

커스타드애플 (*Annona reticulata* L.) 씨 추출물과 그 분획물의 살충활성

신속현^{1,3} · 최근형¹ · 최달순¹ · 권오경¹ · 임건재¹ · 박재음¹ · 최병렬² · 김태완³ · 김진호^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 유해화학과, ²국립농업과학원 곤충산업과, ³한경대학교 식물생명자원과학부

Insecticidal activity of the crude extract and its fractions of Custard apple (*Annona reticulata* L.)

Suk-Hyun Shin,^{1,4} Geun-Hyoung Choi,¹ Dal-Sun Choi,¹ Oh-Kyung Kwon,¹ Geon-Jae Im,¹ Jae-Up Park,¹ Byung-Ryul Choi,² Tae-Wan Kim³, and Jin Hyo Kim^{1*}

¹Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Sciences, RDA, Suwon, 441-701, Republic of Korea

²Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Sciences, RDA, Suwon 441-701, Republic of Korea

³School of Plant Life Environmental & Science, Hankyung National University, Ansong, 456-749, Republic of Korea

Received September 24, 2009; Accepted December 29, 2009

In recent years, many agricultural scientists are studying on eco-friendly farming methods. Among of lots of the methods, the natural insecticides are highly motivated and interested due to their safety and biodegradable issues, and readily available source of bioinsecticides. In this study, the crude extract of custard apple (*Annona reticulata* L.) seed and its three fractions which were separated based on polarity indexes were examined for their insecticidal activities against *Myzus persicae* Sulzer and *Nilaparvata lugens* S.. The crude extract (Aceton/MeOH) showed strong insecticidal activities against both insects at 3.00 mg/mL (LD₅₀=0.45 mg/mL for *M. persicae* S. and 1.42 mg/mL for *N. lugens* S.). Furthermore, simple fractionation with hexane, chloroform, and water lead to increase three-folds insecticidal activity on chloroform fraction (LD₅₀=0.13 mg/mL for *M. persicae* S. and 1.14 mg/mL for *N. lugens* S.). The results suggest that *A. reticulata* extracts might be used to control for *M. persicae* effectively.

Key words: *Annona reticulata*, bioinsecticide, Custard apple, insecticidal activity, *Myzus persicae* S., *Nilaparvata lugens* S.

21 세기는 LOHAS(Lifestyle of Health and Sustainability) 중심의 생활문화가 주류를 이루고 있으며, 이는 농업에서도 LISA(Low Input Sustainable Agriculture) 형태로 나타나고 있다. 즉 생태계 물질순환 시스템을 활용하여 저탄소 친환경농법을 농업에서 확립하고 안전농산물을 소비자에게 공급함으로써 궁극적인 LOHAS의 한 축을 형성하고자 하는 노력을 해오고 있다. 이러한 노력들 중 하나로, 친환경 농업에서는 잔류성문제와 독성문제로 인해 생태계파괴 및 환경오염의 한 축으로 인식되고 있는 화학합성농약을 대체할 수 있는 천연 작물 보호제를 찾아 활용하려는 노력을 꾸준히 해오고 있다[Saxena 등, 1989]. 이러한 천연 작물 보호제 개발연구는 지금까지 천연소재로부터 작물보호활성을 갖는 신규 기능성 물질 탐색연구를 중심으로

이루어지고 있고, 이는 대부분 새로운 합성농약의 모체개발을 위한 목적이었다. 하지만, 최근에는 Green Chemistry 및 친환경 자원순환 및 친환경농법을 위한 새로운 농자재개발을 목적으로도 진행되고 있다.

