(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0001333
(43) 공개일자 2019년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 31/08 (2006.01) *A01N 25/02* (2006.01)
A01N 25/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 31/08 (2013.01)
A01N 25/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0081178
(22) 출원일자 2017년06월27일
심사청구일자 2017년06월27일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이중구
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 109동 603호 (전민동, 엑스포아파트)
김영국
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 409동 1601호 (전민동, 엑스포아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **고삼으로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 함유하는 살유충제 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 쿠라리딘, 이의 염 또는 상기 쿠라리딘 화합물을 함유하는 고삼(*Sophora flavescens*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 살유충제 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 살유충 활성을 갖는 상기 화합물은 천연 소재로부터 분리하여 사용할 수 있어 인축에 보다 안전한 환경친화적인 해충 방제제로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

(52) CPC특허분류
A01N 25/08 (2013.01)
Y10S 514/919 (2013.01)
(72) 발명자
박기웅
대전광역시 유성구 죽동로280번길 48, 401호 (죽동)
김영태
대전광역시 대덕구 계족산로 135, 402동 602호
황기선
대전광역시 유성구 구즉로 16, 105동 902호 (송강동, 한마을아파트)

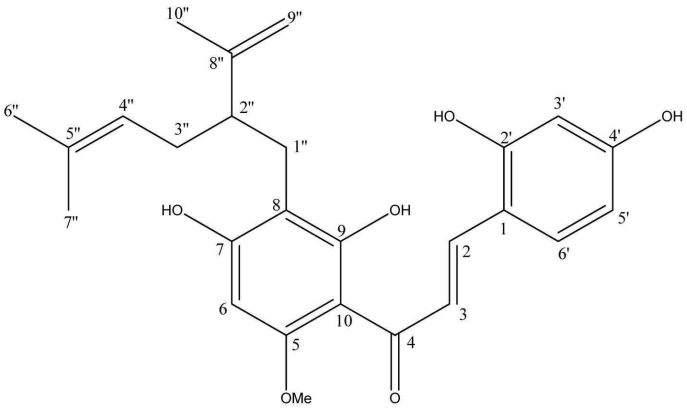
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 쿠라리딘, 이의 염 또는 하기 화학식 1의 쿠라리딘 화합물을 함유하는 고삼(*Sophora flavescens*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 살유충제.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고삼 추출물은 고삼의 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 또는 이의 혼합 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 살유충제.

청구항 3

제1항에 있어서, 농약적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 살유충제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 살유충제를 이용하는 살유충 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고삼으로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 함유하는 살유충제 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고삼 추출물에서 분리정제한 쿠라리딘 화합물의 살유충 활성에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 농작물을 안정적으로 대량 생산하기 위해서 농약과 비료는 필수적인 요소이다. 농약은 작물과 대상 병해충의 종류에 따라서 종류가 다양하고 현재 국내에도 수 백 종의 농약이 제조 판매되고 있다. 그러나 수 십년에 걸친 유기합성농약의 연용(連用)과 남용으로 인하여, 농약 저항성 해충의 출현 및 예측불가능 했던 환경계의 오염 등 많은 부작용들이 나타났다.

[0003] 이에 인축(人畜)에 좋지 않은 영향을 미치는 유기합성농약의 생산과 사용을 점차적으로 제한하자고 국제적으로 합의하였으며, 전 세계국가들은 이전에 사용하였던 유기인계 및 유기염소계 농약에 대해서 2010년까지 생산을 75% 감소시키기로 국제적으로 동의하였다. 그러나 많은 연구진이 유기인계 또는 유기염소계 농약을 대체할 수 있는 살충제를 개발하려고 많은 노력을 하고 있으나, 아직까지 유기인계 살충제인 고독성농약을 대체할 새로운 기작의 안전하고 환경 친화적인 살충제를 개발하지 못하고 있는 실정이다.

