

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000490-01

보안과제( ), 일반과제( ○ ) 과제번호 R0708132

섭식성 해충 성장 및 탈피에 필요한 스테롤 대사조절  
신개념 살충소재 개발연구

(Development of novel insecticides to inhibit sterol metabolism  
essential for the growth and exuvium of a feeding pest)

고려대학교

농 립 수 산 식 품 부



## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “섭식성 해충의 성장 및 탈피에 필요한 스테롤 대사 조절 신개념 살충소재 개발 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 31 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 최 용 석

세부연구책임자 : 최 용 석

책 임 연 구 원 : 한 성 식

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 영 국

책 임 연 구 원 : 노 문 철



# 요 약 문

## I. 제 목

섭식성 해충의 성장 및 탈피에 필요한 스테롤 대사 조절 신개념 살충소재 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계 농약 시장은 2002년 기준으로 약 266억 달러이며 살충제가 27.5%를 차지하고 있다. 국내 농약 규모는 2001년 기준으로 약 8억 달러이며 각 농약별 시장 규모는 살충제(36.3%), 살균제(35.7%), 제초제(24.7%)의 순으로 살충제와 살균제 시장이 국내 전체 농약 시장의 72%를 점유하고 있다.

전 세계적으로 사용되고 있는 살충제를 작용 기작으로 분류하면 신경 전달 저해제, 에너지 생성 저해제, 유약호르몬 저해제와 chitin 생합성 저해제의 성장조절저해제, 및 성 페로몬 유인제로 나눌 수 있고, 현재 전 세계적으로 사용되고 있는 대부분의 살충제는 곤충의 생명유지에 기본적 역할을 하는 신경계나 에너지 생성계의 효소에 작용하는 것들이다. 특히, 곤충의 신경계에 작용하는 아세틸콜린에스테라제의 저해작용을 나타내는 살충제인 유기인계와 카바메이트(carbamate)계가 대부분으로 이들 화합물군은 곤충의 피부뿐만 아니라 인체의 피부로도 빠르게 침투하여 중추신경 표면에 부착하여 이상 신경기능 작용을 일으키는데, 그 증상은 잠복기를 거쳐 과민증, 심한 경련에 이어 마비의 독성을 유발하고 있다.

전 세계적으로 농약의 잔류독성과 환경오염으로 인한 여러 가지 문제점이 나타나자 전 세계 국가들은 인류건강을 위하여 독성이 강한 유기합성 농약의 사용을 자제하기로 국제적으로 논의하였다. 국제적인 협의 중에서 특히 인축에 영향을 많이 미치는 유기 합성된 농약의 사용을 점차 제한하자고 협의하였다. 특히 국내에서도 2004년도에 지난 10년 전부터 사용하여 왔던 화학합성 유기인계 및 유기염소계 농약을 50%까지 생산 및 사용을 감축하기로 합의하였고, 또한 2010년까지 다시 유기인계 및 유기염소계 농약의 사용을 50% 감소시키기로 합의하였다. 그러나 전 세계적으로 유명한 다국적 기업을 포함한 많은 연구진의 노력에도 불구하고 그동안 사용하던 유기인계와 유기염소계 농약을 대체할 수 있는 새로운 기작의 살충제를 개발하지 못하였고, 이에 따라 안전한 살충제가 출현하지 못하면 절대적으로 살충제의 부족으로 큰 문제가 생길 것은 자명한 일이다.

곤충들은 대부분이 스테롤의 합성능력이 없으므로 스테롤은 필수적으로 요구하고 있으며 많은 곤충들은 식물성스테롤을 전환시켜 곤충체내에서 이용하고 있으며, 그리 많지는 않지만 일부 곤충들은 다른 곤충을 먹어 스테롤을 보충하기도 한다. 이에, 본 연구의 목적은 곤충들의 대부분이 필수적으로 필요로 하는 스테롤을 곤충체내에서 생합성하지 못하고 외부의 먹이로부터 스테롤을 섭취하여 여러 대사과정을 거쳐 생존에 필수적으로 스테롤을 이용하고, 필요한 호르몬을 만드는데 스테롤을 이용하고 있다는 사실에 착안하여 곤충류의 스테롤 대사 기작에 관련되어 있는 저해제를 탐색하고, 이를 이용하여 신규 천연물 유래 활성물질의 발굴을 통해 신개념의 고부가가치 살충제를 개발 연구에 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

곤충 체내에서 스테롤의 기능은 첫째로 곤충의 중요한 영양원이며, 여기에 이용되는 스테롤은 주로 지방체와 함께 축적된다. 두 번째로 중요한 기능은 세포막의 구성성분으로서, 인지질과 함께 관련되며, 세 번째로 중요한 기능은 탈피호르몬, 유약호르몬, 페로몬 등의 생성에 관여하고 있다. 이와 같이 대부분의 곤충들은 스테롤을 필수적으로 요구하고 있으며, 또한 스테롤 대사도 아주 중요하다. 이와 같은 곤충의 스테롤대사가 원활히 이루어지지 않도록 하

여 결국 곤충 체내에서 스테롤의 대사가 저해됨에 따라 살충 효과를 나타낼 수 있음에 착안하여, 본 연구에서는

1. 곤충의 스테롤 대사에 중요한 역할을 하는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 (AcylCoA:Cholesterol Acyl Transferase, ACAT)를 저해하는 천연소재의 발굴: 선행연구 결과 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 (ACAT)의 활성을 저해하면 살충 효과를 얻게 된다는 사실을 발견하였다. 따라서 다양한 식물 추출물의 screening을 통해 이 효소를 저해하고 살충 효과를 가지는 유효 성분을 함유하는 천연 자원을 탐색, 선정하였다.
2. 선정된 자원으로부터 유효 물질의 분리, 정제 및 구조 결정: 선정된 천연자원을 activity-guided fractionation으로 활성 물질을 분리 정제하고 그 구조를 결정하고, 그 살충 효과 및 작용기작을 검증하였다.
3. 구조-활성 상관관계 연구와 최적화 연구: 이와 같이 밝혀진 구조를 바탕으로 새로운 유도체를 수식화하고 ACAT 저해 활성과 살충 효과를 평가하였다.

#### IV. 연구개발결과

본 연구에서는 ACAT 저해활성 효과를 나타내는 천연자원 및 천연물 유래 합성화합물을 탐색하였고, ACAT 저해활성 물질들의 살충효과를 조사하였다.

담쟁이(*Parthenocissus tricuspidata* PLANCH)의 알콜 추출물들이 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소저해 활성을 나타내었다. 또한 배추좀나방 유충에 대한 살충활성 실험을 수행한 결과 대조구와 비교하여 지속적인 살충현상을 확인하였고, 이 살충효과는 농도와 시간 의존적이었다. 본 연구 결과 담쟁이 알콜 추출물은 곤충 유충의 체내에서 필수적으로 필요로 하는 스테롤 대사들을 억제하여 유충의 살충 활성을 나타내었다.

감잎 추출물의 에틸아세테이트 분획물이 ACAT 저해활성을 나타내는 것을 확인하였고, 활성 분획에서 포르피린(porphyrin) 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester)화합물이 유효성분임을 확인하였다. 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester) 화합물에 대한 배추좀나방 유충에 대한 활성시험을 통해 곤충 유충의 체내에서 곤충이 필수적으로 필요로 하는 스테롤 대사들을 억제하여 살충 작용을 하는 기작을 확인하였다.

로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)의 알콜 추출물로부터 분리한 모노테르펜계 화합물인 버베논이 ACAT 저해활성이 있음을 규명하였다. 로즈마리 알콜 추출물과 그로부터 분리한 버베논에 대한 배추좀나방 활성시험 결과 살충효과를 확인하였다.

기존의 ACAT 저해제로 알려진 피리피로펜 A 유도체와 나프토키키논 유도체가 우수한 ACAT 저해활성을 가짐을 발견하였고, 이들 유도체들이 온실가루이와 배추좀나방에 대해 살충효과를 나타냄을 알 수 있었다.

#### V. 연구 성과 및 성과활용 계획

전 세계적으로 농약의 잔류독성과 환경오염 등 여러 가지 문제점으로 인하여 국제적인 협의를 통해 유기인계 및 유기염소계 농약의 생산 및 사용을 감축하기로 합의함으로써, 전 세계

적으로 새로운 기작의 살충제 개발이 절대적으로 요구되고 있다. 본 연구결과는 스테롤 대사 기작 저해와 살충활성의 연관성을 확인하였고, 인축에 해가 없음을 확인함으로써 고독성농약을 사용할 수 없는 실내원예용 살충제와 농약살포에 어려운 그린하우스 등에서 안심하고 사용할 수 있는 환경 친화적인 우수한 살충제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구를 통한 결과 및 관련 기술은 기존 살충제의 인체 독성을 경감시킨 신개념의 고부가가치 살충제 개발에 활용될 것이다. 본 연구 결과들을 바탕으로 다국적 농약회사 및 국내 농약회사와의 협력연구를 수행하고 있으며, 향후 지속적인 연구를 통한 기술이전을 목표로 하고 있다.

## SUMMARY

Synthetic organic insecticides were widely used for improving production yields of agricultural crops, eliminating noxious insects, particularly in forests. However, continuous use and abuse of these insecticides for several decades have resulted in destruction of biological protection systems using natural enemies, abnormal occurrence of noxious insects or the development of a resistance to the insecticides, development of toxicity in non-target organism including humans, environmental contamination, etc.

Due to their adverse effects, the synthetic organic insecticides have been gradually reduced in use and in particular, their domestic use was to be reduced to 50% in 2004, compared to their use in 1993. Therefore, there is an urgent need for the development of new insecticides as a tool for enhancing the yields of agricultural products. Also, the size of the world market for biological insecticides is expected to enlarge to about 94 billion Korea won.

In an efforts for the development of novel insecticides, researchers have studied on metabolism-associated enzymes or receptors by means of the molecular biological methods. As a result of such studies, cholesterol was found to be, in insects, required for the formation of plasma membrane and waxes on the cuticle and lipid transports in the blood or lymph. Because insects are unable to synthesize sterols, they require sterols as essential nutrients. Most insects use plant sterols by converting them into cholesterol. Cholesterol is required for the biosynthesis of molting hormones, as well as participating in the formation of the plasma membrane together with phospholipids.

Acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors are known to have the effects of preventing and treating hypertension in humans. In particular, they are under development as a therapeutic agent for hypertension, which has a new action mechanism related with a mechanism of the onset of arteriosclerosis. Based on the fact that insects essentially require sterols for growth and reproduction, the present studies revealed that insects might be killed when a sterol-acylating enzyme participating in storage or transport of sterols is inhibited, and might make the development of novel safe insecticides possible, which are capable of killing insects by the newly identified action mechanism.

The extracts of *Parthenocissus tricuspidata*, extracts of *Diospyros kaki* and its pheophorbide A methyl ester ingredient, and Rosemary extracts and its verbenone ingredient were found to inhibit ACAT enzyme. The extracts and ingredients were assayed for the inhibitory activity against *Plutella xylostella* Larvae, in which the extracts and ingredients exhibited insecticidal effects in comparison with each control.

The synthetic analogues of the known ACAT inhibitor, pyripyropene A, and naphthoquinone analogues were also prepared and found to show potent ACAT inhibitory



activity. The pyripyropene A analogues exhibited the insecticidal activity against *Trialeurodes vaporariorum* (Greenhouse whitefly). The naphthoquinone analogues were found to show insecticidal effects against *Plutella xylostella* Larvae.

This study introduce a new concept of inhibiting target, a sterol-acylating enzyme, known to play a critical role in production of sterols for storage or various hormones during sterol metabolization in the larval stage of insects. The results clearly indicated that compounds having an inhibitory effect on ACAT activity can be used as effective ingredients of novel insecticides.

## CONTENTS

Chapter 1	Research background and objectives -----	11
Chapter 2	Current status of research and development -----	14
Chapter 3	Results of research and development -----	16
Chapter 4	Contributions to the related research areas -----	56
Chapter 5	Research and development outcomes -----	57
Chapter 6	New collections of research information -----	59
Chapter 7	References -----	60

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	14
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	56
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	57
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	59
제 7 장	참고문헌 -----	60



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

◆ 연구 개발의 목적: 본 연구는 곤충들이 생육하는데 필수적인 스테롤의 대사 기작을 저해함으로써 인체에 안전한 천연물 유래 활성 물질을 발굴하고 신개념의 살충제 개발 연구를 통해 신개념의 고부가가치 살충제 개발기술 확보를 목표로 하고 있다.

## 1. 기술적 측면

전 세계적으로 사용되고 있는 살충제를 작용 기작으로 분류하면 신경 전달 저해제, 에너지 생성 저해제, 유약호르몬 저해제와 chitin 생합성 저해제의 생장조절저해제, 및 성 페로몬 유인제로 나눌 수 있다.

현재 전 세계적으로 사용되고 있는 대부분의 살충제는 곤충의 생명유지에 기본적 역할을 하는 신경계나 에너지 생성계의 효소에 작용하는 것들이다. 곤충의 신경계에 작용하는 아세틸콜린에스테라제의 저해작용을 나타내는 살충제인 유기인계와 카바메이트(carbamate)계가 대부분으로 이들 화합물군은 곤충의 피부뿐만 아니라 인체의 피부로도 빠르게 침투하여 중추신경 표면에 부착하여 이상 신경기능 작용을 일으키는데, 그 증상은 잠복기를 거쳐 과민증, 심한 경련에 이어 마비의 독성을 유발하고 있다.

곤충 표피의 구성과 키틴(chitin) 생합성 저해작용을 하는 살충제에 대한 개발 노력도 있다. 곤충은 점진적 성장을 위하여 탈피를 해야 하는데, 표피의 생합성과정은 생리기능상 매우 중요하다. 곤충의 피부는 표피·진피 및 기저막으로 구성되어 있으며, 표피는 다시 외표피와 원표피로 구분할 수 있다. 곤충의 원표피는 N-아세틸 글루코사민(키틴)의 중합체로서 키틴을 다량 함유하고 있으며, 이 키틴은 척추동물에는 존재하지 않고 곤충 표피의 주요 구성성분이므로 탈피저해제에 의하여 이 키틴 생합성을 저해하면 곤충은 죽게된다.

곤충 유충의 탈피저해제의 작용 기구는 신경저해제와는 달리 입이나 기공을 통하여 체내에 들어갔을 때 곤충의 표피형성이 제대로 되지 않아 정상적 탈피를 하지 못한다. 이 때 경화단백질로 된 외표피의 형성에는 영향을 끼치지 않고 원표피층의 키틴 형성을 억제한다. 하지만, 탈피저해제의 구체적인 작용기전은 아직 완전히 규명되지 않았고 있다.

곤충의 유약 호르몬의 생성을 저해하는 등 곤충 특유의 기능에 작용하는 살충제와 교미교란을 유도하는 물질을 개발 중에 있다. 곤충의 암컷에서 분비되는 수컷 유인 페로몬을 이용하여 수컷들을 유도하여 포획하여 죽이는 연구가 진행 중이지만 야외 포장시험에서는 유효한 효력을 나타내지 못하여 아직 상업적으로 사용되지 못하고 있다.

곤충의 생리 관련연구가 분자생물학적 방법을 통하여 곤충의 대사 관련 효소나 수용체에 대한 연구를 하여 살충제를 개발하려고 노력하고 있으나, 아직까지 곤충 체내의 호르몬의 이

송이나 스테롤의 저장에 관련된 연구는 미미하여 그 결과가 많지 않는 상황이다.

곤충들은 대부분이 스테롤의 합성능력이 없으므로 스테롤은 필수적으로 요구하고 있으며 많은 곤충들은 식물성스테롤을 전환시켜 곤충체내에서 이용하고 있으며, 그리 많지는 않지만 일부 곤충들은 다른 곤충을 먹어 스테롤을 보충하기도 한다. 곤충들의 대부분이 필수적으로 필요로 하는 스테롤을 곤충 체내에서 생합성하지 못하고 외부의 먹이로부터 스테롤을 섭취하여 여러 대사과정을 거쳐 생존에 필수적으로 스테롤을 이용하고, 필요한 호르몬을 만드는데 스테롤을 이용하고 있다.

곤충류의 스테롤 대사 기작과 관련된 살충제의 개발연구는 초창기 단계로 본 연구진에 의해 발견되어 곤충의 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제의 활성을 저해하는 신규 활성 물질의 발굴 연구가 진행 중이다.

## (2) 경제적 측면

전 세계 농약 시장은 2002년 기준으로 약 266억 달러이며 살충제 가 27.5%를 차지하고 있으며, 국내 농약 규모는 2001년 기준으로 약 8억 달러이며 각 농약별 시장 규모는 살충제 (36.3%), 살균제(35.7%), 제초제(24.7%)의 순으로 살충제와 살균제 시장이 국내 전체 농약 시장의 72%를 점유하고 있다.

농약산업은 92년 6월 리우선언에 따른 기후변화협약, 생물종다양성과 유전자원의 보호를 위한 생물다양성협약 등의 강화된 국내외 환경 규제로 인해 화합물의 등록 규제 강화에 대한 비용의 증가로 말미암아 신물질의 등장이 상당히 느려지고 있다.

표 1. 농약 시장의 성장과 연구개발 투자비의 비교 (1987-1998)

	1987	1997	1998	연평균증가율
연구개발 투자비용	24.4억불	31.0억불	33.0억불	2.4%
농약시약	263억불	303억불	312.5억불	1.4%

이와 같이 신물질 창출을 위한 연구개발비에 대한 압력은 새로운 기술적인 연구를 필요로 하고 있으며, 표 1에서 볼 수 있듯이 농약 산업의 성장(1987-1998, 1.4%/년)에 비해 연구개발 비용 (1987-1998, 2.4%/년)은 오히려 증가하고 있다

## (3) 사회적 측면

과학의 발달로 인류생존 연령이 높아지고 영아사망률이 줄어드는 가운데 전 세계적으로 인간의 수는 기하급수적으로 증가하는데 반하여 농업의 발달에도 불구하고 식량생산량은 인류증

가을을 따라가지 못하고 있으며, 결국 전 세계적으로는 식량 부족현상이 우려되고 있다.

산업혁명 이후 집약적으로 농산물의 생산량을 증가시키기 위한 일환으로 병충해로부터 작물을 보호하고 있으며, 병충해의 구제를 위하여 농약의 사용은 필수불가결한 실정이며, 여러 가지 이유로 농업생산물 및 가공물, 위생곤충방제와 산림보호를 위하여 전 세계적으로 본다면 살충제의 생산량은 증가하고 있는 추세이다.

농작물을 다수확하기 위하여 절대적으로 필요한 농약이지만 수십 년에 걸친 고독성농약의 연용과 남용으로 인하여 해충군의 이상격발 또는 저항성 해충의 출현, 인간을 비롯한 비목적층에 대한 독성발현 및 환경오염 등 많은 부작용을 야기하게 되었다.

최근 발표된 결과를 보면 농약 등 화학물질에 많이 접촉했을 경우 젊은 남자의 정자수가 50% 정도나 감소된다고 보고하고 있다.

미국 Chemical & Engineering News에 보고된 논문에 따르면 현재 사용되는 농약들의 대부분이 인체에 치명적인 해를 주지 않는다고 하더라도 포유동물의 면역성 저하에는 결정적으로 작용하여 많은 질병 유발의 주원인이 될 수 있다고 보고하고 있다.

전 세계적으로 농약의 잔류독성과 환경오염으로 인한 여러 가지 문제점이 나타나자 전 세계 국가들은 인류건강을 위하여 독성이 강한 유기합성 농약의 사용을 자제하기로 합의하였다.

