

식물추출물을 이용한 버즘나무방패벌레의
친환경적인 방제제 개발

(Development of environment-friendly control
agent of sycamore lace bug to plant extract)

(주) 비아이지

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물추출물을 이용한 버즘나무방패벌레의 친환경적인 방제제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 07 월 10 일

주관연구기관명 : (주) 비아이지
주관연구책임자 : 오 세 찬
연 구 원 : 정 종 상
연 구 원 : 장 희 수
연 구 원 : 윤 병 일
연 구 원 : 김 해 만
협동연구기관명 : 충북대학교
연 구 책 임 자 : 김 길 하
연 구 원 : 윤 창 만
연 구 원 : 양 정 오
연 구 원 : 안 희 근
연 구 원 : 주 유 리
연 구 원 : 김 은 희
연 구 원 : 이 정 은

요 약 문

I. 제 목

식물추출물을 이용한 버즘나무방패벌레의 친환경적인 방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

o 연구배경

- 버즘나무는 도시공해에 강하고 공기 정화력이 커서 가로수로 많이 식재
- 유입해충인 버즘나무방패벌레가 버즘나무를 가해해 미관을 해침
- 연중 2세대 이상 발생하여 증식이 빠름
- 화학적 방제의 환경오염 등의 문제로 안전한 사용을 고려

o 필요성

- 가로수인 버즘나무에 미관상 문제가 계속 제기됨
- 화학살충제의 환경오염으로 다른 안전한 살충제 사용을 고려
- 화학살충제를 대신할 안전한 신규천연물질을 추출 및 방제 필요
- 친환경적인 버즘나무방패벌레 방제 연구가 필요함

o 목적

- 화학살충제의 사용을 줄여 환경오염등의 문제를 줄이고
- 새로운 살충활성물질을 갖는 식물에서 추출기술을 확립하고
- 추출된 화합물을 이용하여 산업화를 위한 제제기술 개발 및 제조공정 시스템 확립

III. 연구개발 내용 및 범위

- 버즘나무방패벌레의 사육시스템을 확립
- 식물추출물을 이용하여 물질 분리하고 살충활성 검정
- 혼합조성물질의 상승효과 검정
- 실증실험 후보물질 선별
- 선별된 식물추출물로 야외 포장 실증실험 실시
- 제제화한 식물추출물로 환경안전성 평가

IV. 연구개발 결과

- 버즘나무방패벌레 사육시스템 확립
 - 채집 및 실내사육조건 및 누대사육 실험조건 확립
- 살충활성물질 분리
 - 다양한 식물로부터 살충활성 물질을 분리하고 동정
- 식물추출물을 이용한 포장약효실험
 - 3개 지역에서 약효를 평가
- 식물추출물의 제제화와 환경안전성 평가
 - 인축 및 환경생태 독성 시험 실시

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 산업화를 위한 제제기술 개발 및 제조공정 시스템 활용
 - 식물추출 기술 확립
 - 제제화 기술 개발 및 제조공정 시스템 활용

Summary

This study was performed to control of the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata*, which causes aesthetic problems in urban street trees, to investigate the materials having the insecticidal activity from plant extracts and plant essential oils which collected various samples, and to develop the environmental–friendly control agents and their related techniques such as extraction and formulation for industrialization.

To investigate the insecticidal activity, natural substances were tested the methods such as dipping, spraying and fumigation. Among tested plant extracts, major components of six essential oils showing insecticidal activity were analyzed by SPME, GC and GC/MS, and characterized by HPLC and NMR. Various substances from natural resources were tested at 1000 ppm against sycamore lace bug, D0097, D0130 and D0134 were showed the insecticidal activity over 80%. Among them, D0130 was showed the insecticidal activity of 85.7% in 100 ppm conc. at 48 hours after treatment. By the testing method such as dipping and spray, it did not show high insecticidal activity from the natural substances. However, BIG07–15 through after formulation were showed high insecticidal activity in field test. Through the second selection of materials showing insecticidal activity, their activities were evaluated in the field and tested the environmental safety with no harm to the human and environment. Therefore, it will be possible to develop the control agents as an environment–friendly.

CONTENTS

SUMMARY	4
Chapter 1. Comprehensive description of research	7
Chapter 2. Present condition of relative technique development in- and out the country	9
Chapter 3. Contents and results of development of practice research	12
1. Approaching methods and contents	12
2. Materials and methods	12
3. Results and discussion	31
Chapter 4. Objective achievement rate and contribution rate of relative branches	77
Chapter 5 Research achievement and Planning to use	88
Chapter 6 References	88

목 차

제 1 장 연구개과제의 개요	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	12
1. 접근방법 및 연구내용	12
2. 재료 및 방법	12
3. 연구결과	31
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	77
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	78
제 7 장 참고문헌	79

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성

- 버즘나무(*Platanus orientalis* L.)는 낙엽활엽교목으로 각종 도시공해에 강하고 공기 정화력이 커서 우리나라 전국 각지에 가로수나 정원수 등으로 많이 심어져 있다 (Lee, 1996; Chung *et al.*, 1996).
- 버즘나무방패벌레(*Corythucha ciliata*)는 북미가 원산지이며 **도시 가로수에서 미관상 문제를 일으키고 있다**. 1995년 대한민국의 일부지역에서 버즘나무방패벌레에 의해 양버즘나무(*Platanus occidentalis*)에서 최초로 발견된 이래 (Chung *et al.*, 1996), 전국적으로 이 해충에 의해서 감염되었다 (Lee *et al.*, 1997; KFRI, 2007).
- 버즘나무방패벌레는 미국 동부전역과 캐나다 남부지역, 유럽에서는 이탈리아 및 주변 국가들에서 발생하는 것으로 알려져 있으며(Wade, 1917,; De Battisti, 1985), 주 기주식물인 양버즘나무(*P. occidentalis* L.)를 가해하지만 때로는 물푸레나무나 닥나무 등도 가해하는 것으로 알려져 있다. 연중 2세대 발생하는 것으로 알려져 있으나 조건에 따라 2세대 이상 발생하는 것으로 알려져 있다 (Drake and Ruhoff, 1965; USDA, 1985).
- 버즘나무방패벌레를 방제하기 위하여 유기인계를 사용하여 왔으며, 5종의 유기인계로 높은 활성이 수간주사방법(trunk injection method)을 이용한 연구 등이 수행되었다(Kim *et al.*, 2000). 그러나 이런 **화학농약의 사용은 환경오염을 일으킬 수 있어 다른 안전한 살충제의 사용의 필요성이 제기되었다**.
- 식물에 함유된 이차대사산물은 현재까지 보고된 약 24,000여종의 이차대사산물 이외에도 많은 미지의 활성물질이 있어 살충활성이 있는 신소재로 개발 가능성이 남아있다(Harborne, 1993).
- 환경에 대한 피해가 적고 인체에 해가 없는 것으로 알려진 **신규천연물을 이**

용하여 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성을 가진 식물을 선별하고 추출 기술을 확립하고자 수행하였다.

- 살충활성이 있는 식물추출물 중에서 작용기작 및 환경에 대한 안정성평가를 실시한 후 산업화를 위한 제제기술 개발 및 제조공정 시스템을 확립하고자 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 목표

- 본 연구개발의 목표는 도시근교의 가로수로 많이 식재되어 있는 버즘나무에서 미관상 문제시 되고 있는 해충인 버즘나무방패벌레에 대한 방제기술을 개발하고 살충활성을 가진 식물을 선별하여 추출기술을 확립하고 산업화를 위한 제제기술 개발 및 제조공정 시스템을 확립하고자 수행하였다.
- 본 연구를 수행하기 위하여 접근방법은 버즘나무방패벌레의 사육시스템 확립을 위해 야외에서 버즘나무방패벌레를 채집하고 실내에서 사육이 가능한 조건을 조사하였다. 살충활성 조사는 확보된 신규천연물질 중에서 침지, 분무와 훈증 방법으로 살충활성을 보이는 물질을 탐색하였고 이차로 기존에 살충활성이 알려진 식물을 포함하여 식물 추출물을 선정하고 식물체로부터 직접 추출한 물질에서 버즘나무방패벌레에 우수한 살충활성이 있는 물질을 선별하였다.
- 선별된 물질은 그 주요 활성성분을 알기 위하여 SPME, GC와 GC/MS, HPLC, NMR 등의 기기를 이용하여 물질을 분리 및 동정을 하고 각 단계별로 살충활성을 조사하였다. 살충활성을 보이는 물질을 이차 선별하여 야외실험을 통하여 그 약효를 검정하고 인축 및 환경에 해가 없는지 환경생태 독성시험을 수행하였다. 이후 물질을 제제화 하여 3개 지역에서 야외 실증실험을 수행하며 환경친화적 방제제로서 개발 가능성을 검토하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

급격한 도시화에 따라 도시에 콘크리트 건물과 도로가 건설되고 도시의 생활이 편리해졌지만 사람들이 휴식할 수 있는 녹색공간이 적어지고 각종 공해 및 오염을 해소할 수 없는 반면, 거리의 가로수는 그늘을 제공하고 도시 공해를 정화하는 등 도시민들에게 많은 이점을 제공하고 있다.

버즘나무는 국내에서 대표적 가로수로서 도시공해에 강하고 공기 정화력이 커서 전국 어디에서나 많이 식재되어 있다. 하지만 버즘나무방패벌레의 피해는 버즘나무의 잎을 황백색으로 변하게 하고 심하면 조기낙엽을 일으켜 미관상 해를 주기도 하지만 이를 방제하기 위하여 약제를 뿌려도 쉽게 방제가 되지 않아 빈번한 약제의 사용으로 환경오염을 일으키는 문제가 있다. 또한 나무그늘에 앉아있는 야외 카페나 바의 고객에게 성가심을 준다(d'Aguiar *et al.*, 1977). 그럼에도 불구하고 버즘나무와 버즘나무방패벌레에 대한 연구는 국내외적으로 많이 미흡한 실정이다.

1. 국외의 기술개발 현황

버즘나무방패벌레는 그 원산지가 북미지역으로 북미지역에서는 미국 동부지역과 캐나다 남부지역에서 발생하는 것으로 알려져 있으며 (Wade, 1917) 특히 양버즘나무에 피해를 많이 주는데 잎의 뒷면에서 성충이 약충과 함께 흡즙을 하여 피해를 주게 된다. 미국에서는 양버즘나무(*Platanus occidentalis* L)를 주로 가해하나 때로는 물푸레나무류, 히코리, 닥나무 등도 가해하며 1년에 2회 이상 발생하는 것으로 알려지고 있다(Drake and Ruhoff 1965, USDA 1985). 유럽에서는 1960년대 유입이 되었고 이탈리아나 독일 등의 주변국에서 분포하고 지금은 널리 퍼져있다 (Italy, 1966; South France, 1975; Hungary, 1976; Spain, 1978; South Austria, 1983; Swizerland, 1983; the former Czechoslovakian Republic, 1986; Bulgaria, 1986; Greece, 1988)(Oszi *et al.*, 2005; De-Battisti, 1985; Nikuisch, 1992). 이 해충의 대다수의 장거리 이동은 인간의 활동에 의한 것으로 보고되고 있다 (Halbert and Meeker, 2001). 버즘나무방패벌레의 생태적인 연구를 살펴보면, 피해는 가뭄에 의한 스트레스를 받을 때 더욱 악화 된다. 북미에서도 건조한 봄시기에 동시에 발생하기도 하였고(Filer *et al.*, 1977), 계속되는 심한 가해로 나무를 죽이기까지 하였다 (Barnard and Dixon, 1983).

따라서 이 해충을 방제하기 위하여 화학방제를 실시도 하였고 (Chauvel, 1990; Tremblay, 1986), 천적에 대한 기초연구도 발표된 바 있다 (Van-Driesche, 1986; Sidor, 1986; Arzone, 1985). 다양한 농약과 다양한 방법(엽분무, 수간주사, 토양관주 등)으로 접근하였지만 비용과 효율에 있어서는 그리 효과가 높지 않았다. 특히 도시에서는 대규모의 농약을 사용했음에도 불구하고 아직까지 확실한 방제가 되지 않고 있고 오히려 더 전파되고 있다. 외국은 자국의 산림보호와 화학살충제에 의한 해충 저항성문제 극복을 위해 미생물 살충제를 적극 활용하는 실정이다.

아직까지 해외에서 식물추출물을 이용한 신규천연활성물질에 대한 연구는 문헌 검색이 되지 않는 것으로 보아 이루어지지 않는 것으로 보인다.

2. 국내의 기술개발 현황

아시아지역에는 분포하지 않았던 해충이나 (Lee and Chung, 1997) 우리나라에서는 1995년도에 서울, 경기, 충북 일부지역의 버즘나무에 가해하는 것이 처음으로 발견되어 (Chung *et al.*, 1996) 이후 피해지역이 전국에서 발생하고 있고 계속 증가 추세에 있다(Lee *et al.*, 1997; KFRI, 2007).

최근 침입한 해충이기 때문에 아직 등록된 방제약제가 없으며, 주로 살충스펙트럼이 넓고 살충활성이 높은 기존 유기합성(유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계) 살충제에 의존하고 있는 실정이다. 이를 방제하기 위하여 Song *et al.* (1997)은 실내에서 성충에 대한 9종 살충제의 활성검정을 통해 피레스로이드계 살충제의 약효가 우수하다고 하였고, Choi *et al.* (1999)는 tebufenozide가 버즘나무방패벌레의 발육에 미치는 영향을 보고하였다. Kim *et al.* (2000)은 수간주사법으로 높은 살충율을 조사하였다. 가로수에 이러한 유기합성 살충제를 이용한 방제는 환경문제로 곤충생장조절제 (insect growth regulator, IGR)를 이용한 방제를 검토하였다 (Oberlander *et al.*, 1997).

가로수에 이러한 유기합성 살충제를 이용한 방제는 도시환경오염을 야기시킬 수 있기 때문에 부작용이 적은 대체제의 개발이 필요하다. 이에 최근 식물정유에 대한 관심이 높아지고 있다.

국내에서 버즘나무방패벌레 방제에 대한 연구는 충북대학교, 국립산림과학원, 서울대학교, 에스케이케미칼등에 실시하였으며 충북대학교의 경우 버즘나무방패벌레의 배자발육과 후배자발육에 미치는 tebufenozide의 영향에 대해 연구한 결과 tebufenozide는 버즘나무방패벌레의 알과 유충에 대해서 살란, 살충효과를 나타내었

을 뿐만 아니라 성충의 수명, 생식 및 부화율에도 영향을 미친 것으로 나타나 차세대 개체군 밀도억제에 유용하다고 보고하였다 (Choi *et al.*, 1999). 또한 IGR계 약제인 bistrifluron을 이용한 살충활성이 효과가 있음을 발표한 바 있다 (Yoon *et al.*, 2008) 국립산림과학원은 산림자원으로부터 무공해 생물농약의 탐색 및 개발에서 나한백에서 솔잎혹파리에 대한 살충성분 cavacrol 분리 및 동정하였고 neem에서 솔껍질깍지벌레에 대한 살충성분 azadirachtin 분리 및 동정하였으며 계피에서 도토리거위벌레에 대한 살충성분 salicialdehyde 분리 및 동정, 편백에서 팔바구미 성충에 대한 살충성분 bornyl acetate 분리 동정, 고추냉이로부터 살충성분 allylisothiocyanate 분리 및 동정, 황련에서 오리나무잎벌레 및 미국흰불나방에 대한 섭식저해물질 berberine chloride와 palmatine iodide 분리 및 동정하였다. 에스케이케미칼은 고삼추출물이 배추좀나방과 응애에 대한 우수한 살충효과가 있는 것으로 보고하였다.

그 외에도 식물정유에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있고 계속 진행중이다.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 접근방법 및 연구내용

본 연구는 도시근교의 가로수로 많이 식재되어 있는 버즘나무에서 미관상 문제시 되고 있는 해충인 버즘나무방패벌레를 방제하고 살충활성을 가진 식물을 선별하여 추출기술을 확립하고 산업화를 위한 제제기술 개발 및 제조공정 시스템을 확립하고자 수행하였다.

본 연구를 수행하기 위한 접근방법은 버즘나무방패벌레의 사육시스템을 확립을 위해 야외에서 버즘나무방패벌레를 채집하고 실내에서 사육이 가능한 조건을 조사하였다. 살충활성 조사는 확보된 신규천연물질 중에서 침지, 분무와 훈증 방법으로 살충활성을 보이는 물질을 탐색하였고 이차로 기존에 살충활성이 알려진 식물을 포함하여 식물 추출물을 선정하고 식물체로부터 직접 추출한 물질에서 버즘나무방패벌레에 우수한 살충활성이 있는 물질을 선별하였다.

선별된 물질은 그 주요 활성성분을 알기 위하여 SPME, GC와 GC/MS, HPLC, NMR 등의 기기를 이용하여 물질을 분리 및 동정을 하고 각 단계별로 살충활성을 조사하였다. 살충활성을 보이는 물질을 이차 선별하여 야외실험을 통하여 그 약효를 검정하고 인축 및 환경에 해가 없는지 환경생태 독성시험을 수행하였다. 이후 물질을 제제화 하여 3개 지역에서 야외 실증실험을 수행하며 환경친화적 방제제로서 개발 가능성을 검토하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시충의 확보

버즘나무방패벌레(Sycamore lace bug; *Corythucha ciliata* Say)는 2006년 6월 충북 청주시 개신동 충북대학교 테니스장과 충북대학교 인근 버즘나무에서 서식하는 충을 채집하여 본 실험에 사용하였고, 충북대학교 곤충사육실에서 사육시스템 확립과 실험을 위해 누대 사육하였다.

버즘나무방패벌레는 버즘나무의 잎 뒷면에서 입을 흡즙하며 가해하기 때문에

수관 전체의 잎이 황백색으로 변하며 심할 경우 수세가 약해지고 조기낙엽이 되기도 한다(그림1).



(A) 피해를 입은 버즘나무

(B) 버즘나무 잎의 피해

그림 1. 버즘나무방패벌레에 의한 피해

2. 버즘나무방패벌레의 사육시스템 확립

가. 공시충의 실내사육조건 및 시스템 확립

버즘나무방패벌레의 실내사육 시스템을 확립하기 위하여 온도, 상대습도, 광조건, 사육용기의 조건과 먹이 공급 조건을 달리하여 실내사육에 적합한 환경을 설정하였고 문헌 조사를 통해 참고하였다.

나. 누대사육 실험조건 확립

실내사육조건을 확립한 후 버즘나무방패벌레의 사육시스템이 대량사육시스템에 적합한지 조사하고 누대사육 실험조건을 확립하여 추후 실험을 할 수 있도록 준비하였다.

3. 살충활성물질 분리

가. 식물추출 시료확보

버즘나무방패벌레의 살충활성을 검정하기 위하여 (주)비아이지 연구소에서 기존에 보유하고 있는 식물추출물 7종, 해외에서 수집한 식물추출물 13종, 강원농업기술원에서 분양받은 식물추출물 13종 등 총 33종의 식물추출물을 확보하였다(표 1).

국내 및 해외에서 수집한 추출물은 식물체를 부위별로 채집, 건조, 분쇄하여 에탄올에 침지한 후 여과한 조추출물로 확보하였으며 강원농업기술원 농산물이용시험장에서 확보한 추출물은 식물체를 건조, 분쇄한 분말 50g을 500ml Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300ml를 붓고 3일 후 감압여과하고 회전진공농축기로 40℃에서 감압 농축한 조추출물을 확보하였다. 이들 수집된 시료의 식물명, 부위, 추출형태는 표 1과 같다.

표 1. 식물추출물의 시료 목록

시료번호	식물	추출부위	추출형태	비고
BIG06-01	멸구슬나무	줄기	에탄올조추출물	당사보유
BIG06-02	고삼	종자	에탄올조추출물	"
BIG06-03	제충국	꽃	에탄올조추출물	"
BIG06-04	제충국	꽃	초임계추출	"
BIG06-05	담배	잎	에탄올조추출물	"
BIG06-06	차	잎	에탄올조추출물	"
BIG06-07	페과민트	꽃	정유	"
BIG06-08	만수국	꽃	분말	해외
BIG06-09	만수국	전부위	분말	"
BIG06-10	녹제초	전부위	분말	"
BIG06-11	담배	잎	정제	"
BIG06-12	차	잎	유제	"
BIG06-13	차	잎	에탄올조추출물	"
BIG06-14	유계놀		정유	"
BIG06-15	고삼	뿌리	에탄올조추출물	"
BIG06-16	고삼	전부위	에탄올조추출물	"
BIG06-17	고삼	전부위	정제	"
BIG06-18	정향		정유	"
BIG06-19	세신	전부위	10%추출물	"
BIG06-20	세신	전부위	20%추출물	"
BIG06-21	닭의장풀	전초	메탄올조추출물	강원도농업기술원
BIG06-22	은행나무	잎	메탄올조추출물	"
BIG06-23	재쭉	전초	메탄올조추출물	"
BIG06-24	민들레	전초	메탄올조추출물	"
BIG06-25	어성초	잎	메탄올조추출물	"
BIG06-26	백부근	뿌리	메탄올조추출물	"
BIG06-27	고삼	뿌리	메탄올조추출물	"
BIG06-28	사군자	뿌리	메탄올조추출물	"
BIG06-29	창포	뿌리	메탄올조추출물	"
BIG06-30	죽제비싸리	목부	메탄올조추출물	"
BIG06-31	오동나무	잎	메탄올조추출물	"
BIG06-32	잣나무	목부	메탄올조추출물	"
BIG06-33	표고	자실체	메탄올조추출물	"

나. 식물시료 추출 및 확보

1차 년도에 이어서 2차 년도에서도 식물시료 확보를 위해 국외에서 살충활성물질로 알려진 식물추출물 24가지를 수집하여 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성물질을 선별하는 연구를 계속 수행하였으며 이들 수집된 시료의 목록은 표 2와 같다.

표 2. 식물추출물의 시료 목록

시료번호	생산회사	식물	추출형태
D0055	중국 서북농업대학	멸구슬나무	에탄올조추출물
D0082	Kingbo사	고추기름	6% 유제
D0097	"	어등동추출물	65% 분말
D0104	MGK	제충국	6% 유제
D0107	"	뽕랑	10% 에탄올조추출물
D0108	"	박락회	60% 분말
D0110	"	녹제초	10% 에탄올조추출물
D0116	"	선학초	10% 분말
D0127	Undersun Bio	미생물추출물	10% 분말
D0128	"	"	20% 분말
D0129	"	"	30% 분말
D0130	"	고삼	에탄올조추출물
D0132	"	멸구슬추출물	0.6% 에탄올조추출물
D0133	"	인연소	0.6% 에탄올조추출물
D0134	"	제충국	10% 에탄올조추출물
D0153	Kingbo사	제충국 + 담배	3% 에탄올조추출물
D0154	"	"	5% 에탄올조추출물
D0155	"	로테논	5% 에탄올조추출물
D0158	"	박락회	1% 분말
D0159	"	어등동	10% 에탄올조추출물
D0160	"	어등동	20% 에탄올조추출물
D0162	서북농업대학	천연소 + 제충국	75% + 1.25%
D0163	"	"	50% + 2.5%
D0164	"	"	25% + 3.75%

다. 식물정유와 그 주요성분인 terpene의 살충활성 검정

(1) 식물정유의 살충활성 검정

식물정유 중에서 살충활성을 갖는 물질을 스크리닝하기 위하여 시중에 판매중인 식물정유를 구입하여 실험에 사용하였다. 각 식물정유는 JinArome, Fluka, Hasegawa, Sigma Co., EuroAroma Co., Charabot Co., Seoul Perfumery Co. 등에서 구입하였으며 이들 식물정유의 학명, 과명, 구입출처를 표 3에 표시하였다.

