

Research Article

Open Access

UPLC를 활용한 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 Rotenone과 Deguelin 정량분석

임성진¹, 김진효¹, 최근형¹, 박병준^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과

Quantitative Analysis of Rotenone and Deguelin in Biopesticides Containing Derris Extract by Ultra performance Liquid Chromatography

Sung-Jin Lim¹, Jin-Hyo Kim¹, Geun-Hyoung Choi¹ and Byung-Jun Park^{1*} (¹Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, 565-851, Korea)

Received: 12 January 2015 / Revised: 26 January 2015/ Accepted: 16 February 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: Three commercial biopesticides containing derris extract, which is permitted as a commercial biopesticide substances by the Environmentally-friendly Agriculture Promotion Act, have been marketed in Korea. But, the quantitative analytical method of active substances for crop protection in biopesticides containing derris extract has not known.

METHODS AND RESULTS: Solid phase extraction (SPE) cartridge clean-up method for the quantitative analysis of rotenone and deguelin in biopesticides containing derris extract was developed and validated by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). The clean-up method was established using hydrophilic lipophilic balance (HLB) SPE cartridges for the bioactive substances in biopesticides containing derris extract, and the eluate was analyzed to quantify the rotenone and deguelin by the UPLC. LOQ and recovery rates of rotenone and deguelin were 0.085 and 0.044 mg/L, 95.7 and 93.3%,

respectively. The content of rotenone and deguelin in three biopesticides containing derris extract were analyzed by the developed method, the results showed 0.001-0.236 and <LOQ-0.258%, respectively.

CONCLUSION: The developed method could be applicable to determine the active substances and to control the quality of commercial biopesticide containing derris extract.

Key words: Biopesticide, Deguelin, Derris, Rotenone, UPLC

서론

웰빙 욕구에 따른 소비자의 식품안전과 건강에 대한 관심 증가로 인하여 유기농산물에 대한 수요가 지속적으로 증가하여 2020년에는 시장규모가 약 7조원에 이를 것으로 전망하고 있다(Kim *et al.*, 2011; KREI, 2012). 또한 농촌진흥청에 따르면 유기농자재 공시 및 품질인증제품 목록의 수는 유기농업의 증가와 함께 증가하여 2015년 1월 현재 병해관리용 91종(6.77%), 병해충관리용 185종(13.75%), 작물생육용 152종(11.30%), 충해관리용 159종(11.82%), 토양개량 및 작물생육용 744종(55.32%), 토양개량용 자재 14종(1.04%)으로 총 1345종에 이른다. 이들 중 식물추출물이 사용된 유기농자재

*Corresponding author: Byung-Jun Park
Phone: +82-63-238-3238; Fax: +82-63-238-3837;
E-mail: bjpark@korea.kr

는 193종(14.3%)으로 병해관리용, 병해충관리용, 충해관리용, 작물생육용, 토양개량 및 작물생육용 자재로 사용되고 있다.

식물추출물로서 유기농자재의 허용물질인 데리스(Derris)는 동남아시아와 남서태평양 도서국에 자생하는 콩과의 덩굴성 식물로 isoflavonoid계 물질을 함유하고 있고, 이들은 α -glucosidase 저해, 살충, 세포독성 및 항산화 등 광범위한 생물활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Svasti *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2007; Yenesew *et al.*, 2009). 또한 데리스는 10^{-6} M 이하의 농도에서 해충의 미토콘드리아 전자전달계를 교란시켜 ATP 합성을 저해함으로써 살충효과를 나타내는 rotenone과 처리 후 48 시간에 이집트숲모기의 반수 치사농도(LC₅₀)가 2.63 mg/L인 deguelin을 포함하고 있어 (Rich, 1996; Bosire *et al.*, 2014) 데리스 추출물 함유 유기농자재 3개 제품이 국내에서 제조·판매되고 있다.

