 검토하고자 "SOS chromotest "를 실험하였다. 그 결과 DBF 12080의 유전독성 유무를 판단하는 induction factor의 값은 실험농도 (0 uM~333.3 uM)에서 1.5 미만으로 유전독성이 없음을 확인하였다.

#### 1차 실험 결과

1차 실험결과 유전독성 유무를 판정하는 induction factor의 값이 1.5 미만이며, b-galactosidase unit과 alkaline phosphatase unit 역시 일정한 값을 나타내는 것으로 보아 의뢰 물질인 DBF-12080과 K-56756은 실험농도 (0uM~333.3uM)에서 유전독성이 없음을 알 수 있으며, 대조 물질로 사용한 4NQO의 induction factor와 b-galactosidase unit 값이 일정하게 증가하는 것으로 보아 실험이 정상적으로 이루어졌음을 알 수 있다(그림 10).

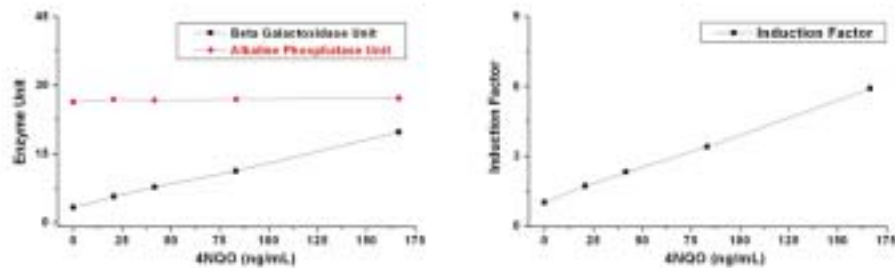


그림 10. Dose response in the SOS chromotest for 4NQO

### 3. 식물병원균과 합성물질의 구조활성 연구

#### 가) Methoxy기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

선도물질에 Ester기가 치환되고 dimethoxybenzoate가 치환되는 경우 methoxy기가 2, 6번 위치에 치환될 경우 역병에 효과가 있는 경향이였다. 이는 대조 약제인 dimothomorph의 구조에서도 dimethoxybenzoate가 치환되어 있는 것으로 볼때 methoxy기가 역병에 대한 효과적인 작용기인 것으로 추측할 수 있었다. 그림 11에서와 같이 3,5번 위치에 methoxy기가 치환될 경우는 역병에는 활성이 미흡하였으나 상대적으로 탄저병에 활성이 있는 것으로 나타났다(그림 11).

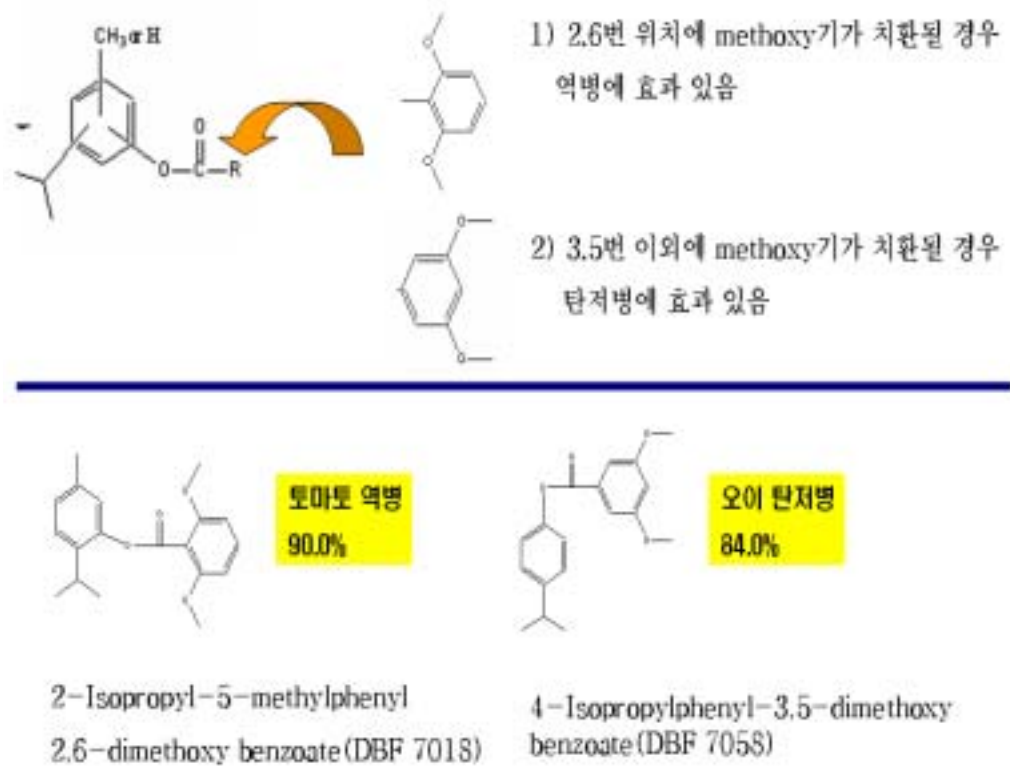


그림 11. Methoxy기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

나) Chloro기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

선도물질에 ester기가 치환되고 chloro가 치환되는 경우 methoxy기가 3, 5번 위치에 치환될 경우 탄저병에 활성이 있는 경향이였다. 3, 5번 위치 이외의 위치에서는 상대적으로 탄저병에 대한 활성이 저조하였으며, 역병에는 chloro 치환위치에 관계없이 저조한 활성으로 조사되었다(그림 12).

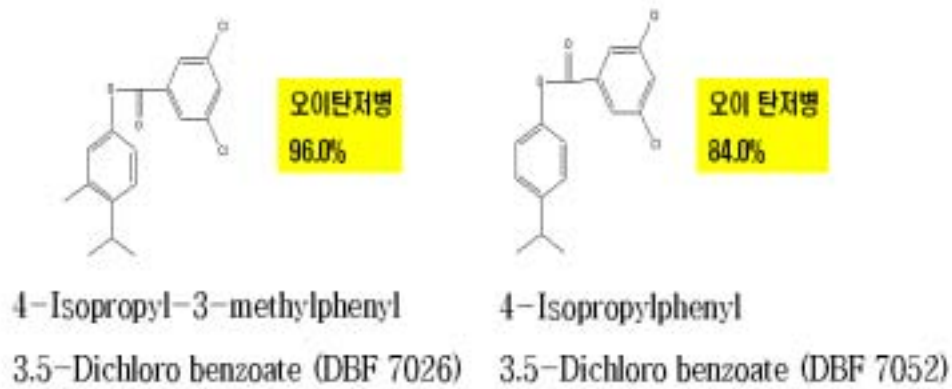
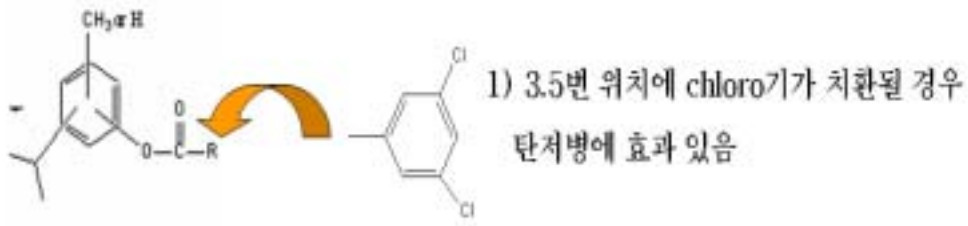


그림 12. Chloro기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

다) Fluoro기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

선도물질에 Ester기가 치환되고 fluorobenzoate가 치환되는 경우 기가 3, 5번 위치에 치환될 경우 탄저병에 활성이 있는 경향이었으며 2, 6번 위치에 치환될 경우 상대적으로 효과가 미흡하였다. Fluoro 치환개수에 비례하여 탄저병에 대한 방제효과가 상승하는 경향이 있었으며, 탄저병 대조약제들에 치환되어 있는 fluoro기와 유사한 작용을 하는 것으로 판단된다. Fluoro기의 역병에 대한 활성은 미흡한 것으로 나타났다(그림 13).