표 3. 실험에 사용한 식물정유

Essential oil	Source Plant	Family	Source
1 Angelica root	<i>Angelica archangelica</i>	Umberlliferae	JinArome
2 Anise	<i>Pimpinella anisum</i>	Apiaceae	JinArome
3 Basil	<i>Ocimu basilicum</i>	Labiatae	Hasegawa Co.
4 Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>	Rutaceae	Seoul Perfumery Co.
5 Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	JinArome
6 Cadamone	<i>Elettaria cardamomum</i>	Zingiberaceae	JinArome
7 Caraway	<i>Carum carvi</i>	Umbelliferae	JinArome
8 Cedar	<i>Juniperus virginiana</i>	Cupressaceae	Kanto Chem. Co.
9 Cedarwood	<i>Cedrus atlantica</i>	Pinaceae	JinArome
10 Chamomile (Rose)	<i>Anthemis nobilis</i>	Compositae	JinArome
11 Chamomile (Germon)	<i>Anthemis nobilis</i>	Compositae	JinArome
12 Cinamon	<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae	JinArome
13 Cinamon bark	<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae	JinArome
14 Citronella	<i>Cymbopogon nardus</i>	Gramineae	JinArome
15 Clary sage	<i>Salvia sclarea</i>	Labiatae	JinArome
16 Clary sage	<i>Salvia sclarea</i>	Labiatae	JinArome
17 Clove (leaf)	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Oleaceae	JinArome
18 Clove (bud)	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Oleaceae	JinArome
19 Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Umbelliferae	한골무역
20 Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	JinArome
21 Eucalyptus camaldulensis	<i>Eucalyptus camaldealensis</i>	Myrtaceae	JinArome
22 Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	Umbelliferae	JinArome
23 Garlic	<i>Allium sativum</i>	Alliaceae	JinArome
24 Geranium	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geraniaceae	JinArome
25 Gingembre			JinArome
26 Ginger	<i>Zinger officinale</i>	Zingiberaceae	JinArome

27 Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	Rutaceae	JinArome
28 Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	JinArome
29 Junifer berry	<i>Juniperus communis</i>	Cupressaceae	JinArome
30 Lavender	<i>Lavendula officinalis</i>	Labiatae	JinArome
31 Lemon	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	JinArome
32 Lemon grass	<i>Cymbopogon citratus</i>	Gramineae	Charabot Co.
33 Lime	<i>Citrus aurantifolia</i>	Rutaceae	JinArome
34 Litsea cubeba	<i>Litsea cubeba</i>	Lauraceae	JinArome
35 Majoram	<i>Origanum vulgare</i>	Labiatae	JinArome
36 Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	Myrtaceae	JinArome
37 Mentha avensis	<i>Mentha avensis</i>		Berje
38 Muguet flower	<i>Convallaria majalis</i>	Ruscaceae	JinArome
39 Mustard	<i>Brassica juncea</i> L. Czern	Brassicaceae	JinArome
40 Myrrh	<i>Commiphora myrrha</i>	Burseraceae	JinArome
41 Neem	<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	JinArome
42 Orange	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	JinArome
43 Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	Labiatae	JinArome
44 Peach flavor	<i>Prunus persicae</i>	Rosaceae	JinArome
45 Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	JinArome
46 Pennyroyal	<i>Mentha pulegium</i>	Labiatae	JinArome
47 Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	Labiatae	JinArome
48 Petitgrain	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	JinArome
49 Pine needle	<i>Pinus densiflora</i>	Pinaceae	JinArome
50 Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Labiatae	JinArome
51 Sage	<i>Salvia officinalis</i>	Labiatae	JinArome
52 Sandalwood	<i>Santalum album</i>	Santalaceae	EuroAroma
53 Spearmint	<i>Mentha spicata</i>	Labiatae	JinArome
54 Strawberry	<i>Fragaria ananassa</i>	Rosaceae	JinArome
55 Sweet orange	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	JinArome
56 Tea tree	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	JinArome
57 Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Labiatae	JinArome
58 Thyme red	<i>Thymus zygis</i>	Labiatae	JinArome
59 Thyme white	<i>Cananga odorata</i>	Annonaceae	JinArome
60 Ylangylang	<i>Cananga odorata</i>	Compositae	JinArome
61 Ylangylang II	<i>Cananga odorata</i>	Compositae	JinArome
62 Grapefruit(Euro)	<i>Citrus paradisi</i>	Rutaceae	JinArome
63 Camomile	<i>Matricaria requitita</i>	Compositae	JinArome
64 Onion	<i>Allium cepa</i>	Alliaceae	JinArome

(2) 식물정유의 주요성분인 Terpenes의 살충활성 검정

식물정유의 주요구성성분을 단일성분으로 정제하여 판매중인 terpenes을 이용하여 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성을 검정하였다. 표 4는 본 실험에 사용한 terpene의 종류 및 구입출처를 표시하였다.

표 4. 실험에 사용한 Terpenes

Terpene	Source	Terpene	Source
1 (R)-(+)-Camphor	Aldrich	40 Fenchone	Sigma
2 (R)-(+)-Limonene	Aldrich	41 Geraniol	Aldrich
3 (R)-(+)-Pulegone	Aldrich	42 Geranyl acetate	Fluka
4 (S)-(-)-Perillyl alcohol	Aldrich	43 Germacrone	Sigma
5 (-)-Bornyl acetate	Aldrich	44 Cinnamalde	Sigma
6 (-)-Carveol	Aldrich	45 Hexanomic acid	Aldrich
7 (-)-trans-caryophyllene	Sigma	46 Isopropyl isothiocyanate	Aldrich
8 (-)- β -pinene	Aldrich	47 trans-2,4,5-Trimethoxy-propenylbenzene	Sigma
9 (+)-Limonene	Aldrich	48 Linalool	Aldrich
10 (R)-(-)-Carvone	Aldrich	49 Linalyl acetate	Aldrich
11 (+/-)-Chmpnene	Sigma	50 Menthol	Aldrich
12 (+/-)-Terpinenol	Sigma	51 (-)-menthone	Aldrich
13 (\pm)- α -Terpinyl acetate	Fluka	52 cis-2,4,5-Trimethoxy-propenylbenzene	Sigma
14 (s)-(-)-Perillaldehyde	TCI	53 Myrcene	Merck
15 (S)-(+)-Carvone	Aldrich	54 N,N-Diethyl-M-Toluamide	Aldrich
16 d-cis/trans Allethrin	Sigma	55 (1s)-(-)- α -Pinene	TCI
17 1,4-cineole	Aldrich	56 Ocimene	Sigma
18 1,8-cineole	ZXCHEM	57 trans-Cinnamic acid	Sigma
19 1-nonanol	Aldrich	58 (1s)-(-)- β -Pinene	Sigma
20 Isosafrole	Sigma	59 R-(-)- α -phellandrene	Aldrich
21 3-Octanol	Sigma	60 Safrole	Aldrich
22 Borneol	Aldrich	61 Salicylaldehyde	Sigma
23 Camphene	Sigma	62 Terpinolene	TCI
24 Camphor	Sigma	63 Thujone	TCI
25 Carvacrol	Sigma	64 Thymol	Aldrich
26 Carvone	Sigma	65 Trans-cinnamaldehyde	Sigma
27 Caryophyllene oxide	Aldrich	66 Tropolone	Aldrich
28 Cineole	Aldrich	67 Valeric acid	Aldrich
29 Cinnamic aldehyde	Aldrich	68 Vanillin	TCI
30 Citral	Aldrich	69 α -Ionone	Aldrich
31 Citronellal	Sigma	70 α -Pinene	Aldrich
32 Citronellic acid	Aldrich	71 α -Terpinene	Sigma
33 Citronellol	Sigma	72 α -Terpineol	Aldrich
34 Citronelly acetate	Aldrich	73 β -Myrcene	Sigma
35 Cinnamyl alcohol	Aldrich	74 2-methyl-3-heptanone	Sigma
36 Cyclohexanone	Fluka	75 γ -Terpinene	Aldrich
37 Diethyl phthalate	Sigma	76 ρ -Cymene	Aldrich
38 4-Ally lanisole (Estragole)	Sigma	77 Benzyl isothiocyanate	Aldrich
39 Eugenol	Sigma		

라. 식물시료 추출 및 확보('08)

문헌조사를 통하여 해충에 살충활성이 보고된 식물과 주변에서 구하기 쉬운 한 약재를 구입하여 직접 건조시킨 후 18개의 식물추출물을 얻었다. 시험에 사용한 식물시료의 목록은 표 5와 같고, 식물시료로 부터 추출한 물질로부터 다른 해충에 대한 살충활성이 있는지 알아보고자 담배가루이, 배추좀나방 유충, 숲모기 유충, 점박이용애, 복숭아혹진딧물에 대하여 살충검정을 검정하였다.

표 5. 식물추출물의 시료 목록

시료 번호	식물명	학명	과명	식물 부위	추출형태
1	쇠뜨기	<i>Equisetum arvense</i>	Equisetaceae	전체	100% methanol
2	은행나무	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	잎	100% methanol
3	담쟁이	<i>Parthenocissus triauspidata</i>	Vitaceae	전체	100% methanol
4	췌잎	<i>Pueraria lobata</i>	Leguminosae	잎	100% methanol
5	췌뿌리	<i>Pueraria lobata</i>	Leguminosae	뿌리	100% methanol
6	포공영	<i>Taraxacum platycarpum</i>	Compositae	전체	100% methanol
7	탱자	<i>Poncirus trifoliata</i>	Rutaceae	잎	100% methanol
8	서광	<i>Tagetes patula</i>	Compositae	줄기	100% methanol
9	홍황초	<i>Tagetes patula</i>	Compositae	전체	100% methanol
10	들깨	<i>Perilla frutescens</i>	Labiatae	전체	100% methanol
11	고추	<i>Capsicum annum</i>	Solanaceae	잎	100% methanol
12	상육	<i>Phytolacca esculenta</i>	Phytolaccaceae	전체	100% methanol
13	맥문동	<i>Liriope platyphylla</i>	Liliaceae	전체	100% methanol
14	삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	Saururaceae	전체	100% methanol
15	오레가노	<i>Origanum vulgare</i>	Labiatae	전체	100% methanol
16	산국	<i>Dendranthema boreale</i>	Compositae	전체	100% methanol
17	죽순대	<i>Phyllostachys pubescens</i>	Gramineae	전체	100% methanol

4. 생물활성 물질의 분석 및 동정

가. 살충활성성분 용매분획층 확보

살충활성검정을 통해 선발된 식물시료는 물질의 분석 및 동정을 위하여 농축과 분획을 거쳐서 살충활성물질이 있는 층을 분리하였다. 식물시료의 조추출물 40 g을 취하여 증류수 800 ml에 녹인 후 2000 ml 분획여두에 넣고 헥산 800 ml를 부어 마개를 닫고 시료와 두 용매가 잘 섞이도록 충분히 흔들어 물층과 헥산층으로 분리하였으며, 약 30분 후에 다른 분획여두를 이용하여 헥산층은 뽑아내고, 물층은 새로운 헥산 800 ml를 부어 동일한 방법으로 2차의 헥산층을 뽑아내었다.

남아있는 물층에 클로로포름(chloroform) 800 ml를 붓고 마개를 닫은 후 충분히 흔들어 물층과 클로로포름층을 분리하였으며, 약 30분 후에 클로로포름층을 뽑아내고, 물층에 새로운 클로로포름층을 뽑아내었다. 마지막으로 남아있는 물층에 다시 에틸아세테이트(ethyl acetate) 800 ml를 부어 동일한 방법으로 에틸아세테이트층과 물층을 2회에 걸쳐 분리하였다(그림 2).

이상과 같은 방법으로 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층 및 물층의 4분획을 얻었으며, 회전 진공농축기(Laborota 4000, heidolph, USA)와 냉각기(EYELA coolcate CCA-1100, Japan)로 45°C에서 감압농축을 하였다. 얻어진 각각의 분획물들은 일정량을 취하여 생물검정에 이용하였다. 각각 분획물의 생물검정 결과에 의해 활성을 가지고 있는 분획에 대하여 분리 및 정제를 실시하였다. 버즘나무방패벌레와 배추좀나방, 빨간집모기에 강한 활성을 보인 헥산 분획물을 open column chromatography (Merck 70~230 mesh, 500 g, 6 cm × 67 cm)를 이용하여 실리카겔 600 g을 헥산으로 습식·충진시킨 뒤, 상층부에 시료를 스포이드로 loading하였다. 용출용매는 헥산과 에틸아세테이트를 사용하여 각각의 비율로 분당 10 ml씩 흘려주었다. 플라스크에 일정하게 받아낸 후 각각 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)에 의해 TLC plate (SILC/UV254, 0.25 mm, Merck KGaA, Germany)상에 전개된 spot pattern을 UV hand lamp(UVGL-58, UV-254/356 nm, UVP Inc., USA)로 확인하였으며, 동일 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축한 후 생물검정에 사용하였다.

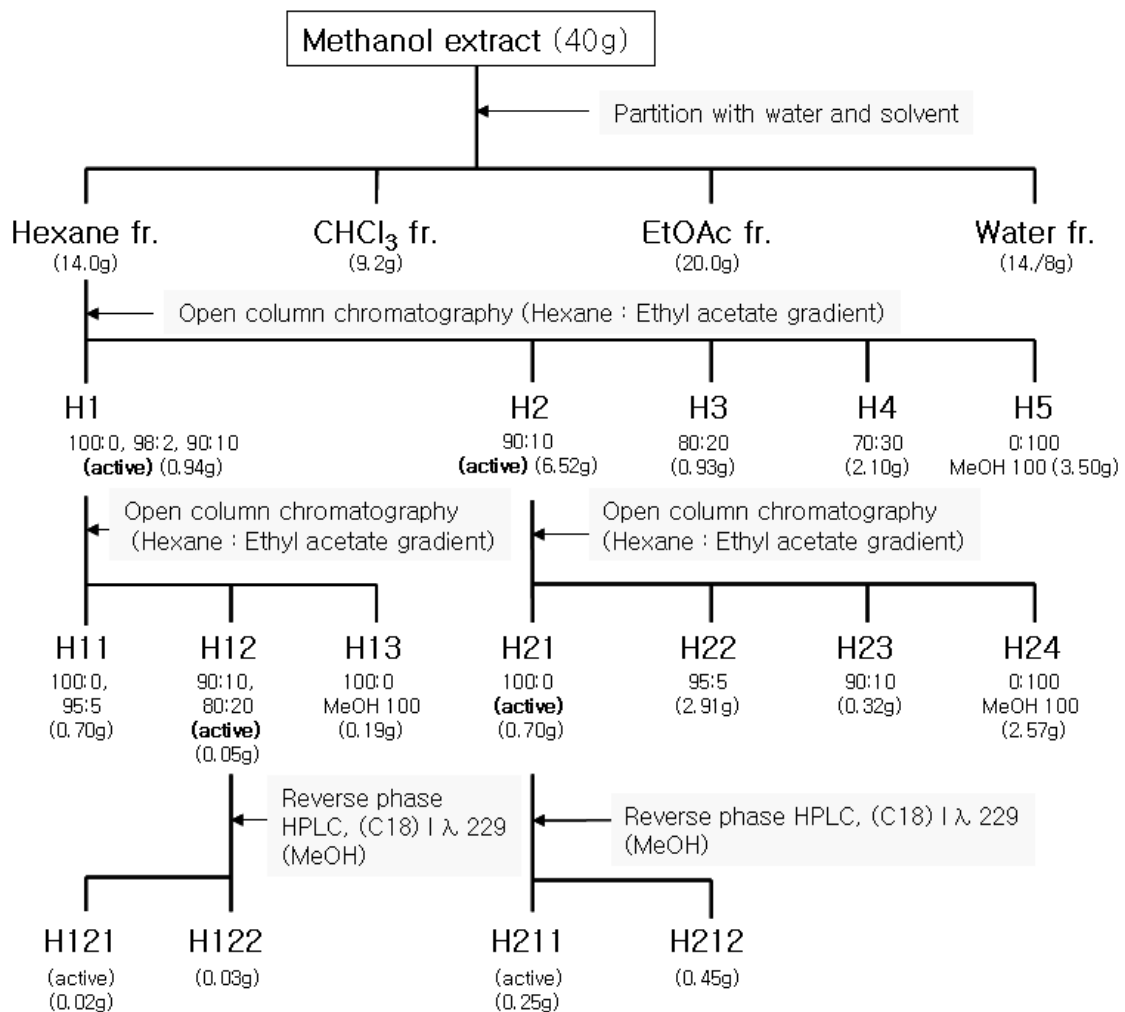


그림. 2. 다양한 식물체에서 살충활성물질을 분리하는 과정

나. 식물정유의 GC와 GC/MS를 이용한 살충활성성분 분리 및 동정

식물정유의 살충활성 성분은 Gas chromatography (GC, Agilent Technologies 6890N)와 Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS, Agilent Technologies 7890A/5975C)를 이용하여 분석하였다. 실험에 이용된 column은 DB-WAX (ID 0.25 mm × 30 m length)이고, carrier gas는 N₂ gas를 이용하였으며, oven 온도는 35°C~200°C(5°C/min)로 하였다. 또한 주입구의 온도는 180°C로 하였고, 검출기 온도는 200°C 조건하에서 FID(Flame Ionization Detector)로 검출하였다. 식물정유의 구성성분은 GC/MS로부터 70eV 에서 시료의 total ion chromatogram을 얻은 후, WILEY 138 library의 자료(Agilent)와 비교하여 확인하였다.

다. 살충활성성분 정제

컬럼크로마토그래피에 의해 분리된 각각의 활성성분은 먼저 UV spectrophotometer (HP 8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 최대 흡수파장을 검색한 후 고속액체크로마토그래피 (HPLC, M930, YOUNG-IN, South Korea)에서 메탄올을 C₁₈ 컬럼(ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150mm, Agilent Technologies, USA)에 흘려주면서 시료용액을 주입하여 순수정제 하였다. 이때 용매의 flow rate는 4.0 ml/min으로 하였으며, UV detector (HPLC, M720, YOUNG-IN, South Korea)상의 최대흡수파장은 229 nm로 하였다.

라. 화학구조 동정

HPLC를 이용하여 최종 정제된 살충활성물질에 대하여 구조결정 분석을 실시하였다. Gas chromatography (GC, Agilent Technologies 6890N)와 Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS, Agilent Technologies 7890A/5975C)로 성분을 분석하였다. 실험에 이용된 column은 DB-WAX (ID 0.25mm × 30 m length)이고, carrier gas는 N₂ gas를 이용하였으며, oven 온도는 30°C~200°C(2°C/min)로 하였다. 또한 주입구 온도는 180°C로 하였고, 검출기 온도는 200°C 조건하에서 검출하였다. GC/MS역시 GC와 같은 조건하에서 실험하였다. UV spectrometer (Jasco V-550, reference solvent: methanol)을 이용하여 각 물질의 최대 흡수파장을 검색하였다. ¹H (500 MHz), ¹³C (500 MHz) NMR spectrum를 통하여 얻은 화학구조상의 수소 및 탄소골격에 대한 정보를 얻어 활성물질의 구조를 동정하였다.

5. 살충작용기작 구명

버즘나무방패벌레의 살충작용기작을 구명하기 위하여 다음과 같은 생물검정법을 수행하였다.

가. 엽침지처리

버즘나무방패벌레 성충을 대상으로 살충활성물질의 섭식에 의한 소화중독효과를 조사하기 위하여 버즘나무의 잎을 약액에 침지처리 하였다(그림 3). 버즘나무의 잎은 소형 페트리디쉬(φ5.5×1.2cm)에 넣을 크기로 잎을 절편으로 자르고(φ5 cm), 약액에 절편(φ5.5×1.2cm)을 30초간 침지 후 음건한다. 약제는 적정농도로 희석하여 준

비하였고, 버즘나무방패벌레는 그 위에 10마리씩 성충을 접종하고 약제처리 후 24시간과 48시간 경과 후 살충률을 조사하였다. 실험은 3반복에서 6반복으로 수행하였다.

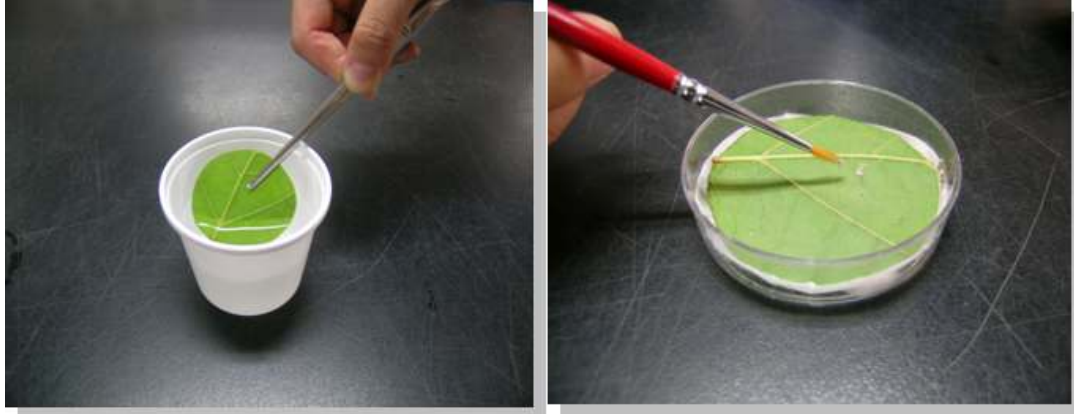


그림 3. 엽침지법에 의한 약제처리

나. 분무처리

버즘나무방패벌레 성충을 대상으로 살충활성물질의 접촉효과를 조사하기 위하여 분무처리를 실시하였다. 소형 유리병에 물을 반쯤 채우고 자른 버즘나무 잎의 엽병을 다치지 않도록 면솜으로 부드럽게 감싸고 소형 유리병의 입구에 맞게 끼워 넣고 물을 채운다. 버즘나무방패벌레 암수 한 쌍씩 버즘나무 잎에 접종한 후 적정농도로 희석한 약액을 분무기를 이용하여 직접 처리하였다(그림 4). 분무처리 후 버즘나무 잎을 원통형 아크릴케이지($\phi 15 \times 30 \text{cm}$)에 24시간과 48시간 경과 후 살충률을 조사하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다.

