

## 송사리에서 제초제 Butachlor의 생물농축성

김 균\* · 김용화

한국화학연구소 안전성연구센터 환경독성 연구팀

(2001년 12월 3일 접수, 2002년 2월 18일 수리)

제초제 butachlor의 어류농축 계수를 결정하기 위하여 동위원소 표지화합물과 비표지 화합물을 사용하여 송사리 체내에서의 농축시험을 수행하였다. 비표지 화합물을 사용하였을 때 송사리 체내에서의 butachlor 농축은 0.036 ppm 농도에서 40시간 경과 후 가장 높은 어류생체 중 296의 생체 농도/수중 농도( $C_f/C_w$ ) 비율을 보였고, 64시간 이후부터는 평형상태에 이르렀으며, 이 때의 bioconcentration factor(BCF)는 87이었다. 또한, 0.0036 ppm 농도에서는 18시간 경과 후 가장 높게 축적되어  $C_f/C_w$ 의 비율이 169였고, 60시간 이후에는 평형상태에 도달하여 BCF 값은 51이었으며, 이 두 농도로부터 결정된 BCF 값은  $69 \pm 28$ 이었다.  $^{14}C$ -butachlor의 송사리 체내에서의 농축 및 배설은 총  $^{14}C$ 를 기준으로 하였을 때 17시간 경과 후 가장 높은 539  $C_f/C_w$ 의 비율을 나타내었고, 74시간 이후부터는 평형상태에 이르러 BCF는 394로 계산되었다. 그러나  $^{14}C$ -butachlor의 양만을 고려했을 때  $C_f/C_w$ 의 비율은 총 흡수량의 1/3이었고, 2/3는  $^{14}C$ -butachlor의 대사물이었으며, 평형상태에서의  $^{14}C$ -butachlor의 BCF는 334로 계산되었다. 또한, 송사리 체내로부터의  $^{14}C$ -butachlor의 배설은 12시간 이내에 50% 이상이, 30시간이 되면서 90% 이상이 배설되었다. 생체 내에서의 대사물은 아주 극성이 강한 대사물들로서 TLC 상에서  $R_f$  값이 0.43인 대사물 M-II와  $R_f$  값이 0.7인 대사물 M-III로 확인되었고, 신선한 사육수로 어체내 대사산물을 배설시켰을 때  $R_f$  값이 0.25인 대사물 M-I을 확인하였다. M-I은 어체내에서 배출되는 과정중의 주요한 중간 대사물임을 예상할 수 있었다.

**Key words:** 어류농축계수, butachlor, 송사리, BCF,  $^{14}C$ -butachlor, 대사물,  $R_f$

### 서 론

화학물질의 생물에 의한 농축현상은 유기염소계 농약뿐만 아니라 전기절연체로 다량 사용되어 오던 PCBs의 사용을 금지하게 한 직접적인 이유가 되었다. 물론 그 농축현상과 독성과의 연관성을 결론짓기에는 수많은 연구가 필요했고, 오랜 시간이 소요된 것이 사실이지만 이 두 종류의 화학물질이 모델이 되어 이와 유사한 특성을 가진 화학물질들을 사용할 수 없게 하는 행정적 조치가 세계적으로 시행되고 있다.

생물농축계수를 측정하는 데는 세가지 방법이 통용되어 왔다.<sup>1)</sup> 즉, 첫째, 어류만 연속적인 유속의 수중에 화학물질 농도를 유지하는 방법, 둘째, 식물이나 동물을 모델 ecosystem의 수중에 넣은 경우, 셋째, 육상 및 수중생물을 모델 ecosystem에 넣은 경우 등이다. 그러나 Macek 등<sup>2)</sup>의 실험에 의하면 둘째 및 셋째에 의한 biomagnification의 영향은 거의 무의미하다는 결론에 도달함에 따라 첫째 방법이 가장 중요한 것으로 인식되고 있으며, 이러한 결과는 행정적인 세부사항으로 적용되고 있다.<sup>3)</sup>

미국에서는 새로운 화학물질의 등록에는 반드시 환경적인 요인을 고려하도록 요구하고 있는데 이에 는 두가지 법규인 TSCA(Toxic Substance Chemical Act, 유해화학물질 관리법)와 FIFRA(Federal Insecticide, Fungicide, Rodenticide Act, 연방 살충제, 살균제, 살서제법)<sup>4)</sup>에서 규정하고 있는 생물농축성 시험도 포함되고 있다. 유럽에서 통용되는 OECD(Organisation

for Economic Co-operation and Development) guideline<sup>5)</sup> 및 EC Directive<sup>6)</sup>에 생물농축시험이 포함되고 있으나 EC(European Committee) guideline<sup>7)</sup>에는 포함되어 있지 않다. 일본은 화학물질 질식사 및 규제에 관한 법령(화심법)<sup>8)</sup>에서 신규화학물질의 등록에 필요한 중요한 두가지 시험자료로서 미생물분해시험과 생물농축시험 자료를 요구하고 있는데 옥탄올/물 분배계수에 근거하여 생물농축시험 자료의 필요 여부가 결정되어진다. 그러나 농약취체법<sup>9)</sup>에서는 아직 이에 대한 규정이 명시되어 있지 않다. 한편 OECD<sup>10)</sup> 및 US EPA<sup>11)</sup>에서는 일본산 송사리를 생물농축성 시험의 공시어종으로 규정하는 시험법을 추가 개정한 바 있다.