국내에서도 2004년도에 지난 10년 전부터 사용하여 왔던 화학합성 유기인계 및 유기염소계 농약을 50%까지 생산 및 사용을 감축하기로 합의하였다.

또한 2010년까지 다시 유기인계 및 유기염소계 농약의 사용을 50% 감소시키기로 합의하였다. 그러나 전 세계적으로 유명한 다국적 기업을 포함한 많은 연구진의 노력에도 불구하고 그동안 사용하던 유기인계와 유기염소계 농약을 대체할 수 있는 새로운 기작의 살충제를 개발이 미비한 실정이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

이러한 어려운 환경에 직면하여 세계적인 농약회사들은 합병 및 안전성을 포함한 환경 문제 등으로 기존품목을 대체하기 위한 신제품 개발과 같은 방법을 도입하여 이익의 극대화를 꾀하고 있다.

통프랑, 노바티스, 바스프, 아그레보 등의 유럽의 회사들은 미국 시장 점유율이 높은 위치의 회사를 합병하였고, 바스프, 사이나미드, 듀폰 및 제네카 등은 많은 비싼 가격에 판매가 가능한 새로운 화합물의 개발에 집중하고 있다.

국내 농약 산업의 현황을 살펴보면 1997년도에 업체수는 16개사로 업체당 평균 120억원 정도의 매출을 보여 영세하고, 완제품을 보면 11개 업체로 동부한농화학(주)이 29.3%, 노바티스가 16.0%, 경농이 14.7% 수준으로 상위 3사가 전체 매출액의 60%를 점유하고 있는 실정으로 상위 몇 개 회사로 매출이 편중되어 있는 실정이며, 영세성으로 인해 외국회사의 국내 농약산업의 인수합병으로 인한 잠식이 본격화되고 있다. 국내 농약산업은 완제품 및 일부 원제의 생산기술은 선진국 수준에 도달해 있지만, 가장 핵심적인 신제품 개발에 필요한 능력은 기술적 기반이 매우 취약하다고 할 수 있다.

다국적 기업들은 사람, 가축 및 유용동물에 독성이 없으면서 저항성 해충에도 효과가 우수한 새로운 작용기작을 가진 IGR(Insect Growth Regulator)계 살충제를 개발하여 판매하고 있으나 이들 신규농약에 대한 기술이전을 해 주지 않고 있다. 또한 특허보호기간이 만료된 농약을 복제하여 생산하던 농약원제도 인도, 중국 등의 저가공급으로 수입 의존도가 급격히 높아지고 있기 때문에 독자적인 신규물질의 개발이 절실한 실정이다.

하지만, 90년대 중반 이후 G7 과제 이후 16여년간의 연구를 통해 선진국에서의 등록에는 실패하였으나 2003년 현재 국내에서도 살충제 1개, 제초제 1개, 살균제 1개 등의 신농약을 개발 출시하는 등 성과를 거두고 있다. 비록 새로운 농약 개발 기술은 선진국 수준에 미치지 못하고 있지만, 새로운 농약 개발에 필요한 각 분야가 체계적으로 확립되어 가고 있어 향후 기술수준의 향상이 기대되고 있다.

표 2. 선진국 국내 해당분야의 기술수준

분야	기술항목	선진국 대비 기술수준			
		부족	다소부족	동등	우월
신물질	새로운 농약 개발 생물농약원 발굴	○	○		
제조	완제품 및 원제 생산 기술 생물농약 생산	○	○	○	



연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
동부한농화학	신규 저독성 살충제 및 화본과 전문 제초제 제품화 연구	신물질 IGR계 살충제 비스트리플루론(bistrifluron)을 국내 최초로 개발 완료 하여 미국·유럽·중국 등에 특허등록
한국화학연구소	특이적 호흡저해 식물병 치료후보물질 개발 연구	(주)경농에 기술실시계약

### 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2007년)	(제1세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조 결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석함</li> <li>- ACAT 저해활성을 나타내는 농산물 소재를 다양한 용매별로 추출물로 분획함</li> <li>- ACAT 활성물질을 함유하는 HPLC를 이용하여 용매 추출물의 성분 분석함</li> <li>▪ 선정소재로부터 활성물질 분리정제 및 구조결정함</li> <li>- 활성물질 함유 용매 추출물을 다양한 정제 기법을 이용하여 유효성분을 분리정제함</li> <li>- 분리된 유효성분을 NMR, Mass 등 기기분석적 방법으로 구조동정함</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가 및 작용기작 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACAT 저해 활성 추출물의 살충효과 측정</li> <li>- ACAT 저해활성을 가진 추출물에 대한 배추 좀나방 2령 유충 살충율을 조사함</li> </ul>
	(협동)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성 소재의 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정</li> <li>- 한국생명공학연구원 자생식물사업단의 천연물은행의 식물추출물을 분양, 활성이 예측되는 식물탐색</li> <li>- 분양 식물 추출물의 ACAT 저해활성 효과 측정함</li> <li>▪ 활성소재 분획의 ACAT저해 활성 평가</li> <li>- 제1세부과제의 활성물질 함유 용매 추출물의 ACAT 활성 저해도를 측정함</li> <li>- 활성물질의 특이성을 검증하기 위하여 ACAT이외의 아실화효소에 대한 활성을 평가함</li> <li>- 활성 물질이 세포에서도 ACAT저해 활성을 나타내는지 HepG2세포를 이용하여 평가함</li> <li>- 효소저해활성양식 규명함</li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도 (2008년)	(제1세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조결정, ACAT과 유효성분의 결합형태 분석과 유도체 수식화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ACAT 저해활성을 나타내는 농산물 소재를 다양한 용매별로 추출물로 분획 후 활성 평가함</li> <li>- 활성물질을 함유하는 HPLC를 이용하여 용매 추출물의 성분 분석함</li> </ul> </li> <li>■ 선정소재로부터 활성물질 분리정제 및 구조를 결정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성물질 함유 용매 추출물을 다양한 정제 기법을 이용하여 유효성분을 분리 정제함</li> <li>- 분리된 유효성분을 NMR, Mass 등 기기분석적 방법으로 구조를 동정함</li> </ul> </li> <li>■ 활성물질의 유도체를 수식화함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유도체의 수식화를 통해 다양한 유도체를 도출함</li> </ul> </li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가 및 작용기작 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ACAT 저해 활성 유효식물성분의 살충효과를 측정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ACAT 저해활성을 가진 추출물에 대한 배추 줄나방 2령 유충 살충율을 조사함</li> </ul> </li> </ul>
	(협동) (제2세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ACAT 저해 활성 소재의 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국생명공학연구원 자생식물사업단의 천연물은행의 식물추출물을 분양, 활성이 예측되는 식물을 탐색함</li> <li>- 분양 식물 추출물의 ACAT 저해활성 효과 측정함</li> </ul> </li> <li>■ 각종 분획 및 유효활성성분의 ACAT 저해활성 측정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제1세부과제의 활성물질 함유 용매 추출물의 ACAT 활성 저해도를 측정함</li> </ul> </li> <li>■ 활성성분의 세포레벨에서의 활성 평가 및 특이성, 작용점 분석 연구함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성 물질이 세포에서도 ACAT저해 활성을 나타내는지 HepG2세포를 이용하여 평가함</li> <li>- 효소저해활성양식 규명함</li> </ul> </li> </ul>

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도 (2009년)	(제1세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성물질의 ACAT과 유효성분의 결합형태 분석</li> <li>◦ 유효식물성분의 유도체 합성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 활성물질의 유도체를 수식화합               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유도체의 수식화를 통해 다양한 유도체를 도출함</li> </ul> </li> <li>▪ 활성물질의 유도체 디자인 및 합성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 설계된 유도체들의 유기 화학적 수식으로 화합물 라이브러리를 구축함</li> </ul> </li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성소재의 살충효과 평가 및 작용기작 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 천연활성물질의 살충효과를 측정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ACAT 저해활성을 가진 천연 활성 물질에 대한 배추 줄나방 2령 유충 살충율을 조사함</li> </ul> </li> <li>▪ 수식화된 유도체의 살충효과 비교               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ACAT 저해활성을 가진 천연활성 물질에 대한 배추 줄나방 2령 유충 살충율을 조사함</li> </ul> </li> </ul>
	(협동)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ ACAT 저해 활성 소재의 발굴 및 작용기작 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 유효식물성분의 수식 유도체의 ACAT 저해 활성을 측정함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제1세부과제의 수식 유도체의 ACAT 활성 저해도를 측정함</li> <li>- 활성물질의 특이성을 검증하기 위하여 ACAT이외의 아실화효소에 대한 활성 평가함</li> </ul> </li> <li>▪ 활성성분의 세포레벨에서의 활성 평가 및 특이성, 작용점 분석 연구함               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성물질이 세포에서도 ACAT저해 활성을 나타내는지 HepG2세포를 이용하여 평가함</li> <li>- 효소저해활성양식 규명함</li> </ul> </li> </ul>

## 제 1 절: 세부연구수행 결과

본 연구팀은 수십종의 천연자원으로부터 ACAT 저해활성 효과를 나타내는 천연자원을 선정하고 용매추출물의 효소 저해활성을 확인하였다. 그 중에서 담쟁이(*Parthenocissus tricuspidata* PLANCH)의 알콜 추출물, 감잎 추출물의 페어포비드 에이 메틸에스터 (pheophorbide A methyl ester), 로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)의 알콜 추출물의 모노테르펜계 화합물인 버베논들이 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소저해 활성을 나타내었다. 이들 추출물 및 그 유효성분의 배추 줄나방 유충에 대한 살충활성 실험을 수행한 결과 대조구와 비교하여 지속적인 살충현상을 확인하였다.

또한, 기존의 ACAT 저해제로 알려진 피리피로펜 A 유도체와 나프토크논 유도체가 우수한 ACAT 저해활성을 가짐을 발견하였고, 이들 유도체들이 온실가루이와 배추줄나방에 대해 살충 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

따라서 식물 추출물 및 그 유효성분들이 살충작용을 하는 기작이 확실하고 스테롤 대사기작 저해는 인축에 해가 없으므로 고독성농약을 사용할 수 없는 실내원예용 살충제와 농약살포에 어려운 그린하우스 등에서 안심하고 사용할 수 있는 환경 친화적인 우수한 살충제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

### 1. 담쟁이의 알콜 추출물의 ACAT 저해활성 및 살충효과 연구

#### 1) 아실코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해물질의 제조

##### ① 추출물의 제조

식물체 추출물들은 먼저 살충작용이 있다고 알려진 식물자원을 모아 탐색하였는데 그 살충작용기작이 콜레스테롤 아실화의 저해에 의하여 살충활성을 나타내는 것을 선별하였다.

식물체 추출물은 물로 깨끗이 세척한 후 그늘에서 건조한 후, 분쇄기로 분말화 시켰다. 분말화 된 추출물 중량의 3배의 에탄올을 가하여 7일간 실온에서 추출한 후 여과하였다. 상기 여과액을 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 여기에 노르말 헥산을 동량 가하여 진탕추출 후 분액 하여 감압 농축하여 시료로 제조하고, 여액에 클로로포름을 동량 가하여 진탕추출 후 분액하여 감압 농축하여 시료로 제조하고, 여액에 에틸아세테이트를 동량 가하여 진탕추출 후 분액하여 감압 농축하여 시료로 제조하고, 나머지 수용액에서 용매를 제거한 후 각각 아실코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해시험에 사용하였다.

표 3에서 나타난 것처럼 알콜 식물추출물의 ACAT 저해활성을 시험하여 그 중에서 활성이 강하게 나오는 담쟁이와 현호색을 선별하여 활성물질의용매이동성을 시험한 후에 담쟁이를 최종적으로 선정하여 배추줄나방 유충에 살충활성시험을 하고 지적재산권을 출원준비하고 있다.

표 3. 식물체 알콜 추출물의 ACAT 저해 활성

Plant name	Scientific name	Used part	Fraction	Inhibition(%)
가래나무	<i>Juglans mandchurica</i>	열매	MeOH Ex.	12%
가래나무	<i>Juglans mandchurica</i>	수피	MeOH Ex.	57%
구기자나무	<i>Lycium chinense</i>	열매	MeOH Ex.	5%
구기자나무	<i>Lycium chinense</i>	뿌리껍질	MeOH Ex.	5%
담쟁이덩굴	<i>Farthenocissus tricuspidata</i>	잎	EtOH Ex.	92%
담쟁이덩굴	<i>Farthenocissus tricuspidata</i>	열매	MeOH Ex.	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	전초	MeOH Ex.	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	수피	MeOH Ex.	-
말개나무	<i>Berchemia berchemisefolia</i>	전초	MeOH Ex.	-
말개나무	<i>Berchemia berchemisefolia</i>	수피	MeOH Ex.	-
삼초나무	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	잎	EtOH Ex.	18%
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	지상부	MeOH Ex.	49%
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i>	전초	MeOH Ex.	-
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i>	지상부	MeOH Ex.	-
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i>	수피	MeOH Ex.	-
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	전초	MeOH Ex.	-
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	수피	MeOH Ex.	-
주목	<i>Taxus cuspidata</i>	열매	MeOH Ex.	-
현호색	<i>Corydalis turtschaninovii</i>	뿌리	MeOH Ex.	44%
현호색	<i>Corydalis turtschaninovii</i>	뿌리	H <sub>2</sub> O Ex.	-
현호색	<i>Corydalis turtschaninovii</i>	뿌리	B.A가용부	42%
현호색	<i>Corydalis turtschaninovii</i>	뿌리	CHCl <sub>3</sub> Ex.	55%

## 2) 식물체 추출물의 ACAT활성 실험

아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성저해(ACAT) 물질의 활성측정은 브리쳐(Brecher)방법을 약간 수정하여 사용하였다[Brecher.P and C. Chen; Biochimica Biophysica Acta 617:458~471, 1980]. 상기 방법은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성 효소원으로는 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤과 방사능으로 표식된 올레오일(oleoyl) 코에이(Co-A)를 반응시키는 것으로, 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으로 반응정도를 측정하였다.

구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 아세톤에 용해시킨 Triton WR-1339를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 K-포스페이트 완충용액(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 첨가하였다. 효소반응을 안정화시키기 위하여 bovine serum albumin을 최종농도로 30 µM을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 적량넣어 37 °C에서 30 분간 예비 반응시켰다. 상기 예비반응 후 본 반응은 기질인 [1-<sup>14</sup>C]oleoyl-Coenzyme A를 0.04 µCi가 되게 넣고 37 °C에서 30 분간 반응시켰다. 반응 완결 후 이소프로판올-헵탄 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 *n*-헵탄 0.6 ml와 KPB bufferf 0.4 ml 를 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하였다. 분액되면 상등액 200 µl를 취하여 scintillation vial에 넣었다. 상기 용액에 scintillation cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 scintillation counter(Packard Delta-200)에서 생성된 cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 수학적 1에 따라 계산하였다.

【수학식 1】

$$\text{저해활성}(\%) = [ 1 - (T-B/C-B) ] * 100$$

(상기 식에서,

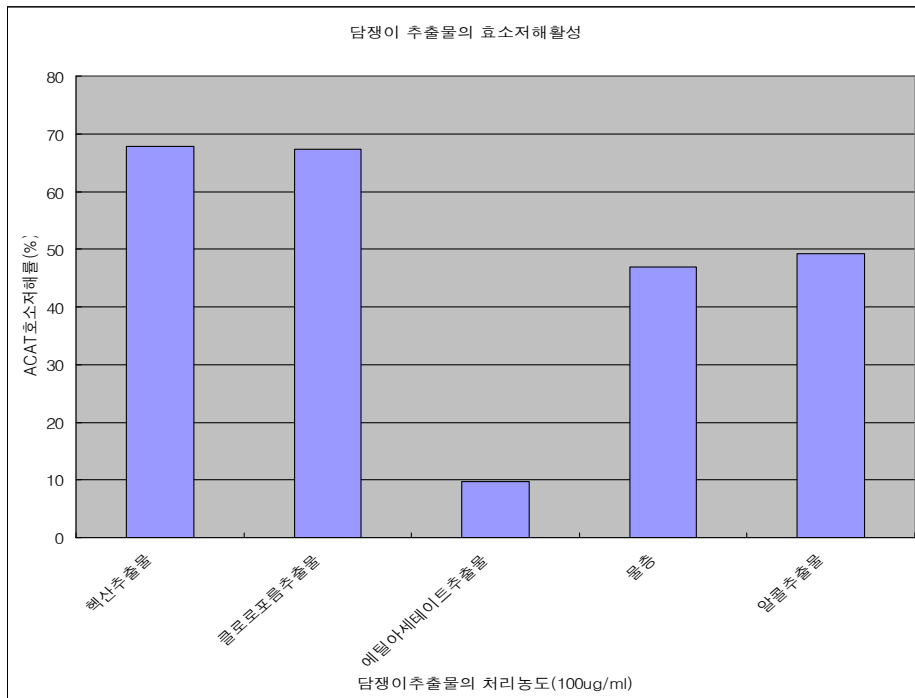
T : 효소반응액에 시료를 넣어 시험구의 cpm값,

C : 효소반응액에 시료를 넣지 않은 대조구의 cpm값,

B : 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값)

이때 공시험은 효소원을 넣지 않은 시험값과 시료를 넣지 않은 시험값을 보정하여 저해 활성을 계산하였다. 그리고 실험의 양성 대조군으로는 obovatol을 사용하여 ACAT 저해 활성을 측정한 결과 IC<sub>50</sub>값은 44 μM로 나타났다.

본 연구의 담쟁이 알콜 추출물의 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소활성저해는 100ug/ml를 처리하였을때 49.29% 효소저해 하는 것으로 측정되었고, 노르말 헥산추출 시료, 클로로포름추출 시료, 에틸아세테이트 추출 시료, 나머지 물층 시료의 효소저해활성은 100ug/ml로 처리하였을 때 각각 66.89%, 67.30%, 9.69%, 46.94% 저해하는 것으로 측정되었다. 담쟁이 추출물은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소에 농도 의존적인 저해 활성을 보여 주었다.



헥산추출물	66.89
클로로포름추출물	67.30
에틸아세테이트추출물	9.69
물층	46.94
알콜추출물	49.29

그림 1. 담쟁이 추출물의 용매 분획별 ACAT 저해 활성

### 3) 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)유충에 대한 활성시험

본 연구에 사용된 시험곤충은 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)으로 2007년 9월 고려대학교 생명과학대학 한성식 교수 연구실에서 살충실험을 하였다. 본 연구의 ACAT 저해활성을 가진 화합물은 정밀하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 triton X-100 100ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다. 배추좀나방 유충의 먹이는 균일한 발육상태의 양배추잎을 잎 디스크(지름 3.0cm)로 잘라 준비된 활성검색물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 60분간 건조하였다. 증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬(55×20mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려 놓고, 배추 좀나방 2령 유충을 총체가 상하지 않도록 부드러운 붓으로 유충을 이동시켜 10마리씩 3반복으로 접종하였다. 활성검색물질이 처리된 배추좀나방 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 24, 48시간의 살충률을 조사하였다. 무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10 % 용액에 triton X-100 100ppm 수용액 9배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다. 활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 이에 대한 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4와 그림 2에서 보는바와 같이 본 발명에 사용한 화학식 담쟁이 알콜 추출물을 1, 10 및 100 ppm씩 배추좀나방 유충에 처리하고 1일 간격으로 4일간 살충정도를 측정하였을 때 대조구와 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났으며 농도, 시간의존적으로 살충효과가 나타났다.

