

넝나무 추출물의 Limonoid계 살충성분 4종의 환경매체 노출 안정성

김진호^{1*} · 정두연¹ · 진초롱¹ · 김원일² · 임성진¹ · 최근형¹ · 박병준¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물팀

Stability of Four Limonoidal Substances of Neem Extract under Controlled Aquatic and Soil Conditions

Jin Hyo Kim^{1*}, Du-Yun Jeong¹, Cho-Long Jin¹, Won-Il Kim², Sung-Jin Lim¹,
Geun-Hyoung Choi¹ and Byung-Jun Park¹

¹Chemical Safety Division, ²Microbial Safety Team,
National Academy of Agricultural Science, RDA, Republic of Korea

(Received on March 18, 2014. Revised on March 26, 2014. Accepted on July 9, 2014)

Abstract The stabilities of four limonoidal substances including azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin and salannin were investigated both in controlled aquatic and soil conditions. The half-life of the total limonoid for neem extracts and its two commercial biopesticides was estimated 86.6-173 days in water under air, while degradation of the compounds was detected below 10% after eight weeks in deoxygenated water. The half-life in dry soil was estimated 43.3-57.7 days, and there was a similar degradation pattern with in aerobic water condition. In case of wet soil condition, the total bacteria of the soils ranged 6-8 log CFU/g soil for during the experiment, and the half-life of the total limonoid was 6.4-12.3 days. From the result, the fast limonoid degradation in wet soil environment was the result of both chemical oxidation and microbial degradation.

Key words biopesticide, environmental stability, limonoid, neem extract

최근 농업의 환경보존 기능 증대와 농산물 안전성에 대한 불안감 등으로 환경 친화적인 농업을 추구함에 따라 천연물질을 이용한 다양한 형태의 유기 농자재가 사용되고 있다. 그 중 대표적인 것이 넝(Neem) 추출물을 활용한 제품이다. 농업에 이용되는 넝의 기본적인 효과는 해충과 선충에 대해 식욕감퇴, 성장 억제, 탈피 저해, 형태형성 저해, 산란관 파괴, 알의 부화 억제, 호르몬의 균형 파괴 등의 작용으로 해충의 번식을 억제시키며 500여 종의 세균에 살균효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ascher, 1993; Boeke 등, 2004). 이에 따라 넝 추출물은 중요한 유기농업 자재 원료로 사용되고 있으며, 우리나라에서도 유기농업에 사용 가능한 재료로 공시되어 있다(유기농업자재 공시 및 품질인증기준-시행 2013.6.18.). 넝나무는 인도, 방글라데시, 미얀마가 원산지

로 열매, 잎, 껍질 등 모든 부위를 사용하며 농자재로 많이 사용되는 오일은 열매에서 얻는다. 주요 성분으로는 azadirachtin A, azadirachtin B, salannin, deacetylsalannin 등 limonoid 계열에 속하는 triterpenoid화합물이 알려져 있다 (Johnson and Morgan, 1997). 넝 오일의 품질은 주요 유효 성분인 azadirachtin의 함량으로 결정되고, 씨앗의 품질과 추출물 생산방식에 따라 주요 성분 함량이 300 mg/kg에서 4,000 mg/kg 이상으로 다양하다(Kumar and Parmar, 1996; Melwita and Ju, 2010). 또한, 넝 추출물 중 병해충 방제 효과와 직접적 관련이 있는 것으로 알려진 limonoid계 성분을 활용한 유기농자재의 품질관리 기법에 관한 연구를 위해 Lee 등(2013)은 유통 중인 유기농자재의 azadirachtins 유효 성분 함량에 관한 조사연구를 실시하였고, Feng 등(2012) 여러 연구자들은 넝 추출물 중 azadirachtins의 광, pH, 온도 등 환경요인에 의한 안정성 연구결과를 보고하였다(da Costa 등 2014, Barrek등 2003, Caboni 등 2009). 하지만,

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3239, Fax: +82-63-238-3837
E-mail: setup75@korea.kr

화학농약과 달리 유기농자재로 활용되는 추출물은 대부분 유효성분의 안정성 평가연구 없이 농업현장에서 산발적으로 사용되고 있으며, 이러한 이유로 병해충 방제를 위한 적절한 처방기술의 연구가 이루어지지 못하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 넝마추출물 및 이를 주원료로 하는 유기농자재의 수계 및 토양 노출에 관한 안정성 평가연구를 통하여, 유효성분으로 알려진 limonoid계 4성분(azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin과 salannin)의 안정성을 평가하였으며, 이러한 결과가 넝마추출물 및 이를 활용한 유기농자재의 약제처방 기술 개발에 기여할 수 있도록 본 연구결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 표준품