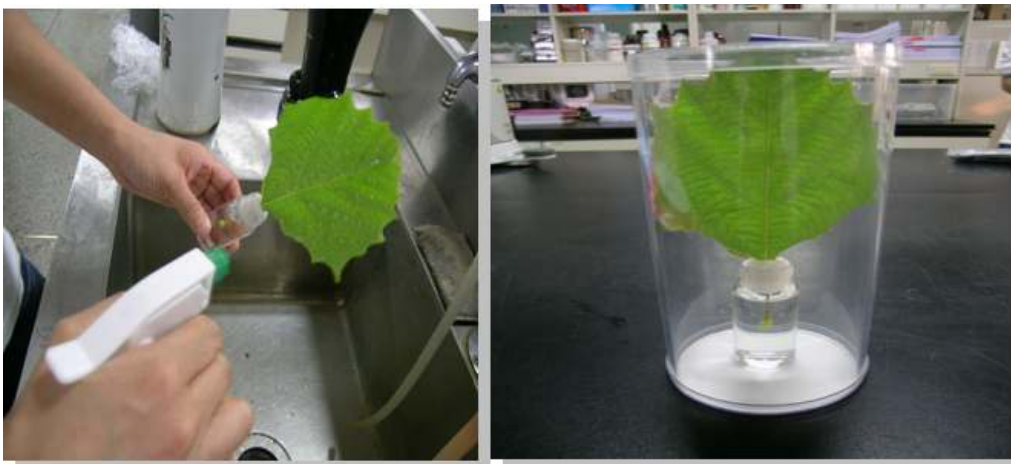


그림 4. 분무법에 의한 약제처리

다. 혼증처리

버즘나무방패벌레에 대한 식물정유의 혼증독성은 성충을 10마리씩 투명한 원통형 아크릴 용기($\Phi 9 \times 15$ cm)에 넣고, 각 화합물 원액을 filter paper($\Phi 5.5$ cm / 2)에 적정량을 처리하여 원통형 아크릴용기 바닥에 놓고, 화합물의 휘발 성분이 용기 밖으로 휘발되는 것을 막기 위해 페트리디쉬($\Phi 9$ cm)를 뚜껑으로 사용하여, parafilm으로 밀봉하였다. 처리 24시간, 48시간 후에 사충수를 조사하였으며, 모든 시험은 3반복으로 수행하였다. 시험 조건은 온도 26 ~ 28°C, 광주기 12L : 12D, 상대습도 40~60%로 하였다.

라. 농도별 살충효과

살충활성검정을 통해 선발된 시료의 농도별 살충활성을 조사하기 위하여 선발된 약제를 500ppm, 100ppm, 50ppm, 10ppm으로 희석하여 상기의 살충활성검정 방법으로 수행하였다. 혼증효과를 검정하기 위하여 식물정유는 Liter당 5 ul, 2.5ul, 1ul로 처리하였다.

6. 제제화 시험 및 환경안전성 평가

가. 제제처방확립

버즘나무방패벌레에 대한 살충활성이 높았던 1차 년도에 선발된 3개 시료와 2차년도 선발된 3개 시료 등 총 6개 식물 조추출물을 원제로 하여 야외포장에서 살포하기 편리한 형태 또는 물에 잘 용해되는 형태로 제제화를 실시하였다. 본 시험에서는 원제의 특성상 유제와 액제 형태의 제형을 검토하여 첨가제와 부제를 선발하여 제제처방을 결정하였다.

나. 제제안정성시험

시료별 제제처방에 따라 조제한 시료 17개를 제형에 따라 유제는 pH, 비중, 유화성, 표면장력, 유화안정성, 내열내한성 항목을 검토하였고 액제는 pH, 비중, 표면장력, 내열내한성 항목을 검토하여 안정성이 있는지 판단하였다.

(1) pH 측정

증류수 100ml이 담긴 비이커에 시료 1g을 넣고 잘 혼합한 후 pH측정기를 사용하여 측정하였다.

(2) 비중

시료를 100ml 메스실린더에 90ml ~ 100ml를 담고 표준비중계를 사용하여 실온에서 측정하였다.

(3) 유화성

아래의 그림 5와 같이 100ml 메스실린더에 3°경도수로 눈금을 맞춘 다음 여기에 0.1% 농도로 시료를 떨어뜨리고 유화상태를 판정한다. 이때 비중이 낮아 수면에 떠 있을 경우에는 가볍게 흔들어 주며 비중이 높아 바닥에 가라앉을 때에도 가볍게 흔들어 준다.



그림 5. 유화성 시험

(4) 유화안정성

100ml 메스실린더에 3° 경도수로 눈금을 맞추고 여기에 용량비 0.1%농도로 시료를 희석한 다음 마개를 하고 1분간 30회 아래 그림 6과 같이 진탕시켜서 상온으로 유지하여 둔 다음 24시간 후 유탁액의 균일성, 유상물 또는 침전물의 생성, 층분리, 색상변화 등을 관찰하였다.



그림 6. 유화안정성 시험

(5) 내열내한성

시료 20g씩을 마개달린 시험관 2개에 넣고 마개를 하고 각각 40℃ 및 15℃의 항온기속에서 72시간 정치한 후 액의 분리 또는 침전물 생성 등 여부를 관찰하여 판정하고 분리 또는 침전물이 생성 되었을 때에는 상온으로 유지시켜 24시간 이내에 원상으로 회복되는지 확인하였다.

다. 환경안정성 시험 및 시제품제작

(1) 공시 시험동물

마우스(ICR계-(주)샘타코)는 급성경구 및 급성경피 독성시험을 수행하였고, 송사리(*Oryzias latipes* -한국화학시험연구원 안전성평가본부 환경독성실험실, 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터)는 담수어류에 대한 영향시험재료로 공시하였다. 이 동물들은 조사하고자하는 독성물질에 대한 반응결과가 광범위하게 연구되어 시험결과 해석이 용이하고, 시험결과에 대한 신뢰도를 높일 수 있다.

(2) 순화 및 검역

마우스는 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하여 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 미생물 등에 의한 오염여부를 확인한 후, 이상이 없는 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 1주일 이상 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

송사리는 시험시작 7일전에 50 L의 수조로 230마리의 시험어를 이동시켜 순화를 시작하였고, 시험과 동일한 환경 하에서 순화를 실시하였다. 순화기간 중 치사어가 발생하지 않고 건강상태가 양호하여 시험에 이용하였다.

(3) 사육환경

(가) 마우스

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(400×250×180mm)에 대팻밥 깔 집을 깔아 5마리씩 사육 유지 하였다. 본 실험의 환경은 온도 $22.2\pm 0.9^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $52.2\pm 0.9\%$, 환기횟수 13~18회/hr, 조도 200~300 Lux, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 송사리

100L 용량의 장방형 유리제 수조에서 수온 21 ~ 25°C, 광조건 16시간, 암조건 8시간의 환경조건으로 사육하였다. 먹이는 오전에 1회 Tetramin flake(Tetra co. 독일)을, 오후에 1회 Blood worm(Hikari sales USA Inc., 미국)를 매일 공급하였다. 시험기간 중 송사리 사육실의 온도 및 사육수조의 수온은 자동 측정기에 의하여 매 30분마다 측정되었다. 사육실의 환경 측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다. 사육에 사용된 용수는 지하수를 전처리필터(1.0um)와 세균제거필터(0.2um)를 통과시킨 후 저수조에서 24시간 이상 폭기시킨 후 사용하였다.

(4) 투여약량 수준설정 및 시험물질 조제

(가) 경구시험

① 투여약량 설정

기초시험에서 5,000mg/kg을 투여하였으며 전 동물이 치사동물이 없었다.

② 투여약량별 실험동물 수

투여약량별 공시동물 수는 암수 5마리씩 10마리를 공시하였으며 개체별 식별은 피모에 색소로 표시한 일련번호에 의하였다.

③ 대조군의 설정

공시 시험물질이 액상으로 약제 조제 시 증류수에 잘 희석되므로 용매 대조군 설정은 하지 않았다.

④ 용매의 선택과 시험물질 조제

공시약제 조제 시 용매의 선택은 시험물질이 액상으로 증류수에 잘 희석되므로 증류수를 용매로 선정하였고 소정의 약량을 50ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 희석시켜 조제하였다.

⑤ 투여 액량 설정

투여 액량은 체중 kg당 10ml로 설정하였다.

(나) 경피시험

① 처리약량

기초시험 결과 수컷과 암컷 모든 동물은 처리약량 4,000mg/kg에서 치사동물이 없었다.

② 처리약량별 실험동물 수

처리약량별 공시동물 수는 암수 5마리씩 10마리를 공시하였으며 개체별 식별은 피모에 색소로 표시한 일련번호에 의하였다.

③ 대조군의 설정

공시 시험물질이 액상으로 처리약제 조제 시 증류수에 잘 희석되므로 용매 대조군 설정은 하지 않았다.

④ 용매의 선택과 시험물질 조제

공시약제 조제 시 용매의 선택은 공시 시험물질이 액상으로 증류수에 잘 희석되므로 증류수를 용매로 선정하였고 소정의 약량을 50ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 희석시켜 조제하였다.

⑤ 처리 액량 설정

처리 액량은 체중 kg당 10ml로 설정하였다.

(다) 어독성시험

① 시험약제의 조제

시험물질 1,000g을 정확히 평량하여 100ml의 volumetric flask에 넣고 시험요수를 가하여 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시켜 시험물질용액(stock solution, 10,000 mg/L)을 조제한 후 1.000, 1.400, 1.960, 2.740 및 3.840ml을 10 L의 시험용수에 넣고 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시킨 후 시험용액(test solution)으로 사용하였다.

② 시험농도

본 시험에 앞서 96시간동안 실시한 예비시험결과 LC50(48hr)값이 1.00 ~ 3.84mg/L

범위내에 있을 것으로 추정되어 1.00, 1.40, 1.96, 2.74, 3.84mg/L (공비 1.4)의 설정농도(nominal concentration)로 하여 시험을 실시하였다.

③ 대조군의 설정

시험용수인 지하수로 음성대조구를 설정하였으며 Pentachlorophenol sodium salt(Fluka, Lot No. 427620/1)를 양성대조물질로 하여 0.20, 0.30, 0.45, 0.68, 및 1.01 mg/L (공비 1.5)의 설정농도(nominal concentration)로 시험을 실시하였다.

(5) 시험물질의 투여

(가) 사료의 절식

급성경구독성시험의 경우 투여개시 4시간 전부터, 시험물질 투여 후 3 ~4시간 후까지 절식시켰으며 급성어독성시험에서는 시험개시 24시간전부터 시험 종료시까지 사료급여를 중단하였다. 급성경피독성시험에서는 투여 경로를 감안하여 따로 절식 시간을 두지 않았다.

(나) 투여경로 및 투여방법

급성경구독성시험의 경우 마우스용 경구투여주사침을 이용하여 체중 측정치를 기준으로 시험물질 조제액량을 산출하여 위내에 1회 강제 경구 투여하였으며 급성경피독성시험에서는 시험물질 처리 전에 공시동물 등부위를 제모기를 이용 5×6cm² 이상의 넓이로 제모한 다음 4×5cm² 면적의 거즈에 조제된 시험물질을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출하여 균일하게 묻힌 다음 제모 부위에 도포한 후 의료용 반창고로 고정 유지시켰다. 어독성시험에서는 12.5L 용량의 원통형 유리수조 (28cm H. × 24cm Ø)에 10L의 시험용액을 투여하였으며, 시험어수는 각각 10마리씩을 반복없이 처리하였다. 노출환경은 사육조건과 동일하게 수온은 21~25℃, 광조건 16시간, 암조건 8시간으로 유지하였다.

(6) 관찰 및 조사항목

(가) 일반중독증상 및 치사동물

급성경구·경피독성의 경우 투여당일은 투여 후 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간의 간격으로 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물 수를 14일간 관찰하였고 어독성의 경우는 모든 시험수조에 대하여 시험직후(2시간), 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 경과시에 일반중독증상, 특이증상 및 치사어 관찰을 실시

하였다. 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

(나) 체중측정

공시된 모든 동물에 대하여 투여 당일 및 투여 후 생존동물에 대하여 7, 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

(다) 시험용수의 수질검사

시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 직후부터 24시간 간격으로 모든 수조에서 pH, DO 및 수온을 조사하였다. pH와 수온은 Sartorius사의 PP-15 pH meter를 사용하였고, DO는 Orion research Incorporated의 810A+ DO meter를 사용하여 측정하였다

(라) LC50산출 및 NOEC

시험물질 투여 후 48 및 96시간의 유효성분에 대한 반수치사농도(LC₅₀) 및 신뢰한계를 probit 분석법(EPA600/4-85/13, 1985)에 의해 산출하였다.

NOEC는 중독증상이없고 치사어가 발생하는않는 최고시험농도로 표시하였다.

(7) 유용곤충 독성 평가

천적 3종과 유용곤충 2종을 선정하였다. 콜레마니진디벌은 엽침적법, 무당벌레는 충체침적, 칠레이리응애는 분무법, 서양뒤영벌과 꿀벌은 충체침적법으로 독성평가를 수행하였다.

7. 야외 실증 시험

가. 야외포장 적용실험

야외포장 적용실험지로 선정된 세 곳의 버즘나무에서 버즘나무방패벌레의 사전밀도를 조사한 후 활성물질을 제형화하여 처리하였다. 약제처 후 3, 6, 9일간격으로 버즘나무방패벌레의 방제효과를 조사하였으며, 시험은 3반복으로 수행하였다. 대조약제는 아세타미드수화제로 하였다. 야외포장에서 실증 시험의 내용은 다음과 같이 진행하였다.

2006년 충북 청원군 문의면 가로수에서 7-8년생 버즘나무에서 버즘나무방패벌레의 사전밀도를 조사한 후 식물추출물 중에서 활성이 있는 BIG06-01, BIG06-04, BIG06-15 물질을 제형화하여 1,000배액으로 처리하였다. 약제처리 후 3, 6, 9일간격으로 버즘나무방패벌레의 방제효과를 조사하였으며, 시험은 3반복으로 수행하였다. 대조약제는 아세타미드수화제로 하였다.

충북대야외포장 적용실험은 2007년 충북 청주시 개신동 충북대학교 인근 가로수에서 버즘나무방패벌레의 사전밀도를 조사한 후 약제를 처리하였다. 신규천연물 중에서 선발한 높은 효과를 보인 한 약제를 선발하여 500ppm의 농도로 적용하였으며 약제처리 후 24시간과 48시간 후에 버즘나무방패벌레의 방제효과를 조사하였다. 대조로는 PVA 0.1%를 비교하여 실험하였으며 3반복으로 수행하였다.

2008년 충북 청원군 진천면 도로의 버즘나무에서 7-8년생 버즘나무에서 버즘나무방패벌레의 사전밀도를 조사한 후 활성물질을 제형화하여 1,000배액으로 처리하였다. 약제처리 후 3, 6, 9일 간격으로 버즘나무방패벌레의 방제효과를 조사하였으며, 시험은 3반복으로 수행하였다. 대조약제는 아세타미드수화제로 하였다.

제 3 절 연구결과

1. 대량사육시스템 확립

버즘나무는 낙엽활엽수로 각종 도시공해에 강하고 공기정화력이 크다고 알려지면서 전국의 가로수나 정원수등으로 많이 식재되어 있다(Woo *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 1993). 버즘나무는 주변에서 쉽게 발견할 수 있고 4월경부터 잎이 나기 시작하여 11월경이면 잎이 떨어지는 활엽낙엽수이다. 하지만 버즘나무방패벌레가 국내 유입 경로가 명확하지 않은 채로 유입된 종으로 1995년도에 최초 확인된 이후 전국적으로 확산되어 발견되고 있다. 이 종은 기온이 상승하는 6월경에 여러 세대의 성충과 약충이 동시에 버즘나무 잎의 뒷면에서 군서생활을 하며 발견되며, 주로 버즘나무의 잎을 먹이로 하지만 때로는 물푸레나무류, 닥나무 등도 가해하는 것으로 알려져 있다.

버즘나무방패벌레를 채집하고 가해습성을 파악하며, 사육을 위하여 온도, 상대습도, 광주조건, 사육용기의 조건을 달리하여 사육에 적합한 환경을 설정하였다.

가. 채집

버즘나무는 도시 주변에 가로수로 식재되어 있기 때문에 쉽게 발견할 수 있고 4월경부터 잎이 나기 시작하여 11월 경이면 잎이 떨어지기 전까지 황갈색으로 변하는 잎을 잘 관찰하면 버즘나무방패벌레가 많이 군서하고 있는 것을 볼 수 있다. 버즘나무는 키가 크고 잎이 손에 닿지 않는 높이에서 자라기 때문에 버즘나무 잎과 버즘나무방패벌레는 길이가 2m인 긴 전정가위를 이용하여 자른 잎에 붙어있는 버즘나무방패벌레를 채집하였다. 채집시 큰 비닐봉지에 잎을 담아서 실험실로 가져온 후 버즘나무 잎과 함께 사육상자에 넣고 사육과 실험을 위한 준비를 하였다.

나. 먹이의 확보

버즘나무방패벌레는 특별한 먹이 공급과 사육기술이 필요하지 않고, 같이 채집한 버즘나무의 잎과 함께 넣어두면 잎을 흡즙하며 사육이 잘 된다. 먹이는 버즘나무방패벌레를 채집하는 방법과 같이 긴 전정가위를 이용하여 잎을 잘라서 준비를 하였다. 특히 겨울철에는 잎이 다 떨어지는 시기이지만 온실에서 소형유리병에 솜으로 고정해서 준비해 두면 겨울동안 버즘나무방패벌레를 키우며 관찰이 가능하다. 따라서 버즘나무의 잎을 잘라서 솜으로 고정한 후 먹이로 공급하였다.

다. 먹이의 공급

버즘나무 잎의 줄기를 잘라 소형 유리병에 물을 반쯤 채우고 자른 버즘나무의 잎의 줄기를 다치지 않도록 면솜으로 부드럽게 감싸고 소형 유리병의 입구에 맞게 끼워 넣고 물을 채운다. 버즘나무 잎은 초겨울까지 잎을 구할 수가 있다. 이렇게 준비된 버즘나무 잎을 사육상자 (34cm x 20cm x 53cm (Length x Width x Height))에 넣고 버즘나무방패벌레를 접종하여 사육을 하였다. 먹이확보가 쉽지 않은 겨울철에는 인공사료 등의 대체먹이를 개발하기 보다는 버즘나무 잎을 많이 준비하여 천연 먹이로 공급하는 것이 가능하다.

라. 사육법

알의 사육은 버즘나무 잎을 소형유리병에 고정한 후 주로 채집된 암수 성충을 1:1로 넣어두면 교미하고 산란한다. 보통 암컷은 알을 72개 정도 낳으며 낳은 알 중에 약 80%가 부화하였다.

약충의 사육은 성충의 사육법과 같다.

성충의 사육은 버즘나무 잎을 먹이의 공급방법과 같이 준비하여 사육상자 (34cm x 20cm x 53cm)에 넣고 버즘나무방패벌레를 접종하여 사육을 하였다. 성충의 수명은 약 38일 정도이며 산란전기는 약 7일, 우화율은 93% 이었다.

마. 사육상자의 청소 및 관리

버즘나무방패벌레를 대량 사육하기 위하여 특별한 주의사항은 요구되지 않았다. 필요시 버즘나무의 잎은 새 잎으로 바꾸어 주었고, 일반적인 사육방법으로 충분히 사육이 가능하므로 다음과 같이 온도, 상대습도, 광조건, 사육용기의 조건을 설정하였다. 따라서 누대사육을 위한 조건도 다음과 같은 실험조건으로 확립하였다.

○ 사육조건

온도: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

상대습도: $50 \pm 10\%$

광주기: 16 : 8 hour (Light : Dark)

사육상자: 34cm X 20cm X 53cm (Length x Width x Height)

먹이공급: 버즘나무 잎을 먹이로 제공, 사육상자에 버즘나무 잎의 줄기를 솜으로 싸서 공급

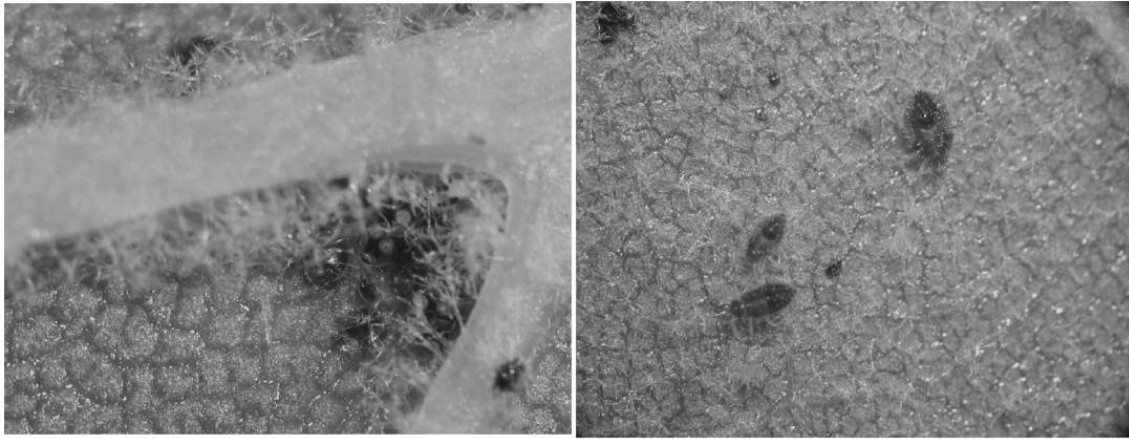
버즘나무방패벌레를 사육하는데 있어서 사육밀도가 높아도 영향을 쉽게 받지 않는 종이였다. 또한 다른 해충처럼 cannibalism 이 나타나지 않으므로 사육하기 쉬운 편이다. 교미와 산란 또한 인위적인 조건에서 잘 이루어지는 편이어서 특별한 관리가 필요하지 않았으며 알려진 천적 등이 없고 실제로 사육하는 동안 발생하지 않았기 때문에 크게 문제시 되지 않는다. 따라서 온습도와 광조건만 잘 유지하면 사육하는데 문제는 없다.

버즘나무방패벌레는 그림 7에서처럼 각각의 발육단계를 형태적으로 쉽게 구별이 가능하다. 알은 잎의 세맥 쪽에 붙여서 무리로 낳고 잘 떨어지지 않게 보호가 된다. 유충과 성충은 버즘나무 잎의 뒷면에서 모여서 흡즙을 하여 피해엽은 황백색으로 변하고 조기낙엽을 하게한다. 노숙약충은 모양과 크기가 성충과 비슷하다. 성충의 몸길이는 약 3.0mm 이며 체색이 흑색이나 날개가 유백색을 띄고 있어 흔히 유백색으로 보인다(Chung *et al.*, 1996). 연중으로 2~3회 이상 발생을 하고 버즘나무에서

는 여러 세대가 공존하므로 여러 태가 같이 발견이 되기도 한다.

