

Research Article

Open Access

LC-MS/MS를 이용한 멀구슬, 협죽도, 황련 유래 활성성분의 벼 중 잔류양상 연구

박준성¹, 남효송¹, 김용환¹, 김도익², 김선암^{1*}

¹(재)전남생물산업진흥원 생물방제연구센터, ²전남농업기술원 친환경연구소

Residue Patterns of Active Ingredients Derived from *Melia Azedarach*, *Nerium Indicum*, and *Coptis Chinensis* in Rice Using LC-MS/MS

Joon-Seong Park¹, Hyo-Song Nam¹, Yong-Hwan Kim¹, Do-ik Kim² and Sun-Am Kim^{1*} (¹Jeonnam Bioindustry Foundation Bio Control Research Center, Gokseong, 516-942, Korea, ²Jeonnam Agricultural Research & Extension Services Eco-friendly Research Institute, Naju, 520-175, Korea)

Received: 30 March 2015 / Revised: 27 May 2015/ Accepted: 22 June 2015

Copyright © 2015 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

BACKGROUND: Plant extracts have been used as environment friendly agricultural materials for organic farming in South Korea. However safety evaluation on the plant extracts was not properly tested. The aim of this study was to evaluate safety of the extracts from *Melia azedarach*, *Nerium indicum* and *Coptis chinensis* on cultivating rice.

METHODS AND RESULTS: Plant extracts 300-fold diluted were treated on rice, and residues of *M. azedarach*, *N. indicum* and *C. chinensis* were determined. The analytes from the rice samples were detected by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was validated, and good linearities ($r^2=0.995-0.998$), specificity, and recoveries were obtained. Limits of detection were 0.01 mg/kg for all of the target compounds. Recoveries were 79.3-118.3% at 0.1 mg/kg and 75.2-111.5% at 0.5 mg/kg. The residue levels were below 0.030 mg/kg for azadirachtin, 0.320 mg/kg for oleandrin and 1.460 mg/kg for berberine.

CONCLUSION(S): The extracts of *M. azedarach*, *N. indicum* and *C. chinensis* contained azadirachtin, oleandrin and berberine as an active ingredient, respectively. The residue of three active ingredients dramatically decreased after treatment in all fruits, stems and roots of rice.

Key words: Environmental-friendly material, LC-MS/MS, Plant extract, Residue

서론

최근 소비자들의 삶의 질이 향상되면서 안전한 먹거리와 환경오염에 대한 관심이 증가함에 따라 유기농산물의 수요도 증가하고 있다. 유기농산물이란 유기합성농약과 화학비료를 일체 사용하지 않고 재배하여

환경에 악영향을 주지 않고 좋은 환경을 유지 보전하면서 생산한 농산물을 의미한다. 이러한 유기농산물을 재배하기 위해서는 병해충 방제를 위해 사용되었던 화학농약 대신 친환경농자재 사용은 필수불가결한 요소이다. 그러나 최근 화학농약의 오남용으로 인하여 생태계 파괴 및 환경오염 등의 문제가 발생하고 있다. 이에 대한 대책으로 살충효과를 보이면서 환경에 대한 영향을 최소화 하는 천연 작물보호제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Saxena, 1989). 식물 추출물은 다양한 생물활성물질을 함유하고 있고(Wink,

*Corresponding author: Sun-Am Kim
Phone: +82-61-363-9549; Fax: +82-61-362-0631;
E-mail: sunam0907@naver.com

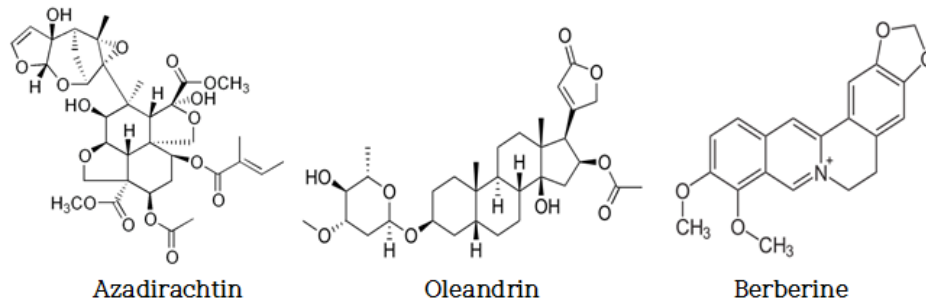


Fig. 1. The chemical structures of azadirachtin, oleandrin, and berberine.

