



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0114950
(43) 공개일자 2010년10월27일

(51) Int. Cl.

A01N 65/08 (2009.01) A01P 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0033386

(22) 출원일자 2009년04월17일

심사청구일자 2009년04월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

최용석

서울특별시 동작구 신대방1동 동작상떼빌아파트
103-603

김영국

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 409-1601

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

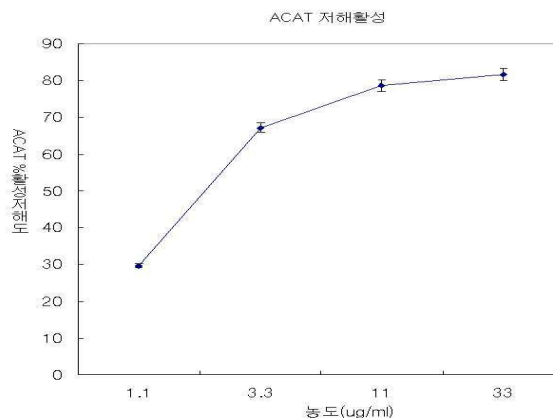
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터 또는 감잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 아실-코에이: 콜레스테롤 아실트랜스퍼라제의 활성 저해제 및 살충제용도

(57) 요약

본 발명은 감잎 추출물 또는 포르핀계(porphyrin) 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester) 화합물을 유효성분으로 함유하는, 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase)의 활성 저해제 또는 살충제 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 감잎 추출물 또는 화학식 1로 표시되는 포르핀계 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester) 화합물이 곤충 유충의 체내에서 곤충이 필수적으로 필요로 하는 스테롤 대사들을 억제하여 살충 작용을 하는 기작을 확인하고, 스테롤 대사기작 저해는 인축에 해가 없음을 확인함으로써, 고독성농약을 사용할 수 없는 실내원예용 살충제와 농약살포에 어려운 그린하우스 등에서 유해 선충류를 포함한 유충들, 또한 종래 살충제에 대한 저항성이 강해진 유충의 효소 활성 저해제 또는 살충제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

노문철

대전광역시 유성구 전민동 청구아파트 104-1605

최정호

대전광역시 중구 오류동 151-8 크릭스빌 402

이성윤

서울특별시 강서구 화곡6동 954-12

한성식

서울특별시 강남구 청담동 65 진흥아파트 5-702

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 107048032SB010

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 농림수산특정연구개발사업

연구과제명 (2년차 주관)섭식성 해충의 성장 및 탈피에 필요한 스테롤 대사 조절 신개념 살충소재
개발 연구

기여율

주관기관 고려대학교

연구기간 2008년 05월 30일~ 2009년 05월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 유효성분으로 함유하는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(ACAT)의 활성 저해제.

청구항 2

감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 유효성분으로 함유하는 살충제 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 살충제는 해충의 유충, 진드기 또는 선충을 방제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방 및 흰불나방으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 진드기는 복숭아 혹 진딧물, 양말기 수염진딧물 및 파 혹 진딧물로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 선충은 오이 뿌리혹선충, 벼이삭선충 및 벼뿌리선충으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 추출물은 감잎을 조추출물, 극성 용매 가용 추출물, 비극성 용매에 가용한 추출물을 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 조추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매에 가용한 추출물을 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 극성 용매 가용 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 비극성 용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린 또는 부틸렌글리콜추출물을 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 임의의 기타 성분들의 첨가없이, 그 자체로서 또는 염산 및 황산과 같은 무기산, 또는 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산과의 농화학적으로 허용 가능한 염을 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 오일 스프레이, 유화 가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물, 과립, 더스트, 에어로졸, 혼연제, 증기화 가능한 제형물, 스모킹 제형물, 독성 유인물, 진드기방지용 시이트 및 수지 제형물을 포함함을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 2항에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 0.01 내지 95 중량%로 포함됨을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 2항에 기재된 살충제 조성물을 유효량으로 곤충 또는 서식지에 처리하는 단계를 포함하는 살충 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 처리 방법은 곤충에서 분무 또는 투여하는 것을 특징으로 하는 살충 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물(pheophorbide a methyl ester)을 유효성분으로 함유하는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, 이하 "ACAT"라 명명함)의 활성 저해제 또는 살충제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Enviro Net. News 2000.12.28, USA

[0003] [문헌 2] 생활과 농약, 한국작물보호학회, 2008.8

[0004] [문헌 3] 곤충생리학, 부경생, 도서출판 집현사, 1996

[0005] [문헌 4] Y.K. Kim et al., J. Antibiotics, 49, pp31-36, 1996

[0006] [문헌 5] Tomoda, H. et al., J. Antibiotics, 47(2), pp148-153, 1994

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 살충제 제조업자들과 연방 정부는 미국에서 가장 널리 사용되고 있는 디아지논(diazinon)의 실내 사용을 2001년 3월부터 단계적으로 금지하며 2003년 12월까지 모든 잔디밭, 정원 그리고 잔디용으로 사용하는 것을 금지하는 데 합의하였다. 살충제 제조업자 Syngenta와 Makhteshim Agan과 협상을 벌인 미환경보호청(EPA)에 따르면, 가정 내부용 살충제의 등록이 2001년 3월에 취소될 것이며 모든 소매가 2002년 12월에는 중단된다고 하였다. 잔디밭과 정원, 잔디용은 2003년 6월에 제조가 중단되고 모든 판매와 소매업자들로의 유통이 2003년 8월에 종결될 것이다. 합의문 발표에서 EPA는 인간의 건강과 환경, 특히 어린아이들을 커다란 위험에 노출시키는 살충제들을 없애기 위해 적극적으로 노력해 왔으며 모든 미국 국민들이 유해한 살충제에 노출되지 않고 안전한 생활을 즐길 수 있도록 조치하였다. 디아지논이 잔디밭을 비롯하여 집주변과 정원에서 가장 많이 사용되는 살충제 성분 중 하나라는 것에 EPA는 주목하였고 그 화학물질은 해충과 유충 제거를 위해 사용되고 있다. EPA는 천백만 파운드 이상에 해당하는 살충제 사용량의 75%를 폐기하는 것에 합의했다. 특히 2002년 동안 25%의 감산이 있을 것이고 2003년에는 50%의 감산이 있을 것이다. 또한 농작물 재배에 관한 20개의 다른 용도 역시 취소하는 것에 합의하는 절차를 시작하였다(Enviro Net. News 2000.12.28, USA). 그러나 유기인계, 유기염소계 농약 감축생산에 합의한 이후, 세계적으로 많은 연구진이 유기인계, 유기염소계 농약을 대체할 수 있는 환경친화적 살충제를 개발하려고 많은 노력을 하였으나 아직 고독성농약을 대체할 새로운 기작의 안전한 살충제를 개발하지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 전 세계적인 농약생산 감축회의 협정내용이 지켜지지 어려운 상황이며, 조만간에 안전한 살충제가 생산되지 않고, 사용할 살충제의 양이 부족하게 된다면 식량생산에 관련된 농업뿐만 아니라 여러 가지 산업에 어려운 문제가 대두될 것으로 예상되고 있다.

