Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(1):17-21. Korean
Published online 2017 March 29. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.1.06

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

피마자유와 양명아주 추출물을 원료로 하는 유기농업자재 유효성분의 열 안정성 평가

최근형[1†], 정동규[2†], 진초롱[1], 노진호[1], 박병준[1], 문병철[1], 김진효[1,2*]

[1]국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과, [2]국립경상대학교 농업생명과학연구원 응용생명과학부

Thermal Stability of Representative Bioactive Compounds in Biopesticide Derived from Castor Oil or Wormseed Extract under Controlled Temperature

Geun-Hyoung Choi[1†], Dong-Kyu Jeong[2†], Cho-Long Jin[1], Jin-Ho Rho[1], Byung-Jun Park[1], Byung-Cheol Moon[1] and Jin-Hyo Kim[1,2*] ([1]Chemical Safety Division, Agro-Food Safety and Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea, [2]Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science (IALS), Gyeongsang National University, Jinju, 52727, Korea)

Received: 10 February 2017 / Revised: 1 March 2017 / Accepted: 24 March 2017

ORCID

Geun-Hyoung Choi
http://orcid.org/0000-0003-1991-1544

Dong-Kyu Jeong
http://orcid.org/0000-0001-8030-5389

Jin-Hyo Kim
http://orcid.org/0000-0002-0341-7085

Abstract

BACKGROUND: Castor oil and wormseed extract are important active ingredients for biopesticide, and ricinoleic acid in castor oil and three monoterpenes (ascaridole, carvacrol and *p*-cymene) in wormseed extract are known bioactive substances. However, their stabilities had not been studied, even though the stability was the core property for estimation of shelf-life of biopesticide. Aimed to investigate the thermal stabilities of the bioactive substances in castor oil and wormseed extracts.

METHODS AND RESULTS: The contents of ricinoleic acid and three monoterpenes (ascaridole, carvacrol and *p*-cymene) were analyzed by gas chromatography (GC). The thermal stabilities of the bioactive substance were measured at 0℃, 23℃, 30℃, 40℃, 45℃ and 54℃ for 84 d. The half-lives of ricinoleic acid in biopesticides was ranged from 28.9 d to 57.8 d at 30℃, and the stability of pure castor oil were located in the range ($t_{1/2}$=46.2 d for Indian product and 27.7 d for Korean product) at the same temperature. The half-lives of the total monoterpenes in biopesticides were ranged from 3.9 d to 27.7 d at 30℃. Among the monoterpenes, the stability ascaridole and *p*-cymene were decreased in acidic condition. All the bioactive substances showed similar stability on the different thermal conditions.

CONCLUSION: The half-lives of most bioactive substance from castor oil and wormseed extracts were less than 100 d. To increase the stability of bioactive substance in biopesticide, stabilizing additives like antioxidant and oxygen remover should be considered to extend of the shelf-life.

Key words: Ascaridole, Biopesticide, Carvacrol, *p*-Cymene, Ricinoleic acid, Thermal stability

서 론

최근 안전한 먹을거리에 대한 관심이 늘어남에 따라 친환경 농산물에 대한 소비자들의 요구가 증가하고 있으며, 농림

†Authors are equally contributed.
*Corresponding author: Jin-Hyo Kim
Phone: +82-55-772-1961; Fax: +82-55-772-1969;
E-mail: jhkim75@gnu.ac.kr

축산식품부의 조사에 따르면 2015년 친환경농산물의 생산량도 570,000톤에 달하고 있다(Jeong *et al.*, 2016). 이러한 유기 농산물을 안정적으로 재배하기 위해 병해충관리와 토양개량 및 작물 생육을 돕는 유기농업자재가 다양하게 사용되고 있으며, 이들은 목록공시제품과 품질인증제품으로 구분되어 유통되고 있다. 현재까지 국립농산물품질관리원에 등록된 유기농업자재는 1493종(2016년 12월 기준)이며, 이들 중 품질인증을 받은 유기농업 자재는 20 종에 불과하다. 이러한 유기농업자재의 원료로는 광물질, 농업부산물, 미생물, 식물성오일 그리고 식물추출물 등이 주 원료로 사용되며, 이들 중 식물추출물은 병해충 방제와 토양개량 및 작물생육의 용도로 다양하게 이용되고 있다(Kim *et al.*, 2015). 전체 유기농업자재 중 식물 추출물을 원료로 사용한 품목은 217품목으로 많은 부분을 차지하고 있다. 특히, 병해충 방제에 주로 이용되는 식물성 오일은 57품목에 이른다. 하지만, 유기농업자재 중 식물성 오일의 효능성분에 대한 안정성 평가 연구가 미흡하여, 식물추출물을 사용하여 품질인증을 받은 유기농업자재는 소수에 불과하다. 이는 농자재 중 유효성분 분석법과 안정성 평가법이 마련되지 못해 나타난 결과로, 최근들어 님, 고삼, 계피 등 추출물의 주요 유효성분에 대한 농자재 중 분석법 개발(Lee *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2014a; Lim *et al.*, 2014b)과 유효성분의 제품 중 안정성에 관한 연구(Kim *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016a)가 일부 수행되었다. 하지만, 피마자유와 양명아주 추출물로부터 제조된 농자재의 유효성분 안정성 연구는 특히 부족하였다.