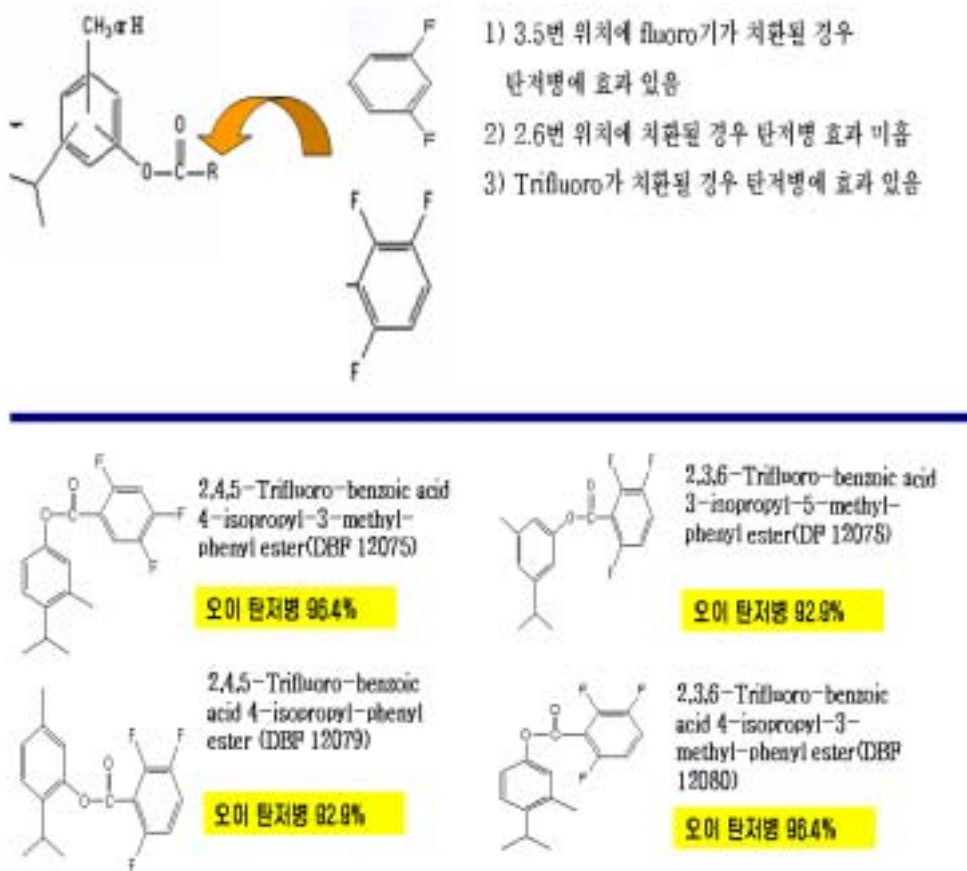


그림 13. Fluoro 기 치환위치에 따른 구조활성의 경향

## 제 5 장 후보물질 탐색 및 활성평가

### 제 1 절 서 론

오이 탄저병과 고추 역병균에 대해 DBF 12001~12080의 화합물을 단일농도로 1차 *in vivo* screening 한 결과 오이 탄저병에서 DBF 12075, 12080을 고추 역병에서 DBF 7018, 7081을 각각 선발하여 포장시험을 수행하였다. 시험 수행결과 고추 역병에 대해 선발되었던 DBF 7018, 7081은 포장에서의 활성을 확인할 수 없었다. 이에 반해 오이 탄저병 *in vivo* screening 시 선발되었던 DBF 12075, 12080은 고추 탄저병 포장시험에서 대조약제로 사용된 tebuconazole과 dithianon 보다 활성은 다소 떨어졌지만 포장에서도 방제활성이 발현됨을 확인할 수 있었다. 지금까지의 screening 결과를 토대로 개발가능성이 있는 후보물질을 찾기 위해 구조활성 분석에 따른 추가 합성방향에 따라 후보물질을 찾기 위해 screening을 수행하였다.

### 제 2 절 최적화합물의 집중합성을 통한 신규 살균제 후보물질의 탐색

#### 1. 후보물질 도출을 위한 추가합성 물질들의 *in vivo* screening

1차 년도 연구로서 시험 대상 후보 약제를 합성하여 생리 활성을 통한 대상 후보 물질의 선정, 2차 년도에는 약효와 최적화를 위한 연구를 집중적으로 추진하였으며, 3차 년도에는 식물병원성균과 구조적 최적화된 약제를 최종 선발하고 경제적 측면을 고려하여 대량 생산화 연구를 실시하였다. 최적화된 화합물의 합성은 선도물질에 isopropyl기 대신 *sec*-butyl기 또는 *tert*-butyl기가 있는 물질 선도물질에 더하여 사용하였으며 작용화합물로 benzoyl chloride 계

열, phenylacetic acid계열, cinamic acid계열화합물을 사용하였다. 또한 carboxy기가 첨가된 phenol 화합물과 benzoyl chloride계열 화합물을 합성하여 최적화합물을 선별하는데 주력하였다. DBF 12001~DBF 12080 의 screening 결과분석을 근거로 하여 총 123개 화합물을 추가 합성하여 후보물질을 찾고자 하였다. DBF 12081~DBF12139의 합성방향은 화합물의 "head" 로 설정했던 phenol 유도체들을 보다 높은 활성이 있을 것으로 예상된 isobutylphenol 및 eugenol로 치환하였고 작용기도 오이 탄저병에 활성을 보였던 fluoro기의 수와 결합위치를 변화시켜가며 생물활성 경향을 파악하고자 하였다. DBF 12140~DBF 12205, 3,5 FHCBT의 화합물들은 head에 보다는 작용기에 따라 방제효과의 경향 달라진다는 판단에 따라 변형시켰던 작용기들 중 그 활성경향이 뚜렷했던 5개의 작용기는 고정시킨 상태에서 isobutylphenol 및 eugenol로 치환했던 Head 부분을 그림 14 와 같은 phenyl기로 치환하였고 합성방향과 별도로 있던 piperonyloyl chloride계통의 유도체들도 오이 탄저병에 대해 생리활성을 보임에 따라 piperonyloyl가 포함된 유도체들도 포함하여 활성경향을 관찰하였다.

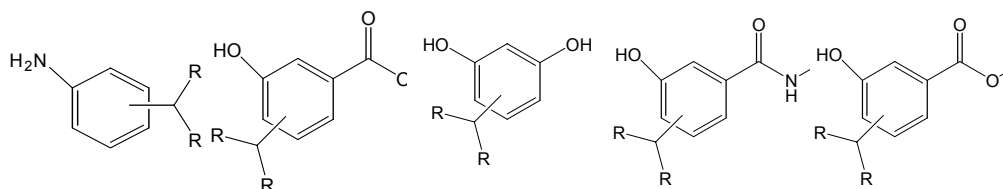


그림 14. 후보물질 탐색을 위해 합성된 유도체들의 head

또한 오이 탄저병에 활성이 있다고 판단된 5개의 작용기를 선정하였고 추가합성시 변형시키지 않고 합성하여 지속적인 활성발현 여부를 판단하고자 하였다. 선발된 작용기는 그림 15와 같다.



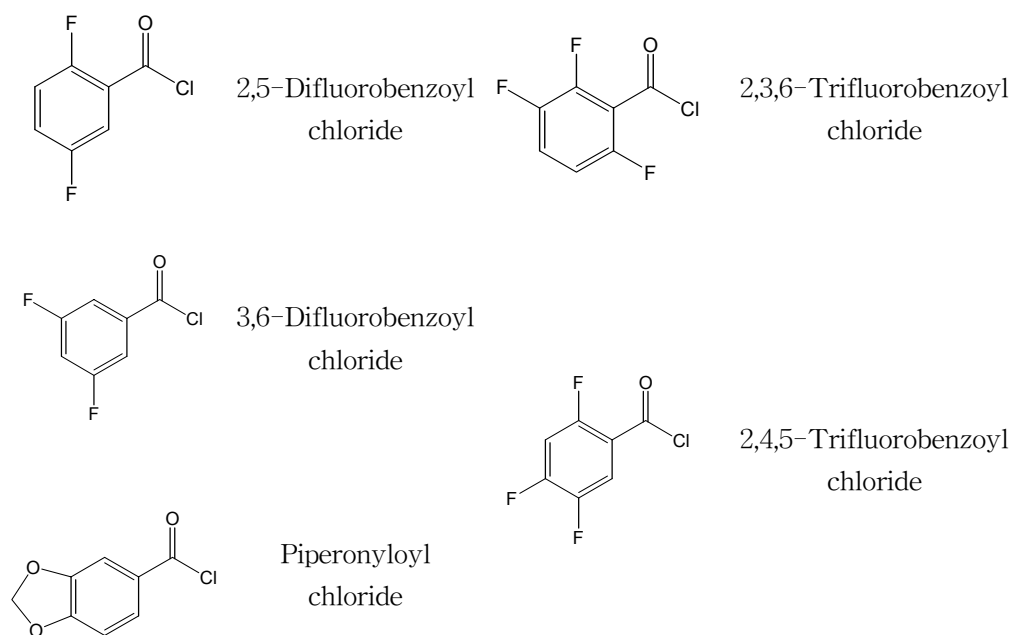


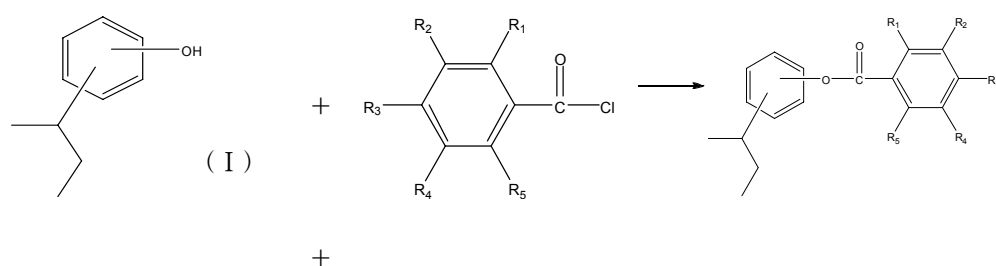
그림 15. 후보물질 탐색을 위한 추가유도체 합성시 선발된 작용기들

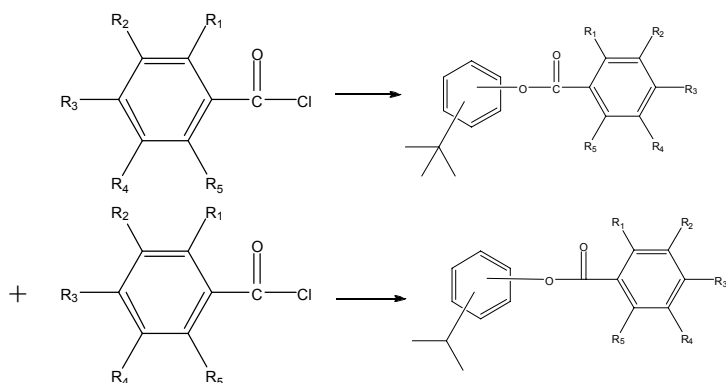
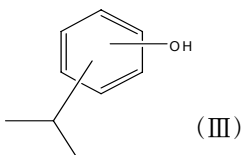
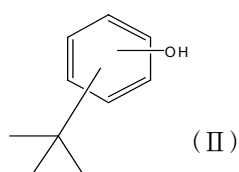
가. 유도체의 합성

1) 재료 및 방법

가) *Sec*-butylphenol, *tert*-butylphenol에 benzoyl 계열 화합물의 도입

### Alkylphenyl benzoate 제조 Scheme





$R_1 \sim R_5$  :  $-OCH_3$ , F, H

I : 2-*sec*-butylphenol, 4-*sec*-butylphenol

II : 2-*tert*-butylphenol, 3-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-butylphenol

III : 5-isopropyl-3-methylphenol, 4-isopropyl-3-methylphenol,  
4-isopropylphenol, 2-isopropylphenol