1993) 포유류인 인축에는 해가 거의 없기 때문에 친환경 농업에서 새로운 해충방제용 자재로 개발되어(Arnason *et al.*, 1989), 살충제, 해충기피제 및 섭식저해제로 활발히 이용되고 있다(Schmutterer, 1980).

해충방제용 자재로 사용되는 식물추출물 중 멀구슬(*Melia azedarach*)은 limonoid계의 azadirachtin과는 다른 terpenoids를 함유하여 여러 곤충 중에 대하여 생장억제 효과를 가진 살충제로서 상업적으로 이용되고 있다 (Schmutterer, 1980; Hwang *et al.*, 2009). 협죽도(*Nerium indicum*)는 사람과 동물에 독성을 나타내는 식물이지만(Langford and Boor, 1996; Al-Yahya *et al.*, 2000), 한편으로 항세균(Mostaqul *et al.*, 1999), 살충(Hassan, 1996) 및 항염증 활성을 가지고 있다(Erdemoglu *et al.*, 2003). 또한 황련(*Coptis chinensis*) 추출물은 고추역병(Ahn *et al.*, 2009)과 배추줄나방(Park *et al.*, 2008) 방제에 효과적임이 보고된 바 있다. 이처럼 식물추출물은 해충방제에 탁월한 효과가 입증되어 실제 농업인들 사이에서 작물보호제로 많이 사용되고 있지만 식물추출물에 대한 안전성 여부는 아직 불분명하다. 이러한 살충 및 살균효과를 가진 식물추출물의 무분별한 사용은 오히려 식품의 안전성과 더불어 생태계에 악영향을 줄 수도 있기 때문에 안전성 확보가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 민간에서 사용되고 있는 식물추출물인 멀구슬(*M. azedarach*), 협죽도(*N. indicum*), 황련(*C. chinensis*) 추출물의 잔류양상을 파악하여 벼 중 안전성 확보를 위한 과학적인 근거를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

식물추출물 및 시험작물

본 시험에 사용한 식물추출물은 멀구슬(*M. azedarach*), 협죽도(*N. indicum*), 황련(*C. chinensis*)의 에탄올 추출물을 사용하였고, 시험작물은 남평벼를 사용하였다. 멀구슬, 협죽도 및 황련 추출물의 유효성분은 azadirachtin, oleandrin 및 berberine을 각각 선정하였고, 벼 중 안전성 시험을 위해 세 성분의 잔류양상을 조사하였다.

포장시험 및 시료채취

시험은 전라남도 나주시 농업기술원 내 실외포장(800 주

/330 m²)에서 수행하였다. 멀구슬, 협죽도 및 황련 에탄올 추출물은 추천살포 농도인 300배로 희석한 수 수확 전 27일에 배부식 분무기를 이용하여 시험구 전체의 벼에 잎 표면에서 약액이 흐를 정도로 충분한 양을 살포하였다. 잔류분석을 위한 시료채취는 추출물 처리 후 0, 10, 20, 23, 27일의 벼를 수확하였다. 수확 한 벼는 열매, 줄기, 뿌리의 3부분으로 분리하여 각각 밀봉 후 -20℃에 냉동 보관하였다.

약제 및 시약

유효성분 분석에 사용된 표준품인 azadirachtin (95.0%), oleandrin (95.0%) 및 berberine (90.0%)은 SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, USA)사 제품을 구입하여 사용하였으며 성분별 구조식은 Fig. 1과 같다. 유효성분의 분석에 사용된 HPLC 등급의 acetonitrile, methanol, water는 Burdick & Jackson사 (Muskegon, USA)로부터 구입하였고, analytical-grade의 sodium chloride, sodium sulfate, formic acid, ammonium formate는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)으로부터 구입하여 사용하였다.

