

최 종  
연구보고서

저독성 Proinsecticide계 살충제 및  
환경친화형 혼합제 개발

Development of Selective Proinsecticide and  
Low-input Pesticide Mixtures

연구 기관  
강원대학교

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저독성 Proinsecticide계 살충제 및 환경친화형  
혼합제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 25 .

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 한 대 성

연 구 원 : 허 장 현

연 구 원 : 김 성 문

연 구 원 : 박 승 순

연 구 원 : 최 승 출

연 구 원 : 박 수 진

연 구 원 : 이 필 호

연 구 원 : 오 병 렬

연 구 원 : 안 문 섭

연 구 원 : 조 준 모

# 요 약 문

## I. 제목

저독성 Proinsecticide계 살충제 및 환경친화형 혼합제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 저독성, 선택성 약제를 연구하여 그 독성이론을 검토하고, 이를 통하여 저독성, 선택성 약제 개발과 이론추적

2) 농약의 무독화 효소에 대한 저해특성을 이용하여 대사 메카니즘을 이해하고, 이를 통하여 효율이 높은 혼합제를 개발

3) 새로운 약제 또는 새로운 혼합제의 개발을 위한 독성이론 추적과 체계를 세우는데 일조하여 환경친화적 저독성 농약 자재의 개발을 위한 자료로 활용

## III. 연구개발의 내용과 범위

### 1) 저독성 살충제 개발

- o 선택적 저독성 약제선정 및 독성발현기작연구(주관)
- o Lead 화합물의 분자설계 및 합성, 구조동정(주관)
- o 생물활성검정(위탁)

## 2) 혼합제 개발

- o 계통별 약제의 무독화 효소활성 저해(주관)
- o 선발약제 상호간의 약효상승작용(주관)
- o 혼합제 선정, 제형 시제품(주관/위탁)
- o 생물활성 검정 및 포장실험(위탁)

## IV. 연구개발결과

1) Proinsecticide계 살충제인 carbosulfan, furathiocarb, benfuracarb, PSC 등 약제에 대한 독성발현기작 연구가 체계적이고 집중적으로 연구되었으며, 고선택성의 안전한 약제들이 산화효소(mfo)와 GST의 도움으로 체내 대사를 통하여 독성물질로 발현되는 과정을 이해할 수 있었다. Proinsecticide에 대한 이러한 체계적인 독성발현기작연구 결과는 국내외에 처음 보고되는 결과이며, 앞으로 새로운 화합물들의 분자설계에 응용할 수 있을 것이다.

2) 새로운 Proinsecticide계 살충제의 개발을 위한 분자설계, lead 화합물의 선정은 크게 두 방향으로 수행하였다. 첫째는 Procarbamate계열로서 시험약제였던 N-dialkoxy phosphinothioyl carbofuran(PSC)의 약점을 보완한 새로운 구조로서 carbofuran의 질소원자에 다양한 치환기를 갖는 새로운 화합물들이 합성, 정제, 구조결정되었다. 높은 살충활성을 보인 화합물들이 많이 선발되었으며, 상품화된 약제인 Carbosulfan의 활성에 준하는 우수한 화합물도 일부 합성되었다. 특히 이 화합물들의 선택독성을 검정하기 위하여 수행된 포유동물 독성실험에서 저독성, 고선택성이 확인되어 제 1세부과제 연구의 큰 성과로 판단되었다. 둘째는 저독성, 고선택성인 imidacloprid 화합물의 유사체 개발은 현재 독성이론을 바탕으로 설계된 분자구조의 합성방

법이 확립되어 다양한 구조의 화합물들이 합성, 구조 동정되어 생물활성검정이 수행되었다. 일부 화합물에서 난방제 해충인 담배거세미 나방에 대한 활성을 보였으며, 높은 살균효과를 나타내는 성과도 얻었다.

3) 체내의 중요 무독화 효소인 monooxygenase(MFO), glutathione-S-transferase(GST), amidase, cytosolic esterase, carboxylesterase에 대한 농약들의 저해경향 연구를 성공적으로 마무리하였다. 그 동안 국내에서 입수 가능한 저해제(6종)을 포함하여 살충제(76종), 살균제(31종)의 총 107종의 농약원제들을 모두 입수하여 5종의 대사효소에 대한 저해경향 검정을 최종 완료, 정리하였다. 국내에서 사용되고 있는 주요 농약들(107종)의 무독화효소 저해경향에 대한 이러한 종합적 결과는 본 제 2세부과제 수행을 통하여 얻어진 중요한 연구결과이다. 이 결과들은 국제적으로 처음 시도된 종합적인 연구성공으로서 앞으로 약제들의 대사효소에 대한 특성을 이해하고, 이를 바탕으로 한 혼합약제의 선택에도 크게 활용될 수 있을 것이다.

4) 대사기작에 대한 이론을 바탕으로 혼합 약제를 선정하였으며, 이들에 대한 생물활성검정 결과를 얻었다. 효소저해 실험결과를 바탕으로 살충제+살충제, 살충제+살균제 혼합약제를 선정, 생물활성 검정을 수행한 결과 선발 약제 대부분에서 우수한 상승효과를 얻었다. 특히 실내실험을 통하여 선발된 혼합약제의 최적비율실험을 통하여 혼합비율을 결정하고, 이를 근거로 혼합제의 시제품 제형(경농 중앙연구소)을 제조하였다. 개발된 혼합제형 중 Phenthoate+Benomyl (24+6 WP) 혼합제의 포장실험에서의 효과는 기대이상으로 탁월하여 실용화가 가능한 것으로 판단되었다. 본 연구결과는 앞으로 국내 기업들이 저투입 환경친화형 혼합제 개발 과정에서 활용할 수 있는 중요한 이론적 모델을 제시한 것으로 평가한다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

0 우수한 화합물 또는 혼합제에 대하여는 물질특허, 제법특허 및 용도특허를 국내외에 출원

0 개발된 신약제와 혼합제제방법을 관련 산업체에 기술이전하여 상품화를 시도. 국내 농약업체와의 공동연구를 추진하여 상호 습득한 기술과 Know-how를 교류

0 독성학적 이론과 분자설계, 유도체 합성 등을 통하여 축적된 이론과 경험을 타 약제의 개발에 응용

0 연구결과 보고서를 주요 도서관에 배부하여 신농약과 혼합제를 개발하고자하는 기업의 참고자료로 활용

0 축적된 독성이론과 개발경험을 학회와 논문발표를 통하여 전문가들에게 공개하여 다른 약제의 개발에 활용

0 혼합제 처방 가능성을 예측하고, 혼합제의 환경친화형 제형을 개발하여 환경약효의 지속성과 약효의 상승효과로 인한 약제의 살포량 및 횟수를 경감시켜 생력화 가능

0 저독성, 저잔류성의 선택성 신농약과 환경친화형 제제의 개발은 우리나라 농약연구와 농약산업의 선진화에 기여

## SUMMARY

### I. Title:

Development of selective proinsecticides and low-input pesticide mixtures.

### II. Objectives

The overall objectives of this research are to develop selective proinsecticides and low-input pesticide mixtures. The objective was attained by:

- 1) understanding the mechanism of action in pesticide selectivity. On the basis of the information, derivatives of a proinsecticide, *N*-dialkoxyphosphinothionyl carbofuran were designed and synthesized, and their insecticidal activities and mammalian toxicities were determined.
- 2) understanding the interactive mechanism between pesticides and their detoxifying enzymes. Pesticides with synergistic action were mixed and their biological activities were determined.



### III. Content

#### 1) Development of selective proinsecticides.

- Selection of selective insecticides and understanding of the mechanism of action in the selectivity.
- Molecular designing and synthesis of lead compounds.
- Determination of biological activity of pesticide mixtures.

#### 2) Development of pesticide mixtures.

- Inhibition of detoxifying enzymes by pesticides.
- Synergism of pesticides.
- Production of pesticide mixtures.
- Determination of biological activity of pesticide mixtures in greenhouse and fields.

### IV. Results

The mechanisms of action of proinsecticides, such as carbosulfan, furathiocarb, and benfuracarb, were studied. Such non/low-toxic pesticides were metabolized in insects by mixed-function oxidases(MFO) and/or glutathione-S-transferase(GST), and transformed to toxic ones. The systemic action of proinsecticides in toxicity was applied in designing of proinsecticides.

Two different approaches were made in designing and synthesizing of proinsecticides, and selection of lead compound for the development of proinsecticides. Firstly, derivatives of an experimental compound N-di-alkoxyphosphinothionyl carbofuran(PSC), which has high mammalian toxicity

and low insecticidal activity, were synthesized. Some newly synthesized compounds had much lower mammalian toxicity and similar insecticidal activity. Secondly, derivatives of imidacloprid, which has high selectivity and low mammalian toxicity, were designed on the basis of selectivity and their biological toxicity was determined. Several compounds showed high insecticidal activities against tobacco cutworm (*Spodoptera litra* (Fabricius)) as well as high fungicidal activities.

Interactions between pesticides and their detoxifying enzymes, such as mfo, GST, amidase, cytosolic esterases, and carboxylesterases were studied. Inhibition mechanisms of 76 insecticides and 31 fungicides as well as six specific inhibitors to detoxifying enzymes showed valuable information in the selection of pesticide mixtures: pesticides were detoxified by detoxifying enzymes, while the detoxifying enzymes were inhibited by pesticides.

On the basis of the results of interactions of pesticide-detoxifying enzyme, pesticide mixtures (insecticide+insecticide and insecticide+fungicide) were made and their biological activities were tested in a small pilot. Of tested pesticide mixtures, the biological activity of a mixture of phenthoate+benomyl (24 + 6 WP) was much higher than a commercial pesticide.

## V. Applications of Research Results in Future

1. Pesticide(s) and pesticide mixtures with high activity can be patented in industrialized countries including Korea.
2. Information on the production of formulations in pesticide mixture can be transferred to pesticide industry
3. Information on the biorational designing techniques of pesticides and synthesis techniques can be transferred to pesticide industry.
4. Low-input pesticides mixture can be commercialized by cooperative work with pesticide industry and help to reduce the number and amount of pesticides usage.
5. A process for the development of low-input pesticide mixtures can be applied to other studies or developments of pesticide mixtures.

## CONTENTS

|  |    |
|--|----|
| Chapter 1. INTRODUCTION .....  | 21 |
| Section 1. Objective and Necessity .....                                   | 22 |
| Section 2. Technical situation .....                                       | 25 |
| Section 3. Result .....  | 30 |
| Section 4. Evaluation of the project and application of results .....      | 33 |
| Chapter 2. Development of selective proinsecticide .....                   | 36 |
| Section 1. Introduction .....  | 37 |
| Section 2. Materials and methods .....                                     | 40 |
| 1. Research for mode of action of proinsecticide .....                     | 40 |
| 1) Synthesis of PSC and determination of chemicals<br>purity .....         | 40 |
| 2) Determination of bimolecular inhibition rate<br>constant of ChE .....   | 40 |
| 3) Bioactivation of AChE/mfo coupling system <i>in vitro</i> .....         | 42 |
| 4) Bioactivation of mouse brain AChE <i>in vivo</i> .....                  | 43 |
| 5) Analysis of toxic metabolites .....                                     | 44 |
| 2. Research for development of selective proinsecticide .....              | 46 |
| 1) Synthesis of procarbamates .....  | 46 |
| (1) Background for design of procarbamtes .....                            | 46 |
| (2) Synthesis of <i>N</i> -phosphinothioyl<br>carbofuran derivatives ..... | 47 |
| ① Synthesis and synthetic methods for compounds<br>.....                   | 47 |

|  |    |
|--|----|
| ② Analysis of $^1\text{H-NMR}$ and GC/MS for compounds .....                                     | 56 |
| (3) Determination of insecticidal activities .....   | 57 |
| ① Preparation of treatment solutions .....   | 58 |
| ② Determination of insecticidal activity against brown<br>plant hopper .....                     | 58 |
| ③ Determination of insecticidal activities against<br>diamondback moth and tobacco cutworm ..... | 58 |
| ④ Determination of insecticidal activity against green<br>peach aphid .....                      | 59 |
| ⑤ Determination of insecticidal activity against<br>two-spotted spider mite .....                | 59 |
| (4) Determination of mammalian toxicities .....  | 60 |
| 2) Synthesis of neonicotinoids .....   | 60 |
| (1) Background for design of neonicotinoids .....  | 60 |
| (2) Synthesis of imidacloprid derivatives .....  | 61 |
| ① Synthesis and synthetic methods for compounds<br>.....   | 61 |
| ② Analysis of $^1\text{H-NMR}$ and GC/MS for compounds<br>.....                                  | 76 |
| (3) Determination of insecticidal activities .....   | 77 |
| ① Preparation of treatment solutions .....   | 78 |
| ② Determination of insecticidal activity against brown<br>plant hopper .....                     | 78 |

|   |    |
|---|----|
| ③ Determination of insecticidal activities against<br>diamondback moth and tobacco cutworm .....        | 78 |
| ④ Determination of insecticidal activity against green<br>peach aphid .....                             | 79 |
| ⑤ Determination of insecticidal activity against<br>two-spotted spider mite .....                       | 79 |
| (4) Determination of fungicidal activities .....  | 80 |
| ① Determination of fungicidal activity against <i>Pyricularia<br/>        grisea</i> .....              | 80 |
| ② Determination of fungicidal activity against <i>Bortyitis<br/>        cinerea</i> .....               | 80 |
| ③ Determination of fungicidal activity against<br><i>Phytophthora infestans</i> .....                   | 81 |
| ④ Determination of fungicidal activity against <i>Puccinia<br/>        recondita</i> .....              | 81 |
| ⑤ Determination of fungicidal activity against <i>Erysiphe<br/>        graminis f. sp. hordei</i> ..... | 81 |
| Section 3. Results .....  | 83 |
| 1. Research for mode of action of proinsecticide .....  | 83 |
| 1) Synthesis of PSC and determination of<br>chemicals purity .....                                      | 83 |
| 2) Determination of bimolecular inhibition<br>rate constant of ChE .....                                | 85 |
| 3) Bioactivation of AChE/mfo coupling system <i>in vitro</i> .....                                      | 88 |
| (1) Bioactivation of benfuracarb .....  | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| (2) Bioactivation of carbosulfan .....  | 88  |
| (3) Bioactivation of PSC .....  | 88  |
| 4) Bioactivation of mouse brain AChE <i>in vivo</i> .....                                 | 89  |
| (1) Bioactivation of benfuracarb .....  | 89  |
| (2) Bioactivation of carbosulfan .....  | 94  |
| (3) Bioactivation of PSC .....  | 94  |
| 5) Analysis of toxic metabolites .....  | 94  |
| (1) Toxic metabolites of benfuracarb via<br>bioactivation process .....                   | 94  |
| (2) Toxic metabolites of carbosulfan via<br>bioactivation process .....                   | 96  |
| (3) Toxic metabolites of PSC via bioactivation process<br>.....                           | 102 |
| 2. Research for development of selective proinsecticide .....                             | 108 |
| 1) Synthesis of novel procarbamates .....   | 108 |
| (1) Chemical characteristics of <i>N</i> -phosphinothioyl carbofuran<br>derivatives ..... | 108 |
| (2) Insecticidal activities of <i>N</i> -phosphinothioyl carbofuran<br>derivatives .....  | 116 |
| (3) Mammalian toxicities of <i>N</i> -phosphinothioyl carbofuran<br>derivatives .....     | 128 |
| 2) Synthesis of novel neonicotinoids .....  | 132 |
| (1) Chemical characteristics of imidacloprid derivatives ..                               | 132 |
| (2) Insecticidal activities of imidacloprid derivatives .....                             | 141 |
| (3) Fungicidal activities of imidacloprid derivatives .....                               | 147 |

|  |     |
|--|-----|
| Section 4. Conclusion .....  | 163 |
| Section 5. References .....  | 164 |
| <br>   |     |
| Chapter 3. The Development of Low-input Mixture .....                | 166 |
| Section 1. Introduction .....  | 167 |
| Section 2. Materials and Methods .....                               | 171 |
| 1. Pesticides .....  | 171 |
| 2. Rats .....  | 171 |
| 3. Insects .....   | 171 |
| 4. Pathogens .....   | 171 |
| 5. Chemicals .....   | 182 |
| 6. Instrument .....  | 183 |
| 7. Enzyme assay .....  | 183 |
| 8. Selection of pesticide detoxified by detoxifying enzyme .....     | 188 |
| 9. Bioassay .....  | 189 |
| 10. Formulation and field test of mixtures .....                     | 191 |
| Section 3. Results .....   | 198 |
| 1. Lists of pesticide mixtures .....                                 | 198 |
| 1) Pesticide mixtures in Korea .....                                 | 198 |
| 2) Pesticide mixtures in Japan .....                                 | 207 |
| 2. Inhibition of detoxifying enzymes by pesticides .....             | 212 |
| 1) Inhibition of detoxifying enzymes by specific inhibitors<br>..... | 212 |
| 2) Inhibition of detoxifying enzymes by insecticides .....           | 213 |
| 3) Inhibition of detoxifying enzymes by fungicides .....             | 213 |



|  |     |
|--|-----|
| 4) Relationships between inhibition of detoxifying enzymes<br>from rats and insects .....              | 224 |
| 3. Selection of pesticide detoxified by detoxifying enzyme .....                                       | 237 |
| 4. Bioassay .....  | 242 |
| 1) Insecticidal activity of mixtures(1:1) to susceptible<br>population of diamondback moth .....       | 244 |
| 2) Fungicidal activity of mixtures(1:1) to various<br>pathogens .....                                  | 253 |
| 3) Toxicity of mixtures combined various ratio<br>to susceptible population of diamondback moth .....  | 258 |
| 4) Insecticidal activity of mixtures(1:1) to field(resistance)<br>population of diamondback moth ..... | 260 |
| 5) Insecticidal activity of mixtures(1:1) to susceptible<br>population of cotton aphid .....           | 264 |
| 6) Field test of formulated mixtures to diamondback moth<br>.....                                      | 268 |
| Section 4. Conclusion .....  | 271 |
| Section 5. References .....  | 273 |
| Chapter 4. Sub-project .....   | 275 |

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| 제 1장 서론 .....   | 21 |
| 제 1절 연구개발의 목적 및 범위 .....  | 22 |
| 제 2절 국내외 기술개발 현황 .....  | 25 |
| 제 3절 연구결과 .....   | 30 |
| 제 4절 연구개발 달성도 및 활용방안 .....  | 33 |
| <br>  |    |
| 제 2장 저독성 Proinsecticide계 살충제의 개발 분야 .....                           | 36 |
| 제 1절 서설 .....   | 37 |
| 제 2절 재료 및 방법 .....  | 40 |
| 1. Proinsecticide계 살충제의 독성발현기작 연구 .....                             | 40 |
| 가. 공시약제의 합성 및 순도확인 .....  | 40 |
| 나. ChE에 대한 이분자 저해속도 상수( $K_i$ ) 측정 .....                            | 40 |
| 다. AChE/mfo coupling system을 이용한<br>활성화 효과( <i>in vitro</i> ) ..... | 42 |
| 라. 생쥐 brain AChE에 대한 독성발현( <i>in vivo</i> ) .....                   | 43 |
| 마. 대사반응을 통하여 생성된 독성 대사물의 분석 .....                                   | 44 |
| 2. 저독성 proinsecticide계 살충제의 개발 연구 .....                             | 46 |
| 가. Procarbamate계 살충제 합성 .....                                       | 46 |
| 1) 분자설계의 근거 .....   | 46 |
| 2) <i>N</i> -Phosphinothioyl carbofuran 유도체의 합성 .....               | 47 |
| 가) 합성법 및 합성 .....   | 47 |
| 나) 구조검정 .....   | 56 |
| 3) 살충활성검정 .....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| 가) 처리액의 조제 .....                       | 58 |
| 나) 벼멸구에 대한 살충활성 검정 .....               | 58 |
| 다) 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한<br>살충활성 검정 ..... | 58 |
| 라) 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성 검정 .....           | 59 |
| 마) 두점박이용애에 대한 살충활성 검정 .....            | 59 |
| 4) 포유동물독성 검정 .....                     | 60 |
| 나. Neonicotinoid 유도체의 합성 .....         | 60 |
| 1) 분자설계의 근거 .....                      | 60 |
| 2) Imidacloprid계 유도체의 합성 .....         | 61 |
| 가) 합성법 및 합성 .....                      | 61 |
| 나) 구조검정 .....                          | 76 |
| 3) 살충활성검정 .....                        | 77 |
| 가) 처리액의 조제 .....                       | 78 |
| 나) 벼멸구에 대한 살충활성 검정 .....               | 78 |
| 다) 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한<br>살충활성 검정 ..... | 78 |
| 라) 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성 검정 .....           | 79 |
| 마) 두점박이용애에 대한 살충활성 검정 .....            | 79 |
| 4) 살균활성검정 .....                        | 80 |
| 가) 벼도열병균에 대한 살균활성 검정 .....             | 80 |
| 나) 오이잿빛곰팡이병균에 대한 살균활성 검정 .....         | 80 |
| 다) 토마토역병균에 대한 살균활성 검정 .....            | 81 |
| 라) 밀녹병균에 대한 살균활성 검정 .....              | 81 |
| 마) 보리흰가루병균에 대한 살균활성 검정 .....           | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| 제 3절 결 과 .....  | 83  |
| 1. Procarbamate계 살충제의 독성발현기작연구 .....                                | 83  |
| 가. 공시약제의 합성 및 순도확인 .....  | 83  |
| 나. ChE에 대한 이분자 저해속도 상수( $k_i$ ) 측정 .....                            | 85  |
| 다. AChE/mfo coupling system을 이용한<br>활성화 효과( <i>in vitro</i> ) ..... | 88  |
| 1) Benfuracarb의 활성효과 .....  | 88  |
| 2) Carbosulfan의 활성효과 .....  | 88  |
| 3) PSC의 활성효과 .....  | 88  |
| 라. 생쥐 brain AChE에 대한 독성발현( <i>in vivo</i> ) .....                   | 89  |
| 1) Benfuracarb에 의한 독성발현 .....                                       | 89  |
| 2) Carbosulfan에 의한 독성발현 .....                                       | 94  |
| 3) PSC에 의한 독성발현 .....   | 94  |
| 마. 대사반응을 통하여 생성된 독성 대사물의 분석 .....                                   | 94  |
| 1) Benfuracarb의 독성대사물 .....   | 94  |
| 2) Carbosulfan의 독성대사물 .....   | 96  |
| 3) PSC의 독성대사물 .....   | 102 |
| 2. 저독성 proinsecticide계 살충제의 개발 연구 .....                             | 108 |
| 가. 새로운 Procarbamate계 살충제의 개발 .....                                  | 108 |
| 1) <i>N</i> -Phosphinothioyl carbofuran 유도체의 합성 및<br>구조 확인 .....    | 108 |
| 2) 살충활성검정 .....   | 116 |
| 3) 포유동물독성 검정 .....  | 128 |
| 나. Neonicotinoid계 살충제의 개발 .....                                     | 132 |
| 1) Imidacloprid계 유도체의 합성과 구조 확인 .....                               | 132 |

|   |     |
|---|-----|
| 2) 살충활성검정 .....                           | 141 |
| 3) 살균활성검정 .....                           | 147 |
| 제 4절 결 론 .....                            | 163 |
| 제 5절 참고문헌 .....                           | 164 |
| 제 3장 환경친화형 혼합제 개발 분야 .....                | 166 |
| 제 1절 서 설 .....                            | 167 |
| 제 2절 재료 및 방법 .....                        | 171 |
| 1. 공시약제 .....                             | 171 |
| 2. 공시동물 .....                             | 171 |
| 3. 공시곤충 .....                             | 171 |
| 4. 공시균주 (병원균) .....                       | 171 |
| 5. 시약 .....                               | 182 |
| 6. 사용기기 .....                             | 183 |
| 7. 실험방법 .....                             | 183 |
| 가. Microsome과 cytosolic protein의 조제 ..... | 183 |
| 나. 단백질 정량 .....                           | 186 |
| 다. 무독화 효소에 대한 농약의 활성 저해 측정 .....          | 186 |
| 8. 기준약제의 선정 .....                         | 188 |
| 9. 생물활성 검정 .....                          | 189 |
| 가. 살충활성 검정 .....                          | 189 |
| 나. 살균활성 검정 .....                          | 190 |
| 10. 제형 개발 및 포장실험 .....                    | 191 |
| 가. 공시곤충 .....                             | 191 |
| 나. 제형 개발 및 혼합제의 개발 .....                  | 192 |
| 다. 혼합제의 살충효과 검정방법 .....                   | 196 |

|   |     |
|---|-----|
| 제 3절 결 과 .....                          | 198 |
| 1. 혼합제의 개발과 사용현황 .....                  | 198 |
| 가. 국내 사용중인 살충활성을 갖는 혼합제 .....           | 198 |
| 나. 일본에서 사용중인 살충활성을 갖는 혼합제 .....         | 207 |
| 2. 무독화 효소에 대한 농약의 활성저해 실험 .....         | 212 |
| 가. 대상 무독화 효소에 대한 선택적 저해제의 활성저해 .....    | 212 |
| 나. 무독화 효소에 대한 살충제의 활성저해 .....           | 213 |
| 다. 무독화 효소에 대한 살균제의 활성저해 .....           | 213 |
| 라. 쥐와 곤충으로부터 추출된 무독화 효소의 활성 저해 비교 ..... | 224 |
| 3. 혼합 기준약제의 선정 .....                    | 237 |
| 4. 생물활성검정 .....                         | 242 |
| 가. 살충활성 검정 .....                        | 244 |
| 1) 실험 I .....                           | 244 |
| 2) 실험 II .....                          | 247 |
| 3) 실험 III .....                         | 249 |
| 4) 실험 IV .....                          | 251 |
| 나. 살균활성 검정 .....                        | 253 |
| 다. 혼합비율에 따른 약효상승의 변화 .....              | 258 |
| 라. 배추좀나방의 야외 계통에 대한 혼합제의 활성 검정 .....    | 260 |
| 마. 적용 대상 확대 실험 .....                    | 264 |
| 바. 포장실험에서 혼합제의 약효 검정 .....              | 268 |
| 제 4절 결 론 .....                          | 271 |
| 제 5절 참고문헌 .....                         | 273 |
| 제 4장 위탁과제 .....                         | 275 |

# 제 1장 서 론

## 제 1절 연구개발의 목적 및 범위

### 가. 연구배경

현재 국내에서 사용되고 있는 농약들은 거의 외국에서 개발되어 수입 또는 royalty를 지불하며 상품화된 것으로 농민들의 농약비용 부담이 매우 크다. 물질특허도입과 WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방의 환경이 도래함에 따라 모방제품 생산이 불가능하여 높은 기술료를 지불하고 농약을 생산해야 하므로 농약가격의 상승에 따른 농민부담의 가중이 우려되고, 또 국내 농약업체가 외국자본과 기술에 예속화되어 국내 시장의 잠식이 우려된다.

선진국으로부터 우리가 필요로 하는 농약관련 핵심기술의 도입이 불가능하므로 기술자립을 위해서는 농약 개발을 위한 체계적인 연구가 필수적이다. 신농약 개발은 고도의 독성학적 이론과 합성기술의 유기적인 공조를 통하여 가능한데, 현재 국내의 농약개발은 독성학적 이론배경보다는 합성기술에 전적으로 의존하여 연구가 진행되고 있다. 저독성, 고선택성 농약의 개발은 해충과 포유동물 내에서의 선택적 체내 대사를 연구하여, 적절한 유도체를 활성이 강한 분자에 도입함으로써 가능한데, 이를 위하여 농약의 작용기작, 선택적 대사에 관한 연구 그리고 분자설계 등의 연구가 반드시 선행되어야 한다.

물질특허 제도의 도입에 따라 기존제품의 모방 및 공정개발이 근본적으로 불가능하므로 현재 생산되는 농약원제들의 세대교체가 일어나면 전량을 수입해야 하는 위기에 처해 있다. 현재 세계 유수의 농약회사들은 기존 농약제품이 갖고있는 독성, 곤충의 내성증가, 환경오염 등의 문제점을 해결



하기 위해 많은 연구 개발비를 투자하여 새로운 형태의 농약과 제형의 개발에 주력하고 있다. 외국 산업체에서는 자신들의 막대한 연구비를 투입하여 개발한 혼합제 개발이론이나 신제형에 대한 권리를 보호받기 위하여 개발이론과 처방법 등에 대한 철저한 대외비를 유지하고 있다. 국내의 농약의 혼합제 개발은 체계화된 이론적 배경, 계통별 특성, 이화학적 성질 등을 근거로 하기보다는 단제로서의 약효 특성만을 기본으로 하여 동시 방제를 목적으로 하는 개발이 주를 이루고 있다. 혼합제 개발은 신농약 개발과 마찬가지로 자원절약적이며 기술집약적인 특성이 강하므로, 자원이 부족하고 고급 인력이 풍부한 우리 나라 여건에 적합한 전략 농업연구분야이다.

농약의 사용으로 인하여 병해충은 저항성이 유발되고 매년 약제의 사용량이 증가되어 방제비용상승과 함께 환경오염에 대한 문제가 대두되고 있으며, 방제를 위한 적절한 약제의 선택에도 어려움을 겪고 있다. 일부 약제들은 혼합을 하거나, 협력제 등을 효율적으로 활용하게 되면 체내 무독화기작에 참여하는 효소의 활성을 조절할 수 있다. 이러한 특성을 잘 응용하면 약제의 저투입으로도 저항성 병해충을 효과적으로 방제할 수 있어 경제성과 함께 환경적, 방제적 측면에서도 이점이 있다. 이렇게 기존 약제의 제형들을 개선하여 약효 향상, 사용편리, 인력절감, 경제성, 환경오염 및 중독 경감 등의 장점이 있는 새로운 제제가 개발된다면, 이는 신물질을 개발하는 것에 준하는 실리를 얻을 수 있을 것이다.

농약산업은 고도의 전문지식과 기술을 요하며 부가가치가 크고 에너지 및 자원절약형 산업이라는 특성 때문에 우수인력이 풍부하고 부존자원이 빈약한 우리 실정에 적합한 분야이다.

## 나. 연구내용

본 연구는 크게 두 개의 세부과제로 구성되어 있는데, 그 중 하나는 기존의 개발된 우수한 약제를 연구하여 그 독성이론을 검토하고, 이를 통하여 높은 선택성, 저독성 Proinsecticide계 약제의 개발하는 것이다. 두 번째 과제의 연구목표는 농약의 무독화 효소에 대한 저해특성을 이용하여 대사 메카니즘을 이해하고, 이를 통하여 효율이 높은 혼합제를 개발하는데 있다. 본 연구과제의 연구범위는 약제의 이론적 연구를 먼저 수행 또는 검토하여 이를 바탕으로 물질을 합성하거나 또는 이론을 바탕으로 약제혼합을 시도하여 활성을 검토하는 것이다. 이러한 연구가 국내의 농약연구자들에게 새로운 약제 또는 새로운 혼합제의 개발을 위한 독성이론 축적과 체계를 세우는데 일조하여 환경친화적 저독성 농약 자체의 개발을 위한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 다. 연구범위

본 과제를 구성하는 2개의 세부과제 연구내용과 범위는 다음과 같다.

### 1) 저독성 살충제 개발

- 선택적 저독성 약제선정 및 독성발현기작연구(주관)
- Lead 화합물의 분자설계 및 합성, 구조동정(주관)
- 생물활성검정(위탁)

### 2) 혼합제 개발

- 혼합제 관련국내외 문헌정보조사(주관)
- 계통별 약제의 무독화 효소활성 저해(주관)

- 상호간의 약효상승작용(주관)
- 혼합제 선정, 제형 시제품(주관/위탁)
- 생물활성 검정 및 포장실험(위탁)

## 제 2절 국내외 기술개발 현황

살충제는 살균제, 제초제와는 달리 급성독성이 강하여 해충뿐만이 아니라 포유동물에 대한 독성이 높아 고독성 또는 맹독성의 분류군에 속할 가능성이 많은 계열의 약제이다. 개발 후에도 상품화과정 뿐만이 아니라 제조, 취급과정, 살포과정에서도 독성문제로 어려움을 많이 겪을 수 있다. 1950년대에 저독성, 저잔류성 살충제의 대표인 Malathion이 개발된 이후 많은 농약 개발관련 연구자들은 탁월한 살충력과 함께 높은 선택성과 저잔류성을 지닌 약제를 개발하기 위하여 해충과 포유동물간의 생리적인 대사작용의 차이를 이용하여 분자를 설계하기 시작하였다. 약제의 target site에 대한 저해력, 차단효과(blocking effects)등에만 즉, 독성이 일어나는 기작 자체에만 관심을 갖고 연구를 하였는데, 최근에는 저독성 농약의 개발을 위한 독성이론과 선택성 이론들에 대한 연구도 동시에 연구를 하면서 biorational method를 통한 높은 선택성 약제들의 설계가 이루어지게 되었다.

선진 농약공업국인 일본, 미국, 서독, 스위스, 영국, 프랑스 등은 신농약 개발을 위한 상당한 수준의 연구가 진행되어 왔으며, 독성이론, 분자설계, 합성기술, 활성검정 그리고 상품화를 위한 활성화된 공조체제가 잘 확립되어 있다. 외국의 대학과 국립 연구소에서는 주로 독성작용기작 연구

(target 연구, 독성발현, 대사, 저항성 연구 등)를 수행하며, 이를 통해 얻어진 이론을 바탕으로한 lead 화합물의 설계, 합성도 일부 진행되고 있다. 개발과 상품화를 위한 합성은 자체 또는 대학 등에서 연구되어진 독성연구를 기초로 하여 산업체연구소에서 본격적으로 이루어지며, QSAR, 분자와 수용기와의 관계 등의 방법을 기초로 활성의 최적화를 유도한다.

최근에 개발된 선택독성이 상당히 향상된 약제로는 Carbosulfan, Benfuracarb, Alanycarb 등의 Procarbamate계 (University of California, Riverside의 T. R. Fukuto가 개념 도입, lead화합물 개발, 최초의 Procarbamate약제인 Carbosulfan 개발-미국 FMC, 일본 Otsuka 화학 등이 상품화)와 Methamidophos의 인축독성을 상당히 경감시킨 Acephate 등의 Phosphoramidate계 등이 있다. 그리고 Imidacloprid 등의 Neonicotinoid계 약제 (일본 I. Yamamoto교수 독성이론, 작용기작연구-일본 Nihon Bayer 합성, 상품화)를 들 수 있으며, 이와 유사약제인 Nitenpyram, Acetamiprid 등이 각각 일본 Takeda사와 Nippon Soda사에서 개발, 상품화되어 시장에서 경쟁을 하고 있다. 한편 미국 University of California, Berkeley의 J. E. Casida 교수 연구실에서도 수년 전부터 Neonicotinoid계 살충제의 개발을 위한 작용기작 연구를 binding study기법을 이용하여 진행하고 있으며, 연구실의 능력으로 보아 수년 내에 새로운 약제의 개발이 기대된다. 또한 아직 상품화가 이뤄지지 않는 않았지만 새로운 target으로 최근 발견된 GABA receptor를 공격하는 탁월한 선택성의 GABA receptor blocker인 bicyclic phosphate계 유도체 [Silyated 1-(4-ethynyl phenyl)-2,6,7-trioxabicyclo [2,2,2] octanes]가 역시 J. E. Casida 연구실에서 binding study와 lead 화합물 합성을 통하여 개발되어, 이 계통의 target과 lead 화합물에 대한 연구도 본격화될 것으로 기대된다. 또한 formamidine계 살충제의 target site인 adrenergic system에 대한 blocking agent의 개발도 formamidine계의 등록

취소(발암성) 이후 새롭게 각광을 받고 있는데, 특히 일본 구주대학의 Kuwano교수 연구실을 중심으로 꾸준하게 연구가 진행 중이다. 결국 새롭게 알려진 target site를 공격하는 신개념의 약제개발, 이미 알려진 target site를 공격하는 약제일지라도 종(species)간의 독성기작(metabolism 포함)등의 차이를 이용한 선택성이 강조된 약제개발의 개념으로 변해가고 있다. 물론 환경 및 인축에 대한 안전성은 엄격하게 적용을 받고 있다. 현대의 새로운 살충제 개발에 대한 연구는 환경친화적인 저독성, 고선택성의 약제 개념으로 완전히 전환되고 있다고 볼 수 있다.

국내에서는 국립기관연구소, 출연연구소, 기업연구소를 중심으로 꾸준하게 합성연구가 진행되어 유기인계 살충제인 KH-502와 피안커 제초제, 카디안 살균제 등이 개발 상품화되었으며, 몇몇 약제들도 상품화를 위한 시도가 진행 중인 것으로 알려져 있다. 주로 제초제를 중심으로 개발연구가 활발히 진행 중이며, 일부에서는 살균제와 살충제도 연구중이다. 또한 미생물 농약과 신제형 개발을 위한 연구도 진행되어 앞으로 국내의 농약연구와 개발은 빠른 속도로 발전할 것으로 판단된다.

현재 국내 연구자들은 신물질 개발에 필수적인 일정 수준의 합성기술을 유지하고 있으며, 합성된 신물질의 활성검정을 위한 체계화된 연구인력과 시설도 충분히 지원되고 있다. 다만 분자설계를 위하여 주로 QSAR에 의존하고 있는데, 이와 병행하여 독성이론, 작용기작, binding study, target 수용체의 3차적 구조, 대사 등에 대한 연구도 진행되어야 효과적인 개발연구가 될 것으로 판단된다.

대학의 농약관련 연구실에서도 합성과 QSAR 그리고 작용기작, 대사 등에 관한 연구가 산발적이지만 지속적으로 진행되고 있으며, 보다 심도있고, 구체적인 연구과제들이 앞으로 많이 계획될 것으로 기대된다. 본 과제의 연구 수행자들은 수년 전부터 농약, 특히 살충제의 활성화과정을 통한 독성발현

에 관한 연구를 수행해 왔으며, 특히 본 연구과제를 통하여 보다 해충과 포유동물과의 체내 활성화를 통한 선택적 독성발현을 유도할 수 있는 분자의 특징과 이러한 분자들의 합성, 활성화 과정 그리고 독성을 발현하는 대사물의 구조 등에 대한 체계적인 연구를 수행하고 있다.

일본 Nihon-Bayer사에서 개발되어 상품화된 Neonicotinoid계 살충제인 Imidacloprid는 기존의 동일한 target site를 공격하는 니코틴 계열과 Nereis toxin 관련약제와는 차별화된 독특한 독성기작을 보이고 있다. 이 계열의 약제는 기존의 일본 살충제시장의 패턴을 바꾸어 놓을 정도로 높은 시장 점유율을 보였으며, 그 후 일본과 미국, 유럽 중심의 다국적 기업들이 앞다투어 Nitenpyram, Acetamiprid 등의 유사한 경쟁약제들을 개발하여 상품화시키고 있다.

최근에는 methamidophos에 acyl기가 치환되어 수십에서 수백 배의 선택 독성이 유도된 유기인계 Proinsecticide화합물인 Acephate의 상품화되어 이에 대한 선택독성 메카니즘을 이해하기 위한 연구가 미국의 몇몇 연구실에서 진행되고 있다. Methamidophos는 곤충에 대하여는 강력한 살충력이 있어 흡즙, 심식해충 방제에 효과적인 약제이다. 그러나 이 약제가 지니는 높은 인축독성으로 인하여 그 사용에 제약을 받아 왔는데, 이 약제분자의 질소원자에 단순히 acyl기를 수소 대신 치환하여 설계한 Acephate의 경우 살충력은 거의 그대로 유지한 반면, 인축독성은 수십배까지 경감시키는 탁월한 선택성을 유도하게 되는 특성을 보인다. 이러한 유용한 독성기작 이론이 다른 Proinsecticide약제의 설계에 응용될 수도 있는 가능성이 상당히 높아 약제의 특성에 따라 작용기작과 선택성에 관한 연구 결과들 그리고 이러한 연구과제를 위하여 수행되었던 분자설계관련 예비실험 결과들을 정리하여 본격적인 연구를 수행하게 되면 선택성이 탁월한 새로운 약제의 개발 가능성도 높은 것으로 많은 연구자들은 판단하고 있다.

혼합제의 개발은 우선 혼합 대상약제들 간의 물리, 화학적으로 영향을 주지 않아야 하기 때문에 약제 선택에 주의를 기울여야 한다. 혼합제의 개발은 동시에 다양한 병해충을 방제 할 수 있어 방제시간, 횡수와 노동력 절감 등 생력형 농업이 요구되는 현대 농업패턴에 잘 부응하는 농업자재이다. 최근에는 단순하게 2종 이상의 약제를 혼합하여 addition효과만을 기대하기보다는, 서로 작용기작 측면에서 보완적이거나 또는 서로의 약효를 상승시킬 수 있는 synergism효과를 기대할 수 있도록 처방을 하는 경향이 강하다. 예를 들어 막대한 연구비와 인력을 통하여 개발된 농약이 몇 년 후 저항성이 생겨 목적하는 해충의 방제가 어려울 경우 1차 적으로는 약제의 사용량을 증가해야 하고, 이러한 과정에서 비용문제, 환경오염문제 등이 대두될 수 있다. 심한 경우에는 약효상실로 인한 약제의 상품성에 문제가 제기되어 사장되는 상품으로 전락되는 경우도 있다. 그러나 농약을 무독화 시키는 저항성 해충체내 효소의 활성을 저해하는 다른 약제와 혼합을 할 경우, 두 약제의 각각의 방제효과를 얻는 동시에 저항성으로 사용의 제약이 있는 약제의 약효도 증진되어 여러 가지 경제적, 환경적, 방제적 이점을 얻을 수 있다. 예를 들어 저독성 농약의 대표적 약제인 Malathion이 근래에는 저항성 유발로 인하여 사용제한을 받아 왔는데, 전혀 다른 작용을 하는 살균제 Kitazin-P와의 혼합을 통하여 약효상승효과를 얻어 Malathion의 활용을 유도하였다. 살균제 Kitazin-P는 살균력 이외에도 Malathion을 무독화시키는데 참여하는 carboxylesterase를 비롯하여 GSH/GST등을 저해하는 것으로 수년 전부터 보고되어 왔는데, 연구자들은 이러한 결과를 혼합제의 개발이론으로 응용한 것이다. 이 결과는 수년 전 일본에서 시도되어 성공한 예이다.

외국에서는 각 약제의 생체 내에서의 활성에 근거를 두어 혼합제 개발은 시도하고 있는데, 국내에서는 아직도 기초 독성이론을 고려하지 않고 무작위로 혼합, 시제품 제조, 활성검정의 과정을 거치면서 개발을 시도하고 있

다. 이러한 방법은 상당한 시간과 비용 그리고 인력의 낭비를 요구하며 효율도 떨어지는 방법이다. 혼합제 개발의 이면에는 우리가 인식하지 못하는 이론적 배경들이 있을 것으로 판단된다. 우선은 외국에서 성공한 혼합제들의 기초이론을 면밀하게 분석하여 이론정립을 시도하고, 이를 통하여 우리나라의 농업현장에 맞는 약제들을 선정하여 가능성을 검토한 후 새로운 혼합제 개발을 시도할 수 있을 것이다. 이미 국내의 대학 연구실에서는 체내 효소들, cytochrome P450, esterases, glutathione/glutathione-S-transferase (GSH/GST) 등의 대사에 관여하는 효소들에 대한 다양한 연구가 시도되고 있어, 이러한 기술에 carboxylesterase, amidase 등 몇 가지 효소들에 대한 활성검정 기법을 추가하여 각 약제들의 효소의 활성(induction, inhibition)에 대한 특징을 정립하고, 약제의 계통을 분류하게 되면 새로운 혼합제 개발에 대한 이론적적과 개발 가능성이 높을 것으로 기대된다.

### 제 3절 연구결과

#### <제 1 세부과제> 저독성 Proinsecticide계 살충제의 개발

##### 1) 작용기작연구(주관)

Proinsecticide계 살충제의 독성발현기작 연구는 1, 2년 차 연구에서 carbosulfan, furathiocarb, benfuracarb, PSC 등 약제에 대하여 체계적이고 집중적인 연구를 수행하였으며, 고선택성 약제들이 체내 대사를 통하여 독성물질로 발현되는 과정을 이해하였다. Proinsecticide에 대한 이러한 체계적인 독성발현기작연구 결과는 국내외에 처음 보고되는 결과이며, 앞으로 새로운 화합물들의 분자설계에 응용할 수 있을 것이다.



## 2) 합성(주관) 및 생물활성(위탁)

2년 차 연구 중반부터 진행된 새로운 Proinsecticide계 살충제의 개발을 위한 분자설계, lead 화합물의 선정은 크게 두 방향으로 수행하였다. 첫째는 Procarbamate계열로서 시험약제였던 N-dialkoxy phosphinothioyl carbofuran(PSC)의 약점을 보완한 새로운 구조로서 carbofuran의 질소원자에 다양한 치환기를 갖는 새로운 화합물들이 합성, 정제, 구조결정되었다. 높은 살충활성을 보인 화합물들이 많이 선발되었으며, 상품화된 약제인 Carbosulfan의 활성에 준하는 우수한 화합물도 일부 합성되었다. 특히 이 화합물들의 선택독성을 검정하기 위하여 수행된 포유동물 독성실험에서 저독성, 고선택성이 확인되어 제 1세부과제 연구의 큰 성과로 판단되었다. 둘째는 저독성, 고선택성인 imidacloprid 화합물의 유사체 개발은 현재 독성이론을 바탕으로 설계된 분자구조의 합성방법이 확립되어 다양한 구조의 화합물들이 합성, 구조 동정되어 생물활성검정이 수행되었다. 일부 화합물에서 난방제 해충인 담배거세미 나방에 대한 활성을 보였으며, 높은 살균효과를 나타내는 성과도 얻었다.

### <제 2 세부과제> 환경친화형 혼합제 개발

#### 1) 약제의 무독화 효소 저해(주관)

체내의 중요 무독화 효소인 monooxygenase(MFO), glutathione-s-transferase(GST), amidase, cytosolic esterase, carboxylesterase에 대한 농약들의 저해경향 연구를 3년 차에 걸쳐 성공적으로 마무리하였다. 그 동안 국내에서 입수 가능한 저해제(6종)을 포함하여 살충제(76종), 살균제(31종)의 총 107종의 농약원제들을 모두 입수하여 5종의 대사효소에 대한 저해경향

검정을 최종 완료, 정리하였다. 국내에서 사용되고 있는 주요 농약들(107종)의 무독화효소 저해경향에 대한 종합적 결과는 본 제 2세부과제 수행을 통하여 얻어진 중요한 연구결과이다. 이 결과는 국제적으로 처음 시도된 종합적인 연구성과로서 앞으로 약제들의 대사효소에 대한 특성을 이해하고, 이를 바탕으로 한 혼합약제의 선택에도 크게 활용될 수 있을 것이다.

## 2) 혼합약제의 생물활성(주관/위탁)

위의 연구 결과와 이미 보고된 약제들의 대사기작에 대한 이론을 바탕으로 혼합 약제를 선정하였으며, 이들에 대한 생물활성검정 결과를 얻었다. 효소저해 실험결과를 바탕으로 살충제+살충제, 살충제+살균제 혼합약제를 선정, 생물활성 검정을 수행한 결과 선발약제 대부분에서 우수한 상승효과를 얻었다. 특히 실내실험을 통하여 선발된 혼합약제의 최적비율실험을 통하여 혼합비율을 결정하고, 이를 근거로 혼합제의 시제품 제형(경농 중앙연구소)을 제조하였다. 개발된 혼합제형 중 Phenthoate+Benomyl (24+6 WP) 혼합제의 포장실험에서의 효과는 기대이상으로 탁월(대조약제인 비티수화제 대비)하여 실용화가 가능(위탁 연구기관인 (주)경농 중앙연구소와 협의 결과)한 것으로 판단되었다. 본 연구결과는 앞으로 국내 기업들이 저투입 환경친화형 혼합제 개발 과정에서 활용할 수 있는 중요한 이론적 모델을 제시한 것으로 평가한다.

## 제 4절 연구개발 달성도 및 활용방안

### 가. 연구개발 목표의 달성도

1) 상품화된 Proinsecticide계 살충제에 대한 독성발현기작연구는 초기 2년간에 걸쳐 집중적으로 연구되었으며, target enzyme인 AChE 또는 BuChE에 대한 bimolecular inhibition rate constant( $k_i$ ), 활성화기구를 이용한 mfo/AChE coupling system, 활성화과정 조절을 통한 쥐 뇌 AChE 저해 실험, 무독화효소에 의한 대사실험 등 다양하게 수행되었다. 독성발현기작을 이해하기 위한 연구결과는 만족스러웠으며, 연구의 진척은 계획된 연구일정 준하여 순조롭게 진행되어 마무리되었다.

2) 저독성 Proinsecticide계 살충제 개발은 분자설계, 합성, 정제, 구조 동정, 생물활성 등의 과정을 거쳤으며, 크게 carbofuran의 alkylalkoxyphosphinothioly 유도체 계열과 chloronicotinyll계열 화합물들에 대한 연구를 하였다. Procarbofuran계열의 경우 설계, 합성된 거의 모든 화합물에서 양호한 살충력을 보였다. 이 연구를 통하여 이미 상품화된 약제만큼의 높은 활성을 보이는 몇 종의 새로운 화합물들을 얻었으며, 특히 포유동물에 대한 높은 선택독성 확인은 독성발현기작 이론을 활용한 본 세부과제의 연구 중 큰 성과로 인정되었다. 일부 chloronicotinyll계 화합물에서는 높은 살균활성을 보여 살균제 개발 가능성을 보이기도 하였다.

3) 국내 입수 가능 농약원제 107종의 무독화 효소(mfo, amidae, esterase, carboxylesterase, glutathione-s-transferase)에 대한 각각의 활성 저해특성을 검정하였다. 원제 입수과정에 어려움은 있었지만 최대한의 원제 종류를 확보하여, 2년여에 걸쳐 방대한 분량의 연구를 수행하였다. 연구결과는 국제 학회에서 많은 연구자들이 관심을 보일 정도로 높은 가치가 높은

것으로 평가되고 있다.

4) 무독화효소 활성저해특성 결과와 약제의 무독화 과정을 고려하여 혼합제를 선발하였으며, 이를 통하여 실내, Pot, 포장시험을 수행하였다. 많은 혼합약제에서 뚜렷한 상승효과를 보였으며, 특히 포장시험의 경우 Phentoate+Benomyl(24+6 WP) 혼합제에서 저투입, 환경친화형 혼합제의 개발 가능성이 확인되어 실용화 가능성이 매우 높았다. 혼합제형의 시제품 제조는 (주) 경농 중앙연구소 농약제제실(이창혁 과장)에서 무상으로 제작해주었다.

5) 생물활성검정은 (주) 경농 중앙연구소 (소장: 유용만 박사)에 위탁 과제로 주로 수행하였으며, 검정에 필요한 곤충(5종)들을 계대 사육하며 생물활성을 진행하였다. 필요에 따라 6종의 식물 병원균에 대한 살균활성실험도 수행하였다. 위탁기관과 유기적인 협조체제로 연구가 잘 진행되어 기내 실험에서부터 Pot실험, 포장실험까지 연구계획에 준하여 순조롭게 진행되었다. 필요시 주관연구기관의 연구원과 연구보조원들이 위탁연구기관을 직접 방문하여 필요한 연구를 수행하였다.

#### 나. 연구개발 결과의 활용

1) 우수한 화합물 또는 혼합제에 대하여는 물질특허, 제법특허 및 용도특허를 국내외에 출원한다.

2) 개발된 신약제와 혼합제제방법을 관련 산업체에 기술이전하여 상품화를 시도한다. 국내 농약업체와의 공동연구를 추진하여 상호 습득한 기술과 Know-how를 교류한다.