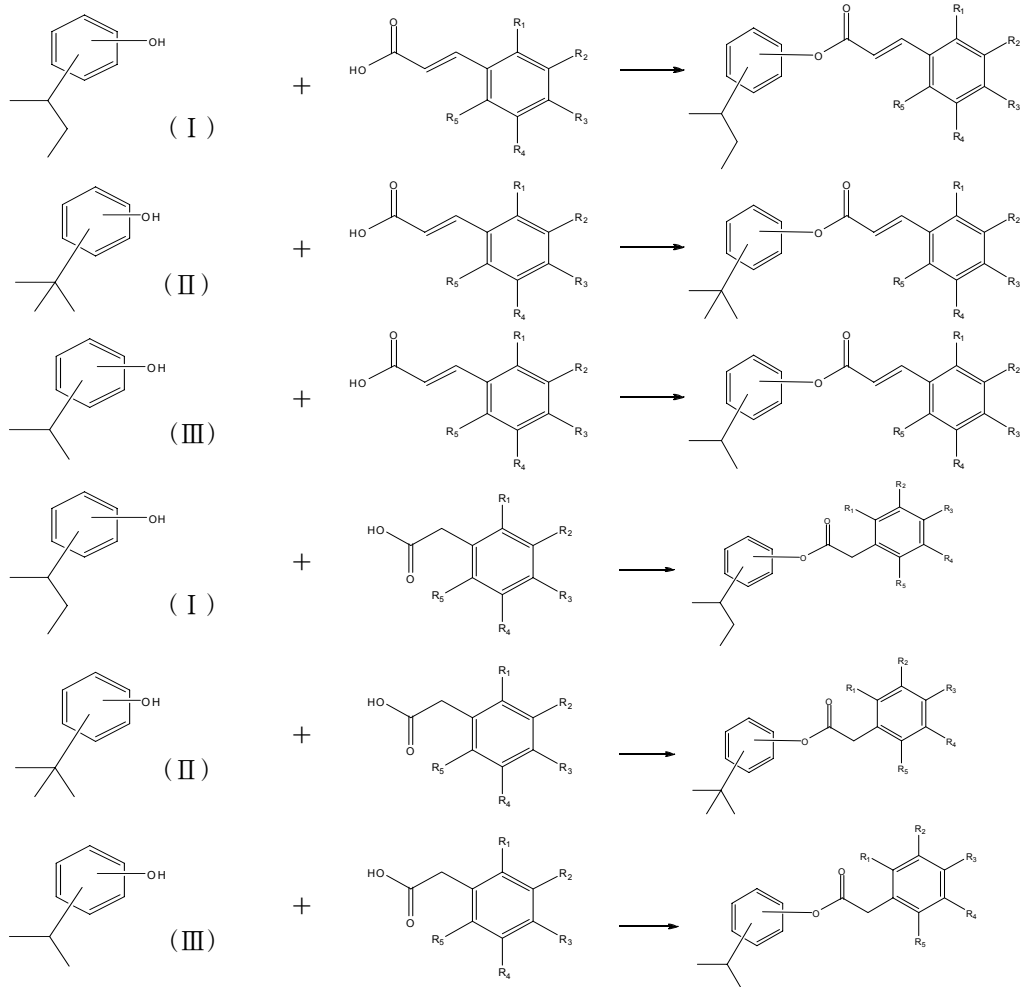
#### Alkylphenyl benzoate 합성방법

화합물들의 합성 방법은 다음과 같으며 한 예로 2-*sec*-butylphenyl-2,5-difluorobenzoate(12114)의 제조 방법은 다음과 같다. 2-*Sec*-butylphenol 0.35 ml(2.0 mmol)를 acetonitrile 10 ml에 녹인다. Triethylamine 0.34 ml(2.1 mmol)를 넣고 0°C로 온도를 낮춘 다음 2,5-difluorobenzoyl chloride 0.30 ml(2.1 mmol)를 넣고 2시간 동안 상온(25°C)교반 한다. 반응이 완결된 후 H<sub>2</sub>O 10 ml와 dichloromethane 10 ml를 반응액에 가한 후 30 분 동안 교반한 다음 유기층을 분리하여 포화NaCl수용액 10 ml로 세척한 후 Magnesium sulfate Anhydride로 탈수한다. 용액을 Evaporation하여 목적물 0.6g을 얻었다.

IR (KBr disk,  $cm^{-1}$ ) : 1748(C=O), 1257(C-O)  
GC/MS (m/e) : 290( $M^+$ ), 120(base peak)  
RT (min.) : 21.2

나) Phenol계열 화합물에 phenyl acetic acid 계열, cinamic acid 계열 작용기의 도입

Alkylphenyl phenylacetate 및 alkylphenyl acrylate 제조 Scheme



$R_1 \sim R_5$  :  $-OCH_3$ , F, H

I : 2-*sec*-butylphenol, 4-*sec*-butylphenol

II : 2-*tert*-butylphenol, 3-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-butylphenol

III : 5-isopropyl-3-methylphenol, 4-isopropyl-3-methylphenol,

4-isopropylphenol, 2-isopropylphenol

Alkylphenyl phenylacetate 및 alkylphenyl acrylate 화합물의 합성방법

위 화합물들의 합성 방법은 다음과 같으며 한예로 4-isopropyl-3-methylphenyl-3,5-difluorophenylacetate(12196)의 제조 방법은 다음과 같다.

**[반응1]**

N,N-dimethylformamide(DMF) 10 ml에 3,5-difluorophenylacetic acid 0.5 g(2.90 mmol)을 용해 시킨다. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide(DCC) 0.6 g(2.90 mmol)과 1-hydroxybenzotriazole(HOBT) 0.4 g(2.90 mmol)을 넣고 상온(25℃)에서 2시간 교반한다. 반응이 완결된 후 반응물을 여과하여 여과액에 H<sub>2</sub>O 10 ml를 5~10℃에서 천천히 적가하여 1시간 동안 5~10℃에서 교반한다.

생성된 결정을 여과하여 완전히 건조 시킨다.

**[반응2]**

4-Isopropyl-3-methylphenol 0.07 g(0.46 mmol)을 acetonitrile 5 ml에 녹인다. Triethylamine 0.07 ml(0.48 mmol)를 넣고 0℃로 온도를 낮춘 다음 반응1에서 얻은 결정 0.13 g(0.48 mmol)를 넣고 2시간동안 상온(25℃)교반 한다.

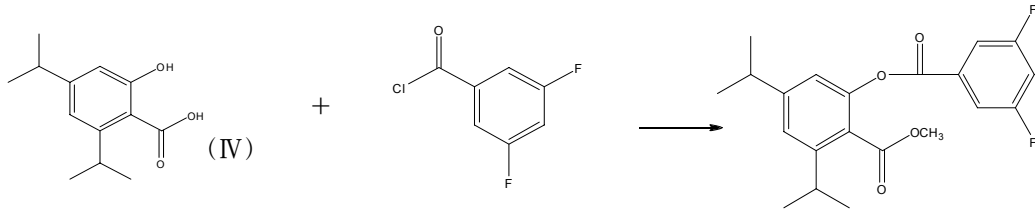
반응이 완결된 후 H<sub>2</sub>O 5 ml와 dichloromethane 5 ml를 반응액에 가한 후 30분동안 교반한 다음 유기층을 분리하여 포화NaCl수용액 10 ml로 세척한 후 magnesium sulfate anhydride로 탈수한다.

용액을 evaporation하여 목적물 0.1g을 얻었다.

IR (KBr disk, cm<sup>-1</sup>) : 1748(C=O), 1257(C-O)  
GC/MS (m/e) : 304(M<sup>+</sup>), 167(base peak)  
RT (min.) : 20.2

다) Salicylic acid계열 화합물에 benzoyl계열 작용기의 도입

### Alkylsalicyl benzoate제조 Scheme



R<sub>1</sub> ~ R<sub>5</sub> : -OCH<sub>3</sub>, F, H

IV : 3,5-diisopropylsalicylic acid

Alkylsalicyl benzoate 합성방법

위 화합물들의 합성 방법은 다음과 같으며 한예로 methyl 2-(3,5-difluorobenzoyloxy)-4,6-diisopropylbenzoate(12203)의 제조 방법은 다음과 같다.

#### [반응1]

3,5-diisopropylsalicylic acid 5.0 g을 methanol 30 ml에 녹인 후 sulfuric acid 2~3방울을 넣고 65~70℃에서 8시간동안 Reflux한다.

반응액을 evaporation한 후 10% sodium bicarbonate수용액 20 ml와 dichloromethane 20 ml를 넣고 30분간 교반한 다음 유기층을 분리 한다. 유기층을 포화NaCl수용액으로 세척한 다음 magnesium sulfate anhydride로 탈수시킨 후 여과하여 여과액을 evaporation한다.

#### [반응2]

반응1에서 얻은 반응물 0.096 g(0.41 mmol)을 acetonitrile 5 ml에 녹인다. Triethylamine 0.068 ml(0.49 mmol)를 넣고 0℃로 온도를 낮춘 다음 3,5-difluorobenzoyl chloride 0.086 g(0.48 mmol)을 넣고 2시간동안 상온(25℃)교반한다.

반응이 완결된 후 H<sub>2</sub>O 5 ml와 dichloromethane 5 ml를 반응액에 가한 후 30분동안 교반한 다음 유기층을 분리하여 포화NaCl수용액 10 ml로 세척한 후 magnesium sulfate anhydride로 탈수한다.

용액을 evaporation하여 목적물 0.11 g을 얻었다.

