한국농약과학회지 제3권 제2호(1999)
The Korean Journal of Pesticide Science
Vol. 3, No. 2, pp.54~59(1999)

제초제 metolachlor의 잉어체내 행적

경기성* · 김진화 · 이병무 · 오병렬 · 정영호 · 이재구[1]

농업과학기술원 작물보호부 농약안전성과, [1]충북대학교 농과대학 농화학과

요 약 : 제초제 metolachlor [2-chloro-6'-ethyl-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl)aceto-*O*-toluidide]의 잉어체내 행적을 구명하기 위하여 LC_{10}(1.93 mg/L)으로 metolachlor를 처리한 시험수에 잉어를 경시적으로 노출시켰다. 수중의 metolachlor는 잉어 체내에 신속히 흡수·이행되어 노출 후 6시간에 최대 흡수량을 나타내었으며, 잉어에 흡수 이행된 metolachlor의 주요 배설경로는 담도이었다. 또한 잉어 체내에 흡수 이행된 방사능의 추출율이 처리 후 6시간까지 현저히 감소하여 잉어 체내에서 생성된 극성 대사산물이 잉어체내에서 접합체를 형성한 후 추출이 불가한 결합잔류물을 형성하였음을 시사하였다. 시험수와 잉어 추출액중 방사능이 수상으로 분배된 양이 각각 처리후 12시간과 6시간에 가장 높았고 그 양도 각각 총처리 방사능의 약 14% 및 12%로써 metolachlor가 잉어 체내에서 신속히 대사될 가능성을 시사하였다. (1999년 6월 23일 접수, 1999년 7월 22일 수리)

Key words : metolachlor, carp, distribution, enterohepatic recirculation.

서 론

Metolachlor [(2-chloro-6'-ethyl-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl)aceto-*o*-toluidide)]는 chloroacetanilide계에 속하는 선택성 흡수이행형 제초제로서 옥수수, 목화, 사탕수수, 감자, 땅콩 등의 재배지에서 발생하는 일년생 광엽잡초의 방제에 사용되며(Bollag, 1990; Cruz 등. 1993; The Pesticide Manual, 1994), 국내에서는 주로 고추, 땅콩, 마늘, 콩, 감자 등의 재배지에서 일년생 화본과 광엽잡초 방제용으로 사용되는 잡초 발아전 토양처리형 제초제로서(농약사용지침서, 1998) 1997년도에 유효성분함량 기준으로 약 13만톤이 출하되었다(농약연보, 1998).

토양표면에 처리된 metolachlor가 폭우에 의한 표면유실(runoff)로 인근 수계에 유입되어 수서생물들이 이 농약에 직접 노출되거나 또는 어류의 먹이에 metolachlor와 그 대사산물이 잔류하게 되어 수서 생태계 오염뿐만 아니라 먹이사슬을 오염시킬 수 있기 때문에 외국에서는 농경지에 살포된 metolachlor가 수서 생태계에 유입될 가능성에 대한 연구 결과가 다수 보고되어 있으나(Buttle, 1990; Buttle과 Harris, 1991; Gaynor 등, 1995) 국내에서는 아직 이러한 분야의 연구가 매우 미흡한 실정이다.

Metolachlor의 어체내 생물농축에 관한 연구로는 Fackler(1989)가 0.1 mg/L의 metolachlor에 bluegill sunfish를 유수조건(流水條件, flow-through system)에서 28일간 노출시켰을 때 평균 생물농축계수(bioconcentration factor)는 몸전체(whole body)에서 69배이었으며, 그 중 가식부위에서는 15배, 비가식부위에서는 155배이었다고 보고하였다. 또한 이 농약의 어체내 대사에 관한 연구는 Cruz 등(1993)이 유수조건에서 bluegill sunfish 체내 대사에 관한 보고가 있으나 잉어에 대한 경시적 흡수 이행과 장기별 및 부위별 분포에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 보다 정확한 어독성 평가기법을 확립하기 위한 기초자료를 얻고자 LC_{10}의 metolachlor에 잉어를 노출시킨 후 어체내 장기 및 부위별 경시적 분포와 그 특성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험화합물

비표지 metolachlor는 Ciba-Geigy사에서 분양받았으며, 화학적 순도는 98.0%이었다. Sigma사에서 합성된 [carbonyl-^{14}C]metolachlor는 국제원자력기구에서 분양받아 사용하였으며, 비방사능은 1.71 MBq/mg이고 방사화학적 순도는 98% 이상이었다(그림 1).