3) 독성학적 이론과 분자설계, 유도체 합성 등을 통하여 축적된 이론과 경험을 타 약제의 개발에 응용하여, 신농약 개발을 위한 자립도를 향상한다.

4) 합성에서 제제 시험, 실용화 방안까지 신농약개발연구에 실질적인 대학 연구실의 참여경험과 역할분담이 확보되어, 기초독성이론 연구와 양질의 농약전문인력 배양에 기여한다.

5) 혼합제 처방 가능성을 예측하고, 혼합제의 환경친화형 제형을 개발하여 환경약효의 지속성과 약효의 상승효과로 인한 약제의 살포량 및 횟수를 경감시켜 생력화가 가능하게 한다.

6) 연구결과는 보고서를 주요 도서관에 배부하여 신농약과 혼합제를 개발하고자하는 기업의 참고자료가 되게 한다.

7) 축적된 독성이론과 개발경험을 학회와 논문발표를 통하여 전문가들에게 공개하여 다른 약제의 개발에 활용하도록 한다.

8) 신농약과 혼합제형이 개발되어 상품화까지의 전과정에 대한 충분한 경험이 취약한 국내 농약산업체에 신물질, 새로운 혼합제가 지니는 높은 부가가치를 경험할 수 있는 기회를 제공한다.

9) 저독성, 저잔류성의 선택성 신농약과 환경친화형 제제의 개발은 우리나라 농약연구와 농약산업의 선진화에 기여한다.

## 제 2장 저독성 Proinsecticide계 살충제의 개발 분야

## 제 1절 서 설

일반적으로 carbamate계 살충제는 유기인계 살충제보다 낮은 포유동물 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 몇몇 carbamate계 살충제, 예를 들면 carbofuran, porpoxur, aminocarb, aldicarb, methomyl, oxamyl 등은 높은 포유동물 독성을 나타내어 보다 안전성을 개선한 제품의 개발이 요구되었다.

각국의 연구자들은 이와 같은 carbamate계 살충제들의 곤충에 대한 독성은 그대로 유지시키면서 포유동물 독성을 경감시키기 위한 여러 각도의 연구를 진행하던 중, *N*-methylcarbamate ester의 질소원자에 다른 이탈기를 치환시켜 뛰어난 선택성을 보이는 새로운 개념의 약제들을 개발하기 시작하였다. 이러한 약제들은 그 자체로는 AChE에 대한 저해력은 없으며, 체내에서 화학적 또는 생화학적 변화의 과정을 겪으며 독성이 큰 물질로 전환된 후 독성을 나타내었기에 'Procarbamate'라고 명명되었다.

Procarbamate 약제의 설계에 nitrogen-sulfur 결합을 고안해 낸 이후, aryl-sulfonyl 또는 alkylsulfonyl, aminosulfonyl 등의 nitrogen-sulfur 또는 nitrogen-sulfur-nitrogen 결합을 갖는 약제들이 다수 개발되었다. 현재까지 상품화된 procarbamate계 약제는 aminosulfonyl 계열이 대부분이며, 대표적인 약제는 furathiocarb, carbosulfan, benfuracarb, alanycarb 등이 있다.

많은 연구자들은 이러한 procarbamate계 약제가 어떠한 대사과정을 통하여 곤충과 포유동물에 대한 선택적 독성을 나타내는지에 대하여 연구를 해왔다. 집파리와 식물체를 이용한 carbosulfan의 대사실험에서 carbosulfan의 주된 대사물은 모화합물인 carbofuran, 3-OH-carbofuran, 3-keto-phenol 및 phenol 등이라는 것을 밝혀냈으며, carbosulfan이 쥐에서 2가지의 일차적인 대사과정에 의해 대사된다는 것이 보고되었다. Carbosulfan은 sulfur의 산화반응

에 의해 carbosulfan-sulfone으로 전환된 후 마지막에는 sulfamide를 형성하여 무독화되며, 다른 한편으로 nitrogen-sulfur 결합이 끊어져 carbofuran으로 전환된다. 또한 carbosulfan이 pH 5 미만의 산성조건하에서 빠른 속도로 carbofuran으로 전환됨을 확인하고, carbosulfan을 쥐에 경구투여한 후 위(stomach)에서의 대사물을 확인한 결과 주된 화합물이 carbofuran polysulfide임을 확인하였으며, *in vitro*의 산성조건에 비하여 *in vivo* 조건에서는 carbosulfan이 carbofuran으로 매우 느리게 전환되며, carbofuran으로의 대사를 또한 상당히 낮은 수준이었다고 보고되어 있다. 집파리에 대해서 carbosulfan의 대사실험 결과 nitrogen-sulfur 결합이 끊어져 모화합물인 carbofuran으로 전환된다고 보고되어 있다. 그러나 어떠한 효소에 의해서 대사되는지에 대한 연구결과는 전무한 실정이다.

유기인계 약제가 곤충에서 *mfo*에 의한 desulfuration을 통해 독성이 강한 화합물로 전환되면서 인 원자가 쉽게 친핵체에 의해 공격을 받을 수 있다는 것에 착안하여, *N*-methylcarbamate의 질소원자에 유기인계를 치환시킨 *N*-dialkoxyposphinothioyl 유도체의 합성이 시도되었다. *N*-Dialkoxyposphinothioyl 유도체는 ChE에 대한 저해능력이 모화합물인 *N*-methylcarbamate계 약제보다 낮으며, 곤충과 포유동물에 선택독성이 있음이 밝혀졌다. Phosphinothioyl 기를 갖는 약제와 *mfo*를 저해하는 piperonyl butoxide를 혼합처리하였을 때 살충력이 현저하게 저해됨을 확인하였으며, 따라서 phosphinothioyl 기를 갖는 procarbamate계 약제는 *mfo*에 의해 활성화될 것이라 제안되었다. *N*-Dialkylphosphinothioyl 유도체는 곤충체내에서는 desulfuration이 일어난 후 산화와 가수분해 작용을 받아 carbofuran으로 전환되어 독성을 발휘하고, 포유동물체내에서는 무독한 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol(7-OH), 3-hydroxycarbofuran phenol 및 3-keto-carbofuran phenol로 전환되어 무독화되며, 곤충과 포유동물에 선택독성을 나타낸다는 것이 여러 연구자들에 의해 밝



혀졌다.

그러나 이러한 procarbofuran의 질소원자에 치환된 이탈기가 곤충체내에서 선택적으로 끊어지는 정확한 작용기작에 대해서는 아직까지 구체적인 연구보고가 없는 실정이다.

본 연구는 국내에 등록되어 있는 procarbamate계 살충제 중 분양받을 수 있었던 procarbofuran계인 carbosulfan, benfuracarb, furatiocarb 등의 *N*-sulfenylated carbofuran과 화학적 산화방법을 이용하여 그 활성화 과정이 일부 연구되어진 carbofuran의 *N*-dimethoxyphosphinothiyl 유도체를 합성하여 cytochrome P<sub>450</sub>, GST/GSH에 의한 활성화 과정을 통한 procarbofuran의 독성 발현 기작을 조사하였다.

선행 연구를 바탕으로 procarbamate계 살충제인 carbosulfan, furathiocarb, benfuracarb 등과 함께 carbofuran의 *N*-dialkoxyposphinothiyl 유도체(PSC)를 중심으로 작용기작을 검토하고, 이를 바탕으로 PSC의 alkoxy기를 다른 작용기로 바꾸면서 질소원자와 인원자 사이의 결합이 곤충 체내에서 쉽게 끊어지도록 유도한 화합물을 합성하였다. 특히 procarbamate계 살충제의 선택적 독성기작, 특히 활성화 과정(bioactivation process)의 원리를 응용하여 새로운 약제의 설계와 합성을 시도하였다. 분자설계된 새로운 procarbofuran계약제(lead 화합물)의 합성방법을 확립하여 대표적인 화합물들을 합성하고, 생물검정을 수행하였다.

또한 일본에서 개발되어 사용되고 있는 새로운 작용기작을 갖는 약제인 imidacloprid의 독성이론에 근거하여 imidacloprid의 amine기를 phosphoyl기로 치환하여 nAChR의 active site에 결합하는 결합길이가 5.9Å보다 약간 긴 화합물을 설계하였다. 설계된 새로운 neonicotinoid계약제(lead 화합물)의 합성방법을 확립하여 대표적인 화합물을 합성하고, 생물검정을 수행하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. Proinsecticide계 살충제의 독성발현기작 연구

#### 가. 공시약제의 합성 및 순도확인

국립농업자재검사소에서 분양받은 carbofuran(76%), (주)경농에서 분양받은 carbosulfan(86.8%), (주)동방아그로에서 분양받은 benfuracarb(90.2%), (주)동양화학에서 분양받은 furathiocarb을 정제해서 사용하였다. 시험약제인 *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbofuran(PSC)는 합성하여 사용하였으며, 합성은 <그림 1>의 경로를 거쳤다. 합성된 PSC는 <sup>1</sup>H-NMR(DPX 400, BRUKER, U.S.A.) spectrometer와 GC/MS spectrometer(MS-QP 1000A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 구조를 확인하였다. Carbofuran은 재결정을 사용하였고 나머지 약제는 column chromatography법으로 정제 하였으며, 정제된 약제는 HPLC(LC10A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 순도를 결정하였다.

#### 나. ChE에 대한 이분자 저해속도 상수 ( $k_i$ ) 측정

이분자 저해속도 상수를 측정하기 위하여 Ellman(1961)의 분석방법을 이용하였다. 5ml 시험관에 전기뱀장어 acetylcholinesterase(AChE, electric eel, V-S type, 1,000 units/mg protein, Sigma Chemical Co.,

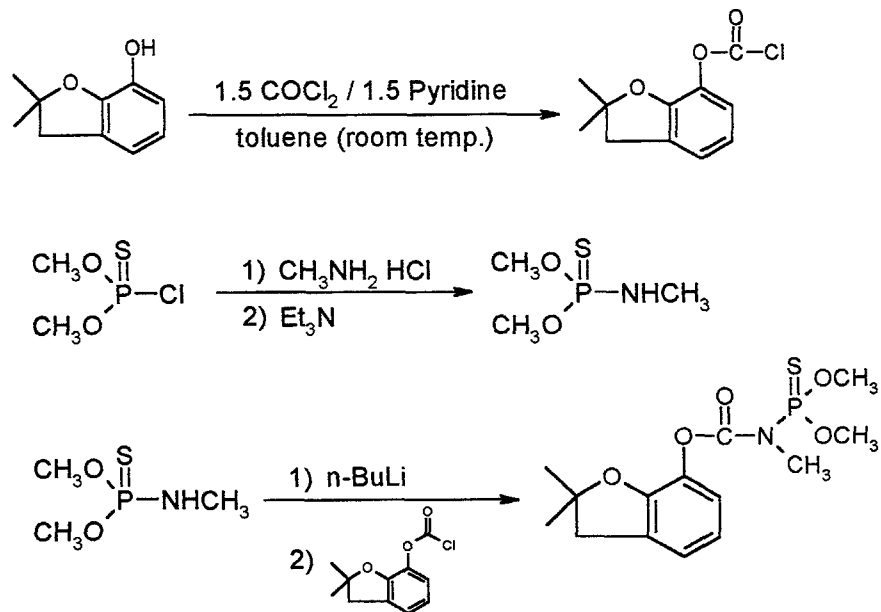


Figure 1. Synthetic scheme of *N*-dimethoxyphosphinothiyl carbofuran(PSC).

U. S. A.) 또는 말혈청 butyrylcholinesterase(BuChE, horse serum, 1,000 units/mg protein, Sigma Chemical Co., U. S. A.) 4 units와 carbofuran 및 procarbofuran( $10^{-1} \sim 10^{-8}M$ )  $5\mu\text{l}$ 씩을 넣고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)로 최종부피 3ml로 한 다음 37°C의 항온수조에서 반응시켰다. 기질인 0.1M acetylthiocholine iodine(ASChI, Sigma Chem. Co., U. S. A.) 또는 butyrylthiocholine iodine(BuSChI, Sigma Chem. Co., U. S. A.) 용액 0.1ml와 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB, Sigma Chem. Co., U. S. A.)용액 [DTNB 0.38g,  $\text{NaHCO}_3$  0.15g, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6) 100ml] 2.8ml가 담겨진 cuvette에 효소반응액 0.1ml을 넣고 2분 간격으로 UV-visible spectrophotometer(U-3210, Hitachi Co., Japan)로 412nm에서 효소활성을 측정하였다. Carbofuran 및 procarbofuran들의 AChE 및 BuChE에 대한  $k_i$ 값은 Aldridge(1950)의 방법으로 계산하였다.

#### 다. AChE/mfo coupling system을 이용한 활성화 효과(*in vitro*)

Cytochrome P<sub>450</sub>에 의한 활성화 효과는 cholinesterase (ChE)/mixed function oxidase(mfo) coupling system에서 Ellman(1961) 방법을 이용하여 관찰하였다. Microsomal protein 0.1mg, cytochrome P<sub>450</sub>의 cofactor인  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADPH, Sigma Chem. Co., U. S. A.) (+)(-)  $67\mu\text{M}$ , cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 piperonyl butoxide(PBO, Fluka Chem. Co., Switzerland) (+)(-)  $100\mu\text{M}$ , AChE 또는 BuChE 4 units과 acetone에 녹인 carbosulfan, furathiocarb, benfuracarb, PSC( $10^{-1}M \sim 10^{-8}M$ )  $5\mu\text{l}$ 를 넣

고, 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.6)로 3ml 부피를 만들었다. Carbofuran 처리구는 30분, Carbosulfan 또는 PSC 등 Procarbofuran 처리구는 10분간 37°C에서 각각 반응시킨 후, 반응액 100 $\mu$ l를 취하여 Ellman(1961)의 방법을 이용하여 AChE 또는 BuChE의 활성을 측정하였다.

#### 라. 생쥐 brain AChE에 대한 독성발현(*in vivo*)

활성화를 통한 Procarbofuran 약제들의 독성발현을 관찰하기 위하여, propylene glycol(J. T. Baker, U. S. A.)에 녹인 carbosulfan, benfuracarb 또는 PSC를 0, 20, 50, 70, 100, 150, 180mg/kg의 수준으로 생쥐에 복강투여하였다. 약제투여 1시간 후 뇌를 취하여 100mg당 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.6) 1ml를 넣고 균질마쇄한 후 2000g에서 15분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 단백질 정량(Bradford, 1976)을 한 후 2mg의 soluble protein을 취하여 Ellman(1961) 방법으로 AChE의 활성을 측정하였다. Cytochrome P<sub>450</sub>의 저해효과를 살펴보기 위하여 PBO를 200mg/kg으로 복강투여하고 1시간 뒤 carbosulfan, benfuracarb 또는 PSC를 다시 투여한 후, 위와 동일한 방법으로 뇌를 추출하여 AChE의 활성을 측정하였다.

#### 마. 대사반응을 통하여 생성된 독성 대사물의 분석

Procarbofuran계 살충제인 carbofuran, benfuracarb 시험약제인 PSC가 cytochrome P<sub>450</sub> 또는 GST/GSH에 의하여 모화합물인 carbofuran으로 전환되어 독성을 발현하는 것으로 가정하여, procarbofuran이 *in vitro*의 microsomal oxidase system(MFO system), glutathione-S-transferase /glutathione system(GST/GSH system), MFO/GST/GSH combination system에 의하여 carbofuran으로 전환되는 것을 HPLC로 분석하였다.

MFO system에 의해 carbofuran으로 전환되는 실험은 procarbofurans ( $10^{-1}$ M,  $100\mu\text{l}$ )과 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)만을 넣은 Blank, cytochrome P<sub>450</sub>을 함유하는 microsomal protein 1.0mg을 첨가한 Control, cytochrome P<sub>450</sub>의 cofactor인 NADPH( $5 \times 10^{-2}$ M,  $100\mu\text{l}$ )를 첨가한 Oxidase 처리구, 그리고 PBO( $1 \times 10^{-1}$ M,  $100\mu\text{l}$ )를 처리한 Oxidase+PBO 처리구의 4개 처리구로 나누어 실험을 수행하였으며, 최종 부피는 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)를 이용하여 10ml가 되도록 하였다. 위의 각 처리구를 37°C에서 30분간 항온반응 시킨 후 이 용액을 50ml분액여두에 옮겨 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20ml를 넣고 진탕 추출하여, procarbofurans와 전환된 carbofuran을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층으로 분배시켰다. 이것을 감압농축하여 n-hexane 10ml로 정용한 후 HPLC로 분석하였다.

GST/GSH system에 의해 carbofuran으로 전환되는 실험은 procarbofurans  $10^{-1}$ M, cytosolic esterase protein 0.5mg을 넣고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)용액으로 최종부피를 10ml로 하는 GST(glutathione-S-transferase,  $6 \times 10^{-3}$ M) system과 GST의 co-substrate인 glycine, cysteine 및 glutamic acid의 잔기가 결합되어 tripeptide를 형성하는 GSH(glutathione)만을 넣은 GSH system, GST+GSH가 결합된

combination system, GSH의 고갈제인 diethyl maleate를 처리한 GST+GSH+DM system을 각각 37°C에서 30분간 항온반응한 후 MFO system에서 사용한 추출법을 이용 추출하였다. 추출물은 감압농축하여 10ml의 n-hexane으로 녹이고 HPLC로 분석하였다.

MFO/GST/GSH combination system에 의해 carbofuran으로 전환되는 실험은 procarbofurans  $10^{-1}M$ , microsomal protein 1mg, cytosolic esterase protein 0.5mg을 넣고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)로 최종부피 10ml로 한 system, NADPH( $5 \times 10^{-2}M$ )를 첨가한 MFO system, PBO( $1 \times 10^{-1}M$ )을 첨가한 MFO+PB system, NADPH 대신 GST의 co-substrate인 GSH( $6 \times 10^{-3}M$ )를 처리한 MFO+GST+GSH system, GSH의 고갈제인 DM( $1 \times 10^{-2}M$ )을 처리한 MFO+GST+GSH+DM system, GST/GSH system 과 MFO system을 모두 포함하는 MFO+GST+GSH+NADPH combination system을 각각 37°C에서 30분간 항온반응한 후 MFO system에서 사용한 추출법을 이용 추출하였다. 추출물은 감압농축하여 10ml의 n-hexane으로 녹이고 HPLC로 분석하였다.

Carbosulfan, benfuracarb, PSC 그리고 carbofuran의 HPLC 분석(LC10A, Shimadzu Co., Japan)은 순상컬럼( $\mu$ Bondpack silicagel, U.S.A.)을 사용하여 285nm에서 행하였다. 이동상 용매는 carbofuran과 carbosulfan, benfuracarb 또는 PSC의 최적분리를 위하여 hexane : ethylacetate의 8:2(v/v)와 7:3(v/v) 혼합용매를 각각 사용하였다. 정제된 carbosulfan, benfuracarb, PSC 그리고 carbofuran을 각각 n-hexane으로 1, 3, 5, 10, 20  $\mu g/l$ 로 조제하여 분석하고, 표준품의 농도와 면적을 기준하여 검량선을 작성한 후, 시료를 정량분석하였다.

## 2. 저독성 proinsecticide계 살충제의 개발 연구

### 가. Procarbamate계 살충제 합성

#### 1) 분자설계 근거

독성발현기작의 시험약제였던 *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbofuran(PSC) 분자구조의 문제점을 보완하기 위하여, 치환기인 phosphorus 기를 체내 활성화과정을 통하여 효율적으로 탈리될 수 있는 분자로 재설계 하였다. 분자설계의 근거는 phosphorus 원자에 alkoxy기가 있을 경우 보다 oxygen이 없는 alkyl기가 있을 때 phosphorus 원자는 더  $\delta^+$ 를 갖으며 (Fukuto *et al.*, 1959. J.A.C.S., 81:372-377; Fukuto *et al.*, 1959. J. Econ. Entomol., 52:1121-1127), 이 경우 mfo에 의하여 산화된 oxon(P=O)형태가 비교적 쉽게 친핵체(GSH 등)에 의하여 기존의 PSC 보다 carbofuran 으로의 전환이 용이 할 것으로 예상 하였다. 다른 유기인계 살충제의 경우에서와 마찬가지로 alkoxy기(phosphate)의 alkyl기(phosphonate)로의 치환은 포유동물에 대한 저독성은 그대로 유지되는 반면 곤충에 대한 독성은 선택적으로 증가시킬 것으로 기대되었다. 또한 PSC의 인(P)을 포함하는 치환기의 phosphinothioyl(P=S)기는 PSC의 곤충과 포유동물간의 선택성을 유도할 수 있도록 본 연구에서도 그대로 유지시켰다.



## 2) *N*-Phosphinothioyl carbofuran 유도체의 합성

Procarbamate계 살충제인 carbosulfan, furathiocarb, benfuracarb 등과 함께 carbofuran의 *N*-dimethoxyphosphinothioyl 유도체(PSC)를 중심으로 작용기작을 검토하고, 이를 바탕으로 PSC의 alkoxy기를 다른 작용기로 바꾸면서 질소원자와 인원자 사이의 결합이 곤충 체내에서 쉽게 끊어지도록 유도하기 위한 연구가 우선적으로 수행되었다. Procarbamate계 살충제의 선택적 독성기작, 특히 활성화 과정(bioactivation process)의 원리를 응용하여 새로운 약제의 설계와 합성이 시도되었다. 분자설계된 새로운 Proinsecticide계약제(lead 화합물)의 합성방법을 확립하여 대표적인 화합물들을 합성하고, <sup>1</sup>H-NMR, 질량분석기 등을 사용하여 분자구조를 동정, 생물검정을 수행하였다.

### 가) 합성법 및 합성

**2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuran-7-yl chloroformate:** 둥근 바닥플라스크(500ml)에 toluene 150ml와 phosgene 0.15mole(14.84g)를 넣은 후 toluene 50ml로 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol 0.1mole (16.02g)과 pyridine 0.15mole(11.87g)을 각각 용해하여 100ml dropping funnel을 이용 반응용기에 가했다. 실온에서 6시간 반응시켜 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuran-7-yl chloroformate(carbofuran chloroformate)를 합성하였다. 합성된 carbofuran chloroformate는 물과 methylene chloride를 이용하여 salt를 제거한 후 30℃에서 n-hexane에 녹인 후 -29℃에서 재결정하여 다음 반응에 사용하였다. Diphosgen 및

triphosgen 반응도 위의 방법에 준하여 합성하였고, 용매는 dichloromethane 을 사용하였다.  $^1\text{H-NMR}(\delta, \text{CDCl}_3/\text{TMS}) : 1.49(\text{s}, 6\text{H}), 3.05(\text{s}, 2\text{H}), 6.75\sim 7.08(\text{m}, 2\text{H})$ .

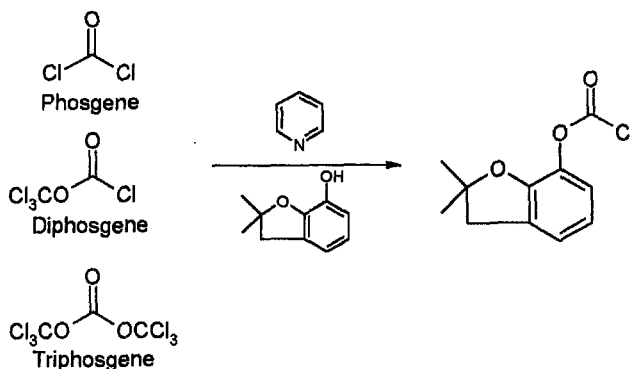


Figure 2. A synthetic scheme of 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl chloroformate.

**Methylphosphonothionic dichloride:** 둥근바닥플라스크(500ml)에 dimethyl methylphosphonate 0.5mole(62.04g)을 넣은 후 0℃(ice bath)를 유지한 상태에서 250ml dropping funnel을 이용하여 thionyl chloride 1.25mole (148.73g)을 반응용기에 가했다. 10분간 교반한 후 syringe를 이용하여 *N,N*-dimethylformamide 0.005mole(0.37g)을 반응용기에 가했다. 이후 200℃를 유지하며 환류시켜 methylphosphonic dichloride를 합성하였다. 둥근바닥 플라스크(100ml)에 합성된 methylphosphonic dichloride 0.3mole(39.87g)과 phosphorus pentasulfide 0.06mole(13.34g)을 넣은 후 50℃에서 1시간, 100℃에서 1시간, 150℃에서 1시간, 200℃에서 6시간 반응시켜 methylphosphonothionic dichloride를 합성하였다. 위 반응시간이

methylphosphonothionic dichloride를 합성하기 위한 가장 좋은 조건이었으며, 급격히 온도를 올리면 polymer형태로 전환되는 것을 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}(\delta, \text{CDCl}_3/\text{TMS}) : 2.76\sim 2.84(\text{d}, 3\text{H})$ .

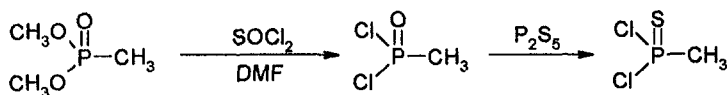


Figure 3. A synthetic scheme of methylphosphonothionic dichloride.

**Dimethylphosphonothionic chloride** : Condenser가 장치된 2구 둥근바닥 플라스크(50ml)에 4500.0mg(40mmole)의 dimethylphosphinic chloride와 13.34g(0.06mole)의 phosphorus pentasulfide를 넣은 후 질소 가스로 충전하였다. 실온에서 30분간 교반한 후, 50°C에서 1시간, 100°C에서 1시간, 150°C에서 1시간, 200°C에서 6시간 교반하였다. 반응이 종결된 후 vacuum distillation장치를 이용하여 순수한 dimethylphosphonothionic chloride를 분리하였다.

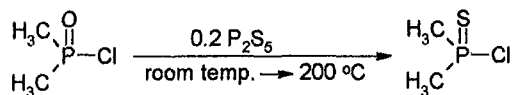


Figure 4. A synthetic scheme of dimethylphosphonothionic chloride.

***N*-Dimethoxyphosphinothioyl carbofuran**: 둥근바닥플라스크(250ml)에 THF 120ml, dimethylchlorothiophosphate 0.1mole(16.1g), methylamine hydrochloride 0.1mole(6.75g)를 넣은 후 반응용기 내부를 질소로 충전하였다. 이 후 0°C(ice bath)를 유지하면서 triethylamine 0.2mole(20.24g)을 THF 50ml에 용해한 후 100ml dropping funnel을 이용하여 서서히 반응용기에 가했다(60drops/min). 이 후 1시간 실온에서 반응 한 후 *O,O*-dimethyl *N*-methylphosphoamidothioate를 합성하였다. 둥근바닥플라스크(250ml)에 THF 120ml와 합성된 *O,O*-dimethyl *N*-methyl-phosphoamidothioate 0.05mole(7.76g)을 넣은 후 반응용기 내부를 질소로 충전하였다. 이 후 -78°C(dry ice in acetone)를 유지하면서 syringe를 이용하여 n-BuLi 0.05mole(3.2g)을 반응용기에 가해 수소를 제거한 후, THF 50ml에 carbofuran chloroformate 0.05mole(10.73g)을 용해하여 100ml dropping funnel을 이용하여 반응용기에 가했다. 이 후 6시간 실온에서 반응시켜 최종 생성물을 합성하였다. <sup>1</sup>H-NMR( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>/TMS) : 1.46(s, 6H), 3.03(s, 2H), 3.26~3.31(d, 2H), 3.81~3.88(d, 6H), 6.74~7.02(m, 3H).

***N*-Alkoxymethylphosphinothioyl carbofuran** : 둥근바닥플라스크(250ml)에 반응용매인 THF 120ml를 넣은 후 methylphosphonothionic dichloride 0.1mole, methylamine hydrochloride 0.1mole을 넣은 후 반응용기 내부를 질소로 충전하였다. 이 후 -78°C(dry ice in acetone)를 유지하며 triethylamine 0.2mole을 THF 70ml에 용해하여 100ml dropping funnel을 이용하여 서서히 반응용기에 가했다(30drops/min). 온도를 유지시키며 2시간 동안 반응한 후 다시 실온에서 1시간 반응하였다. 반응용기에 합성하고자하는 치환기의 종류에 따라 sodium methoxide 또는 그외의 반응시약 0.1mole을 넣은 후 4시간 반응시켜 alkoxymethyl *N*-methylphosphoamidothioate를 합성

하였다. 둥근바닥플라스크(250ml)에 THF 120ml를 넣은 후 합성된 alkoxyethyl *N*-methylphosphoramidothioate 0.05mole을 넣고 반응용기 내부를 질소로 충전하였다. 이 후 -78°C(dry ice in acetone)를 유지하면서 syringe를 이용하여 *n*-BuLi 0.05mole을 반응용기에 가해 수소를 제거한 후, THF 50ml에 carbofuran chloroformate 0.05mole을 용해하여 100ml dropping funnel을 이용 반응용기에 가했다. 실온에서 6시간동안 반응하여 *N*-alkoxyethylphosphinothioyl carbofuran을 합성하였다. 이와 같은 방법으로 sodium methoxide을 포함하여 sodium ethoxide, sodium propoxide, sodium butoxide, sodium thioethoxide, sodium thiobutoxide, dimethyl amine, diethyl amine, dipropyl amine, dibutyl amine, morpholine 등을 반응하여 다양한 구조의 화합물들을 합성하였다<그림 5>.

***N*-[(2-Bromoethoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 둥근바닥 플라스크(25ml)에 THF 15ml를 넣은 후 (2-bromoethoxy)methyl *N*-methylphosphoramidothioate 5mmole(1080.1mg)을 넣고 반응용기 내부를 질소로 충전하였다. 이 후 -78°C(dry ice in acetone)를 유지하면서 syringe를 이용하여 LDA 6mmole(2.0M in THF, Aldrich 36,179-8, USA)을 반응용기에 가해 수소를 제거한 후, THF 5ml에 carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg)을 용해하여 서서히 반응용기에 가했다. -78°C를 유지하며 3시간동안 반응한 후 포화 암모늄염용액(NH<sub>4</sub>Cl)용액 20방울로 반응을 종료하고 실온으로 올린후 ethyl acetate와 포화식염수로 2회 분배한후 유기용매층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨후 여과하여 감압농축하였다. 여기에서 얻은 생성물을 column chromatography로 정제하였다.

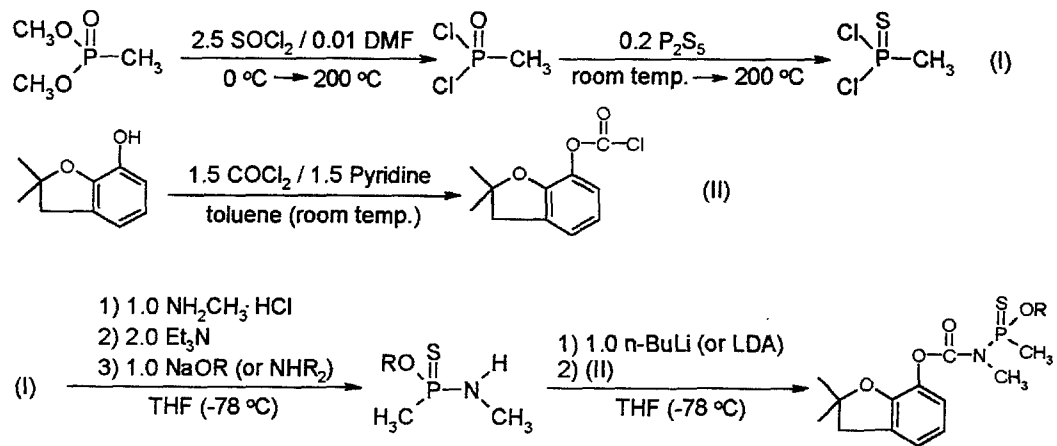


Figure 5. Synthetic scheme for *N*-phosphinthionyl derivatives of carbofuran.

***N*-[(3-Bromo-1-propoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2,2-Tribromoethoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole (1230.6mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(2-Chloroethoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2-Chloroethoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole(938.2mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole (1335.96mg).

***N*-[(2,2-Dichloroethoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2-Dichloroethoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole (1110.4mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(2,2,2-Trichloroethoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2,2-Trichloroethoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole (1282.6mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(3-Chloro-1-propoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (3-Chloro-1-propoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole (1008.3mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(2,2,2-Trifluoroethoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2,2-Trifluoroethoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole (1035.8mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(2,2,3,3-Tetrafluoro-1-propoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2,3,3-Tetrafluoro-1-propoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole(1195.9mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).

***N*-[(2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propoxy)methyl]phosphinothioyl carbofuran** : 합성은 위의 방법에 따랐으며, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. (2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propoxy)methyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole(1285.8mg), LDA 6mmole(2.0M in THF), carbofuran chloroformate 6mmole(1335.96mg).



***N*-Dimethylphosphinothioyl carbofuran** : 둥근바닥플라스크(A, 50ml)에 magnetic stirring bar를 넣고 dimethyl *N*-methylphosphoamidothioate 5mmole을 넣고 플라스크 내부를 질소로 충전하였다. 이 플라스크(A)에 15ml의 수분이 제거된 THF를 syringe(30ml)를 이용하여 넣어 dimethyl *N*-methylphosphoamidothioate를 용해시켰다. 이 플라스크를 dry ice와 acetone이 들어있는 -78℃ 등은 용기에 놓았고, 이 플라스크(A)에 LDA 5mmole(2.0M in THF, Aldrich 36,179-8, U.S.A.)를 syringe(5ml)를 이용하여 1분동안 적가한 후 30분간 교반하였다. 건조된 질소가스로 충전된 또 다른 플라스크(B, 25ml)에 3.1.3.1에서 합성된 1335.96mg(6mmole)의 carbofuran chloroformate를 넣은 후 syringe(10ml)를 이용하여 10ml의 수분이 제거된 THF를 가했다. 이 반응액을 플라스크(A)에 syringe(10ml)를 이용하여 5분간 적가한 후 -78℃에서 3시간 동안 교반하였다. 포화 NH<sub>4</sub>Cl 용액 20방울로 반응을 종료하였고, 반응액을 서서히 실온으로 올린후 분별깔대기(C, 250ml)에 옮겼다. 이 분별깔대기에 150ml의 NaCl 포화수용액과 50ml의 ethylacetate를 가한 후, 격렬하게 분별깔때기를 흔들어 반응액을 물층과 유기층으로 분리시켰다. 분리된 유기층은 삼각플라스크(250ml)에 받았으며, 남은 물층은 다시 70ml의 ethylacetate를 가한 후 격렬하게 흔들어 물층과 유기층으로 분리하였다. 분리된 유기층을 첫번째 분리된 유기층이 담겨있는 삼각플라스크에 받은 후, 5g의 무수 magnesium sulfate를 넣고 2시간 방치하여 수분을 제거하였다. 이를 glass filter(250ml)를 이용하여 감압여과한 후, 여과된 유기층을 vacuum rotary evaporator(N-2N TRK, EYELA, Japan)를 이용하여 감압농축하였다. 농축된 반응물로부터 관크로마토그래피[silica gel(240~400mesh), n-hexane:ethylacetate 혼합용매, 길이 300mm, 내경 30mm]를 이용하여 순수한 최종 화합물을 분리하였다.

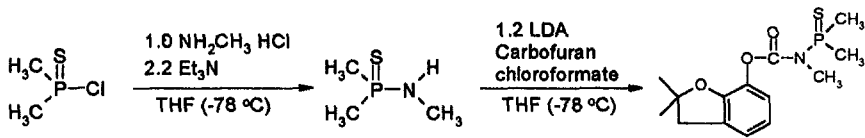


Figure 6. A synthetic scheme of *N*-dimethylphosphinothioyl carbofuran.

#### 나) 구조검정

<sup>1</sup>H-NMR구조 분석을 위하여 5mm O.D. NMR sample tube(NE-HL5-8, New Era Enterprises, Inc., U.S.A.)에 chloroform-*d*(TMS 0.03% 포함) 1ml 중 합성된 화합물이 10%가 되도록 용해시킨 후, nuclear magnetic resonance spectrometer(DPX 400, BRUKER, U.S.A.)를 이용하여 NMR 스펙트럼을 얻었다. NMR 스펙트럼 각각의 피크로부터 합성 화합물의 구조를 확인하였다.

또한, 합성된 화합물을 10ppm이 되도록 ethylacetate에 녹여 gas-chromatograph-mass spectrometer(MS-QP 1000A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 mass 스펙트럼을 얻었다. Mass 스펙트럼 각각의 피크로부터 합성 화합물의 구조를 확인하였다. 기기의 분석조건은 <표 1>과 같다.



#### 가) 처리액의 조제

합성 화합물 25mg을 5ml의 acetone에 각각 녹인 다음, 45ml의 Triton X-100<sup>®</sup> solution(1000ppm in distilled water)를 첨가하여 최종농도가 500ppm이 되도록 50ml를 조제하였다. 이것을 각각의 stock solution으로 하여 250, 125, 63, 32, 16, 8ppm을 조제하였다.

#### 나) 벼멸구에 대한 살충활성 검정

초장 4~5cm의 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Tongjin) 유묘 6본의 근부를 탈지면으로 싸고, 근부가 아래로 향하도록 하여 2ml의 물이 담긴 시험관(직경 3cm, 높이 15cm)에 밀어 넣었다. 흡충관으로 포획한 3령 약충 20마리를 시험관 내에 방사하여 접종한 후, 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)을 시험관을 회전시키면서 시험관 안쪽으로 3회 살포하였다. 처리 후, 시험관 입구를 망사로 된 뚜껑으로 씌우고 풍건한 다음, 사육실(상대 습도 60%, 25±2℃) 내에서 48시간동안 인큐베이션시키고 사충율을 조사하였으며, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 다) 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한 살충활성 검정

양배추(*Brassica oleracea* var. Capitata L.) 절편(7.5×7.5cm)을 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)에 30초간 침적한 후 1시간동안 음건하였다. 처리된 양배추 절편을 여과지가 깔린 폴리에틸렌 용기(직경 8.0cm, 높이 4.5cm)에 놓고, 가는 붓을 이용하여 3령 유충 10마리를 접

종한 후, 뚜껑을 덮어 25℃ 항온기에 보관하였다. 처리 48시간 후 사충율을 조사하였고, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 라) 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성 검정

직경 7.5cm의 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 엽편을 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)에 30초간 침적한 후 풍건하였다. 처리된 담배 엽편을 여과지가 깔린 플라스틱 페트리디쉬(직경 9cm, 높이 2cm)에 놓고, 가는 붓을 이용하여 성충 10마리를 접종하였다. 페트리디쉬를 사육실(상대습도 60%, 25±2℃) 내에서 48시간동안 인큐베이션시킨 후 사충율을 조사하였으며, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 마) 두점박이용애에 대한 살충활성 검정

플라스틱 페트리디쉬(직경 5.5cm, 높이 2cm)에 탈지면을 깔고 탈지면이 젖을 정도로 물을 채운 후, 직경 3cm의 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 엽편의 뒷면이 위로 가게 올려놓은 다음, 가는 붓을 이용하여 성충 30마리를 접종하였다. 살포기로 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)을 살포한 후 60분간 풍건하였다. 페트리디쉬를 사육실(상대습도 60%, 25±2℃) 내에서 48시간동안 인큐베이션시킨 후 사충율을 조사하였고, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 4) 포유동물독성 검정

ICR계 마우스(5주령, 30~35g)를 사용하여 살충활성이 우수한 약제의 포유동물에 대한 선택독성 및 안전성검정 실험을 수행하였다. 포유동물에 대한 선택독성 및 안전성 검정을 위한 대조약제로 모약제인 carbofuran(Furadan<sup>®</sup>)과 procarbofuran계 약제인 carbosulfan(Marshall<sup>®</sup>)을 선정하였고, 이 약제들의 포유동물 독성을 측정하였다. 시험물질을 DMSO에 녹인 후 10ml/kg(체중) 수준으로 4시간 절식시킨 공시동물에 경구투여 하였다. 투여방법은 마우스용 경구주사침(zonde)을 이용하여 위내에 1회에 한하여 강제 투여하였다. 약물 투여 후 14일간 일반 중독 증상을 관찰하였고, 체중을 측정 하였으며, 치사된 개체 수를 조사하여 LD<sub>50</sub>(반수치사약량)을 산출하였다.

#### 나. Neonicotinoid 유도체의 합성

##### 1) 분자설계의 근거

곤충의 신경계에 존재하는 nAChR에서 agonist로 작용하는 neonicotinoid계 살충제의 독성이론을 근거로 하여 새로운 분자구조를 설계 하였다. Neonicotinoid계 살충제의 대표적 약제인 imidachloprid계 약제의 nAChR의 active site 사이의 거리(5.9Å)와 정전기적 인력, 그리고 선택성 유도를 위한 부분적 양전하( $\delta^+$ )의 특성을 검토 유사체의 분자설계 및 개발을 시도하였다. Imidachloprid의 부분 양전하의 질소원자를 부분 양전하의 인원으로 치환하여 선택성과 살충활성의 기능을 검정하였다.

## 2) Imidacloprid계 유도체의 합성

### 가) 합성법 및 합성

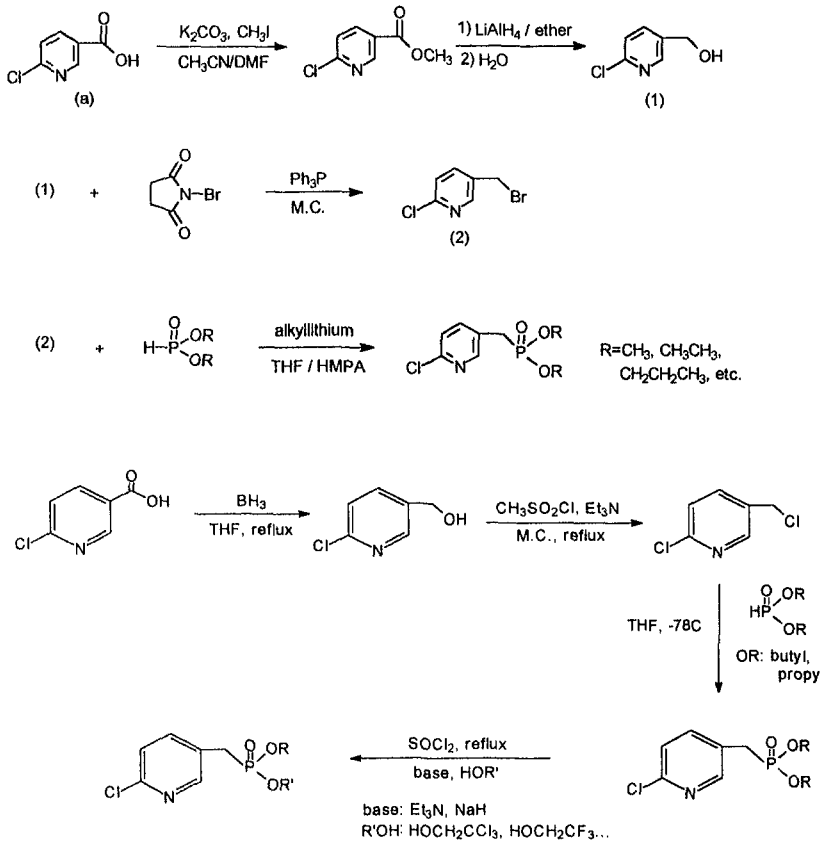


Figure 7. Synthetic scheme of Imidachloprid derivatives (I).

**Methyl-6-chloro-3-pyridinecarboxylate** : 건조된 질소가스로 충전한 500ml 둥근바닥플라스크에 6-chloronicotinic acid 5g(31.7mmole)과 acetonitrile 300ml, DMF 60ml를 넣고, 맑은 용액이 될 때까지 교반하였다. 이 용액에 potassium carbonate 8.77g(63mmole)을 조금씩 넣은 다음 약 1시간 동안 교반하고, syringe를 이용하여 methyl iodide 3.1ml(47mmole)를 천천히 가하였다. 실온에서 약 30분간 교반한 다음 oil bath하에서 24시간 동안 환류하였다. Oil bath를 제거한 후 온도를 실온까지 내린 다음 여과하고, 이 여과된 용액을 500ml 둥근바닥플라스크에 옮겨 감압, 농축하였다. 여기서 얻은 고체를 250ml 분별 깔때기에 넣고, NaCl 포화수용액과 ether를 넣고 흔든 다음, 층분리 시켜 유기층을 받았다. 그리고 이 유기층을 NaCl 포화수용액으로 2~3회 씻어 준 다음, 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 여과하여 감압 농축하였다. 이 과정에서 얻은 건고된 미색의 고체를 n-hexane으로 재결정하여 백색의 고체를 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR(δ, CDCl<sub>3</sub>/TMS) : 3.93(s, 3H), 7.35-7.45(d, 1H), 8.15-8.25(d, 1H), 8.95(s, 1H).

**2-Chloro-5-hydroxymethylpyridine** : 250ml 둥근바닥플라스크에 건조된 질소가스를 충전한 후 methyl-6-chloro-3-pyridinecarboxylate 4.94g (29mmole)을 ether에 녹여 넣고, 온도를 0°C가 되면 LiAlH<sub>4</sub> 0.88(23mmole)을 조금씩 넣고, 약 5시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 증류수를 조금씩 넣으면서 교반하여 Li의 반응성을 소멸시킨 다음, ether로 2~3회 추출하고, NaCl 포화수용액으로 2~3회 씻어주었다. 수용액 층은 버리고 유기층은 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 여과하여 감압 농축하였다. 이 농축물을 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane = 1:2)로 분리하여 주황색의 기름상 물질을 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR(δ, CDCl<sub>3</sub>/TMS) : 2.60(s, 1H), 4.60(s, 2H), 7.25-7.35(d, 1H), 7.65-7.75(d, 1H), 8.30(s, 1H).



**2-Chloro-5-bromomethylpyridine** : 건조된 질소가스를 100ml 둥근바닥플라스크에 충분히 흘려 준 다음, 플라스크내에 가득 채우고, 2-chloro-5-hydroxymethylpyridine 3.38g(23.5mmole)을 dichloromethane에 녹여 넣었다. 0°C(ice bath)에서 triphenylphosphine 6.16g(23.5mmole)을 조금씩 넣고 약 10분간 교반한 다음, NBS 4.19g(23.5mmole)을 조금씩 넣고 교반하였다. 이 용액을 oil bath에서 약 12시간 동안 환류한 다음 100ml 둥근바닥플라스크에 옮겨 감압 농축하였다. 여기에서 얻은 생성물을 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane = 1:3)로 분리하였다. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>/TMS) : 4.45(s, 2H), 7.30-7.40(d, 1H), 7.65-7.80(d, 1H), 8.45(s, 1H).

**Dimethyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 오븐에서 잘 건조된 25ml 둥근바닥플라스크를 꺼내서 질소가스 하에서 서서히 식히고, 질소가스로 충전한 다음, THF 10ml와 diisopropylamine 0.5ml(3.3mmole)를 넣고 교반하였다. 그리고 -77°C(dry ice in acetone)에서 1.05M n-BuLi 3.14ml(3.3mmole)를 syringe로 천천히 한 방울씩 넣고, 약 20분 동안 교반하였다. 여기에 dimethylphosphite 0.3ml(3.3mmole)를 넣고 약 15분 동안 교반한 다음, 온도를 5°C까지 올린 후 HMPA 0.57ml(3.3mmole)를 넣고 15분 동안 교반하였다. 온도를 0°C(ice bath)로 내린 다음 2-chloro-5-bromo-methylpyridine 0.68g(3.3mmole)을 THF에 녹여 한 방울씩 넣고 약 3.5시간 동안 교반하였다. 반응이 다 진행되면 10% HCl 수용액을 넣고 약 10분 동안 교반한 다음, ether로 2~3회 씻어주었다. 이 유기층을 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 여과하여 감압 농축하였다. 여기에서 얻은 생성물을 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane = 9:1)로 정제하였다. Mass m/z 235(M), 220, 205, 190m 169, 156, 126, m121, 91, 79, 63.

**Diethyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine(0.46g, 2.23mmole), diethylphosphite(0.29g, 2.23mmole), 2.0M LDA(1.1ml, 2.23mmole), HMPA(0.34ml, 2.23mmole). Mass m/z 264(M), 250, 234, 207, 190, 153, 126, 91, 73.

**Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine(0.2g, 0.96mmole), dipropylphosphite(0.13ml, 0.96mmole), 1.09M n-butyllithium(0.8 ml, 0.96mmole), diisopropylamine(0.135ml, 0.96mmole), HMPA(0.16ml, 0.96mmole). <sup>1</sup>H-NMR(δ, CDCl<sub>3</sub>/TMS) : 0.85-1.00(t, 6H), 1.55-1.75(m, 4H), 3.05-3.20(d, 2H), 3.85-4.05(q, 4H), 7.25-7.35(d, 1H), 7.60-7.70(d, 1H), 8.28(s, 1H). Mass m/z 291(M), 276, 263, 250, 234, 220, 208, 190, 172, 126, 90, 73.

**Methyl 1-butyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine (0.68g, 3.3mmole), 1.05M n-butyl-lithium(3.14ml, 3.3mmole), diisopropylamine(0.5ml, 3.3mmole), HMPA(0.57ml, 3.3mmole). Mass m/z 277(M), 262, 248, 235, 222, 203, 190, 168, 156, 126, 90, 57.

**Dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine(0.4g, 1.9mmole), dibutylphosphite(0.37ml, 1.9mmole), 2.0M LDA(0.96ml,

1.9mmole), HMPA(0.26ml, 1.9mmole). Mass m/z 320(M), 290, 264, 248, 234, 208, 190, 126, 90, 73, 57.

**Di-2,2,2-trifluoroethyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 25ml 둥근바닥플라스크를 오븐에서 하루정도 잘 건조시킨 다음 질소를 흘려 주면서 상온으로 식혔다. 건조된 질소를 플라스크에 충전한 후, bis-trifluoroethylphosphite 0.15ml(0.97mmole)와 THF 10ml를 넣고 교반하였다. 온도를 -77°C(dry ice in acetone)까지 내리고, 2.0M LDA 0.48ml (0.97mmole)를 syringe로 천천히 한 방울씩 넣고, 약 1시간 동안 교반하였다. 여기에 2-chloro-5-bromomethylpyridine 0.2g(0.97 mmole)을 THF에 녹여 조금씩 넣고, -77°C에서 약 3시간 정도 교반한 다음 상온에서 18시간 정도 교반하였다. 반응이 종결되면 10% HCl을 천천히 넣고 10분 동안 교반한 다음, ether로 2~3회 추출하고, NaCl 포화수용액으로 여러번 씻어주었다. 이 유기층을 MgSO<sub>4</sub>로 약 4시간 정도 건조시킨 다음 여과하여 감압 농축하고, 농축물을 column chromatography(ethyl acetate : n-hexane = 1:1)로 정제하였다. Mass m/z 372(M), 352, 331, 283, 263, 251, 209, 169, 126, 99, 90, 73, 63.

**Di-2-ethylhexyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine (0.2g, 0.97mmole), bis-2-ethylhexylphosphite(0.9ml, 0.97mmole), 0.83M tert-butyllithium(1.17ml, 0.97mmole). Mass m/z 432(M), 396, 374, 346, 320, 284, 208, 190, 126.

**Diphenyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 2-Chloro-5-bromomethylpyridine(0.2g, 0.96mmole), diphenylphosphite(0.19ml, 0.96mmole), 1.30M tert-butylolithium(0.75ml, 0.96mmole). Mass m/z 359(M), 324, 266, 248, 233, 201, 140, 126, 90, 77.

**Dibenzyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다. 2-Chloro-5-bromomethylpyridine(0.3g, 1.45mmole), dibenzylphosphite(0.32ml, 1.45mmole), 1.30M tert-butylolithium(1.12ml, 1.45mmole).