IR (KBr disk, cm<sup>-1</sup>) : 1748(C=O), 1257(C-O)  
GC/MS (m/e) : 376(M<sup>+</sup>), 141(base peak)  
RT (min.) : 15.9

나. *in vivo* 살균활성 screening

1) 재료 및 방법

가) 고추 역병 *in vivo* screening

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 고추 역병(*Phytophthora capsici*) 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하여 실시하였다. 접종원으로 사용된 고추 역병(*Phytophthora capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800 ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨 후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100 ppm tween 20 용액에 10<sup>4</sup> sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 6-8엽의 작물체 경엽에 고루 살포하였다. 병원균 접종후 20℃ Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 2일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

<sup>1</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ 병반면적}\% - \text{처리구} \text{ 병반면적}\%}{\text{무처리구의 병반 면적}\%} \times 100$$

나) 오이 탄저병 *in vivo* screening

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Colletotichum orbiculare* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 오이 탄저병(*Colletotichum orbiculare*)은 PDA 배지에서 7일간 25℃로 배양한 후 분홍색의 포자를 붓으로 수거한 후 100 ppm tween 20 용액에  $3 \times 10^5$  spores/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 1엽의 작물체 경엽에 고루 살포한다. 병원균 접종후 20℃ Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도한다. 접종 2일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다

<sup>1</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ 병반면적}\% - \text{처리구} \text{ 병반면적}\%}{\text{무처리구의 병반 면적}\%} \times 100$$

다) 벼 문고병 *in vivo* screening

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Rhizoctonia solani* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*)은 PDA 배지에서 7일간 30℃로 배양한 후 멸균된 밀기울 배지(Wheat Bran Medium; Wheat bran 300 ml, 왕겨150 ml, 증류수 100 ml)에 재접종하여 7일간 30℃로 배양한 뒤 마쇄하여 벼의 기저부에 일정량을 균일하게 접종하였다. 병원균 접종후 27℃ Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도하였다. 접종 2일후 잎집에 발생한 균사의 성장 높이를 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup> 를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

<sup>1)</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{(\text{무처리구의 균사성장높이} - \text{시험약제처리구의 균사성장 높이})}{\text{무처리구의 균사성장높이}} \times 100$$

라) 오이 잿빛곰팡이병 *in vivo* screening

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Botrytis cinerea* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24 시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 오이 잿빛곰팡이(*Botrytis cinerea*)는 PDA 배지에서 10 일간 20℃로 배양한 후 형성된 포자를 붓으로 수거해 tween 20 100 ppm용액에  $1 \times 10^6$  spores/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 1엽의 작물체 경엽에 고루 살포하였다. 병원균 접종 후 20℃ Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도하였다. 접종 2일후 잎에 발생한 병



반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

<sup>1)</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ --- } \text{처리구}}{\text{병반면적율\%} \quad \text{병반면적율\%}} \times 100$$

$$\text{무처리구의 병반 면적율\%}$$

마) 보리 흰가루병 *in vivo* screening

2005년 한국화학연구원에서 분양받은 *Erysiphe graminis f. sp. hordei* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 이 균은 활물기생균이므로 온실에서 보리유묘로 계대배양 하면서 균주를 유지하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한 후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 보리 흰가루병원균(*Erysiphe graminis f. sp. hordei*)은 활물기생균으로 10일간 육묘된 1엽기의 보리에 계대한뒤 7일 뒤 형성된 분생포자를 직접 약제처리된 보리 유묘에 털어(dusting) 접종하였다. 병원균 접종후 온실로 이동하여 11일간 발병을 유도하였다. 접종 후 1엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다

<sup>1)</sup>: 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ --- } \text{처리구}}{\text{병반면적율\%} \quad \text{병반면적율\%}} \times 100$$

$$\text{무처리구의 병반 면적율\%}$$

## 2. DBF 12075, DBF 12080의 오이 탄저병에 대한 다중농도 비교시험

포장시험에 선발되었던 두 화합물에 대한 다중농도에서의 약효지속성 검정 시험을 진행하였다. 접종 후 20℃ Dew chamber 내에서 약제처리 후 8 일 후까지 발병을 유도하여 과도한 발병유도시의 현저한 약제별 방제효과 차이를 확인하고자 하였다.

### 가. 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 오이 탄저병(*Colletotichum orbiculare*) 균주를 계대 배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 5 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 95 ml와 혼합한후 최종농도는 100, 25, 12.5 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방 효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 오이 탄저병(*Colletotichum orbiculare*)은 PDA 배지에서 7일간 25℃로 배양한 후 분홍색의 포자를 붓으로 수거한 후 100 ppm tween 20 용액에  $3 \times 10^5$  spores/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 1엽의 작물체 경엽에 고루 살포한다. 병원균 접종후 20℃ dew chamber로 이동하였다. 현저한 약효차를 비교하고자 접종후 Dew chamber내에 8일간 습실처리하여 과도한 발병을 유도시켰다. 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가<sup>1)</sup>를 구하여 약제의 효과를 비교하였다. 대조로 dithianon, trifloxystrobin, tebuconazole 3약제를 사용하였다.

<sup>1)</sup> 방제가 산출법

$$\text{방제가} = \frac{\text{무처리구} \text{ --- } \text{처리구}}{\text{무처리구의 병반 면적율\%}} \times 100$$

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 후보물질 도출을 위한 추가합성 물질들의 *in vivo* screening 시험결과

##### 가. 시험결과

후보물질 도출을 위해 추가 합성한 123개 화합물의 5개 병해에 대한 *in vivo* screening 시험은 9회에 걸쳐 나눠 수행되었으며 결과는 다음과 같았다.

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잣빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12083	15.7	64	20.5	35	6.8
DBF 12084	39.5	74	52.3	0	9.2
DBF 12085	8.1	74	72.7	0	21.2
DBF 12086	19.5	93.6	56.8	25	13.7
DBF 12087	8.1	24	0	15	13.4
DBF 12088	31.4	0	6.8	0	11
DBF 12089	54.6	4	0	30	0.7
DBF 12090	54.6	12	13.6	30	3.1
DBF 12091	58.4	8	34.1	35	9.2
DBF 12092	47	74	0	65	5.8
DBF 12093	35.7	62	0	60	9.2
DBF 12094	47	4	70.5	15	18.2
DBF 12095	31.9	4	38.6	5	21.9
DBF 12096	27.6	4	31.8	35	15.4
DBF 12097	50.8	4	29.5	25	16.8
DBF 12098	23.8	0	90.9	15	20.2
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
100	100	98	97.7	99	100
20	99.2	92	95	96	100
4	92.4	74	84.1	91	70.9

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잭빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12101	31.9	4	70.5	35	14.7
DBF 12102	27.6	28	20.5	65	15.8
DBF 12103	50.8	0	36.4	55	18.8
DBF 12104	43.2	0	52.3	0	18.8
DBF 12105	26.1	20.4	11	16.7	6.9
DBF 12106	0	10.2	23	8.3	0
DBF 12107	30.4	44.9	15	0	2.8
DBF 12108	56.5	22.4	16	33.3	12.5
DBF 12109	13	18.4	18	8.3	16.7
DBF 12110	34.8	14.3	25	13.3	15.3
DBF 12111	0	18.4	41	21.7	27.8
DBF 12112	26.1	63.3	5	16.7	33.3
DBF 12113	47.8	77.6	8	16.7	25
DBF 12114	26.1	98	8	41.7	20.8
DBF 12115	4.3	87.8	5	63.3	11.1
DBF 12116	15.2	73.5	20	53.3	9.7
DBF 12117	39.1	53.1	21	63.3	16.7
DBF 12118	30.4	42.9	13	55	2.8
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
100	100	97.6	100	95	100
20	82.6	89.8	94	91.7	98.6
4	71.7	71.4	75	78.3	96.1

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잿빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12119	17.4	26.5	50	55	22.2
DBF 12120	0	2	28	58.3	19.4
DBF 12121	0	8.2	48	50	19.4
DBF 12122	0	20.4	10	78.3	20.8
DBF 12123	18.5	21.2	15	48.1	5.2
DBF 12124	5.6	32.7	25	44.4	5.9
DBF 12125	3.7	1.9	18	48.1	0
DBF 12126	5.6	0	15	40.7	0
DBF 12127	11.1	0	5	53.3	0
DBF 12128	9.3	46.2	43	37	5.2
DBF 12129	33.3	0	23	51.9	0
DBF 12130	9.3	9.6	52	34.8	0
DBF 12131	16.7	0	39	40.7	0
DBF 12132	25.9	0	13	25.9	0
DBF 12133	14.8	0	8	22.2	1
DBF 12134	55.6	13.5	89	25.9	0
DBF 12135	29.6	5.8	30	14.8	1.7
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
20	100	96.5	98	74.1	91.4
4	85.2	53.8	91	40.7	84.5
0.8	44.4	11.5	25	7.4	58.6

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잿빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12136	18.5	25	5	18.5	0
DBF 12137	25.9	0	10	11.1	0
DBF 12138	29.6	0	0	3.7	0
DBF 12139	48.1	13.5	48	18.5	0
DBF 12140	4	0	3.4	0	9.7
DBF 12141	4	18.2	10.3	0	27.7
DBF 12142	4	0	41.4	0	12.9
DBF 12143	4	0	0	0	29
DBF 12144	4	0	0	0	9.7
DBF 12145	4	0	0	0	0
DBF 12146	4	0	3.4	0	3.2
DBF 12147	4	0	41.4	0	0
DBF 12148	4	0	0	0	0
DBF 12149	4	0	0	0	0
DBF 12150	0	0	3.4	0	32.3
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
20	99.6	99.5	93.1	93.6	100
4	96.4	95.5	75.9	80	100
0.8	92	88.6	44.8	68	83.9

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잿빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12151	4	0	41.4	0	0
DBF 12152	4	0	72.4	0	0
DBF 12153	0	22.7	0	0	0
DBF 12154	24	81.8	0	0	0
DBF 12155	0	0	14.3	0	0
DBF 12156	0	0	7.1	0	11.9
DBF 12157	4	0	14.3	0	10.5
DBF 12158	8	0	14.3	0	11.9
DBF 12159	8	0	14.3	5.9	7.7
DBF 12160	0	0	85.7	11.8	6.2
DBF 12161	12	0	50	5.9	3.4
DBF 12162	12	0	84.3	5.9	7.7
DBF 12163	4	4.8	81.4	5.9	6.2
DBF 12164	0	0	0	0	0
DBF 12165	0	0	0	0	0.6
DBF 12166	8	0	28.6	11.8	6.2
DBF 12167	12	0	7.1	23.5	9.9
DBF 12168	16	0	14.3	11.8	8.5
DBF 12169	14	0	42.9	0	12.8
DBF 12170	18	0	0	17.6	18.5
DBF 12171	12	0	0	0	20.5
DBF 12172	0	0	14.3	11.8	2.3
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
20	100	85.7	85.7	91.8	94.3
10	98	80	21.4	89.4	92.9
5	56	69.5	0	82.4	90.1