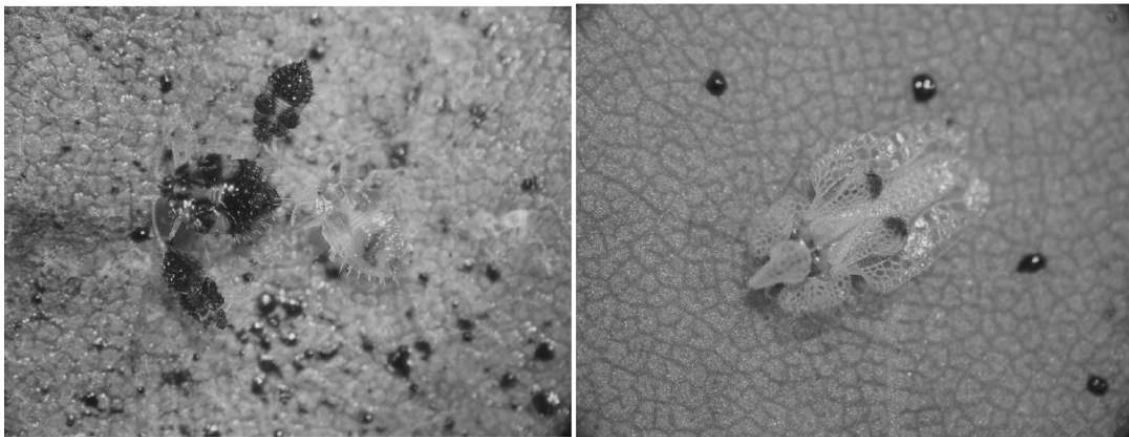
버즘나무방패벌레는 온도별로 사육조건을 달리한 결과에서 발육속도는 Kim *et al.* (1999)과 Park *et al.* (1999)의 결과에서와 같이 알기간과 약충기간이 온도가 높아질수록 짧았으며 버즘나무방패벌레의 발육이 온도조건에 민감함을 알 수 있었다. Kim *et al.* (1999)은 산란전기와 암컷성충의 수명은 온도가 높아질수록 짧아지는 일반적인 경향을 나타내었고 온도간에 유의한 차이를 나타낸 것으로 보고하였다. 하지만 종합적인 실험의 결과에서 버즘나무방패벌레의 발육과 생식은 온도가 중요한 영향을 미치지 않지만, 곤충의 생식과 증식에 적합한 온도범위는 25~28℃인 것으로 보고하였고, 우리나라의 여름철 평균기온이 25℃인 점, 약충의 최적 발육온도가 25℃내외인 점과 비교하여, 본 실험의 결과에서도 실내에서 사육시에는 이 온도가 버즘나무방패벌레의 사육에 적정한 것으로 판단을 하였다. Song *et al.* (1997)은 25℃ 조건에서 성충수명이 40~50일, 암컷 한 마리당 평균 산란수는 85개로 본 실험에서 73개보다는 많았지만 비슷한 경향을 나타내었으며, Battisi *et al.* (1985)은 성충이 우화후 7일이 경과되면 산란이 가능하고 암컷 한 마리당 평균 100개 이상 산란한다고 보고하였는데 이는 환경에 따라서 산란수가 차이가 있을 것으로 보이나 사육에 있어서는 큰 문제가 없어 보인다.

따라서 사육에 있어서 다른 습도나 광조건, 사육공간은 크게 문제시 되지 않았으며 먹이만 공급이 되면 잘 자라는 경향을 보였다. 따라서 위와 같이 사육조건을 정하여 대량사육시스템을 확립하고 추후 실험을 진행하였다.



Eggs

1~3rd instars



4~5th instars

Adult

그림 7. 각 발육단계별 버즘나무방패벌레의 사진

2. 살충활성 식물추출물 선발

가. 살충활성 식물추출물 스크리닝

2006년도에 버즘나무방패벌레 성충에 대하여 확보한 33개의 시료를 살충활성을 검정한 결과, 멸구슬나무, 고삼, 제충국에서 추출한 5개 시료에서 80%이상의 높은 살충활성을 보였으며 다른 시료에서는 50%이하의 낮은 살충활성을 나타내었다(표 6). 따라서 선발된 5개의 시료에 대해 농도별, 용매 분획층별 살충활성을 살펴보았다.

표 6. 버즘나무방패벌레 성충에 대한 살충 활성 검정 결과

시료번호	사충율(%)	시료번호	사충율(%)
BIG06-01	100	BIG06-18	0
BIG06-02	83.3	BIG06-19	33.3
BIG06-03	90	BIG06-20	16.7
BIG06-04	100	BIG06-21	6.7
BIG06-05	13.3	BIG06-22	23.3
BIG06-06	23.3	BIG06-23	33.3
BIG06-07	40.0	BIG06-24	0
BIG06-08	6.7	BIG06-25	16.7
BIG06-09	16.7	BIG06-26	0
BIG06-10	0	BIG06-27	6.7
BIG06-11	13.3	BIG06-28	40.0
BIG06-12	16.7	BIG06-29	0
BIG06-13	23.3	BIG06-30	0
BIG06-14	13.3	BIG06-31	16.7
BIG06-15	100	BIG06-32	6.7
BIG06-16	16.7	BIG06-33	23.3
BIG06-17	46.7		

나. 농도별 시험

살충활성검정에서 선발된 5개 시료(BIG06-01, BIG06-02, BIG06-03, BIG06-04, BIG06-15)를 다양한 농도별(500ppm, 100ppm, 50ppm, 10ppm)로 살충활성을 검정하였다(표 7). 그 결과, 제충국을 초임계추출한 시료인 BIG06-04가 10ppm에서 높은 활성을 보였으며 그 다음으로 해외에서 수집한 고삼추출물(BIG06-15)이 활성이 높은 것으로 나타났다. 시료 BIG06-02와 BIG06-03은 10ppm에서 살충율을 보이지 않으므로 제외하였고, BIG06-04의 제충국은 pyrethrins이라는 살충물질이 알려져 있으나 BIG06-01과 BIG06-15는 살충활성물질이 확인되지 않아 다음단계로 용매를 단계적으로 분획하여 살충활성을 검정하였다.

표 7. 약량에 따른 살충 활성 검정 결과

시료번호	농도별 사충율(%)			
	500ppm	100ppm	50ppm	10ppm
BIG06-01	100	93.3	73.3	33.3
BIG06-02	46.7	6.7	0	0
BIG06-03	100	67.7	16.7	0
BIG06-04	100	100	100	76.7
BIG06-15	100	83.3	80	66.7

다. 신규천연물의 살충율 조사

1차년도에 이어서 2차년도에서도 살충활성물질로 알려진 식물추출물을 국외에서 확보하였고 24가지를 수집하여 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성물질 선별 연구를 계속 수행하였으며 이들 수집된 시료의 목록은 표 2와 같다. 신규천연물질 중에서 1차에서 높은 살충활성을 나타낸 15종에 대하여 대상농도를 10, 100, 1000ppm으로 처리하여 살충효과를 검정한 결과 표 8와 같다.

표 8. 버즘나무방패벌레에 대한 신규천연물질의 살충효과검정

Natural compound	Conc. (ppm)	n	Mortality (%)	
			24 h after treatment	48 h after treatment
D0055	100	73	15.9±16.7	27.1±27.5
	10	74	3.1±5.0	24.2±14.1
D0082	1,000	63	8.6±10.4	31.3±14.0
D0097	1,000	70	64.3±36.0	83.1±22.7
D0104	1,000	70	9.8±9.2	28.1±19.7
D0107	1,000	80	0.0±0.0	29.1±36.0
D0108	1,000	77	15.8±31.7	23.9±38.9
D0110	1,000	68	9.6±10.7	30.8±14.3
D0116	1,000	67	3.5±5.5	22.9±20.5
D0127	1,000	68	26.3±26.5	45.6±33.2
D0128	1,000	75	2.8±4.3	20.0±21.1
D0129	1,000	79	9.0±5.2	40.8±18.8
D0130	1,000	61	85.0±27.4	93.3±12.1
D0132	100	71	3.0±4.7	47.4±25.2
	10	65	5.6±6.3	17.5±11.5
D0133	100	66	5.3±6.0	8.9±5.9
D0134	100	71	47.2±43.1	85.7±23.5
Control	-	87	4.3±5.4	14.2±14.9

라. 신규천연물질의 선발과 농도별 살충율 비교

표 9은 신규천연물 중에서 D0097, D0130과 D0134가 80%이상의 살충율을 보임에 따라, 이 3종을 선택하여 10과 100ppm의 낮은 농도에서도 높은 살충율을 보이는지 실험하였다.

표 9. 신규천연물질 중 선별된 약제의 농도별 살충효과검정

Natural compound	Conc. (ppm)	n	Mortality	
			24 h	48 h
D0097	1,000	70	64.3±36.0	83.1±22.7
	100	47	21.6±23.5	32.4±16.5
	10	46	5.1±5.0	39.6±42.4
D0130	1,000	61	85.0±27.4	93.3±12.1
	100	35	26.3±30.7	88.8±1.3
	10	38	3.3±5.8	22.2±6.9
D0134	1,000	71	47.2±43.1	85.7±23.5
	100	47	21.9±33.4	49.8±34.9
	10	37	0.0±0.0	40.1±44.3
Control	-	30	3.3±5.8	3.3±5.8

이상의 결과에서 D0097과 D0134는 10과 100ppm에서는 낮은 살충율을 나타내었다. 하지만 D0130은 100ppm의 농도에서 48시간에서 88.8%의 살충율을 보임에 따라서 D0130은 야외포장 적용실험의 약제로 적합하다 판별하여 야외포장에 적용하여 추후 실험하였다.

마. 식물정유와 Terpene의 혼증독성 조사

(1) 식물정유의 혼증독성

시중에 상용화된 64종의 식물정유를 이용하여 버즘나무방패벌레 성충에 대한 혼증독성을 실내에서 수행한 결과 표 10와 같다. 각 정유에 대한 혼증활성은 확연한 차이를 나타내었는데, 5µl/1L의 처리에서 100%의 혼증활성을 나타낸 Basil 등 23종을 선발하였다.

100% 혼증활성을 보여 선발된 23종의 식물정유를 농도를 낮추어 2.5µl/1L로 처리하였을 때에는 Manuka가 93.3%로 가장 높았고, 그 다음으로 Mentha avensis

86.7%를 나타내었다. 그 외는 효과가 낮거나 거의 없었다 (표 11).

표 10. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 식물정유 5 μ l처리에 의한 혼증시험결과

Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)	Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)
1 Angelica root	5	44.4	33 Lime	5	66.7
2 Anise	5	42.9	34 Litsea cubeba	5	66.7
3 Basil	5	100.0	35 Majoram	5	100.0
4 Bergamot	5	87.5	36 Manuka	5	100.0
5 Black pepper	5	100.0	37 Mentha avensis	5	100.0
6 Cadamone	5	33.3	38 Muguet flower	5	44.4
7 Caraway	5	100.0	39 Mustard	5	55.6
8 Cedar	5	44.4	40 Myrrh	5	87.5
9 Cedarwood	5	57.1	41 Neem	5	50.0
10 Chamomile (Rose)	5	62.5	42 Orange	5	100.0
11 Chamomile (Germon)	5	100.0	43 Patchouli	5	90.0
12 Cinamone	5	100.0	44 Peach lover	5	27.3
13 Cinamone bark	5	80.0	45 Peanut	5	25.0
14 Citronella	5	100.0	46 Pennyroyal	5	100.0
15 Clary sage	5	81.8	47 Peppermint	5	100.0
16 Clary sage	5	11.1	48 Petitgrain	5	100.0
17 Clove (leaf)	5	87.5	49 Pine needle	5	66.7
18 Clove (bud)	5	100.0	50 Rosemary	5	93.3
19 Coriander	5	100.0	51 Sage	5	100.0
20 Eucalyptus	5	100.0	52 Sandalwood	5	7.7
21 Eucalyptus camaldulensis	5	100.0	53 Spearmint	5	100.0
22 Fennel	5	83.3	54 Strawberry	5	45.5
23 Garlic	5	27.3	55 Sweet orange	5	54.5
24 Geranium	5	100.0	56 Tea tree	5	100.0
25 Gingembre	5	90.9	57 Thyme	5	44.4
26 Ginger	5	75.0	58 Thyme red	5	9.1
27 Grapefruit	5	87.5	59 Thyme white	5	100.0
28 Hyssop	5	90.9	60 Ylangylang	5	85.7
29 Junifer berry	5	70.0	61 Ylangylang II	5	0.0
30 Lavender	5	90.0	62 Grapefruit(Euro)	5	64.2
31 Lemon	5	50.0	63 Caomile	5	0.0
32 Lemon grass	5	36.4	64 Onion	5	100.0

표 11. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 식물정유 2.5 μ l처리에 의한 혼증시험결과

Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)	Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)
3 Basil	2.5	10.4	28 Hyssop	2.5	14.4
4 Bergamot	2.5	3.3	30 Lavender	2.5	20.0
5 Black pepper	2.5	10.2	35 Majoram	2.5	53.3
7 Caraway	2.5	6.1	36 Manuka	2.5	93.3
11 Chamomile (Germon)	2.5	8.3	37 Mentha avensis	2.5	86.7
12 Cinamone	2.5	0.0	40 Myrrh	2.5	3.3
13 Cinamone bark	2.5	43.5	42 Orange	2.5	0.0
14 Citronella	2.5	0.0	43 Patchouli	2.5	0.0
15 Clary sage	2.5	13.5	46 Pennyroyal	2.5	16.4
17 Clove (leaf)	2.5	13.8	47 Peppermint	2.5	0.0
18 Clove (bud)	2.5	13.0	48 Petitgrain	2.5	57.6
19 Coriander	2.5	0.0	50 Rosemary	2.5	5.1
20 Eucalyptus	2.5	2.4	51 Sage	2.5	7.5
21 Eucalyptus camaldulensis	2.5	6.7	53 Spearmint	2.5	17.0
22 Fennel	2.5	0.0	56 Tea tree	2.5	0.0
24 Geranium	2.5	6.4	59 Thyme white	2.5	0.0
25 Gingembre	2.5	0.0	60 Ylangylang	2.5	8.8
27 Grapefruit	2.5	0.0	64 Onion	2.5	21.4

그리고 1 μ l/1 L 처리에서는 실험한 식물정유 모두 효과가 거의 없었다(표 12). 따라서 5 μ l/L와 2.5 μ l/L의 수준으로 혼증처리를 해야 효과가 있을 것으로 판단된다.

표 12. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 식물정유 1 μ l처리에 의한 혼증시험결과

Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)	Essential oil	Dose (μ l/L)	Mortality (%)
3 Basil	1	0.0	28 Hyssop	1	0.0
4 Bergamot	1	0.0	30 Lavender	1	0.0
5 Black pepper	1	0.0	35 Majoram	1	0.0
7 Caraway	1	0.0	36 Manuka	1	43.9
11 Chamomile (Germon)	1	0.0	37 Mentha avensis	1	13.3
12 Cinamone	1	0.0	40 Myrrh	1	0.0
13 Cinamone bark	1	0.0	42 Orange	1	0.0
14 Citronella	1	0.0	43 Patchouli	1	0.0
15 Clary sage	1	0.0	46 Pennyroyal	1	0.0
17 Clove (leaf)	1	0.0	47 Peppermint	1	50.0
18 Clove (bud)	1	0.0	48 Petitgrain	1	0.0
19 Coriander	1	0.0	50 Rosemary	1	0.0
20 Eucalyptus	1	0.0	51 Sage	1	0.0
21 Eucalyptus camaldulensis	1	0.0	53 Spearmint	1	0.0
22 Fennel	1	0.0	56 Tea tree	1	10.0
24 Geranium	1	10.0	59 Thyme white	1	0.0
25 Gingembre	1	0.0	60 Ylangylang	1	0.0
27 Grapefruit	1	0.0	64 Onion	1	25.0

구미나 일본 등의 선진국에서는 오래전부터 인축 및 환경에 부작용이 적은 천연 물로부터 살충 성분의 탐색과 개발에 주력하였다. 최근에는 인도와 터키 및 자생식물이 많은 나라들에서도 많은 연구 보고가 되었을 뿐 아니라, 식물로부터 추출한 식물정유를 실용화하고 다양한 기능에 초점을 맞추고 있다(Miyakado, 1986; Arnason *et al.*, 1989). 식물정유의 성분중에는 제충국의 pyrethroid와 같이 천연물 유래의 살충 성분을 모핵 화합물로 이용하여 아미노산계, 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 등의 살충제로 개발되어 농업 및 위생 해충의 방제에 이용되고 있으며, 오늘날도 꾸준히 저독성 살충제의 개발에 주력하고 있다.

이와 같이 생물농약으로서 생리활성천연물의 화학구조로부터 신약개발에 중요한 역할을 하고 있으며, 보다 중요하게 천연물의 생합성, 대사 작용기작의 구명을 통한 생명현상에 대한 이해를 깊게 함으로써 생물 생산성이라는 측면에서 폭넓고 새로운 기술의 개발로 이어진다는 점에서 연구의 가치가 있다고 하겠다. 또한 호르몬류의 생합성·대사 등에 관한 연구결과, 이들에 대한 특이적인 저해제를 외인성의 화합물에서 찾는 것도 새로운 모핵 신물질 발견하는 기회를 높이는 것이며 작용기작

의 구멍은 분자적 수준의 재설계로 신약 창출의 확률을 증가시킬 것이다. 따라서 식물정유를 식물로부터 추출하고 기술을 개발하며 새로운 물질의 산업화의 기반을 다지는 것이 중요하다.

식물정유는 식물이 만드는 2차 대사산물로서 자연적으로 발생하는 1000개 이상의 친유성 화학물질인 monoterpene이 고등식물로부터 분리 되고(Charlwood, 1991; Rice and Coats, 1994), 이들은 음식의 향신료, 향수, 진통제, 방부제로 오래 전부터 사용되어 왔기 때문에 인간과 환경에 안전하다고 알려져 있으며 (Templeton, 1969), 이 물질들은 생물 개체내의 작용물질인 호르몬, 타종생물 간에 작용하는 타감물질, 독소, 곤충 기피물질, 유인물질 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있다. Kim *et al.* (2006)은 털두꺼비하늘소에 대한 식물정유의 혼증효과를 확인하였다. Yu *et al.* (2005)는 점박이응애에 대한 caraway oil의 기피활성을 보고하였다. Kong *et al.*(2006)은 식물정유의 소나무재선충에 대한 살선충효과에 대한 결과를 발표하기도 하였다. Yi *et al.* (2007)는 식물정유성분에 의한 배추좀나방과 배추나비고치벌에 대한 혼증효과에 대한 결과를 발표한 바 있다.

하지만 지금까지 많은 식물로부터 식물정유를 추출하고 그 연구결과가 많은 논문에서 발표되었지만 이를 산업화하는 측면에서는 연구가 잘 이루어지지 않은 것도 사실이다. 식물정유는 대개 휘발성 물질에서 살충활성이 높게 나타났는데 제제화의 과정을 통해서 많은 약효가 사라지고 효과가 떨어지기도 하며 살충활성이 높은 물질을 분리 정제하여 가공하여 산업화까지 여러 과정을 거쳐야 하고 추출기술과 더불어 제제기술을 개발하는 것이 쉽지 않기 때문이다. 따라서 많은 제품화한 식물정유의 대부분은 아로마향으로 첨가를 하는 방향제, 향신료 등으로 많이 개발이 되어졌고, 농업적 이용에서는 시설재배단지에서 화훼나 채소의 미소해충의 기피제로서 개발이 되고 있으며 야외나 포장에서는 트랩에 병행하여 유인제로서 개발이 점차 이루어지고 있다. 아직까지는 농업적 이용에 있어서 식물정유의 약효가 떨어질 수 있기에 다른 성분들과 조합으로 기능을 높여서 사용을 하는 쪽으로 개발을 진행해야 할 것이다.

(2) 식물정유 성분인 monoterpene의 혼증독성

식물정유의 주요성분으로 알려진 terpene을 구입하여 혼증독성을 조사한 결과 표 13와 같다. 77종의 terpene 중에서 (R)-(+)–Pulegone을 포함한 31종이 100%의 살충활성을 보였으며 80%이상의 살충활성을 보인 terpene도 (-)-Carveol을 포함하여 16종이나 되었다.

표 13. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 terpene 5 μ l 처리에 의한 혼증효과시험 결과

Terpene	Dose (μ l/L)	Mortality (%)	Terpene	Dose (μ l/L)	Mortality (%)
1 (R)-(+)-Camphor	5	57.1	40 Fenchone	5	91.7
2 (R)-(+)-Limonene	5	27.3	41 Geraniol	5	44.4
3 (R)-(+)-Pulegone	5	100.0	42 Geranyl acetate	5	80.0
4 (S)-(-)-Perillyl alcohol	5	66.7	43 Germacrone	5	42.9
5 (-)-Bornyl acetate	5	100.0	44 Cinnamalde	5	100.0
6 (-)-Carveol	5	87.5	45 Hexanoic acid	5	40.0
7 (-)-trans-caryophyllene	5	33.3	46 Isopropyl isothiocyanate	5	100.0
8 (-)- β -pinene	5	72.7	47 trans-2,4,5-Trimethoxypropenylbenzene	5	7.7
9 (+)-Limonene	5	87.5	48 Linalool	5	100.0
10 (R)-(-)-Carvone	5	90.0	49 Linalyl acetate	5	80.0
11 (+/-)-Chmpnene	5	60.0	50 Menthol	5	10.0
12 (+/-)-Terpinenol	5	100.0	51 (-)-menthone	5	100.0
13 (\pm)- α -Terpinyl acetate	5	100.0	52 cis-2,4,5-Trimethoxypropenylbenzene	5	55.6
14 (s)-(-)-Perillaldehyde	5	88.9	53 Myrcene	5	33.3
15 (S)-(+)-Carvone	5	100.0	54 N,N-Diethyl-M-Toluamide	5	100.0
16 d-cis/trans Allethrin	5	90.0	55 (1s)-(-)- α -Pinene	5	14.3
17 1,4-cineole	5	100.0	56 Ocimene	5	41.7
18 1,8-cineole	5	100.0	57 trans-Cinnamic acid	5	22.2
19 1-nonanol	5	44.4	58 (1s)-(-)- β -Pinene	5	100.0
20 Isosafrole	5	100.0	59 R-(-)- α -phellandrene	5	87.5
21 3-Octanol	5	85.7	60 Safrole	5	100.0
22 Borneol	5	85.7	61 Salicylaldehyde	5	100.0
23 Camphene	5	25.0	62 Terpinolene	5	100.0
24 Camphor	5	12.5	63 Thujone	5	100.0
25 Carvacrol	5	80.0	64 Thymol	5	40.0
26 Carvone	5	100.0	65 Trans-cinnamaldehyde	5	100.0
27 Caryophyllene oxide	5	22.2	66 Tropolone	5	22.2
28 cineole	5	100.0	67 Valeric acid	5	50.0
29 Cinnamic aldehyde	5	100.0	68 Vanillin	5	14.3
30 Citral	5	87.5	69 α -ionone	5	14.3
31 Citronellal	5	100.0	70 α -pinene	5	90.0
32 Citronellic acid	5	0.0	71 α -terpinene	5	100.0
33 Citronellol	5	11.1	72 α -terpineol	5	14.3
34 Citronelly acetate	5	100.0	73 β -myrcene	5	100.0
35 Cinnamyl alcohol	5	44.4	74 2-methyl-3-heptanone	5	100.0
36 Cyclohexanone	5	100.0	75 γ -terpinene	5	88.9
37 Diethyl phthalate	5	22.2	76 p -cymene	5	100.0
38 4-Allylanisole (Estragole)	5	88.9	77 Benzyl isothiocyanate	5	100.0
39 Eugenol	5	100.0			

5ul/L에서 혼증독성을 보인 42개의 terpene을 선발하여 다시 2.5ul/L로 2차 혼증독성을 통해 선발하고자 실시한 결과 표 14과 같다.