*연락저자

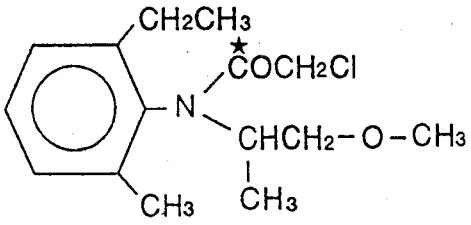

Fig. 1. Structural formula and labeled position(*) of metolachlor[(2-chloro-6'-ethyl-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl)aceto-*O*-toluidide)].

시험용 어류

Metolachlor의 잉어(*Cyprinus carpio* L.)에 대한 LC_{10}과 LC_{50}을 산출하기 위한 농도별 치사율 확인 시험용 잉어는 경기도 내수면 개발시험장에서 분양 받았으며, 평균전장은 4.8 ± 0.25 cm이고 평균체중은 0.73 ± 0.06 g이었다. 또한 어체내 경시적 행적 시험용 잉어는 전북 내수면 개발시험장에서 분양 받았으며, 평균전장은 11.8 ± 0.62 cm이고 평균체중은 3.12 ± 0.26 g이었다.

시험수

시험수는 24시간 동안 통기(aeration)시킨 지하수를 이용하였으며, 이 시험수는 pH 7.4, DO 8.0 ppm, 수온 23 ± 1℃, $CaCO_3$ 25.4 ppm이었다.

잉어에 대한 metolachlor의 독성 시험

경기도 내수면 개발시험장에서 분양 받아 실험실 조건에서 3주간 순화시킨 후 24시간 절식시킨 잉어를 무처리구를 포함하여 2, 4, 6, 8, 10 ppm의 비표지 metolachlor를 처리한 20 L의 시험수가 담긴 유리수조(내경 28.5 cm × 높이 37 cm)에 3반복으로 시험용 잉어 20 마리씩 넣고 96시간 노출시키면서 경시적 치사율을 조사하였으며, 이를 Finney(1971)의 probit 분석으로 LC_{10}과 LC_{50}을 구하였다.

Metolachlor의 잉어체내 경시적 행적 시험

행적 시험용 잉어는 LC_{10} 산정에 이용된 잉어와 크기가 다르기 때문에 비표지 metolachlor를 LC_{10}으로 처리한 5 L의 시험수에 행적 시험용 잉어를 3반복으로 10마리씩 넣고 5일간 양어하면서 치사 여부를 확인하였다. 그 결과 이 기간중 치사한 잉어가 없고 모든 잉어가 육안적으로 정상적인 활동을 하고 있었으며, 외부 자극에 정상적인 반응을 보이는 것으로 판단되어 740 kBq의 [carbonyl-^{14}C]metolachlor와 비표지 metolachlor를 합하여 LC_{10}(1.93 ppm)으로 처리한 5 L의 시험수에 실험실 조건에서 3주간 순화시킨 후 24시간 절식시킨 잉어를 2반복으로 각 처리구당 9마리씩 넣고 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96 시간 각각 노출시켰다. 노출이 끝난 잉어는 깨끗한 물로 외부를 세척한 후 머리부분을 신속하게 제거하여 혈액을 채취하고 간, 심장, 쓸개, 부레, 신장, 내장 등을 적출하였으며, 적출물은 냉동건조하여 마쇄한 후 분석용 시료로 사용하였다.

시료의 추출

경시적 행적 시험이 끝난 잉어 2마리(약 23 g)에 100 mL의 80% acetonitrile을 넣고 고속분쇄기(Ace homogenizer, Nihonseiki Kaisha Ltd., Japan)를 이용하여 10,000 rpm에서 3분간 균질화한 후 이를 500 mL Erlenmeyer flask에 옮겨 3시간 진탕하고 10,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상징액을 분리하였으며, 원심분리후 침전물을 앞서의 방법으로 재차 진탕 추출하여 상징액을 합하였다.