정제에 사용한 Oasis HLB (60 mg)는 Waters사(Milford, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 분석대상으로 사용한 표준물질인 azadirachtins 4종(azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin, salannin)은 ChromaDex사(Irvine, CA, USA)의 제품을 사용하였다. Methanol, acetonitril은 TEDIA사(Fairfield, OH, USA)의 HPLC등급 시약을 사용하였으며, formic acid (Sigma-aldrich, MO, USA)와 peptone (Oxoid Ltd., England)은 reagent급을 사용하였다. 표준품의 stock solution은 1,000 mg/L 농도로 methanol에 녹여 조제하고 -20°C 냉동고에 보관하면서 필요시 적정 농도로 희석하여 검량선 작성에 사용하였다. reagent급의 염화나트륨 및 무수 황산나트륨은 Merck사 제품을 사용하였다.

시료

안정성 평가 시험에는 인도산 넝마추출물(고려바이오(수입), 한국)과 Biopesticide A (그린바이오텍, 한국), Biopesticide B (누보, 한국) 등 4종의 유기농자재를 사용하였으며, 2012년도에 생산된 제품을 구입하여 사용하였다. 이들의 총 limonoid 함량(azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin, salannin의 총량)은 각각 3,471 mg/L, 8,021 mg/L 와 3,328 mg/L이었다. 특히 추출물과 Biopesticide A, Biopesticide B의 총 limonoid 구성 성분들 중 주성분 함량비율은 각각 deacetylsalannin 95.3%, deacetylsalannin 83.9%, azadirachtin A 53.3%로 확인되었다.

수용액 중 안정성 평가

넝마추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재 2종에 대하여 수용액 중 유효성분 4종의 안정성을 평가하였다. 탈산소 조건의 안정성평가는 증류수 19 mL를 갈색유리병에 넣고, 질소를 1시간 동안 폭기하여 산소를 제거하였다. 이후 질소가 흐르는 상태에서 1 mL 시료를 넣은 뒤 밀폐하고,

150 rpm에서 교반하였다. 호기조건의 안정성평가 시험은 19 mL 증류수와 1 mL 시료를 섞은 갈색유리병에 폭기 장치를 설치하고 200 mL/min의 유속으로 공기를 주입하면서 진행하였다. 이후 8주간 7일 간격으로 시료를 채취하여 유효성분 4종을 분석하여 분해율을 조사하였다.

토양 중 안정성 평가

넝마추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재 2종을 이용하여 유효성분 4종의 토양 중 안정성을 평가하였다. 토양 시료는 사양토를 그늘에서 건조시킨 후 2 mm 체로 쳐서 시험 전까지 냉암소에 보관하였다. 1 mL의 넝마추출물과 유기농자재 시료를 휘발성이 높은 10 mL acetone에 희석하여 미리 준비한 20 g의 건조토양에 분무하고, 1시간 동안 교반기로 섞어 주었다. 토양을 10 mm 이하의 두께로 넓게 펼친 후 실온의 암조건에서 안정성 평가를 실시하였다. 또한, 함수도양에 대한 안전성평가 시험은 평균되지 않은 20 g의 건조토양에 위와 동일한 방법으로 분무처리하고, 토양수분이 포장용수량의 60%가 되도록 증류수를 골고루 섞어주며 넣은 뒤, 72시간 동안 격렬하게 진탕하였다. 이후 실온의 암조건에서 덮개를 덮고 보관하며 7일 간격으로 유효성분 4종의 함량을 분석하여 안정성 평가를 진행하였다.