**2-Chloro-5-hydroxymethylpyridine** : 둥근바닥플라스크(500ml)에 6-chloronicotinic acid 5g(31.7mmole)을 넣고 건조한 THF 200ml로 녹인 후, 1M borane-tetrahydrofuran complex 64ml(63.5mmole)를 dropping funnel을 이용하여 실온에서 서서히 가한 후 22시간동안 환류시켰다. 환류 후 반응온도를 실온까지 서서히 내리고 물을 사용하여 미반응한 borane을 분해시킨 다음, 용매(THF)를 40℃의 감압장치에서 제거하였다. 잔류물을 물과 diethylether를 사용하여 합성된 화합물을 추출한 후, diethylether층을 magnesium sulfate로 건조시키고, 여과농축하여 투명한 노란색의 액상물질을 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>/TMS): 2.81~3.0(s, 1H), 4.72(s, 1H), 7.31~7.34(d, 1H), 7.69~7.71(d, 1H), 8.33(s, 1H).

**2-Chloro-5-chloromethylpyridine** : 실험으로부터 얻은 노란액상물질 4.56g(31.7 mmole)을 둥근바닥플라스크(250ml)에 넣은 후, 건조한 dichloromethane 80ml를 넣어 충분히 녹인 다음, 여기에 triethylamine 8.03g(79.3mmole)과 methanesulfonyl chloride 9.09g (79.3mmole)을 ice bath

하에서 천천히 가하였다. 반응 10분 후 ice bath를 제거하고 6시간 동안 환류시켰으며, 환류반응 후 감압장치를 이용하여 dichloromethane을 제거한 다음, 잔류물을 물과 diethylether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하고, diethylether층을 magnesium sulfate로 건조시킨 다음 여과 농축하여 노란색의 액체를 얻었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): 4.58(s, 2H), 7.34~7.37(d, 1H), 7.70~7.73(d, 1H), 8.41(s, 1H).

***O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 둥근바닥 플라스크(25ml)를 질소가스로 충전한 다음 THF 5ml를 넣고, 반응용기의 외부온도가  $-78^\circ\text{C}$  (acetone: dry ice=1:1)일 때 2.0M lithium diisopropylamide (LDA) 21ml(41.1mmole)를 syringe를 이용하여 첨가하였다. 여기에 dipropylphosphite 6.71ml(39.2mmole)를 syringe를 이용하여 천천히 떨어 뜨린 후, 온도를  $-78^\circ\text{C}$ 에서  $-40^\circ\text{C}$ 까지 서서히 올렸다. 이 온도조건에서 HMPA 7.02 ml (39.2mmole)를 첨가하였고, 첨가 5분 후 실험 2.2로부터 얻은 2-chloro-5-chloromethyl을 THF 10ml에 녹여 syringe를 이용하여 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 4시간 가량 반응시킨 후, 물을 10ml정도 가하고, 5분 경과 후에 물과 diethylether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하였으며, diethylether층을 magnesium sulfate로 건조한 다음 여과 농축하여 노란액체를 얻었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): 0.85~1.00(t, 6H), 1.55~1.75(m, 4H), 3.05~3.20(d, 2H), 3.85~4.05(q, 4H), 7.25~7.35(d, 1H), 7.60~7.70(d, 1H), 8.28(s, 1H).

***O,O*-Dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: 2.0M LDA 16.4ml(32.7mmol), dibutylphosphite 6.61ml(32.7mmole), HMPA 5.86ml(32.7mmole), 2-chloro-

5-chloromethylpyridine 5.3g(32.7mmole).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ): 0.85~0.95(t, 6H), 1.20~1.45(m, 4H), 1.45~1.65(m, 4H), 3.00~3.20(d, 2H), 3.90~4.05(q, 4H), 7.25~7.30(d, 1H), 7.60~7.70(d, 1H), 8.25(s, 1H).

***O*-Butyl *O*-(4-nitrophenyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 둥근바닥플라스크(25ml)에 *O,O*-dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g (6.25mmole)과 thionyl chloride 15ml를 넣고 5시간 동안 환류시킨 후, 감압증류하여 thionyl chloride와 불순물을 제거하였다. 또 다른 50ml의 둥근바닥플라스크에 4-nitrophenol 0.87g(6.25mmole)을 넣고 THF 10ml를 넣어 녹인 후 triethylamine 0.76g(7.50mmole)을 반응용기에 피펫을 이용하여 첨가하였다. 첨가 10분후  $-78^\circ\text{C}$ 의 온도조건하에서 감압증류 후 남은 잔류물을 THF 5ml에 녹인 다음 위의 혼합물에 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 4시간 반응후에 1N NaOH와 diethylether를 이용하여 합성된 화합물을 추출하고, diethylether층을 magnesium sulfate로 건조한 후 여과 농축하여 얻은 갈색의 혼합물을 Flash Column Chromatography(내경 2.0cm, 길이 50cm)법으로 분리정제하여 순도 98%이상의 갈색 액체를 얻었다.

***O*-Butyl *O*-(2,2,2-trichloroethyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : base로는 triethylamine대신 sodium hydride를 이용하였고, 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.25mmole), 2,2,2-trichloroethanol 0.94g (6.25mmole), sodium hydride 0.19g(7.50mmole).

***O*-Butyl *O*-(2,2,2-trifluoroethyl) (2-chloro-5-pyridyl)methyl-**

**phosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.25m mole), 2,2,2-trifluoro-ethanol 0.63g(6.25mmole), sodium hydride 0.19g(7.50 mmole).

***O*-Butyl *O*-(1-piperidineethyl) (2-chloro-5-pyridyl)methyl-phosphonate** : 둥근바닥플라스크(25ml)에 *O,O*-dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g (6.25mmole)과 thionyl chloride 15ml를 넣고 5시간 동안 환류시킨 후 감압증류하여 thionyl chloride와 불순물을 제거하였다. 또 다른 50ml 둥근바닥플라스크에 1-piperidineethanol 0.81g(6.25mmole)을 넣고 THF 10ml를 넣어 녹인 후 triethylamine 0.76g(7.50mmole)을 반응용기에 피펫을 이용하여 가하였다. 반응 10분 후, 감압증류 후 남은 잔류물을 THF 5ml에 녹인 다음 천천히 떨어뜨렸다. 반응 4시간 후 1N NaOH와 diethylether를 이용하여 합성된 화합물을 추출하고, diethylether층을 magnesium sulfate로 건조한 후 여과농축하여 얻은 갈색의 혼합물을 Flash Column Chromatography법으로 분리정제하여 순도 98%이상의 갈색 액체를 얻었다.

***O*-Butyl *O*-(tertahydropyran-2-methyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dibutyl (2-chloro-5-pyridyl)methyl-phosphonate 2.1g(6.56mmole), tetrahydropyran-2-methanol 0.68g(6.56mmole), triethylamine 0.80g (7.88mmole).

***O*-Butyl *O*-tetrahydrofurfuryl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dibutyl

(2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.25 mmole), tetrahydrofurfuryl alcohol 0.65g(6.25mmole), triethylamine 0.80g(7.88 mmole).

***O*-(4-Nitrophenyl) *O*-propyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86 mmole), 4-nitrophenol 0.95g(6.86mmole), triethylamine 0.83g(8.23mmole).

***O*-Propyl *O*-(2,2,2-trichloroethyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86 mmole), 2,2,2,-trichloroethanol 1.03g(6.86mmole), sodium hydride 0.21g(8.23 mmole).

***O*-Propyl *O*-(2,2,2-trifluoroethyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86m mole), 2,2,2,-trifluoroethanol 0.69g(6.86mmole), sodium hydride 0.21g(8.23 mmole).

***O*-(1-Piperidineethyl) *O*-propyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86m mole), 1-piperidineethanol 0.90g(6.86mmole), triethylamine 0.83g(0.82mmole).

***O*-Propyl *O*-(tetrahydropyran-2-methyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 사용한 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다:



*O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86mmole), tetrahydropyran-2- methanol 0.72g(6.86mmole), triethylamine 0.83g (8.23m mole).

***O*-Propyl *O*-tetrahydrofurfuryl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 시약의 종류와 사용량은 다음과 같다: *O,O*-Dipropyl (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 2.0g(6.86mmole), tetrahydrofurfuryl alcohol 0.72g(6.86mmole), triethylamine 0.83g(8.23 mmole).

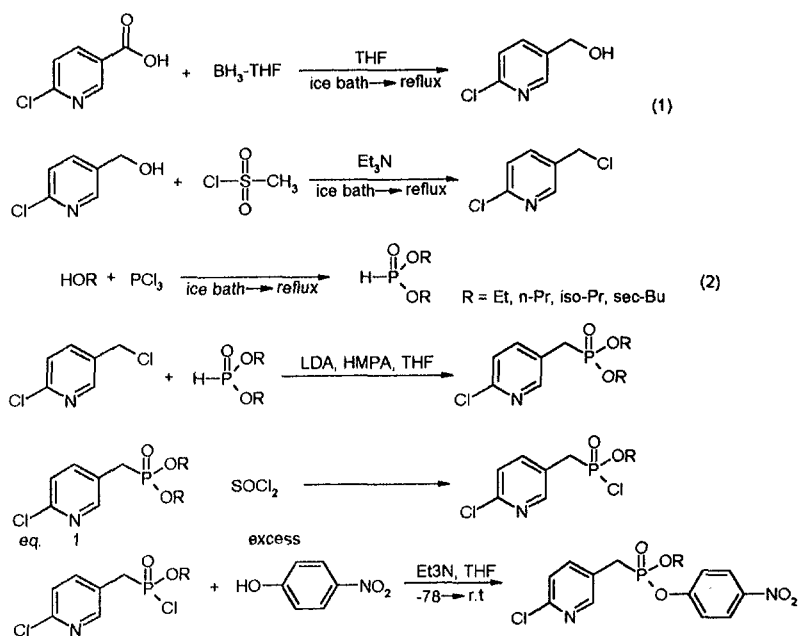


Figure 8. Synthetic scheme of imidacloprid derivatives(II).

**2-Chloro-5-hydroxymethylpyridine** : 둥근바닥플라스크(500ml)에 6-chloronicotinic acid 5.23g (0.03mole)을 넣고 건조시킨 THF 200ml로 녹인 후 1M borane-tetrahydrofuran complex 60ml(0.06mole)를 dropping funnel 을 이용하여 ice bath하에서 가한 후 22시간 동안 환류시켰다. 환류 후 반응 온도를 실온까지 서서히 내리고 물을 사용하여 미반응한 borane을 분해시킨 다음, 용매(THF)를 40℃의 감압장치에서 제거하였다. 잔류물을 물과 diethyl ether를 사용하여 합성된 화합물을 추출한 후, diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조시키고, 여과농축하여 투명한 노란색의 액상물질을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ) : 2.81~3.00(s, 1H), 4.72(s, 1H), 7.31~7.34(d, 1H), 7.69~7.71(d, 1H), 8.33(s, 1H).

**2-Chloro-5-chloromethylpyridine** : 위의 실험으로부터 얻은 2-chloro-5-hydroxymethylpyridine 4.25g(0.03mole)을 둥근 바닥 플라스크 (250ml)에 넣은 후 건조시킨 dichloro- methane 85ml를 넣어 충분히 녹인 다음, 여기에 triethylamine 7.59g(0.075mole)과 methanesulfonyl chloride 8.59g(0.075mole)을 ice bath하에서 천천히 가하였다. 반응 10분 후 ice bath 를 제거하고 6시간동안 환류시켰으며, 환류 후 반응온도를 실온까지 서서히 내리고 감압장치를 이용하여 dichloromethane을 제거한 다음, 잔류물을 물과 diethyl ether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하고 diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조시킨 다음 여과농축하여 노란색의 액상물질을 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ) : 4.59(s, 2H), 7.34~7.38(d, 1H), 7.70~7.74(q, 1H), 8.40(s, 1H).

**Diethyl phosphite** : Ethyl alcohol 4.61g(0.1mole)을 둥근 바닥 플라스크(250ml)에 넣은 후 ice bath하에서 phosphorus trichloride 4.53g(0.033mole)을 dropping funnel을 이용하여 천천히 가하였다. ice bath를 제거한 다음에 실온에서 3시간 동안 반응하였다. 반응 후 물과 diethyl ether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하고 diethyl ether 층을 magnesium sulfate 로 건조시킨 다음 여과 농축하여 투명한 액상 물질을 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) : 1.35~1.40(t, 6H), 4.12~4.20(m, 4H), 5.97, 7.7(d, 1H).

**Dipropyl phosphite** : 위와 같은 방법으로 합성하였으며, 사용한 시약의 종류와 양은 다음과 같다. propyl alcohol 48.24g(0.791 mole), phosphorus trichloride 36.21g(0.264mole).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) : 0.95~1.01(t, 6H), 1.68~1.78(m, 4H), 4.00~4.09(q, 4H), 5.96, 7.70(d, 1H).

**Di-iso-propyl phosphite** : 위와 같은 방법으로 합성하였으며, 사용한 시약의 종류와 양은 다음과 같다. iso-propyl alcohol 7.0g(0.117 mole), phosphorus trichloride 5.49g(0.039mole).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) : 1.27~1.31(q, 12H), 4.60~4.72(m, 2H), 5.95, 7.65(d, 1H).

**Di-sec-butyl phosphite** : 위와 같은 방법으로 합성하였으며, 사용한 시약의 종류와 양은 다음과 같다. sec-butyl alcohol 13.5g(0.18 mole), phosphorus trichloride 8.35g(0.06mole).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) : 0.93~0.99(t, 6H), 1.32~1.38(q, 6H), 1.54~1.76(m, 4H), 4.45~4.59(m, 2H), 6.05, 7.74(d, 1H).

***O,O*-Dialkyl(2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 둥근바닥 플라스크를 질소가스로 충전한 다음 용매(THF)를 넣고, 반응용기의 외부온도가  $-78^{\circ}\text{C}$ (acetone : dry ice = 1:1)일 때 2.0M lithium diisopropylamide(LDA) 1.1eq.를 syringe를 이용하여 첨가하였다. 여기에 위의 실험에서 얻은 dialkyl phosphite 1eq.(R : ethyl, propyl, *iso*-propyl, butyl, *sec*-butyl)를 syringe를 이용하여 서서히 가한 후, 온도를  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서  $-45^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 올렸다. 이 온도조건에서 hexamethyl phosphoramidate(HMPA) 1.1eq.를 첨가하였고, 그 후 반응에서 얻은 2-chloro-5-chloromethylpyridine을 THF에 녹여 syringe를 이용하여 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 5시간 가량 반응시킨 후, 물과 diethyl ether를 이용하여 합성된 화합물을 추출하였으며, diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조한 다음 여과 농축하여 노란액체를 얻었다.

***O*-Alkyl *O*-(4-nitrophenyl) (2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate** : 둥근바닥플라스크에 *O,O*-dialkyl(2-chloro-5-pyridyl)methylphosphonate 1eq.(R : ethyl, propyl, *iso*-propyl, butyl, *sec*-butyl)를 넣고 과량의 thionyl chloride를 넣고 5시간동안 환류시킨 후, 감압증류하여 thionyl chloride와 불순물을 제거하였다. 또 다른 둥근바닥 플라스크에 4-nitrophenol 1eq.를 넣고 THF를 넣어 녹인 후 triethylamine 1.2eq.를 반응용기에 피펫을 이용하여 첨가하였다. 첨가 10분후  $-78^{\circ}\text{C}$ 의 온도조건하에서 감압증류하고 남은 잔류물을 THF에 녹여 위의 혼합물에 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 5시간 반응후에 1N NaOH와 diethyl ether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하고 diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조한 후 농축하여 화합물을 얻었다.

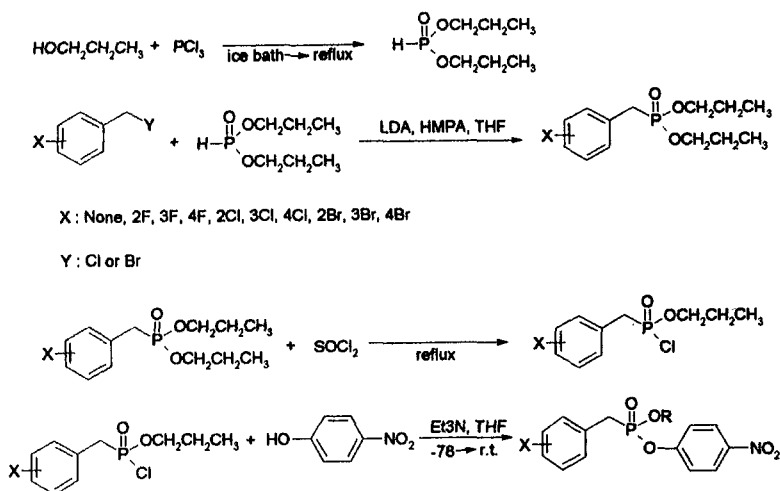


Figure 9. Synthetic scheme of imidacloprid derivatives(III)

***O,O*-Dipropyl substituted benzyl methylphosphonate** : 등근바닥 플라스크를 질소가스로 충전한 다음 용매(THF)를 넣고, 반응용기의 외부온도가  $-78^{\circ}\text{C}$ (acetone : dry ice = 1:1)일 때 2.0M lithium diisopropylamide (LDA) 1.1eq.를 syringe를 이용하여 첨가하였다. 여기에 위의 실험에서 얻은 dipropyl phosphite 1eq.를 syringe를 이용하여 서서히 가한 후, 온도를  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서  $-45^{\circ}\text{C}$ 까지 서서히 올렸다. 이 온도조건에서 hexamethyl phosphoramidate(HMPA) 1.1eq.를 첨가하였고, 그 후 반응에서 얻은 substituted benzyl chloride(bromide)(X : None, 2F, 3F, 4F, 2Cl, 3Cl, 4Cl, 2Br, 3Br, 4Br)을 THF에 녹여 syringe를 이용하여 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 5시간 가량 반응시킨 후, 물과 diethyl ether를 이

용하여 합성된 화합물을 추출하였으며, diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조한 다음 여과 농축하여 화합물을 얻었다.

**O-Propyl O-(4-nitrophenyl) (substituted benzyl)methylphosphonate** : 둥근바닥플라스크에 *O,O*-dipropyl substituted benzyl methylphosphonate 1eq.X : None, 2F, 3F, 4F, 2Cl, 3Cl, 4Cl, 2Br, 3Br, 4Br) 를 넣고 과량의 thionyl chloride를 넣고 5시간동안 환류시킨 후, 감압증류하여 thionyl chloride와 불순물을 제거하였다. 또 다른 둥근바닥 플라스크에 4-nitrophenol 1eq.를 넣고 THF를 넣어 녹인 후 triethylamine 1.2eq.를 반응 용기에 피펫을 이용하여 첨가하였다. 첨가 10분후  $-78^{\circ}\text{C}$ 의 온도조건하에서 감압증류하고 남은 잔류물을 THF에 녹여 위의 혼합물에 천천히 가하였다. 온도를 실온까지 서서히 올리면서 5시간 반응후에 1N NaOH와 diethyl ether를 사용하여 합성된 화합물을 추출하고 diethyl ether층을 magnesium sulfate로 건조한 후 농축하여 화합물을 얻었다.

#### 나) 구조검정

$^1\text{H-NMR}$ 구조 분석을 위하여 5mm O.D. NMR sample tube(NE-HL5-8, New Era Enterprises, Inc., U.S.A.)에 chloroform-*d*(TMS 0.03% 포함) 1ml 중 합성된 화합물이 10%가 되도록 용해시킨 후, nuclear magnetic resonance spectrometer(DPX 400, BRUKER, U.S.A.)를 이용하여 NMR 스펙트럼을 얻었다. NMR 스펙트럼 각각의 피크로부터 합성 화합물의 구조를 확인하였다.

또한, 합성된 화합물을 10ppm이 되도록 ethylacetate에 녹여 gas-chromatograph-mass spectrometer(MS-QP 1000A, Shimadzu Co., Japan)를



충활성의 검정은 약제 처리 48시간이 경과한 후 사충율을 측정하였다. 얻어진 결과를 통하여 약제의 실용화 가능성을 타진하고, 약제의 독성작용기작과 선택성을 검토하여 다른 약제의 분자설계에 응용하였다.

#### 가) 처리액의 조제

합성 화합물 25mg을 5ml의 acetone에 각각 녹인 다음, 45ml의 Triton X-100<sup>®</sup> solution(1000ppm in distilled water)를 첨가하여 최종농도가 500ppm이 되도록 50ml를 조제하였다. 이것을 각각의 stock solution으로 하여 250, 125, 63, 32, 16, 8ppm을 조제하였다.

#### 나) 벼멸구에 대한 살충활성 검정

초장 4~5cm의 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Tongjin) 유묘 6본의 근부를 탈지면으로 싸고, 근부가 아래로 향하도록 하여 2ml의 물이 담긴 시험관(직경 3cm, 높이 15cm)에 밀어 넣었다. 흡충관으로 포획한 3령 약충 20마리를 시험관 내에 방사하여 접종한 후, 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)을 시험관을 회전시키면서 시험관 안쪽으로 3회 살포하였다. 처리 후, 시험관 입구를 망사로 된 뚜껑으로 씌우고 풍건한 다음, 사육실(상대 습도 60%, 25±2°C) 내에서 48시간동안 인큐베이션시키고 사충율을 조사하였으며, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 다) 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한 살충활성 검정

양배추(*Brassica oleracea* var. Capitata L.) 절편(7.5×7.5cm)을 처리



액 (합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)에 30초간 침적한 후 1시간동안 음건하였다. 처리된 양배추 절편을 여과지가 깔린 폴리에틸렌 용기 (직경 8.0cm, 높이 4.5cm)에 놓고, 가는 붓을 이용하여 3령 유충 10마리를 접종한 후, 뚜껑을 덮어 25℃ 항온기에 보관하였다. 처리 48시간 후 사충율을 조사하였고, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 라) 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성 검정

직경 7.5cm의 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 엽편을 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)에 30초간 침적한 후 풍건하였다. 처리된 담배 엽편을 여과지가 깔린 플라스틱 페트리디쉬(직경 9cm, 높이 2cm)에 놓고, 가는 붓을 이용하여 성충 10마리를 접종하였다. 페트리디쉬를 사육실(상대습도 60%, 25±2℃) 내에서 48시간동안 인큐베이션시킨 후 사충율을 조사하였으며, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 마) 두점박이용애에 대한 살충활성 검정

플라스틱 페트리디쉬(직경 5.5cm, 높이 2cm)에 탈지면을 깔고 탈지면이 젖을 정도로 물을 채운 후, 직경 3cm의 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 엽편의 뒷면이 위로 가게 올려놓은 다음, 가는 붓을 이용하여 성충 30마리를 접종하였다. 살포기로 처리액(합성된 각각의 화합물, 최종처리액 1% acetone 함유)을 살포한 후 60분간 풍건하였다. 페트리디쉬를 사육실(상대습도 60%, 25±2℃) 내에서 48시간동안 인큐베이션시킨 후 사충율을 조사하였고, 대조구의 경우 무처리액(1% acetone 함유)을 살포하였다.

#### 4) 살균활성검정

합성된 imidachloprid 유사체들은 벼도열병균(RCB, *Pyricularia grisea*), 오이갯빛곰팡이병균(CGB, *Bortyitis cinerea*), 토마토역병균(TLB, *Phytophthora infestans*), 밀녹병균(WLR, *Puccinia recondita*), 보리흰가루병균(BPM, *Erysiphe graminis f. sp. hordei*)에 대한 살균활성을 검정하였다. 모든 살균활성 검정실험은 3반복으로 실시되었다. 각 시험약제의 살균활성은 방제가(처리구의 병반면적/무처리구의 병반면적×100)로 표시하였다.

##### 가) 벼도열병균에 대한 살균활성 검정

제 3엽기의 낙동벼(*Oryza sativa* L. cv. Naktong)에 처리액(합성된 화합물, 250ppm, Tween-20<sup>®</sup> 250ppm 함유)을 살포하여 24시간 풍건한 후, 병원균( $1 \times 10^3$  spores/ml의 포자현탁액)을 콧트에 흘려내리지 않을 정도로 충분히 분무하여 접종하였다. 접종된 벼는 항온항습실(상대습도 95%,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )에서 5일간 발병시킨 다음, 병반 면적율을 조사하였다. 무처리구에는 무처리액(250ppm Tween-20<sup>®</sup> 함유)을 처리구와 동일한 방법으로 살포하였다.

##### 나) 오이갯빛곰팡이병균에 대한 살균활성 검정

본엽 1엽기의 오이(*Cucumis sativus* L.)에 처리액(합성된 화합물, 250ppm, Tween-20<sup>®</sup> 250ppm 함유)을 살포하여 24시간 풍건한 후, 병원균( $1 \times 10^3$  spores/ml의 포자현탁액)을 콧트에 흘려내리지 않을 정도로 충분히 분무하여 접종하였다. 접종된 오이는 항온항습실(상대습도 70%,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )에

서 5일간 발병시킨 다음, 병반 면적율을 조사하였다. 무처리구에는 무처리액(250ppm Tween-20<sup>®</sup> 함유)을 처리구와 동일한 방법으로 살포하였다.

다) 토마토역병균에 대한 살균활성 검정

본엽 2~3엽기의 토마토(*Lycopersicon lycopersicum* L.)에 처리액(합성된 화합물, 250ppm, Tween-20<sup>®</sup> 250ppm 함유)을 살포하여 24시간 풍건한 후, 병원균( $1 \times 10^3$  sporangia/ml)을 폿트에 흘러내리지 않을 정도로 충분히 분무하여 접종하였다. 접종된 토마토는 항온항습실(상대습도 95%이상,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )에서 4일간 발병시킨 다음, 병반 면적율을 조사하였다. 무처리구에는 무처리액(250ppm Tween-20<sup>®</sup> 함유)을 처리구와 동일한 방법으로 살포하였다.

라) 밀녹병균에 대한 살균활성 검정

제 1엽기의 밀(*Triticum aestivum* L.)에 처리액(합성된 화합물, 250ppm, Tween-20<sup>®</sup> 250ppm 함유)을 살포하여 24시간 풍건한 후, 병원균(0.67g/l의 포자현탁액)을 폿트에 흘러내리지 않을 정도로 충분히 분무하여 접종하였다. 접종된 밀은 항온항습실(상대습도 70%,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )에서 7일간 발병시킨 다음, 병반 면적율을 조사하였다. 무처리구에는 무처리액(250ppm Tween-20<sup>®</sup> 함유)을 처리구와 동일한 방법으로 살포하였다.

마) 보리흰가루병균에 대한 살균활성 검정

제 1엽기의 보리(*Hordeum vulgare* L.)에 처리액(합성된 화합물,

250ppm, Tween-20<sup>®</sup> 250ppm 함유)을 살포하고 보리흰가루병원균을 접종한 후, 접종된 보리는 항온항습실(상대습도 50%, 20±2℃)에서 7일간 발병시킨 다음, 병반 면적율을 조사하였다. 무처리구에는 무처리액(250ppm Tween-20<sup>®</sup> 함유)을 처리구와 동일한 방법으로 살포하였다.

## 제 3절 결 과

### 1. Procarbamate계 살충제의 독성발현기작연구

○ 본 연구수행 방법은 기존의 개발된 약제를 연구하여 그 독성이론을 검토하고 이를 통하여 높은 선택성, 저독성 Proinsecticide 약제를 개발하고, 그 이론을 축적하는 것이다.

○ Procarbamate계 살충제인 carbosulfan, furathiocarb 그리고 benfuracarb 등과 함께 carbofuran의 *N*-dialkoxyposphinothioyl 유도체 (PSC)를 중심으로 작용기작을 검토하고, alkoxy기를 다른 작용기로 바꾸면서 질소원자와 인원자 사이의 결합이 곤충 체내에서 쉽게 끊어 지도록 유도 하는데 연구의 우선적 순서를 두었다. 생체내의 선택적인 생화학 대사과정을 통한 이탈기의 탈리 과정을 생체 *in vitro*와 *in vivo* 대사기구를 이용하여 살펴보았다.

#### 가. 공시약제의 합성 및 순도확인

합성된 *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbofuran(PSC)는 <sup>1</sup>H-NMR spectrometer와 GC/MS Spectrometer를 이용하여 구조를 확인하였다<표 3>. 또한, 합성된 PSC 및 공시약제는 재결정 및 column chromatography법으로 정제하였으며<표 4>, 정제된 각각의 약제는 HPLC분석을 통하여 순도 (98.0% 이상)를 확인하였다<표 6>.

Table 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum and GC/MS spectrum of N-dimethoxy phosphinothioyl carbofuran (PSC).

| Compound | <sup>1</sup> H-NMR(CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)                                  | GC-Mass(m/z)                   |
|----------|--|--------------------------------|
| PSC      | 1.43(s, 6H), 2.95(s, 2H),<br>3.1~3.2(d, 2H), 3.6~3.7(d, 6H),<br>6.6~6.9(m, 3H) | 345(M <sup>+</sup> ), 147, 125 |

Table 4. Eluting solvent system for column chromatography.

| Compounds    | Eluting solvent system (v/v)     |
|--------------|----------------------------------|
| Carbofuran   | Recrystallization (n-hexane)     |
| PSC          | benzene : diethyl ether = 19 : 1 |
| Carbosulfan  | n-hexane : ethylacetate = 6 : 1  |
| Benfuracarb  | n-hexane : ethylacetate = 3 : 1  |
| Furathiocarb | n-hexane : ethylacetate = 5 : 1  |

Table 5. Condition of HPLC for analysis.

---

HPLC : LC10A, Shimadzu Co. (Japan)  
 Column : μ Bondpack C<sub>18</sub> 3.0×300mm  
 UV wavelength : 254nm  
 Flow rate : 1.2ml/min  
 Attenuation : 16  
 Eluting solvent : Ethanol/Water(7/3, v/v)

---

Table 6. Purity of the purified carbofuran and procarbofurans.

| Compounds    | Rt(min)* | Purity(%) |
|--------------|----------|-----------|
| Carbofuran   | 3.52     | 99        |
| PSC          | 4.46     | 99        |
| Carbosulfan  | 11.63    | 99        |
| Benfuracarb  | 8.18     | 99        |
| Furathiocarb | 8.34     | 98        |

\* Rt: retention time(min).

나. ChE에 대한 이분자 저해속도 상수 ( $k_i$ ) 측정

Carbofuran은  $k_i$ 값이  $7.7 \times 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 target 효소인 AChE를 빠른 속도로 저해하는 강한 독성이 있는 반면, procarbamate들은  $<10^2 \sim 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 측정되어 자체로는 target 효소인 AChE에 대한 저해력이 없는 것으로 확인되었다<표 7>. 또한 BuChE에 대해 Carbofuran은  $k_i$ 값이  $3.4 \times 10^4 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 BuChE에 대해 약한 저해력을 보였으며, procarbamate들은  $<10^2 \sim 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 측정되어 자체로는 BuChE에 대한 저해력이 없는 것으로 확인되었다<표 8>. 그러나 benfuracarb은  $3.2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 모화합물인 carbofuran보다 BuChE의 저해제로서의 활성이 높았다. 따라서 이들 procarbamate약제들은 독성을 발현하기 위하여 반드시 체내에서 활성화과정을 거쳐야만 하는 것으로 가정되었다.

Table 7. Bimolecular inhibition rate constants of Carbofuran and Procarbofurans as an inhibitor of *AChE*\*<sup>1</sup>

| Compounds    | Concentration(M) <sup>*2</sup> | (Slope)b <sup>*3</sup> | r <sup>*4</sup> | k <sub>i</sub> (M <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ) |
|--------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|---|
| Carbofuran   | 1.67 × 10 <sup>-7</sup>        | 0.1290                 | 0.84*           | 7.7 × 10 <sup>9</sup>                                 |
| PSC          | 1.67 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.2080                 | 0.91*           | 1.2 × 10 <sup>5</sup>                                 |
| Carbosulfan  | 1.67 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.1552                 | 0.92**          | 9.3 × 10 <sup>2</sup>                                 |
| Benfuracarb  | 1.67 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.1888                 | 0.99***         | 1.1 × 10 <sup>3</sup>                                 |
| Furathiocarb | 6.60 × 10 <sup>-3</sup>        | 0.2885                 | 0.97***         | ≪ 10 <sup>2</sup>                                     |

\*1. *Acetylcholinesterase* obtained from electric eel.

\*2. Concentration of inhibitor in incubation mixture.

\*3. (Slope)b=ln[A<sub>0</sub>]/ln[A<sub>t</sub>]

\*4. Correlation coefficient of slope(\*, \*\*, \*\*\* significant at P <0.05, P <0.01 and P <0.001, respectively).



Table 8. Bimolecular inhibition rate constants of Carbofuran and Procarbofurans as an inhibitor of *BuChE*\*<sup>1</sup>

| Compounds    | Concentration(M) <sup>*2</sup> | (Slope)b <sup>*3</sup> | r <sup>*4</sup> | k <sub>i</sub> (M <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ) |
|--------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|---|
| Carbofuran   | 1.67 × 10 <sup>-7</sup>        | 0.0577                 | 0.99***         | 3.4 × 10 <sup>4</sup>                                 |
| PSC          | 1.67 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.1075                 | 0.90**          | 6.4 × 10 <sup>3</sup>                                 |
| Carbosulfan  | 1.67 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.0646                 | 0.94**          | 4.0 × 10 <sup>2</sup>                                 |
| Benfuracarb  | 8.32 × 10 <sup>-6</sup>        | 0.2644                 | 0.94***         | 3.2 × 10 <sup>3</sup>                                 |
| Furathiocarb | 6.60 × 10 <sup>-4</sup>        | 0.1194                 | 0.96***         | 7.1 × 10 <sup>2</sup>                                 |

\*1. *Butyrylcholinesterase* obtained from horse serum.

\*2. Concentration of inhibitor in incubation mixture.

\*3. (Slope)b=ln[A<sub>0</sub>]/ln[A<sub>t</sub>]

\*4. Correlation coefficient of slope(\*, \*\*, \*\*\* significant at P <0.05, P <0.01 and P <0.001, respectively).

다. AChE/mfo coupling system을 이용한 활성화 효과(*in vitro*)

1) Benfuracarb의 활성화효과

NADPH가 첨가된 oxidase system에서 benfuracarb의 AChE에 대한 저해력이 control에 비하여 약 10배정도 증가되었고, cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 PBO가 처리된 oxidase+PB system에서의 저해정도는 약간 감소하여 control의 저해곡선 쪽으로 이동을 하였다. 각 처리구에서의 AChE에 대한 I<sub>50</sub>은 control, oxidase, oxidase+PB system에서 각각  $5.58 \times 10^{-7}M$ ,  $6.11 \times 10^{-8}M$ ,  $7.57 \times 10^{-8}M$ 이었다<그림 10>.

2) Carbosulfan의 활성화효과

NADPH가 첨가된 oxidase system에서 PSC의 AChE에 대한 저해력이 carbosulfan에 비하여 약 20배 정도 증가되었고, cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 PBO가 처리된 oxidase+PB system에서는 control에 비하여 오히려 더 감소하였다. 각 처리구에서의 AChE에 대한 carbosulfan의 I<sub>50</sub>은 control, oxidase, oxidase+PB system에서 각각  $7.73 \times 10^{-5}M$ ,  $8.41 \times 10^{-6}M$ ,  $3.18 \times 10^{-5}M$ 이었다<그림 11>.

3) PSC의 활성화효과

NADPH가 첨가된 oxidase system에서의 AChE에 대한 저해력은 control에 비하여 약 800배정도 증가되었고, cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해

제인 piperonyl butoxide (PBO)를 처리하였을 때 oxidase system에 비하여 oxidase+PB system에서의 저해정도는 control의 저해곡선 쪽으로 상당히 이동을 하였다. Target 효소 활성의 50%를 저해하는 약제의 농도인  $I_{50}$ 을 비교하면 control, oxidase, oxidase+PB system에서 각각  $4.69 \times 10^{-4}M$ ,  $3.75 \times 10^{-7}M$ ,  $1.94 \times 10^{-5}M$ 이었다<그림 12>.

#### 라. 생쥐 brain AChE에 대한 독성발현 (*in vivo*)

Procarbafurans를 0, 20, 50, 70, 100, 150, 180mg/kg등의 수준으로 복강투여하였을 때 무처리구(control)과 PBO처리구에서 생쥐 brain AChE 저해제로서의 독성효과를 관찰하였다. 이를 통하여 procarbafurans의 활성화과정에 참여하는 mfo효소의 역할을 *in vivo*에서 확인하고자 하였다.

##### 1) Benfuracarb에 의한 독성발현

활성화 과정 중 mfo의 역할을 *in vivo*에서 알아보기 위하여, 생쥐에 benfuracarb만을 0, 25, 50, 75, 100mg/kg 수준으로 복강투여한 약제 처리구와, cytochrome P<sub>450</sub>의 저해제인 PBO를 2시간 전 처리한 처리구를 비교하였다. 그 결과 PBO를 전 처리한 경우가 약제만을 처리한 처리구보다 brain AChE의 활성이 높게 나타났다. 이 때 benfuracarb처리구의  $I_{50}$ 은 22.7mg/kg이었으며, benfuracarb+PBO 처리구는 저해정도가 급격하게 경감되어 최대수준인 100mg/kg투여시에도  $I_{50}$ 은 구할 수 없었다<그림 13>.

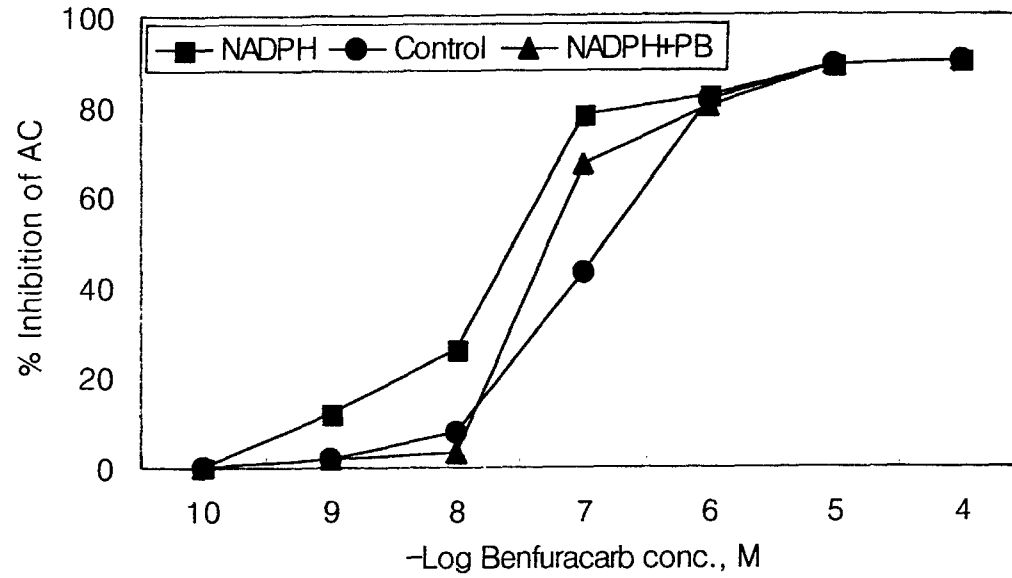


Figure 10. Microsomal oxidative activation of benfuracarb as an inhibitor of electric eel AChE by Ellman's assay.

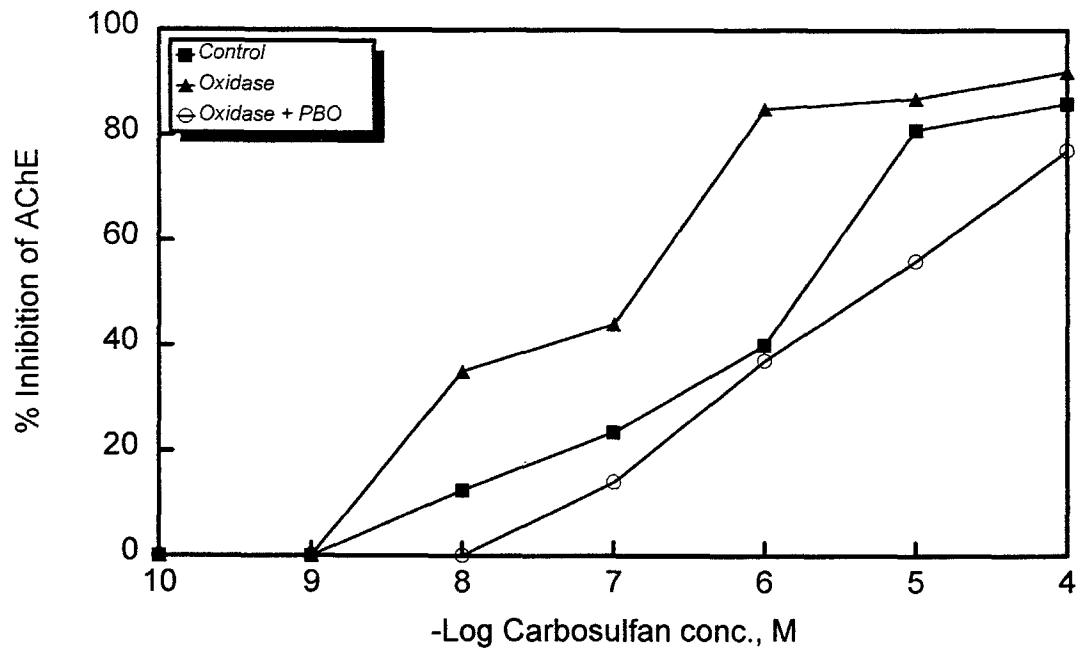


Figure 11. Microsomal oxidative activation of carbosulfan as an inhibitor of electric eel AChE by Ellman's assay.

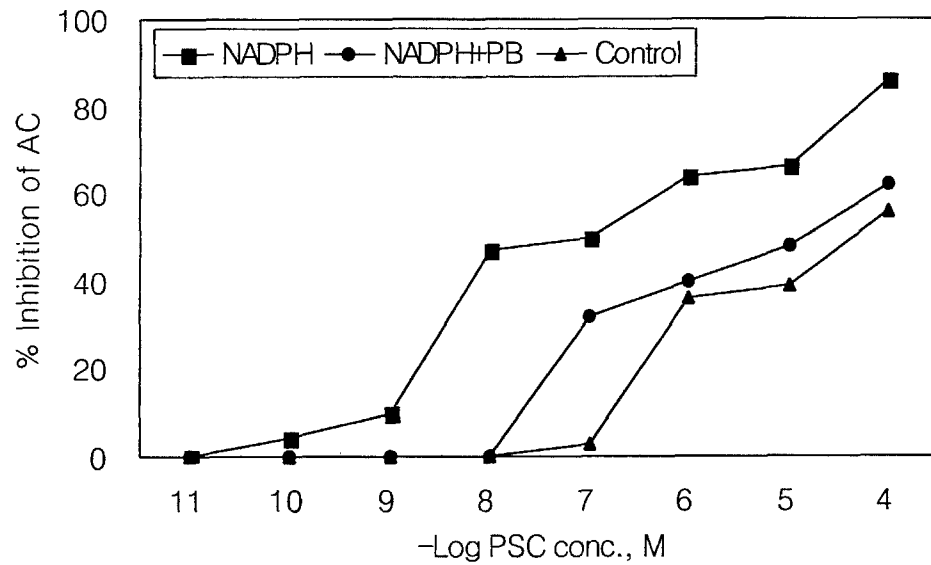


Figure 12. Microsomal oxidative activation of PSC as an inhibitor of electric eel AChE by Ellman's assay.

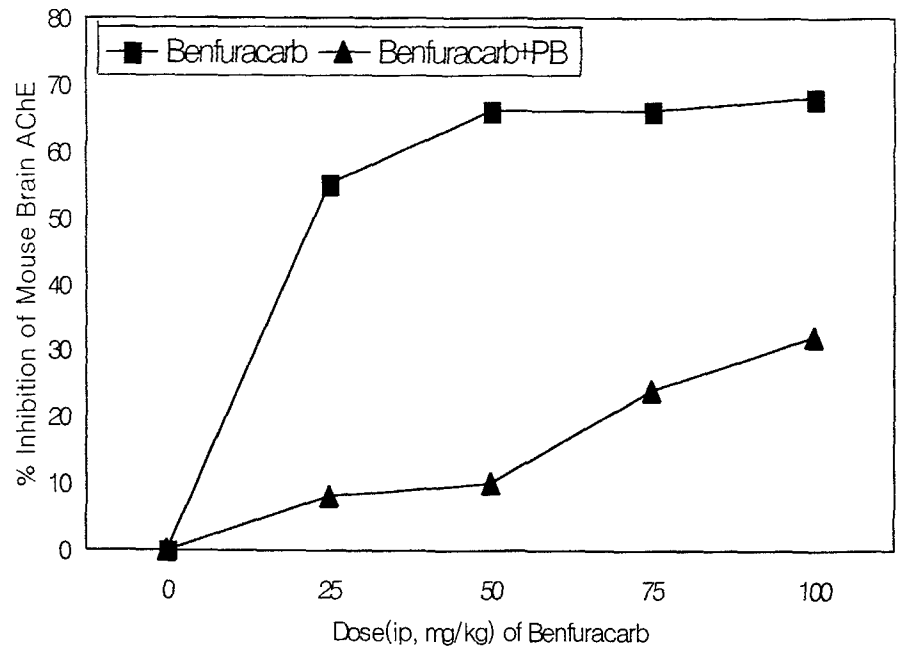


Figure 13. Inhibition of mouse brain AChE by benfuracarb.

## 2) Carbosulfan에 의한 독성발현

Cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 PBO를 처리하였을 때 control보다 brain AChE의 활성이 다소 높게 나타났다. 이 때 PBO처리구에서 carbosulfan의 I<sub>50</sub>은 162mg/kg이었고, control에서의 I<sub>50</sub>은 14mg/kg이었다. I<sub>50</sub>를 기준으로 볼 때 PBO처리구에서 carbosulfan의 brain AChE 저해력이 무처리구에서 보다 약 12배 정도 낮게 나타났다<그림 14>.

## 3) PSC에 의한 독성발현

Cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 PBO를 처리하였을 때 control보다 brain AChE의 활성이 높게 나타났다. 이 때 PBO처리구에서 PSC의 I<sub>50</sub>은 57mg/kg이었고, 무처리구에서의 I<sub>50</sub>은 28mg/kg이었으며, I<sub>50</sub>을 기준으로 볼 때 PBO처리구가 무처리구에 비하여 PSC에 의한 생쥐 brain AChE 저해력이 약 2배 감소되었다<그림 15>.

### 마. 대사반응을 통하여 생성된 독성 대사물의 분석

#### 1) Benfuracarb의 독성대사물

MFO system에서 독성대사물의 생성은 control의 경우 남아있는 benfuracarb의 양은 81.0%, 생성된 carbofuran의 양은 1.9%였으며, mfo의 cofactor인 NADPH가 첨가된 MFO system에서는 benfuracarb이 11.5%, carbofuran이 58.2%가 생성되어 control에 비해 30배정도 높은 carbofuran의



생성을 보였고, 또한 mfo가 저해된 MFO+PBO system에서는 carbofuran이 1.7%가 생성되었다. 이상의 결과에서 benfuracarb의 독성대사물이 carbofuran임을 알 수 있었고, 이 활성화 과정에 mfo가 관여함을 확인할 수 있었다<그림 16>.

GST/GSH system에서의 독성대사물의 생성은 GST와 inhibitor만이 존재하는 system에서 carbofuran의 생성은 0.1%이하였으며 이는 GST만의 단독 역할만으로는 독성대사물을 생성할 수 없음을 알았다. 또한 cytosol의 또 다른 효소에 의하여 미지의 물질로 35%가 전환되었고, GSH와 inhibitor가 존재하는 system에서는 10%이하의 carbofuran이 생성되었다. 그러나 GST와 이것의 co-substrate인 GSH가 동시에 존재하는 system에서는 carbofuran이 80%가 생성되었고, GSH의 고갈제인 DM을 첨가한 GST+GSH+DM 처리구에서는 carbofuran이 71%가 생성되었다. 이 결과로는 GST+GSH system보다 DM이 처리된 system에서 carbofuran의 생성이 1.1% 감소한 것을 알 수 있었으나 그 효과는 뚜렷하지 않았다<그림 17>.

MFO/GST/GSH combination system에서의 독성대사물 생성은 microsome과 GST만이 존재하는 system에서 carbofuran이 7.9% 생성되었고, MFO+GST system에서는 carbofuran이 35.1%, 미지의 물질이 46.5%가 생성되어 cytosol내의 다른 효소가 대사과정에 관여하는 것을 알 수 있었으나 이 효소가 무엇인지는 밝혀내지 못하였다. 또한 PBO를 처리한 결과 carbofuran으로는 전혀 전환되지 못하였으며 다량의 benfuracarb과 미지의 물질을 확인할 수 있었다. MFO+GST+GSH system과 MFO+GST+GSH+DM system에서는 각각 80%와 36%의 carbofuran이 생성되어 carbofuran의 생성에 GSH의 역할이 큰 것을 확인하였다. MFO+NADPH+GST+GSH combination system에서 carbofuran의 생성이 97%로 가장 높은 것을 확인하였다. 이상의 결과는 benfuracarb이 독성물질인 carbofuran으로 전환되기

위해서는 MFO+NADPH+GST+GSH의 복합적인 작용이 필요하다는 것을 시사한다<그림 18>.

## 2) Carbosulfan의 독성대사물

Carbosulfan만을 처리한 blank에서는 carbosulfan이 101.1%가 검출되었으며, carbosulfan과 cytochrome P<sub>450</sub>만을 함유한 control system에서 남아있는 carbosulfan의 양은 77.0%이었으며, 생성된 carbofuran의 양은 9.2%이었다. 또한 cytochrome P<sub>450</sub>의 cofactor인 NADPH가 첨가된 oxidase system에서는 carbosulfan이 55.8%, carbofuran이 14.9%가 생성되어 control에 비해 1.5배 높다는 것을 확인 하였다. Cytochrome P<sub>450</sub>의 선택적 저해제인 PBO가 첨가된 oxidase+PB system에서 생성된 carbofuran의 양은 peak로 확인되지 않을 정도의 소량이었으며, carbosulfan은 PBO에 의해 생성된 간섭물질로 인하여 정량할 수 없었다<표 9>.

Table 9. Production of metabolites of carbosulfan in oxidase system.

| System     | Production (%) |            |          |
|------------|----------------|------------|----------|
|            | Carbosulfan    | Carbofuran | Unknowns |
| blank      | 101.8          | -          |          |
| control    | 77.0           | 9.2        | 14.0     |
| oxidase    | 55.8           | 14.9       | 29.3     |
| oxidase+PB | -*             | trace      | -*       |

\* : Unable to be detected due to interference.