시험수와 추출액중 ^{14}C의 수상(aqueous phase)과 유기상(organic phase)간 분배

시험수와 추출액중 ^{14}C의 수상과 유기상간 분배시험은 시험수의 경우 5 mL의 시험수와 동량의 dichloromethane으로 분배 추출한 후 분리된 각층에서 2 mL씩을 취하여 방사능을 계측하였다. 또한 잉어 추출액의 경우는 80% acetonitrile 추출액 30 mL를 취하여 회전농축기로 농축하여 acetonitrile을 완전히 제거하고 이를 소량의 acetone으로 capped tube에 옮겨 질소 가스로 acetone을 완전히 휘발시킨 후 5 mL의 증류수와 dichloromethane을 넣고 2분간 진탕하여 분리된 각 층에서 2 mL를 취해 방사능을 계측하였다.

시료의 방사능 계측

냉동건조하여 마쇄한 부위별 시료와 추출이 끝난 시료는 Oxidizer(Model 306, Packard)로 연소한 후 Liquid Scintillation Analyzer(Tri-Carb 1600 TR, Packard)로 각각의 방사능을 계측하였으며, 채취한 혈액은 이에 증류수와 butanol 및 H_2O_2를 가하여 혈액-증류수-butanol-H_2O_2 (1:10:1:6, v/v/v/v)의 혼합액을 만든 후 25℃에서 12시간 동안 항온처리하여 혈액의 색소를 제거하고 방사능을 계측하였다. 시험수와 혈액 등과 같은 수용성 시료의 방사능 계측에는

Aquasol®(Du Pont, NEN Research Products, USA)을, 유기용매중 ^{14}C는 유기용매를 완전히 휘발시킨 후 Ready Value™ (Packard, USA)를 cocktail로 사용하였으며, Oxidizer로 연소시 발생한 $^{14}CO_2$는 7 mL의 Carbo-Sorb®E (Packard, USA)에 흡수시킨 후 8 mL의 Permafluor®E (Packard, USA)를 첨가하여 방사능을 계측하였다.

결과 및 고찰

잉어에 대한 metolachlor의 독성

농도별로 처리된 metolachlor에 노출된 잉어의 경시적 치사율을 Finney(1971)의 probit 분석으로 구한 96시간 LC_{10}과 LC_{50}은 그림 2에서 보는 바와 같이 각각 1.93과 3.18 ppm이었으며, 잉어에 대한 노출시험은 LC_{10}인 1.93 mg/L에서 수행하였다.

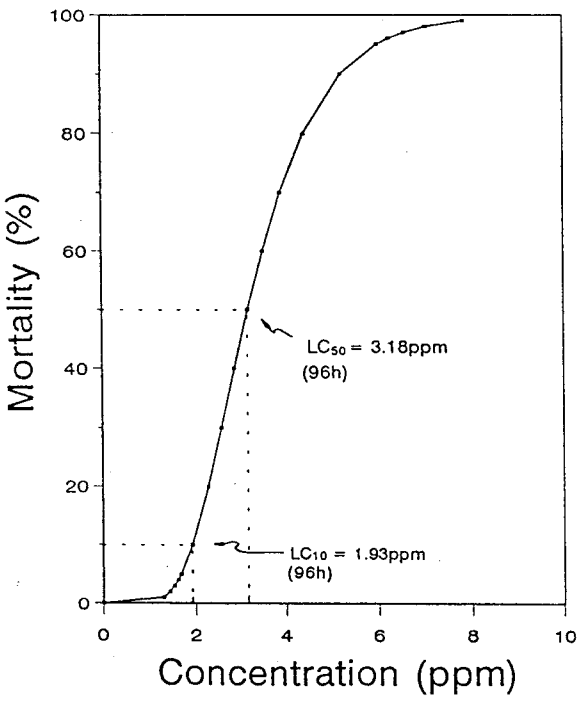

Fig. 2. Acute toxicity of metolachlor to carps for 96 hours.