전처리

먼저 열매, 줄기, 뿌리의 3부분으로 분취한 벼를 각각 세절 분쇄하였다. 열매는 낱알만을 모아 곱게 분쇄한 후 고운 표준체(40 mesh)를 이용하여 걸렀으며 줄기는 잘게 세절 후 곱게 분쇄하였다. 뿌리는 서늘한 곳에서 하루 동안 건조한 다음 흙을 털어낸 후 세절하여 곱게 분쇄하였다. 이러한 벼를 각각 5 g씩 정밀하게 취한 후 acetonitrile 50 mL를 첨가하고 진탕기를 이용하여 20분간 교반하였다. 이 후 초음파 추출기를 이용하여 항온조건(30~40℃)에서 10분간 sonication 하였으며 20분간 상온에 정치하였다. 그리고 magnesium sulfate 6 g과 sodium chloride 3 g을 첨가하고 진탕 후 10분간 3500 rpm에서 원심분리하였다. 상층액 10 mL에 PSA 0.5 g과 magnesium sulfate 1.5 g을 첨가하고 진탕과 원심분리를 하였고 상층액 5 mL를 취하여 농축한 후 acetonitrile 1 mL에 재용해하여 syringe filter (0.2 μm, PTFE)로 여과하였다.

LC-MS/MS 기기분석

일정량의 시험 용액을 주입하여 LC-MS/MS (ABSCIEX,

Table 1. The MRM transition parameters of the analytes in LC-MS/MS

	Precursor ion (Da)	Product ion (Da)	DP ^{b)} (volts)	EP ^{c)} (volts)	CE ^{d)} (volts)	Ionization mode
Azadirachtin	742.6	724.8 ^{a)}	71.0	10.5	88.0	Positive ESI ^{e)}
		664.9	71.0	10.5	88.0	
Oleandrin	577.0	373.2 ^{a)}	41.0	10.5	100.0	Positive ESI
		145.2	41.0	10.5	100.0	
Berberine	336.1	320.1 ^{a)}	26.0	10.0	24.0	Positive ESI
		292.1	26.0	10.0	24.0	

^{a)}Quantitation ion ^{b)}Declustering potential ^{c)}Entrance potential ^{d)}Collision energy ^{e)}Electrospray ionization

Boston, USA)로 분석하였으며, 컬럼은 Kinetex (100 × 4.60 mm, 2.6 μm, C18, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA)를 사용하였다. Azadirachtin 분리용매는 80% acetonitrile를 사용하였으며(Pozo *et al.*, 2003), oleandrin과 berberine의 분리용매는 70% acetonitrile를 사용하였다(Wang *et al.*, 2000; Jee *et al.*, 2010). 모든 화합물은 positive 및 ESI (Electro Spray Ionization) mode에서 이온화하였으며 MRM(Multiple Reaction Monitoring) mode로 분석하여 크로마토그램상의 peak 면적값을 검량선과 비교하여 정량하였다.

표준품의 검량선 작성

구입한 azadirachtin, oleandrin 및 berberine의 표준품을 각각 acetonitrile에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak면적을 기준으로 검량선을 작성하였다.

회수율 시험 및 검출한계

무처리구 벼의 열매, 줄기, 뿌리를 각각 5 g씩 취한 후 0.5, 2.5 mg/L의 표준용액 1 mL 각각 혼합한 후 상기 추출 과정을 동일하게 수행하여 회수율을 산출하였다. 회수율 시험은 검출한계(limit of detection, LOD)의 10배와 50배 수준이었고 검출한계는 식 1을 이용하여 산출하였다.

$$\text{식 1} > \text{검출한계(mg/kg)} = \frac{\text{최소검출량(ng)} \times \frac{\text{최종희석량(mL)}}{\text{시료주입량(μL)}} \times \frac{\text{희석배수}}{\text{분석시료량(g)}}$$

식물추출물의 독성 조사

식물추출물에 대한 인축 및 환경 독성 시험은 “농약의 등록 시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2008-4호, 2008년 2월 11일)” 중 인축독성 시험분야의 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 안자극성시험, 피부자극성시험 방법과 환경생태독성시험 분야의 담수어류 급성독성시험법을 이용하였다(Hwang *et al.*, 2009).