이러한 선진국에서의 생물농축성 시험 연구 및 행정적인 규제·관리 추세에 비하여 국내에서는 이 분야에 대한 연구가 활발히 이루어지지 않고 있는 실정이다. 그러나 지난 96년 12월 7일부로 전면 시행된 개정 농약관리법에 의하면 원제의 경우 옥탄올/물 분배계수가 높은 농약 즉,  $\log P_{ow}$ 가 3이상인 농약은 원제에 대해서 어류에 대한 생물농축성 시험 자료를 요구하고 있으며, 조만간 시험기준과 방법을 설정, 고시할 예정으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 가장 많이 사용되고 있는 제초제 중의 하나<sup>12)</sup>인 butachlor의 어류농축계수를 결정하고 이에 수반되는 문제점을 파악하고 개선점을 제시하고자 하였는데, butachlor 농약이 선정된 이유는 이 화합물의 분배계수치를 추정해본 바 10,000 이상( $\log P_{ow} = 4.567$ )으로써 생물농축 가능성이 높을 것으로 예상되었고, 또한 생물농축계수를 예측해 본 결과<sup>13)</sup> Bioconcentration factor(BCF) 값의 범위는 105~1,741

\*연락처

Phone: 82-42-860-7494; Fax: 82-42-860-7488

E-mail: kkim@kriict.re.kr

정도로서 생물농축의 가능성이 있을 것으로 판단되었기 때문이다. 또한 이 등<sup>14)</sup>의 보고에 의하면 이 농약은 토양미생물에 의해 분해되는 것으로 알려져 있으나 일반환경 중 소하천, 강 등 수계에서의 분해양상에 대해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료되었다. 생물농축 시험방법은 주로 OECD의 방법(TG 305 E)에 준하였고, 비방사성 화합물과 방사성 화합물 양자에 대한 실험을 병행하므로써 두 방법상의 장단점을 상호 비교하였다. 공시어류는 본 연구실에서 계대배양되고 있어 년중 이용이 가능한 일본산 송사리를 사용하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** Butachlor(*N*-(butoxymethyl)-2-chlor-*N*-(2,6-diethylphenyl)acetamide: CA) 분석용 표준품은 U.S. EPA(Research Triangle Park, NC)에서 공급받아 사용하였으며 순도는 99.6%였다. 농축시험에 사용한 butachlor는 88.5%의 원제를 정제하여 사용하였고, <sup>14</sup>C-butachlor는 specific activity가 8.62 μCi/μM로서 TLC 방법으로 정제하여 정제도가 99% 이상 되는 것을 냉동고에 보관하면서 시험에 사용하였다.

표지화합물 <sup>14</sup>C-butachlor 일정량을 TLC plate(Kieselgel 60, Merck Co.)에 점적한 후 chloroform : acetone = 19 : 1인 전개용매 하에서 TLC를 수행하였다. 전개가 끝난 후 이것을 radio TLC scanner로 동위원소 peak를 확인하여 분해되지 않은 <sup>14</sup>C-butachlor의 부분을 10 ml의 methanol로 3회 반복하여 추출한 뒤 다시 TLC를 수행하여 정제도가 99% 이상인 것을 확인하고 농축실험에 사용하였다.

추출용매로 사용한 isooctane은 Tedia(USA) 제품이었으며 n-hexane과 petroleum ether는 잔류농약 분석용(Wako Pure Chem. Co., Japan)을 사용하였다. Methanol은 Merck계 분석용 시약을 사용하였고, 동위원소 측정시 사용한 scintillation cocktail은 Insta-Gel과 Pico-Fluor 30을 사용하였다.

**공시어류.** 본 시험에 사용한 어류는 일본산 송사리(Killifish: *Oryzias latipes*)를 이용하였으며, 수온은 23°C~24°C이고 광조건 14시간, 암조건 10시간의 사육실에서 계대사육 중인 개체 중에서 선발하였다.

**기기 및 조건.** 가스 크로마토그래프(GC)는 Varian사(USA) 모델 3700을 사용하였으며, 검출기는 TSD와 FID, 칼럼은 3% OV-17과 10% OV-101(Chromosorb W/HP, 80/100 mesh, 2 m × 1/8")을 사용하였고, 칼럼온도는 각각 200°C, 235°C, 주입구 250°C, 검출구 250°C 조건에서 사용하였다. Liquid Scintillation Counter(LSC)는 Packard사(USA)의 Tri-carb 1500 liquid scintillation analyzer를 사용하였고, Radio TLC Scanner는 Berthold사(Germany)의 TLC Linear Analyzer LB 284 모델, Sample Oxidizer는 Packard사의 sample oxidizer 306 모델을 사용하였다.

**Butachlor 정제.** Butachlor 원제의 정제는 이 등<sup>14)</sup>의 방법을 이용하여 정제하였으며, 최종적으로 얻은 황갈색의 butachlor 순도를 GC-FID로 확인하였다.

**시험농도.** 시험농도는 신 등<sup>15)</sup>의 송사리 생육단계에 따른 96시간 LC<sub>50</sub>치를 참고하여 결정하였다. 비방사성 butachlor의

경우는 96시간 LC<sub>50</sub>치(0.36 ppm)의 1/10인 0.036 ppm과 1/100인 0.0036 ppm을 시험물질의 노출농도로 설정하였고, 방사성 butachlor는 공시동물로 성체가 아닌 post-larva 단계의 것을 사용하였고, 노출농도는 0.036 ppm으로 설정하였다.