최근의 연구흐름과 같이 하여, 본 연구에서는 식품으로 사용 후 폐기되는 식물자원 중 커스타드애플(*Annona reticulata* L.) 씨를 대상으로 기능성 물질의 자연순환 및 생물자원의 재활용을 목적으로 친환경 작물보호제 개발 연구를 진행하였다. 커스타드애플은 열대지역과 플로리다 원산의, 포도나무 과에 속하는 관목 또는 소교목으로, 6~10 m 높이로 자라는 반상록수 나무로 알려져 있다. 이 나무의 열매는 좌우대칭의 원형에서 심장모양, 타원형, 전혀 불규칙한 모양까지 다양하고 크기는 7~12 cm 정도이다[Mondal 등, 2008]. 성숙한 열매는 갈색이나 노란색, 일부는 붉은색을 띠며, 달콤한 맛이 나 열대과일로 인기 있다. 이러한 커스타드애플은 향암[Mondal 등, 2007], 향산화[Baskar 등, 2007], 항염증[Joy 등, 2006], 위궤양억제효과[Umamaheshwari 등, 2008]를 갖는 것으로 알려져 있으며, 최근

*Corresponding author

Phone: +82-31-290-0523; Fax: +82-31-290-0506

E-mail: setup75@korea.kr

이에 대한 기능성 성분 연구가 활발히 진행 중에 있다. 지금까지 이 식물에서 알려진 화합물로는 sasolinol, reticulatin, anonaine, reticuline과[Buckingham 등, 1994] 정유성분으로 (*E,E*)-farnesyl acetate, turmerone, benzoate, terpinene 등이 [Ogunwande 등, 2006] 있고, 본 연구의 대상이 되는 씨에서 확인된 성분은 acetogenin계 화합물인 annoreticuin, annoreticuin-9-one, bullatacin, squamacin, *cis/trans*-bullatacinone, *cis/trans*-murisolinone, *cis/trans*-isomurisolenin 등이 [Chang 등, 1998] 보고되어 있으며, 지방산계 화합물로는 linoleic acid, caprylic acid, oleic acid, capric acid, caproic acid 등이 [Joy 등, 2006] 보고 되어있다. 또한, 커스타드애플이 속해 있는 *Ammona* 속 식물에서 알려진 작물보호 기능성으로는 담배겨세미나방[Babu 등, 1998], 어리쌀도독[Williams 등, 1993]에 대한 살충활성이 조추출물 수준에서 보고되어 있다.

본 연구에서 방제하고자 하는 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae* Sulzer)은 복숭아나무, 살구나무, 자두나무, 뽕나무, 굴나무 등의 새로 나온 잎을 흡즙하여 신초의 생장을 억제하며, 5월 중순이 후에는 감자, 고구마, 고추, 수박, 담배 등으로 이동하여 피해가 확대되는 경우가 많다 [Han 등, 2008]. 이의 방제에는 일반적으로 발생초기에 Imidachloprid 등의 합성농약을 살포하여 사용하고 있다 [Yum, 2009a]. 또한 멸구 과에 속하는 벼멸구 (*Nilaparvata lugens* Stal)는 북위 19도선 이남 지역인 필리핀, 인도네시아, 말레이시아, 베트남 및 중국의 하이난섬(海南島) 등지에서만 월동이 가능하며, 우리나라에서 월동하지 못하고 매년 중국 남부로부터 비래해 온다. 벼멸구로 인해 고사가 일찍 될수록 수량감소가 심하여 유숙기 고사는 20-80%, 호숙기는 30-50%, 황숙기는 10%가 감소되는 것으로 알려져 있고 [Choi 등, 1997], 이러한 벼멸구는 buprofezin 등의 합성농약을 처리하여 방제하고 있다 [Yum, 2009b]. 본 연구에서는 커스타드애플로부터 버려지는 씨의 조추출물 및 그 분획 물로부터 국내 농작물에 큰 피해를 일으키는 복숭아혹진딧물과 벼멸구에 대한 살충시험을 실시하고, 이의 방제효과를 검증하였으며, 분획물의 극성과 커스타드애플로부터 알려진 2차대사산물자료를 비교하여 살충성분의 특성을 분석하였다.

