

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(), 발간등록번호(○)
농식품기술개발사업 제2차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002607-01

제충국을 이용한 친환경 살충제 개발 및 제품화 최종보고서

2019.03.29.

주관연구기관 / (주)한국생물안전성연구소
참여기관 / 달마시안제충국

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “제충국을 이용한 친환경 살충제 개발 및 제품화”(개발기간 : 2016. 12. 05 ~ 2018. 12. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 29.

주관연구기관명 : (주)한국생물안전성연구소 (대표자) 이 해 근 (인)
참여기관명 : 달마시안제충국 (대표자) 채 의 수 (인)



주관연구책임자 : 조인선

참여기관책임자 : 채의수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116148-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.12.05. ~2018.12.04	단 계 구 분	개발
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	창업벤처지원 R&D 바우처 시범사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	제충국을 이용한 친환경 살충제 개발 및 제품화			
연구책임자	조인선	해당단계 참여연구원 수	총: 10 명 내부: 10명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 59,400천원 계: 218,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 10 명 내부: 10명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 59,400천원 계: 218,400천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)한국생물안전성연구소 독성연구팀			참여기업명	달마시안제충국
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수
101

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 연구개발의 목표 천연살충 효과 증진제로서 국내 토종식물인 방아풀과 자소엽을 이용하고 주원료로서 제충국을 이용한 친환경 살충제를 개발 시효과는 우수하면서도 저독성인 안전한 유기농업자재 및 가축용 살충제를 개발한다. 2. 연구개발의 내용 <ul style="list-style-type: none"> ○ 제제 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 선정, 유화제 및 보조제 선발, 시제품 제조 ○ 시제품 이화학적 특성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 유효성분 분석 및 유해성분 분석 ○ 시제품 및 원료에 대한 안전성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 인축독성 : 급성경구, 급성경피, 피부자극성, 안점막자극성 피부감작성, 유전독성 (염색체이상시험) - 환경독성 : 어독성, 꿀벌급성접촉독성, 물벼룩급성독성 ○ 시제품 성능 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 살충효과시험 : 수박 목화진딧물 시험 - 닭진드기 효과시험 : 닭진드기(와구모) 효과시험 - 약해시험 : 고추, 배추, 벼, 상추, 오이 ○ 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 대량생산 공정 구축 - 유기농업자재 공시 등록: 병해충관리자재용 				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 병해충관리용 유기농업자재 공시 4건 : 제품화 2. 연구개발내용 한국농약과학회 학술대회 포스터 3건 발표 3. 동물의약품(닭진드기 살충제) 임상시험계획서 제출 <ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 및 제품의 안전성시험 완료 (유전독성 등 포함) ○ 실내 및 야외시험에서 닭진드기 살충효과 우수 4. 시제품의 매출 (2018년 92백만원, 2017년 20백만원) 5. 홍보 전시 4건 (2017농업기술박람회 등) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 본 연구로 개발된 제품은 원예용 병해충방제제로 활용 2. 본 연구로 개발된 제품은 천연살충제의 효과를 높이는 천연소재의 효과증진제 국산원료 사용으로 가격경쟁력 및 시장성 우수 3. 본 연구로 개발된 제품은 친환경적으로 병해충을 방제하는 기술로 화학농약의 사용량을 줄여 환경을 보호하는 효과 기대 가능 4. 본 연구로 개발된 제품은 친환경 제품으로 농민의 건강보호에도 도움이 될 것으로 기대 5. 본 연구자료를 바탕으로 가축용살충제 임상시험 및 제품개발 가능 				
<p>국문핵심어</p>	제충국	천연살충제	유기농업자재	효과증진제	가축용살충제
<p>영문핵심어</p>	Pyrethrum	Natural insecticide	Organic agricultural material	Effect Enhancer	Insecticides for cattle

< 목 차 >

- 제 1 장 연구개발과제의 개요6**
 - 제 1 절 연구개발의 필요성 6
 - 1. 연구개발의 개요 6
 - 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황 6
 - 3. 연구개발의 중요성 8
 - 제 2 절 연구개발의 범위 9
 - 1. 연구개발의 최종목표 9
 - 2. 개발 목표 및 내용 9
 - 3. 연구개발 성과 및 평가방법 10

- 제 2 장 연구수행 내용 및 결과12**
 - 제 1 절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 12
 - 1. 연구개발 추진전략 및 방법 12
 - 2. 연구개발 추진체계 12
 - 3. 추진일정 14
 - 제 2 절 연구개발 내용 및 결과 15
 - 1. 제제 연구 15
 - 2. 시제품의 이화학적 특성 연구 18
 - 3. 시제품 및 원료에 대한 안전성 연구 29
 - 4. 시제품의 성능시험 53
 - 5. 제품화 70
 - 6. 동물약품(닭진드기 살충제) 개발을 위한 야외임상·효능시험연구 .. 75
 - 제 3 절 연구개발 성과 82
 - 1. 제품화 : 유기농업자재 공시 4건 82
 - 2. 홍보 전시 : 4건 87
 - 3. 학술대회 발표 : 3건 90
 - 4. 사업화 계획 및 매출 실적 96

- 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도97**
 - 제 1 절 목표 달성도 97
 - 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 98
 - 1. 경제적 측면 98
 - 2. 기술적 측면 98

- 제 4 장 연구결과의 활용 계획 등99**
 - 붙임. 참고 문헌 100

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요

가. 농민과 소비자 요구에 부응하여 화학물질을 대체하는 천연살충제 개발

- 최근 화학살생물제 안전성이 사회문제로 부각, 특히 화학살충제의 사용은 안전불안한 요소임
- 안전한 천연살충원료의 수요가 급격히 증가되고 있으나 원료의 대부분을 수입에 의존하고 있음
- 현재 수입산 천연살충원료의 경우 높은 불량률과 더불어 높은 가격으로 사용에 부담이 있음
- 현재 유기농업자재로 사용되는 제품들은 화학농약 및 화학성분의 살충제에 비해 현저히 효과가 떨어져서 많은 비용을 들임에도 불구하고 사용하는 농민들의 불만 요소가 높음
- 가격 경쟁력이 있고 전문가의 안전성이 검증된 국내산 천연살충원료로 우수한 천연살충제 연구 및 제품화가 절실히 필요함

나. 유기농업자재와 가축용 살충제를 만족시키는 천연살충제 개발

- 천연원료로 제조되는 살충성분은 유기농업자재 뿐 아니라 가정용 살충제, 방역용 살충제의 원료로 사용되어 원료 생산 공급뿐 아니라 용도를 확대하여 제품시장을 확장할 수 있음
- 식용으로 사용되는 닭의 진드기 등에 금지된 농약성분의 화학물질이 산란계 농장에 사용되어 생산·유통한 계란에서 피프로닐 대사체 등 성분이 검출되어 안전한 천연살충제의 개발이 요구되고 있다.
- 따라서 천연원료를 이용한 천연살충제 원료 및 제품화를 위하여 국내산 천연효과 증진제를 사용하고 살충력이 좋은 제충국을 주원료로 약효시험, 약해시험, 독성시험 및 잔류성분 분석 등을 연구하여 안전하고 우수한 유기농업자재와 가축용 살충제를 개발하고 이를 통해 천연성분의 방역용 살충제와 가정용 살충제 제품을 위한 토대를 마련하고자 한다.

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

친환경농산물은 웰빙 열풍, 소득수준 향상 등으로 소비자의 수요가 지속적으로 증대되고, 농업인의 적극적 참여와 정책적 지원 등에 힘입어 짧은 기간 동안 우리 농업의 새로운 성장동력으로 자리매김해 왔다. 농진청에 의하면 유기농업자재 공시 및 품질인증 건수가 2007년 70개에서 2014년 1237개로 증가하였다. 그러나 취약한 생산기반, 부실인증에 대한 소비자 신뢰 저하 및 점검 강화에 따른 인증 취소 등으로 '12년 이후에 재배면적 및 농가 수가 감소하고 있고, 불량수입 유기농업자재 사용으로 농가피해 발생, 부적합율은 18%(농진청 보도자료 2014.7.25.)에 달하고 있다. 특히 병해충용 유기농업자재의 경우 농약성분 검출사례가 가장 많이 나타났으며, 중금속 함유량 초과가 원인인 경우도 많이 있었다. 천연물질에서 유래된 유기농업자재 개발에 있어 지원과 투자는 유기농업시장 경쟁력 향상을 위해 반드시 필요하다.

(2) 시장현황

2014년 병해충용 유기농업자재 침체로 40여 업체가 도태될 정도로 영향이 심각하다. 친환경농자재 종류가 수십종에 달해 시장규모 파악이 쉽지 않지만 2014년 말 기준 공시제품만 3500억원(2,350천톤) 정도이고, 2015년 식물영양제를 포함한 친환경농자재 시장은 평균 5% 가량 줄어든 5500억원 정도가 된 것으로 추정하고 있다. 반면 병해충관리용 유기농업자재 시장은 농약검출 등 부실인증 보도 영향에 따른 지자체 보조감소, 농산물 가격하락에 의한 살포횟수 저감 및 이상기후 여파로 병해충 발생이 줄면서 2년 연속 출하량이 최저 실적에 그쳐 2015년에는 전년대비 20% 이상 감소한 1300억 수준에 머물고 있는 단계이다. 또한, 전체 친환경농산물중 인증 출하량은 30%의 감소('14년 대비 '15년 말 기준, 친환경인증관리 정보시스템 분석)를 보이고 있으며, 저농약 인증이 2016.1.1.일부로 폐지됨에 따라 저농약 인증 농가들은 관행농업으로 복귀(63%)하거나 일부 무농약으로 전환하지만, 무농약 인증 비율도 '14년 대비 15년말 기준 약 24%가 감소하였다. 많은 부분 농산물의 가격요소도 작용하지만, 재배방법에 있어 친환경농업인들이 살충, 살균제로 사용하는 유기농업자재의 약효가 농민들의 기대에 부응하지 못하는 현실이다.

(3) 경쟁기관현황

- 유기농업자재를 생산하고 있는 업체들의 현재 시판되고 있는 제품들은 효능이 떨어져 가격대비 화학농약제품에 비해 불만이 많은 상태이다.
- 농약회사들의 화학성분 농약 제품들은 닭진드기의 방제 사용 시 달걀 내에서 살충제 잔류성분이 검출될 우려가 있어 동물약품의 제품등록에 어려움을 겪고 있다.
- 본 기술개발에서는 유기농업자재로서 버섯파리, 닭진드기 등에 천연식물을 사용한 방제제가 마땅히 없고 기존 유기농업자재의 효능을 높일 수 있는 우수한 천연 살충제로서 기존의 경쟁기관과 차별화 된 기술이라고 볼 수 있다.

(4) 지식재산권현황

- 제충국과 방아 등을 유효성분으로 함유하는 살충제 조성에 대한 지적재산권은

특히 방아(배초향) 추출물 살충제 조성물은 방아의 첨가로 인해 제충국이 갖는 살충효과가 극대화되어 해충에 대한 살충효과가 매우 우수하다. 이에 대한 살충제 조성물은 농업해충 및 위생해충의 친환경 증해자재로 유용하게 사용될 수 있어 제조 방법에 관한 특허를 실시기업인 달마시안제충국에서 출원하여 현재 등록되어 있다 (2018.11.14., 특허등록번호 1019205380000)

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 80년대 후반부터 “지속가능한 농업(sustainable agriculture)”개념이 도입되면서 환경보전 측면뿐만 아니라, 사회적/경제적 측면에서 농업과 농촌 문제의 중요성이 동시에 강조되고 있으며, 세계적으로 천연물질 14만개 및 천연신물질 4천개 성분에 대해 발굴, 개발 중이라고 한다.
- 선진국에서는 저투입 자원순환 유기농업 기술체계가 정립되어 지역 특성에 맞는 유기경종/축산 순환 작부체계가 개발되어 활용되고 있다.
- 유럽 등에서는 유기농산물 종합생산 기술개발을 위해 토양/양분 및 병해충/잡초 관리는 저투입 자원순환의 원리에 부합한 연구에 집중하고 있다.

(2) 시장현황

- 세계 유기농식품산업은 식품안전 등으로 재배면적 3750만ha, 640억달러로 연 20%정도 성장추세이다.
- 전체 경지면적 대비 호주 38%, EU 24%, 남미 20%, 아시아 9%, 북미 7% 순이고, 국가별 시장규모는 EU 222억 달러, 미국 211억 달러, 중국 19.6억 달러 순이다. 이처럼 각국이 경쟁적으로 유기농 육성정책을 펴고 있는 추세이다(2014 FIBL-IFOAM).

3. 연구개발의 중요성

(1) 국내 친환경농업용 유기농자재(천연살충제)의 필요

- 친환경농업용 살충원료의 국산화율이 전무하여, 높은 불량률에도 불구하고 수입산을 활용하여 유기농업자재 제품개발이 진행되고 있으며, 천연살충제를 연구하는 연구기관조차 국내산 자재의 연구를 기피하고 있다.
- 유기농자재 발전방향: 외부 수입자재 의존형(현재) -> 지역자원 순환형 -> 생태조화형으로 진행되고 있음(제4차 친환경농업 육성 5개년 계획 2016~2020년, 농림부).
- 유기농업자재로 현재 시판되고 있는 제품들은 효능이 떨어져 가격대비 화학농약 제품에 비해 불만이 많은 상태임.
- 가격 경쟁력을 갖추면서도 살충효과를 높일 수 있는 천연살충제의 유기농업자재의 개발이 요구됨

(2) 국내 천연식물 성분의 가축용 살충제의 필요

- 양계장에서 산란율을 저하시키고 가금티푸스 등의 질병을 전파하는 닭진드기를 잡기위해 금지된 화학 농약제품이 일부 농가에서 살충제로 사용되고 있어서 대책마련이 시급하다는 지적이 꾸준히 제기되고 있다.
- 화학성분의 농약은 달걀내에서 살충제 성분이 검출될 우려가 있어 국민들에게 먹거리 안전을 의심들게 하고 있으며 현재 대안이 없는 상태에서 농가의 단속은 농민에게 피해가 커 불만이다.
- 유기농업자재로 현재 시판되고 있는 제품들은 효능이 떨어져 가격대비 화학농약 제품에 비해 불만이 많은 상태이다.
- 가격 경쟁력을 갖추면서도 살충효과를 높일 수 있는 천연살충제의 유기농업자재 개발이 요구된다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	제충국을 이용한 친환경 살충제를 개발하여 천연바이오 소재의 유기농업자재 및 가축용 살충제(동물의약품) 제품화
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연살충 효과증진제 원료의 국산화 ○ 국내 친환경농업용 고효율의 천연식물성분로 된 해충용 유기농업자재 제품화 3건 ○ 천연식물성분의 가축용 살충제(동물의약품) 제품화 1건

2. 개발 목표 및 내용

가. 개발목표

국산 토종식물을 이용한 천연성분의 유기농업자재 제품화(3건), 관련 특허 4건, 가축용 살충제 제품 후보물질 도출 및 축용 살충제 제품 후보물질 도출

(1) 주관연구기관(한국생물안전성연구소) :

- 시제품 안전성연구

																			등)
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	건		명	건	건
가중치	10					40									10				
최종목표	4					4									3				
1차년도	2					2									2				
2차년도	2					2									1				
3차년도																			
4차년도																			
5차년도																			
소 계	4					4									3				
종료 1차년도				2		2	20								2				2
종료 2차년도				2		2	92								1				2
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
종료 5차년도																			
소 계	0			4		4	112								3				4
합 계	0			4		4	112								3				4

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

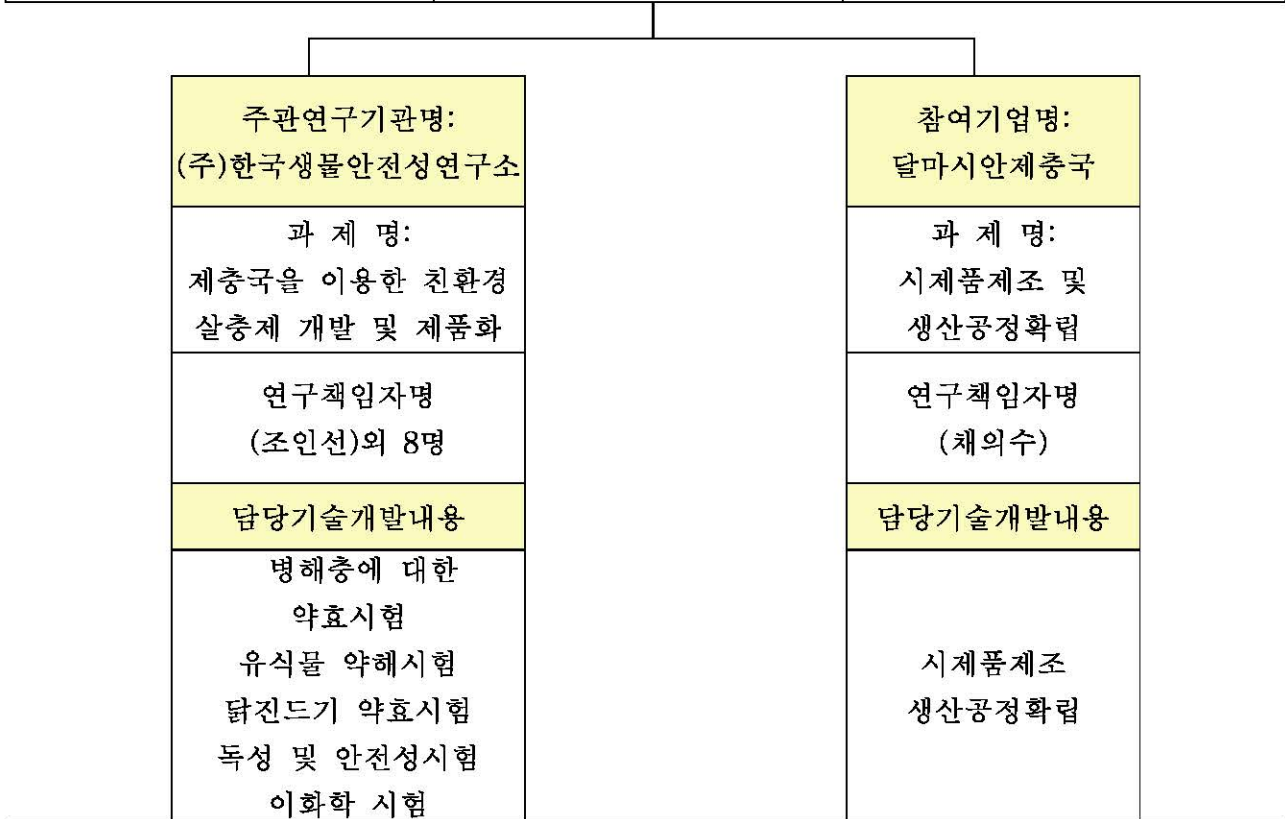
1. 연구개발 추진전략 및 방법

- 참여기업인 달마시안은 주관연구기관인 (주)한국생물안전성연구소가 연구를 진행할 수 있도록 시제품을 제조한다.
- 주관연구기관인 (주)한국생물안전성연구소는 참여기업으로부터 받은 시제품으로 작물에 대한 약해시험, 병해충 약효시험, 이화학분석, 독성의 안전성시험 실시한다.
- 이화학분석 중 일부는 자체 지정된 분석기관에 의뢰하여 실시한다.
- 참여기업은 주관기관의 연구결과를 토대로 50,000L 생산공정 구축
- 주관연구기관은 약해시험, 약효시험, 안전성 및 이화학 시험성적서를 확보하여 유기농업자재 공시를 위한 자료를 만들어 참여기업으로 하여금 유기농업자재 인증기관에 유기농업자재 공시 신청
- 최종적으로 병해충관리용 유기농업자재로 공시하여 제품화하고 참여기업에서는 생산공정을 구축하여 제품을 생산한다.