식물성오일 중 피마자유는 토마토 잿빛 곰팡이병과(Hong *et al.*, 2015b) 고추 탄저병에(Hong *et al.*, 2015a)에 살균효과가 있다는 보고가 있었으며, 앞선 연구에서 피마자 유의 주요 활성성분은 ricinoleic acid으로 보고 하였다(Kim *et al.*, 2008). 양명아주 추출물은 monoterpene계 화합물 인 ascaridole, carvacrol, *p*-cymene 그리고 limonene이 주요 성분으로 식물 병원균에 대한 살균활성도 보고되어 있다(Cavalli *et al.*, 2004; Jardim *et al.*, 2008). 이 중 ascaridole, carvacrol 그리고 *p*-cymene은 감꼭지나방과 톱다리개미허리노린재에 대해 살충활성을 갖는 것이 알려져 있다(Kim *et al.*, 2016). 따라서, 본 시험에서는 피마자 유와 양명아주 추출물을 원료로 하는 유기농업자재 5종의 주요 활성 성분인 ricinoleic acid, ascaridole, carvacrol, *p*-cymene 등에 대하여 보관온도에 따른 안정성 조사를 통해 유기농업자재의 유효성분 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

표준품 및 시약

Ascaridole (99%)은 City Chemical LLC. (West Haven, USA), *p*-cymene (98%)는 Wako Co. (Tokyo, Japan)사에서 구입하여 사용하였다. Ricinoleic acid (99%), boron trifluoride (BF_3, 14% in methanol), ENVI- Carb^{TM} SPE cartridge (250 mg, 3 mL와 500 mg, 6 mL) 그리고 carvacrol (98%)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. HPLC용 acetone, acetonitrile, methanol, isooctane 그리고 sodium hydroxide는 Merck & Co., Inc. (Darmstadt, Germany)에서 구매하였으며, C_{18} SPE (500 mg, 6 mL)는 Phenomenex Inc. (CA, USA)에서, 그리고 hydrophilic lipophilic SPE cartridge (HLB, 60 mg, 3 mL)는 Waters Co. (MA, USA)에서 구매하였다. 본 시험에 사용한 두 종류의 피마자유와 5종의 유기농업자재는 시중에서 구매하여 시험에 사용하였다.

Ricinoleic acid 분석

피마자유 및 피마자유를 원료로 사용하여 제조한 유기농업자재에서 ricinoleic acid의 정량분석은 Choi *et al.* (2016b)의 방법과 동일하게 methylation과정을 수행한 후 GC를 통해 아래와 같은 방법으로 정량분석 하였다. 유리튜브에 시료용액(20 mg)과 isooctane 1 mL, 0.5 N methanolic sodium hydroxide를 첨가하고 질소가스로 용기를 채운 뒤 100℃에서 5분간 가수분해 시킨다. 이 후 반응 시킨 샘플을 식히고, 1 mL isooctane, BF_3 (14%)를 넣고 30초간 격렬하게 흔들어준 뒤, 포화식염수(5 mL)을 추가로 넣고 다시 30초간 진탕하였다. 열을 식힌 시료의 용매 층을 취하여 농축하고, 농축된 잔사물을 dichloromethane으로 용해하여 gas chromatography (GC)-time to flight mass spectrometry (TOFMS)로 분석하였다.

Monoterpene 분석

Ascaridole과 carvacrol, *p*-cymene은 Yang *et al.* (2016)이 보고한 방법을 일부 수정하여 정량분석에 사용하였다. 분석 시료는 증류수를 이용하여 10배에서 100배까지 희석 후 전처리에 사용하였다. HLB-SPE cartridge (60 mg, 3 mL)는 2 mL acetone와 증류수 1 mL로 세척 후 준비된 시료 1 mL를 loading 하고, 10분간 정체였다. 이 후 시료가 들어있는 SPE는 증류수 2 mL로 세척하고 acetone (2 mL×2)으로 용출한 뒤 최종 시료 부피를 5 mL로 맞춘 후 농축 과정 없이 GC-FID로 분석하였다.