1) 급성경구 독성시험

시험물질 투여 4시간 전부터 절식 시킨 specific pathogen free (SPF) mouse에 300배 희석액의 추출물(멸구슬, 협죽도, 황련)을 위장 내 강제 투여하였다. 각 추출물은 mouse 5,000 mg/kg(체중)을 기준으로 투여하였으며, 시험물질 투여 후 14일간 체중변화, 임상증상 및 치사개체를 조사하였다.

2) 급성경피 독성시험

SPF rat에 4,000 mg/kg을 기준으로 300배 희석액의 추출물을 투여하였다. 시험물질 투여 전에 미리 rat의 등 부위를 제모한 후 추출물이 투여된 패취를 이용하여 피부에 노출한 후, 노출 24시간 경과 후 시험물질을 제거하였다. 시험물질 제거 후 14일간 체중변화, 임상 증상 및 치사 개체를 조사하였다.

3) 안점막 자극 시험

300배 희석액의 추출물 3종을 각각 백색토끼의 오른쪽 눈의 하안검 결막낭에 0.1 mL씩 투여하였다. 시험물질 투여 후 72시간 동안 체중변화, 임상 증상 및 치사개체에 대해 조사하였다.

4) 피부자극 시험

백색토끼 개체 당 0.5 mL씩 300배 희석액의 추출물을 투여하여 4시간 후 시험물질을 제거하였다. 시험물질 투여 후 72시간 동안 체중변화, 임상증상 및 치사개체를 조사하였다.

결과 및 고찰

분석법 확립

벼 작물에서 식물추출물의 유효성분인 azadirachtin, oleandrin 및 berberine에 대한 잔류분석법의 유효성을 평가하기 위해 회수율시험 및 검출한계를 수행하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 검량선의 r^2 값은 모두 0.995 이상으로 우수한 직선성(Fig. 2)을 보였고, 검출한계는 0.01 mg/kg으로 분석법의 높은 감도를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

회수율은 검출한계의 10배 및 50배 수준인 저농도 0.1

Table 2. Recovery and limit of detection the analytes in the method

	Rice	Fortification (mg/kg)	Recovery±CV ^{a)} (%)	LOD ^{b)} (mg/kg)
Azadirachtin	Fruit	0.1	79.27±7.60	0.01
		0.5	76.00±1.05	
	Stem	0.1	97.07±2.55	
		0.5	82.67±3.57	
	Root	0.1	86.80±5.05	
		0.5	75.20±3.84	
Oleandrin	Fruit	0.1	107.73±1.09	0.01
		0.5	104.13±7.11	
	Stem	0.1	118.27±5.07	
		0.5	111.33±4.46	
	Root	0.1	103.20±4.89	
		0.5	100.40±6.41	
Berberine	Fruit	0.1	93.87±4.85	0.01
		0.5	89.60±4.97	
	Stem	0.1	104.13±3.49	
		0.5	81.57±3.43	
	Root	0.1	118.27±1.37	
		0.5	111.47±3.54	