2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	제충국을 이용한 친환경 살충제 개발 및 제품화	주관연구책임자 (조인선)외 총 9명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	2	10
대학		
국공립(연)		
출연(연)		
기타		



3. 추진 일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)		
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11	
1	계획수립 및 자료조사	■													4,950	조인선
2	시제품 제조 (다양한 후보물질)	■	■	■									■		9,050	채의수 조인선
3	약효시험 및 안전성 예비시험 (후보물질)		■	■	■					■	■	■			22,200	조인선
4	유기농업자재 제품등록시험 (약해, 이화학, 독성)		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			10,050	조인선
5	유기농업자재 제품등록(2건)				■	■	■	■	■						15,150	조인선
6	가축용 살충 효능 스크리닝시험							■	■	■	■	■	■		28,800	조인선
7	독성시험 및 잔류효과시험										■	■	■	■	12,100	조인선
8	천연살충제 제형연구												■		3,050	조인선
9	학술발표 (2건)											■	■		4,650	조인선
2차년도																
1	제형연구 및 시제품 제조		■	■	■	■	■								10,000	채의수 조인선
2	문헌조사, 제품마케팅, 자료수집	■	■	■	■	■									9,050	조인선
3	약효시험 및 안전성 예비시험 (후보물질)		■	■	■	■	■			■	■	■			15,200	조인선
4	약효스크리닝, 공시등록시험				■	■	■	■	■						6,050	조인선
5	유기농업자재 제품등록(1건)							■	■	■	■	■	■		12,150	조인선
6	가축용 살충 효능시험										■	■	■		27,950	조인선
7	가정용 효력 및 잔류효과시험, 안전성시험								■	■	■	■	■		15150	조인선
8	동물약품 천연살충제 (사료첨가제) 등록									■	■	■	■		10,500	조인선
9	학술발표 (1건)											■	■		3,650	조인선

제 2 절 연구개발 내용 및 결과

1. 제제 연구

가. 원료 선정

살충제는 사람이나 농작물에 해가 되는 곤충을 죽이는 효과를 지닌 약제이다. 농작물을 재배할 때 발생하는 해충을 방제하고 작물의 생산성 향상을 위한 목적으로 사용되는 살충제의 사용에 대한 수요는 지속적으로 유지되고 있는 추세이다. 지금까지 관행적으로 사용된 화학 합성 살충제는 작물의 재배시 발생하는 병이나 해충을 방제하여 농업 생산성을 증대하는데 크게 기여한바 있다. 그러나 화학적으로 합성된 살충제의 과다사용은 토양과 수질을 오염시키는 원인이 되었고, 시설재배 환경을 오염시켜 농업인의 건강에 위협이 되고 있다. 또한, 화학합성 살충제를 이용하여 재배된 농산물의 잔류 화학성분들은 인체에도 매우 유독하여 소비자들은 합성 살충제를 사용하지 않고 재배한 안전한 먹거리를 선호하고 있다. 또한, 최근에는 농산물에 대한 안전성 문제와 토양환경 보존을 통한 지속 가능한 농업에 대한 관심이 증가하고 있고, 이러한 분위기 하에서 유기농업이 세계적으로 급격하게 확산되고 있는 실정이며, 가정용살충제, 해충기피제, 동물용살충제, 방역용살충제 또한 같은 실정이다.

또한 유기농업에 사용되는 천연 살충제는 사람이나 가축, 어패류 등에 무해하며, 환경오염과 생태계 교란의 우려가 없다는 장점 때문에 최근 많은 연구가 이루어지고 있다. 식물추출물을 이용한 천연 살충제의 사용은, 토양환경을 지속적으로 보존할 수 있고, 농작물에 대한 잔류농약의 위험성을 제거해 안전성을 확보 할 수 있는 장점이 있다. 살충제는 처리된 식물체에 살충제가 어떻게 작용하고 분산되느냐에 따라 국부효과를 갖는 잔류성 살충제와 입제 형태로 약제가 토양에 살포되어, 유효성분이 식물에 흡수되어 오랜 기간 동안 방제효과가 있는 침투성 살충제(systemic insecticide)로 나눌 수 있다. 지금까지 알려진 천연살충제들은 화학적으로 합성된 살충제에 비해 인체나 환경에 부작용이 적은 장점이 있는 반면, 해충 방제효과가 낮고, 신속한 효과를 얻기 어려운 단점이 있고, 이를 극복하기 위해 원제와 혼합되는 물의 양을 적게 하여 높은 농도에서 사용하게 되면 비용이 증가하는 단점이 발생하였다.

제충국(Insect flower, Pyrethrum, Dalmatian pyrethrum)은 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과의 여러해살이풀로서, 제충국의 꽃에는 피레트린(Pyrethrins)이라는 담적황색의 유상물질을 함유하고 있다. 피레트린은 냉혈동물, 특히 곤충의 신경계를 마비시켜 강한 살충력을 나타내지만, 사람과 같은 온혈동물에는 독성이 없는 안전한 천연 유래의 살충성분이다. 구체적으로, 피레트린은 곤충에 대한 강한 살충 작용을 지니는바 유제 외에 코일(Coil)형 모기향 등으로서 모기, 파리의 구제에 사용되고 있으며, 바퀴벌레, 벼룩, 개미 및 이와 유사한 기어 다니는 곤충에 대해서도 적용 가능한 것으로 알려져 있고, 다른 천연 살충제 성분과 혼합되어 작물보호제로 사용되고 있다.

그러나, 제충국 추출물이 카페인 보다 17배 정도 안전하고, 살충효과도 뛰어나 세계유기농업연맹(IFOAM)과 세계식품규격위원회(CODEX)에 의해 친환경유기농자재 제품에

사용가능한 친환경 농약 원제로 허가되었음에도 불구하고, 비교적 고가인 제충국 꽃 부위만을 추출하여 이용하여야 하기 때문에 발생하는 경제적인 문제점과, 살충제 원료로 충분히 제충국 꽃을 확보하기 어려운 원료수급의 문제점으로 인하여 지금까지 농업 현장에서는 제충국을 주성분으로 한 살충제의 개발이 어려운 문제점이 있었고, 지금까지는 제충국이 다른 식물성 천연살충제 성분에 혼합되는 보조성분으로 이용되고 있는 실정이다. 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙의 별표 1에서 병해충 관리를 위하여 사용이 가능한 물질인 제충국을 주원료로 선정하였다.

그리고 선행 연구에서 살충활성을 상승시키기 위하여 제충국이 갖는 살충 효과를 극대화시키는데 도움을 주는 천연성분을 찾고, 이를 통해 천연살충제의 방제효과를 증대시키기 위하여 연구 노력한 결과, 제충국에 방아(배초향)을 조합하여 살충제 조성물을 제조하고 이를 분무 형태로 살포하는 경우, 제충국이 갖는 살충효과를 대화시키는 것을 확인하고, 자소, 방아 식물추출물을 추가로 선정하였다. "자소(紫蘇, *Perilla frutescens*)"는 꿀풀과에 속하는 여러해살이풀을 의미하며, 차조기, 소엽, 소경, 소자라고도 한다. 중국 및 남부원산으로서 식용으로 또는 약용으로 재배되어 왔으며 전국 각지에서 재배하는 한해살이풀로 높이 20~70cm 정도이다. 생김새가 들깨와 유사한데 줄기와 잎이 보랏빛이 나는 점이 들깨와 구별되며, 번식력이 강하여 재배하기 쉬운 장점이 있다. 자소는 그 자체로는 살충 효과가 거의 없거나 미약하지만, 제충국과 혼합되어 사용되는 경우 제충국이 보유하고 있는 살충효과를 극대화시켜주는 일종의 효과증진제로서의 역할을 수행하게 된다. "방아(*Isodon japonicus*)"는 꿀풀과에 속하는 여러해살이풀을 의미하며, 착생 후 균락을 이루고 척박한 산야에서도 생장력이 강한 자생식물이며, 지리적으로는 동북아에 분포하고 있으며 우리나라 전 지역에서 자라는 토착 식용자원이다. 방아는 그 자체로는 살충 효과가 거의 없거나 미약하지만, 제충국과 혼합되어 사용되는 경우 제충국이 보유하고 있는 살충효과를 극대화시켜주는 일종의 효과증진제로서의 역할을 수행하게 된다. 방아와 자소추출물은 식물 조직 배양물에서도 추출이 가능하며, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 열매 등의 부위에서 추출한 추출물을 사용할 수 있다. 방아 및 자소 추출물을 세척하고 건조시킨 후, 분쇄하는 단계 및 분쇄물을 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로 추출하여 수 있으며, 증류추출, 초임계추출 등 다양한 방법으로 추출할 수 있다.

나. 원료생산 방법

달마시안제충국S1의 원료는 제충국추출물, 자소추출물이고 달마시안제충국S2는 제충국추출물과 방아추출물이다. 달마시안제충국S3의 원료는 제충국추출물, 방아와 바질추출물이고 시너지2의 원료는 차나무추출물과 방아추출물이다.

원료생산 방법과 출처는 다음과 같다. 제충국추출물(직수입/국내유통사 매입, Hopizon Sopyrwa/ Rwanda), 자소추출물과 방아추출물(자체생산 원료 직접 재배 및 농가 계약재배), 바질 오일과 차나무추출물(직수입, KANTA ENTERPRISE PVT. LTD/INDIA) 그리고 유화제(직수입, CRODA SINGAPORE PET, LTD/SINGAPORE) 이다.

다. 시제품 제조

주원료로 사용하는 제충국추출물은 유기농업자재 등록을 위한 시험항목에서 어류급성 독성이 높아서 저독성 기준인 3급(주원료 기준, LD₅₀값 > 2mg/L)을 만족시키기가 쉽지

않았다. 어독성 예비시험 결과 pyrethrin 50%를 함유하는 제충국추출물은 잉어보다는 송사리에 민감도가 떨어져서 어류급성독성 시험시 어종을 송사리를 선택하였으며 여러 차례 어독성 예비시험한 결과 주원료를 최대 4%까지 사용 가능한 것으로 확인되었다. 효과증진제로 사용되는 자소엽과 방아추출물은 원료수급과 저항성 등을 고려하여 여러 시제품 조제시 사용가능한 최대함량을 사용하였다.

시제품 4건에 대한 시험처방은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4와 같다. 달마시안제충국社에서 제조된 시험품의 초기분산성, 희석안정성, 제제안정성을 시험한 결과 안정성이 양호한 것으로 조사되었다.

[표 1] 달마시안제충국S1 시제품 시험처방

원료명	성분별 함유 내역				투입비율 (%)
	물질명 (화학명)	함유량 (%)	CAS No.	EPA list	
[주원료]					
제충국추출물	Pyrethrins	50			4
자소추출물	Dillapiol	0.079			96

[표 2] 달마시안제충국S2 시제품 시험처방

원료명	성분별 함유 내역				투입비율 (%)
	물질명 (화학명)	함유량 (%)	CAS No.	EPA list	
[주원료]					
제충국추출물	Pyrethrins	50			4
방아추출물	Estragole	0.079			96

[표 3] 달마시안제충국S3 시제품 시험처방

원료명	성분별 함유 내역				투입비율 (%)
	물질명 (화학명)	함유량 (%)	CAS No.	EPA list	
[주원료]					
제충국추출물	Pyrethrins	50			2
방아추출물	Estragole	0.099			50
바질추출물	Estragole	76			38
[유화제]					
폴리소르베이트80	Polysorbate 80	100	9005-65-6		10

[표 4] 시너지2 시제품 시험처방

원료명	성분별 함유 내역				투입비율 (%)
	물질명 (화학명)	함유량 (%)	CAS No.	EPA list	
[주원료]					
차나무추출물	Terpinen-4-ol	74.76			30
방아추출물	Estragole	0.079			70

2. 시제품의 이화학적 특성 연구

가. 유효성분 분석

시제품의 유효성분 분석은 주원료의 pyrethrins, dillapiol, estragole, terpinen-4-ol을 분석하였고, 주성분 분석시 시제품 달마시안제충국S1, 달마시안제충국S2는 한국생물안전성연구소에서 자체 분석하였고 달마시안제충국S3와 시너지2의 제품은 한국생물안전성연구소와 농업기술실용화재단에 의뢰해 분석하였다.

GC-FID 및 UPLC-UVD로 분석한 시제품 달마시안제충국S1는 pyrethrins 2.158%, dillapiol 0.080%로 분석되었다(그림 1). 달마시안제충국S2는 GC-FID 및 UPLC-UVD를 사용하여 pyrethrins 2.158%, estragole 0.081%로 분석되었다(그림 2). 달마시안제충국S3는 HPLC와 GC-MS를 이용하여 분석한 결과 pyrethrins 1.086%, estragole 24.235%로 분석되었다(그림 3, 4). 시너지2에 대한 유효성분은 GC-FID 및 GC-MS로 분석하여 terpinen-4-ol 22.21%, estragole 0.099%로 분석되었다(그림 5, 6)

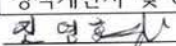
분석 결과를 종합해보면 주성분의 분석치가 원료의 주성분 함유량 대비 투입량을 계산하여 대비하면 오차범위 내로 분석되는 것으로 확인되었다.

나. 유해성분 분석

시제품의 유해성분 분석은 유기농업자재 공시에 필요한 322종 또는 360종의 농약을 분석하였고, 농약 다성분 분석은 순천향대학교 농업기술실용화재단에 의뢰하였다.

시제품의 농약 다성분을 분석한 결과는 그림 7 ~ 10과 같이 농약성분이 불검출 되는 것으로 확인되었다.

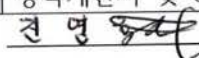
※ 그림 1

농약시료의 분석성적서				
① 의 뢰 인	성 명	달마시안 제충국	사업자등록번호	312-92-39102
	주소	충청남도 천안시 광덕면 보산원리 687-66		
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	달마시안 제충국 S1 (제충국추출물 4%+자소엽추출물 96%)		
	의뢰내용	GC-FID 및 UPLC-UVD를 이용한 성분검사		
	유효기간	-	Lot No.(제조번호)	-
③ 분석 (시험) 성적				
달마시안 제충국 S1 (제충국추출물 4%+자소엽추출물 96%)				
성분명	분석결과(단위)			
Pyrethrins (Pyrethrin I + Pyrethrin II)	2.158%			
Cinerins (Cinerin I + Cinerin II)	0.492%			
Jasmolins (Jasmolin I + Jasmolin II)	0.243%			
Dillapiol	0.080%			
※이하빈칸				
④ 첨부 자료		성적계산서 및 chromatogram 첨부		
한국생물안전성연구소 진영호 signed:		진영호  Date: June 23, 2017		

(주) 한국생물안전성연구소




※ 그림 2

농약시료의 분석성적서			
① 의 뢰 인	성 명	달마시안 제충국	사업자등록번호 312-92-39102
	주소	충청남도 천안시 광덕면 보산원리 687-66	
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	달마시안 제충국 S2 (제충국추출물 4%+방아풀추출물 96%)	
	의뢰내용	GC-FID 및 UPLC-UVD를 이용한 성분검사	
	유효기간	-	Lot No.(제조번호) -
③ 분석 (시험) 성적			
달마시안 제충국 S1 (제충국추출물 4%+자소엽추출물 96%)			
성분명	분석결과(단위)		
Pyrethrins (Pyrethrin I + Pyrethrin II)	2.158%		
Cinerins (Cinerin I + Cinerin II)	0.492%		
Jasmolins (Jasmolin I + Jasmolin II)	0.243%		
Estragole	0.081%		
*이하빈칸			
④ 첨부 자료		성적계산서 및 chromatogram 첨부	
한국생물안전성연구소 진영호 signed:		진영호  Date: June 23, 2017	

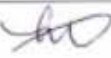
(주) 한국생물안전성연구소



※ 그림 3

발급번호 : 18-PPA-7-00128				
분 석 성 적 서				
① 의 퇴 인	성 명	달마시안 제충국	사업자등록번호	110-31-51135
	주 소	31218 충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13		
② 의 퇴 내 용	대상 물품명	달마시안 제충국 S3		
	시 험 개 요	HPLC를 이용한 성분검사		
	용 도	품질 관리		
③ 분석(시험) 성적 :				
항 목		성 적(단위)	비고	
피레스린		1.086 % 이하 여백		
<p>「농업기술실용화재단 분석시험 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2018년 08월 31일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.</p> <p style="text-align: right;">2018년 10월 08일</p> <div style="border: 1px solid red; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <p style="color: red; font-size: small;">이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">농업기술실용화재단 이사장 </p>				


※ 그림 4

분석 성적서			
① 의 뢰 인	성 명	달마시안 제충국	사업자등록번호 110-31-51135
	주소	충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66	
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	달마시안제충국 S3(제충국2%+바질38%+방아50%)	
	의뢰내용	GC-FID를 이용한 성분검사	
	용도	유기농업자재 공시등록용 유효성분 분석	
③ 분석 (시험) 성적			
바질(38%)+방아풀추출물(50%)			
성분명	분석결과(단위)		
Estragole	24.235%		
#이하빈칸			
④ 첨부자료		성적계산서 및 chromatogram 첨부	
2018년 09월 17일 한국생물안전성연구소 시험담당자 : 오 현 택 			

(주)한국생물안전성연구소



※ 그림 5

발급번호 : 18-PPA-8-00038					분석 성적서				
① 의뢰인	성명	달마시안 제충국			사업자등록번호	110-31-51135			
	주소	31218 충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13							
② 의뢰내용	대상 물품명	시너지 2							
	시험 개요	GC를 이용한 성분검사							
	용도	유기농업자재공시등록							
③ 분석(시험) 성적 :									
항 목		성 적(단위)				비고			
Terpinen-4-ol		22.21 % 이하 여백							
<p>「농업기술실용화재단 분석시험 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2018년 10월 25일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.</p> <p style="text-align: right;">2018년 11월 19일</p> <div style="border: 1px solid red; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> <p style="color: red; font-size: small;">이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로, 관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하지 수 없습니다.</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">농업기술실용화재단 이사장</p> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  </div>									