**송사리에서의 회수율.** Acetone에 녹인 butachlor 1.03 ppm 용액을 1 ml 취하여 50 ml cap tube에서 질소 가스로 농축 후 송사리와 petroleum ether 30 ml을 첨가하여 Polytron homogenizer Brinkman, Swiss)로 2 분간 분쇄하였다. 분쇄 후 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 분리하고 acetonitrile 30 ml을 가하여 1분간 추출한 후 무수황산소다 층을 통과시켰다. 위의 과정을 3회 반복한 후, 추출액을 모아 감압농축시킨 뒤, Florisil 15 g과 무수황산소다 5 g을 충전한 칼럼에 ethyl acetate/iso-octane(5 : 95, v/v) 30 ml로 세척한 후 농축액을 통과시켰다. 용출액은 15%(v/v)의 ethyl acetate가 함유된 isooctane 100 ml을 용출시켰으며 용출액을 모아 감압농축하여 n-hexane 1 ml로 정용하고 이를 GC 분석시료로 하였다.

**물에서의 회수율.** Acetone에 녹인 0.72 ppm의 butachlor 표준용액 1 ml을 취하여 질소개스로 acetone을 날려보낸 뒤 사육수 20 ml을 첨가하였다. 여기에 isooctane 10 ml을 넣고 5 분간 외류진탕 추출하여 5 g의 무수황산소다 층을 통과시켰다. 다시 시료에 isooctane 10 ml을 넣어서 5 분간 추출한 후 이전의 추출액과 합하여 감압농축시킨 뒤 n-hexane 1 ml로 정용하여 GC 분석시료로 사용하였다.

**송사리에서의 농축시험.** 송사리에서의 butachlor의 농축은 OECD 지침서에 따라서 연속흐름 체계를 이용하였다.<sup>9)</sup> 송사리는 0.2 g의 성어를 사용하였고, butachlor에 노출시키기 전 1 주일간 순화시켰다. 송사리의 노출은 한 군은 5 L 수조에 LC<sub>50</sub> 값의 1/10인 0.036 ppm(고농도)에서, 또 다른 군은 LC<sub>50</sub> 값의 1/100인 0.0036 ppm(저농도)에서 연속적인 흐름체계로 노출시켰다. 유속은 100 ml/min으로 조정하였으며, 사육수는 95 ml/min의 속도로, butachlor는 5 ml/min의 속도로 흘러주었다(Fig. 1).

Butachlor 용액의 조제는 720 ppm이 되도록 acetone에 butachlor technical(97.0%)을 녹인 뒤 상기의 유속에 맞도록 사육수로 희석하여 사용하였다. 송사리를 각각 80 마리씩 넣고 OECD 지침서에 따라 계산한 시간별로 송사리를 3 마리씩 취하여 회수율 시험 방법과 동일하게 분석을 수행하였으며, 이때 사육수 중의 농도를 측정하기 위하여 0.036 ppm 수조에서는 20 ml씩 3개의 시료를, 0.0036 ppm 수조에서는 200 ml씩 3개의 시료를 채취하여 물에서의 회수율 시험방법에 준하여 시료를 추출하였다. 용존산소와 pH는 1일 1회씩 측정하였다.

동위원소가 표지된 <sup>14</sup>C-butachlor에 대한 생물농축성 시험은 비표지 butachlor와 정제된 <sup>14</sup>C-butachlor(specific activity = 8.62 μCi/μM = 61,300,000 dpm/mg)의 비율이 6 : 1이 되도록 사육수로 희석하여 0.036 ppm의 농도를 만들어 5 ml/min의 속도로 흘러주었으며, 노출시간은 167시간, 배설기간은 사육수에서 동위원소의 양이 검출되는 시점까지 수행하였다. 송사리 80마리(4 주령, 0.1 g wt./마리)를 2 L 수조에 동시에 넣고 일정 시간별로 2 마리씩 3개의 시료를 취하였다. 노출 종료(167시간) 후 butachlor가 없는 신선한 사육수로 옮겨주어 같은 속도로 사육수를 흘러주어 butachlor의 체내 대사물들을 배설시켰다. 또한

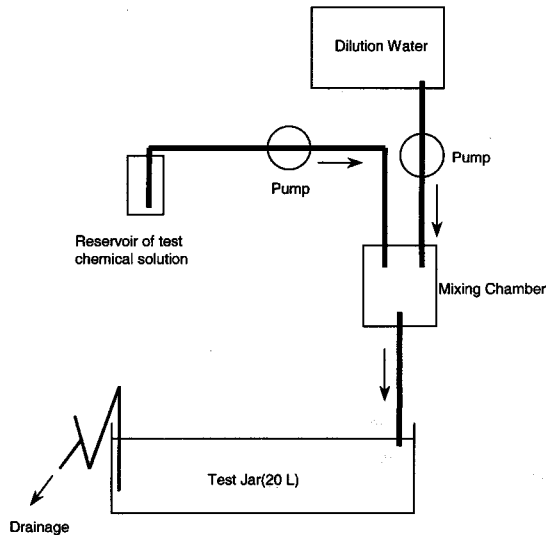


Fig. 1. A continuous flow system for bioconcentration experiment of butachlor.

수조에 있는 사육수를 3 ml씩 3회 취하여 물에서의 butachlor 농도를 측정하였다. 먹이는 하루에 한번씩 시료를 채취한 직후에 공급하였으며 수온과 용존산소 및 pH는 일정하게 유지되도록 조절하였다.