a) Coefficient of variation

b) Limit of detection

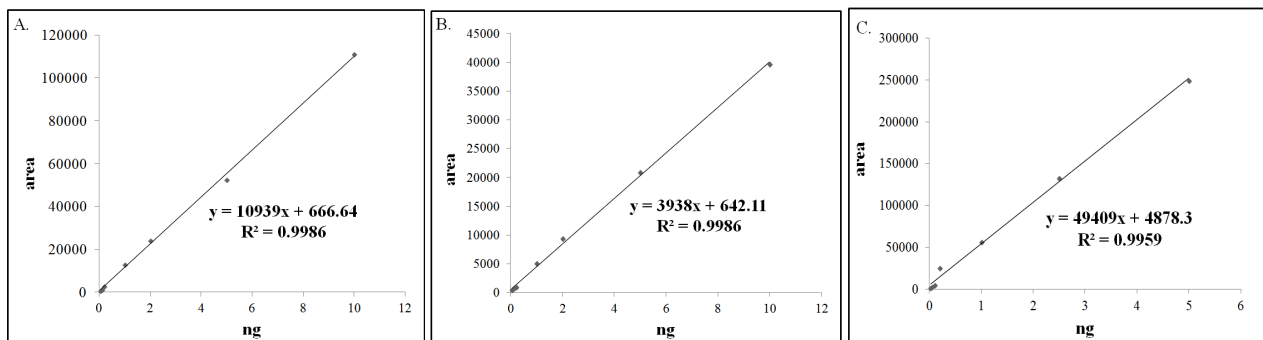


Fig. 2. Calibration curve of azadirachtin(A), oleandrin(B), and berberine(C).

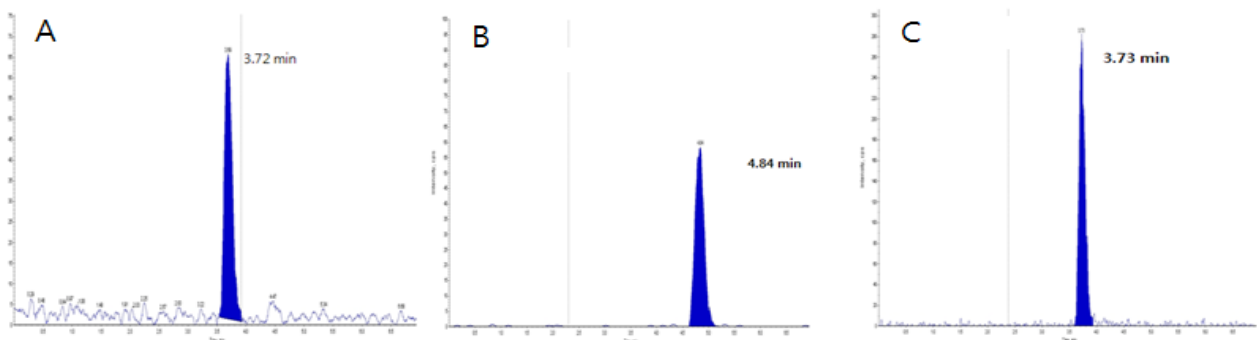


Fig. 3. Chromatograms of azadirachtin (0.01 mg/L, A), oleandrin (0.01 mg/L, B), berberine (0.01 mg/L, C) for limits of detection.

mg/kg 및 고농도 0.5 mg/kg에서 수행하였다. Azadirachtin에 대한 분석법의 회수율은 벼 열매에 대해 각각 79.27±7.60과 76.00±1.05%, 벼 줄기에서는 97.07±2.55와 82.67±3.57%, 벼 뿌리에서는 86.80±5.05과 75.20±3.84%를 나타내었다.

그리고 oleandrin에 대한 회수율은 벼 열매에 대해 각각 107.73±1.09와 104.13±7.11%, 벼 줄기에서는 118.27±5.07과 111.33±4.46%, 벼 뿌리에서는 103.20±4.89와 100.40±6.41%를 나타내었으며 berberine의 회수율은 열매에서

Table 3. Residues of azadirachtin, oleandrin, and berberine in rice after treatment ($n=3$)

Compound		Residues (mg/kg)±SD ^{a)}				
		0 DAT ^{b)}	10 DAT	20 DAT	23 DAT	27 DAT
Azadirachtin	Fruit	0.025±0.02	<LOD ^{c)}	<LOD	<LOD	<LOD
	Stem	0.026±0.19	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Root	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Oleandrin	Fruit	0.245±0.03	0.057±0.00	<LOD	<LOD	<LOD
	Stem	0.319±0.03	0.139±0.01	<LOD	<LOD	<LOD
	Root	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Berberine	Fruit	0.343±0.02	0.028±0.00	0.015±0.00	0.010±0.00	<LOD
	Stem	1.451±0.29	0.163±0.01	0.088±0.01	0.077±0.01	0.059±0.01
	Root	0.028±0.00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