[0004] 최근에는 저독성 농약 개발이 진행 중이며 그 중에서 생물 농약에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 생물농약은 미생물 농약, 생화학 농약 및 천적을 이용한 방법으로 대별되어 있다. 생물농약은 자연계에 존재하는 생

물체 및 그로부터 유래한 소재를 이용하여 농작물 생산 및 보존에 피해를 방제하는 작물 보호제이다. 미생물 농약은 진균, 세균, 바이러스 및 원생동물 등 살아있는 미생물을 이용하여 농업에 해를 주는 미생물의 방제제이고, 생화학 농약은 자연계에서 존재하는 천연자원으로부터 활성화합물을 추출하여 이용하는데, 신호전달에 관련된 활성물질 또는 생약 방제제로 구분되어있다. 이와 같은 생물 농약은, 잔류성이 비교적 적으며 인축 및 환경에 악영향을 미치지 않아 화학농약의 대체재로 이용하려고 개발이 진행되고 있다. 그러나 친환경적 농약은 화학합성 농약과 비교하면 방제가가 낮고, 대부분의 생물 농약 및 천연자원 유래 농약은 가격이 고가인 관계로 경제성이 낮고 실효성이 적으며, 효과가 제한적이고, 약효가 속효성이 아닌 경우가 많기 때문에 이제까지 유기합성농약을 사용하던 농민들로부터 호응을 얻지 못하고 있었다.

[0005] 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나비목(Lepidoptera) 집나방과(Yponomeutidae)에 속하는 해충으로 배추, 무, 양배추 등 주로 십자화과 작물에 해를 주는 해충으로, 필리핀, 태국 등 동남아지역의 열대지방으로부터 캐나다 북부의 고위도 지방까지 광범위하게 분포되어 있는 세계적인 해충이다. 한국은 최근 십자화과 채소류인 배추, 양배추, 무의 재배면적이 늘어나고 있으며, 온실재배로 십자화과 채소를 연중 재배하고 있고, 십자화과 채소류의 재배가 대단지화 및 연작되고 있는 추세이다. 배추좀나방은 세대 기간이 짧고 연간 9~12세대로 발생하여 다른 곤충류보다 세대 교체률이 비교적 많아 약제에 대한 저항성이 생기게 되고 기존 약제의 방제효과가 떨어져 그 피해가 증가하고 있다. 배추에 실제적으로 해를 주는 유충은 기주 작물의 잎 뒷면에서 표피를 파고 들어가 표피만 남기고 잎을 먹어치운다. 특히 배추의 성장초기에 유충이 발생하면 어린잎을 갉아먹어 엽맥만 남기기 때문에 배추 생육을 저해하고 심하면 고사에 이르게 하는 등 초기생육에 현저한 지장을 준다.

[0006] 고삼(*Sophora flavescens*)은 장미목(Rosales) 콩과(Leguminosae)의 여러해살이식물로, 한국, 일본, 중국, 러시아 극동지방에서 자생하는데, 이 식물의 뿌리는 맛은 쓰지만 인삼과 같은 효능이 있어 한방에서는 고삼(苦蔘)이라 불린다. 고삼은 항부정맥, 항종양, 이뇨 및 해열 작용 등의 약리효과를 가지며, 피부 상재균에 대한 항균 또는 항진균 작용이 있어 신경성 피부염 또는 습진 등에도 효과가 있다고 알려져 있다. 고삼뿌리의 총 알칼로이드 함량은 1.1%이며, 알려진 성분으로는 옥시마트린, 마트린, 소포라놀, 아나기린, 메틸시티진, 바프티폴린, 소포카르핀, 알로마트린, 소포라플라바논 지, 큐세놀 에이치, 큐세놀 케이, 큐세놀 비, 큐세놀 엠, 큐세놀 이, 큐세놀 엘 등이 있다. 또한, 강한 항산화력을 가지는 플라보노이드 계열의 화합물들을 다량 함유하고 있어 미백에 대한 효과가 우수하다고 보고되었으며, 고삼의 플라보노이드 계열 화합물 중 쿠라리논과 쿠라리딘은 높은 티노시나제(tyrosinase) 저해효과를 가지고 있음이 보고되었다.