표 14. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 terpene 2.5ul 처리에 의한 혼증효과시험 결과

Monoterpenoid	Dose (ul/L)	Mortality (%)	Monoterpenoid	Dose (ul/L)	Mortality (%)
3 (R)-(+)-Pulegone	2.5	36.4	36 Cyclohexanone (Junsei)	2.5	0.0
5 (-)-Bornyl acetate	2.5	33.9	38 4-Ally lanisole (Estragole)	2.5	0.0
6 (-)-Carveol	2.5	30.0	39 Eugenol	2.5	0.0
9 (+)-Limonene	2.5	6.4	40 Fenchone	2.5	0.0
10 (R)-(-)-Carvone	2.5	25.6	42 Geranyl acetate	2.5	13.6
12 (+/-)-Terpinenol	2.5	22.2	48 Linalool	2.5	0.0
13 (±)-α-Terpinyl acetate	2.5	0.0	49 Linalyl acetate	2.5	0.0
14 (s)-(-)-Perillaldehyde	2.5	6.7	51 (-)-menthone	2.5	18.3
15 (S)-(+)-Carvone	2.5	15.0	54 N,N-Diethyl-M-Toluamide	2.5	0.0
16 d-cis/trans Allethrin	2.5	29.2	58 (1s)-(-)-β-Pinene	2.5	0.0
17 1,4-cineole	2.5	17.0	59 R-(-)-α-phellandrene	2.5	13.9
18 1,8-cineole	2.5	21.8	62 Terpinolene	2.5	0.0
21 3-Octanol	2.5	14.2	63 Thujone	2.5	5.1
22 Borneol	2.5	0.0	65 Trans-cinnamaldehyde	2.5	30.6
25 Carvacrol	2.5	15.8	70 α-pinene	2.5	0.0
26 Carvone	2.5	0.0	71 α-terpinene	2.5	0.0
28 cineole	2.5	16.4	73 β-myrcene	2.5	3.7
29 Cinnamic aldehyde	2.5	14.4	74 2-methyl-3-heptanone	2.5	0.0
30 Citral	2.5	0.0	75 γ-terpinene	2.5	0.0
31 Citronellal	2.5	0.0	76 p-cymene	2.5	0.0
34 Citronelly acetate	2.5	0.0	77 Benzyl isothiocyanate	2.5	0.0

42종의 terpene을 1ul/L의 농도로 혼증독성을 실험한 결과 표 15와 같다. Terpene은 식물정유보다 효과가 떨어지며 혼증독성을 보려면 5ul/L의 농도로 처리를 해야 살충효과가 높게 나타남을 알 수 있었다.

표 15. 버즘나무방패벌레 성충에 대해 terpene 1ul 처리에 의한 혼증효과시험 결과

Terpene	Dose (ul/L)	Mortality (%)	Terpene	Dose (ul/L)	Mortality (%)
3 (R)-(+)-Pulegone	1	0.0	36 Cyclohexanone (Junsei)	1	0.0
5 (-)-Bornyl acetate	1	0.0	38 4-Ally lanisole (Estragole)	1	0.0
6 (-)-Carveol	1	0.0	39 Eugenol	1	12.5
9 (+)-Limonene	1	0.0	40 Fenchone	1	0.0
10 (R)-(-)-Carvone	1	11.1	42 Geranyl acetate	1	0.0
12 (+/-)-Terpinenol	1	7.1	48 Linalool	1	0.0
13 (±)-α-Terpinyl acetate	1	0.0	49 Linalyl acetate	1	0.0
14 (s)-(-)-Perillaldehyde	1	0.0	51 (-)-menthone	1	16.7
15 (S)-(+)-Carvone	1	0.0	54 N,N-Diethyl-M-Toluamide	1	0.0
16 d-cis/trans Allethrin	1	23.1	58 (1s)-(-)-β-Pinene	1	0.0
17 1,4-cineole	1	12.5	59 R-(-)-α-phellandrene	1	0.0
18 1,8-cineole	1	0.0	62 Terpinolene	1	0.0
21 3-Octanol	1	33.3	63 Thujone	1	0.0
22 Borneol	1	0.0	65 Trans-cinnamaldehyde	1	0.0
25 Carvacrol	1	0.0	70 α-pinene	1	0.0
26 Carvone	1	0.0	71 α-terpinene	1	0.0
28 cineole	1	22.2	73 β-myrcene	1	0.0
29 Cinnamic aldehyde	1	0.0	74 2-methyl-3-heptanone	1	0.0
30 Citral	1	0.0	75 γ-terpinene	1	14.3
31 Citronellal	1	20.0	76 ρ-cymene	1	0.0
34 Citronelly acetate	1	0.0	77 Benzyl isothiocyanate	1	-

현재까지 보고된 많은 논문에서 monoterpeneoid에 대한 혼증독성이나 기주유인성 및 기주에 대한 산란기피 등이 보고되어 있다. Terpene류를 이용한 방제제 연구는 제한된 공간에서 서식하는 저숙해충을 대상으로 주로 수행되어 왔다. (Rice and Coats, 1994; Byers *et al.*, 2000; Tiberi *et al.*, 1999). Rice and Coats(1994)는 pulegone, fenchone 등의 monoterpene이 거릿쌀도둑거저리에 대해 우수한 혼증효과를 있음을 보고하였고, Byers *et al.* (2000)는 verbenone이 소나무의 나무좀(*Pityogenes bidentatus*)에 대해 기주유인성이 있음을 확인했다. Tiberi *et al.* (1999)은 limonene이 나비목곤충의 일종인 *Thumetopoea pityocampa*에 대해서 산란을 저해한다고 보고하였다. Yoo *et al.* (2002)은 털두꺼비하늘소 성충에 대해서 25종의 monoterpene 중 geraniol이 산란기피 효과가 가장 높았으나 잔효성이 없음을 보고하였다. Traboulsi *et al.* (2002)은 *Cx. pipiens molestus* 유충을 이용한 실험에서 carvacrol, α -pinene, thymol이 우수한 살충효과를 나타내며 대조적으로 linalool, 1,8-cineole, terpineol이 낮은 효과를 보인다고 하였다. 또한 Chantraine *et al.* (1998)은 *Ae. aegypti* 유충에 대해서 anethole, (+)-limonene이 살충효과가 우수하며 α -pinene, linalool, 1,8-cineole은 효과가 낮았다고 보고하였다.

많은 terpene들은 식물정유와 마찬가지로 그 살충활성이 해충마다 다르게 나타나게 되는데 이는 종간에 갖는 개체의 특성으로 보여진다. 이는 살충제가 갖는 개체특성과도 같은 경향을 나타내는 것으로 terpene을 이용하여 특정 대상해충을 방제하는 것이 가능하다는 것을 보여주는 것이기도 하다. 본 실험에서도 pulgone, geraniol, thymol등은 버즘나무방패벌레에 그 효과가 낮게 나타나 다른 결과를 보여주었지만 limonene, 1,8-cineole, terpineol등은 효과가 높게 나타나 실험과 대상해충에 따라 다르게 나타나는 결과를 보여주었다.

이와 같이 식물정유는 해충에 대해 독성을 나타내지만, 포유동물에 대해 급성독성이 없고, 음식조미료, 향료, 소염제, 외용의 진통제(external analgesic)와 방부제로 사용이 된다(Templeton, 1969). 실례로 대표적인 terpene인 limonene은 개나 고양이에 대한 고양이벼룩(*Ctenocephalides felis*)의 방제약제로 EPA(Environmental Protection Agency)에 등록되었으며, 바구미에 대해 독성을 나타낸다고 보고되었다(Taylor and Viekerly, 1974; Collart and Hink, 1986; Hink and Fee, 1986). 따라서 식물정유와 같이 개별적인 개발을 통해 산업화가 이루어져야 할 것이다.

3. 살충작용기작 구명

식물추출물의 살충작용기작 구명을 위하여 분무처리에서 높은 활성을 나타낸 DO130과 DO134를 포함한 총 11가지 식물추출물에 대해서 버즘나무방패벌레에 대해 침지효과를 검정하였고 그 결과는 표 16과 같다. 신규천연물 중에서 버즘나무방패벌레에 침지효과를 보인 약제는 없었다. 침지효과의 경우 섭식을 통한 소화중독 작용을 살펴보았는데 버즘나무방패벌레는 흡즙을 통해 섭식이 이루어지기 때문에 그 효과가 떨어지는 것으로 사료된다. 즉, 식물추출물의 살충작용기작은 섭식에 의한 소화중독보다는 접촉에 의한 살충활성이 있는 것으로 판단된다.

표 16. 버즘나무방패벌레에 대한 신규천연물의 침지효과

Natural compound	Conc. (ppm)	n	Mortality (%)	
			24 h	48 h
D0130	100	31	0.0±0.0	19.7±10.5
	10	28	0.0±0.0	3.3±5.8
D0134	100	32	24.8±10.0	50.0±13.6
	10	26	0.0±0.0	14.8±15.0
D0153	100	30	13.3±11.5	33.3±5.8
	10	30	0.0±0.0	3.3±5.8
D0154	100	30	9.4±9.1	26.5±3.9
	10	30	0.0±0.0	6.7±5.8
D0155	100	30	0.0±0.0	6.7±11.5
	10	30	0.0±0.0	3.3±5.8
D0158	100	30	0.0±0.0	6.7±5.8
	10	28	0.0±0.0	0.0±0.0
D0159	100	30	0.0±0.0	20.0±10.0
	10	30	0.0±0.0	0.0±0.0
D0160	100	30	0.0±0.0	3.3±5.8
	10	30	0.0±0.0	3.3±5.8
D0162	100	31	0.0±0.0	16.4±11.8
	10	29	0.0±0.0	3.7±6.4
D0163	100	30	0.0±0.0	10.0±10.0
	10	30	0.0±0.0	3.3±5.8
D0164	100	30	3.3±5.8	16.7±11.5
	10	30	0.0±0.0	3.3±5.8
Control	—	32	0.0±0.0	0.0±0.0

4. 살충활성물질의 분리 및 동정

가. 살충활성추출물의 용매 분획층별 살충활성

용매 분획별 살충활성을 검정한 결과, BIG06-01과 BIG06-15 모두 EtOH과 Hexane 용매 분획층에서 살충활성이 높게 나타나는 것으로 조사되었다(표 17). 살충활성을 보이는 물질을 확인하기 위하여 GC와 GC/MS를 이용하여 확인하였다.

표 17. 용매분획별 살충 활성 검정 결과

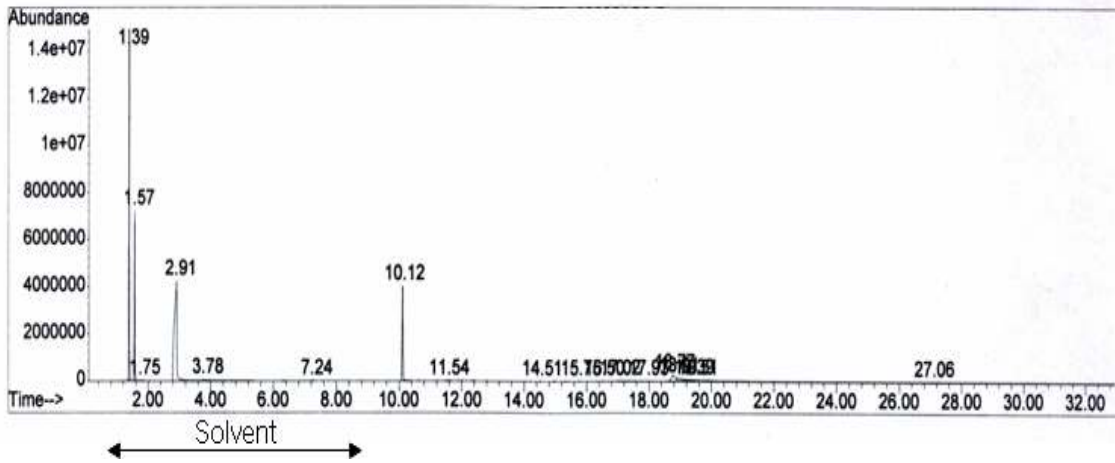
시료번호	농도 (ppm)	용매 분획층별 사충율(%)					
		EtOH	Hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	H ₂ O
BIG06-01	100	86.7	66.7	16.7	23.3	6.7	33.3
BIG06-15	100	76.7	83.3	20.0	33.3	23.3	13.3

나. 물질분석

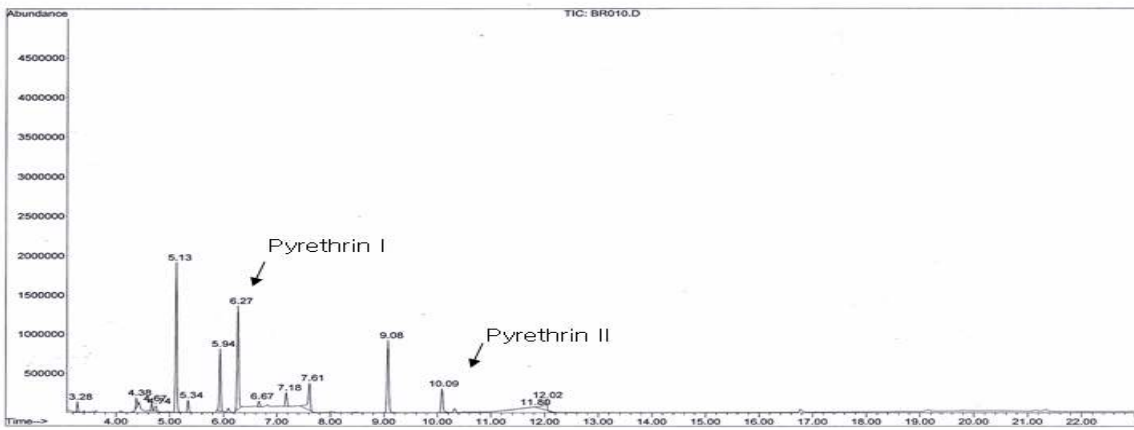
상기 시험에서 낮은 농도에서 살충활성을 보이는 선발된 3개의 시료인 BIG06-01, BIG06-04, BIG06-15의 살충활성물질에 대한 분석을 위하여 시료를 메탄올과 1:1로 혼합하여 잘 섞은 다음 여과하여 GC/MS에 주입하여 peak의 패턴을 분석한 결과, 그림 8과 같이 분석되었으며 이를 바탕으로 살충물질의 구조 동정을 수행하였다.

BIG06-04의 시료에서 GC와 GC/MS의 분석결과 Pyrethrin I과 II의 물질이 함유되어 있는 것으로 나타났고 BIG06-15에서는 Sophordine이라는 물질이 동정되었다. Pyrethrin은 이미 Pyrethroids계 살충제로서 널리 알려져 있고 Sophordine은 한약재로 많이 쓰이는 고삼에서 추출되는 minor 물질로 알려져 있다. BIG06-01은 정확한 물질은 아직 모르지만 살충활성이 다른 물질보다 높아 개발 가능성이 높고 고삼추출물인 sophordine은 아직 살충활성이 보고된 바 없어서 새로운 살충활성을 가진 식물추출물로 개발이 가능할 것이다.

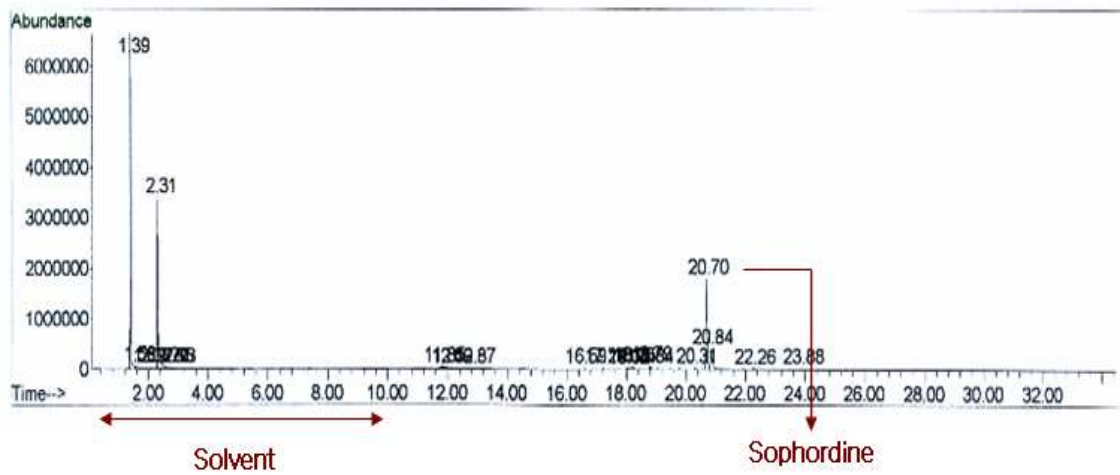
본 연구과제는 버즘나무방패벌레의 유기합성살충제 대체를 위한 친환경적 방제제 개발이 목적이므로 1년차의 실험결과를 기초로 2년차에서는 식물추출물의 우수활성물질을 계속 탐색하고, 선발된 3개의 시료는 제품화를 위한 제제시험과 제제 안정성평가 연구를 수행하였다.



(A)



(B)

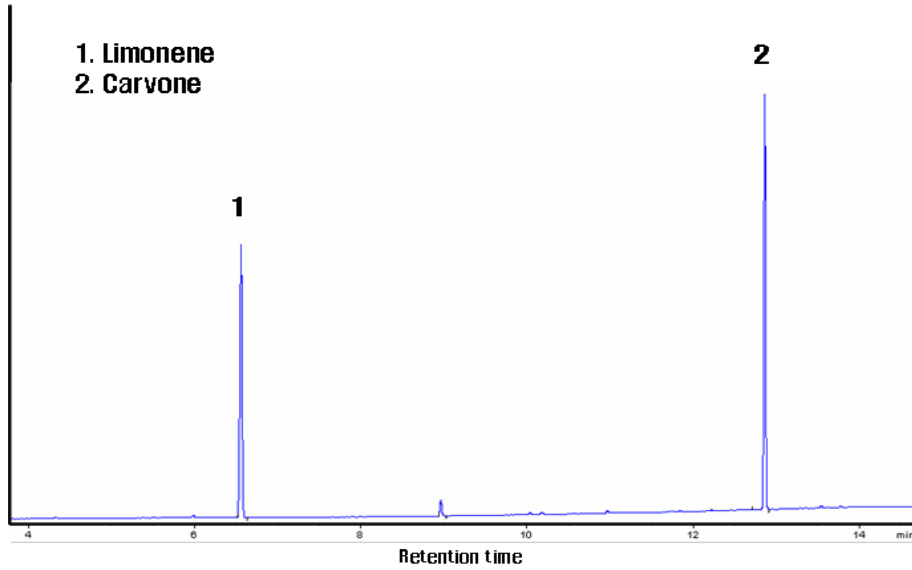


(C)

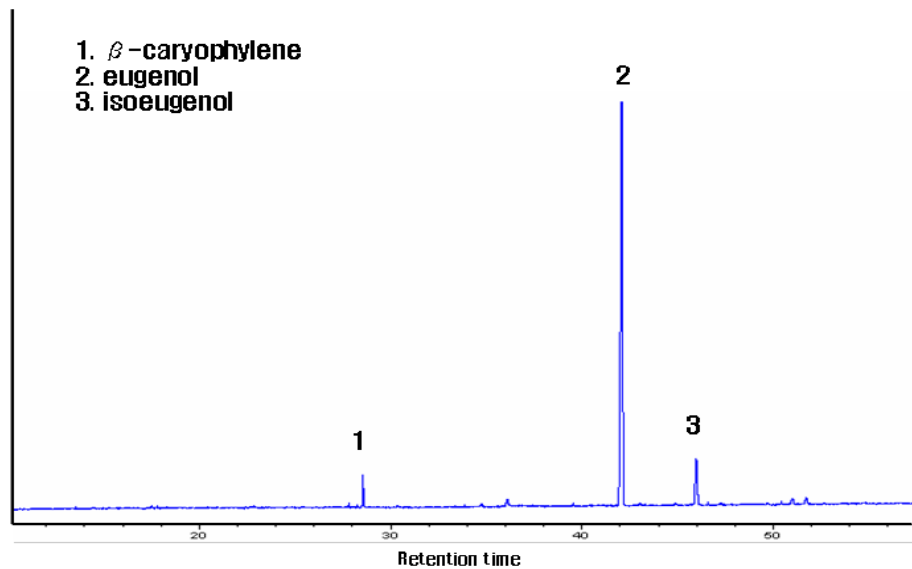
그림 8. 살충활성물질의 GC/MS 분석 결과. (A) : BIG06-1, (B) : BIG06-04, and (C) : BIG06-15.

다. 식물정유의 GC와 GC/MS를 이용한 살충활성성분 분리 및 동정

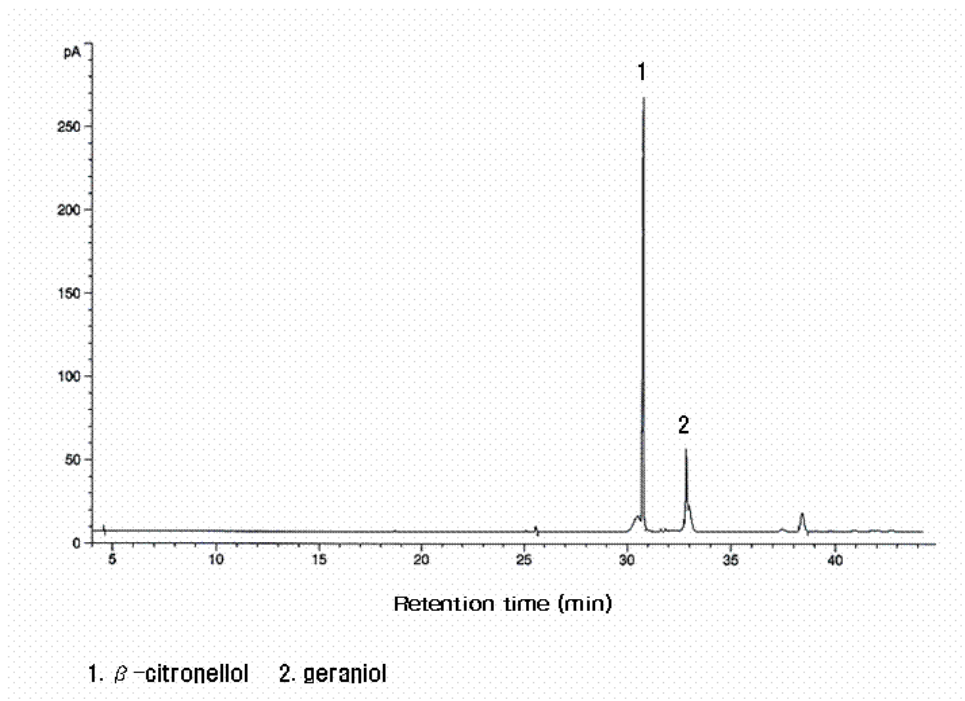
버즘나무방패벌레에 대한 높은 혼중독성을 보였던 식물정유 중에서 Caraway, Clove bud, Citronella, Grapefruit, Orange, Thyme white의 6종을 선별하여 GC 및 GC/MS를 이용하여 그 주요 성분을 분석하였다. 그림 9는 GC로 분석한 6종의 식물정유를 표시한 것이다.