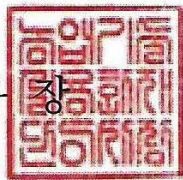
※ 그림 6

분석 성적서			
① 의뢰인	성 명	달마시안 재충국	사업자등록번호 110-31-51135
	주소	충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66	
② 의뢰내용	대상 물품명	1. 방아추출물 원료 2. 시너지 2 (차나무추출물 30%+방아추출물 70%)	
	의뢰내용	Estragole 성분검사	
	용도	유기농업자재 공시등록용 유효성분 분석	
③ 분석 (시험) 성적			
	대상물품	성분명	분석결과 (단위) 비교
	방아추출물 원료	Estragole	0.099% GC-FID
	시너지 2 (차나무추출물 30%+방아추출물 70%)	Estragole	0.099% GC-MS (㈜피캥코리아 기기 사용)
		이하여백	
④ 첨부자료	성적계산서 및 chromatogram 첨부		
2018년 11월 16일 (주)한국생물안전성연구소 시험담당자 : 오 현 택 (주)피캥코리아 시험담당자 : 장 지 례			


(주)한국생물안전성연구소



※ 그림 7

발급번호: 제 17-PPA-8-00051 호					분석 성적서				
① 의 뢰 인	성 명	달마시안 제충국		사업자등록번호	110-31-51135				
	주 소	330-921 충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66							
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	달마시안 제충국 S1							
	시 험 개 요	MS/MS를 이용한 성분검사							
	용 도	유기농자재 공시 자료							
③ 분석(시험) 성적									
성 분 명		분석결과(단위)			성 분 명		분석결과(단위)		
다성분농약(360성분)		불검출 mg/kg 이하 여백							
④ 비 고									
<p>「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2017년 05월 25일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.</p>									
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.</p> </div>					<p style="text-align: right;">2017년 05월 29일</p>				
<p>농업기술실용화재단 이사장</p>									

※ 그림 8

발급번호: 제 17-PPA-8-00052 호					분석 성적서				
① 의뢰인	성명	달마시안 제충국			사업자등록번호	110-31-51135			
	주소	330-921 충청남도 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66							
② 의뢰내용	대상 물품명	달마시안 제충국 S2							
	시험 개요	MS/MS를 이용한 성분검사							
	용도	유기농자재 공시 자료							
③ 분석(시험) 성적									
성분명		분석결과(단위)			성분명		분석결과(단위)		
다성분농약(360성분)		불검출 mg/kg 이하 여백							
④ 비고									
<p>「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2017년 05월 25일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;"> <p>이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> <p>2017년 05월 29일</p> <p>농업기술실용화재단 이사장</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>									

※ 그림 9



순천대학교

SUNCHON NATIONAL UNIVERSITY

우 57922 전남 순천시 중앙로 255 순천대학교 친환경농업센터(C2동) 104호 / 전화 (061) 750-5470,3891 / 전송 (061) 750-5454 담당부서 : 친환경농업센터 분석팀 / 분석담당 : 백대성 / 분석책임자 : 경유진

문서번호	친환경농업센터 - 1684호	제 목	잔류농약검사결과통보
반 음	달마시안 제충국	시 행 일	2018.07.11.

접수일자	2018.07.09.	접수번호	P18RM-A165
검사용도	참고용	검사결과번호	PR18RM-A158
검사 항목	농약 322 성분		

신청단체	달마시안 제충국		
신 청 인	채의수		
대상품목	달마시안 제충국 S3		
인증구분	동물용의약외품, 유기농자재 공시용	시료번호	180706
채취장소	충남 천안시 광덕면 보산원로 13 달마시안 제충국 내		

잔류농약 검사 결과 (단위 : mg/kg)					
성분명	분석결과	잔류허용기준치	성분명	분석결과	잔류허용기준치
검사 항목 농약 성분	불검출	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

위와 같이 잔류농약 검사 결과를 통보 합니다.

친환경농업센터



본 검사결과는 의뢰자가 제공한 시료에 국한하며, 소지한 전체 제품의 품질을 보증하지는 않습니다.
본 검사결과는 시험의뢰목적 이외의 광고, 선전등 상업적인 용도나 법적인 해결 용도로 사용할 수 없습니다.

표 그림 10



순천대학교 SUNCHON NATIONAL UNIVERSITY

우 57922 전남 순천시 중앙로 255 순천대학교 친환경농업센터(C2동) 104호 / 전화 (061) 750-5470,3891 / 전송 (061) 750-5454 담당부서 : 친환경농업센터 분석팀 / 분석담당 : 백대성 / 분석책임자 : 정유진

문서번호	친환경농업센터 - 1684호	제 목	잔류농약검사결과통보
받 음	달마시안 제충국	시 행 일	2018.07.11.

접수일자	2018.07.09.	접수번호	P18RM-A167
검사용도	참고용	검사결과번호	PR18RM-A160
검사 항목	농약 322 성분		

신청단체	달마시안 제충국		
신청인	채의수		
대상품목	시너지 2		
인증구분	유기농업자재 공시용	시료번호	180706
채취장소	충남 천안시 광덕면 보산원로 13 달마시안 제충국 내		

잔류농약 검사 결과 (단위 : mg/kg)					
성분명	분석결과	잔류허용기준치	성분명	분석결과	잔류허용기준치
검사 항목 농약 성분	불검출	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

위의 값이 잔류농약 검사 결과를 통보 합니다.

친 환경 농 업 센 터 장



본 검사결과는 의뢰자가 제공한 시료에 국한하며, 소지한 전체 제품의 품질을 보증하지는 않습니다.
본 검사결과는 시험의뢰목적 이외의 광고, 선전등 상업적인 용도나 법적인 해결 용도로 사용할 수 없습니다.

3. 시제품 및 원료에 대한 안전성 연구

가. 랫드에 대한 급성경구독성

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

(가) 시험물질

- ① 달마시안제충국S1
- ② 달마시안제충국S2
- ③ 달마시안제충국S3
- ④ 시너지2
- ⑤ 방아추출물(원료)

(나) 시험동물

① 시험계

- Rat : Sprague-Dawley (SD), SPF

② 공급원

- 명칭 : 한림실험동물연구소

- 소재지 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1

- 연락처 : 031-227-5955

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 인축독성시험 기준과 방법에 시험동물로 랫드를 추천하고 있으며, 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

④ 주령 및 체중범위

시험약제 투여시	1단계 (2000 mg/kg bw)	2단계 (2000 mg/kg bw)
주령(주)	8	8
체중(g)	190 ~ 210	200 ~ 220

⑤ 순화 및 검역

시험단계별로 동물을 구입한 후 1단계 및 2단계 시험은 각각 5일, 8일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

(다) 사육환경 및 관리

급성경구독성시험과 동일한 사육환경 및 조건에서 관리

본 시험의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (26 × 42 × 18 cm)에 3마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

③ 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고품사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(라) 투여약량수준설정 및 약제조제

① 투여약량수준설정

시험에 사용된 물질들이 유기농자재들의 시험한 자료들을 검토한 결과 독성이 낮을 것으로 평가되어 1단계 시험에서 최고투여약량인 2000 mg/kg bw로 투여하였고, 투여 후 72시간 동안 치사 및 일반중독증상이 관찰 되지 않아, 동일한 농도로 투여약량을 설정하여 2단계 시험을 실시하였다.

② 실험동물 수 / 개체식별

실험동물 수는 각 단계별 암컷 3마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육상자는 군식별정보를 부착하여 식별하였다.

③ 용매대조군의 설정

증류수로 시험물질을 조제하여 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

④ 용매의 선택과 시험용액 조제

- 1단계 / 2단계 시험 (2000 mg/kg bw)

시험용액은 1단계 및 2단계 시험에서 투여직전 각각 동일하게 조제하여 시험에 사용하였고, 시험용액 조제 시 용매는 2차 증류수를 사용하였으며 액상인 시험물질을 저울로 2.0 g 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

⑤ 투여액량 (volume)설정

투여액량은 5 mL/kg bw로 설정하였다.

(마) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았다.

② 투여경로 및 투여방법

랫드 경구투여용 зонде (Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내 1회에 한하여 강제 투여하였다.

(2) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

(가) 일반중독증상 및 치사동물

처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

(나) 체중측정

시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

(다) 부검

실험종료일에 모든 개체에 대하여 부검을 실시하였다.

(라) 반수치사약량 (LD₅₀) 산출

급성경구독성 시험을 독성등급법에 의해 실시하여 LD₅₀을 산출하였으며, 농약관리법 시행규칙[별표 3의5], 농약 등의 독성 및 잔류성정도별 구분에 준하여 독성을 구분하였다.

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	경구독성	LD ₅₀ 값: >2000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
달마시안제충국S2	경구독성	LD ₅₀ 값: >2000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
달마시안제충국S3	경구독성	LD ₅₀ 값: >2000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
시너지2	경구독성	LD ₅₀ 값: >2000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
방아추출물	경구독성	LD ₅₀ 값: >2000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)

나. 렫드에 대한 급성경피독성

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

(가) 시험물질

급성경구독성 시험에 사용한 시료와 동일한 물질

(나) 시험동물

급성경구독성 시험에 사용한 동일한 동물을 사용

(다) 사육환경 및 관리

급성경구독성시험의 사육환경과 동일하게 관리

(라) 투여약량수준설정 및 약제조제

① 투여약량수준설정

암수 모두 한계투여약량인 4000 mg/kg bw로 설정하여 시험을 실시하였다.

② 실험동물 수 / 개체식별

시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육 상자는 군 식별정보를 부착하여 관리하였다.

③ 용매대조군의 설정

증류수를 이용하여 시험물질을 조제하였기에 용매대조군은 따로 설정하지 않았다.

④ 용매의 선택과 시험용액 조제

시험용액 조제 시 용매는 2차 증류수를 사용하였으며 시험물질 16.0 g을 정확히 평량하여 20 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

⑤ 처리액량 (volume)설정

처리액량은 처리약량수준별 공히 5 mL/kg bw로 설정하였다.

(마) 시험물질의 투여

① 약제처리경로 및 처리방법

시험동물은 시험물질처리 하루 전에 등부위에 제모기를 이용하여 5 × 6 cm이상 크기 넓이로 제모하고, 4 × 4 cm 크기 면적의 거즈에 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모 된 부위에 Coban (self-adherentwrap, 3M 社)으로 고정 / 유지 시켰다.

② 시험물질의 제거

등부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어두었다.

(2) 관찰 및 측정 [Observation and determination]

(가) 일반중독증상 및 치사동물

처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사하였다.

(나) 체중측정

시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 실험종료일인 14일째 개체별 체중을

측정하였다.

(다) 부검

모든 시험동물에게서 특이한 중독증상 및 치사개체가 발견되지 않아 부검을 실시하지 않았다.

(라) 반수치사약량(LD₅₀) 산출

농촌진흥청고시 제 2017-26호 농약 및 원제의 등록기준에 의해 시험을 실시한 결과, 시험고시의 최고용량에서 모든 시험동물이 생존하여 시험종료 후 통계처리는 생략하였다.

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	경피독성	LD ₅₀ 값: >4000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
달마시안제충국S2	경피독성	LD ₅₀ 값: >4000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
달마시안제충국S3	경피독성	LD ₅₀ 값: >4000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
시너지2	경피독성	LD ₅₀ 값: >4000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)
방아풀추출물	경피독성	LD ₅₀ 값: >4000 mg/kg bw (농약관리법 IV급, 저독성)

다. New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성시험

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

(가) 시험물질

급성경구독성 시험시료와 동일한 물질 사용

(나) 시험동물

① 시험계 : 토끼 (New Zealand White계)

② 공급원

- 명칭 : 한림실험동물연구소
- 소재지 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1
- 연락처 : 031-227-5955

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 인축독성시험 기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

④ 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
시험동물	1.9 ~ 2.1	1.9 ~ 2.3

⑤ 순화 및 검역

동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

⑥ 균분리

균분리 시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였다.

⑦ 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

(다) 사육환경 및 관리

① 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50 × 38 × 40 cm)안에 넣어 사육하였다.

③ 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠렛사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(라) 시험물질의 처리

① 시험군의 구성

시험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였다.

② 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 처리함으로써 조제하지 않고 처리하였다.

③ 처리량 설정

처리량은 처리 군별 공히 0.5 mL로 설정하였다.

④ 처리방법

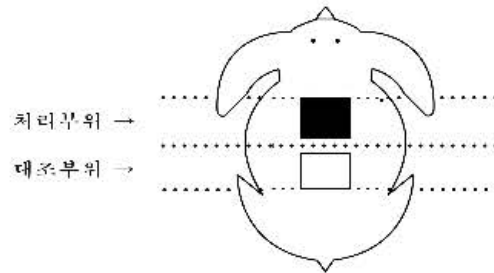
시험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부 (등부위)의 털을 15×15cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 비자극성테이프 (Tegaderm™, 3M社)와 Coban™ (self-adherent wrap,

3M社)으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

⑤ 시험물질의 제거

시험물질 처리 4시간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.

Figure 1. 피부자극성시험 부위별
처리방법



(2) 관찰 및 측정 [Observation and determination]

(가) 일반중독증상 및 치사

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

(나) 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

(다) 처리부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유·무를 관찰하였다.

(라) 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고 결과에 대한 자극성은 [피부 1차 자극표]의 자극성기준에 따라 자극성을 판정하였다.

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성	4
총가능한홍반점수	4
(2) 부종형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총가능한부종점수	4

- 피부 1차 자극표

자극성구분	기준
없 음	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 5.1 이상

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	피부자극성	P.II: 0.0 (자극 없음)
달마시안제충국S2	피부자극성	P.II: 0.0 (자극 없음)
달마시안제충국S3	피부자극성	P.II: 0.0 (자극 없음)
시너지2	피부자극성	P.II: 0.0 (자극 없음)
방아풀추출물	피부자극성	P.II: 0.0 (자극 없음)

라. New Zealand White계 토끼에 대한 안점막자극성시험

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and methods]

(가) 시험물질

피부자극성 시험과 동일한 물질을 사용

(나) 시험동물

① 시험계 : New Zealand White계 토끼

② 공급원

- 명칭 : 한림실험동물연구소

- 소재지 : 경기도 화성시 봉담읍 유리 254-1

- 연락처 : 031-227-5955

③ 시험계의 선택사유

본 시험에 사용된 New Zealand White계 토끼는 안점막자극성시험에 널리 사용되고 있으며 본 계통에 대한 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

④ 체중범위

구 분	입수시 체중 (kg)	처리시 체중 (kg)
비세척군	1.9 ~ 2.1	1.9 ~ 2.3

⑤ 순화 및 검역

동물을 구입한 후 각 5일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

⑥ 균분리

시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다.

⑦ 개체식별

사육 상자에 개체식별정보를 부착하여 식별하였다.

(다) 사육환경 및 관리

① 사육환경

본 시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 (공조기계), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 stainless steel 사육상자 (50 × 38 × 40 cm)안에 넣어 사육하였다.

③ 사료 및 음용수

사료는 토끼용 펠릿사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(라) 시험물질의 투여

① 시험군의 구성

군	동물수	좌우구분	처리
비세척군	3	좌 안	시험물질
		우 안	무처리

② 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접 투여함으로 조제하지 않고 처리하였다.

③ 투여량 설정

투여량은 투여 개체별로 0.1 mL로 설정하였다.

④ 투여방법

시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

(2) 관찰 및 측정 [Observation and determination]

(가) 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유·무를 관찰하였다.

(나) 체중 측정

시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

(다) 안반응 (眼反應)의 평가

안반응의 평가는 “안반응평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다.

(라) 자극성의 평가

안반응평가표에 의해 개체별 안자극 지수 (I.O.I., individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수 (M.O.I., mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수 (A.O.I., acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 구분하였다.

[안반응평가표]

1) 각막	
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	평점
◦ 화농이나 혼탁이 없음	0
◦ 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
◦ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
◦ 진주색갈을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨..	3
◦ 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4
(B) 혼탁된 각막의 범위	
◦ 1/4이하(그러나 0은 아니다)	1
◦ 1/4이상 1/2미만	2
◦ 1/2이상 3/4미만	3
◦ 3/4이상 1까지	4
A×B×5	
최대치 = 80	
2) 홍채	
(C) 반응치	
◦ 정상.....	0
◦ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성).....	1
◦ 빛에 대해 반응 없음, 충혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부)..	2
C×5	
최대치 = 10	
3) 결막	
(D) 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	
◦ 혈관은 정상.....	0
◦ 일부 혈관 충혈.....	1
◦ 옅은 선홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨.....	2
◦ 짙은 선홍색.....	3
(E) 결막부종	
◦ 부풀지 않음.....	0
◦ 정상보다 약간 종창(순막 포함).....	1
◦ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창.....	2
◦ 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창.....	3
◦ 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 종창.....	4

(F) 배출물

- 배출물 없음..... 0
 - 약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외)..... 1
 - 속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물..... 2
 - 눈주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물..... 3
- 점수(D+E+F) × 2
최대치 = 20

[안점막자극표]

자극성구분	기준
없 음	급성안자극지수 (A.O.I.)가 10.0 이하
경 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 10.1 ~ 30.0
중 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 30.1 ~ 60.0
강 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 60.1 이상

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	안점막자극	비세척군 A.O.I.: 13.3 (경도 자극) 세척군 A.O.I.: 3.3 (자극 없음)
달마시안제충국S2	안점막자극	비세척군 A.O.I.: 10.0 (자극 없음) 세척군 A.O.I.: 8.0 (자극 없음)
달마시안제충국S3	안점막자극	비세척군 A.O.I.: 9.3 (자극 없음)
시너지2	안점막자극	비세척군 A.O.I.: 4.0 (자극 없음)
방아풀추출물	안점막자극	비세척군 A.O.I.: 7.3 (자극 없음)

마. 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

(1)재료 및 방법 [Materials and Methods]

(가) 시험물질

- ① 달마시안제충국S1
- ② 달마시안제충국S2
- ③ 달마시안제충국S3

④ 시너지2

(나) 시험생물

① 시험생물

- 시험종 : 꿀벌 (*Apis mellifera*)
- 공급원 : (주)한국생물안전성연구소
- 주소 : 충청북도 음성군 갑곡면 성주로 362-20
- 입수일 : 2014.07.28

② 사육

- 사육장소 : (주)한국생물안전성연구소 꿀벌야외사육소
- 사육상자 : 장방형 나무소재 벌통
- 사육조건 : 당 연구소의 기존 생물군으로부터 자연 분봉된 꿀벌 세력을 꿀벌 야외사육소에서 입수일 부터 본 시험 시까지 순화 및 자연사육 하였다.
- 사육관리 : 입수 이후 동절기 (월동), 장마 기간 등 사육관리자의 판단에 의해 필요시 고농도 (60% 이상) 자당용액을 급이 하였으며, 하절기 (3월~10월)에는 월 2회 이상 벌집 내부를 점검하여 봉군의 건강상태를 확인하고, 세력이 강할 경우 분봉 등을 통하여 관리하였다.