^{a)}Standard deviation ^{b)}Days after treatment ^{c)}Limit of detection

93.87±4.85와 89.60±4.97%, 줄기에서 104.13±3.49와 81.57±3.43%, 뿌리에서 118.27±1.37과 111.47±3.54%를 나타내었다. 이는 농촌진흥청 농약등록시험기준과 방법에서 정한 회수를 70-120%와 20% 이내의 변이계수 수준을 모두 만족하였다.

추출물의 잔류량 조사

벼 재배시 멀구슬, 협죽도, 황련 추출물을 구획화하여 살포한 후 일정 간격으로 벼를 수확하였으며 열매, 줄기, 뿌리로 분리하여 시료를 취하였다. 벼의 각 부위에서 추출물의 유효성분 잔류량을 측정한 결과 Table 3과 같았다.

멀구슬 추출물의 유효성분인 azadirachtin은 처리 후 0일에서만 열매와 줄기에서 각각 0.025와 0.026 mg/kg이 검출되었고 그 이후에는 검출되지 않았으며, 뿌리에서는 처리 후 0일부터 azadirachtin이 검출되지 않았다.

협죽도의 유효성분인 oleandrin은 처리 후 0일에 열매와 줄기에서 각각 0.245, 0.319 mg/kg이 검출되었고, 처리 후 10일에 0.057과 0.139 mg/kg이 검출되었으며 그 이후에는 검출되지 않았다. Oleandrin도 뿌리에서는 처리 후 0일부터 검출되지 않았다.

Berberine을 유효성분으로 하는 황련의 경우 처리 후 0일에 열매, 줄기에서 각각 0.343, 1.451 mg/kg이 검출되었으며, 열매에서는 처리 후 23일에 0.010 mg/kg이 처리 후 27일부터는 검출한계 미만이었다. 또한 줄기에서는 처리 후 27일까지 검출한계 이상인 0.059 mg/kg이 검출되었다. Berberine은 뿌리에서는 처리 후 0일에 0.028 mg/kg이 검출된 후 처리 후 10일 부터는 검출되지 않았다.

본 연구는 국내에서 유기재배시 민간에서 사용되고 있는 식물 추출물 특히, 멀구슬, 협죽도, 황련 추출물에 대해 안전성을 검증하기 위해 수행되었다. 이들 추출물은 해충 방제의 목적으로 일반적으로 사용되고 있으나, 이에 대한 안전성 검증은 부족한 실정이다. 이번 연구에서는 이들 사용 후 잔류양상을 파악하여 안전성 여부를 조사하였다. 멀구슬, 협죽도, 황련의 활성성분은 각각 azadirachtin과 oleandrin, berberine이었다.

세 가지 식물추출물의 벼(열매, 줄기, 뿌리) 중 잔류양상으로 azadirachtin은 열매와 줄기에서는 살포 당일에 각각 0.025와 0.026 mg/kg이 검출되었으며 뿌리에서는 검출되지 않았다. Oleandrin의 잔류량은 열매와 줄기에서 0.245-0.057과 0.319-0.139 mg/kg 이었으며 뿌리에서는 검출되지 않았다. Berberine은 열매와 줄기에서 각각 0.343-0.010과 1.451-0.059 mg/kg로 살포 후 감소되는 양상을 보였으며 뿌리에서는 살포 당일에만 0.028 mg/kg이 검출되었다.