[0007] 한편, 한국공개특허 제2011-0007546호에는 '진딧물방제 활성을 나타내는 고삼뿌리 추출물의 제조방법과 이 추출물을 이용한 진딧물방제제 조성물 및 방제방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1412111호에는 '님 추출물 및 고삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 살충용 조성물 및 이를 이용한 살충 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 고삼으로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 함유하는 살유충제 및 이의 용도에 관해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 고삼의 메탄올 추출물에서 살유충 활성을 확인하고, 상기 추출물의 분획물 중 살유충 활성이 확인된 에틸아세테이트 분획물로부터 살유충 활성물질을 순수 분리, 정제하였고, 분리된 활성물질을 배추좀나방 및 멸강나방의 유충에 처리하여, 상기 활성물질의 우수한 살유충 활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 쿠라리딘, 이의 염 또는 쿠라리딘을 함유하는 고삼(*Sophora flavescens*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 살유충제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 살유충제를 이용하는 살유충 방법을 제공한다.

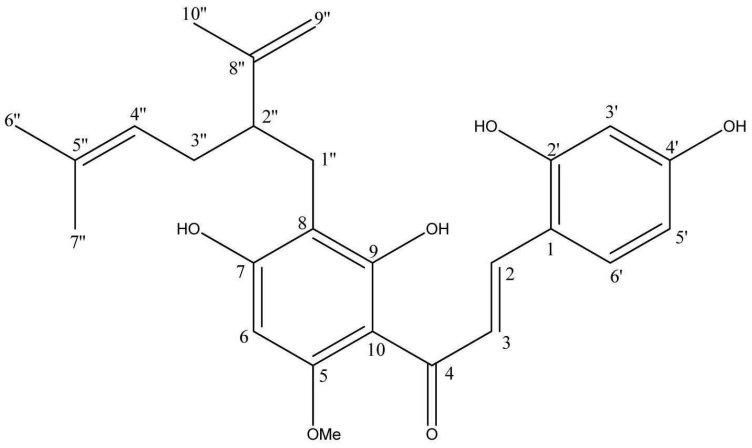
발명의 효과

[0011] 본 발명의 살유충 활성을 갖는 쿠라리딘 화합물은 천연 소재로부터 분리하여 사용할 수 있어 인축에 보다 안전한 환경친화적 해충 방제제로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 쿠라리딘, 이의 염 또는 쿠라리딘 화합물을 함유하는 고삼(*Sophora flavescens*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 살유충제를 제공한다.

화학식 1

[0013] 

[0014] 본 발명에서 상기 화학식 1의 화합물은 천연 소재로부터 공지의 방법으로 분리하거나, 공지의 화학적 합성법으로 합성할 수 있다. 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 살유충제에서, 상기 화학식 1의 화합물은 고삼으로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 살유충제에서, 상기 화학식 1의 화합물을 함유하는 고삼 추출물은 고삼의 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 또는 이의 혼합 용매 추출물일 수 있고, 바람직하게는 고삼의 메탄올 추출물일 수 있고, 구체적으로는 풍건하여 0.5㎝ 크리고 세절한 고삼을 95% 메탄올 10ℓ에 침지시킨 후, 빛을 차단시킨 상태로 서늘한 장소의 실온에서 7일 동안 정치하여 추출한 후 여과하여 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 용어 '살충제'는 사람이나 농작물에 해(害)가 되는 병해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해시키는 효과를 지닌 약제로, 농림해충 구제가 목적인 농약과 위생해충 방제를 위한 방역용 살충제로 많이 사용되며, 특수한 경우를 제외하고는 대부분의 살충제는 농림해충과 위생해충에 공통으로 사용된다. 또한 그 작용 대상의 종류에 따라 살란제(알을 죽이는 것), 살유충제(유충을 죽이는 것) 및 살성충제(성충을 죽이는 것)로 분류할 수 있다.

