

Research Article

Open Access

고삼 추출물을 주성분으로 하는 유기농자재의 alkaloid계 살충성분 2종의 토양 및 수계 노출 안정성

김진효^{1*}, 최근형¹, 임성진¹, 박병준¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과

Stability of Matrine and Oxymatrine from the Biopesticide from *Sophora flavescens* under Aquatic and Soil Environment

Jin Hyo Kim^{1*}, Geun-Hyoung Choi¹, Sung-Jin Lim¹ and Byung-Jun Park¹ (¹Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development of Administration, Wanju-gun, 565-851, Korea)

Received: 7 November 2014 / Revised: 2 December 2014 / Accepted: 6 January 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: The stabilities of the two alkaloidal insecticides of *S. flavescens* including matrine and oxymatrine are important factor to establish expiry date and usage manual for crop protection. However, the environmental stability of the compounds had not been studied with the extract and its commercial biopesticide.

METHODS AND RESULTS: The environmental stabilities of the two alkaloids were performed with extract of *S. flavescens*, and its two commercial biopesticides both in controlled aquatic and soil conditions. The half-lives of the total matrines for the extract and its two commercial biopesticides were estimated over 200 days both under aerobic and anaerobic water condition. Under dry soil condition, the initial decay rates of the matrines were calculated 0.0804-0.1275 ($t_{1/2}$ 5.4-8.6 days), and the half-lives under wet soil condition were calculated 33.0-231 days. Total soil bacteria on the wet soil ranged 6.0-8.0 log CFU/g-soil during the experiments period.

CONCLUSION: The aquatic mixture of the extract showed excellent stability both with the extract and its biopesticides, however, the stability of soil mixture were shorter than the aquatic mixture, suggesting that soil metal consider as a catalyst for the degradation of the two alkaloids

Key words: Biopesticide, matrine, Environmental stability, *Sophora flavescens* extract

서 론

식물 추출물을 활용한 작물 병해충 방제기술 수요가 최근 급격히 증가하고 있으며, 이를 위한 식물 추출물별 병해충 방제 기능성에 대한 연구도 여러 분야에서 진행되고 있다 (Kwon *et al.*, 1997; Kyung *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). 이들 중 콩과 식물인 고삼은 우리나라와 일본 등지에서 서식하며 (Kim *et al.*, 2000), 추출물의 살균 (Ahn *et al.*, 1998) 및 살충활성 (Taylor *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008) 등이 확인되어, 화학농약을 대체하는 병해충 방제제로도 광범위하게 활용되고 있다. 하지만, 추출물을 활용한 병해충 방제는 Seo 등 (2011)의 보고와 같이, 식물의 재배환경, 추출부위, 추출공정 및 유통 형태 등에 따라 기능성을 나

*Corresponding author: Jin Hyo Kim
Phone: +82-63-238-3239; Fax: +82-63-238-3837;
E-mail: setup75@korea.kr

타내는 유효물질의 함량차이로 인해 약효가 달라져, 식물 추출물을 활용한 유기농자재의 병해충 방제 효능은 화학농약과 달리 보장받기 어려운 실정이다. 이로 인해 유기농자재의 품질관리를 위한 지표물질 설정 및 유기농자재 내 유효물질의 정량분석 기술 등에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다(Lee et al., 2013; Lim et al., 2014).

고삼 추출물의 병해충 방제 기능 성분으로는 *matrine*, *oxymatrine* 같은 alkaloid 계열성분(Liu et al., 2008)과 polyphenol계열의 *sophoraflavanone G* (Cha et al., 2007), saponin계열의 *soyasaponin I* (Taylor et al., 2007) 등이 알려져 있다. 이 중 *matrine*과 *oxymatrine*은 살충과 살균기능이 있는 것으로 알려져 있어, Lim 등(2014)은 *matrine*과 *oxymatrine*을 효능을 나타내는 지표물질로 선정하고, 제품의 함량을 분석하여 유기농자재 품질관리에 활용하고자 하였다. 하지만, 고삼의 병해충 방제기능 성분인 *matrine*의 환경노출 안정성에 대한 연구 결과가 부족하여 적절한 약제처방기술이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 고삼의 작물 병해충 방제 기능성 물질로 알려진 *matrine*과 *oxymatrine*이 고삼 추출물과 여러 보조제가 포함된 유기농자재 제품 형태로 수계와 농경지 토양에 노출될 때의 안정성을 평가하여, 병해충 방제를 위한 제형 및 처방기술 개발에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준품