③ 시험종의 선정이유

본 시험에 사용된 꿀벌 (*Apis mellifera*)은 환경생물독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 해당 시험가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.

(다) 시험재료 및 준비

① 시험용 용기

스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용케이지에 입구를 원통형 유리제 급식관 (직경 1 cm, 길이 5 cm 정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개를 사용하였다.

② 먹이

실험실시 전 50% 자당용액을 유리급식관에 2 mL 이상 채워 준비하였다.

③ 시험물질 노출 전 시험생물 처리

환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO₂ gas로 마취시킨 후, 어린 개체를 제외하고 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25℃±2의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다.

(라) 시험방법

① 시험약량설정

시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상된 시너지2는 주원료 투입비율 기준 100.000 µg/bee를 한계시험 약량으로 설정하였고, 달마시안 제충국S1, S2, S3는 주원료 특성 상 독성이 있을 것으로 예상됨에 따라 예비시험 후 결과에 따라 본시험 단계를 진행하였다.

② 시험용액 조제

각 시험물질의 주원료 투입비율을 기준으로 설정된 시험약량에 부합하는 시험물질을 측정된 다음, 용매(acetone)를 사용해 충분히 용해시켜 각각의 시험약량에 맞는 시험용액(test solution)을 조제하였다.

③ 시험물질 노출

케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 밀봉팩에 담아 CO₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, 조제된 시험용액을 micro applicator를 사용하여 마취된 꿀벌의 흉부(등부위)에 각각 1 µL씩 처리하였다.

④ 노출 생물수

무처리군과 음성대조군 그리고 시험물질 처리군 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다.

⑤ 대조군 설정

- 무처리군 : 마취 후 어떠한 자극도 주지 않았다.
- 음성대조군 : 시험용액 조제 시 사용된 용매를 개체 당 1 µL씩 처리 하였다.
- 양성대조군 : 가장 최근에 실시한 시험결과로 대체하였다 (Appendix 1).

⑥ 시험환경

- 기간 : 48시간
- 광주기 : 암조건 (관찰시간 제외)
- 온도 : 23.0~27.0℃
- 상대습도 : 50.0~70.0%
- 먹이공급 : 시험물질이 처리된 벌을 다시 케이지에 옮긴 후, 50% 자당용액이 들어있는 급식관을 공급하였다.

(2) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

(가) 관찰

시험물질 노출 후 4, 24시간 및 48시간 경과 시에 중독증상 및 치사 개체를 관찰하였다. 중독증상은 일반중독증상, 특이증상 등을 관찰하였으며, 치사 개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리 및 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

(나) 실내온도 및 상대습도

실험실 실내온도 및 상대습도는 시험개시부터 60분 간격으로 자동 전자 온습도 기록계 (Thermo recorder TR-72U, Thermo Scientific™, USA)를 이용하여 측정 하였다.

(다) 시험결과의 표시 및 통계처리방법

한계시험 단계에서 종료된 시험은 주원료 투입비율을 기준으로 설정한 한계시험 약량의 초과로서 24, 48시간 반수치사약량 (LD₅₀)을 표기하였고, 본시험 단계로 진행된 시험은 probit method 통계프로그램(IBM SPSS statistics ver.

20)을 사용하여 반수치사약량(LD₅₀) 및 95% 신뢰한계를 산출하였다.

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	꿀벌급성접촉독성	24 & 48hr LD ₅₀ 값: 10.287 µg/bee
달마시안제충국S2	꿀벌급성접촉독성	24 & 48hr LD ₅₀ 값: 6.741 µg/bee
달마시안제충국S3	꿀벌급성접촉독성	24hr LD ₅₀ 값: 12.200 µg/bee 48hr LD ₅₀ 값: 12.007 µg/bee
시너지2	꿀벌급성접촉독성	24 & 48hr LD ₅₀ 값: > 100 µg/bee

바. 담수어류 (송사리, *Oryzias latipes*)에 대한 급성독성시험

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

(가) 시험물질

- ① 달마시안제충국S1
- ② 달마시안제충국S2
- ③ 달마시안제충국S3
- ④ 시너지2

(나) 시험생물

- ① 시험어종 (학명) : 송사리 (*Oryzias latipes*)
- ② 시험종 선정이유

본 시험에 사용된 *Oryzias latipes*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정하였다.

③ 공급원

- 명칭 : ㈜한국생물안전성연구소 GLP연구동, 송사리 사육실
- 소재지 : 충북 음성군 감곡면 성주로 362-20
- 연락처 : Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

④ 입수일 : 2017년 08월 07일

⑤ 사육

- 사육장소 : GLP 연구동 송사리 사육실
- 사육온도 : 21.0~25.0℃
- 광조건 : 조명 16시간, 암 8시간
- 먹이급이 : 일 1회 이상 또는 주 3회 이상 Tetra Min (제일 사료)과 *Artemia*를 공급

(다) 시험방법

① 순화

- 순화장소 : GLP 연구동 어독성실험실
- 사용수조 : 시험어류의 단위체중 1 g 당 시험용수의 양이 1 L가 넘도록 24 L 용량의 수조를 사용하였다.
- 순화환경 : 순화기간동안 시험조건과 동일한 수온에서 유지되도록 하였으며, 순화중인 사육수의 용존산소량을 포화농도의 80% 이상으로 유지하기 위하여 연속폭기로 산소공급을 실시하였다.
- 순화온도 : 21.0~25.0℃
- 광조건 : 조명 16시간, 암 8시간
- 마리수 및 기간 : 독성시험에 필요한 마리수의 110%이상률 시험시작 전 7일 이상 순화하였다.
- 먹이급여 : 사육시 공급한 사료를 1일 1회 급여하였고, 시험시작 24시간 이전부터 절식하였다.

② 시험농도 및 노출 마리 수

시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상된 시너지2는 주원료 투입비율 기준 10.0 mg/L를 기초시험 농도로 설정하였고, 달마시안 제충국S1, S2, S3는 주원료 특성 상 독성이 있을 것으로 예상됨에 따라 예비시험 후 결과에 따라 본시험 단계를 진행하였다. 시험생물은 각 농도 당 10마리씩 노출하였다.

③ 시험물질의 조제

시험물질을 기초시험과 예비시험 결과를 바탕으로 주원료 투입비율에 따라 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 각 농도에 맞게 시험용액을 조제하였다.

④ 시험물질 적용방법

- 사용수조 : 6 L 용량의 시험용 수조 (원통형 유리제)
- 노출기간 : 시험물질 노출 후 96시간
- 시험용수 : 지하수를 전처리필터 (1.0 μm)와 중간필터 (0.5 μm) 또한 세균제거필터 (0.1 μm)로 정수된 지하수로 1주 이상 연속폭기하며 정체하여 사용하였다. 수온은 순화온도와 동일한 범위 (21.0~25.0℃)내로 유지되도록 하였다. 시험기간 중 수온의 변화는 $\pm 1^\circ\text{C}$ 이상 변화되지 않도록 하였다. 또한 시험용수의 용존산소량은 최소한 포화농도 60%를 유지하도록 하였다.

⑤ 시험 대조군

- 음성대조군 : 시험용수인 지하수로 음성대조군시험을 실시하였다.
- 양성대조군 : Potassium dichromate (Sigma-Aldrich, Lot.-MKBZ3208V)를 양성대조물질로 하여 100.000, 149.535, 223.607, 334.370 및 500.000 mg/L (공비 1.495)로 시험한 GLP 급성어류독성시험 결과를 적용하였다

(2) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

(가) 관찰

시험생물 투입 후 3시간 및 24시간 간격으로 96시간까지 관찰을 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유연이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

(나) 수질측정

수온과 pH 및 DO는 시험물질 처리후 시험생물 노출기간동안 1일 1회 Orion 4 star 모델로 측정하였다. 경도는 시험생물 노출 전 음성대조군에서 시험용수를 취하여 측정하였다.

(다) 전장 및 체중 측정

시험종료 후 음성대조군 및 시험물질 처리군 전 개체의 전장 및 체중을 측정하였다.

(라) 시험결과의 표시 및 통계처리방법

본시험 단계로 진행된 시험은 시험물질 투여 후 경과시간별 누적치사율을 사용하여 결과를 나타냈으며, probit method (IBM SPSS statistics version 19)를 이용하여 반수치사농도 (LC₅₀)값 및 95% 신뢰한계를 통계처리 하였다.

(3) 시험결과 [Results]

시험물질	시험항목	시험결과
달마시안제충국S1	어류급성독성시험	48hr LC ₅₀ 값: 2.923 mg/L (농약관리법 III급, 저독성) 96hr LC ₅₀ 값: 2.822 mg/L (농약관리법 III급, 저독성)
달마시안제충국S2	어류급성독성시험	48hr LC ₅₀ 값: 2.615 mg/L (농약관리법 III급, 저독성) 96hr LC ₅₀ 값: 2.380 mg/L (농약관리법 III급, 저독성)
달마시안제충국S3	어류급성독성시험	48hr & 96hr LC ₅₀ 값: 5.272 mg/L (농약관리법 III급, 저독성)
시너지2	어류급성독성시험	48hr & 96hr LC ₅₀ 값: > 10.0 mg/L (농약관리법 III급, 저독성)

사. 물벼룩 (*Daphnia magna*)에 대한 급성독성시험

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

(가) 시험물질

- ① 달마시안제충국S1
- ② 달마시안제충국S2

(나) 시험생물

- ① 시험어종 (학명) : 물벼룩 (*Daphnia magna*)
- ② 시험종 선정이유

본 시험에 사용된 *Daphnia magna*는 해당 시험법에 추천된 시험생물이며, 국내외적으로 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있어 선정하였다.

③ 공급원

- 분양원: 국립환경과학원
- 소재지 : 인천 서구 환경로 42 종합환경연구단지
- 연락처 : Tel : 043-882-0297, Fax : 043-882-0298

④ 입수일 : 2014년 01월 14일

⑤ 사육

- 사육장소 : GLP 연구동 물벼룩 사육실
- 사육온도 : 21.0~25.0℃
- 광조건 : 조명 16시간, 암 8시간
- 먹이급이 : GLP 연구동 먹이배양실에서 계대 배양한 *Chlorella vulgaris*를 주 5회 이상 급이하였다.

(다) 시험방법

① 시험생물의 노출마리 수

물벼룩의 수는 음성대조군과 시험물질 처리군의 농도수준 당 각각 10마리씩 3반복으로 노출시켰다.

② 시험물질의 조제

시험물질을 기초시험과 예비시험 결과에 따라 주원료 투입비율을 기준으로 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 각 농도에 맞게 시험용액을 조제하였다.

③ 시험환경 및 노출 조건

- 기간: 48시간
- 광주기: 16시간 광조건, 8시간 암조건
- 수온: 사육온도와 동일한 범위 (18~22℃) 내로 유지하되 ±1℃ 이상 변화되지 않도록 하였다.
- 용존산소농도: 포화산소농도의 60% 이상을 유지하였다.
- 먹이공급: 시험기간 동안 먹이를 공급하지 않았다.
- 노출방법: 지수식시험 (static system)을 하였다.
- 시험수조: 125 mL 용량의 유리 수조에 투명아크릴수지 (perspex)로 된 덮개를 해주었다.
- 시험용수: 시험용수는 M4 media (OECD guideline, No. 202, Nov. 23, 2004)를 사용하였다.
- 시험용액의 양: 10 mL 이상/물벼룩 마리

(2) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

(가) 관찰

(나) 시험생물

① 시험계 : CBA/J 마우스

② 시험종 선정이유

농촌진흥청고시 제 2018-4호 인축독성시험 기준과 방법에 CBA/J 마우스를 사용하도록 되어 있으며 CBA/J 마우스는 피부감작성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

③ 공급원

- 명칭: (주)코아텍

- 소재지 : 경기도 평택시 진위면 진위로 181-21

- 연락처 : Tel 031-611-8225

④ 순화 및 검역

동물을 구입한 후 14일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다.

(다) 사육환경 및 관리

급성경구독성시험과 동일한 사육환경 및 조건에서 관리

본 시험의 사육환경은 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기시설 (공조기), 조명시간 12시간 (오전7시~오후7시) 및 조도 200 ~ 300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자 (200×260×130 mm)안에 4마리씩 넣어 깔짚을 깔아 사육하였다.

③ 사료 및 음용수

사료는 실험동물용 고품사료 [Cargill Agri Purina Korea Inc.]를 자유 급식시켰으며 음용수는 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(라) 시험물질의 처리

① 시험군의 구성

시험물질	투여농도	성별 및 주령	동물번호
Acetone : Olive Oil	4 : 1 (v/v)	암컷, 10주령	1~4
Eugenol	25%(w/v)		1~4
Prodiamine 63% WG	2.5%(w/v)		1~4
	5%(w/v)		1~4
	10%(w/v)		1~4

② 투여농도 설정

본 시험물질에 대하여 100%(w/v), 50%(w/v), 25%(w/v), 10%(w/v),

5%(w/v)의 농도로 예비실험을 수행한 결과, 10%(w/v)에서 전신독성 및 국부적 피부자극성이 나타나지 않아 본 시험의 농도를 10(w/v), 5(w/v), 2.5%(w/v)로 설정하였다.

③ 시험물질 조제

시험물질은 처리당일 조제하였으며 액상의 시험물질을 0.05 g, 0.1 g, 0.2 g을 정확히 평량하여 acetone:olive oil (4:1 v/v)과 혼합하고 현탁시켜 2.5%(w/v), 5(w/v), 10(w/v)의 농도로 2 mL씩 조제하였다. 또한, 양성대조물질인 Eugenol 조제 시 0.5 g을 정확히 평량하여 acetone:olive oil (4:1 v/v)과 혼합 및 용해시켜 25%(w/v)의 농도로 2 mL을 조제하였다.

④ 처리량 설정

처리량은 시험가이드라인에 따라 CBA/J 마우스의 양쪽 귓등에 25 μ L를 처리하였다.

⑤ 처리방법

가. 물질처리 : 1, 2, 3일

조제한 시험물질을 CBA/J 마우스의 양쪽 귓등에 25 μ L씩 3일간 1일 1회 처리하였으며, 1일차에 체중 및 귀 두께, 3일차에 귀 두께를 측정하였다.

나. 휴지기 : 4일

시험물질을 처리하지 않았다.

다. 복강투여 : 5일

10 mg/mL로 조제된 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) 용액을 각 시험군의 모든 개체에 0.5ml씩 복강 투여하였다 (5 mg/mouse).

라. 이개립프질 적출 및 세포현탁액 준비 : 6일

각 시험군의 동물의 체중 및 귀 두께를 측정하고 국소피부반응을 관찰한 후 CO₂ 가스로 안락사하여 이개 립프질을 적출하였다. 적출한 립프질은 70 μ m nylon mesh를 이용하여 단일세포를 분리하고 총 15 mL이 되도록 PBS (1X) 에 분산시켰다.

마. 세포 증식 측정 : 6일

Cell proliferation ELISA, BrdU Kit를 이용하여 준비한 세포현탁액 당 microplate 3개 well에 100 μ L씩 넣고 세포의 고정 및 변성 후, BrdU antibody를 첨가하여 반응시키고 기질용액을 첨가하여 발색시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190)로 492 nm의 reference 파장과 370 nm의 emission 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

① 일반중독증상 및 치사동물

시험기간 동안 1일 1회 일반증상 및 치사 동물의 유·무를 관찰하였다.

② 체중측정

시험에 사용되는 모든 동물에 대하여 투여일 (처리 직전)에 체중을 측정하고

실험종료일인 6일에 체중을 측정하였다.

③ 귀 두께 측정

시험에 사용되는 모든 동물에 대하여 투여일 (처리 직전)에 체중을 측정하고 실험종료일인 6일에 체중을 측정하였다.

④ 국소피부반응 관찰

시험기간 동안 각 시험군의 모든 동물에 대하여 시험물질 처리 적용면의 국소피부반응을 관찰하였다. 국소피부반응은 [홍반점수표]를 이용하여 증상을 관찰하고 점수를 기록하였다.

[표 1. 홍반점수표]

관찰결과	점수
홍반이 없을 경우	0
매우 약한 홍반이 나타날 경우(겨우 인지될 정도)	1
홍반이 명확하게 나타난 경우	2
중증도에서 심각한 상황의 홍반	3
심각한 홍반(적홍색)에서 홍반의 등급을 매기기 어려울 정도의 가피가 생기는 수준	4

⑤ 자극지수 (SI) 산출

각 시험군의 결과는 자극지수 (SI)로 평가하였다. 자극지수는 아래의 계산식*에 따라 계산하여 산출하였으며 계산된 값을 이용하여 용매대조군의 SI 값을 1로 결정하였다. 용매대조군의 SI 값과 비교하여 시험물질 처리군의 SI 값을 산출하고 그 값이 1.6 이상일 때 시험물질을 양성으로 판정하였다.

$$* \text{ BruU labelling index} = \frac{(\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})}{\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}}}$$

ABS: Absorbance, em: emission 파장 (370 nm), ref: reference 파장 (492 nm)

(3) 시험결과 [Results]

달마시안제충국S3의 CBA/J 마우스에 대한 피부감작성시험 결과, 일반증상, 치사 및 국소피부반응이 관찰되지 않았으며, 달마시안제충국S3 2.5%(w/v), 5%(w/v) 및 10%(w/v) 처리군의 SI 지수는 0.486, 0.588 및 0.933로 산출되었고, 1.6 이하이므로 피부감작성을 유발하지 않는 물질로 판단된다.

자. 달마시안제충국S3의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

달마시안제충국S3의 닭진드기의 살충제로 동물의약품 품목등록에 필요한 안전성시험이다.

(1) 시험재료 및 방법 [Materials and Methods]

(가) 시험물질

① 물질명	달마시안제충국S3
② 입수일	2018년 06월 01일
③ 입수량	500 mL
④ 시료번호	18-3-002
⑤ 성상 및 외관	액상, 녹갈색
⑥ 주원료	제충국추출물, 방아추출물, 바질추출물
⑦ 주원료 투입비율	90% (제충국추출물 2%+방아추출물 50%+바질추출물 38%)
⑧ 보관조건	암소, 상온
⑨ 공급원	달마시안제충국

(나) 시험생물

- ① 시험계 : Chines Hamster Lung (CHL)/IU cells
- ② 시험종 선정이유

Chinese Hamster Lung(CHL)/IU cells을 시험에 사용하였으며, 이 세포주의 염색체 modal number는 “25”이며 분열주기(doubling time)는 약 12~15 시간이다.