[0018] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 실시예를 통해 살유충 활성이 있음을 확인하였으므로, 상기 화학식 1의 화합물, 이의 염 또는 상기 화학식 1의 화합물을 함유하는 고삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 살유충제는 해충의 유충들에 대한 방제 효력을 나타내어 살충 효과를 발휘하는 것이다.

[0019] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 살유충제가 효과를 발휘하는 해충으로는, 나비목(Lepidoptera) 해충으로, 이에 한정되지 않으나, 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 멸강나방(*Pseudaletia separata*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 복숭아심식나방(*Carposina niponensis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 배명나방(*Ectomyelois pyrivorella*), 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*), 담배나방(*Helicoverpa assulta*), 오이금무늬밤나방(*Anadevidia peponis*), 콩금무늬밤나방(*Ctenoplusia agnata*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 검거세미나방(*Rhyacia ypsilon*) 또는 거세미나방(*Agrotis segetum*) 등일 수 있다. 나비목에 속하는 종들은 부화부터 작물에 피해를 주기 시작함으로써 나비목 해충의 방제는 유충 및 성충 모두를 방제하는 것이 중요하다.

[0020] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화학물을 살유충제의 유효성분으로 사용할 경우, 그것은 임의의 기타 성분들의 첨가없이 화합물 자체 또는 염산이나 황산과 같은 무기산, 또는 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산과의 농화학적으로 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있다.

[0021] 그러나 본 발명의 화합물은 통상 고체 담체, 액체 담체, 기체 담체 또는 유인물과 혼합하거나, 염기성 물질, 예컨대 다공질 세라믹 플레이트 또는 부직포에 흡수시킨 후, 계면활성제 및 필요한 경우, 기타 보조제들을 첨가하

여, 이를 각종 형태들, 예를 들어 오일 스프레이, 유화 가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물, 과립, 더스트, 에어로졸, 훈연제, 증기화가 가능한 제형물, 스모킹 제형물, 독성 유인물, 진드기방지용 시이트 또는 수지 제형물로 제형화 할 수 있다.

[0022] 상기 각 제형물들은 통상 유효성분으로서 본 화합물을 0.01 내지 95 중량%까지 함유할 수 있다. 제형물에 사용될 수 있는 고체 담체의 종류에는, 카올린 점토, 규조토, 합성 수화된 산화규소, 벤토나이트, 푸바사미 점토 및 산성 점토 등의 점토 물질의 미세 분말 또는 과립; 각종 탈크, 세라믹 및 기타 무기 물질, 예컨대 견운모, 석영, 황, 활성탄, 탄산칼슘 및 수화된 실리카; 및 화학적 비료, 예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 염화암모늄이 포함될 수 있다. 액체 담체에는, 물; 알콜, 예컨대 메탄올 및 에탄올; 케톤, 예컨대 아세톤 및 메틸 에틸 케톤; 방향족 탄화수소, 예컨대 벤젠, 톨루엔, 자일렌, 에틸벤젠 및 메틸나프탈렌; 지방족 탄화수소, 예컨대 헥산, 시클로헥산, 케로신 및 라이트 오일;에스테르, 예컨대 에틸 아세테이트 및 부틸 아세테이트; 니트릴, 예컨대 아세토니트릴 및 이소부티르니트릴; 에테르, 예컨대 디이소프로필에테르 및 디옥산; 산 아미드, 예컨대 N,N-디메틸포름아미드 및 N,N-디메틸아세트아미드; 할로겐화 탄화수소, 예컨대 디클로로메탄, 트리클로로에탄 및 사염화탄소; 디메틸 술폭시드; 및 식물성 오일, 예컨대 대두유 및 면실유가 포함될 수 있다. 기체 담체 또는 추진제에는, 부탄 가스, 액화석유 가스, 디메틸 에테르 및 이산화탄소가 포함될 수 있다.