표 4. 담쟁이 알콜 추출물의 배추좀나방 유충 살충효과

시료	농도 ppm	반복	개체수	살충수				4Day 살충률(%)
				1Day	2Day	3Day	4Day	
담쟁이 알콜 추출물	1000	1	10	2	10	10	10	100.0
		2	10	3	10	10	10	
		3	10	2	10	10	10	
	100	1	10	4	6	8	10	96.7
		2	10	2	5	10	10	
		3	10	2	7	7	9	
	10	1	10	3	4	7	7	80.0
		2	10	3	5	7	7	
		3	10	2	8	10	10	
	1	1	10	0	5	5	9	73.3
		2	10	2	5	7	7	
		3	10	2	6	6	6	
Control	1	10	0	0	1	2	10.0	
	2	10	0	0	0	0		
	3	10	0	0	0	1		



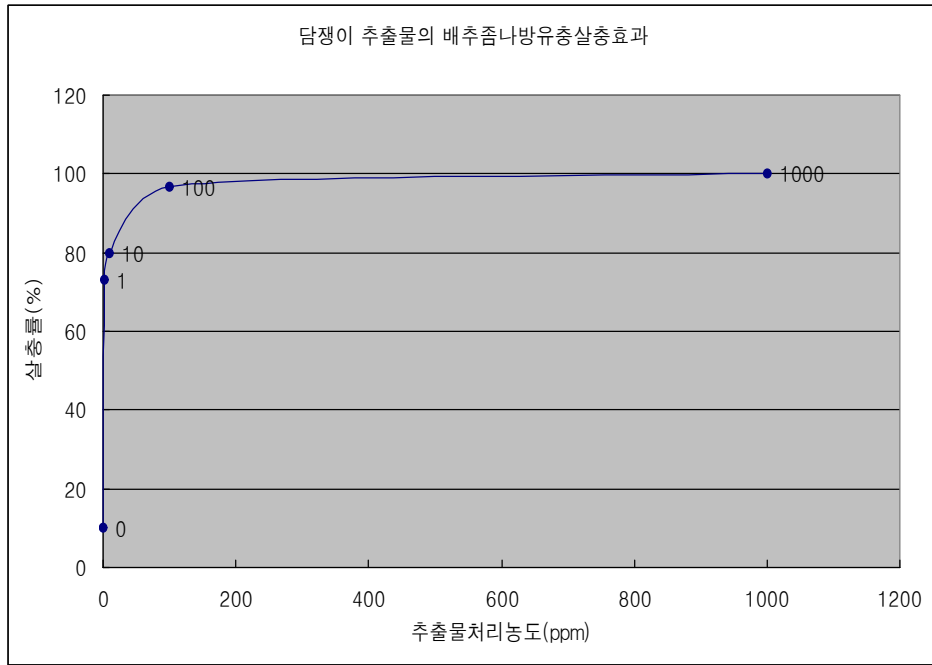


그림 2. 담쟁이 추출물의 배추즙나방 유충의 살충효과

본 연구를 통해 10종의 선별된 식물체에 대한 ACAT 저해활성을 검색한 후 담쟁이 알코올 추출물이 ACAT 저해 작용을 기작을 통해 배추즙나방 유충에 대해 우수한 살충효과를 나타냄을 발견하였다. 향후 신규 살충제의 개발을 위한 상업화시 담쟁이는 주변에서 흔히 발견할 수 있는 식물이며, 유효성분의 분리방법 또한 통상적인 추출방법으로 생산단가를 고려할 때 그 가격경쟁력이 있는 것으로 판단된다.

## 2. 감잎 추출물의 포르피린(porphyrin) 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester)의 ACAT 저해활성 및 살충효과 연구

### 1) 감잎 추출물의 제조

#### ① 감잎 조추출물의 제조

감잎 조추출물은 대전 근교 보문산 계곡에서 채집한 감잎을 식물분류 전문가의 검증을 받은 후, 물로 세척하여 그늘에서 7일 동안 건조하여 잘게 썰어 실험에 사용하였다. 건조된 감잎 2 kg에 5배 용량의 70% 에탄올을 넣고 3일간 실온에서 냉침시킨 후, 여과지로 여과하고, 그 여액을 30℃ 이하의 온도에서 감압농축기 (EYELA, N-1000 Model)로 감압 농축하여 300 g의 감잎 조추출물을 얻었다(이하, "DK"라 명명함).

#### ② 감잎 헥산 추출물의 제조

감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 헥산을 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 헥산층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회

반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 헥산 추출물 12 g (이하, "DKH"라 명명함)을 수득하였다.

### ③ 감잎 클로로포름 추출물의 제조

감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 클로로포름을 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 클로로포름층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회 반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 클로로포름 추출물 15 g (이하, "DKC"라 명명함)을 수득하였다.

### ④ 감잎 에틸아세테이트 추출물의 제조

감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 에틸아세테이트를 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 에틸아세테이트층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회 반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 에틸아세테이트추출물 25 g 에틸아세테이트를 수득하였고 추출되고 남은 물층을 감압 농축하여 75 g (이하, "DKW"라 명명함)을 수득하였다.

## 2) 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물의 분리

감잎 용매추출물 중 ACAT 저해 활성이 가장 높았던 에틸아세테이트 분획물(DKE)을 감압농축하여 얻은 농축액 300 g을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 하기 위하여 실리카겔 1,500 g을 클로로포름:메탄올=100:1 혼합 용액을 사용하여 칼럼 (10x50 cm)에 충전한 후, 활성성분 분획을 적량의 실리카겔에 흡착시키고 충전한 컬럼 위에 얹어 놓고 클로로포름:메탄올 (100:0~0:100 (v/v))을 용출용매로 사용하여 1회의 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 활성분획을 모아 1 g을 분리하였다. 상기 활성분획을 용출용매( $\text{CHCl}_3$ :MeOH=1:1)를 이용하여 세파텍스 엘에이치-20크로마토그래피를 실시하여 활성분획 0.3 g을 수득하였다.

최종 활성분획을 (Column:J'sphere ODS H-80, 250 x20 mm)에 용출 용매로서 메탄올:물=98:2를 6 ml/분으로 흘려주면서 HPLC를 실시하였고, 자외선분광검출기 (SHIMADZU, Diode array detector)상에서 물질을 분획하였다. 효소 저해활성물질은 13.4 분에 용출된 부분이였다. 순수 활성물질 3.8 mg을 수득하였다.

상기 수득한 화합물은 고속원자 충격 질량분석법 (FAB-MS, Vacuum Generator spectrometer, VG70-VSEQ), 수소핵자기공명 분석법 ( $^1\text{H-NMR}$ , 500MHz, Varian Unit 500 spectrometer) 및 탄소핵자기공명 분석법 ( $^{13}\text{C-NMR}$ , 125MHz, Varian Unit 500 spectrometer)을 이용하여 동정하여 하기 물성치를 갖는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 수득하였다.

효소 저해 활성물질은 13.4 분에 용출된 부분이였다.

UV<sub>max</sub>: 408 nm 와 666 nm;

FAB-MS (<sup>+</sup>) Mass (m/z): 607 [M+H]<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 1.52 (3H, d, J=7.2 Hz, H-31), 1.72 (3H, d, J=7.2 Hz, H-25), 2.15 (2H, m, 2-H), 2.54 (2H, m, 1-H), 3.00 (3H, s, H-29), 3.23 (3H, s, H-26), 3.44 (2H, q, J=7.3 Hz, H-30), 3.53 (3H, s, H-32), 3.78 (3H, s, H-34), 4.11 (1H, m, H-3), 4.34 (1H, dq, J=7.2, 1.9 Hz, H-4), 6.01 (1H, dd, J=17.8, 1.2 Hz, Ha-28), 6.14 (1H, dd, J=11.5, 1.2 Hz, Hb-28), 6.14 (1H, s, H-21), 7.77 (1H, dd, J=17.8, 11.5 Hz, H-27), 8.43 (1H, s, H-6), 9.13 (1H, s, H-11), 9.29 (1H, s, H-16), -1.92 (br, s, NH);

<sup>13</sup>C-NMR: δ 189.56 (s, C-20), 178.05 (s, C-35), 172.03 (s, C-5), 169.60 (s, C-33), 161.06 (s, C-23), 155.56 (s, C-12), 150.88 (s, C-15), 149.61 (s, C-24), 145.09 (s, C-14), 142.00 (s, C-7), 137.86 (s, C-17), 136.43 (s, C-13), 136.15 (s, C-10), 136.06 (s, C-9), 131.79 (s, C-8), 128.95 (s, C-18), 128.95 (s, C-19), 128.95 (d, C-27), 122.65 (t, C-28), 105.11 (s, C-22), 104.31 (d, C-16), 97.43 (d, C-11), 93.06 (d, C-6), 64.64 (d, C-21), 52.85 (q, C-34), 51.01 (d, C-3), 50.07 (d, C-4), 30.82 (t, C-1), 29.54 (t, C-2), 23.09 (q, C-25), 19.32 (t, C-30), 17.33 (q, C-31), 12.05 (q, C-32), 12.01 (q, C-26), 11.10 (q, C-29).

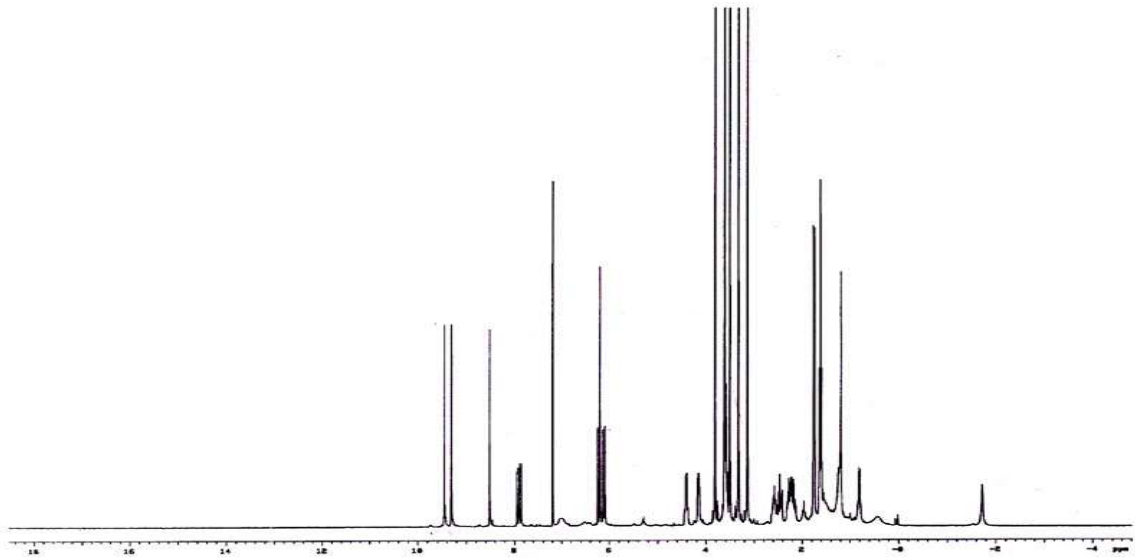


그림 3. 페어포비드 에이 메틸에스터의 <sup>1</sup>H NMR

그림 3은 포르핀계 화합물 구조에서 가장 특징적인 C 고리의 불포화된 클로린 고리 (chlorin ring)의 비닐기의 메틴 수소 (vinyl methine proton)가 가장 저자장인 δ 9.29, 9.13 및 8.43에서 관찰됨으로써 확인되었다.

또한, C-4, C-8, C-13, C-18에 각각 결합하고 있는 메틸기의 수소(methyl protone)가 각각 δ 1.72, 3.23, 3.00 및 3.53을 나타내고, C-14에 결합하고 있는 에틸기의 수소 (ethyl

proton)가  $\delta$  3.44 및 1.52에서 보이고, 말단에 하나의 올레핀기의 수소 (olefinic proton)인 28-H가  $\delta$  6.01에서 28-H과 연결된 또 하나의 올레핀기의 수소(olefinic proton)인 27-H가  $\delta$  7.77에서 나타났다.

포르핀 구조에서 또 다른 특징인 구조 내부의 -NH의 수소 피크가  $\delta$ -1.92에서 관찰됨으로써, 포르핀 내부의 수소는 자기장 영역내에 강하게 차단되어 있음을 확인할 수 있었다.

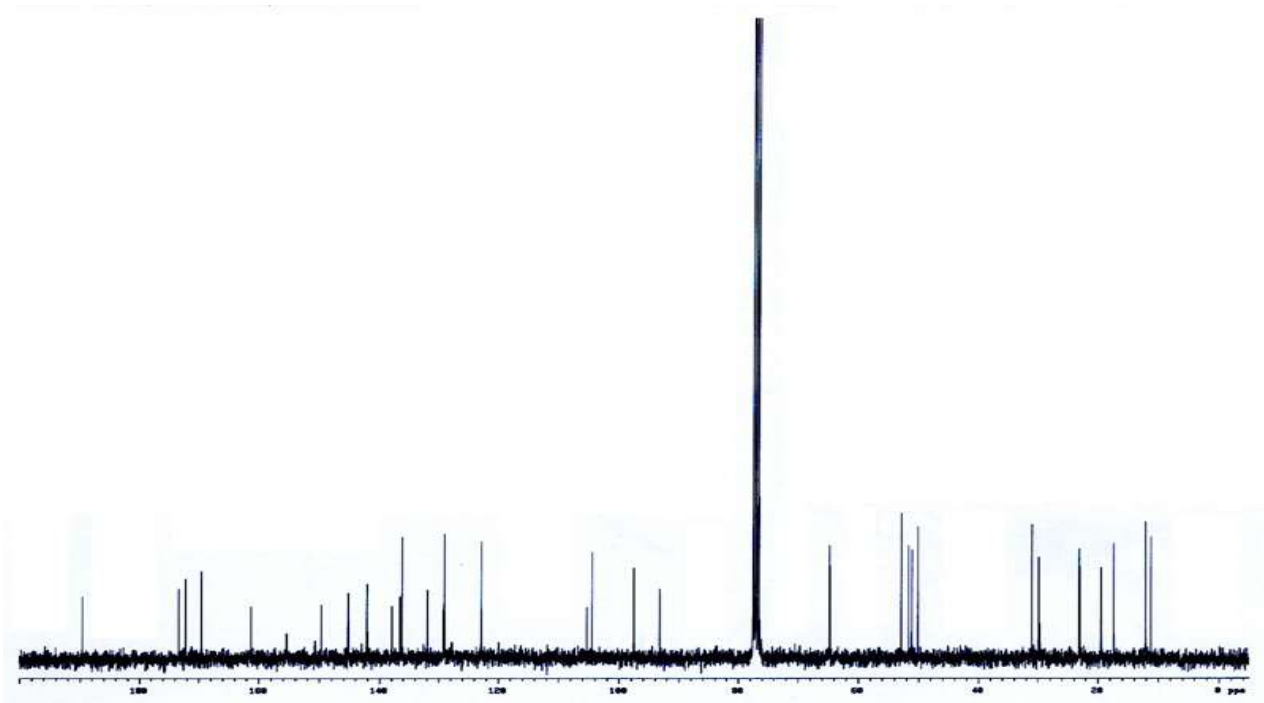


그림 4. 페어포비드 에이 메탈에스터의  $^{13}\text{C}$ -NMR

그림 5은 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메탈에스터의 분극이동에 의하여 왜곡되지 않는 것을 이용한 DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 스펙트럼 ( $\text{CDCl}_3$ , 125.75 MHz)을 나타낸 것으로, 6 개의 메틸, 3 개의 메틸렌(methylene), 3 개의 메틴(metine), 1 개의  $\text{sp}^2$  메틸렌(methylene), 4 개의  $\text{sp}^2$  메틴(metine), 15 개의  $\text{sp}^2$  4 급 탄소, 3 개의 카르보닐기의 탄소가 관찰되었음.

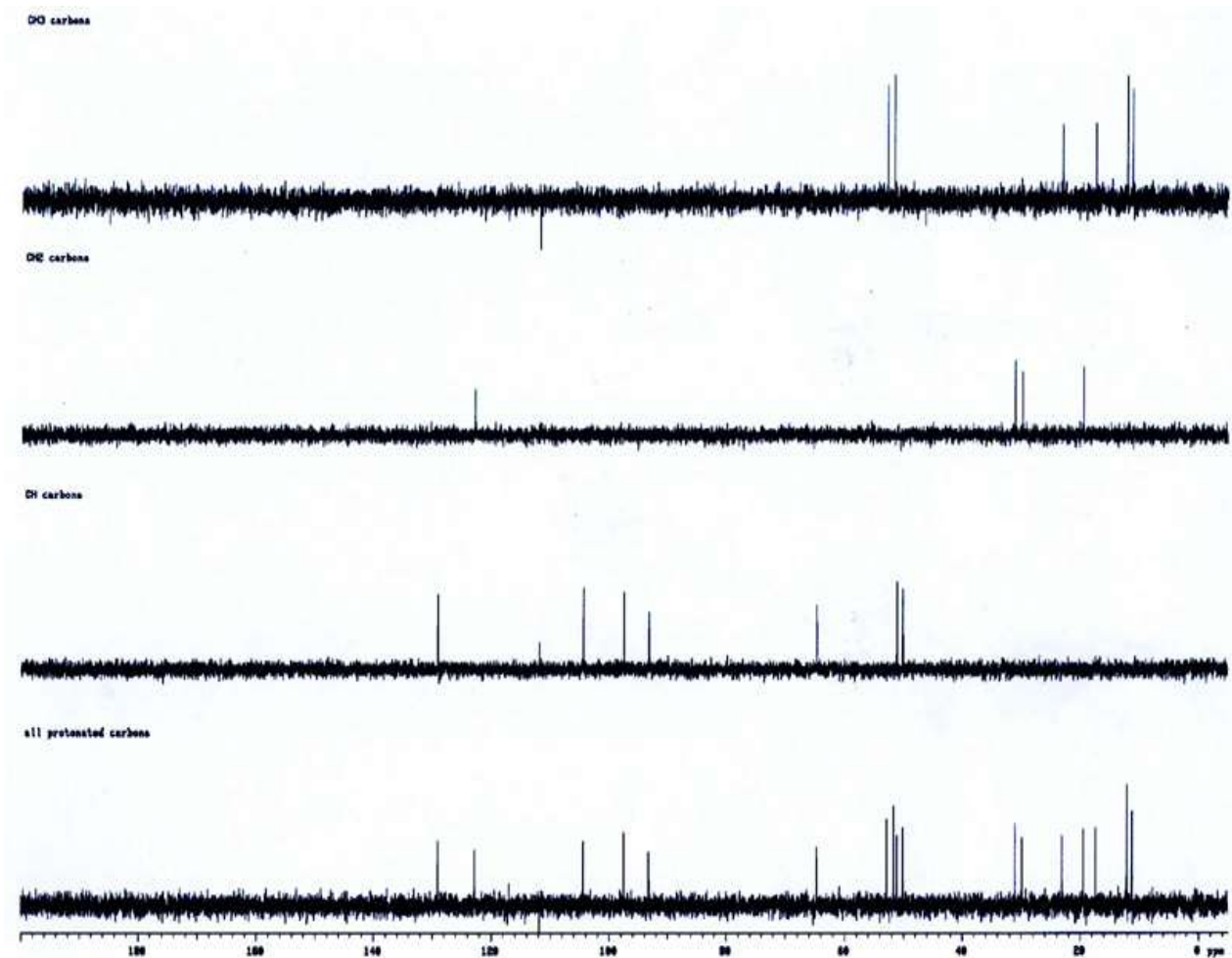


그림 5. 페어포비드 에이 메틸에스터의 DEPT 스펙트럼

그림 6은 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 HMBC( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)를 나타낸 것으로,  $\delta$  2.54 (2H, m, 1-H) 메틸렌으로부터  $\delta$  178.05 (s, C-35), 51.01 (d, C-3) 및 29.54 (t, C-2) 탄소로의 상관성, 2.15 (2H, m, 2-H) 메틸렌으로부터  $\delta$  178.05 (s, C-35), 161.06 (s, C-23), 51.01 (d, C-3), 50.07 (d, C-4) 및 30.82 (t, C-1) 탄소로의 상관성, 4.11 (1H, m, H-3) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 161.06 (s, C-23), 50.07 (d, C-4), 30.82 (t, C-1), 29.54 (t, C-2) 및 23.09 (q, C-25) 탄소로의 상관성, 4.34 (1H, dq,  $J=7.2$ , 1.9 Hz, H-4) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 161.06 (s, C-23), 51.01 (d, C-3), 29.54 (t, C-2) 및 23.09 (q, C-25) 탄소로의 상관성, 1.72 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-25) 메틸로부터 172.03 (s, C-5), 51.01 (d, C-3) 및 50.07 (d, C-4) 탄소로의 상관성, 8.43 (1H, s, H-6) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 142.00 (s, C-7), 131.79 (s, C-8) 및 50.07 (d, C-4) 탄소로의 상관성, 3.23 (3H, s, H-26) 메틸로부터 142.00 (s, C-7), 136.06 (s, C-9) 및 131.79 (s, C-8) 탄소로의 상관성, 7.77 (1H, dd,  $J=17.8$ , 11.5 Hz, H-27) 메틴으로부터 136.15 (s, C-10), 136.06 (s, C-9), 131.79 (s, C-8) 및 122.65 (t, C-28) 탄소로의 상관성, 6.01 (1H, dd,  $J=17.8$ , 1.2 Hz, Ha-28), 6.11 (1H, dd,  $J=11.5$ , 1.2 Hz, Hb-28) 메틸렌으로부터 136.06 (s, C-9) 및 128.95 (d, C-27)탄소로의 상관성, 9.13 (1H,

