

보안과제(), 일반과제(√)

발간등록번호
11-1541000-001412-01

양귀비과(Papaveraceae) 식물추출물을 이용한
친환경 해충방제제 개발

Development of Environment-friendly Insecticide
Materials from Papaveraceae Plants

경희대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “양귀비과(Papaveraceae) 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 경희대학교

주관연구책임자 : 백 남 인

세부연구책임자 : 백 남 인

협동연구기관명 : 경기도농업기술원

협동연구책임자 : 소 호 섭

협동연구기관명 : (주)두애니

협동연구책임자 : 문 선 주

요 약 문

I. 제 목

양귀비과(Papaveraceae) 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 소득수준의 향상과 웰빙, 로하스 추세로 소비자들의 소비성향이 가격과 양에서 건강과 안전 먹거리로 변화함에 따라 세계적으로 유기농산물의 수요가 계속 증가하고 있으며 유럽, 미국 등 선진국은 매년 20% 성장하고 있다. 우리나라에서도 친환경농산물 시장이 2000년대 초반에는 매년 122.7%씩 증가하였으며 그 후 매년 52%씩 꾸준히 증가하고 있다.

이와 같이 친환경농업이 빠른 속도로 확산됨에 따라 친환경농업과 녹색기술 분야의 R&D 발굴이 필요하고 화학농약 및 비료 사용을 줄이고 생물농약, 유기질비료, 천적 등을 이용한 저탄소 녹색기술을 이용한 생물학적 방제기술에 대한 요구가 증가하고 있다.

목화진딧물 (*Aphis gossypii*)는 오이, 고추, 토마토 등 채소류에서 피해가 큰 해충으로 우리나라에서는 전국적으로 발생할 뿐만 아니라 섭식하는 동안 다양한 바이러스 병을 전염시켜 가장 문제되는 해충중 하나이다. 일반적으로 진딧물은 무당벌레 등 천적을 이용하여 방제하기도 하지만 대부분의 방제는 살충제에 의존하고 있고 있다. 살충제의 과용은 약제저항성을 일으켜 저항성 발달의 가능성이 적은 새로운 방제제의 개발이 요구되고 있다.

식물추출물은 약제 저항성 발달의 가능성이 적고 특정 해충만을 골라서 방제할 수 있어 환경에 대한 안전성이 높은 장점이 있는 것으로 알려져 있다. 해충 방제효과가 있는 식물유래 물질은 주로 살충제, 기피제, 거식제로서 이용되어 왔으며 우리나라에서는 제충국, 님오일, 고삼, 멀구슬 등의 몇 가지 식물추출물만이 친환경농업에서 많이 사용되고 있어 새로운 살충소재의 개발이 필요하다.

따라서, 본 연구는 친환경농산물 시장규모가 지속적으로 증가할 것으로 전망됨에 따라 채소류에서 가장 문제가 되고 있는 진딧물의 생물학적 방제 방법을 개발하기 위하여 양귀비과 식물추출물로부터 살충활성물질 분리동정 및 표준화를 확립하고 제형화하여 친환경 해충방제제를 개발하고자 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 양귀비과 식물체 유래 진딧물 살충활성 소재에 대한 표준화 확립 (경희대)
 - 가. 양귀비과 식물로부터 지표 성분 분리 동정
 - 나. 양귀비과 식물 지표 성분의 분석 방법 확립
 - 다. 진딧물 방제 활성 양귀비과 식물 추출물의 표준화 확립
 - 라. 양귀비과 식물로부터 진딧물방제 활성 물질 분리, 동정

2. 식물추출물의 진딧물 살충효과 검정 및 이용기술 개발 (경기도농업기술원)
 - 가. 추출용매, 살충분획 및 활성물질의 진딧물 살충활성검정
 - 나. 시제품의 살충활성 검정 및 농가실증시험
 - 다. 시제품의 적용확대시험
 - 라. 시제품의 안전성 평가

3. 친환경 해충방제 제제 개발 ((주)두애니)
 - 가. 살충활성기작 구명
 - 나. 친환경유기농자재 제제 선발
 - 다. 산업화를 위한 원료확보 방안 수립
 - 라. 대량생산에 필요한 추출방법 및 생산 공정 확립
 - 마. 친환경유기농자재 목록공시

IV. 연구개발결과

1. 식물유래 진딧물 살충물질의 분리동정

죽자초 외 6종의 양귀비과 식물에 대하여 살충활성을 검정한 결과 죽자초와 현호색 추출물이 유의성있는 살충율을 보여 죽자초에서 추출한 추출물을 해충방제제로 개발하고자 연구를 수행하였다.

죽자초 추출물에서 살충활성 물질을 분리하고 살충활성 검정을 하였다. 메탄올 추출물을 activity-guided fractionation 방법을 이용하여 살충물질을 분리, 동정하고자 하였다. 조성물을 용매로 추출하여 추출물을 조제하고, 추출물은 다시 용매를 이용하여 분획하였다. 분획물에 대하여 진딧물 살충효과를 검정하였다. 활성을 보인 분획물에 대하여 column chromatography 를 이용하여 분획을 나누었고, 각 분획에 대해서 다시 활성을 검토하는 방법을 반복하여 최종적으로 3종의 알칼로이드를 분리하였고 화합물의 진딧물 살충활성을 검정하였다. 화합물의 구조는 NMR 등 스펙트럼 데이터를 해석하여 8-hydroxydihydrochelerythrine, 6-methoxydihydrosanguinarine, 그리고 sanguinarine으로 구조동정하였다.

현호색 추출물은 살충효과를 증진시키는데 활용하고자 활성물질을 분리하고 살충

활성 검정을 하였다. 죽자초 추출물과 같은 activity-guided fractionation 방법을 이용하여 최종적으로 6종의 알칼로이드를 분리하였고 화합물의 진딧물 살충활성을 검정하였다. 그 중 4종의 화합물의 구조를 NMR 등 스펙트럼 데이터를 해석하여 (+)-stylophine, (+)-corydaline, demethylcorydalmine, glaucine으로 구조동정하였다.

2. HPLC를 통한 지표성분의 분석

제품 추출물로부터 분리한 3종의 단일물질들을 표준물질로 하여 HPLC를 이용한 지표성분의 분석을 확립하였다. 동일한 조건 하에 3종을 분석하고 회귀곡선을 작성한 후, 50 mg/ml 의 농도로 제조한 시료를 표준물질과 같은 조건에서 정량 분석하였다.

Sigma-Aldrich® 에서 구매한 sanguinarine 표준품을 지표물질로 하여 제품의 안정성 분석을 시행하였다. 토마토 식물체에 죽자초 시제품을 엽면살포하고 잎이 건조한 후 처리 후 1,3,7,14일 후에 유사한 크기의 잎을 수확하여 초저온 냉동 보관한 후 일괄 분석에 사용하였다. Sanguinarine 표준품의 HPLC 분석 후 회귀곡선을 작성하였고, 200 mg/ml 의 농도로 제조한 분석용 시료를 정량 분석한 결과 처리 1일 후의 토마토 잎에서만 sanguinarine이 분석되었다.

3. 제형화를 통한 시제품 개발

죽자초 추출물을 제형화하기 위하여 메탄올, 에탄올 등 5종의 추출용매를 달리하여 진딧물 살충활성을 검정한 결과 에탄올로 추출하였을 때 가장 활성이 높아 시제품 조제시 추출용매로 선발하였다.

죽자초 추출물 분말과 차유추출물 분말, 광물질, 담배추출물의 비율을 달리하여 20개의 시제품을 제조하여 유화성 및 전착성, 그리고 진딧물에 대한 살충효과를 비교 시험하여 시제품의 조성비를 결정하였다.

시제품의 살충작용 특성 조사를 위하여 농도별 약효시험, 진딧물 발육단계별 약효시험, 약제발현속도시험, 독성작용시험, 잔효성 시험, 침투이행성 시험을 시행하였다. 그 결과 시제품 1,000 ppm에서 진딧물의 전 발육단계에 대해 살충효과가 있었으며 약제처리 24시간 후부터 살충작용이 발생되었고 시제품 처리구보다 우수한 약효지속기간을 보였다.

4. 시제품의 해충 살충효과 검정

죽자초 추출물을 이용하여 조제한 시제품을 풋트 수준에서 효과를 검정한 결과 오이 목화진딧물은 98.7%, 고추 북송아혹진딧물은 96.0%의 살충효과가 나타났으며, 오이 하우스 포장에서 검정한 결과 3일후에는 87.6%, 7일후에는 98.0%의 높은 진딧물 방제효과가 나타났다. 이 시험결과를 농가에서 실증하기 위해 경기도 이천, 광주 친환경재배농가에서 분말 수화제 시제품을 1000배의 농도로 희석하여 살포한 결과 고추 98.8%, 오이 88.3%의 방제효과가 있었으며 약해도 발생하지 않았다.

죽자초 추출물 시제품을 다른 해충에도 적용하기 위하여 살충 스펙트럼을 조사한 결과 꽃매미와 쌍점매미충에서 살충효과가 높았다. 죽자초 추출물을 기존 살충물질로 알려져 있는 데리스, 고삼, 제충국추출물과 진딧물 살충활성을 비교한 결과 유사한 살충효과를 보였고, 꽃매미는 고삼, 데리스, 제충국추출물은 살충효과가 낮았던 반면 죽자초 추출물은 93.3%의 살충효과를 보여 진딧물뿐만 아니라 꽃매미에도 적용확대가 가능할 것으로 판단되었다.

5. 시제품의 안전성평가

친환경유기농자재 목록공시에 필요한 죽자초 추출물 시제품의 경구, 경피, 어독성을 평가한 결과 어독성은 III급으로 확인되었으며 급성경구, 급성경피 독성은 반수치사량이 각각 1111.5, 2000 mg/kg으로 모두 친환경유기농자재 등록기준인 200 mg/kg 이상으로 안전성을 확보하였다.

또한 시제품의 177종의 농약 잔류량과 Zn, Cu 등 8종의 중금속을 분석한 결과 기준치를 초과하는 성분은 검출되지 않았다. 이 결과로 인해 죽자초 친환경자재 사용에 적합한 것으로 나타났다.

6. 시제품의 산업화 연구

개발된 시제품을 개발하여 실용화하기 위해서는 죽자초의 안정적인 확보가 중요하므로 죽자초에 대한 재배특성을 조사하고 씨앗을 확보하여 재배를 시도하였고, 해외재배단지를 조사하여 죽자초를 대량 확보할 수 있는 방법을 수립하고자 하였다. 국내에 죽자초가 자생하지만 대량으로 분포 또는 재배하는 곳이 없고, 연구과정을 통해 재배하고자 시도하였지만 실패하였다. 죽자초의 주요 생산지인 중국의 호난성에 있는 제조업체와 공급계약을 맺고 죽자초를 공급받기로 하였고 추출공정에 대한 기술 자문도 받기로 하였다.

죽자초 추출물을 이용한 시제품의 실용화를 위한 죽자초 추출물의 대량생산공정을 수립하고자 500 L 추출조에서 생산공정 수립 후 1500 L의 대량추출조에서 추출을 수행하여 대량생산공정을 확립하였다.

개발된 죽자초 추출물을 제품화하여 산업화하기 위해 친환경육성법에 따라 친환경유기농자재로 목록 공시되었다. 총스타의 목록등재번호는 11-유기-5-307이며 공시기간은 2년으로 2013년 4월 13일까지 농촌진흥청 홈페이지 농자재정보에 공시된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 특허출원 : 2건

- 백남인, 백미영, 박희정, 이지영, 소호섭, 한영희, 이현주, 김성기, 문선주, 윤태호, 정장희 ‘죽자초에서 분리한 살충조성물, 상기 살충조성물을 함유한 해충 방제제 및 이를 이용한 방제방법’
출원번호 : 10-2010-0082145
출원일 : 2010.08.24
- 백남인, 박희정, 백미영, 이지영, 문선주 ‘현호색 추출물로부터 분획된 현호색 분획물로부터 분리된 알칼로이드 화합물을 포함하는 살충 조성물’
출원번호 : 10-2011-0101272
출원일 : 2011. 10. 05

나. 학술발표 및 논문게재 : 학술발표 4건, 논문게재 1건

(1) 학술발표

- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Jin-Gyeong Cho, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Gi-Min Kim, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2009) Alkaloids from Plant Extracts Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2009 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, October, 22-24, Jeju Grand Hotel, Jeju, Korea.
- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, Nam-In Baek (2010) Isolation of Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* and Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2010 춘계학술대회 발표논문초록집, The Korean Society for Applied Biological Chemistry, Feb. 19-20, KIST 강릉분원, Korea.
- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2010) Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2010년도 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회, 한국약용작물학회, April 22th, 정선군 하이원호텔, Korea.
- Gee-Young Lee, Ho-Seob Soh, Hyun-Ju Lee, Young-Hee Han, Sung-Kee Kim, Sun-Ju Moon, and Nam-In Baek (2010) Insecticidal Activities of Extract from *Macleaya cordata*, 2010 한국자원식물학회 정기총회 및 추계 학술발표회, 한국자원식물학회, 2010.10.07~2010.10.08, 제주 라마다 호텔.

(2) 논문게재

- Hee-Jung Park, Mi-Young Baek, Jin-Gyeong Cho, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek(2011)

Insecticidal Alkaloids on Aphids from *Corydalis turtschaninovii* Tubers, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54(3), 345-352.

다. 친환경유기농자재 목록공시 등재 : 2011. 4. 15

목록등재번호	자재종류	자재명(상표명)	제조회사
11-유기-5-307	작물충해관리용 자재	식물추출물(충스타)	(주)두애니



그림 1. 죽자초추출물 친환경유기농자재

라. 기술이전 실시 (2011. 10. 18)

- (1) 협약대상 : 경기도농업기술원, 경희대학교, (주)두애니
- (2) 처분방법 : 수의계약에 의한 전용실시
- (3) 수의계약업체 : (주)두애니
- (4) 실시금액 : 정액기술료 54,000천원

마. 홍보

- (1) 언론홍보 : 15건 (기술이전 관련 홍보)
 - 신문(7) : 농민신문, 경기신문, 경인매일, 기호일보, 전국도민일보, 중부일보, 수도권일보
 - 인터넷(8) : 머니투데이, 뉴스핌, 아시아투데이, 수원일보, 서울경제, 뉴시스, 연합뉴스, 파이낸셜뉴스

2. 성과활용계획

가. 사업화방안

본 연구수행을 통해 산업화를 위한 제품화하는데 성공하였다. 그러나 제품의 대량생산을 위한 원료 대량생산공정이 완성되지 않아 현재는 제품을 생산할 수 없으며 1년 이내 제품을 출시할 계획을 가지고 있다.

또한 유효 약효 성분으로 예상되는 화합물의 세포 독성에 대한 기작 연구 및 유효성분 또는 그 유사물질을 함유하고 있는 재배가 쉬운 작물을 찾아 국내에서 원료를 생산할 수 있도록 할 계획을 가지고 있으며 제품의 유통과정 중 안정성 검사를 실시할 예정이다.

(1) 국내 판매

- 제품출시예정 : 2012년 11월
- 판매방안 : 기존 거래처를 통한 판매 및 지자체 친환경 지원 사업 확보
- 예상판매계획

년도	2013년	2014년	2015년
매출액(백만원)	50	200	300

(2) 해외 판매

- 판매방안 : 현재 거래 중인 중국 농약업체를 통한 판매 및 이외의 국가는 전시회를 통한 홍보 및 영업
- 예상판매계획

년도	2013년	2014년	2015년
매출액(\$)	10,000	100,000	200,000

나. 교육 및 홍보

경기도농업기술원에서는 지속적으로 농업인 교육, 각종 전시회 참가시 개발한 충스타 제품의 개발 및 친환경 생물학적 방제기술 관련 교육 및 홍보를 할 예정이다.

SUMMARY

I. Project title

Development of Environment-friendly Insecticide Materials from Papaveraceae Plants

II. Object and necessity of the project

Aphids (Aphididae), also known as plant lice, have long, small bodies and suck the sap out of plants. *Aphis gossypii*, the cotton aphid, is indigenous to tropical, subtropical, and temperate regions. The damage caused by sap-sucking leads to leaf shrinkage, indirect sooty mold, and the transmission of plant viruses. To prevent damage, synthetic insecticides are currently used in agricultural practices; however, this procedure has many negative side effects. Synthetic insecticides are predominantly composed of organic bases, organic phosphorus, and carbamates. Since these are highly toxic and are not easily decomposed in nature, they accumulate in all stages of the food chain. As a result, side effects such as environmental pollution, resistance to chemicals, and the poisoning of both humans and animals occur.

Recently, there has been an increasing interest in the production of environment-friendly agricultural products. The latest development of insecticides utilizes the microorganism *Bacillus thuringiensis*, insect growth regulators (IGR), which inhibit the acceptance of neurotransmitters. In line of this approach, neonicotinoid-type compounds, nitenpyram and acetamprid, were developed by modifying the structure of nicotine. However, pesticide resistance has become problematic. As a result, alkaloid compounds have been considered as replacements for insecticide. In this report, the research has focused on the Papaveraceae plants because they contain many bioactive alkaloids. Specifically, *Corydalis turtschaninovii* and *Macleadya cordata* alcohol extract was selected to test significant activity against *A. gossypii*.

III. Contents and scope of the project

1. Standardization of insecticidal materials from Papaveraceae Plants on aphids (Kyung Hee University)

- A. Isolation and identification of index components from Papaveraceae Plants
 - B. Quantitative analysis of index components of active materials
 - C. Standardization of insecticidal materials from Papaveraceae Plants on ophids
 - D. Isolation and identification of insecticidal components from Papaveraceae Plants on aphids
2. Insecticidal activity assay on aphids and development of application technology of plant extracts
(Gyeonggi-do Agricultural Research & Extension Services)
- A. Insecticidal activity assay on aphids of solvent extracts, active fractions and compounds
 - B. Insecticidal activity assay of sample products and field test
 - C. Scale-up test of sample products
 - D. Safety evaluation of sample products
3. Production of environment-friendly insecticidal materials
(DoAny Ltd.)
- A. Investigation of insecticidal mechanism
 - B. Selection of environment-friendly agricultural products
 - C. Securement of raw materials for industrialization
 - D. Establishing extraction methods and manufacturing process for mass production
 - E. Public announcement of lists for environment-friendly organic agricultural products

IV. Study Results

1. Isolation and identification of insecticidal components from Papaveraceae Plants on aphids

Alcohol extracts from the seed of *Macleaya cordata* have shown a significant insecticidal effect against the growth of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. In this study, we aimed to isolate the principal component of *M. cordata* to manifest its insecticidal effect on *A. gossypii*. The dried seed of *M. cordata* were extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extracts were partitioned successively with EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O. During a search for an insecticidal compound against the aphids, activity-guided fractionation led to the isolation of two alkaloids from an *n*-BuOH fraction

through repeated silica gel column chromatographic separations. Based on NMR, MS, and IR spectroscopic data, the chemical structures of the compounds were determined to be 8-hydroxydihydrochelerythrine and 8-methoxydihydrosanguinarine, respectively. This was the first study in which 8-methoxydihydrosanguinarine was isolated from *M. cordata*. 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-methoxydihydrosanguinarine showed significant insecticidal effects against the cotton aphid, 73.6±14.6 % and 76.1±7.9 % at 100 ppm, respectively.

Tubers of *Corydalis turtschaninovii* were extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was successively partitioned with *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O. An activity-guided fractionation to search for insecticidal compounds against aphids led to the isolation of six alkaloids from the *n*-hexane and EtOAc fractions using a repeated silica gel, an octadecyl silica gel (ODS), and Sephadex LH-20 column chromatographic separations. Based on the spectroscopic data of NMR, MS, and IR, the chemical structures of the compounds were determined to be: (+)-stylophine (1), (+)-corydaline (2), demethylcorydalmine (3), isocorypalmine (4), glaucine (5), and pseudoprotopine (6). The compounds showed significant insecticidal effects against *A. gossypii*, 69.7±7.2%, 46.9±2.4%, 68.5±8.6%, 75.5±4.2%, 80.2±9.7%, and 78.9±11.3% at 1000 ppm, respectively.

2. Quantitative analysis of index components using HPLC

HPLC method for quantitative analysis of index components was established. Index components were designated as three insecticidal alkaloids isolated from Papaveraceae Plants. HPLC analysis was carried out for quantification of index components in the sample products.

To test the stability of the insecticidal components in the sample products HPLC analysis was performed and index component was used by sanguinarine. The sample products were sprayed on the leaves of tomato and the leaves were collected on 1, 3, 7, and 14 days after. The collected leaves were freeze-dried and used for HPLC analysis. The index component, sanguinarine, was detected in the leaves collected only on 1 day after.

3. Manufacture of sample products

To select the best solvents to manufacture sample products, five solvents including methanol and ethanol was used to extract *Macleaya cordata*. Among them, ethanol extracts showed the highest insecticidal activity.

20 sample products were manufactured using *Macleaya cordata* extracts, Chajhu Extract, tobacco extracts and some minerals and evaluated for emulsibility, throwing power, and insecticidal activity on aphids. To investigate the insecticidal characteristics of sample products, the variance of insecticidal effect according to the treatment concentration and life cycles of aphids, expression rate of drug effects, toxicity, residue of drug effect, penetration and translocation of drugs were evaluated. The sample products including 1,000 ppm active materials showed significant insecticidal activity through all life cycles of aphids, and insecticidal effects was expressed from 24 hrs after treatment of drugs.

4. Evaluation for insecticidal effects of sample products

Macleaya cordata extracts were treated on the leaves of cucumber and red pexpper cultivated in pots, and it showed very high insecticidal effects against the cotton aphid on cucumber and red pepper 98.7 and 96.0, respectively. The same test performed for cucumber cultivated in greenhouse also showed the significant insecticidal effects against the cotton aphid 87.6% and 98.0% at 3 days and 7 days, respectively. after treatment.

Macleaya cordata extracts also showed significant insecticidal effects against different insects, Limois emelianovi Oshanin and leafhopper, which was almost same activiy as the well-known insecticides, derris, sophora and a pyrethrum flower extracts.

5. Safety test of sample products

Safety test of sample products was carried out as for oral toxicity, dermal toxicity, and fish toxicity to submit to public-announcement list as environment-friendly organic agricultural materials. Fish toxicity was evaluated as III grade, LD50 values in acute oral toxicity and dermal toxicity were determined as 1111.5 and 2000 mg/kg, respectively, which indicated the sample product was very safe comparing to registration standard value, 200 mg/kg. And analysis of 177 agricultural pesticides and 8 heavy metals including Zn and Cu in the sample products showed no detection in the samples.

6. Industrialization of sample products

To steady secure raw materials, *Macleaya cordata*, cultivation methods in domestic and foreign area were studied. Finally, Supply contract was agreed

with a manufacture company at Hoonan province in China, which is the major production area of *Macleaya cordata*. And mass production of the extracts using 1500 L extractor was established. The sample materials was public-announced as the list of environment-friendly organic agricultural materials. No. of environment-friendly organic agricultural materials, Choongstar, was 11-유기-5-307, which will be available for two years and public-announced on the home-page of RDA until April 13th in 2013.

V. Outcome of project and application plan

1. Outcome of project

A. Patents

1. Nam-In Baek, Mi-Yeong Baek, Hui-Jeong Park, Ji-Young Lee, Ho -Seop So, Yeong-Hui Han, Hyeon-Ju Lee, Seong-Gi Kim, Seon-Ju Moon, Tae-Ho Yoon, Jang-Hui Jung(2010) Insecticidal compounds isolated from *Macleaya cordata* and method for pesticides using the same. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*, KR 2012019046
2. Nam-In Baek, Hee-Jung Park, Mi-Young Baek, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon(2011) Insecticidal compositions comprising alkaloid compounds isolated from *Corydalis turtschaninovii* tubers extracts and fractions thereof. 10-2011-0101272.

B. Paper

1. Hee-Jung Park, Mi-Young Baek, Jin-Gyeong Cho, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek(2011) Insecticidal Alkaloids on Aphids from *Corydalis turtschaninovii* Tubers, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54(3)**, 345-352.

C. Abstracts

1. Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Jin-Gyeong Cho, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Gi-Min Kim, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2009) Alkaloids from Plant Extracts Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2009 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, October, 22-24, Jeju Grand Hotel, Jeju, Korea.
2. Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee,

Sun-Ju Moon, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, Nam-In Baek (2010) Isolation of Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* and Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2010 춘계학술대회 발표논문초록집, The Korean Society for Applied Biological Chemistry, Feb. 19-20, KIST 강릉분원, Korea.

3. Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2010) Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2010년도 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회, 한국약용작물학회, April 22th, 정선군 하이원호텔, Korea.
4. Gee-Young Lee, Ho-Seob Soh, Hyun-Ju Lee, Young-Hee Han, Sung-Kee Kim, Sun-Ju Moon, and Nam-In Baek (2010) Insecticidal Activities of Extract from *Macleaya cordata*, 2010 한국자원식물학회 정기총회 및 추계학술발표회, 한국자원식물학회, 2010.10.07~2010.10.08, 제주 라마다 호텔.

D. Public-announcement as list of environment-friendly organic agricultural materials : 2011. 4. 15

Registration No	Kind of materials	Materials name	Manufacture company
11-유기-5-307	Management of crop insects	ChoongStar	DoAny Ltd.



Fig. 1. Environment-friendly organic agricultural materials, ChoongStar.