[0008] 그리고 국내의 농약시장은 2006년 통계에 의하면 총 1조600억원이고 전세계 시장과는 농약별 점유율에서 차이가 있으며, 국내는 농약 중에서 제초제 23.9%, 살충제 37.0%, 살균제 35.5%, 기타농약이 3.6%를 점유하고 있다. 그러므로 살충제는 3760억원 시장이며 점차적으로 증가추세에 있다. 최근 전 세계의 농약관련 시장동향을 분석해보면 2008년 통계에 의하면 전세계 농약시장은 396억\$이고 그중에서 살충제가 100억\$로 25.6% 차지하고 있다. 전세계적인 식량, 사료, 바이오에너지 등의 지속적인 수요로 2008년에도 높은 수준의 농산물가격을 유지시킬 것으로 보인다. 그러나 전통적인 고독성의 유기인계 유기염소계 살충제의 기피현상은 계속될 것으로 예상되고 있다(생활과 농약, 한국작물보호학회, 2008.8)

[0009] 살충제가 작용하기 위하여 곤충체내 침입경로에는 입, 피부 및 기문이 있으며, 체조직 내로 들어간 살충제가 작용점에 도달할 때 어떤 것은 분해되어 무독화되고, 어떤 것은 반대로 활성화되어 보다 강력한 독성을 지닌 물질로 변하여 일부는 기관에 축적되고 일부는 배출된다. 그리고 충체에 약제가 도달하더라도 그 전부가 살충작용에 관여하는 것은 아니고 침입시 체조직 내에서 여러 가지인자에 의하여 저항을 받기 때문에 그 일부만이 작용부위에 도달한 후 곤충 생리 및 생화학적 기능의 변화를 일으켜 치사작용을 나타낸다. 그러므로 살충제의 작용기구를 고려할 때 살충제의 작용점과 그 방법, 그리고 곤충체내에 유효한 살충제의 양을 지배하는 대사작용 등이 중요한 의미를 지니고 있다. 현재 사용되는 살충제들은 작용 기작면에서 신경 전달 저해제, 에너지 생성 저해제, 성장조절제 및 성 페르몬 유인제로 분류할 수 있으며, 그중에서 성장조절제는 유약호르몬 저해제 및 키틴 생합성 저해제로 구분할 수 있다. 신경 전달 저해제는 곤충의 신경계를 이상자극, 흥분 또는 이상 억제하여 곤충을 살충시키며, 신경 전달 저해제는 아세틸콜린에스터의 저해작용을 나타내는 살충제는 유기인계와 카바메이트(carbamate)계 화합물들이 신경화학전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소인 아세틸콜린에스터의 활성화작용을 저해하게 되면 아세틸콜린은 시냅스에 축적되어 신경전달 기능에 이상을 일으키고 경련과 마비를 일으키게 되어 곤충이 죽게 된다. 성장조절제는 곤충 표피의 구성과 키틴 생합성 저해작용에 의하여 살충효과를 나타내며, 유약호르몬 저해제와 키틴 생합성 저해제가 있다. 곤충체 내로 침입한 살충제는 각종 효소에 의하여 산화, 환원, 가수분해 등의 대사분해를 한다. 그러나 살충제 중에는 이러한 대사과정에서 해독과는 반대로 독성이 현저하게 증가하는 경우가 있다. 이러한 변화를 활성화라고 하고, 살충제에서는 산화에 의한 것이 대부분이다. 곤충의 체벽인 피부는 외골격이라 하고, 척추동물의 피부와는 달리 체형유지와 근육지지 등 구조기능 및 화학적 조성이 여러 가지 점에서 다르다. 곤충은 점진적 성장을 위하여 탈피를 하는데, 표피의 생합성과정은 생리기능상 매우 중요하다. 곤충의 피부는 표피진피 및 기저막으로 구성되어 있는데, 표피는 외표피와 원표피로 나누어져 있다. 키틴은 척추동물에는 존재하지 않고 곤충 표피의 주요 구성성분으로서 탈피저해제인 살충제에 의하여 이 키틴 생합성을 저해하면 곤충은 탈피를 못하여 죽게 된다. 성 페르몬 유인제는 곤충의 암컷에서 분비되는 페르몬을

이용하여 슛컷을 유도 포획하여 죽이는 것이다. 그러나 현재 성 페르몬 유인제는 아직 야외포장시험에서는 그다지 효력을 나타내지 못하고 있다. 종래의 살충제는 기계유화제를 사용하여 충체 표면을 덮어 질식사시키는 물리적 치사작용을 일으키는 것도 있지만, 현재 사용되는 대부분의 살충제는 생명유지에 기본적 역할을 하는 신경계나 에너지 생성계의 효소에 작용하는 것들이 주종을 이루고 있다. 최근에는 표피층을 형성하는 키틴의 생합성을 저해하거나 유약 호르몬의 생성을 저해하는 곤충 특유의 기능에 작용하는 살충제를 개발 중에 있다. 곤충이 생육과정에서 세포막의 생성, 표피층의 왁스성분 및 혈림프에서의 지방수송 등에 스테롤이 필수 불가결하다고 알려졌으며, 실제로 대부분의 곤충들은 스테롤을 이용하는 과정에서 콜레스테롤 대신에 22-데히드로콜레스테롤(22-dehydrocholesterol)이나 7-데히드로에르고스테롤(7-dehydroergosterol)로 대체가 가능하고 또한 이러한 화합물을 곤충학적으로는 대체화합물이라 한다. 그러나 탈피호르몬 합성에 관여하는 스테롤은 콜레스테롤만 이용 가능하고 대체화합물은 이용할 수 없다고 알려졌다(곤충생리학, 부경생, 도서출판 집현사, 1996).