s, H-11) 메틴으로부터 155.56 (s, C-12), 136.43 (s, C-13), 136.15 (s, C-10) 및 136.06 (s, C-9), 탄소로의 상관성, 3.00 (3H, s, H-29) 메틸로부터 155.56 (s, C-12), 145.09 (s, C-14) 및 136.43 (s, C-13) 탄소로의 상관성, 3.44 (2H, q,  $J=7.3$  Hz, H-30) 메틸렌으로부터 150.88 (s, C-15), 145.09 (s, C-14), 136.43 (s, C-13) 및 17.33 (q, C-31) 탄소로의 상관성, 1.52 (3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-31) 메틸로부터 145.09 (s, C-14) 및 19.32 (t, C-30) 탄소로의 상관성, 9.29 (1H, s, H-16) 메틴으로부터 150.88 (s, C-15), 145.09 (s, C-14), 137.86 (s, C-17) 및 128.95 (s, C-18)탄소로의 상관성, 3.53 (3H, s, H-32) 메틸로부터 137.86 (s, C-17) 및 128.95 (s, C-19) 탄소로의 상관성, 6.14 (1H, s, H-21) 메틴으로부터 189.56 (s, C-20), 169.60 (s, C-33), 161.06 (s, C-23), 149.61 (s, C-24), 128.95 (s, C-19) 및 105.11 (s, C-22) 탄소로의 상관성 그리고 3.78 (3H, s, H-34) 메틸로부터 169.60 (s, C-33) 탄소로의 상관성이 관찰되었다.

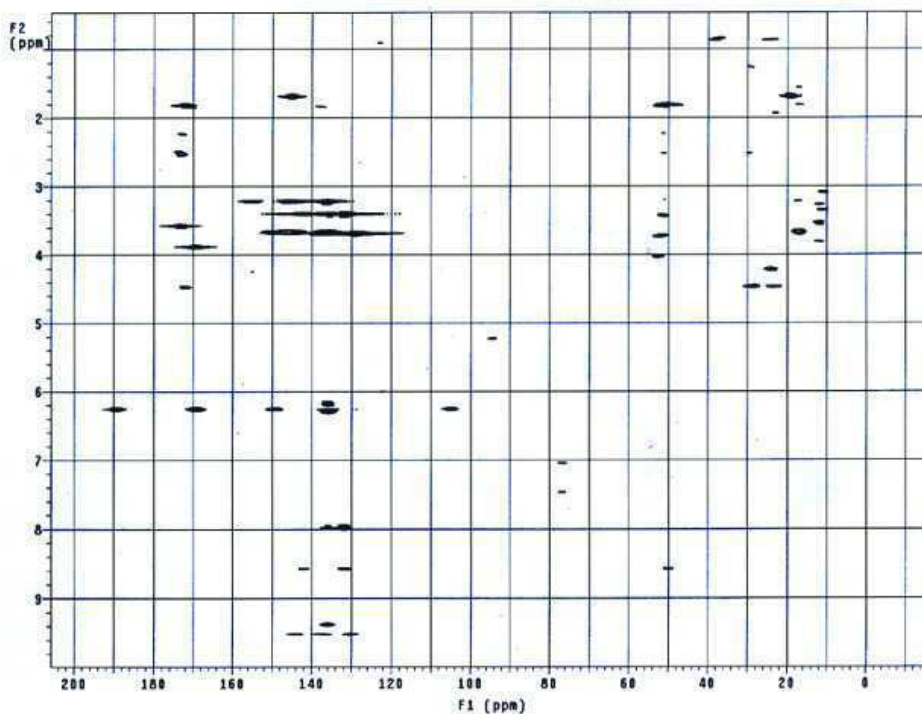


그림 6. 페어포비드 에이 메틸에스터의 HMBC

자외선 분광검출기로 측정된 결과, 포르핀계 화합물의 특성 피크인 가시영역에서 408 nm 및 666 nm의 피크가 관찰되고, 짙은 녹색을 보임으로써 화합물의 구조 내 포르핀 고리의 존재를 확인할 수 있었다.

또한, 분자량( $[M+H]^+$ )을 측정된 결과는 607.2 m/z 이며, 이것은 이론적 계산치와 0.3 mD의 오차를 보였고, 고분해 FAB-MS의 측정된 결과, 분자식이  $C_{38}H_{40}O_6N_4$ 로 예상되었다.

상기의 분석 결과로부터 감잎에서 추출하여 얻어 분리 및 정제한 화합물이 클로린 거대고

리(chlorin macrocycle) 구조를 갖는 포르핀계의 화합물로 결정할 수 있고, 화합물이 그림 7로 표시되는 포르핀계 화합물의 페어포비드 에이 메틸에스터 (pheophorbide A methyl ester)임을 확인하였음.

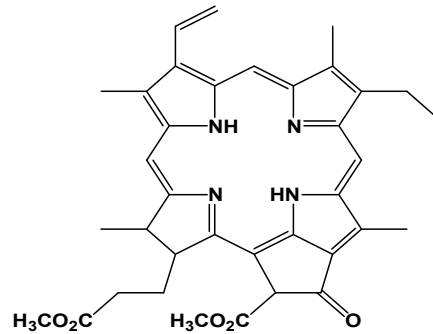


그림 7. 페어포비드 에이 메틸에스터의 화학구조식

### 3) ACAT 효소원의 제조

시험에 사용된 ACAT 효소원으로 흰쥐(Male Sprague-Dawley rats 250~300 g)의 간을 분리하여 마이크로솜 완충용액 A (0.25 M 슈크로오스(sucrose), 1 mM EDTA, 0.01 M 트리스-염산, pH 7.4)으로 세척하고 가위로 1~2 cm<sup>3</sup> 크기로 세절하여 테프론-유리로 이루어진 균질화기 (homogenizer, IWAKI, homogenizer, 7720 HMOGT, ASAHI TECHNO GLASS SCITTECH. DIV)로 빙냉하에서 5분동안 균질화하였다.

상기 균질액을 14,000×g에서 15분동안 원심분리(Beckman, JS-21M)하여 상등액을 모아 다시 100,000×g에서 1시간동안 초고속 원심분리 (Beckman, L8-80M)하였다. ACAT 효소 활성이 포함된 마이크로솜 (microsome)을 분리하기 위해 초고속 원심분리한 침전물에 마이크로솜 완충용액 B (0.25 M 슈크로오스, 0.01 M 트리스-염산, pH 7.4)를 2배량을 가하여 잘 섞어 다시 현탁시킨후 100,000×g에서 1시간동안 다시 원심분리하였다.

시험시 효소원의 단백질 농도를 표준화하기 위하여 단백질함유량을 측정하였는데, 원심분리된 침전물에 마이크로솜 완충용액 B를 적당히 가하여 용해시키고 단백질 표준물질로 소혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma, A1653)을 사용하고 단백질측정 키트 (Biorad DC protein Assay kit)에 의하여 단백질 농도를 결정한 후, 마이크로솜 완충용액 B로 희석하여 단백질 농도를 10 mg/ml로 조정하여 2 ml 바이알에 1 ml씩 분주하여 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 4) ACAT 효소 활성 측정

포르핀계의 페어포비드 에이 메틸에스터에 의한 ACAT 효소 저해 활성활성은 [1-<sup>14</sup>C]올레오일-코에이와 콜레스테롤을 기질로 하고, 하기의 공지된 방법을 일부 수정하여 측정하였다[Y. K. Kim, et al., *J. Antibiotics*, 49, 31-36, 1996].

반응 용액으로는 상기 실시예 1의 시료액 10.0  $\mu\text{l}$ , 쥐에서 채취한 간 조직의 마이크로솜 효소원 (liver microsomal enzyme) 4.0  $\mu\text{l}$ , 표준 완충용액 (assay buffer)[0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM DTT(Dithiothreitol), pH 7.4] 20.0  $\mu\text{l}$ , 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, Sigma, A1653)은 검색계에 필요 이상의 지방산이 들어가지 않도록 필수지방산이 특별히 제거된 (essentially fatty acid free) 특급으로 40 mg/ml의 15.0  $\mu\text{l}$ , 20 mg/ml의 콜레스테롤 2.0  $\mu\text{l}$ , 증류수 41.0  $\mu\text{l}$ 를 가하여 잘 섞어 37°C에서 20분간 예비 반응을 실시하였다.

상기 반응액에 8.0  $\mu\text{l}$ 의 [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] 올레오일-코에이 (0.05  $\mu\text{Ci}$ , 최종농도 10  $\mu\text{M}$ )를 첨가하여 다시 37°C에서 25분간 본 반응시킨 후, 1 ml의 이소프로판올:헵탄=4:1 (v/v)을 가하여 효소반응을 정지시켰다. 0.6 ml의 헵탄과 5배로 희석한 표준 완충용액 0.4 ml를 첨가하여 원심 분리하였다.

ACAT 효소 활성의 측정은 원심분리하여 얻은 분리층중에서 반응생성물을 함유하는 100  $\mu\text{l}$ 의 상층액에 3 ml의 신틸레이션 각테일 (scintillation cocktail, Lipoluma, Lumac Co.)을 첨가한 후, 리퀴드 신틸레이션 카운터 (liquid scintillation counter, Beckman, LS-6000TA)를 이용하여 방사능량 (radioactivity)을 측정하였다.

ACAT 효소 활성 저해도는 방사능으로 표지한 기질 및 효소에 검색시료를 넣어 반응결과물의 방사능량을 사용하여 계산하였고, 하기 수학적 식 2를 이용하여 ACAT 효소 활성 저해도를 계산하였다.

#### 【수학적 식 2】

$$\% \text{ 활성저해도} = 100 \times [1 - \{ \text{CPM(T)} - \text{CPM(C2)} / \text{CPM(C1)} - \text{CPM(B)} \}]$$

CPM(T): 시료 및 효소를 첨가하였을 때 CPM(counter per minute);

CPM(C1): 시료는 첨가하지 않고, 효소는 첨가하였을 때 CPM;

CPM(C2): 시료는 첨가하고, 효소는 첨가하지 않았을 때 CPM;

CPM(B): 시료 및 효소를 첨가하지 않았을 때 CPM

이때, 모든 반응은 0°C에서 실시하였고, 양성 대조군으로는 오보바톨(obovato1)을 사용하였다(Planta Med. 63, pp550-551, 1977).

상기 수학적 식 2를 이용하여 ACAT 효소 저해 활성을 측정하여 평균값 $\pm$ S.D으로 나타낸 결과, 양성 대조군인 오보바톨 (obovato1)의  $\text{IC}_{50}$  (Inhibition Concentration) 값은 44  $\mu\text{M}$ 이었고, 페어포비드 에이 메틸에스터의  $\text{IC}_{50}$  값은 2.2  $\mu\text{M}$ 로 나타났으며, 사용된 페어포비드 에이 메틸에스터의 농도에 의존하여 ACAT 효소 저해 활성을 보였다 (그림 8 참조).



표 5. 페어포비드 에이 메틸에스터의 ACAT 효소 저해 활성

농도( $\mu\text{g/ml}$ )	ACAT 저해 활성(%)
33	81.6 $\pm$ 1.65
11	78.7 $\pm$ 0.59
3.3	67.2 $\pm$ 1.83
1	29.7 $\pm$ 1.98

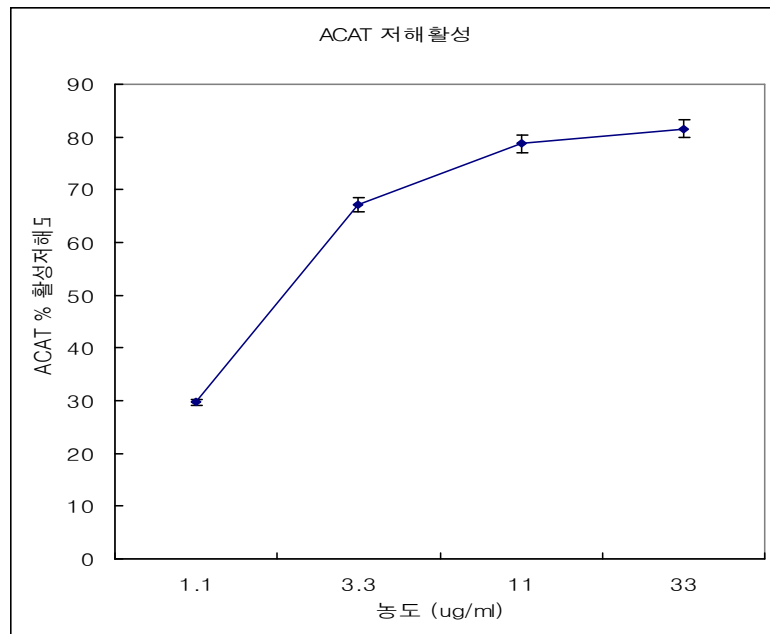


그림 8. 페어포비드 에이 메틸에스터의 ACAT 효소 저해 활성

상기의 결과로부터, 포르핀계 페어포비드 에이 메틸에스터에 대한 ACAT 효소 활성 저해도를 측정된 결과, 농도 의존적으로 저해 활성을 보이고, IC<sub>50</sub> 값이 2.2  $\mu\text{M}$ 로서, 양성 대조군보다 강력한 ACAT 저해효과를 확인하였다.

포르핀계 페어포비드 에이 메틸에스터 및 이를 포함하는 감잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 효소 활성 저해 및 살충작용을 하는 기작이 확실하고, 스테롤 대사기작 저해는 인축에 해가 없으므로 안심하고 사용할 수 있는 환경 친화적인 우수한 살충제 조성물로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 5) 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.) 유충에 대한 활성시험

배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.) 유충에 대한 활성시험은 시험곤충으로 배추좀나방 90 마리를 사용하여 살충실험을 하였다.

ACAT효소 저해 활성을 가진 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 정밀하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 트리톤X-100 100 ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다.

배추좁나방 유충의 먹이는 균일한 발육상태의 양배추잎을 잎 디스크 (지름 3.0 cm)로 잘라 준비된 활성검색물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 60분간 건조하였다.

증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬 (55×20 mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려놓고, 배추좁나방 2령 유충을 충체가 상하지 않도록 부드러운 붓으로 유충을 이동시켜 10마리씩 3반복으로 접종하였다. 활성검색물질이 처리된 배추좁나방 유충은 항온실 (25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 24, 48시간의 살충률을 조사하였다.

무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10% 용액에 트리톤 X-100 100 ppm 수용액 9배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다.

활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 이에 대한 결과를 표 6에 나타내었다.

수득한 감잎 추출물(DK)을 10 mg/ml씩 배추좁나방 유충에 처리하고 1일 간격으로 4일간 살충 정도를 측정하였을 때 대조군과 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났으며 농도, 시간 의존적으로 살충효과가 나타났다.

표 6. 감잎 추출물의 배추좁나방 유충 살충효과

	1DAT <sup>a</sup> (%)	2DAT <sup>b</sup> (%)	ACAT 저해활성 <sup>c</sup> (%)
DK	38.7±17.5	76.8±18.4	55.0
<sup>a</sup> 10 mg/ml, 24시간 동안 노출 <sup>b</sup> 처리 후 일자 <sup>c</sup> 최종농도: 50 µg/ml			

#### 6) 실험용 생쥐에 대한 경구투여 급성독성 시험

페어포비드 에이 메틸에스터를 임상적으로 활용하기 위하여 하기와 같은 방법으로 급성독성을 조사하였다.

6 주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 군당 5 마리씩으로 나누어 본 발명의 페어포비드 에이 메틸에스터를 0.5% 메틸셀룰로오즈 용액에 현탁하여 0.1 g/kg의 용량으로 단회 경구투여하였다. 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

그 결과 페어포비드 에이 메틸에스터를 투여한 동물에서는 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며 체중변화, 혈액생화학적 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 실험한 상기 화합물은 랫트에서 0.1 g/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며 경구 투여 최소치사량 (LD<sub>50</sub>)은 0.1 g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

### 3. 로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)의 알콜 추출물 및 알콜 추출물로부터 분리한 모노테르펜계 화합물인 버베논의 ACAT 저해활성 및 살충효과 연구

#### 1) 아실코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해물질의 제조

로즈마리 추출물의 제조는 대전 시장에서 구입 후 식물 분류학자에게 자문을 받아 물로 세척한 후 그늘에서 건조한 후, 분쇄기로 분말화 시켰다. 분말화 된 로즈마리 중량의 3배의 에탄올을 가하여 7일간 실온에서 추출한 후 여과하였다. 상기 여과액을 에틸에테르를 가하면서 감압 농축하여 조 시료로 제조하였다.

분말화된 로즈마리잎의 100g을 취하여 건조 질량 3배에 해당하는 에탄올 300ml을 가하여 마개를 하여 실온에서 7일간 추출한 뒤 여과 후 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 상기 조추출물을 에틸에테르를 넣어가면서 감압 농축하여 조추출물을 520mg을 얻어 50배량의 실리카겔(230-400 mesh, Art. 9385, Merck사)을 담체로 실리카겔 컬럼크로마토그래피(2× 10cm)를 수행하였다. 이때 용출용매로서 노르말헥산을 초기 용매(100%)로 하여 에틸아세테이트의 양을 증가시켜 헥산 : 에틸아세테이트 혼합액(3 : 1)까지 극성을 올리면서 분획을 받았다. 이 분획들을 아실 코에이 : 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해활성을 측정하여 그 중에서 가장 저해활성이 높은 분획들을 모아 농축하여 2차 실리카겔 컬럼크로마토그래피(2× 10cm)를 수행하였다. 이때 용출용매로서 헥산:에틸아세테이트를 초기 용매(100:1)로 하여 에틸아세테이트의 양을 증가시켜 헥산:에틸아세테이트 혼합액(3 : 1)까지 극성을 올리면서 분획을 받았다.