E. contract for the transfer of technology (2011. 10. 18)

- (1) Contracting parties : Gyeonggi-do Agricultural Research & Extension Services, KyungHee University, DoAny Co. Ltd.
- (2) Contracting process : Exclusive License through a private contract

- (3) Private contract company : DoAny Co Ltd.
- (4) Implementation amount : Fixed amounts ₩54,000,000

F. Public advertisement

- (1) The Press media : 15 cases
 - Newspaper (7) : 농민신문, 경기신문, 경인매일, 기호일보, 전국도민일보, 중부일보, 수도권일보
 - Internet (8) : 머니투데이, 뉴스핌, 아시아투데이, 수원일보, 서울경제, 뉴시스, 연합뉴스, 파이낸셜뉴스

2. Application of project outcomes

A. Industrialization plan

- (1) Domestic sales
 - Product launching : November, 2012
 - Sales strategy : Existing customers, environment-friendly project by local government
 - Sales amounts

year	2013	2014	2015
million won	50	200	300

- (2) Abroad sales
 - Sales strategy : Existing customer in China and participation in exhibition show
 - Sales amounts

year	2013	2014	2015
(\$)	10,000	100,000	200,000

B. Education and public announcement

Gyeonggi-do Agricultural Research & Extension Services continues to give farmers opportunity to learn pest control techniques through environment-friendly and biological methods, and will take part in several exhibition shows to advertize the products, ChoongStar.

CONTENTS

1. General outline of the project
 - 1-1. Object and necessity of the project
 - 1-2. Scope and contents of the project
2. Domestic and foreign status in technology development
 - 2-1. Domestic and foreign status in production and market
3. Methods and results of the study
 - 3-1. Isolation and identification of insecticidal alkaloids on aphids from natural sources
 - 3-1-1. Isolation and identification of insecticidal alkaloids on aphids from *Macleaya cordata*
 - 3-1-2. Isolation and identification of insecticidal alkaloids on aphids from *Corydalis turtschaminovii*
 - 3-2. Quantitative analysis of index components of active materials
 - 3-2-1. Quantitative analysis of index components using HPLC
 - 3-2-2. Stability evaluation of active materials using HPLC
 - 3-3. Manufacture of sample products
 - 3-3-1. Selection of the optimized solvents
 - 3-3-2. Preparation of sample products
 - 3-3-3. Insecticidal effect of sample products on aphids
 - 3-4. Evaluation of insecticidal effect of sample products
 - 3-4-1. Insecticidal effect of sample products on aphids
 - 3-4-2. Field test for insecticidal effect of sample products on aphids
 - 3-4-3. Application and scale-up test of sample products
 - 3-5. Safety test of sample products
 1. Toxicity test of sample products
 2. Environmental safety test of sample products
 - 3-6. Industrialization study of sample products
4. Achievement of project object and contribution to related field
 - 4-1. Achievement of project object
 - 4-2. Contribution to technological progress
5. Outcome of project and application plan
 - 5-1. Outcome of project
 - 5-2. Application of project outcomes
6. Foreign science information obtained in the project
7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
 - 제1절 연구개발의 목적 및 필요성
 - 제2절 연구개발의 범위 및 연구내용
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
 - 제1절 국내외 생산 및 시장현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
 - 제1절 식물유래 진딧물 살충물질의 분리동정
 - 1. 죽자초로부터 진딧물 살충물질 분리동정
 - 2. 현호색으로부터 진딧물 살충물질 분리동정
 - 제2절 식물체 지표성분의 분석법 확립
 - 1. HPLC를 통한 지표성분의 분석
 - 2. HPLC를 이용한 제품의 안정성 분석
 - 제3절 제형화를 통한 시제품 개발
 - 1. 제형화를 위한 최적용매선발
 - 2. 시제품 제조
 - 3. 시제품의 살충작용 특성조사
 - 제4절 시제품의 해충 살충효과 검정
 - 1. 시제품의 진딧물 살충효과 검정
 - 2. 시제품의 진딧물 살충효과 농가실증
 - 3. 시제품의 적용확대시험
 - 제5절 시제품의 안전성평가
 - 1. 시제품의 독성평가
 - 2. 시제품의 환경안전성 평가
 - 제6절 시제품의 산업화 연구
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
 - 제1절. 목표달성도
 - 제2절 기술발전기여도
- 제 5 장 연구개발성과 및 성과활용계획
 - 제1절 연구개발성과
 - 제2절 성과활용계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보
- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

최근 소득수준의 향상과 웰빙, 로하스 추세로 소비자들의 소비성향이 가격과 양에서 건강과 안전 먹거리로 변화함에 따라 세계적으로 유기농산물의 수요가 계속 증가하고 있으며 유럽, 미국 등 선진국은 매년 20% 성장하고 있다. 미국은 1990년대 후반 이후 유기농생산이 2배 이상 증가한데 비해 2008년에는 211억 달러로 1997년의 36억 달러의 5배 이상 성장하였다. 중국 또한 정부의 녹색식품 육성전략에 의해 1997년 이후 매년 29% 이상 성장하였으며 우리나라 친환경농산물 면적의 약 133배에 이르는 규모로 성장하였다. 게다가 일본은 유기농산물의 부족으로 해외 인증 유기농산물을 수입하고 있다 (김 등, 2009).

우리나라에서도 1997년부터 친환경농업육성정책을 제정하고 농약사용량과 화학비료를 감축해 왔으며 제3차 친환경농업육성법에 따라 2009년 농약사용량을 9.92kg/ha에서 2015년에는 8.4kg/ha로 감축목표를 두고 추진하고 있고 친환경농산물 재배면적을 2009년 4.9%를 2015년에 12%까지 증가시키려는 목표를 두고 추진하고 있다. 그 결과 국내 친환경농산물 시장이 2000년대 초반에는 매년 122.7%씩 증가하였으며 그 후 매년 52%씩 꾸준히 증가하고 있다.

이와 같이 친환경농업이 빠른 속도로 확산됨에 따라 친환경농업과 녹색기술 분야의 R&D 발굴이 필요하고 화학농약 및 비료 사용을 줄이고 생물농약, 유기질비료, 천적 등을 이용한 저탄소 녹색기술을 이용한 생물학적 방제기술에 대한 요구가 증가하고 있다.

표 1. 국내 친환경농산물 현황

구 분	'01	'05	'07	'08	'09
농가수(천호) (전체 농가수 대비 %)	5 (0.3)	53 (4.2)	131 (10.7)	173 (14.2%)	199 (16.6%)
재배면적(천ha) (전체 경지면적 대비 %)	5 (0.2)	50 (2.7)	123 (6.9)	174 (9.9%)	202 (11.6%)
생산량(천톤) (전체 생산물 대비 %)	87 (0.2)	798 (4.4)	1,786 (9.7)	2,188 (11.9)	2,358 (12.2)

목화진딧물 (*Aphis gossypii*)는 오이, 고추, 토마토 등 채소류에서 피해가 큰 해충으로 우리나라에서는 전국적으로 발생할 뿐만 아니라 섭식하는 동안 오이 모

자이크 바이러스, 포티바이러스 등 다양한 바이러스 병을 전염시켜 가장 문제되는 해충중 하나이다. 진딧물에 의해 피해를 입는 채소류의 재배면적은 172,634ha로 전국채소 재배면적의 62.2%를 차지하고 있다 (농림부, 07). 일반적으로 진딧물은 무당벌레 등 천적을 이용하여 방제하기도 하지만 대부분의 방제는 살충제에 의존하고 있다 (Herron et al., 2001; Ahmad and Arif, 2008). 하지만 유기인산염, 피레트로이드 및 카바메이트와 같은 살충제의 과용은 약제저항성을 일으켜 저항성 발달의 가능성이 적은 새로운 방제제의 개발이 요구되고 있다 (Li and Han, 2004).

화학성분의 농약을 대체할 수 있는 식물추출물을 이용한 살충제는 사람이나 가축, 어패류 등에 무해하며 환경오염과 생태계 교란의 우려성이 없다는 장점에 많은 연구가 이루어지고 있다. 식물추출물은 약제 저항성 발달의 가능성이 적고 특정 해충만을 골라서 방제할 수 있어 환경에 대한 안전성이 높은 장점이 있는 것으로 알려져 있다. 해충 방제효과가 있는 식물유래 물질은 주로 살충제, 기피제, 거식제로서 이용되어 왔으며 terpenoid계 및 alkaloid계 물질들을 많이 포함하고 있다 (김, 2005). 우리나라에서는 제충국, 님오일, 고삼, 멸구슬 등의 몇 가지 식물추출물만이 친환경농업에서 많이 사용되고 있어 새로운 살충소재의 개발이 필요하다.

죽자초(*Macleaya cordata*)는 양귀비과(Papaveraceae)의 식물로 키가 1~2m 정도로 곧게 자라는 여러해살이풀로서 들판이나 산비탈에서 자란다. 줄기는 속이 비어 있는 것이 마치 대나무와 같다고 해서 “죽사초”라는 이름으로도 부르며, 열매는 가을이 되면 작은 물고기 모양의 열매가 달린다. 열매 속에는 여러 개의 종자가 들어 있으며 바람이 불 때 사각사각 소리를 낸다. 죽자초는 줄기를 자르면 유독성 노란즙이 나오며, 맛은 쓰고 성질은 따뜻하고 독성이 있다. 이 즙으로 곰팡이의 일종인 백선균 등을 치료하고, 잎에서 나는 즙을 환부에 바르면 피부병이나 옴 등을 나게 하고, 또한 몸의 부기를 가라앉히거나 해독하고 기생충을 구제하는 약제로 사용되고 있다.

따라서, 본 연구는 친환경농산물 시장규모가 지속적으로 증가할 것으로 전망됨에 따라 오이, 고추 등 많은 채소류에서 가장 문제가 되고 있는 진딧물의 생물학적 방제 방법을 개발하기 위하여 양귀비과 식물추출물로부터 살충활성물질 분리동정 및 표준화를 확립하고 제형화하여 친환경 해충방제제를 개발하고자 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 범위 및 연구내용

구분	연도	연구개발 범위	내용
1차년도	2009	진딧물 방제 식물체 추출물로부터 지표성분의 분리 동정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 식물체유래 활성 추출물 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 용매 추출 및 용매 분획물 제조 2. 식물체로부터 지표성분의 분리 정제 <ul style="list-style-type: none"> - 용매 분획물 제조 - Column chromatography 활성물질 분리정제
		진딧물 방제효과 검정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 살충물질의 진딧물 살충효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 용매분획 및 분획물의 살충효과 2. 살충활성증진을 위한 추출조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용매 : MeOH, EtOH, Aceton 등
		식물성 해충방제제 기본 제형연구	<ol style="list-style-type: none"> 1. 제형화를 위한 시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 수화제, 액제, 분제 등 제형 선발 - 계면활성제, 물성조정제, 안정제 등 보조제 선발 - 이화학적 특성 조사
2차년도	2010	식물체 지표성분의 분석법 확립 및 활성 성분 추적 분리	<ol style="list-style-type: none"> 1. 지표성분의 본체 구조 구명 <ul style="list-style-type: none"> - MS, NMR 등 이용 물질구조 구명 2. 지표성분 분석법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC, GC, LC/MS 및 GC/MS를 이용한 분석법 확립 3. 양귀비 추출물로부터 활성 물질 분리, 정제 <ul style="list-style-type: none"> - Activity-guided fractionation 이용하여 추출, 분획, column chromatography 활성물질 분리 정제

2차년도	2010	진딧물 살충효과 검정	<ol style="list-style-type: none"> 1. 활성물질의 진딧물 살충효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 분획 및 화합물의 진딧물 살충효과 검정 2. 시제품의 진딧물 살충효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 풋트검정 - 시제품의 포장검정
		시제품의 안전성 평가	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 독성평가 <ul style="list-style-type: none"> - 급성경구, 경피, 어독성 평가 2. 시제품의 환경안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 잔류농약 분석 - 중금속 유해성분 분석
		대량생산공정 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1. 식물재배단지 조성 및 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 추출공정개발 및 대량생산
3차년도	2011	양귀비 유래 활성 소재에 대한 표준화 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. 추출물, 분획물 및 진딧물 방제제에 대한 표준화 확립 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC, GC, LC/MS 및 GC/MS를 이용하여 표준화 자료 확보 2. 양귀비 유래 진딧물 방제 활성 물질 동정 <ul style="list-style-type: none"> - NMR, MS를 이용한 활성 물질 구조 동정
		시제품의 진딧물 방제효과 농가 실증시험	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 농가현지 실증시험 <ul style="list-style-type: none"> - 친환경재배농가 실증시험
		시제품의 적용확대 연구	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 살충스펙트럼 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 배추좀나방, 점박이용애 등
		친환경 해충방제제 산업화	<ol style="list-style-type: none"> 1. 유통보관성 향상 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 보관기간에 따른 활성변화 등 2. 제품포장과 장기보관방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 제형별 유효기간 조사 3. 친환경 유기농자재 등록 4. 생물농약 신청

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생산 및 시장현황

1. 국내외 제품생산 및 시장 현황

국내 생물농약의 등록현황(2011)은 살균제 19종, 살충제 13종, 제초제 1종으로 총 33종이 등록되어 있으며 미생물농약이 31종, 생화학농약이 2종 등록되어 있다. 생물농약시장은 95년에는 국내 생물농약시장도 95년에는 전체 농약의 0.7%를 차지하였으나 계속 증가하고 있다.

표 2. 국내 생물농약시장

구 분	1995	1999	2001	2007	2010
농 약 시 장 (백만원)	4,359	6,933	8,283	20,000	82,700
전체농약시장대비비율(%)	0.7	0.7	0.7	1.5	6.2

(농약연보)

생물농약뿐만 아니라 현재 친환경재배농가에서 많이 쓰이고 있는 친환경농자재 시장은 2002년에 1,500억원에서 2010년에는 4,000억원으로 매년 급속하게 증가하고 있다. 친환경유기농자재는 2012년 현재 1,370종이 등록되어 있으며 그중 충해관리용 자재는 285종이며 식물추출물이 주원료이며 천적, 미생물이 등록되어 있다.

식물추출물은 계피, 고삼, 데리스, 차나무, 해조추출물 등의 원료를 혼합하여 만든 제품이 주를 이루고 있다.

표 3. 친환경농자재 시장규모

(단위 : 억원)

년도	2002	2003	2004	2005	2010
매출액	1,500	1,700	2,000	2,400	4,000

(비료사업통계요람, 농협 2005)

표 4. 친환경유기농자재 등록현황

용 도	병충해관리	병해관리	충해관리	생육관리	토양개량 및 작물생육	계
자재수	6	170	285	404	505	1,370

(농촌진흥청, 2012)

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

세계 농약 시장은 2003년부터 생물농약은 연 9.9% 증가하고 있는 반면 합성농약은 연 1.1%씩 감소하고 있다. 국가별로도 매년 생물농약 시장의 매출액이 증가하고 있으며 유럽이 14.6%, 아시아의 성장률이 11.9%로 지속적으로 증가하고 있다.

표 5. 세계 농약시장 추이

(단위 : 백만불)

항 목	2003	2004	2005	2010	년증가율
생물농약(A)	468	562	672	1,075	9.9%
합성농약(B)	27,144	27,162	26,740	25,200	-1.1%
비율(A/B)	1.69%	2.07%	2.51%	4.25%	

(The New Biopesticide Market (Business Communications Company, Inc., Jan 2006)

표 6. 세계 생물농약시장의 매출액 동향 및 전망

지 역	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2010	성 장률(%)
미 국	211	218	226	242	278	317	352	445	7.8
캐나다	5	5	6	6	7	8	9	13	9.2
유 럽	66	68	73	82	102	125	150	259	14.6
아 시아	55	57	61	68	80	95	111	171	11.9
남 미	43	44	45	48	53	58	63	74	5.7
기 타	7	7	7	8	9	10	12	19	9.3
계	387	399	418	454	531	613	697	979	9.7

(Biopesticides—a global strategic business report, GIA, 2008)

제 2 절 국내외 기술개발 현황

선진국에서는 농약의 환경안전성에 대한 인식의 증가로 1980년대부터 살균, 살충, 제초활성이 높은 천연물을 찾으려는 연구가 진행되었다. 연구결과 식물체내 주요 살충활성 물질은 주로 phenol, terpenoid, alkaloid 계통의 화합물이 주성분을 이루고 있다는 것을 밝혀내었고, 그 이후 선도화합물을 찾으려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

식물체의 활성성분으로부터 유래되어 상용화된 농약으로는 제충국 꽃을 이용한 pyrethrin, 인도산 님나무 열매에서 추출한 azadiractin, 콩과식물 데리스의 괴경과 뿌리에서 추출한 rotenone, 백합과 식물 종자를 이용한 sabadilla, 열대성 관목 *Ryania speciosa*의 줄기분말에서 추출한 ryania 등이 있으며 많은 해충의 살충 및 기피효과가 밝혀졌다.

최근 국내에서도 식물자원으로부터 병해충 활성물질의 탐색 및 유효성분의 분리·동정연구가 이루어졌고(Park 등, 2002 ; Lee 등, 2000), 홀아비꽃대로부터 벼도열병과 붉은 녹병 방제효과가 높은 shizukanol(박 등, 2004), 할미꽃으로부터 살초물질인 anemonin(최 등 2,003)을 분리·동정하였다.

천연물을 이용한 살균, 살충활성연구가 많은 연구가에 의해 이루어졌음에도 불구하고 균일한 제품 생산을 위한 활성성분의 표준화, 원료확보, 대량생산 체계, 경제성 등의 문제로 상업화된 사례는 많지 않은 편이다.

특히 국내에서는 죽자초 추출물의 구조분석이나 활성연구에 대한 연구는 전무한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 식물 유래 진딧물 살충 물질의 분리 동정

1. 진딧물 살충용 식물추출물 선발

가. 연구방법

(1) 식물추출물 선발

양귀비과 속하는 식물 중 한약재로 사용되는 죽자초 외 6종의 식물을 시중에서 판매하는 식물체 또는 추출물을 구입하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용된 식물추출물의 식물명, 학명, 추출부위, 추출용매는 표 1과 같다.

(2) 실내 살충활성검정

공시해충인 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 사육실조건(온도 24~26℃, 광조건 L:D=16:8)에서 누대 사육하였고, 기주식물은 배추를 포트에 재배하여 사용하였다. 살충활성검정은 페트리디쉬(100X40mm)에 여과지를 깔고 배추잎을 절단하여 여과지 위에 놓고 진딧물을 접종한 후 약제를 소형분무기로 분무처리하고 24시간, 48시간 후 진딧물 사충수를 조사하여 살충활성을 검정하였다.

나. 연구결과

시험에 사용된 개양귀비, 애기뿔풀, 죽자초, 피나물, 노루발, 자주괴불주머니, 현호색 등 7종의 양귀비과 식물의 추출부위별 진딧물 살충효과를 검정한 결과는 표 1과 같이 죽자초(*Macleata cordata*)의 종피에서 추출한 추출물이 살충율 81.3%로 가장 살충효과가 높았으며 현호색의 줄기에서 추출한 추출물이 66.5%의 살충율을 보였고, 나머지 식물추출물은 50%미만의 낮은 살충율을 보였다.

표 7. 양귀비과 식물추출물의 살충활성 검정

식물명	학명	추출부위	처리농도 (ppm)	살충율(%)
개양귀비	<i>Pappaver rhoeas</i>	뿌리	5,000	22.3
애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i>	뿌리	5,000	39.3
죽자초	<i>Macleaya cordata</i>	종피	5,000	81.3
피나물	<i>Hylomecon vernale</i>	뿌리	5,000	22.5
노루발	<i>Pyrola japonica</i>	전초	5,000	2.2
자주괴불주머니	<i>Corydalis incisa</i>	전초,뿌리	5,000	15.6
현호색	<i>Corydalis remota</i>	줄기	5,000	66.5

해충방제에 있어서 살충, 기피, 거식효과가 있는 식물을 이용하는 것은 해충종합방제에 있어서 중요한 방법 중의 하나이다. 현재 해충방제로 연구 보고된 식물로는 *Chrysanthemum*(Elliott 1965), *Azadirachta indica*(Linton, 1997), *Citrus* sp.(Ruberto, 2002), *Cedrela salvadorensis*(Jimenez, 1997), *Melia dubia*(Koul, 2002), *Dictamnus dasycarpus*(Liu, 2002), *Maytenus chiapensis*(Nunez, 2004), *Stemona surtisii*(Kaltenegger, 2003), *Piper nigrum*(Park, 2002), *Stemona collinsae*(Jiwajinda, 2001), *Heliotropium megalanthum*(Reina, 1998) 등이 있다. 하지만 양귀비과의 죽자초(*Macleata cordata*)에 대한 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 죽자초에서 추출한 추출물을 해충방제제로 개발하고자 연구를 수행하였다.

2. 죽자초로부터 진딧물 살충물질의 분리 동정

가. 연구방법

(1) 죽자초의 용매 추출 및 분획

죽자초 90 g을 80% MeOH 용액 0.4 L에 sonication을 이용하여 2시간 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 1회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 40 °C에서 감압 농축하고, 이 농축물을 H₂O(1 L)와 ethyl acetate(EtOAc, 2 L × 2)로 분배 추출하였으며, 다시 H₂O분획은 *n*-butanol(*n*-BuOH, 0.8 L × 3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 EtOAc분획(42 g), *n*-BuOH분획(24 g)과 H₂O분획(4 g)을 얻었다.

(2) 활성 분획으로부터 alkaloid 화합물의 분리

n-BuOH 분획(GTN23B, 23 g)을 flash column을 이용하여 silica gel column chromatography (c.c.)(*n*-hexane - EtOAc=2:1, CHCl₃ - MeOH=50:1→30:1→15:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 11개의 분획물(GTN23B-1 ~ GTN23B-11)을 얻었다.

활성을 보인 GTN23B-4+5+6[366.8 mg, ve/vt(elution volume/total volume) 0.392-0.518]에 대하여 silica gel c.c.(CHCl₃ - MeOH=50:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 7개의 분획(GTN23B-4+5+6-1 ~ GTN23B-4+5+6-7)을 얻었고, 화합물 1[GTN23B-4+5+6-3, 23.9 mg, ve/vt 0.100-0.160, TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄) CHCl₃ - MeOH=20:1, R_f 0.36]을 분리하였다.

화합물 1 [8-hydroxydihydrochelerythrine] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.74 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 7.67 (1H, s, H-1), 7.60 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-12), 7.44 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.09 (1H, s, H-4), 7.02 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-11), 6.03 (2H, d, *J*=2.4 Hz, -OCH₂O-), 5.52 (1H, s, H-8), 3.94 (3H, s, -OMe), 3.90 (3H, s, -OMe), 2.74 (3H, s, -NCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 152.8 (C-10), 147.7 (C-2), 147.1 (C-3), 146.4 (C-9), 138.2 (C-14), 130.9 (C-4a), 126.6 (C-14a), 125.5 (C-8a), 124.7 (C-12a), 123.3 (C-5), 122.4 (C-13), 119.9 (C-6), 118.8 (C-12), 112.8 (C-11), 104.5 (C-4), 101.4 (-OCH₂O-), 86.0 (C-1), 61.6 (-OMe), 55.9 (-OMe), 40.6 (-NCH₃).

GTN23B-4+5+6-2[274.0 mg, ve/vt 0.040-0.080]에 대하여 silica gel c.c.(*n*-hexane - EtOAc=2:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 7개의 분획(GTN23B-4+5+6-2-1 ~ GTN23B-4+5+6-2-7)을 얻었고, 화합물 2[GTN23B-4+5+6-2-3, 20.1 mg, ve/vt 0.268-0.373, TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄) CHCl₃ - MeOH=30:1, R_f 0.18]를 분리하였다.

화합물 2 [6-methoxydihydrosanguinarine] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.74 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 7.67 (1H, s, H-1), 7.46 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.39 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-12), 7.19 (1H, s, H-4), 6.92 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-11), 6.10 (2H, d, *J*=1.2 Hz, -OCH₂O-), 6.04 (2H, d, *J*=1.2 Hz, -OCH₂O-), 5.36 (1H, s, H-8), 3.52 (3H, s, -OMe), 2.73 (3H, s, -NCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 147.9 (C-3), 147.2 (C-2), 147.0 (C-10), 145.1 (C-9), 138.0 (C-14), 130.9 (C-4a), 126.7 (C-14a), 125.6 (C-12a), 123.6 (C-5), 122.6 (C-13), 120.1 (C-6), 116.3 (C-12), 113.0 (C-8a), 108.8 (C-11), 104.6 (C-4), 101.7 (-OCH₂O-), 101.0 (-OCH₂O-), 100.6 (C-1), 85.8 (C-8), 54.1 (-OMe), 40.9 (-NCH₃).

(3) 죽자초로부터 sanguinarine의 분리

죽자초로부터 sanguinarine을 분리하기 위하여 GTN23E의 분획들과

sanguinarine 표준 물질을 TLC에서 비교해 본 결과, sanguinarine이 확인된 6번 분획에 대하여 실험을 진행하였다. GTN23E-6[366.8 mg, ve/vt(elution volume/total volume) 0.392-0.518]에 대하여 silica gel c.c.(CHCl₃ - MeOH=50:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 7개의 분획(GTN23B-4+5+6-1 ~ GTN23B-4+5+6-7)을 얻었고, 화합물 3[GTN23B-4+5+6-3, 23.9 mg, ve/vt 0.100-0.160, TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄) CHCl₃ - MeOH=20:1, R_f 0.36]을 분리하였다.