[0023] 독성 유인물에 사용되기 위한 유인물 물질로 그레인 분말, 식물성 오일, 슈거 및 결정성 셀룰로스; 산화방지제, 예로 디부틸히드록시톨루엔 및 노르디 히드로구아이아레트산; 보존제, 예컨대 데히드로아세트산; 비식음 방지용 물질, 예로 고추 분말; 및 유인성 풍미, 예로 치즈 풍미 또는 양파 풍미가 포함될 수 있다.

[0024] 계면활성제에는, 알킬 술페이트, 알킬 술포네이트, 알킬 아릴술포네이트, 알킬 아릴 에테르 및 그것의 폴리옥시에틸렌 유도체, 폴리에틸렌 글리콜 에테르, 다가 알콜 에스테르 및 당 알콜 유도체가 포함될 수 있다. 접착제 또는 분산제와 같은 보조제에는, 카세인, 젤라틴; 다당류, 예컨대 전분, 아라비아검, 셀룰로스 유도체 및 알긴산; 리그닌 유도체, 벤토나이트, 슈거 및 합성 수용성 중합체, 예컨대 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리아크릴산이 포함될 수 있다. 안정화제에는, 이소프로필 산 포스페이트, 2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀, 2-tert-부틸-4-메톡시페놀 및 3-tert-부틸-4-메톡시페놀의 혼합물, 식물성 오일, 미네랄 오일, 지방산 및 그것의 에스테르가 포함될 수있다.

[0025] 본 발명의 화합물이 살유충제로 사용될 경우, 적용량은 통상 10 에이커 당, 0.1 내지 100g이다. 물로 희석한 후 사용되는 유화 가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물 및 기타 유사 제형화물들의 경우, 그 적용 농도는 통상 1 내지 100,000ppm 의 범위이다. 과립, 더스트 또는 기타 유사 제형물의 적용은, 희석하지 않은 제형물로서 수행된다.

[0026] 본 발명의 화합물을 유행병 예방을 위한 살유충제로 사용할 경우, 그것들이 유화 가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물 또는 기타 유사 제형물일 경우에는 0.1 내지 500ppm의 농도가 되도록 물로 희석하고, 그것들이 오일 스프레이, 에어로졸, 훈연제, 독성 유인물, 진드기방지용 시이트 또는 기타 유사 제형물일 경우에는 그대로 적용한다. 상기 적용양 및 농도는, 제형물의 형태, 적용 시기, 장소 및 방법, 해충의 종류, 손해 정도 및 기타 요인들에 따라 다를 수 있으므로, 상기 범위에 한정되지 않고 증감이 가능하다.

[0027] 또한 본 발명의 상기 화합물은 다른 살곤충제, 살선충제, 살진드기제, 살세균제, 살진균제, 제초제, 식물 성장 조절제, 시너지스트, 비료, 토양 컨디셔너 및 또는 동물 사료와 함께, 혹은 그것들과 별도로 하되 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 살유충제를 이용하는 살유충 방법을 제공한다.

[0029] 구체적으로, 본 발명의 살유충 방법은 살충제의 제형, 살충 대상 개체, 장소 및 방법 등의 다양한 요인을 감안하여 본 발명의 살유충제를 적용시키는 것을 포함하며, 바람직하게는 본 발명의 살유충제를 유효량으로 해충의 유충 서식지 또는 유충 개체에 직접 처리하는 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 고삼 추출물 및 살유충 활성이 있는 분획물의 제조**