기기조건

Ricinoleic acid와 ascaridole, carvacrol, *p*-cymene의 분석에 사용된 GC기기 분석조건은 과 Yang *et al.* (2016)의 실험방법과 같고, Table 1에 나타내었다.

열 안정성 평가

분석대상인 피마자유와 양명아주 추출물을 원료로 하는 5종의 유기농업자재는 산소에 의한 산화를 방지하고자 질소를 채운 chamber에서 개봉하여 갈색 밀폐용기에 나누어 담아 빛을 차단한 뒤 0℃, 23℃, 30℃, 40℃, 45℃ 그리고 54℃로 설정된 항온기에 보관 후, 일정한 간격으로 시료를 채취하여 분석에 이용하였다.

Table 1. Instrumental condition of GC for analysis of ricinoleic acid, ascaridole, carvacrol and *p*-cymene

Compound	Methyl ricinoleic acid				Compound	Ascaridole, carvacrol, *p*-cymene			
Instrument	Agilent 7890A with time-of-flight mass spectrometry				Instrument	Agilent 6890 series with flame ionization detector			
Column	SP-2330 (30 m×0.25 mm, 0.2 μm)				Column	DB-5 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)			
Column flow	Helium 1.0 mL/min				Column flow	Helium 3.0 mL/min			
	Temp. (℃)	Rate (℃/min)	Hold (min)	Total (min)		Temp. (℃)	Rate (℃/min)	Hold (min)	Total (min)
Oven	100		3	3		50		2	2
	240	20		15	Oven	100	10		7
	Injector temperature: 240℃					140	4		17
	Ionization mode		Electronic impact mode at 70 eV			250	20		22.5
MS	Ion source temperature		230℃		Detector	250℃			
	Transfer line temperature		200℃		Injector	Injector volume: 1 (splitless mode) Injector temperature: 220℃			
	Scan range		50-500 *m/z*						

Table 2. Ingredient list of the biopesticides

Biopesticide A	Sesame oil, castor oil
Biopesticide B	Castor oil
Biopesticide C	Plant extract (Chinese scholar tree, Japanese bead tree, Wormseed)
Biopesticide D	Plant extract (Chinese scholar tree, Japanese bead tree, Wormseed), wood vinegar
Biopesticide E	Plant extract (Chinese scholar tree, Japanese bead tree, Wormseed), paraffin oil

Table 3. Total contents of the selected bioactive compounds in the biopesticides and commercial product

	Bioactive compound contents (%)				
	Ricinine	Ricinoleic acid	Ascaridole	Carvacrol	*p*-Cymene
Castor oil (India)	ND*	58.5	ND	ND	ND
Castor oil (Korea)	ND	71.7	ND	ND	ND
Biopesticide A	< 0.01	20.9	ND	ND	ND
Biopesticide B	< 0.01	34.9	ND	ND	ND
Biopesticide C	ND	ND	0.08	0.16	ND
Biopesticide D	ND	ND	0.49	0.03	0.20
Biopesticide E	ND	ND	0.03	0.01	ND

*ND means no detection

결과 및 고찰

유효물질 함량 조사

본 실험에서는 보관 온도에 따른 유기농업자재의 유효성분 반감기를 산출하여 유통기한 설정에 도움을 주고자 수행되었다. 본 연구에서 사용한 유기농업자재 5종의 주요 구성성분은 피마자 유와 식물추출물이 주요 성분으로 구성되어 있었으며(Table 2), 기타 성분에 대한 자료는 정확히 기록되어 있지 않아 확보하지 못하였다. 피마자유로부터 유래된 ricinoleic acid의 안정성 평가에 사용된 원료는 무작위로 선정된 인도산과 국내산의 피마자 유이며, 이들의 ricinoleic acid 함량은 각각 58.5%와 71.7%이었다. 시중에서 구매한 2종의 피마자유 함유 유기농업자재의 ricinoleic acid 함량은 20.9%와 34.9%로 조사 되었다. 피마자유를 원료로 사용한 유기농업자재에서 또 다른 유효성분으로 알려진 ricinine은 함량이 0.01% 이하로 매우 낮아 본 실험에서는 안정성 평가에 사용하지 않았다. 그리고, 양명아주 추출물을 원료로 한 유기농업자재 3 종의 총 monoterpenes (ascaridole, carvacrol, *p*-cymene) 함량은 0.24%, 0.52% 그리고 0.04%로 확인되었다(Table 3).