이 분획들을 아실 코에이 : 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 저해활성을 측정하여 그 중에서 가장 저해활성이 높은 분획들을 모아 농축하여 120mg을 얻었다. 실리카 겔 컬럼크로마토그래피를 행하여 활성물질을 담체로 세파덱스 LH-20컬럼에서 메탄올을 용출액으로 크로마토그래피를 수행하여 순수화합물로 화학식1의 활성물질(80mg)을 분리하였다.

#### 2) 활성물질의 이화학적 특성 분석

아실 코에이 : 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제를 저해하는 활성물질의 이화학적 특성을 분석하였다. 분자량을 측정하기 위하여 (electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 이용하였다. 활성물질의 구조를 알아보기 위하여 핵자기공명 방법을 이용하였다.

NMR실험은 각 시료를 CDCl<sub>3</sub> 녹여 5 mm NMR 튜브에서 수소 및 탄소 핵자기 공명 스펙트럼을 측정하였으며, 각 용매의 피이크를 Ttetramethylsilane의 피이크를 기준으로 측정하였다.

활성화합물에 대하여 물질의 성상, 분자량, 분자식 및 질량을 분석한 결과 활성물질의 성상은 유상이며, (M+Na)<sup>+</sup>는 174.3m/z로 측정되어, 화합물의 질량은 151.3으로 추정되었다.

고분해능 질량분석 결과 활성물질의 분자식은 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>로 추정되었다. 이화학적 특성을 참고 하면서 활성물질을 CDCl<sub>3</sub>에 녹여 분석한 수소 핵자기공명 스펙트럼에서 14분의 수소가 protons (1.00ppm (A), 1.49ppm (B), 2.01ppm (C), each 3H, s), (2.07ppm (D), 1H, d), (2.41ppm (E), 2.64ppm (F), each 3H, t), (2.8ppm (G), 1H, m), (5.72ppm (H), 1H, s)에서 측정되었다(그림 9).

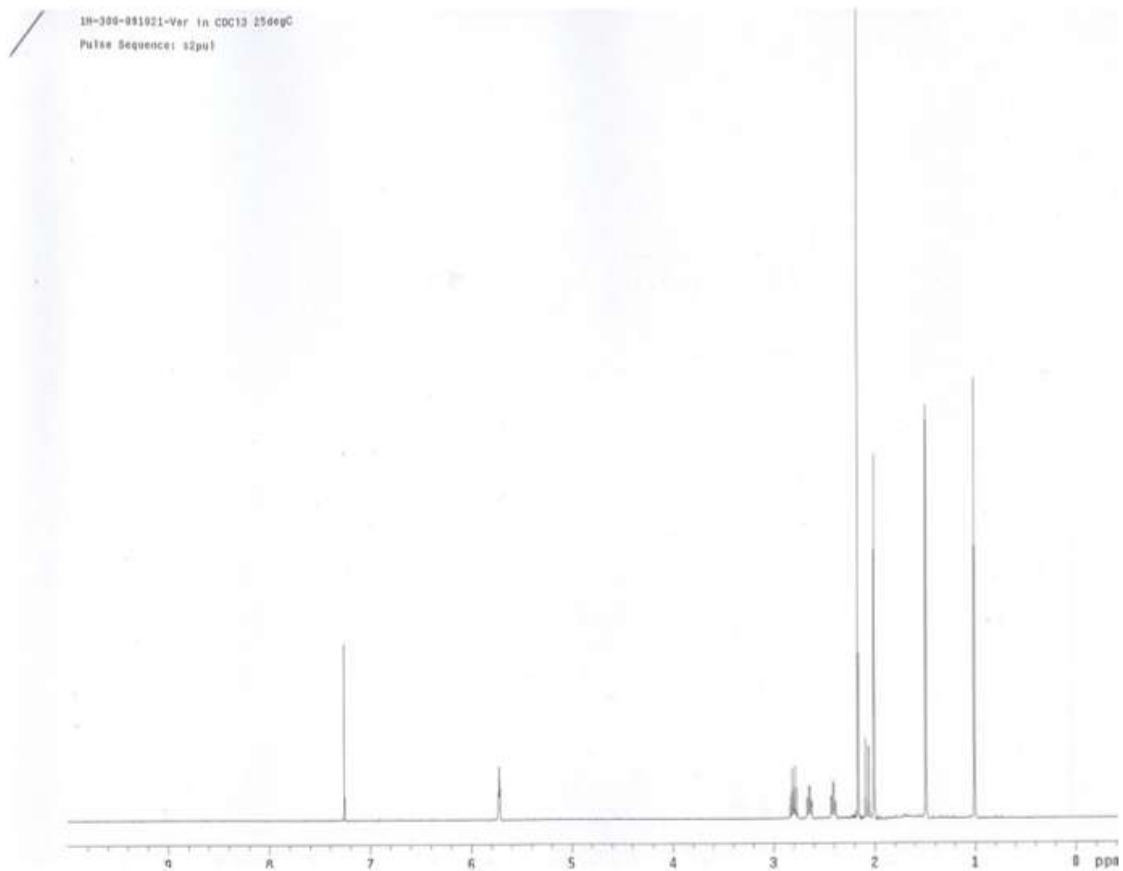


그림 9. 버베논의 <sup>1</sup>H NMR

탄소 핵자기공명 스펙트럼에서 10개의 탄소가(22 (C-1), 24 (C-2), 27 (C-3), 41 (C-4), 50 (C-5), 54 (C-6), 58 (C-7), 122 (C-8), 170 (C-9), 191 (C-10))측정되었다(그림 10). <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 스펙트럼에서 (A - B), (D - G), (E - G, F), (F-E, G), (G-D, E, F)가 관련 있음을 나타냈고(그림 11), HMBC 스펙트럼(그림 12)을 분석하여 활성물질의 구조를 추정한 결과, 활성 화합물은 (Passaro LC and Webster FX., J. Agric Food Chem. (2004) 19; 52 (10): 2896-2899 )에서 규명한 Verbenone과 일치하였다(그림 13).

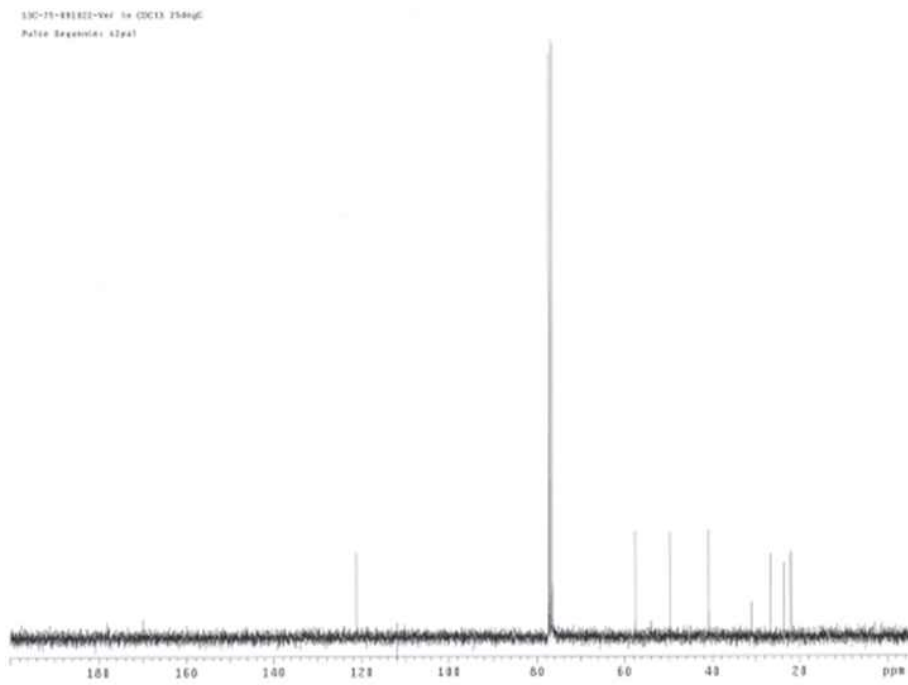


그림 10. 버베논의  $^{13}\text{C}$  NMR

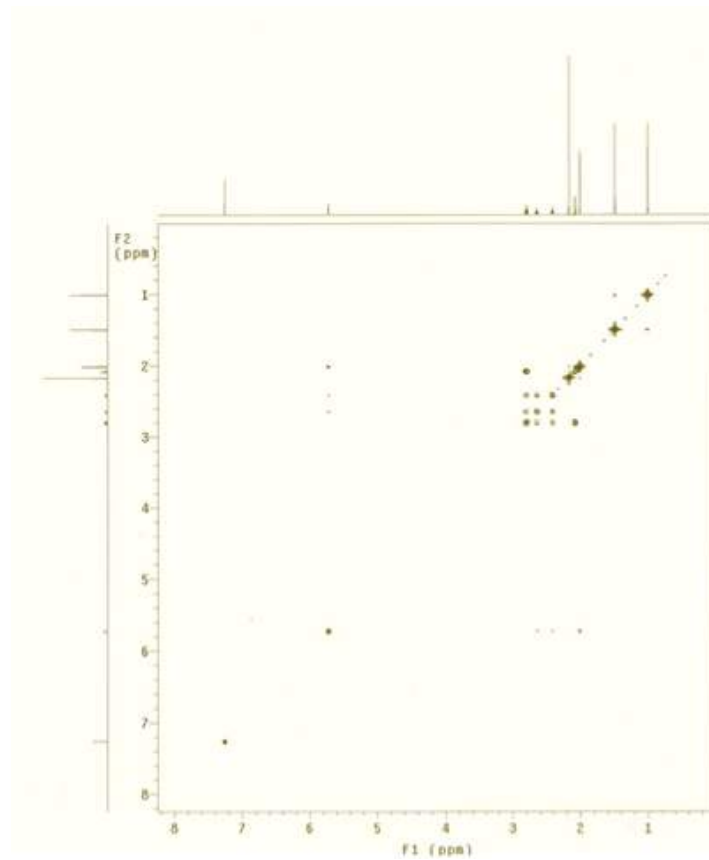


그림 11. 버베논의  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼

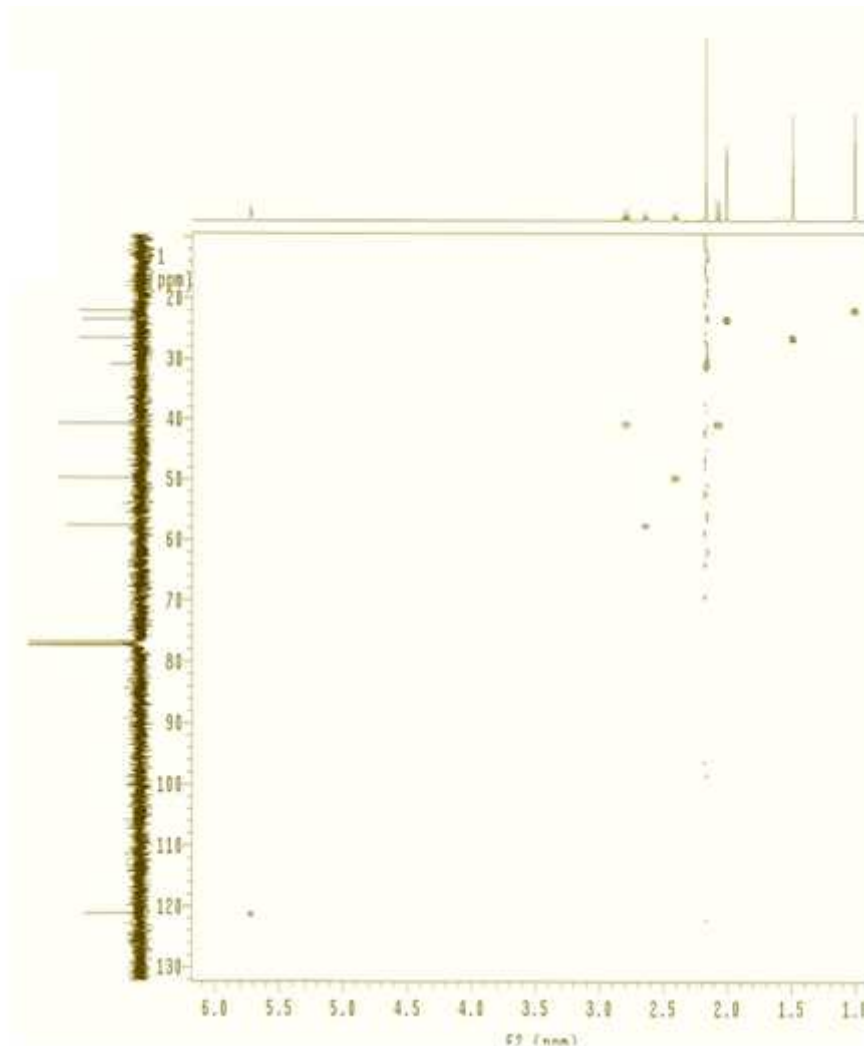


그림 12. 버베논의 HMBC 스펙트럼

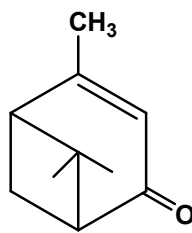


그림 13. 버베논의 화학구조식

### 3) ACAT 효소원의 제조

Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 효소원으로는 흰쥐 (Male Sprague - Dawley rats 250 -300 g)의 간을 분리하여 microsome buffer A (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4)로 세척하고 가위로 적당히 세절하고 teflon-glass homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 14,000 x g에서 15분 동안 원심 분리하여 침전물은 제거하고 상등액을 모

아 100,000 x g에서 1시간동안 원심 분리하였다. ACAT이 포함된 microsome 분리를 위해 원심 분리한 침전물을 microsome buffer B (0.25 M sucrose, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4)를 가하여 재 균질화 시킨후 100,000 x g에서 1시간동안 다시 원심 분리하였다.

시험 시 효소원의 단백질 농도의 균일화를 위하여 원심분리된 침전물에 microsome buffer B를 단백질함량을 간이 검사하기 위하여 적당히 가하여 침전물을 완전히 용해하였다. 단백질 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 방법에 의해 단백질 농도를 결정한 후, 효소원은 microsome buffer B로 희석하여 단백질 농도를 10 mg/ml로 조정하여 1 ml 바이알에 분주하여 -70 °C에서 보관하면서 시험에 사용하였다.

#### 4) 화합물의 ACAT활성 실험

아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성저해물질의 활성측정은 브리처(Brecher)방법을 약간 수정하여 사용하였다[Brecher. P and C. Chen; Biochimica Biophysica Acta 617:458~471, 1980]. 상기 방법은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성 효소원으로 흰쥐의 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤과 방사능으로 표식된 올레오일(oleoyl) 코에이(Co-A)를 효소반응시키는 것으로, 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으로 효소의 반응정도를 측정하였다.

구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 아세톤에 용해시킨 Triton WR-1339를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 K-포스페이트 완충용액(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 첨가하였다. 효소반응을 안정화 시키기 위하여 bovine serum albumin을 최종농도로 30 µM을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 적량넣어 37 °C에서 30 분간 예비반응시켰다.

상기 예비반응 후 본 반응은 기질인 [1-<sup>14</sup>C]oleoyl-Coenzyme A를 0.04 µCi가 되게 넣고 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 반응 완결 후 이소프로판올-헵탄 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 *n*-헵탄 0.6 ml와 KPB buffer 0.4 ml 를 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하였다. 분액이 되면 상등액 200 µl를 취하여 scintillation vial에 넣었다. 상기 용액에 scintillation cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 scintillation counter(Packard Delta-200)에서 생성된 cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 수학적 식 3에 따라 계산하였다.

#### 【수학적 식 3】

$$\text{저해활성(\%)} = [ 1 - (T-B/C-B) ] * 100$$

(상기 식에서,

T : 효소반응액에 시료를 넣어 시험구의 cpm값,

C : 효소반응액에 시료를 넣지 않은 대조구의 cpm값,

B : 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값)

이때 공시험은 효소원을 넣지 않은 시험값과 시료를 넣지 않은 시험값을 보정하여 저해 활성을 계산하였다. 그리고 실험의 양성 대조군으로는 obovatol을 사용하여 ACAT 저해활성을 측정 한 결과 IC<sub>50</sub>값은 44  $\mu$ M로 나타났다. 로즈마리 추출물과 버베논은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 효소에 농도의존적인 저해활성을 보여 주었다. 로즈마리로부터 분리하여 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 저해활성도를 측정하였을 때 버베논의 IC<sub>50</sub> 값은 2.3  $\mu$ M로 계산되었다(그림 14).

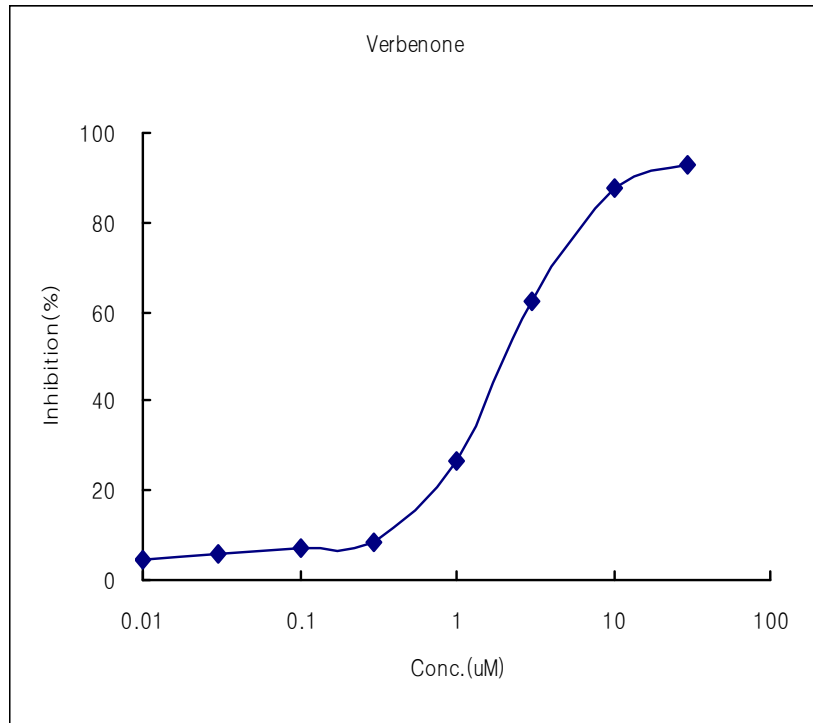


그림 14. 버베논의 ACAT 저해활성

#### 5) 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)유충에 대한 활성시험

본 연구에 사용된 시험곤충으로 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)으로 2009년 9월 경상북도 경주시 경북농약주식회사 연구부에서 살충실험을 하였다. 본 연구의 ACAT 저해활성을 가진 버베논은 정밀하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 triton X-100 100ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다.