정제에 사용한 Solid Phase Extract (SPE) 카트리지는 ENVI-Carb™ (500 mg, Sigma-Aldrich, PA, USA)과 C₁₈ 카트리지(500 mg, GL Science, Japan)를 사용하였다. 분석대상으로 사용한 표준물질인 *matrine*과 *oxymatrine*은 ChromaDex사(Irvine, CA, USA)의 제품을 사용하였다. Methanol, acetonitrile은 TEDIA사(Fairfield, OH, USA)의 HPLC등급 시약을 사용하였으며, triethylamine과 formic acid는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 reagent급 제품을 사용하였다. 표준품의 stock solution은 1,000 mg/L 농도로 methanol에 녹여 조제하고 -20℃ 냉동고에 보관하면서 필요할 때 적정 농도로 희석하여 검량선 작성에 사용하였다. Reagent급 염화나트륨 및 무수황산나트륨은 Merck (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다.

시 료

안정성 평가 시험에는 중국산 고삼 추출물과 Biopesticide A (㈜바이오아그로, 한국), Biopesticide B (㈜참농지기, 한국) 등 2종의 유기농자재를 국내에서 구입하여 사용하였다. 추출물과 제품의 총 *matrines* 함량(*matrine*과 *oxymatrine*의 총량)은 각각 16,924 mg/L, 7,783 mg/L와 5,726 mg/L이었으며, *matrine* 함량이 80% 이상을 차지하였고, *oxymatrine* 함량은 높지 않은 것으로 확인되었다.

수용액 중 안정성 평가

탈산소 조건의 안정성 평가는 증류수 19 mL를 갈색유리병에 넣고, 질소가스를 1시간 동안 폭기하여 산소를 제거한 후 질소가류 하에서 시료 1 mL를 넣은 뒤 밀폐하고, 실온에서 시험기간 동안 150 rpm으로 연속 교반하였다. 호기조건의 안정성 평가 시험은 증류수 19 mL와 시료 1 mL를 섞은 갈색유리병에 폭기장치를 설치하고 200 mL/min의 유속으로 공기를 주입하면서 진행하였다. 이 후 12주간 7일 간격으로 시료를 채취하여 유효성분 2종을 분석하여 분해율을 조사하였다.

토양 중 안정성 평가

고삼 추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재 2종을 이용하여 유효성분의 토양 중 안정성을 평가하였다. 토양 시료는 사양토를 그늘에서 건조시킨 후 2 mm 체로 쳐서 시험 전까지 냉암소에 보관하였다. 1 mL의 고삼 추출물과 유기농자재 시료를 각각 0.1 M triethylamine methanol 용액 10 mL에 희석하고, 미리 준비한 건조 토양 20 g에 분무한 뒤, 1시간 동안 교반기로 섞어 주었다. 토양을 10 mm 이하의 두께로 넓게 펼친 후 실온 암조건에서 안정성 평가를 실시하였다. 또한, 함수토양에 대한 안전성 평가 시험은 멸균되지 않은 건조 토양 20 g에 위와 동일한 방법으로 분무처리하고, 토양 수분이 포장용수량의 60%가 되도록 증류수를 골고루 섞어주며 넣고, 덮개를 덮은 뒤 72 시간 동안 격렬하게 진탕하였다. 이후 실온 암조건에서 마개를 막아 수분증발을 억제하는 조건에서 1주일 간격으로 시료를 채취한 뒤 유효성분 2종의 함량을 분석하였다.

토양 중 총 세균수 변화

토양 중 총 세균수는 Kim 등(2014)의 방법으로 측정하였다. 토양 1 g을 멸균 증류수에 녹인 0.1% peptone 용액 9.0 mL에 넣고 vortexing하여, 추출용액을 제조하였다. 추출용액은 10배씩 순차희석하고, 희석용액은 일반세균용 petrifilm (3 M™, Minnesota, USA)에 1 mL씩 접종하였다. 접종이 완료된 petrifilm을 30℃에서 2일간 배양한 후 총 세균수를 측정하였다.