일정한 시간별로 채취한 시료는 Takimoto 등의 방법<sup>10</sup>으로 추출하였다. 채취한 송사리를 작은 토막으로 자른 후 10 ml의 methanol과 함께 균질화시켜 최종적인 부피가 15 ml이 되도록 methanol 균질액을 만들었다. 균질액 3 ml을 취하여 감압여과한 뒤 여과된 methanol 층은 Insta-Gel cocktail 10 ml에 직접 넣어 방사선 양을 LSC로 측정하였고, 여과지에 걸러진 조직은 Sample Oxidizer로 완전히 연소시킨 후에 LSC로 측정하였다. 또한 물에 남아있는 동위원소의 양은 수조의 중앙부분에서 3 ml씩 취하여 Pico-Fluor 30을 첨가하고 직접 LSC로 3회 반복 측정하였다.

대사산물 확인을 위하여 methanol 균질액을 15,000×g에서 고속 원심분리하여 그 상등액을 질소 가스로 완전히 건조시켰다. Methanol 및 acetone 300 μl로 재용해시켜 방사선 양을 측정 후 chloroform : acetone = 19 : 1인 전개용매와 acetonitrile : water = 85 : 15인 전개용매 하에서 TLC를 수행한 후 0.5 cm 간격으로 silica gel을 긁어 직접 LSC로 측정하였다. 배설기간 동안에 배설된 대사물들을 포함하는 사육수는 동결건조시켜서 얻어진 건조물을 methanol로 추출하여 위와 동일한 방법으로 각 peak의 방사선 양을 측정하였다.

**농축계수의 계산.** 노출기간, 배설기간의 결정 및 BCF의 계산은 OECD guideline<sup>10</sup>에 따라 계산하였다. 특히 BCF를 계산할 때는 F test에서 P = 0.05일때의 연속적인 세 점의 시료 채취구간을 먼저 결정하여 이 세 점으로부터 어체 내 및 물의 평균 ± 표준오차 값을 구한 뒤 신뢰구간을 결정하여 물에서의 상한 농도에 대한 어체 내에서의 하한 농도 비율과 물에서의 하한 농도에 대한 어체 내에서의 상한 농도 비율을 계산하여 BCF 값이 그 비율의 사이에 들어가도록 하였다.

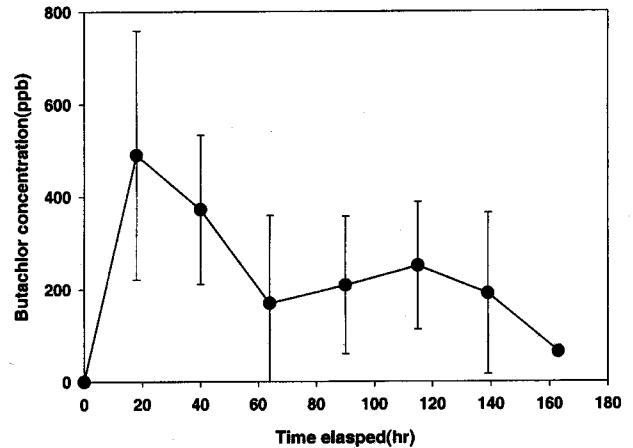


Fig. 2. Changes in butachlor concentration in killifish at 0.0036 ppm butachlor in water.

## 결과 및 고찰

**Butachlor의 정제 및 확인.** 원제 Butachlor의 정제는 Tiedje 등의 방법을 변형시켜 사용한 이 등<sup>14</sup>의 방법을 이용하였다. 정제 시험을 수행하기 전의 butachlor의 순도는 88.5%였고, 정제 후 순도는 97.0%였다. 표지된 <sup>14</sup>C-butachlor의 정제하기 전 방사화학적 순도 (radiochemical purity)는 50%였고, 정제 후 TLC로 확인한 결과 분해된 물질의 peak는 발견되지 않았으며, 방사화학적 순도는 99% 이상이었다.

**Butachlor의 회수율.** 송사리의 회수율은 1.03, 0.52, 0.10 ppm 농도에서 각각 98, 96, 103%였고, 물에서의 회수율은 0.031, 0.293 ppm 두 농도에서 n-hexane을 추출용매로 사용시 각각 85%, 91%였으며, isooctane을 추출용매로 사용시 0.293 ppm 농도에서 96%로, 물에서의 추출용매로는 iso-octane을 사용하였다.

**공시어류.** 공시어류로 잉어대신 송사리를 공시한 이유는 급성독성 값이 유사하고, 지침서에서 제시하는 어종 중 fathead minnow와 대체 가능한 어종으로 판단되었고 또한 본 연구실에서 계대사육하고 있으므로 균질한 개체를 쉽게 구할 수 있었기 때문이었다.