본 실험에 사용한 커스타드애플 씨는 베트남에서 자란 열매를 채취하여 씨만 음건하였고, 음건된 씨는 분쇄하여 냉동 보관 후 실험시료로 사용하였으며, 커스타드애플 씨는 잘 말린 뒤 분쇄기(Waring commercial)를 이용하여 분말을 만들고, 시료 50 g에 혼합용매(acetone:methanol=3:7) 500 mL을 넣어 heating mantle에서 100°C의 열을 서서히 가하여 6시간동안 환류 추출하고, 추출물을 여과(Whatman No. 2)한 뒤, 감압농축기(Buchi Rotavapor R-124)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하여 사용하였다.

벼멸구와 복숭아혹진딧물은 국립농업과학원 곤충산업과에서 분양 받아 사용하였으며, 이들의 살충능 시험은 다음과 같이 진행하였다. 복숭아혹진딧물 성충을 흡충기를 이용하여 20마리를 포획하고, 포획한 성충을 CO₂ 가스로 마취시킨 뒤, 희석된 시료를 hand microapplicator(Burkard Scientific)를 사용하여 각각 0.1 µL씩 처리하였다. 처리된 복숭아혹진딧물은 증류수 0.5 mL로 적신 여과지(Whatman No. 2)를 깔고 배춧잎(직경 4 cm)을 넣은 페트리디쉬(직경 4.5 cm, 높이 1.5 cm)에 보관하였고, 처리를 마친 복숭아혹진딧물은 25°C의 실내에서 24시간, 48시간 보관 후에 붓으로 건드려서 움직이지 않는 것을 죽은 것으로 간주하고 사충수를 조사하였다. 또한, 벼멸구에 대한 살충능 시험은 암컷성충을 흡충기를 이용하여 30마리 포획하고, 포획한 벼멸구를 CO₂ 가스로 마취시킨 뒤, 희석된 시료를 hand microapplicator(Burkard Scientific)를 사용하여 성충의 흉복부에 각각 0.2 µL씩 처리하였다. 처리를 마친 벼멸구는 2-3엽기의 벼유묘 10본씩을 탈지면으로 고정된 직경 3 cm의 시험관에 놓고 상부를 망사로 덮어 25°C의 실내에서 24시간, 48시간 보관 후에 사충수를 조사하였다.

커스타드애플 씨의 조추출물을 3.00 mg/mL 조건에서 복숭아혹진딧물과 벼멸구에 대해 살충능을 시험한 결과 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 24시간 후 모든 시험개체에서 살충능이 확인되었고, 벼멸구(*Nilaparvata lugens*)는 24시간과 48시간일 때 각각 66.2%와 92.4%의 살충능을 나타내었다. 조추출물에 대한 LD₅₀는 48시간을 기준으로 복숭아혹진딧물과 벼멸구의 경우 각각 446.3 µg/mL와 1423.6 µg/mL로 커스타드애플은 복숭아혹진딧물에 대해 보다 더 선택적인 살충능을 나타내었다. 이러한 살충능을 갖는 커스타드애플 씨 조추출물의 살충능을 향상시키기 위한 방법으로 핵산(Polarity index, PI=0.0) 클로로포름(PI=3.4), 물(PI=9.0) 3가지 용매에 대해 극성지수별 [Godfrey, 1972] 분획을 실시하여 조추출물의 물질정제 및 살충능 향상효과를 시험하였다. 분획에 사용한 두 가지 유기용매 중 핵산은 비극성을 대표하는 대표적인 용매로 1차 대사산물 중 지방 등을 분획하기 위해 사용하였고, 클로로포름은 물과 섞이지 않는 중간극성을 갖는 용매로 수산기 등의 극성인자를 포함하는 스테로이드, 플라보노이드, 비극성 알칼로이드 등 2차 대사산물을 분획하기 위해 사용하였다. 분획은 핵산, 클로로포름 순으로 진행하였으며, 클로로포름 분획 후 남은 것을 모두 물 분획물로 농축하였다. 그 결과, 1.9 g의 조추출물로부터 핵산 및 클로로포름으로 분리된 화합물이 0.8 g(42%)과 0.73 g(38%)으로 전체의 약 80%를 차지하였다.