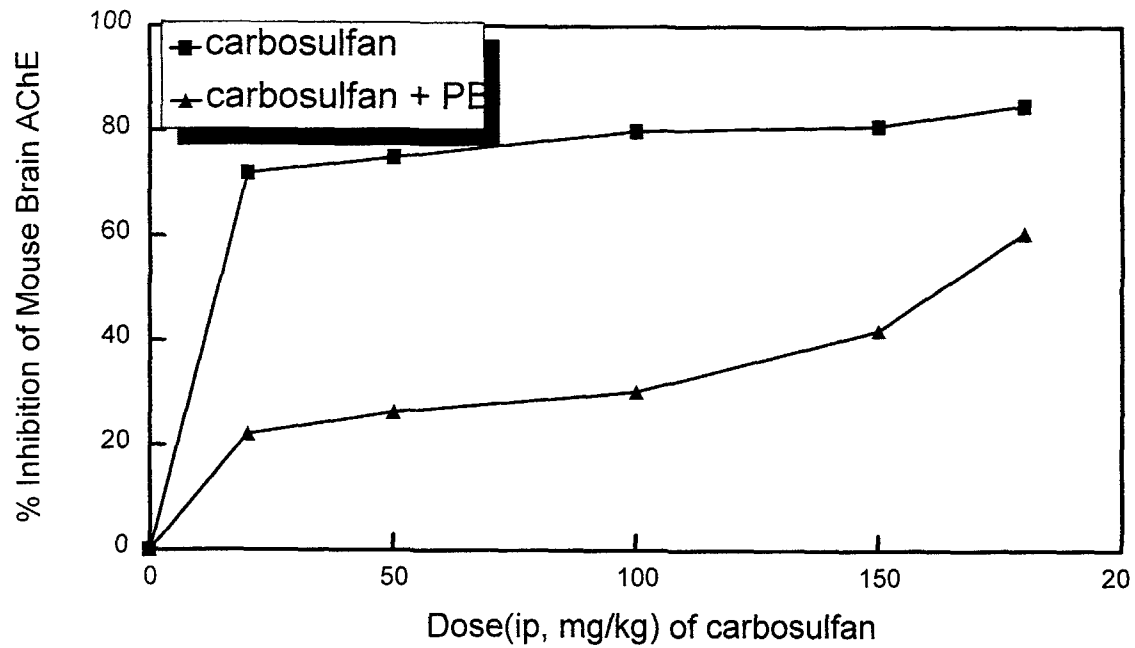


Figure 14. Inhibition of mouse brain AChE by carbosulfan.

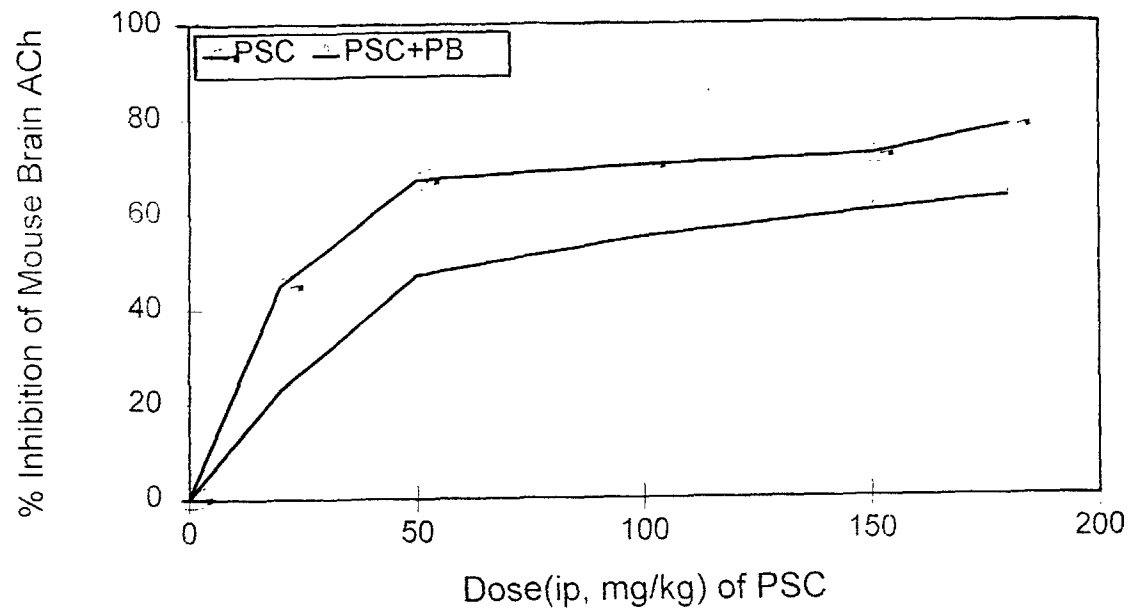


Figure 15. Inhibition of mouse brain AChE by PSC.

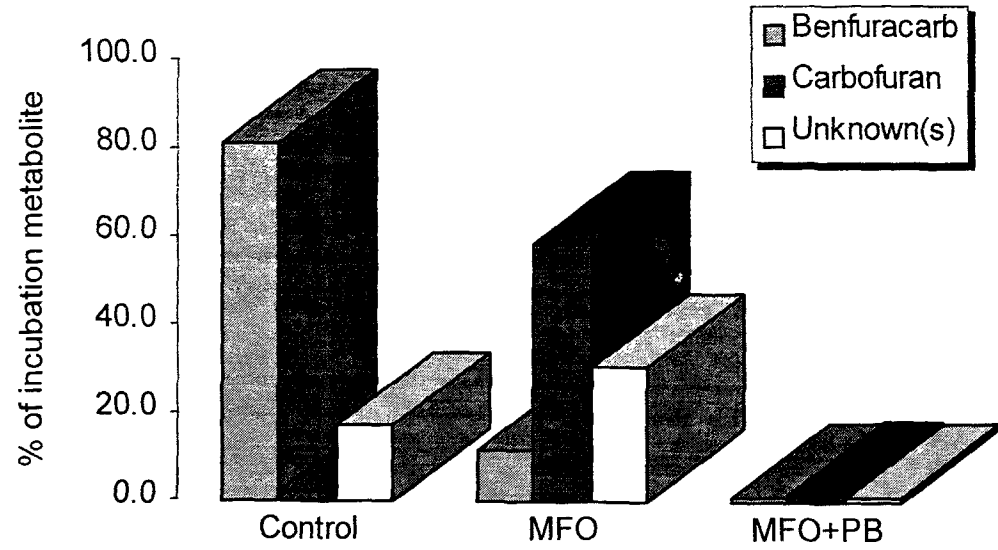


Figure 16. Incubation metabolites of benfuracarb in MFO system.

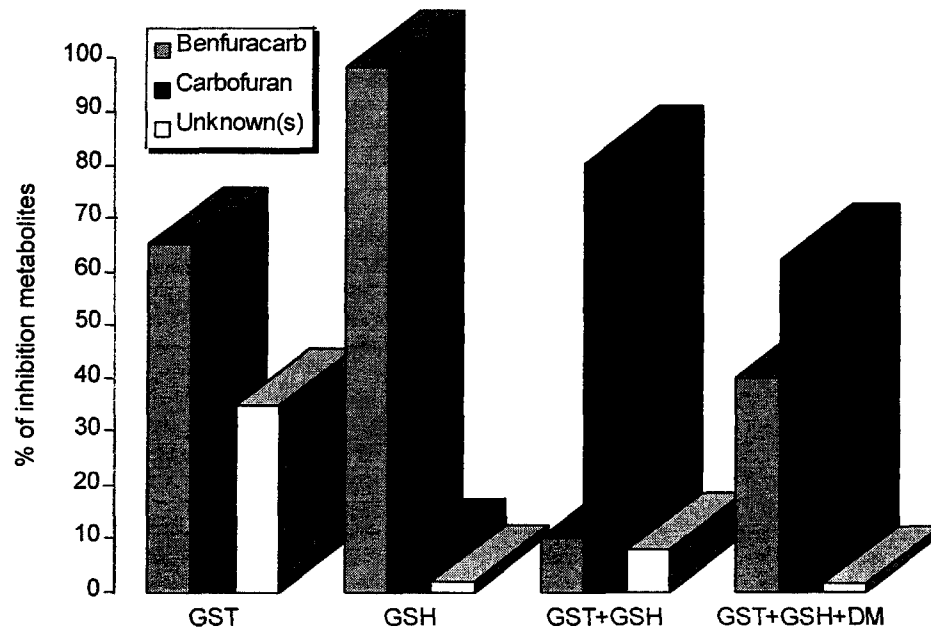


Figure 17. Incubation metabolites of benfuracarb in GST/GSH system.

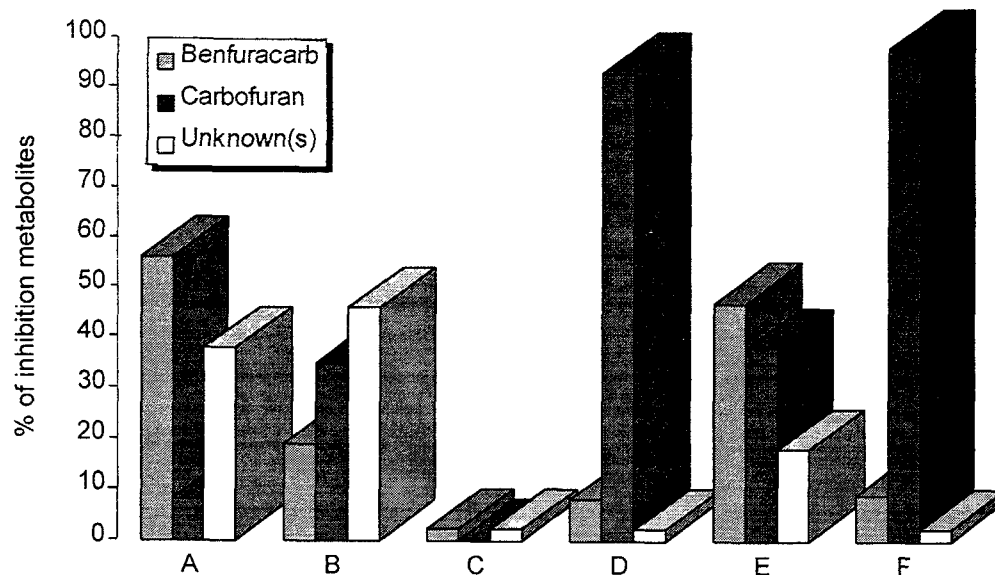


Figure 18. Incubation metabolites of benfuracarb in GST/GSH system. A: microsome+GST, B: microsome+GST, C: MFO+GST+PB, D: microsome+ GST+GSH, E: microsome+GST+GSH+DM, F: microsome+GST+GSH+ NADPH.

### 3) PSC의 독성대사물

Microsomal protein 1mg 만을 포함하는 control과 mfo의 cofactor인 NADPH를 넣은 oxidase system을 이용하여 PSC의 활성화 정도를 살펴 보았다. 본 실험에서 control과 oxidase system 하에서 carbofuran으로의 전환을 관찰할 수 없었다. 다만 가수분해물인 7-OH로의 생성을 각각 14, 19% 관찰할 수 있었다<그림 19>.

GST/GSH, MFO/NADPH/GST/GSH system에서도 PSC의 경우에는 carbofuran으로 전환되는 것을 확인 할 수 없었으며, 전 system에서 7-OH로 17~20%, unknown(s) 10~13% 그리고 PSC자체로 70%정도가 남아있는 유사한 결과를 얻었다<그림 20, 21>.

Mfo의 작용을 mimic하는 유기산화제로 알려진 m-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA)를 PSC와 반응한 결과 75%의 carbofuran 생성을 관찰할 수 있었다<그림 22>. 이로서 PSC의 활성화 과정에 산화효소인 mfo의 역할이 중요함을 추정할 수 있었다.

이상의 결과를 통해서 procarbofurans들은 생체내에서 mfo가 관여하는 대사과정을 통하여 독성을 타나내는 것을 확인하였다. Procarbofurans의 예상되는 체내 독성 발현기작을 <그림 23>에 도식하였다.



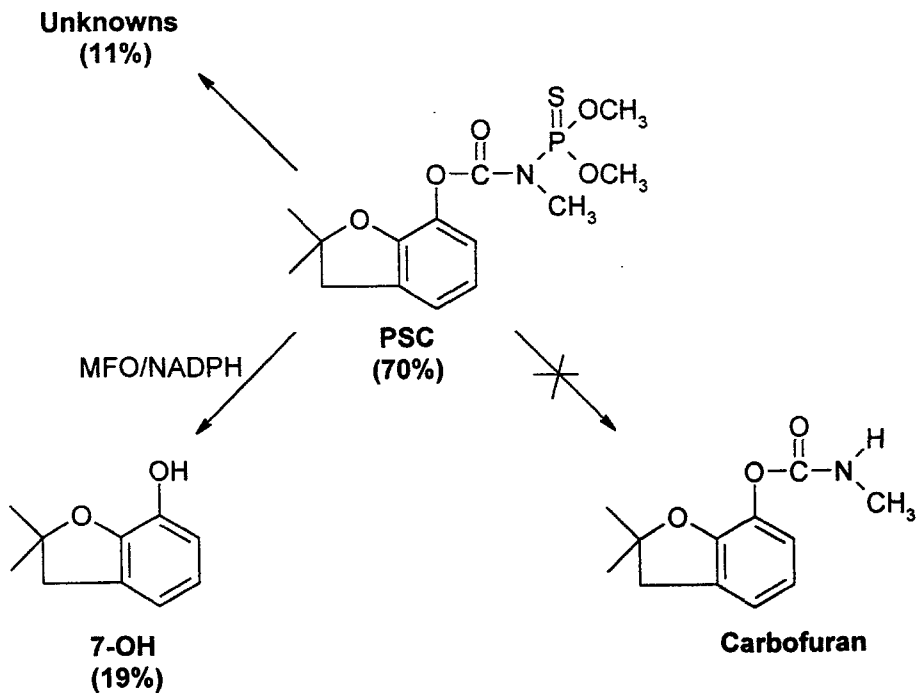


Figure 19. Formation of PSC metabolites via MFO/NADPH bioactivation process.

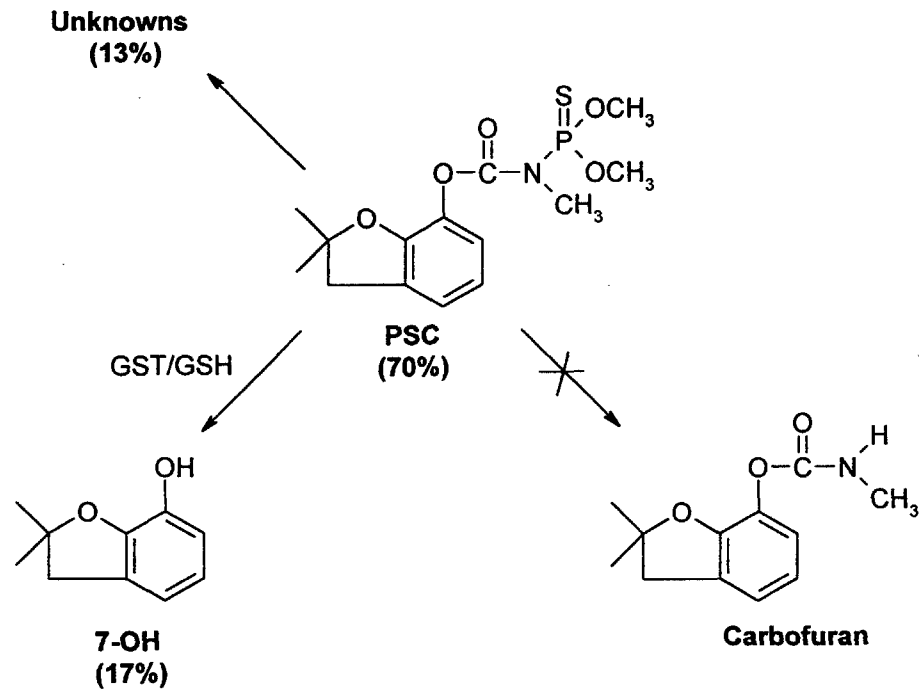


Figure 20. Formation of PSC metabolites via GST/GSH bioactivation process.

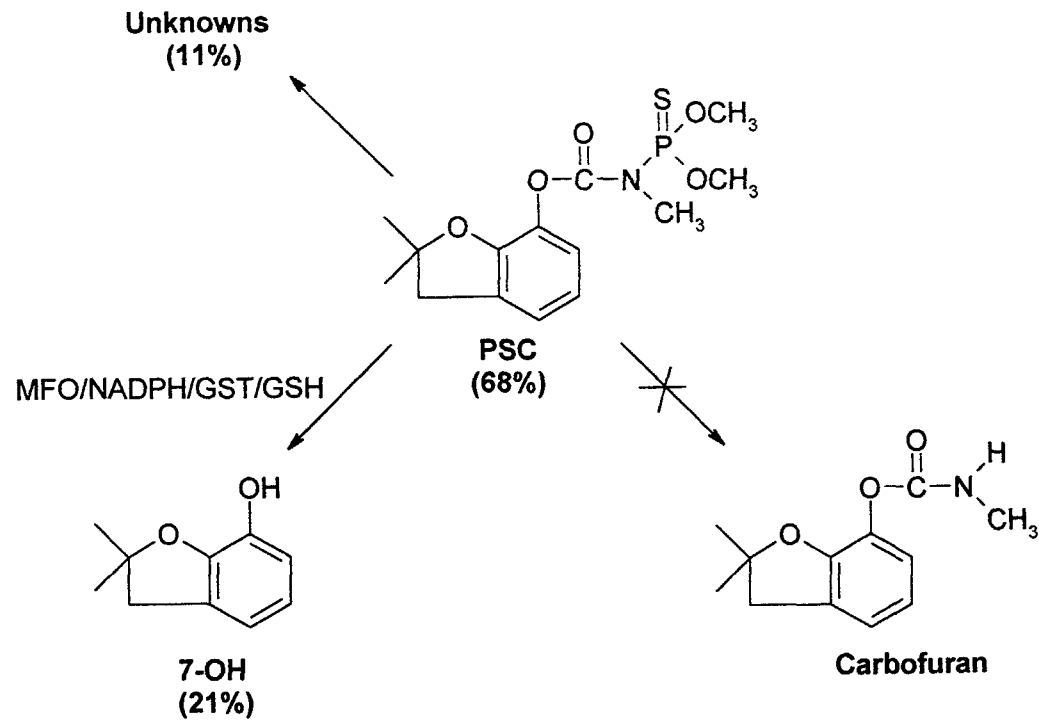


Figure 21. Formation of PSC metabolites via MFO/NADPH/GST/GSH bioactivation process.

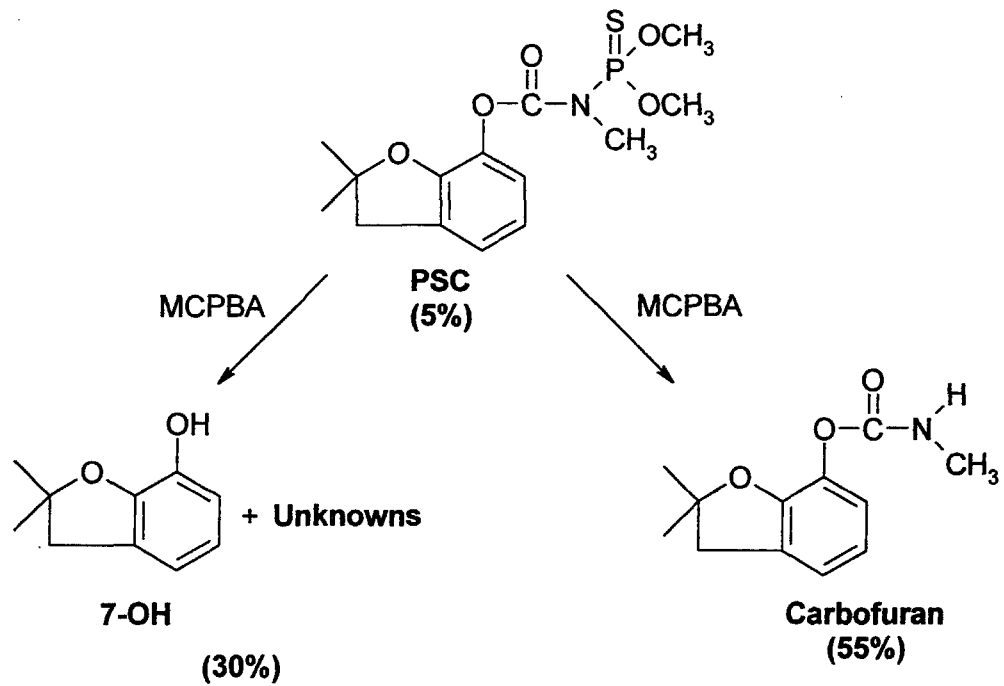


Figure 22. Formation of PSC metabolites via MCPBA bioactivation process.

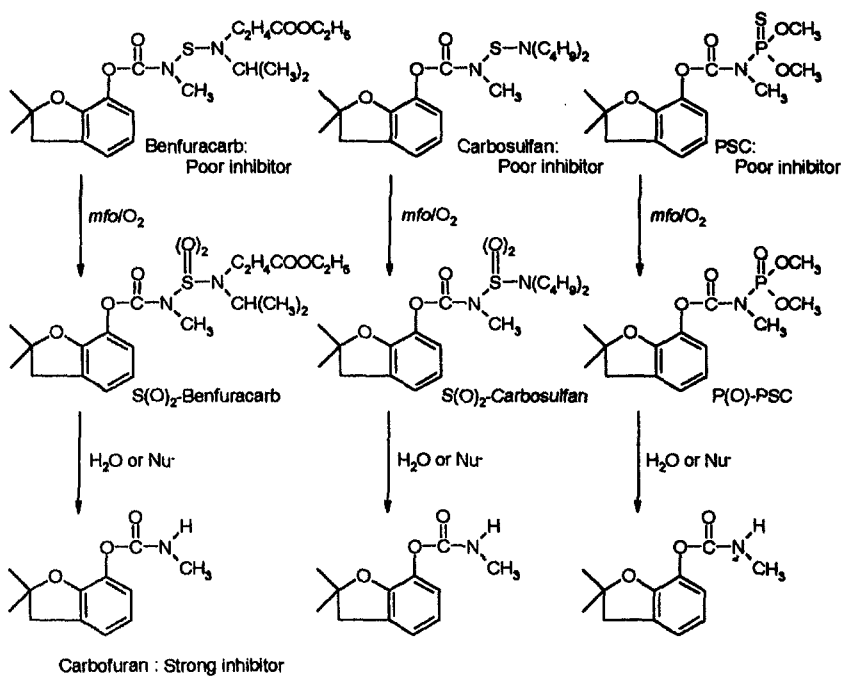


Figure 23. Suggested scheme for bioactivation of Procarbofurans

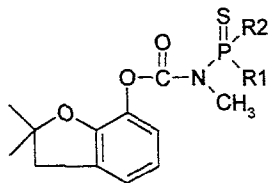
## 2. 저독성 Proinsecticide계 살충제의 개발연구

### 가. 새로운 Procarbamate계 살충제의 개발 (합성법, 합성, 생물활성)

세부과제의 독성발현기작 결과를 기초로 하여 설계한 carbofuran 유도체의 합성을 시도하였다. 합성된 화합물은  $^1\text{H-NMR}$  spectrometer (DPX 400, Bruker, U.S.A.)를 사용하여 구조를 확인하였고<표 10> GC-Mass spectrometer(MS-QP 1000A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 구조분석 하였으며<표 11>, 5종의 곤충에 대한 생물활성을 검정결과는 다음<표 13>과 같았다.



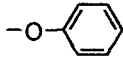

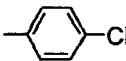
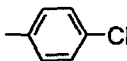
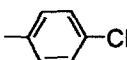
#### 1) *N*-Phosphinothioyl carbofuran 유도체의 합성 및 구조 확인

Table 10. <sup>1</sup>H-NMR Spectra of *N*-phosphinothioyl carbofuran derivatives.





| Compounds         |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)   |
|-------------------|---|--|
| R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub>                                    |  |
| -OCH <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub>                                 | 1.46(s, 6H), 3.03(s, 2H), 3.26~3.31(d, 2H), 3.81~3.88(d, 6H), 6.74~7.02(m, 3H)   |
| -CH <sub>3</sub>  | -OCH <sub>3</sub>                                 | 1.45~1.47(d, 6H), 2.21~2.29(d, 3H), 3.04(s, 2H), 3.28~3.43(d, 3H), 3.67~3.75(d, 3H), 6.76~7.04(m, 3H)                                |
|                   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 1.28~1.33(t, 3H), 1.36~1.37(d, 6H), 2.21~2.29(d, 3H), 3.01(s, 2H), 3.38~3.42(d, 3H), 3.98~4.26(m, 2H), 6.71~7.04(m, 3H)              |
|                   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.92~0.99(t, 3H), 1.57(s, 6H), 1.62~1.76(m, 2H), 2.22~2.30(d, 3H), 3.04(s, 2H), 3.38~3.42(d, 3H), 3.90~4.16(m, 2H), 6.72~7.29(m, 3H) |

(Continued)

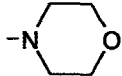
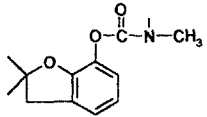
| Compounds   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)   |
|---|---|--|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |  |
| -CH <sub>3</sub>  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 0.86~0.96(t, 3H), 1.44(s, 6H), 1.59~1.69(m, 2H), 2.19~2.29(d, 3H), 2.58~2.72(m, 2H), 3.04(s, 2H), 3.38~3.42(d, 3H), 3.85~4.21(m, 2H), 6.76~7.06(m, 3H) |
|  |  | 1.45(s, 6H), 2.99(s, 2H), 3.46(d, 3H), 6.48~6.92(m, 3H), 7.45~7.50(m, 6H), 7.89~7.97(m, 4H)  |
| -CH <sub>3</sub>  |  | 1.40(s, 6H), 2.42(d, 3H), 3.02(s, 2H), 3.28(d, 3H), 6.74~7.01(m, 3H), 7.17~7.34(m, 5H)   |
| -OCH <sub>3</sub>   |  | 1.42(d, 6H), 3.00(s, 2H), 3.47(d, 3H), 3.91(d, 3H), 6.67~6.97(m, 3H), 7.43~7.47(m, 3H), 7.89~7.97(m, 2H)   |
|  |  | 1.44(s, 6H), 3.01(s, 2H), 3.46(d, 3H), 6.59~6.97(m, 3H), 7.41~7.43(2d, 4H), 7.80~7.88(2d, 4H)  |
| -OCH <sub>3</sub>   |  | 1.39(s, 6H), 3.00(s, 2H), 3.49(d, 3H), 3.89(d, 3H), 6.63~6.98(m, 3H), 7.39~7.42(2d, 2H), 7.83~7.91(2d, 2H)   |

(Continued)



| Compounds                        |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|----------------------------------|---|---|
| R <sub>1</sub>                   | R <sub>2</sub>  |   |
| -CH <sub>3</sub>                 | -OCH <sub>2</sub> -  | 1.46(d, 6H), 2.32(d, 3H), 3.06(s, 2H), 5.03~5.23(m, 2H),<br>6.80~7.28(m, 3H), 7.34~7.47(m, 5H)  |
| -CH <sub>3</sub>                 | -SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | 1.35(t, 3H), 1.48(d, 6H), 2.50(d, 3H), 3.08(s, 2H), 2.99~3.10(m,<br>2H), 3.38(d, 3H), 6.78~7.04(m, 3H)  |
| -OCH <sub>3</sub>                | -CH <sub>2</sub> -   | 1.49(s, 6H), 3.07(s, 2H), 3.42(d, 3H), 3.61(d, 2H), 3.72(d, 3H),<br>6.74~7.04(m, 3H), 7.33~7.48(m, 5H)  |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub>   | 1.25~1.32(m, 3H), 1.48(d, 6H), 2.37~2.46(m, 1H), 2.59~2.67(m,<br>1H), 3.06(s, 2H), 3.41(d, 3H), 3.75(d, 3H), 6.78~7.05(m, 3H)                 |
| -CH <sub>3</sub>                 | -SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                     | 0.96(t, 3H), 1.43~1.50(m, 2H), 1.48(d, 6H), 1.60~1.68(m, 2H),<br>2.50(d, 3H), 2.98~3.08(m, 2H), 3.07(s, 2H), 3.37(d, 3H),<br>6.78~7.05(m, 3H) |
|                                  | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | 1.49(s, 6H), 2.27(d, 3H), 2.79(d, 6H), 3.07(s, 2H), 3.33(d, 3H),<br>6.79~7.05(m, 3H)  |

(Continued)

| Compounds        |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|------------------|---|---|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>  |   |
| -CH <sub>3</sub> | -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 1.12(t, 6H), 1.46(s, 6H), 2.27(d, 3H), 3.04(s, 2H), 3.09~3.46(m, 4H), 3.32(d, 3H), 6.76~7.02(m, 3H)   |
|                  | -N(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 0.89(t, 6H), 1.46~1.67(m, 4H), 1.48(s, 6H), 2.29(d, 3H), 2.93~3.10(m, 2H), 3.04(s, 2H), 3.20~3.38(m, 2H), 3.35(d, 3H), 6.79~7.04(m, 3H)                   |
|                  | -N(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub>                                   | 0.94(t, 6H), 1.27~1.34(m, 4H), 1.36~1.59(m, 4H), 1.48(s, 6H), 2.27(d, 3H), 2.97~3.11(m, 2H), 3.05(s, 2H), 3.34(d, 3H), 3.24~3.40(m, 2H), 6.81~7.04(m, 3H) |
|                  |  | 1.49(d, 6H), 2.27(d, 3H), 3.07(s, 2H), 3.18~3.24(m, 2H), 3.32~3.45(m, 2H), 3.35(d, 3H), 3.61~3.77(m, 4H), 6.79~7.05(m, 3H)                                |
|                  |  | 1.44(d, 12H), 2.57(d, 3H), 3.03(s, 4H), 3.33(d, 6H), 6.78~7.03(m, 6H)   |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br  | 1.47(6H, d), 2.26(3H, d), 3.05(2H, s), 3.38(3H, d), 3.55(2H, m), 4.19~4.45(2H, m), 6.82(1H, t), 6.96(1H, d), 7.03(1H, d)                                  |

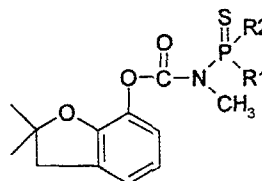
(Continued)

| Compounds        |                                      | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|------------------|--------------------------------------|---|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                       |   |
| -CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br | 1.47(6H, d), 2.23(2H, m), 2.27(3H, d), 3.05(2H, s), 3.44(3H, d), 3.55(2H, m), 4.05~4.28(2H, m), 6.82(1H, t), 7.03(1H, d)              |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl | 1.48(6H, d), 2.29(3H, d), 3.05(2H, s), 3.40(3H, d), 3.72(2H, t), 4.19~4.38(2H, m), 6.81(1H, t), 6.92(1H, d), 7.02(1H, d)              |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CHCl <sub>2</sub>  | 1.48(6H, d), 2.31(3H, d), 3.40(3H, d), 4.30~4.47(2H, m), 5.89(1H, t), 6.81(1H, t), 6.92(1H, d), 7.04(1H, d)                           |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>   | 1.49(6H, d), 2.41(3H, q), 3.09(2H, s), 3.39(3H, d), 4.65(2H, m), 6.84(1H, t), 6.96(1H, d), 7.02(1H, d)                                |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl | 1.48(6H, d), 2.12(2H, m), 2.27(3H, d), 3.05(2H, s), 3.42(3H, d), 3.65(2H, m), 4.06~4.29(2H, m), 6.81(1H, t), 6.93(1H, d), 7.02(1H, d) |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>    | 1.46(6H, d), 2.35(3H, d), 3.06(2H, s), 3.38(3H, d), 4.43(2H, m), 6.81(1H, t), 6.91(1H, d), 7.02(1H, d)                                |

(Continued)

| Compounds        |  | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|------------------|--|---|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                                     |   |
| -CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> | 1.47(6H, d), 2.31(3H, q), 3.05(2H, d), 3.39(2H, q), 4.28~4.48(2H, m), 4.70~4.88(1H, m), 6.82(1H, q), 6.90(1H, d), 7.02(1H, t) |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 1.46(6H, d), 2.35(3H, d), 3.05(2H, s), 3.38(3H, d), 4.35~4.61(2H, m), 6.80(1H, t), 6.91(1H, d), 7.02(1H, d)                   |
|                  | -CH <sub>3</sub>                                   | 1.48(6H, d), 2.16(6H, d), 3.05(2H, s), 3.49(3H, d), 6.81(1H, t), 6.94(1H, d), 7.02(1H, d)                                     |

Table 11. GC/MS Spectra of *N*-phosphinothioyl carbofuran derivatives.



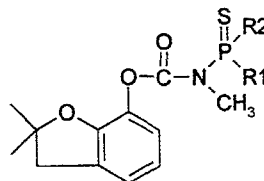
| Compounds        |  | GC-Mass (m/z)                    |
|------------------|--|----------------------------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                                     |                                  |
| -CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br               | 421(M'), 343, 203, 164, 147      |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br               | 435(M'), 274, 217, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl               | 377(M'), 221, 214, 164, 157, 147 |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CHCl <sub>2</sub>                | 411(M'), 248, 191, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>                 | 445(M'), 298, 284, 226, 164, 147 |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl               | 405(M'), 243, 215, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                  | 397(M'), 234, 177, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> | 429(M'), 266, 209, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 447(M'), 284, 227, 164, 147      |
|                  | -CH <sub>3</sub>                                   | 313(M'), 164, 150, 147, 93       |

## 2) 살충활성검정

합성된 procarbamate계 화합물들의 3~5종의 곤충에 대한 살충활성을 조사하기 위하여 여러 가지 농도로 생물검정을 행하였다. 상품화된 procarbamate계 살충제인 benfuracarb과 carbosulfan을 대조 약제로 선정하여 새롭게 합성된 화합물들에 대한 살충활성과 비교를 하였다.

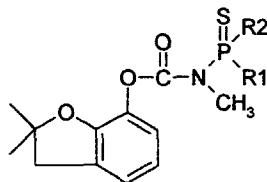
Benfuracarb과 carfosulfan은 배추좀나방과 벼멸구에 대하여 높은 활성을 보였으며<표 13>, 새로 합성된 화합물들에서도 두 대조 약제와 비슷한 수준에서 배추좀나방과 벼멸구에 대하여 활성이 관찰되었다<표 12>. 분자설계 시 고려되었던 PSC의 인원자에 치환된 methoxy기를 methyl기로 치환하는 과정을 통하여 전반적인 살충활성이 증가됨을 확인하는 과정을 통하여 독성이론을 바탕으로 분자를 설계하는 것이 새로운 살충제의 개발에 중요한 과정임을 실증하였다. 포유동물에 대한 추가적인 독성실험을 통하여 안전성이 확인되면 새로운 저독성, 고선택성 살충제의 가능성이 높을 것으로 판단된다.

Table 11. GC/MS Spectra of *N*-phosphinothioyl carbofuran derivatives.



| Compounds        |  | GC-Mass (m/z)                                 |
|------------------|--|---|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                                     |   |
| -CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br               | 421(M <sup>+</sup> ), 343, 203, 164, 147      |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br               | 435(M <sup>+</sup> ), 274, 217, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl               | 377(M <sup>+</sup> ), 221, 214, 164, 157, 147 |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CHCl <sub>2</sub>                | 411(M <sup>+</sup> ), 248, 191, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>                 | 445(M <sup>+</sup> ), 298, 284, 226, 164, 147 |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl               | 405(M <sup>+</sup> ), 243, 215, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                  | 397(M <sup>+</sup> ), 234, 177, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> | 429(M <sup>+</sup> ), 266, 209, 164, 147      |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 447(M <sup>+</sup> ), 284, 227, 164, 147      |
|                  | -CH <sub>3</sub>                                   | 313(M <sup>+</sup> ), 164, 150, 147, 93       |



Table 13. Insecticidal activity (%) of *N*-phosphinothioyl carbofuran derivatives in five different pests.



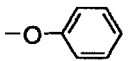

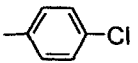
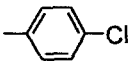
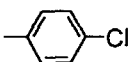
| Compounds         |                   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |
|-------------------|-------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub>    |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |
| -OCH <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub> | 500            | 60          | 40          | 100         | -       | 0           |
|                   |                   | 500            | 95          | 100         | 100         | -       | 0           |
|                   |                   | 250            | 70          | 40          | 100         | 80      | -           |
|                   | -OCH <sub>3</sub> | 125            | -           | 0           | 100         | -       | -           |
|                   |                   | 63             | -           | 0           | 100         | -       | -           |
|                   |                   | 31             | -           | 0           | 80          | -       | -           |
|                   |                   | 16             | -           | 0           | 60          | -       | -           |

(Continued)





| Compounds   |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |
|---|---|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |
| -CH <sub>3</sub>  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | 500            | 95          | 100         | 100         | -       | 0           |
|   |   | 250            | 100         | 100         | 100         | 0       | 0           |
|   |   | 125            | 80          | 70          | 100         | -       | -           |
|   |   | 63             | 80          | 20          | 90          | -       | -           |
|   |   | 31             | 0           | 0           | 35          | -       | -           |
|   |   | 16             | 0           | 0           | 25          | -       | -           |
|   |   | 8              | 0           | 0           | -           | -       | -           |
| -CH <sub>3</sub>  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | 500            | 95          | 60          | 100         | -       | 0           |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 500            | 70          | 0           | 100         | -       | 0           |
|  |  | 250            | 0           | 0           | 80          | 0       | 0           |

(Continued)

| Compounds   |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant Hopper | Green Peach Aphid | Diamondback Moth | Tobacco Cutworm | Two-Spotted Spider Mite |
|---|---|----------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                |                    |                   |                  |                 |                         |
| -CH <sub>3</sub>  |  | 250            | 0                  | 0                 | 100              | 0               | 0                       |
|   |   | 125            | -                  | -                 | 50               | -               | -                       |
|   |   | 63             | -                  | -                 | 50               | -               | -                       |
|   |   | 31             | -                  | -                 | 15               | -               | -                       |
|   |   | 16             | -                  | -                 | 15               | -               | -                       |
| -OCH <sub>3</sub>   |  | 250            | 60                 | 0                 | 100              | 0               | 0                       |
|   |   | 125            | -                  | -                 | 100              | -               | -                       |
|   |   | 63             | -                  | -                 | 70               | -               | -                       |
|   |   | 31             | -                  | -                 | 55               | -               | -                       |
|   |   | 16             | -                  | -                 | 20               | -               | -                       |
|  |  | 250            | 0                  | 0                 | 70               | 0               | 0                       |
| -OCH <sub>3</sub>   |  | 250            | 0                  | 0                 | 100              | 0               | 0                       |
|   |   | 125            | -                  | -                 | 70               | -               | -                       |
|   |   | 63             | -                  | -                 | 10               | -               | -                       |
|   |   | 31             | -                  | -                 | 5                | -               | -                       |
|   |   | 16             | -                  | -                 | 5                | -               | -                       |

(Continued)

| Compounds         |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant Hopper | Green Peach Aphid | Diamondback Moth | Tobacco Cutworm | Two-Spotted Spider Mite |
|-------------------|---|----------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------|
| R <sub>1</sub>    | R <sub>2</sub>  |                |                    |                   |                  |                 |                         |
| -CH <sub>3</sub>  | -OCH <sub>2</sub> -  | 250            | 0                  | 0                 | 100              | 0               | 0                       |
|                   |   | 125            | -                  | -                 | 90               | -               | -                       |
|                   |   | 63             | -                  | -                 | 75               | -               | -                       |
| -CH <sub>3</sub>  | -SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | 250            | 100                | 100               | 85(?)            | 0               | 0                       |
|                   |   | 125            | 75                 | 80                | 60               | -               | -                       |
|                   |   | 63             | 48                 | 10                | 40               | -               | -                       |
|                   |   | 31             | 50                 | 0                 | 20               | -               | -                       |
|                   |   | 16             | 35                 | 0                 | 5                | -               | -                       |
|                   |   | 8              | 8                  | 0                 | 0                | -               | -                       |
| -OCH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -   | 250            | 15                 | 100               | 100              | 60              | 0                       |
|                   |   | 125            | -                  | 0                 | 95               | -               | -                       |
|                   |   | 63             | -                  | 0                 | 35               | -               | -                       |
|                   |   | 31             | -                  | 0                 | 0                | -               | -                       |
|                   |   | 16             | -                  | 0                 | 0                | -               | -                       |
|                   |   | 8              | -                  | 0                 | 0                | -               | -                       |

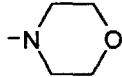
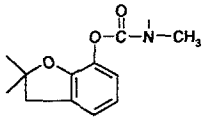
(Continued)

| Compounds                        |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |   |
|----------------------------------|---|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|---|
| R <sub>1</sub>                   | R <sub>2</sub>  |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |   |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub>   | 250            | 100         | 40          | 100         | 90      | -           |   |
|                                  |   | 125            | 73          | -           | 100         | 75      | -           |   |
|                                  |   | 63             | 40          | -           | 95          | 45      | -           |   |
|                                  |   | 31             | 43          | -           | 75          | 10      | -           |   |
|                                  |   | 16             | 0           | -           | 55          | 5       | -           |   |
|                                  |   | 8              | 0           | -           | 35          | 0       | -           |   |
| -CH <sub>3</sub>                 | -SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 250            | 90          | 0           | 100         | 70      | 0           |   |
|                                  |   | 125            | 0           | -           | 80          | -       | -           |   |
|                                  |   | 63             | 0           | -           | 50          | -       | -           |   |
|                                  |   | 31             | 0           | -           | 45          | -       | -           |   |
|                                  |   | 16             | 0           | -           | 55          | -       | -           |   |
|                                  |   | 8              | -           | -           | 60          | -       | -           |   |
|                                  | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                 |                | 250         | 100         | 100         | 100     | —           | 0 |
|                                  |   |                | 125         | 100         | 70          | 100     | —           | — |
|                                  |   |                | 63          | 98          | 10          | 70      | —           | — |
|                                  |   |                | 31          | 73          | 0           | 20      | —           | — |
|                                  |   |                | 16          | 30          | 0           | 5       | —           | — |
|                                  |   |                | 8           | 0           | 0           | 0       | —           | — |

(Continued)

| Compounds        |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |
|------------------|---|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                                  |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |
| -CH <sub>3</sub> | -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> | 250            | 100         | 100         | 100         | 0       | 0           |
|                  |   | 125            | 98          | 70          | 100         | —       | —           |
|                  |   | 63             | 95          | 10          | 100         | —       | —           |
|                  |   | 31             | 83          | 0           | 100         | —       | —           |
|                  |   | 16             | 35          | 0           | 95          | —       | —           |
|                  |   | 8              | 5           | 0           | 45          | —       | —           |
|                  | -N(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> | 250            | 100         | 0           | 100         | 70      | 0           |
|                  |   | 125            | 60          | —           | 100         | —       | —           |
|                  |   | 63             | 25          | —           | 90          | —       | —           |
|                  |   | 31             | 0           | —           | 90          | —       | —           |
|                  |   | 16             | 0           | —           | 45          | —       | —           |
|                  |   | 8              | 0           | —           | 20          | —       | —           |
|                  | -N(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> | 250            | 25          | 0           | 100         | 70      | 0           |
|                  |   | 125            | —           | —           | 85          | —       | —           |
|                  |   | 63             | —           | —           | 75          | —       | —           |
|                  |   | 31             | —           | —           | 45          | —       | —           |
|                  |   | 16             | —           | —           | 30          | —       | —           |
|                  |   | 8              | —           | —           | 5           | —       | —           |

(Continued)

| Compounds        |   | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant Hopper | Green Peach Aphid | Diamondback Moth | Tobacco Cutworm | Two-Spotted Spider Mite |
|------------------|---|----------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>  |                |                    |                   |                  |                 |                         |
| -CH <sub>3</sub> |  | 250            | 100                | 100               | 100              | —               | 0                       |
|                  |   | 125            | 100                | 70                | 100              | —               | —                       |
|                  |   | 63             | 98                 | 10                | 70               | —               | —                       |
|                  |   | 31             | 15                 | —                 | 15               | —               | —                       |
|                  |   | 16             | 30                 | 0                 | 5                | —               | —                       |
|                  |   | 8              | 0                  | 0                 | 0                | —               | —                       |
|                  |  | 250            | 100                | 100               | 100              | 0               | 0                       |
|                  |   | 125            | 98                 | 70                | 100              | —               | —                       |
|                  |   | 63             | 95                 | 10                | 100              | —               | —                       |
|                  |   | 31             | 0                  | —                 | 55               | —               | —                       |
|                  |   | 16             | 35                 | 0                 | 95               | —               | —                       |
|                  |   | 8              | 5                  | 0                 | 45               | —               | —                       |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Br  | 250            | 100                | 0                 | 90               | —               | 70                      |
|                  |   | 125            | —                  | 0                 | 50               | —               | 60                      |
|                  |   | 63             | —                  | 0                 | 20               | —               | 5                       |
|                  |   | 31             | —                  | 0                 | 0                | —               | 0                       |
|                  |   | 16             | —                  | 0                 | 0                | —               | 0                       |
|                  |   | 8              | —                  | 0                 | 0                | —               | 0                       |

(Continued)

| Chemical Ref.    |                                      | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |
|------------------|--------------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                       |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |
| -CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Br | 250            | 95          | 60          | 100         | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | —           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | —           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | —           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | —           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | —           | —           | —       | 0           |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl | 250            | 78          | 0           | 90          | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | 0           | 55          | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | 0           | 35          | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | 0           | 0           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | 0           | 0           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | 0           | 0           | —       | 0           |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CHCl <sub>2</sub>  | 250            | 85          | 0           | 70          | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | 0           | —           | —       | 0           |

(Continued)

| Compounds        |                                      | Conc.<br>(ppm) | Brown Plant | Green Peach | Diamondback | Tobacco | Two-Spotted |
|------------------|--------------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                       |                | Hopper      | Aphid       | Moth        | Cutworm | Spider Mite |
| -CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>   | 250            | 90          | 0           | 50          | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl | 250            | 100         | 0           | 80          | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | 0           | —           | —       | 0           |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>    | 250            | 100         | 0           | 100         | —       | 0           |
|                  |                                      | 125            | —           | 0           | 95          | —       | 0           |
|                  |                                      | 63             | —           | 0           | 70          | —       | 0           |
|                  |                                      | 31             | —           | 0           | 0           | —       | 0           |
|                  |                                      | 16             | —           | 0           | 0           | —       | 0           |
|                  |                                      | 8              | —           | 0           | 0           | —       | 0           |

(Continued)

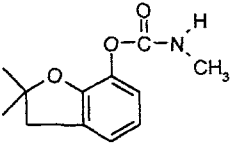
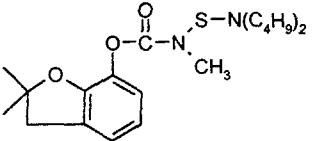
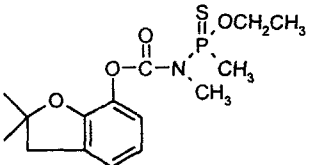


| Compounds        |  | Conc.<br>(ppm) | Brown  | Plant Green | Peach | Diamondback | Tobacco     | Two-Spotted |
|------------------|--|----------------|--------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|
| R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                                     |                | Hopper | Aphid       | Moth  | Cutworm     | Spider Mite |             |
| -CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> | 250            | 60     | 50          | 100   | —           | 0           |             |
|                  |  | 125            | —      | —           | —     | —           | 0           |             |
|                  |  | 63             | —      | —           | —     | —           | 0           |             |
|                  |  | 31             | —      | —           | —     | —           | 0           |             |
|                  |  | 16             | —      | —           | —     | —           | 0           |             |
|                  |  | 8              | —      | —           | —     | —           | 0           |             |
|                  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 250            | 90     | 0           | 100   | —           | 0           |             |
|                  |  | 125            | —      | 0           | 80    | —           | 0           |             |
|                  |  | 63             | —      | 0           | 15    | —           | 0           |             |
|                  |  | 31             | —      | 0           | 0     | —           | 0           |             |
|                  |  | 16             | —      | 0           | 0     | —           | 0           |             |
|                  |  | 8              | —      | 0           | 0     | —           | 0           |             |
|                  | -CH <sub>3</sub>                                   | 250            | 100    | 100         | 100   | —           | 0           |             |
|                  |  | 125            | 100    | 100         | 95    | —           | 0           |             |
|                  |  | 63             | 97     | 100         | 50    | —           | 0           |             |
|                  |  | 31             | 95     | 90          | 40    | —           | 0           |             |
|                  |  | 16             | 82     | 10          | 15    | —           | 0           |             |
|                  |  | 8              | 75     | —           | —     | —           | 0           |             |
| 4                | 30   | —              | —      | —           | 0     |             |             |             |
| 2                | 10   | —              | —      | —           | 0     |             |             |             |

### 3) 포유동물(쥐)에 대한 급성독성검정

쥐에 대한 급성독성을 검정한 결과 새로운 화합물인 KP-CA-03의 경우 모화합물인 carbofuran의 반수치사량(LD<sub>50</sub>, rat, oral)인 15.5mg/kg(문헌 14.4mg/kg)에 비하여 상당히 독성이 낮은 316.7mg/kg으로 확인되었다. 또한, KP-CA-22(53.1mg/kg)의 경우도 carbofuran보다 포유동물 독성이 1/3 배 경감되었으며, KP-CA-29(180.2mg/kg)의 경우도 carbofuran보다 포유동물 독성이 1/11배 경감되었다. 특히, 현재 상품화되어 있는 carbosulfan의 급성독성인 175mg/kg(문헌 250mg/kg) 보다도 1/2배 가까이 낮은 포유동물독성을 보이고 있어 선택성이 높은 안전한 살충제로의 개발 가능성이 상당히 높은 것으로 평가되었다. 본 연구과제의 목표인 저독성, 고선택성의 살충제 개발을 위한 이론적 접근을 위한 시도가 상당부분 근거가 있음을 확인할 수 있었다<표 14, 15>.

Table 14. Mammalian toxicity of N-phosphinothioyl carbofuran derivatives, carbofuran, and carbosulfan.

| Compounds  | Known LD <sub>50</sub> (mg/kg) | Dose (mg/kg) | n | Alive: Dead | Dead ratio % | LD <sub>50</sub> (mg/kg) |
|--|--------------------------------|--------------|---|-------------|--------------|--------------------------|
| <br>Carbofuran  | 14.4                           | 3            | 6 | 6 : 0       | 0            | 15.8                     |
|  |                                | 5            | 6 | 6 : 0       | 0            |                          |
|  |                                | 10           | 6 | 4 : 2       | 33           |                          |
|  |                                | 30           | 6 | 0 : 6       | 100          |                          |
|  |                                | 100          | 3 | 0 : 3       | .            |                          |
| <br>Carbosulfan | 250                            | 100          | 6 | 6 : 0       | 0            | 175                      |
|  |                                | 150          | 6 | 3 : 3       | 38           |                          |
|  |                                | 200          | 6 | 2 : 4       | 78           |                          |
|  |                                | 300          | 6 | 0 : 6       | 100          |                          |
|  |                                | 1000         | 3 | 0 : 3       | .            |                          |
| <br>KP-CA-03   | -                              | 10           | 3 | 3 : 0       | .            | 316.7                    |
|  |                                | 100          | 6 | 6 : 0       | 0            |                          |
|  |                                | 200          | 6 | 6 : 0       | 0            |                          |
|  |                                | 300          | 6 | 1 : 5       | 83           |                          |
|  |                                | 1000         | 6 | 0 : 6       | 100          |                          |

(Continued)

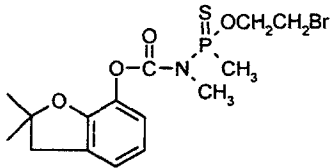
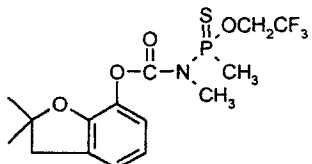
| Compounds   | Known<br>LD <sub>50</sub><br>(mg/kg) | Dose<br>(mg/kg) | n  | Alive: Dead | Dead<br>ratio % | LD <sub>50</sub><br>(mg/kg) |
|---|--------------------------------------|-----------------|----|-------------|-----------------|-----------------------------|
|  <p>KP-CA-22</p> | -                                    | 18.8            | 10 | 10 : 0      | 0               | 53.1                        |
|   |                                      | 37.5            | 10 | 9 : 1       | 10              |                             |
|   |                                      | 75              | 10 | 1 : 9       | 90              |                             |
|   |                                      | 150             | 10 | 0 : 10      | 100             |                             |
|   |                                      | 300             | 10 | 0 : 10      | 100             |                             |
|   |                                      | 600             | 10 | 0 : 10      | 100             |                             |
|  <p>KP-CA-28</p> | -                                    | 18.8            | 10 | 10 : 0      | 0               | 180.2                       |
|   |                                      | 37.5            | 10 | 10 : 0      | 0               |                             |
|   |                                      | 75              | 10 | 10 : 0      | 0               |                             |
|   |                                      | 150             | 10 | 6 : 4       | 40              |                             |
|   |                                      | 300             | 10 | 1 : 9       | 90              |                             |
|   |                                      | 600             | 10 | 0 : 10      | 100             |                             |

Table 15. Mammalian toxicities of carbofuran, procarbofuran, and *N*-phosphinothioyl carbofuran derivatives.

| Compounds       | Purity | Known LD <sub>50</sub><br>(rat oral, mg/kg) | LD <sub>50</sub><br>(mice oral, mg/kg) |
|-----------------|--------|---|--|
| Carbofuran      | >99%   | 11 <sup>1)</sup>                            | 15.8                                   |
| Carbosulfan     | 88%    | 250 <sup>2)</sup>                           | 175                                    |
| <b>KP-CA-03</b> | >99%   | -   | 316.7                                  |
| <b>KP-CA-22</b> | >99%   | -   | 53.1                                   |
| <b>KP-CA-28</b> | >99%   | -   | 180.2                                  |

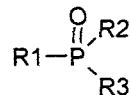
<sup>1)</sup> Kuhr, 1976; <sup>2)</sup> Drabek *et al.*, 1985.