- [0010] 많은 연구자들에 의하여 곤충의 생리 관련연구가 분자생물학적 방법을 이용하여 대사 관련 효소나 수용체에 대한 연구가 부분적으로 밝혀지고 있으나 호르몬의 이동이나 스테롤의 저장에 관련된 연구결과는 그다지 되어 있지 않다.
- [0011] 대부분의 곤충들은 스테롤 합성능력이 없으므로 스테롤을 외부로부터 섭취하여야 하는 필수 영양분으로 요구되며 대부분 많은 곤충들은 식물성스테롤을 먹어 체내에서 콜레스테롤로 전환시켜 이용하고, 일부 육식성 곤충들은 타곤충을 잡아먹어 스테롤을 충당하기도 한다. 콜레스테롤은 탈피호르몬을 합성하는데 필수적이며 세포막을 형성하는데도 인지질과 함께 필수적으로 관여하며 여러 가지 생리작용에 관여하고 있다.
- [0012] 한편, 인간과 가축들에서는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제는 콜레스테롤의 아실화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 초저밀도 지단백질의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 저장형인 아실화된 콜레스테롤의 축적에 관여하여 동맥경화 진전에도 관여하는 효소로 알려져 있어 새로운 대사기작의 신약 개발 연구가 진행 중에 있으며 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제 저해제들은 대다수가 유기 화학적으로 합성된 우레아, 아미드, 페놀계의 합성화합물들이 주종을 이루고 있다. 그 중에서는 *in vivo* 활성시험을 마치고 동맥경화 예방치료제로 사용하기 위하여 전 임상 단계 시험 중인 의약품 후보물질은 있으나, 아직까지 임상에 사용되고 있는 것은 없다.
- [0013] 이에 본 발명자들은 유충의 스테롤대사에서 저장형 스테롤 또는 각종 호르몬 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 스테롤 아실화 효소를 조절하면 곤충의 유충의 생리에 영향을 미친다는 새로운 개념의 목표 지향적인 탐색계를 사용하여, 천연자원인 감잎 추출물로부터 새로운 효소저해 활성물질을 탐색하였고, 탐색된 활성물질을 분리 정제하여 구조를 규명하였으며, 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 유충에 처리한 결과 살충 활성을 나타남을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

- [0014] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터(Pheophorbide A Methyl ester)를 유효성분으로 함유하는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제(Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase)의 활성 저해제를 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 감잎 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스터를 유효성분으로 함유하는 살충제 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 상기 살충제 조성물을 유효량으로 곤충 또는 서식지에 처리하는 단계를 포함하는 살충방법을 제공한다.
- [0017] 본원에서 정의되는 페어포비드 에이 메틸에스터는 감잎 추출물로부터 추출분리 및 정제됨을 특징으로 한다.
- [0018] 본원에서 정의되는 추출물은 감잎을 조추출물, 극성 용매 가용 추출물, 비극성 용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0019] 본원에서 정의되는 상기 조추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매, 보다 바람직하게는, 50 내지 90% 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0020] 본원에서 정의되는 상기 극성 용매 가용 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직

하계는 물에 가용한 추출물을 포함한다.

- [0021] 본원에서 정의되는 상기 비극성 용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린 또는 부틸렌글리콜, 바람직하게는 에틸아세테이트 가용 추출물을 포함한다.
- [0022] 본원에서 정의되는 상기 살충제는 해충의 유충, 진드기 또는 선충을 방제하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본원에서 정의되는 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 및 흰불나방으로부터 선택된 것임을 특징으로 한다.
- [0024] 본원에서 정의되는 상기 진드기는 복숭아 혹 진딧물, 양말기 수염진딧물, 및 과 혹 진딧물로부터 선택된 것임을 특징으로 한다.
- [0025] 본원에서 정의되는 상기 선충은 오이 뿌리혹선충, 벼이삭선충, 및 벼뿌리선충으로부터 선택된 것임을 특징으로 한다.
- [0026] 본원에서 정의되는 상기 살충 방법은 곤충에게 분무 또는 투여하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 이하, 본 발명의 감잎 추출물 및 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명의 추출물은 감잎을, 세척, 음건건조 및 세절한 후, 추출용매로서 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매를 건조된 감잎 중량의 약 1 내지 5배, 바람직하게는 2 내지 4배를 가하여, 5 내지 70℃, 바람직하게는 10 내지 30℃에서, 더 바람직하게는 실온에서 1일 내지 20일, 바람직하게는 2일 내지 5일 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등, 바람직하게는 냉침추출법으로 추출한 후 여과하고 감압 농축하여 본 발명의 감잎 조추출물을 수득하는 제 1단계;
- [0029] 상기에서 얻은 감잎의 조추출물을 중량의 1 내지 5배, 바람직하게는 2 내지 4배 부피(v/w)의 물에 현탁시킨 후, 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 순차적으로 물과 동량 부피를 가하여 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 등의 비극성 용매에 가용하여 비극성 용매 가용 추출물을 수득하는 제 2단계;
- [0030] 상기 제 2단계의 추출물을 감압농축하고, 클로로포름:메탄올(100:0~0:100 (v/v))로 구성된 단계농도 구배(step gradient) 용매 시스템을 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 실시하여 분획하는 제 3단계;
- [0031] 상기 제 3단계의 분획을 용출용매(CHCl₃:MeOH=1:1)를 이용하여 세파텍스 엘에이치-20크로마토그래피를 실시하여 최종분획을 수득하는 제 4단계;
- [0032] 상기 제 4단계의 최종분획을 용출용매(메탄올:물=98:2)를 이용하여 HPLC를 실시하고, 자외선 분광기 상에서 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 분리하는 제 5단계의 제조 공정을 통해 본 발명의 감잎 추출물로부터 순수 분리된 화합물을 수득할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 상기의 제조방법으로 얻어진 감잎 추출물 또는 이로부터 분리된 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 유효성분으로 함유하는 아실 코에이:콜레스테롤 아실 트랜스퍼라제의 활성 저해제를 제공한다.
- [0034] 또한 본 발명은 감잎 추출물 또는 이로부터 분리된 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 유효성분으로 함유하는 살충제 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 감잎 추출물 또는 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 임의의 기타 성분들의 첨가없이, 그 자체로서 또는 염(염산 및 황산과 같은 무기산, 또는 p-톨루엔술포산과 같은 유기산과의 농화화적으로 허용가능한 염)의 형태로 사용될 수 있다. 그러나 본 발명의 추출물 또는 화합물은 통상 고체 담체, 액체 담체, 기체 담체 또는 유인물(bait)과 혼합하거나, 염기성 물질, 예컨대 다공질 세라믹 플레이트 또는 부직포에 흡수시킨 후, 계면활성제 및 필요한 경우, 기타 보조제들을 첨가하여, 이를 각종 형태들, 예컨대 오일 스프레이, 유화 가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물, 과립, 더스트, 에어로졸, 혼연제, 증기화 가능한 제형물, 스모킹 제형물, 독성 유인물, 진드기방지용 시이트 또는 수지 제형물로 제형할 수 있다.
- [0036] 상기 각 제형물들은 통상 유효성분으로서 하나 이상의 본 추출물 또는 화합물을 0.01 내지 95 중량% 함유할 수 있다.