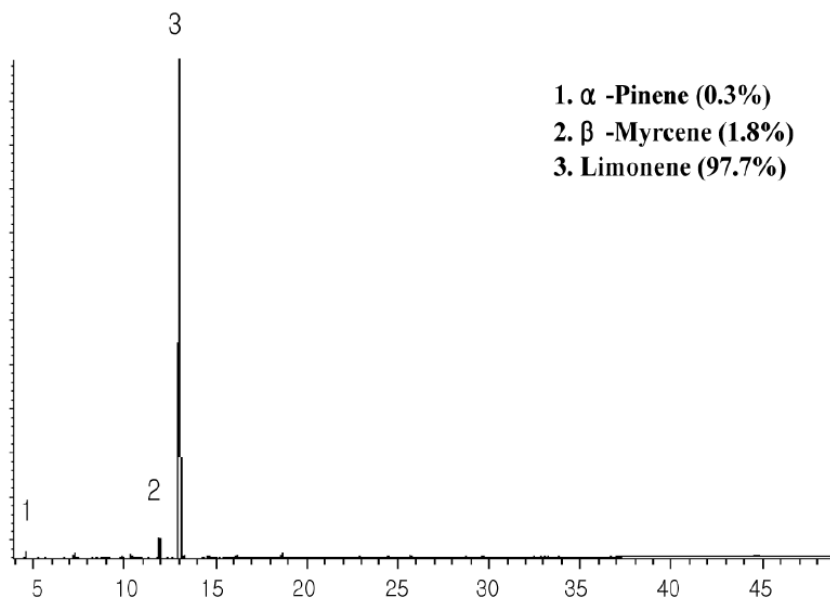
(A) Caraway



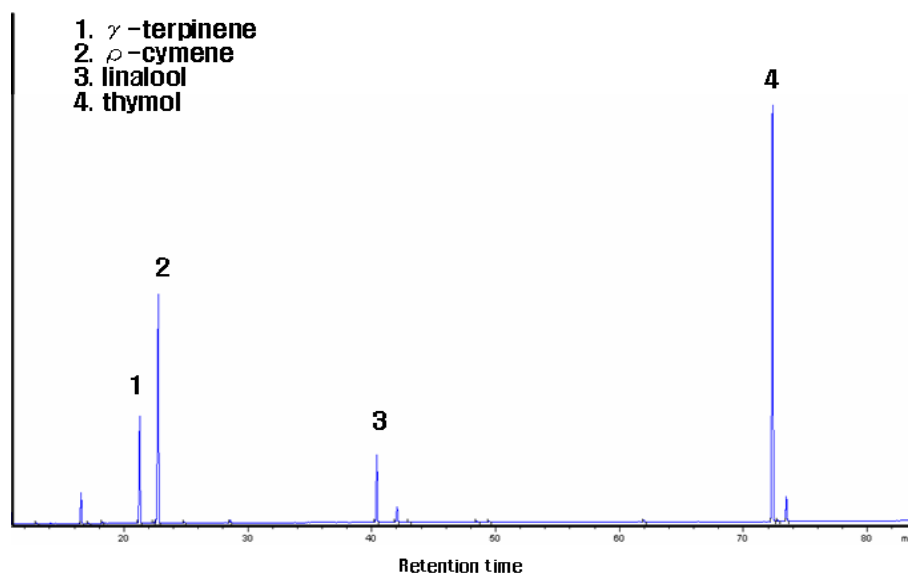
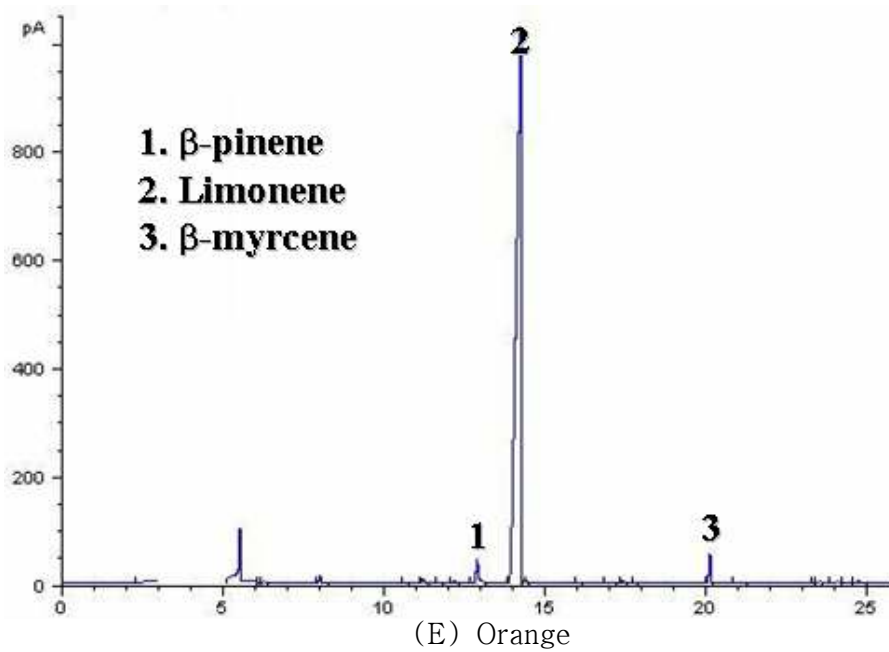
(B) Clove bud



(C) Citronella



(D) Grapefruit oil



(F) thyme white

그림 9. GC를 이용한 식물정유의 주요성분 분석. (A) caraway (B) clove bud (C) citronella (D) grapefruit (E) orange and (F) thyme white. DB-WAX capillary column (I.D. 0.25mm, 30m long, 0.25 μ m film thickness) (Temp., 35 $^{\circ}$ C to 180 $^{\circ}$ C at 4 $^{\circ}$ C/min).

그림 10은 GC/MS로 구조 동정한 한 예로서, GC로 분석한 Caraway oil을 GC/MS를 이용하여 carvone과 limonene으로 동정한 후 나온 그림이다. 다른 식물 정유들도 똑같은 방법으로 동정하였다. 이와 같은 결과로 Caraway는 limonene과 carvone으로 주요성분이 동정되었고, Clove bud는 β -caryophyllene, eugenol과 isoeugenol로 동정되었다. Citronella는 β -citronellol과 geraniol로, Grapefruit는 α -pinene, β -myrcene과 limonene이 동정되었다. Orange는 β -pinene, limonene과 β -myrcene이, thyme white는 γ -terpinene, p -cymene, linalool과 thymol이 동정되었다.

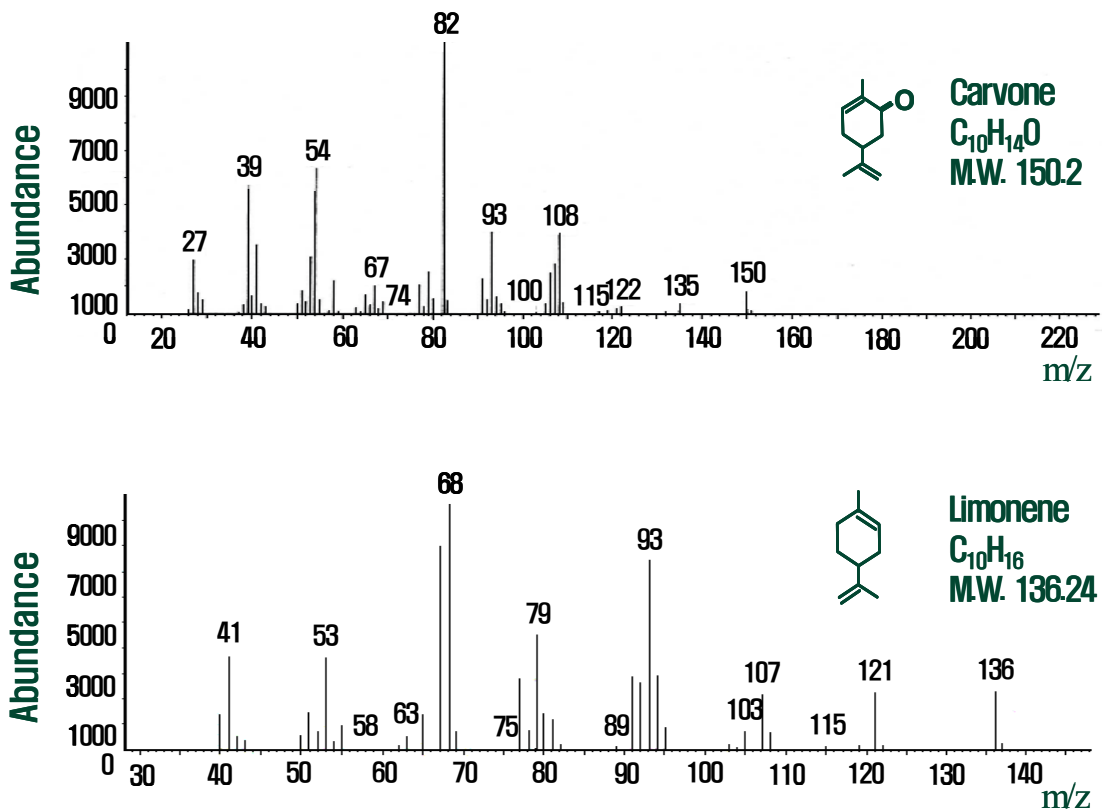


그림 10. Caraway oil로부터 MS를 이용한 limonene과 carvone 분석.

라. 식물정유의 주요 구성성분의 살충활성

그림 10과 같이 동정된 식물정유의 monoterpene 함량에 따라 6종의 식물정유와 그 주요 구성성분을 5 μ L의 양으로 혼증독성을 살펴본 결과 표 18과 같다.

표 18. Monoterpene 처리에 의한 버즘나무방패벌레의 혼증효과시험 결과

Essential oil	Major component	Contents in oils (%)	Dose (μ L)	Mortality (%)
(A) Caraway	limonene	38.1	5	27.3
	carvone	61.9	5	100.0
(B) Clove bud	β -caryophyllene	7.0	5	33.3
	eugenol	80.6	5	100.0
	isoeugenol	11.8	5	90.0
(C) Citronella	β -citronellol	76.1	5	11.1
	geraniol	12.3	5	44.4
(D) Grapefruit	α -pinene	0.3	5	90.0
	β -myrcene	1.8	5	100.0
	limonene	97.7	5	27.3
(E) Orange	β -pinene	3.2	5	72.7
	limonene	91.4	5	27.3
	β -myrcene	5.4	5	100.0
(F) Thyme white	γ -terpinene	6.1	5	88.9
	p -cymene	24.1	5	100.0
	linalool	5.4	5	100.0
	thymol	49.5	5	40.0

Caraway에서는 carvone이, clove bud에서는 eugenol과 isoeugenol, grapefruit에서는 α -pinene과 β -myrcene, orange에서는 β -myrcene, thyme white에서는 γ -terpinene, p -cymene과 linalool이 85%이상의 혼증독성을 나타내었다. 이는 표 17과도 같은 결과이다. Citronella와 같이 식물정유 자체는 100%의 살충활성을 보였으나 주요구성성분인 terpene으로 조사하였을 때는 살충활성을 보이지 않는 경우도 있었다.

마. 식물추출물을 이용한 살충효과 비교

식물로부터 메탄올을 이용하여 직접 추출하여 다른 해충들에 대한 살충활성을 함께 검토한 결과 표 19와 같다. 추출용매로는 메탄올 100%를 사용하였고 추출시 72시간동안 침적시켰다. 이후 회전 진공농축기와 냉각기로 45℃에서 감압 농축하여 액기스 형태로 작은 병에 담았고 실험에 사용할 때까지 -20℃ deepfreezer에 보관하였다.

표 19. 식물추출물에 처리에 의한 살충효과시험 결과

식물명	Dose	Mortality, % (Mean±SD)			
		버즘나무방패벌레		배추좀나방 유충(3령)	
		24h	48h	24h	48h
쇠뜨기	5000	6.7±5.8	14.6±0.5	10.0±17.3	10.0±17.3
은행나무	5000	0.0±0.0	3.3±3.3	3.3±5.8	3.3±5.8
담쟁이	5000	2.3±0.9	4.8±3.6	3.3±5.8	14.2±5.2
취잎	5000	10.0±5.8	11.6±5.8	10.0±10.0	10.0±10.0
취뿌리	5000	8.3±2.8	15.6±3.8	13.3±15.3	16.7±11.6
포공영	5000	0.9±0.0	1.2±0.2	3.3±5.8	10.0±10.0
탱자	5000	0.0±0.0	1.3±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0
서광	5000	36.7±12.3	42.9±20.0	90.0±10.0	93.3±5.8
홍황초	5000	0.0±0.0	6.7±5.8	12.2±10.7	15.0±13.2
들깨	5000	64.0±37.9	69.3±28.9	73.2±15.3	76.0±16.8
고추	5000	- ^{b)}	-	6.7±5.8	6.7±5.8
상육	5000	0.0±0.0	1.3±0.6	3.3±5.8	3.3±5.8
맥문동	5000	0.9±0.0	3.3±1.2	0.0±0.0	3.3±5.8
삼백초	5000	8.3±6.9	10.0±10.0	20.0±5.8	30.0±0.0
오레가노	5000	12.5±13.2	17.5±10.0	0.0±0.0	0.0±0.0
산국	5000	2.9±0.0	14.8±5.4	10.0±5.8	10.0±5.8
죽순대	5000	22.3±18.6	24.2±19.7	51.9±10.5	57.4±22.5

^{a)} Plant extracts were treated with 500 ppm in this pest.

^{a)} Not tested

다양한 식물로부터 메탄올을 이용하여 추출을 한 식물추출물로부터 살충활성을 갖는지 조사한 결과 들깨추출물에서 버즘나무방패벌레에 대하여 살충활성이 나타났다. 다른 나머지 17개의 식물추출물에서는 대체로 살충활성을 보이지 않았지만 이를 다른 해충들에 대한 살충활성을 검정한 결과 다양하게 나타났다. 쑥잎과 고추의 경우 숲모기 유충에 대하여 100%의 살충활성을 나타낸 반면 다른 해충들에 대해서는 미미한 살충활성을 갖는 것으로 나타났고, 서광의 경우 배추좀나방과 숲모기 유충에 약 80%이상의 높은 살충활성을 보였다. 들깨는 아직까지 살충활성 성분이 보고된 바 없다. 서광의 경우는 이미 piperitone과 piperitenone이 살충활성 성분으로 알려져 있고(Dharmagadda, 2005), 고추는 capsaicin이 잘 알려져 있다. 쑥잎의 경우 모기에 대하여 살충활성이 나타났으나 본 실험의 대상과 벗어나서 추후 실험은 진행하지 않았다. 따라서 들깨를 선정하여 살충활성 성분이 무엇인지 용액분획을 통하여 분석하고 살충활성층을 분리한 후 GC/MS, NMR을 이용하여 화학 구조 동정을 수행하였다.

우선 용매분획을 통하여 얻은 분액을 버즘나무방패벌레와 배추좀나방 3령충에 대하여 살충활성을 검정한 결과 표 20와 같다.

들깨의 메탄올 조추출물을 5000 ppm의 농도로 처리하였을 때, 배추좀나방에 대해서 76.0%의 살충활성을 나타내었다. 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 물층을 5000 ppm의 농도로 처리했을 때 각각 100.0, 20.0, 12.0, 3.3%의 살충활성을 나타내었으며 헥산층에서 배추좀나방 3령 유충에 대하여 강한 살충효과를 나타내었다.

살충활성을 가지는 헥산층에 대하여 헥산-에틸아세테이트를 이용하여 실리카겔 오픈 컬럼크로마토그래피를 실시하여 살충활성을 가지는 물질을 분리 및 정제를 실시하였다. 그 결과 살충효과가 가장 좋은 헥산 획분물에 대한 배추좀나방 3령 유충의 실험결과 헥산의 두 번째 획분물인 H2와 H21 1000 ppm에서 모두 100%의 살충활성을 보였으며(표 22), H21을 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분리, 정제를 실시하였다.

표 20. 식물의 메탄올 분획에 의한 살충활성 결과

Fraction	ppm	Mortality, %(mean±SE)	
		<i>Corythucha ciliata</i>	<i>Plutella xylostella</i>
Methanol fr.	5000	43.6±26.7	76.0±16.73
Hexane fr.	5000	53.2±28.3	100.0±0.00
Chloroform fr.	5000	18.3±17.8	20.0±28.28
Ethyl acetate fr.	5000	6.7±5.8	12.0±17.86
Water fr.	5000	5.8±3.3	3.3±5.77
.....			
H1	1000	10.0±3.3	16.0±21.91
H2	1000	68.7±28.3	100.0±0.00
H3	1000	3.3±3.3	4.0±8.94
H4	1000	14.1±20.0	44.0±26.08
H5	1000	28.3±11.6	20.0±20.0
.....			
H21	1000	72.0±17.8	100.0±0.00
H22	1000	22.8±12.6	40.0±14.14
H23	1000	6.7±5.8	20.0±28.28
H24	1000	3.3±5.8	0.0±0.00
.....			
H211	500	65.3±21.2	100.0±0.00
H212	500	13.3±14.1	26.7±11.55

고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분리, 정제를 실시하여 얻은 H211와 H212에 대하여 500 ppm으로 살충실험을 해 본 결과 각각 100%, 26.7%가 나왔다.

들깨에서 배추좀나방 3령 유충에 대해 뛰어난 살충활성을 가지는 H211의 화학구조를 다음과 같은 spectral techniques를 이용하여 결정하였다. 화합물의 GC-MS spectrum을 이용하여 분자량이 204임을 알 수 있었으며(그림 11), ¹H-NMR spectrum data(그림 12)와 ¹³C-NMR spectrum data(그림 13)를 통해 H211은 화학구조상 탄소의 수 15개와 수소의 수 24개로 확인 되었다.

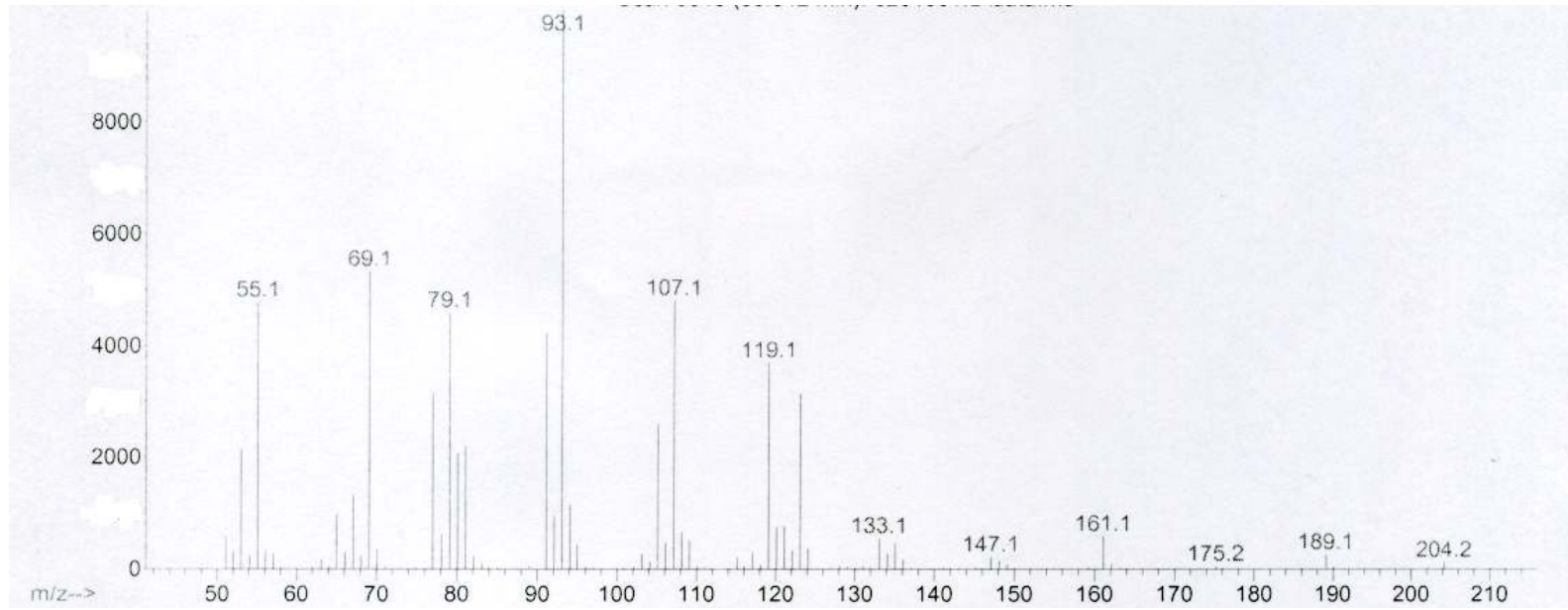


그림 11. GC-MS spectrum of H211.