유효성분 정량분석

고삼 추출물의 주요 유효성분인 *matrine* 및 *oxymatrine* 2종의 분석은 Lim 등(2014)의 분석법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 수중 안정성 평가를 위한 수용액시료는 다음과 같이 전처리 하였다. 시료 1 mL를 ENVI-Carb™ 카트리지에 주입하고, 10분간 안정화 시킨다. 이 후 증류수 12 mL로 세척하고, ENVI-Carb™ 카트리지 하단에 C₁₈ 카트리지를 연결한 뒤, 12 mL methanol로 용출시킨다. 마지막으로 ENVI-Carb™ 카트리지를 제거 후 C₁₈ 카트리지를 methanol 6 mL로 용출시킨 뒤 용출용액을 모두 모아 감압농축 후 methanol 1 mL에 재 용해하여, Lim 등(2014)이 설정한 조건에서 ultra performance liquid chromatography (UPLC)를 통한 정량분

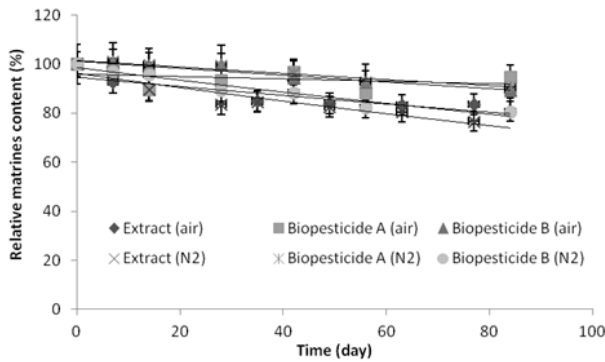


Fig. 1. Temporal changes of total matrine ($\Sigma(\text{matrine} + \text{oxymatrine})$) content.

◆ for *S. flavescens* extract (under air), ■ for Biopesticide A (under air), ▲ for Biopesticide B (under air), × for *S. flavescens* extract (under N_2), * for Biopesticide A (under N_2), and ● for Biopesticide B (under N_2) in water.

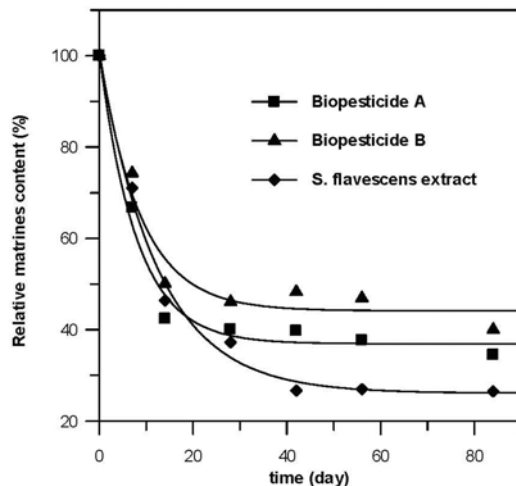


Fig. 2. Temporal changes of total matrine ($\Sigma(\text{matrine} + \text{oxymatrine})$) content.

◆ for *S. flavescens* extract, ■ for Biopesticide A, and ▲ for Biopesticide B on dry soil.

석을 실시하였다. 토양 중 안정성 평가를 위한 시료는 토양 20 g을 0.1 M triethylamine이 포함된 acetonitrile 20 mL로 2시간 진탕 추출하고, 여과 후 감압 농축하였다. 농축된 시료는 5 % methanol 1 mL 수용액에 재용해한 후 ENVI-CarbTM 카트리지에 주입하였다. 이 후 카트리지 정제는 수용액 시료의 정제와 동일한 과정을 거친 후 기기분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Matrines 수중 안정성

고삼 추출물 및 이를 주성분으로 하는 유기농자재 2종에 대해 수중 안정성을 탈산소 조건과 호기 조건에서 각각 시험하였다. 추출물과 유기농자재 2종 모두 수용액 상태에서 12