화합물 3 [sanguinarine] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) 7.84 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-11), 7.54 (1H, s, H-4), 7.54 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-12), 7.48 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-10), 7.31 (1H, s, H-1), 7.02 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-9), 6.13 (2H, d, *J*=1.2 Hz, -OCH₂O-), 6.10 (2H, d, *J*=1.2 Hz, -OCH₂O-), 5.71 (-OH), 5.63 (1H, s, H-6), 2.59 (3H, s, -NCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, δ_C) 147.51 (C-3), 146.98 (C-2), 146.65 (C-8), 144.43 (C-7), 138.77 (C-4b), 130.33 (C-12a), 126.41 (C-4a), 124.82 (C-10a), 123.07 (C-12), 122.14 (C-10b), 119.86 (C-11), 115.97 (C-10), 114.73 (C-6a), 108.05 (C-9), 104.08 (C-1), 101.03 (-OCH₂O-), 100.08 (C-4), 77.35 (C-7), 39.89 (NCH₃)

(4) 진딧물 살충활성 검정

목화진딧물 (*Aphid gossypii*)은 오이를 파종하고 본엽이 3-4매일 때 진딧물을 접종하여 하우스에서 증식시켜 시험에 사용하였다. 유묘검정법으로 시험하였으며 본엽이 4~6매 된 오이 포트에 진딧물을 접종하여 정착된 진딧물의 밀도를 사전 조사한 후 triton-100 250ppm을 첨가한 추출물을 농도별로 엽면살포하고 3일과 7일 후에 생충율을 조사하였다. 3반복으로 처리하였다.

$$\text{방제가 (\%)} = [(\text{무처리구 생충율} - \text{처리구 생충율}) / \text{무처리구 생충율}] \times 100$$

나. 연구결과

(1) 죽자초로부터 용매추출물 및 분획물 조제 및 진딧물 살충 효과 검정

죽자초 90 g에서 추출물 70 g이 얻어져서 약 78%의 수율을 나타냈으며, 이 추출물에 대하여 H₂O(1 L)와 ethyl acetate(EtOAc, 2 L × 2)로 분배 추출하였다. 다시 H₂O분획은 *n*-butanol(*n*-BuOH, 0.8L × 3)로 분배 추출하여 EtOAc분획(42 g, 수율 60%), *n*-BuOH분획(24 g, 수율 34%)과 H₂O분획(4 g, 수율 6%)을 얻었다.

분획별로 진딧물 살충효과를 검정한 결과 *n*-BuOH분획에서 진딧물 살충효과가 높게 나타났다.

표 8. 죽자초의 용매 분획별 진딧물 살충효과

분획용매	농도(ppm)	방제가 (%)
EtOAc	2000	71.4 ± 17.8
	1000	60.8 ± 34.0
	500	43.3 ± 40.6
<i>n</i> -BuOH	2000	89.5 ± 4.0
	1000	89.6 ± 8.2
	500	90.3 ± 9.8
H ₂ O	2000	88.2 ± 8.6
	1000	76.6 ± 21.4
	500	74.0 ± 33.3

J 조사 : 처리 3일후

(2) *n*-BuOH분획으로부터 column chromatography를 이용한 활성분획 검색

진딧물 살충효과가 높게 나타난 *n*-BuOH 분획으로부터 진딧물 살충효과 성분을 분리하기 위하여 column chromatography를 이용하여 소분획을 제조하였다.

n-BuOH 분획에 대하여 silica gel column chromatography를 실시하였고, TLC를 이용하여 유사한 분획끼리 모으고 농축하여 11개의 소분획을 제조하였다. 각 분획에 대하여 진딧물 살충효과를 실험하였다. 500 ppm의 농도에서는 B4, 5, 6, 8, 9 분획이 살충효과가 높았으며 100 ppm 의 농도로 살포하였을 때는 B6, 8, 9 분획이 살충효과가 높았다.

표 9. 죽자초 *n*-BuOH 분획으로부터 분리한 소분획의 진딧물 살충효과

농도 BuOH분획	500ppm		100ppm	
	생층율(%)	방제가(%)	생층율(%)	방제가(%)
B1	106.7	51.6± 6.5	341.7	26.8±15.5
B2	117.0	46.9±21.3	243.6	44.5±18.5
B3	122.2	44.6± 8.7	289.9	34.0±16.9
B4	9.5	95.7± 5.5	112.8	74.3±16.9
B5	13.6	93.8± 8.1	190.0	56.7±23.1
B6	0	100.0± 0	8.3	98.1± 3.3
B7	82.8	62.4±15.1	309.2	29.6±33.1
B8	0.7	99.7± 0.5	0.5	99.9± 0.2
B9	1.3	99.4± 1.0	4.8	98.9± 1.9
B10	53.6	75.7±20.5	134.4	69.4±16.0
B11	250.0	-	250.0	30.4±32.3
BuOH	13.6	93.8± 5.5	75.7	82.8± 8.0
대조(증류수)	220.4	-	433.9	-

J 조사 : 처리 3일 후

(3) 활성분획으로부터 alkaloid의 분리

B4, B5 및 B6 분획의 경우 TLC 로 검토하였을 때, 유사한 성분이 주성분으로 함유되어 있었다. 또한 주성분은 alkaloid로 판명되었다. 따라서 3개의 분획을 합한 후 (GTN23B-4+5+6), column chromatography를 수행하여 alkaloid를 분리, 정제하였다. Silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 alkaloid (GTN23B-4+5+6-4, 1; GTN23B-4+5+6-2-3, 2)를 분리 정제하였다.

B8, B9 분획은 분리한 결과 2종의 alkaloid와 동일물질임을 확인하였다.

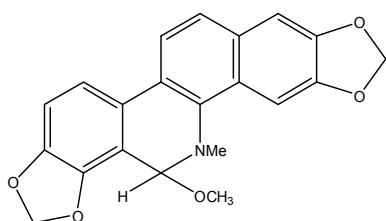
(4) Alkaloid의 구조결정

NMR 을 이용하여 각 화합물의 구조를 결정하였다

화합물 1은 TLC 확인 시, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendroff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. 또한 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면 2개의 singlet olefin methine (δ_H 7.67, δ_H 7.09), 4개의 doublet olefin methine이 vicinal coupling (δ_H 7.74, $J=8.4$ Hz; δ_H 7.60, $J=8.4$ Hz; δ_H 7.44, $J=8.4$ Hz; δ_H 7.02, $J=8.4$ Hz)을 하고, dioxygenatedmethylene (δ_H 6.03, $J=2.4$ Hz) signals이 관측되었다. 또 oxygenated methine (δ_H 5.52), 2개의 methoxy (δ_H 3.94, δ_H 3.90) proton signals과 nitrogen이 결합한 methyl (δ_H 2.74)이 관측되어 alkaloid type임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에서는 21개의 carbon signals을 관측 할 수 있었다. 4개의 oxygenated

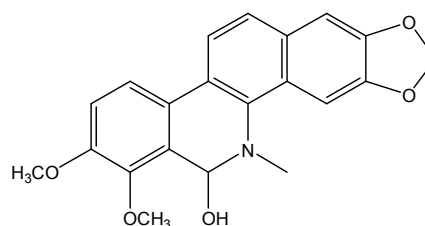
olefin quaternary (δ_C 152.8, δ_C 147.7, δ_C 147.1, δ_C 146.4), 6개의 olefin quaternary (δ_C 138.2, δ_C 130.9, δ_C 126.6, δ_C 125.5, δ_C 124.7, δ_C 122.4), 6개의 olefin methine (δ_C 123.3, δ_C 119.9, δ_C 118.8, δ_C 112.8, δ_C 104.5, δ_C 86.0), 2개의 methoxy (δ_C 61.6, δ_C 55.9), 1개의 nitrogenated-methyl (δ_C 40.6) signals이 관측되었다. ^1H - and ^{13}C -NMR data의 chemical shifts 와 coupling patterns를 통해 8-hydroxydihydrochelerythrine로 구조동정 하였다.

화합물 2는 TLC 확인 시, UV(254/365nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendorff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. 또한 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum을 보면 2개의 singlet olefin methine (δ_H 7.64, δ_H 7.19), 4개의 doublet olefin methine이 vicinal coupling (δ_H 7.74, $J=8.4$ Hz; δ_H 7.46, $J=8.4$ Hz; δ_H 7.39, $J=8.4$ Hz; δ_H 6.92, $J=8.4$ Hz)을 하고, 2개의 dioxygenatedmethylene (δ_H 6.10, $J=1.2$ Hz; δ_H 6.10, $J=1.2$ Hz)signals이 관측되었다. 또한 methoxy (δ_H 3.52)의 proton signals과 nitrogen이 결합한 methyl (δ_H 2.73)이 관측되어 alkaloid type임을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서는 21개의 carbon signals을 관측 할 수 있었다. 4개의 oxygenated olefin quaternary (δ_C 147.9, δ_C 147.2, δ_C 147.0, δ_C 145.1), 6개의 olefin quaternary (δ_C 138.0, δ_C 130.9, δ_C 126.7, δ_C 125.6, δ_C 122.6, δ_C 113), 6개의 olefin methine (δ_C 123.6, δ_C 120.1, δ_C 116.3, δ_C 108.8, δ_C 104.6, δ_C 85.8), methoxy (δ_C 54.1), 1개의 nitrogenated-methyl (δ_C 40.9) signals이 관측되었다. ^1H - and ^{13}C -NMR data의 chemical shifts와 coupling patterns를 통해 6-methoxydihydrosanguinarine로 구조동정 하였다.



화합물 1

8-hydroxydihydrochelerythrine



화합물 2

6-methoxydihydrosanguinarine

그림 2. 활성분획으로부터 분리한 물질

(5) Alkaloid 화합물의 진딧물 살충효과

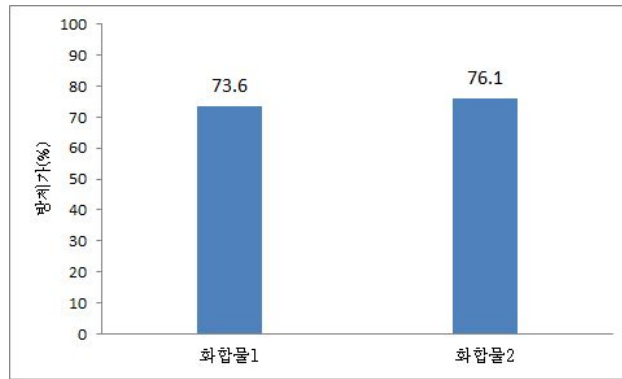


그림 3. Alkaloid 화합물의 진딧물 살충효과 (100ppm)

두 화합물 모두 100 ppm 농도로 처리하였을 때, 진딧물의 70% 이상을 방제하여 유의성 있는 효과를 보였다. 추출물이나 분획물보다 살충효과가 다소 낮게 나타났지만, 이는 분리되지 않은 다른 알칼로이드와의 상승효과가 배제되었기 때문으로 생각한다.

(6) EtOAc 분획으로부터 column chromatography를 이용한 활성분획 살충활성 검정

EtOAc 분획에 대하여 silica gel column chromatography를 실시하였고, TLC를 이용하여 유사한 분획끼리 모으고 농축하여 21개의 소분획을 제조하였다. 각 분획에 대하여 진딧물 살충효과를 실험하였다.

표 10. 죽자조 EtOAc 분획으로부터 분리한 소분획의 진딧물 살충효과

농도 EtOAc분획	500ppm		100ppm	
	생층율(%)	방제가(%)	생층율(%)	방제가(%)
E4	56.7	85.7±10.2	192.2	36.1±21.5
E6	159.6	59.7±21.2	213.6	29.0±18.4
E7	164.7	58.4±17.5	215.5	28.4±14.0
E8	241.0	39.1±24.0	178.1	40.8±12.4
E9	173.3	56.2±7.3	318.2	0±17.9
E10	111.0	72.0±13.5	296.5	1.5±1.0
E11	117.3	70.4±18.0	210.2	30.2±17.3
E12	146.7	62.9±24.8	209.8	30.3±10.3
E14	56.7	85.7±18.5	269.6	10.4±64.5
E15	8.9	97.8±2.3	0.6	99.8±0.3
E16	3.0	99.2±1.3	0	100±0
E17	0	100±0	1.3	99.6±0.8
E18	0	100±0	1.5	99.5±0.6
E19	6.7	98.3±2.9	22.6	92.5±11.0
E20	134.6	66.0±20.3	157.3	47.8±30.7
E21	110.2	72.2±2.3	296.3	1.6±4.1
EtOAc	6.7	98.3±2.9	11.2	96.3±4.1
대조구 (중류수)	395.7	-	301.0	-

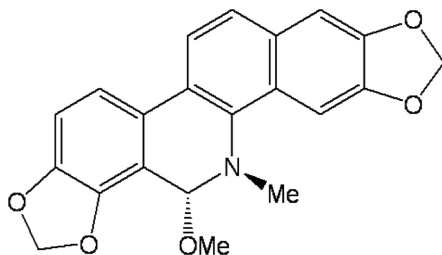
J 조사 : 처리 3일 후

E1, 2, 3, 5, 13는 시료량이 적어 미검정

100 ppm에서 100%의 방제가를 보인 E16 분획에 대하여 (GTN23E-16), column chromatography를 수행하여 alkaloid를 분리, 정제하였다.

화합물은 3은 TLC 확인 시, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendorff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. 또한 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) spectrum에서 3개의 singlet olefin methine (δ_H 7.64, δ_H 7.19, δ_H 5.63), 4개의 doublet olefin methine이 vicinal coupling (δ_H 7.84, $J=8.0$ Hz; δ_H 7.54, $J=8.0$ Hz; δ_H 7.48, $J=8.0$ Hz; δ_H 7.02, $J=8.0$ Hz)을 하고, 2개의 dioxygenatedmethylene (δ_H 6.13, $J=1.2$ Hz; δ_H 6.10, $J=1.2$ Hz) signals이 관측되었다. 또한 nitrogen이 결합한 methyl (δ_H 2.59)이 관측되어 alkaloid type임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에서는 총 21개의 carbon signals을 관측할 수 있었다. 4개의 oxygenated olefin quaternary (δ_C 147.51, δ_C 146.98, δ_C 146.65, δ_C 144.43), 6개의 olefin quaternary (δ_C 138.77, δ_C 130.33, δ_C 126.41, δ_C 124.82, δ_C 122.14, δ_C 114.08), 6개의 olefin methine (δ_C 123.07, δ_C 119.86, δ_C 115.97, δ_C 108.05, δ_C 104.08, δ_C 100.08), 1개의

nitrogenated-methyl (δ_C 39.89) signals이 관측되었다. ^1H - and ^{13}C -NMR data의 chemical shifts와 coupling patterns를 통해 sanguinarine으로 구조동정하였다.



화합물 3
sanguinarine

그림 4. 죽자초 EtOAc 분획으로부터 분리한 물질

2. 현호색으로부터 진딧물 살충 물질의 규명

양귀비과인 현호색 추출물을 살충효과를 증진시키는데 활용하고자 활성물질을 분리하고 살충활성 검정을 하였다. 메탄올 추출물을 activity-guided fractionation 방법을 이용하여 살충물질을 분리, 동정하고자 하였다. 조성물을 용매로 추출하여 추출물을 조제하고, 추출물은 다시 용매를 이용하여 분획하였다. 분획물에 대하여 진딧물 살충효과를 검정하였다. 활성을 보인 분획물에 대하여 column chromatography를 이용하여 분획을 나누었고, 각 분획에 대해서 다시 활성을 검토하는 방법을 반복하여 최종적으로 6종의 알칼로이드를 분리하였고 화합물의 진딧물 살충활성을 검정하였다. 그 중 4종의 화합물의 구조를 NMR 등 스펙트럼 데이터를 해석하여 결정하였다.

가. 연구방법

(1) 식물추출물의 용매 추출 및 분획

현호색 3 kg을 80% MeOH 용액 20 L에 실온에서 12시간 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 1회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 40 °C에서 감압 농축하고, 이 농축물을 H_2O (3 L)와 *n*-hexane(3 L × 3)과 분배 추출하였으며, 다시 H_2O 분획은 ethyl acetate(EtOAc, 3 L × 5)로 분배 추출하였다. 또 다시 H_2O 분획은 *n*-butanol(*n*-BuOH, 3 L × 2)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 *n*-hexane분획(23 g) EtOAc분획(6 g), *n*-BuOH분획(26 g)과 H_2O

분획을 얻었다.

분획별로 진딧물 살충 효과를 검증하였다.

(2) *n*-Hexane 분획으로부터 alkaloid 화합물의 분리

n-Hexane 분획(CTH, 7 g)을 flash column(SNAP Cartridge KP-Sil, 100 g, Biotage®, Uppsala, Sweden)을 이용하여 silica gel(SiO₂) column chromatography(c.c.)(*n*-hexane - EtOAc=1:1, CHCl₃ - MeOH=30:1→15:1→8:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 13개의 분획물(CTH-1 ~ CTH-13)을 얻었다.

CTH-2[1.8 g, ve/vt(elution volume/total volume) 0.011-0.022]에 대하여 SiO₂ c.c.(Φ 4 × 15 cm, CHCl₃ - MeOH=200:1→100:1)을 실시하여 13개의 분획(CTH-2-1 ~ CTE-2-13)을 얻었으며, CTH-2-8[369 mg, Ve/Vt 0.155-0.200]에 대하여 SiO₂ c.c.(Φ 3 × 13 cm, *n*-hexane-EtOAc=10:1)로 실시하여 9개의 분획을 얻었으며, 화합물 1[CTH-2-8-5, Ve/Vt 0.623-0.697, 21 mg, TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄) R_f 0.60, *n*-hexane-EtOAc (1:1)]과 화합물 2[CTH-2-8-7, Ve/Vt 0.759-0.882, 170 mg, TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄) R_f 0.56, *n*-hexane-EtOAc (1:1)]를 분리하였다.

화합물 1 [(+)-stylopinel] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 6.69 (1H, s, H-1), 6.64 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-12), 6.60 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-11), 6.54 (1H, s, H-4), 5.91 (1H, d, *J*=1.6 Hz, -O-CH₂-O-), 5.89 (1H, d *J*=1.6 Hz, -O-CH₂-O-), 5.86 (2H, s, -O-CH₂-O-), 4.02 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8a), 3.54 (1H, dd, *J*=3.2, 11.2 Hz, H-14), 3.49 (1H, d, *J*=15.2 Hz, H-8b), 3.24 (1H, dd, *J*=16.4, 3.6 Hz, H-13a), 3.12 (1H, m, H-6a), 3.04 (1H, m, H-5a), 2.75 (1H, dd, *J*=11.6, 16.4 Hz, H-13b), 2.63 (1H, m, H-5b), 2.58 (1H, m, H-6b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 146.8 (C-9), 146.6 (C-3), 145.5 (C-2), 143.7 (C-10), 130.4 (C-14a), 128.3 (C-12a), 127.6 (C-4a), 121.5 (C-8a), 116.4 (C-12), 108.7 (C-11), 107.3 (C-4), 105.5 (C-1), 101.5 (-O-CH₂-O-), 101.2 (-O-CH₂-O-), 60.1 (C-14), 53.1 (C-8), 51.6 (C-6), 36.1 (C-13), 29.2 (C-5).

화합물 2 [(+)-corydaline] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-12), 6.79 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-11), 6.66 (1H, s, H-1), 6.58 (1H, s, H-4), 4.17 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8a), 3.88 (9-OMe), 3.85 (3-OMe), 3.85 (10-OMe), 3.83 (2-OMe), 3.66 (3H, br.s, H-14), 3.47 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8b), 3.19 (1H, m, H-13), 3.06 (2H, m, H-6), 2.57 (2H, m, H-5), 0.92 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 13-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 149.9 (C-10), 147.5 (C-2), 147.0 (C-3), 144.7 (C-9), 134.8 (C-12a), 128.3 (C-8a), 128.2 (C-4a), 128.2

(C-4a), 123.9 (C-12), 111.0 (C-11), 110.8 (C-4), 108.6 (C-1), 62.9 (C-14), 60.0 (9-OMe), 56.0 (2-OMe), 55.7 (3-OMe), 55.7 (10-OMe), 54.3 (C-8), 51.3 (C-6), 38.1 (C-13), 29.6 (C-5), 18.2 (C-13Me)

(3) EtOAc 분획으로부터 alkaloid 화합물의 분리

EtOAc 분획(CTE, 6 g)을 flash column을 이용하여 SiO₂ c.c.(*n*-hexane - EtOAc=1:1, CHCl₃ - MeOH=30:1→15:1→8:1, EtOH - MeOH=4:1)를 실시하여 16 개의 분획물(CTE-1 ~ CTE-16)을 얻었다.

CTE-4[287.0 mg, Ve/Vt 0.086-0.129]에 대하여 SiO₂ c.c.(Φ 3.5 × 12 cm, CHCl₃ - MeOH=40:1)을 실시하여 10개의 분획(CTE-4-1 ~ CTE-4-10)을 얻었다. CTE-4-5[19.0 mg, Ve/Vt 0.063-0.174]에 대하여 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2 × 26 cm, 100% MeOH)을 실시하여 3개의 분획을 얻었으며, 화합물 3[CTE-4-5-2, Ve/Vt 0.775-0.999, TLC (Kieselgel 60 F₂₅₄) R_f 0.56, CHCl₃-MeOH (7:1)]을 분리하였다.

화합물 3 [demethylcorydalmine] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 6.80 (1H, s, H-1), 6.71 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-11), 6.64 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-12), 6.57 (1H, s, H-4), 4.21 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8a), 3.84 (6H, s, 2, 3-OMe), 3.49 (2H, m, H-14, 8b), 3.20 (2H, m, H-6a, 13a), 3.12 (1H, m, H-5a), 2.79 (1H, dd, *J*=15.6, 11.2 Hz, H-13b), 2.63 (2H, m, H-5b, 6b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 144.8 (C-3), 143.8 (C-2), 143.7 (C-10), 141.2 (C-9), 130.3 (C-14a), 127.9 (C-12a), 125.9 (C-4a), 121.0 (C-8a), 119.2 (C-12), 111.2 (C-1), 110.4 (C-4), 108.8(C-11), 59.1 (C-14), 56.1 (2-OMe), 55.8 (3-OMe), 53.4 (C-8), 51.5 (C-6), 36.2 (C-13), 29.1 (C-5).

CTE-8[3.5 g, Ve/Vt 0.327-0.365]에 대하여 SiO₂ c.c.(Φ 4 × 15 cm, CHCl₃ - MeOH=50:1)를 실시하여 9개의 분획(CTE-8-1 ~ CTE-8-9)을 얻었고, 다시 CTE-8-2[670.0 mg, ve/vt 0.084-0.120]에 대하여 ODS(Octadecyl Silica gel) c.c. (Φ 3.5 × 8 cm, MeOH- H₂O=5:1)를 실시하여 9개의 분획(CTE-8-2-1 ~ CTE-8-2-9)을 얻었다. 또 CTE-8-2-5[42.0 mg, ve/vt 0.300-0.473]에 대하여 Sephadex LH-20 column (Φ 1 × 35 cm, MeOH-H₂O=6:1)을 진행하여 8개의 분획(CTE-8-2-5-1 ~ CTE-8-2-5-8)을 얻었고, 화합물 4[CTE-8-2-5-3, 28.0 mg, ve/vt 0.465-0.551, TLC (Kieselgel 60 RP-18) R_f 0.25, MeOH-H₂O (10:1)]를 분리하였다.

화합물 4 [glaucine] yellow powder; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.94 (1H, s, H-11), 6.85 (1H, s, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 3.84 (3H, s, 1-OMe), 3.82 (3H, s, 2-OMe), 3.81 (3H, s, 9-OMe), 3.57 (3H, s, 10-OMe), 3.06 (1H, m, H-5a), 3.03 (1H, m, H-7a), 3.02 (1H, m, H-4a), 2.99 (1H, m, H-5b), 2.90 (1H, m, H-6a), 2.63 (1H, m, H-4b), 2.49 (3H, s, N-CH₃), 2.43 (1H, m, H-7a), 2.40 (1H, m, H-7b); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 153.4 (C-2), 149.5 (C-9), 148.6 (C-10), 145.4 (C-1), 130.4 (C-7a), 129.7 (C-3a), 127.7 (C-1b), 127.4 (C-1a), 125.4 (C-11a), 113.1 (C-11), 112.3 (C-8), 111.6 (C-3), 63.7 (C-6a), 60.4 (1-OMe), 56.5 (2-OMe), 56.2 (9-OMe), 56.1 (10-OMe), 54.0 (C-5), 43.9 (6-Me), 34.0 (C-7), 29.5 (C-4).

(4) 살충활성검정

목화진딧물 (*Aphid gossypii*)은 오이를 파종하고 본엽이 3-4매일 때 진딧물을 접종하여 하우스에서 증식시켜 시험에 사용함

유묘검정법으로 시험하였으며 본엽이 4~6매 된 오이 포트에 진딧물을 접종하여 정착된 진딧물의 밀도를 사전조사한 후 triton-100 250ppm을 첨가한 추출물을 농도별로 엽면살포하고 3일과 7일 후에 생충율을 조사함

- 3반복으로 처리

- 방제가 (%) = [(무처리구 생충율 - 처리구 생충율) / 무처리구 생충율] x 100

나. 연구결과

(1) 현호색으로부터 추출물 및 분획물 조제 및 진딧물 살충 효과 검정

현호색으로부터 얻은 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성 차이를 이용하여 계통분획하였다. 그 결과, *n*-hexane분획(23 g), EtOAc분획(6 g), *n*-BuOH분획(26 g)과 H₂O분획을 얻었다. 각 분획들에 대하여 진딧물 살충활성검정을 실시하였고, *n*-hexane분획과 EtOAc분획에서 활성을 확인하였다.

표 11. 현호색의 용매분획별 진딧물 살충효과

분획 용매	농도(ppm)	방제가(%)
<i>n</i> -hexane	3000	64.7 ± 3.7
	2000	84.6 ± 9.8
EtOAc	3000	77.7 ± 2.9
	2000	67.1 ± 11.4
<i>n</i> -BuOH	3000	35.5 ± 5.6
	2000	55.6 ± 33.7
H ₂ O	3000	28.8 ± 15.4
	2000	32.0 ± 28.9

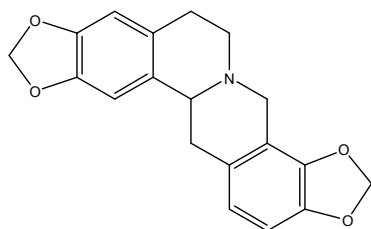
(2) *n*-Hexane 분획으로부터 alkaloid 의 분리 정제 및 구조결정

CTH의 경우 TLC로 검토했을 때, 주성분은 alkaloid로 판명되었다. 따라서 CTH에 대하여 column chromatography 를 수행하여 alkaloid 를 분리, 정제하였다. silica gel column chromatography를 반복하여 2종의 alkaloid (CTH-2-8-5; CTH-2-8-7)를 분리 정제하였다.