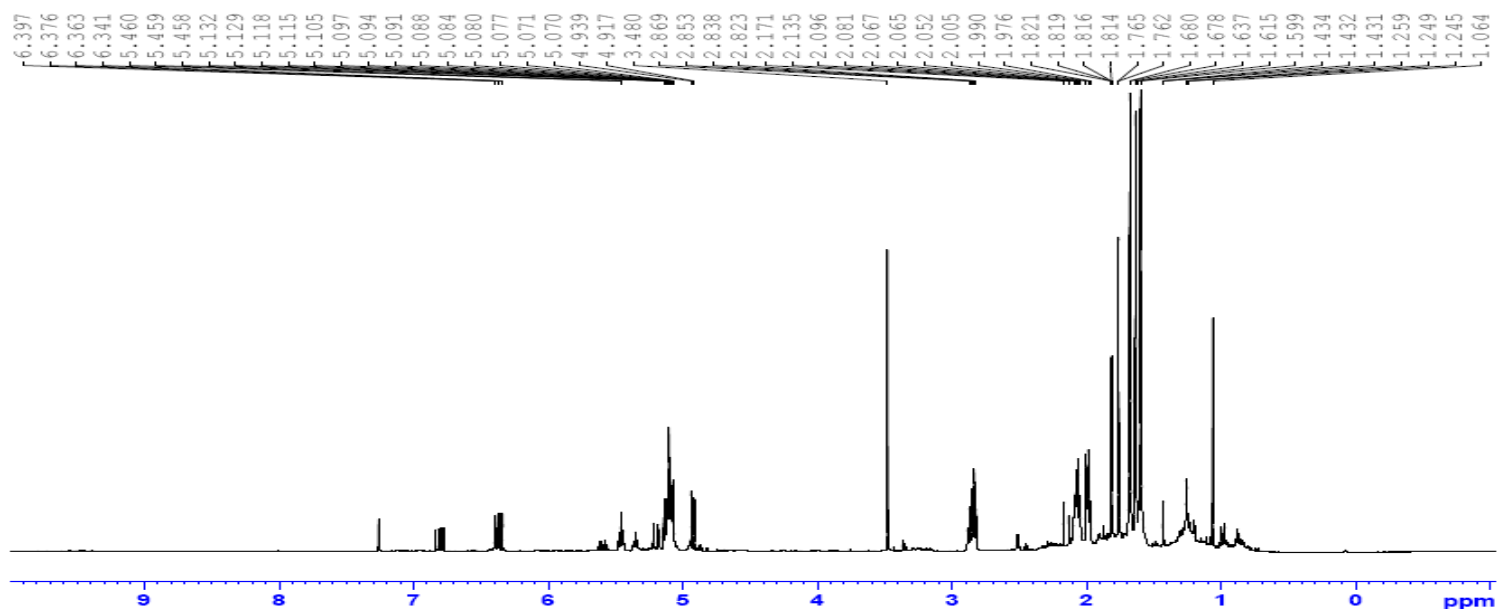


그림 12. ^1H -NMR spectrum of H211.

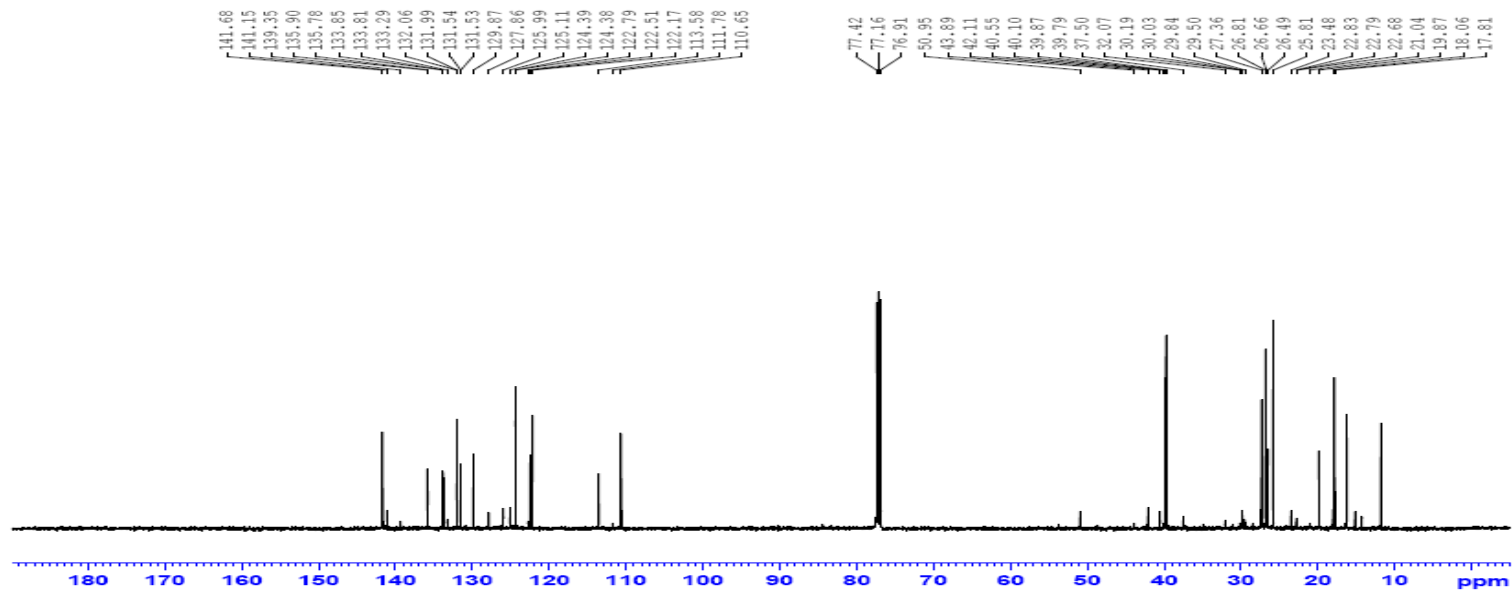


그림 13. ^{13}C -NMR spectrum of H211.

이상과 같이 GC/MS와 NMR을 이용하여 분자화학식은 C₁₅H₂₄인 farnesene으로 활성물질의 구조를 동정하였다(그림 14).

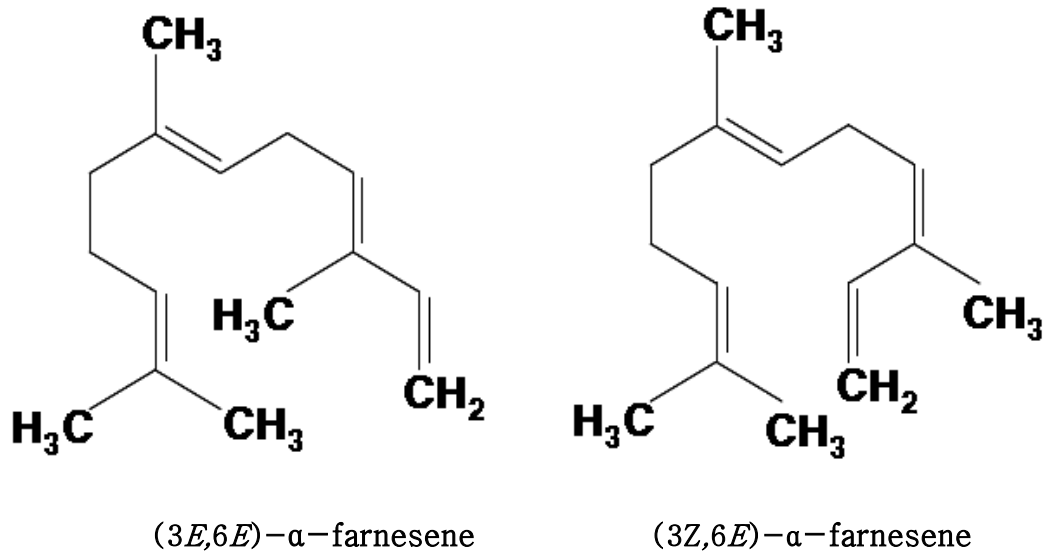


그림 14. Chemical structures of insecticidal constituents derived from *Perilla frutescens*.

들깨에서 분리, 정제된 farnesene은 (2Z,6E)- α -farnesene과 (3E,6E)- α -farnesene의 이성질체로서 순수한 분리가 어려워 본 실험에서는 α -farnesene으로 합쳐 실험하였다.

5. 야외포장 적용을 위한 간이 실내실험

표 21은 버즘나무방패벌레 성충에 대하여 식물추출물 중에서 활성이 있는 BIG 06-01과 식물정유와 terpene류 중에서 효과가 있는 일부(carvone, eugenol, 1,8-cineole, Manuka와 Mentha)를 혼합하여 간이 실내실험을 수행한 결과이다. BIG06-01+Carvone(40+40 μ l/1 L)이 100%의 살충활성을 나타내었으나, 약해가 있어서 검토가 필요하다. BIG06-01+Manuka(40+80 μ l/1 L)에서는 93.9%의 활성을 나타내었다. 이는 BIG06-01 extract의 72%보다 높게 나타난 것이지만, BIG06-01+Manuka 그 외는 효과가 낮거나 거의 없었다. 이는 단독으로 식물천연물질을 처리하는 것보다 특정 조합에 의해 살충효과를 증대시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있을 것이다.

표 21. 버즘나무방패벌레 성충에 대한 식물추출물과 terpene 혼합제의 살충활성 결과

Plant source	Conc. (μ l/L)	n	Mortality (%)		비고
			24h	48h	
BIG06-01 extract (S)	40	28	44.1 \pm 30.0	71.9 \pm 15.1	
	40+20	36	3.3 \pm 5.8	8.8 \pm 2.2	
BIG06-01+carvone	40+40	34	52.8 \pm 29.3	100.0 \pm 0.0	약해
	40+80	41	8.9 \pm 10.2	17.5 \pm 4.3	
BIG06-01+Eugenol	40+20	32	0.0 \pm 0.0	3.0 \pm 5.3	
	40+40	30	3.3 \pm 5.8	6.8 \pm 11.6	
	40+80	32	12.6 \pm 15.6	16.3 \pm 12.0	
BIG06-01+1,8-cineole	40+20	31	2.6 \pm 4.4	13.7 \pm 7.6	
	40+40	32	14.9 \pm 7.3	17.9 \pm 5.3	
	40+80	32	12.2 \pm 10.7	21.1 \pm 11.7	
BIG06-01+Manuka	40+20	33	6.7 \pm 11.6	23.3 \pm 20.8	
	40+40	33	32.6 \pm 33.0	51.3 \pm 20.1	
	40+80	31	69.7 \pm 52.5	93.9 \pm 10.5	
BIG06-01+Mentha	40+20	31	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 5.8	
	40+40	33	8.9 \pm 8.4	8.9 \pm 8.4	
	40+80	35	6.7 \pm 5.8	13.3 \pm 5.8	
Control	-	34	8.1 \pm 7.3	8.1 \pm 7.3	

표 22는 2007년도 신규천연물질 중 선별된 약제인 D0097, D0130과 D0134의 야외포장 적용을 위한 농도별 살충활성을 검정한 실험이다. 처리후 24시간에서 D0097이 64%, D0130이 85%의 살충활성을 보였고 D0134는 비교적 낮은 살충활성을 보였다. 하지만 처리후 48시간에서는 세 약제 모두 1000ppm에서는 80%이상의 높은 살충활성을 보였다. 하지만 100ppm과 10ppm에서는 기대할만한 살충활성을 보이지 않았다. 따라서 D0130이 추후 야외포장을 위한 약제로서 선발하였으며 제형화를 거쳐 야외 포장실험에 적용하였다.

표 22. 신규천연물질 중 선별된 약제의 농도별 살충효과검정

Natural compound	Conc. (ppm)	n	Mortality	
			24 h	48 h
D0097	1,000	70	64.3±36.0	83.1±22.7
	100	47	21.6±23.5	32.4±16.5
	10	46	5.1±5.0	39.6±42.4
D0130	1,000	61	85.0±27.4	93.3±12.1
	100	35	26.3±30.7	88.8±1.3
	10	38	3.3±5.8	22.2±6.9
D0134	1,000	71	47.2±43.1	85.7±23.5
	100	47	21.9±33.4	49.8±34.9
	10	37	0.0±0.0	40.1±44.3
Control	—	30	3.3±5.8	3.3±5.8

6. 제제처방 확립 및 안정성 평가

가. 제제화시험

(1) 살충활성검정

24개 시료를 충북대학교에서 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성검정을 수행한 결과 D0097 1,000ppm, D0130 1,000ppm, D0134 100ppm 등 3개의 시료가 80%이상의 살충활성효과를 보이므로 선발된 3시료를 다시 제제화를 통하여 포장시험에 사용하였다.

(2) 제제처방

아래의 그림 15와 같이 선발된 6개 시료를 친환경농자재로 사용하기 위하여 첨가제 및 부제로 Oleic acid, Tween-80, 에탄올 및 물 등을 사용하였고 각각 비율을 달리하여 처방한 후 버즘나무방패벌레에 대한 약효시험, 제제 물리성 및 안정성을 조사하였다.



A B C D E F

그림 15. 선발된 6개 시료의 성상

그림 15의 6개 시료를 다음과 같이 제제 처방하였다(표 23). BIG 06-01의 제제는 약효상승 및 유화성을 증진시키기 위하여 Oleic acid와 Tween-80의 첨가여부에 따른 제제를 비교하였으며 BIG 06-04의 제제는 원제의 특성상 유화성이 떨어져 제제가 어려우므로 Tween-80의 농도를 달리하여 제제를 비교하였다. BIG 06-15의 제제는 BIG 06-01과 같이 약효상승 및 유화성을 증진시키기 위하여 Oleic acid와 Tween-80의 첨가여부에 따른 제제를 비교하였고 D0097의 경우 분말로서 물에 잘 용해되지 않아 에탄올을 사용하여 녹인 후 Oleic acid와 Tween-80의 첨가여부에 따른 제제를 비교하였다. 또한 D0130의 제제는 BIG 06-01과 같이 약효상승 및 유화성을 증진시키기 위하여 Oleic acid와 Tween-80의 첨가여부에 따른 제제를 비교하였으며 D0134의 제제는 이미 제제가 되어 있는 상태로 Oleic acid의 첨가 여부에

따른 제제를 비교하였다.

표 23. 선발된 6개 시료의 제제화 실험

	시료번호	원제비율	Oleic acid	Tween-80	에탄올	물
(A)	BIG 07-01	100	-	-	-	-
BIG06-01	BIG 07-02	90	10	-	-	-
	BIG 07-03	80	10	10	-	-
(B)	BIG 07-04	10	10	-	40	40
BIG06-04	BIG 07-05	10	10	10	40	30
	BIG 07-06	10	10	20	40	20
(C)	BIG 07-07	100	-	-	-	-
BIG06-15	BIG 07-08	90	10	-	-	-
	BIG 07-09	80	10	10	-	-
(D)	BIG 07-10	90	-	-	10	-
D0097	BIG 07-11	80	10	-	10	-
	BIG 07-12	80	5	5	10	-
(E)	BIG 07-13	100	-	-	-	-
D0130	BIG 07-14	95	5	-	-	-
	BIG 07-15	90	5	5	-	-
(F)	BIG 07-16	100	-	-	-	-
D0134	BIG 07-17	90	10	-	-	-

(3) 제제 물리성 및 안정성 조사

제제별 물리성 및 안정성을 조사한 결과 표 24와 같이 조사되었다. 제제별 물리성을 검토한 결과 pH는 5.1~6.6으로 나타났고 비중은 0.84~1.09로 조사되었다. 유화성에 있어서는 BIG 07-04, BIG 07-10, BIG 07-11 등 3개 시료는 개선이 필요하거나 불량으로 나타났으나 나머지 시료는 양호한 것으로 조사되었다.

제제별 안정성을 조사한 결과, 유화안정성에 있어서 BIG 07-04, BIG 07-05, BIG 07-16, BIG 07-17 등 4개 시료는 층 분리가 일어났으며 BIG 07-10, BIG 07-11,

BIG 07-12 등 3개 시료는 침전물이 생성되어 유화안정성이 없는 것으로 나타났고 나머지 시료는 안정한 것으로 조사되었다. 내한내열성에 있어서도 유화안정성 시험과 비슷한 결과를 나타내었다.

표 24. 제제 물리성 및 안정성 시험

제제	pH	비중	유화성	유화안정성	내한내열성
BIG 07-01	5.5	0.96	양호	균일	안정
BIG 07-02	5.8	0.94	양호	균일	안정
BIG 07-03	5.7	0.95	양호	균일	안정
BIG 07-04	6.3	0.87	개선필요	충분리	충분리
BIG 07-05	6.1	0.91	양호	충분리	충분리
BIG 07-06	6.0	0.90	양호	균일	안정
BIG 07-07	5.3	1.09	양호	균일	안정
BIG 07-08	5.1	1.01	양호	균일	안정
BIG 07-09	5.4	1.03	양호	균일	안정
BIG 07-10	6.5	0.84	불량	침전물생성	침전물생성
BIG 07-11	6.0	0.88	불량	침전물생성	침전물생성
BIG 07-12	6.4	0.86	양호	침전물생성	침전물생성
BIG 07-13	6.6	0.93	양호	균일	안정
BIG 07-14	6.4	0.92	양호	균일	안정
BIG 07-15	6.5	0.93	양호	균일	안정
BIG 07-16	6.0	0.90	양호	충분리	충분리
BIG 07-17	5.8	0.92	양호	충분리	충분리

(4) 제제별 살충활성검정

이화학적으로 안정한 17개 제제처방의 버즘나무방패벌레에 대한 100ppm에서 살충활성을 검정한 결과 표 25와 같이 조사되었다. BIG 07-15 제제가 93.9%의 가장 살충활성이 높은 것으로 조사되었으며 다음으로 BIG 07-06 제제가 88.3%로 살충활성이 높은 것으로 조사되었다. 따라서 BIG 07-06과 BIG 07-15를 포장약효시험에 사용하였다.

표 25. 제제별 버즘나무방패벌레에 대한 살충활성시험

제제	살충율(%)	제제	살충율(%)
BIG 07-01	73.3	BIG 07-10	39.6
BIG 07-02	67.7	BIG 07-11	22.9
BIG 07-03	73.3	BIG 07-12	28.1
BIG 07-04	83.3	BIG 07-13	85.7
BIG 07-05	86.7	BIG 07-14	83.1
BIG 07-06	88.3	BIG 07-15	93.3
BIG 07-07	67.7	BIG 07-16	47.4
BIG 07-08	83.3	BIG 07-17	64.3
BIG 07-09	66.3		

7. 환경안전성 평가

가. 급성경구시험

급성경구시험의 결과는 표 26에서 보는 바와 같이 기초시험에서 암컷, 수컷 모두 5,000mg/kg으로 투여하였을 때 전 동물이 치사가 없었으므로 급성경구독성 LD₅₀ 값은 5,000mg/kg 이상이었다. 또한, 시험물질 투여에 기인한 어떠한 증독증상도 관찰되지 않았다.(표 27)

공시약물 투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 시험약물에 기인한 체중변화는 관찰되지 않았다.(표 28)

표 26. 마우스에 대한 BIG07-15의 급성경구독성결과

Sex	Conc. (mg/kg)	Number of dead mouse								Mortality (%)
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	336h	
Male	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 27. BIG07-15에 의한 마우스의 이상증상

Sex	Concentration (mg/kg)	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	336h
Male	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-

- : normal

표 28. BIG07-15에 의한 마우스의 체중변화

Sex	Concentration (mg/kg)	Number of mouse	0 DAT	7 DAT	14 DAT
			Mean±S.D.	Mean±S.D.(n)	Mean±S.D.
Male	5,000	5	30.3±1.7	31.7±4.2	34.4±1.6
Female	5,000	5	23.3±1.8	24.7±3.5	24.9±3.6

나. 급성경피시험

급성경피시험 역시 표 29에서 보는 바와 같이 기초시험에서 암컷, 수컷 모두 4,000mg/kg으로 투여하였을 때 전 동물이 치사가 없었으므로 급성경구독성 LD₅₀ 값은 4,000mg/kg 이상이였다. 또한, 시험물질 투여에 기인한 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다(표 30).

공시약물 투여 후 체중은 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 시험약물에 기인한 체중변화는 관찰되지 않았다(표 31).

표 29. 마우스에 대한 BIG07-15의 급성경피독성결과

Sex	Concentration (mg/kg)	Number of dead mouse								Mortality (%)
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	336h	
Male	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 30. BIG07-15에 의한 마우스의 이상증상

Sex	Concentration (mg/kg)	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	336h
Male	4,000	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	4,000	-	-	-	-	-	-	-	-

- : normal

표 31. BIG07-15에 의한 마우스의 체중변화

Sex	Concentration (mg/kg)	Number of mouse	0	7	14
			Mean±S.D.	Mean±S.D.(n)	Mean±S.D.
Male	4,000	5	183.7±6.3	238.6±8.9	242.5±12.5
Female	4,000	5	158.2±6.8	202.8±32.8	193.8±21.8

다. 어독성시험

예비시험결과에 따라 1.00 ~ 3.84mg/L의 시험농도에서 본시험을 실시한 결과 48시간 경과시 1.00, 1.40mg/L 처리구에서는 치사어가 관찰되지 않았고, 1.96, 2.74mg/L 처리구에서는 각각 1, 5마리의 치사어가 관찰되었다. 3.84mg/L 처리구에서는 전개체가 치사하였다. 96시간 경과시에는 1.00, 1.40mg/L 처리구에서는 치사어가 관찰되지 않았고, 1.96, 2.74mg/L 처리구에서는 각각 2, 6마리의 치사어가 관찰되었다. 3.84mg/L 처리구에서는 전개체가 치사하였다(표 32). 시험기간 중 처리군에서 일반중독증상으로 평형상실개체가 관찰되었다(표 33). 따라서 송사리에 대한 급성어독성 48시간 LC₅₀은 2.631mg/L, 95% 신뢰한계는 2.285 ~ 3.037mg/L으로 나타났고, 96시간 LC₅₀은 2.468mg/L, 95% 신뢰한계는 2.131 ~ 2.866mg/L으로 나타났다. 48시간 무영향농도는 1.40mg/L, 96시간 무영향농도는 1.40mg/L이었다(표 34).

시험기간 중 pH는 평균 8.20(최소 7.95 ~ 최대 8.41)이었고, DO는 평균 6.77mg/L(최소 4.98mg/L ~ 최대 8.36mg/L)이었다. 수온은 평균 22.88±0.44℃(최소 22.1℃ ~ 최대 23.6℃)이었다.

표 32. BIG07-15에 의한 송사리의 독성결과

Concentration (mg/L)	Number of fish	Number of dead fish				Mortality(%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
Control	10	0	0	0	0	0	0
1.00	10	0	0	0	0	0	0
1.40	10	0	0	0	0	0	0
1.96	10	0	1	2	2	10	20
2.74	10	1	5	6	6	50	60
3.84	10	10	10	10	10	100	100

표 33. BIG07-15에 의한 송사리의 이상증상

Concentration (mg/L)	Abnormal response			
	24hour	48hour	72hour	96hour
Control	NOR	NOR	NOR	NOR
1.00	NOR	NOR	NOR	NOR
1.40	NOR	NOR	NOR	NOR
1.96	NOR	NOR	NOR	NOR
2.74	LOE(3)	NOR	NOR	NOR
3.84	-	-	-	-

※ Abbreviation for abnormal response

LOE : loss of equilibrium, SUR : fish mainly at the surface, BOT : fish mainly at the bottom,
HEM : hemorrhage, VDE : vertebral deformation, PAR : paroxysm, NOR : normal

표 34. 송사리에 대한 BIG07-15의 LC₅₀

Test substance	LC50(mg/L)		Body Weight (g)	Total length (cm)
	48hour	96hour		
Control	-	-	0.15±0.03	2.43±0.14
PCP-Na	0.592 (0.483 ~ 0.740)	0.548 (0.447 ~ 0.679)	0.21±0.03	2.84±0.20
BIG 07-15	2.631 (2.285 ~ 3.037)	2.468 (2.131 ~ 2.866)	0.15±0.04	2.45±0.11

라. 유용곤충에 대한 안전성 평가

표 35의 결과에서는 야외 방제효과 실험에서 효과가 우수하였던 BIG06-04약제는 BIG06-01약제에 비하여 유용곤충에 대하여 독성이 낮았다. 하지만 칠레이리응애에 대해서는 독성이 높은 것으로 나타났다.