CHL/IU 세포는 유전독성시험에 사용되며, 시험기초자료 또한 풍부하여 data의 해석 및 접근이 용이하다. 또한 “OECD Guidelines for Testing of Chemicals”의 TG 473 에서 권장하고 있어 선택하였다.

- ③ 공급원

American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 (주)바이오톡스텍이 분양받은 세포로서 (주)센트럴바이오에서 계대배양 및 냉동보관한 것을 시험에 사용하였다.

- ④ 세포주의 사용

CHL/IU 세포는 액체질소 내에 보관하였으며, 시험에 사용하는 계대수는 세포를 재생하여 30계대 미만인 세포를 사용하였다.

(다) 세포의 보존, 배양 및 형질확인

- ① 세포주의 보존 15 % FBS(Fetal bovine serum)를 함유한 Minimum Essential Medium(MEM)으로 세포 현탁액을 만든 후 10 %(v/v) 농도가 되도록 DMSO를 혼합하였다. 이 세포 혼합액을 멸균 바이알에 분주하고 isopropanol이 채워진 냉동용 freezing tank에 꽂아 초저온 냉동고(-70 ± 10 °C)에 보관한 후 다음날 액체질소 탱크 내에서 장기 보관하였다.

- ② 세포주의 배양

배양액은 1 %(v/v) 비율의 Penicillin-Streptomycin 용액(P/S) 및 10 % 비율의 FBS가 첨가된 MEM을 사용하였으며, 배양 환경은 포화수증기 및 5 % CO₂가 공급되는 37 °C 배양기에서 배양하였다. 매 2 ~ 3 일마다 0.1 %

trypsin 용액을 이용하여 세포를 분리 및 계대배양하였다.

③ 세포주의 형질확인

CHL/IU 세포주는 염색체 modal number, 세포증식률(doubling time) 및 핵형분석(karyotyping), 미생물(mycoplasma) 오염 여부 등을 확인하여 세포주 형질이 양호하게 유지되고 있는 세포주를 시험에 사용하였다.

④ S9 Mix의 구성

S9 Mix는 S9 fraction과 보조인자를 혼합하되 S9 fraction의 농도가 10 %가 되도록 혼합하여 조제하였다. 조제한 S9 Mix는 차가운 상태를 유지하면서 사용하였다. S9 Mix는 0.5 mL/5 mL Total volume/T-25 flask로 처리하여 최종 시험배지에서 1 %(v/v) 농도로 사용하였으며, 효소활성여부는 B[a]P의 돌연변이 유발로 확인하였다.

Composition of S9 Mix		mL (Final concentration)	
S9 fraction		1	(10 % v/v S9)
Cofator	0.4 mol/L MgCl ₂	0.2	(8 μmol/mL)
	1.65 mol/L KCl	0.2	(33 μmol/mL)
	1.0 mol/L glucose-6-phosphate	0.05	(5 μmol/mL)
	0.1 mol/L NADPH	0.4	(4 μmol/mL)
	0.1 mol/L NADH	0.4	(4 μmol/mL)
	0.2 mol/L sodium phosphate buffer(0.2 M SPB, pH 7.4)	5.0	(100 μmol/mL)
	Purified water	2.75	
Total volume		10	

(라) 시험물질의 처리

① 처리농도결정시험

본시험의 최고농도설정을 위하여 대사활성계 적용 및 비적용 6시간 처리군(6+S9 및 6-S9)과 대사활성계 비적용 24 시간 처리군(24-S9)에 대하여 시험물질 최고농도는 2000 μg/mL로 설정하고 공비 2 이 되도록 희석하여 6 단계 농도(62.5, 125, 250, 500, 1000 및 2000 μg/mL)로 설정 한 후 실험을 수행하였으며, RICC 값 산출을 통한 IC50 값을 확인하였다. 음성대조군 및 시험물질 처리군으로 구성하여 각 농도당 1 개의 플라스크로 시험을 실시하였으며, 혼탁이나 침전의 생성유무 및 세포독성(RICC, Relative Increase Cell Count)을 확인하였다.

② 본시험

본시험의 처리농도는 처리농도결정시험의 결과를 토대로 대사활성계 적용 6시간 처리군(6+S9)과 대사활성계 비적용(-S9) 6시간 처리군 및 24 시간 처리군에서 세포독성이 관찰되어 세포독성 지표에서의 55 ± 5 % 의 감소를 나타내는 농도를 최고농도로 설정하였다. 최고농도로부터 공비 3 이 되도록 4 단계로 희석하여 농도를 설정하였으며 염색체이상 유무를 관찰하였다. 음성대조군 및 양성대조군을 구성하여 각 농도당 3 개의 플라스크로 시험을 실시하였으며, 2 개의 플라스크는 검체 제작용으로, 1 개의 플라스크는

세포독성 확인 시에 사용하였다. 본시험에서의 시험물질 설정농도는 아래 표와 같았다.

시험물질 처리시간	S9 Mix	설정농도 (µg/mL)
6	+	17.8, 53.3, 160, 480
6	-	11.9, 35.6, 106.7, 320
24	-	11.1, 33.3, 100, 300

(2) 염색체이상의 계수 및 결과의 표시

① 염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의하여 수행하였다.

② 각 플라스크로부터 제작한 2 매의 검체를 코드화한 후, 농도당 300 개(슬라이드 당 150 개)의 중기분열상 세포(이하 '중기상')를 대상으로 1000 배의 배율에서 염색체이상을 계수하였다.

③ 동원체 수가 23~27 개인 중기상에 대하여 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수를 기록하였다. 염색체이상은 크게 염색체형 이상 및 염색분체형 이상을 절단 및 교환으로 분류해 계수하였으며, 그 수와 출현빈도는 각각 gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 명시하였다.

④ 구조적 이상의 유무에 관계없이 동원체의 수에 따라 배수체(polyploidy, $38 \leq$ 동원체) 및 내재복제(endoreduplication)의 수를 구조적 이상과 별도로 기록하였다.

(3) 시험결과 [Results]

본시험 결과, 대사활성계 적용 6시간 처리군의 시험물질에 따른 이상중기상 발현빈도는 0.7~1.3%, 대사활성계 비적용 6시간 처리군의 시험물질 처리에 따른 이상중기상 발현빈도는 1.3~2.3%, 24시간 처리군의 이상중기상 발현 빈도는 0.7~2.3%로 확인되었다. 모든 처리군은 음성대조군 historical data의 95% 신뢰한계범위에 포함되었다. 반면, 모든 처리군의 양성대조군은 음성대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가가 확인되었다. 이상의 결과로 달마시안제충국S3는 본 시험 조건하에 CHL/IU 세포를 이용한 염색체이상시험에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

4. 시제품의 성능시험

가. 달마시안제충국S2의 닭진드기에 대한 야외 약효시험 및 안전성시험

(1) 시험물질

- ① 물질명 : 달마시안제충국S2
- ② 제조일 : 2017년 07월 26일
- ③ 제품용량 : 500 mL
- ④ 공시등록번호 : 공시-1-5-048
- ⑤ 외관 및 색상 : 액상, 녹색
- ⑥ 주원료 : 제충국추출물, 식물추출물 (방아)
- ⑦ 주원료 투입비율 : 100% (제충국추출물 4%+방아추출물 96%)
- ⑧ 보관조건 : 냉장소
- ⑨ 공급원 : 달마시안 제충국

(2) 시험계

- ① 시험생물 : 양계장 닭
- ② 명칭 : 계룡농장 (충남 천안시 직산읍 판정리 144-1)
호성농장 (충남 천안시 동남구 풍세면)

(3) 약제처리방법 I (계룡농장)

- ① 약제처리 : 달마시안 제충국 S2를 500배 희석하여 사육케이지 및 사육중인 닭에게 약제처리를 충분히 하였다.
- ② 살충효과 : 약제처리한 후 수건 4개를 처리한 시설과 약제처리하지 않은 케이지에 각각 4개씩 무작위로 묶어두고 24시간 이후에 수거하여 개체 수를 측정하였다.
- ③ 달걀잔류 : 약제처리한 후 다음날 1일째, 2일째 및 3일째에 산란한 달걀을 수거하여 제충국의 주요 성분인 pyrethrins 등 6성분의 분석을 실시하였다.



(4) 약제처리방법 II (호성농장)

- ① 약제처리 : 달마시안 제충국 S2를 500배 희석하여 5마리의 닭 입안과 사료에 충분히 약제를 살포하였다.
- ② 달걀잔류 : 약제처리한 후 다음날 1일째, 2일째 및 3일째에 산란한 달걀을 수거하여 제충국의 주요 성분인 pyrethrins 등의 분석을 실시하였다.

닭 입안에 약제처리



닭 몸통에 약제처리



사료에 살포



달걀 수거 (1~3일)



(4) 달걀내 제충국 주요성분 pyrethrins 등의 분석

Sample preparation of Pyrethrins in eggs using QuEChERS

- ① sample homogenization
- ② 균질화된 달걀 10 g 1% acetic acid in ACN 10mL
- ③ 1분 handshaking
- ④ add extraction salt kit
- ⑤ 1분 handshaking
- ⑥ 3000 rpm 5분 centrifuge

거하여 pyrethrins 등 6가지 성분을 분석한 결과 동일하게 모든 달걀에서 제충국의 주요성분인 pyrethrins 등의 지표 성분이 검출되지 않았다.

표 2) 달마시안 제충국 S2의 달걀에 대한 잔류성분 분석결과

달걀 샘플 수거일 (경과일수)	제충국의 주요성분 Pyrethrin 등 검출량 (mg/L)	
	계룡농장	호성농장
1	ND ^{a)}	ND
2	ND	ND
3	ND	ND

a) Not Detect (검출한계: 0.01 mg/L)

이상의 시험결과, 달마시안제충국S2의 닭진드기에 대한 효과는 유의하게 살충효과 있는 것으로 나타났으며 달걀에 대한 잔류성분 분석결과 제충국의 주요성분들은 잔류되지 않는 것으로 판단되어 식품에 안전한 것으로 판단된다.

나. 달마시안제충국S3의 닭진드기에 대한 야외 약효시험 (실내시험)

(1) 시험물질

- ① 물질명 : 달마시안제충국S3
- ② 제조일 : 2018년 06월 01일
- ③ 제품용량 : 500 mL
- ④ tlfyqjsggh : 18-3-002
- ⑤ 외관 및 색상 : 액상, 녹갈색
- ⑥ 주원료 : 제충국추출물, 방아추출물, 바질추출물
- ⑦ 주원료 투입비율 : 90% (제충국추출물 2%+방아추출물 50%+바질추출물 38%)
- ⑧ 보관조건 : 암소, 상온
- ⑨ 공급원 : 달마시안 제충국

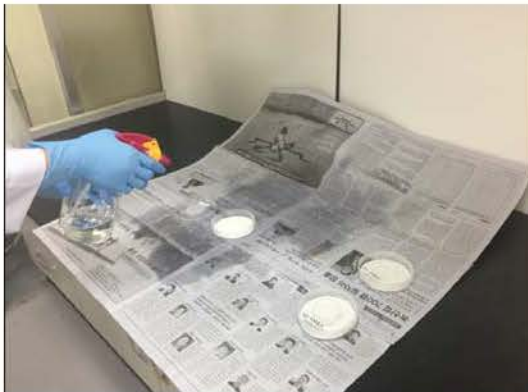
(2) 시험계

- ① 시험생물 : 닭진드기
- ② 명칭 : K&P Egg Farm (충남 천안시 동남구 동산행암길 131-19)

(3) 약제처리방법

- ① 약제처리 : 달마시안 제충국 S3을 250, 500 및 100배 희석하여 각 20마리씩 와 구모가 들어 있는 페트리디쉬에 5초간 약제처리를 충분히 하였다(온도 25~27℃, 습도 50~70%).
- ② 살충효과 : 약제처리한 후 24시간 및 48시간 후 닭진드기의 생존 수를 관찰하여 효과를 산출하였다.

약제처리



약제 처리한 전체 시험군



(4) 관찰 및 측정 [Observation and Determination]

- ① 관찰 : 닭진드기인 와구모의 생존 개체 수를 24시간과 48시간에 개체 수를 측정하였다.
- ② 살충효과 표기 : 음성대조군과 비교하여 치사한 개체에 대한 살충효과를 산출하였다.

(5) 시험결과 [Results]

닭진드기에 대한 살충효과를 알아보기 위하여 달마시안제충국S3를 증류수로 250, 500 및 100배 희석한 후 각 20마리씩 닭진드기가 들어 있는 페트리디쉬에 5초간 약제처리를 실시한 살충효과 시험결과는 다음과 같다.

표 1) 달마시안 제충국 S3의 닭진드기^{a)}에 대한 살충효과

희석배수	시간 (hr)	생존개체 수 (각 20마리)			평균 생존개체 수	효능평가 평균(%)
		1	2	3		
무처리	24	20 ^{b)}	19	20	20	-
	48	20	17	18	18	-
1000배	24	4	0	2	2	90
	48	2	0	1	1	95
500배	24	0	3	5	3	87
	48	0	2	0	1	97
250배	24	0	0	0	0	100
	48	0	0	0	0	100

a) K&P Egg Farm

b) 약제 24 및 48시간 후 생존한 와구모 개체 수

살충효과는 24시간에 모든 약제처리군에서 80% 이상 효과가 있는 것이 확인되었고 48시간에서는 90% 효과를 나타냈으며 250배 희석농도에서는 24시간에도

100% 효과가 있는 것으로 확인되었다. 500배와 1000배 희석한 농도군에서는 효과 시험의 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

다. 목화진딧물 약제방제 효과시험

(1) 시험방법

(가) 농촌진흥청 고시'농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법'에 준함.

(나) 대상해충: 목화진딧물(*Aphis gossypii*)

(다) 시험작물(품종): 수박(브라보)

(라) 대상충해 발생상황: 수박 목화진딧물의 약제처리 전 무처리 밀도는 233.3마리로 약효를 검정하기에 충분하였음.

(마) 처리내용

시험약제	주원료 투입량 (%)	약효시험		의뢰회사
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	
달마시안제충국S1	제충국추출물 4 자소추출물 96	1,000배	다발생기 경엽처리 (9/4)	달마시안 제충국
달마시안제충국S2	제충국추출물 4 방아추출물 96	1,000		
무처리	-	-	-	-

(바) 경종개요 : 시설재배. 비닐멀칭. 2017년 6월 30일 200×45cm로 정식하였음. 시험기간 동안에 타 살충제는 살포하지 않았음.

(사) 시험구배치 및 면적: 난괴법 3반복

구분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약효	3	3	9	10m ²	90m ²	90m ²

(아) 약제살포 전후 기상상황: 효·약해에 영향을 미칠만한 기상변화는 없었음 (시설하우스).

(2) 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효시험	생충률	3회	9/4, 9/7, 9/11	약제처리 전 및 약제처리 3, 7일 후 구당 20엽에 대한 생충수 조사

(3) 시험성적

(가) 약효시험

① 수박 목화진딧물에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 3일차)

시험약제	약제처리전 밀도(마리)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
달마시안제충국S1	230.7	62.6	66.5	62.7	63.9	b	49.6
달마시안제충국S2	237.7	55.5	63.2	70.7	63.1	b	50.3
무 처 리	233.3	131.0	126.4	123.4	126.9	a	

C.V.(%) ----- (7.1)

② 수박 목화진딧물에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 7일차)

시험약제	약제처리전 밀도(마리)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
달마시안제충국S1	230.7	92.1	105.4	101.3	99.6	b	37.9
달마시안제충국S2	237.7	105.0	99.1	108.5	104.2	b	35.0
무 처 리	233.3	170.2	159.9	150.9	160.3	a	

C.V.(%) ----- (7.3)

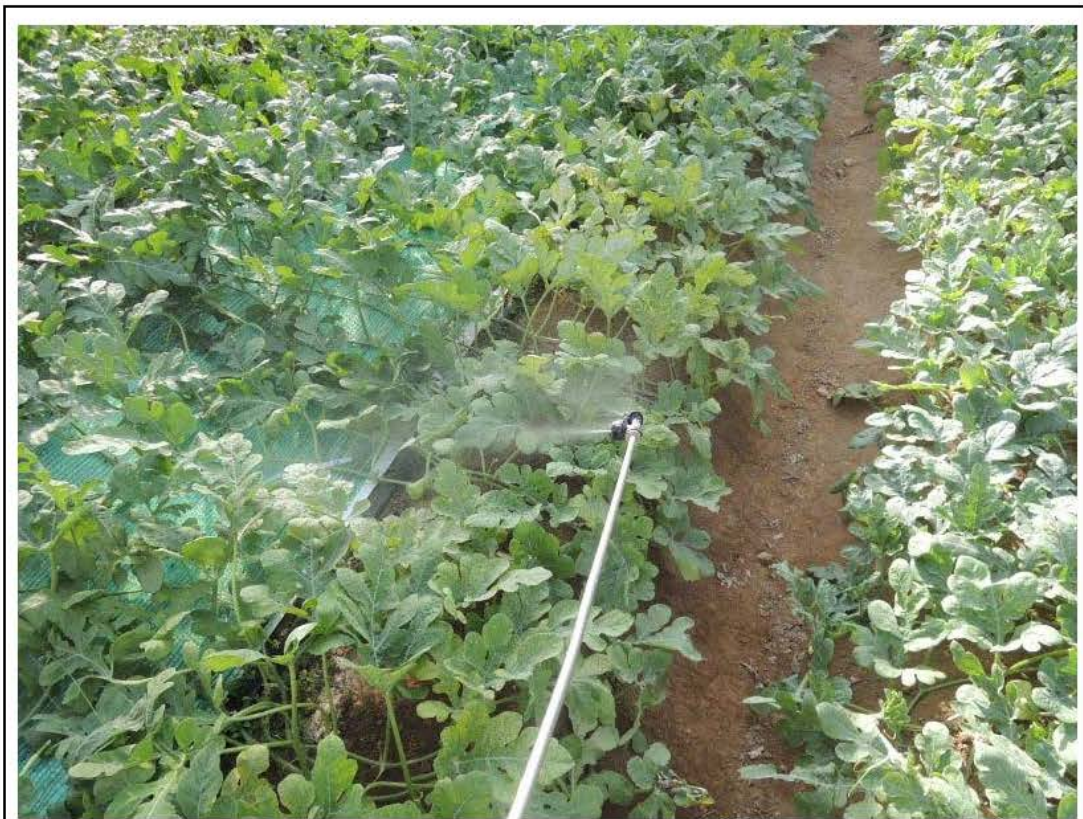
(4) 결과요약

시험 의뢰된 달마시안제충국S1과 S2의 방제가 35.0% 이상의 방제효과를 보였음.