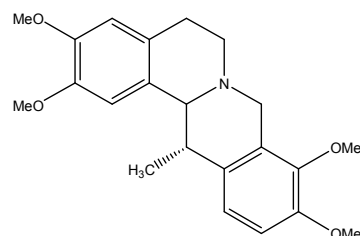
화합물 1은 TLC 확인 시, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendorff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면 저자장에서 2개의 singlet olefin methine (δ_H 6.69, δ_H 6.54), 2개의 doublet olefin methine이 vicinal coupling (δ_H 6.64, $J=8.0$ Hz; δ_H 6.60, $J=8.0$ Hz)을 하는 것이 관측되었다. 또한 δ_H 5.91, δ_H 5.89에서 1.6 Hz의 J 값을 가지는 doublet 두 개와 δ_H 5.86에서 수소 2개의 integration 값을 가지는 singlet 하나를 관측하여 2개의 dioxymethylene을 예상하였다. δ_H 4.02~3.49와 δ_H 3.12~2.58에 걸쳐 nitrogen이 치환되어 저자장으로 shift된 methylene signal 을 관측하였고, δ_H 3.24~2.63의 고자장 영역에서 methylene signal들이 multiplet으로 나타났다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum 에서는 19개의 signal을 확인하였다. 저자장에서 4개의 oxygenated olefine quaternary signal(δ_C 146.8, C-9; δ_C 146.6, C-3; δ_C 145.5, C-2; δ_C 143.7, C-10)과, 4개의 olefine quaternary signal(δ_C 130.4, C-14a; δ_C 128.3, C-12a; δ_C 127.6, C-4a; δ_C 121.5, C-8a), 그리고 4개의 olefine methine signal(δ_C 116.4, C-12; δ_C 108.7, C-11; δ_C 107.3, C-4; δ_C 105.5, C-1)을 확인하였다. δ_C 101.5, δ_C 101.2에서 2개의 dioxymethylene signal을 확인하였고, δ_C 60.1에서 관측된 methine을 비롯한 δ_C 53.1, δ_C 51.6에서 관측된 methylene들은 저자장으로 shift된 것으로 보아 nitrogen과 결합하고 있는 것을 알 수 있었다. 2개의 dioxymethylene의 위치를 확인하기 위하여 gradient heteronuclear multiple-bond connectivity(gHMBC)를 측정하였다. gHMBC spectrum에서, 2개의 dioxymethylene signal(δ_H 5.89, δ_H 5.86)이 4개의 oxygenated olefine quaternary signal(δ_C 145.5, C-2; δ_C 146.6, C-3; δ_C 146.8, C-9; δ_C 143.7, C-10)들과 correlation을 보여 각각의 위치에 결합하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 화합물 1은 protoberberine의 골격을 가지는 (+)-stylophine으로 구조 동정하였다.

화합물 2 역시 TLC에서 확인하였을 때, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendorff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)과 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum의 전체적인 양상이 화합물 1과 비슷한 양상을 보였다. 하지만, 화합물 1에서는 관측되지 않았던 4개의 singlet methoxy signal(δ_H 3.88, 9-OMe; δ_H 3.85, 3-OMe; δ_H 3.85, 10-OMe; δ_H 3.83, 2-OMe; δ_C 60.0, 9-OMe; δ_C 56.0, 2-OMe; 55.7, 3-OMe; δ_C

c 55.7, 10-OMe)과 1개의 doublet methyl(δ_H 0.92, d, $J=6.8$ Hz, 13-Me; δ_C 18.2, 13-Me)이 확인되었다. 따라서, 화합물 2는 protoberberine 골격의 corydaline으로 구조 동정되었다.



화합물 1
(+)-stylopine



화합물 2
corydaline

그림 5. 현호색 n-hexane 분획으로부터 분리한 물질

(3) EtOAc 분획으로부터 alkaloid의 분리 정제 및 구조결정

CTE의 경우 TLC로 검토하였을 때, 주성분은 alkaloid로 판명되었다. 따라서 CTE에 대하여 SiO₂, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 수행하여 2종의 alkaloid (CTE-4-2; CTE-8-2-5-3)를 분리 정제하였다.

화합물 3은 TLC 확인 시, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendroff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)과 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectra 역시 화합물 1과 비슷한 양상을 띠고 있으나, 2개의 methoxy signal이 더 관측되었다. Methoxy들의 위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정하였다. 그 결과, methoxy signal(δ_H 3.84, s, 2,3-OMe)이 2개의 oxygenated olefine quaternary (δ_C 144.8, C-3; δ_C 143.8, C-2)들과 correlation을 보여 methoxy기가 2번과 3번 탄소와 결합하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 화합물 3번은 demethylcorydalmine으로 구조동정하였다.

화합물 4는 TLC 확인 시, UV(254/365 nm)에서 강한 UV 흡수를 보였으며, Dragendroff's 발색 시, 등황색으로 발색되었다. 또한 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면 저자장 영역에서 3개의 singlet olefine methines (δ_H 7.94, δ_H 6.85, δ_H 6.64)가 관측되었고, δ_H 3.84, δ_H 3.82, δ_H 3.81, δ_H 3.57에서 4개의 methoxy signal들이 singlet으로 관측되었다. 고자장 영역에서는, δ_H 3.06, δ_H 2.99에서 1개의 nitrogenated methylene, δ_H 3.03~2.43에서 2개의 multiplet methylene signal, 그리고 δ_H 2.90에서 1개의 nitrogenated methine signal을 확인하였다. δ_H 2.49에서 관측되는 1개의 methyl signal은 저자장으로 관측된 것으

로 보아 질소가 결합하고 있음을 알 수 있었으며, 이것으로 화합물 4는 benzyloquinoline 계열의 alkaloid로 예상하였다. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서는 총 21개의 signal이 관측되었다. 저자장 영역에서 4개의 oxygenated olefine quaternary(δ_{C} 153.4, C-2; 149.5, C-9; 148.6, C-10; 145.4, C-1)와 5개의 olefine quaternary(δ_{C} 130.4, C-7a; 129.7, C-3a; 127.7, C-1b; 127.4, C-1a; 125.4, C-11a), olefine methine 3개(δ_{C} 113.1, C-11; 112.3, C-8; 111.6, C-3)를 관측하였다. 또한, methoxy 4개(δ_{C} 60.4, 1-OMe; 56.5, 2-OMe; 56.2, 9-OMe; 56.1, 10-OMe)와 nitrogenated methine(δ_{C} 63.7, C-6a), nitrogenated methylene(δ_{C} 54.0, C-5), niteogenated methyl(δ_{C} 43.9, 6-Me) 각각 1개씩을 확인하였다. 4개의 methoxy 기들의 위치는 gHMBC를 통하여, 각각의 proton signal(δ_{H} 3.84, 1-OMe; 3.82, 2-OMe; 3.81, 9-OMe; 3.57, 10-OMe)들이 4개의 oxygenated olefine quaternary(C-2, δ_{C} 153.4; C-9, δ_{C} 149.5; C-10, δ_{C} 148.6 and C-1, δ_{C} 145.4)와 correlation을 보여 위치를 확인하였다. 그 결과, 화합물 4는 glaucine으로 구조동정하였다.

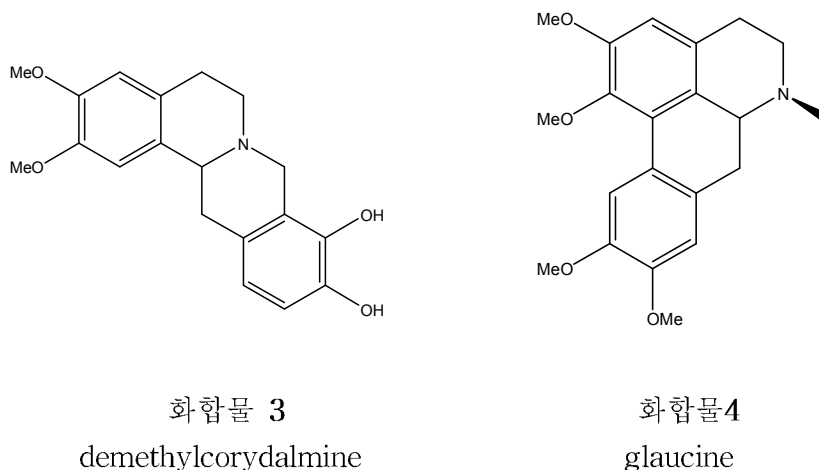


그림 6. 현호색 EtOAc 분획으로부터 분리한 물질

(4) Alkaloid 화합물의 진딧물 살충 효과

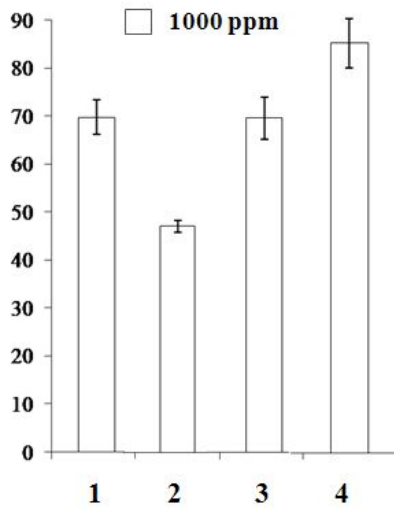


그림 7. Alkaloid 화합물 4종의 살충효과

네 화합물을 1000 ppm의 농도로 처리하였을 때, 위와 같은 효과를 보였다. 2번 화합물을 제외한 나머지 3종의 화합물에서는 70% 이상의 유의성 있는 효과를 보였다.

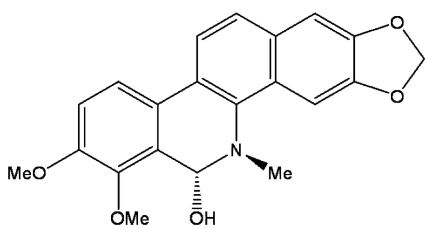
제 2절 HPLC를 이용한 지표 성분 분석 방법 확립 및 표준화

1. HPLC를 이용한 지표성분의 분석

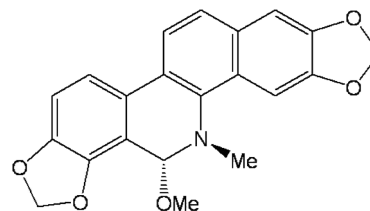
가. 연구방법

(1) 지표성분

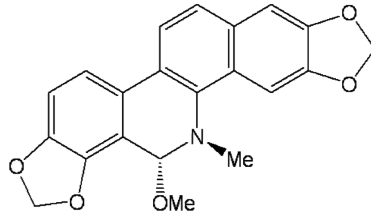
제품 추출물로부터 분리한 3종의 단일물질을 사용하였다.



8-hydroxydihydrochelerythrine



8-methoxydihydrosanguinarine



sanguinarine

그림 8. 제품 추출물로부터 분리한 단일물질

(2) HPLC를 이용한 정량 분석

(가) 최대 UV 흡수 파장 측정

Sanguinarine의 최대UV 흡수 파장을 찾기 위하여 0.025 mg/ml의 농도로 제조한 시료를 UV-VIS spectrophotometer [SCINCO사의 S-4100(Seoul, Korea)]로 측정하였다.

(나) HPLC 분석용 시료의 조제

8-hydroxydihydrochelerythrine은 1 mg의 시료를 pyridine 0.2 ml과 MeOH 0.8 ml 를 이용하여, 8-methoxydihydrosanguinarine과 sanguinarine은 1 mg의 시료를 MeOH 1.0 ml를 이용하여 녹인 후, 0.45 µm membrane filter로 여과시켜, 여액을 분석에 사용하였다.

(다) HPLC 분석 조건

- 기기명 : Shimadzu LC-10AT
- Column : Waters, symmetry ® C18, 5 mm, 4.6 X 250 mm
- 검출기 : UV-detector, 280 nm
- 용출용매 : A - acetonitrile
 B - 0.1% H₃PO₄ aqueous solution
- 용출속도 : 0.8 mL/min
- Injection volume : 20 µl

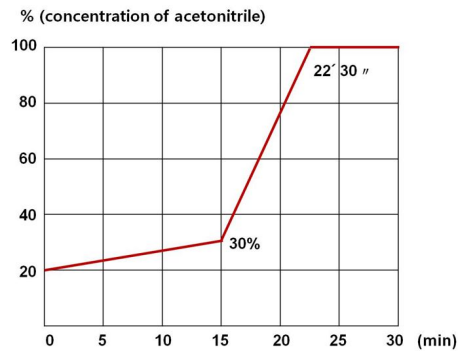


그림 9. Acetonitrile의 농도 곡선

(라) 회귀곡선 작성

각 시료를 각각 0.0625 mg/ml 에서 0.5 mg/ml 까지의 농도로 제조한 후, 20 μ l을 주입하여 회귀곡선을 작성하였다.

(마) 두 단일물질에 대한 HPLC 분석

조제한 HPLC 분석용 시료액을 각각 20 μ l씩 주입한 후 30분 동안 분석하였다.

(바) 제품의 *n*-BuOH 분획 중 단일물질 함량 분석

제품 추출물 *n*-BuOH 분획을 HPLC로 분석하여 *n*-BuOH 분획 중 두 단일물질의 함량을 분석하였다.

(사) 죽자초 제제 중의 sauguinarine 함량 분석

충스타 1 g에 100% MeOH 50 ml을 가하여 상온에서 6시간동안 추출한 후, 여과하여 감압농축 하였다. 얻어진 농축물 266 mg을 100% MeOH 50 ml 에 녹인 후, 0.45 mm membrane filter로 여과하였다. 이 시료에 대하여 가-(2)-(다)와 같은 HPLC 조건으로 20 ml를 주입하여 분석하였다.

이 시료에 대하여 가-(2)-(다)와 같은 HPLC 조건으로 20 μ l를 주입하여 분석하였다.

나. 연구결과

(1) 최대 UV 흡수 파장 측정

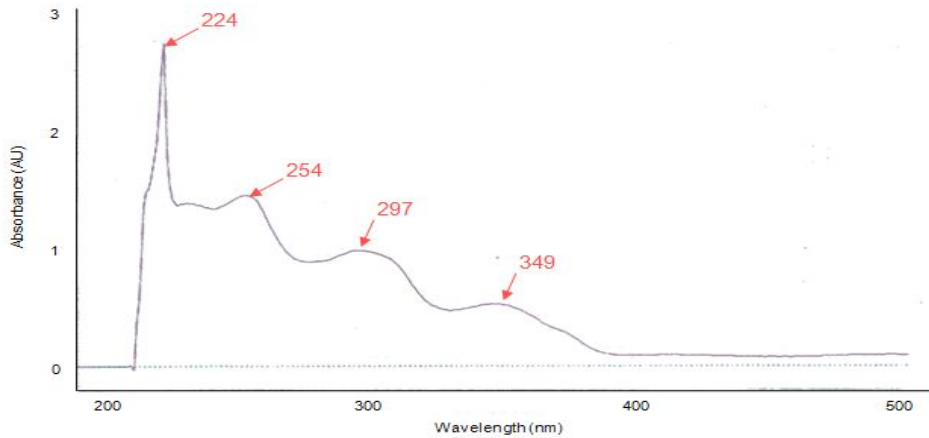


그림 10. Sanguinarine의 UV 흡수 파장

UV 흡수 파장을 분석한 결과 254 nm를 최대흡수 파장으로 결정하였다.

(2) HPLC 법을 이용한 정량 분석

(가) HPLC 정량법을 이용한 회귀곡선의 작성

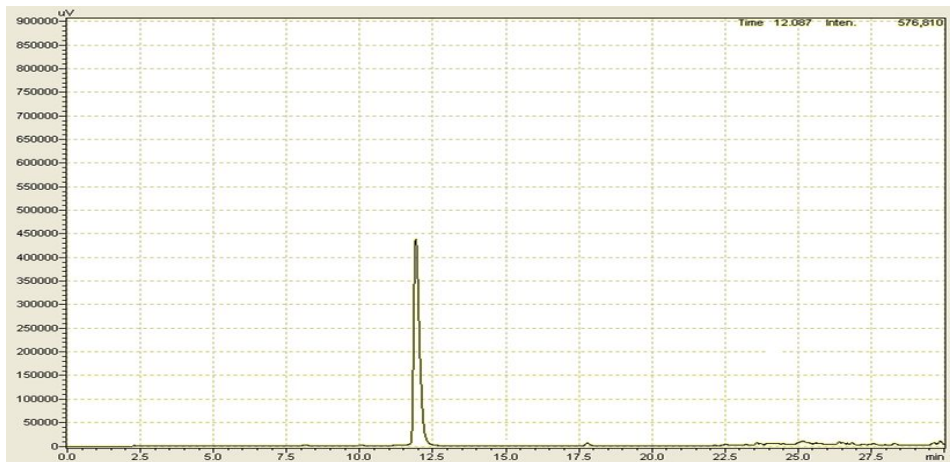


그림 11. 8-hydroxydihydrochelerythrine 의 HPLC chromatogram

8-hydroxydihydrochelerythrine을 가-(2)-(다)와 같은 조건으로 분석한 결과, 11.93분에서 peak가 나타났다. 이를 이용하여 작성한 회귀곡선은 다음과 같다.

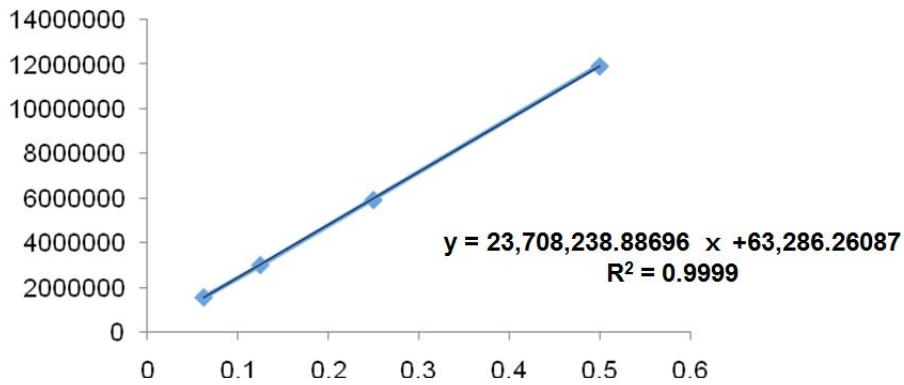


그림 12. 8-hydroxydihydrochelerythrine에 대한 회귀곡선

8-hydroxydihydrochelerythrine의 경우 표준시료의 농도 0.0625 mg/ml에서 0.5 mg/ml까지 HPLC로 분석했을 때 농도에 따른 peak 면적은 $y = 23,708,238.88696 x + 63,286.26087$ 와 같은 식으로 나타났으며, 회귀계수는 0.9999 였다.

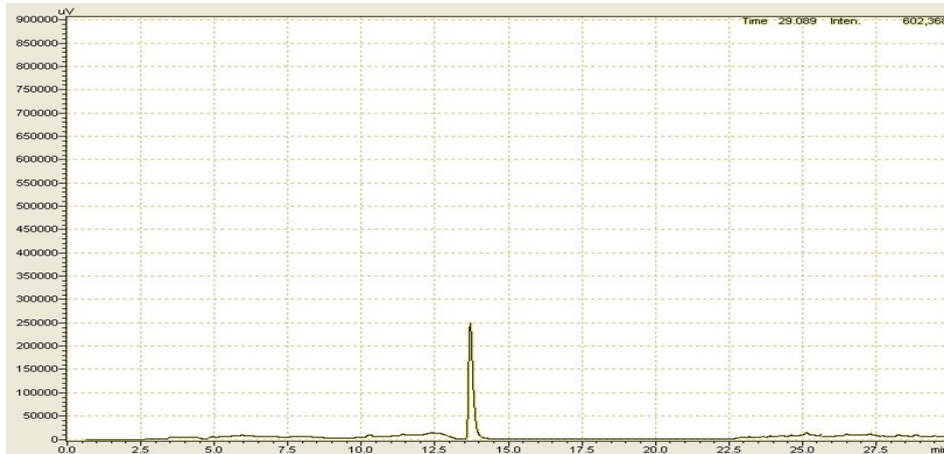


그림 13. 8-methoxydihydrosanguinarine의 HPLC chromatogram

8-methoxydihydrosanguinarine을 가-(2)-(다)와 같은 조건으로 분석한 결과, 15.24분에서 peak가 나타났고 이것을 이용하여 작성한 회귀곡선은 다음과 같다.

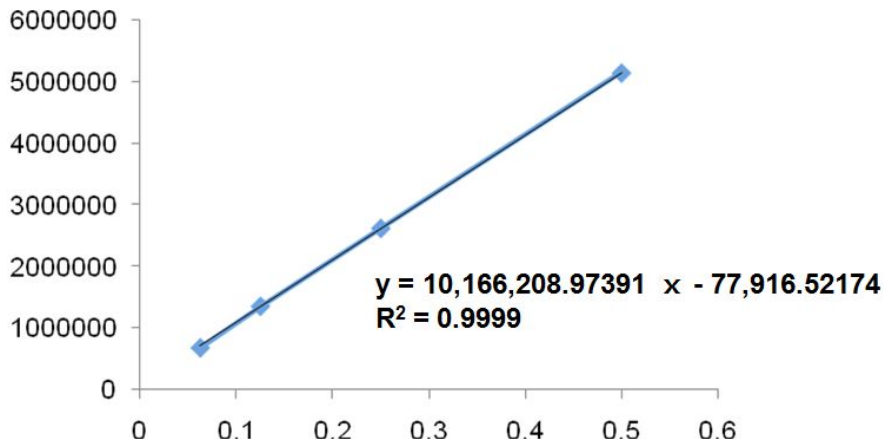


그림 14. 8-methoxydihydrosanguinarine에 대한 회귀곡선

8-methoxydihydrosanguinarine의 경우 표준시료의 농도 0.0625 mg/ml에서 0.5 mg/ml까지 HPLC로 분석했을 때, 농도에 따른 peak 면적은 $y = 10,166,208.97391 x + 77,916.52174$ 와 같은 식으로 나타났으며, 회귀계수는 0.9999 였다.

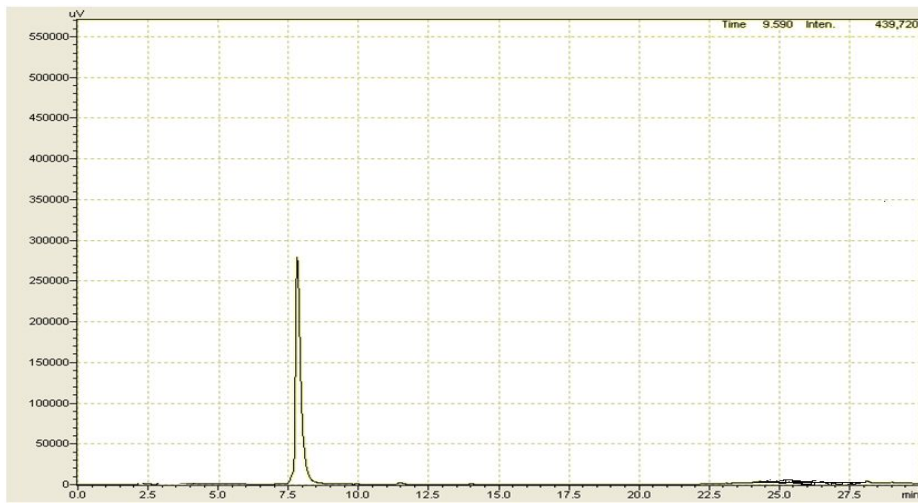


그림 15. Sanguinarine의 HPLC chromatogram

Sanguinarine을 가-(2)-(다)와 같은 조건으로 분석한 결과, 7.81분에서 peak가 나타났고, 이를 이용하여 작성한 회귀곡선은 다음과 같다.

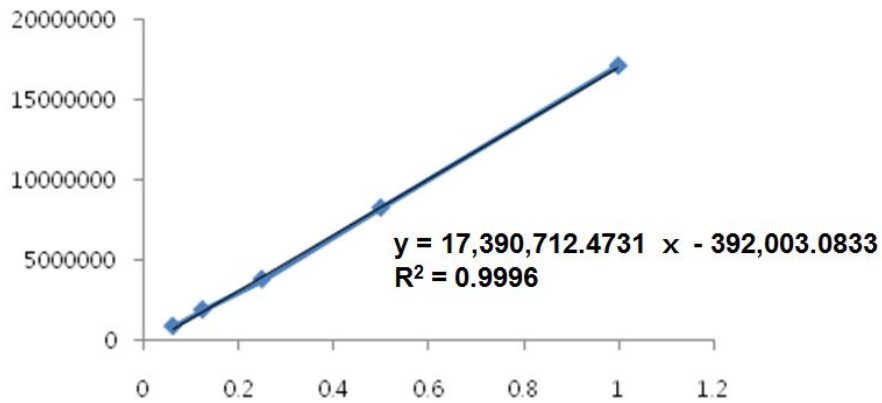


그림 16. Sanguinarine에 대한 회귀곡선

Sanguinarine 표준시료를 0.0625 mg/ml에서 1.0 mg/ml 까지의 농도로 제조하여 HPLC로 분석했을 때 농도에 따른 peak 면적은 $y = 17,390,712.4731 x - 392,003.0833$ 와 같은 식으로 나타났으며, 회귀계수는 0.9996 이었다.

(3) 죽자초 *n*-BuOH 분획 중 지표성분 함량 분석

50 mg/ml의 농도로 제조한 시료를 가-(2)-(다)와 같은 조건에서 분석한 결과는 다음과 같다.