화학합성농약의 경우 해충 뿐만아니라 유용곤충에 대한 독성이 매우 높아 생태계를 파괴할 수 있으나 식물추출물의 경우 급성경구·경피, 어독성과 유용곤충에 대한 독성이 모두 낮아 생태적으로 안전할 것으로 사료된다.

표 35. 유용곤충에 대한 독성시험결과

Compound	Dilution (x)	Mortality (%)				
		콜레마니진디벌	무당벌레	칠레이리응애	서양뒤영벌	꿀벌
BIG06-01	1,000	11.3	100	100	20.0	30.0
BIG06-04	1,000	30.7	31.3	86.7	25.0	20.0
BIG07-15	1,000	25.3	45.0	88.0	30.0	25.0

8. 야외 포장시험

식물추출물 중에서 활성이 있는 BIG06-01, BIG06-04, BIG07-15를 합성살충제인 acetamiprid WP를 대조로 충북 청원군 문의면의 야외 포장에서 수행하였다. 대조약제는 조사기간 9일 동안 97-98%의 살충효과를 나타내었으며, BIG06-04, BIG07-15는 90-95%로 합성살충제 보다는 효과가 낮았으나, 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그러나 BIG06-01은 방제효과가 낮았다 (표 36).

표 36. 충북 청원에서의 버즘나무방패벌레 성충에 대한 포장시험 결과

Compound	Dilution (x)	Control effect (%)		
		3 DAT	6 DAT	9 DAT
BIG06-01	1,000	7.4	35.6	31.0
BIG06-04	1,000	90.3	90.8	94.0
BIG07-15	1,000	92.6	94.2	95.3
Acetamiprid WP	1,000	97.5	98.6	98.1

신규천연물 중에서 높은 효과를 보였던 BIG07-15으로 충북 청주시 충북대학교 인근 야외포장에서 적용실험을 실시한 결과는 표 37와 같다. 야외에서 효과를 높이기 위하여 전착제로 PVA 0.1%를 사용하였다. 야외포장 적용실험에서는 BIG07-15가 처리후 2일에서 98.2%의 높은 살충효과를 보였으며 또한 BIG07-15에 PVA 0.1%를 첨가한 약제에 대해서 처리후 2일에서 보다 높은 100% 살충율을 나타내었다.

표 37. 충북 청주에서 버즘나무방패벌레 성충에 대한 포장시험 결과

Natural compound	Conc. (ppm)	n	Control effect (%)			
			1 DAT	%	2 DAT	%
BIG07-15	500	230	25.2	77.4	2.3	98.2
BIG07-15+PVA 0.1%	500	191	17.3	84.4	0.0	100.0
PVA 0.1%	-	180	92.2	17.0	90.7	27.6
Control	-	203	111.1	-	125.3	-

충북 청원군 진천면에서 식물추출물 중에서 활성을 보여 제형화한 BIG 07-06, BIG07-15를 합성살충제인 acetamiprid WP를 대조로 충북 진천의 야외 포장에서 수행하였다 (표 38). 대조약제는 조사기간 9일 동안 95-98%의 살충효과를 나타내었으며, BIG07-15는 85-94%로 합성살충제 보다는 효과가 낮았으나, 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그러나 BIG07-06은 방제효과가 낮았다.

표 38. 충북 진천에서의 버즘나무방패벌레 성충에 대한 포장시험 결과

Compound	Dilution (x)	Control effect (%)		
		3 DAT	6 DAT	9 DAT
BIG 07-06	1,000	12.4	38.9	44.2
BIG 07-15	1,000	85.2	89.5	93.9
Acetamiprid WP	1,000	95.7	97.9	98.6

9. 제품 생산 공정 기술개발

가. 제조공정 시스템 구축

식량증산을 위한 식물보조제의 사용은 필수적이다. 따라서 농약개발기술은 정밀 화학, 생물학, 농학, 환경화학, 독성학 등 여러분야의 기술종합을 필요로 하기 때문에 고부가 가치의 선진국형 기술에 속한다. 이러한 농약 기술 중에서도 환경친화적이고 안전한 천연물 농약의 개발이야말로 고도의 기술을 요하는 산업이다. 선진국에서는 천연농약의 개발을 위해 "보다 많이, 보다 빠르게, 보다 쉽게" 라는 전략으로 전하고 있다. 과거에는 몇 가지 추출자원에 한정하여 한두가지 목표에 대해 검정을 하면서 분리, 정제, 구조동정을 하였다. 지금은 다수의 자원을 가지고 여러 가지 활성을 동시에 조사하는 방법을 사용하고 있다. 이것은 개발에만 국한되는 것이 아니라 생산기술에서도 대량생산, 생산의 단순화 등을 통한 대량의 물량 공급과 생산시간 단축을 통한 비용절감으로 생산 단가의 하락을 유발 경쟁력 있는 제품생산에 있다고 하겠다.

제조공정 시스템 구축계획의 모식도를 간단히 보면 제일 중요한 것은 시료의 확보이다. 이들 시료는 동일한 균이어야 하며 좋은 질의 제품원료가 확보 되어야 한다. 그 다음으로 제조공정에서 중요한 것은 원료의 확보와 대량 구입이 가능한 것이어야 할 것이다. 하지만 불행하게도 한국의 상황으로 볼 때 고삼추출물 원료를 대량으로 공급받기는 한계가 있다. 일반적으로 농업분야의 제조공정 기술은 일정한 양의 샘플과 양질의 제품이 들어오기에 가능하다. 하지만 국내에서 천연물원료의 확보에는 문제가 있으며 원료 확보가 용이한 외국에서의 수입을 검토하여 균일한 대량의 원료 공급처를 확보 하였으며 아래와 같은 방법으로 공정시스템 구축 계획을 세워 보았다.(그림 16)

현재 생산하려는 천연물질은 액상상태의 원료를 사용하기 때문에 원료에 적합한 생산설비가 필요하며 원료의 원활한 혼합을 위한 교반기가 필요로 하였다.

일반적인 500리터 소형 교반 시스템을 구축하였으며, 에탄올에 고삼추출물 원료와 안정제를 혼합하여 균일한 제품의 생산을 위한 체계적인 공정을 구축하였다.

생산의 안전화를 위하여 초기 교반기의 역할이 가장 중요하며 이 교반기의 능력을 최대한 발휘하는 동일 회전수를 택하다. 유체공학적 특성을 철저히 추구한 PROPELLER를 설치하였으며 이 PROPELLER는 획기적인 교반효과를 도출하며 교반용량도 증가시켜 대량생산이 가능하여졌다.

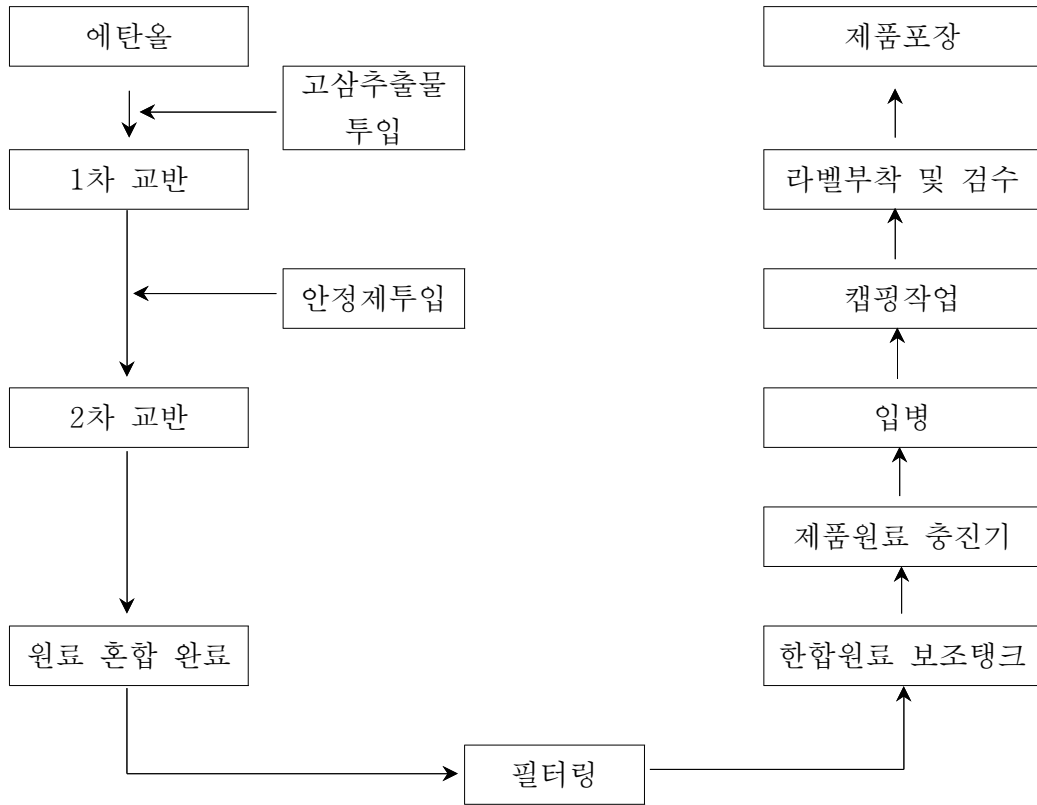


그림 16. 생산공정 모식도

나. 품질관리 시스템 구축 계획

애석하게도 우리나라에서 천연물 제품의 경우 품질관리를 하는 곳은 아직 없다. 품질관리라 함은 일정한 지표성분이 기준치이상 존재하는가의 판단이라는 것인데 이것도 현실적으로 어려움이 많다. 일반적인 농약의 경우는 그 지표성분이 명확하여 그 성분을 알아내는 데에는 어려움이 없다. 하지만 천연물 제품의 경우는 그 성분을 정확히 측정하고 표시하는 일조차 매우 어려운 일이다. 그러나 현실적인 어려움이 있다고 하더라도 그 제품의 표준을 설정 못 한다면 제품의 기준을 마련할 수 없을 것이라고 판단되어 제품이 중요 성분을 기준으로 하여 품질관리 시스템을 구축하여 보았다. 품질관리라 함은 제품의 유용성을 결정하는 성질로써 제품에 대한 사용목적을 수행하기 위하여 구비하여야 할 성질을 말한다. 오늘날과 같은 시대에는 사용자의 입장에서 제품의 유용성이 강조되고 있으며 시대의 변천과 더불어 제품의 품질뿐만 아니라 원가(cost), 양(quantity), 납기(delivery) 및 서비스(service)에 이르기까지 고객에게 주는 유용성은 모두 품질에 포함시키고 있고 이것은 넓은 의미의 품질이라 한다. 품질관리에서 의미하는 품질은 소비자를 위한 품질이기 때문

에 가격을 무시하고 최상의 품질 특성만을 만들어 내는 절대적 품질이 아니고 가격과 품질 특성과의 조화를 이루는 상대적 품질을 제시하여 제품의 유효성분 규격 개선에 초점을 두었다. 농약의 경우 제품의 품질관리 규격은 지표물질이 확실하게 정하여져 있으나 천연물은 그러한 기준을 잡기가 매우 어렵기에 그 지표성분을 기준으로 다른 성분에 대한 표준적인 가치를 제시하는 것으로 품질관리를 하는데 기준을 세웠다.

검사의 기준은 항상 일정한 범위 이상의 균일화된 제품을 생산하여야 하는데 그 항목에 해당하는 품목별 기준을 세워 평균 90점 이상일 때를 기준으로 삼았으며 90 이하일 경우는 제품기준에 미달되는 것으로 재생산 혹은 폐기 처리하는 것으로 하였다. 완제품의 제품 품질 모식도는 아래 표와 같다.(그림 17)

고삼추출물 원료에 대한 잔류농약분석을 통해 화학농약의 혼입을 차단하며 부제들 또한 엄격한 관리를 통해 제품의 안전성에 문제가 없도록 관리할 계획이다.

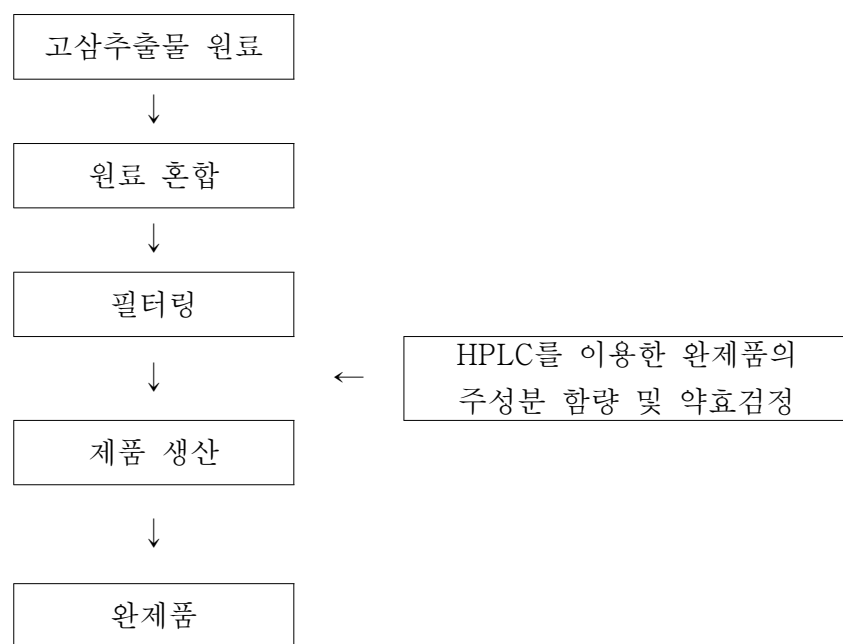


그림 17. 제품 품질검사 모식도

제 4 절 요약

- 식물정유 중에서 살충효과를 갖는 물질의 분리 및 동정을 위하여 버즘나무방패벌레에 높은 혼중독성을 보였던 식물추출물과 식물정유를 선별하였다.
- 그중에서 6개의 식물정유 중에 포함되어 있는 터펜을 분리 및 동정을 위하여 GC로 분석하고 GC/MS로 확인을 하였다.
- 식물추출물 중에서 활성이 있는 BIG06-01, BIG06-04, BIG06-15를 분석한 결과, BIG06-01에서는 정확한 물질이 분석되지 않았고, BIG06-04는 pyrethrin I and II물질을 함유하고 있었고, BIG07-15는 Sophordine이 검출되었다. 이들이 살충활성의 성분으로 새로운 살충활성을 가진 식물추출물로 개발을 추진하였다.
- 버즘나무방패벌레에 대하여 사용된 신규천연물질로는 총 24가지를 1000ppm으로 처리하여 얻은 결과, D0097, D0130과 D0134가 48시간에서 80%이상의 살충효과를 나타내었다. 이 중에서 D0130은 100ppm의 농도에서 48시간에서 85.7%의 살충율을 보였고 이후 야외포장 적용실험의 약제로 선별하였다.
- 살충활성을 보인 식물정유와 monoterpene에는 carvone, eugenol, 1,8-cineole, manuka, mentha 이 있었다.
- 제제화 실험에서 BIG07-06과 BIG07-15가 환경에 대한 안정성이 있고 살충활성이 높아 야외포장에 적용하였다.
- 야외포장 적용에서 BIG07-15는 제품개발이 가능할 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목표달성도

구분 연구내용	월별 추진일정												달성	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
○ 사육시스템 확립						■	■	■	■	■	■	■	■	100%
○ 살충작용기작 구명			■	■	■	■	■	■	■	■				100%
○ 살충활성물질 분리	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	100%
○ 제제화 기술 개발	■	■	■	■										100%
○ 환경안전성 평가					■	■	■	■	■	■	■			100%
○ 야외 실증 시험						■	■	■	■	■	■	■	■	100%

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

고삼추출물은 환경친화적인 버즘나무방패벌레 방제용 작물보호제로 활용될 수 있다. 본 과제의 결과로 완성된 버즘나무방패벌레 방제용 천연살충제에 대하여 2010년부터 제품으로 출시될 예정이다.

합성농약의 과다 사용은 환경 오염, 생태계 파괴 등의 문제를 일으키는 데 반하여 환경친화적 천연살충제를 사용하면 환경저해기능 요인을 감소시킴과 동시에 국민의 보건위생을 증진시키는 데 기여할 것이다.

물질 추출, 분리 및 동정 기술뿐만 아니라 미량으로 생물활성을 조사하는 기술의 발달을 촉진시키고 동시에 천연물의 제제기술 및 포장적용 기술 등이 선진기술과 대등해질 수 있도록 개발 및 연구활동을 계속진행 할 계획에 있다.

제 6 장 참고문헌

- Arnason, J. T., B. J. R. Philogene and P. Morand. 1989. Insecticides of Plant Origin. Am. Chem. Soc., Washington, D. C.. p. 213.
- Battisti, R.D., A. Forti and S. Zangheri. 1985. Research on biology sycamore lace bug (*Corythucha ciliata*)(Rhynchota, Tingidae) in the Veneto region. *Rustula Entomologica* 7-8: 125-141.
- Byers, J.A., Z.H. Zhang and G. Birgersson. 2000. Strategies of a bark beetle, *Pityogenes bidentatus*, in an olfactory landscape. *Naturwissenschaften* 87: 503-507.
- Chang, N.K., H.R. Kwon, S.K. Lee and M.J. Kang. 1993. Relative estimation of air pollution by the water soluble sulfur content in the litters of *Platanus orientalis*. *Korean J. Ecol.* 16: 27-37.
- Charlwood, B.V., and K.A. Charlwood. 1991. Monoterpenoids, pp. 43-98. in B.V. Charlwood and D.V. Banthorpe, (eds.), *Methods in plant biochemistry*, vol. 7 Terpenoids. Academic, London.
- Choi, M.H., J.W. Kim and G.H. Kim. 1999. Effect of tebufenozide on embryonic and postembryonic development of sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). *Korean J. Pestic. Sci.* 3: 74-80.
- Chung, Y.J., T. S. Kwon, W. H. Yeo, B. K. Byun and C. H. Park. 1996. Occurrence of the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) in Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 35: 137-139
- Collart, M.G. and S.F. Hink. 1986. Sublethal effects of *d*-limonene on the cat flea(*Ctenocephalides felis*). *Entomol. Exp. Appl.* 42: 225-229.
- De Battisti, R., A. Forti, and S. Zangheri. 1985. Research on biology sycamore

- lace-bug (*Corythucha ciliata* Say) (Rhynchota Tingida) in the Venteto Region, Frustula. Entomol. 20-21: 1225-141.
- Dharmagadda, V.S.S., S.N. Naik, P.K. Mittal, and P. Vasudevan. 2005. Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species. Bioresource Technology 96: 1235-1240.
- Drake, C.J. and F.A. Ruhoff. 1965. Lace-bugs of the world, a catalog (Hemiptera: Tingidae). US Natl. Mus. Bull. 243.
- Harborn, J. B. 1993. The plant and its biological adaptation to the environments. *In*: Introduction to Ecological Biochemistry. J. B. Harborne ed. Academic Press. London. pp. 1~41.
- Hink, W.F. and B.J. Fee. 1986. Toxicity of *d*-limonene the major component of citrus peel oil, to all life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis*(Siphonaptera: Pulicidae). J. Med. Entomol. 23: 400-404.
- Kim, C.S., J.D. Park, B.H. Byun, I.K. Park and C.S. Chae. 2000. Chemical control of sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say). J. Korean For. Soc. 89: 384-388.
- Kim, G.H., M.H. Choi and J.W. Kim. 1999. Effects of temperatures on development and reproduction of the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). Korean J. Appl. Entomol. 38: 117-121.
- Kim, J.S., D.K. Seo, S.A. Jang, J.H. Han, Y.J. Kim and G.H. Kim. 2006. Fumigant toxicity of 18 essential oils and their major compounds against adult oak longicorn beetle, *Moechotypa diphysis* (Coleoptera: Cerambycidae). Kor. J. Appl. Entomol. 45: 189-194.
- Lee, B. Y., W. H. Yeo, J. D. Park, Y. J. Chung, S. A. Seo and B. K. Byun. 1997. Annual report on forest insect and disease surveys and forecasting. Korea Forestry Research Institute pp. 39-45

- Miyakado, M. 1986. The search for new insecticidal and fungicidal compounds from plants. *J. Pestic. Sci.* 11: 483~492.
- Park, J.D., C.S. Kim, G.S. Lee, Y.S. Park, S.H. Kang and S.C. Shin. Effect of temperature on the development of sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). *J. Korean For. Soc.* 88: 555–561.
- Rice P.J. and J.R. Coats. 1994. Structural requirements for monoterpenoid activity against insects. *In*: Hedin, P.A. (ed), Bioregulators for crop protection and pest control. American Chemical Society Symposium 557: 92–108.
- Song, C., G.H. Kim and K.Y. Cho. 1997. Characteristic of biology of the sycamore lace bug, (*Corythucha ciliata*) and its insecticide susceptibilities. Program and Abstract of the Annual Joint Meeting of the Entomological Society of Korea and Korean Society of Applied Entomology in Autumn. 68pp. (in Korean)
- Taylor, W.E. and B. Viekery. 1974. Insecticidal properties of limonene, a constituent of Citrus oil. *China J. Agr. Sci.* 7: 61–62.
- Templeton, W. 1969. An introduction to the chemistry of terpenoids and steroids. Butterworths, London.
- Tiberi, R., A. Niccoli, M. Curini, F. Epifano, M.C. Marcotullio and O. Rosati. 1999. The role of the monoterpene composition in *Pinus* spp. needles, in host selection by the pine processionary caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*. *Phytoparasitica* 27: 263–272.
- USDA. 1985. Insects of Eastern Forests. Misc. Publ. 1426. US Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, 608p.
- Woo, S.Y., S.H. Lee, K.W. Kwon and J. C. Lee. 2004. Chlorophyll contents and glutathione reductase activity of *Ailanthus altissima*, *Liriodendron tulipifera* and *Platanus orientalis* seedlings to the ozone exposure. *J. Korean For. Soc.* 93: 423–427.

- Yi, C.G., M. Kwon, T.T. Hieu, Y.S. Jang and Y.J. Ahn. 2007. Fumigant toxicity of plant essential oils to *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) and *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). J. Asia-Pacific Entomol. 10:157–163.
- Yoo, J.S., G.H. Kim, S.G. Lee, S.C. Shin, J.D. Park and S.C. Park. 2002. Insecticidal activity and ovipositional repellency of monoterpenoids against *Moechotypa diphysis* adults (Coleoptera: Cerambycidae). Kor. J. Appl. Entomol. 41: 285–292.
- Yoon, C., J.O. Yang, S.H. Kang and G.H. Kim. 2008. Insecticidal properties of bistrifluron against sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). J. Pestic. Sci. 33: 44–50.
- Yu, J.S., J.S. Bae, D.K. Shin and G.H. Kim. 2005. Repellency of the constituents of caraway oil, *Carum carvi* against *Tetranychus urticae*. Korean J. Appl. Entomol. 44: 161–164

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.