■ 수박 목화진딧물 약제방제 효과시험 시험포장



시험포장 전경



약제살포 전경

■ 수박 약해조사 (약제처리 후 3, 5, 7일차)

 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 기준량 3일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 기준량 5일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 기준량 7일차</p>
1-기준량 3일차	1-기준량 5일차	1-기준량 7일차
 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 배량 3일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 배량 5일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 배량 7일차</p>
1-배량 3일차	1-배량 5일차	1-배량 7일차
 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 기준량 3일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 기준량 5일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 2 기준량 7일차</p>
2-기준량 3일차	2-기준량 5일차	2-기준량 7일차

■ 수박 복화진딧물 약해조사 (약제처리 후 3, 5, 7일차)

 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 2 배량 3일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 2 배량 5일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 2 배량 7일차</p>
2-배량 3일차	2-배량 5일차	2-배량 7일차
 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 무처리 3일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 무처리 5일차</p>	 <p>시험명 수박 목화진딧물 시험번호 GET1708-01 무처리 7일차</p>
무처리 3일차	무처리 5일차	무처리 7일차

라. 복수박에 대한 약해시험

(1) 시험방법

(가) 농촌진흥청 고시'농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법'에 준함.

(나) 시험작물(품종): 수박(꼬꼬마2호)

(다) 처리내용

시험약제	주원료 투입량 (%)	약효 시험			의뢰 회사
		기준량	배 량	처리방법	
달마시안제충국S1	제충국추출물 4 자소추출물 96	1,000배	500배	경엽처리 (10/13)	달마시안 제충국
달마시안제충국S2	제충국추출물 4 방아추출물 96	1,000배	500배		
무 처리	-	-	-		

(라) 경종개요 : 9월 22일 파종하였으며, 파종 18일 후 컵포트에 정식하였음 (10/10). 시험약제는 정식 3일 후, 복수박 본엽 2엽(온실 조건)시 처리하였음.

(마) 시험구배치 및 면적 : 완전임의배치법 3반복

구 분	처 리 수	반 복 수	총 구 수	구당pot	소요pot
약 해	5	3	15	5pot	75pot

(바) 약제살포 전후 기상상황: 효·약해에 영향을 미칠만한 기상변화는 없었음 (시설하우스).

(2) 조사방법

구 분	조사횟수	조사일자	조 사 방 법
약해시험	3회	10/16, 10/18, 10/20	약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무 3회 달관조사

(3) 시험성적 (약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
달마시안제충국S1	수박 (꼬꼬마2호)	0	0	약해없음
달마시안제충국S2		0	0	약해없음

(4) 결과요약

시험 의뢰된 달마시안제총국S1과 S2는 수박(꼬꼬마2호)에 대하여 기준량, 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

■ 복수박에 대한 약해시험 시험포장 전경



시험포장 전경(복수박)



약제살포 전경(복수박)

■ 참고자료

복수박 약해조사(약제처리 후 3, 5, 7일차)



■ 참고자료



2-배양 3일차

2-배양 5일차

2-배양 7일차



무처리 3일차

무처리 5일차

무처리 7일차

마. 시제품별 약해시험

(1) 시험방법

(가) 농촌진흥청 고시‘농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법’에 준함.

(나) 시험작물(품종):

- 고추, 배추, 벼, 상추, 오이 (달마시안제충국S1, 달마시안제충국S2)
- 고추, 배추, 콩, 상추, 오이 (달마시안제충국S3, 시너지2)

(다) 처리내용

시험약제	주원료 투입량 (%)	약효 시험			의뢰 회사
		기준량	배 량	처리방법	
달마시안제충국S1	제충국추출물 4 자소추출물 96	1,000배	500배	경엽처리 (10/13)	달마시안 제충국
달마시안제충국S2	제충국추출물 4 방아추출물 96	1,000배	500배		
달마시안제충국S3	제충국추출물 2 방아추출물 50 바질추출물 38	500배	250배		
시너지2	차나무추출물 30 방아풀추출물 70	1,000배	500배		
무 처리	-	-	-		-

(3) 시험성적 (약제처리 3, 5, 7일 후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
달마시안제충국S1	고추, 배추, 벼,	0	0	약해없음
달마시안제충국S2	상추, 오이	0	0	약해없음
달마시안제충국S3	고추, 배추, 콩,	0	0	약해없음
시너지2	상추, 오이	0	0	약해없음

(4) 결과요약

시험 의뢰된 달마시안제충국S1, 달마시안제충국S2, 달마시안제충국S2, 시너지2 는 고추, 배추, 벼, 콩, 상추, 오이 등에 대하여 기준량, 배량에서 외관상 나타난 약해증상은 없었음.

5. 제품화

가. 대량생산 공정 구축

(1) 원료 확보

(가) 제충국 추출물 (pyrethrins 50%)

- ① 생산지 : Rwanda
- ② 제조사 : Hopizon Sopyrwa

(나) 방아 추출물

- ① 생산지 : 국내
- ② 제조사 : 달마시안 제충국 자체 재배 (또는 농가) 및 자체생산

(다) 자소 추출물

- ① 생산지 : 국내
- ② 제조사 : 달마시안 제충국 자체 재배 (또는 농가) 및 자체생산

(라) 바질 추출물

- ① 생산지 : INDIA
- ② 제조사 : KANTA ENTERPRISE PVT. LTD

(리) 차나무 추출물

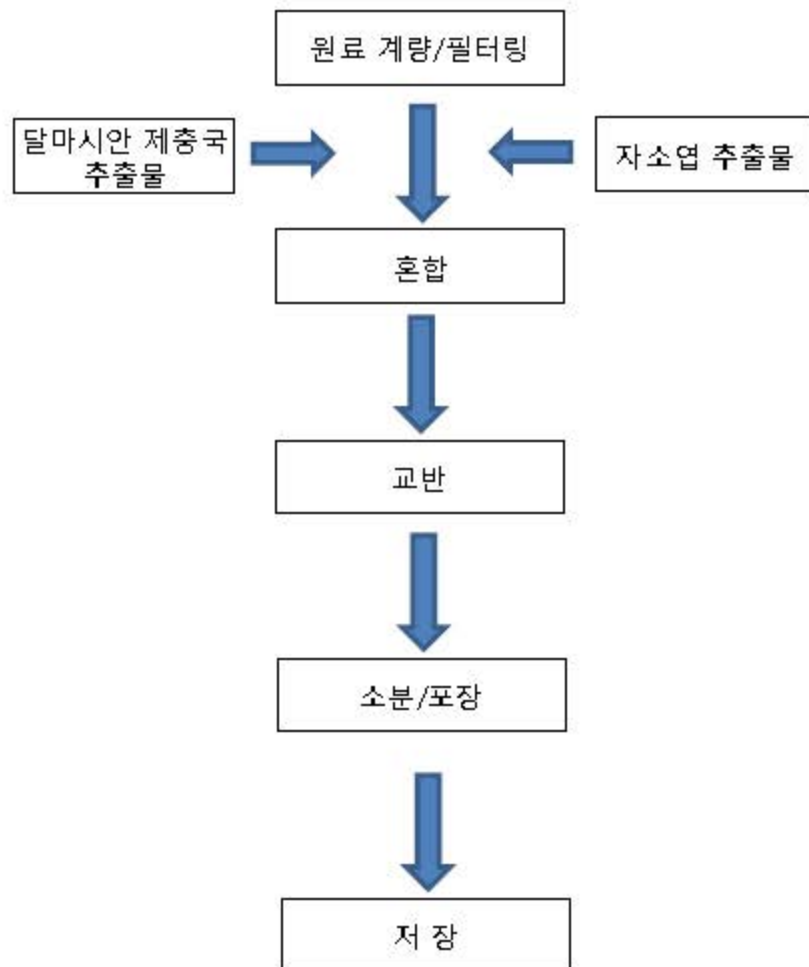
- ① 생산지 : INDIA
- ② 제조사 : KANTA ENTERPRISE PVT. LTD

(마) 유화제

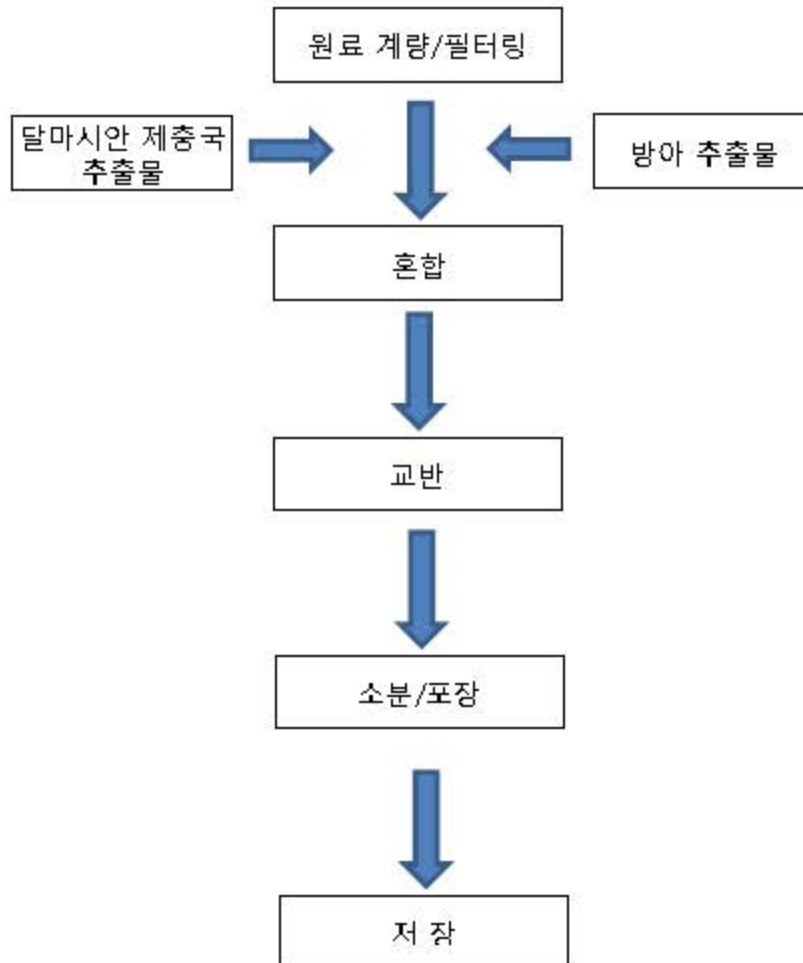
- ① 생산지 : SINGAPORE
- ② 제조사 : CRODA SINGAPORE PET, LTD

(2) 제조공정

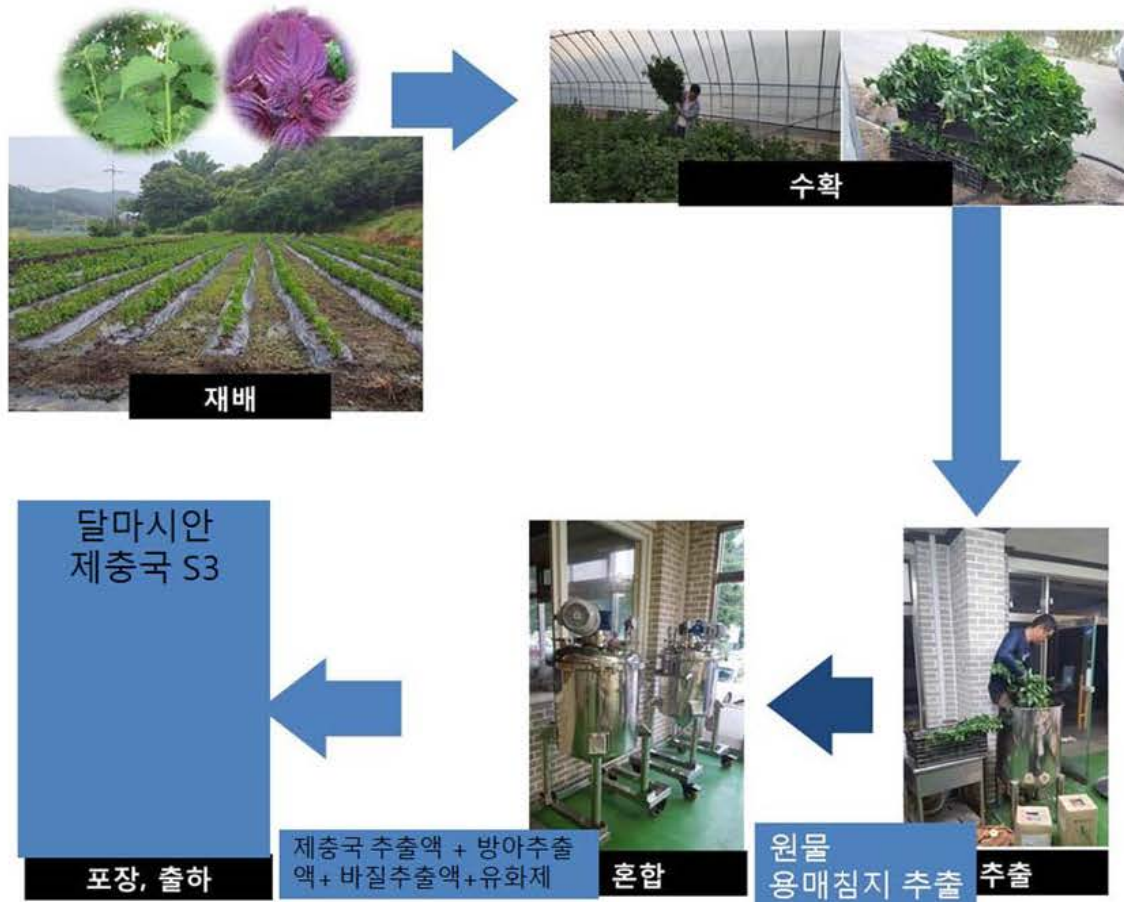
(가) 달마시안제총국S1 제조 공정도



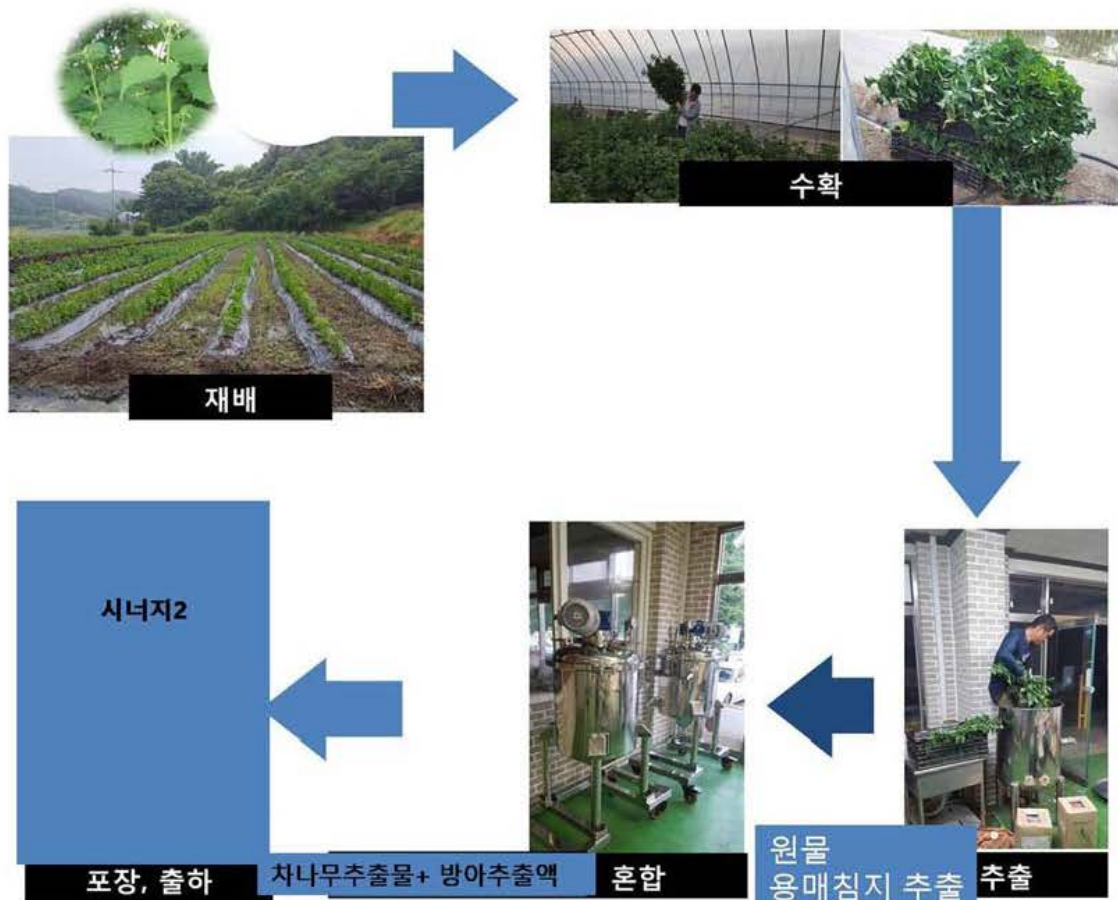
(나) 달마시안계총극S2 제조 공정도



(다) 달마시안제충국S3 제조 공정도



(라) 시너지2 제조 공정도



(3) 품질관리

(가) 원료 품질관리

- ① 제충국추출물 : 제조사의 제품성적서로 품질 확인, 유효성분은 pyrethrins 분석 및 다성분농약 분석 (원료 입고시 / 연간 1회 이상 실시)
- ② 자소엽추출물 : 유효성분은 dillapiol 분석 및 다성분농약 분석 (원료 입고시 / 연간 1회 이상 실시)
- ③ 방아풀추출물 : 유효성분은 estragole 분석 및 다성분농약 분석 (원료 입고시 / 연간 1회 이상 실시)
- ④ 차나무추출물 : 제조사의 제품성적서로 품질 확인, 유효성분은 terpinen-4-ol 분석 및 다성분농약 분석 (원료 입고시 / 연간 1회 이상 실시)
- ⑤ 바질추출물 : 제조사의 제품성적서로 품질 확인, 유효성분은 terpinen-4-ol 분석 및 다성분농약 분석 (원료 입고시 / 연간 1회 이상 실시)
- ⑤ 보조제 : 제조사의 제품성적서로 품질 확인

(나) 제품 품질관리

- ① 유효성분 : 제충국추출물, 자소엽추출물, 방아추출물, 차나무추출물, 바질추출

물 - 농업기술실용화재단에 의뢰하여 연간 1회이상 실시

② 농약다성분 : 농약 360종에 대한 성분 검사 - 시험인증기관에 의뢰하여 연간 1회이상 실시 (농업기술실용화재단, 순천향대학)

③ 물성검사 : 색상, 비중 등 - 제품생산시 자체 검사

나. 유기농업자재 공시

본 연구개발의 결과물인 시제품의 상표를 각각 “달마시안제충국S1”, “달마시안제충국 S2”, “달마시안제충국S3”, “시너지2”로 명명하고 시제품의 생산계획서, 원료의 특성에 관한 자료, 제조공정 및 품질관리에 관한 자료, 원가계산서, 원료공급증명서와 본 연구개발 수행으로 확보된 유효성분 및 유해성분 분석성적서, 시제품의 인축·환경독성 시험성적서, 시제품의 약효·약해 시험성적서를 준비하여 농업기술실용화재단에 병해충관리용 유기농업자재로 공시를 신청하여 유기농업자재 공시서를 교부받았다.