극성단위별로 분리 정제된 커스타드애플 씨의 살충능시험 결과를 표 2에 나타내었다. 물 분획물은 시험대상인 두 가지 충에 대해 모두 3.00 mg/mL에서 살충효과가 없는 것으로 확인된

Table 1. Insecticidal activity of crude extract on *Nilaparvata lugens* and *Myzus persicae*.

Insect species	24 h		48 h	
	Mortality (mean±SE, %)	LD ₅₀ (µg/mL)	Mortality (mean±SE, %)	LD ₅₀ (µg/mL)
<i>Myzus persicae</i>	100.0±0.0	473.2	100.0±0.0	446.3
<i>Nilaparvata lugens</i>	66.2±2.0	2486.2	92.4±1.0	1423.6

*crude extract con. 3.00 mg/mL

Table 2. Insecticidal activity of each solvent extracts from *Annona reticulata* L.

Insect species	Material	24 h		48 h	
		Mortality (mean±SE, %)	LD ₅₀ (mg/mL)	Mortality (mean±SE, %)	LD ₅₀ (mg/mL)
<i>Myzus persicae</i> ^a	Hexane	56.4±2.5	0.97	89.7±0.5	0.57
	Chloroform	100.0±0.0	0.19	100.0±0.0	0.13
	Water	0.0±0.5	>3.00	28.2±2.0	>3.00
<i>Nilaparvata lugens</i> ^b	Hexane	21.4±1.8	>3.00	47.4±1.1	>3.00
	Chloroform	72.2±0.9	1.75	95.5±0.8	1.14
	Water	1.0±0.5	>3.00	0.1±0.5	>3.00

^aConc. 0.60 mg/mL, ^bConc. 3.00 mg/mL

반면, 클로로포름 분획물에서 가장 높은 살충능이 확인되었다. 특히 복숭아혹진딧물의 경우 클로로포름 분획물이 0.19 mg/mL (24시간)와 0.13 mg/mL(48시간)에서 LD₅₀를 나타낼 정도로 매우 높은 살충능을 나타내었고, 단 한 차례의 간단한 액/액분리 과정을 통한 화합물 정제로 3배 이상의 높은 살충능 향상효과를 가져왔다. 이러한 시험결과는 조추출물에서 클로로포름 분획물이 갖는 비중이 전체의 약 1/3에 해당하여, 용매 분액 정제를 통해 살충능이 높은 물질군만을 정제할 수 있었기 때문인 것으로 판단된다. 극성별 분획물의 높은 살충능은 벼멸구에서도 동일한 경향으로 클로로포름>헥산>물의 순서로 나타났으며, 이들의 LD₅₀는 클로로포름 분획물에서 1.75 mg/mL(24시간)와 1.14 mg/mL(48시간)로 가장 높게 나타났으나, 복숭아혹진딧물에서 나타난 것과 같은 뚜렷한 살충능 증가현상은 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해보면, 커스타드애플에서 추출되는 지용성의 천연물질이 수용성 물질보다 복숭아혹진딧물 및 벼멸구에 대해 높은 살충능을 갖는 것을 확인 할 수 있었고, 특히 본 연구에서는 특별한 고도의 정제과정 없이 극성을 활용한 액/액분리정제를 통해 약 3배이상의 살충능을 향상효과를 볼 수 있었다. 이는 살충효과만을 목적으로 할 때, 조추출물의 제조시 극성이 낮은 헥산 혹은 클로로포름으로 추출물을 제조하게 되면, 액/액분리 정제과정을 거치지 않고도 높은 살충능이 보장되는 천연살충제를 개발하여 친환경농자재로 활용가능 할 것으로 기대한다.