꿀, 혈청, 물, 어류, 종자, 식물성 기름 및 데리스 추출물 중 rotenone과 deguelin 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-MS-MS) 및 gas chromatography (GC)를 활용하여 분석되고 있지만 (Dawson and Allen, 1988; Draper *et al.*, 1999; Pedersen and Shibamoto, 1999; Jimenez *et al.*, 2000; Scortichini *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Caboni *et al.*, 2008; Wenjie *et al.*, 2009; Lautie *et al.*, 2012), 현재까지 유기농자재 중 이들의 함량평가를 위한 분석방법은 보고된 바 없다.

최근 님, 고삼, 계피 및 마늘 추출물 함유 유기농자재 중 작물보호활성 성분을 지표성분으로 설정하고, hydrophilic liphophilic balance (HLB), ENVI-Carb 및 C₁₈ 카트리지를 이용한 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)과 ultra-performance liquid chromatography (UPLC) 및 GC를 활용한 지표성분 분석법이 보고되었다 (Lee *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2014a; Lim *et al.*, 2014b; Lim *et al.*, 2014c). 따라서 본 연구에서는 작물보호활성을 기초로 rotenone과 deguelin을 데리스의 지표성분으로 설정하고, 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 이들의 함량을 분석하기 위한 SPE 정제법과 UPLC 분석조건을 확립한 후 이 분석법을 활용하여 유기농자재 중 지표성분 함량을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준품

Rotenone (95% purity)과 deguelin (98% purity) 표준품은 Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)로부터 구입하였고, dichloromethane (purity 99.9%)과 methanol (purity 100%)은 각각 J.T. Baker (New Jersey, USA)와 Tedia (Ohio, USA)의 제품을 사용하였다. 시료정제에 사용한 ENVI-Carb (500 mg, 6 mL), C₁₈ (500 mg, 6 mL) 및 HLB (60 mg, 3 mL) cartridge는 각각 Supelco (Philadelphia, USA), Phenomenex (California, USA) 및 Waters (Milford, USA)로부터 구입하였고, 데리스 추출물

함유 유기농자재는 2개의 유기농자재 업체로부터 구입하여 분석에 사용하였다.

유기농자재 중 지표물질 선정

데리스의 고유성분으로 작물보호활성을 나타내는 rotenone과 deguelin을 데리스 추출물 함유 유기농자재의 지표성분으로 선발하였고, 두 지표성분의 함량은 UV detector가 장착된 UPLC (Waters, Massachusetts, USA)를 사용하여 분석하였다.

지표성분 분석

데리스 추출물을 함유한 유기농자재 중 지표성분 분석을 위한 정제방법으로는 액액분배법과 SPE cartridge를 사용하였다. 증류수(distilled water, DW)로 10배 희석한 유기농자재 1 mL를 분액여두로 옮기고 증류수 50 mL와 dichloromethane 20 mL를 첨가하여 진탕한 후 dichloromethane 층을 sodium sulfate anhydrous를 이용하여 탈수하는 방법으로 3회 분배하였으며, dichloromethane 분배액을 혼합하여 40°C에서 감압 농축한 다음 2 mL의 methanol:DW (5:95, v/v) 혼합액으로 재 용해하여 정제용 시료로 사용하였다.

Methanol 2 mL와 DW 2 mL를 순차적으로 흘려주어 활성화 한 HLB cartridge (60 mg, 3 mL)에 정제용 시료 2 mL를 하적한 다음 2 mL의 methanol:DW (5:95, v/v) 혼합액을 흘려주어 세정하고, methanol 5 mL로 지표성분을 용출하였다. 이 용출액을 40°C에서 감압 농축하고, methanol 2 mL로 재 용해한 후 syringe filter (0.45 μ m)로 여과한 다음 UPLC를 이용하여 Table 1의 기기조건에서 분석하였다.