다른 수서생물종에 대하여 metolachlor의 급성독성 시험결과중 입수가능한 자료는 많지 않다.

Metolachlor에 가장 감수성이 큰 어종은 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)로써 96시간 LC_{50}은 2 mg/L이며(Weed Science Society of America, 1983), 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 48시간 LC_{50}은 25 mg/L이었다는 보고(Mayer와 Ellersieck, 1986)와 비교하면 잉어에 대한 metolachlor의 급성독성은 무지개 송어와 비슷한 수준이었다. 또한 수서생물에 대한 metolachlor의 만성독성 시험결과 fathead minnow (*Pimephales promelas*)에 대한 번식 무영향농도(NOEC)는 0.78 mg/L로 보고된 바 있다(U.S. EPA, 1987).

Metolachlor의 잉어 체내 경시적 분포

LC_{10}으로 처리한 metolachlor에 노출된 잉어의 부위별 및 장기별 metolachlor와 그 대사산물의 분포 특성은 그림 3에서 보는 바와 같다. 신장, 부레, 두부, 몸체, 혈액 중에 분포하는 ^{14}C 방사능은 처리 30분 후에, 간과 심장은 처리 1시간 후에, 내장과 쓸개에는 각각 처리 6시간과 12시간 후에 가장 높아 수서환경에 유입된 metolachlor는 잉어체내로 신속하게 흡수이행되는 것으로 나타났다. 또한 쓸개에 잔류하는 방사능은 처리 1시간 후부터 급격히 증가하여 처리 12시간 후에 최고치에 달한 후 완만한 감소경향을 보였으며, 다른 부위의 흡수 이행량과 비교해 볼 때 그 양이 현저히 높았다. 이 결과는 독성물질의 배설에는 일반적으로 신장과 담즙을 통한 배설이 가장 중요하다는 사실(이, 1993)과 metolachlor와 화학구조가 매우 유사한 acetanilide계 제초제인 butachlor를 rat에 투여했을 때 주로 담도를 통하여 배설되었다는 Elliott와 Klemm(1987)의 보고와 본 실험에서 잉어의 각 부위 및 장기에 잔류하는 방사능을 metolachlor 당량(equivalent)으로 환산한 잔류량이 신장<간<내장<쓸개 순으로 높았음을 고려할 때 잉어체내에 흡수이행된 metolachlor는 신장보다는 주로 담도를 통하여 배설되는 것으로 판단되었다. 또한 잉어 장기별 잔류량이 쓸개 뿐만 아니라 장(腸)과 간 및 신장에서 다른 부위보다 더 높은 것으로 보아 배설에 관여하는 부위에 더 높은 것으로 나타났다.

또한 ^{14}C-표지 metolachlor, alachlor, butachlor, propachlor, methoxypropachlor를 rat에 경구투여하였을 때 propachlor와 methoxypropachlor는 소변으로 배설된 반면 metolachlor와 alachlor 및 butachlor는 소변과 대변으로 균등하게 배설되었으며, 담도(bile duct)에 배설관(cannula)을 삽입하였을 때에는 경구투여한 모든 시험 화합물들이 담즙으로 배설되었다는 Davison 등(1994)의 보고를 근거로 할 때 잉어 체내에 흡수된 metolachlor는 아가미의 filament와 피부를 통하여 혈액에 흡수된 후 간과 쓸개 및 장(腸)을 거친후 재차 혈액을 거쳐 순환하는 enterohepatic

recirculation 과정을 통하여 체외로 배설(Hodgson과 Levi, 1994)되는 것으로 보인다.

잉어에 대한 경시적 노출시험 기간중 metolachlor의 행적은 그림 4에 제시한 바와 같이 잉어에 대한 흡수량은 노출후 급격히 증가하여 처리 6시간 후에 최고에 달해 metolachlor가 신속히 잉어 체내에 흡수 이행됨을 알 수 있었다. 또한 수중의 metolachlor는 처리 직후부터 매우 빠르게 잉어체내에 흡수된 후 처리 6시간 후부터는 체외로 배설됨을 알 수 있었으며, 회수율도 양호하였다.