[0032] 본 발명에 사용된 고삼은 대전 한약시장에서 구입하여 식물분류 전문가에게 의뢰하여 고삼으로 확정받은 후 사용하였다. 고삼 2kg을 풍건하여 0.5cm 크기로 세절하여 메탄올 10ℓ에 침지시킨 후 빛이 보이지 않고 서늘한 장소의 실온에서 7일간 정치하여 추출액을 얻고, 1차 추출액을 받아 놓고 고삼에 다시 5ℓ의 메탄올을 가하여 2회 추출하였고, 상기 각 추출액을 부흐너 깔대기(Buchner funnel)에 여과지를 깔고 추출액을 여과하여 혼합하였다. 상기 메탄올 추출물을 감압, 농축 및 건조하여 조추출물 201g을 얻었다. 상기 조추출물에서 활성물질의 유기용매 추출성을 알아보기 위하여 조추출물 중 1g을 취하여 물 10mℓ에 현탁시키고 동량의 클로로포름, 에틸아세테이트 및 노말 헥산을 이용하여 각각의 용매추출물을 얻고, 감압하에 각 용매들을 증발시키고 각 용매추출물의 살유충 활성을 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 유충을 사용하여 확인하였다.

[0033] 각 용매추출물의 살유충 활성을 비교한 결과, 에틸아세테이트로 추출한 추출물에서 가장 우수한 살유충 활성이 확인되어, 상기 메탄올 조추출물 200g을 0.3ℓ의 증류수를 넣어 현탁시킨 다음, 1차적으로 에틸아세테이트 1ℓ를 가하여 격렬히 흔들어 정치하여 상등의 에틸아세테이트층을 얻었다. 같은 방법으로 에틸아세테이트로 2회 추출하여 에틸아세테이트층을 합쳤다. 상기 수득한 에틸아세테이트 층을 감압, 농축하여 에틸아세테이트에서 추출된 조추출물 96g을 얻었다.

[0034] **실시예 2. 살유충활성을 갖는 활성물질의 분리 및 정제**

[0035] 살유충 활성을 나타내는 활성물질을 순수 분리정제하기 위하여 실리카 겔(230-400mesh, Art. 9385, Merck, 독일) 1.1kg에 디클로로메탄(dichloromethane)을 넣고 초음파파쇄기(ultrasonicator)에서 기포를 제거하고 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 에틸아세테이트 가용부 95g을 디클로로메탄에 현탁시켜 실리카겔 컬럼 톱에 조심스럽게 올리고, 전개용매로서 디클로로메탄 100%를 초기 용매로 하여 메탄올의 양을 순차적으로 증가시켜 디클로로메탄:메탄올 혼합액(1:1)까지 극성을 올리면서, 시간당 100mℓ를 흘려주면서 100mℓ 단위로 분획을 나누었다. 각각의 분획에 대해 살유충 활성을 평가하여 살유충 활성이 있는 분획을 얻었다.

[0036] 상기 에틸아세테이트의 분획들 중 6번째 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(10 x 80cm, 전개용매; 클로로포름: 메탄올(30:1 →1:1))를 수행하여 시간당 300mℓ로 수행하여 4개 분획물로 나누었다. 각 분획의 살유충 활성을 측정하여 가장 높은 살유충 활성이 확인된 2번째 분획물에서, 살유충 활성물질을 분리하기 위하여 ODS(octadecyl silica) 역상크로마토그래피(8 x 80cm)를 사용하였으며, 용출용매로는 60, 70, 80, 90, 100% 메탄올을 사용하였고, 각 용매를 30mℓ씩 흘려주면서 10개의 분획물로 나누어 받았다. 이 중 살유충 활성을 보이는 분획을 모아 단일물질로 분리하기 위하여 최종적으로 HPLC를 수행하였다. 컬럼으로는 YMC Jsphere ODS H-80(250 × 20㎜)을 사용하였고, 용출 용매로는 A액(0.1% 초산), B액(0.1% 아세토나이트릴)에서 A액에 대하여 초기에는 30%의 B액을 25분간 흘려주다가, 35분까지 B액을 60% 수준으로 흘려주고, 이후 100% B액을 흘리면서 피크별, 시간별로 물질을 나누어받아 각 분획별로 살유충 활성을 확인하였다. 활성물질의 검출은 UV 210㎚에서 수행하였으며, 살유충 활성물질은 49분에 용출되는 피크였으며, 이 피크 분획을 감압 건조시켜 순수물질로 80mg을 얻었다.