시험방법의 유효성 확인

Rotenone과 deguelin의 정량분석을 위한 시험방법의 유효성은 검량곡선의 직선성, 정량한계(limits of quantitation, LOQ), 회수율 및 상대표준편차를 사용하여 검증하였다. 검량곡선의 직선성은 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 및 20 mg/L의 농도를 Table 1의 조건에서 5반복 주입하여 얻은 평균값으로 작성하였고, S/N 비가(signal to noise ratio) 10이 되는 농도를 rotenone과 deguelin의 LOQ로 정하였다. 회수율 시험은 rotenone과 deguelin 각각 4 mg/L의 농도가 되도록 데리스 추출물을 함유하지 않은 유기농자재에 첨가하고, 상기의 분석방법에 따라 3회 반복 수행하였다. 회수율은 rotenone과 deguelin의 검량곡선에 대입하여 얻은 농도와 첨가농도의 비교를 통해 산출하였다. 실험실내 정밀성(intermediate precision)은 5반복 수행한 값을 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)로 나타냈다.

결과 및 고찰

지표성분 선정

데리스의 고유성분으로 다량 포함되어 있고 이집트숲모기 등의 해충에 살충효과를 나타내는 rotenone과 deguelin을 데리스 추출물 함유 유기농자재의 품질관리를 위한 지표성분

Table 1. Analytical conditions for rotenone and deguelin analysis

Item	Analytical conditions			
Column	Acquity BEH C ₁₈ (1.7 μm, 2.1x100 mm, Waters, Boston, USA)			
Column temp.	40°C			
Injection volume	5 μL			
Mobile phase	Time (min)	Flow (mL/min)	0.05% Formic acid (%)	Acetonitrile (%)
	0		55	45
	10		55	45
	13	0.5	0	100
	15		0	100
	17		55	45
Detector	UV (295 nm)			

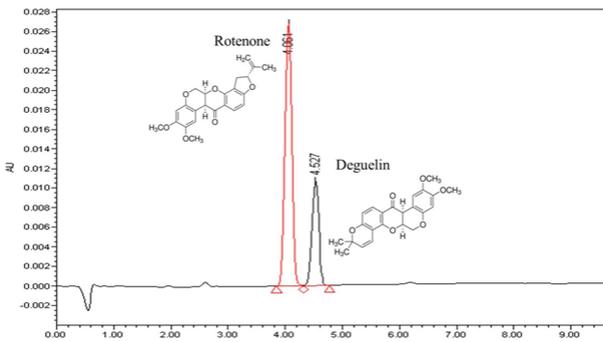


Fig. 1. Chromatogram and structure of rotenone and deguelin.

으로 선정하였다. 두 성분은 C₁₈ column, 0.05% formic acid와 acetonitrile 이동상의 UPLC 기기조건에서 각각 동시분석에 적합한 감도와 간섭물질의 영향을 받지 않는 4.06과 4.53 분의 머무름시간을 나타냈다(Fig. 1).

정제방법

데리스 추출물을 함유한 유기농자재 중 지표성분 rotenone과 deguelin은 ENVI-Carb, C₁₈ 및 HLB cartridge 정제를 통해 분석하고자 하였다. 유기농자재 중 지표성분 분석에 있어서 이들 cartridge의 유용성은 Lee 등(2013)과 Lim 등(2014a)의 결과에서 검증된 바 있다. ENVI-Carb와 C₁₈ cartridge를 상하에 연속적으로 배치하여 고삼 추출물 함유 유기농자재 중 matrine과 oxymatrine 함량 분석(Lim *et al.*, 2014a)에 사용된 정제방법을 데리스 추출물 함유 유기농자재에 적용하였을 경우, 지표성분인 rotenone과 deguelin의 회수율이 20% 미만이었다(결과미제시).