6. 동물약품 (닭진드기 살충제) 개발을 위한 야외임상·효능시험연구

가. 달마시안제충국 S3의 닭진드기에 대한 안전성시험

본 연구개발의 결과물인 “달마시안제충국S2”, “달마시안제충국S3”를 가지고 시제품의 인축·환경독성 시험을 통해 인체위해성 및 환경위해성을 평가한 결과 화학제품의 닭진드기에 비해 매우 안전한 것으로 확인되었다. 특히 “달마시안제충국S3”는 유기농업자재 공시등록을 위해 급성경구, 급성경피, 안점막자극성, 피부자극성, 어류급성, 꿀벌급성 외에도 유전독성 (포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험)과 피부감작성시험을 추가로 실시하여 인체에 유해하지 않다는 시험결과를 확인할 수 있었다. 또한, 주원료로 사용되는 방아풀추출물에 대한 급성경구, 급성경피, 안점막자극성 등을 추가로 실시하여 역시 원료에도 문제가 없는 것을 확인하였다.

“달마시안제충국S3”를 사용해서 실내에서 닭진드기에 대한 살충효과를 알아보기 위하여 증류수로 250, 500 및 1000배 희석한 후 각 20마리씩 와구모가 들어 있는 페트리디쉬에 5초간 약제처리를 실시한 살충효과에서 가장 낮은 1000배 희석한 낮은 농도에서도 효능평가가 90% 이상 유의하게 있는 것으로 관찰되었다. 또한, 야외에서 실시한 “달마시안제충국S2”의 예비 야외임상·효능시험에서 효과가 우수할 뿐 아니라 달걀을 수거하여 0, 1, 3일째에 달걀을 수거하여 제충국의 주성분인 pyrethrins에 대한 잔류성분을 LC-MS/MS로 분석을 실시한 결과 지표성분이 전혀 검출되지 않았다.

따라서 제충국을 이용한 천연 닭진드기 살충제를 동물약품으로 개발하기 위해서 필수적으로 제출해야하는 급성경구, 급성경피, 안점막자극성, 피부자극, 피부감작성, 유전독성 등 안전성에 대한 모든 시험항목을 실시하여 시험성적서를 확보하였다. 뿐만아니라 야외 임상·효능시험연구를 하기 위한 실내 및 예비시험 성적도 확보하였으며 임상시험을 수행할 수 있는 수의학 박사인 호서대학교 정상희 교수팀과 연구계약을 하여 “달마시안제충국S3의 닭진드기에 대한 야외임상효능시험연구” 계획서를 작성하여 농림축산검역본부에 제출하였다.

나. “달마시안제총국S3의 닭진드기에 대한 야외임상효능시험연구” 계획서 내용 일부



Biomedical Science Research Institute
Hoseo University, 20, Hoseo-ro, 79 beon-gil
Baebang, Asan, KOREA, 31499
Tel: +82-41-540-9675, Fax: +82-41-540-9829

호서대학교 바이오의과학연구소
우 31499 충남 아산시 배방읍 호서로 79번길 20
전화: 041-540-9675 전송: 041-540-9829

연구 계획서

달마시안제총국 S3의
닭진드기에 대한 야외임상·효능시험연구

2018 년 10월

호서대학교 바이오의과학연구소

호서대학교 산학협력단



개 요

- 제 목 달마시안제충국 S3의 닭진드기에 대한 아외 임상·효능시험연구
- 의뢰자 (주) 한국생물안전성연구소
(27600) 충북 음성군 갑곡면 성주로 362-20
Tel:043-882-0296, Fax: 043-882-0298
- 연구기관 호서대학교 바이오의과학연구소
(31499) 충청남도 아산시 배방읍 호서로 79번길 20
Tel: 041-540-9675, Fax: 041-540-9829
- 연구책임자 정상희(DVM, PhD, 교수)
호서대학교 임상병리학과
호서대학교 바이오의과학연구소
- 연구담당자 민정란(DVM, 연구원), 이창훈(연구원), 이주현(연구원),
김기훈(연구원), 허재석(연구원), 김선결(연구원)
- 연구기간 임상시험계획서 승인 후 3개월 이내



목 차

개 요	-----	I
목 차	-----	II
1. 목 적	-----	1
2. 연구 구성	-----	1
3. 공시 물질	-----	1
4. 재료 및 방법	-----	1
4.1. 야외임상효능시험	-----	1
4.2 안전성시험	-----	3
5. 평가 및 결론	-----	3



1. 목적

달마시안 제충국 S3의 닭진드기에 대한 예방 및 구제 효능확인을 위하여 본 제품을 야외조건 인 국내 산란계 농장에서 적용하여 구제효능을 파악하고 닭진드기에 대한 예방기간을 측정 하고자 한다.

2. 연구 구성

분류	항 목	구 성
임상효능 및 안전성시험	야외임상시험	- 산란계농장 : 3군데 - 관찰항목 : 진드기 감소율, 산란율, 임상증상 등
	안전성 시험(실험실)	- 시험군: 무치치군, 4배용량 투여군 - 관찰항목: 임상증상, 산란율, 혈액학 및 혈액화학치

3. 공시물질

3.1. 달마시안제충국 S3

1) 조성 (본제 1L 중)

- 제충국추출물 2% + 방아추출물 50%+ 바질추출물 38%

2) 제형 및 성상 : 분무용 액제



3) 용법 및 용량 : 500배 희석하여 계사에 분무 살포 (7일 간격으로 2회 처리)

4. 시험방법

4.1. 야외임상효능 시험

1) 공시축

- 공시축은 건강한 개체를 이용한다.
- 산란계 주령: 30주령 이상

2) 시험군 구성

- 질병의 특성상, 각 농장의 사육동을 기준으로 하여, 계사 전체에 제품을 적용한다.

시험군	처리방법	수수
제품살포군	500배 희석한 제품을 계사내에 7일 간격으로 2회 분무살포	10,000수 이상

○ 농장정보

농장명	주소	개체수	주령	사육시스템
덧골농장	충남 천안시 서북구 입장면 위례산길355	10만수	57	직립식 무청계사
용천양계	충남 청양군 비봉면 용화1길10	24만수	60	직립식 무청계사
K&P Egg Farm	충남 천안시 동남구 동산행암길 131-19	10만수	53	직립식 무청계사

3) 관찰항목

- 관찰기간동안 폐사율 변화를 관찰한다.
- 임상증상 : 제품을 분무/살포한 후, 매일 1회 임상증상을 관찰하고, 제품 적용 후 전신반응이나 활력저하 등의 부작용을 확인한다.
- 산란율 : 제품적용전과 적용 후의 산란율을 평가한다.
- 구제효과 : 각계사의 진드기 감염정도를 측정하기 위하여, 농장선발전 시점부터 농장규모에 맞게 진드기 채집용 골판지를 각 계사에 설치한다.
- 닭진드기 채집용 골판지는 분무살포 1주일 전, 최종 2회 처리하고 나서 1일 후, 분무살포 1주일 후, 분무살포 2주일 후, 분무살포 한달 후에 걸쳐 총 5회 설치하고 설치 3일차에 회수하여 닭진드기의 개체수를 확인한다.

[표1] 제품 살포 후  설치 일정

살포 전 7일	살포 당일 (24시간이내 설치)	살포 후 7일 (2차접종)	살포 후 14일	살포 후 28일
○	○	○	○	○

4) 효능 평가기준

- 각 트랩에서 확인된 red-mite의 수를 측정하여 처치군의 감소비율을 투여전과 비교한다.
- 주요 기준은 Henderson-Tilton 공식을 이용하여 계산한 후 투여 후 각각의 시점에 대한 계사의 총 진드기 감소비율 (유충, 약충, 성충 모두 포함)과 각각의 진드기 단계별 (유충, 약충, 성충 단계별) 감소 비율을 계산한다.
- 채집된 진드기에 대하여 현미경 검경을 통하여 닭 진드기 유무를 확인하기 위한 닭 진드기 동정을 실시한다.
- Henderson-Tilton 공식

$$\text{Corrected \%} = \left(1 - \frac{nT \text{ after treat.}}{nT \text{ before treat.}} \right) \times 100$$

(n = Insect population, T = treated, treat.: Treatment)

4.2. 안전성시험 (실험실 내)

1) 공시축

- 공시축은 건강한 개체를 이용한다.
- 산란계 주령: 30주령 이상

2) 시험군 구성

시험군	처치방법	수수
대조군	무처치군	10수
안전성시험군	125배 희석한 제품을 계사내에 7일 간격으로 2회 분무살포	10수

3) 관찰항목

- 관찰기간동안 폐사율 변화를 관찰한다.
- 임상증상 : 약물처치전 및 약물처치후 관찰기간동안 매일 임상증상을 관찰하고 특이적인 임상소견은 기록한다. 매일 1회 임상증상을 관찰하고, 제품 적용 후 전신반응이나 활력저하 등의 부작용을 확인한다.
- 산란율 : 제품적용군과 무처치군 사이의 산란율을 확인한다.
- 무처치군과 약물투여군에서 약물투여 전, 첫 번째 약물 살포 후 1일, 4일, 7일, 14일째 각 시점별 10수의 개체에서 혈액을 채취하여 혈액학치 및 혈액화학치를 검사한다.
 - 혈액학치: RBC, WBC, Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC 등
 - 혈액화학치: ALT, AST, LDH, TP, Alb, Glu, ALP, TG 등

4) 안전성 평가기준

- 임상증상, 혈액학치 및 혈액화학치, 산란율 등을 종합하여 시험약물의 부작용(안전성)을 평가한다 (통계분석을 통한 유의성을 검증한다).

6) 통계처리 방법

- 안전성 시험 항목은 무처치군에 비하여 통계학적 유의성을 검증한다.

5. 평가 및 결론

야외임상시험 및 안전성시험 결과에 의하여 닭진드기에 대한 달마시안 제충국 S3의 효능 및 안전성을 확인한다.

제 3 절 연구개발 성과

1. 제품화 : 유기농업자재 공시 4건

가. 시제품 1 - 달마시안제충국S1

- 자재의 명칭 : 제충국추출물 4%, 자소추출물 96%
- 자재의 구분 : 병해충관리용
- 상표명 : 달마시안제충국S1
- 공시번호 : 공시-1-5-047호
- 유효기간 : 2017. 7. 13 ~ 2020. 7. 12
- 공시기관 : 농업기술실용화재단
- 유기농업자재 공시서

공시번호 : 제 공시-1-5-047호

유기농업자재 공시서

1. 업체명 : 달마시안 제충국 2. 대표자 성명 : 채의수

3. 주소(사업장) : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66

4. 자재의 명칭 : 제충국추출물+식물추출물

5. 자재의 구분 : 총해관리용

6. 상표명 : 달마시안 제충국 S1

7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
- 주성분 : Pyrethrins, Dillapiol
- 원료의 종류 및 함량(%) : 제충국 추출물 4, 자소추출물 96

8. 유효기간 : 2017.07.13.~2020.07.12.


9. 제조장 주소 : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66

10. 최초 공고일 : 2017.07.13.

11. 최초 공시기관 : 농업기술실용화재단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2017년 7월 13일

농업기술실용화재단 이사장 

나. 시제품 2 - 달마시안제충국S2

- 자재의 명칭 : 제충국추출물 4%, 방아추출물 96%
- 자재의 구분 : 병해충관리용
- 상표명 : 달마시안제충국S2
- 공시번호 : 공시-1-5-048호
- 유효기간 : 2017. 7. 13 ~ 2020. 7. 12
- 공시기관 : 농업기술실용화재단
- 유기농업자재 공시서


공시번호 : 제 공시-1-5-048호

유기농업자재 공시서

1. 업체명 : 달마시안 제충국 2. 대표자 성명 : 채의수
3. 주소(사업장) : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66
4. 자재의 명칭 : 제충국추출물+식물추출물
5. 자재의 구분 : 총해관리용
6. 상표명 : 달마시안 제충국 S2
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
 - 주성분 : Pyrethrins, Estragole
 - 원료의 종류 및 함량(%) : 제충국 추출물 4, 방아추출물 96
8. 유효기간 : 2017.07.13.~2020.07.12.
9. 제조장 주소 : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원리 687-66
10. 최초 공고일 : 2017.07.13.
11. 최초 공시기관 : 농업기술실용화재단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2017년 7월 13일

농업기술실용화재단 이사장 

다. 시제품 3 - 달마시안제충국S3

- 자재의 명칭 : 제충국추출물 2%, 방아추출물 50%, 바질오일 38%, 보조제 10%
- 자재의 구분 : 병해충관리용
- 상표명 : 달마시안제충국S3
- 공시번호 : 공시-1-5-068호
- 유효기간 : 2018. 12. 28 ~ 2021. 12. 27
- 공시기관 : 농업기술실용화재단
- 유기농업자재 공시서

공시번호 : 제 공시-1-5-068호

유기농업자재 공시서

1. 업체명 : 달마시안 제충국
2. 대표자 성명 : 채의수
3. 주소(사업장) : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13
4. 자재의 명칭 : 제충국추출물+식물추출물+식물성오일
5. 자재의 구분 : 총해관리용
6. 상표명 : 달마시안 제충국 S3
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
 - 주성분 : Pyrethrins, Estragole
 - 원료의 종류 및 함량 : 제충국추출물 2, 방아추출물 50, 바질오일 38, 보조제 10
8. 유효기간 : 2018.12.28.~2021.12.27.
9. 제조장 주소 : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13
10. 최초 공고일 : 2018.12.28.
11. 최초 공시기관 : 농업기술실용화재단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2018년 12월 28일

농업기술실용화재단 이사장



다. 시제품 4 - 시너지2

- 자재의 명칭 : 차나무추출물 30%, 방아추출물 70%
- 자재의 구분 : 병해충관리용
- 상표명 : 시너지2
- 공시번호 : 공시-1-6-032호
- 유효기간 : 2018. 12. 28 ~ 2021. 12. 27
- 공시기관 : 농업기술실용화재단
- 유기농업자재 공시서

공시번호 : 제 공시-1-6-032호

유기농업자재 공시서

1. 업체명 : 달마시안 제충국
2. 대표자 성명 : 채의수
3. 주소(사업장) : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13
4. 자재의 명칭 : 식물추출물
5. 자재의 구분 : 병해충관리용
6. 상표명 : 시너지2
7. 주성분(원료)의 종류 및 함량(%)
 - 주성분 : Terpinen-4-ol, Estragole
 - 원료의 종류 및 함량 : 차나무추출물 30, 방아추출물 70
8. 유효기간 : 2018.12.28.~2021.12.27.
9. 제조장 주소 : 충남 천안시 동남구 광덕면 보산원로 13
10. 최초 공고일 : 2018.12.28.
11. 최초 공시기관 : 농업기술실용화재단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2018년 12월 28일

농업기술실용화재단 이사장



○ 제품사진



2. 홍보 전시 : 4건

가. 2017 농업기술박람회

시 작 일: 2017.8.14	종 료 일: 2017.8.15	
행 사 명 칭: 2017 농업기술박람회	참 가 자: 달마시안제충국	참여품목: 유기농업자재
주 관 기 관: 농촌진흥청, 농업기술실용화재단	국 내 외: 국내	

○ 전시 사진



달마시안제충국 대표 농업인 부문 우수상 시상



다. 천안홍타령 축축제

시 작 일: 2018.9.12	종 료 일: 2018.9.16	
행 사 명 칭: 천안홍타령 축축제	참 가 자: 달마시안제충국	참여품목: 유기농업자재
주 관 기 관: (재)천안문화재단	국 내 외: 국내	

○ 전시 사진 (달마시안제충국S2의 천연살충제 홍보)



라. 2018 국제농기계자재 박람회

시 작 일: 2018.10.31	종 료 일: 2018.11.03	
행 사 명 칭: 2018 국제농기계자재 박람회	참 가 자: 달마시안제충국	참여품목: 유기농업자재
주 관 기 관: 천안시, 한국농기계공업협동조합, 농민신문사	국 내 외: 국내	

○ 전시 사진 (달마시안제충국S2 홍보, 달마시안제충국 대표 채의수)



3. 학술대회 발표 3건

가. 2017년 한국농약과학회 추계 학술발표회

포스터발표 : 제충국을 이용한 친환경 살충제 개발

2017년 한국농약과학회 임시총회 및 창립 20주년 기념 추계학술발표회

P-127

제충국을 이용한 친환경 살충제 개발

정호섭^{1*}, 장희섭¹, 염지영¹, 오현택¹, 김지완¹, 채의수², 조인선¹

¹한국생물안전성연구소, ²달마시안제충국

천연식물 살충제의 원료로 사용되는 제충국은 그 효과가 빠르고 좋은 것으로 알려져 있으나 제충국 추출물의 성분중 농약으로 분류되는 피레트린(pyrethrin)으로 인해서 한동안 유기농업자재의 원료로 사용하지 못하였다. 그러나 최근 제충국추출물의 경우 성분분석 시 피레트린즈(pyrethrins) 성분인 피레트린-I, 피레트린-II, 시네린-I, 시네린-II, 자스모린-I 및 자스모린-II의 6가지 성분이 함께 검출되는 제충국추출물의 천연성분 특성을 확인함으로써 유기농업자재의 원료로 사용가능한 길이 열렸다. 하지만 일반적으로 제충국추출물의 어류 및 수중생물에 대한 독성이 높아서 실제 제충국추출물을 주원료로 하는 유기농업 자재의 경우 담수어류 급성독성 시험 평가기준 (어독성 III급)을 만족시키는데 어려움을 겪고 있다. 당소에서는 농림식품기술기획평가원의 연구과제로 지원받아 제충국추출물 중 피레트린(피레트린-I + 피레트린-II)의 함유량과 천연 효과증진제(방아풀, 자소엽)의 조성을 다르게 조제하여 여러 후보물질들을 개발하였다. 그리고 각 후보물질들에 대하여 담수어류 급성독성시험을 수행한 후 결과들을 토대로 친환경 유기농업자재로서의 안전성평가 기준을 만족하는 천연 살충제의 제품을 개발하였고 이에 대한 약효를 확인하였다.