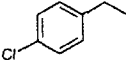
## 나. Neonicotinoid계 살충제의 개발 (합성법, 합성, 생물활성)

### 1) Imidacloprid 유도체의 합성과 구조확인

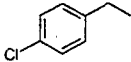
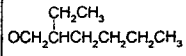
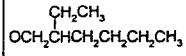
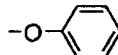
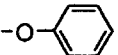
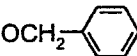
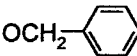
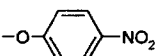
확립된 반응 과정<그림 7, 8, 9>와 같이 6-Chloronicotinic acid(a)를 starting material로 사용하여, methylation, reduction, halogenation 및 phosphorylation 반응을 이용하여 33개의 새로운 화합물을 합성하였다. 합성 chloronicotiny] 유사체 화합물의  $^1\text{H-NMR}$  spectrometer와 GC-Mass spectrometer를 이용한 구조를 확인하였으며, 결과는 다음과 같다<표 16>.

Table 16. <sup>1</sup>H-NMR Spectra of newly synthesized chloronicotinylnyl derivatives.



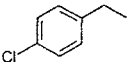
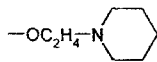
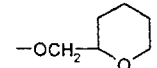
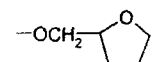
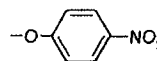
| Compounds   |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|---|---|---|---|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |   |
|  | -OCH <sub>3</sub>   | -OCH <sub>3</sub>   | 2.95-3.15(d, 2H), 3.55-3.70(d, 6H), 7.15-7.25(d, 1H), 7.50-7.60(d, 1H), 8.20(s, 1H).  |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | 1.25-1.35(t, 6H), 3.00-3.20(d, 2H), 4.00-4.15(m, 4H), 7.10-7.20(d, 1H), 7.25-7.35(d, 1H), 8.28(s, 1H).  |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 1.25-1.35(t, 6H), 3.00-3.20(d, 2H), 4.00-4.15(m, 4H), 7.10-7.20(d, 1H), 7.25-7.35(d, 1H), 8.28(s, 1H).  |
|   | -OCH <sub>3</sub>   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.75-0.85(t, 3H), 1.15-1.4(m, 2H), 1.45-1.60(m, 2H), 2.95-3.15(d, 2H), 3.55-3.70(d, 2H), 3.85-4.00(q, 2H), 7.15-7.25(d, 1H), 7.55-7.65(d, 1H), 8.25(s, 1H). |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.85-0.95(t, 6H), 1.20-1.45(m, 4H), 1.45-1.65(m, 4H), 3.30-3.20(d, 2H), 3.90-4.05(q, 4H), 7.25-7.30(d, 1H), 7.60-7.70(d, 1H), 8.25(s, 1H).                  |

(Continued)

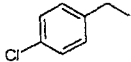



| Compounds   |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |   |
|---|---|---|---|---|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |   |   |
|  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   | 3.20-3.30(d, 2H), 4.25-4.45(q, 4H), 7.25-7.35(d, 1H),<br>7.65-7.75(d, 1H), 8.30(s, 1H).   |   |
|   |  |  | 0.80-0.95(m, 10H), 1.20-0.40(m, 20H), 1.45-1.55(d, 2H),<br>1.75-1.80(d, 2H), 3.85-3.95(t, 4H), 7.25-7.35(d, 1H),<br>7.60-7.70(d, 1H), 8.25(s, 1H).                |   |
|   |  |  | 3.35-3.55(d, 2H), 7.00-7.40(m, 11H), 7.70-7.80(d, 1H),<br>8.35(s, 1H).  |   |
|   |  |  | 2.95-3.15(d, 2H), 4.85-5.10(m, 4H), 7.10-7.35(m, 1H),<br>7.40-7.50(d, 1H), 8.10(s, 1H).   |   |
|   | -OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |  |   | 0.80~0.90(t, 6H), 1.27~1.32(q, 2H), 1.55~1.60(m, 2H),<br>3.32~3.40(d, 2H), 4.03~4.19(m, 2H), 7.28~7.35(d, 3H),<br>7.65~7.72(d, 1H), 8.20~8.25(d, 2H), 8.33(s, 1H) |
|   |   | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  |   | 0.88~0.92(t, 3H), 1.30~1.38(q, 2H), 1.60~1.70(m, 2H),<br>3.23~3.30(d, 2H), 4.03~4.12(m, 2H), 4.48~4.52(m, 2H),<br>7.30~7.32(d, 1H), 7.65~7.69(d, 1H), 8.32(s, 1H) |
| -OCH <sub>3</sub> CF <sub>3</sub>   |   |   | 0.80~0.85(t, 3H), 1.21~1.28(q, 2H), 1.49~1.55(m, 2H),<br>3.08~3.17(d, 2H), 3.90~4.00(m, 2H), 4.19~4.30(m, 2H),<br>7.21~7.25(d, 1H), 7.53~7.58(d, 1H), 8.21(s, 1H) |   |

(Continued)

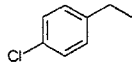
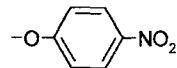
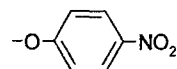



| Compounds   |                                 |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|---|---------------------------------|---|---|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>                  | R <sub>3</sub>  |   |
|  | -OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub> |  | 0.80~0.90(t, 3H), 1.21~1.40(m, 8H), 1.48~1.60(m, 8H),<br>3.00~3.08(d, 2H), 3.88~3.99(m, 4H), 7.21~7.25(d, 1H),<br>7.57~7.60(d, 1H), 8.20(s, 1H)                   |
|   |                                 |  | 0.80~0.85(t, 3H), 1.15~1.30(m, 3H), 1.40~1.54(m, 7H),<br>3.02~3.12(q, 2H), 3.30~3.48(m, 2H), 7.18~7.22(d, 1H),<br>7.56~7.64(t, 1H), 8.19~8.23(d, 1H)              |
|   |                                 |  | 0.87~0.92(t, 3H), 1.28~1.37(q, 2H), 1.50~1.61(m, 3H),<br>1.82~1.92(m, 5H), 3.10~3.21(m, 2H), 3.80~4.10(m, 8H),<br>7.23~7.30(d, 1H), 7.65~7.69(d, 1H), 8.29(s, 1H) |
|   | -OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> |  | 0.85~0.90(t, 3H), 1.60~1.65(q, 2H), 3.29~3.36(d, 2H),<br>4.09~4.15(m, 2H), 7.25~7.34(m, 3H), 7.65~7.70(d, 1H),<br>8.18~8.25(d, 2H), 8.33(s, 1H)                   |
|   |                                 | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  | 0.87~0.92(t, 3H), 1.60~1.70(m, 2H), 3.21~3.30(d, 2H),<br>4.01~4.09(m, 2H), 7.29~7.32(d, 1H), 7.65~7.69(d, 1H), 8.32(s,<br>1H)                                     |

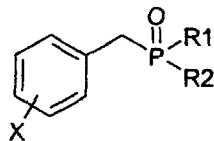
(Continued)

| Compounds   |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|---|---|---|---|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>                                      | R <sub>3</sub>  |   |
|  | -OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>                     | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   | 0.88~0.92(t, 3H), 1.59~1.68(m, 2H), 3.15~3.25(d, 2H), 3.94~4.16(m, 2H), 4.26~4.37(m, 2H), 7.29~7.35(d, 1H), 7.16~7.68(d, 1H), 8.30(s, 1H)   |
|   |   | -OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -  | 0.88~0.92(t, 3H), 1.15~1.22(m, 2H), 2.38~2.51(m, 4H), 2.91~3.03(m, 4H), 3.15~3.23(d, 2H), 3.43~3.50(q, 2H), 3.80~3.88(m, 2H), 4.05~4.15(m, 2H), 7.29~7.32(d, 1H), 7.78~7.82(d, 1H), 8.31(s, 1H) |
|   | -OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>                     | -OCH <sub>2</sub> -                | 0.86~0.91(t, 3H), 1.19~1.29(m, 2H), 1.45~1.59(m, 4H), 1.60~1.66(q, 2H), 3.12~3.21(q, 2H), 3.44~3.50(t, 1H), 3.90~4.12(m, 5H), 7.26~7.30(d, 1H), 7.68~7.72(d, 1H), 8.32(s, 1H)                   |
|   |   | -OCH <sub>2</sub> -                | 0.85~0.91(t, 3H), 1.18~1.26(m, 2H), 1.58~1.63(m, 2H), 3.10~3.18(d, 2H), 3.77~4.03(m, 7H), 7.28~7.31(d, 1H), 7.68~7.71(d, 1H), 8.31(s, 1H)   |
|   | -OCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | -OCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 1.20~1.35(d, 12H), 3.00~3.10(d, 2H), 4.60~4.70(m, 2H), 7.26~7.31(d, 1H), 7.64~7.68(m, 1H), 8.28(s, 1H)  |

(Continued)

| Compounds   |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|---|---|---|---|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |   |
|  | -OCH(CH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>             | -OCH(CH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>                                 | 0.87~0.94(t, 6H), 1.28~1.34(q, 6H), 1.47~1.64(m, 4H), 4.37~4.50(m, 2H), 7.23~7.28(d, 1H), 7.62~7.66(d, 1H), 8.29(s, 1H)                                     |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | -O-  | 1.31~1.37(t, 3H), 4.05~4.17(m, 2H), 7.21~7.27(m, 3H), 7.60~7.64(d, 1H), 8.18~8.21(d, 2H), 8.26(s, 1H)   |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | -O-  | 0.85~0.90(t, 3H), 1.60~1.65(q, 2H), 3.29~3.36(d, 2H), 4.09~4.15(m, 2H), 7.25~7.34(m, 3H), 7.65~7.70(d, 1H), 8.18~8.25(d, 2H), 8.33(s, 1H)                   |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O-  | 0.80~0.90(t, 3H), 1.27~1.32(q, 2H), 1.55~1.60(m, 2H), 3.32~3.40(d, 2H), 4.03~4.19(m, 2H), 7.28~7.35(d, 3H), 7.65~7.72(d, 1H), 8.20~8.25(d, 2H), 8.33(s, 1H) |

(Continued)



| Compounds |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)  |
|-----------|---|---|---|
| X         | R <sub>1</sub>                                    | R <sub>2</sub>                                    |   |
| None      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.88~0.92(t, 6H), 1.57~1.67(m, 4H), 3.13~3.20(d, 2H),<br>3.85~3.92(q, 4H), 7.32(s, 5H)  |
| 2-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.88~0.92(t, 6H), 1.58~1.65(m, 4H), 3.17~3.24(d, 2H),<br>3.90~3.95(q, 4H), 7.02~7.12(m, 2H), 7.19~7.26(m,<br>1H), 7.35~7.41(t, 1H)              |
| 3-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.88~0.93(t, 6H), 1.58~1.66(m, 4H), 3.11~3.19(d, 2H),<br>3.89~3.95(q, 4H), 6.92~6.99(t, 1H), 7.00~7.05(d, 1H),<br>7.06~7.10(d, 1H), 7.26(s, 1H) |

(Continued)

| Compounds |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)   |
|-----------|---|---|--|
| X         | R <sub>1</sub>                                    | R <sub>2</sub>                                    |  |
| 4-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.87~0.92(t, 6H), 1.58~1.68(m, 4H), 3.09~3.15(d, 2H),<br>3.88~3.94(q, 4H), 6.97~7.04(t, 2H), 7.23~7.29(m, 2H)                      |
| 2-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.88~0.93(t, 6H), 1.58~1.68(m, 4H), 3.37~3.42(d, 2H),<br>3.91~3.97(q, 4H), 7.16~7.25(m, 2H), 7.36~7.39(d, 1H),<br>7.44~7.47(m, 1H) |
| 3-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.89~0.94(t, 6H), 1.58~1.68(m, 4H), 3.09~3.17(d, 2H),<br>3.89~3.96(q, 4H), 7.17~7.22(m, 2H), 7.24~7.25(d, 1H),<br>7.29(s, 1H)      |
| 4-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.89~0.93(t, 6H), 1.57~1.67(m, 4H), 3.09~3.15(d, 2H),<br>3.88~3.94(q, 4H), 7.22~7.25(d, 2H), 7.26~7.30(d, 2H)                      |

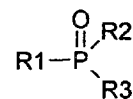
(Continued)

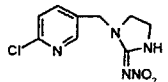
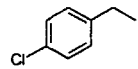
| Compounds |   |   | <sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , δ/TMS)   |
|-----------|---|---|--|
| X         | R <sub>1</sub>                                    | R <sub>2</sub>                                    |  |
| 2-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.87~0.92(t, 6H), 1.59~1.69(m, 4H), 3.38~3.45(d, 2H),<br>3.90~3.96(q, 4H), 7.08~7.14(m, 1H), 7.25~7.30(t, 1H),<br>7.46~7.49(m, 1H), 7.54~7.58(d, 1H) |
| 3-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.89~0.93(t, 6H), 1.59~1.68(m, 4H), 3.08~3.14(d, 2H),<br>3.88~3.95(q, 4H), 7.16~7.21(t, 1H), 7.23~7.27(d, 1H),<br>7.36~7.41(d, 1H), 7.45(s, 1H)      |
| 4-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 0.88~0.92(t, 6H), 1.58~1.66(m, 4H), 3.07~3.12(d, 2H),<br>3.87~3.93(q, 4H), 7.16~7.20(d, 2H), 7.42~7.46(d, 2H)  |

## 2) Imidacloprid 유도체의 살충활성

합성된 17종의 새로운 화합물들을 배추좀나방, 두점박이용애, 벼멸구등에 대한 살충율을 조사하였다. 검정 결과 벼멸구에서 비교적 높은 활성을 나타내었고, 일부 화합물에서는 점박이용애에 대해서는 대조약제인 imidacloprid보다 더 높은 살충활성을 나타내는 경향을 보였다<표 17, 18> 그러나 분자를 변형해 가면서 살충력이 급격히 감소하는 경향을 보여 분자 설계에 대한 전반적인 검토가 필요한 것으로 판단되었다. 한편 합성된 화합물들에 대한 살균활성을 검정한 결과 예상 밖의 높은 활성이 검정되어 살균제의 lead 화합물로서의 가능성이 상당히 높은 것으로 사료되었다.

Table 17. Insecticidal activity of newly synthesized chloronicotinyl derivatives against five insect species at 500ppm.

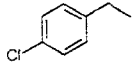
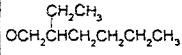
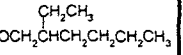
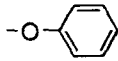
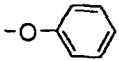
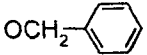
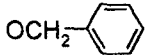


| Compounds   |   |   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%) after 24hrs |                    |                   | Mortality(%) after 48hrs |      |      |
|---|---|---|----------------|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|------|------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |                | DM <sup>1)</sup>         | TSSM <sup>2)</sup> | BPH <sup>3)</sup> | DM                       | TSSM | BPH  |
|  |   |   | 500            | 70.0                     | 20.0               | 100               | 80.0                     | 20.0 | 100  |
|   | -OCH <sub>3</sub>   | -OCH <sub>3</sub>   |                | 0.0                      | 10.0               | 0.0               | 0.0                      | 60.0 | 0.0  |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 |                | 10.0                     | 20.0               | 40.0              | 20.0                     | 40.0 | 40.0 |
|  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 |                | 0.0                      | 5.0                | 0.0               | 0.0                      | 60.0 | 20.0 |
|   | -OCH <sub>3</sub>   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                | 0.0                      | 20.0               | 80.0              | 0.0                      | 60.0 | 90.0 |
|   | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |                | 0.0                      | 20.0               | 80.0              | 0.0                      | 80.0 | 90.0 |

<sup>1)</sup> BPH : Brown plant hopper, <sup>2)</sup> DM : Diamondback moth, <sup>3)</sup> TSSM : Two-spotted spider mite.

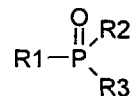
(Continued)

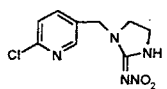
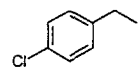
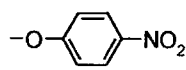


| Compounds   |   |   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%) after 24hrs |                    |                   | Mortality(%) after 48hrs |      |      |
|---|---|---|----------------|--------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|------|------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>  |                | DM <sup>1)</sup>         | TSSM <sup>2)</sup> | BPH <sup>3)</sup> | DM                       | TSSM | BPH  |
|  | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   | 500            | 10.0                     | 20.0               | 80.0              | 40.0                     | 80.0 | 90.0 |
|   |  |  |                | 0.0                      | 20.0               | 80.0              | 40.0                     | 60.0 | 90.0 |
|   |  |  |                | 0.0                      | 20.0               | 80.0              | 10.0                     | 10.0 | 90.0 |
|   |  |  |                | 10.0                     | 20.0               | 60.0              | 10.0                     | 30.0 | 80.0 |

<sup>1)</sup> BPH : Brown plant hopper, <sup>2)</sup> DM : Diamondback moth, <sup>3)</sup> TSSM : Two-spotted spider mite.

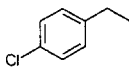




Table 18. Insecticidal activity of newly synthesized chloronicotinyl derivatives against five insect species at 250ppm.



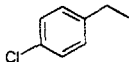



| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | 48HAT <sup>1)</sup> Mortality(%) |                   |                   |                   |                    |
|---|----------------|---|----------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | BPH <sup>2)</sup>                | GPA <sup>3)</sup> | DBM <sup>4)</sup> | TCW <sup>5)</sup> | TSSM <sup>6)</sup> |
|  |                |   | 250            | 100                              | 100               | 100               | 0                 | 0                  |
|  | -OBu           |  |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |

<sup>1)</sup> HAT: Hour after treatment, <sup>2)</sup> BPH: Brown planthopper, <sup>3)</sup> GPA: Green peach aphid,  
<sup>4)</sup> DBM: Diamondback moth, <sup>5)</sup> TCW: Tobacco cutworm, <sup>6)</sup> TSSM: Two-spotted spider mite.

(Continued)

| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | 48HAT <sup>1)</sup> Mortality(%) |                   |                   |                   |                    |
|---|----------------|---|----------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | BPH <sup>2)</sup>                | GPA <sup>3)</sup> | DBM <sup>4)</sup> | TCW <sup>5)</sup> | TSSM <sup>6)</sup> |
|  | -OBu           | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N  | 250            | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   | -OPr           | -O                                   |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                |   |                |                                  |                   |                   |                   |                    |

<sup>1)</sup> HAT: Hour after treatment, <sup>2)</sup> BPH: Brown planthopper, <sup>3)</sup> GPA: Green peach aphid,  
<sup>4)</sup> DBM: Diamondback moth, <sup>5)</sup> TCW: Tobacco cutworm, <sup>6)</sup> TSSM: Two-spotted spider mite.  
 (Continued)

| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | 48HAT <sup>1)</sup> Mortality(%) |                   |                   |                   |                    |
|---|----------------|---|----------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | BPH <sup>2)</sup>                | GPA <sup>3)</sup> | DBM <sup>4)</sup> | TCW <sup>5)</sup> | TSSM <sup>6)</sup> |
|  | -OPr           | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N  | 250            | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                  |

<sup>1)</sup> HAT: Hour after treatment, <sup>2)</sup> BPH: Brown planthopper, <sup>3)</sup> GPA: Green peach aphid,

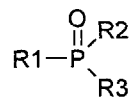
<sup>4)</sup> DBM: Diamondback moth, <sup>5)</sup> TCW: Tobacco cutworm, <sup>6)</sup> TSSM: Two-spotted spider mite.

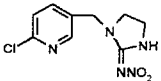
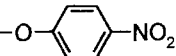
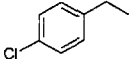
### 3) Imidacloprid 유도체의 살균활성

합성된 imidacloprid 유사체에 대한 25종의 식물병원균에 대한 살균 활성을 검정한 결과 예상 밖의 살균활성이 관찰되었다. 특히 R<sub>1</sub>에 chloropyridyl, R<sub>2</sub>에 butoxy, R<sub>3</sub>기에 p-nitrophenol 기가 치환된 화합물에서 좋은 활성을 보였다<표 19, 20>.

많은 화합물이 고농도에서는 살균활성을 나타내었으나 농도가 감소함에 따라 살균활성이 감소됨이 확인되었다. 그러나 <표 21>과 같은 화합물은 대표적인 살균제인 tricyclazole에 비하여 다소 활성이 낮기는 하지만 lead 화합물로서의 상당한 가능성을 지니고 있는 것으로 판단되었다.

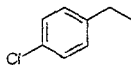



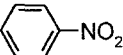
Table 19. Fungicidal activity of newly synthesized chloronicotinyl derivatives against six fungi species at 250ppm.



| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%)      |                   |                   |                   |                   |                   |
|---|----------------|---|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | RCB <sup>1)</sup> | RSB <sup>2)</sup> | CGM <sup>3)</sup> | TLB <sup>4)</sup> | WLR <sup>5)</sup> | BPM <sup>6)</sup> |
|  |                |   | 250            | 0                 | 0                 | 17                | 12                | 83                | 18                |
|   |                |  |                | 91                | 0                 | 24                | 0                 | 95                | 78                |
|  | -OBu           | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  |                | 0                 | 0                 | 27                | 0                 | 80                | 36                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   |                | 0                 | 0                 | 24                | 25                | 33                | 36                |

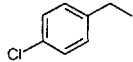



<sup>1)</sup> RCB: Rice blast, <sup>2)</sup> RSB: Rice sheath blight, <sup>3)</sup> CGM: Cucumber gray mold, <sup>4)</sup>TLB: Tomato late blight, <sup>5)</sup> WLR: Wheat leaf rust, <sup>6)</sup>BPM: Barley powdery mildew.

(Continued)

| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%)      |                   |                   |                   |                   |                   |
|---|----------------|---|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | RCB <sup>1)</sup> | RSB <sup>2)</sup> | CGM <sup>3)</sup> | TLB <sup>4)</sup> | WLR <sup>5)</sup> | BPM <sup>6)</sup> |
|  | -OBu           | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N  | 250            | 0                 | 0                 | 3                 | 12                | 53                | 27                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 33                | 0                 |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                 | 10                | 0                 | 6                 | 0                 | 0                 |
|   | -OPr           | -O                                   |                | 100               | 30                | 36                | 20                | 98                | 87                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>  |                | 33                | 20                | 36                | 20                | 0                 | 92                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>   |                | 0                 | 15                | 20                | 20                | 0                 | 25                |

<sup>1)</sup> RCB: Rice blast, <sup>2)</sup> RSB: Rice sheath blight, <sup>3)</sup> CGM: Cucumber gray mold, <sup>4)</sup>TLB: Tomato late blight, <sup>5)</sup> WLR: Wheat leaf rust, <sup>6)</sup>BPM: Barley powdery mildew.

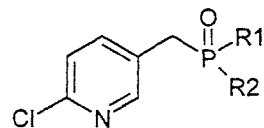
(Continued)

| Compounds   |                |   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%)      |                   |                   |                   |                   |                   |
|---|----------------|---|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |                | RCB <sup>1)</sup> | RSB <sup>2)</sup> | CGM <sup>3)</sup> | TLB <sup>4)</sup> | WLR <sup>5)</sup> | BPM <sup>6)</sup> |
|  | -OPr           | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N  | 250            | 0                 | 25                | 36                | 33                | 0                 | 80                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                 | 10                | 20                | 6                 | 0                 | 25                |
|   |                | -OCH <sub>2</sub>                    |                | 0                 | 0                 | 36                | 0                 | 0                 | 37                |

<sup>1)</sup> RCB: Rice blast, <sup>2)</sup> RSB: Rice sheath blight, <sup>3)</sup> CGM: Cucumber gray mold, <sup>4)</sup> TLB: Tomato late blight, <sup>5)</sup> WLR: Wheat leaf rust, <sup>6)</sup> BPM: Barley powdery mildew.

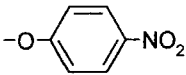
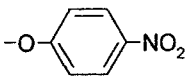
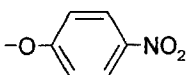


Table 20. Fungicidal activity of newly synthesized chloronicotinyl derivatives against fungi species.

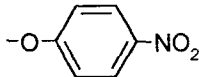
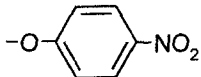


| Compounds                         |                                   | Conc.<br>(ppm)   | 균사 생장 저지율(%) |    |      |      |    |      |      |    |      |      |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------|----|------|------|----|------|------|----|------|------|
| R <sub>1</sub>                    | R <sub>2</sub>                    |                  | Pu           | Po | Rs   | Rh   | Fm | Pc   | Am   | Bd | Gc   | Bc   |
| Control                           |                                   | 25               | 0            |    |      |      |    |      |      |    |      |      |
|                                   |                                   | 12.5             |              |    |      |      |    |      |      |    |      |      |
| STD1(IBP)                         |                                   | 25               | 19           | 75 | 58.3 | 9.1  | 0  | 0    | 0    | 0  | 18.5 | 33.3 |
|                                   |                                   | 12.5             | 0            | 20 | 43.3 | 0    | 0  | 0    | 0    | 0  | 11.1 | 16.7 |
| STD2(Hinosan)                     |                                   | 25               | 74           | 80 | 100  | 57.6 | 0  | 25.7 | 28.6 | 24 | 44.4 | 80   |
|                                   |                                   | 12.5             | 47           | 80 | 70   | 48.5 | 0  | 25.4 | 14.3 | 12 | 25.9 | 53.3 |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 미 실시(Sample량 부족) |              |    |      |      |    |      |      |    |      |      |

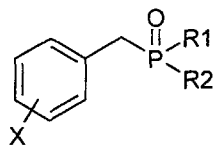
(Continued)

| Compounds   |   | Conc.<br>(ppm) | 군사 생장 저지율(%) |     |      |      |     |      |     |    |      |      |
|---|---|----------------|--------------|-----|------|------|-----|------|-----|----|------|------|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                | Pu           | Po  | Rs   | Rh   | Fm  | Pc   | Am  | Bd | Gc   | Bc   |
| -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>                             | -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>   | 25             | 0            | 10  | 17   | 0    | 0   | 14.3 | 0   | 0  | 18.5 | 0    |
|   |   | 12.5           | 0            | 10  | 8.3  | 0    | 0   | 8.6  | 0   | 0  | 7.4  | 0    |
| -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>             | -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                             | 200            | -            | 43  | 9    | 24   | 9.9 | -    | 22  | 7  | 5.9  | 4    |
|   |   | 50             | -            | 14  | 7    | 4.7  | -2  | -    | 6   | 4  | 3.5  | 2    |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 |  | 200            | -            | 11  | 6.3  | 7.8  | 0   | -    | 6.3 | 19 | 8.7  | 7    |
|   |   | 50             | -            | 5.1 | -11  | 3.1  | 3.9 | -    | -9  | 10 | 7.7  | 1    |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 |  | 200            | 0            | 10  | 21.6 | 18.2 | 0   | 14.3 | 0   | 0  | 25.9 | 10   |
|   |   | 50             | 0            | 3.3 | 21.6 | 12.1 | 0   | 14.3 | 0   | 0  | 18.5 | 10   |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |  | 200            | 0            | 10  | 33.3 | 24.2 | 0   | 17.1 | 19  | 0  | 18.5 | 33.3 |
|   |   | 50             | 0            | 10  | 25   | 0    | 0   | 8.6  | 9.5 | 0  | 20   | 33.3 |

(Continued)

| Compounds   |   | Conc.<br>(ppm) | 군사 생장 저지율(%) |    |    |    |
|---|---|----------------|--------------|----|----|----|
| R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>  |                | Po           | Rs | Pi | Sf |
| Control   |   | 25             | 85           | 80 | 60 | 50 |
|   |   | 12.5           | -            | -  | -  | -  |
| STD1 (IBP)  |   | 25             | 50           | 30 | 0  | 0  |
|   |   | 12.5           | 25           | 10 | 0  | 0  |
| STD2 (Hinosan)  |   | 25             | 65           | 50 | 10 | 0  |
|   |   | 12.5           | 30           | 35 | 0  | 0  |
| -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>                             | -OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>3</sub>   | 25             | 0            | 0  | 0  | 0  |
|   |   | 12.5           | 0            | 0  | 0  | 0  |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 |  | 25             | 15           | 10 | 0  | 0  |
|   |   | 12.5           | 0            | 0  | 0  | 0  |
| -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |  | 25             | 0            | 15 | 0  | 0  |
|   |   | 12.5           | 0            | 0  | 0  | 0  |

(Continued)



| Compounds |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 성장 저지율(%) |      |    |      |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|----------------|--------------|------|----|------|----|----|----|----|----|
| X         | R1  | R2  |                | Mg           | Rs   | Rh | Fm   | Pc | Am | Bd | Gc | Bc |
| None      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 2-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 3-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 4-F       | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 2-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 71           | 37.2 | 50 | 24.9 | 43 | 50 | 0  | 38 | 11 |

(Continued)

| Compounds |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%) |      |    |      |    |    |      |    |    |
|-----------|---|---|----------------|--------------|------|----|------|----|----|------|----|----|
| X         | R1  | R2  |                | Mg           | Rs   | Rh | Fm   | Pc | Am | Bd   | Gc | Bc |
| 3-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 72           | 82.4 | 58 | 46.8 | 65 | 55 | 3.4  | 52 | 66 |
| 4-Cl      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 73           | 96.8 | 69 | 59.6 | 72 | 62 | 30.1 | 54 | 66 |
| 2-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 83           | 68.8 | 57 | 48.5 | 58 | 57 | 0    | 47 | 68 |
| 3-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 84           | 87.5 | 66 | 56.9 | 75 | 64 | 11.9 | 58 | 86 |
| 4-Br      | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 76           | 98.4 | 73 | 62.6 | 76 | 64 | 18.4 | 68 | 84 |
| 2-I       | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 44           | 0    | 18 | 6.4  | 0  | 27 | 0    | 20 | 0  |
|           |   |   | 200            | 48           | 57.7 | 64 | 51.2 | 64 | 66 | 32.6 | 48 | 79 |
| 3-I       | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0            | 0    | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0  |
|           |   |   | 200            | 69           | 74.2 | 64 | 54.5 | 59 | 65 | 2.1  | 46 | 69 |

(Continued)

| Compounds           |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%)       |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------------|---|---|----------------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| X                   | R1  | R2  |                | Mg                 | Rs | Rh | Fm | Pc | Am | Bd | Gc | Bc |
| 4-CF <sub>3</sub>   | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 4-CH <sub>3</sub> O | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 3-CH <sub>3</sub> O | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 2-CH <sub>3</sub>   | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 3-CH <sub>3</sub>   | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 4-CH <sub>3</sub>   | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 4-CF <sub>3</sub>   | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 미 실시 (sample 량 부족) |    |    |    |    |    |    |    |    |
|                     |   |   | 200            |                    |    |    |    |    |    |    |    |    |

(Continued)

| Compounds           |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%)       |      |     |      |     |     |      |     |     |
|---------------------|---|---|----------------|--------------------|------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
| X                   | R1  | R2  |                | Mg                 | Rs   | Rh  | Fm   | Pc  | Am  | Bd   | Gc  | Bc  |
| 3-CH <sub>3</sub> O | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50<br>200      | 미 실시 (sample 량 부족) |      |     |      |     |     |      |     |     |
| 4-CH <sub>3</sub> O | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 100                | 93.3 | 26  | 19.9 | 56  | 49  | 0    | 35  | 12  |
|                     |   |   | 200            | 100                | 100  | 100 | 100  | 100 | 100 | 100  | 100 | 100 |
| 4-Cl                | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 62                 | 39.7 | 20  | 27.6 | 16  | 45  | 14   | 31  | 0   |
|                     |   |   | 200            | 100                | 69.2 | 59  | 35   | 48  | 68  | 44.8 | 64  | 35  |
| 2-Br                | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 0                  | 0    | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   |
|                     |   |   | 200            | 76                 | 39.1 | 37  | 27.9 | 11  | 43  | 21.8 | 43  | 0   |
| 3-Br                | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 53                 | 35.4 | 19  | 9.8  | 6.8 | 41  | 0    | 20  | 5.9 |
|                     |   |   | 200            | 78                 | 42.6 | 36  | 21.5 | 11  | 46  | 11.1 | 34  | 0   |
| 2,3-Cl              | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 44                 | 57   | 42  | 32   | 16  | 47  | 0    | 40  | 6.4 |
|                     |   |   | 200            | 82                 | 94.1 | 79  | 65.3 | 80  | 84  | 70.2 | 70  | 84  |
| 2,3-Cl              | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 0                  | 0    | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   |
|                     |   |   | 200            | 0                  | 0    | 0   | 0    | 0   | 0   | 0    | 0   | 0   |

(Continued)

| Compounds          |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%) |    |    |     |    |     |    |     |    |
|--------------------|---|---|----------------|--------------|----|----|-----|----|-----|----|-----|----|
| X                  | R1  | R2  |                | Mg           | Rs | Rh | Fm  | Pc | Am  | Bd | Gc  | Bc |
| 2-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 33           | 61 | 46 | 31  | -  | 31  | 44 | 18  | 40 |
|                    |   |   | 200            | 71           | 81 | 77 | 58  | -  | 82  | 81 | 78  | 82 |
| 2-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 28           | 12 | 31 | 12  | -  | 8.7 | 45 | 2.4 | 45 |
|                    |   |   | 200            | 50           | 23 | 46 | 27  | -  | 28  | 40 | 25  | 59 |
| 3-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 44           | 64 | 49 | 34  | -  | 30  | 51 | 34  | 12 |
|                    |   |   | 200            | 94           | 83 | 83 | 73  | -  | 87  | 88 | 81  | 83 |
| 3-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | -            | -  | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
|                    |   |   | 200            | -            | -  | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
| 4-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 21           | 58 | 48 | 35  | -  | 38  | 30 | 32  | 42 |
|                    |   |   | 200            | 56           | 82 | 84 | 74  | -  | 86  | 82 | 77  | 83 |
| 4-CH <sub>3</sub>  | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | -            | -  | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
|                    |   |   | 200            | -            | -  | -  | -   | -  | -   | -  | -   | -  |
| 3-OCH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 28           | 34 | 31 | 4.7 | -  | 13  | 22 | 3.8 | 35 |
|                    |   |   | 200            | 69           | 82 | 65 | 48  | -  | 61  | 66 | 47  | 81 |

(Continued)



| Compounds          |   |   | Conc.<br>(ppm) | 군사 생장 저지율(%) |    |    |     |    |    |    |    |    |
|--------------------|---|---|----------------|--------------|----|----|-----|----|----|----|----|----|
| X                  | R1  | R2  |                | Mg           | Rs | Rh | Fm  | Pc | Am | Bd | Gc | Bc |
| 3-OCH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 41           | 30 | 38 | 4.3 | -  | 29 | 16 | 14 | 13 |
|                    |   |   | 200            | 57           | 53 | 47 | 17  | -  | 39 | 20 | 27 | 25 |
| 4-OCH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 21           | 11 | 30 | 17  | -  | 11 | 23 | -6 | 31 |
|                    |   |   | 200            | 65           | 57 | 65 | 48  | -  | 65 | 31 | 37 | 50 |
| 4-OCH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 50           | 23 | 32 | 22  | -  | 27 | 40 | 15 | 15 |
|                    |   |   | 200            | 75           | 34 | 54 | 36  | -  | 42 | 63 | 33 | 24 |
| 4-F                | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 26           | 61 | 41 | 27  | -  | 24 | 24 | 16 | 32 |
|                    |   |   | 200            | 65           | 83 | 76 | 68  | -  | 79 | 79 | 78 | 80 |
| 4-F                | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 45           | 65 | 27 | -10 | -  | 36 | 29 | 11 | 17 |
|                    |   |   | 200            | 76           | 72 | 54 | 35  | -  | 57 | 61 | 44 | 49 |
| 2-Br               | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 32           | 81 | 44 | 39  | -  | 45 | 32 | 35 | 60 |
|                    |   |   | 200            | 64           | 86 | 71 | 57  | -  | 73 | 73 | 70 | 65 |
| 2-Br               | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 34           | 48 | 31 | 24  | -  | 17 | 13 | 12 | 14 |
|                    |   |   | 200            | 54           | 5  | 40 | 22  | -  | 28 | 18 | 21 | 24 |

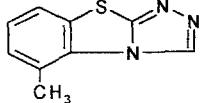
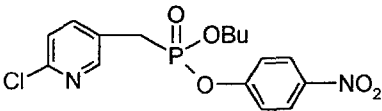
(Continued)

| Compounds |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%) |    |    |     |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|----------------|--------------|----|----|-----|----|----|----|----|----|
| X         | R1  | R2  |                | Mg           | Rs | Rh | Fm  | Pc | Am | Bd | Gc | Bc |
| 3-Br      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 26           | 72 | 49 | 38  | -  | 46 | 29 | 39 | 48 |
|           |   |   | 200            | 46           | 86 | 72 | 54  | -  | 71 | 41 | 57 | 76 |
| 3-Br      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 28           | 16 | 26 | 9.9 | -  | 10 | 17 | 15 | 18 |
|           |   |   | 200            | 70           | 65 | 43 | 5.6 | -  | 33 | 25 | 33 | 31 |
| 4-Br      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 23           | 18 | 51 | 40  | -  | 38 | 13 | 26 | 27 |
|           |   |   | 200            | 46           | 66 | 73 | 55  | -  | 68 | 21 | 71 | 45 |
| 4-Br      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 30           | 13 | 27 | 20  | -  | 18 | 15 | 22 | 19 |
|           |   |   | 200            | 57           | 42 | 40 | 32  | -  | 25 | 38 | 26 | 22 |
| 4-Cl      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 27           | 73 | 63 | 44  | -  | 48 | 52 | 46 | 71 |
|           |   |   | 200            | 53           | 84 | 78 | 62  | -  | 76 | 75 | 75 | 83 |
| 4-Cl      | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 37           | 80 | 28 | 21  | -  | 23 | 42 | 28 | 71 |
|           |   |   | 200            | 100          | 85 | 58 | 35  | -  | 61 | 59 | 51 | 75 |
| 2-I       | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 34           | 24 | 44 | 44  | -  | 46 | 45 | 30 | 51 |
|           |   |   | 200            | 53           | 51 | 62 | 54  | -  | 66 | 63 | 62 | 69 |

(Continued)

| Compounds         |   |   | Conc.<br>(ppm) | 균사 생장 저지율(%) |    |    |     |    |     |    |     |    |
|-------------------|---|---|----------------|--------------|----|----|-----|----|-----|----|-----|----|
| X                 | R1  | R2  |                | Mg           | Rs | Rh | Fm  | Pc | Am  | Bd | Gc  | Bc |
| 2-I               | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 30           | 30 | 30 | 6.9 | -  | 18  | 23 | 6.6 | 13 |
|                   |   |   | 200            | 68           | 62 | 43 | 19  | -  | 43  | 33 | 34  | 29 |
| 4-CF <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | 50             | 18           | 48 | 37 | 26  | -  | 26  | 26 | 28  | 51 |
|                   |   |   | 200            | 41           | 82 | 56 | 40  | -  | 57  | 67 | 62  | 66 |
| 4-CF <sub>3</sub> | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> | -OPNP   | 50             | 21           | 23 | 17 | 30  | -  | -4  | 9  | 11  | 10 |
|                   |   |   | 200            | 45           | 36 | 30 | 0.9 | -  | 9.3 | 15 | 22  | 21 |

Table 21. Fungicidal activity of newly synthesized chloronicotinyl derivatives against six fungi species.

| Compounds   | Conc.<br>(ppm) | Mortality(%)      |                   |                   |                   |                   |                   |
|---|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|   |                | RCB <sup>1)</sup> | RSB <sup>2)</sup> | CGM <sup>3)</sup> | TLB <sup>4)</sup> | WLR <sup>5)</sup> | BPM <sup>6)</sup> |
| <br>Tricyclazole | 10             | 100               | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
|   | 0.5            | 78                | -                 | -                 | -                 | -                 | -                 |
|                  | 10             | 86                | -                 | -                 | -                 | 0                 | 25                |
|   | 2              | 0                 | -                 | -                 | -                 | 0                 | 0                 |

<sup>1)</sup> RCB: Rice blast, <sup>2)</sup> RSB: Rice sheath blight, <sup>3)</sup> CGM: Cucumber gray mold, <sup>4)</sup> TLB: Tomato late blight, <sup>5)</sup> WLR: Wheat leaf rust, <sup>6)</sup> BPM: Barley powdery mildew.

## 제 4절 결 론

본 연구를 통하여 carbosulfan, PSC 등의 procarbamates는 분자 그 자체로는 target 효소인 AChE에 대한 저해력이 없으나, 체내에서 활성화과정을 통하여 저해력이 강한 carbofuran으로 전환되어 독성을 발현할 수 있는 것으로 확인되었다. 그리고 이 과정에서 mfo와 GST/GSH가 중요한 역할을 하는 것으로 관찰되었다. 특히 carbosulfan은 mfo에 의하여 산화되고, 이 산화된 carbosulfan sulfoxide(?)가 GST/GSH system에 의하여 공격을 받아 치환기가 탈리되면서 생성된 carbofuran이 독성을 일으키는 것으로 보여졌다. 특히 mfo의 산화과정이 없는 GSH 자체만으로도 GST의 도움을 받아 비교적 효과적으로 탈리가 이루어지고 있음을 볼 수 있었다.

새롭게 합성된 저독성 proinsecticide계 화합물의 생물검정결과는 예상대로 높은 살충활성을 가지고 있었으며, 살충성이 높은 화합물의 선택독성여부를 조사하기 위하여 포유동물(쥐)에 대한 독성을 검정한 결과 보통독성(LD<sub>50</sub>, rat, oral, 316.7mg.kg)으로 평가되어 고살충성, 저독성의 훌륭한 선택독성을 보유하고 있는 것으로 평가되었다. 또한 새롭게 합성된 neonicotinoid계 화합물의 생물검정결과는 일부 화합물에서 살충활성을 가지고 있었으며, 일부 화합물에서는 뛰어난 살균활성을 보유한 것으로 확인되었다.

이상의 결과는 procarbofuran계 화합물의 독성기작을 이해하고, 이를 통하여 새로운 procarbofuran계 화합물을 설계하여 새로운 선도물질을 개발하는데 새로운 모델을 제시했다.

## 제 5절 참 고 문 헌

- Black, A. L., Y. C. Chiu, M. A. H. Fahmy, and T. R. Fukuto. 1973. Selective toxicity of *N*-sulfenylated derivatives of insecticidal methylcarbamate esters. *J. Agric. Food Chem.* 21:747-751.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Drabek, J. and F. Bachmann. 1983. Proinsecticides: Structure-activity relationships in carbamoyl sulfenyl *N*-methylcarbamates. *In Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem., Hum. Welfare Environ., Pergamon Press, p.271-277.*
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress, and R. M. Featherstone. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88.
- Fahmy, M. A. H, R. L. Metcalf, T. R. Fukuto, and D. J. Hennessy. 1966. Effects of deuteration, fluorination, and other structural modifications of the carbamyl moiety upon the anticholinesterase and insecticidal activities of phenyl *N*-methylcarbamates. *J. Agric. Food Chem.* 14:79-83.
- Fahmy, M. A. H. and T. R. Fukuto. 1983. Rational and chemistry of proinsecticidal methylcarbamates. *In Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem., Hum. Welfare Environ., Vol. I, S.A.R., p.193-200.*
- Fahmy, M. A. H., T. R. Fukuto, R. O. Mayer, and R. B. March. 1970. The selective toxicity of new *N*-phosphorothioylcarbamate esters. *J. Agric. Food Chem.* 18:793-796.
- Fukuto, T. R. 1983. Structure-activity relationships in derivatives of

- anticholinesterase insecticides. *In Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem., Hum. Welfare Environ., Vol. I, Synthesis and Structure Activity Relationships*, p.203-212.
- Fukuto, T. R., R. L. Metcalf, and M. Winton. 1959a. Alkylphosphonic acid esters as insecticides. *J. Econ. Entomol.* 52:1121-1127.
- Fukuto, T. R., R. L. Metcalf. 1959b. The effect of structure on the reactivity of alkylphosphonate esters. *J. Am. Chem. Soc.* 81:372-377.
- Jojima, T., M. A. H. Fahmy, and T. R. Fukuto. 1983. Sugar, glyceryl, and (pyridylalkoxy)sulfinyl derivatives of methylcarbamate insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 31:613-620.
- Kagabu, S. 1996. Studies on the synthesis and insecticidal activity of neonicotinoid compounds. *J. Pestic. Sci.* 21:231-239.
- Kagabu, S. and T. Akagi. 1997. Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds. *J. Pestic. Sci.* 22:84-89.
- Kawata, M., N. Umetsu, T. Goto, and T. R. Fukuto. 1988. Synthesis and biological activity of alkoxy-sulfonyl derivatives of methylcarbamate insecticides. *J. Pesticide Sci.* 13:595-603.
- Kinosita, Y. and T. R. Fukuto. 1980. Insecticidal properties of *N*-sulfonyl derivatives of propoxur and carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* 28:1325-1327.
- Koyanagi, T., H. Okada, T. Toki, T. Haga, K. Fujikawa, and R. Nishiyama. 1991. A new phosphoramidothioate insecticide and nematicide. *In ACS symposium series. 443, Am. Chem. Soc., p.387-399.*
- Mallipudi, N. M., A. Lee, I. P. Kapoor, and G. J. Hollingshaus. 1994. Synthesis and insecticidal activity of novel *N*-oxalyl-*N*-methylcarbamates. *J. Agric. Food Chem.* 42:1019-1025.

### 제 3장 환경친화형 혼합제 개발 분야



## 제 1절 서 설

농업에 있어 농약의 발전은 농산물의 수량증진과 품질향상에 큰 역할을 하고 있을 뿐만 아니라, 작부체계의 변천, 생산비의 저하 등 많은 변화를 가져왔다. 그러나 무분별한 유기합성농약의 사용은 환경오염, 식품오염, 해충의 천적 감소와 인축독성 등 여러 가지 부작용을 유발하였는데, 이러한 농약사용의 가장 심각한 부작용 중 하나인 약제 저항성 발달 문제는 생산비용, 노동경비 증가, 약제의 수명 단축과 잡초 및 병충해의 방제를 위해 더 많은 농약을 투입하게 되는 문제 등 악순환을 초래하였다. 특히 저항성 발달속도가 저항성 극복을 위한 신농약 개발속도보다 앞서기 때문에 문제는 더욱 심각한 실정이다. 그 중 살충제에 대한 저항성 발달은 제초제나 살균제에 비하여 더 빠르게 나타난다고 보고되고 있으며, 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 농약들과 제 3세대 농약이라 불리는 곤충생장조절제(insect growth regulator)와 미생물농약(microbial agent) 등에 대해서도 나타나고 있기 때문에 그 대책이 시급한 상황이다. 이상의 문제들을 고려해 볼 때 앞으로는 환경친화적·저투입형 신농약의 개발과 기존의 개발된 농약의 합리적인 이용법이 동시에 이루어져야만 한다. 기존에 사용되고 있는 농약의 합리적이고 새로운 사용방법으로 제시되고 있는 것이 제형기술의 발달, 약효를 상승시키는 농약 보조제의 개발 그리고 혼합제의 개발 등이다.

혼합제란 병, 해충, 잡초의 효율적 방제를 목적으로 두가지 이상의 약제를 혼합하여 제형화한 것이며 기존에 사용되고 있는 농약의 합리적 이용이라는 측면에서 큰 의미를 지닌다. 혼합제의 이용은 효과적인 해충방제라는 실제적인 측면뿐만 아니라 새로운 보조제의 개발, 노력 및 경비절감에 의한 생력화 등의 여러 가지 면에서 새로운 가능성을 제시하고 있다. 또한 현재 사

용중이거나 개발되고 있는 농약들의 제한적 생리활성 범위와 지역별 대상작물 및 주요 병해충의 차이는 기존 약제들을 이용한 혼합제의 개발을 불가피하게 하고 있다. 현재 혼합제는 적용대상의 확대, 사용시기의 확대, 약효의 상승의 원리로 개발되고 있다. 특히 약효의 상승을 목적으로 개발된 혼합제는 기존 단제의 사용량보다 훨씬 적은 농약으로도 방제효과를 나타낼 수 있으므로 독성문제와 환경오염문제에 대한 대비책으로도 고려되고 있다. 또한, 저항성 해충의 출현 지연 및 방제 가능성이 제시된 이후 혼합제 개발에 대한 관심은 더욱 증가하고 있다. 약효의 상승(synergism)이라는 말은 처음 약리학적인 면에서 약물들의 조합에 따라 나타나는 현상을 표현하기 위하여 사용되었다. 살충제의 약효상승은 약제의 체내 침투율 증가와 무독화 과정의 조절, 작용점 다양화 등의 생리, 생화학적인 측면에서 많이 연구되고 있으며, 이는 저항성 해충의 발현 억제 및 방제 가능성으로 이어져 연구가 진행되고 있다. 이 중 근래에 살충제의 약효상승에 관한 연구에서 가장 중요시 고려되는 것은 무독화 과정의 저해를 이용한 약효의 상승효과이다. 무독화 과정이란 모든 생물이 자신을 보호하기 위하여 체내에 농약과 같은 독성물질이 들어 왔을 경우 여러가지 효소에 의하여 산화, 가수분해, conjugation 과정을 거친 후 분자구조를 변형시켜 모화합물보다 독성이 적은 화합물을 만들거나 수용성을 증가시켜 체외로 배설되는 속도를 빠르게 하는 일련의 대사과정을 의미하는 것이다.

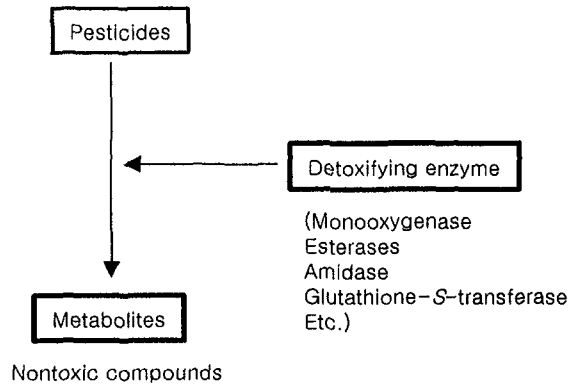


Figure 1. Detoxification process of pesticides by detoxifying enzymes

대사효소에 의한 무독화 과정에는 phase I 반응인 산화반응, 가수분해반응, 환원반응과 phase II 반응인 conjugation반응이 있는데, 이러한 무독화 과정을 대사효소의 선택적 저해제로 억제함으로써 나타나는 약효 상승 효과에 대한 연구가 많이 보고되고 있다.