HLB cartridge는 액액분배법(dichloromethane)과 함께 님 추출물 함유 유기농자재 중 limonoid계 살충활성 성분인 azadirachtin A, azadirachtin B, deacetylsalannin 및 salannin의 함량분석 시 정제방법으로 사용된 바 있다(Lee *et al.*, 2013). 이 분석방법을 데리스 추출물 함유 유기농자재

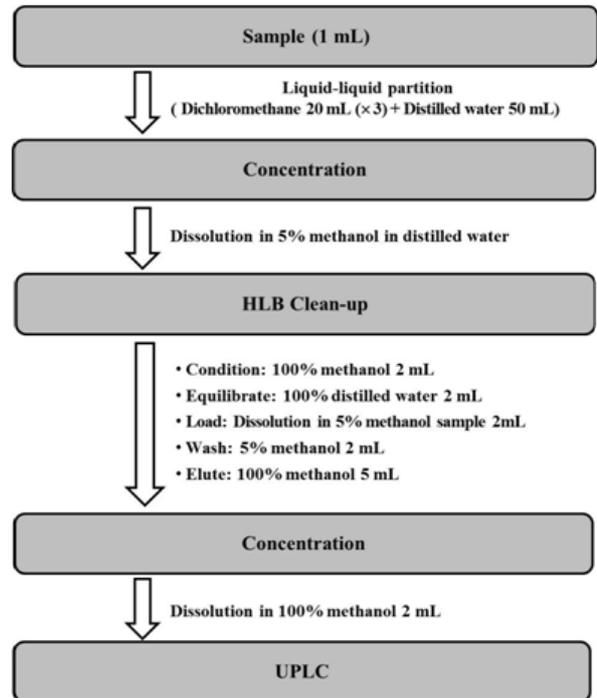


Fig. 2. Flow chart for rotenone and deguelin analysis in biopesticides containing derris extract.

중 지표성분 분석에 적용하였을 경우, 지표성분인 rotenone과 deguelin 회수율이 각각 92.8-100.2와 88.2-99.8%로 양호한 결과를 나타냈다. 따라서 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 두 지표성분 분석을 위한 정제방법으로 HLB cartridge를 채택하였다(Fig. 2).

시험방법의 유효성 검증

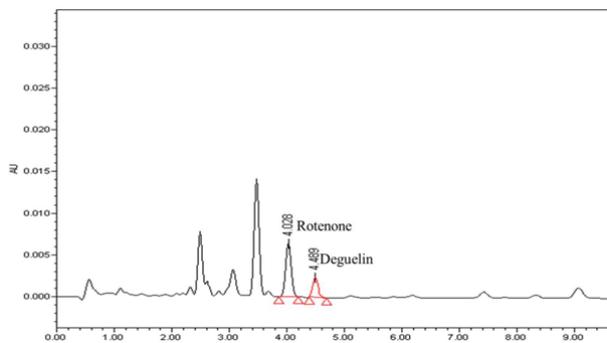
지표성분인 rotenone과 deguelin의 표준검량곡선은 0-20 mg/L표준용액을 제조한 다음 Table 1의 기기조건에서 분석하고, 각 성분의 피크면적으로부터 작성하였다. Rotenone과 deguelin의 머무름시간과 표준검량선 회귀방정

Table 2. Validation parameters for rotenone and deguelin analysis

Materials	Linearity(R^2)	Recovery rate ^a (%)	LOQ (mg/L)	RSD ^b (%)
Rotenone	0.9997	95.7±4.0	0.085	4.1
Deguelin	0.9997	93.3±5.9	0.044	6.3

^a The data represent the mean values ±SD (standard deviation) of three replicates

^b Relative standard deviation (SD/Average ×100)

**Fig. 3. Representative chromatogram of rotenone and deguelin in biopesticide samples.****Table 3. Rotenone and deguelin contents in commercial biopesticides containing derris extract**

Samples	Rotenone (%)	Deguelin (%)	Total (%)
1	0.001	<LOQ	0.001
2	0.236	0.258	0.494
3	0.079	<LOQ	0.079

식은 각각 4.06과 4.53분(Fig. 1), $y=27743.6x+2358.5$ ($R^2=0.9997$)와 $y=8807.8x+842.3$ ($R^2=0.9997$)으로 검량선의 직선성과 결정계수(R^2)는 모두 양호하였다(Table 2). 지표성분인 rotenone과 deguelin의 LOQ는 각각 0.085와 0.044 mg/L, 데리스 추출물을 포함하지 않은 유기농자재에 4 mg/L 수준으로 처리한 두 지표성분의 회수율과 RSD는 각각 95.7과 93.3%, 4.1과 6.3%로 농촌진흥청에서 권장하는 회수율 70-120%, RSD 10% 이내의 조건을 충족하였다(RDA, 2011, Table 2). 이상의 결과는 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 지표성분 rotenone과 deguelin 분석을 위한 정제과정을 포함한 분석방법이 적합함을 시사하였다.