**송사리 체내에서 butachlor의 농축.** 농축성시험 수행시 수조 내의 온도는 25.1±0.4°C를 유지하였고, pH는 7.0, 용존산소는 5~8 ppm을 유지하였다. 또한 시험기간 중 치사된 송사리는 없었으며, 생물농축성 시험결과 물의 농도가 0.036 ppm인 고농도에서 가장 높은 측정농도는 실험시작 후 40시간에서 6.212 ppm으로 C<sub>f</sub>/C<sub>w</sub> 비율은 296이었으나, 40시간 이후에 측정농도는 급격히 감소하여 60시간 이후부터는 평형상태에 도달하였으며 (Fig. 2), 이 때의 BCF는 87로 계산되었다. 그러나 물의 농도가 저농도인 0.0036 ppm일 때는 20시간 이전에 측정농도가 증가되었다가 30시간 이후부터는 급격히 감소하여 90시간 이후에는 평형상태에 도달하였고 (Fig. 3), 최고 측정농도시 C<sub>f</sub>/C<sub>w</sub> 비율은 169였고, 평형상태에 도달했을 때의 BCF는 51로 계산되었다 (Table 1, 2).

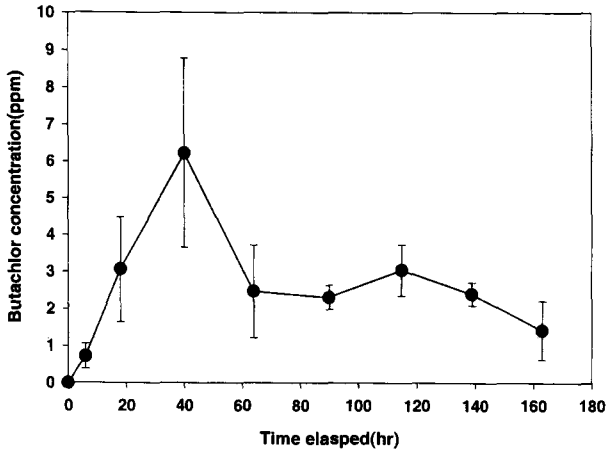


Fig. 3. Changes in butachlor concentration in killifish at 0.036 ppm butachlor in water.

Table 1. Changes in butachlor concentration in killifish and water treated at 0.0036 ppm

Time (hr)	C <sub>f</sub>	C <sub>w</sub>	C <sub>f</sub> /C <sub>w</sub> *
-32		2.5±0.5	
-21		1.9±0.4	
-6		2.3±0.8	
0		2.3±0.8	
6		2.4±0.5	
18	489±270	1.9±0.4	169±90
40	372±160	2.8±0.8	133±60
64	169±190	2.8±0.2	61±70
90	208±150	2.7±0.3	77±60
115	250±140	6.9±0.1	37±20
139	190±170	4.7±0.6	40±40
163	64±9	2.4±0.3	24±4

\*C<sub>f</sub> and C<sub>w</sub> denote butachlor concentration (ppb) in killifish and water, respectively

Table 2. Changes in butachlor concentration in killifish and water treated at 0.036 ppm

Time (hr)	C <sub>f</sub> *	C <sub>w</sub> *	C <sub>f</sub> /C <sub>w</sub>
-32		18±3	
-21		20±6	
-6		16±0	
0		34±0	
6	713±340	14±3	51±20
18	3056±1420	19±3	161±80
40	6212±2560	21±7	296±120
64	2459±1250	24±4	102±50
90	2305±330	24±7	96±10
115	3040±690	49±10	62±10
139	2393±310	34±4	73±4
163	1412±790	24±4	59±30

\*C<sub>f</sub> and C<sub>w</sub> denote butachlor concentration (ppb) in killifish and water, respectively

이 두 농도의 결과로부터 결정해야 하는 BCF값의 결정은 F-test를 통하여 통계학적으로 유사한 연속적인 세 점의 시료 채취구간을 결정하였다. 이에 의하여 고농도(0.036 ppm)의 경우

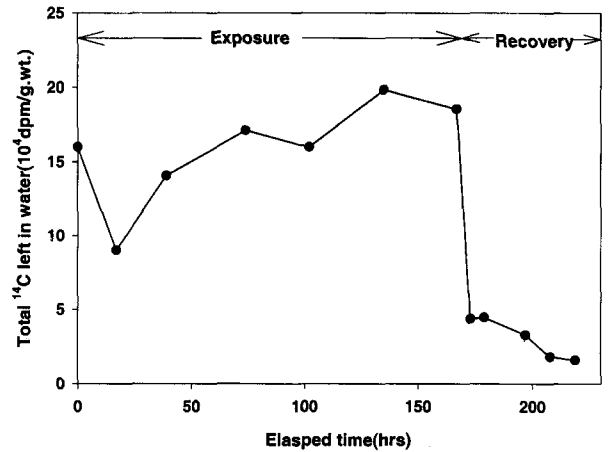


Fig. 4. Changes in total radioactivity in water.

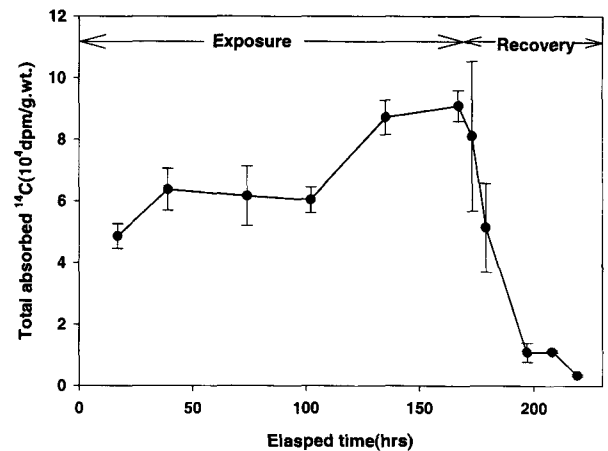


Fig. 5. Changes in total radioactivity in killifish.