유효성분 정량분석

넝마추출물의 주요 유효성분인 azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin, salannin 4종의 분석은 Lee et al. (2013)이 수행한 방법으로 실시하였다. 수중 안정성 평가를 위한 수용액시료는 1 mL 시료를 50 mL의 증류수로 희석하고, 3 mL의 포화 식염수를 첨가한 후 20 mL의 dichloromethane으로 3회 분액하고, 유기용매층을 회수하여 감압 농축하였다. 토양 중 안정성 평가를 위한 시료는 20 g 토양 시료에 20 mL acetonitrile을 넣어 2시간 동안 진탕 추출하고, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리한 뒤, 상등액 10 mL를 취하였다. 이후 10 mL acetonitrile을 추가하여 3회 반복 추출하고, 상등액을 모두 모아 감압 농축하였다. 농축된 시료는 0.5 mL methanol에 재용해한 후 9.5 mL의 증류수를 넣고, 2 mL를 취하여 증류수로 미리 conditioning 된 60 mg HLB 카트리지에 loading 하였다. 먼저, 2 mL 5% (v/v) methanol 수용액으로 카트리지를 세척한 뒤, 5 mL methanol을 카트리지에 용출하여 정제물을 획득하고, 이를 농축한 후 2 mL methanol에 재용해하여 기기분석을 실시하였다. 기기분석용 시료는 Lee et al. (2013)의 조건과 동일하게 BEH-Phenyl 칼럼(1.7 μm, 3 mm × 100 mm; Waters, Dublin, Ireland)이 장착된 UPLC장비에서, 0.5 min/mL 유속과 40°C 칼럼온도를 유지하면서 이동상으로 0.5% formic acid 수용액과 100% acetonitrile을 gradient 조건으로 사용하여 정량 분석을 실시하였다.

토양 중 총 세균수 변화

토양 중 총 세균수는 Kim et al. (2013)의 방법을 토대로 다음과 같이 변형하여 수행하였다. 1 g 토양을 멸균증류수에 녹인 9.0 mL 0.1% peptone에 넣고 vortexing하여, 추출용액을 제조하였다. 추출용액은 10배씩 순차희석하고, 희석용액은 일반세균용 petrifilm (3M™, Minnesota, USA)에 1 mL씩 접종하였다. 접종이 완료된 petrifilm은 30°C에서 2일간 배양 후 총세균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

Limonoids 성분의 수중 안정성

혐기조건에서의 안정성 시험은 12주간 7일 간격으로 limonoid 4성분의 분해율을 조사하였으며, 그 결과 전체 시험기간 동안 분해율이 10% 미만으로 확인되어, 산소가 없는 수용액 조건에서 limonoid계 유효물질이 매우 안정적임을 확인할 수 있었다. 반면, 공기를 폭기한 호기조건에서는 12주간 분해율을 조사한 결과 추출물은 $51.0 \pm 7.6\%$ 로 관찰되었으며, 제품 2종의 경우 평균 $27.6 \pm 10.6\%$ 의 분해율이 관찰되었다(Fig. 1). 따라서, limonoid계 유효성분의 주요 화학적 분해경로는 산소접촉에 의한 산화반응일 것으로 기대된다. 유효성분 반감기는 1st order equation을 이용하여 산출하였으며, 호기조건의 총 limonoid 반감기는 님 추출물 원액의 경우 86.6일($k = 0.008$), 제품의 경우 최대 173일($k = 0.004$)로 확인되었다. 또한, 추출물 및 제품의 주요 limonoid 성분에 따른 반감기 차이는 크게 나타나지 않았으나, 유기농자재 제품의 반감기가 추출물 원액보다 길게 나타났고, 이는 Johnson과 Dureja (2002)의 주장과 같이 제품에 사용된 계면활성제 등 여러 보조성분 및 안정제 성분의 영향으로 추정된다.

Limonoids 성분의 토양 중 안정성

토양노출에 의한 limonoid계 물질 4종의 안정성 평가는 건조토양과 60% 함수 토양에서 각각 진행하였다. 건조토양에서 7주간 진행된 안정성 시험결과, 님추출물 원액은 총 limonoid 함량대비 분해율이 $56.2 \pm 8.5\%$ 로 관찰되었으며, 님 추출물을 원료로 한 제품 2종의 평균 분해율은 $50.7 \pm 9.3\%$ 로 관찰되어 님 추출물 원액과 이를 활용한 유기농자재 제품간의 안정성은 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 또한, 유효물질인 총 limonoid 분해 반감기가 추출물과 제품에서 46.9-52.5일($k = 0.012-0.016$)로 확인되어, 수중 호기조건의 분해율보다 약 2배 가량 높은 것으로 확인되었다. 이는 유효물질이 수중에 있을 때 보다 토양 입자 표면에 넓게 분포함으로써, 유효물질의 산소 노출빈도 증가에 따른 산화 분해를 증가와 관련이 깊은 것으로 판단된다.