현재 국내에 시판중인 살충 혼합제는 대부분이 방제 효과를 증가시키기 위해 작용점이 다른 약제들을 혼합하거나 복수 해충에 대한 동시방제를 위해 혼합한 것들이다. 또한 살충제와 무독화 효소의 선택적 저해제를 혼합하는 방법이 경제적 부담을 수반하기 때문에 기존에 개발된 여러 약제들을 대상으로 하여 상승작용을 나타내는 약제 조합을 탐색하려는 노력이 이루어지고 있다. 그러나, 아직까지 대부분의 연구들은 실험실이나 포장에서 임의로 약제들을 혼합 처리하여 약효 상승을 확인하고, 필요에 따라 *in vitro*에서 약효 상승의 원인을 규명하려는 수준이다.

상승효과를 이용한 혼합제는 기존 약제의 약효 상승과 저항성 발달에 대

한 대책 등의 잇점을 지니고 있음에도 불구하고 아직까지 체계적인 연구·보고가 미비한 실정이다. 따라서 상승효과를 이용한 혼합제 개발시 체계적인 기초 실험과 이론의 확립은 약효 상승의 예측뿐만 아니라 시간과 연구경비의 절감 등 상당한 경제적 효과를 기대할 수 있을 것이다.

본 연구는 체계적인 이론을 바탕으로 농약의 주된 무독화 과정에 참여하는 무독화에 대하여 저해력이 있는 약제를 선별하고, 이를 통한 혼합제 개발을 목적으로 수행하였다. 이를 위하여 혼합제의 현황을 파악하고 국내 유통되고 있는 살충제와 살균제를 대상으로 무독화 효소에 개한 저해력을 측정하였다. 또한 혼합제의 실내 실험과 적용 확대 실험, 저항성 해충에 대한 방제 가능성을 실험적으로 검증한 후 실제 제형으로 만들고 포장 실험을 통하여 최종 약효를 확인하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 공시약제

공시약제들은 현재 유통 중인 acephate의 살충제 76종과 benomyl의 살균제 31종을 (주) 경농, (주) 동방아그로, (주) 동양화학, (주) 동부한농화학, (주) 미성화학, (주) 성보화학, (주) 전진화학, (주) 영일화학, 농업과학기술원 작물보호부 농약개발과에서 각각 분양 받아 정제하지 않고 원제 그대로 사용하였다. 사용된 농약은 다음과 같다.

### 2. 공시동물

180~200g의 생중량을 갖는 sprague dawley계(SD계) 수컷 쥐(Rats)를 대한실험동물센터(충북음성군 삼성면 대야리 113)로부터 구입하여 2~3일간 순화시킨 후 사용하였다.

### 3. 공시곤충

살충활성 시험에 사용된 배추좀나방(*Plutella xylostera* L.)은 (주)경농 경주 중앙연구소와 (주)동부한농화학의 사육실에서 사육되어 유전적으로 안정된 3령충을 이용하였다. 목화진딧물(*Aphis gossypii* Glover)은 일본 농업환경 기술연구소에서 분양 받은 무시암컷성충을 사육하여 실험에 사용하였다.

### 4. 공시균주 (병원균)

살균활성은 (주) 경농 중앙연구소 살균제 실험실에서 수행되었으며 공시균주는 다음과 같다.

Table 1. Insecticides tested to enzyme assay

| Insecticide        | Chemical name  | Purity(%) |
|--------------------|--|-----------|
| Acephate           | O,S-dimethyl acetylphosphoramidothioate  | 960       |
| Acetamiprid        | (E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1-methylacetamidine  | 99.0      |
| Alpha-cypermethrin | racemate comprising (S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate and (R)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl(1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-di-methyl-cyclopropanecarboxylate |           |
| Amitraz            | N-methylbis(2,4-xylyliminomethyl)amine   | 98.5      |
| Azinphos-methyl    | S-(3,4-dihydro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ylmethyl)O,O-di-methyl phosphorodithioate   | 90.0      |
| Azocyclotin        | tri(cyclohexyl)-1H-1,2,4-triazol-1-yltin   | 97.4      |
| Benfuracarb        | ethyl N-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yloxycarbonyl(methyl)aminothio]-N-isopropyl- $\beta$ -alaninate  | 90.0      |
| Bifenthrin         | 2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-tri-fluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclo-propanecarboxylate  | 94        |
| Bromopropylate     | isipropyl 4,4'-dibromobenzilate  | 93.5      |
| Buprofezin         | 2-tert-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-1,3,5-thiadiazinan-4-one  |           |
| Carbaryl           | 1-naphthyl methylcarbamate   | 97.0      |
| Carbofuran         | 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate  | 99.8      |

(continued)

| Insecticide      | Chemical name  | Purity(%) |
|------------------|--|-----------|
| Carbosulfan      | 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl(dibutylaminothio)methyl-carbamate  | 88        |
| Cartap           | S,S' -(2-dimethylaminotrimethylene) bis(thiocarbamate)   |           |
| Chinomethionat   | 6-methyl-1,3-dithiolo[4,5-b]quinoxalin-2-one   | 90.0      |
| Chlorfenapyr     | 4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-ethoxymethyl-5-trifluoromethylpyrrole-3-carbonitrile  | 96.3      |
| Chlorfenson      | -  | 94.1      |
| Chlorfluazuron   | 1-[3,5-dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea                             | 91.0      |
| Chlorpyrifos     | O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate   | 96.0      |
| Clortentezine    | -  |           |
| Cyfluthrin       | (RS)- $\alpha$ -cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate | 95.0      |
| Cypermethrin     | (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate          | 91.2      |
| dichlorovos      | 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate   |           |
| Demeton-S-methyl | S-2-ethylthioethyl O,O-dimethyl phosphorothioate   | 50.0      |

(continued)

| Insecticide      | Chemical name   | Purity(%) |
|------------------|---|-----------|
| Deltamethrin     | (S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate | 98.0      |
| Diazinon         | O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate                                     | 96.4      |
| Dimethoate       | O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate   | 96.0      |
| Dimethylvinphos  | (Z)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl dimethyl phosphate   | 95.0      |
| Endosulfan       | (1,4,5,6,7,7-hexachloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ylenebismethylene) sulfite                         | 95.5      |
| Etofenprox       | 2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether   | 98.0      |
| Ethoprophos      | O-ethyl S,S-dipropyl phosphorodithioate   | 92.3      |
| Fenazaquin       | 4-tert-butylphenethyl quinazolin-4-yl ether   | 97.5      |
| Fenbutatin oxide | bis[tris(2-methyl-2-phenylpropyl)tin]oxide  | 99.5      |
| Fenitrothion     | O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate   | 95.0      |
| Fenobucarb       | 2-sec-butylphenyl methylcarbamate   | 94.0      |
| Fenothiocarb     | S-4-phenoxybutyl dimethylthiocarbamate  | 99.1      |

(continued)



| Insecticide   | Chemical name   | Purity(%) |
|---------------|---|-----------|
| Fenoxycarb    | ethyl 2-(4-phenoxyphenoxy)ethylcarbamate  |           |
| Fenpropathrin | (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethyl-cyclopropane-carboxylate  | 92.2      |
| Fenpyroximate | tert-butyl(E)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethylene=amino-oxy)-p-toluate                                 | 99.0      |
| Fenvalerate   | (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (RS)-2-(4-chlorophenyl)-3-methyl butyrate   | 95.0      |
| Fipronil      | (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile | 91.0      |
| Flucythrinate | (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (S)-2-(4-difluoromethoxyphenyl)-3-methylbutyrate                                      | 96.0      |
| Flufenoxuron  | 1-[4-(2-chloro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-p-tolyloxy)-2-fluorophenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea                 | 96.0      |
| Flupyrazophos | O,O-diethyl-O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl)thiophosphoric acid  | 96.4      |
| Fonofos       | O-ethyl S-phenyl (RS)-ethylphosphonodithioate   | 97.0      |
| Furathiocarb  | butyl 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N,N'-dimethyl-N,N'-thiodicarbamate  | 95.0      |
| Hexythiozox   | (4RS,5RS)-5-(4-chlorophenyl)-N-cyclohexyl-4-methyl-2-oxo-1,3-thiazolidine-3-carboxamide                                     | 96.6      |
| Imidacloprid  | 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine   | 95.0      |

(continued)

| Insecticide        | Chemical name  | Purity(%) |
|--------------------|--|-----------|
| Lambda-cyhalothrin | reaction product comprising equal quantities of (S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxy-benzyl (Z)-(1R,3R)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate and (R)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1S,3S)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate | 87.0      |
| Malathion          | diethyl (dimethoxythiophosphorylthio)succinate   | 96.5      |
| Mecarbam           | S-(N-ethoxycarbonyl-N-methylcarbamoylmethyl) O,O-diethyl phosphorodithioate  | 98.2      |
| Monocrotophos      | dimethyl (E)-1-methyl-2-(methylcarbamoyl)vinyl phosphate   | 76.0      |
| Methamidophos      | O,S-dimethyl phosphoramidothioate  | 95.0      |
| Methidathion       | 4-methylthio-3,5-xylol methylcarbamate   | 95.5      |
| Methomyl           | S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate   | 98.0      |
| Metolcarb          | m-tolyl methylcarbamate  | 97.0      |
| Omethoate          | O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorothioate  |           |
| Parathion          | O,O-diethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate   | 98.4      |
| Pirimicarb         | 2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl dimethylcarbamate   | 85.0      |
| Pirimiphos-methyl  | O-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-dimethyl phosphorothioate  |           |

(continued)

| Insecticide     | Chemical name  | Purity(%) |
|-----------------|--|-----------|
| Phenthoate      | S- $\alpha$ -ethoxycarbonylbenzyl O,O-dimethyl phosphorodithioate  | 91.7      |
| Phosmet         | O,O-dimethyl S-phthalimidomethyl phosphorodithioate  | 96.0      |
| Phosphamidon    | 2-chloro-2-diethylcarbamoyl-1-methylvinyl dimethyl phosphate   | 92.5      |
| Profenofos      | O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate   | 96.0      |
| Prothiofos      | O-2,4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate   | 91.0      |
| Propargite      | 2-(4-tert-butylphenoxy)cyclohexyl prop-2-ynyl sulfite  | 91.5      |
| Pyridaphenthion | O-(1,6-dihydro-6-oxo-1-phenylpyridazin-3-yl) O,O-diethyl phosphorothioate  | 98.9      |
| Pyridaben       | 2-tert-butyl-5-(4-tert-butylbenzylthio)-4-chloropyridazin-3(2H)-one  | 98.0      |
| Silafluofen     | (4-ethoxyphenyl)[3-(4-fluoro-3-phenoxyphenyl)propyl](dimethyl)silane   | 93.0      |
| Spinosad        | mixture of 50-95% of (2R,3aS,5aR,5bS,9S,13S,14R,16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl- $\alpha$ -L-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-14-methyl-1H-8-oxacyclododeca[b]as-indacene-7,15-dione and 50-5% (2R,3aR,5aS,5bS, 9S, 13S, 14R, 16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl- $\alpha$ -L-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-4,14-dimethyl-1H-8-oxacyclododeca[b]as-indacene-7,15-dione | 90.3      |

(continued)

| Insecticide   | Chemical name  | Purity(%) |
|---------------|--|-----------|
| Teblufenozide | -  | 99.7      |
| Teflubenzuron | 1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea                                  | 91.0      |
| Tetradifon    | 4-chlorophenyl-2,4,5-trichlorophenyl sulfone   | 98.5      |
| Thiocyclam    | N,N-dimethyl-1,2,3-trithian-5-ylamine  | 87.6      |
| Thiodicarb    | 3,7,9,13-tetramethyl-5,11-dioxa-2,8,14-trithia-4,7,9,12-tetra-azapentadeca-3,12-diene-6,10-dione | 95.0      |
| Triazophos    | O,O-diethyl O-1-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl phosphorothioate                                    |           |
| Triflumuron   | 1-(2-chlorobenzoyl)-3-(4-trifluoromethoxyphenyl)urea   | 90.0      |

Table 2. Fungicides tested to enzyme assay

| Fungicide        | Chemical name  | purity(%) |
|------------------|--|-----------|
| Benomyl          | methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate  | 80.0      |
| Bitertanol       | 1-(biphenyl-4-yloxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol (20:80 ratio of (1RS,2RS) and (1RS,2SR) isomers) | 97.0      |
| Carbendazim      | methyl benzimidazol-2-ylcarbamate  | 96.0      |
| Copper hydroxide | copper(II) hydroxide   | 98.0      |
| Cyproconazole    | (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol                                 | 95.6      |
| Cyprodinil       | 4-cyclopropyl-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine   | 99.0      |
| Dazomet          | 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione  | 95.7      |
| Dithianon        | 5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-b]-1,4-dithiin-2,3-dicarbonitrile   | 95.7      |
| Diniconazole     | (E)-(RS)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pent-1-en-3-ol                                   | 97.8      |
| Dimethomorph     | (E,Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine   | 98.0      |
| Edifenphos       | O-ethyl S,S-diphenyl phosphorodithioate  |           |
| Etridiazole      | ethyl 3-trichloromethyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl ether  | 98.6      |

(continued)

| Fungicide      | Chemical name  | Purity(%) |
|----------------|--|-----------|
| Fenbuconazole  | 4-(4-chlorophenyl)-2-phenyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)butyronitrile                                       | 96.5      |
| Fenarimol      | (±)2,4'-dichloro- $\alpha$ -(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol   | 98.4      |
| Fluazinam      | 3-chloro-N-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyl)- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidine | 95.0      |
| Fludioxonil    | 4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)pyrrole-3-carbonitrile  | 96.1      |
| Fosetyl-Al     | ethyl hydrogen phosphonate   | 95.0      |
| Hexaconazole   | (RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol  | 88.0      |
| Hymexazol      | 5-methylisoxazol-3-ol  | 95.0      |
| Imibenconazole | 4-chlorobenzyl N-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)thioacetamidate                                 | 97.5      |
| Probenazole    | 3-allyloxy-1,2-benz[d]isothiazole 1,1-dioxide  | 96.5      |
| Procymidone    | N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide  | 98.7      |
| Pyrazophos     | O-6-ethoxycarbonyl-5-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl<br>O,O-diethyl phosphorothioate                       | 60.0      |
| Tebuconazole   | (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol                                  | 98.0      |

(continued)

| Fungicide        | Chemical name  | Purity(%) |
|------------------|--|-----------|
| Thiram           | tetramethylthiuram disulfide   | 98.1      |
| Tolclofos-methyl | O-2,6-dichloro-p-tolyl O,O-dimethyl phosphorothioate   | 97.2      |
| Tolyfluanide     | N-dichlorofluoromethylthio-N',N' -dimethyl-N-p-tolylsulfamide  | 97.0      |
| Tricyclazole     | 5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3]benzothiazole   | 96.0      |
| Triflumizole     | (E)-4-chloro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-N-(1-imidazol-1-yl-2-propoxyethylidene)-<br>-o-toluidine | 91.0      |
| Trifluazamide    | -  | 91.0      |
| Triforine        | N,N' -(piperazine-1,4-diylbis((trichloromethyl)methylene))diformamide                                      | 91.0      |
| Vinclozolin      | (RS)-3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-1,3-oxazolidine-2,4-dione                                     | 91.0      |

- 1) 사과 점무늬낙엽병 : *Alternaria mali*(Am)
- 2) 사과 점무늬썩음병 : *Botyosphaeria dothidea*(Bd)
- 3) 사과 탄저병 : *Glomerella cingulata*(Gc)

#### 5. 시약

- Metyrapone : Fluka Chemical AG. (Switzerland)
- Diethyl maleate : Aldrich Chemical Co. (U.S.A.)
- 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Dimethylaminocinamaldehyde : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Glutathione (GSH, reduced form) : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Lauryl sulfate sodium salt sigma ultra >99% : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Triphenyl phosphate, 99+%: Aldrich Chemical Co. (U.S.A.)
- Piperonyl butoxide : Aldrich Chemical Co. (U.S.A.)
- Eserine(physostigmin) : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- $\alpha$ -Naphthyl acetate : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- *o*-Dianisidine, tetrazotized (fast blue salt BN) zinc chloride complex dye content approx 20% : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- $\rho$ -Hydroxymercuribenzoic acid (sodium salt) H<sub>2</sub>O content 2mol/mol : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Disodium hydrogenphosphate 12-water : Showa Chemical Inc. (Japan)
- Sodium dihydrogen phosphate dihydrate : Showa Chemical Inc. (Japan)
- Potassium chloride : Showa Chemical Inc. (Japan)



- Acetone : Showa Chemical Inc. (Japan)
- Ethyl alcohol : Hyman Limited Co., GP급 (England)
- Chloroform : Hyman Limited Co., GP급 (England)
- Bovin Serum Albumine(BSA) : Sigma Chemical Co. (U.S.A.)

## 6. 사용기기

- Centrifuge : Beckman L8-700-M, ultracentrifuge (German)  
Beckman J2-21, centrifuge (German)
- Homogenizer : Philip Harris Co. (England)
- Ultraviolet/visible spectrophotometer :  
Model V-320, Hitachi Co. (Japan)  
UV-240, Shimadzu Co. (Japan)
- Refrigerator : Model HM-150IV, Han-II Co. (Korea)
- Water bath shaker : Personal-11, Taitec Co. (Japan)

## 7. 실험방법

### 가. Microsome과 cytosolic protein의 조제

쥐의 경우, microsome 및 glutathione-S-transferase(GST)를 함유한 효소액은 쥐의 경추를 추골시킨 후, 복부를 절개하여 간을 적출하였다. 간을 1.15% potassium chloride용액으로 여분의 혈액을 제거한 다음 homogenizer tube에 옮긴 후, 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.4) 5ml로 homogenizer (Philip Harris Co., England)로 빠른 시간 내에 균질마쇄하였다. 이 시료를 centrifuge(Beckman J2-21, Germany) 10,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취한 후 ultracentrifuge(Beckman L8-700M, Germany) 105,000g에

서 1시간 동안 초원심분리하여, 분리되어진 상등액으로부터 cytosol fraction을 얻었다. 남은 pellet은 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6) 5ml로 재현탁시킨 후 105,000g에서 1시간 더 초원심분리하여 순수한 microsomal pellet을 얻었다. 여기서 얻은 microsome과 cytosol fraction은 -74℃의 deep freezer에 보관하였다.

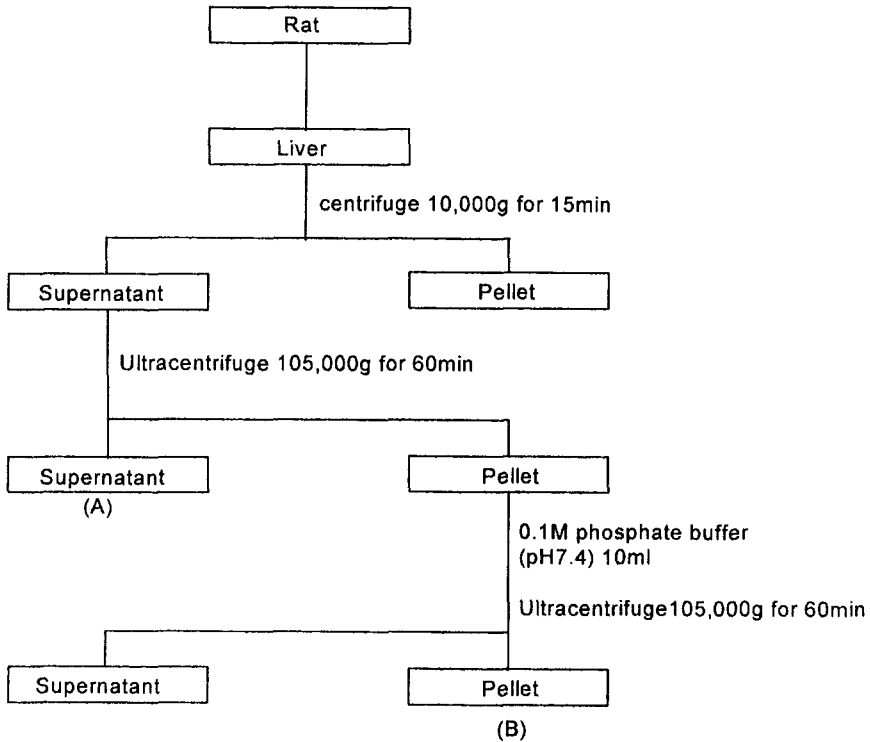


Figure 2. A schematic diagram for the preparation of cytosolic protein (A:amidase, esterases, carboxylesterase, glutathione-S-transferase) and microsomal fraction(B: monooxygenase) from rat

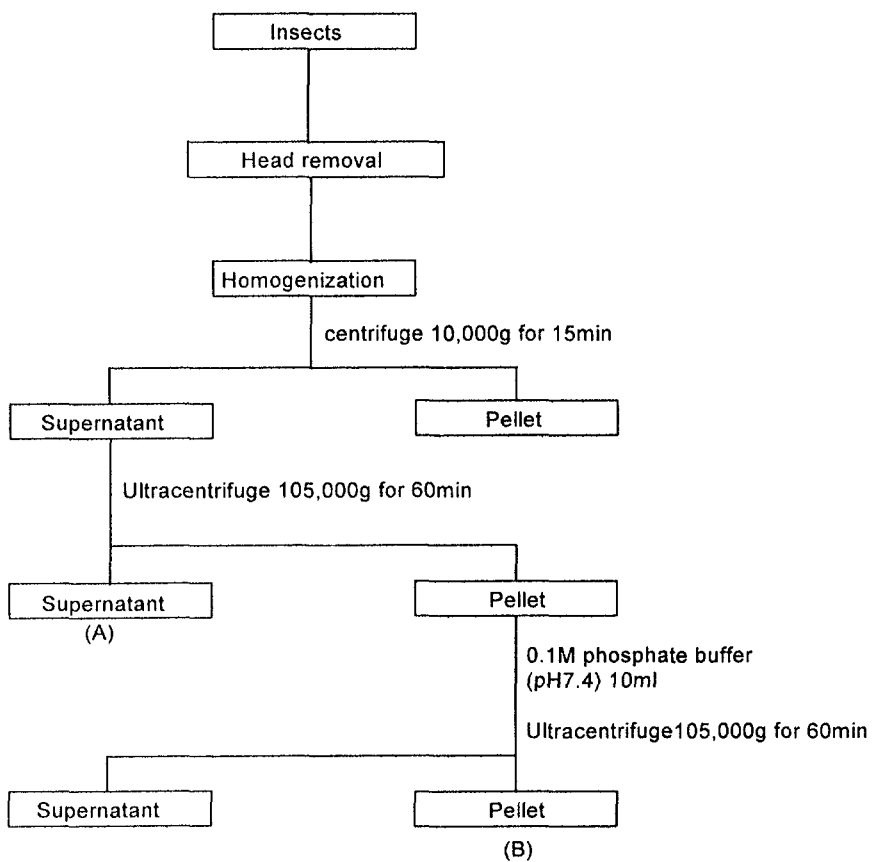


Figure 3. A schematic diagram for the preparation of cytosolic protein (A:amidase, esterases, carboxylesterase, glutathione-*S*-transferase) and microsomal fraction(B: monooxygenase) from insect

## 나. 단백질 정량

Lowery 등의 방법에 준하여 bovin serum albumin(BSA)을 표준품으로 750nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

## 다. 무독화 효소에 대한 농약의 활성 저해 측정

### 1) 표준용액 조제

각각의 약제들은 원제를 정칭하여 10ml volumetric flask에 옮기고 용해도에 따라 acetone이나 H<sub>2</sub>O에 정용하여 0.1M 표준용액을 조제한 후  $1 \times 10^{-2}M \sim 1 \times 10^{-7}M$ 까지 희석하여 사용하였다.

### 2) 농약의 glutathione-S-transferase 활성 저해

약제의 GST 활성저해력은 Habig의 방법에 준하여 실시하였다. 시험관에 0.1M phosphate buffer(pH7.4), GST를 함유하는 cytosolic protein 0.2mg, 측정대상 약제 30 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation시킨 후 15mM glutathione 30 $\mu$ l와 기질인 1-chloro-2,4-nitrobenzene(CDNB)를 첨가하고, 반응 직후부터 1분간 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 3) 농약의 amidase 활성 저해

Amidase 활성저해 측정은 Matsunaka의 방법에 준하여 실시하였다. Amidase 효소를 함유하는 cytosolic protein 1.5mg과 농약 30 $\mu$ l를 배양기(37 $^{\circ}$ C)에서 5분간 incubation시킨 후, 기질인 0.1M propanil 30 $\mu$ l를 넣어 배양기에서 30분간 반응시켰다. Trichloroacetic acid (10%) 2ml를 넣어 반응을 종결시킨 후 5,000g에서 10분간 원심분리하여 변성된 단백질을 제거하였다. 여기에 0.1% dimethyl aminocinnamaldehyde 1ml를 첨가하여 5분간 발색시

킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 농약의 monooxygenase 활성 저해

Monooxygenase 활성 저해 측정은 Kuhr의 방법에 준하여 실시하였다. 시험관에 microsomal protein 3mg, 0.1M phosphate buffer(pH7.4), 농약 30  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 5분간 incubation시킨 후, 0.53M  $\rho$ -nitroanisole 30 $\mu$ l, NADPH generating system 0.5ml [20mM glucose-6-phosphate, 1.8 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20mM NADP in phosphate buffer (pH7.4)]를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1N-HCl 2ml로 반응을 종결시켰다. 반응액을 분액여두에 옮겨 chloroform으로 분획하고 5N-NaOH 5 ml를 가하여 생성된  $\rho$ -nitrophenolate ion을 흡광도 400nm에서 측정하였다.

#### 5) 농약의 esterases 활성 저해

약제의 esterase 활성 저해력은 Van Asperin의 방법에 준하여 측정하였다. cytosolic protein 2mg, 농약 10 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 5분간 incubation시킨 후, 기질인  $\alpha$ -naphthyl acetate(5mM) 1ml를 첨가하고 다시 20분간 항온수조에서 incubation 시켰다. 반응 직후 반응액 0.6ml에 diazoblue-sodium laurylsulfate(5% sodium lauryl sulfate + 1% fast blue B.N. salt, 5:2(v:v)) 용액 0.8ml를 첨가하고 상온에서 15분간 발색시킨 후, 600nm에서 가수분해산물인  $\alpha$ -naphthol의 흡광도를 측정하였다.

#### 6) 농약의 carboxylesterase 활성 저해

약제의 carboxylesterase 활성 저해력은 Van Asperin의 방법에 준하여 실시하였다. 시험관에 0.1M phosphate buffer(pH7.4), esterase를 함유하는 cytosolic protein 2mg, 농약 10 $\mu$ l를 넣고 arylesterase와 cholinesterase의 제

거를 위해  $p$ -hydromercuribenzoate  $20\mu\text{l}$ 와 eserine  $20\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응시켰다.  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 incubation시킨 후, 기질인  $\alpha$ -naphthyl acetate ( $5\text{mM}$ )  $1\text{ml}$ 를 첨가하고 다시 20분간 incubation 시켰다. 반응 직후 반응액  $0.6\text{ml}$ 에 diazoblue-sodium laurylsulfate( $5\%$  sodium lauryl sulfate +  $1\%$  fast blue B.N. salt,  $5:2(\text{v:v})$ ) 용액  $0.6\text{ml}$ 를 첨가하여 상온에서 15분간 발색시킨 후,  $600\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다

#### 7) 약제의 무독화 효소 저해력의 계산

약제 처리구의 효소활성을 무처리구의 효소활성과 비교하여 저해율을 구하고, 효소활성을 50% 저해하는 농도인  $I_{50}$ 값으로 나타내었다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : 대조구의 효소활성.

B : 공시약제에 의해 처리구의 효소활성.

#### 8. 기준약제의 선정

기준약제는 생물활성 검정시 무독화 효소 활성을 저해하는 약제와 혼합하기 위한 약제로 문헌조사를 통하여 충체내 대사가 알려진 약제나 혼합처리시 효과가 인정된 약제, 또는 저항성 발현이 무독화효소에 의한 것이 확인된 약제를 중심으로 선발하였다.

## 9. 생물활성 검정

### 가. 살충활성 검정

#### 1) 표준용액조제

단제처리시 대상 약제들은 원제를 정칭하여 500ml volumetric flask에 옮기고 acetone 50ml와 전착액(Triton X-100, 100ppm) 450ml에 녹였다. 물로 정용하여 500ppm의 표준용액을 조제한 후 희석하여 사용하였다. 혼합처리하는 2종의 약제를 각각 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 사용하였다.

#### 2) 공시곤충의 약제 처리 방법

엽면침지법을 이용하여 실험하였다. 배추잎을 직경 5cm로 자른 후 희석액에 30초간 침적하고 음건시킨 후, 여과지가 깔린 petri dish(i.d. 9cm)에 놓고 공시충을 접종하였다. 1농도당 10마리씩 하여 3반복 시험하여 25±1℃에서 24시간을 방치한 후 살충률을 조사하였으며 Finney의 probit계산법에 의하여 반수치사 농도 (LC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### 3) 상승작용(Synergism)의 비교 평가

Sun & Johnson의 방법을 이용하여 혼합 처리 효과를 비교하였다.

$$\text{Co-toxicity coefficient} = \frac{\text{혼합제의 Actual Toxicity Index}}{\text{혼합제의 Theoretical Toxicity Index}} \times 100$$

$$\text{Actual Toxicity Index} = \frac{\text{A제의 LD}_{50}}{\text{혼합제의 LD}_{50}} \times 100$$

### Theoretical Toxicity Index

$$= \frac{\text{A제의 독성지수} \times \text{혼합제중의 A제의 \%}}{\text{B제의 독성지수} \times \text{혼합제중의 B제의 \%}} \times 100$$

독성지수(Toxicity Index)

$$= \frac{\text{기준살충제(A)의 LD}_{50}}{\text{공시제의 LD}_{50}} \times 100$$

이때 co-toxicity coefficient 계산치가 100에 가까우면 similar action, 100보다 훨씬 크면 synergistic action, 100보다 작으면 independent action, 100보다 훨씬 작으면 antagonistic action으로 평가하였다.

#### 나. 살균활성 검정

살충제와 살균제를 혼합한 경우 균에 대한 약효를 알아보기 위하여 살균활성을 측정하였다. 살균활성 검정은 (주)경농 중앙연구소 살균제 연구실에서 수행되었다.

##### 1) 약액배지의 조제

일정량의 potato dextrose agar(PDA)를 조제한 후 56℃ 정도로 식힌 다음 일정량의 약액을 첨가하여 약액배지를 제조하였다.

##### 2) 병원균의 접종

28℃에서 4일간 배양한 병원균의 균사선단부로부터 6mm cork corer로 punching하여 약액배지에 이식하고 4일간 배양한 후 균총의 직경을 제어균사의 생장을 조사하고 생장 저지율을 계산하였다.



### 3) 균사생장 저지율의 계산

균사생장 저지율(%)

$$= \frac{(\text{무처리구의 균총 직경 평균}) - (\text{처리구의 균총 직경 평균})}{(\text{무처리구의 균총 직경 평균})} \times 100$$

## 10. 제형 개발 및 포장실험

본 실험은 (주)경농 중앙 연구소에 위탁하여 실시되었다.

### 가. 공시곤충

실내실험은 (주)경농 중앙연구소 곤충사육실 (25±2℃)에서 7년간 약제노출 없이 사육해온 배추좀나방(*Plutella xylostella* L)을 누대사육하며 실험에 이용하였으며, 포장실험은 배추좀나방에 대한 적용가능성을 검토하기 위하여 일반농가의 배추포장에서 실험을 실시하였으며, 공시충은 이들 포장에서 직접 발생하는 충을 이용하였다.

Table 3. Insects tested and their rearing conditions in the laboratory and the field

| Species                    | Tested places | Host plants  |
|----------------------------|---------------|--------------|
| <i>Plutella xylostella</i> | Laboratory    | Cabbage leaf |

#### 나. 제형 개발 및 혼합제의 개발

본 실험에 사용한 diazinon+carbosulfan(24%+6%) 유제, chlorpyrifos+carbofuran(12.5%+12.5%) 수화제 그리고 phenthoate+benomyl(24%+ 6%) 수화제는 (주)경농 중앙연구소 제제연구파트에서 제제화하여 사용하였으며, 제조방법은 아래와 같다.

수화제의 제조방법은 먼저 원제와 계면활성제, 보조제, 증량제 등을 계량하고, universal mixer(Dalton Co. Ltd.)를 이용하여 골고루 혼합한 후 jet-o-mill(Altech Co. Ltd.)을 이용하여 평균입경  $8\mu\text{m}$ 이하로 분쇄하여 제조하였으며, 유제의 제조방법은 먼저 원제와 용제를 계량하여 원제를 용제로 용해시킨 후 계면활성제를 첨가하고 stirrer를 이용하여 혼합하여 제조하였다. 실내실험에서의 약액조제는 우선 증류수에 triton X-100을 첨가하여 100ppm의 stock solution을 준비하였다. 공시약제를 chemical balance로 측정하여 100ml 삼각플라스크에 담아 용해시킨 후 triton X-100 stock solution(100ppm)을 첨가하여 소정의 농도별 희석액을 조제하여 사용하였으며, 포장시험의 경우에는 일반농약의 사용방법에 따라 사용가능농도로 희석하여 이용하였다.

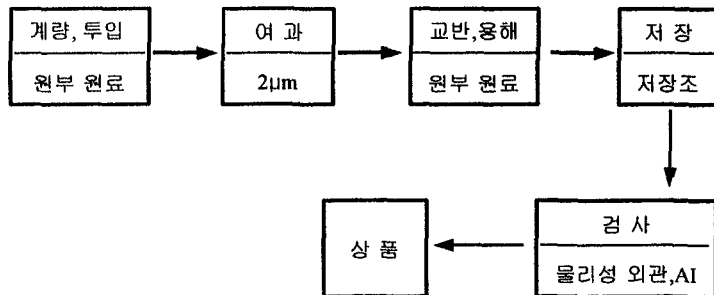
혼합제 처방 방법

Diazinon + Carbosulfan (24+6) EC

처방서

| 용 도      | 품 명                                 | 함 량(%) |
|----------|-------------------------------------|--------|
| 원 제      | Diazinon                            | 24.0   |
| 원 제      | Carbosulfan                         | 6.0    |
| 계면활성제 I  | POE Tristyryl phenyl ether          | 5.5    |
| 계면활성제 II | Calcium of dodecylbenzene sulfonate | 4.5    |
| 용제       | Xylene                              | Rest   |
| Total    |                                     | 100.0  |

제조공정

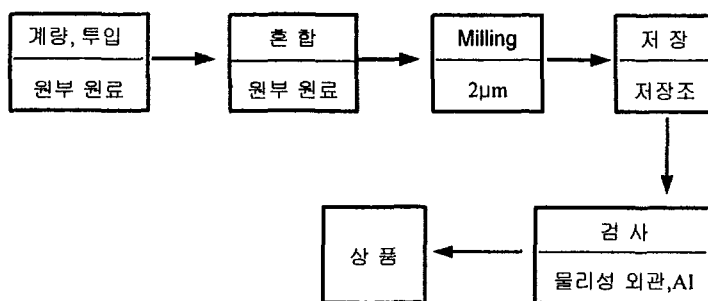


Chlorpyrifos + Carbosulfan (12.5+12.5) WP

처방서

| 용도       | 품명                     | 합량(%) |
|----------|------------------------|-------|
| 원제       | Chlorpyrifos           | 12.5  |
| 원제       | Carbosulfan            | 12.5  |
| 계면활성제 I  | POE alkyl aryl sulfate | 5.0   |
| 계면활성제 II | Sodium lignosulfonate  | 2.0   |
| 보조제      | White Carbon           | 17.0  |
| 증량제      | Kaoline                | Rest  |
| Total    |                        | 100.0 |

제조공정

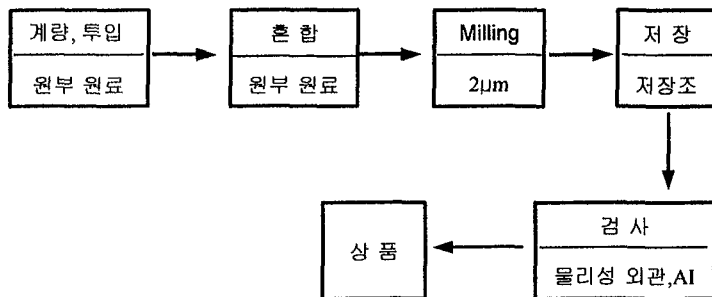


Phenthoate + Benomyl (24.0+6.0) WP

처방서

| 용 도     | 품 명                    | 합 량(%) |
|---------|------------------------|--------|
| 원 제     | Phenthoate             | 24.0   |
| 원 제     | Carbosulfan            | 6.0    |
| 계면활성제 I | POE alkyl aryl sulfate | 8.0    |
| 보조제     | White Carbon           | 20.0   |
| 증량제     | Kaoline                | Rest   |
| Total   |                        | 100.0  |

제조공정



## 다. 혼합제의 살충효과 검정방법

### 1) 실내실험

본 실험의 생물검정은 배추좀나방의 섭식특성을 이용한 방법을 선택하여 살충효과를 검정하였다. 섭식독성은 배추좀나방의 2령유충을 이용하여 실험을 수행하였으며, 검정방법은 양배추잎(지름 5cm)을 소정의 농도별 희석액에 10초간 침지하여 음건후 여과지가 깔린 petri-dish(지름 9cm)에 놓고, 각 단계별 유충을 반복당 10마리씩 접종하였다(엽침적법). 약제처리 24, 48, 72시간 후에 생사충수를 조사하였으며, 모든 실험은 실내사육조건인 온도  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 광조건 16L : 8D조건으로 보관하였다. 생사충의 판단은 부드러운 붓이나 칩으로 충체를 접촉시켜 움직임이 없는 것을 죽은 것으로 하였다. 모든 실험은 3반복으로 하였으며, 생충율로 환산한 후 그 결과를 분석하였다.

### 2) 혼합제의 활성평가

배추좀나방에 대한 활성시험은 경북 경주시 배반동 소재의 농가포장에서 수행하였으며, 재배방법 및 약제살포는 농가일반 관행재배법에 준하되 시험에 영향을 미칠만한 살충제, 살균제 및 제초제는 일체 살포하지 않았다. 시험구 및 시험면적은 난괴법 3반복으로 반복당  $20\text{m}^2$ 로 배치하였으며, 약제는 공시한 작물에 반복당 배추좀나방의 밀도가 50마리 이상 되게 표식한 후에 처리하였다. 조사방법은 일반적인 농약등록법상의 조사방법인 약제처리 3, 7, 14일 후에 반복당 생충수를 조사하였으며, 이 결과를 생충율로 환산하여 통계처리시 이용하였다.

### 3) 통계분석

생물활성검정실험의 경우 조사한 생충수를 Finney(1971)의 probit법으로 통계 처리하여 혼합계의 함량을 결정하였다. Duncan multiple range test(Duncan 1955, SAS program로 통계 처리하여 유의차를 검정하였으며, 생충율로 환산한 후 Excel program(Microsoft Co. ver 5.0)을 이용하여 방제 효과를 구하였다.

### 제 3절 결과

#### 1. 혼합제의 개발과 사용현황

가. 국내 사용중인 살충활성을 갖는 혼합제

Table 4. Pesticide mixtures in korea

| Insecticide-A          | Pesticide-B  | 작물 및 대상해충   |
|------------------------|--------------|---|
| $\alpha$ -Cypermethrin | Chlorpyrifos | 감귤 진딧물, 사과 사과굴나방, 배 진딧물, 감 감꼭지 나방, 고추 진딧물, 배추 파밤나방, |
| Bifenthrin             | Chorpyrifos  | 사과 점박이 응애·진딧물, 배추 담배거세미 나방, 파밤나방, 오이 작은각시들나방        |
| Bifenthrin             | Profenofos   | 고추 목화진딧물·담배나방                                       |
| Bifenthrin             | Carbendazine | 사과 진딧물·탄저병·응애                                       |
| Buprofezine            | BPMC         | 벼 벼멸구   |
| Buprofezine            | Isoprocarb   | 벼 벼멸구   |
| Buprofezine            | Matolcarb    | 벼 벼멸구   |
| Cabaryl                | Phosalone    | 배추 배추흰나비, 잔디 거세미나방·멸강나방                             |
| Carbofuran             | Isoprocarb   | 벼 벼물바구미   |

(continued)



| Insecticide-A | Pesticide-B      | 작물 및 대상해충   |
|---------------|------------------|---|
| Carbofuran    | Probenazole      | 벼 벼물바구미 · 잎도열병  |
| Cartap        | Buprofezine      | 벼 벼멸구 · 흑명나방, 토마토 온실가루이, 단감 각지벌레, 고추 오이충채벌레, 감자 아메리카잎굴파리    |
| Cartap        | Ethofenprox      | 벼 벼물바구미 · 이화명나방 · 벼멸구                                       |
| Chlorpyrifos  | Diflubenzuron    | 사과 사과굴나방, 감귤 굴나방, 감 감꼭지나방, 배추 파밤나방, 사과 파밤나방, 잔디 멸강나방, 배 명나방 |
| Clofentezine  | Acrinathrin      | 사과 점박이용애  |
| Clofentezine  | Fenbutatin-oxide | 사과 점박이용애  |
| Clofentezine  | Acrinathrin      | 사과 점박이용애  |
| Clofentezine  | Fenbutatin-oxide | 사과 점박이용애  |
| Cypermethrin  | chlorpyrifos     | 사과 사과혹진딧물, 배추 복숭아혹진딧물                                       |
| Cypermethrin  | Phosalone        | 감귤 진딧물, 사과 진딧물  |
| Celtamethrin  | Dichlorvos       | 사과 사과혹진딧물   |
| Celtamethrin  | Phosalone        | 감귤 진딧물, 유자 굴굴나방, 사과 사과혹진딧물, 고추 복숭아혹진딧물, 오리나무 오리나무잎벌레        |

(continued)

| Insecticide-A   | Pesticide-B   | 작물 및 대상해충  |
|-----------------|---------------|--|
| Deltamethrin    | Profenofos    | 고추 목화진딧물, 배추 복숭아혹진딧물, 국화 진딧물, 장미 진딧물, 오리나무 오리나무잎벌레       |
| Deltamethrin    | Pyraclufos    | 배추 복숭아혹진딧물   |
| Diazinon        | BPMC          | 벼 벼멸구  |
| Diflubenzuron   | Furathiocarb  | 사과 사과굴나방, 감귤 자나방, 배추 파밤나방, 단감 감꼭지나방, 배 조팝나무진딧물           |
| Dimethylvinphos | BPMC          | 벼 벼멸구 · 흑명나방   |
| Edifenphos      | BPMC          | 벼 도열병 · 벼멸구  |
| Esfenvalerate   | Fenithrothion | 사과 사과혹진딧물, 배 배명나방, 양버즘나무 미국흰불나방                          |
| Esfenvalerate   | Malathion     | 고추 목화진딧물, 배추 복숭아혹진딧물, 오이 진딧물, 플라타너스 미국흰불나방               |
| Ethofenprox     | Diazinon      | 사과 복숭아심식나방, 고추 담배나방, 오이 온실가루이, 배추 파밤나방, 감 감꼭지나방, 잔디 멸강나방 |
| Ethofenprox     | Phenthoate    | 감귤 굴나방, 사과 진딧물, 배 진딧물, 배추 파밤나방                           |
| Fenitrothion    | BPMC          | 벼 벼멸구  |
| Fenitrothion    | Kasugamycin   | 벼 이화명나방 · 도열병  |

(continued)

| Insecticide-A       | Pesticide-B      | 작물 및 대상해충                     |
|---------------------|------------------|-------------------------------|
| Fenpropathrin       | Fenitrothion     | 감귤 껍응애 · 귤굴나방 · 조팝나무진딧물       |
| Hexythiazox         | Machine-oil      | 감귤 껍응애, 사과 사과응애               |
| Imidacloprid        | Pebufenozide     | 벼 벼멸구, 감귤 조팝나무진딧물             |
| Isoprocarb          | Pencycuron       | 벼 잎집무늬마름병 · 벼멸구               |
| Isoprothiolane      | BPMC             | 벼 벼멸구 · 목도열병                  |
| Lambda cyhalothrine | Phosalone        | 사과 진딧물, 감귤 귤굴나방               |
| Lambda cyhalothrine | Primicarb        | 고추 진딧물, 배추 복숭아혹진딧물, 장미 진딧물    |
| Lambda cyhalothrine | Primiphos-methyl | 사과 사과굴나방, 고추 진딧물, 감귤 진딧물      |
| Fenpropathrin       | Propargite       | 사과 점박이응애 · 진딧물                |
| Fenpropathrin       | Tetradifon       | 사과 응애, 감귤 껍응애, 배 점박이응애, 수박 응애 |
| Flufenoxuron        | Fenbutatin-oxide | 사과 사과굴나방 · 응애, 배 점박이응애        |
| Lambda cyhalothrine | Tetradifon       | 사과 응애류 · 사과굴나방                |
| Mecarbam            | Cypermethrine    | 사과 진딧물, 감귤 귤굴나방               |
| Phenthoate          | BPMC             | 벼 벼멸구 · 노린재                   |
| Pirimiphos methyl   | Cypermethrine    | 사과 진딧물, 고추 담배나방, 배추 배추흰나비     |

(continued)

| Insecticide-A   | Pesticide-B      | 작물 및 대상해충  |
|-----------------|------------------|--|
| Pyridaphenthion | BPMC             | 벼 벼멸구 · 벼물바구미  |
| Pyridaphenthion | Ethofenprox      |  |
| Pyridaphenthion | Metolcarb        | 벼 이화명나방, 오리나무 오리나무 잎벌레                                   |
| Tebufenozide    | BPMC             | 벼 벼멸구 · 이화명나방  |
| Tebufenpyrad    | Furathiocarb     | 배 진딧물, 수박 목화진딧물, 감귤 꿀응애, 사과 응애                           |
| Teflubenzuron   | B.T.             | 사과 복숭아심식나방   |
| Tetradifon      | Fenbutatin oxide | 사과 응애, 감귤 꿀응애, 배 점박이응애                                   |
| Tetradifon      | Primiphosmethyl  | 사과 응애, 수박 진딧물, 관엽류 점박이응애                                 |
| Tetradifon      | Propargite       | 사과 점박이 응애  |
| Validamycin     | BPMC             |  |
| Dichlorvos      | Phosalone        | 사과 사과굴나방, 감귤 꿀응애   |
| Diafenthion     | Furathiocarb     | 사과 사과혹진딧물, 감귤 조팝나무진딧물                                    |
| Fenitrothion    | Fenvalerate      | 사과 진딧물, 감귤 굴나방, 포도 호랑하늘소, 배추 담배나방, 오리나무 오리나무잎벌레, 감 감꼭지나방 |
| Benfuracarb     | Acephate         | 사과 진딧물   |

(continued)

| Insecticide-A | Pesticide-B   | 작물 및 대상해충   |
|---------------|---------------|---|
| buprofezin    | Bifenthrin    | 오이 온실가루이  |
| Buprofezin    | Amitarz       | 관엽류 굴가루깍지벌레, 차 뽕밀깍지벌레                                 |
| Buprofezin    | Furathiocarb  | 배 깍지벌레, 감귤 이세리아깍지벌레, 토B마토·오이 온실가루이                    |
| Fenitrothion  | Silafluofen   | 벼 흑명나방, 파 파밤나방  |
| Cypermethrin  | Tebupirimfos  | 감자 방아벌레   |
| Amitarz       | Bifenthrin    | 사과 사과응애·점박이응애   |
| Acetamiprd    | Diflubenzuron | 사과 사과굴나방  |
| Acetamiprid   | Bifenthrin    | 배추 파밤나방, 오이 온실가루이                                     |
| Acetamiprid   | Etofenprox    | 사과 진딧물, 배·감귤 조팝나무진딧물                                  |
| Acetamiprid   | Chlorfenapyr  | 수박 점박이응애  |
| Acetamipridq  | Fipronil      | 감귤 꽃노랑총채벌레  |
| Indoxcarb     | Teflubenzuron | 사과 사과굴나방  |
| Hexythiazox   | Dichlorvos    | 장미 점박이응애·짚레수염진딧물                                      |
| Chorpyrifos   | Acetamiprid   | 사과 진딧물  |
| Chlorfenapyr  | Bifenthrin    | 수박 점박이응애, 배추 담배거세미나방, 국화 대만총채벌레, 거베라 차면지응애, 고추 오이총채벌레 |

(continued)

| Insecticide-A          | Pesticide-B            | 작물 및 대상해충                                     |
|------------------------|------------------------|---|
| $\alpha$ -Cypermethrin | Cchlorfenapyr          | 배추 배추좀나방                                      |
| Chlorfenapyr           | Teflubenzuron          | 사과 사과글나방, 배추 배추좀나방                            |
| Chlorfenapyr           | Pyridaben              | 사과 응애   |
| Tebufenpyrad           | Diafenthiuron          | 사과 응애, 감귤 꿀응애, 배 점박이응애                        |
| Tebupirimfos           | Tetradifon             | 감귤 꿀응애, 사과 응애, 장미 점박이응애                       |
| Tebupirimfos           | Cyfluthrin             | 감자 방아벌레·거세미나방, 마늘 고자리파리,<br>배추 벼룩잎벌레, 잔디 굼벵이류 |
| Teflubenzuron          | $\alpha$ -Cypermethrin | 배추 파밤나방                                       |
| Triazamate             | $\alpha$ -Cypermethrin | 고추 진딧물  |
| Triazamate             | Furathiocarb           | 사과 사과혹진딧물                                     |
| Fenpropathrin          | Fenitrothion           | 감귤 꿀응애·조팝나무진딧물                                |
| Fenpropathrin          | Benfuracarb            | 고추 진딧물, 감귤 조팝나무진딧물                            |
| Fenpyroximate          | Propargite             | 사과 응애·진딧물                                     |
| Phorate                | Diazinon               | 감자 거세미나방                                      |
| Pyridaben              | Bifenthrin             | 감귤 꿀응애  |

(continued)

| Insecticide-A               | Pesticide-B                 | 작물 및 대상해충        |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Pyridaben                   | Azocyclotin                 | 사과 점박이응애         |
| Pyridaben                   | Primiphos-methyl            | 배 점박이응애          |
| Pyrimidifen                 | Bifenthrin                  | 사과 응애, 배 점박이응애   |
| Lambda-cyhalothrin          | Chlorpyrifos                | 사과 잎말이나방 · 사과굴나방 |
| Lambda-cyhalothrin          | Tetradifon                  | 사과 응애류 · 사과굴나방   |
| Hexythiazox                 | Bifenthrin                  | 사과 응애            |
| Difenoconazole              | Fenazaquin                  | 배 점박이응애          |
| Probenazole                 | Carbofuran                  | 벼 잎도열병 · 벼멸구     |
| Imidacloprid                | Carpropamid                 | 벼 잎도열병 · 벼물바구미   |
| Carbosulfan                 | Probenazole                 | 벼 잎도열병 · 벼물바구미   |
| Carpropamid                 | Imidacloprid                | 벼 잎도열병 · 벼물바구미   |
| Carpropamid                 | Imidacloprid<br>Fludioxonil | 벼 종자소독 · 잎도열병    |
| Tribasic copper<br>-sulfate | Tebufenpyrad                | 배 점박이응애          |