유기농자재 중 지표성분 함량

데리스 추출물 함유 유기농자재 중 지표성분인 rotenone과 deguelin 함량을 정량하기 위해 확립된 분석방법으로 조사한 크로마토그램과 결과를 각각 Fig. 3과 Table 3에 나타냈다. 조사대상 데리스 추출물 함유 유기농자재의 rotenone과 deguelin 함량은 각각 0.001-0.236과 <LOQ-0.258% 수준으로 나타났다(Table 3). Rotenone의 *Trichostrongylus colubriformis*와 *Haemonchus contortus* 유충에 대한 50%

치사농도(LC₅₀)는 각각 0.054와 0.64 mg/L으로 알려져 있고 (Kotze *et al.*, 2006), Deguelin의 *Aedes aegypti* 유충에 대한 LC₅₀는 24와 48 시간 노출 시 각각 5.75와 2.63 mg/L으로 보고된 바 있다(Bosire *et al.*, 2014). 따라서 본 연구에서 조사한 시중유통 유기농자재의 지표성분의 함량은 작물보호를 위한 충분한 양이 함유되어 있는 것으로 판단되지만, 유기농자재가 100-1000배 물로 희석하여 사용되는 점을 고려하면 작물보호활성에 요구되는 유효성분의 농도가 LC₅₀ 수준에 이르지 못하는 제품도 있었다. 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 rotenone과 deguelin 함량은 작물보호 활성과 밀접한 관련이 있으므로 유기농자재 중 이들의 함량에 대한 품질관리가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

결론

데리스의 고유성분으로 이질트솜고기 등 해충에 살충효과를 나타내는 rotenone과 deguelin 두 성분을 데리스 추출물 함유 유기농자재의 품질관리를 위한 지표성분으로 설정한 다음, 액액분배법과 HLB cartridge를 활용하여 정제하고 UPLC 기기분석을 통한 지표성분의 정량분석법을 확립하였다. 확립된 분석법을 활용하여 데리스 추출물 함유 유기농자재 중 지표성분 함량 조사결과 일부 제품에서 지표성분 함량이 작물보호에 필요한 수준에 이르지 못하는 제품도 있었다. 따라서 본 연구에서 확립된 분석법은 데리스 추출물 함유 유기농자재를 제조함에 있어 품질관리를 위한 분석방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgements

The study was funded under the "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (PJ010117 and PJ010922)" and "Postdoctoral Fellowship Program of Chemical Safety Division", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Bosire, C. M., Deyou, T., Kabar, J. M., Kimata, D. M., & Yenesew, A. (2014). Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera:

- Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3), 531-535.
- Carboni, P., Sarais, G., Vargiu, S., De Luca, M. A., Garau, V. L., Ibba, A., & Cabras, P. (2008). LC-MS-MS determination of rotenone, deguelin, and rotenolone in human serum. *Chromatographia*, 68, 739-745.
- Dawson, V. K., & Allen, J. L. (1988). Liquid chromatographic determination of rotenone in fish, crayfish, mussels, and sediments. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 71(6), 1094-1096.
- Draper, W. M., Dhoot, J. S., & Perera, S. K. (1999). Determination of rotenoids and piperonyl butoxide in water, sediments and piscicide formulations. *Journal of Environmental Monitoring*, 1(6), 519-524.
- Jimenez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Novo, M., Higes, M., & Llorente, J. (2000). Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 871(1), 67-73.
- Kim, H., Heo, S. W., & Lee, J. E. (2010). An analysis and implications on the consumption and consciousness situation of green consumers. *The Korean Journal of Food Preservation*, 27(3), 43-62.
- Kotze, A. C., Dobson, R. J., & Chandler, D. (2006). Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro: potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Veterinary Parasitology*, 136(3), 275-282.
- Lautié, E., Rozet, E., Hubert, P., & Leclercq, J. Q. (2012). Quantification of rotenone in Seeds of different species of yam bean (*Pachyrhizus* sp.) by a SPE HPLC-UV method. *Food Chemistry*, 131(4), 1531-1538.
- Lee, J. W., Jin, C. L., Jang, K. C., Choi, G. H., Lee, H. D., & Kim, J. H. (2013). Investigation of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 2(4), 81-85.
- Lim, S. J., Jeong, D. Y., Choi, G. H., Park, B. J., & Kim, J. H. (2014a). Quantitative analysis of matrine and oxymatrine in *Sophora flavescens* extract and its biopesticides by UPLC. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3(2), 64-73.
- Lim, S. J., Lee, J. H., Kim, J. H., Choi, G. H., Cho, N. J., & Park, B. J. (2014b). Quantitative analysis of cinnamaldehyde, cinnamylalcohol and salicylaldehyde in commercial biopesticides containing cinnamon extract using gas chromatography-Flame ionization detector. *The Korean Journal of Environmental Agriculture*, 33(3), 213-219.
- Lim, S. J., Lee, J. H., Kim, J. H., Choi, G. H., Cho, N. J., & Park, B. J. (2014c). Determination of dimethyl disulfide, diallyl disulfide, and diallyl trisulfide in biopesticides containing *Allium sativum* extract by gas chromatography. *The Korean Journal of Environmental Agriculture*, 33(4), 237-243.
- Pedersen, T., & Shibamoto, T. (1999). Analysis of the naturally occurring pesticide rotenone by capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22(5), 294-296.
- Rao, S. A., Srinivas, P. V., Tiwari, A. K., Vanka, U. M., Rao, R. V. S., & Dasari, K. R. (2007). Isolation, characterization and chemobiological quantification of alpha-glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. *Journal of chromatography B*, 855(2), 166-172.
- Rich, R. P. (1996). Quinone binding sites of membrane proteins as targets for inhibitors. *Pesticide science*, 47(3), 287-296.
- Scortichini, G., Diletti, G., Annunziata, L., Langella, V., & Calvarese, S. (2004). Determination of rotenone in honey by high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Veterinaria italiana*, 40(2), 56-61.
- Shin, Y. G., Udeanin, G. O., Kosmeder II, J. W., Zhao, G. M., Dagar, S., Onyuksel, H., Moriarty, R. M., Cordell, G. A., Moon, R. C., Kinghorn, A. D., & Pezzuto, J. M. (2004). Identification of degradation product of deguelin and its stability using liquid chromatography and electrospray/mass spectrometry. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 27(6), 1057-1069.
- Svasti, J., Srisomsap, C., Subhasitanont, P., Keeratichamroen, S., Chokchaichamnankit, D., Ngiwsara, L., Chimnoi, N., Pisutjaroenpong, S., Techasakul, S., & Chen, S. T. (2005). Proteomic profiling of cholangiocarcinoma cell line treated with promiferin from *Derris malaccensis*. *Proteomics*, 5(17), 4504-4509.
- Wenjie, J., Yuchun, F., Chunji, G., Yunhui, W., & Jie, P. (2009). Extraction and purification of deguelin from *Derris trifoliata* Lour root. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4), 98-102.
- Yenesew, A., Twinomuhwezi, H., Kabar, J. M., Akala, H. M., Kiremire, B. T., Heydenreich, M., Peter, M. G., Eyase, F. L., Waters, N. C., & Walsh, D. S. (2009). Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from *Derris trifoliata*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 23(3), 409-414.