함수토양에서 진행된 총 limonoid 안정성 시험결과, 님

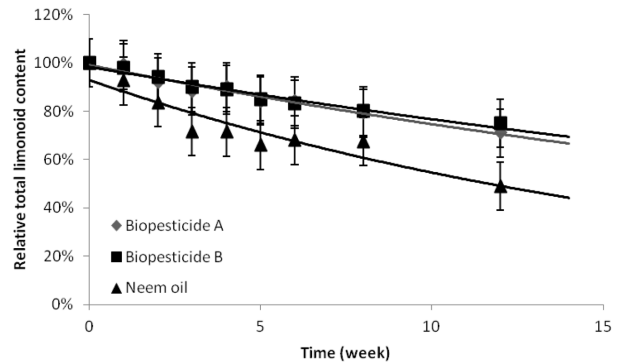


Fig. 1. Temporal changes of total limonoid content (◆ for Biopesticide A, ■ for Biopesticide B, and ▲ for neem oil) in water under air.

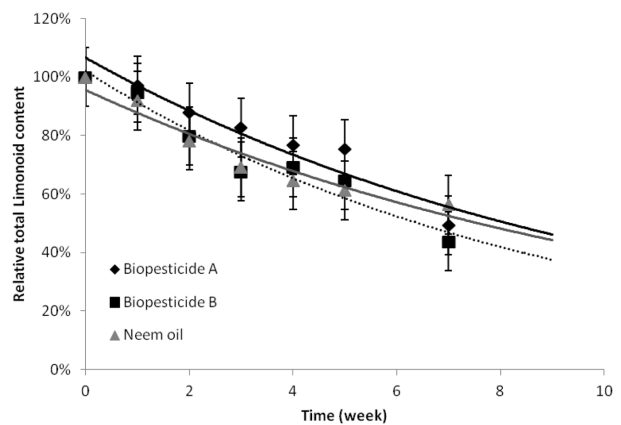


Fig. 2. Temporal changes of total limonoid content (◆ for Biopesticide A, ■ for Biopesticide B, and ▲ for neem oil) in dry soil.

추출물 및 이를 활용한 유기농자재에서 모두 유효성분의 분해율이 매우 빠르게 관찰되었으며, 2주 후 60% 이상 토양에서 분해된 것으로 확인되었고, 함수토양내 총 limonoid 반감기는 6.4-12.3일($k = 0.056-0.107$)로 확인되었다. 또한, 님 추출물과 이를 주성분으로 활용한 유기농자재간 limonoid 성분의 분해양상은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 분해 반감기는 최대 약 2배 가량 차이가 나타났다(Fig. 3). 본 연구에서는 함수 토양내 총 limonoid 안정성에 영향을 미치는 요인으로 토양 미생물의 생물학적 분해를 우선적으로 고려하여, 시험 토양 내 총 세균수 변화를 관찰하였다. 모든 시험 토양에서 시험기간 동안 $6.0 \log \text{CFU/g soil}$ 이상의 일반 세균수가 유지되는 것을 확인하였으며, 이는 님 추출물 및 시험에 사용된 유기농자재에 의해 토양세균 생장이 방해 받지 않은 것으로 판단된다. Biopesticide B 처리구에서는 2주 정도의 lag period 후 총 세균수 증가가 확인되었으며, 총 세균수 증가와 유효성분 분해율 간 높은 상관성($r^2 = 0.8238$)이 확인되었고(Fig. 4), 이에 따른 반감기도 6.4일로 가장 짧게 나타났다. 이러한 결과는 Stark와 Walter (1995)의 연구