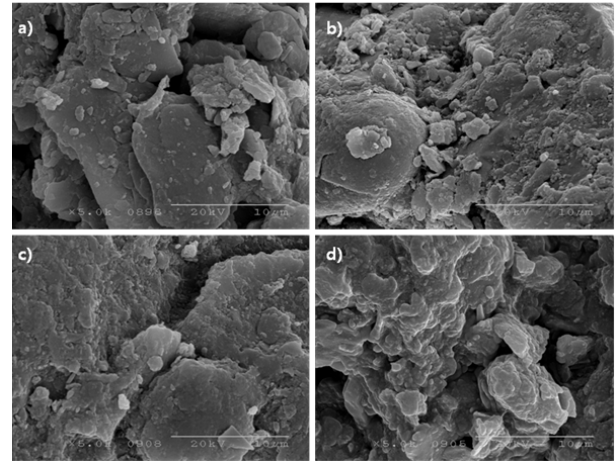


Fig. 3. SEM images of dried soil surface.

Untreated soil (a), the extract of *S. flavescens* treated soil with 0.05 mL/g (b), 0.10 mL/g (c), and 0.25 mL/g (d) after 14 days aging.

주간 총 matrine 분해율이 20% 미만으로 확인되었고, 총 matrines 수중 반감기는 추출물과 농자재에서 모두 30주 이상인 것으로 예측되었다(Fig. 1). 또한, 총 matrines의 80% 이상을 차지하는 matrine의 수중 분해율은 추출물 및 제품에서 모두 10% 미만으로 확인되었으나, oxymatrine 분해율은 최대 80%까지 확인되었고, 이를 통해 oxymatrine의 분해가 총 matrines 감소의 주요 원인인 것으로 판단되었다. Oxymatrine의 반감기는 2종의 제품에서 각각 28일과 200일 이상으로 확인되었고, 이러한 반감기 차이는 유기농자재 내 포함된 보조제 등의 영향인 것으로 판단된다. 그리고 산소에 의한 matrines 분해 감소 영향을 살펴보기 위해 진행된 호기 조건과 탈산소 조건의 비교시험에서 유의적인 차이가 발견되지 않았으며, 이러한 결과로 볼 때 matrine과 oxymatrine은 산소에 의한 접촉산화에는 비교적 안정적인 것으로 판단된다.

Matrines 토양 노출 안정성

토양 노출에 의한 matrine 및 oxymatrine 안정성 평가는 건조토양과 60% 함수토양에서 각각 진행되었으며, 건조토양에서 진행된 시험결과, 14일 경과 후 50% 수준으로 분해되었고, 84일 경과 후 60-73.5%의 총 matrines 분해율이 관찰되었다. 건조 토양에서 matrine 분해패턴은 수중 분해패턴과 달리, 시험시작 14일 이전에 급격히 분해가 진행되고, 이후 분해율이 급격히 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서는 single exponential decay equation (offset)를 사용하여 총 matrine의 초기 분해 속도를 구하였다. 시험 결과, 건조 토양에서 고삼 추출물의 초기 분해 속도상수 k 는 0.0804 ($t_{1/2}=8.6$ 일)로 나타났으며, Biopesticide A와 B의 초기 분해 속도상수 k 는 각각 0.1275 ($t_{1/2}=5.4$ 일)와 0.1144 ($t_{1/2}=6.0$ 일)로 계산되어, 추출물과 유기농자재 제품간 반감기 차이가 크게 나타나지 않았다. 건조 토양에서 총 matrines 반감기가 수중 시험에서 보다 짧은 것은 토양광물

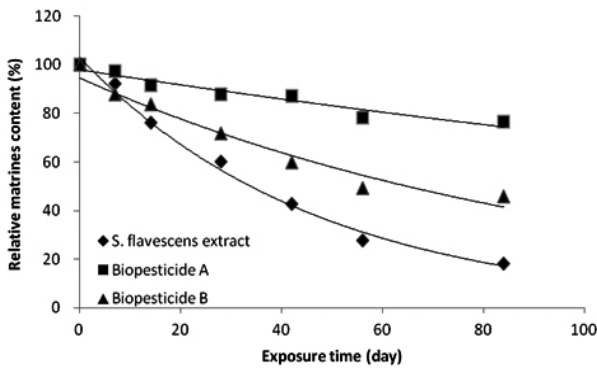


Fig. 4. Temporal changes of total matrine (Σ (matrine+oxymatrine) content. ◆ for *S. flavescentis* extract, ■ for Biopesticide A, and ▲ for Biopesticide B on wet soil.