배추좀나방 유충의 먹이는 균일한 발육상태의 양배추 잎을 잎 디스크(지름 3.0cm)로 잘라 준비된 활성검색물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 60분간 건조하였다. 증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬(55×20mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려놓고, 배추 좀나방 2령 유충을 충체가 상하지 않도록 부드러운 붓으로 유충을 이동시켜 10마리씩 3반복으로 접종하였다. 활성검색물질이 처리된 배추좀나방 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 24, 48시간의 살충률을 조사하였다. 무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10 % 용액에 triton X-100 100ppm 수용액 9배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다. 활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 이



에 대한 결과를 표 7에 나타내었다.

표 7과 그림 17에서 보는바와 같이 본 연구에 사용한 버베논을 50과 100 ppm씩 배추좀나방 유충에 처리하고 1일과 2일에 살충정도를 측정하였을 때 무처리 대조구와 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났으며 농도, 시간 의존적으로 살충 효과가 나타났다.

표 7. 버베논 처리에 의한 배추좀나방 유충 살충효과

시료	농도 (ppm)	반복	개체수	유충수		Day 살충률(%)
				1일	2일	
버베논	50	1	10	8	4	33.3
		2	10	8	5	
		3	10	8	8	
	100	1	10	6	4	56.7
		2	10	9	5	
		3	10	5	4	
무처리 대조구		1	10	0	0	0.0
		2	10	0	0	
		3	10	0	0	



그림 15. 버베논 처리에 의한 배추좀나방 유충 살충효과  
 1일; 버베논 50ppm 처리 48시간경과 후 섭식정도;  
 2일; 버베논 100ppm 처리 48시간경과 후 섭식정도;  
 3일; 버베논 무처리 48시간경과 후 섭식정도

## 5. 살충활성을 갖는 나프토크논류 화합물들의 유기합성방법과 살충효과 연구

본 연구는 ACAT 저해활성을 갖는 신규 설폰일 나프토크논류의 화합물의 제조방법 및 이로 부터 얻어진 화합물들의 살충활성 관한 연구 결과를 제공한다.

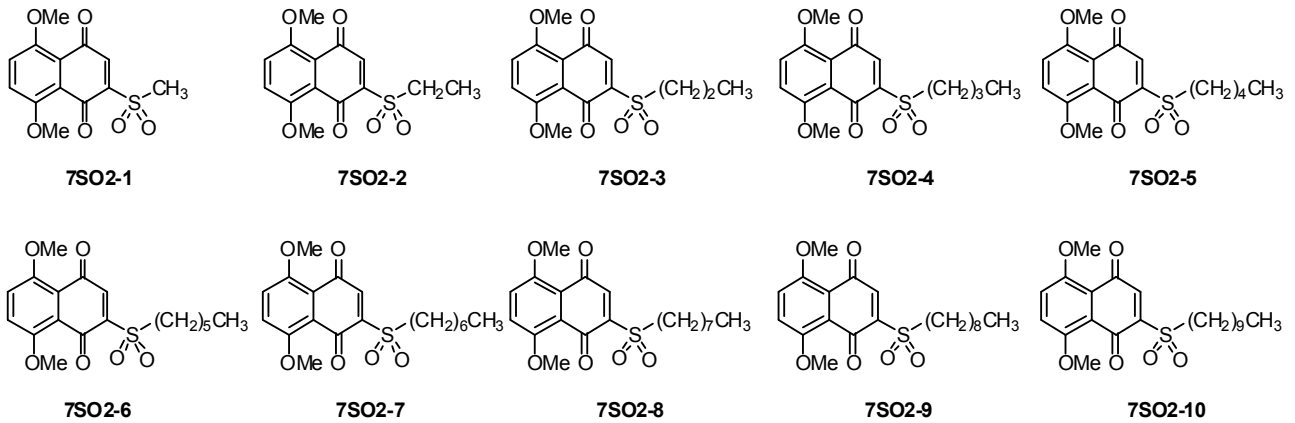
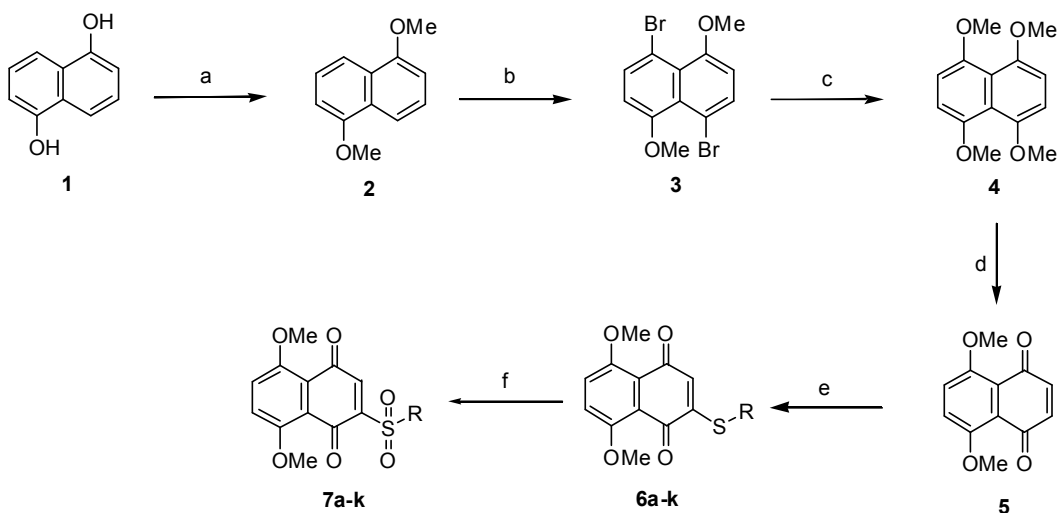


그림 16. 신규 설폰일 나프토크논류의 화합물의 구조식

### 1) 나프토크논류 화합물의 합성

아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제의 저해활성을 갖는 화합물의 유기화학적 합성 방법은 다음과 같다.



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) NaOH,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ , rt, 2h; (b) NBS, rt, 3h; (c)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , CuI, reflux 30h; (d) CAN, rt, 1h; (e) RSH,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , rt, 4h; (f) MCPBA, rt, 8h.

그림 17. 신규 설폰일 나프토크논류의 화합물의 제조 방법

### 1,5-Dimethoxynaphthalene(2)의 합성

2L의 2구 라운드플라스크에 질소가스의 존재 하에서 1,5-dihydroxynaphthalene 1 100g (0.62mol)을 10% NaOH 500ml (1.25mol)에 녹인 후 dimethyl sulfate 156g (1.24mol)을 1시간 동안 천천히 적가한 다음 2시간 동안 반응시켰다. 생성된 침전을 감압여과하여 5% KOH 200ml 씩으로 2회 세척한 다음 다시 증류수 200ml씩으로 3회 세척한 후 건조시켰다. 건조시킨 잔사에 벤젠 1.5L와 활성탄 300g을 넣어 80℃에서 완전히 녹여 뜨거울 때 여과한 뒤 방치하여 백색결정 73g을 얻었다.

수율: 63%, 녹는점: 181.9~182.3℃

Rf: 0.49 [헥산:에틸아세테이트(5:1)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.70(d, *J*=8.8Hz, 2H), 7.38(t, *J*=8.0Hz, 2H), 6.98(d, *J*=8.0Hz, 2H), 3.94(s, 6H)

### 4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene(3)의 합성

1000ml의 라운드플라스크에 1,5-dimethoxynaphthalene 2 10g (0.05mol)을 넣고 160ml의 아세토니트릴에 용해시켰다. 여기에 N-bromosuccinimide(NBS) 21g (0.12mol)을 180ml의 아세토니트릴에 용해시킨 용액을 천천히 적가하면서 교반하였다. 반응혼액을 실온에서 3시간 동안 교반시키고 감압여과하여 생성된 침전을 아세토니트릴로 세척하고 헥산으로 두 번 더 세척하여 건조시켜 백색분말 12.7g을 얻었다.

수율: 69.02%, 녹는점: 187~188℃

Rf: 0.20 [헥산:에틸아세테이트(50:1)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.68(d, *J*=8.4Hz, 2H), 6.72(d, *J*=8.4Hz, 2H), 3.91(s, 6H)

### 1,4,5,8-Tetramethoxynaphthalene(4)의 합성

4,8-Dibromo-1,5-dimethoxynaphthalene 3 14.5g (0.04mol)과 sodium methoxide 7.5g (0.14mol), copper(I) iodide 26.3g (0.14mol)을 디메틸포름아미드 50% 메탄올 용액 700ml에 녹이고 30시간 환류하였다. 반응혼합액을 냉각시킨 다음 얼음물 1L에 넣고 생성되는 침전물을 여과, 세척하여 얻은 잔사를 건조시킨 후 메틸렌클로라이드 1L에 녹여 불용물을 여과제거하고 감압농축하였다. 벤젠으로 재결정하여 백색침전물 6.5g을 얻었다.

수율: 62.5%, 녹는점: 168~169℃

Rf: 0.14 [헥산:메틸렌클로라이드(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 6.85(s, 4H), 3.90(s, 12H)

### 5,8-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone(5)의 합성

250ml 1구 라운드 플라스크에 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene 4 10g (40.28mmol)을 넣고 아세토니트릴 450ml, 클로로포름 150ml 혼합용액에 녹인 후 ceriumdiammonium nitrate 54g (98.5mmol)을 250ml의 물에 녹여 30분간 천천히 적가하였다. 반응혼액을 30분간 더 반응시키고 증류수 500ml을 넣은 후 클로로포름 500ml씩으로 세 번 추출한 뒤 무수망초로 탈수시켰다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 메탄올로 재결정하여 적갈색의 침상물질 4.80g을 얻었다.

수율: 54.6%, 녹는점: 122~123℃

Rf: 0.22 [헥산:에틸아세테이트(1:2)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(s, 2H), 6.79(s, 2H), 3.97(s, 6H)

### 2-Alkylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones(6a-k)의 합성

1구 100ml의 라운드 플라스크에 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone 5 1.38mmol을 무수메탄올 30ml에 용해시킨 후 alkylmercaptan 1.65mmol을 넣고 4시간 동안 교반시켰다. 반응혼액에 sodium dichromate 0.23mmol과 황산 0.76mmol을 물에 용해시켜 천천히 적가한 후 실온에서 3분간 교반하였다. 반응혼액에 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 100ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 메탄올로 재결정하여 목적하는 적갈색의 6a-k를 얻었다.

### 2-Methylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6a)

수율: 46.8%, 녹는점: 167~169°C

Rf: 0.28 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.2Hz, 1H), 7.27(d, *J*=9.2Hz, 1H), 6.41(s, 1H), 3.97(s, 3H), 3.96(s, 3H), 2.31(s, 3H)

### 2-Ethylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6b)

수율: 61.2%, 녹는점: 130~131°C

Rf: 0.23 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.32(d, *J*=9.2Hz, 1H), 7.26(d, *J*=9.2Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 3.94(s, 6H), 2.78(q, *J*=7.2Hz, 2H), 1.38(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Propylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6c)

수율: 60%, 녹는점: 80~81°C

Rf: 0.28 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, *J*=9.2Hz, 1H), 7.27(d, *J*=9.2Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 3.96(s, 6H), 2.74(t, *J*=7.2Hz, 2H), 1.81~1.72(m, 2H), 1.08(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Butylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6d)

수율: 53.5%, 녹는점: 104~105°C

Rf: 0.32 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.27(d, *J*=9.6Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 3.95(s, 6H), 2.76(t, *J*=7.2Hz, 2H), 1.76~1.68(m, 2H), 1.54~1.45(m, 2H), 0.96(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Pentylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6e)

수율: 42.1%, 녹는점: 101~102°C

Rf: 0.48 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.27(d, *J*=9.6Hz, 1H), 6.44(s, 1H),

3.95(s, 3H), 3.95(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 1.77~1.33(m, 6H), 0.92(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Hexylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6f)

수율: 42.1%, 녹는점: 139~140°C

Rf: 0.33 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.33(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.27(d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 6.44(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 1.73~1.48(m, 2H), 1.47~1.30(m, 6H), 0.90(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Heptylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6g)

수율: 62.5%, 녹는점: 125~126°C

Rf: 0.32 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.33(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.26(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 6.45(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.2$ , 2H), 1.75~1.26(m, 10H), 0.89(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Octylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6h)

수율: 44.2%, 녹는점: 109~110°C

Rf: 0.52 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.33(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.26(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 6.44(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.2$ , 2H), 1.77~1.27(m, 12H), 0.88(t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Nonylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6i)

수율: 77%, 녹는점: 75~76°C

Rf: 0.45 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.33(d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 7.27(d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 6.44(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 1.77~1.27(m, 14H), 0.89(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Decylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6j)

수율: 64.5%, 녹는점: 97~98 °C

Rf: 0.45 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.33(d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 7.27(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 6.45(s, 1H), 3.97(s, 3H), 3.96(s, 3H), 2.75(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 1.76~1.26(m, 16H), 0.88(t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H)

#### 2-Phenylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(6k)

수율: 58%, 녹는점: 105~106°C

Rf: 0.30 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.52~7.47(m, 5H), 7.31(s, 2H), 5.97(s, 1H), 3.98(s, 3H), 3.92(s, 3H)

#### 2-Alkylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones(7S02 화합물들)의 합성

실온에서 2-alkylthio-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone **6a-k** 0.19mmol 을 10ml의 메틸렌클로라이드에 녹이고 77% MCPBA 0.43mmol을 넣고 8시간 반응시켰다. 반응혼액에 10%의 sodium bicarbonate를 넣고 포화 염화나트륨 수용액 50ml을 넣은 뒤 클로로포름 50ml로 3회 추출하였다. 유기층을 무수망초로 탈수시킨 후 여과하여 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 컬럼크로마토그래피를 실시하여 목적하는 적갈색 물질 7S02 화합물들을 얻었다.

#### 2-Methylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-1)

수율: 46.9%, 녹는점: 211~212°C

Rf: 0.18 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.49(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.37(s, 3H)

#### 2-Ethylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-2)

수율: 65.9%, 녹는점: 164~165°C

Rf: 0.21 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.50(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 2.05(q, *J*=7.6Hz, 2H), 1.35(t, *J*=7.6Hz, 3H)

#### 2-Propylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-3)

수율: 20.7%, 녹는점: 208~209°C

Rf: 0.25 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.50(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.53(t, *J*=8.2Hz, 2H), 1.82~1.78(m, 2H), 1.07(t, *J*=7.6Hz, 3H)

#### 2-Butylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-4)

수율: 60.3%, 녹는점: 112~113°C

Rf: 0.26 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.48(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.54(t, *J*=8.0Hz, 2H), 1.79~1.71(m, 2H), 1.49~1.44(m, 2H), 0.94(t, *J*=7.6Hz, 3H)

#### 2-Pentylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-5)

수율: 33.3%, 녹는점: 42~43°C

Rf: 0.37 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.50(s, 1H), 7.42(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.54(t, *J*=8.0Hz, 2H), 1.80~1.72(m, 2H), 1.44~1.37(m, 4H), 0.88(t, *J*=7.2Hz, 3H)

#### 2-Hexylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-6)

수율: 32%, 녹는점: 40~41°C

Rf: 0.33 [헥산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.49(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.54(t, *J*=8Hz, 2H), 1.79~1.71(m, 2H), 1.42~1.40(m, 2H), 1.30~1.25(m, 4H), 0.87(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Heptylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-7)

수율: 29.7%, 녹는점: 79~80°C

Rf: 0.38 [핵산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.49(s, 1H), 7.40(s, 2H), 3.98(s, 6H), 3.55~3.47(m, 2H), 1.79~1.71(m, 2H), 1.41~1.39(m, 2H), 1.30~1.21(m, 6H), 0.86(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Octylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-8)

수율: 32%, 녹는점: 92~94°C

Rf: 0.41 [핵산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.49(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.53(t, *J*=8.0Hz, 2H), 1.79~1.71(m, 2H), 1.45~1.36(m, 2H), 1.30~1.20(m, 8H), 0.86(t, *J*=7.2Hz, 3H)

### 2-Nonylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-9)

수율: 40.1%, 녹는점: 101~103°C

Rf: 0.38 [핵산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.49(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.53(t, *J*=8.4Hz, 2H), 1.79~1.72(m, 2H), 1.58~1.56(m, 2H), 1.41~1.39(m, 2H), 1.28~1.24(m, 8H), 0.89(t, *J*=8.4Hz, 3H)

### 2-Decylsulfonyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(7S02-10)

수율: 31.4%, 녹는점: 127~128°C

Rf: 0.57 [핵산:에틸아세테이트(1:4)]

<sup>1</sup>H-NMR (CDC1<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.50(s, 1H), 7.41(s, 2H), 3.99(s, 6H), 3.53(d, *J*=8.4Hz, 2H), 1.79~1.71(m, 2H), 1.43~1.37(m, 2H), 1.30~1.24(m, 12H), 0.87(t, *J*=6.8Hz, 3H)

## 2) 나프토크논류의 ACAT활성 실험

아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성저해(이하 "ACAT"라 칭한다.)물질의 활성 측정은 브리쳐(Brecher)방법을 약간 수정하여 사용하였다[Brecher.P and C. Chen; Biochimica Biophysica Acta 617:458~471, 1980]. 상기 방법은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성 효소원으로는 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤과 방사능으로 표식된 올레오일(oleoyl) 코에이(Co-A)를 반응시키는 것으로, 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으로 반응정도를 측정하였다.

구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 아세톤에 용해시킨 Triton WR-1339를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 K-포스페이트 완충용액(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 첨가하였다. 효소반응을 안정화 시키기 위하여 bovine serum albumin을 최종농도로 30 μM을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 적량넣어 37 °C에서 30 분간 예비반응시켰다. 상기 예비

반응 후 본 반응은 기질인 [1-<sup>14</sup>C]oleoyl-Coenzyme A를 0.04 μCi가 되게 넣고 37 °C에서 30분 간 반응시켰다. 반응 완결 후 이소프로판올-헵탄 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 *n*-헵탄 0.6 ml와 KPB bufferf 0.4 ml 를 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하였다. 분액되면 상등액 200 μ l를 취하여 scintillation vial에 넣었다. 상기 용액에 scintillation cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 scintillation counter(Packard Delta-200)에서 생성된 cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 수학적 식 4에 따라 계산하였다.

**【수학적 식 4】**

$$\text{저해활성}(\%) = [ 1 - (T-B/C-B) ] * 100$$

(상기 식에서,

T : 효소반응액에 시료를 넣어 시험구의 cpm값,

C : 효소반응액에 시료를 넣지않은 대조구의 cpm값,

B : 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값)

상기 ACAT 저해율을 측정 한 결과 상기화학식 7S02-1 ~ 7S02-10으로 이루어진 그룹의 화합물들의 ACAT 저해율을 측정 한 결과 화합물들은 농도의존적인 저해활성을 보였다. 각 화합물의 ACAT 저해정도는 그림 18에 나타냈다. 시험에 사용한 화학식 7S02-1 ~ 7S02-10 의 ACAT 효소의 저해활성을 50 % 저해하는 농도는 7S02-10 화합물이 가장 저해활성이 좋은 것으로 나타났다.