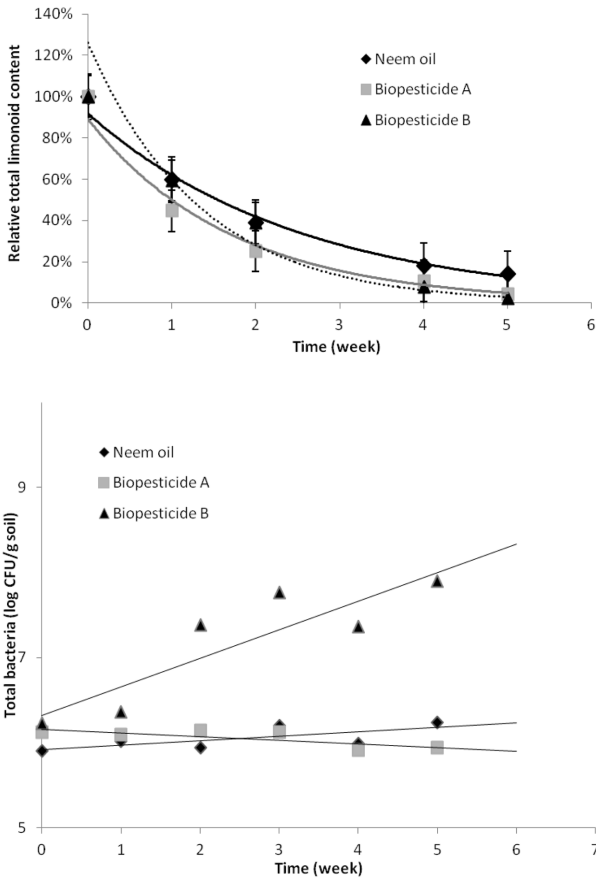


Fig. 3. Temporal changes of total limonoid contents (top) and total bacterial changes (bottom) on wet soil (■ for Biopesticide A, ▲ for Biopesticide B, and ◆ for neem oil).

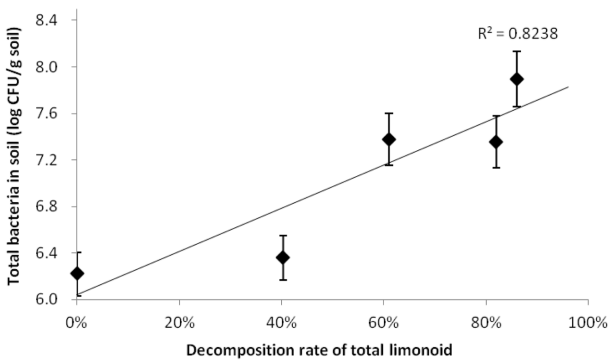


Fig. 4. Correlation between the decomposition rate (%) of total limonoid for Biopesticide B and total bacteria growth (log CFU/g soil) in wet soil.

결과와 같이 토양 미생물의 활동이, 산소에 의한 화학적 산화작용과 더불어 limonoid 성분 분해 감소의 주요 요인으로 작용한 것으로 판단된다. 또한, 주요 유효성분이 서로 다른 biopesticide A와 B 간에 분해율이 유사하게 관찰됨에 따라 수계 및 토양 중 limonoids 성분별 안정성 차이는 크지 않은 것으로 판단된다.

결론

넝 추출물의 유효성분인 limonoid계 물질의 안정성 평가는 지금까지 azadirachtin A와 azadirachtin B를 중심으로 연구되었으며, azadirachtins의 광노출 반감기는 약 40일, 수중 40°C 노출시 약 14일로 알려져 있다(Barrek 등 2004). 본 연구는 이러한 연구결과를 토대로, 농용수 및 농경지 토양에서의 넝 추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재를 대상으로 농업환경에서의 유효성분 안정성에 대한 평가를 진행하였다. 그 결과 탈산소 수용액 조건에서 limonoid계 4성분의 분해는 매우 느리게 진행됨을 확인할 수 있었고(반감기 210일 이상), 호기 수용액 조건에서는 혐기조건과 달리 분해가 빠르게 진행됨을 확인할 수 있었다(반감기 98-168일). 또한, 건조토양 중 유효성분 반감기는 46.9-52.5일로 수중 조건보다 분해가 빨리 진행됨을 확인하였고, 이는 산소에 의한 화학적 산화반응이 유효물질을 분해시키는 주요 경로인 것으로 판단되었다. 함수토양에서 진행된 안정성 시험결과, limonoid계 유효성분의 반감기가 6.4-12.3일로 수중 및 건조토양 조건에 비해 짧음을 확인하였고, 이러한 시험결과는 화학적 분해대와 생물학적 분해대가 동시에 진행되었기 때문으로 판단된다. 이를 통해 볼 때, 농업현장에서의 limonoid계 유효물질 반감기는 광분해, 화학적 산화, 토양 미생물대사 및 환경생물 등의 작용으로 인해 본 연구에서 도출한 결과보다 더 짧을 것으로 예상되며, 넝 추출물 및 이를 활용한 유기농자재는 토양 병해충 방제보다 작물 지상부 병해충 방제에 보다 적합한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 기관고유과제(PJ 008468)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

Literature cited

Ascher, K. R. S. (1993) Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*, Arch. Insect Biochem. Physiol. 22:433-449.