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추	오이 잿빛	오이	보리	벼	
	역병	곰팡이병	탄저병	흰가루병	문고병	
DBF 12173	0	19	0	17.6	9.1	
DBF 12175	4	0	0	35.3	9.1	
DBF 12081	4	0	3.4	0	5.2	
DBF 12082	4	11.4	0	0	9.7	
DBF 12176	7.4	0	65.8	7.7	5.7	
DBF 12177	3.7	0	60.5	0	5.7	
DBF 12178	7.4	0	73.7	15.4	5.7	
DBF 12179	0	0	71.1	7.7	0	
대조약제명	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron	
ppm						
	20	100	97.7	100	67.7	100
	10	92.6	96.7	98.9	69.2	92.5
	5	87	76.7	94.2	23.1	84.9

표 25. Alkylphenyl benzoate 화합물 *in vivo* screening 결과(계속)

대상병해 시험약제	고추	오이 잿빛	오이	보리	벼	
	역병	곰팡이병	탄저병	흰가루병	문고병	
DBF 12180	1.9	0	47.4	0	0	
DBF 12181	3.7	0	0	7.7	3.8	
DBF 12182	0	0	31.6	0	0	
DBF 12183	3.7	0	52.6	0	0	
DBF 12184	0	0	15.8	0	8.5	
DBF 12185	0	0	63.2	11.1	0	
DBF 12186	0	2.3	52.6	2.8	0	
DBF 12187	0	2.3	68.4	0	0	
DBF 12188	0	7	0	11.1	12.8	
대조약제명	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron	
ppm						
	20	100	97.7	100	96.1	100
	10	98	96.7	98.9	96.1	91.5
	5	88.8	76.7	94.2	92.8	68.1



표 26. Alkylphenyl benzoate, alkylphenyl phenylacetate 및 alkylphenyl acrylate  
 화합물화합물 *in vivo* screening 결과

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잭빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12189	0	0	87.9	16.7	25.5
DBF 12190	0	62.8	0	22.2	17
DBF 12191	0	67.4	0	0	6.4
DBF 12192	0	7	94.2	0	2.1
DBF 12193	0	13	8.3	16.7	0
DBF 12194	2.1	13	33.3	38.9	0
DBF 12195	64.6	13	16.7	27.8	0
DBF 12196	18.8	39.1	87.5	0	3.1
DBF 12197	4.2	13	33.3	0	4.7
DBF 12198	14.6	0	66.7	0	4.7
DBF 12199	20.8	0	79.2	5.6	4.7
DBF 12200	2.1	34.8	0	0	6.3
DBF 12201	0	34.8	25	11.1	1.6
DBF 12202	0	60.9	16.7	27.8	0
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
20	100	100	90.8	99.4	100
10	97.9	95.7	89.2	88.9	98.1
5	79.2	87	62.5	75	95.3

표 27. Alkylphenyl phenylacetate 및 alkylphenyl acrylate 화합물화합물  
*in vivo* screening 결과

대상병해 시험약제	고추 역병	오이 잿빛 곰팡이병	오이 탄저병	보리 흰가루병	벼 문고병
DBF 12203	41.2	0	90	7.7	21.7
DBF 12204	76.5	12.5	60	3.8	18.1
DBF 12205	85.3	43.8	60	15.4	25.3
3,5 FHCBT	0	50	53.3	3.8	24.1
대조약제명 ppm	Dimethomorph	Boscalid	Tebuconazole	Azoxystrobin	Pencycuron
20	100	95.6	95.3	98.8	97.6
10	98.2	93.1	83.3	96.5	94
5	93.5	78.1	80	95	75.9

나. 구조 활성 분석

1). Head에 따른 활성경향

가) Thymol을 가지고 있는 화합물들의 5병해에 대한 100 ppm 에서의 *in vivo* screening 결과이다. DBF12051부터 DBF12167는 fluorobenzen기를 가지고 있는 화합물로 fluoro의 결합 수 및 결합 위치에 따른 방제활성 변화가 있음을 알 수 있다(그림 16).

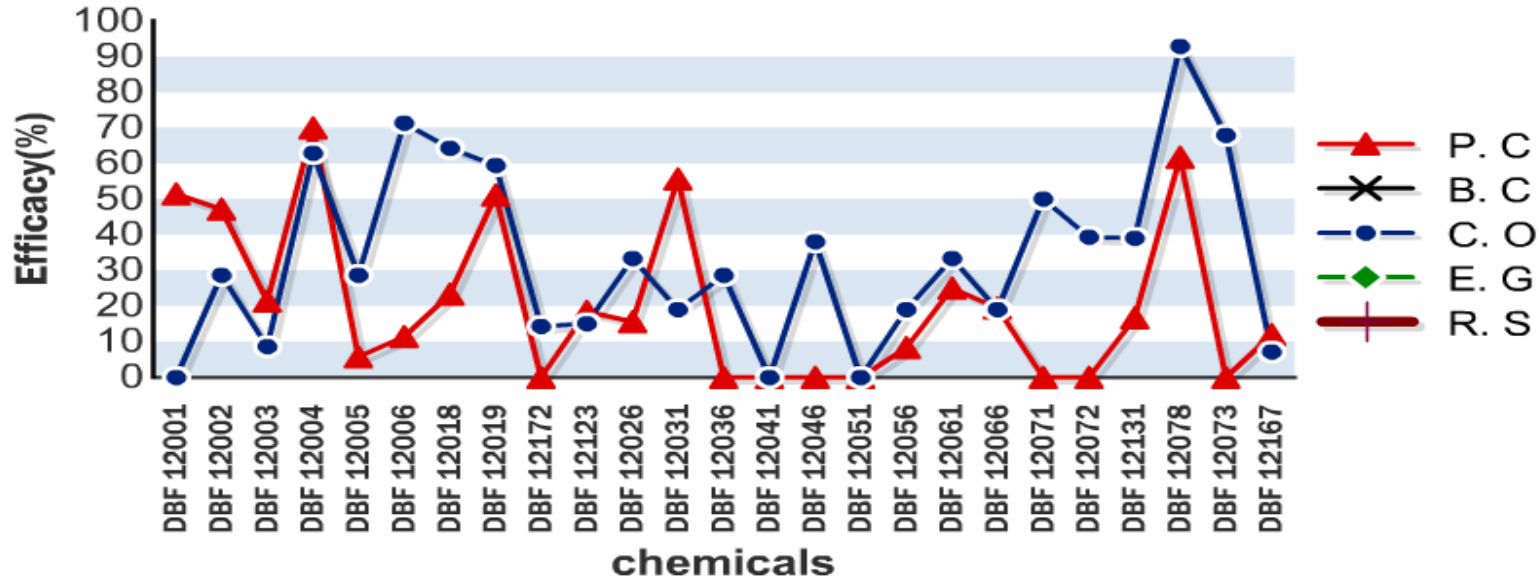


그림 16. Thymol head를 갖는 화합물의 활성경향

P.C: *Phytophthora capsici* B.C: *Botrytis cinerea* C.O: *Colletotrichum orbiculare* E.G: *Erysiphe graminis*  
 R.S: *Rhizoctonia solani*

나) Isopropyl head를 가지고 있는 화합물들의 5병해에 대한 100 ppm 에서의 *in vivo* screening 결과이다. 5병해 중 오이 탄저균에 대해 80%이상의 활성을 보이는 DBF12079와 6종의 화합물이 있었으며 화합물의 구조식을 확인한 결과 7종의 화합물 모두 difluoro 및 trifluoro기를 가지고 있음을 확인하였다(그림 17).

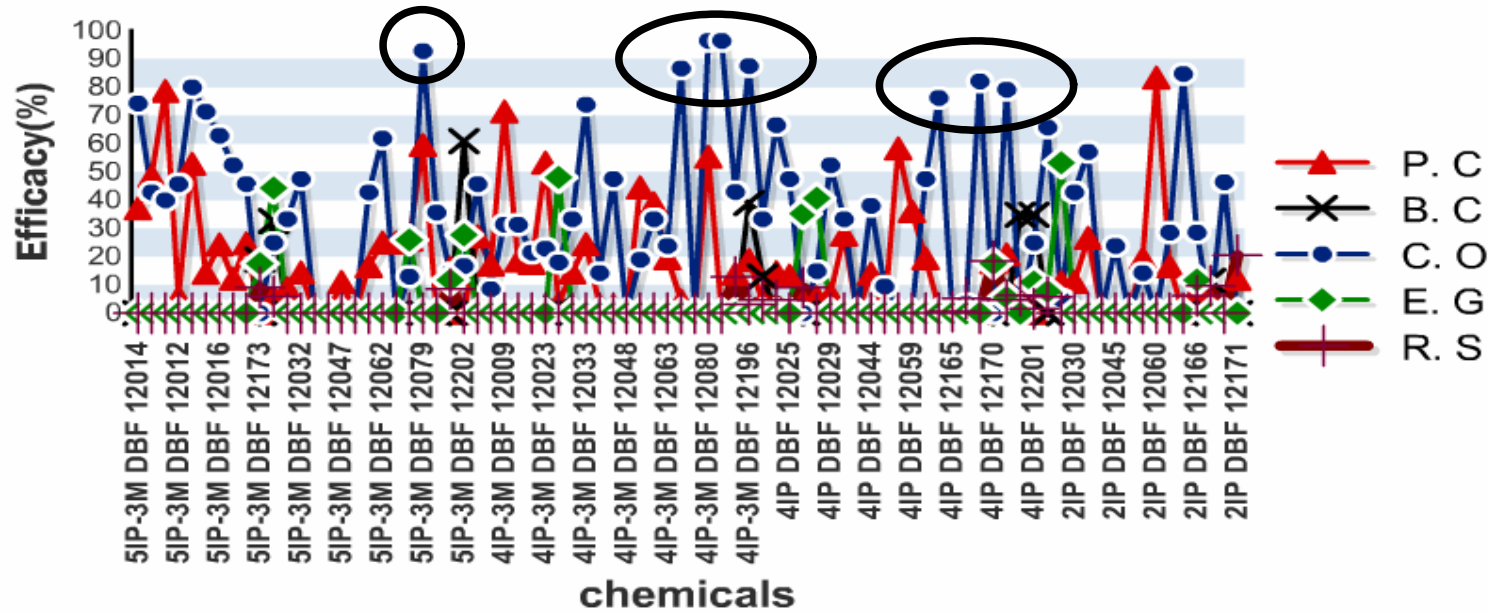


그림 17. Isopropyl head를 갖는 화합물의 활성경향

P.C : *Phytophthora capsici*    B.C : *Botrytis cinerea*    C.O : *Colletotrichum orbiculare*    E.G : *Erysiphe graminis*  
R.S : *Rhizoctonia solani*  
5IP-3M : 5-Isopropyl-3-Methyl phenol    4IP-3M : 4-Isopropyl-3-Methyl phenol    4IP : 4-Isopropyl-phenol  
2IP : 2-Isopropyl-phenol