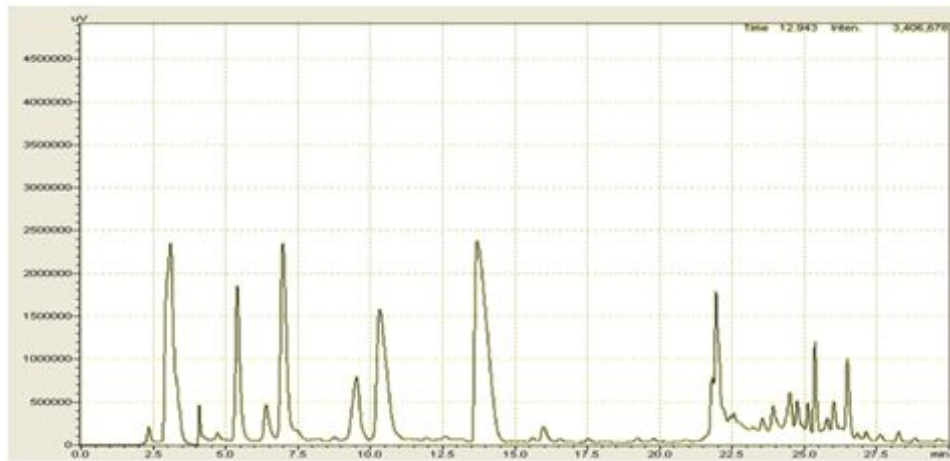


그림 17. 죽자초 *n*-BuOH 분획의 HPLC chromatogram

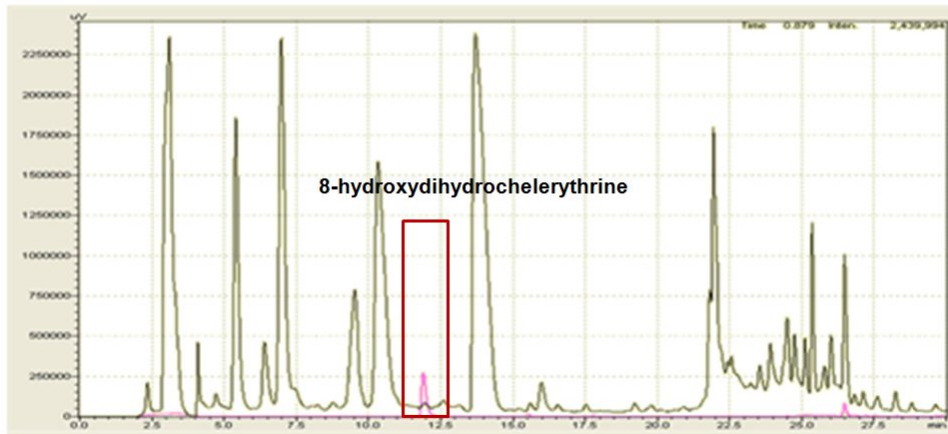


그림 18. *n*-BuOH 분획과 8-hydroxydihydrochelerythrine의 HPLC chromatogram

8-hydroxydihydrochelerythrine와 같은 Retention time을 가지는 peak에 대하여 함량을 그림 12의 회귀곡선을 이용하여 계산한 결과, 8-hydroxydihydrochelerythrine은 죽자초 *n*-BuOH 분획에 0.16 mg/g이 함유되어 있었다.

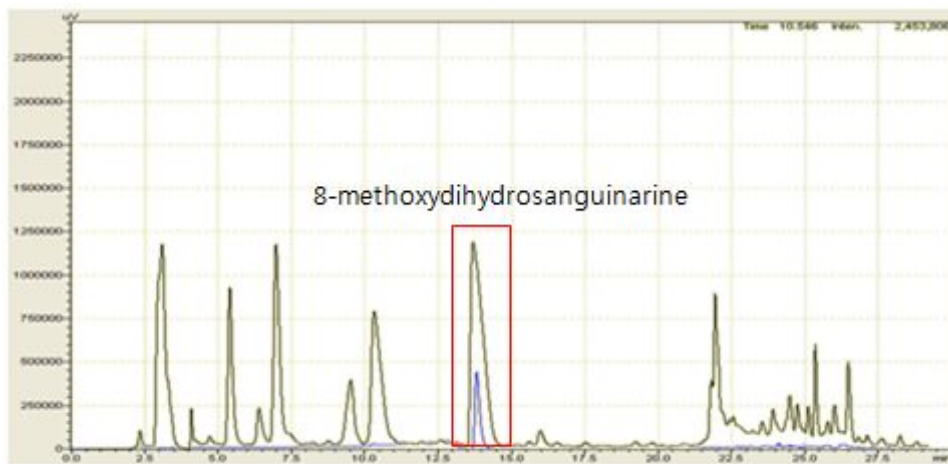


그림 19. *n*-BuOH 분획과 8-methoxydihydrosanguinarine의 HPLC chromatogram

8-methoxydihydrosanguinarine 와 같은 Retention time을 가지는 peak 에 대하여 함량을 그림 14의 회귀곡선을 이용하여 계산한 결과, 8-methoxydihydrosanguinarine은 죽자초 *n*-BuOH 분획에 61.1 mg/g이 함유되어 있었다.

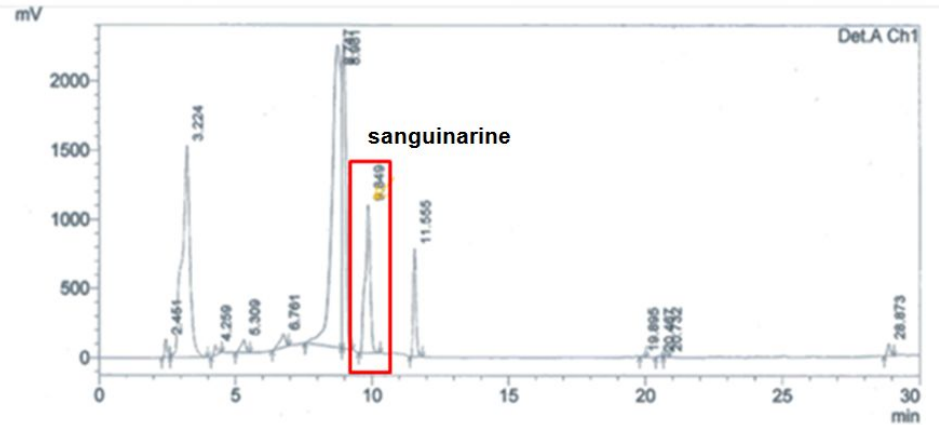


그림 20. 식물추출물 제품의 HPLC chromatogram

가-(2)-(사)의 방법으로 조제한 시료를 가-(2)-(다)와 같은 조건으로 분석하고, sanguinarine과 같은 retention time을 갖는 peak에 대하여 그림 16의 회귀곡선을 이용하여 계산한 결과, sanguinarine은 식물추출물 제품(충스타)에 0.82 mg/ml이 함유되어 있었다.

2. HPLC를 이용한 제품의 안정성 분석

가. 연구방법

(1) 실험재료

(가) 지표성분 sanguinarine

Sigma-Aldrich® 에서 구매한 sanguinarine 표준품을 시료로 사용하였다.

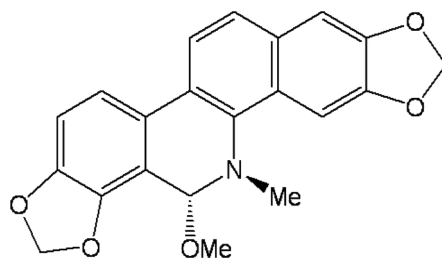


그림 21. Sanguinarine

(나) 죽자초 제제 처리 토마토 잎

경기도농업기술원에서 관행적으로 재배하고 있는 토마토 재배하우스에서 죽자초 시제품을 토마토 식물체에 엽면살포하고 잎이 건조한 후 처리당일, 처리 후 1, 3, 7, 14일후에 유사한 크기의 잎을 수확하여 초저온 냉동보관하였다가 일괄 분석에 사용하였다.

표 12. 죽자초 제제 처리 토마토 잎

시료명	무게 (g)
처리 1일 후 (1)	6.50
처리 1일 후 (2)	4.51
처리 3일 후	19.09
처리 7일 후	19.57
처리 13일 후	19.96

(2) HPLC를 이용한 안정성 분석

(가) HPLC 분석용 시료의 조제

토마토 잎 1 g 당 8 ml의 100% MeOH을 가하여 shaker를 사용하여 2시간 동안 2번 반복 추출하고 감압 농축하여 얻은 추출물에 대하여 EtOAc/H₂O의 계통분획을 실시하여 EtOAc 분획을 얻었다. 얻어진 EtOAc 분획을 200 mg/ml의 농도로 제조한 후 0.45 µm membrane filter로 여과시켜, 여액을 분석에 사용하였다.

(나) HPLC 분석 조건

- 기기명 : Shimadzu LC-10AT
- Column : Waters, symmetry ® C18, 5 mm, 4.6 X 250 mm
- 검출기 : UV-detector, 280 nm
- 용출용매 : A - acetonitrile
 B - 0.1% H₃PO₄ aqueous solution
- 용출속도 : 0.8 mL/min
- Injection volume : 20 µl

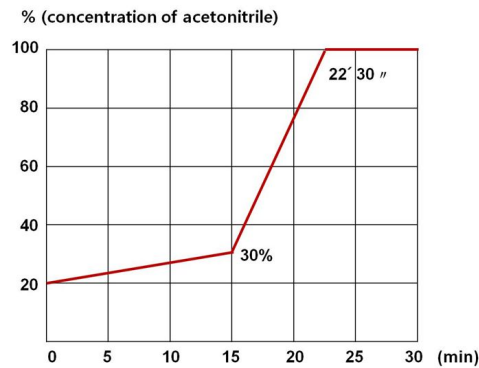


그림 22. Acetonitrile의 농도 곡선

(다) 회귀곡선 작성

Sanguinarine을 6.25 ppm에서 31.25 ppm 까지 3단계의 농도로 제조한 후, 20 μ l을 주입하여 회귀곡선을 작성하였다.

(라) 죽자초 제제 처리 토마토 잎의 sanguinarine 함량 분석

(2)-(가)의 방법으로 조제한 시료에 대하여 (2)-(나)와 같은 HPLC 조건으로 20 μ l를 주입하여 분석하였다.

나. 연구결과

(1) HPLC 분석용 시료 조제

표 13. HPLC 분석용 시료

시료명	무게(g)	추출물 무게(mg)	EtOAc fr. 무게(mg)
처리 1일 후 (1)	6.50	189	42.8
처리 1일 후 (2)	4.51	129.4	33.8
처리 3일 후	19.09	753.4	137.6
처리 7일 후	19.57	753.4	113.7
처리 13일 후	19.96	555	95.9

(2) Sanguinarine의 HPLC 분석

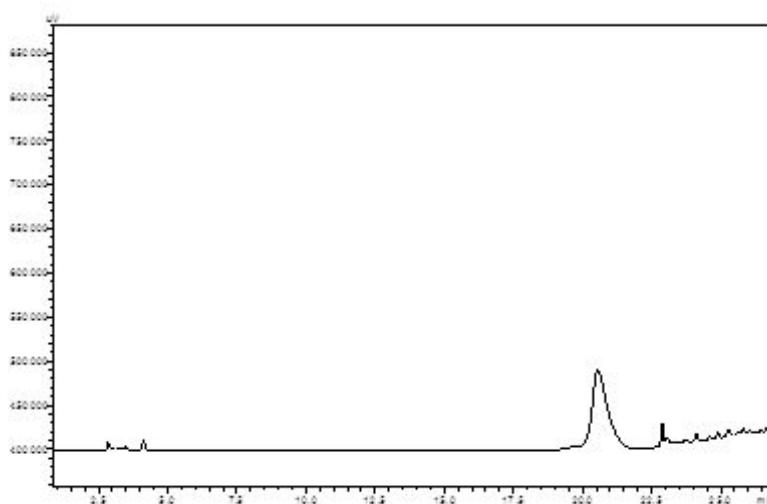


그림 23. Sanguinarine의 HPLC chromatogram

표준 시료용액을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 20.54분에서 peak가 나타

났으며 이를 이용하여 작성한 회귀곡선은 다음과 같다.

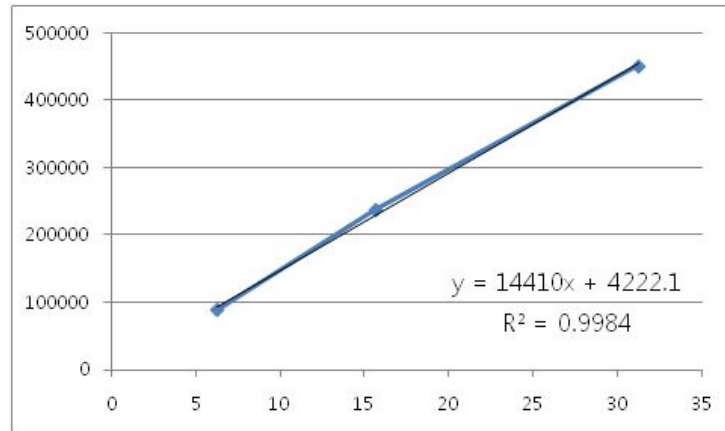


그림 24. Sanguinarine의 회귀곡선

Sanguinarine 표준시료의 농도를 6.25 ppm에서 31.25 ppm까지 HPLC로 분석했을 때 농도에 따른 peak 면적은 $y = 14410x + 4222.1$ 과 같은 식으로 나타났으며, 회귀계수는 0.9984 였다.

(3) 죽자초 제제 처리 후 토마토 잎의 HPLC 분석

표 13의 시료를 분석한 결과는 다음과 같다.

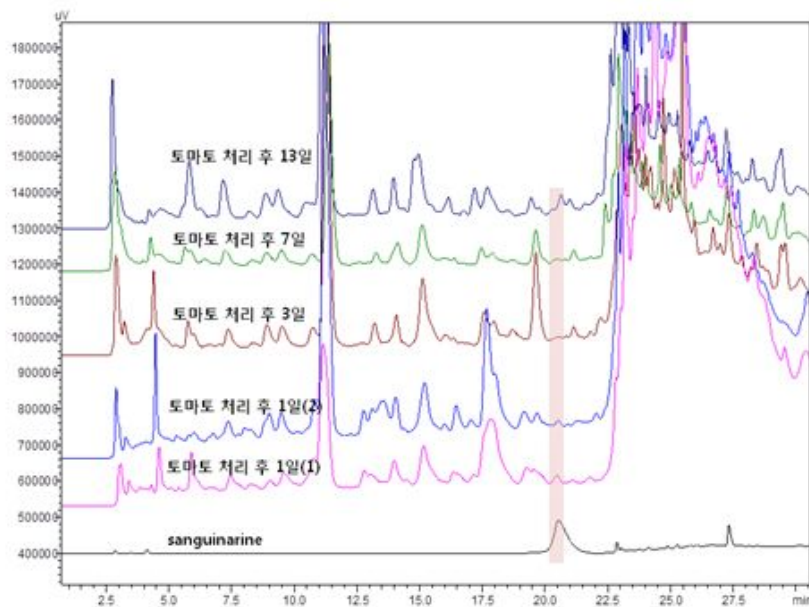


그림 25. 시료의 HPLC chromatogram

HPLC 분석 결과 제제 처리 후 3일, 7일, 13일 후 시료에서는 sanguinarine이 분석되지 않았다. 그림 24의 회귀곡선을 이용하여 sanguinarine의 함량을 계산

한 결과는 다음과 같다.

표 14. 각 시료별 sanguinarine 함량

시료명	함량 (µg/g)
처리 1일 후 (1)	0.43
처리 1일 후 (2)	1.31
처리 3일 후	0
처리 7일 후	0
처리 13일 후	0

제 3 절 제형화를 통한 시제품 개발

1. 제형화를 위한 최적용매 선발

가. 연구방법

(1) 추출용매별 조추출물 조제

제형화를 위한 최적 용매를 선정하기 위해서 죽자초, 현호색 건시료 각각 100 g를 추출용매별로 1 L에 24시간 2회 상온에서 추출하여 여과한 후 여과액을 진공감압농축기를 이용하여 완전농축하고 다음 동결 건조기에서 건조시킨 후 시험에 사용하였다. 시험에 사용된 추출용매는 methanol(MeOH), ethanol(EtOH), *n*-hexane, ethylacetate(EtOAc), dichloromethane(DCM) 5종이었다.

(2) 살충활성 검정

시험해충은 목화진딧물을 대상으로 유묘검정법으로 검정하였다. 목화진딧물 (*Aphis gossypii*)은 본엽이 4~6매 된 오이 포트에 진딧물을 집중하여 정착된 진딧물의 밀도를 사전조사한 후 triton-100 250ppm을 첨가한 추출물을 농도별로 엽면살포하고 3일과 7일 후에 생충율을 조사하였다. 3반복으로 처리하였다.

방제가 (%) = [(무처리구 생충율 - 처리구 생충율) / 무처리구 생충율] x 100 (Abbott, 1925)

나. 연구결과

(1) 추출용매별 진딧물 살충효과

(가) 죽자초의 추출용매별 진딧물 살충효과

죽자초 추출물을 제형화하기 위해 추출용매별 진딧물 방제효과를 검정한 결과 에탄올로 추출하였을 때 살충효과가 86%로 가장 높았다 (표 15). 이 결과로 에탄올추출물을 이용하여 시제품을 제조하였다.

표 15. 죽자초 추출용매별 목화진딧물 방제효과

추출용매	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
		생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
MeOH	48.3	178.9	30.6±20.3	1127.6	48.7±12.6
EtOH	30.3	55.6	78.4±26.6	307.1	86.0±15.6
<i>n</i> -hexane	33.7	153.4	40.4±10.5	1138.2	48.2± 4.4
EtOAc	41.0	122.9	52.3± 2.7	755.4	65.6±14.5
DCM	48.7	61.8	76.0±14.1	657.1	70.1±14.1
대조(증류수)	46.0	339.3	-	2198.6	-

↓ 처리농도 3000ppm

(나) 현호색의 추출용매별 진딧물 살충효과

죽자초와 같은 양귀비과 식물인 현호색의 진딧물 살충효과가 있음을 이용하여 죽자초를 이용한 시제품에 약효증진 혼합제로 활용하기 위하여 추출용매별 살충효과를 검정하였다. 에탄올로 추출하였을 때 83.4%로 살충효과가 높아 죽자초와 같은 경향을 보였다 (표 16). 에탄올은 친환경유기농자재의 원료로 사용이 가능하기 때문에 추후 현호색 에탄올추출물에 대한 추가적인 약효시험을 통해 독자적인 시제품 또는 기존의 시제품에 약효증진 혼합제로 활용할 계획이다.

표 16. 현호색 추출용매별 목화진딧물 방제효과

추출용매	사전밀도(마리/반복)	생충율(%)	방제가(%)
MeOH	78.3	58.1	72.2±12.3
EtOH	85.3	34.8	83.4±8.5
<i>n</i> -hexane	108.0	70.7	66.2±18.0
EtOAc	90.7	39.1	81.3±1.2
DCM	86.7	42.8	79.5±20.1
대조(증류수)	37.7	208.8	-

↓ 처리농도 3000 ppm, ♪ 조사 : 처리 3일 후

2. 시제품제조

가. 연구방법

(1) 죽자초추출물

죽자초추출물은 건조된 죽자초 식물체를 추출기에 넣고 60% 에탄올을 넣고 24시간 침지하여 추출한 후 농축기로 이동하여 70℃에서 농축하여 진공분무 건조기에서 건조하여 분말로 만든 것으로 지표물질인 sanguinarine의 함량은 1% 이상이었다.

(2) 보조제

시제품 제제에 있어 친환경유기농자재 목록공시 신청을 고려하여 미국 EPA에서 규정하는 List of Inert Pesticide Ingredients의 List 4A와 List 4B에 속하는 물질을 참고로 하여 보조제를 선발하였다. 보조제로 선발한 물질로는 차유추출물, 파라핀유, Tween-80, 라우릴알콜 및 규조토, 제올라이트, 송강약돌 등의 광물질을 시중에서 판매하는 것을 구입하여 제제에 사용하였다. 또한 진딧물에 대한 살충효과를 상승시키기 위해 담배잎 추출물을 보조제로 사용하였다.

(3)시제품 제제

시제품 제제는 액제와 수화제 형태로 제제 하였다. 액제의 경우 죽자초 추출물 분말의 특성상 물에 용해가 되지않아 죽자초 추출물 분말을 물에 녹여 액제로 제제하기가 곤란하여 죽자초 추출물을 농축한 겔 형태에 에탄올을 넣어 녹인 후 파라핀유, Tween-80, 라우릴 알콜, 차유추출물을 넣어 액제를 제조하였다. 수화제의 경우 친환경유기농자재의 유화제로 많이 사용되는 차유추출물 분말을 사용하였고, 증량제로 규조토, 제올라이트, 송강약돌 등 광물질분말을 100 메쉬 이상 되는 제품을 구입하여 제제에 사용하였다.

나. 연구결과

죽자초 추출물 분말과 담배잎 추출액 등을 이용하여 액제와 수화제 형태로 시제품을 제조하였다.

액제는 죽자초 추출과정 중의 농축액을 주원료로 사용하여 죽자초 추출물의 지표성분인 sanguinarine의 함량이 낮고 보조제로 친환경농자재에 사용가능한 에탄올 및 물을 사용하여 제제를 하였으나 제제의 안정성이 떨어지고 진딧물에 대한

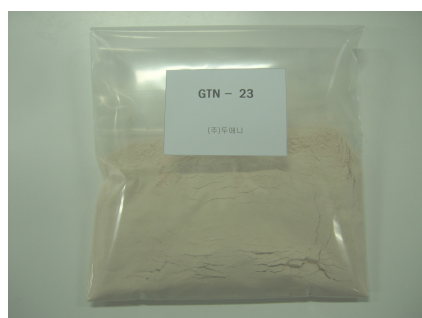
살충효과도 낮았다.

수화제는 죽자초 추출물 분말과 차유추출물 분말, 광물질, 담배추출물의 비율을 달리하여 20개의 시제품을 제조하였고, 제조된 20개 시제품의 물에 희석시 유화성 및 약제를 식물체에 살포시 전착성 그리고 진딧물에 대한 살충효과를 비교 시험한 결과, <표 17>의 시제품 조성비로 시제품을 제조하였다. 보조제로 차유추출물과 규조토를 사용하였는데 차유추출물은 동백나무씨앗추출물을 분말화 한 것으로 주성분은 Tea saponin으로 식품, 농약 등의 유화제로 많이 사용되고 규조토는 곤충의 표피에 달라붙어 물을 흡수하여 말라 죽게하며 날카로운 구조에 의해 상처등을 일으켜 곤충을 죽게 만드는 작용을 하여 농약의 보조제로 많이 사용된다.

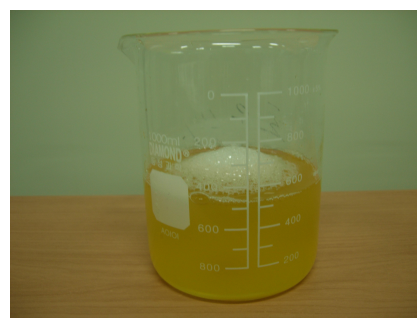
표 17. 시제품(GTN-23) 조성비

구성성분	성상	함유량(%)
죽자초추출물	주황색 분말	2.0
담배추출물	연갈색 액상	15.8
차유추출물	흰색 분말	22.2
규조토	흰색 분말	60.0
시제품(GTN-23)	연한 주황색 분말	100

제조한 시제품(GTN-23)을 물에 희석시 물리성을 시험해 보았다.



시제품(GTN-23) 수화제



시제품 희석액 (X1,000)

그림 26. 시제품 및 희석액

<그림 26>과 같이 시제품을 1,000배로 물에 희석시 옅은 주황색을 띄었으며 차유추출물에 의해 약간 거품이 일어났으며 유화 및 전착에는 전혀 문제가 없는 것으로 조사되었다.

국내에서 식물추출물을 사용하여 충해관리용자재로 친환경유기농자재 목록공시된 제품은 대부분 액제 형태이다. 본 연구를 통해 제조된 시제품은 수화제 형태로, 사용시 액제보다 분말이 날리고 물에 희석시 시간이 많이 소요된다는 불편한 점이 있다. 하지만 시제품의 제제 형태를 수화제로 한 것은 죽자초 추출물의 살충효과를 유지하기 위한 제제이다.

3. 시제품의 살충작용 특성 조사

가. 연구방법

(1) 농도별 약효시험

복숭아혹진딧물 실내 사육충을 페트리디쉬(직경 9.5 cm)에 넣고 시제품 희석액(10, 100, 500, 1,000 ppm)을 소형분무기로 분무하고 24시간, 48시간 후 복숭아혹진딧물의 사충수를 조사하였다.

(2) 진딧물 발육단계별 약효시험

시제품의 적정처리농도에서 진딧물의 발육단계에 따른 살충효과를 결정하기 위하여 진딧물의 약충 1~2령, 3~4령, 성충으로 3단계로 구분하여 시제품 1,000 ppm농도로 살충효과를 검정하였다.

(3) 약제발현속도시험

시제품을 진딧물에 처리한 후 얼마간의 시간이 지난 살충작용을 발현되는지를 확인하기 위하여 진딧물 성충에 시제품 1,000 ppm을 처리하고 6시간 단위로 살충수를 조사하였다.

(4) 독성작용시험

시제품의 살충작용이 접촉작용에 의해 발현되는지, 섭식작용에 의해 발현되는지를 확인하기 위하여 접촉작용시험은 진딧물에 약제를 직접 분무하고 기주식물을 넣어 주었고, 섭식작용시험은 기주식물을 약액에 30초간 침지하여 건조시킨 후 진딧물을 접종하고 살충수를 조사하였다.

(5) 잔효성 시험

- 대상해충 : 복숭아혹진딧물
- 시험작물 : 신선초
- 시험장소 : 강원도 원주시 신림면
- 대상해충의 발생상황 : 약제처리 전 무처리구의 평균밀도가 주당 50마리이상

- 처리내용 : 시제품 1,000배, 1,500배, 무처리 등 3개 처리구
- 경종개요 : 친환경(무농약) 재배방법에 따라 조성된 재배하우스에서 실시하였으며 시험기간 전후 시험포장에는 타살충제를 전혀 살포하지 않았고, 하우스(7*80m)의 면적은 560m² 2동을 사용
- 조사방법 : 약제처리 전 진딧물의 사전밀도를 조사하고 약제처리 후 시간경과에 따른 생충수를 조사

(6) 침투이행성 시험

(가) 뿌리에서 침투이행성 시험

담배를 포트에 4~5엽 정도 육묘한 유묘에 시제품을 1,000배 희석하여 약액 100ml을 식물체에는 묻지 않도록 토양에 관주처리하고 복숭아진딧물을 담배잎에 10마리씩 접종하고 사육케이스에 넣고 보관하면서 7일간 사충수를 조사하였다.