BCF의 confidence margin은 73.9에서 90.3으로 정해졌고, BCF의 평균값은 87이었으며, 저농도(0.0036 ppm)의 경우는 BCF의 confidence margin은 36.1에서 59.7, BCF의 평균값은 51이었다. 이 수치를 이용하여 Student's t-test를 수행한 결과  $t=1.973$ 으로 이 두 값의 평균이 현저하게 다르지 않으므로 두 농도에서 BCF값은  $69 \pm 28$ 로 결정하였다. 그러나 이 수치는 잉어 (*Cyprinus carpio*)에서의 생물농축성 실험 결과인 최대 C<sub>f</sub>/C<sub>w</sub> 279와, 14일 이후 평형상태에 도달시 BCF 값 44와는 다소 차이가 있었으나, butachlor는 생물농축성이 낮은 물질이라는 결론을 내리는데 있어서 큰 차이는 없는 것으로 사료되었다.

동위원소 표지 butachlor의 농축 및 배설시험은 비표지 butachlor를 이용한 실험 결과와는 상이한 양상을 보였다. 실험 기간 중 물에서의 <sup>14</sup>C-butachlor의 농도는 처음 17시간 이전에는 농도가 급격히 감소하고, 17시간 이후부터 점차로 증가하여 평형상태에 도달하였다(Fig. 4).

송사리 체내에서 <sup>14</sup>C-butachlor의 농축 양상은(Fig. 5) 비표지 화합물의 경우(Fig. 2, 3)와는 달리 처음부터 일정한 축적농도에서 평형상태를 보이다가 132시간이 되면서 축적농도가 급격히 증가하였으며, 167시간 이후의 회복기간 동안에는 12시간 이내에 50% 이상이 배설되었고, 30시간 이후 90% 이상이 배설되었다. 그러나 물에서의 농도를 함께 고려한 C<sub>f</sub>/C<sub>w</sub> 비율은

Table 3. Bioaccumulation of  $^{14}\text{C}$ -butachlor in killifish

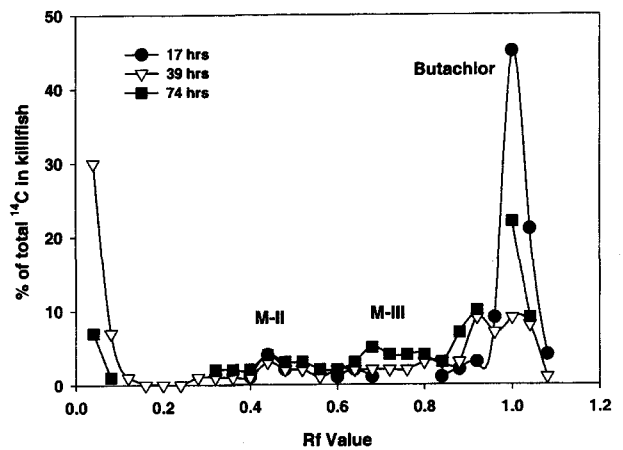
Time (hr)	$^{14}\text{C}$ in fish ( $10^3$ DPM/g.wt.)	$^{14}\text{C}$ in water ( $10^3$ DPM/L)	$^{14}\text{C}$ -butachlor ( $10^3$ DPM/g.wt.)	$^{14}\text{C}$ $C_f/C_w$ *	Butachlor $C_f/C_w$ **
17	48.5±4.0	90.0±1.2	23.0	539	256
39	63.7±6.8	140.4±3.1	14.3	453	102
74	61.6±9.7	171.0±2.2	21.8	360	127
102	60.3±4.2	159.7±5.4	20.2	377	126
135	87.2±5.6	198.1±5.0	29.9	439	151
167	90.9±5.0	185.2±14.2	31.1	491	168
R-6***	81.0±24.3	43.5±4.9			
R-12	51.3±14.4	44.3±3.6			
R-30	10.9±3.1	32.7±1.4			
R-41	11.1±0.4	18.0±0.7			
R-52	3.4±0.4	15.7±0.7			

\*On the basis of total  $^{14}\text{C}$ \*\* $^{14}\text{C}$ -butachlor in fish/total  $^{14}\text{C}$  in water

\*\*\*Recovery period

처음 17시간에서는 539로 가장 높았고, 점차적으로 102시간까지 감소하다가 135시간이 되면서 다시 증가하여 167시간에서는 491까지 증가하였다. 이 때의  $C_f/C_w$  비율은 송사리 체내에 있는 모든 형태의  $^{14}\text{C}$ 량을 모두 고려한 것이므로 이 중에는  $^{14}\text{C}$ -butachlor 뿐만 아니라 그것의 대사산물들이 함께 포함되어 있기 때문에  $^{14}\text{C}$  총량의 비율과  $^{14}\text{C}$ -butachlor만의 비율을 따로 계산하였다(Table 3). 사육수에서의 농도를 고려하지 않고 송사리 어체 내에 흡수, 잔존되어 있는  $^{14}\text{C}$ 의 총량과 대사되지 않은 butachlor의 양을 계산해 보면 송사리 체내에서 대사되지 않고 축적되는  $^{14}\text{C}$ -butachlor는 약 30%이고 나머지 70%는 대사물로서 축적된 것임을 알 수가 있다. 여기에 사육수에서의  $^{14}\text{C}$  총량과  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 양을 함께 고려해 주었을 때 F-test에 의한 통계학적으로 비슷한 연속적인 세 점에서의  $C_f/C_w$ 의 평균 비율은 394였고, 송사리의 생체내 대사물의 TLC에 의하여 정량된 대사되지 않은  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 BCF는 335였다. 즉  $^{14}\text{C}$  총량에 의한 BCF 값의 계산이나  $^{14}\text{C}$ -butachlor만의 양으로 계산된 BCF 값이 유사함을 볼 수 있었다. 결국 평형상태일 때,  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 흡수와 송사리 체내에서 대사되어 배설되는 비율이 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.