- [0037] 제형물에 사용될 수 있는 고체 담체에는, 카올린 점토, 규조토, 합성 수화된 산화규소, 벤토나이트 및 산점토 등의 점토 물질의 미세 분말 또는 과립; 각종 탈크, 세라믹 및 기타 무기 물질, 예컨대 건운모, 석영, 황, 황성탄, 탄산칼슘 및 수화된 실리카; 및 화학적 비료, 예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아 및 염화암모늄이 포함될 수 있다.
- [0038] 액체 담체에는 물, 메탄올, 에탄올, 케톤, 아세톤, 메틸 에틸 케톤, 톨루엔, 자일렌, 에틸벤젠 및 메틸나프탈렌, 헥산, 시클로헥산, 케로신 및 라이 에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 아세토니트릴, 이소부티르니트릴, 디이소프로필에테르, N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, 디클로로메탄, 트리클로로에탄, 사염화탄소, 디메틸 술폰, 대두유 및 면실유가 포함될 수 있다.
- [0039] 기체 담체 또는 추진제(propellant)에는, 프레온 가스, 부탄 가스, LPG(액화 석유 가스), 디메틸에테르 및 이산화탄소가 포함될 수 있다.
- [0040] 독성 유인물에 사용되기 위한 염기 물질에는, 유인물 물질, 예컨대 그레인 분말, 식물성 오일, 슈거 및 결정성 셀룰로스, 디부틸히드록시톨루엔 및 노르디히드로구아아아레트산, 데히드로아세트산, 고추 분말, 치즈 풍미 및 양파 풍미가 포함될 수 있다.
- [0041] 계면활성제에는, 알킬 술페이트, 알킬 술포네이트, 알킬 아릴술포네이트, 알킬 아릴 에테르 및 그것의 폴리옥시 에틸렌 유도체, 폴리에틸렌 글리콜 에테르, 다가 물 에스테르 및 당 물 유도체가 포함될 수 있다.
- [0042] 접착제 또는 분산제와 같은 보조제에는, 카세인, 젤라틴, 전분, 아라비아검, 셀룰로스 유도체, 알긴산, 벤토나이트, 슈거, 폴리비닐 물, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리아크릴산이 포함될 수 있다.
- [0043] 안정화제에는, PAT(이소프로필 산 포스페이트), BHT(2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀), BHA(2-tert-부틸-4-메톡시페놀 및 3-tert-부틸-4-메톡시페놀의 혼합물), 식물성 오일, 미네랄 오일, 계면활성제, 지방산 및 그것의 에스테르가 포함될 수 있다.
- [0044] 본 화합물이 농업용 살충제, 살진드기제 또는 살선충제로 사용될 경우, 그것들의 적용량은 통상 10 에이커 당, 0.1 내지 100 g이다. 물로 희석한 후 사용되는 유화가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물 및 기타 유사 제형물들의 경우, 그 적용 농도는 통상 1 내지 1,000 ppm의 범위이다. 과립, 더스트 또는 기타 유사 제형물의 적용은, 희석하지 않은 제형물로서 수행된다. 본 발명의 화합물을 유행병 예방을 위한 살진드기제 또는 살선충제로서 사용할 경우, 그것들은 유화가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물 또는 기타 유사 제형물의 경우, 물로 농도 0.1 내지 500 ppm으로 희석하거나, 그것들을 오일 스프레이, 에어로졸, 혼연제, 독성 유인물, 진드기방지용 시이트 또는 기타 유사 제형물의 경우에는, 그대로 적용된다. 이 적용 양 및 농도는, 제형물의 형태, 적용 시기, 장소 및 방법, 해충의 종류, 손해 정도 및 기타 요인들에 따라 다를 수 있으므로, 상기 범위에 한정되지 않고, 증감 가능하다.
- [0045] 본 조성물을 소 및 돼지 등의 가축, 또는 고양이 및 개 등의 애완동물의 기생충 방제를 위한 살진드기제로 사용할 경우, 그 조성물 또는 이의 염을 공지된 수의학적 방법들, 예컨대 계통적 방제를 위한 정제, 캡슐, 침액용 용액, 볼리(boli), 먹이 혼입, 좌약 또는 주사제; 또는 유성 또는 수성 용액의 분무, 주입(붓기 또는 점적) 처리로써, 또는 비계통적 방제를 위해 칼라 및 귀 태크(꼬리표)와 같은 적절한 모양으로 만든 성형품을 이용하여 적용할 수 있다. 이 경우, 본 화합물은 통상 숙주 체중 kg 당, 1 내지 100 mg의 양으로 적용된다.
- [0046] 본 화합물은, 다른 살충제, 살선충제, 살진드기제, 살세균제, 살진균제, 제초제, 식물 성장 조절제, 시너지스트, 비료, 토양 컨디셔너 및 동물 사료와 함께, 혹은 그것들과 별도로 하되 동시에 사용될 수 있다.