(나) 잎에서 침투이행성 시험

담배를 포트에 4~5엽 정도 육묘한 유묘에 시제품을 1,000배 희석하여 한쪽 잎에만 약제를 처리하여 호일로 덮고 약제가 처리되지 않은 잎에 복숭아진딧물을 10마리씩 접종하고 사육케이스에 넣고 보관하면서 7일간 사충수를 조사하였다.

나. 연구결과

(1) 농도별 약효시험

시제품 10, 100, 500, 1,000ppm 4개의 농도에서 진딧물에 대한 살충효과를 조사하였는데 그 결과는 다음과 같다.

표 18. 복숭아혹진딧물에 대한 GTN-23의 농도별 살충효과

처리농도(ppm)	처리전 개체수	살충율(%)
10	43	4.8
100	43	12.1
500	48	68.5
1,000	45	82.2

시제품 1,000ppm에서 82.2%의 높은 살충율을 보였으나, 500ppm, 100ppm, 10ppm에서는 각각 68.5%, 12.1%, 4.8%의 살충율을 보여 살충효과가 떨어지는 것으로 조사되었다. 따라서 이후 시험에서는 1,000ppm에서 모든 시험을 수행하였다.

(2) 진딧물 발육단계별 약효시험

시제품 1,000ppm에서 진딧물의 발육단계별 살충효과를 시험한 결과는 다음과 같다.

표 19. 복숭아혹진딧물 발육단계별 GTN-23의 살충효과

발육단계	처리전 개체수	살충율(%)
약충 1~2령	48	100
약충 3~4령	48	100
성충	47	91.1

약충에 대해서는 100% 살충효과를 보였으며 성충에 대해서도 91.1%의 살충효과가 나타났다. 따라서 시제품(GTN-23)은 1,000ppm에서 진딧물의 전 발육단계에 대해 살충효과가 있는 것으로 조사되었다.

(3) 약효발현속도시험

시제품의 약효가 약제처리 후 어느 정도의 시간이 지난 후 약효가 발현되는지를 시험하였다.

표 20. 복숭아혹진딧물에 대한 GTN-23의 시간별 살충효과

구분	약제처리 후 시간(hr)							
	6	12	18	24	30	36	42	48
살충율(%)	0	8.3	22.9	60.4	77.1	85.4	89.6	89.6

약제처리 24시간 후 살충율이 60.4%로 급격히 살충율이 상승하였고, 그 이후에는 완만하게 증가하는 것으로 조사되었다. 따라서 시제품의 살충작용은 24시간 후부터 발현되는 것을 알 수 있다.

(4) 독성시험

복숭아혹진딧물에 있어서 시제품이 어떠한 경로를 통해 살충활성을 나타내는지를 섭식독성과 접촉독성의 검정법으로 비교하였다.

표 21. 복숭아혹진딧물에 대한 GTN-23의 접촉독성과 섭식독성시험

처리방법	살충율(%)	
	24hr	48hr
접촉독성	82.2	91.1
섭식독성	47.9	84.4

접촉독성과 섭식독성에 의한 시간별 살충율을 비교하면 접촉독성 시험에서는 24시간 후 82.2%의 살충율을 보인 반면 섭식독성 시험에서는 24시간 후 47.9%의 살충율을 보여 접촉독성에 의한 약효발현속도가 빠른 것을 알 수 있다. 또한 살충작용에 있어서는 접촉독성이 약간 높은 살충효과를 보였지만 섭식독성과 크게 차이가 없는 것으로 조사되어 시제품은 접촉독성 및 섭식독성에 의해 모두 살충작용을 일으키는 것을 알 수 있다.

(5) 잔효성 시험

시제품의 약효지속기간을 시험한 결과는 다음과 같이 조사되었다.

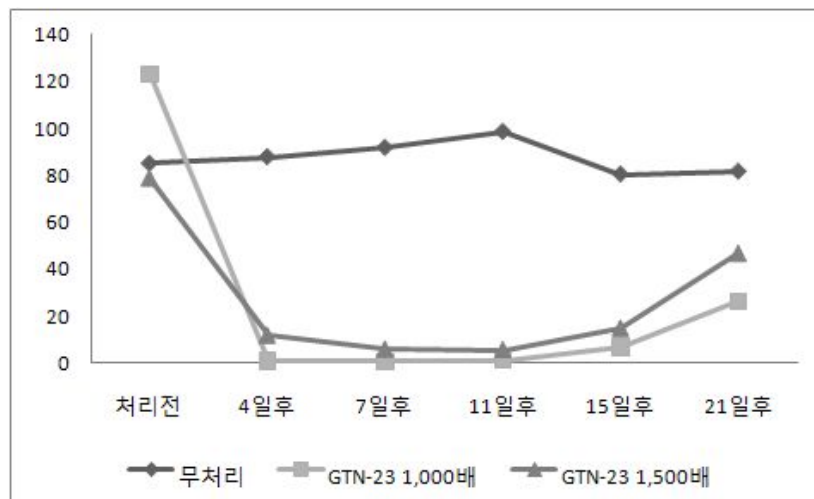


그림 27. 시제품의 잔효성 시험

무처리구는 시간 경과에 따라 진딧물의 밀도가 조금씩 증가하였지만 주당 진딧물의 밀도 변화는 크게 없었으나, 전체 밀도는 증가하는 것으로 조사되었다. 시제품 1,500배 처리구는 약제처리 4일후부터 진딧물의 밀도가 급격히 감소하여 진딧물에 대한 살충활성이 있는 것으로 조사되었고, 진딧물의 밀도가 약제처리 11일 후까지 밀도가 증가하지 않다가 약제처리 15일부터 점차 증가하는 것으로 나타났다. 시제품 1,000배 처리구에서도 진딧물의 밀도는 시제품 1,500배와 유사한 결과를 보였고, 살충효과에 있어서는 시제품 1,500배 처리구 보다 우수한 것으로 조사되었다.

따라서 본 연구는 동절기에 수행한 시험결과로 동절기의 시제품 약효 잔효 기간은 15일 정도 지속되는 것으로 판단된다. 따라서 동절기에 시제품을 사용하여 진딧물을 방제하고자 하는 농가에는 15일 간격으로 약제 살포하도록 방제프로그램을 작성하여야 할 것이다. 하지만 진딧물의 밀도 변화는 온도에 영향을 많이 받기 때문에 하절기에 시제품의 약효잔효기간에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

(6) 침투이행성 시험

표 22. 침투이행성 시험 결과

처리구	n	사충수			살충율(%)
		1일차	4일차	7일차	
뿌리	50	0	0	0	0
잎	50	0	0	0	0
무처리	50	0	0	0	0

시제품을 1,000배 희석하여 뿌리에 처리한 후 잎으로 침투이행시험을 한 결과, 진딧물에 대한 살충효과가 없는 것으로 조사되어 시제품은 뿌리에서 잎으로 침투이행성은 없는 것으로 나타났다.

시제품을 1,000배 희석하여 한쪽 잎에 처리한 후 처리하지 않은 잎으로 침투이행시험을 한 결과, 진딧물에 대한 살충효과가 없는 것으로 조사되어 시제품은 잎에서 잎으로 침투이행성은 없는 것으로 나타났다.

상기의 침투이행성 시험 결과를 볼 때 죽자초추출물의 살충성분으로 동정된 성분(8-hydroxydihydrochelerythrine, 8-methoxydihydrosanguinarine)이 작물체 내로 이동하지 못하는 것을 알 수 있다.

제 4 절 시제품의 해충 살충효과 검증

1. 시제품의 진딧물 살충효과 검증

가. 연구방법

(1) 시제품의 진딧물 방제효과 포트검정

죽자초 에탄올추출물을 이용하여 제조한 시제품의 진딧물 방제효과를 검정하였다. 대상해충으로 목화진딧물은 오이 유묘를 이용하였으며 복숭아혹진딧물은 고추 유묘를 이용하여 살충활성을 검정하였다.

진딧물 (*Aphid gossypii*)은 오이나 고추묘를 파종하고 본엽이 3~4매일 때 진딧물을 접종하여 하우스에서 증식시켜 시험에 사용하였다. 유묘검정법으로 시험하였으며 본엽이 4~6매 된 오이, 고추 포트에 진딧물을 접종하여 정착된 진딧물의 밀도를 사전조사한 후 triton-100 250ppm을 첨가한 추출물을 농도별로 엽면살포하고 3일과 7일 후에 생충율을 조사하였다. 3반복으로 처리하였다.

$$\text{방제가 (\%)} = [(\text{무처리구 생충율} - \text{처리구 생충율}) / \text{무처리구 생충율}] \times 100$$

(2) 시제품의 진딧물 방제효과 포장검정

진딧물 방제효과를 포장검정하기 위해 경기도농업기술원(화성내) 시설오이 재배하우스에서 시험하였으며 2010년 5월 6일 오이(한빛백침다다기)를 5월 6일 하우스에 40×150cm 간격으로 정식하였다. 시험구 배치는 난피법으로 하였다. 6월 11일에 자연발생한 진딧물 사전밀도를 조사한 후 시제품과 대조로 화학농약(칼립소)을 엽면살포후 3, 7일후 생충율, 방제가 및 약해를 조사하였다.

① 시험구 면적

구분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약효	2	3	6	15m ²	90m ²	108m ²
약해	2	3	6	3m ²	18m ²	

② 약제 살포 전후 기상상황

월/일	강우량(mm)	최고/최저기온(℃)	평균기온(℃)
6.11	-	31.4/18.3	24.8
6.12	41.7	20.6/18.3	19.2

③ 조사방법

구분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효	생충율	3	6.11, 6.14,	약제처리 전 및 처리 3, 7일후 생충수 조사 약제처리 전 및 처리 3, 7일후 기준량, 배량에서 외관상 약해유무 달관조사
약해	약해유무	3	6.18 "	

나. 연구결과

(1) 죽자초 시제품의 진딧물 방제효과 포트검정

죽자초 시제품의 진딧물 종류별 살충효과를 검정한 결과 오이 목화진딧물은 2000배에서도 93.3%의 방제효과가 있었으며, 1000배 살포시 98.7%의 높은 방제효과가 있었다(표 23).. 한편 고추에 발생한 복숭아혹진딧물에 대한 살충효과는 2000배 살포시 81.2%, 1000배 살포시 96% 방제효과가 있어 목화진딧물보다는 살충효과가 다소 낮은 경향을 보였지만 고삼추출물을 이용한 시판 친환경자재보다 살충효과가 높았다 (표 24).

천 등(2003)은 돼지감자 추출물이 같은 진딧물이라도 복숭아혹진딧물과 목화진딧물간의 활성이 다르며 식물추출물에 대한 살충활성이 목화진딧물이 더 높다고 보고하였는데 위 결과와 일치하였다.

표 23. 죽자초 시제품의 목화진딧물 살충효과

처리내용	희석배수	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
			생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
죽자초 시제품	×2000	78.3	5.9	98.6±2.0	87.1	93.3±5.4
"	×1000	70.0	0	100±0	16.9	98.7±0.3
시판친환경자재	×1000	247.0	0.5	99.9±0.1	12.0	99.1±0.3
대조(증류수)		142.7	407.8	-	1298.6	-

↓ 시판친환경자재 : 식물추출물(고삼)

표 24. 죽자초 시제품의 복숭아혹진딧물 살충효과

처리내용	희석배수	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
			생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
죽자초 시제품	×2000	363.0	20.1	89.0±16.9	67.0	81.2±31.3
"	×1000	338.0	4.7	97.4±2.6	14.2	96.0±4.6
시판친환경자재	×1000	370.0	9.8	94.7±1.8	44.4	87.6±6.4
대조(증류수)		394.0	183.5		356.5	

↓ 시판친환경자재 : 식물추출물(고삼)



살포전



살포후

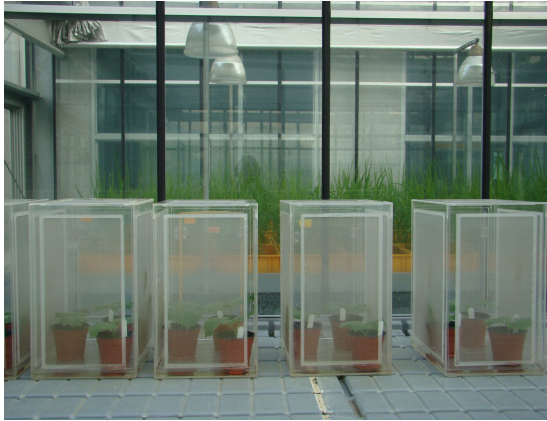
그림 28. 죽자초 시제품의 진딧물 살충효과

(2) 죽자초 시제품의 진딧물 방제효과 포장검정

죽자초 시제품을 1000배로 희석하여 경기도농업기술원(화성)내 오이 하우스 포장에서 진딧물 살충효과를 시험한 결과 3일후에는 87.6%, 7일후에는 98.0%의 방제효과가 나타났으며, 기준 농도의 배량(500배)를 살포하였을때도 약해가 전혀 발생하지 않았다. 이 시험의 결과를 농촌진흥청 친환경유기농자재 목록공시에 필요한 성적서로 제출하였다.

표 25. 죽자초 시제품의 목화진딧물에 대한 포장 방제효과

처리내용	희석 배수	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
			생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
죽자초 시제품	×1000	879.3	24.0	87.6±7.0	16.1 a	98.3±1.6
화학농약(칼립소)	×2000	312.7	0.5	99.7±0.2	1.8 a	99.8±0.2
대조(증류수)		552.0	193.3	-	942.3 b	



포트검정



포장검정 (화성)

그림 29. 오이 진딧물 살충효과 검정

2. 시제품의 진딧물 살충효과 농가실증

가. 연구방법

죽자초 시제품 “충스타” 수화제의 살충효과는 경기도내 친환경농가에서 수행되었다. 재배방법은 농가관행방법으로 재배하였고 화학농약을 전혀 살포하지 않았다. 이천시 호법면에 있는 매곡유기농업단지 고추재배포장에서 2011년 5월 2일에, 광주시 퇴촌면 정지리 친환경 오이재배농가에서 9월 16일 하우스에 자연적으로 진딧물이 발생하였을 때 각각 처리하였다. 처리방법은 3반복으로 하였으며 살포전 사전밀도를 조사하고 시제품을 1000배로 희석하여 엽면살포후 3, 7일후 생충율, 방제가 및 약해여부를 조사하였다.

나. 연구결과

이천에 있는 고추 재배하우스에서는 목화진딧물과 복숭아혹진딧물이 동시에 발생하였으며 죽자초 시제품의 진딧물 방제효과를 시험한 결과 3일후에 92.7%, 7일후에는 98.8%의 살충효과가 나타났다.

광주에 있는 오이 재배하우스에서는 목화진딧물만 발생하였으며 죽자초 시제품을 살포하였을 때 3일후에는 91%, 7일후에는 88.3%의 방제효과가 나타났다 (표 26, 표 27).

이와 같은 결과로 기존에 판매되고 있는 고삼, 님오일 등을 이용한 시판제품들과 유사하거나 높은 살충효과를 보였고 동일한 식물추출물을 사용할 경우 발생할 수 있는 저항성문제 또한 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

표 26. 죽자초 시제품의 고추 진딧물 방제효과 농가실증

처리내용	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
		생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
죽자초 시제품	222.7	8.2	92.7±4.8	2.4	98.8±1.2
타사제품 (고삼)	176.3	11.7	89.6±4.0	11.2	94.2±1.4
대조(증류수)	72.3	113.1	-	195.2	-

표 27. 죽자초 시제품의 오이 진딧물 방제효과 농가실증

처리내용	사전밀도 (마리/반복)	3일 후		7일 후	
		생충율(%)	방제가(%)	생충율(%)	방제가(%)
죽자초 시제품	396.7	15.2	91.0±0.7	48.2	88.3±4.5
대조(증류수)	279.3	169.0	-	412.6	-



고추 재배하우스 (이천)



오이 재배하우스 (광주)

그림 30. 진딧물 살충효과 농가실증포장

3. 시제품의 적용확대시험

가. 살충스펙트럼 조사

(1) 연구방법

죽자초 시제품을 다른 해충에 적용확대 가능성을 알아보기위해 등 6종의 해충에 대한 살충효과를 3반복으로 시험하였다.

(가) 점박이응애

엽절편법으로 검정하였고 강낭콩 잎을 ϕ 2cm로 잘라 물에 적신 탈지면이 놓인 페트리디쉬에 놓고 점박이응애 성충을 20마리씩 접종한 후 시제품 1000배액을 10초간 살포한 후 후드에서 4시간 건조시켰다. 사육실에서 보관하면서 24시간, 48시간 후에 살충율을 조사하였다. 생사판별은 해부현미경에서 붓끝으로 충체를 접촉하여 이동하지 못한 개체를 죽은 것으로 간주하였다.

$$\text{살비율} = [\text{사충수}/(\text{사충수}+\text{생충수})] \times 100$$

(나) 배추좀나방

엽절편법으로 검정하였다. 배춧잎을 ϕ 5cm로 잘라 물에 적신 여과지가 놓인 페트리디쉬에 놓고 배추좀나방 3령 유충을 15마리씩 접종한후 시제품을 10초간 살포하여 후드에서 4시간 건조시켰다. 처리후 사육실에서 보관하면서 24시간, 48시간후에 살충율을 조사하였다.

$$\text{살충율} (\%) = [\text{사충수}/(\text{사충수}+\text{생충수})] \times 100$$

(다) 배추흰나비

엽절편법으로 검정하였다. 배춧잎을 ϕ 5cm로 잘라 물에 적신 여과지가 놓인 페트리디쉬에 놓고 배추흰나비 유충을 15마리씩 접종한후 시제품을 10초간 살포하여 후드에서 4시간 건조시켰다. 처리후 사육실에서 보관하면서 24시간, 48시간후에 살충율을 조사하였다.

(라) 담배가루이

토마토 유묘에 담배가루이 성충을 접종하고 시제품을 분무살포후 24시간 48시간후 생충수를 조사하였다.

(마) 꽃매미

가죽나무 줄기에 꽃매미를 접종후 시제품을 1000배로 분무살포후 24, 48시간후 살충율을 조사하였다.

(바) 쌍점매미충

강원도 삼척 포도 재배농가에서 포도나무에 쌍점매미충의 발생 초기에 1000 배로 엽면처리후 3일, 7일후 조사하였다.

(2) 연구결과

죽자초 시제품을 배추좀나방, 배추흰나비, 점박이응애에 대해 엽절편법으로 생물검정한 결과 배추좀나방은 48시간후에 77.3%, 담배가루이는 66.6%의 살충효과가 있었고 배추흰나비와 점박이응애에는 살충효과가 낮은 편이었다 (표 28).

꽃매미를 대상으로 시제품의 살충효과를 검정한 결과 48시간후에 93.3%의 높은 살충효과가 나타났다. 한편 쌍점매미충에 대해 포도나무에서 시제품의 효과를 검정한 결과 73.1%의 방제효과가 나타났다 (표 29). 위의 결과로 죽자초 시제품은 추가적인 시험을 통해 진딧물 뿐만 아니라 꽃매미, 쌍점매미충에도 적용확대가 가능할 것으로 판단되었다.

표 28. 죽자초 시제품의 해충별 살충효과

대상해충	시험방법	희석배수	살충율(%)	
			24시간	48시간
배추좀나방	엽절편법	×2000	29.3±4.6	32.0±8.0
		×1000	77.3±4.6	77.3±4.6
배추흰나비	"	×2000	-	33.3±30.6
		×1000	6.7±11.6	20.0±20.0
점박이응애	"	×1000	24.7±14.2	31.4±7.9
		×2000	8.2±0	13.1±4.5
담배가루이	유묘검정법	×1000	21.4±4.8	66.6±13.0

표 29 . 죽자초시제품의 꽃매미 살충효과

처리	시험해충(마리)	살충율 (%)	
		24시간	48시간
죽자초시제품	28	78.3	93.3
무처리	30	0	6.7

표 30. 죽자초 시제품의 쌍점매미충 살충효과 포도 포장검정

처리내용	사전밀도	3일 후		7일 후	
		생충수	방제가(%)	생충수	방제가(%)
죽자초시제품	158	37	79.6	57	73.1
대조(증류수)	124	142	-	163	-

나. 죽자초 추출물과 기존 살충물질과의 비교

(1) 연구방법

죽자초 추출물과 기존에 이미 농업해충의 살충효과가 있다고 알려진 데리스, 제충국, 고삼추출물과 진딧물과 꽃매미의 살충효과를 비교하였다.

진딧물은 본엽이 4~6매 된 오이 포트에 진딧물을 접종하여 정착된 진딧물의 밀도를 사전조사한 후 추출물을 1000배로 엽면살포하고 3일과 7일 후에 생충율을 조사하였다. 3반복으로 처리하였으며 꽃매미는 가죽나무 줄기에 꽃매미를 접종후 추출물을 1000배로 분무살포후 24, 48시간 후 살충율을 조사하였다.

(2) 연구결과

죽자초추출물과 기존에 알려진 살충활성물질의 진딧물 방제효과를 비교한 결과 죽자초추출물과 데리스, 제충국추출물과 유사한 살충효과가 나타났다 (표 31). 친환경유기농자재의 원료로 가장 많이 쓰이는 고삼추출물보다 높은 살충효과가 나타나서 고삼추출물을 대체할 수 있을 것으로 기대한다.

표 31. 죽자초추출물과 살충활성추출물의 진딧물 방제효과 비교

처리내용	살충율(%)	
	24시간후	48시간후
죽자초추출물	93.3	96.7
데리스추출물	76.7	100.0
제충국추출물	90.9	97.0
고삼추출물	25.2	84.3

이전 시험의 결과와 같이 꽃매미 살충효과가 있었던 죽자초추출물을 기존 살충활성물질과 비교한 결과는 <표 32>와 같다. 데리스 등 다른 살충활성물질은 꽃매미 살충효과가 낮았던 반면 죽자초추출물은 48시간후 93.3%의 살충율을 나타내어 최근 피해가 증가하고 있는 꽃매미의 방제에도 활용이 가능할 것으로 판단된다. 차후 꽃매미에 대한 살충효과 검정과 농가실증을 시행할 계획이다.

표 32 . 죽자초추출물과 살충활성추출물의 꽃매미 살충효과 비교

처리내용	살충율(%)	
	24시간후	48시간후
죽자초추출물	78.3	93.3
데리스추출물	13.3	16.7
제충국추출물	9.8	12.8
고삼추출물	3.3	6.7

제 5절 시제품의 안전성 평가

1. 시제품의 독성 평가

가. 연구방법

농촌진흥청 고시 제2010-3호 환경생물 독성시험기준에 따라 경구독성, 경피독성, 어독성 평가를 한국화학융합연구소에 의뢰하여 수행하였다.

(1) 급성경구독성

식물추출물 시제품의 ICR 마우스에 대한 급성 경구 독성을 알아보기 위하여 수행 하였다. 기초 투여 용량인 2500 mg/kg B.W.로 암·수 각각 5마리에 투여한 결과 투여 후 사망여부를 조사하였다. LD50을 산정하기 위해 예비시험을 거쳐 최고 투여용량을 1500 mg/kg B.W.으로 설정한 다음 공비 1.2로 하여 1250, 1042, 868, 723 및 0 mg/kg B.W.로 그룹을 설정하여 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

(2) 급성경피독성

식물추출물 시제품의 SD 랫드에 대한 급성 경피투여 독성을 알아보기 위하여 시험물질을 2000 mg/kg B.W.로 암·수 각각에 단회 경피투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

(3) 어독성

식물추출물 시제품의 담수어류 (잉어)영향시험을 96시간 지수식으로 실시하여 농도당 노출어류 10마리에 대한 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였다.

나. 연구결과

(1) 급성경구독성

식물추출물 시제품의 ICR 마우스에 대해 기초 투여 용량인 2500 mg/kg B.W.로 암·수 각각 5마리에 투여한 결과 투여 후 4시간 이내에 투여군 동물이 전부 사망하였다. LD50을 산정하기 위해 예비시험을 거쳐 최고 투여용량을 1500 mg/kg B.W.으로 설정한 다음 공비 1.2로 하여 1250, 1042, 868, 723 및 0 mg/kg B.W.로 그룹을 설정하여 본 시험을 실시하여 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 본 시험 결과 1500 mg/kg B.W.군에서 8마리, 1250 mg/kg B.W.군에서 6마리, 1042 mg/kg B.W.군에서 4마리, 686 mg/kg B.W.군에서 4마리 사망하였다.

(나) 시험물질과 연관된 일반증상 투여후 1시간부터 4시간 까지 암/수 모두 유루(Lacrimation)및 경련(Convulsion)이 관찰 되었으나 48시간 이후 모두 회복 되는 경향을 보였다.

(다) 생존동물에 대한 체중측정 결과 대조군과 시험군 (투여군)간 체중 증체량의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.
모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견을 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 마우스에 대한 식물추출물 시제품의 경구 투여에 대한 LD50 값은 1112.474 mg/kg B.W. (95% 신뢰구간; 956.667 ~ 1293.655mg/kg B.W.)로 산출되었다.

(2) 급성경피독성

식물추출물 시제품의 SD 랫드에 대한 급성 경피투여 독성을 알아보기 위하여 시험물질을 2000 mg/kg B.W.로 암·수 각각에 단회 경피투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(가) 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

(나) 시험물질과 연관된 일반증상 투여 후 1시간부터 4시간 까지 암/수 모두 유루(Lacrimation)및 경련(Convulsion)이 관찰 되었으나 48시간 이후 모두 회복 되는 경향을 보였다.