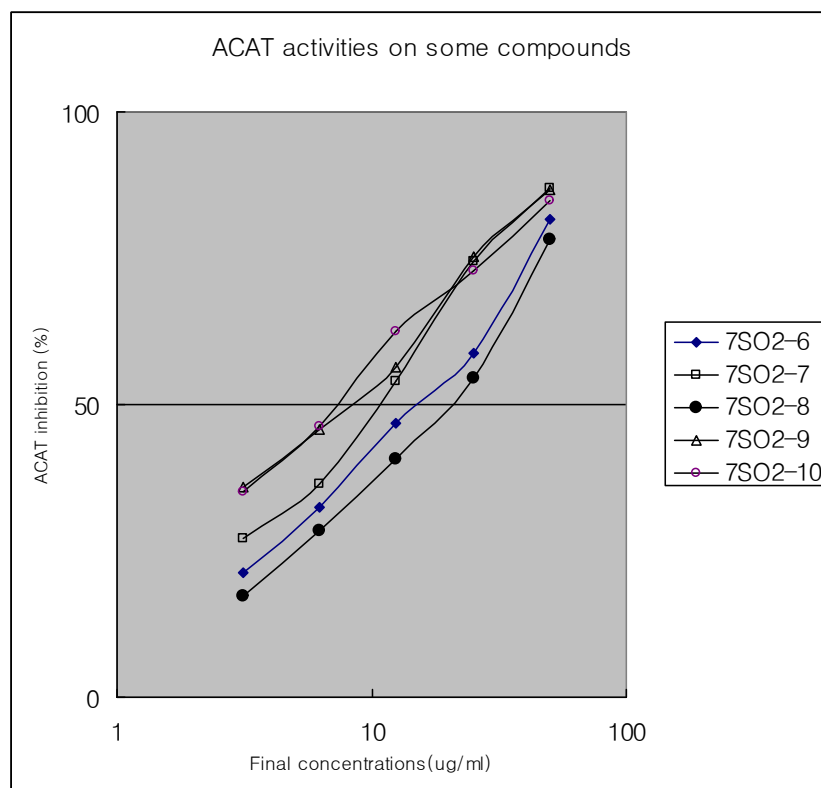


그림 18. 활성화합물들의 ACAT 저해 활성



### 3) 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)유충에 대한 활성시험

본 연구에 사용된 시험곤충으로 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 충청북도 청주시 충북대학교 농업생물환경대학 농생물과에서 살충실험을 하였다. 본 dsurn의 ACAT 저해활성을 가진 화합물은 정확하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 triton X-100 100ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다.

배추좀나방 유충의 먹이는 균일한 발육상태의 양배추잎을 잎 디스크(지름 3.0cm)로 잘라 준비된 활성검색물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 60분간 건조하였다. 증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬(55×20mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려놓고, 배추 좀나방 2령 유충을 충체가 상하지 않도록 부드러운 붓으로 유충을 이동시켜 10마리씩 3반복으로 접종하였다. 활성검색물질이 처리된 배추좀나방 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 24, 48시간의 살충율을 조사하였다. 무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10 % 용액에 triton X-100 100ppm 수용액 9배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다. 활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 Finney(1982)의 probit 계산법에 의해 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)을 산출하였다.

표 8에서 보는 바와 같이, 본 발명에 사용한 ACAT저해제 중에 7S02-8을 1, 10, 100PPM 씩 배추 좀나방 유충에 처리하고 24 시간 간격으로 살충정도를 측정하였을 때 비교구와 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났다. 100ppm, 10ppm을 처리한 처리구에서의 살충 활성이 1PPM으로 처리한 처리구에서 보다 살충수가 적은 이유는 사용한 화합물7S02-8의 기피효과로 보여졌고 1PPM 처리구에서도 살충활성이 85%로 아주 높은 살충활성을 나타냈다.

표 8. 활성화합물 7S02-8의 배추좀나방 살충활성

약제	농도	반복	N	살충수				4D살충률 (%)±SD
				1D	2D	3D	4D	
7S02-8	100	1	9	0	0	1	5	51.9±30.2
		2	10	0	0	2	2	
		3	10	0	0	2	8	
	10	1	7	0	1	3	7	73.3±30.6
		2	10	0	0	1	4	
		3	10	1	1	4	8	
	1	1	10	2	7	7	7	85.8±15.1
		2	6	0	4	4	6	
		3	8	0	3	7	7	

## 5. 피리피로펜 유도체의 ACAT 저해활성 및 살충효과 연구

### 1) 피리피로펜 A의 생산

본 연구에 사용된 활성중간체인 피리피로펜 A의 생산균주 페니실리움 그리세오폴범 F1959(*Penicillium griseofulvum* F1959)는 대한민국 경상북도 울산에서 채취한 토양에서 분리한 균으로 균학적 연구로 *Penicillium griseofulvum*으로 판명되어 생명공학연구소 한국중균협회에 *Penicillium griseofulvum* F1959로 기탁하여 기탁번호 KCTC 0387BP를 부여받았다.

냉동 보관된 상기 균주(10 % 글리세롤, -80℃)를 차폐장치(baffle)가 있는 1 L 삼각플라스크에 100 ml 종균배지(포도당 0.5%, 이스트 추출물 0.2%, 폴리펩톤 0.5%, 인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 칠배 결정수 0.05%, pH 5.8로 조정 후 멸균)에 접종하여 29℃에서 18시간 동안 진탕 배양하였다. 상기 배양된 종균 20 ml를 차폐장치가 1자로 달려 있는 5 L 삼각플라스크에 활성물질 생산배지 1L(가용성 전분 2%, 소이톤 0.4%, 파마미디아 0.3%, 인산칼륨 0.1%, 황산마그네슘 칠배결정수 0.05%, 탄산칼슘0.3%, 나트륨클로리드 0.2%, pH 5.8로 조정 후 멸균)에 접종하여 26℃에서 120시간 동안 원운동으로 진탕 배양하였다.

상기에서 배양이 끝난 발효액에 동량의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 교반추출한 후 감압 농축하고 갈색 유상의 추출물을 얻었다. 상기 추출물을 실리카겔(Merck사, 9385) 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올=99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 90:10 V/V %, 실리카겔의 4배량)를 수행하고,분액을 박막 크로마토그래피로 물질의 분포도를 확인하고 같은 물질군들을 모아 in vitro ACAT 저해 활성을 측정 한 후 저해활성 부분을 모았는데 저해활성물질은 클로로포름-메탄올 95:5~ 90:10 V/V %에서 용출되었고 유기 용매층을 감압 농축하여 유상의 황갈색 추출물을 얻었다.

상기방법에 의하여 얻어진 황갈색 추출물을 고속 액체크로마토그래피를 사용하여 본 발명의 활성물질 중간체인 피리피로펜 A를 분리하였다. 구체적으로, 고속 액체크로마토그래피 컬럼은 와이엠씨(YMC)사의 ODS(20 x 250 mm)를 사용하였으며, 검출기는 자외선검출기를 사용하였으며, 322 nm에서 상기 피리페로펜 A를 검출하였다.

상기 정제된 활성물질을 아세트나이트릴/물(45/55, 부피비)을 용매로 하여 용출하였고, 11분에 피리피로펜 A(pyripyropene A)를 용출하였다. 상기 얻어진 용출액을 감압농축하여 한 번 더 정제하여 무색의 결정인 피리피로펜 A를 얻었다. 화합합성 출발물질 피리피로펜 A의 생산량은 120시간 배양한 발효액 1 L당 30 mg 얻었다.

2) 피리피로펜 유도체의 합성

피리피로펜 A를 출발물질로 하여 다음의 구조식을 가지는 화합물들을 합성하였다.

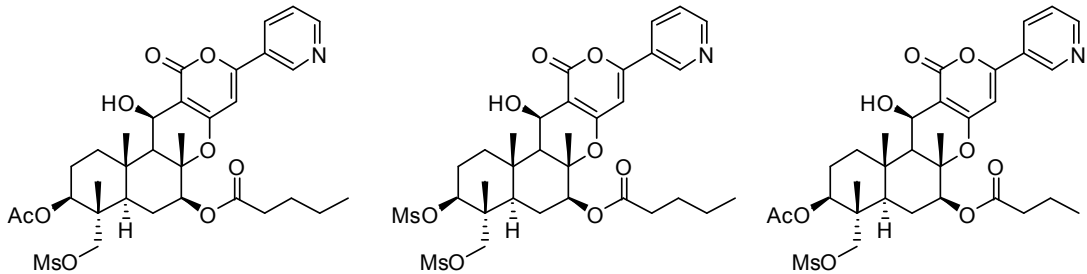


그림 19. 피리피로펜 A 유도체

① 화학식 1과 화학식 2 화합물들의 합성

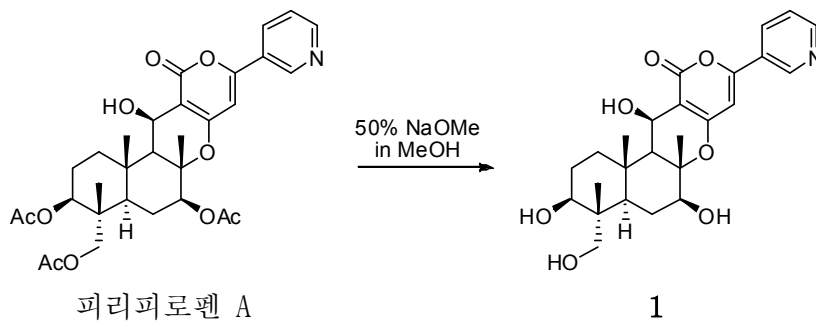


그림 20

피리피로펜 A (75 mg, 0.129 mmol)의 MeOH (5 mL)용액에 NaOMe (50%, 110 ml, 8eq.)를 가하고 상온에서 12시간동안 교반하였다. 반응이 완결된 것은 TLC로 출발물질을 확인하였다. 모든 화합물이 1이 된 것을 확인한 후에 NH<sub>4</sub>Cl 수용액 (1 mL)을 넣은 후, 감압농축하고 얻은 잔사를 과량의 EtOAc로 희석하고, 여과하여 화합물 1(54mg, 92%)을 노란색 고체로 얻었다.

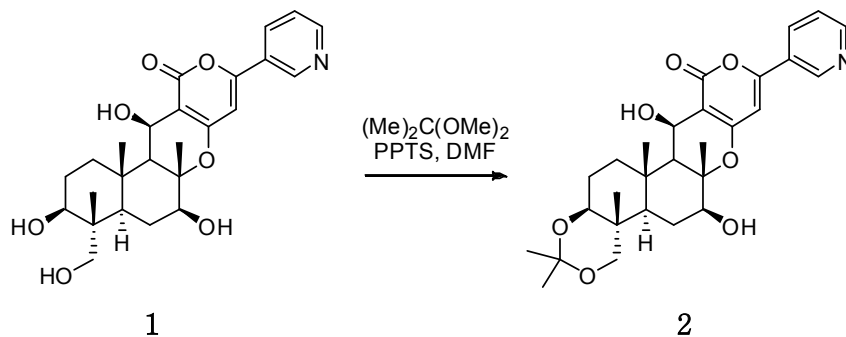


그림 21

화합물 1 (10 mg, 0.022 mmol)의 DMF (1.0 mL) 용액에 dimethoxypropane (28 ml, 10 eq) , PPTS (5.5 mg, 1 eq)를 넣고 20시간동안 상온에서 교반하였다. 반응혼합물을 감압농축하여 DMF를 제거하고, 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:MeOH = 12: 1)하여 acetonide 2 (11mg, 100%)를 고체로 얻었다.

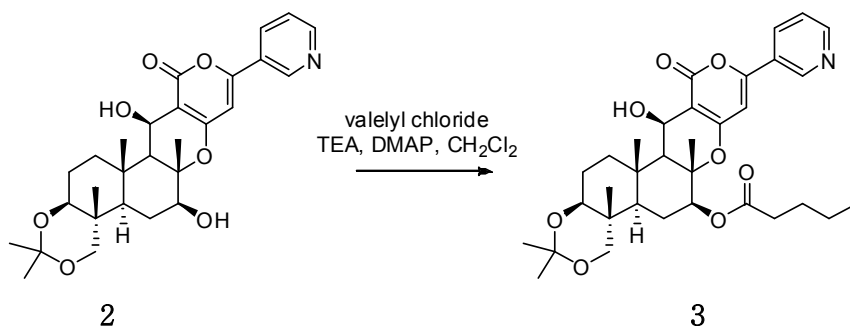


그림 22

Acetonide 2 (8.5 mg, 0.017 mmol), Et<sub>3</sub>N (23 mL, 10eq.), 4-DMAP (2 mg)의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1 mL) 용액을 넣고 얼음물수조에서 냉각시킨 후 valeryl chloride (4.2 mg, 2 eq.)를 넣고 3시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 EtOAc (10 mL)로 희석한 후, 물, brine으로 세척하고, MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후, 여과하고 감압농축 하였다. 얻어진 잔사를 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (EtOAc:Hex = 2:1)하여 물질을 분리하고 건조시켜 3 (9.3 mg, 94%)를 고체로 얻었다.

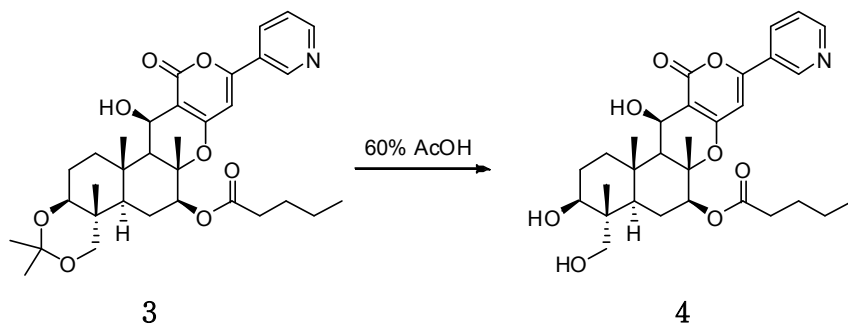


그림 23

화합물 3 (12 mg, 0.0206 mmol)에 60% AcOH (1 mL)를 가하고, 상온에서 20시간 동안 교반 하였다. 반응 종료 후에 NaHCO<sub>3</sub> 수용액을 가하여 AcOH를 중화하고, 반응혼합물을 감압농축 하였다. 얻어진 잔사를 EtOAc로 희석한 후 물, brine으로 세척하고, MgSO<sub>4</sub>로 건조한 후, 여과 및 감압농축 하였다. 얻어진 잔사를 컬럼크로마토그래피(EtOAc:MeOH = 12:1)하여 화합물 4 (10.5 mg, 95%)를 고체로 얻었다.

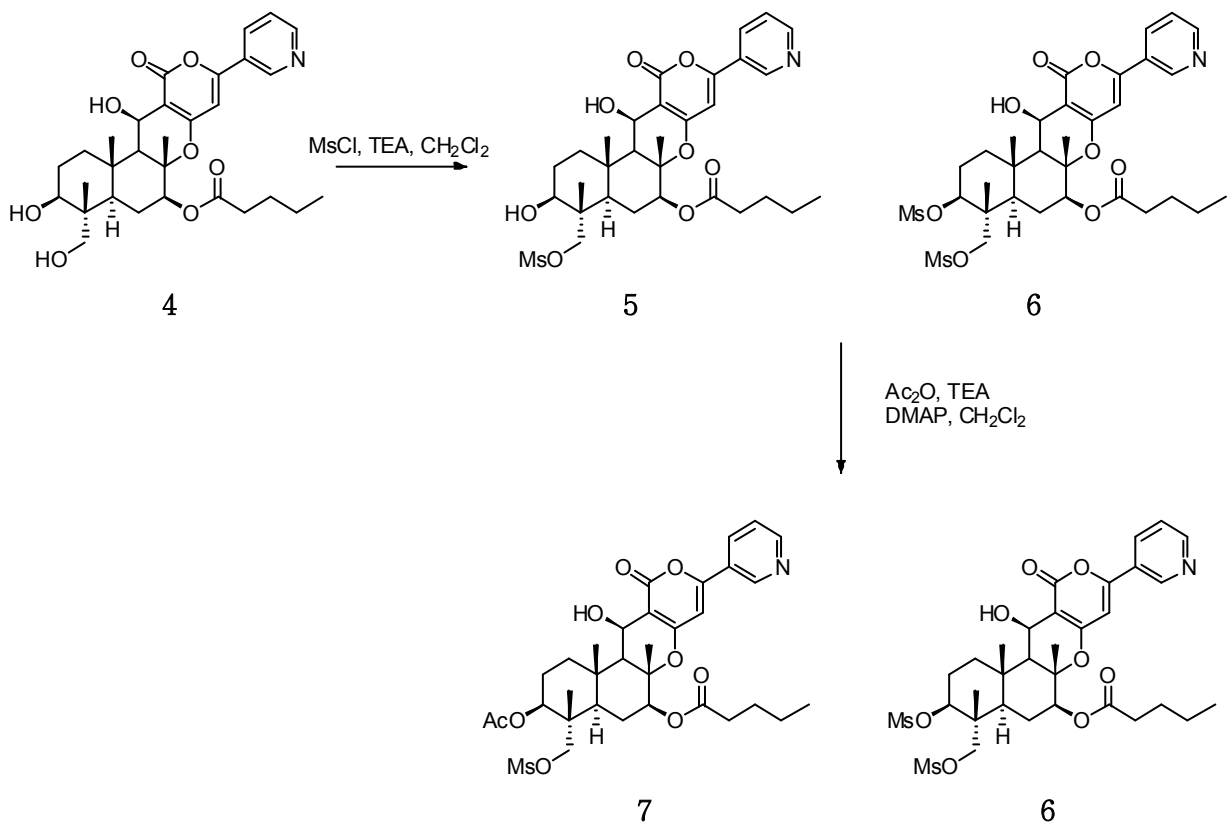


그림 24

화합물 4 (13 mg, 0.024 mmol), Et<sub>3</sub>N (33 mL, 10eq.), 4-DMAP (2 mg)의 Pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/2, 1 mL) 용액에, 0 °C에서 MsCl (4.2 mg, 1.5 eq.)를 넣고 4시간동안 교반하였다. 반응혼합물을 감압농축한 후, PTLC (EtOAc:Hex:MeOH = 20:20:1) 하여 혼합물 5와 6(6.7 mg, 45%)을 고체로 얻었다. 혼합물 5와 6 (6.6 mg, 0.011 mmol), Et<sub>3</sub>N (16 mL, 10eq.), 4-DMAP (2 mg)의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) 용액에, 0 °C에서 Ac<sub>2</sub>O (1.6 mg, 1.5 eq.)를 넣고 4시간동안 교반하였다. 반응혼합물을 감압농축한 후, 컬럼크로마토그래피(EtOAc:Hex:MeOH = 20:20:1)하여 7 (6.0 mg, 85%)와 6 (0.9mg, 15%)를 고체로 얻었다.

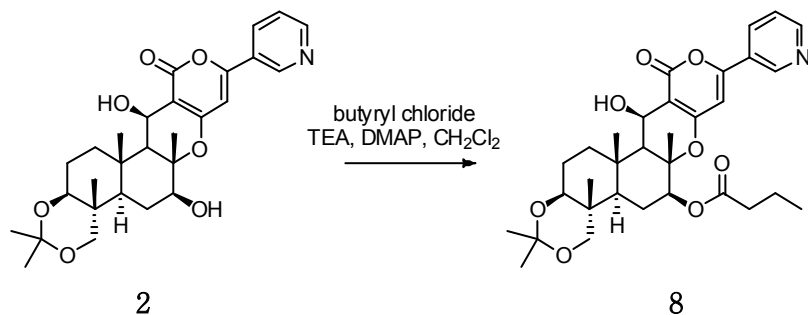


그림 25

상기의 화합물 3 합성과 동일한 방법을 사용하여 8 (92%)을 얻었다.