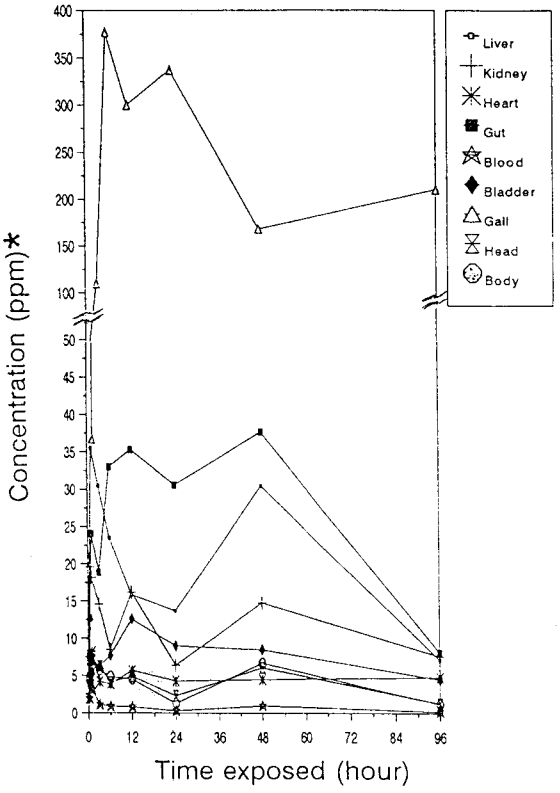

Fig. 3. Distribution of ^{14}C-radioactivities in carp exposed to [^{14}C]metolachlor as a function of exposure time.
***Calculated as metolachlor equivalents on the basis of the specific activity of [^{14}C]metolachlor.**

시료의 추출

경시적으로 [^{14}C]metolachlor를 노출시킨 잉어 몸체를 80% acetonitrile으로 추출한 결과는 그림 5에서 보는 바와 같이 노출 후 6시간까지 추출율이 현저히 감소하였으나 그 이후는 완만한 감소 추세를 보였다.

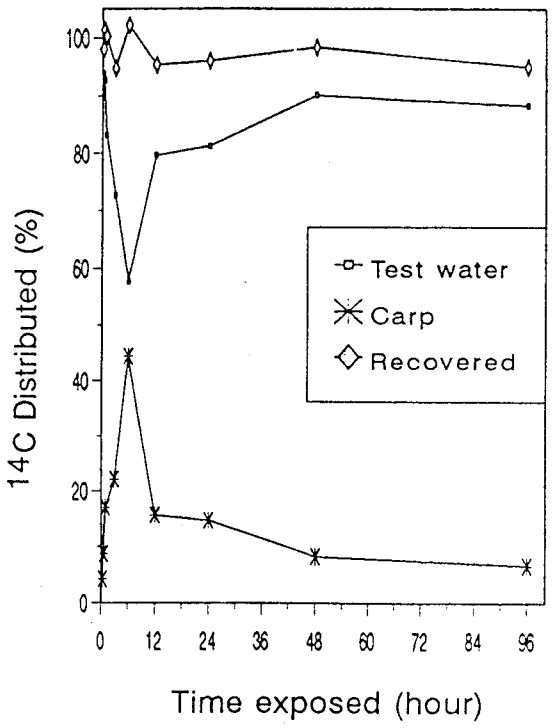

Fig. 4. Changes in extractability of ^{14}C by 80% acetonitrile from carp body during 96-hour exposure to [^{14}C]metolachlor.

이는 metolachlor의 bluegill sunfish 체내 극성대사산물이 어체내 대사과정에서 glucuronic acid와 접합체(conjugate)를 형성하였다는 Cruz 등(1993)의 보고로 미루어 볼 때 metolachlor가 잉어체내에서 극성대사산물로 신속히 분해된 후 생체내의 여러 구성성분에 강하게 결합되어 추출불가 결합잔류물(non-extractable bound residue)을 형성하였기 때문이라 사료된다.