(continued)

| Insecticide-A          | Pesticide-B              | 작물 및 대상해충                             |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Alanycarb              | Fenpropathrin            | 오이 목화진딧물                              |
| $\alpha$ -Cypermethrin | Flufenoxuron             | 과 파밤나방, 배추 배추좀나방, 감귤 꽃노랑총채벌레          |
| Ethofenprox            | Fenitrothion             | 사과 복숭아심식나방                            |
| Etofenprox             | Tebufenozide             | 잔디 검거세미나방                             |
| Imidacloprid           | Methiocarb               | 국화 꽃노랑총채벌레, 감귤 이세리아각지벌레,<br>오이 오이총채벌레 |
| Imidacloprid           | Mmethoxyfenozide         | 벼 벼멸구·흑명나방                            |
| Imidacloprid           | Chlorpyrifos             | 사과 사과굴나방, 감귤 조팝나무진딧물                  |
| Indoxacarb             | Etofenprox               | 사과 사과굴나방, 배추 배추좀나방                    |
| Lambda-cyhalothrin     | Triadimefon              | 배 붉은별무늬병·진딧물                          |
| Halosulfon-methyl      | Mefenacet<br>Carbosulfan | 기계이양벼(어린모) 일년생잡초·다년생잡초,<br>벼물바구미      |



나. 혼합제 개발, 사용현황(일본)조사

Table 5. Pesticide mixtures in Japan

| Pesticide-A   | 계<br>통 | Pesticide-B | 계<br>통 | Pesticide-C | 계<br>통 | 작물 및 대상해충   |
|---------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|---|
| Allethrin     | PR     | CVMP        | OP     |             |        | 국화 진딧물류, 벚나무 미국흰불나방, 장미 진딧물류  |
| Allethrin     | PR     | Machine oil | MO     |             |        | 감탕나무 뽕밀각지벌레, 동백나무 각지벌레, 벚나무 진딧물류, 사철나무 각지벌레류, 산다화 뽕밀각지벌레, 협죽도 진딧물류, 아카시아 이세리아각지벌레, 장미과 상록교목 진딧물류, |
| Allethrin     | PR     | Malathion   | OP     |             |        | 국화진딧물류, 장미 진딧물류   |
| Allethrin     | PR     | MEP         | OP     | NAC         | CB     | 국화 진딧물류, 백합 진딧물류, 벚나무 미국흰불나방, 튜울립 진딧물류, 장미 장미등에잎벌장미진딧물류   |
| Cycloprothrin | PR     | BPMC        | CB     |             |        | 벼 벼물바구미, 벼 벼잎벌레, 벼 애벌레  |
| Cycloprothrin | PR     | Diazinon    | OP     | NAC         | CB     | 벼 끝동매미충, 벼 멸구류, 벼 벼잎벌레, 벼 흑명나방  |
| Cycloprothrin | PR     | NAC         | CB     |             |        | 벼 벼물바구미, 벼 벼잎벌레,  |
| Cycloprothrin | PR     | PHC         | CB     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 멸구류, 벼 벼잎벌레  |

(continued)

| Pesticide-A | 계<br>통 | Pesticide-B   | 계통 | Pesticide-C | 계<br>통 | 작물 및 대상해충  |
|-------------|--------|---------------|----|-------------|--------|--|
| Cyhalothrin | PR     | Diflubenzuron | BU |             |        | 감노린재류, 감 블록총채벌레, 감귤 귤굴나방, 감<br>귤 블록총채벌레, 배 배선굴나방, 배 심식나방,<br>배 진딧물류, 사과 사과굴나방, 사과 진딧물류,<br>사과 심식나방류, 사과 잎말이나방류, 차 동백가<br>는나방차 블록총채벌레 |
| Diazinon    | OP     | Machine oil   | MO |             |        | 벼 응애류, 뽕나무 뽕나무꼭지벌레, 뽕나무 뽕나무에<br>바구니뽕나무 뽕애기이팔이나방, 사과 사과응애   |
| Diazinon    | OP     | Machine oil   | MO | Malathion   | OP     | 배 응애류, 사과 사과응애, 황도 사과응애  |
| Ethion      | OP     | Machine oil   | MO |             |        | 감귤 거북밀꼭지벌레, 감귤 귤진딧물, 감귤 응애류, 감<br>귤 이세리아꼭지벌레, 감귤 화살꼭지벌레, 배 응애류,<br>뽕나무꼭지벌레, 사과 응애류, 사과 진딧물류  |
| Etofenprox  | PR     | Bensultap     | NT |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 벼물바구미, 벼 벼애<br>나방, 벼 벼잎벌레, 벼 이화명충, 벼 흑명나방   |
| Etofenprox  | PR     | BPMC          | CB |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 멸구류, 벼 벼물바구미, 벼 벼잎벌<br>레  |

(continued)

| Pesticide-A | 계<br>통 | Pesticide-B             | 계<br>통 | Pesticide-C | 계<br>통 | 작물 및 대상해충   |
|-------------|--------|-------------------------|--------|-------------|--------|---|
| Etofenprox  | PR     | Cartap                  | N<br>T |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 메뚜기류, 벼<br>멸구류, 벼 벼물바구미, 벼 벼애나방, 벼 벼잎<br>벌레, 벼 이화명나방, 벼 총채벌레류, 벼 흑명<br>나방, 양배추 배추좀나방, 양배추 진딧물류 |
| Etofenprox  | PR     | Chlorpyrifos<br>-methyl | OP     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 멸구류, 벼 벼<br>잎벌레, 벼 이화명나방, 벼 흑명나방   |
| Etofenprox  | PR     | dichlorovos             | CB     |             |        | 오이 진딧물류, 포인세티아 담배가루이  |
| Etofenprox  | PR     | DEP                     | OP     |             |        | 무 배추흰나비, 배추 배추흰나비, 양배추 배추<br>흰나비  |
| Etofenprox  | PR     | Dimethyl<br>-vinphos    | OP     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 메뚜기류, 벼<br>멸구류, 벼 벼애나방, 벼 벼잎벌레, 벼 이화명<br>나방, 벼 흑명나방,   |
| Etofenprox  | PR     | MEP                     | OP     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 메뚜기류, 벼<br>멸구류, 벼 벼잎벌레, 벼이화명나방   |
| Etofenprox  | PR     | MPP                     | OP     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 메뚜기류, 벼<br>멸구류, 벼 벼잎벌레, 벼 이화명나방  |

(continued)

| Pesticide-A   | 계<br>통 | Pesticide-B     | 계<br>통 | Pesticide-C | 계<br>통 | 작물 및 대상해충   |
|---------------|--------|-----------------|--------|-------------|--------|---|
| Etofenprox    | PR     | PAP             | OP     |             |        | 감 감꼭지나방, 감 노린재류, 감 은실가루깍지벌레, 감귤 블록총채벌레, 갈귤 화살깍지벌레   |
| Etofenprox    | PR     | PHC             | CB     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 멸구류, 벼 벼잎벌레  |
| Fenpropathrin | PR     | Hexythiazox     | IT     |             |        | 감 블록총채벌레, 감 응애류, 감귤 굴응애, 감귤 블록총채벌레, 배 응애류, 배 진딧물류, 복숭아 응애류, 복숭아 진딧물류, 포도응애류, 사과 사과굴나방, 사과 사과응애, 사과 심식나방류, 포도 블록총채벌레, 사과 점박이응애, 차 간자와응애, 차 블록총채벌레, 차 오누키애매미충 |
| Etofenprox    | PR     | Pyridaphenthion | OP     |             |        | 벼 끝동매미충, 벼 노린재류, 벼 멸구류, 벼 물바구미, 벼 벼잎벌레, 벼 이화명나방, 벼 흑명나방   |
| Etofenprox    | PR     | Thiocyclam      | NT     |             |        | 벼 벼잎벌레, 벼 애벌구   |

(continued)

| Pesticide-A   | 계<br>통 | Pesticide-B | 계<br>통 | Pesticide-C | 계<br>통 | 작물 및 대상해충   |
|---------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|---|
| Etofenprox    | PR     | Thiodicarb  | CO     |             |        | 사탕무우 풍뎅이,   |
| Fenpropathrin | PR     | dichlorovos | CB     |             |        | 감귤 꿀응애, 감귤 진딧물류, 국화 응애류,<br>메론 목화진딧물, 메론 응애류, 수박 목화<br>진딧물, 수박 응애류, 장미 응애류, 카네이<br>션 응애류, 피망 진딧물류 |

PR : Pyrethroid insecticide,

OP : Organophosphorus insecticide,

CB : Carbamate insecticide

MO : Machine oil,

CO : Carbanoyloxime insecticide

NT : Nereistoxin-analogue insecticide

BU : Benzoylurea insecticide

IT : Isothiazolidinone insecticide

## 2. 무독화 효소에 대한 농약의 활성저해 실험

### 가. 대상 무독화 효소에 대한 선택적 저해제의 활성저해

각 약제의 무독화 효소 활성저해 실험에 앞서, 효소 실험법의 안전성과 저해정도의 비교기준을 마련하기 위하여 이미 알려진 무독화 효소의 선택적 저해제를 이용하여 효소활성 저해력을 측정하였다. 그 결과 모든 저해제가 각 해당 무독화 효소에 대하여 높은 저해력을 나타냈었다. 이러한 결과는 본 실험법의 안정성을 잘 나타내는 것이다.

Table 6. Inhibition of detoxifying enzyme by specific inhibitors.

| Compound                 | Specific inhibitors    | Degree of inhibition( $I_{50}^a$ , M) |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Ethacrynic acid          | Glutathione-S          | $4.01 \times 10^{-6}$                 |
| Diethyl maleate          | -transferase inhibitor | - <sup>b)</sup>                       |
| IBP                      | Amidase inhibitor      | $2.50 \times 10^{-7}$                 |
| IBP                      | Esterase inhibitor     | $6.17 \times 10^{-8}$                 |
| Triphenyl phosphate(TPP) | Carboxylesterase       | $2.57 \times 10^{-9}$                 |
| Triphenyl phosphate(TPP) | inhibitor              | $1.26 \times 10^{-6}$                 |
| IBP                      | inhibitor              | $2.45 \times 10^{-6}$                 |
| Metyrapone               | Monooxygenase          | $1.00 \times 10^{-4}$                 |
| Piperonyl Butoxide(PB)   | inhibitor              | $1.00 \times 10^{-5}$                 |

a)  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

b) - :  $>1.00 \times 10^{-3}M$

#### 나. 무독화 효소에 대한 살충제의 활성저해

현재 상품화되어 있는 77종의 살충제를 대상으로 glutathione-S-transferase, amidase, monooxygenase, esterases, carboxylesterase에 대한 활성저해력을 검정한 결과, 일부 살충제들이 저해제로 사용될 수 있는 잠재력을 지닌 것으로 확인되었다. 일반적으로 유기인계와 카바메이트계 살충제는 가수분해 효소인 amidase와 esterases, carboxylesterase에 대하여 높은 저해력을 나타내었다. GST의 활성을 잘 저해하는 것으로 나타난 살충제는 benfuracarb, furathiocarb, thiodicarb, thiocyclam, azinphos-methyl 등 이었으며, amidase의 경우 dimethylvinphos, profenofos, phosphamidon에 의해 강하게 저해되는 것으로 확인되었다. Monooxygenase는 acephate와 chlorpyrifos, profenofos에 의해, esterases와 carboxylesterase는 두 효소 모두 carbofuran, DDVP, profenofos, pirimicarb에 의해 저해되는 것이 확인되었다.

#### 다. 무독화 효소에 대한 살균제의 활성저해

총 32종의 살균제를 대상으로 5종의 무독화 효소에 대한 활성저해력을 검정하였다. 그 결과 GST는 dithianon, edifenphos, tolyfluanide에 의하여, amidase는 edifenphos에 의해 저해되는 것을 확인하였다. benomyl과 edifenphos, pyrazophos는 esterases를 잘 저해하는 것으로 나타났다.

Table 7. Inhibition of detoxifying enzymes by insecticides

| Insecticide        | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , M) |                         |                         |                         |                         |
|--------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                    | GST   | Amidase                 | Monooxygenase           | Esterase                | Carboxylesterase        |
| Acephate           | - <sup>b)</sup>   | 2.10 × 10 <sup>-5</sup> | 1.31 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       |
| Acetamidrid        | -   | 7.25 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       | -                       |
| Alpha-cypermethrin | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Amitraz            | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Azinphos-methyl    | 9.06 × 10 <sup>-4</sup>                                 | 1.42 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | 4.79 × 10 <sup>-3</sup> | 5.50 × 10 <sup>-4</sup> |
| Azocyclotin        | -   | -                       | 2.92 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | -                       |
| Benfuracarb        | 1.30 × 10 <sup>-4</sup>                                 | 4.60 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | 4.17 × 10 <sup>-6</sup> | 1.10 × 10 <sup>-4</sup> |
| Bifenthrin         | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Bromopropylate     | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Buprofezin         | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Carbaryl           | -   | 1.26 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | - <sup>b)</sup>         | -                       |
| Carbofuran         | -   | 1.48 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 7.59 × 10 <sup>-7</sup> | 7.94 × 10 <sup>-4</sup> |

<sup>a)</sup> I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - : >1.00 × 10<sup>-3</sup>M

(continued)



| Insecticide      | Degree of inhibition( $I_{50}^a$ , M) |                       |                       |                       |                       |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                  | GST                                   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterase              | Carboxylesterase      |
| Carbosulfan      | $2.00 \times 10^{-3}$                 | $2.00 \times 10^{-4}$ | -                     | $3.98 \times 10^{-6}$ | $3.80 \times 10^{-6}$ |
| Cartap           | - <sup>b)</sup>                       | $7.64 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     | -                     |
| Chinomethionate  | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Chlorfenapyr     | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Chlorfenson      | -                                     | $3.81 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     | -                     |
| Chlorfluazuron   | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Chlorpyrifos     | -                                     | $3.98 \times 10^{-5}$ | $1.26 \times 10^{-4}$ | $2.34 \times 10^{-4}$ | $6.31 \times 10^{-4}$ |
| Clortentazine    | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Cyfluthrin       | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Cypermethrin     | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| dichlorovos      | -                                     | $7.92 \times 10^{-7}$ | $8.63 \times 10^{-6}$ | $8.95 \times 10^{-8}$ | $1.53 \times 10^{-6}$ |
| Demeton-S-methyl | -                                     | $3.16 \times 10^{-6}$ | -                     | $4.27 \times 10^{-6}$ | $8.24 \times 10^{-6}$ |

<sup>a)</sup>  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - :  $>1.00 \times 10^{-3}$ M

(continued)

| Insecticide      | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , M) |                       |                       |                       |                       |
|------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                  | GST   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterase              | Carboxylesterase      |
| Deltamethrin     | - <sup>b)</sup>   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Diazinon         | -   | $2.51 \times 10^{-5}$ | $3.61 \times 10^{-4}$ | $3.91 \times 10^{-4}$ | $5.41 \times 10^{-4}$ |
| Dimethoate       | -   | $5.62 \times 10^{-4}$ | $8.01 \times 10^{-4}$ | $9.55 \times 10^{-4}$ | $7.08 \times 10^{-4}$ |
| Dimethylvinphos  | -   | $1.45 \times 10^{-6}$ | -                     | $1.26 \times 10^{-4}$ | $7.59 \times 10^{-5}$ |
| Endosulfan       | -   | $3.17 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     | -                     |
| Etofenprox       | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Ethoprophos      | -   | $2.29 \times 10^{-5}$ | $1.04 \times 10^{-4}$ | -                     | $9.42 \times 10^{-5}$ |
| Fenazaquin       | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Fenbutatin oxide | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Fenitrothion     | -   | $1.50 \times 10^{-4}$ | $1.79 \times 10^{-3}$ | $2.51 \times 10^{-4}$ | $7.41 \times 10^{-5}$ |
| Fenobucarb       | -   | $6.31 \times 10^{-6}$ | -                     | $5.65 \times 10^{-6}$ | $8.64 \times 10^{-5}$ |
| Fenothiocarb     | -   | $2.10 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     | -                     |

<sup>a)</sup> I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - :  $>1.00 \times 10^{-3}$ M

(continued)

| Insecticide   | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , M) |                       |                       |                       |                       |
|---------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|               | GST   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterase              | Carboxylesterase      |
| Fenoxycarb    | - <sup>b)</sup>   | 3.10×10 <sup>-9</sup> | -                     | -                     | -                     |
| Fenpropathrin | -   | -                     | 2.30×10 <sup>-4</sup> | -                     | -                     |
| Fenpyroximate | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Fenvalerate   | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Fipronil      | -   | 7.70×10 <sup>-4</sup> | -                     | -                     | -                     |
| Flucythrinate | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Flufenoxuron  | -   | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Flupyrzaphos  | -   | -                     | -                     | 2.82×10 <sup>-3</sup> | 9.55×10 <sup>-4</sup> |
| Fonofos       | -   | 3.98×10 <sup>-6</sup> | -                     | -                     | 7.29×10 <sup>-3</sup> |
| Furathiocarb  | 1.60×10 <sup>-4</sup>                                   | 2.82×10 <sup>-6</sup> | 9.8×10 <sup>-4</sup>  | 1.58×10 <sup>-6</sup> | 3.47×10 <sup>-4</sup> |
| Hexythiozox   | —   | —                     | —                     | —                     | —                     |
| Imidacloprid  | —   | —                     | —                     | —                     | 6.97×10 <sup>-4</sup> |

<sup>a)</sup> I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - : >1.00×10<sup>-3</sup>M

(continued)

| Insecticide        | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a</sup> , M) |                         |                         |                         |                         |
|--------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                    | GST  | Amidase                 | Monooxygenase           | Esterase                | Carboxylesterase        |
| Lambda-cyhalothrin | - <sup>b)</sup>  | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Malathion          | -  | 2.51 × 10 <sup>-5</sup> | 3.16 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | 5.37 × 10 <sup>-4</sup> |
| Mecarbam           | -  | 6.31 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 6.03 × 10 <sup>-5</sup> | 8.31 × 10 <sup>-4</sup> |
| Monocrotophos      | -  | -                       | -                       | 1.07 × 10 <sup>-5</sup> | 6.35 × 10 <sup>-5</sup> |
| Methamidophos      | -  | 5.75 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 4.68 × 10 <sup>-6</sup> | 3.55 × 10 <sup>-4</sup> |
| Methidathion       | -  | 1.27 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 5.25 × 10 <sup>-4</sup> | 3.09 × 10 <sup>-4</sup> |
| Methomyl           | -  | 1.26 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 5.89 × 10 <sup>-6</sup> | 7.76 × 10 <sup>-5</sup> |
| Metolcarb          | -  | 1.20 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 5.42 × 10 <sup>-6</sup> | 3.89 × 10 <sup>-6</sup> |
| Omethoate          | -  | 7.93 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 4.89 × 10 <sup>-4</sup> | 8.73 × 10 <sup>-4</sup> |
| Parathion          | -  | 4.79 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 5.01 × 10 <sup>-6</sup> | 5.25 × 10 <sup>-5</sup> |
| Pirimicarb         | -  | 4.51 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 2.74 × 10 <sup>-6</sup> | 9.50 × 10 <sup>-6</sup> |
| Pirimiphos-methyl  | -  | 4.00 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | 7.76 × 10 <sup>-5</sup> | 4.37 × 10 <sup>-5</sup> |

<sup>a)</sup> I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - : >1.00 × 10<sup>-3</sup>M

(continued)

| Insecticide     | Degree of inhibition( $I_{50}^a$ , M) |                       |                       |                       |                       |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                 | GST                                   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterase              | Carboxylesterase      |
| Phenthoate      | - <sup>b)</sup>                       | $1.47 \times 10^{-4}$ | -                     | $2.63 \times 10^{-4}$ | $5.50 \times 10^{-5}$ |
| Phosmet         | -                                     | $2.10 \times 10^{-5}$ | $6.31 \times 10^{-4}$ | $3.80 \times 10^{-5}$ | $8.13 \times 10^{-5}$ |
| Phosphamidon    | -                                     | $3.63 \times 10^{-6}$ | $5.41 \times 10^{-4}$ | $2.09 \times 10^{-5}$ | $3.16 \times 10^{-4}$ |
| Profenofos      | -                                     | $1.56 \times 10^{-6}$ | $1.21 \times 10^{-4}$ | $9.12 \times 10^{-7}$ | $4.57 \times 10^{-6}$ |
| Prothiofos      | -                                     | $7.21 \times 10^{-4}$ | -                     | $4.73 \times 10^{-4}$ | $7.15 \times 10^{-4}$ |
| Propargit       | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Pyridaphenthion | -                                     | $1.17 \times 10^{-3}$ | $7.94 \times 10^{-4}$ | $3.16 \times 10^{-5}$ | $5.37 \times 10^{-4}$ |
| Pyridaben       | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Silafluofen     | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Spinosad        | -                                     | $8.97 \times 10^{-5}$ | -                     | -                     | -                     |
| Tebluefenozone  | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Teflubenzuron   | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |

<sup>a)</sup>  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - :  $>1.00 \times 10^{-3}$ M

(continued)

| Insecticide | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , M) |                       |               |                       |                       |
|-------------|---|-----------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|
|             | GST   | Amidase               | Monooxygenase | Esterase              | Carboxylesterase      |
| Tetradifon  | - <sup>b)</sup>   | -                     | -             | -                     | -                     |
| Thiocyclam  | $7.40 \times 10^{-4}$                                   | -                     | -             | -                     | -                     |
| Thiodicarb  | $1.87 \times 10^{-4}$                                   | $5.02 \times 10^{-4}$ | -             | $1.35 \times 10^{-5}$ | $3.61 \times 10^{-4}$ |
| Triazophos  | -   | $3.98 \times 10^{-5}$ | -             | -                     | -                     |
| Triflumuron | -   | -                     | -             | -                     | -                     |

a) I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

b) - :  $>1.00 \times 10^{-3}M$

Table 8. Inhibition of detoxifying enzymes by fungicides

| Fungicide        | Degree of inhibition( $I_{50}^a$ , M) |                       |                       |                       |                       |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                  | GST                                   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterases             | Carboxylesterase      |
| Benomyl          | - <sup>b)</sup>                       | $4.81 \times 10^{-5}$ | -                     | $4.96 \times 10^{-5}$ | $8.54 \times 10^{-5}$ |
| Bitertanol       | -                                     | $5.73 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     | -                     |
| Carbendazim      | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Copper hydroxide | $4.95 \times 10^{-4}$                 | -                     | $3.60 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     |
| Cyproconazole    | -                                     | $6.69 \times 10^{-4}$ | $9.33 \times 10^{-4}$ | -                     | -                     |
| Cyprodinil       | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Dazomet          | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| Dithianon        | $7.55 \times 10^{-5}$                 | $4.63 \times 10^{-4}$ | -                     | $5.75 \times 10^{-4}$ | $6.39 \times 10^{-4}$ |
| Diniconazole     | -                                     | $8.20 \times 10^{-4}$ | $8.71 \times 10^{-5}$ | -                     | -                     |
| Dimethomorph     | -                                     | $4.50 \times 10^{-5}$ | -                     | -                     | -                     |
| Edifenphos       | $9.80 \times 10^{-4}$                 | $1.21 \times 10^{-6}$ | $8.51 \times 10^{-4}$ | $3.31 \times 10^{-4}$ | $6.80 \times 10^{-8}$ |
| Etridiazole      | -                                     | -                     | -                     | -                     | -                     |

<sup>a)</sup>  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - :  $>1.00 \times 10^{-3}M$

(continued)

| Fungicide      | Degree of inhibition(I <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , M) |                         |                         |                         |                         |
|----------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                | GST   | Amidase                 | Monooxygenase           | Esterases               | Carboxylesterase        |
| Fenbuconazole  | - <sup>b)</sup>   | 7.32 × 10 <sup>-5</sup> | -                       | -                       | -                       |
| Fenarimole     | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Fluazinam      | 1.45 × 10 <sup>-4</sup>                                 | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Fludioxonil    | -   | 6.65 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       | -                       |
| Fosetyl-Al     | -   | 3.25 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       | -                       |
| Hexaconazole   | - <sup>b)</sup>   | 3.25 × 10 <sup>-4</sup> | 2.95 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       |
| Hymexazole     | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Imibenconazole | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Probenazole    | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Procymidone    | -   | -                       | -                       | -                       | -                       |
| Pyrazophos     | -   | 1.96 × 10 <sup>-3</sup> | -                       | 3.31 × 10 <sup>-3</sup> | 5.83 × 10 <sup>-3</sup> |
| Tebuconazole   | -   | -                       | 6.01 × 10 <sup>-4</sup> | -                       | -                       |

<sup>a)</sup> I<sub>50</sub> : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

<sup>b)</sup> - : >1.00 × 10<sup>-3</sup>M

(continued)



| Fungicide        | Degree of inhibition( $I_{50}^a$ , M) |                       |                       |                 |                  |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|------------------|
|                  | GST                                   | Amidase               | Monooxygenase         | Esterases       | Carboxylesterase |
| Thiram           | $4.07 \times 10^{-4}$                 | $3.27 \times 10^{-4}$ | $7.51 \times 10^{-4}$ | - <sup>b)</sup> | -                |
| Tolclofos-methyl | -                                     | $3.49 \times 10^{-4}$ | -                     | -               | -                |
| Tolyfluanide     | $8.66 \times 10^{-3}$                 | -                     | $3.74 \times 10^{-3}$ | -               | -                |
| Tricyclazole     | -                                     | -                     | $6.76 \times 10^{-4}$ | -               | -                |
| Triflumizole     | -                                     | $8.78 \times 10^{-4}$ | $5.60 \times 10^{-4}$ | -               | -                |
| Trifluazamide    | -                                     | -                     | -                     | -               | -                |
| Triforine        | -                                     | $7.72 \times 10^{-4}$ | $2.26 \times 10^{-4}$ | -               | -                |
| Vinclozolin      | $4.34 \times 10^{-4}$                 | -                     | -                     | -               | -                |

a)  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

b) - :  $>1.00 \times 10^{-3}M$

라. 쥐와 곤충으로부터 추출된 무독화 효소의 활성 저해 비교

살충제의 실질적인 적용대상은 곤충이므로 곤충으로부터 대사효소를 얻어 실험을 수행해야 하나 공시약제 수에 비하여 얻을 수 있는 대사효소의 양은 제한적이므로 대사효소의 양이 풍부한 쥐를 이용하여 실험을 수행하였다. 따라서 쥐로부터 얻은 효소를 이용한 실험 결과를 곤충에도 적용시킬 수 있는지를 알기 위해, 4종의 곤충(멸강나방 : *Pseudaletia separata* W., 이질바퀴 : *Periplaneta americana* L., 집파리 : *Musca domestica* L., 파밤나방 : *Spodoptera exigua* H.)으로부터 esterase와 carboxylesterase를 얻어 일부 약제에 대한 활성 저해 정도를 측정 후, 곤충과 쥐 실험 결과간 상관관계를 검정하여 저해 경향의 유의성을 확인하였다.

1) 쥐와 곤충으로부터 추출된 esterase의 활성 저해 관계

총 3의 곤충 (*Pseudaletia separata* W., *Spodoptera exigua* H., *Periplaneta americana* L.)으로 추출된 esterases를 rat으로부터 추출한 esterases와 활성 저해 경향을 비교한 결과 모든 경우에서 1% 이내의 유의차를 나타내었다.

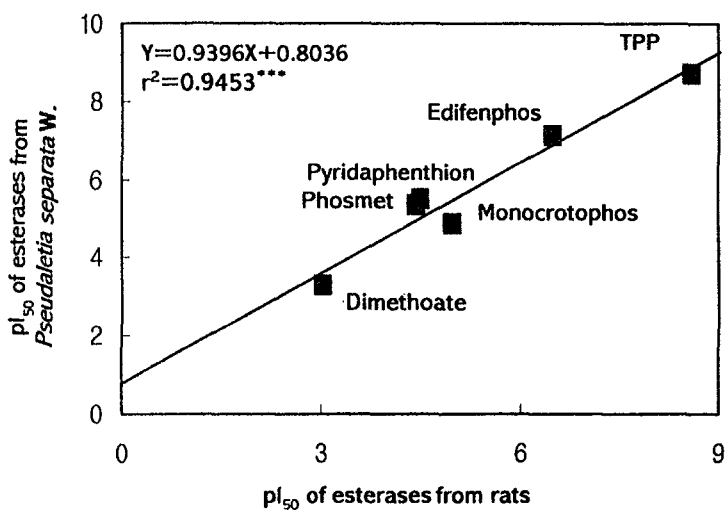


Figure 5. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against cytosolic esterases from rats and *Pseudaletia separata* W

\*\*\* : p<0.01

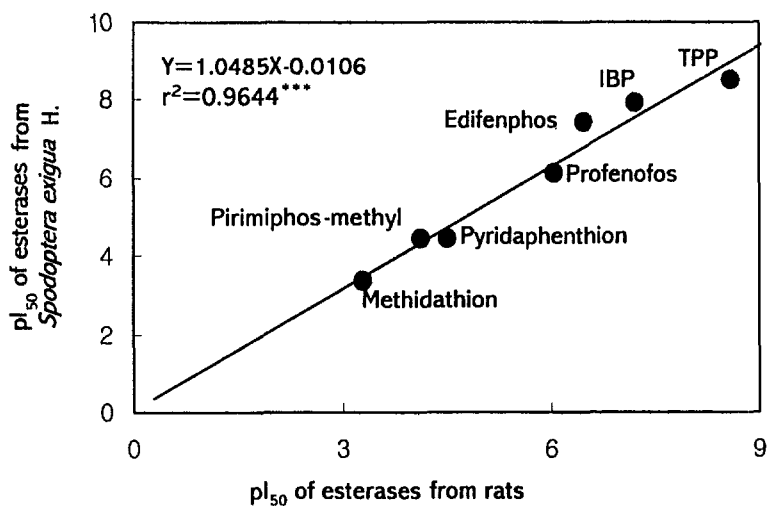


Figure 6. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against cytosolic esterases from rat and *Spodoptera exigua* H

\*\*\*: p<0.01

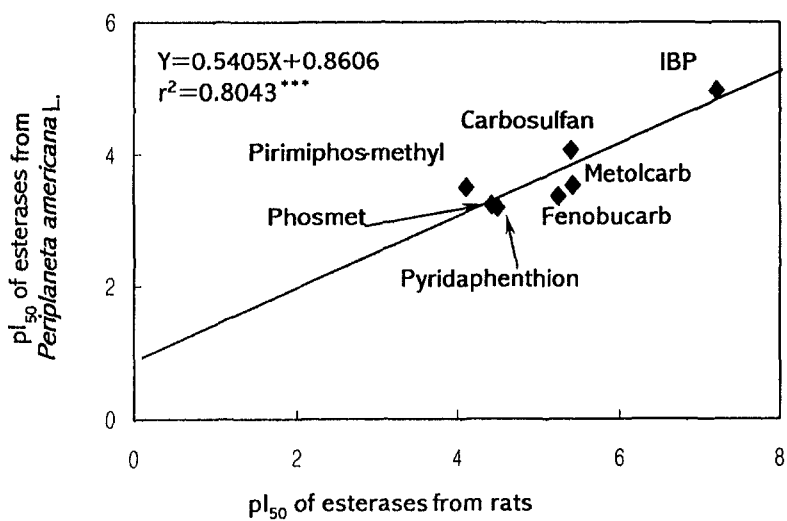


Figure 7. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against cytosolic esterases from rats and *Periplaneta americana* L

\*\*\* : p<0.01

2) 쥐와 곤충으로부터 추출된 carboxylesterase의 활성 저해 관계

쥐로부터 추출된 carboxylesterase는 멸강나방(*Pseudaletia separata* W.)으로부터 추출된 것과 1%, 파밤나방(*Spodoptera exigua* H.)과 이질바퀴(*Periplaneta americana* L)와는 5%이내의 유의성차를 나타내었다.

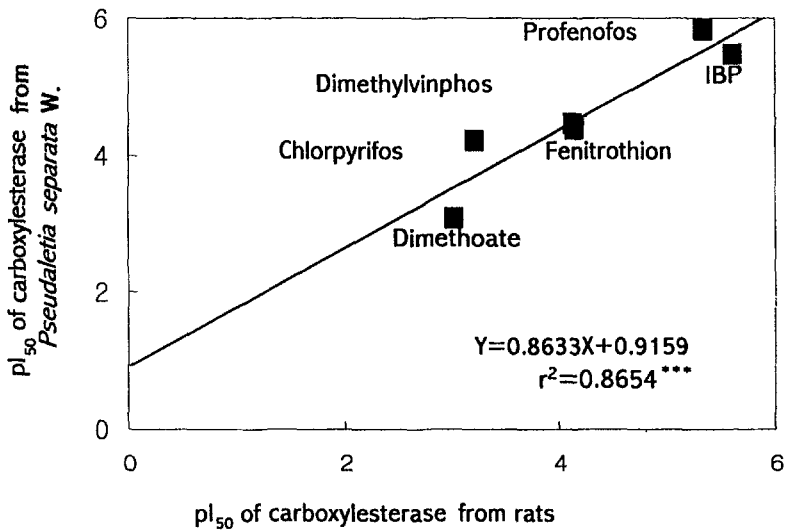


Figure 8. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against carboxylesterase from rats and *Pseudaletia separata* W.

\*\*\*:p<0.01

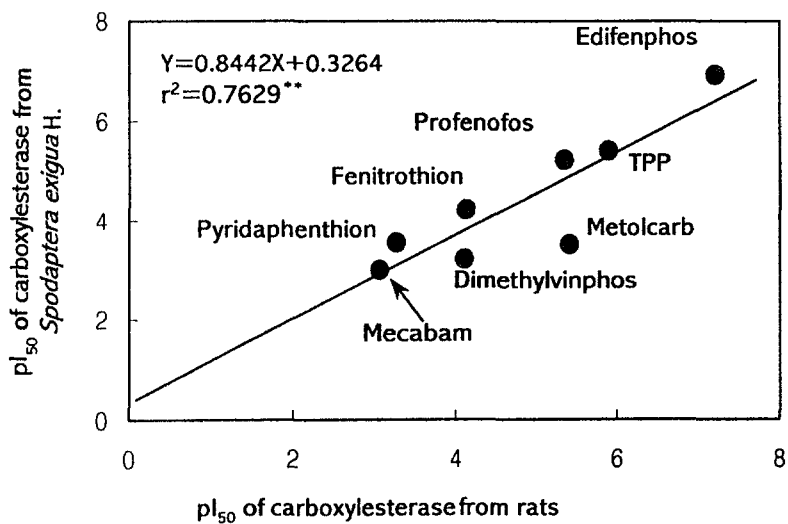


Figure 9. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against carboxylesterase from rats and *Spodoptera exigua* H.

\*\*: $p < 0.05$

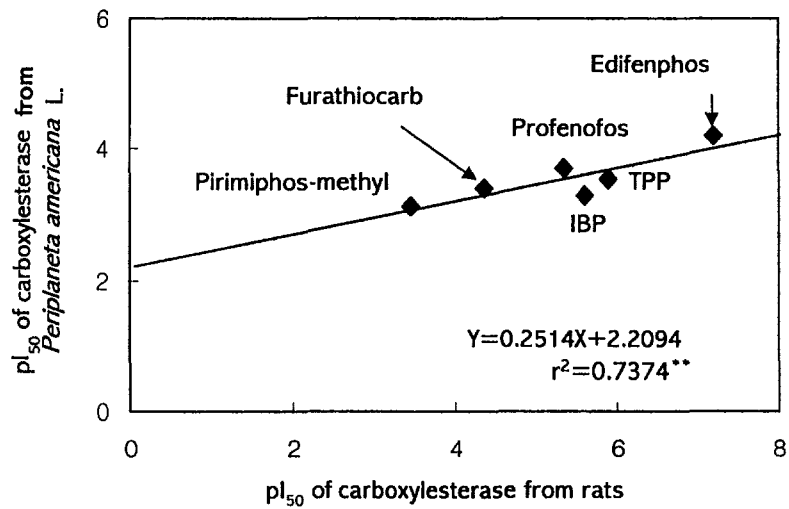


Figure 10. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against carboxylesterase from rats and *Periplaneta americana* L

\*\* : p < 0.05



3) 쥐와 곤충으로부터 추출된 monooxygenase의 활성 저해 관계

쥐로부터 추출된 monooxygenase는 멸강나방(*Pseudaletia separata* W.), 집파리(*Musca domestica* L.), 이질바퀴(*Periplaneta americana* L)로부터 추출된 것과 1%이내의 유의성차를 나타내었다.

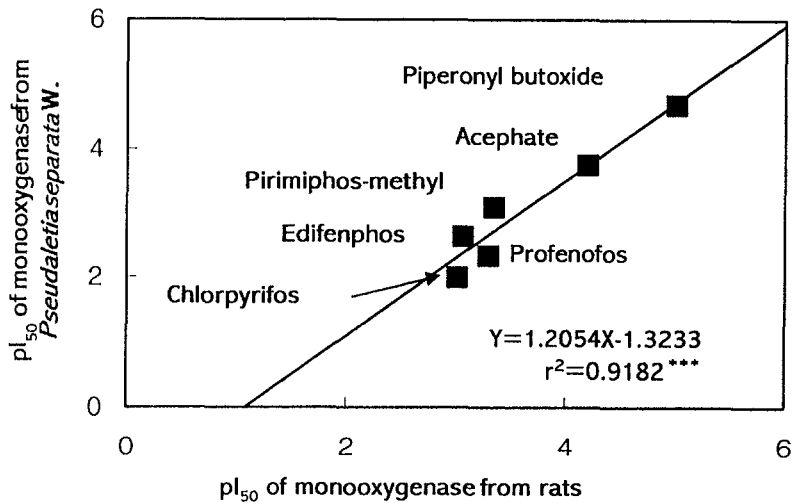


Figure 11. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against monooxygenase from rats and *Pseudaletia separata* W.

\*\*\*: p<0.01

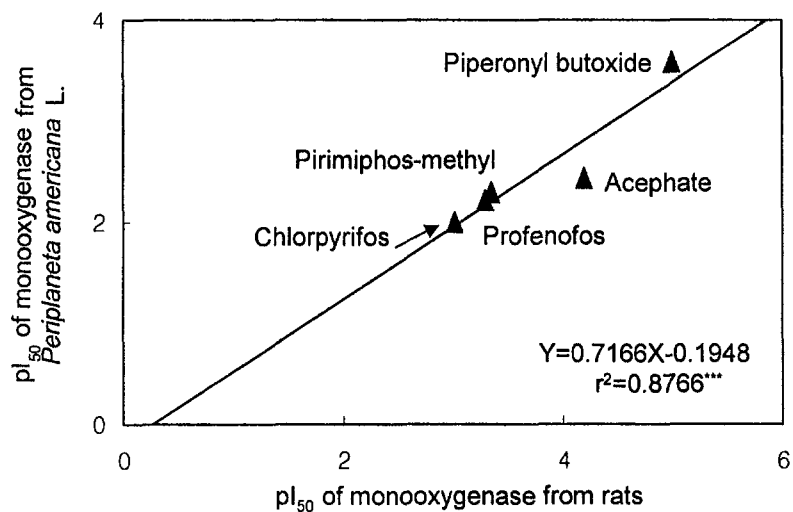


Figure 12. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against monoxygenase from rats and *Periplaneta americana* L.

\*\*\* : p<0.01

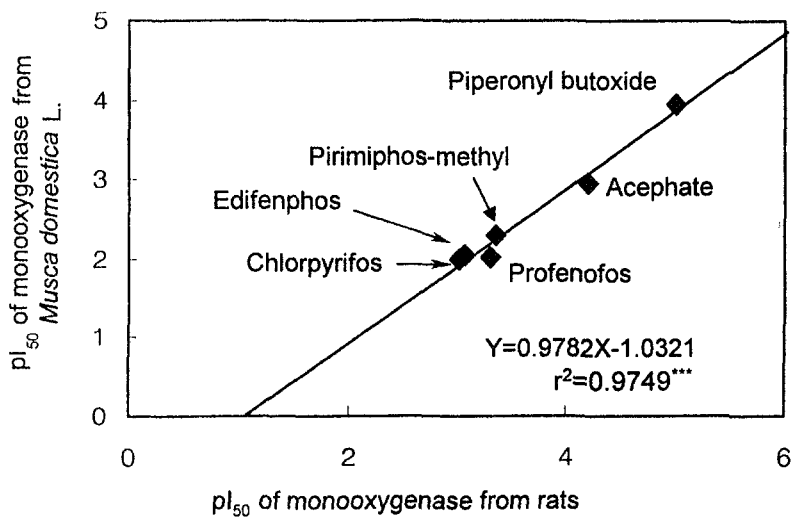


Figure 13. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against monoxygenase from rats and *Musca domestica* L.

\*\*\* : p<0.01

4) 쥐와 곤충으로부터 추출된 glutathione-S-transferase(GST)의 활성  
저해 관계

쥐로부터 추출된 GST는 멸강나방(*Pseudaletia separata* W.)과 이질바퀴(*Periplaneta americana* L.)로부터 추출된 것과는 5%, 집파리(*Musca domestica* L.)와는 1%이내의 유의성차를 나타내었다.

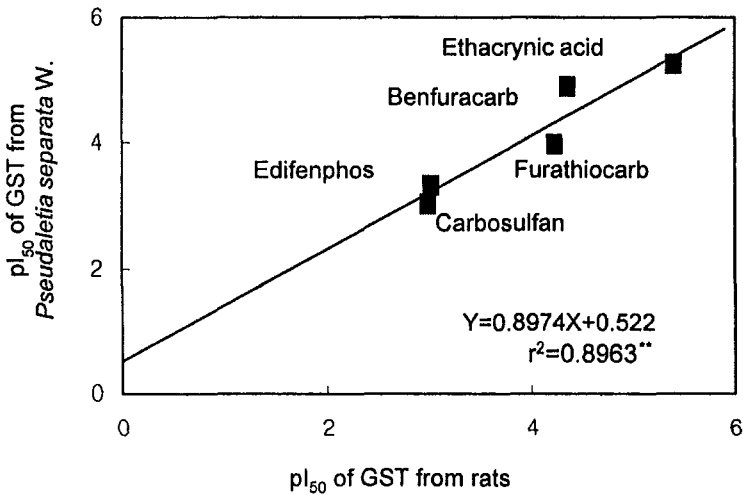


Figure 14. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against glutathione-S-transferase (GST) from rats and *Pseudaletia separata* W. \*\* : p<0.05

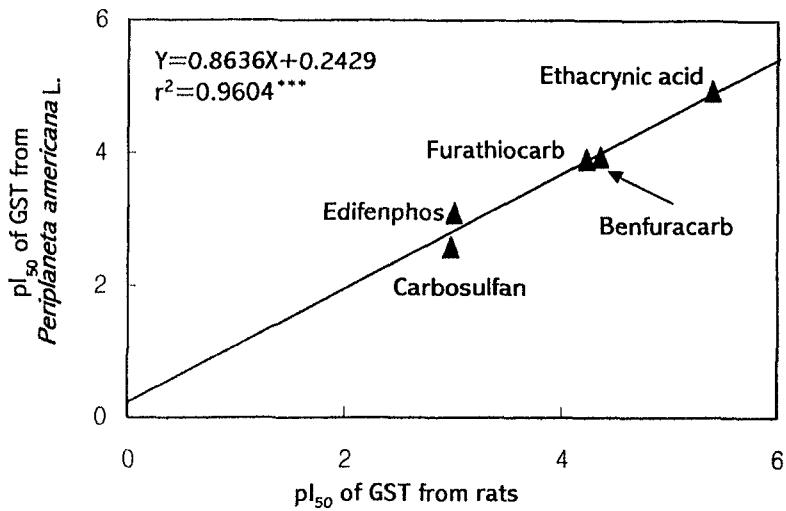


Figure 15. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against glutathione-S-transferase(GST) from rats and *Periplaneta americana* L. \*\*\* : p<0.01

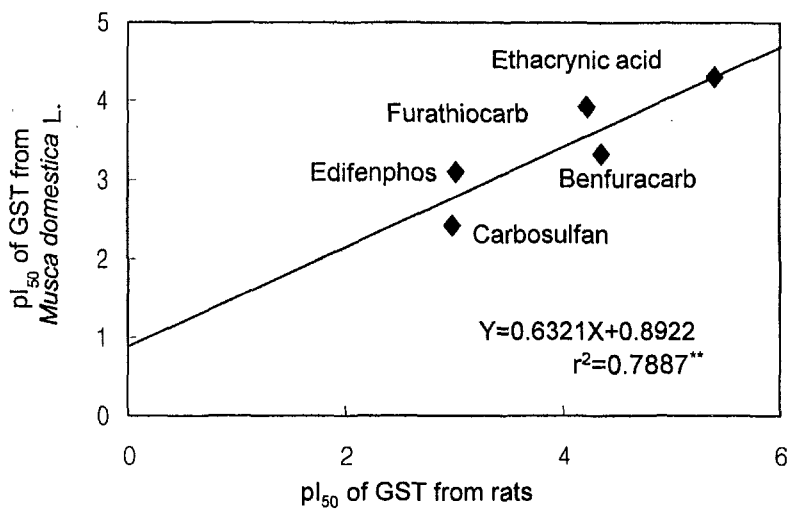


Figure 16. Correlation between pI<sub>50</sub> values of several pesticides against glutathione-S-transferase(GST) from rats and *Musca domestica* L. \*\*: p<0.05

### 3. 혼합 기준약제의 선정

무독화 효소 저해실험을 통하여 무독화 효소에 대한 저해력이 인정된 약제와 혼합처리되었을 때 나타나는 약효의 상승효과를 관찰하기 위해 혼합할 기준약제를 선정하였다. 사용된 기준약제는 문헌을 통하여 이미 무독화 효소에 의한 분해, 대사 기작이 잘 알려져 있거나, 이로 인한 저항성 해충의 보고가 있는 약제, 또는 효력 상승제에 의해 약효의 상승이 알려진 약제를 중심으로 선정한 결과, chlorpyrifos, phenthoate, malathion, diazinon, acephate, carbaryl이 결정되었다.

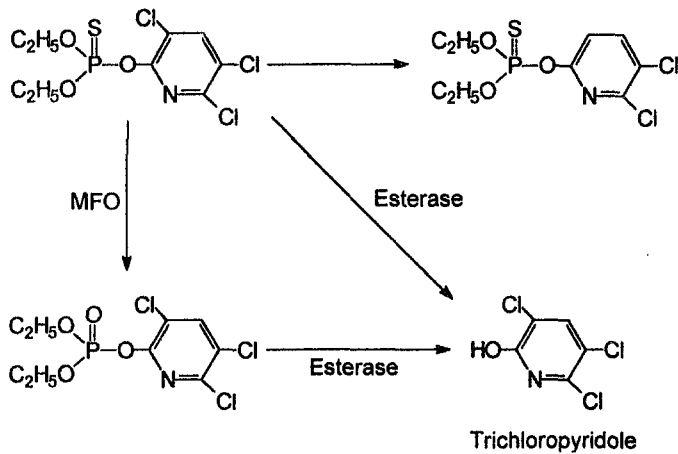


Figure 17. Metabolic pathway for chlorpyrifos.

Chlorpyrifos는 모화합물이나 MFO에 의해 활성화된 oxon형태의 화합물 모두 esterase에 의해 쉽게 수용성 물질인 알코올로 전환된 후 배설된다.

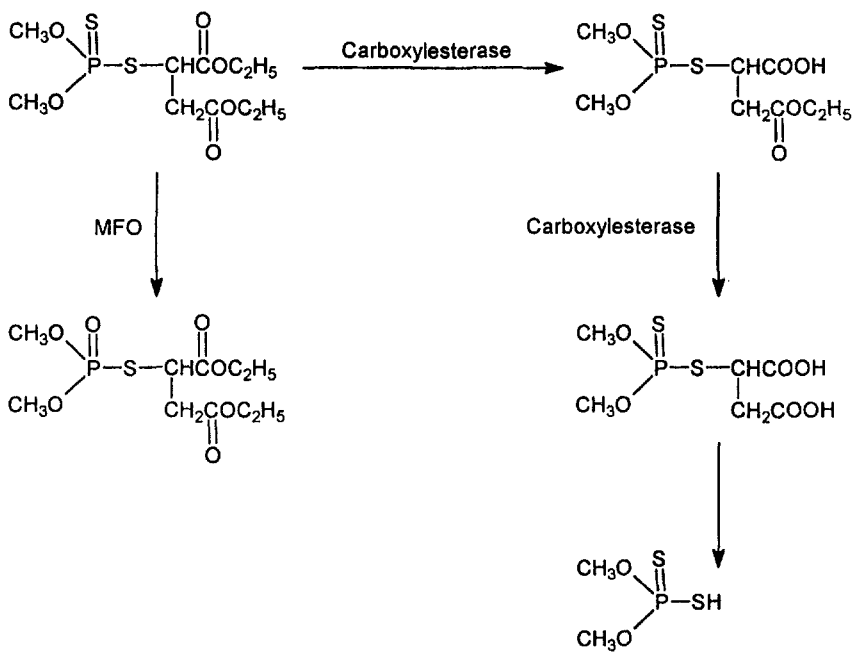


Figure 18. Metabolic pathway for malathion.

Malathion은 MFO에 의하여 malaoxon으로 활성화된 후 독성을 일으키기도 하지만, esterase 중 carboxylesterase에 의해 독성이 없는 acid 형태로 전환되는데, 포유동물에게 있어 malathion이 선택적으로 독성이 낮은 것도 체내에 carboxylesterase의 작용이 강하기 때문이다.



Phenthoate는 구조와 작용기작에 있어서 malathion과 매우 유사하며, 효소에 의해 무독화되는 대사부위 역시 malathion과 흡사하다고 알려져 있다. 즉, 산화 효소계에 의해 thion의 유황원자가 산소원자와 치환되어 독성이 더 증가하기도 하지만, esterase의 영향으로 succinic ester 부위의 ethyl기가 제거됨으로써 무독화 된다고 알려져 있는 약제이다.

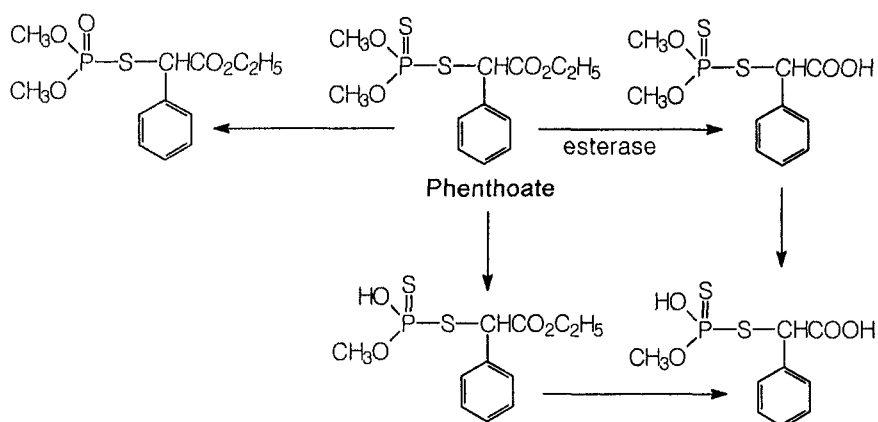


Figure 19. Metabolic pathway of phenthoate.

Monooxygenase에 의해 무독화되는 대표적인 약제는 카바메이트계 약제인 carbaryl이며, 산화반응에 거쳐 Figure에서 보여주는 바와 같이 다양한 형태의 무독화 물질로 전환된다고 알려져 있다.