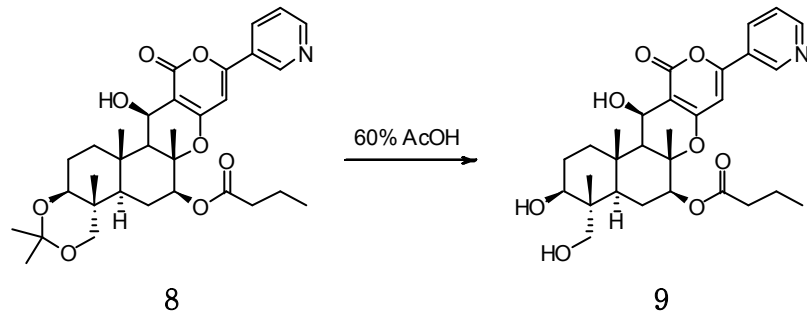


그림 26

상기의 화합물 4 합성과 동일한 방법을 사용하여 9 (93%)를 얻었다.

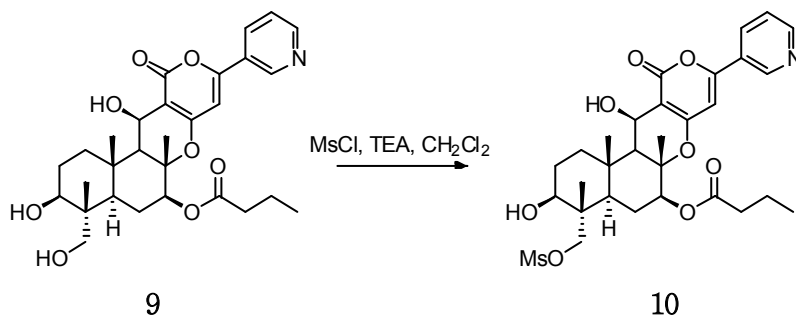


그림 27

상기의 화합물 5 합성과 동일한 방법을 사용하여 10 (51%)를 얻었다.

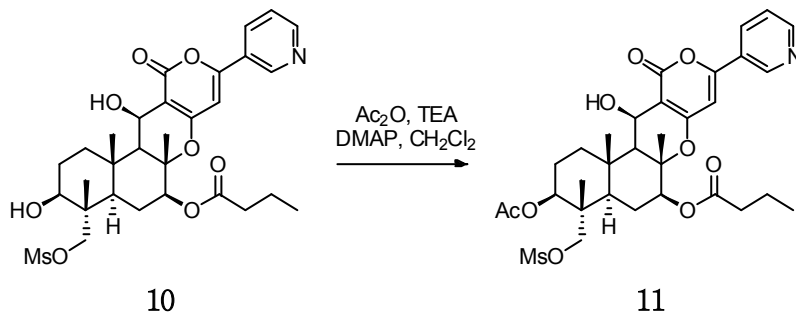


그림 28

상기의 화합물 7 합성과 동일한 방법을 사용하여 11 (89 %)를 얻었다.

### 3) 본 발명의 합성화합물의 ACAT활성 실험

ACAT 저해물질의 활성측정은 브리처(Brecher)방법을 약간 수정하여 사용하였다[Brecher.P and C. Chen; Biochimica Biophysica Acat 617:458~471, 1980]. 상기 방법은 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 활성 효소원으로는 간으로부터 부분 정제한 마이크로솜을 사용하였으며, 기질로는 콜레스테롤과 방사능으로 표식된 올레오일(oleoyl) 코에이(Co-A)를 반응시키는 것으로, 반응생성물인 콜레스테롤 에스테르(cholesterol ester)에 포함된 방사능의 양으

로 반응정도를 측정하였다. 구체적으로, 아세톤에 용해시킨 콜레스테롤과 아세톤에 용해시킨 Triton WR-1339를 물에 현탁시켜 아세톤은 질소가스로 제거한 후 K-포스페이트 완충용액(pH 7.4, 최종농도 0.1 M)을 첨가하였다. 효소반응을 안정화 시키기 위하여 bovine serum albumin 을 최종농도로 30  $\mu$ M을 넣고, DMSO 또는 MeOH로 녹인 시료를 적량넣어 37  $^{\circ}$ C에서 30 분간 예비반응시켰다.

상기 예비반응 후 본 반응은 기질인 [1- $^{14}$ C]oleoyl-Coenzyme A를 0.04  $\mu$ Ci가 되게 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응 완결 후 이소프로판올-헵탄 1 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 *n*-헵탄 0.6 ml와 KPB buffer 0.4 ml 를 넣고 잘 섞은 후 2분간 방치하였다. 분액이 되면 상등액 200  $\mu$ l를 취하여 scintillation vial에 넣었다. 상기 용액에 scintillation cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 넣어 scintillation counter(Packard Delta-200)에서 생성된 cholesteryl oleate의 양을 측정하였으며 저해활성은 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

**【수학적 식 5】**

$$\text{저해활성(\%)} = [ 1 - (T-B/C-B) ] * 100$$

(상기 식에서,

T : 효소반응액에 시료를 넣어 시험구의 cpm값,

C : 효소반응액에 시료를 넣지 않은 대조구의 cpm값,

B : 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조구의 cpm값)

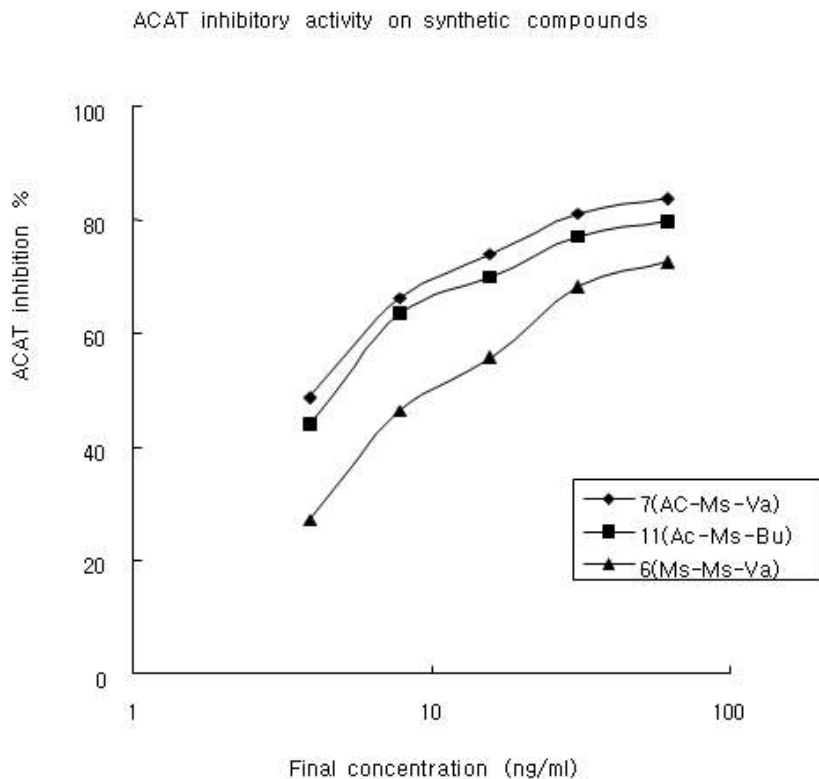


그림 29. 피리피로펜 A 유도체의 ACAT 저해활성

상기의 방법으로 활성물질들의 ACAT 저해율을 측정 한 결과, 피리피로펜 A는 효소의 활성을 50 % 저해하는 농도 즉 IC<sub>50</sub>는 35 ng/ml로 분자량이 583이므로 60 nM로 계산되었다. 그리고 합성된 화합물 6a, 6b, 6a1 의 효소의 활성을 50 % 저해하는 농도는 4.9 ng/ml, 5.3 ng/ml, 7.8 ng/ml로 나타났으며(그림 31), 화합물 7, 6, 11의 분자량이 719, 815, 707이므로 50 % 저해농도를 계산하면 IC<sub>50</sub>는 각각 6.8 nM, 9.6 nM, 7.5nM로 계산되었다. 즉 피리피로펜 에이를 유기합성적 방법으로 구조변환하여 8.8배, 6.3배, 8배의 저해활성이 증가하였다.

#### 4) Greenhouse whitefly의 유충에 대한 살충시험

활성물질의 생물활성평가에 사용된 시험곤충은 온실가루이로 학명이 *Trialeurodes vaporariorum*이고 일반명은 Greenhouse whitefly이며 살충실험은 2006년 5월 충청북도 청주시 충북대학교 농업생물환경대학 농생물과에서 살충실험을 평가 하였다.

본 연구의 ACAT 저해활성을 가진 화합물은 정확하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 triton X-100 100ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다.

시험 살충제를 각 농도로 희석하여 알과 약충이 혼재되어 있는 토마토 잎을 30초간 침지한 후 음건시켜 부화율과 약충에 대한 살충수를 9일동안 매일 조사하였으며, 실험은 2반복으로 수행하였다.

증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬(55×20mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려놓고 활성검색물질이 처리된 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 9일간 살충율을 조사하였다. 무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10 % 용액에 triton X-100 100ppm 수용액 9배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다. 활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 Finney(1982)의 probit계산법에 의해 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)을 산출하였다.

본 연구에 사용한 ACAT저해제 7, 6, 11을 1ppm, 10ppm, 100 ppm씩 온실 가루이에 처리하고 1일 간격으로 살충정도를 측정하였을 때 비교구와 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났으며 농도 의존적으로 시간 의존적으로 살충효과가 나타났다.(표 1)

화합물 7, 6, 11의 in vitro ACAT효소 저해활성은 7, 11, 6의 순으로 나타났으며, in vivo 살충활성은 11, 7, 6의 순으로 나타났다.



표 9. 피리피로펜 유도체들의 온실 가루이에 대한 살충효과

약제	농도	반복	n	살충수						9D 살충률(%)
				4D	5D	6D	7D	8D	9D	
7	100	1	86	14	15	15	16	18	18	21.2
		2	102	22	22	22	22	22	22	
	10	1	156	2	3	3	3	6	6	4.9
		2	136	5	5	6	8	8	8	
	1	1	73	4	4	4	4	4	6	24.8
		2	29	5	9	10	11	11	12	
11	100	1	203	100	103	107	108	108	108	59.6
		2	174	41	59	71	100	105	115	
	10	1	31	2	3	5	5	5	5	15.1
		2	128	1	11	16	16	18	18	
	1	1	78	3	3	3	3	3	3	11.9
		2	10	2	2	2	2	2	2	
6	100	1	29	0	0	0	0	0	0	10.4
		2	144	18	21	25	26	29	30	
	10	1	53	16	16	17	17	17	17	29.4
		2	15	2	2	3	4	4	4	
	1	1	32	7	7	7	7	7	7	17.9
		2	108	7	9	13	14	15	15	
control	1	72	1	1	1	1	1	1	1.9	
	2	167	3	3	4	4	4	4		

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2007	ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조 결정	100 %	ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석
		ACAT 저해 활성 소재의 발굴	100 %	ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정
		ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가	100 %	ACAT 저해 활성 추출물의 살충효과 측정
2차 년도	2008	ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조 결정	100 %	ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석
		ACAT 저해 활성 소재의 발굴	100 %	ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정
		ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가	100 %	ACAT 저해 활성 추출물의 살충효과 측정
3차 년도	2009	ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조 결정	100 %	ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석
		ACAT 저해 활성 소재의 발굴	100 %	ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정
		ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가	100 %	ACAT 저해 활성 추출물의 살충효과 측정
최종 평가	2010	ACAT 저해 활성물질의 분리 정제 및 구조 결정	100 %	ACAT 저해활성 소재의 추출조건 확립 및 용매 이행성 분석
		ACAT 저해 활성 소재의 발굴	100 %	ACAT 저해활성 농산물 소재 탐색 및 선정
		ACAT 저해 활성 소재의 살충효과 평가	100 %	ACAT 저해 활성 추출물의 살충효과 측정

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		비고
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차년도	목표	1				
	달성		1	1		
2차년도	목표	1		1		
	달성	2		2		
3차년도	목표	1	1	2		
	달성	1	1			
4차년도	목표					
	달성					
5차년도	목표					
	달성					
계	목표	3	1	3		
	달성	3	2	3		

### 2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2007	Pyripyropene A derivatives as potent acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) inhibitors and their insecticidal activities	노문철	최용석	송규용; 김길하; 박용진; 구차일; 김영국	Drugs of the Future	32, suppl. A	국외	SCI
2009	2-Substituted Thio- and Amino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones as a Novel Class of Acyl-CoA:Cholestrol Acyltransferase Inhibitors	신귀남	최용석	최정호; Gajulapti K; 김영국; 노문철; 정상헌; 이경; 한성식; 송규용	Bulletin of the Korean Chemical Society	30 (5)	국내	SCI
2009	Synthesis of a Novel Series of Imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyridines as Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) Inhibitors	진영란; 노문철	최용석	Gajulapti K; 정화영; Boovanahalli SK; 송규용; 최정호; 김영국, 이경	Bulletin of the Korean Chemical Society	30 (6) 게재예정	국내	SCI

### 3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
					2007	살충활성을 갖는 나프토키투유기살충제 합성 방법과 살충제 이용기술	한국생명공학연구원	한국	10-0769708 (2007. 10. 17)
2009	담쟁이 추출물을 유효성분으로 함유하는 아실트랜스퍼라제 또는 살충제 조성물	고려대학교 산학협력단	한국	10-2009-0033946 (2009. 04. 20)					
2009	포르핀계 화합물인 페어포비드 에이틸에스터 또는 추출물을 함유하는 코에이: 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 활성 저해제 및 살충제 용도	고려대학교 산학협력단	한국	10-2009-0033386 (2009. 04. 17)					
2010	로즈마리 추출물 또는 이로부터 분리하는 화합물을 포함하는 살충제	한국생명공학연구원	한국	10-1010-0007571 (2010. 01. 17)	2010	피리피로펜 유도체 및 이를 포함하는 살충제 조성물	한국생명공학연구원	한국	10-0943983 (2010. 02. 07)

상기 선행 연구 결과를 통해 본 연구자들은 곤충들의 대부분이 필수적으로 필요로 하는 스테롤을 곤충체내에서 생합성하지 못하고 외부의 먹이로부터 스테롤을 섭취하여 여러 대사과정을 거쳐 생존에 필수적으로 스테롤을 이용하고, 필요한 호르몬을 만드는데 스테롤을 이용하고 있다는 사실과 ACAT 저해활성과 살충활성이 상관관계가 있음을 발견하였다. 따라서 본 연구 결과로부터 신개념의 살충제를 개발을 추진할 계획이다.

본 연구결과들을 바탕으로 기술이전을 추진할 계획임. 현재 다국적 기업인 S사에서 피리피로펜 유도체 및 이를 포함하는 살충제 조성물(등록번호 10-0943983)에 관한 특허에 관심을 가지고 있음. 따라서 기술이전을 목표로 S사와 비밀유지계약을 작성하고 특허 물질에 대한 살충효과 검증을 실시 중에 있다.

또한 국내 농약회사와 본 연구결과를 바탕으로 기술이전을 목표로 살충제 개발에 관한 공동연구를 진행하고 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 세계 농약 시장 규모는 400억달러를 돌파한 것으로 나타났으며, 전년대비 21.2%가 증가하였음.
- 세계 농약관련 25개 선두회사 중 2008년 매출액 기준으로 Syngenta(\$ 9,231m)가 처음으로 Bayer를 제치고 선두를 차지하였고, 다음으로 Bayer(\$ 8,675m), Monsanto(\$ 4,998m) 등의 순위를 차지하였음.
- Syngenta와 Bayer 두 회사 모두 우수한 매출 성장을 하였고, Syngenta가 제초제 glyphosate와 살균제 azoxystrobin의 매출 증가로 더욱 빠른 성장세를 보였음.
- Syngenta의 매출을 분석해 보면 작물보호 분야 aonfdor의 79.1%를 차지하고 있고, 나머지 종자 부분이 20.9%를 차지하고 있음.
- 작물보호 분야는 제초제, 살충제, 살균제로 구성되어 있음
- Syngentadml 주요 살충제를 보면 2세대 neonicotinoid계인 thiamethoxam, pyrethroid계인 lambda-cyhalothrin, 천연물 유래 abamectin이 매출액의 큰 부분을 차지하고 있음.
- 세계시장에서 선두회사들은 평균 매출액의 6% 정도를 연구개발비에 투자하고 있으며, 이중 많은 부분이 신규 물질의 개발에 투자하고 있음을 볼 수 있음(Croponosis, 2009).
- Syngenta 등 다국적 기업들은 사람, 가축 및 유용동물에 독성이 없으면서 저항성 해충에도 효과가 우수한 새로운 작용기작을 가진 IGR(Insect Growth Regulator)계 살충제를 개발하여 판매하고 있으나 이들 신규농약에 대한 기술이전을 해 주지 않고, 또한 특허보호기간이 만료된 농약을 복제하여 생산하던 농약원제도 인도, 중국 등의 저가공급으로 수입 의존도가 급격히 높아지고 있기 때문에 독자적인 신규물질의 개발이 절실한 실정임.
- 미래의 농약은 단순히 농작물의 대량 생산에 그치지 않고, 점차 독성이 낮고 잔류성이 없으며, 인체에 무해하도록 요구되어 지고 있음. 특히, 기존의 화학 농약이 지니고 있는 독성의 문제점으로 인해 친환경적 농약의 개발 및 실용화가 더욱 촉진되고 있음.

## 제 7 장 참고문헌

Brecher P, Chan CT. Properties of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 1980. 617(3):458-71.

Cheung K, Sirur G. Update of the Companies Section. *Cropnosis*. 2009.

Choi JH, Rho MC, Lee SW, Choi JN, Lee HJ, Bae KS, Kim K, Kim YK. *Penicillium griseofulvum* F1959, high-production strain of pyripyropene A, specific inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 2. *J Microbiol Biotechnol*. 2008. 18(10):1663-5.

Jin YL, Rho MC, Gajulapati K, et al. Synthesis of a Novel Series of Imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyridines as Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase (ACAT) Inhibitors. *Bull Korean Chem Soc*. 2009. 30(6), 1297-1304.

Lee SW, Kim YK, Kim K, Lee HS, Choi JH, Lee WS, Jun CD, Park JH, Lee JM, Rho MC. Alkamides from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum* displaying potent cell adhesion inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008. 18(16):4544-6.

Macauley SK, Billheimer JT, Ritter KS. Sterol substrate specificity of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase from the corn earworm, *Heliothis zea*. *J Lipid Res*. 1986. 27(1):64-71.

Miyamoto J, Kaneko H, Takamatsu Y. Stereoselective formation of a cholesterol ester conjugate from fenvalerate by mouse microsomal carboxyesterase(s). *J Biochem Toxicol*. 1986. 1(2):79-93.

Rho MC, Lee SW, Park HR, Choi JH, Kang JY, Kim K, Lee HS, Kim YK. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry*. 2007. 68(6):899-903.

Rho MC, Song GY, Kim GH, Park YJ, Gu JI, Kim YK, Choi Y. Pyripyropene A derivatives as potent acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) inhibitors and their insecticidal activities. *Drugs of the Future*. 2007, 32(supple A)

Shen GN, Choi JH, Gajulapati K, et al. 2-Substituted Thio- and Amino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones as a Novel Class of Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase. *Bull Korean Chem Soc*. 2009. 30(5), 1088-1092.

Xu MZ, Lee WS, Kim MJ, Park DS, Yu H, Tian GR, Jeong TS, Park HY. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitory activities of fatty acid amides isolated from *Mylabris phalerate* Pallas. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004. 14(16):4277-80.