(다) 생존동물에 대한 체중측정 결과 대조군과 시험군 (투여군)간 체중 증체

량의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

(라) 모든 생종동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견을 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드를 이용한 식물추출물 시제품의 경피 투여에 대한 LD50은 2000mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

(3) 어독성

시험기간중 치사가 일어나지 않는 최대 농도는 1.71 mg/L이었다. 시험기간중 100% 치사가 일어나는 최소농도는 10 mg/L이었다. 처리구에서 일반중독증상으로 평형상실개체 및 수조상단에서 유평하는 개체가 관찰되었다. 전장은 평균 (3.89±0.21)cm, 체중은 평균(0.87±0.14 g)이었다. pH는 평균 7.27(6.91~8.10)이었고 DO는 평균 5.96 mg/L (4.09 mg/L~8.09 mg/L)이었다. 시험기간의 평균수온은 (23.8~0.2)℃ (23.4~24.0℃)이었다. 이상의 시험결과 48시간-LD50 값은 4.908mg/L으로 어독성 III급으로 확인되었다.

표 33. 죽자초 추출물 시제품의 어독성 시험결과

Observation time	LD ₅₀ (mg/L)	95% confidence limits(mg/L)	NOEC ^z (mg/L)
48h	4.908	3.847~6.274	1.71
96h	4.908	3.847~6.274	1.71

^zNo observed effect concentration

친환경유기농자재 목록공시에 필요한 경구, 경피, 어독성 평가결과를 종합해보면 <표 33>과 같다. 어독성은 III급으로 확인되었으며 급성경구, 급성경피 독성은 반수치사량이 각각 1111.5, 2000 mg/kg으로 모두 친환경유기농자재 등록기준인 200 mg/kg 이상으로 안전성을 확보하였다 (표 34).

표 34. 시제품의 독성평가 결과

독 성	시험동물	시험결과 (LD ₅₀)
어 독 성	잉 어	LD ₅₀ =4.908mg/L
급성경구독성	마우스	LD ₅₀ = 1111.5mg/kg
급성경피독성	랫 트	LD ₅₀ = 2000mg/kg

※ 친환경유기농자재기준 : 급성경구, 경피 독성 200mg/kg 이상

2. 시제품의 환경안전성 평가

가. 연구방법

(1) 잔류농약 분석 : 177성분 분석

(가) 시료전처리

죽자초 시제품 시료 50 g 을 polyethylene bottle에 칭량하고 ACN 100 ml를 가하고 균질기에서 5,000 rpm으로 3분간 마쇄 추출하였다. NaCl 20~30 g을 추가 한 후 shaker에서 30분간 진탕 후 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액 10ml를 취한 후 감압 농축 후 acetone/*n*-hexane(2/8, v/v) 1 ml로 재용해해서 SPE cartridge(Florisil, 1 g)에 *n*-hexane 5 ml, acetone/*n*-hexane (2/8) 5 ml로 순차적으로 conditioning 후 시료액 1 ml를 loading하고 acetone/*n*-hexane(2/8) 6 ml로 용출하여 미세농축 후 acetone 1 ml에 재용해하여 GC를 이용하여 분석하였다. 다시 상등액 10 ml를 취한 후 감압 농축 후 methylenechloride 2 ml로 재용해하여 SPE cartridge(Amino-propyl, 1 g)에 methylenechloride 5 ml로 conditioning, 시료액 loading후, 5% methanol 함유 methylenechloride 6 ml로 용출하여 농축 후 acetonitrile 1 ml에 재용해하여 HPLC분석(UVD, FLD)하였다.

(나) 기기조건

① GC

Detector	ECD	NPD
GC	Agilent 5890	
Column	DB-5, DB-17 (30 m × 0.25 mm(i.d), 0.25 μm)	
Inlet	Temperature : 260℃ 1 μl split ratio 50 : 1	Temperature : 260℃ 1 μl splitless
Detector	Temperature : 320℃ Make up(N2) : 60 ml/min	Temperature : 320℃ H ₂ : 3.0ml/min , Air : 60 ml/min Make up(N2) : 10 ml/min
Oven	80℃(2min hold) → 10℃/min → 200℃ → 2℃/min → 220℃(4min hold) → 10℃/min → 300℃(4min hold)	

② HPLC

Detector	UV	FL		
HPLC	Waters Alliance			
Column	Phenomenex Gemini NX (15cm, particle size 3 μ m, C18)			
Injector	Injection volumn : 10 μ l			
Detector	Wavelength : 254, 230 nm(UV-311 칩)	Excitation : 330 nm, Emission : 446 nm		
Mobile Phase	Time	Water	ACN	유속(mL/min)
	0	70	30	0.8
	5	70	30	0.8
	20	30	70	0.8
	25	30	70	0.8
	26	90	10	1.0
	30	90	10	1.0
	35	100	0	1.0

(다) 기기조건별 분석성분

분 류	성 분 명	비 고
GC 1 (21)	Anilofos, Chlorfluazuron, Cyhalothrin (lambda), Deltamethrin, Dicofol, Dieldrin, Dimethenamid, Disulfoton, Etrimfos, Fenpropathrin, Fenvalerate, Flutolanil, Folpet, Halfenprox, Lufenuron, Methyl-pentachlorophenyl sulfide, Paclobutrazole, Penconazole, Permethrin, Triflumuron, Trifluralin	ECD
GC 2 (19)	Azoxystrobin, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Difenoconazole, Endosulfan(alpha, sulfate), Flucythrinate, Heptachlor epoxide, Indanofan, Oxadiazon, Probenazole, Prochloraz, Procymidone, Simeconazole, Tefluthrin, Tetraconazole, Tetradifon, Thifluzamid, Zoxamide	ECD
GC 3 (20)	Acrinathrin, Bromobutide, Butachlor, Cyfluthrin, Dichlofluanid, Dithiopyr, Fenamidone, Fenoxanil, Fipronil, Fthalide, Indoxacarb, Iprodione, Isoprothiolane, Kresoxim-methyl, Mefenacet, Nuarimol, Pentachloroaniline, Piperophos, Pyridalyl, Tolyfluanid	ECD
GC 4 (14)	Alachlor, Chlorothalonil, Cypermethrin, Endosulfan beta, Etridiazole, Fenarimol, Flufenoxuron, Ofurace, Propanil, Pyridaben, Pyrimidifen, Tralomethrin, Triadimefon, Vinclozolin	ECD
GC 5 (16)	Cyproconazole, Dichlorvos, Edifenphos, Etoxazole, Furathiocarb, Hexaconazole, Iprobenfos, Malathion, Metalaxyl, Methabenzthiazuron, Myclobutanil, Parathion, Pendimethalin, Pyraclofos, Terbutylazine, Triflumizole	NPD
GC 6 (16)	Azinphos-methyl, Bitertanol, Buprofezin, Cadusafos, Diniconazole, Diphenamid, Fenitrothion, Iprovalicarb, Methidathion, Molinate, Phosphamidone, Prothiofos, Pyriminobac-methyl(E), Tebufenpyrad, Terbufos, Thiazopyr	NPD
GC 7 (15)	Chlorpyrifos-methyl, Diazinon, Dimepiperate, Fenbuconazole, Fenothiocarb, Fenthion, Flusilazole, Fosthiazate, Metconazole, Phorate, Phosalone, Pirimiphos-methyl, Profenofos, Pyriminobac-methyl(Z), Tebuconazole	NPD
GC 8 (15)	Chlorpyrifos, Cyprodinil, Dimethoate, EPN, Esprocarb, Ethoprophos, Fenazaquin, Fludioxonil, Mepronil, Napropamide, Phenthoate, Pyrazophos, Tebupirimfos, Tolclofos-methyl, Triazophos	NPD
LC 1 (16)	Chromafenozide, Clothianidin, Cyhalofop-butyl, Dimethomorph(E,Z), Dimethylvinphos(Z), Ferimzone, Flumioxazine, Mepanipyrim, Metamifop, Pirimicarb, Pyributicarb, Pyriproxyfen, Quinoclamine, Tebufenozide, Thiacloprid, Trifloxystrobin	UV
LC 2 (17)	Acetamiprid, Boscalid, Cyazofamid, Cymoxanil, Diethofencarb, Diflubenzuron, Fenpyroximate, Fluacrypyrim, Forchlorfenuron, Imibenconazole, Imidacloprid, Pentoxazone, Pyraclostrobin, Pyribenzoxim, Pyrimethanil, Pyroquilon, Teflubenzuron	UV
LC 3 (3)	Carbendazim, Pencycuron, Tricyclazole	UV
LC 4 (5)	Carbaryl, Carbofuran, Fluquinconazole, Isoproc carb, Methiocarb, Thiamethoxam, Thiodicarb	FLD
LC 5 (7)	Aldicarb, Ethiofencarb, Fenobucarb, methomyl, oxamyl	FLD

(2) 중금속 분석

(가) 시료전처리

죽자초 시제품 1 g을 마이크로웨이브 셀에 담고 증류수 1 ml를 넣어 시료를 적신후 HNO₃ 12 ml를 넣은 다음 12시간 흡후드에 둔 후 마이크로웨이브 (Q WAVE 2000(테크톤))으로 분해하였다. 분해과정은 저온부터 175℃에 이르기까지 약 3시간 분해한 후 방냉한 다음 No5B여과지로 여과 후 초순수수 100 ml로 mess up하였다. As는 하이드라이를 이용하여 여액을 기화시켜 ICP로 분석하였다.

(나) 기기 중금속은 ICP INTEGRA×L DUAL (GBC)로 분석하였으며 수은은 수은전용분석기(AMA 254) Leco Mercury Analyzer로 분석하였다.

나. 연구결과

(1) 잔류농약분석결과

죽자초 추출물 시제품에 대하여 177종의 잔류농약성분을 분석한 결과 기준치를 초과하는 농약성분은 검출되지 않았음

(2) 중금속 분석결과

죽자초 추출물 시제품의 중금속 함량을 분석한 결과는 <표 35>와 같으며 토양의 기준으로 비교했을때 기준 이하였으므로 문제는 되지 않았으며 미량 검출된 것은 제제화에 필요한 규조토(60%)가 함유되었기 때문으로 추정된다.

표 35. 죽자초 시제품의 중금속 함량 분석결과 (mg/kg)

분석성분	Zn	Cu	Pb	Cd	As	Cr	Ni	Hg
검출량	9.94	5.99	0.91	0.09	0.44	2.38	2.38	0.51
토양기준 ^z	300	150	200	4	25	5	100	4

^z토양환경보전법 시행규칙 토양오염우려기준

제 6절 시제품의 산업화 연구

1. 원료 확보 방안 수립

본 연구과정에서 개발된 시제품을 제품화하여 실용화하기 위해서는 죽자초의

안정적인 확보가 중요하므로 죽자초에 대한 재배특성을 조사하고 씨앗을 확보하여 재배를 시도하였고, 해외재배단지를 조사하여 죽자초를 대량 확보할 수 있는 방안을 수립하고자 하였다.

가. 죽자초에 대한 재배특성 조사

죽자초(*Macleaya cordata*)는 양귀비과(Papaveraceae)의 식물로 키가 1~2m 정도로 곧게 자라는 여러해살이풀로서 들판이나 산비탈에서 자란다. 줄기는 속이 비어있는 것이 마치 대나무와 같다고 해서 “죽사초”라는 이름으로도 부르며, 열매는 가을이 되면 작은 물고기 모양의 열매가 달린다. 열매 속에는 여러 개의 종자가 들어 있으며 바람이 불 때 사각사각 소리를 낸다. 죽자초는 줄기를 자르면 유독성 노란즙이 나오며, 맛은 쓰고 성질은 따뜻하고 독성이 있다. 이 즙으로 곰팡이의 일종인 백선균 등을 치료하고, 잎에서 나는 즙을 환부에 바르면 피부병이나 욕 등을 나게 하고, 또한 몸의 부기를 가라앉히거나 해독하고 기생충을 구제하는 약제로 사용한다.

죽자초의 주요 분포지역은 아시아이며 특히, 중국과 일본에 서식하며 배수가 잘되는 토양에서 자란다. 햇볕이 잘 드는 곳을 선호하지만 그늘에서도 자라며 내한성도 강하다.

현재 죽자초의 재배특성에 대한 자료는 거의 없으며 지금까지 수집한 자료를 바탕으로 재배방법을 서술하면 다음과 같다. 일반적으로 씨앗은 가을에 수확하여 즉시 파종을 하는 것이 좋으며 저장된 종자는 이른 봄에 파종해야 한다. 온실에서 포트에 모종을 키운 후 늦은 봄이나 초여름에 노지에 정식한다. 늦은 봄에는 지체부를 잘라주고, 그 후 새순이 지상 8~10cm정도 자라면 수확하여 포트에서 키우다가 뿌리가 잘 자라면 여름에 노지에 정식하여 재배한다. 그리고 여름에는 큰 잎을 잘라주고 겨울에는 뿌리를 잘라주어야 한다.

상기의 재배방법을 토대로 국내에서 죽자초 재배를 시도하였다. 종자는 중국에서 구입하여 온실에서 포트에 파종하여 재배하였으나, 발아가 되지않아 죽자초 재배는 성공하지 못했다.

나. 죽자초 확보 방안 수립

국내에 죽자초가 자생하지만 대량으로 분포 또는 재배하는 곳이 없고, 본 연구 과정을 통해 재배하고자 시도하였지만 실패하였다. 죽자초를 확보하기 위해 해외에서의 죽자초 분포 및 사용실태를 조사하여 자료를 수집하였다. 죽자초는 한약제

및 사료첨가제로 많이 사용되고 있었고, 주로 생산하는 곳은 중국이었다. 중국은 죽자초 추출물에 대한 한약제와 사료첨가제 및 살충제로도 오래 전부터 연구가 되어 있었고, 현재에도 죽자초 추출물을 이용하여 한약제 및 사료첨가제를 생산하는 회사가 있어 중국의 몇몇 제조업체를 방문하였다. 중국에서는 죽자초가 산시성, 간쑤성, 쓰촨성, 허베이성에 분포하고 있으며 이곳에서 채집한 원료를 가지고 한약제 원료 및 사료첨가제 원료로 사용하기 위해 죽자초를 추출하고 있었다.

향후 죽자초 원료 확보를 위하여 방문한 중국 업체 중 죽자초 추출물을 가지고 한약제 원료 및 사료첨가제를 생산하는 중국 호난성에 있는 제조업체와 공급계약을 맺고 죽자초를 공급받기로 하였고, 추출공정에 대한 기술 자문도 받기로 하였다.

2. 대량생산에 필요한 추출방법 및 생산공정 확립

본 연구과정에서 개발된 죽자초 추출물을 이용한 시제품의 실용화를 위한 죽자초 추출물의 대량생산공정을 수립하고자 500 L 추출조에서 생산공정을 수립한 후 1,500 L의 대량추출조에서 추출을 수행하여 대량생산공정을 확립하고자 한다.

가. 연구방법

다음과 같은 식물추출공정으로 죽자초추출물을 제조하였다.



그림 31. 식물 추출 공정

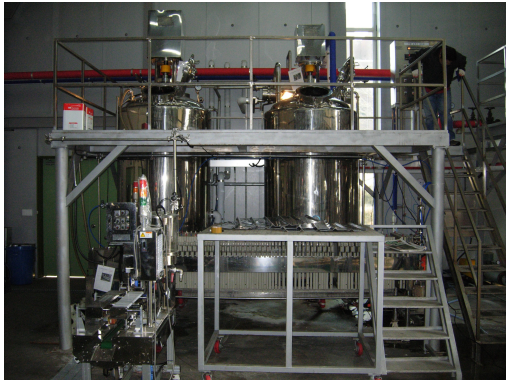


그림 32. 추출조, 농축조



그림 33. 분무건조기

(1) 500L 추출조

(가) 죽자초와 에탄올 비율 조건 중국에서 수입한 건조, 분쇄된 죽자초를 부직포 망에 넣고 추출조에 넣은 다음 죽자초와 에탄올의 비율을 2.5:97.5, 5:95, 10:90(중량)로 100kg 넣고, 추출조의 온도를 45℃로 올린 후 24시간 동안 진탕한 후 농축기로 이송하여 온도를 60℃까지 천천히 올리면서 brix 4%까지 농축하였다. 농축액에 물과 텍스트린을 첨가하여 brix를 20%로 조정한 후 분무건조기의 조건을 온도 180℃, 회전속도 20,000rpm/min하여 죽자초 추출물을 제조하여 수율을 비교하였다.

(나) 추출시간 조건

중국에서 수입한 건조, 분쇄된 죽자초를 부직포 망에 넣고 추출조에 넣은 다음 죽자초와 에탄올의 비율을 10:90(중량)로 100 kg 넣고, 추출조의 온도를 45℃로 올린 후 추출시간을 12시간, 24시간, 48시간으로 구분하여 추출한 후 농축기로 이송하여 온도를 60℃까지 천천히 올리면서 brix 4%까지 농축하였다. 농축액에 물과 텍스트린을 첨가하여 brix를 20%로 조정한 후 분무건조기의 조건을 온도 180℃, 회전속도 20,000 rpm/min하여 죽자초 추출물을 제조하여 수율을 비교하였다.

(다) 추출용매 조건

추출 용매를 물, 60% 에탄올, 100% 에탄올로 구분하여 중국에서 수입한 건조, 분쇄된 죽자초와 10:90(중량)로 100 kg 넣고, 추출조의 온도를 45℃로 올린 후 추출시간을 12시간, 24시간, 48시간으로 구분하여 추출한 후 농축기로 이송하여 온도를 60℃까지 천천히 올리면서 brix 4%까지 농축하였다. 농축액에 물과 텍스트린을 첨가하여 brix를 20%로 조정한 후 분무건조기의 조건을 온도 180℃, 회전속도 20,000 rpm/min하여 죽자초 추출물을 제조하여 수율을 비교하

였다.

(2) 1,500L 추출조

죽자초추출물의 대량생산공정을 확립하고자 500 L 추출조에서 비교 시험한 결과를 바탕으로 경제성을 고려하여 추출공정을 수립하였다. 장비는 건국대학교 충주캠퍼스 바이오식의약연구센터에 설치된 것을 임대하여 추출하였다. 추출조, 농축조, 분무건조기는 서강엔지니어링(주)에서 제작한 것을 사용하였다.

추출방법은 부직포에 넣은 죽자초를 추출조에 100 kg 넣고, 추출용매(물 또는 60% 에탄올)를 1,000 L 넣은 다음 추출온도를 60℃로 올리고 4시간 동안 순환 펌프를 가동한 후 15시간 진탕하였다. 추출조에서 추출한 액을 농축조로 이동하여 온도 38~65℃의 진공상태에서 8시간 농축하였다. 겔형태의 농축액에 물과 차유추출물을 넣어 Brix를 10%로 조정하고 분무건조기의 조건을 입력온도 180℃, 출구온도 80℃, Atomizer 회전속도 12,000rpm/min으로 분무건조하여 죽자초 추출물 분말을 제조하였다.

나. 연구결과

(1) 500 L 추출조

(가) 죽자초와 에탄올 비율 조건

표 36. 죽자초와 에탄올 비율 조건에 따른 수율 비교

죽자초 : 에탄올	추출물 량(g)	수율(%)*
2.5 : 97.5	143	5.72
5 : 95	258	5.16
10 : 90	612	6.12

* 수율 = 추출물 양 / 죽자초 투입량 × 100

죽자초와 에탄올의 비율에 따른 추출물의 수율을 조사한 결과 죽자초와 에탄올의 비율이 10:90에서 수율이 6.12%가장 수율이 높은 것으로 나타났다.

(나) 추출시간 조건

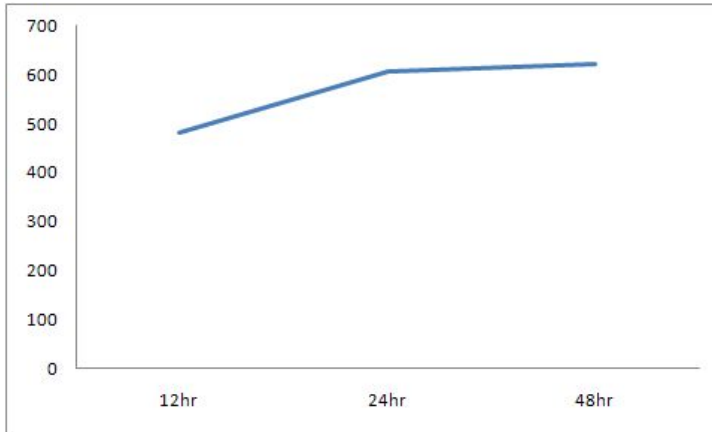


그림 34. 추출시간 조건에 따른 수율 비교

에탄올 추출시간에 따른 추출물의 수율을 조사한 결과 추출 24시간까지는 수율이 증가하다가 48시간에는 24시간과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

(다) 추출용매 조건

표 37. 추출용매 조건에 따른 수율 비교

추출용매	추출물 량(g)	수율(%)*
물	854	8.54
60% 에탄올	688	6.88
에탄올	612	6.12

추출용매에 따른 죽자초추출물의 수율을 비교한 결과 추출용매로 물, 60% 에탄올, 에탄올을 사용하여 추출한 죽자초추출물의 수율은 8.54%, 6.88%, 6.12%로 물을 사용하여 추출한 것이 수율이 가장 높았다.

(2) 1,500 L 추출조

(가) 60% 에탄올 추출

추출기에서 추출된 추출물의 Brix는 16% 였고, 농축기를 통해 농축된 액 180 L에 차유추출물 10 kg을 투입, 혼합하여 Brix를 10%로 조정하였고 이를 분무건조기로 건조한 죽자초 추출물은 16.1 kg을 얻었다. 죽자초 추출물은 진한 황색이었으며 분말도는 300 mesh 이상이였다.

(나) 열수추출

추출기에서 추출된 추출물의 Brix는 2% 였고, 농축기를 통해 농축된 액 180

L에 차유추출물 5 kg을 투입, 혼합하여 Brix를 10%로 조정하였고 이를 분무건조기로 건조한 죽자초 추출물은 17 kg을 얻었다. 죽자초추출물은 연한 황색이 있으며 분말도는 300 mesh 이상이였다.

1,500 L 추출조에서 추출용매를 물과 60% 에탄올로 구분하여 추출한 결과 물로 추출한 죽자초 추출물의 수율이 12%로 60% 에탄올을 사용하여 추출한 죽자초 추출물의 수율 6.1%보다 2배 정도 높게 나왔다.

표 38. 생산비용

내역	사용량	단가	금액
죽자초	100kg	15,000원	1,500,000원
추출기 임대	2일	270,000원	540,000원
농축조 임대	1일	360,000원	360,000원
분무건조기 임대	1일	570,000원	570,000원
인건비	2일	100,000원	200,000원
합계			3,170,000원

1,500 L 추출조에서 추출용매로 물을 사용한 생산공정으로 죽자초 추출물의 제조비용을 분석해 본 결과 죽자초 추출물 12 kg 제조하는데 총 3,170,000원 소요되었으며 죽자초 추출물 1 kg으로 환산하면 264,000원으로 비싼 것으로 나타났다.

본 연구과제의 산업화를 위해서는 죽자초 추출물의 대량생산이 필요하며 이를 위한 죽자초 추출물의 대량생산공정을 1,500 L 추출조에서의 추출공정을 확립하였다. 그러나 죽자초 추출물의 생산비용이 많이 소요되어 산업화시 경제성이 떨어질 것으로 예상되며 이를 해결하기 위해 지속적인 연구 및 해결 방안을 모색하여 과제종료 후 1년 이내 산업화를 할 계획이다.