이와 같은 결과를 비방사성 butachlor에 대한 BCF 값과 비교해 볼 때 그 값이 약 5배 정도 차이가 있는데 이에 대해서 본 연구에서 수행한 두 가지 종류의 butachlor에 대한 실험을 함께 비교한다는 것은 문제점이 있는 것으로 판단된다. 왜냐하면 비방사성 butachlor의 경우 butachlor의 주입속도는 100 ml/min 이었고, 방사성 butachlor의 주입속도는 본 연구실에서 보유하고 있는  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 제한된 양으로 검출할 수 있는 최소한의 양만 사용할 수 있도록 5 ml/min의 유속으로 유지해 주었기 때문이었다. 그러나 현재의 연구 결과에서,  $^{14}\text{C}$  총량의  $C_f/C_w$ 의 비율과  $^{14}\text{C}$ -butachlor만의 비율이 유사하게 나온 것은 송사리 체내에서  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 축적, 대사 및 대사 산물의 배출경로가 일정하게 유지된다고 추론할 수 있다. 그러나 Fritag<sup>17)</sup> 등에 의한 실험 결과 static system 하에서 급성독성 값이 높은 어종은 일정한 농도의 화합물을 흡수하는 동안 비울적으로 사육수에서의 화합물 농도가 점차적으로 줄어들 뿐만 아니라 이미 흡수된

Fig. 6. Thin layer chromatogram of the killifish extract showing in vivo metabolites of  $^{14}\text{C}$ -butachlor.

후 대사과정을 거쳐서 사육수로 배설된 대사물의 재흡수가 일어나서 전반적으로 BCF 값이 continuous flow system 하에서 얻어지는 BCF 값보다 낮게 얻어지는 경향이 있다는 보고와 Kenaga<sup>1)</sup> 등의 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서 5 ml/min의 유속으로 수행했던 실험은 static system에 접근하는 결과를 예상할 수 있으므로 BCF 값은 전자보다 낮아져야 함에도 불구하고 본 연구의 결과는 반대로 높아진 상황이어서 추후에 이에 대한 확인실험을 수행할 예정이다.

$^{14}\text{C}$ -butachlor의 체내 및 배설된 대사물. 시간별로 흡수된  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 생체내 대사산물은 acetonitrile : water = 85 : 15인 전개용매 하에서 TLC를 수행시 극성이 강하여 원점에서 전개가 되지 않는 극성 대사물과  $R_f$  값이 약 0.43 정도인 대사물 M-II,  $R_{st}$  값이 약 0.7인 대사물 M-III를 분리할 수 있었다 (Fig. 6). 처음 17시간에서는  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 양이 상당량 존재하다가 39시간이 되면서 점차로 분해되어 있음을 볼 수 있으나, 74시간에서는 그 양이 다시 증가하였고 극성 대사물의 양이 상대적으로 줄어들었음을 볼 수 있다. 이것으로 39시간 이내에  $^{14}\text{C}$ -butachlor의 대사가 더 빠르게 진행되고 있음을 예상

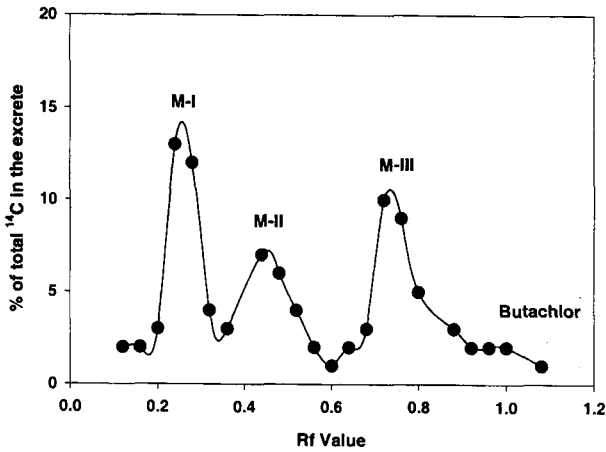


Fig. 7. Thin layer chromatogram of the water extract showing excreted metabolites of <sup>14</sup>C-butachlor during the recovery periods.

할 수 있었다. 한편 배설기간 동안에 송사리 체내로부터 배설된 대사물들을 생체 내 대사물들과 비교, 확인하기 위하여 12시간 동안 배설된 사육수를 동결 건조시켜 methanol을 이용하여 배설물들을 추출하였다. 전개용매를 acetonitrile : water = 85 : 15로 하여 TLC한 결과(Fig. 7), R<sub>f</sub> 값이 0.25에서 대사물(M-I)과 R<sub>f</sub> 값이 0.42 정도에서 대사물(M-II) 및 R<sub>f</sub> 값이 0.73에서 대사물(M-III)로 분리됨을 볼 수 있었다. 대사되지 않은 <sup>14</sup>C-butachlor(R<sub>f</sub>=1.0)는 그 양이 상대적으로 적었고, 생체 내 대사물과 비교했을 때 M-II와 M-III가 주요 대사물임을 알 수 있었다.