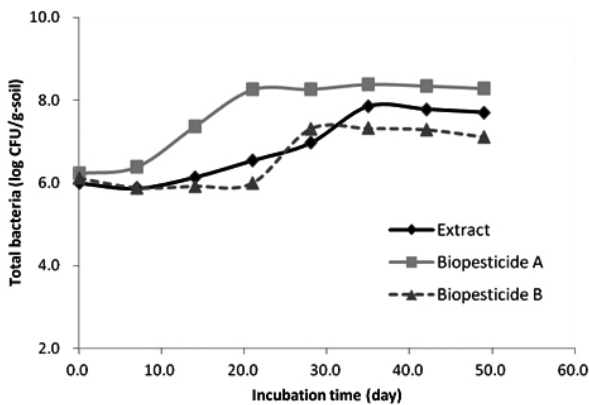


Fig. 5. Temporal changes of total bacteria on wet soil. ◆ for *S. flavescentis* extract, ■ for Biopesticide A, and ▲ for Biopesticide B.

에 의한 분해 촉매작용이 주요한 요인으로 고려되었다. 또한, 노출 후반기의 분해율이 급격히 감소하는 것은 고삼 추출물 등 처리된 유기물이 토양 표면에 견고한 피막을 형성하기 때문인 것으로 판단된다(Fig. 3). 그리고, 건조 조건에서는 토양 생물활동이 제한적이므로, 미생물 등 생물학적 요인에 의한 matrine 분해 영향은 낮은 것으로 기대되었다.

60% 함수토양에서 진행된 총 matrine의 토양 노출 안정성 평가 결과, 시험기간 전체에 걸쳐 분해율이 일정하게 나타남에 따라, 1st order equation을 이용하여 분해 반감기를 산출하였다. 고삼 추출물의 총 matrine반감기는 33.0일로 확인되었고, 유기농자재 2종의 경우, Biopesticide A는 231일, Biopesticide B는 69.3일로 예측되어, 유기농자재에 포함된 보조제의 영향이 크게 작용함을 알 수 있었다(Fig. 4). 함수 토양 내 일반세균 분포의 변화 관찰 시험에서, 총 일반세균수가 6.0 log colony forming unit (CFU)/g-soil 이상을 유지하고 있는 것이 확인되어 고삼 추출물의 일반세균에 대한 항균성이 높지 않은 것으로 사료되었다. 또한, 함수 토양 내 일반세균수는 보관 2-3주 경과 후 증가하기 시작하여

8.0 log CFU/g-soil 수준에서 일정하게 유지되었으며, 이러한 결과는 고삼 추출물 및 유기농자재 2종이 각각 처리된 함수토양에서 모두 유사하게 나타났다(Fig. 5). 따라서 함수 토양에서는 화학적 분해요인과 함께 생물학적 분해요인이 alkaloid계 유효물질의 안정성에 영향을 미치는 것으로 판단되었고, Sun 등(2010)이 보고한 matrine 반감기(6.70-9.18 일) 결과에서 볼 수 있듯이, 실제 농업 환경에서의 고삼 중 matrine 반감기는 본 연구에서 고려되지 못한 토양 생물, 태양광 등의 다양한 환경요인으로 인해 본 시험에서 도출된 유효성분 반감기 보다 짧을 것으로 기대된다.

그리고, matrine과 oxymatrine의 성분별 토양 노출 안정성 시험결과는 수중 노출 시험 결과와 같이 oxymatrine의 분해율이 matrine 분해율 보다 높게 관찰되었다.