잉어추출액과 시험수중 ^{14}C의 수상(aqueous phase)과 유기상(organic phase)간 분배

[^{14}C]Metolachlor를 경시적으로 잉어에 노출시킨 후 시험수와 잉어 추출액(80% CH_3CN)중 ^{14}C의 수상과 유기상간의 분배시험 결과는 그림 6에서 보는 바와 같이 수상에 분배된 방사능이 시험수와 잉어 추출액에서 처리 후 각각 12시간과 6시간까지 현저히 증가하였으나 그 이후는 완만히 증가하였으며, 수상에 분배된 양도 시험수와 잉어 추출액에서 각각 총처리 방사능의 약 14 및 12%로써 시험수와 잉어 추출액중에 metolachlor의 극성 대사산물이 존재할 가능성을 시사하였다.

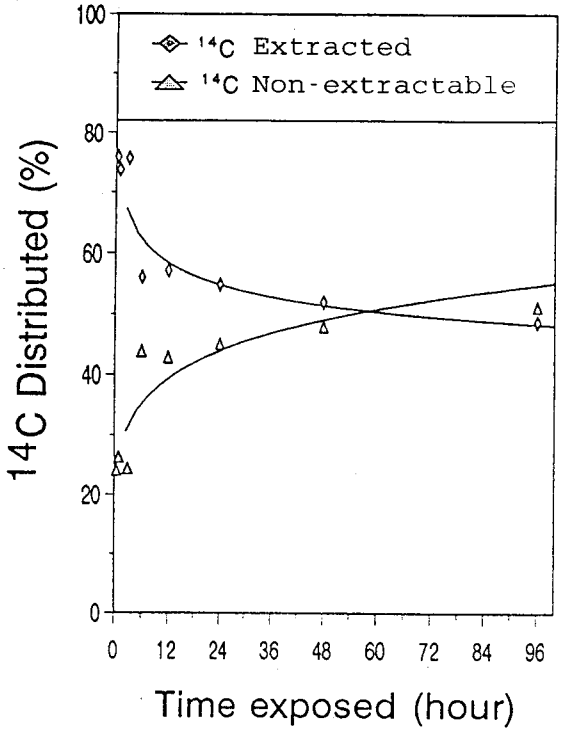

Fig. 5. Distribution of ^{14}C between carp body and test water during the 96-hour exposure to [^{14}C]metolachlor.

인용문헌

Bollag, J. M. (1990) Biotransformation of the herbicide metolachlor. Journal of Industrial Microbiology. Suppl. No. 5:75~80.

Buttle, J. M. (1990) Metolachlor transport in surface runoff. J. Environ. Qual. 19:531~538.

Buttle, J. M. and B. J. Harris (1991) Hydrological pathways of metolachlor export from an agricultural watershed. Water, Air, and Soil Pollution. 60:315~335.

Cruz, S. M., M. N. Scott, and A. K. Merritt (1993) Metabolism of [^{14}C]metolachlor in bluegill sunfish. J. Agric. Food Chem. 41(4):662~668.

Davison K. L., G. L. Larsen, and V. J. Feil (1994) Comparative metabolism and elimination of acetanilide compounds by rat. Xenobiotica. 24(10):1003~1012.

Elliott, R. C. and G. H. Klemm (1987) A study on the metabolism of butachlor in the rat following intravenous administration. Part II: Identification of metabolites and pharmacokinetic analysis of metabolite formulation in the excrement. pp. 1~