[0037] 고삼으로부터 분리된 화합물(이하 화합물 1)은 미황색의 분말로, 분자량 측정기에서 분자량을 측정한 결과 $[M+H]^+$가 m/z 439.5로 나타나 분자량은 438로 측정되었고, 고분해 EI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Hewlettpackard 5989A, Hewlettpackard, 미국)에서 분자식이 $C_{26}H_{30}O_6$로 추정되었다. 시마주 UV-260 분광광도계(Shimadzu, 일본)를 사용하여 화합물 1의 자외선 흡광도를 측정한 결과 최대 흡수치가 390㎚에서 나타났다.

[0038] 화합물 1의 구조를 결정하기 위한 NMR(nuclear magnetic resonance) 결과는 하기와 같다.

[0039] ^{1}H-NMR 스펙트럼(400 MHz, CD_3OD) - δ 7.95 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-2), 7.88 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-3), 7.39 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-6'), 6.34 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3'), 6.32 (1H, dd, J = 8.9, 2.4 Hz, H-5), 5.99 (1H, s, H-6), 5.03 (1H, m, H-4"), 4.58 (1H, br s, H-9"a), 4.53 (1H, br s, H-9"b), 3.87 (3H, s, OCH_3), 2.61 (2H, m, H-1"), 2.53 (1H, m, H-2"), 2.06 (2H, m, H-3"), 1.70 (3H, s, H-10"), 1.62 (3H, s, H-7"), 1.55 (3H, s, H-6").

[0040] ^{13}C-NMR 스펙트럼(100 MHz, CD_3OD) - δ 194.7 (C-4), 165.2 (C-5), 163.9 (C-7), 162.3 (C-9), 162.1 (C-4'), 160.2 (C-2'), 149.7 (C-8"), 139.7 (C-2), 131.7 (C-5"), 131.5 (C-6'), 125.3 (C-4"), 125.0 (C-3), 116.2 (C-1'), 111.1 (C-9"), 108.9(C-3'), 108.8 (C-8), 108.7 (C-5'), 106.4 (C-10), 91.4 (C-6), 56.0 (C-5-

OCH_3), 48.7 (C-2"), 32.3 (C-3"), 28.1 (C-1"), 25.9 (C-6"), 19.0 (C-10"), 17.8 (C-7").

[0041] 상기 분석 결과를 통해 화합물 1이 쿠라리딘(kuraridin; 2,2',4,4'-Tetrahydroxy-3'-(2-isopropenyl-5-methyl-4-hexenyl)-6'-methoxychalcone)으로 판명되었다.

[0042] **실시예 3. 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 유충에 대한 활성시험**

[0043] 본 발명에 사용된 시험에 배추좀나방 유충은 2016년 7월 충북대학교 김길하 교수실에서 분양받아 실험 유충으로 사용하였다. 본 발명의 살유충 활성을 가진 화합물 1을 정확하게 무게를 측정하여 아세톤 10% 용액에 적정량을 녹인 후 트리톤 X-100 100ppm 수용액 9배에 혼합하였다. 유충의 먹이는 양배추 생육시 살충제를 사용하지 않았던 것을 선택하여 그 중에서 균일한 발육상태의 양배추 잎을 지름 3.0㎝ 잎 디스크 보러로 잘라내고, 준비된 활성물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 유기용매를 날려 보냈다. 증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리 플레이트(55×20㎜)에 활성물질이 처리된 잎을 올려놓고, 2령 유충을 유충체가 상하지 않도록 유충을 이동시켜 10마리씩 3반복으로 시험하였다. 활성물질이 처리된 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16시간 명/8시간 암 광주기)에서 사육하며 24, 48,72, 96시간 후에 유충의 살충율을 조사하였다. 무처리구는 화합물 1을 넣지 않고 아세톤 10% 용액에 트리톤 X-100 100ppm 수용액 9배를 처리하여, 활성물질 처리방법과 같은 방법으로 시험하였다. 살유충 활성검색 실험은 3반복으로 실시하였고 반수치사농도를 산출하였다.