효 과

- [0047] 본 발명의 감염 추출물 또는 페어포비드 에이 메틸에스테르 화합물이 곤충 유충의 체내에서 곤충이 필수적으로 필요로 하는 스테롤 대사들을 억제하여 살충 작용을 하는 기작을 확인하고, 스테롤 대사기작 저해는 인축에 해가 없음을 확인함으로써, 고독성농약을 사용할 수 없는 실내원예용 살충제와 농약살포에 어려운 그린하우스 등에서 유해 선충류를 포함한 유충들, 또한 종래 살충제에 대한 저항성이 강해진 유충의 효소 활성 저해제 및 안전성이 우수한 살충제로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명을 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0049] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] **실시예 1. 감잎 추출물의 제조**
- [0051] 1-1. 감잎 조추출물의 제조
- [0052] 대전 근교 보문산 계곡에서 채집한 감잎을 식물분류 전문가의 검증을 받은 후, 물로 세척하여 그늘에서 7일 동안 건조하여 잘게 썰어 실험에 사용하였다. 건조된 감잎 2 kg에 5배 용량의 70% 에탄올을 넣고 3일간 실온에서 냉침시킨 후, 여과지로 여과하고, 그 여액을 30℃ 이하의 온도에서 감압농축기(EYELA, N-1000 Model)로 감압 농축하여 300 g의 감잎 조추출물을 얻었다(이하, "DK"라 명명함).
- [0053] 1-2. 감잎 헥산 추출물의 제조
- [0054] 상기 실시예 1-1의 감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 헥산을 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 헥산층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회 반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 헥산 추출물 12 g(이하, "DKH"라 명명함)을 수득하였다.
- [0055] 1-3. 감잎 클로로포름 추출물의 제조
- [0056] 상기 실시예 1-1의 감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 클로로포름을 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 클로로포름층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회 반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 클로로포름 추출물 15 g(이하, "DKC"라 명명함)을 수득하였다.
- [0057] 1-4. 감잎 에틸아세테이트 추출물의 제조
- [0058] 상기 실시예 1-1의 감잎의 조추출물 100 g을 1000 ml의 물에 현탁시킨 후, 5000 ml의 분획깔대기에 넣은 다음, 동량의 에틸아세테이트를 가하여 잘 섞이도록 흔들어 물층과 에틸아세테이트층으로 분리하였으며, 이 과정을 각각 3회 반복하였다. 감압, 농축 및 건조하여 감잎의 에틸아세테이트추출물 25 g 에틸아세테이트를 수득하였고 추출되고 남은 물층을 감압 농축하여 75 g (이하, "DKW"라 명명함)을 수득하였다.
- [0059]
- [0060] **실시예 2. 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물의 분리**
- [0061] 상기 실시예 1의 ACAT 저해 활성이 가장 높았던 에틸아세테이트 분획물(DKE)을 감압농축하여 얻은 농축액 300 g을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 하기 위하여 실리카겔 1,500 g을 클로로포름:메탄올=100:1 혼합 용액을 사용하여 칼럼 (10x50 cm)에 충전한 후, 활성성분 분획을 적량의 실리카겔에 흡착시키고 충전한 컬럼 위에 얹어 놓고 클로로포름:메탄올(100:0~0:100(v/v))을 용출용매로 사용하여 1회의 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 활성분획을 모아 1 g을 분리하였다.
- [0062] 상기 활성분획을 용출용매(CHCl₃:MeOH=1:1)를 이용하여 세파텍스 엘에이치-20크로마토그래피를 실시하여 활성분획 0.3 g을 수득하였다. 최종 활성분획을 용출용매(메탄올:물=98:2)를 이용하여 고성능액체크로마토그래피(SHIMADZU)를 실시하고, 자외선분광검출기(SHIMADZU, Diode array detector)상에서 순수 활성물질 3.8 mg을 수득하였다. 상기 수득한 화합물은 고속원자 충격 질량분석법(FAB-MS, Vacuum Generator spectrometer, VG70-VSEQ), 수소핵자기공명 분석법(¹H-NMR, 500MHz, Varian Unit 500 spectrometer) 및 탄소핵자기공명 분석법(¹³C-NMR, 125MHz, Varian Unit 500 spectrometer)을 이용하여 동정하여 하기 물성치를 갖는 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 수득하여 본 발명의 시료로 사용하였다.
- [0063] 효소 저해 활성물질은 13.4 분에 용출된 부분이었다.
- [0064] UV_{max}: 408 nm 와 666 nm;
- [0065] FAB-MS (⁺) Mass (m/z): 593 [M+H]⁺;

[0066] HRFAB-MS (m/z) 593.2767;

[0067] ^1H NMR(CDC $_3$): δ 1.52 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-31), 1.72 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-25), 2.15 (2H, m, 2-H), 2.54 (2H, m, 1-H), 3.00 (3H, s, H-29), 3.23 (3H, s, H-26), 3.44 (2H, q, $J=7.3$ Hz, H-30), 3.53 (3H, s, H-32), 3.78 (3H, s, H-34), 4.11 (1H, m, H-3), 4.34 (1H, dq, $J=7.2, 1.9$ Hz, H-4), 6.01 (1H, dd, $J=17.8, 1.2$ Hz, Ha-28), 6.14 (1H, dd, $J=11.5, 1.2$ Hz, Hb-28), 6.14 (1H, s, H-21), 7.77 (1H, dd, $J=17.8, 11.5$ Hz, H-27), 8.43 (1H, s, H-6), 9.13 (1H, s, H-11), 9.29 (1H, s, H-16), -1.92 (br, s, NH);

[0068] ^{13}C -NMR: δ 189.56 (s, C-20), 178.05 (s, C-35), 172.03 (s, C-5), 169.60 (s, C-33), 161.06 (s, C-23), 155.56 (s, C-12), 150.88 (s, C-15), 149.61 (s, C-24), 145.09 (s, C-14), 142.00 (s, C-7), 137.86 (s, C-17), 136.43 (s, C-13), 136.15 (s, C-10), 136.06 (s, C-9), 131.79 (s, C-8), 128.95 (s, C-18), 128.95 (s, C-19), 128.95 (d, C-27), 122.65 (t, C-28), 105.11 (s, C-22), 104.31 (d, C-16), 97.43 (d, C-11), 93.06 (d, C-6), 64.64 (d, C-21), 52.85 (q, C-34), 51.01 (d, C-3), 50.07 (d, C-4), 30.82 (t, C-1), 29.54 (t, C-2), 23.09 (q, C-25), 19.32 (t, C-30), 17.33 (q, C-31), 12.05 (q, C-32), 12.01 (q, C-26), 11.10 (q, C-29).

[0069] 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 포르핀계 화합물 구조에서 가장 특징적인 C 고리의 불포화된 클로린 고리(chlorin ring)의 비닐기의 메틴 수소 (vinyl methine proton)가 가장 저자장인 δ 9.29, 9.13 및 8.43에서 관찰됨으로써 확인되었다.

[0070] 또한, C-4, C-8, C-13, C-18에 각각 결합하고 있는 메틸기의 수소(methyl proton)가 각각 δ 1.72, 3.23, 3.00 및 3.53을 나타내고, C-14에 결합하고 있는 에틸기의 수소(ethyl proton)가 δ 3.44 및 1.52에서 보이고, 말단에 하나의 올레핀기의 수소(olefinic proton)인 28-H가 δ 6.01에서 28-H과 연결된 또 하나의 올레핀기의 수소(olefinic proton)인 27-H가 δ 7.77에서 나타났다.

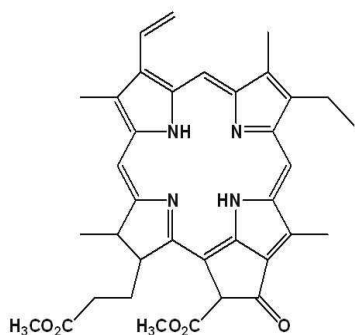
[0071] 포르핀 구조에서 또 다른 특징인 구조 내부의 -NH의 수소 피크가 δ -1.92에서 관찰됨으로써, 포르핀 내부의 수소는 자기장 영역내에 강하게 차단되어 있음을 확인할 수 있다.

[0072] 도 3는 하기 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 분극이동에 의하여 왜곡되지 않는 것을 이용한 DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 스펙트럼(CDC $_3$, 125.75 MHz)을 나타낸 것으로, 6개의 메틸, 3개의 메틸렌(methylene), 3개의 메틴(metine), 1개의 sp^2 메틸렌(methylene), 4개의 sp^2 메틴(metine), 15개의 sp^2 4 급 탄소, 3개의 카르보닐기의 탄소가 관찰되었다.