다) Isobutyl head를 가지고 있는 화합물들의 5병해에 대한 100 ppm 에서의 *in vivo* screening 결과이다. Isobutyl head를 가지고 있는 화합물에서는 오이 탄저병균과 오이 잭빛곰팡이균에 80% 이상의 방제활성을 보이는 유도체를 각각 4종, 3종씩 선발 할 수 있었으며 이들 중 2,6-dimethoxybenzoyl기가 있는 DBF12086과 piperonyloyl기가 있는 DBF12098을 제외한 5종의 유도체는 모두 difluorobenzen기를 가지고 있는 화합물이었다(그림18)

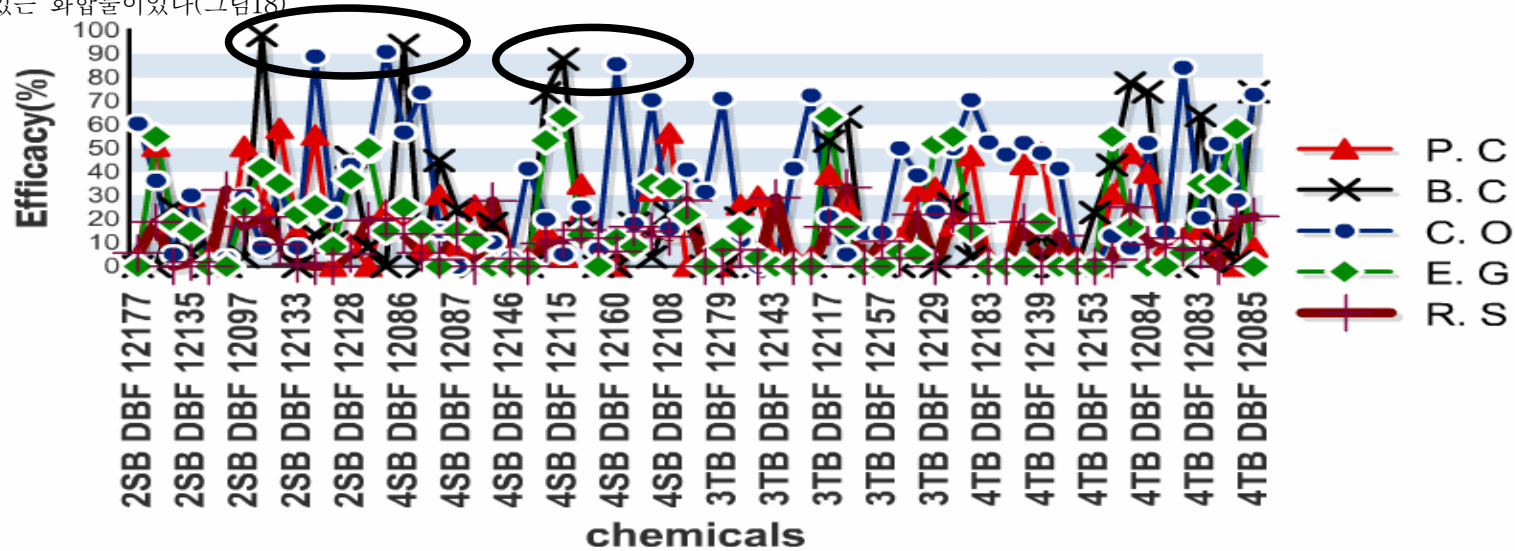


그림 18. Isobutyl head를 갖는 화합물의 활성경향

P.C : *Phytophthora capsici*      C.O : *Colletotrichum orbiculare*      B.C : *Botrytis cinerea*  
 E.G : *Erysiphe graminis*      R.S : *Rhizoctonia solani*  
 2SB : 2-*sec*-Butylphenol      4SB : 4-*sec*-Butylphenol  
 3TB : 3-*tert*-Butylphenol      4TB : 4-*tert*-Butylphenol

라) Eugenol 및 기타 head를 가지고 있는 화합물들의 5병해에 대한 100 ppm 에서의 *in vivo* screening 결과이다. 5병해에 대한 eugenol 유도체들의 방제활성은 미미한 것으로 판단되며 기타 head를 갖는 유도체들은 합성된 화합물 수가 적어 활성경향을 파악하기 어려웠다. Eugenol 유도체 중 방제가 80%이상의 화합물도 difluorobenzoyl기를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(그림 19).

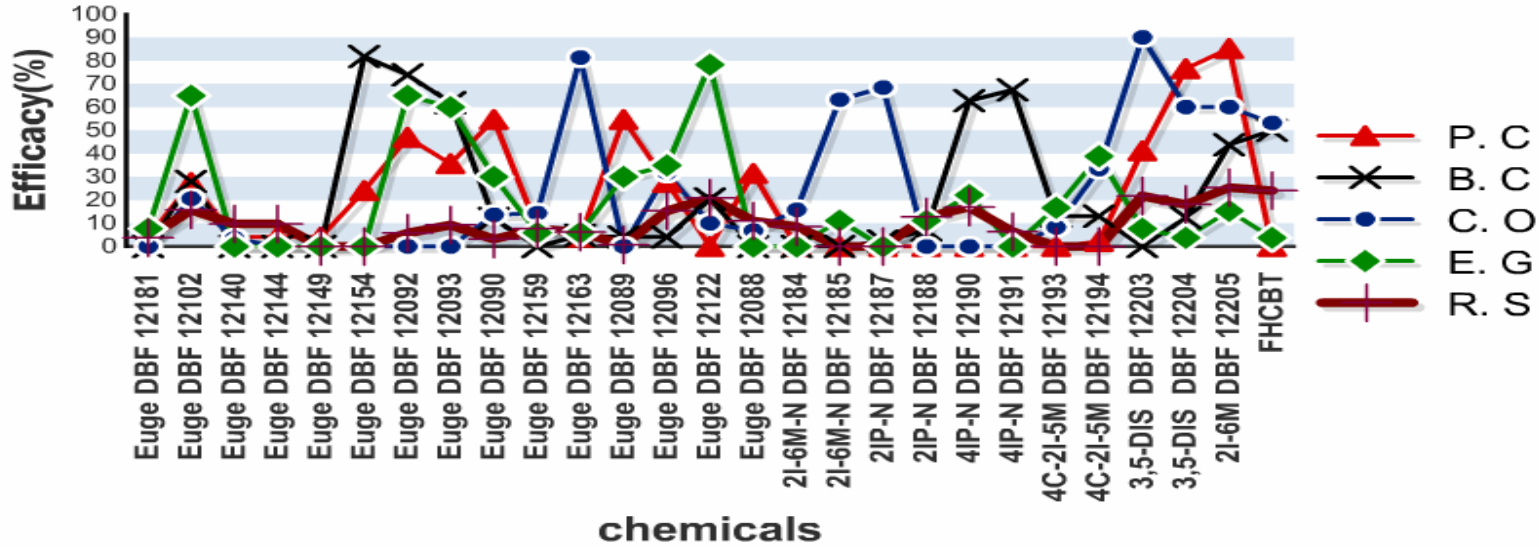


그림 19. Eugenol 및 기타 head를 갖는 화합물의 활성경향

P.C : <i>Phytophthora capsici</i>	Euge : Eugenol	3,5-DIS : 3,5-Diisopropylsalicylic acid
B.C : <i>Botrytis cinerea</i>	2I-6M-N : 2-Iso-6M-methylaniline	2I-6M : 2-Iso-6-M-4-pyrimidinol
C.O : <i>Colletotrichum orbiculare</i>	2IP-N : 2-Isopropylaniline	FHCBT : 2,3,6-Trifluorophenylacetic acid
E.G : <i>Erysiphe graminis</i>	4IP-N : 4-Isopropylaniline	
R.S : <i>Rhizoctonia solani</i>	4C-2I-5M : 4-Chl-2-Iso-5-Methylphenol	

(1) Fluoro기에 따른 활성경향 분석

다음 그림은 DBF 12001~DBF 12080의 합성표이다. *in vivo* screening 시험시 활성검정 대상이었던 5병해에 대해 무처리 대비 70%이상의 방제활성을 보였던 화합물들을 음영으로 표시하였다(그림 20).