[0044] 화합물 1을 1㎍/㎖ 또는 10㎍/㎖의 농도로 유충에 처리하고 24시간 간격으로 살유충 정도를 측정하였을 때, 무처리 대조구와 비교하여 지속적인이고 농도 의존적으로 배추좀나방 유충에 살유충 효과가 나타났으며, 반수치사농도 값은 0.58㎍/㎖로 계산되었다(표 1).

표 1

[0045] 쿠라리딘의 배추좀나방 유충에 대한 살유충 활성

약제	농도 (㎍/㎖)	반복	충수	살유충수(누적)				살유충율(%)±SD
				1일	2일	3일	4일	
쿠라리딘	10	1	9	3	7	8	8	88.9±0.0
		2	9	1	3	8	8	
		3	9	3	6	4	8	
	1	1	9	0	2	4	5	59.3±6.4
		2	9	4	6	6	6	
		3	9	0	4	5	5	
대조구	0	1	10	0	1	1	1	3.3±5.8
		2	10	0	0	0	0	
		3	10	0	0	0	0	

[0046] **실시예 4. 멸강나방(*Pseudaletia separata*) 유충에 대한 활성시험**

[0047] 시험에 사용된 멸강나방 유충은 2016년 7월 충북대학교 김길하 교수실에서 분양받아 사용하였다. 멸강나방은 실내에서 누에 인공사료를 공급하면서 아크릴 케이지(30 × 30 × 30cm)에 넣어 사육하였다. 실내 사육조건은 25~28℃의 온도, 16시간 명/8시간 암 광주기, 그리고 상대습도는 50~60%로 하였다. 살유충활성 실험은 사육조건과 동일한 조건에서 수행하였다.

[0048] 멸강나방 유충에 대한 살유충 활성 실험은 상기 실시예 2에서 분리정제한 화합물 1(쿠라리딘)을 정확하게 무게를 측정하여 각 농도로 희석하여 약액에 배추 잎 절편(직경 5cm)을 30초간 침지한 후 음건시켜 1회용 페트리디쉬(5.5 × 2cm)에 솜과 여과지(Φ 5.5cm)를 깔고 음건시킨 배추 잎을 올렸다. 멸강나방 유충을 10마리 정도씩 넣어주고 화합물 처리 1일, 2일, 3일 및 4일 간격으로 살유충률을 조사하였으며, 실험은 3반복으로 수행하였다.

[0049] 그 결과, 화합물 1을 1㎍/㎖ 또는 10㎍/㎖의 농도로 유충에 처리하고 24시간 간격으로 살충 정도를 측정하였을 때 무처리 대조구와 비교하여 화합물 1을 처리한 실험구는 지속적이고 농도의존적으로 멸강나방 유충에 살유충 효과가 나타났으며, 외삽법(extrapolation)으로 측정한 반수치사농도 값은 11.45㎍/㎖로 계산되었다(표 2).

표 2

[0050] 쿠라리딘의 멸강나방 유충에 대한 살유충 활성

약제	농도 (㎍/㎖)	반복	충수	살유충수(누적)				살유충율(%)±SD
				1일	2일	3일	4일	
쿠라리딘	10	1	9	0	4	4	4	47.0±18.5
		2	9	0	3	5	6	
		3	10	0	0	1	3	
	1	1	10	0	0	0	2	26.7±11.5
		2	10	0	3	3	4	
		3	10	0	0	0	2	
대조구	0	1	10	0	0	0	0	0.0
		2	10	0	0	0	0	
		3	10	0	0	0	0	