Barrek, S., O. Paisse and M. F. Grenier-Loustalot (2004) Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin A in a controlled environment; Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. Anal. Bioanal. Chem. 378:753-763.

Boeke, S. J., M. G. Boersma, G. M. Alink, J. J. A. Loon, Huis, A. M. Dicke and I. M. C. M. Rietjens (2004) Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides, J. Ethnopharmacol. 94:25-41.

Caboni, P., G. Sarais, A. Angioni, F. Lai, F. Dedola and P. Cabras (2009) Fate of azadirachtin A and related azadira-

- chtoids on tomatoes after greenhouse treatment. J. Environ. Sci. Health B. 44:598-605.
- da Costa, J. T., M. R. Forim, E. S. Costa, J. R. De Souza, J. M. Mondego and A. L. Boica Junior (2014) Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. J. Stored Prod. Res. 56:49-53.
- Feng, B. H. and L. F. Peng (2012) Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan carrying ricinoleic functions as an emulsifier for azadirachtin. Carbohydr. Res. 88:576-582.
- Johnson, S. and E. D. Morgan (1997) Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) seeds, J. Chromatogr. A. 761:53-63.
- Johnson, S. and P. Dureja (2006) Effect of surfactants on persistence of azadirachtin A (neem based pesticide). J. Environ. Sci. Health B. 37:75-80.
- Kim, W. I., A.R. Jo, J. H. Lee, S. R. Kim, K. H. Park, K. W. Nam, Y. Yoon, D. H. Yoon, S. Y. Oh, M. H. Lee, J. G. Ryu and H. Y. Kim (2013) Survey of microbial contamination of tomatoes at farms in Korea. J. Fd. Hyg. Safety. 28:1-6.
- Kumar, J. and B. S. Parmar (1996) Physicochemical and chemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura*, J. Agric. Food chem. 44:2137-2143.
- Lee, J. W., C. L. Jin, K. C. Jang, G. H. Choi, H. D. Lee and J. H. Kim (2013) Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticide and neem extract using solid phase extraction. J. Agric. Chem. Environ. 2:81-85.
- Melwita, E. and Y. H. Ju (2010) Separation of azadirachtin and other limonoids from crude neem oil via solvent precipitation, Sep. Purif. Technol. 74:219-224.
- Stark, J. D., and J. F. Walter (1995) Persistence of azadirachtin A and B in soil: Effects of temperature and microbial activity. J. Environ. Sci. Health. B. 30:685-698.

● ● 님나무 추출물의 Limonoid계 살충성분 4종의 환경매체 노출 안정성

김진호^{1*} · 정두연¹ · 진초롱¹ · 김원일² · 임성진¹ · 최근형¹ · 박병준¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물팀

요 약 본 연구에서는 님 추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재의 limonoid계 주요 4성분인 azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin, salannin에 대해 수중 및 토양 노출 안정성을 평가하였다. 님 추출물을 대상으로 한 시험에서 limonoid계 유효성분의 수중 안정성 평가 결과 탈산소 조건에서 반감기는 210일 이상으로 매우 안정적이었으며, 호기조건의 반감기는 86.6일로 관찰되었다. 이러한 현상은 유기농자재 제품에서도 동일하게 나타났으며, 제품의 경우 반감기가 최대 173일로 관찰되어 추출물 원액보다 안정성이 높음을 확인할 수 있었다. 또한, 님 추출물 및 제품을 대상으로 유효성분의 토양노출 안정성을 평가한 결과, 건조토양의 경우 추출물 원액과 유기농자재 제품의 차이가 크지 않았으며, 이때 유효성분의 반감기는 43.3-57.7일로 수중 호기조건 노출보다 분해가 약 2배 가량 빨리 진행됨을 확인하였다. 함수토양의 경우 총 limonoid 반감기는 6.4-12.3일로 본 연구에서 설정한 조건 중 분해 반감기가 가장 짧은 것으로 확인되었다. 또한, 함수토양 내 총 세균수는 6.0 log CFU/g soil 이상에서 유지됨을 확인하였으며, 이러한 결과로 볼 때 함수토양에서의 limonoid 성분 분해는 화학적 산화와 미생물 분해가 동시에 진행되는 것으로 판단되었다.

색인어 님추출물, 유기농자재, 리모노미드, 환경노출, 안정성

● ●