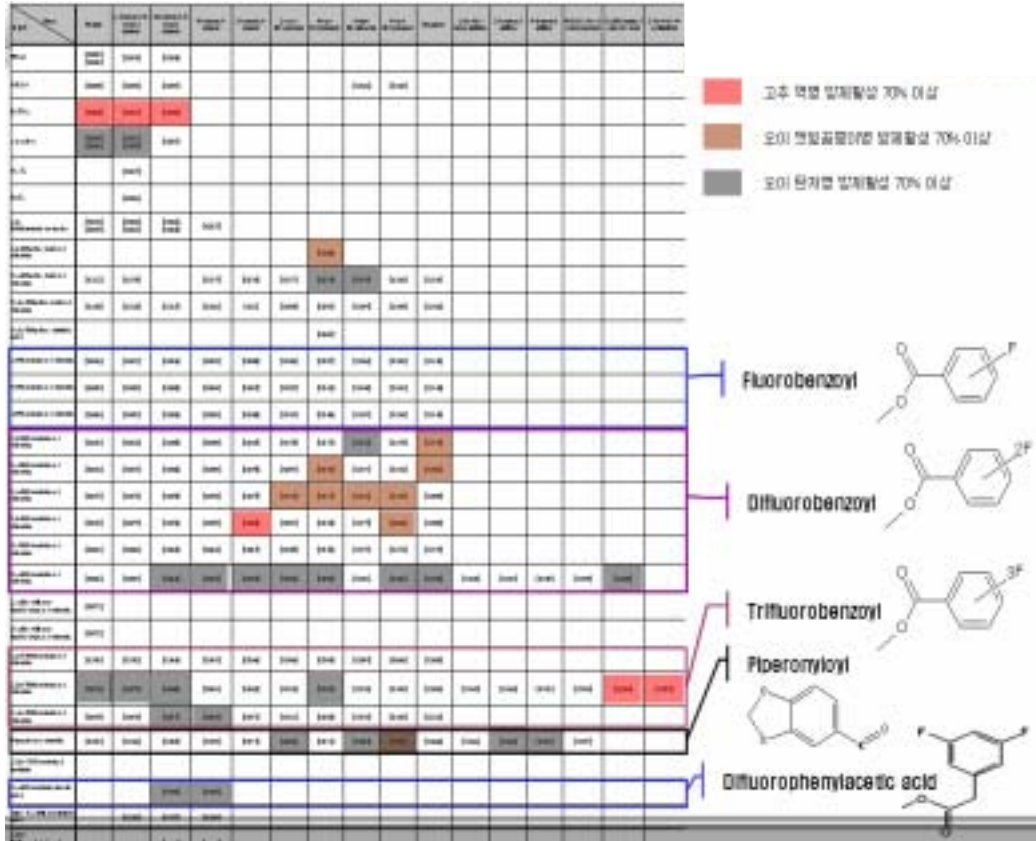


그림 20. DBF12001~DBF12205 합성표

가로축은 head로 설정한 thymol 및 유도체들이며 세로축은 tail로 설정한 methoxy 기 및 fluoro기 등이 결합된 작용기들이다. Fluoro기의 수가 증가할수록 오이 탄저병에 대한 방제활성을 보이는 물질수가 많아지는 경향을 확인할 수 있었으며, 오이 탄저병에 70% 이상의 방제가를 보였던 화합물들을 정리하면 표 28과 같다.

표 28 Fluoro기 결합에 따른 오이 탄저병에 대한 활성경향


Tail 내의 Fluoro 수	작용기 내의 Fluoro 결합위치	code name	탄저병에 대한 방제가(%)	평균 방제가
0~1	-	-	-	-
2	2,3	DBF 12152	72.4	83.38%
		DBF 12068	86.7	
		DBF 12069	76.2	
		DBF 12070	84.8	
		DBF 12134	89.0	
	3,5	DBF 12160	85.7	
		DBF 12162	84.3	
		DBF 12163	81.4	
		DBF 12203	90	
		DBF 12196	87.5	
3	2,3,6	DBF 12199	79.2	85.59%
		DBF 12078	92.9	
		DBF 12079	92.9	
	2,4,5	DBF 12080	96.4	
		DBF 12101	70.5	
		DBF 12073	67.9	
		DBF 12075	96.4	
		DBF 12076	82.1	

Fluoro가 없거나 1개 결합되어 있는 작용기를 갖는 화합물들에 대해서는 오이 탄저병에 대해 70% 이상의 방제가를 나타내는 화합물이 없었던 반면 2개 이상의 fluoro와 결합되어 있는 작용기를 갖는 화합물들 중에서는 무처리 대비 70~96.4%의 방제가를 갖는 18개의 화합물을 선발 할 수 있었다. 하지만 fluoro의 결합수와 방제 활성이 서로 비례한다고는 보기 어려웠으며 표 28에서 보는 바와 같이 70% 이상의 방제효과를 보인 화합물 중에서 fluoro를 2개, 3개 가지고 있는 화합물들의 방제가 평균에는 유의적 차이가 없어 보인다.



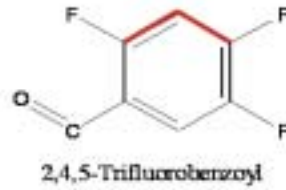
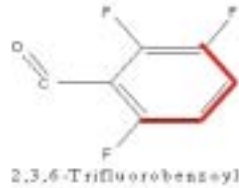
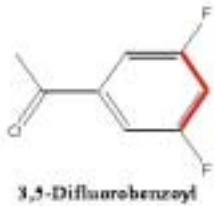
(2) Fluoro의 결합 위치에 따른 활성경향

DBF 12001~12205 화합물의 fluoro 결합위치에 따라 다음과 같은 경향이 있었다. Fluoro가 서로 인접한 작용기를 갖는 화합물은 오이 탄저병균 및 오이 잭빛곰팡이병균에 대한 활성이 거의 관찰되지 않은 반면 fluoro가 서로 떨어져 있는 작용기를 갖는 화합물들은 활성경향을 나타내었다. 또한 결합 위치에 있어서 3번과 5번 위치에 fluoro가 결합된 경우 뚜렷한 활성상승 경향이 있는 것으로 관찰되었다(그림 21).



OCH <sub>2</sub>	Cl	F
DBF 7056 (84.0%) DBF 7077 (79.0%) DBF 12178 (73.7%) DBF 12179 (71.1%)	DBF 7028 (96%) DBF 7052 (84%)	DBF 12066 (86.7%) DBF 12069 (76.2%) DBF 12070 (84.8%) DBF 12134 (89.0%) DBF 12060 (85.7%) DBF 12162 (84.3%) DBF 12163 (81.4%) DBF 12203 (90.0%)

**Active functional groups**



**Non-active functional groups**

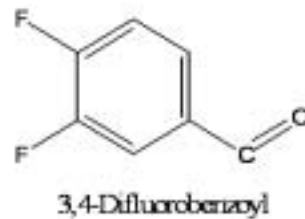
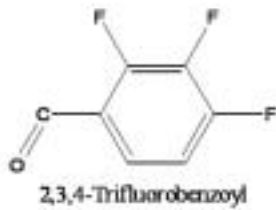


그림 21. 벤젠의 3,5 위치에서의 특이적 방제활성과 fluoro의 결합 위치에 따른 활성유무별 group 분류

라) 다음 그림은 Piperonyloyl기를 가지고 있는 화합물들의 5병해에 대한 100 ppm 에서의 *in vivo* screening 결과이다. Piperonyloyl기를 가지고 있는 화합물 중에서 오이 탄저병에 대해 80% 이상의 방제활성을 갖는 3종의 화합물을 선발하였다(그림 22).

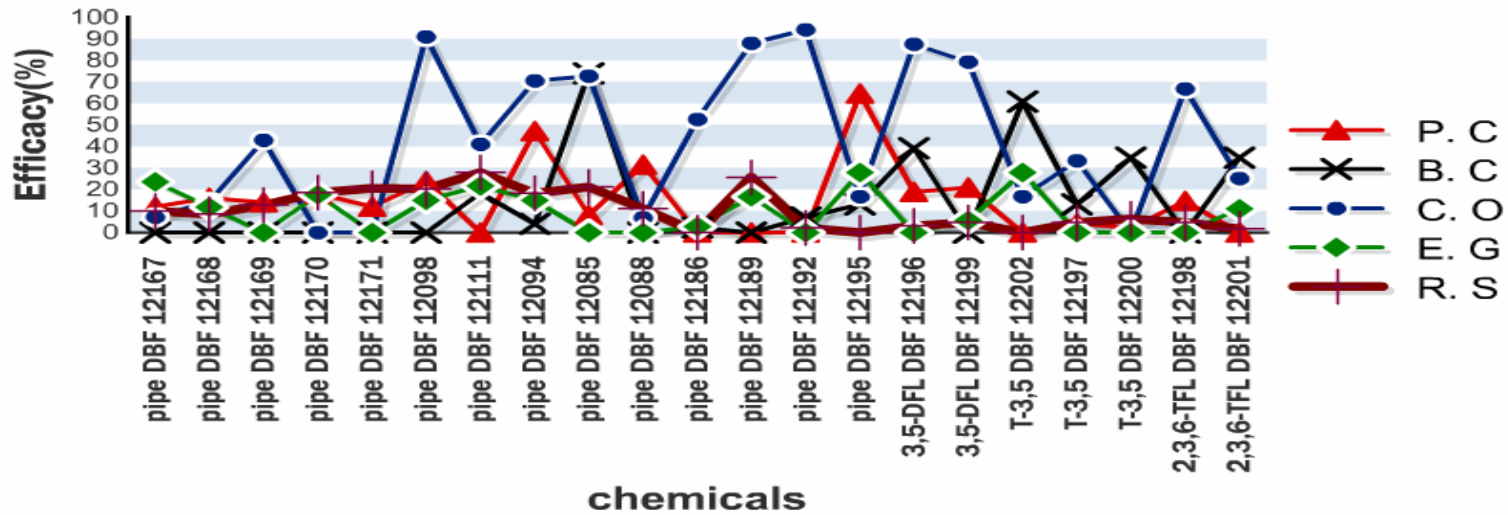


그림 22. Piperonyloyl 및 기타 작용기를 갖는 화합물의 활성경향

P.C : *Phytophthora capsici*

C.O : *Colletotrichum orbiculare*

R.S : *Rhizoctonia solani*

Pipe : Piperonyloyl chloride

T-3,5 : trans-3,5-Difluorocinamic acid

B.C : *Botrytis cinerea*

E.G : *Erysiphe graminis*

3,5-DFL : 3,5-Difluorophenylacetic acid

2,3,6-TFL : 2,3,6-Trifluorophenylacetic acid

(1) Piperonyloyl기의 방제활성

Piperonyloyl기를 tail로 갖는 14개 화합물 중 오이 탄저병 및 오이 잿빛곰팡이병에 70%이상의 방제가를 갖는 화합물들은 다음과 같은 5종의 화합물이 있었다.