제충국추출물 중 주성분의 하나인 피레트린의 함량을 각각 10000, 15000, 20000 및 40000 ppm의 농도가 되도록 하고, 천연 효과증진제로 자소엽추출물 및 방아풀추출물을 첨가하여 시험물질 샘플을 조제한 후 담수어류급성독성시험을 수행하였다. 그 결과 제충국추출물 중 피레트린의 함량이 40000 ppm인 경우 자소엽추출물 및 방아풀추출물을 첨가한 제품 모두 담수어류급성독성시험의 농도가 2 mg/L에서 100%의 치사율을 보였고, 제충국추출물 중 피레트린의 함량이 20000 ppm인 경우 자소엽추출물을 첨가한 제품은 담수어류급성독성시험의 농도가 2 mg/L에서 0%, 방아풀추출물을 첨가한 제품은 담수어류급성독성시험의 농도가 2 mg/L에서 40%의 치사율을 보였다. 제충국추출물 중 피레트린의 함량이 10000 및 15000 ppm인 경우 자소엽추출물 및 방아풀추출물을 첨가한 제품 모두 담수어류급성독성시험의 농도가 2 mg/L에서 0%의 치사율을 보였다. 위 담수어류급성독성시험 결과를 토대로 제충국추출물 중 피레트린의 함량이 20000 ppm이고 자소엽추출물을 첨가한 제품을 달마시안제충국 S1, 제충국추출물 중 피레트린의 함량이 20000 ppm이고 방아풀추출물을 첨가한 제품을 달마시안제충국 S2로 명명하고 이상 두 제품에 대하여 각각 약효시험을 진행하였다. 약효시험은 수박의 목화진딧물에 대하여 처리 후 3일 및 7일차의 생충율을 조사하였다. 달마시안제충국 S1의 약효시험 결과, 처리전 유충수는 평균 230.7 마리였고, 처리 후 3일 및 7일차의 평균 생충율은 각각 64.0 ± 2.2 (62.6~66.5) 및 99.6 ± 6.8 (92.1~105.4)로 확인되었다. 달마시안제충국 S2의 약효시험 결과, 처리전 유충수는 평균 236.7 마리였고, 처리 후 3일 및 7일차의 평균 생충율은 각각 63.1 ± 7.6 (55.5~70.7) 및 104.2 ± 4.7 (99.1~108.5)로 확인되었다.

나. 2017년 한국농약과학회 추계 학술발표회

포스터발표 : LC-MS/MS 및 산성 퀘처스법을 이용하여 계란에 잔류하는 제충국 천연 살충성분 동시분석



P-22

LC-MS/MS를 이용한 계란에서 제충국 살충성분 잔류 동시분석

진영호^{1*}, 엄지영¹, 장희섭¹, 오연택¹, 채익수² 조인선¹

¹한국생물안전성연구소, ²달마시안제충국

최근 농약살포 담긴드기 '외구모' 를 잡기 위한 농약 안전성에 대한 관심이 높아지면서 잔류농약에 대한 소비자의 우려가 국내 계란에 있어 이슈가 되고 있는 실정이다. 따라서 최근 연구에서는 약효가 뛰어나고 안전성이 높은 친환경 식물추출물 등을 이용한 농약 대체제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 제충국 꽃의 주성분은 피레트린-I, 피레트린-II 및 피레트로이드 (시네린-I, II 및 자스모린-I, II)으로 구성되어 있으며, 이들 천연 농약성분으로 인해 살충효과를 나타낼 수 있다. 제충국은 주정알코올 등으로 손쉽게 추출이 가능해 유기농업자재 및 친환경 살충제로 사용이 가능하며 농약 대체제로도 활용할 수 있다고 보고되고 있다. 작년말부터는 제충국을 이용한 여러 제품들이 친환경 유기농업자재로 등록되어 현재 사용되고 있다. 당소에서 농림식품기술기획평가원의 연구과제로 지원받아 제충국과 살충효과를 증진시키는 방아풀 등 천연식물추출물을 이용하여 효과가 우수한 달마시안 제충국 S2 제품을 개발하였으며 현재 유기농업자재로 등록되어 시장에서 판매되고 있다. 개발된 "달마시안 제충국S2" 제품을 이용하여 양계장 농가에서 닭진드기에 대한 효과시험을 실시하였다. 닭진드기에 대한 효과시험을 하기 위해서 닭과 양계장 사육케이지 구성구석에 시험약제를 처리한 결과, 24시간 경과 후 56%의 닭진드기의 치사효과가 나타났다. 또한, 약제 처리한 주요지표 살충효과 성분들이 달걀내에 잔류가 되어 있는지 확인하기 위해서 약제 살포 후 3일간 달걀을 수거하여 잔류분석을 실시하였다. 제충국 꽃의 주요 살충성분이 달걀내 잔류하는 것을 분석하기위한 동시분석법은 퀘처스 (QuEChERS) 및 LC-MS/MS를 이용하여 분석법을 개발하였다. 제충국 꽃의 살충성분의 특성상 유기용매 acetonitrile을 추출용매로 하여 NaCl, MgSO₄, citrate buffer를 가하는 퀘처스 (QuEChERS) EN법과 1% acetic acid가 함유된 acetonitrile을 추출용매로 하여 NaCl, MgSO₄를 가하는 산성 퀘처스법의 결과를 비교하였다. 비교 결과 EN 퀘처스의 회수율은 70~120% 와 RSD ≤ 10%를 만족하지 못하였지만, 산성 퀘처스의 회수율은 70~120% 와 RSD < 10%을 만족하였다. 결과적으로 산성 퀘처스법을 이용하여 6종 천연살충제 성분분석을 하는 것이 회수율면에서 더 나은 결과를 도출할 수 있었다. 산성 퀘처스법에 대한 분석법 검증은 선별성, 직선성, 정확성 및 정밀성 등을 기준으로 하였으며, 검증 요소 모두 검증 가이드라인 기준에 부합되어 분석법의 신뢰성을 확보하였다. 본 연구를 통해 확립한 분석법을 통하여 계란에 잔류되는 피레트린-I, 피레트린-II 및 피레트로이드의 정량한계 미만으로 분석되었다. 따라서 천연살충제로 개발된 "달마시안 제충국S2" 는 유기농업자재의 천연살충제로 현재 사용하고 있지만, 양계장내에서 외구모의 천연살충제로도 활용이 가능하며 무엇보다 잔류에 대한 염려없이 안전하게 사용할 수 있다.

다. 2018년 한국농약과학회 추계 학술발표회

포스터발표 : 천연식물추출물(제충국)을 이용한 닭진드기 살충제 개발

A-P-064
Glyphosate influences cell proliferation in cultured human kidney cells
 Soyent Jeon¹, Sang-Hyeop Lee¹, Yeon-Hui Kim, Jaechul Roh, Hyeeseung Choe, Jang-Eok Kim, Heeyoun Bunch²
¹Department of Applied Biosciences, College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea.
²These authors contributed equally to this work.

Glyphosate is the most widely used herbicide worldwide. However, since the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified glyphosate as "likely carcinogenic" to humans in 2015, the safety of this synthetic chemical has been under debate and requires validation. Most studies on glyphosate have been conducted in animals, and the effects of glyphosate in humans are not fully understood. In the present study, we report that glyphosate increases the rate of cell growth in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. Interestingly, the concentrations of glyphosate ranging between 0.6 and 18 μ M enhance cell proliferation, while lower or higher concentrations do not stimulate cell growth or interfere with it, respectively. At the molecular level, cell biology and biochemical data demonstrate that glyphosate promotes the transcription of EGR1, JUN, FOS, and MYC, which are critical transcription factors and immediate early genes for cell cycle progression, and cell cycle regulators including cyclin B1, cyclin D1, and p21. In addition, the absorption efficiency of glyphosate to HEK293 cells estimates approximately 11 pM/cell/day, and glyphosate metabolism appears increased when incubated with HEK293 cells. Our findings provide valuable evidence on the effects of glyphosate on human cell growth and suggest that glyphosate promotes cell proliferation by activating gene expression of cell cycle regulators in humans.

A-P-065
천연 식물추출물(제충국)을 이용한 닭진드기 살충제 개발
 조인산¹, 오현택¹, 정호섭¹, 장희섭¹, 염지영¹, 채의수²
¹한국생물안전성연구소, ²달마시안제충국
³충북 음성군 감곡면 성주로 362-20, 대한민국
⁴충남 천안시 평덕면 보산원로 13, 대한민국

닭진드기(poultry red mite, *Dermatophyso gallinice*)는 가금류에 기생하여 흡혈하는 외부 기생충으로써 전 세계적으로 분포하며 닭캐슬마이러스, 추베리, 가금티푸스, 가금스피로헤파증 그리고 콜레라 등을 매개하는 해충이다. 또한 흡혈로 인한 철단백의 빈혈, 알의 생산량 감소 및 품질을 감소시켜 경제적 손실을 야기하기도 한다. 최근 농가에서 닭진드기(와구모) 방제를 위한 피프르닐 등의 농약 사용으로 인해 유통되는 달걀에서 피프르닐 대사체 등 잔류농약이 기준치보다 초과하여 소비자의 우려가 국내 달걀에 있어 이슈가 되고 있는 실정이다. 따라서 현재 개발중인 연구에서는 살비활성 효과가 뛰어나고 안전성이 높은 천연성 천연살비제를 이용한 농약 대체제 연구가 활발히 진행되고 있다. 천연식물 살충제의 원료로 사용되는 제충국을 이용하여 개발한 "달마시안제충국 S3"는 안전성이 우수(랫드 급성경구 LD50 > 2000mg/kg, 랫드 급성경구 LD50 > 4000mg/kg, 안자극과 피부자극 자극없음, 피부감각 야기없음, 어독성 III 급(적독성), 물별급성경구독성 LD50 12mg/bee(적독성), 물벼룩급성독성 48hr EC50 0.927 mg/L) 하여 유기농업자재 및 닭진드기 살충제와 살비제로 등록할 경우 안전한 것으로 확인되었다. 달마시안제충국 S3는 주성분이 제충국추출물 2%, 망아추출물 50% 및 바질추출물 38%로 구성되어 있다. 이 시제품으로 양계장에서 채집한 닭진드기 성충에 대하여 실내에서 살비 효과를 조사하고자 추천사용약량인 500배 희석배수와 이 보다 낮은 1000배와 이 보다 높은 250배로 각각 처리하여 살비율을 측정할 결과, 가장 낮은 1000배 희석배수에서조차 90% 이상의 살비활성 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 "달마시안제충국 S3"는 천연 식물추출물로 개발된 살충제이며 무엇보다 안전하고 살비효과가 우수해 추후 양계장에서 임상시험을 진행한 후 동물용의약품으로 등록하여 천연 닭진드기 구제제로 활용할 예정이다.

4. 사업화 계획 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.1억원
			향후 3년간 매출	15억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.2 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

나. 사업화계획 및 매출실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	50			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		1.1	5	10	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.2	3	5
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	본 연구개발로 확보한 천연살충제를 혼중제 체제기술을 활용하여 병행충관리용 유기농업자재, 버섯파리 및 닭진드기 살충제로 개발할 계획임			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표 달성도

연구과제명	연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
제충국을 이용한 친환경 살충제 개발 및 제품화 (주)한국생물안전성연 구소	1차년도 천연살충성분의 유기농업자재 제품화 2건	- 유기농업자재공시 제품 인증 1) 달마시안제충국S1 (제충국추출물+자소추출물) 2) 달마시안제충국S2 (제충국추출물+방아추출물)	100
	1차년도 가축용 천연살충제 제품 후보물질 도출	- 제충국과 방아풀이 들어 있는 달마시안제충국S2로 닭진드기의 살충에 효과 확인, 동물약품활용 가능성 입증	100
	1차년도 학술발표 2건 관련특허 2건	- 2017년 한국농약과학회 추계 학술발표회 포스터발표 2건 1) 제충국을 이용한 친환경살충제 개발 2) LC-MS/MS 및 산성 퀘처스법 이용하여 계란에 잔류하는 제충국 천연살충성분 동시분석	50
	1차년도 (추가) 홍보전시 2건	1) 2017 농업기술박람회 (2017.08.14.~15) 2) 버섯파리 성충 친환경 방제 현장평가회(2017.11.03)	100
	2차년도 천연살충성분의 유기 농업자재 제품화 1건	- 유기농업자재공시 제품 인증 시너지2 (차나무추출물+방아추출물)	100
	2차년도 가축용 천연살충제 제품화 1건	- 유기농업자재공시 제품 인증 달마시안제충국S3 (제충국추출물+방아추출물+ 바질오일)	100
	2차년도 방역용 천연살충제, 가정용 해충기피 후보물질 도출 1건	- 천연살충제 시너지1 개발 (바질추출물, 자소추출물) 독성시험, 약해시험 등 제품화 시험완료	100
	1차년도 학술발표 1건 관련특허 2건	- 201년 한국농약과학회 추계 학술발표회 포스터발표 1건 천연식물추출물 (제충국) 을 이용한 닭진드기 살충제 개발	33
	2차년도 (추가) 홍보전시 2건	1) 천안홍타령춤축제 (2018.09.12.~16) 2) 2018 국제농기계자재 박람회 (2018.10.31.~11.3)	100

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 경제적 측면

- 가. 방아와 자소엽 등의 살충효과를 증진시키는 국내산 천연살충원료의 사용으로 수입대체 효과 및 화학원료를 사용하지 않아 농민과 소비자가 선호하는 안전한 제품
- 나. 기존 친환경유기농업자재의 경우는 살충제의 효과가 떨어져 효과가 떨어져 많은 비용을 들임에도 불구하고 사용하는 농민들의 불만 요소가 높으나 천연식물을 원료로 함에도 불구하고 화학원료로 사용하는 제품만큼의 살충효과를 나타냄
- 다. 본 연구로 개발된 제품은 닭진드기 및 버섯파리 등에서도 좋은 효과를 보여서 동물약품 등으로 제품용도를 확대할 경우 친환경적이고 화학농약의 사용량을 줄여 환경을 보호하는 효과가 있을 것으로 기대
- 라. 본 연구로 개발된 제품은 친환경 제품으로 주원료의 잔류성분이 잔류되지 않아 사용하는 농민의 건강보호에도 도움이 될 것으로 기대
- 마. 고품질 친환경농산물 생산으로 농민 소득증대에 기여할 것으로 기대
- 바. 개발 성과물의 제품판매를 통한 기업의 매출증대 효과

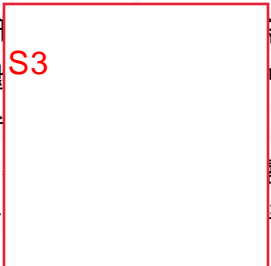
2. 기술적 측면

- 가. 본 연구로 개발된 제충국의 주원료 유효성분인 pyrethrins 함량과 어종에 따른 시험자료는 제품화하고 살충효과를 높이는 데 중요한 자료를 제공하였다.
- 나. 본 연구로 개발된 제품들은 가정용 살충제, 방역용 살충제, 닭진드기용 살충제 등으로 제품용도를 확대해도 효과가 우수하다는 결과를 확인하였다.
- 다. 본 연구로 개발된 제품들을 훈증제 제제기술을 활용할 경우 버섯파리 및 닭진드기의 살충제로서도 우수할 것으로 판단되어 추후 제형변경을 통해 제품화해서 소비자와 농민이 요구하는 우수한 제품이 될 것으로 판단된다.

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

본 연구과제를 통해 제충국을 이용한 친환경 살충제를 개발하여 유기농업자재 제품을 4건 완료하였고, 개발된 시제품의 제품명은 각각 “달마시안제충국S1”, “달마시안제충국S2”, “달마시안제충국S3” 및 “시너지2”로 농업기술실용화재단에 병해충관리용 유기농업자재로 공시 신청하여 유기농업자재로 공시되었다.

본 연구과제를 통해 제품화된 “달마시안제충국S3”는 유기농업자재 뿐만 아니라 닭진드기의 살충제에도 효과가 우수하여 동물약품으로 개발하고자 외부 전문가를 통해 원료인 방아풀의 안전성시험(급성경구, 급성경피, 안점막자극성, 피부자극성)을 수행하였다. 또한, 동물약품으로 품목등록을 인증받기 위해서는 “달마시안제충국S3”에 대한 급성경구, 급성경피, 안점막자극성, 피부자극성, 어류급성 외에도 유전독성 (포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험)과 피부감작성시험이 필요하다는 농림축산검역본부의 요청에 따라 모든 시험을 수행하여 시험성적서를 확보하였다. 동물약품의 제품화를 진행하기위해서 야외임상·효능시험연구를 하기 위한 실내 및 예비시험 성적도 확보하였으며 임상시험을 수행할 수 있는 수의학 박사인 호서대학교 정상희 교수팀과 연구계약을 하여 “달마시안제충국S3의 닭진드기에 대한 야외임상효능시험연구” 계획서를 작성하여 농림축산검역본부에 제출하였다. S3 임상시험계획서의 검토가 늦어져 연구기간내에는 계획된 임상시험을 진행할 수 없게 되었고, 다만 연구과제 종료 후 참여기업인 달마시안제충국에서 주관연구기관으로 농림축산검역본부에 신청하여 품목등록을 신청할 예정이며 당사에서는 미인 달마시안제충국은 GMP 시설을 갖



본 연구개발로 확보한 천연살충제를 훈증제 제제기술을 활용하여 병행충관리용 유기농업자재, 버섯파리 및 닭진드기 살충제로 적용분야를 확대하여 판매증진에 필요한 자료를 구축할 계획이다.

유기농업자재로 공시된 제품 4건의 사업화를 위하여 원료구매처 확보를 통해 대량생산공정을 확립하고 시제품을 생산하여 온라인, 전국 판매대리점, 전시회 (4회 실시)를 통해 홍보하였고 2017년 7월부터 현재까지 본격적인 제품을 생산하고 있다.

생산된 제품은 현재는 2018년 12월까지 1.1억을 농가 등에 판매하였으며 농촌진흥청 신기술 보급사업으로 선정되어 2019년 1월에는 버섯병해충 친환경방제기술보급시험으로 12개 기술센터에 3억원을 납품하였다.

또한 지자체 및 원예협동조합과 현장시범사업을 통해 제품의 우수성을 홍보할 계획이다.

붙임. 참고문헌

- 국립농산물품질관리원 고시 제 2017-33호 (2017.06.03) “유기농업자재 공시 및 품질 인증 기준”.
- 농촌진흥청 (2017) 농촌진흥청 고시 제2017-26호 「농약 및 원제의 등록기준」 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (2017.10.17.)
- 농촌진흥청 고시 제 2017-26호 (2017.10.17) “농약 및 원제의 등록기준”, [별표 13] “환경생물 독성시험 기준과 방법”, “13-1-4. 꿀벌급성독성시험”, “13-1-4-1. 꿀벌접촉 독성”.
- Draize, J.H. (1959) Dermal. Assoc. Food and Drug officials, U.S. Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics. Texas State Dept. of Health, Austin, pp 46~59, Texas.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203 “Fish, Acute Toxicity Test (Adopted : July 17, 1992)”
- OECD (2001) OECD. Guideline for testing chemicals. 423. 「Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method」 (2001.12.17)
- OECD guidelines for the testing of chemicals, No. 214 “Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (Adopted: Sep. 21, 1998)”.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 창업벤처지원 **R&D** 바우처 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 창업벤처지원 **R&D** 바우처 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.