이와 같은 실험 결과 측정된 BCF값 69의 의미는 어떤 화학물질의 환경오염성을 판정하는 기준의 일부로 사용될 때 미국의 유해화학물질 관리법(TSCA)<sup>4)</sup>과 일본의 화심법<sup>8)</sup>의 분류에 의하면 BCF가 10,000 이상이면 고농축성, 100에서 10,000이면 중농축성, 100 이하이면 저농축성으로 분류하므로, 이에 의하면 butachlor는 저농축성 화합물로 판단된다.

### 참고문헌

1. Kenaga, E. E. and Goring, C. A. I. (1980) In *Aquatic Toxicology: Relationship between Water Solubility, Soil Sorption, Octanol-Water Partitioning, and Concentration of Chemicals in Biota*, Eaton, J. G., Parrish, P. R. and Hendricks, H.C. (eds.), Proceedings of the 3rd Ann. Symp. on Aquatic Toxicology, ASTM, Philadelphia p. 78-115.
2. Macek, K. J. and Petrocelli, S. R. (1979) In *Test Protocols for Environmental Fate & Movement of Toxicants: Measuring the potential for and evaluating the significance of contamination*

- of aquatic organisms by chemical residues, Proceedings of a Symposium, AOAC 94th Annual Meeting AOAC. pp. 168-176.
3. Macek, K. J., Petrocelli, S. R. and Sleight, B. H. (1979) In *Aquatic Toxicology: Considerations in Assessing the Potential for, and Significance of, Biomagnification of Chemical Residues in Aquatic Food Chains*, Marking, L. L., and Kimerle, R. A. (eds.), Proceeding of the 2nd Ann. Symp. on Aquatic Toxicology, ASTM, Philadelphia p.251-268.
4. Hitch, R. K. (1982) Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N Chemistry: Environmental Fate, U.S. EPA, Washington D.C. pp. 103-106
5. OECD (1981) OECD guidelines for Testing of Chemicals., Section 2: Effects on Biotic Systems, OECD Paris.
6. European Communities (1979) Official Journal of the European Communities, 22(L251) p. 9-28.
7. European Communities (1984) Official Journal of the European Communities 27(L251).
8. 通商産業省 基礎産業局 化學品 安全課 (1985) 化審法 關係 GLP 制度 概要, 通商産業省 調査會, 東京 p. 91-100.
9. 農藥工業會(日本) (1982) 農藥 登録 申請の 實務書, 農藥工業會, 東京 p. 99-151.
10. OECD (1996) OECD guidelines for Testing of Chemicals.,Section 3: Degradation and Accumulation, Bioconcentration: Flow-through Fish Test, 305(Adopted: 14.06.96), OECD Paris.
11. US EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.1730, Fish BCF, EPA 712-C-96-129.
12. Agricultural Chemicals Industrial Association (1998) Agrochemical Year Book Seoul
13. Lyman, W. J., Reehl, W. F. and Rosenblatt, D. H. (1982) Handbook of chemical property estimation methods, Environmental Behavior of Organic Compounds, '5. Bioconcentration factor in aquatic organisms' McGraw-Hill, Inc.
14. Lee, J. (1978) A Study on Degradation of Butachlor by a Soil Fungus, Chaetomium globosum, *J. Korean Agric. Chem.* **21**, 1.
15. Chun Chul Shin, Sung Kyu Lee, Young Bae Kim, Yong-Hwa Kim and Jung Koo Roh (1987) Changes in susceptibility of killifish (*Oryzias latipes*) to three pesticides with growth, *Korean J. Environ. Agric.* **6**, 50-60.
16. Takimoto, Y., Ohshima, M., Yamada, H. and Miyamoto, J. (1984) Fate of Fenitrothion in Several Developmental Stages of the Killifish (*Oryzias latipes*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **13**, 579-587.
17. Freitag, D., Geyer, H., Kraus, A., Viswanathan, R., Kotzias, D., Attar, A., Klein, W. and Korte, F. (1982) Ecotoxicological Profile Analysis: VII. Screening Chemicals for their Environmental Behavior by Comparative Evaluation, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **6**, 60-81.

---

**Bioaccumulation of Herbicide Butachlor in Killifish**

Kyun Kim\* and Yong-Hwa Kim (*Toxicology Reseach Team, Korea Research Institute Chemical Technology, Yusong, Taejon 305-306, Korea*)

**Abstract:** A bioconcentration experiment was performed for killifish using nonradioactive and radioactive butachlor. At 0.036 ppm concentration, the highest bioconcentration ratio ( $C_f/C_w$ ) and BCF at steady state recorded as 296 and 87 respectively. And at 0.0036 ppm concentration, the highest  $C_f/C_w$  ratio was 169 and the BCF was 51 at steady state. Considering the experimental variation of the BCF's, the BCF of butachlor was tentatively determined to be  $69 \pm 28$ . And the  $^{14}\text{C}$ -butachlor and its metabolites depurated about 50% within 12 hours and 90% within 30 hours after depuration experiment started. And *in vivo* metabolites, designated as M-I, M-II, and M-III, were found in killifish and the excretes as butachlor was metabolised.

---

Key words: bioconcentration, butachlor, killifish, BCF,  $^{14}\text{C}$ -butachlor, metabolites, depuration

\*Corresponding author