[0073] 도 4는 하기 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 HMBC(^1H - ^{13}C -heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)를 나타낸 것으로, δ 2.54 (2H, m, 1-H) 메틸렌으로부터 δ 178.05 (s, C-35), 51.01 (d, C-3) 및 29.54 (t, C-2) 탄소로의 상관성, 2.15 (2H, m, 2-H) 메틸렌으로부터 δ 178.05 (s, C-35), 161.06 (s, C-23), 51.01 (d, C-3), 50.07 (d, C-4) 및 30.82 (t, C-1) 탄소로의 상관성, 4.11 (1H, m, H-3) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 161.06 (s, C-23), 50.07 (d, C-4), 30.82 (t, C-1), 29.54 (t, C-2) 및 23.09 (q, C-25) 탄소로의 상관성, 4.34 (1H, dq, $J=7.2, 1.9$ Hz, H-4) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 161.06 (s, C-23), 51.01 (d, C-3), 29.54 (t, C-2) 및 23.09 (q, C-25) 탄소로의 상관성, 1.72 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-25) 메틸로부터 172.03 (s, C-5), 51.01 (d, C-3) 및 50.07 (d, C-4) 탄소로의 상관성, 8.43 (1H, s, H-6) 메틴으로부터 172.03 (s, C-5), 142.00 (s, C-7), 131.79 (s, C-8) 및 50.07 (d, C-4) 탄소로의 상관성, 3.23 (3H, s, H-26) 메틸로부터 142.00 (s, C-7), 136.06 (s, C-9) 및 131.79 (s, C-8) 탄소로의 상관성, 7.77 (1H, dd, $J=17.8, 11.5$ Hz, H-27) 메틴으로부터 136.15 (s, C-10), 136.06 (s, C-9), 131.79 (s, C-8) 및 122.65 (t, C-28) 탄소로의 상관성, 6.01 (1H, dd, $J=17.8, 1.2$ Hz, Ha-28), 6.11 (1H, dd, $J=11.5, 1.2$ Hz, Hb-28) 메틸렌으로부터 136.06 (s, C-9) 및 128.95 (d, C-27) 탄소로의 상관성, 9.13 (1H, s, H-11) 메틴으로부터 155.56 (s, C-12), 136.43 (s, C-13), 136.15 (s, C-10) 및 136.06 (s, C-9), 탄소로의 상관성, 3.00 (3H, s, H-29) 메틸로부터 155.56 (s, C-12), 145.09 (s, C-14) 및 136.43 (s, C-13) 탄소로의 상관성, 3.44 (2H, q, $J=7.3$ Hz, H-30) 메틸렌으로부터 150.88 (s, C-15), 145.09 (s, C-14), 136.43 (s, C-13) 및 17.33 (q, C-31) 탄소로의 상관성, 1.52 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-31) 메틸로부터 145.09 (s, C-14) 및 19.32 (t, C-30) 탄소로의 상관성, 9.29 (1H, s, H-16) 메틴으로부터 150.88 (s, C-15), 145.09 (s, C-14), 137.86 (s, C-17) 및 128.95 (s, C-18) 탄소로의 상관성, 3.53 (3H, s, H-32) 메틸로부터 137.86 (s, C-17) 및 128.95 (s,

C-19) 탄소로의 상관성, 6.14 (1H, s, H-21) 메틴으로부터 189.56 (s, C-20), 169.60 (s, C-33), 161.06 (s, C-23), 149.61 (s, C-24), 128.95 (s, C-19) 및 105.11 (s, C-22) 탄소로의 상관성 그리고 3.78 (3H, s, H-34) 메틸로 부터 169.60 (s, C-33) 탄소로의 상관성이 관찰되었다.

화학식 1



[0074]

[0075] 상기 화학식 1은 본 발명의 방법으로 최종적으로 분리 및 정제된 화합물의 구조를 나타낸 것으로서, 자외선 분광검출기로 측정한 결과, 포르피계 화합물의 특성 피크인 가시영역에서 408 nm 및 666 nm의 피크가 관찰되고, 짙은 녹색을 보임으로써 화합물의 구조 내 포르핀 고리의 존재를 확인할 수 있다. 또한, 분자량([M+H]⁺)을 측정한 결과는 607.2 m/z이며, 이것은 이론적 계산치와 0.3 mD의 오차를 보였고, 고분해 FAB-MS의 측정한 결과, 분자식이 C₃₈H₄₀O₆N₄로 예상되었다.

[0076] 상기의 분석 결과로부터 본 발명의 감잎에서 추출하여 얻어 분리 및 정제한 화합물이 클로린 거대고리(chlorin macrocycle) 구조를 갖는 포르피계의 화합물로 결정할 수 있고, 본 발명에서 얻은 화합물이 화학식 1로 표시되는 포르피계 화합물의 페어포비드 에이 메틸에스터(pheophorbide A methyl ester)임을 확인하였다.

[0077] 참고예 1. ACAT 효소원의 제조

[0078] 시험에 사용된 ACAT 효소원으로 흰쥐(Male Sprague-Dawley rats 250~300 g)의 간을 분리하여 마이크로솜 완충용액 A(0.25 M 슈크로오스(sucrose), 1 mM EDTA, 0.01 M 트리스-염산, pH 7.4)으로 세척하고 가위로 1~2 cm³ 크기로 세절하여 테프론-유리로 이루어진 균질화기(homogenizer, IWAKI, 7720 HMOGT, ASAHI TECHNO GLASS SCITTECH. DIV)로 빙냉하에서 5분 동안 균질화하였다. 상기 균질액을 14,000×g에서 15분동안 원심분리(Beckman, JS-21M)하여 상등액을 모아 다시 100,000×g에서 1시간동안 초고속 원심분리(Beckman, L8-80M)하였다. ACAT 효소 활성이 포함된 마이크로솜(microsome)을 분리하기 위해 초고속 원심분리한 침전물에 마이크로솜 완충용액 B (0.25 M 슈크로오스, 0.01 M 트리스-염산, pH 7.4)를 2배량을 가하여 잘 섞어 다시 현탁시킨후 100,000×g에서 1시간동안 다시 원심분리하였다.

[0079] 시험시 효소원의 단백질 농도를 표준화하기 위하여 단백질함유량을 측정하였는데, 원심분리된 침전물에 마이크로솜 완충용액 B를 적당히 가하여 용해시키고 단백질 표준물질로 소혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma, A1653)을 사용하고 단백질측정 키트(Biorad DC protein Assay kit)에 의하여 단백질 농도를 결정한 후, 마이크로솜 완충용액 B로 희석하여 단백질 농도를 10 mg/ml로 조정하여 2 ml 바이알에 1 ml씩 분주하여 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0080] 실험예 1. ACAT 효소 활성 측정

[0081] 본 발명의 포르피계의 페어포비드 에이 메틸에스터에 의한 ACAT 효소 저해 활성을 실험하였다. ACAT 효소 활성

은 $[1-^{14}\text{C}]$ 올레오일-코에이와 콜레스테롤을 기질로 하고, 하기의 공지된 방법을 일부 수정하여 측정하였다(Y. K.Kim, et al., *J. Antibiotics*, 49, 31-36, 1996).