초 록

커스타드애플(*Annona reticulata* L.)씨 추출물 및 그의 분획물을 활용하여 복숭아혹진딧물 및 벼멸구를 대상으로 살충활성을 조사하였으며, 그 결과 아세톤/메탄올 조추출물 3000 µg/mL에서 복숭아혹진딧물은 100%, 벼멸구에 대해서는 92%의 살충률을 나타내었다. 이들에 대한 LD₅₀는 각각 446.3 µg/mL와 1423.6 µg/mL로 복숭아혹진딧물이 추출물에 높은 감수성을 나타내었다. 이들의 헥산, 클로로포름, 물 분획물에 대한 분리정제물의 경우 클로로포름 분획물이 조추출물 분획물보다 약 3배 높은 살충능이 관찰되었으며, 이는 극성분배를 통해 살충성이 높은 물질군을 선별적으로 정제할 수 있음을 보여준다. 특히 클로로포름 분획물에 대한 살충능의 경우 137.2 µg/mL(복숭아혹진딧물), 1145.5 µg/mL(벼멸구)의 농도에서 LD₅₀가 관찰되었다.

Key words: *Annona reticulata*, bioinsecticide, Custard apple, insecticidal activity, *Myzus persicae* S., *Nilaparvata lugens* S.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구개발사업(2009년)의 연구비 지원으로 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

Babu PBS, Madhusudana Rao J, Joy BJ (1998) Effect of crude oils of *Annona squamosa* and *A. reticulata* on feeding and development of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. *Journal of Insect Science* **11**(2), 184-185.

Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. (2007) In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology* **45**(5), 480-485.

Buckingham J. (1994) In *Dictionary of Natural Products*. (1st Ed.). Chapman & Hall, London, UK.

Byung-Man Yum (2009a) In *Pesticide Use Guidelines*. Korea Crop Protection Association (Eds), pp 538-542, Sam-Jung Printing Co. Seoul, Republic of Korea.

Byung-Man Yum (2009b) In *Pesticide Use Guidelines*. Korea Crop Protection Association (Eds), pp 440-447, Sam-Jung Printing Co. Seoul, Republic of Korea.

Chang FR, Chen JL, Chiu HF, Wu MJ, Wu YC (1998) Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*. *Phytochemistry*, **47**(6), 1057-1061.

Godfrey NB (1972) Solvent selection via Miscibility Number. *Chemtech*, 359-363

Han MJ, et al. (2008) Diagnosis and control of diseases and insect pests in bioenergy crops. Rural development administration, 114-126.

Joy B, Gopi TV, Sobhana D. (2006) Chemical characterization and pharmacological screening of some *Annona* seed oils. *Asian Journal of Chemistry* **18**(2), 1125-1128.

Jung-Gon Choi (1997) In *A comprehensive guide of rice pesticides*. Rural Development of Administration (Eds), pp 162-179. Rural Development of Administration

Mondal SK, Saha P, Mondal MB and Mazumder UK. (2008) Free radical scavenging property of *Annona reticulata* leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* **8**(3), 260-265.

- Mondal SK, Mondal NB, Mazumder UK. (2007) In vitro cytotoxic and human recombinant caspase inhibitory effect of *Annona reticulata* leaves. *Indian Journal of Pharmacology* **39**(5), 253-254.
- Ogunwande IA, Ekundayo O, Olawore NO, Kasali AA (2006) Essential oil of *Annona reticulata* L. leaves from Nigeria, *Journal of Essential oil research*, **18**(4), 374-376
- Saxena RC, Arnason JT, Philogene BJR and Morand P. (1989) Insecticides of plant origin: Insecticides from neem, *ACS Symposium series* No. 387. (American Chemical Society) Washington DC. pp 110-135.
- Umamaheshwari A, Jaswanth A, Arunkumar A, Surya Prabha D, Punitha S, Vedha Hari BN. (2008) Evaluation of antiulcer effects of seeds extract of *Annona reticulata*. *Int. J. Chem. Sci.* **6**(2), 903-906.
- Williams LAD and Mansingh A. (1993) Pesticidal potential of tropical plant: I Insecticidal activity in leaf extracts of sixty plant. *Insect Sci. Applic* **14**(5-6), 697-700.