결론

고삼 추출물의 작물 병해충 방제 기능성 물질로 알려진 matrine과 oxymatrine의 수중 및 토양 노출 안정성을 추출물 원액과 이를 활용한 유기농자재에서 각각 평가한 결과, 고삼 추출물과 유기농자재를 물에 희석한 채 보관할 경우 유효성분 안정성이 높아 상당한 기간 동안 보관할 수 있을 것으로 판단되었다. 반면, 토양 노출의 경우 건조 토양의 반감기가 함수 토양의 반감기보다 짧은 것으로 예측되었다. 그리고, 실제 농업 환경에서는 토양 광물에 의한 분해 촉진, 토양 생물 활동, 광 노출 등 다양한 요인을 고려할 경우, matrine의 환경 노출 안정성은 본 연구 결과보다 더 낮아 질 것으로 판단된다.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from "The Research Program for Agricultural Science & Technology Development(PJ010834)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Cha, D., Jeong, M. R., Jeong, S. I., & Lee, K. Y. (2007). Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescentis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 858-864.
- Kim, J. H., Jeong, D. Y., Jin, C. L., Kim, W. I., Lim, S. J., Choi, G. H., & Park, B. J. (2014). Stability of four limonoid substances of neem extract under controlled aquatic and soil conditions. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 18(3), 156-160.
- Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, K. S., Chang, S. Y., & Won, D. H. (2000). Isolation and quantitative determination of matrine from *Sophorae Radix*. *The Korean Journal of*

- Pharmacognosy, 31(4), 421-425.
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Jee, H. J., Yun, J. C., Hong, S. J., Park, J. H., & Han, E. J. (2013). Insecticidal effect of organic materials of BT, neem, and matrine alone and its mixture against major insect pests of organic chinese cabbage. The Korean Journal of Pesticide Science, 17(3), 213-219.
- Kim, S. K., Jin, J. H., Lim, C. K., Hur, J. H., & Cho, S. Y. (2009). Evaluation of insecticidal efficacy of plant extracts against major insect pests. The Korean Journal of Pesticide Science, 13(3), 165-170.
- Kwon, O. K., Lim, S. K., Seong, K. S., & Choi, B. R. (1997). Screening of pesticidal active compounds from various domestic wild plants. The Korean Journal of Environmental Agriculture, 16(4), 347-355.
- Kyung, S. H., & Yoon, Y. H. (1999). Insecticidal activity of native plant extracts against *Culex pipiens pallens* and *Musca domestica*. The Korean Journal of Pesticide Science, 3(1), 46-50.
- Lee, J. W., Jin, C. L., Jang, K. C., Choi, G. H., Lee, H. D., & Kim, J. H. (2013). Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 2(1), 81- 85.
- Lim, S. J., Jeong, D. Y., Choi, G. H., Park, B. J., & Kim, J. H. (2014). Quantitative analysis of matrine and oxymatrine in *Sophora flavescens* extract and its biopesticides by UPLC. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 3(4), 64-73.
- Liu, L., Alam, M. S., Hirata, K., Matsuda, K., & Ozoe, Y. (2008). Actions of quinolizidine alkaloids on *Periplaneta americana* nicotinic acetylcholine receptors. Pesticide Management Science, 64(12), 1222-1228.
- Seo, M. J., Shin, H. S., Jo, S. H., Gawk, C. S., Kwon, H. R., Park, M. W., Kim, S. H., Cho, D. H., Yu, Y. M., & Youn, Y. N. (2011). Selection of environmental-friendly control agents for controlling the comstock mealybug [*Pseudococcus comstocki* (Kuwana), Pseudococcidae, Hemiptera]. The Korean Journal of Pesticide Science, 15(4), 479-484.
- Song, J. S., Lee, C. M., Lee, S. M., Lee, D. S., Choi, Y. H., & Lee, D. W. (2013). Insecticidal activity of 7 herbal extracts against black pine bast scale, *Matsucoccus thunbergianae*. The Korean Journal of Pesticide Science, 17(4), 411-418.
- Sun, Y., Xu, Y., Qin, D., Qin, X., & Dai, X. (2010). Residue detection and degradation of matrine in cucumber and soil. Journal of Agro-Environment Science, 29(4), 686-691.
- Taylor, W. G., Fields, P. G., & Sutherland, D. H. (2007). Fractionation of lentil seeds (*Lens culinaris* Medik.) for insecticidal and flavonol tetraglycoside components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(14), 5491-5498.