[0082] 반응 용액으로는 상기 실시예 1의 시료액 10.0 μl , 쥐에서 채취한 간 조직의 마이크로솜 효소원(liver microsomal enzyme) 4.0 μl , 표준 완충용액(assay buffer)[0.5 M KH_2PO_4 , 10 mM DTT(Dithiothreitol), pH 7.4] 20.0 μl , 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, Sigma, A1653)은 검색계에 필요 이상의 지방산이 들어가지 않도록 필수지방산이 특별히 제거된(essentially fatty acid free) 특급으로 40 mg/ml의 15.0 μl , 20 mg/ml의 콜레스테롤 2.0 μl , 증류수 41.0 μl 를 가하여 잘 섞어 37°C에서 20분간 예비 반응을 실시하였다.

[0083] 상기 반응액에 8.0 μl 의 $[1-^{14}\text{C}]$ 올레오일-코에이(0.05 μCi , 최종농도 10 μM)를 첨가하여 다시 37°C에서 25분간 본 반응시킨 후, 1 ml의 이소프로판올:헵탄=4:1(v/v)을 가하여 효소반응을 정지시켰다. 0.6 ml의 헵탄과 5배로 희석한 표준 완충용액 0.4 ml를 첨가하여 원심분리하였다.

[0084] ACAT 효소 활성의 측정은 원심분리하여 얻은 분리층중에서 반응생성물을 함유하는 100 μl 의 상층액에 3 ml의 신틸레이션 콕테일(scintillation cocktail, Lipoluma, Lumac Co.)을 첨가한 후, 리퀴드 신틸레이션 카운터(liquid scintillation counter, Beckman, LS-6000TA)를 이용하여 방사능량 (radioactivity)을 측정하였다.

[0085] ACAT 효소 활성 저해도는 방사능으로 표지한 기질 및 효소에 검색시료를 넣어 반응결과물의 방사능량을 사용하여 계산하였고, 하기 수학적 식 1을 이용하여 ACAT 효소 활성 저해도를 계산하였다.

수학적 식 1

[0086] % 활성저해도= $100 \times [1 - \{ \text{CPM}(\text{T}) - \text{CPM}(\text{C}2) / \text{CPM}(\text{C}1) - \text{CPM}(\text{B}) \}]$

[0087] CPM(T): 시료 및 효소를 첨가하였을 때 CPM(counter per minute);

[0088] CPM(C1): 시료는 첨가하지 않고, 효소는 첨가하였을 때 CPM;

[0089] CPM(C2): 시료는 첨가하고, 효소는 첨가하지 않았을 때 CPM;

[0090] CPM(B): 시료 및 효소를 첨가하지 않았을 때 CPM

[0091] 이때, 모든 반응은 0°C에서 실시하였고, 양성 대조군으로는 오보바톨(obovato1)을 사용하였다(Planta Med. 63, pp550-551, 1977).

[0092] 상기 수학적 식 1을 이용하여 ACAT 효소 저해 활성을 측정하여 평균값 $\pm$ S.D으로 나타낸 결과, 양성 대조군인 오보바톨(obovato1)의 IC_{50} (Inhibition Concentration) 값은 44 μM 이었고, 본 발명의 페어포비드 에이 메틸에스터의 IC_{50} 값은 2.2 μM 로 나타났으며, 사용된 페어포비드 에이 메틸에스터의 농도에 의존하여 ACAT 효소 저해 활성을 보였다(도 6 참조).

표 1

[0093]

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

[0094] 상기의 결과로부터, 본 발명의 포르핀계 페어포비드 에이 메틸에스터에 대한 ACAT 효소 활성 저해도를 측정한 결과, 농도 의존적으로 저해 활성을 보이고, IC_{50} 값이 2.2 μM 로서, 양성 대조군보다 강력한 ACAT 저해

효과를 확인하였다.

[0095] 또한, 상기 실시예 1에서 수득한 각각의 분획물의 ACAT 저해 활성을 측정한 결과, DKH(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 40%, DKC(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 20%, DKE(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 60%, DKW (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 10%의 ACAT 저해 활성을 보였다.

[0096] 따라서, 본 발명의 포르핀계 페어포비드 에이 메틸에스터 및 이를 포함하는 감잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 효소 활성 저해 및 살충작용을 하는 기작이 확실하고, 스테롤 대사가작 저해는 인축에 해가 없으므로 안심하고 사용할 수 있는 환경 친화적인 우수한 살충제 조성물로 사용할 수 있다.

[0097] 실험예 2. 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.)유충에 대한 활성시험

[0098] 본 발명은 2006년 9월 충청북도 청주시 충북대학교 농업생물환경대학 농생물과에서 시험곤충으로 배추좀나방 90마리를 사용하여 살충실험을 하였다. 본 발명의 ACAT 효소 저해활성을 가진 페어포비드 에이 메틸에스터 화합물을 정밀하게 무게를 측정하여 아세톤에 적정량을 녹인 후 트리톤X-100 100 ppm 수용액 9배와 혼합하여 순차적으로 희석하고 처리할 활성검색물질 용액을 조제하였다. 배추좀나방 유충의 먹이는 균일한 발육상태의 양배추잎을 잎 디스크(지름 3.0 cm)로 잘라 준비된 활성검색물질 용액에 30초간 충분히 잠길 정도로 침적한 후 꺼내 후드 내에서 60분간 건조하였다. 증류수로 적신 여과지가 깔린 페트리디쉬(55×20 mm)에 활성검색물질이 처리된 잎을 올려놓고, 배추좀나방 2령 유충을 충체가 상하지 않도록 부드러운 붓으로 유충을 이동시켜 10 마리씩 3반복으로 접종하였다. 활성검색물질이 처리된 배추좀나방 유충은 항온실(25±1℃, 상대습도 40-45%, 16L:8D)에서 사육하며 24, 48 시간의 살충률을 조사하였다. 무처리구는 처리된 추출물을 제외한 아세톤 10% 용액에 트리톤 X-100 100 ppm 수용액 9 배를 처리하여 활성검색물질 처리방법과 같은 방법으로 처리하였다.

[0099] 활성검색실험은 3반복으로 실시하였고 이에 대한 결과를 표 2에 나타내었다. 상기 실시예 1-1에서 수득한 감잎 추출물(DK)을 10 mg/ml씩 배추좀나방 유충에 처리하고 1일 간격으로 4일간 살충정도를 측정하였을 때 대조군과 비교하여 지속적인 살충현상이 나타났으며 농도, 시간 의존적으로 살충효과가 나타났다.