Table 4. Half-life of ricinoleic acid and total monoterpene in biopesticides at 30℃

	Half-life (days)							
	Ricinoleic acid	Castor oil (India)	Castor oil (Korea)	Biopesticide A	Biopesticide B	Biopesticide C	Biopesticide D	Biopesticide E
Ricinoleic acid	21.7	46.2	27.7	28.9	57.8	ND	ND	ND
Ascaridole	ND*	ND	ND	ND	ND	24.8	2.2	27.7
Carvacrol	ND	ND	ND	ND	ND	25.7	18.7	36.5
p-Cymene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.4	ND
Total monoterpene	ND	ND	ND	ND	ND	24.8	3.9	27.7

*ND means no detection

피마자유를 주성분으로 한 유기농업자재

유기농업자재 원료인 피마자유와 표준물질(순도>99%)의 반감기를 동일 시험조건에서 평가한 결과, 원료물질인 피마자유와 표준물질에서 유효성분의 반감기는 보관온도 30℃에서 인도산 피마자유 46.2일, 국내산 피마자유 27.7일 그리고 ricinoleic acid 표준물질은 21.7일로 조사되었다. 피마자유의 ricinoleic acid (표준품>국내산>인도산)의 함량이 높아질수록 ricinoleic acid의 반감기가 짧아지는 경향으로 보아 안정성은 낮아진다. 이는 피마자유에는 ricinoleic acid 외에도 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid 그리고 linolenic acid와 같은 불포화 지방산 등이 존재한다고 알려져 있고(Kim *et al.*, 2008), 이러한 불포화 지방산 중 oleic acid는 강력한 항산화 효과를 가진 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2012; Casal *et al.*, 2010). 따라서, 피마자유내 포함된 지방산의 불포화도는 산화안정성에 영향을 줄 수 있으며, ricinoleic acid의 함량이 상대적으로 낮고, 불포화지방산의 상대적인 함량이 높은 피마자유의 반감기가 순수 ricinoleic acid 보다 긴 것으로 판단된다. 또한 시중에 수거된 유기농업자재 2종의 ricinoleic acid 안정성은 30℃에서 보관 시 반감기가 28.9일, 57.8일로 각각 나타났으며, 이는 원료의 원산지 차이와 불포화지방의 조성차이, 그리고 계면활성제 등 보조제 차이에 따라 달리 나타날 수 있다. 또한, 피마자유 원료와 이를 활용한 유기농업자재의 반감기는 30℃에서 유의적 차이를 나타내지 않았다(p>0.05).

특히, ricinoleic acid는 앞선 연구 보고에 의하면 대기 중에서 빛에 의해 생성된 radical 혹은 오존에 의한 분해 반감기가 4.6 시간과 2.1 시간으로 분해가 매우 빠른 것으로 알려져 있어(Atkinson and Carter 1984; Meylan and Howard 1993) 피마자유를 함유한 유기농업자재의 용기는 암갈색병에 질소충전을 하여 제품을 제조 유통 하는 것이 유효 성분의 안정성에 도움이 될 것이라 생각된다.

양명아주 추출물을 주성분으로 한 유기농업자재

양명아주 추출물을 원료로 한 유기농업자재의 유효성분을 ascaridole, carvacrol 그리고 *p*-cymene으로 정하고, 유기농업자재 제품 중 이들 성분의 열 안정성 평가를 진행하였다. 30℃에서의 총 유효성분의 반감기는 각각 21.0일, 3.9일 그리고 27.7일로 조사되었다. 유효성분의 반감기가 특히 낮게 나타난 Biopesticide D는 목초액이 포함된 시료로 pH가 4 이하로 낮게 나타났다. 이미 잘 알려진 바와 같이, 목초액은 천연목재를 고온에서 가열하여 탄화시키는 과정에서 기화한 기체를 포집하여 냉각한 뒤 추출한 액체로 유기산, 페놀류 그리고 알코올류 등 다양한 성분을 함유하고 있으며, pH 3 정도의 강한 산성을 나타낸다(Kim *et al.*, 2005). 특히, pH가 중성인 제품에 포함된 ascaridole, carvacrol, *p*-cymene이 유사한 분해 반감기(24.8-36.7일)를 갖는 것과 달리, 산성 조건에 노출된 Biopesticide D에서는 ascaridole과 *p*-cymene의 안정성이 3배 가량 낮아짐(3.9일)을 확인할 수 있었다(Table 4). 이로 인해 Biopesticide D의 총 유효성분의 반감기가 타 제품에 비해 3배 가량 짧게 나타났으며, 이는 해당 제품에 들어있는 목초액의 영향으로 산성 조건에서 분해가 촉진되었기 때문으로 판단된다. 양명아주 추출물내 유효성분의 열에 대한 안정성은 피마자유의 ricinoleic acid 사례와 같이 보관온도에 따른 차이는 보이지 않았다.