표 29. 오이 탄저병 및 오이 잿빛곰팡이병에 대해 70%이상의 방제가를 보인 화합물

Code name	오이 탄저병 방제가(%)	오이 잿빛곰팡이병 방제가(%)
DBF 12098	90.9	-
DBF 12094	70.5	-
DBF 12085	72.7	74.0
DBF 12189	87.9	-
DBF 12192	94.2	-

Piperonyloyl기는 butylphenol과 isopropylanilin과 결합된 화합물에서만 방제활성을 확인할 수 있었다.

나) 3,5-difluorophenylacetic acid 및 trans-3,5-Difluorocinnamic acid 의 방제활성

3,5-difluorophenyl기를 tail로 가진 화합물에서는 오이 탄저병에 대한 지속적인 방제활성이 관찰되고 3,5-difluorophenylacetic acid와 결합된 화합물인 DBF 12196, DBF 12199에서도 각각 무처리 대비 87.5%, 79.2%의 방제가를 보였다. 하지만 trans-3,5-difluorocinnamic acid를 tail로 갖은 DBF 12202, DBF 12179, DBF12200의 화합물에서는 오이 탄저병에 대해 각각 16.7%, 71.1%, 0%의 방제가를 보여 활성이 감소하거나 사라지는 경향을 보였다.

2. DBF 12075, DBF 12080의 오이 탄저병에 대한 다중농도 비교시험결과

DBF 12075, DBF 12080를 dithianon, trifloxystrobin, tebuconazole와 다중농도로 비교시험 결과는 다음과 같은 약제처리 후 8일차 결과를 얻을 수 있었다(표 30).

8일간 Dew Chamber에서의 20℃ 습실처리는 약제간 뚜렷한 방제활성차이를 보여 주었다. 대조로 쓰인 dithianon, trifloxystrobin, tebuconazole는 동일 처리농도에서도 Dew Chamber에서 습실처리한 시간에 큰 영향없는 방제활성을 나타내었다. 하지만 우수한 방제활성으로 1차 선발되었던 DBF 12075와 DBF 12080은 습실처리가 길어짐에 따라 방제활성이 급감하는 경향을 확인할 수 있었고 이는 포장시험결과에서 관찰된 대조약제와의 방제활성차이 원인이 약효지속성 차이에 기인한 것일 수 있다는 판단근거자료가 되었다(표 30).

표 30. DBF 12075, DBF 12080의 오이 탄저병에 대한 *in vivo* 다중농도 시험결과

시험약제	처리농도(ppm)	농도단위	방제가(%)
DBF 12075	100	PPM A	43.1
DBF 12075	25	PPM A	37.3
DBF 12075	12.5	PPM A	25.5
DBF 12080	100	PPM A	56.9
DBF 12080	25	PPM A	5.9
DBF 12080	12.5	PPM A	5.9
Dithianon	100	PPM A	98.8
Dithianon	25	PPM A	97.3
Dithianon	12.5	PPM A	88.2
Trifloxystrobin	100	PPM A	100
Trifloxystrobin	25	PPM A	88.2
Trifloxystrobin	12.5	PPM A	86.3
Tebuconazole	100	PPM A	100
Tebuconazole	25	PPM A	98
Tebuconazole	12.5	PPM A	92.2

## 제 6 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

1. 목표달성도는 다음과 같다.

구 분	연구개발 목표	목표 달성도
1차년도 ( 2003 )	살균효능을 지닌 천연물 및 유도체 합성	-식물 정유 42종 <i>in vitro</i> screening을 통한 생리활성성분 분리 및 동정 완료 -thymol 유도체 146종 합성 및 <i>in vitro</i> screening 시험을 통한 활성검정 완료
	합성된 유도체의 1, 2차 screening을 통한 효과 검정	- 1, 2차 <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> screening을 통한 12종의 lead compounds 선정
2차년도 ( 2004 )	최적 화합물 합성, 선정 및 작용기의 집중적인합성	- 12종의 lead compounds를 기초로 162개 유도체 합성 및 <i>in vivo</i> screening 완료
	선정된 최적 화합물의 포장 시험, 제형화 검정, 독서시험 및 특허 가능성 검토	- DBF 7018, DBF 7081, DBF 12075, DBF 12080을 1차 최적화합물로 선정 후 포장시험, 제형화, 독성시험 및 관련 특허 출원 완료
3차년도 ( 2005 )	최적화합물의 집중 합성을 통한 신규 살균제 선정	- 최적 화합물 탐색을 위한 작용기 치환 화합물 123개 합성 및 <i>in vivo</i> screening 완료
	대규모 포장 시험 확인, 제형 개발, 및 등록 시험 1년차 진행	- 오이 탄저병과 오이 잿빛곰팡이병에 방제활성을 갖는 최적 화합물 탐색을 위해 123종의 유도체를 추가 합성 및 <i>in vivo</i> screening을 통하여 각각 7종, 2종의 compound를 확보하였으나 동일농도에서의 활성이 대조물질 활성에 미치지 못함에 따라 제품화 및 등록시험 미진행

## 2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 화학적 평가</li> <li>○ Carvacrol 과 thymol 유도체 합성</li> <li>▶ 생물학적 평가</li> <li>○ 생물효능검정(실내 및 온실시험)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 화합물의 합성품 및 검정시료의 확보(50점)</li> <li>○ 활성 검정 자료 및 활성의 증감이 나타나는 구조적 변화성(35점)</li> <li>○ 생물효능확인 (15점)</li> </ul>
2차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 화학적 평가</li> <li>○ 신규 살균제 집중 합성</li> <li>○ 최적화합물 선정</li> <li>▶ 생물학적 평가</li> <li>○ 살균효과 검정</li> <li>○ 제형화 연구</li> <li>▶ 안전성평가</li> <li>○ 급성독성(경구,어독성)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 화합물의 합성품 및 검정시료의 확보 (30점)</li> <li>○ 활성 검정 자료 및 활성의 증감이 나타나는 구조적 변화성(30점)</li> <li>○ 살균효과(20점)</li> <li>○ 제형화 연구(10점)</li> <li>○ 안전성(10점)</li> </ul>
3차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 화학적 평가</li> <li>○ 신규 살균제 선정</li> <li>○ 최적 화합물의 추가 합성 및 대량생산 공정개발</li> <li>▶ 생물학적 평가</li> <li>○ 생물효과 확인(온실 및 포장)</li> <li>○ 적용작물 및 대상 확대</li> <li>○ 경쟁약제와의 장점 및 차별성 비교</li> <li>▶ 제형개발</li> <li>○ 적정 신규제형의 개발</li> <li>▶ 안전성 평가</li> <li>○ 급성독성(경구,경피,어독성)</li> <li>▶ 농약등록 시험추진(생물시험)</li> <li>▶ 특허 출원(한국, PCT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 화합물의 합성품 및 검정시료의 확보 (20점)</li> <li>○ 활성 검정 자료 및 활성의 증감이 나타나는 구조적 변화성(20점)</li> <li>○ 대량합성 공정개발(10점)</li> <li>○ 생물효과 확인(온실 및 포장)(20점)</li> <li>○ 처방확립 (5점)</li> <li>○ 안전성(10점)</li> <li>○ 농약등록시험 신청여부(5점)</li> <li>○ 특허출원(10점)</li> </ul>
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 화합물 선정</li> <li>○ 대량합성 공정개발</li> <li>○ 농약등록시험추진</li> <li>○ 안전성</li> <li>○ 특허</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 50점</li> <li>○ 10점</li> <li>○ 10점</li> <li>○ 20점</li> <li>○ 10점</li> </ul>

## 제 2 절 관련분야 기여도

작물보호제는 특허출원 후 20년간 독점적으로 판매할 수 있으므로 경제적으로 고부가가치를 창출할 수 있는 산업품목이다. 그러나 신규 작물보호제를 개발함에 있어서 막대한 비용과 시간이 소비됨에 따라 현재 개발된 대부분의 작물보호제는 Bayer, BASF 등의 선진국 거대 작물보호제 기업에 의해 주도적으로 이루어지고 있다. 이러한 상황 하에서 고부가가치 산업에 대하여 국내 독자적으로 선도화합물의 창출 및 천연물 유래의 환경친화적인 새로운 작물보호제 개발을 위한 과제 수행은 목표의 현실화에 있어 큰 의미가 있었다고 생각되며, 이번 과제를 통하여 시장성 있는 주요 식물병해에 대한 screening 기술과 경험 축적할 수 있었다. 이러한 성과는 기반기술 발전과 경험 축적으로 기타 농업 관련 산업에 활용될 수 있으며, 축적된 기술을 바탕으로 지속적인 신물질 창출과 신제품 개발에 활용 가능할 것을 판단된다.

## 참고문헌

1. 신농약 개발 연구의 현황 및 발전전략, 한국신농약개발연구조합, 1993
2. Benbrook CM(1996) Pest Management at the Crossroads. Consumers Union, Yonkers, NY.
3. Coats, J. R., Karr, L. L., Drewes, C. D.(1991) TOxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insect and earthworms. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. 449, 306-316
4. Hummelbrunner, L.A. and M.B. Isman (2001) Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*(Lep., Noctuidae). J.Agric. Food Chem.49, 715-720
5. Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19 : 603-608
6. Lee, S-E ., B-H. Lee, W.-S. Choi , B.-S. Park, J.-G. Kim and B.C. Campbell (2001) Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae*(L.). Pest Management Sci. 57,548-553
7. Muller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O. (1995) Chemical composition and fungitoxicproperties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agric. Food Chem. 43,2262-2266.
8. Rice, P.J., Coats, J.R.(1994) Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). Pestic. Sci. 41, 195-202.
9. Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81, 204-210.
10. Ho, S.H., Ma, Y. and Huang, Y. (1997) Anethole, a potential insecticide from



*Illicium verum* Hook f., against two stored product insects. Int. Pest Control. 39:50-51.

11. Huang, Y., and Ho, S.H. (1998) Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. J.Stored Prod. Res. 34:11-17.

12. Huang, Y., Chen, S.X. and Ho, S.H. (2000) Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). J.Econ.Entomol. 93:537-543.

13. Huang, Y., Lam, S.L. and Ho, S.H. (2000) Bioactivities of essential oil from *Elletaria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). J.Stored Prod. Res. 36:107-117.