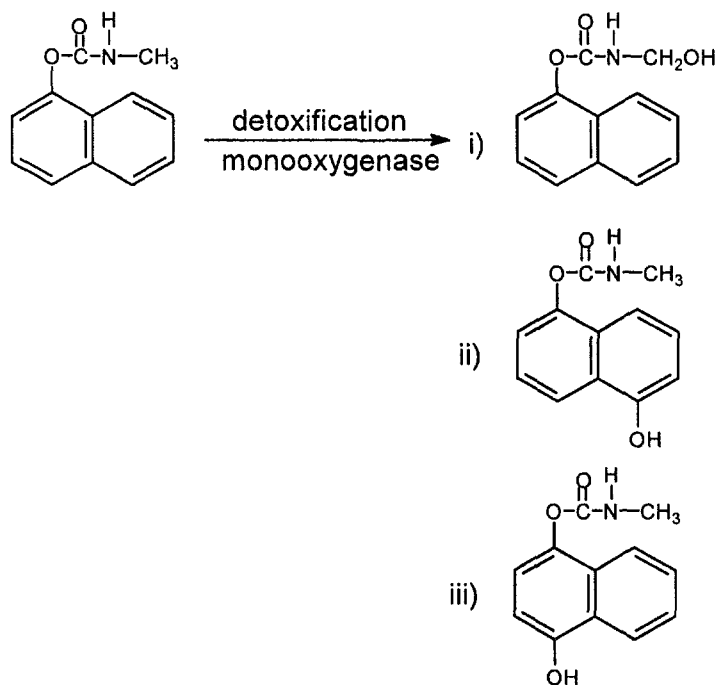


Figure 20. Oxidative metabolites of carbaryl.

- i) *N*-hydroxymethylcarbaryl
- ii) 5-hydroxycarbaryl,
- iii) 4-hydroxycarbaryl

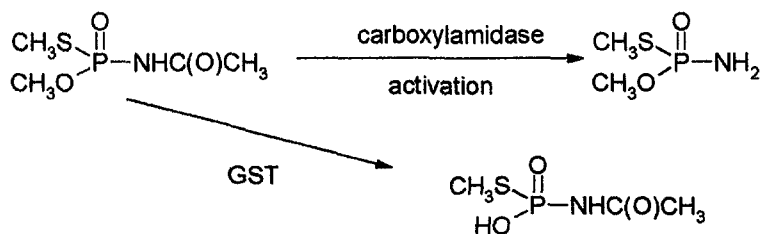


Figure 21. Hypothesis for the metabolic activation and detoxication of acephate.

Acephate의 독성기작에 관한 연구에서 acephate가 esterase에 의해 methamidophos로 전환된 후 acetylcholinesterase(AChE)를 저해하여 독작용을 나타내기도 하지만, esterase도 동시에 저해하여 methamidophos로 전환되는 acephate의 양을 감소하게 함을 보고한 바 있다. 또한 methamidophos를 전처리하여 acephate의 activation 과정을 저해한 후 acephate의 대사산물을 조사한 결과, *O*-demethyl acephate ( $\text{HO}(\text{CH}_3\text{S})\text{P}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ), demethylthio acephate ( $\text{CH}_3\text{O}(\text{HO})\text{P}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$ ), deacetylamino acephate ( $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{S})\text{P}(\text{O})\text{OH}$ )등의 대사산물이 검출되었으며, 이들 중 *O*-demethyl acephate의 양에 acephate 단독 처리시 보다 현저하게 증가하였다고 보고하였다. 이는 acephate의 대사과정에 glutathione-*S*-transferase가 관여함을 시사하는 것이다.

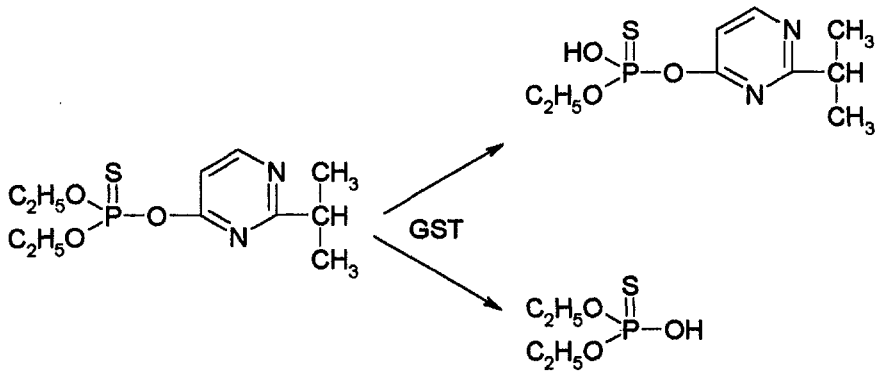


Figure 22. Metabolic pathway of diazinon

유기인계 살충제인 diazinon은 GST에 의하여 de-ethyl diazinon과 diethyl phosphorothioic acid로 무독화된다.

#### 4. 생물활성검정

약제의 혼합처리시 곤충과 균에 대한 약효 변화를 관찰하기 위하여 생물활성 시험을 수행하였다. 무독화 효소 저해 실험을 통하여 선발된 약제와 무독화 효소에 의하여 대사되는 약제를 혼합 한 후 약효의 상승효과를 관찰하였다. 살충제와 살균제를 혼합하였을 때에는 혼합제가 살균활성에 미치는 영향도 확인하였다. 효소무독화효소의 저해제로 사용한 농약을 요약한 결과 다음과 같다.

Table 9. Pesticides as potential inhibitor to detoxifying enzyme

| Detoxifying enzyme        | Compound        | Sort        | Degree of inhibition ( $I_{50}^a$ , M) |
|---------------------------|-----------------|-------------|--|
| Monoxygenase              | Acephate        | Insecticide | $3.10 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Chloropyrifos   |             | $1.26 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Profenofos      |             | $1.21 \times 10^{-4}$                  |
| Esterases                 | Carbofuran      | Insecticide | $7.59 \times 10^{-7}$                  |
|                           | Dichlorovos     |             | $8.95 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Profenofos      |             | $9.12 \times 10^{-7}$                  |
|                           | Pirimicarb      |             | $2.74 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Benomyl         | Fungicide   | $4.96 \times 10^{-5}$                  |
|                           | Edifenphos      |             | $3.31 \times 10^{-7}$                  |
|                           | Pyrazophos      |             | $3.31 \times 10^{-5}$                  |
| Carboxylesterase          | Dichlorovos     | Insecticide | $1.53 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Carbofuran      |             | $3.80 \times 10^{-6}$                  |
|                           | Profenofos      |             | $8.95 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Pirimicarb      |             | $7.15 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Edifenphos      | Fungicide   | $6.80 \times 10^{-8}$                  |
| Amidase                   | Dimethylvinphos | Insecticide | $1.45 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Phosphamidon    |             | $3.63 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Profenofos      |             | $1.56 \times 10^{-8}$                  |
|                           | Edifenphos      | Fungicide   | $1.21 \times 10^{-8}$                  |
| Glutathione-S-transferase | Benfuracarb     | Insecticide | $1.30 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Furathiocarb    |             | $6.00 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Thiodicarb      |             | $1.87 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Thiocyclam      |             | $7.40 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Dithianon       | Fungicide   | $7.55 \times 10^{-5}$                  |
|                           | Edifenphos      |             | $9.80 \times 10^{-4}$                  |
|                           | Tolyfluanide    |             | $8.66 \times 10^{-5}$                  |

<sup>a)</sup>  $I_{50}$  : Enzyme activity 50%를 저해할 수 있는 약제의 농도

가. 살충활성 검정

생물활성실험은 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)을 공시충으로 하여 모든 약제에 대한 단제처리시 독성을 측정한 후, 약제의 혼합 처리시 효과를 관찰하였다. 약제의 독성은 반수치사량인  $LC_{50}$ 으로 나타내었으며, 약제에 대한 상승효과는 co-toxicity coefficient로 비교하였다.

1) 실험 I

가) 단제 처리 효과

배추좀나방에 대해 diazinon과 carbaryl에 약제를 혼합하였을 경우 약효상승의 여부를 확인하기 위해서 먼저 각 단제별  $LC_{50}$ (ppm)값을 산출하였다.

Table 10. Toxicity of pesticides to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | Insect           | $LC_{50}$ (ppm) |        |
|--------------|------------------|-----------------|--------|
|              |                  | 24hrs           | 48hrs  |
| Diazinon     |                  | 228.10          | 108.10 |
| Benfuracarb  |                  | 33.10           | 18.01  |
| Furathiocarb |                  | 39.02           | 17.63  |
| Acephate     | Diamondback moth | 44.90           | 27.82  |
| Chlorpyrifos |                  | 221.20          | 130.30 |
| Carbaryl     |                  | 380.36          | 250.46 |
| Edifenphos   |                  | >1000           | >1000  |
| Profenofos   |                  | 28.01           | 10.90  |

각 약제에 대한 LC<sub>50</sub>값을 산출한 결과 배추좀나방에 대해서 24시간 및 48시간후의 LC<sub>50</sub>값은 diazinon, chlorpyrifos, carbaryl이 다른 약제에 비하여 높은 값이 측정되었고, benfuracarb, profenofos이 낮은 LC<sub>50</sub>값을 나타냈다. Edifenphos의 경우 살균제로 쓰이고 있는 약제로 배추좀나방에 대한 LC<sub>50</sub>값은 산출할 수 없었다.

나) Diazinon과 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Diazinon의 경우 edifenphos와 혼합 처리하였을 경우 약효상승효과를 관찰할 수 없었으나, diazinon과 benfuracarb을 1:1로 혼합처리한 경우 24시간 및 48시간후의 co-toxicity coefficient가 982.3과 777.7로, diazinon과 furathiocarb을 혼합처리시는 509.5와 523.4로 약효상승효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 11. Toxicity of diazinon mixture against a susceptible strain of diamondback moth(*Plutella xylostella*)

| Pesticides     | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |        |
|----------------|------------------------|--------|---------------------------------------|--------|
|                | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs  |
| Diazinon       | 228.10                 | 108.10 | -                                     | -      |
| + Benfuracarb  | 5.87                   | 3.97   | 982.30                                | 777.73 |
| + Furathiocarb | 13.08                  | 5.76   | 509.47                                | 523.38 |
| + Edifenfos    | 208.66                 | 138.64 | 178.02                                | 140.71 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

다) Carbaryl과 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Monooxygenase를 강하게 저해하는 약제인 acephate, profenofos, chlorpyrifos와 PBO(monooxygenase inhibitor)를 carbaryl과 1:1로 혼합하여 약효상승효과를 검정한 결과, acephate와 PBO를 혼합 처리하였을 경우에는 약효상승효과를 관찰할 수 없었으나, carbaryl과 profenofos를 1:1로 혼합처리한 경우 24시간 및 48시간후의 co-toxicity coefficient가 484.7과 319.9로, carbaryl과 chlorpyrifos를 혼합하였을 경우 345.9와 637.4로 약효상승효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 12. Toxicity of carbaryl mixture against susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella*).

| Pesticides     | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |        |
|----------------|------------------------|--------|---------------------------------------|--------|
|                | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs  |
| Carbaryl       | 380.36                 | 250.46 | -                                     | -      |
| + Acephate     | 68.92                  | 37.65  | 116.56                                | 133.11 |
| + Profenofos   | 10.77                  | 6.53   | 484.47                                | 319.92 |
| + Chlorpyrifos | 80.85                  | 26.89  | 345.97                                | 637.48 |
| + PBO          | 326.99                 | 224.26 | 168.53                                | 178.62 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action



2) 실험 II

가) 단제 처리 효과

살균제인 IBP와 edifenphos에 대한 LC<sub>50</sub>은 1000ppm이상이었으며 malathion을 제외한 모든 약제들의 LC<sub>50</sub>은 2ppm~14ppm이었다.

Table 12. Toxicity of pesticides to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | Insect           | LC <sub>50</sub> (ppm) |        |
|--------------|------------------|------------------------|--------|
|              |                  | 24hrs                  | 48hrs  |
| Diazinon     | Diamondback moth | 228.10                 | 108.10 |
| Benfuracarb  |                  | 33.10                  | 18.01  |
| Furathiocarb |                  | 39.02                  | 17.63  |
| Acephate     |                  | 44.90                  | 27.82  |
| Chlorpyrifos |                  | 221.20                 | 130.30 |
| Carbaryl     |                  | 380.36                 | 250.46 |

나) Chlorpyrifos와 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Esterase에 의해 쉽게 대사되는 chlorpyrifos와 esterase를 잘 저해하는 edifenphos, profenofos, carbofuran, IBP를 혼합처리한 결과 모두 상승효과를 나타내었다.

Table 13. Toxicity of chlorpyrifos mixtures to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |       |
|--------------|------------------------|--------|---------------------------------------|-------|
|              | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs |
| Chlorpyrifos | 7.42                   | 6.08   | -                                     | -     |
| + Profenofos | 1.48                   | 1.09   | 319.5                                 | 302.3 |
| + Carbofuran | 1.98                   | 1.41   | 492.0                                 | 580.8 |
| + Edifenfos  | 4.50                   | 4.46   | 327.3                                 | 271.0 |
| + IBP        | 4.49                   | 3.97   | 328.1                                 | 304.4 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

가장 높은 약효의 상승은 chlorpyrifos와 carbofuran을 혼합하였을 때 나타났는데, 24시간과 48시간 경과 후 각각 5배와 6배의 약효상승이 관찰되었다. 이외에도 chlorpyrifos를 edifenphos, profenofos, IBP와 각각 혼합처리시 약효가 약 3배 증가됨을 확인하였다.

다) Malathion과 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Carboxylesterase에 의해 쉽게 대사되는 malathion과 carboxylesterase를 잘 저해하는 edifenphos, profenofos, carbofuran, IBP를 각각 혼합처리한 결과 약 2~3배의 약효 상승을 확인하였다

Table 14. Toxicity of malathion mixtures to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |       |
|--------------|------------------------|--------|---------------------------------------|-------|
|              | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs |
| Malathion    | 570.87                 | 570.31 | -                                     | -     |
| + Profenofos | 2.86                   | 2.16   | 241.2                                 | 208.4 |
| + Carbofuran | 12.26                  | 10.08  | 225.7                                 | 243.6 |
| + Edifenfos  | 319.53                 | 231.13 | 227.5                                 | 314.3 |
| + IBP        | 357.67                 | 249.19 | 203.2                                 | 291.5 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

### 3) 실험 III

#### 가) 단제 처리 효과

기준약제인 acephate는 188ppm(24hrs), 120ppm(48hrs)이었다. 혼합대상 약제 중 살충제인 thiocyclam은 비교적 높은 독성을 나타내고 있었으나 살충제 중 thiodicarb, 살균제의 대부분은 1,000ppm에서 LC<sub>50</sub>값을 측정할 수 없었다.

Table 15. Toxicity of pesticides to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | Insect           | LC <sub>50</sub> (ppm) |         |
|--------------|------------------|------------------------|---------|
|              |                  | 24hrs                  | 48hrs   |
| Acephate     |                  | 188.87                 | 120.83  |
| Thiodicarb   |                  | >1000                  | 772.590 |
| Thiocyclam   | Diamondback moth | 193.14                 | 133.14  |
| Dithianon    |                  | >1000                  | >1000   |
| Tolyfluanide |                  | >1000                  | >1000   |

나) Acephate와 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Glutathion-S-transferase(GST)에 의해 쉽게 대사되는 acephate와 GST활성 저해실험을 통하여 선정된 약제들을 혼합처리한 결과, 모든 조합에서 약효의 상승효과를 확인할 수 있었다. 특히 살균제인 dithianon과 혼합처리시 co-toxicity coefficient가 492(24hrs), 738(48hrs)로 가장 높은 상승효과가 나타났으며, thiocyclam, tolyfluanide의 혼합시 251~445이었으며, thiodicarb은 180(24hrs), 204(48hrs)로 나타났다.

Table 16. Toxicity of acephate mixtures to a susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Compound       | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |       |
|----------------|------------------------|--------|---------------------------------------|-------|
|                | 24hrs                  | 48hrs  | 24hrs                                 | 48hrs |
| Acephate       | 188.87                 | 120.83 |                                       |       |
| + Thiodicarb   | 175.818                | 102.39 | 180.7                                 | 204.1 |
| + Thiocyclam   | 47.87                  | 28.53  | 398.9                                 | 445.3 |
| + Dithianon    | 55.66                  | 29.02  | 492.5                                 | 738.4 |
| + Tolyfluanide | 75.99                  | 52.69  | 251.3                                 | 409.5 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

#### 4) 실험 IV

##### 가) 단제 처리 효과

유기인계인 Pheathoate는 6.3ppm, 5.2ppm의 LC<sub>50</sub> 값을 나타내었으며 carbamate계 살충제인 pirimicarb은 살충활성을 나타내지 않은 반면 살균제인 ptrazofos는 약간의 살충활성을 나타내었다.

Table 17. Toxicity of pesticides to a susceptible population of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides | Insect           | LC <sub>50</sub> (ppm) |       |
|------------|------------------|------------------------|-------|
|            |                  | 24hrs                  | 48hrs |
| Phenthoate |                  | 6.27                   | 5.16  |
| Dchlorovos |                  | 74.08                  | 59.18 |
| Pirimicarb | Diamondback moth | >1000                  | >1000 |
| Pyrazophos |                  | 89.60                  | 67.94 |
| Benomyl    |                  | >1000                  | >1000 |

나) phenthoate와 혼합처리시 약효 상승효과 검정

Esterase에 의해 쉽게 대사되는 phenthoate와 esterase를 잘 저해하는 약제들과 혼합처리시 약효상승효과를 관찰하였다.

Table 18. Toxicity of phenthoate mixtures to a susceptible population of diamond back moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticide     | LC <sub>50</sub> (ppm) |       | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |        |
|---------------|------------------------|-------|---------------------------------------|--------|
|               | 24hrs                  | 48hrs | 24hrs                                 | 48hrs  |
| Phenthoate    | 6.28                   | 5.16  |                                       |        |
| + Pirimicarb  | 1.88                   | 1.57  | 663.6                                 | 653.9  |
| + Dichlorovos | 0.77                   | 0.52  | 1512.9                                | 1877.4 |
| + Pyrazophos  | 1.63                   | 1.10  | 721.5                                 | 872.7  |
| + Benomyl     | 1.19                   | 0.83  | 1047.2                                | 1243.0 |

<sup>a)</sup> Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action

Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

가장 높은 약효의 상승은 dichlorovos와 혼합하였을 때 나타났으며, co-toxicity coefficient는 24시간과 48시간 경과 후 각각 1512와 1877이었다. 이외에도 phenthoate를 pirimicarb, pyrazophos, benomyl과 각각 혼합처리시 co-toxicity coefficient는 663~1243임을 확인하였다

#### 나. 살균활성 검정

살충활성 검정 실험에서 살충효과를 상승시킨 살충·살균제 조합 (acephate+dithianon, phenthoate+benomyl)의 균에 대한 영향을 알아보기 위하여 살균활성을 측정하여 비교하였다;

1) Dithianon과 acephate의 살균활성

Dithianon 단제와 혼합액(acephate+dithianon)은 사과 점무늬낙엽병 (*Alternaria mali*, Am)의 성장을 효과적으로 저지하였으며 농도에 따라 저지효과도 증가하는 것으로 나타났다. 균사생장 저지율은 50ppm에서 dithianon 단제의 경우 52.1%, 혼합액은 62.9%로 나타났다.

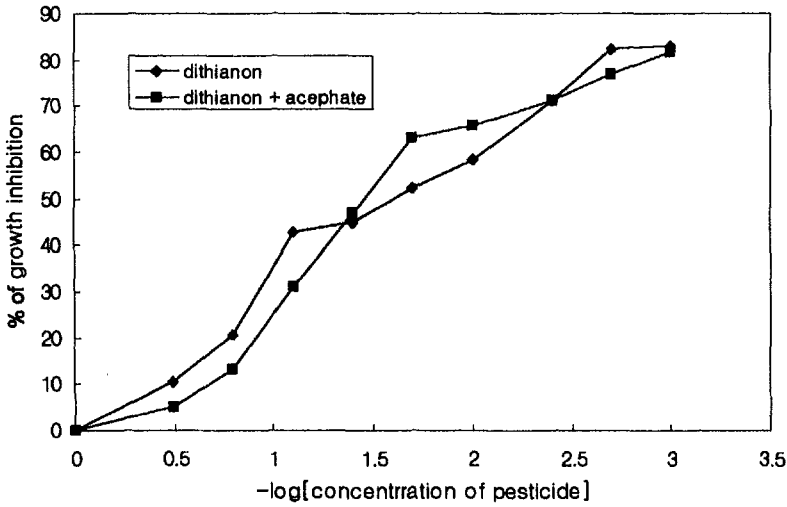


Figure 23. Growth inhibition of *Alternaria mali* by dithianon and pesticide mixture(dithianon+acephate).

2) Benomyl과 phenthoate의 살균활성

Benomyl과 혼합액(benomyl+phenthoate)이 효과적으로 성장을 저해한 병원균은 사과썩음병(*Botyosphaeria dothidea*, Bd)과 사과 탄저병(*Glomerella cingulata*, Gc)이었다. benomyl은 0.125ppm에서 두 병원균에 대하여 각각



52.5%, 48.4%, 0.5ppm에서 85.5%, 98.1%의 균사생장 저지율을 나타내었다 또한 혼합액의 균사생장 저지율은 0.25ppm에서 각각주에 대하여 54.7% 55.4%이었다.

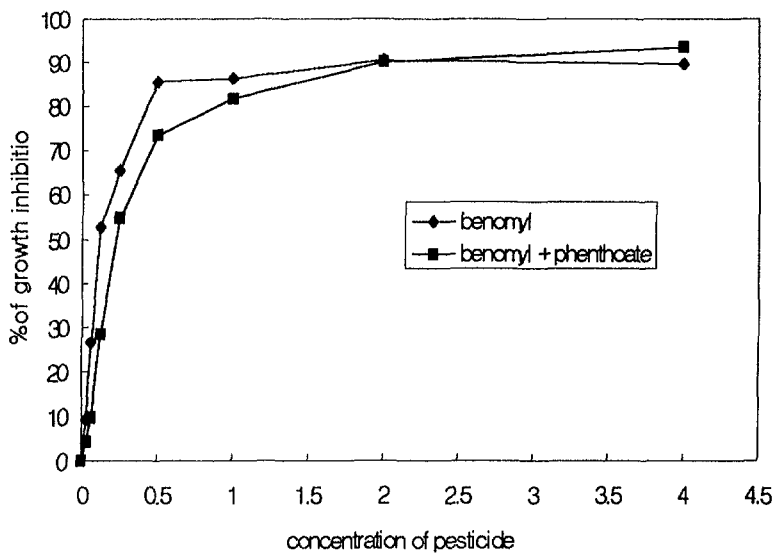


Figure 24. Growth inhibition of *Botryosphaeria dothidea* by benomyl and pesticide mixture(benomyl+phenthoate).

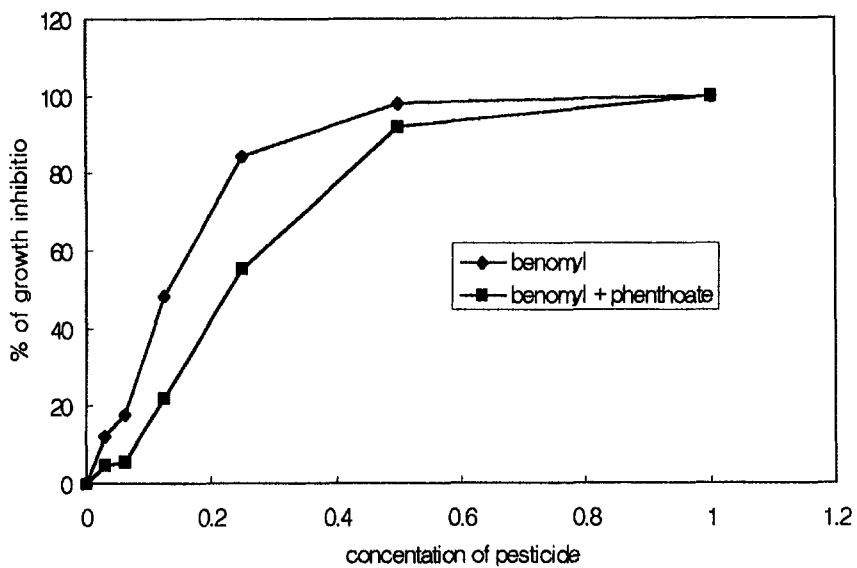


Figure 25. Growth inhibition of *Glomerella cingulata* by benomyl and pesticide mixture(benomyl+phenthoate).

### 3) 살충제의 살균활성

살충제는 1000ppm에서 뚜렷하게 균사의 성장을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

Table 19. Growth inhibition of pathogens by acephate and phenthoate

| Pathogen                      | Insecticides | % of growth inhibition |        |        |         |
|-------------------------------|--------------|------------------------|--------|--------|---------|
|                               |              | 0ppm                   | 250ppm | 500ppm | 1000ppm |
| <i>Alternaria mali.</i>       | Acephate     | 0                      | 3.9    | 0.2    | 4.7     |
|                               | Phenthoate   | 0                      | 2.3    | 18.1   | 15.4    |
| <i>Botyosphaeria dothidea</i> | Acephate     | 0                      | -3.4   | 3.2    | 20.7    |
|                               | Phenthoate   | 0                      | 28.4   | 30.3   | 26.1    |
| <i>Glomerella cingulata</i>   | Acephate     | 0                      | -11.3  | -4.6   | -0.5    |
|                               | Phenthoate   | 0                      | 27.3   | 31.9   | 39.1    |

다. 혼합비율에 따른 약효상승의 변화

앞선 살충활성 검정을 통하여 1:1 혼합제들 중 가장 혼합 상승효과가 좋았던 약제들을 대상으로 최적의 혼합비율을 결정하기 위한 생물활성실험이 진행되었다. Diazinon과 benfuracarb, furathiocarb, carbosulfan을 다양한 비율로 혼합하고 24시간 뒤 살충활성을 검정하였다.

Table 20. Toxicity of diazinon and benfuracarb mixtures to susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Mixture ratio<br>Diazinon : Benfuracarb | LC <sub>50</sub> (ppm) % a.i. | co-toxicity<br>coefficient |
|---|-------------------------------|----------------------------|
| 0 : 10                                  | 18.02±1.52                    | -                          |
| 2 : 8                                   | 10.94±1.13                    | 197.8                      |
| 4 : 6                                   | 5.37±0.42                     | 504.0                      |
| 5 : 5                                   | 4.46±0.39                     | 692.0                      |
| 6 : 4                                   | 6.11±0.51                     | 589.7                      |
| 8 : 2                                   | 14.84±1.33                    | 364.5                      |
| 10 : 0                                  | 108.14±1.52                   | -                          |

Diazinon과 befuracarb 혼합의 경우 1:1의 비율에서 약 7배의 최대 상승효과를 6:4의 비율에서는 6배 가량 약효가 상승한 것을 확인하였다.

Table 21. Toxicity of diazinon and furathiocarb mixtures to susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Mixture ratio<br>Diazinon : Furathiocarb | LC <sub>50</sub> (ppm) in % a.i. | co-toxicity<br>coefficient |
|--|----------------------------------|----------------------------|
| 0 : 10                                   | 17.63±0.78                       | -                          |
| 2 : 8                                    | 2.71±0.25                        | 783.5                      |
| 4 : 6                                    | 4.21±0.41                        | 630.4                      |
| 5 : 5                                    | 2.79±0.32                        | 1086.0                     |
| 6 : 4                                    | 4.65±0.46                        | 763.0                      |
| 8 : 2                                    | 5.10±0.48                        | 1044.8                     |
| 10 : 0                                   | 108.14±1.52                      | -                          |

Diazinon과 furathiocarb 혼합의 경우 1:1 비율과 8:2 비율에서 각각 10배 이상의 최대 상승효과를 나타내었다.

Table 22. Toxicity of diazinon and carbosulfan mixtures to susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Mixture ratio<br>Diazinon : Carbosulfan | LC <sub>50</sub> (ppm) in % a.i. | co-toxicity<br>coefficient |
|---|----------------------------------|----------------------------|
| 0 : 10                                  | 5.42 ± 0.55                      | -                          |
| 2 : 8                                   | 2.87 ± 0.28                      | 247.3                      |
| 4 : 6                                   | 5.35 ± 0.50                      | 163.5                      |
| 5 : 5                                   | 5.71 ± 0.54                      | 180.8                      |
| 6 : 4                                   | 5.31 ± 0.45                      | 237.2                      |
| 8 : 2                                   | 5.09 ± 0.55                      | 443.8                      |
| 10 : 0                                  | 108.14 ± 1.52                    | -                          |

Diazinon과 carbosulfan 혼합의 경우 8:2 비율에서 약 4.5배의 최대 상승효과를 나타내었다.

라. 배추좀나방의 야외 계통에 대한 혼합제의 활성 검정

감수성에 대한 혼합제의 활성 결과를 분석한 후 실제 포장에서 채집해 온 배추좀나방을 대상으로 혼합약제들을 처방하였다. 본 실험은 강원대학교에서 수행되었으며 감수성은 한국화학연구소에서 야외계통은 강원도 춘천시 서면 월송 2리 배추재배지에서 채집하여 실험실에서 5~7세대 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 1차로 감수성에 대한 각 단계들의 반수치사농도를 구한 후, 야외계통에 대한 각 단계들의 반수치사농도를 구하여 저항성 발달정도를 측정하였다. 다음 혼합약제(1:1)들의 야외계통에 대한 반수치사농도를 검

정하였다. 살충활성 결과를 근거로 co-toxicity coefficient를 계산하고 혼합 약제의 약효 상승효과를 산출하였다.

1) 야외계통 배추좀나방의 저항성 발달

Table 23. Toxicity of pesticides to susceptible and field population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Compounds   | LC <sub>50</sub> (ppm) |              | RR <sup>b)</sup> |      |
|-------------|------------------------|--------------|------------------|------|
|             | Susceptible strain     | Field strain |                  |      |
| Insecticide | Benfuracarb            | 13.3         | 257.8            | 19.4 |
|             | Carbofuran             | 9.4          | 13.6             | 1.4  |
|             | dichlorovos            | 5.6          | 34.2             | 28.6 |
|             | Diazinon               | 5.8          | 51.8             | 8.9  |
|             | Furathiocarb           | 13.2         | 14.3             | 1.1  |
|             | Phenthoat              | 1.6          | 4.4              | 2.8  |
|             | Profenofos             | 1.0          | 39.2             | 39.2 |
|             | Pirimicarb             | >1000.0      | >1000.0          | -    |
|             | Thiocylam              | 53.0         | 500.0            | 9.4  |
| Fungicide   | Benomyl                | >1000.0      | >1000.0          | -    |
|             | Dithianon              | >1000.0      | >1000.0          | -    |
|             | Edifenphos             | >1000.0      | >1000.0          | -    |
|             | Pyrazophos             | 101.8        | 126.1            | 1.2  |
|             | Tolyfluanide           | >1000.0      | >1000.0          | -    |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Resistance ratio = LC50 of susceptible strain/LC50 of field strain

포장에서 채집되어 온 배추주름나방은 다양한 살충제에 대하여 저항성이 발달되어 있었다. 특히, 유기인계 살충제인 dichlorovos와 profenofos에 대해서는 28배, 39배의 약제 저항성을 나타내었다. Phenthoate에 대해서는 약 3배의 저항성을 나타내었으며 카바메이트계 살충제인 carbofuran과 furathiocarb에 대해서는 저항성이 거의 발달되어 있지 않았다.

2) 감수성 배추주름나방에 대한 phenthoate 혼합제의 약효 상승효과 검정

저항성이 발달되어 있지 않은 감수성에 대하여 phenthoate 혼합제는 거의 약효 상승을 나타내지 못하였다.

Table 24. Toxicity of phenthoate mixtures to susceptible population of diamondback moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |       |
|--------------|------------------------|--------|---------------------------------------|-------|
|              | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs |
| Phenthoate   | 1.6                    | 0.6    | -                                     | -     |
| + Profenofos | 1.3                    | 0.6    | 101.8                                 | 101.6 |
| + Carbofuran | 2.7                    | 1.8    | 105.3                                 | 60.9  |
| + Pirmicarb  | 1.7                    | 0.9    | 188.6                                 | 139.7 |
| + Edifenphos | 1.9                    | 1.1    | 173.6                                 | 106.1 |
| + IBP        | 1.5                    | 1.1    | 216.3                                 | 110.5 |
| + Pyrazophos | 0.9                    | 0.9    | 364.0                                 | 131.4 |
| + Benomyl    | 3.5                    | 1.8    | 95.3                                  | 65.3  |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action



이러한 결과는 감수성 체내에서 phenthoate에 대한 일련의 대사과정이 일어나지 않아 약효 상승을 관찰되지 않은 것으로 예상된다.

3) 야외계통 배추좀나방에 대한 phenthoate 혼합제의 약효 상승효과  
검정

Phenthoate에 대하여 약 3배의 저항성을 갖는 야외계통에 phenthoate 혼합제를 처리하였다. Phenthoate의 주된 대사는 esterases에 의해 이루어진다고 보고되어 있는데, esterases를 저해하리라 예상되는 선발 약제들을 각각 혼합한 후 처리한 결과 대부분 약효가 상승하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 25. Toxicity of phenthoate mixtures to field population of diamond back moth(*Plutella xylostella* L.)

| Pesticides   | LC <sub>50</sub> (ppm) |        | Co-toxicity coefficient <sup>a)</sup> |       |
|--------------|------------------------|--------|---------------------------------------|-------|
|              | 24 hrs                 | 48 hrs | 24 hrs                                | 48hrs |
| Phenthoate   | 4.4                    | 2.1    | -                                     | -     |
| + Profenofos | 1.1                    | 0.4    | 748.5                                 | 797.3 |
| + Carbofuran | 2.3                    | 2.0    | 292.4                                 | 170.4 |
| + Pirimicarb | 4.1                    | 2.3    | 214.6                                 | 183.8 |
| + Edifenphos | 4.0                    | 1.6    | 224.4                                 | 268.4 |
| + IBP        | 4.4                    | 2.2    | 200.5                                 | 197.3 |
| + Pyrazophos | 1.8                    | 0.5    | 401.7                                 | 515.0 |
| + Benomyl    | 2.1                    | 0.6    | 498.0                                 | 803.2 |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

Phenthoate를 profenofos와 혼합하였을 때 7~8배 가량 약효가 증가하는 것이 확인되었으며, benomyl과 혼합하였을 때에도 5~8배의 약효 상승이 관찰되었다. 이러한 결과는 앞으로 살충제의 투입량을 줄이고, 저항성 발달을 지연시킬 수 있는 대안이 되리라 기대한다.

#### 마. 적용 대상 확대 실험

목화진딧물(*Aphis gossypii* Glover)을 대상으로 적용 대상 확대 실험을 수행하였다. 본 실험은 기존의 배추좀나방을 이용한 실험을 통하여 나타났던 다양한 약효의 상승효과가 대상 곤충이 달라지더라도 유사하게 나타나는지 확인하기 위해 수행하였다. Esterases와 glutathione-S-transferase에 의해 무독화되는 약제로 보고된 phenthoate와 pirimicarb, acephate를 선정하여, esterases를 저해하는 benfuracarb, furathiocarb 등과 GST를 저해하는 benfuracarb, profenofos 등의 약제와 혼합하여 목화진딧물을 대상으로 상승효과를 검정하였다. 또한 무독화 효소를 저해하는 benomyl(살균제)과 대사효소에 의하여 무독화되는 것으로 보고된 phenthoate 등의 살충제와의 혼합 상승효과를 검정하였다.

##### 1) 목화진딧물에 대한 pirimicarb 혼합제의 약효 상승효과 검정

Esterases에 의해 대사된다고 알려진 pirimicarb과 esterases 활성 저해 실험을 통하여 선정된 약제들을 혼합 처리한 결과, 모든 조합에서 약효의 상승을 확인할 수 있었다. 특히 pirimicarb과 benfuracarb을 혼합 처리하였을 때 저항성 계통에서 8배의 약효 상승이 확인되었다. 또한 pirimicarb의 약효상승폭은 감수성보다 저항성에 대하여 더 크게 나타났다.

Table 26. Toxicity of pesticides to a susceptible and a resistant populations of cotton aphids (*Aphis gossypii* Glover)

| Insecticides | LC <sub>50</sub> (ppm) <sup>a)</sup> |         |          |         | RR <sup>b)</sup> |        |
|--------------|--------------------------------------|---------|----------|---------|------------------|--------|
|              | S strain                             |         | R strain |         | 24h              | 48h    |
|              | 24h                                  | 48h     | 24h      | 48h     |                  |        |
| Acephate     | 4.3                                  | 1.0     | 191.5    | 106.5   | 45.1             | 112.0  |
| Pirimicarb   | 0.6                                  | 0.2     | 377.3    | 289.4   | 659.6            | 1321.5 |
| Chlorpyrifos | 8.2                                  | 2.3     | 101.9    | 63.2    | 12.5             | 27.3   |
| Dichlorvos   | 14.0                                 | 10.0    | 44.5     | 22.4    | 3.2              | 2.3    |
| Cypermethrin | 4.7                                  | 2.6     | 16.1     | 8.4     | 3.5              | 3.3    |
| Profenofos   | 8.8                                  | 6.3     | 107.2    | 78.7    | 12.2             | 12.5   |
| Carbaryl     | 7.1                                  | 3.7     | 34.0     | 10.5    | 4.8              | 2.8    |
| Benfuracarb  | 2.0                                  | 0.7     | 1.5      | 0.3     | 0.8              | 0.5    |
| Furathiocarb | 1.7                                  | 0.2     | 2.1      | 0.7     | 1.3              | 3.5    |
| Phenthoate   | 37.7                                 | 35.4    | 39.9     | 37.5    | 1.1              | 1.1    |
| Benomyl      | >1000.0                              | >1000.0 | >1000.0  | >1000.0 | -                | -      |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Resistance ratio = LC50 of susceptible strain/LC50 of resistance strain

Table 27. Toxicity of pirimicarb mixtures to a susceptible and a resistant populations of cotton aphids(*Aphis gossypii* Glover)

| Insecticides  | LC <sub>50</sub> (ppm) <sup>a)</sup> |       |          |       | Co-toxicity coefficient <sup>b)</sup> |       |          |       |
|---------------|--------------------------------------|-------|----------|-------|---------------------------------------|-------|----------|-------|
|               | S strain                             |       | R strain |       | S strain                              |       | R strain |       |
|               | 24hrs                                | 48hrs | 24hrs    | 48hrs | 24hrs                                 | 48hrs | 24hrs    | 48hrs |
| Pirimicarb    | 0.6                                  | 0.2   | 377.3    | 289.4 | -                                     | -     | -        | -     |
| +Benfuracarb  | 0.2                                  | 0.1   | 0.4      | 0.1   | 374.8                                 | 477.4 | 842.0    | 455.0 |
| +Furathiocarb | 0.6                                  | 0.20  | 2.1      | 1.0   | 153.4                                 | 104.1 | 207.2    | 126.0 |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action  
 Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

2) 목화진딧물에 대한 acepate 혼합제의 약효 상승효과 검정

Glutathione-S-transferase에 의하여 대사되는 acephate와 GST를 저해하는 약제들과 혼합처리시 약효 상승효과를 관찰하였다. 가장 높은 약효의 상승은 acephate와 profenofos를 혼합하였을 때 나타났으며, co-toxicity coefficient는 저항성 계통에서 24시간과 48시간 후 각각 280과 578이었다. 저항성계통과 감수성 계통의 약효 상승효과를 비교해 보았을 때 저항성 계통의 목화진딧물에 더 효율적임을 확인할 수 있었다.

Table 28. Toxicity of pesticide mixtures to a susceptible and a resistant populations of cotton aphids(*Aphis gossypii* Glover)

| Insecticides | LC <sub>50</sub> (ppm) <sup>a)</sup> |       |          |       | Co-toxicity coefficient <sup>b)</sup> |       |          |       |
|--------------|--------------------------------------|-------|----------|-------|---------------------------------------|-------|----------|-------|
|              | S strain                             |       | R strain |       | S strain                              |       | R strain |       |
|              | 24hrs                                | 48hrs | 24hrs    | 48hrs | 24hrs                                 | 48hrs | 24hrs    | 48hrs |
| Acephate     | 4.3                                  | 1.0   | 191.5    | 106.5 | -                                     | -     | -        | -     |
| +Benfuracarb | 1.0                                  | 0.7   | 1.3      | 0.6   | 268.4                                 | 109.8 | 236.6    | 104.2 |
| +Carbaryl    | 6.5                                  | 4.1   | 39.3     | 8.8   | 81.3                                  | 37.2  | 147.1    | 218.4 |
| +Profenofos  | 8.8                                  | 3.3   | 49.2     | 15.7  | 64.7                                  | 50.1  | 279.6    | 578.4 |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Co-toxicity coefficient significantly greater than 100 : synergistic action

Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

### 3) 목화진딧물에 대한 phenthoate 혼합제의 약효 상승효과 검증

Esterases에 의해 대사된다고 알려진 phenthoate와 esterases 활성을 저해하는 benomyl(살균제)를 혼합 처리하였을 때 약효의 상승이 관찰되었다.

Table 29. Toxicity of phenthoate mixtures to a susceptible and a resistant populations of cotton aphids(*Aphis gossypii* Glover)

| Pesticides | LC <sub>50</sub> (ppm) <sup>a)</sup> |       |          |       | Co-toxicity coefficient |       |          |       |
|------------|--------------------------------------|-------|----------|-------|-------------------------|-------|----------|-------|
|            | S strain                             |       | R strain |       | S strain                |       | R strain |       |
|            | 24hrs                                | 48hrs | 24hrs    | 48hrs | 24hrs                   | 48hrs | 24hrs    | 48hrs |
| Phenthoate | 37.7                                 | 35.4  | 39.9     | 37.5  | -                       | -     | -        | -     |
| +Benomyl   | 19.9                                 | 12.3  | 30.8     | 21.4  | 365.0                   | 555.9 | 248.9    | 337.6 |

a) 공시해충의 50%를 치사시킬 수 있는 약제의 농도(ppm).

b) Co-toxicity coefficient significantly greater than 100: synergistic action  
Co-toxicity coefficient less than 100 : independent action

바. 포장실험에서 혼합제의 약효 검정

실제 제형으로 만들어진 혼합제의 포장 실험을 실시하였다. 대조 약제로는 현재 미생물 농약으로 배추좀나방의 방제를 위하여 사용되고 있는 Bt제를 설정하였다. 실험결과, phenthoate와 benomyl의 혼합이 매우 뛰어난 방제가를 나타내었다. 특히 Bt제와 비교하여 보았을 때에 더 뛰어난 약효를 나타내었다.

Table 30. Field test of mixture formulated to diamondback moth(*Plutella xylostella*)

| Compounds                                     | Density before application(%) |    |    |      | 3 days after application |       |       |       |      |
|---|-------------------------------|----|----|------|--------------------------|-------|-------|-------|------|
|   | 1                             | 2  | 3  | AV   | 1                        | 2     | 3     | AV    | CV   |
| Diazinon + Carbosulfan<br>(24+6) EC           | 58                            | 60 | 55 | 57.7 | 94.8                     | 91.7  | 90.9  | 92.5  | 12.0 |
| Chlorpyrifos + Carbofuran<br>(12.5 + 12.5) WP | 65                            | 70 | 56 | 63.7 | 92.3                     | 92.9  | 98.2  | 94.5  | 10.1 |
| Phenthoate + Benomyl<br>(24+6) WP             | 55                            | 65 | 50 | 56.7 | 5.5                      | 3.1   | 6.0   | 4.9   | 95.3 |
| Bt WP   | 56                            | 65 | 66 | 62.3 | 14.3                     | 12.3  | 12.1  | 12.9  | 87.7 |
| Control                                       | 56                            | 60 | 60 | 58.7 | 107.1                    | 103.3 | 105.0 | 105.1 | -    |

(continued)

| Compounds                                     | 7 days after application |       |       |       |      | 14 days after application |       |       |       |      |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|------|---------------------------|-------|-------|-------|------|
|   | 1                        | 2     | 3     | AV    | CV   | 1                         | 2     | 3     | AV    | CV   |
| Diazinon + Carbosulfan<br>(24+6) EC           | 86.2                     | 83.3  | 87.3  | 85.6  | 80.8 | 77.6                      | 76.7  | 81.8  | 78.7  | 29.4 |
| Chlorpyrifos + Carbofuran<br>(12.5 + 12.5) WP | 84.6                     | 74.3  | 50.4  | 79.8  | 26.2 | 69.2                      | 71.4  | 71.4  | 70.7  | 36.6 |
| Phenthoate + Benomyl<br>(24+6) WP             | 1.8                      | 1.5   | 0.0   | 1.1   | 99.0 | 0.0                       | 1.5   | 0.0   | 0.5   | 99.6 |
| Bt WP   | 14.3                     | 7.7   | 10.6  | 10.9  | 89.9 | 10.7                      | 6.2   | 10.6  | 9.2   | 91.7 |
| Control                                       | 116.1                    | 105.0 | 103.3 | 108.1 | -    | 116.1                     | 106.7 | 111.7 | 111.5 | -    |



## 제 4절 결 론

총 109종의 살충제와 살균제를 대상으로 무독화 효소인 monooxygenase 와 amidase, glutathione-S-transferase, esterases, carboxylesterase에 대한 저해력을 실험한 결과, 일부약제들로부터 저해 특성을 확인할 수 있었다. Monooxygenase은 acephate, chlorpyrifos, profenofos에 의해 저해됨을 확인할 수 있었으며 amidase는 dimethyl vinphos, phosphamidon, profenofos, edifenphos에 의하여 강하게 저해되었다. Glutathione-S-transferase는 benfuracarb, furathiocarb, thiodicarb, thiocyclam, dithianon, edifenphos, tolylfluanide에 의하여 저해되었다. Carbofuran과 dichlorovos, profenofos, pirimicarb, benomyl, edifenfos, pyrazophos는 esterase와 carboxylesterase의 저해제로 활용될 가능성을 나타냈다. 이상의 효소활성 저해 실험 결과를 토대로 다양한 농약과 1:1로 혼합한 뒤 배추좀나방(diamondback moth)을 대상으로 약효를 확인한 결과 대부분의 조합에서 상승효과를 확인할 수 있었다. 특히 diazinon+benfuracarb, chlorpyrifos+carbofuran, acephate+dithianon, phenthoate+benomyl, phenthoate+dichlorovos의 조합에서는 각각 10배, 6배, 7배, 10배, 15배의 약효상승이 확인되었다. 살충제와 살균제를 혼합한 경우 살균제를 단독으로 처리했을 때의 살균활성은 그대로 유지하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과들은 기존의 농약의 사용량을 줄일 수 있는 대안이며 현재 농민들이 실제 농약의 사용시 살충과 살균활성을 동시에 지닌 상품에 상당히 접근한 것이라고 판단된다. 또한 목화진딧물을 대상으로 적용확대 실험을 실시한 결과, 배추좀나방의 실험과 마찬가지로 다양한 약효 상승이 확인되었는데 앞으로 다양한 해충에 대한 약효 검증이 이루어져야 된다고 판단된다. 살충제에 저항성을 나타내는 야외계통에 대한 약효 실험결과는 이

러한 혼합제가 저항성의 발달 해충의 방제에 효율적으로 이용될 가능성을 보여 주었다. 최종적으로 제형화한 뒤 포장실험을 통하여 나타난 살충제 phenthoate와 살균제 benomyl의 조합은 기존에 상품화되어 있는 Bt제보다 더 뛰어난 효과를 나타내었으며, 앞으로 새로운 제형의 개발과 적용범위 확대를 통하여 실제 농가에 응용되리라 예상된다.

본 연구는 혼합제의 개발에 있어 무작위적·경험적 방법을 벗어나 체계적이고 합리적인 방법을 제시함으로써 시간과 인적 노력을 감소시킬 수 있으리라 사료된다. 또한, 실험을 통하여 얻어진 많은 자료는 추후 다양한 작물과, 해충, 제형에 따른 이상적인 혼합제 조합에 이용되리라 기대한다.

## 제 5절 참고문헌

1. Bassem, M., A. Ashour, L. G. Harshman, and B. Hammock. 1987. Malathion toxicity and carboxylesterase activity in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 29:97-111.
2. Bernard, J. R. P. and B. B. Chlaude. 1993. Insecticide synergist: role, importance, and perspectives. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38:199-223
3. Byford, R. L, J. A. Lockwood, and S. M. Smith. 1987. Insecticide mixtures as an approach to the management of pyrethroid-resistant horn flies. *J. Econ. Entomol.*, 80:111-116.
4. Dauterman, W. C. 1994. Introduction to biochemical toxicology. Chapter 5- Metabolism of toxicants phase II reaction, pp114-132. Appleton & Lange.
5. Finny, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose, 9~47p. Cambridg Univ. Press.
6. Georghiou, G. P. 1986. The magnitude of the resistance problem. pesticide resistance: Strategies and tactics for management. National Academy Press.
7. Hiroyasu, A. 1982. Metabolic maps of pesticides. National Academic Press. volume 1
8. Hiroyasu, A. 1989. Metabolic maps of pesticides. National Academic Press. volume II

9. Hodgson, E. and P. E. Levi. Introduction to biochemical toxicology. Chapter 4 - Metabolism of toxicants phase I reaction, pp76-112. Appleton & Lange.
10. Hodgson, E. 1994. Introduction to biochemical toxicology. Chapter 7 - Chemical and environmental factors affecting metabolism of xenobiotics, pp153-161. Appleton & Lange.
11. Ishaaya, I. 1993. Insect detoxifying enzymes: their importance in pesticide synergism and resistance. *Arch. Insec. Biochem. Physiol.*, 22:263-276.
12. Johnson, E. R. and Y. P. Sun. 1960. Analysis of joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.*, 53(5):887-889
13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenyl reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
14. 박창규, 이재구, 한대성, 서용택. 1993. 농약의 생화학과 사용법. 신일상사.
15. 조정래, 이규승. 1996. 농약의 약효증진을 위한 첨가제 효과에 관하여. 한국환경농학회지, 15: 105-116.

## 제 4장 위탁과제

연 구 원 : 유 용 만  
연 구 원 : 황 인 천  
연 구 원 : 하 태 기  
연 구 원 : 이 창 혁  
연 구 원 : 김 현 재

연 구 원 : 장 철  
연 구 원 : 김 형 민  
연 구 원 : 김 주 경  
연 구 원 : 임 금 춘

## 제 4장 위탁과제

위탁과제의 연구 목적과 내용 그리고 결과는 본 보고서의 제 2장과 제 3장의 본문내용에 모두 포함되어 있습니다. 본 과제의 성격상 「제 1세부과제 저독성 Proinsecticide계 살충제의 개발」로부터 얻어진 합성 화합물에 대한 살충활성(필요시 살균활성 포함) 검정결과와 제 2세부과제 「환경친화형 혼합제 개발」로부터 선발된 혼합약제, 그리고 개발된 제형들의 살충활성(필요시 살균활성 포함) 검정 결과를 해당 세부과제의 본문 내용에 포함시키는 것이 보고서의 내용전달의 편리함을 고려할 때 합당하다는 결론을 연구팀들과의 협의를 거쳐 얻었습니다. 본문 내용 중 위탁연구과제의 내용과 결과에서 위탁연구에 관련된 항목은 “(위탁)”으로 표시하였습니다. 위탁과제 연구내용과 결과 그리고 진행된 구체적 사항에 대한 의문이 있으시면 연구책임자(한대성, dshan@cc.kangwon.ac.kr, ☎ 033-250-6441) 또는 위탁연구책임자(유용만, ymyu@knco.co.kr, ☎ 054-776-0131)로 연락으로 주시면 성실하게 답변해 드리겠습니다.