Acknowledgement

This study was supported by the "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ010834)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Atkinson, R., & Carter, W. P. (1984). Kinetics and mechanisms of the gas-phase reactions of ozone with organic compounds under atmospheric conditions. Chemical Reviews, 84(5), 437-470.

Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. Food and Chemical Toxicology, 48(10), 2972-2979.

Cavalli, J. F., Tomi, F., Bernardini, A. F., & Casanova, J. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and 13C-NMR spectroscopy: quantitative determination of

ascaridole, a heat-sensitive compound. Phytochemical Analysis, 15(5), 275-279.

Choi, G. H., Jin, C. L., Park, B. J., Lim S. J., Rho, J. H., Moon, B. C., Kong, S. H., & Kim, J. H. (2016a). The shelf-life of agricultural organic materials containing cinnamon or derris extract: thermal stability of cinnamyl derivatives and rotenoids. The Korean Journal of Pesticide Science, 20(3), 197-202.

Choi, G. H., Kim, L., Lee, D. Y., Jin, C. L., Lim, S. J., Park, B. J., Cho, N.-J., & Kim, J. H. (2016b). Quantitative analyses of ricinoleic acid and ricinine in *Ricinus communis* extracts and its biopesticides. Journal of Applied Biological Chemistry, 59(2), 165-169.

Hong, S. J., Kim, Y. K., Jee, H. J., Shim, C. K., Kim, M. J., Park, J. H., Han, E. J., Kim, J. H.,& Kim, S. C. (2015a). Control of pepper anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* using alternate application of agricultural organic materials and iminoctadine tris+ thiram. The Korean Journal of Pesticide Science, 19(4), 428-439.

Hong, S. J., Kim, Y. K., Shim, C. K., Kim, M. J., Park, J. H., Han, E. J., Jee, H. J.,& Kim, S. C. (2015b). Suppressive effect of organic farming materials on the development of tomato gray mold. Korean Journal Organic Agriculture 23(3), 567-582.

Jardim, C. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., & Freire, M. M. (2008). Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Chemical Ecology, 34(9), 1213-1218.

Jeong, H. K., Lee, H. J. & Kim, C. G. (2016) 2016 Production status and market prospect of eco-friendly agricultural products at home and abroad. KREI Agricultural Policy Focus 151, 1-24

Kim, I. J., Nam, S. Y., Kim, M. J., Rho, C. W., Yun, T., Kim, H. S., Song, H. L., & Jeong, H. S. (2008). Analysis of crude fat and fatty acid in collections of *Ricinus communis* L. Korea Journal of Medicinal Crop Science 16(5), 301-305.

Kim, J. S., Park, S. W., Choi, J. H., Lee, E. Y., Lee, S. H., & Chung, S. K. (2005). Volatile substances and physicochemical characteristics of pyroligneous liquor. Korean Journal of Food Preservation, 12(6), 656-661.

Kim, J. C., Yu, J. S., Song, M. H., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J. & Kim, J. S. (2016). Eco-friendly organic pesticides (EFOP)-mediated management of persimmon pests, *Stathmopoda masinissa* and *Riptortus pedestris*. Korean Journal of Applied Entomology, 55(4), 319-327.

Kim, J. H., Choi, G. H., Kang, J. E. & Park, B. J. (2015). Stability of representative active compounds on commercial biopesticides based on neem or *Sophora flavescens* extract under controlled temperature. The Korean Journal of Pesticide Science, 19(2), 88-92.

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, 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, 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 ionizationdetector. Korean Journal of Environmental Agriculture, 33(3), 213-219.

Lee, T. S., Lee, Y. H., Kim, K. S., Kim, W., Kim, K. S., Jang, Y. S., & Park, K. G. (2012). Characteristics of fatty acid composition and properties by blending of vegetable oils. Korean Journal of Plant Resources, 25(5), 624-632.

Meylan, W. M., & Howard, P. H. (1993). Computer estimation of the atmospheric gas-phase reaction rate of organic compounds with hydroxyl radicals and ozone. Chemosphere, 26(12), 2293-2299.

Yang, J. Y., Ryu, S. H., Lim, S. J., Choi, G. H. & Park, B. J. (2016). Quantitative determination of ascaridole, carvacrol and *p*-cymene in the biopesticides products derived from *Chenopodium ambrosioides* extracts by gas chromatography. Korean Journal of Environmental Agriculture, 35(3), 211-215.