식물추출물의 안전사용기준을 설정하기 위하여 잔류량 조사와 더불어 농촌진흥청 고시 제2008-4호 「농약의 등록시험기준과 방법」에 의해 인축 독성 시험을 수행하였다. 세 추출물의 사용농도인 300배 희석액에 대한 인축 독성 시험 결과 급성경구독성은 > 5,000 mg/kg, 급성경피독성은 > 4,000 mg/kg으로 저독성이었고 안점막자극시험과 피부자극시험에서는 자극이 없는 것으로 보아 안전함을 확인하였다(결과미제시). 이에 따라 본 연구에서는 멀구슬, 협죽도와 황련 추출물을 친환경농자재로 활용함에 있어 이러한 식물추출물의 안전성 확보를 위한 과학적인 근거를 제시하였다.

Acknowledgement

This research was supported by Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development(Project No. PJ008423), Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Al-Yahya, M. A., AL-Farhan, A. H., Adam, S. E. (2000). Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia*, 71(4), 385-391.
- Ahn, S. M., Lee, D. S., Kim, M. S., Choi, S. J., Choi, C. S., Lee, J. B., Jang H. S. & Sohn. H. Y. (2009). Bioactivity

- of extract of *Coptis chinensis*: *In-vitro* antifungal activity against *Phytophthora capsici* and growth-promotion effect in red-pepper, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 37, 280-286.
- Arnason, J. T., Philogene, B. J. R. Morand, P., Imrie, K., Iyengar, S., Duval, F., Soucy-Breau, C., Scaiano, J. C., Werstiuk, N. H., Hasspieler B. & Downe. A. E. R. (1989). Naturally occurring and synthetic thiopenes as photoactivated insecticides, *In Insecticides of Plant Origin*. (ed. Arnason, J. T., Philogene, B. J. R. and Morand, P.) ACS symposium series no. 387, pp. 164-172, American Chemical Society, Washington, DC., USA.
- Erdemoglu, N., Küpeli, E., & Ye ilada, E. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 123-129.
- Hassan, A. J. (1996). The effect of different extracts of *Nerium oleander* (Apocynaceae) on the biological performance of the housefly *Musca domestica* (Diptera : Muscidae), M. Sc., College of Science , University of Babylon , Iraq, 79.
- Hwang, I. C., Kim, J., Kim, H. M., Kim, D. I., Kim, S. G., Kim, S. S., & Jang, C. (2009). Evaluation of toxicity of plant extract made by neem and matrine against main pests and natural enemies. *Korean Journal of Applied Entomology*, 48(1), 87-94.
- Jee, E. H., Kim, H. J., Jeong, S. H., Moon, J. H., & Jang, Y. P. (2010). Assessment of the Quality Variance among Commercial Hwang-Ryun-Hae-Dok-Tang by Simultaneous Analysis of Characterizing Compounds. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 41(3), 161-165.
- Jeong, I. M. (1997). Separation and activity test of antifungal substance from *C. japonica* extract. *Analytical Science and Technology*, 10(2), 153-159.
- Langford, S. D., & Boor, P. J. (1996). Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*, 109(1), 1-13.
- Mostaqul Huq, M., Jabbar, A., Rashid, M. A., & Hasan, C. M. (1999). A novel antibacterial and cardiac steroid from the roots of *Nerium oleander*. *Fitoterapia*, 70(1), 5-9.
- Park, J. H., Ryu, K. Y., Jee, H. J., Lee, B. M., & Gho, H. G. (2008). Evaluation of insecticidal activity of plant extracts against three insect pests. *Korean Journal of Applied Entomology*, 47(1), 59-64.
- Pozo, O. J., Marin, J. M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2003). Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 992(1), 133-140.
- Saxena, R. C. (1989). Insecticides from neem. In *Insecticides of plant origin* Ed. Journal of The American Chemical Society No. 387, pp. 110-135, USA.
- Schmutterer, H. (1980). Natural pesticides from the neem tree. *Proc. 1st Int. Neem Conf.* pp. 33-259.
- Wang, X., Plomley, J. B., Newman, R. A. & Cisneros, A. (2000). LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment, *Analytical. Chemistry*. 72(15), 3547-3552.
- Wink, M. (1993). Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In *Phytochemistry and Agriculture*. (ed. Van, T. A. Beek and Breteler, H.) Vol. 34, 171-213, Clarendon, Oxford, UK.