2. 친환경유기농자재 목록공시

본 연구 과제를 통해 개발된 죽자초 추출물을 제품화하여 산업화하기 위해서는 농약관리법에 따른 생화학농약으로 등록하거나 친환경육성법에 따라 친환경유기농자재 총해관리용자재로 목록공시하는 방법이 있다. 생화학농약으로 등록하기 위해서는 본 연구 과제를 통한 연구결과로는 부족하고 추가적인 연구가 수행되어야 한다. 따라서 친환경유기농자재로 목록공시하여 제품화하고자 2010년 12월 농촌진흥청 농자재관리과에 죽자초 추출물을 주성분으로 하는 “총스타”라는 제품명으로 신청서를 제출하였고 농촌진흥청의 보완요구에 따라 주성분을 죽자초 추출물과 차추출물로 하는 친환경유기농자재 총해관리용자재로 2011년 4월 14일 목록공시

되었다. “충스타”의 목록등록번호는 11-유기-5-307이며 공시기간은 2년으로 2013년 4월 13일까지 농촌진흥청 홈페이지 농자재정보에 공시된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	양귀비과 식물유래 진딧물 방제 활성 소재 표준화 연구	식물체유래 활성 추출물 제조	100	- 이차대사산물 용매 추출물 제조 - 추출물로부터 용매 계통 분획물 제조
		식물체로부터 지표성분의 분리 정제	100	- 용매 분획물 제조 - Column chromatography를 이용한 활성물질 10종 분리 정제
		활성물질의 구조 동정	100	- NMR, MS, IR 데이터 분석을 통하여 4종 성분 구조 동정 - 문헌과 비교하여 구조 확인
	식물추출물의 진딧물 살충효과 검정 및 이용기술 개발	분획물 및 활성물질 살충효과 검정	100	- 용매 계통분획물의 진딧물 살충 활성 검정 - 분리한 소분획의 진딧물 살충 활성 검정 - 활성물질의 살충효과 검정
		기존 살충물질과 살충활성 비교평가	90	- 고삼, 님오일 등 기존물질 및 시제품의 살충효과 검정
	친환경 해충방제제 개발	제형화를 위한 시제품 개발	100	- 수화제 형태의 시제품제조
		살충작용기작구명	80	- 시제품의 진딧물발육단계별, 독성작용, 발현속도에 대한 살충작용특성 구명

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	양귀비과 식물유래 진딧물 방제 활성 소재 표준화 연구	현호색으로부터 진딧물 살충성분의 분리	100	- 용매 분획물 제조 - Column chromatography를 이용한 활성물질 6종 분리 정제
		진딧물 살충 성분의 구조동정	100	- NMR, MS, IR 데이터분석을 통하여 4종 성분 구조 동정 - 문헌과 비교하여 구조 확인
		HPLC를 이용한 지표성분의 분석	100	- HPLC를 이용하여 활성 지표성분의 정량분석법 확립 - 분획물 중 지표성분함량분석
	식물추출물의 진딧물 살충효과 검정 및 이용기술 개발	활성물질의 진딧물 살충효과 검정	95	- 대상해충 : 목화진딧물, 복숭아혹진딧물, 조팝나무진딧물 등 - 분리한 물질 및 추출물의 진딧물 살충효과 검정
		시제품의 방제효과 포장검정	100	- 시설하우스내 시제품 살포 후 진딧물 방제효과 및 약 해 검정
		시제품의 안전성 평가	100	- 급성경구, 경피, 어독성평가 - 잔류농약 분석 : LC, GC를 이용한 농약분석 - 중금속 유해성분 분석
	친환경 해충방제제 개발	살충기작 구명	90	- 시제품의 약효지속기간 구명을 위한 잔효성 연구 - 시제품의 작물체로 이동을 구명하기 위한 침투이행성 연구
		산업화를 위한 원료확보방안 수립	100	- 죽자초 식물의 재배특성조사 - 원료확보방안 수립
		대량생산 방안 수립	70	- 500L 추출조에서 생산공정 연구 - 1,500L 추출조에서 생산공정 연구

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2011)	양귀비과 식물유래 진딧물 방제 활성 소재 표준화 연구	지표성분 분석법 확립	100	- HPLC를 통한 분석법 validation 확립
		진딧물 방제 활성 제품의 표준화 연구	100	- HPLC 및 LC/MS를 통한 지표성분 분석 - 시제품으로 개발된 방제 수화제 제품에 대한 표준화 연구
		시제품에 대한 안정성 검정	100	- HPLC 및 LC/MS를 이용한 분석법 확립 - 포장, 살포 후 분해양상을 HPLC를 이용하여 분석
	식물추출물의 진딧물 살충효과 검정 및 이용기술 개발	시제품의 진딧물 방제효과 농가 실증시험	100	- 대상농가 : 경기도내 친환경 채소재배농가 - 처리내용 : 죽자초추출물 시제품, 무처리 - 조사항목 : 방제가, 약해
		적용확대를 위한 살충스펙트럼 조사	100	- 시험재료 : 죽자초추출물 시제품 - 대상해충 : 배추좀나방, 점박이응애, 담배가루이 등 - 조사항목 : 살충효과, 약해
	친환경해충방 제제 개발	살충활성검정 및 살충기작 구명	100	- 잔효성 시험
		대량생산공정확립	90	- 1,500L 추출조에서 죽자초의 추출공정 확립
		유통보관성 향상시험	100	- 대량추출공정에서 분무건조 과정에서 죽자초 추출물의 안전성 향상을 위한 부제 선발 - 보관기간 설정
		친환경유기농자재 등록	100	- 친환경유기농자재 목록공시 등재하여 기술이전 받음

제 2절 기술발전 기여도

본 연구과제는 친환경농업을 확대 실현하기 위해 천연 살충제로 사용되고 있는 식물추출물이 아닌 새로운 살충활성을 가진 죽자초 식물을 이용하여 진딧물 살충활성물질을 분리, 구조를 구명하였고 살충기작을 밝혀내었다. 죽자초 추출물을 제형화하여 진딧물의 높은 살충효과를 검증하였으며 농가에서 방제효과를 적용 가능성을 확인하였다. 산업화를 위해서 시제품의 대량생산공정 및 생산기반을 확립하고 시제품의 독성평가 등 안전성을 평가한 후 친환경유기농자재에 목록공시하였다.

개발한 천연살충제는 친환경 농산물 재배농가에서 기존에 사용하고 있는 식물추출물 제품에 비해 진딧물의 살충력이 우수하고 약효의 지속기간도 길어 방제비용을 절감시킬 뿐만 아니라 천연해충방제제를 이용함으로써 안전한 친환경농산물 생산으로 농가의 소득증대에 크게 기여할 것으로 기대한다. 또한 기존에 알려진 살충물질과 유사한 진딧물 살충효과를 보이면서 다른 살충물질과는 달리 꽃매미에도 살충효과를 보여 기존 동일 대상 방제제와 경제적, 효과적 측면에서 차별성이 있는 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발성과

1. 산업재산권 출원

가. 특허출원 : 2건

- 백남인, 백미영, 박희정, 이지영, 소호섭, 한영희, 이현주, 김성기, 문선주, 윤태호, 정장희 ‘죽자초에서 분리한 살충조성물, 상기 살충조성물을 함유한 해충 방제제 및 이를 이용한 방제방법’

출원번호 : 10-2010-0082145

출원일 : 2010.08.24

등록번호 : 1011583640000

등록일 : 2012.06.14

- 백남인, 박희정, 백미영, 이지영, 문선주 ‘현호색 추출물로부터 분획된 현호색 분획물로부터 분리된 알칼로이드 화합물을 포함하는 살충 조성물’

출원번호 : 10-2011-0101272

출원일 : 2011. 10. 05

2. 학술지 논문게재

가. 학술발표

- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Jin-Gyeong Cho, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Gi-Min Kim, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2009) Alkaloids from Plant Extracts Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2009 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, October, 22-24, Jeju Grand Hotel, Jeju, Korea.
- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Gyu-Won Huh, Eun-Mi Ahn, Nam-In Baek (2010) Isolation of Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* and Showed Insecticidal Activity on Aphid, 2010 춘계학술대회 발표논문초록집, The Korean Society for Applied Biological Chemistry, Feb. 19-20, KIST 강릉분원, Korea.
- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek (2010) Alkaloids from the Tuber of *Corydalis turtschaninovii* Showed Insecticidal Activity on Aphid,

2010년도 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회, 한국약용작물학회, April 22th, 정선군 하이원호텔, Korea.

- Gee-Young Lee, Ho-Seob Soh, Hyun-Ju Lee, Young-Hee Han, Sung-Kee Kim, Sun-Ju Moon, and Nam-In Baek (2010) Insecticidal Activities of Extract from *Macleaya cordata*, 2010 한국자원식물학회 정기총회 및 춘계 학술발표회, 한국자원식물학회, 2010.10.07~2010.10.08, 제주 라마다 호텔.

나. 논문게재

- Hee-Jung Park, Mi-Young Baek, Jin-Gyeong Cho, Kyeong-Hwa Seo, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, and Nam-In Baek(2011) Insecticidal Alkaloids on Aphids from *Corydalis turtschaninovii* Tubers, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54(3)**, 345-352.
- Mi-Young Baek, Hee-Jung Park, Gi-Min Kim, Dae-Young Lee, Gee-Young Lee, Sun-Ju Moon, Eun-Mi Ahn, Nam-In Baek (2012) Insecticidal alkaloids from the root of *Macleaya cordata* on a cotton aphid (*Aphis gossypii*), *Phytochemistry Letter* (in revision).

3. 친환경유기농자재 목록공시 : 2011. 4. 15

목록등재번호	자재종류	자재명(상표명)	제조회사
11-유기-5-307	작물충해관리용 자재	식물추출물(충스타)	(주)두애니



그림 34. 죽자초추출물 친환경유기농자재

4. 기술이전 실시 : 2011. 10. 18

- 협약대상 : 경기도농업기술원, 경희대학교, (주)두애니
- 처분방법 : 수의계약에 의한 전용실시
- 수의계약업체 : (주)두애니

- 실시금액 : 정액기술료 54,000천원

5. 홍보

가. 언론홍보 : 15건 (기술이전 관련 홍보)

- 신문(7) : 농민신문, 경기신문, 경인매일, 기호일보, 전국도민일보, 중부일보, 수도권일보
- 인터넷(8) : 머니투데이, 뉴스핌, 아시아투데이, 수원일보, 서울경제, 뉴시스, 연합뉴스, 파이낸셜뉴스

[도가 개발한 기술특허 민간에 이전](#) 머니투데이 사회 | 2011.10.18 (화) 오전 11:11

'죽자초 추출물'의 특허기술을 두애니로 이전하는 협약식을 체결했다. 죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온... 농업기술원 관계자는 "죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에 비해...
네이버 | [관련기사 보기](#)

[경기도, 천연 진딧물 살충제 특허 민간 이전](#) 뉴스핌 | 2011.10.18 (화) 오전 10:03

죽자초 추출물의 특허기술을 (주)두애니로 이전하는 협약식을 이날 체결했다. 죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온... 농업기술원 관계자는 "죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에...
[관련기사 보기](#)

[효과 강한 천연 진딧물 살충제, 민간에 특허 이전](#) 아시아투데이 사회 | 2011.10.18 (화) 오전 7:55

(양귀비과 식물 죽자초 추출물, 약효 지속기간 길고 환경에도 좋아... '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두애니로 이전하는 협약식을 체결한다. 죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온...
[관련기사 보기](#)

[도 농기원, 천연 진딧물 살충제 특허 민간 이전](#) 수원일보 경제 | 2011.10.19 (수) 오전 0:35

경희대학교와 공동 개발한 진딧물 살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두애니로 이전하는 협약식을 체결했다. 죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온 것으로 경기도농업기술원은 진딧물...
[관련기사 보기](#)

[\[전국 패트론\] 러시아 인천 명예총영사관 송도에 21일 개관 외](#) 서울경제 사회 | 2011.10.18 (화) 오전 10:33

18일 경희대와 공동 개발한 진딧물 살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두애니로 이전하는 협약식을 체결했다. '죽자초 추출물'은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온 것으로, 기존 살충제보다...
네이버 | [관련기사 보기](#)

[경 농업기술원, 특허 천연 살충제 내년 시판](#) 뉴시스 사회 | 2011.10.18 (화) 오전 9:39

= 경기도농업기술원은 죽자초 추출물을 이용해 만든 친환경... 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온 추출물을 이용한 것으로... 등록됐다. 기술원 관계자는 "죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에 비해...
네이버 | [관련기사 보기](#)

[<경기소식> 경기센터서 20일 장애인채용박람회](#) 연합뉴스 사회 | 2011.10.18 (화) 오후 3:26

18일 경희대학교와 공동 개발한 진딧물살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두애니에 이전하기로 하고 협약식을 가졌다. 도 농기원은 양귀비과 식물인 죽자초 추출물질의 진딧물 살충효과를 밝혀내고...
네이버 | [관련기사 보기](#)

[경기도농업기술원, 친환경 살충제 출시](#) 파이낸셜뉴스 사회 | 2011.10.18 (화) 오전 10:02

경희대학교와 공동 개발한 진딧물 살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두애니로 이전하는... 농자재로 등록했다. 농업기술원 관계자는 "죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에 비해 진딧물 살충력이

도농기원 천연살충제 특허기술 이전

내년 친환경재배농가에 보급

경기도농업기술원은 18일 두에니(주)와 천연 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제(천연살충제)의 특허기술이전 협약을 체결했다고 밝혔다.

지난 2009년부터 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원을 받아 도농기원과 경희대학교가 공동개발한 천연살충제는 천연소재인 양귀비과 식물인 죽자초의 추출물로 만들었으며 진딧물 살충효과가 뛰어나다.

특히 오이, 고추 재배농가에서 진딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났으며 최근 과수원에서 피해를 입히고 있는 매미충에게도 살충효과가 있는 것으로 조사됐다고 도농기원은 전했다.

또 어독성 등 환경에 대한 독성시험을 실시한 결과 안전한 수준을 확보해 지난 4월에 ‘충스타’란 이름으



18일 경기도농업기술원 김영호 원장(가운데)이 박동준 두에니(주) 대표이사(오른쪽), 백남인 경희대학교 교수와 친환경 해충방제제의 특허기술이전 협약을 체결한 뒤 협약서를 들어보고 있다. /경기도농업기술원 제공

로 친환경유기농자재로 등록된 바 있다.

기술이전된 천연살충제는 내년부터 국내 친환경농산물 재배농가에 본격적으로 생산 보급할 예정이며 해외시장 수출도 계획하고 있다.

김영호 도농기원장은 “이번 특허

기술이전된 천연살충제는 기존 제품에 비해 진딧물의 살충력이 우수하고 약효의 지속기간도 길다”며 “비용절감은 물론 안전한 친환경농산물 생산으로 농가의 소득증대에 크게 기여할 것”이라고 말했다.

/김태연기자 tyon@

천연 진딧물 살충제, 민간에 이전

도농기원, 친환경 해충방제제 특허기술이전 협약

기존 살충제보다 살충력이 뛰어 나고, 약효 지속기간이 길 뿐만 아니라 환경에도 안전한 살충제가 출시된다.

경기도농업기술원(원장 김영호)은 18일 경희대학교와 공동 개발한 진딧물 살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두에니로 이전하는 협약식을 체결했다.

죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온

것으로 경기도농업기술원은 진딧물 살충효과가 높은 이 추출물질의 구조를 밝혀내 특허출원한 바 있다.

경기도농업기술원 관계자는 오이, 고추 재배농가에서 진딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났으며, 최근 과수원에서 피해가 증가하고 있는 매미충에도 살충효과가 있다고 밝혔다.

환경에 대한 독성시험 결과 안전한 수준을 확보 지난 4월 '충스타'란 이름을 가진 친환경유기농 자재로도 등록됐다.

농업기술원 관계자는 "죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에 비해 진딧물 살충력이 우수하고 약효의 지속기간도 길어 방제비용을 절감시킬 뿐만 아니라 안전한 친환경농산물 생산으로 농가의 소득증대에 크게 기여할 것으로 기대한다"고 말했다.

수원 송상섭기자

기호일보

효과 탁월 진딧물 살충제 도농기원, 특허기술 이전

죽자초 추출물 활용 두에니와 어제 협약

경기도농업기술원은 18일 경희대학교와 공동 개발한 진딧물 살충효과가 뛰어난 죽자초 추출물을 두에니㈜와 특허기술이전 협약을 체결했다.

이 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제는 지난 2009년부터 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원을 받아 개발됐다.

도농기술원은 천연소재인 양귀비과 식물인 죽자초 추출물로부터 진딧물 살충효과가 높은 활성물질의

구조를 밝혀내 특허출원했고, 오이·고추 재배농가에서 진딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났다.

최근 과수원에서 피해가 증가하고 있는 매미충에도 살충효과가 있는 것으로 나타났다.

어독성 등 환경에 대한 독성시험을 실시한 결과 안전한 수준을 확보해 지난 4월 '충스타'란 이름으로 친환경유기농자재로 등록됐다.

기술이전된 개발제품은 내년부터 국내 친환경농산물 재배농가에 본격적으로 생산·보급할 예정이며 해외 시장 수출도 계획하고 있다.

정훈영 기자 hyj@khihoilbo.co.kr

죽자초 추출물 민간기업 이전

경기도농기원 “천연 살충제 내년 시판”

기존 살충제보다 살충력이 뛰어나고 약효 지속기간이 길 뿐만 아니라 환경에도 안전한 살충제가 출시된다.
경기도농업기술원은 18일 경희대학교와 공동 개발한 진딧물 살

충제 ‘죽자초 추출물’의 특허기술을 ㈜두에니로 이전하는 협약식을 체결했다.
죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온 것으로 경기도농업기술원은 진딧물

살충효과가 높은 이 추출물질의 구조를 밝혀내 특허출원한 바 있다. 경기도농업기술원이 오이, 고추 재배농가에서 진딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났다.

또 최근 과수원에서 피해가 증가하고 있는 매미충에도 살충효과가 있다. 환경에 대한 독성시험 결과 안전한 수준을 확보, 지난 4월 ‘충스타’란 이름을 가진 친환경유기농자재로도 등록됐다.

경기도농업기술원 관계자는 “죽자초 추출물은 기존 식물추출물 제품에 비해 진딧물 살충력이 우수하고 약효의 지속기간도 길어 방제비용을 절감시킬 뿐만 아니라 안전한 친환경농산물 생산으로 농가의 소득증대에 크게 기여할 것으로 기대한다”고 말했다.

진딧물은 채소 재배기간 중 전 생육기간에 발생하는 해충으로 작물의 생육을 방해할 뿐만 아니라 식물 전염병의 원인이 되는 등 친환경채소 재배에 걸림돌이 되는 문제가 큰 해충이다.

기술 이전된 개발제품은 내년부터 국내 친환경농산물 재배농가를 대상으로 본격 시판에 들어갈 예정이다며 해외시장 수출도 계획 중이다.

우영식기자

도농기원, 잔딧물 살충 특허기술 이전

경기도농업기술원(원장 김영호)은 18일 경희대학교와 공동개발한 잔딧물 살충효과가 뛰어난 죽자초추출물을 두에니(주)와 특허기술이전 협약식을 체결했다. 이 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제는 지난

2009년부터 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원을 받아 개발됐다.

오이, 고추 재배농가에서 잔딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났으며, 최근 과수원에서 피해가 증가하고 있는 매미충에도 살충효과가 있다. 어독성 등 환경에 대한 독성시험을 실시한 결과 안전한 수준을 확보하여 2011년 4월에 '총스타'란 이름으로 친환경유기농자재로 등록됐다.

기술이전된 개발제품은 내년부터 국내 친환경 농산물 재배농가에 본격적으로 생산 보급할 예정이며 해외시장 수출도 계획하고 있다.

김도훈기자/pooh81@joongboo.com

수도권일보

2011년 10월 19일 수요일
005면 경제

죽자초 추출물 특허 이전

경기도농업기술원-(주)두에니

경기도농업기술원은 18일 경희대학교와 공동 개발한 잔딧물 살충제 '죽자초 추출물'의 특허기술을 (주)두에니로 이전하는 협약식을 체결했다.

죽자초 추출물은 천연소재인 양귀비과식물인 죽자초에서 나온 것으로 경기도농업기술원은 잔딧물 살충효과가 높은 이 추출물질의 구조를 밝혀내 특허출원한 바 있다. 경기도농업기술원 관계자는 오이, 고추 재배농가에서 잔딧물 살충효과를 시험한 결과 90% 이상의 높은 방제효과가 나타났다고 밝혔다.

/우민기자 woomin80@sudokwon.com

나. 전시회 홍보

(1) 진주국제농업박람회

- 전시주관 : 경기도농업기술원
- 전시기간 및 장소 : 2011. 11.9~11.12, 진주종합경기장
- 리후렛 배부 : 1,000부
- 부스 방문자수 : 2000여명



(2) TAMAS 2011 제9회 대전국제농자재 및 우수종자전시회

- 전시주관 : (주)두애니
- 기간 및 장소 : 11. 8.~11.11 (대전무역전시관)
- 리후렛 배부 : 1000부
- 방문자수 : 1,600여명



6. 교육

가. 2012 새해영농교육 교관반 교육시 활용

- 장소 및 대상 : 경기도농업기술원, 경기도 시군농업기술센터
- 내용 : 리후렛 제작 및 배부 : 1500부

환경친화적 병해충방제를 위한
친환경농자재 개발

Global Inspiration
세계속의 경기도

개발내용	제품
제품명 : 지외부대KM (친환경유기농자재 등록 2011.7) 주요성분 : 미생물 (슈도모나스, 17S, 29S) 대상병해 : 토마토 시들음병, 딸기탄저병, 모실목병 등 특징 : 생육촉진, 토소질양상, 합성훈수촉진	제품명 : 고려의 (친환경유기농자재 등록 2011.7) 주요성분 : 미생물 (박테리야실러스-플라미사 No.72) 대상병해 : 고추역병 특징 : 과채류 역병 예방 및 방제, 김황성 2차 대사산물로 식물보호
제품명 : 홍스타 (친환경유기농자재 등록 2011.4) 주요성분 : 식물추출물 (옥저초) 대상병해 : 진딧물 특징 : 식물의 천연살충성분 이용, 오이, 고추 등 진딧물 방제효과 우수	

문의 : 경기도농업기술원 환경농업연구과 (031-229-5837~8)

제2절 성과활용계획

1. 사업화방안

본 연구수행을 통해 산업화를 위한 제품화하는데 성공하였다. 그러나 제품의 대량생산을 위한 원료 대량생산공정이 완성되지 않아 현재는 제품을 생산할 수 없으며 1년 이내 제품을 출시할 계획을 가지고 있다.

또한 유효 약효 성분으로 예상되는 화합물의 세포 독성에 대한 기작 연구 및 유효성분 또는 그 유사물질들을 함유하고 있는 재배가 쉬운 작물을 찾아 국내에서 원료를 생산할 수 있도록 할 계획을 가지고 있으며 제품의 유통과정 중 안정성 검사를 실시할 예정이다.

가. 국내 판매

- 제품출시예정 : 2012년 11월
- 판매방안 : 기존 거래처를 통한 판매 및 지자체 친환경지원사업 확보
- 예상판매계획

년도	2013년	2014년	2015년
매출액(백만원)	50	200	300

나. 해외 판매

- 판매방안 : 현재 거래 중인 중국 농약업체를 통한 판매 및 이외의 국가는 전시회를 통한 홍보 및 영업
- 예상판매계획

년도	2013년	2014년	2015년
매출액(\$)	10,000	100,000	200,000

2. 교육 및 홍보

경기도농업기술원에서는 농업인 교육, 각종 전시회 참가시 개발한 충스타 제품의 개발 관련 교육 및 홍보를 할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특이 사항 없음

제 7 장 참고문헌

1. 김종범 (2005) 식물유래 2차 대사물질의 병충해 및 잡초 방제효과. *한국응용학회지*, **48(1)**, 1-15.
2. 김창길, 정학균, 문동현 (2009) 최근 국내외 친환경농산물 생산실태 및 시장전망. 한국농촌경제연구원 연구보고서.
3. 농림수산식품부 (2008) 2007 채소재배현황.
4. 박미란, 김혜영, 최경자, 이선우, 장경수, 김진석, 홍경식, 박노중, 조광연, 김진철 (2004) 아비꽃대(*Chloranthus japonicus*) 뿌리로부터 분리한 shizukanol들의 생물활성. *농약과학회지* **8(4)**, 338-346.
5. 이인화, 설명수, 박종대 (2005) 점박이용애, 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 대한 은행잎 추출물의 살충 및 기피효과. *한국응용생명화학회지*. **48(2)**, 150-154.
6. 천상욱, 김도익, 최용수(2003) 수종의 국화과식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균 활성연구. *한국잡초학회지* **23(2)**, 81-91.
7. 최해진, 김희연, 허장현, 허수정, 김도순, 김성문 (2003) 할미꽃(*Pulsatilla koreana* Nakai)로부터 새로운 살초활성물질, chrysophanic acid의 분리. *한국잡초학회지* **23(4)**
8. Abbott W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**, 265-267.
9. Ahmad, M., Arif, M.I. (2008) Susceptibility of Pakistani populations of cotton aphid *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to endosulfan, organophosphorus and carbamate insecticides. *Crop Prot* **27**, 523-531.
10. Elliot, M., Janes, N. F., Jeffs, K. A., Needham, P. H. and Sawicki, R. M. (1965) New pyrethrin-like esters with high insecticidal activity. *Nature* **207**, 938-940.
11. Herron, G.A., Powis, K., Rophail, J.(2001) Insecticide resistance in *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), a serious threat to Australian cotton. *Aust J Entomol.* **40**, 85 - 91.
12. Hoe-Seon Lee, Gyung-ja Choi, Kwang-Yun Cho, Sang-Gil Lee, Young-Joon Ahn (2000) Fungicidal and insecticidal activities of various grain extracts against five insect pests and six phytopathogenic fungi. *The Korean Journal of Pesticide Science* **4(3)**, 7-14.
13. Il Kwon Park, Ji Doo Park, Chul Su Kim, Sang Shin, Young Joon Ahn, Seung Chan Park, Sang Gil Lee (2002) Insecticidal and acaricidal activities of domestic plant extracts against five major arthropod pests. *The Korean Journal of Pesticide Science* **6(4)**, 271-278.
14. Jinmenez, A., Mata, R., Pereda-Miranda, R., Calderon, J., Isman, M. B., Nicol,

- R. and Arnason, J. T. (1997) Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *J Chem Ecol* **23**, 1225-1234.
15. Jiwajinda, S., Hirai, N., Watanade, K., Santisopasri, V., Chuengsamarnyart, N., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. (2001) Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. *Phytochemistry* **56**, 693~695
 16. Kaltenegger, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Khlig, H., Hpfer, O. Vajrodaya, S. and Greger, H. (2003) Insecticidal pyridol[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry* **63**, 803-816.
 17. Koul, O., Multani, J. S., Singh, G. and Wahab, S. (2002) Bioefficacy of toosendanin from *Melia dubia* against gram pod-borer, *Helicoverpa armigera*(Hubner). *Curr Sci India* **83**, 1387-1391.
 18. Li, F., Han, Z., 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochem Mol Biol* **34**, 397-405.
 19. Linton, Y. M., Nisbet, A. J. and Mordue, A. J. (1997) The effects of azadirachtin on the tests of the desert locust, *Schistocerca gregaria*(Forsk.) *J Insect Physiol* **43**, 1077-1084.
 20. Liu, Z. L., Xu, Y. J., Wu, J., Goh, S. H. and Ho, S. H. (2002) Feeding deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz against two stored-product insects. *J Agric Food Chem* **50**, 1447-1450.
 21. Nunez, M. J., Guadano, A., Jimenez, I. A., Ravelo, A. G., Gonzalez-Coloma, A. and Bazzocchi, I. L. (2004) Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. *J Nat Prod* **67**, 14-18.
 22. Park, I. K., Lee, S. G., Shin, S. C., Park, J. D. and Ahn, Y. J. (2002) Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J Agric Food Chem* **50**, 1866-1870.
 23. Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Grutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J. and Villarreal, L. (1998) Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. *J Nat Prod* **61**, 1418-1420.
 24. Ruberto, G., Renda, A., Tringali, C., Napoli, E. M. and Simmonds, M. S. (2002) Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem* **50**, 6766-6774.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 양귀비과 (Papaveraceae) 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 양귀비과(Papaveraceae) 식물추출물을 이용한 친환경 해충방제제 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.