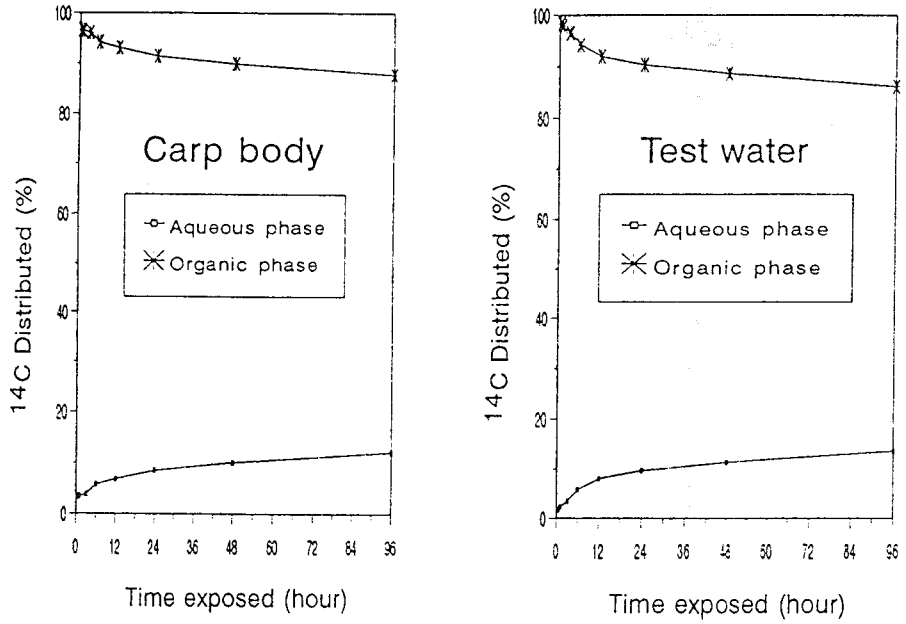

Fig. 6. Changes in distribution of ^{14}C in carp body extracts and in test water between aqueous phase and organic phase(CH_2Cl_2) during 96-hour exposure to [^{14}C]metaolachlor. Aqueous phase+organic phase=100%

41, Report No. MSL-5628, Monsanto company.
Fackler, P. H. (1989) Bioconcentration and elimination of ^{14}C-residues by Bluegill (*Lepomis macrochirus*) exposed to metolachlor. Springborn Life Science, Inc., Wareham, MA, Unpublished report.
Finney, D. J. (1971) Estimation of the medium effective dose, pp.19~47, *In* Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England.
Gaynor, J. D., D. C. MacTavish, and W. I. Findlay (1995) Atrazine and metolachlor loss in surface and subsurface runoff three tillage treatments in corn. J. Environ. Qual. 24:246~256.
Matthews, H. B. (1994) Excretion and elimination of toxicants and their metabolites. Chapter 2, pp.17 7~192, *In* Introduction to biochemical toxicology (ed. Hodgson, E. and P. E. Levi), second edition, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut.
Tomlin, C. (1994) The Pesticide Manual. 10th ed.. p.693. British Crop Protection Council. United Kingdom.
U.S. Environmental Protection Agency (1987) Water quality advisory. Aquatic life and human health. Metolachlor, Draft document. Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standards Division, Washington DC.
Weed Science Society of America (1983) Herbicide Handbook, 5th ed. Champaign, IL.
농약공업협회 (1998) 농약사용지침서.
농약공업협회 (1998) 농약연보.
이창업 (1993) 수의독성학. pp.54~74, 서울대학교 출판부.

Behavior of the herbicide metolachlor in carps

Kee-Sung Kyung*, Jin-Wha Kim, Byung-Moo Lee, Byung-Youl Oh, Young-Ho Jeong, and Jae-Koo Lee[1]
(Department of Crop Protection, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, 441-707, Korea and [1]Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea)

Abstract : In order to investigate the behavior of the herbicide metolachlor [(2-chloro-6'-ethyl-*N*-(2-methoxy-1-methylethyl)aceto-*O*-toluidide)] in fish, carps (*Cyprinus carpio* L.) were exposed to the herbicide at LC_{10} (1.93 mg/L) for 4 days. Metolachlor dissolved in water was absorbed rapidly into carps to mark the maximum concentration 6 hours after exposure. The amounts of the ^{14}C-metolachlor and its metabolites absorbed in gall were much higher than those in the other parts, strongly suggesting that biliary excretion involving enterohepatic recirculation could be an important route for the elimination of metolachlor. The ^{14}C-radioactivity distributed into aqueous phase fraction in test water and in carp extract was increased in time-dependent manner. Extraction rate of ^{14}C absorbed in carp tissues was decreased remarkably up to 6 hours after exposure, suggesting that the possible polar metabolites of metolachlor were transformed into the conjugates to form non-extractable bound residues.

---

*Corresponding author(FAX : +82-331-290-0521, E-mail: kskyung@niast.go.kr)