표 2

[0100]

	1DAT ^a (%)	2DAT ^b (%)	ACAT 저해활성 ^c (%)
DK	38.7±17.5	76.8±18.4	55.0
^a 10 mg/ml, 24시간 동안 노출			
^b 처리 후 일자			
^c 최종농도: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$			

[0101] 실험예 3. 실험용 생쥐에 대한 경구투여 급성독성 시험

[0102] 상기 화학식 1의 페어포비드 에이 메틸에스터를 임상적으로 활용하기 위하여 하기와 같은 방법으로 급성독성을 조사하였다.

[0103] 6 주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 군당 5 마리씩으로 나누어 본 발명의 페어포비드 에이 메틸에스터를 0.5% 메틸셀룰로오즈 용액에 현탁하여 0.1 g/kg의 용량으로 단회 경구투여 하였다. 투여 후 동물의 폐사 여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

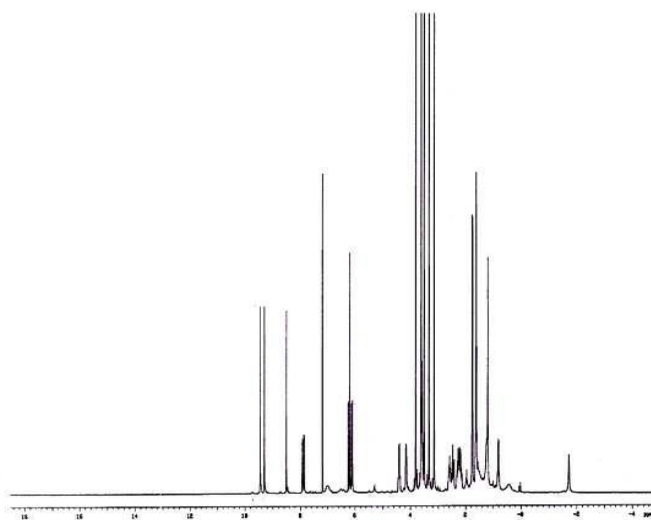
[0104] 그 결과 본 발명의 화학식 1의 페어포비드 에이 메틸에스터를 투여한 동물에서는 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며 체중변화, 혈액생화학적 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다(Tomoda, H. *et. al. J. Antibiotics* 47(2), pp148-153, 1994). 실험한 상기 화합물은 랫트에서 0.1 g/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며 경구투여 최소치사량(LD₅₀)은 0.1 g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

도면의 간단한 설명

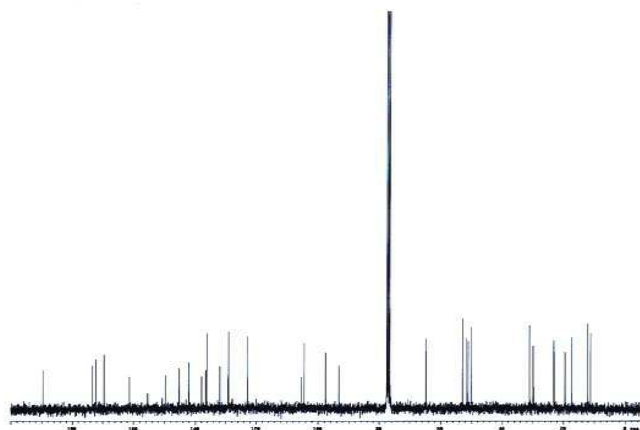
- [0105] 도 1은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 수소-핵자기공명 스펙트럼 (CDCl_3 , 500.13 MHz)을 나타낸 도이고,
- [0106] 도 2은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 탄소-핵자기공명 스펙트럼(CDCl_3 , 125.75 MHz)을 나타낸 도이고,
- [0107] 도 3는 본 발명의 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 DEPT 스펙트럼(CDCl_3 , 125.75 MHz)을 나타낸 도이고,
- [0108] 도 4는 본 발명의 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 HMBC를 나타낸 도이고,
- [0109] 도 5은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 포르핀계 화합물인 페어포비드 에이 메틸에스터의 ACAT 저해 활성을 나타낸 도이다.

도면

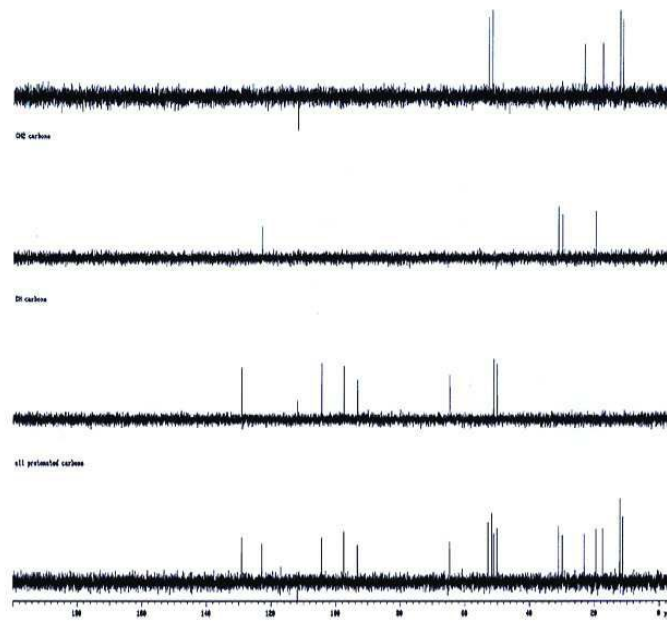
도면1



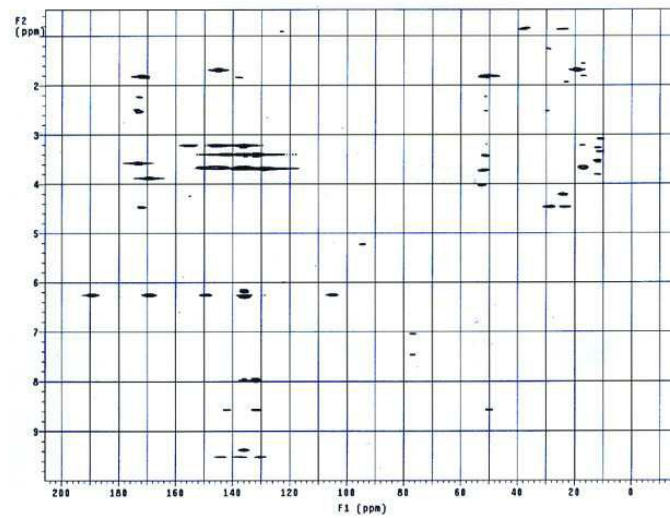
도면2



도면3



도면4



도면5

