

Research Article

Open Access

토양 및 토양수 중 살충제 Clothianidin 및 대사산물 잔류분석법 확립

최영준,^{1*} 권찬혁,² 한병수,¹ 이영득³

¹(주)동방아그로 기술연구소, ²식품의약품안전처 식품기준과, ³대구대학교 생명환경대학 생명환경학부

Determination of Analytical Method for the Insecticide Clothianidin and its Metabolites in Soil and Surface Water

Young-Joon Choi,^{1*} Chan-Hyeok Kwon,² Byung-Soo Han¹ and Young-Deuk Lee³ (¹Institute of Technology, Dongbang Agro Corporation, Chungcheongnam-do 323-932, Korea, ²Food Standard Division, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea, ³Division of Life and Environmental Science, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea)

Received: 28 February 2014 / Revised: 16 April 2014 / Accepted: 19 May 2014

Copyright © 2014 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 purpose of this study was to investigate the effects of clothianidin on the soil in terms of clothianidin dissipation and degradation to evaluate its safety in order to provide an analytical foundation for clothianidin and the 5 metabolites related to it.

METHODS AND RESULTS: High-performance liquid chromatography(HPLC) was used to separate clothianidin and its metabolites in this study. In soil, after suppressing dissociation-prone ions with weak alkalic NH₄OH and extracting the metabolites with methanol, clothianidin, Methylaminoimidazole(MAI), Methylnitroguanidine(MNG), Thiazolymethylurea(TZMU) and Thiazolynitroguanidine(TZNG). Thiazolymethylguanidine(TMG) were extracted with the addition of neutral NH₄OAC to increasing the intensity of ions. Compounding elements were separated by using Hydrometrix (ChemElutTM) and ion-exchanging Solid-phase extraction(SPE) Strong cation-exchanger(SCX) and C18 were used. The recovery rates of clothianidin and 5

metabolites in soil and water ranged from 87.4% to 104.3%. A standard deviation of our analysis for the soil and water samples were less than 5%.

CONCLUSION: Well accepted detection limits for clothianidin and 5 metabolites in soil samples based on a dissipation analysis is 0.005 mg/kg and 0.001 mg/L in water samples. The dissipation concentration of this study was decided to be enough to evaluate the dissipation levels of clothianidin and its metabolites.

Key words: Clothianidin, Insecticide, Residue, Soil, Water

서론

농약은 작물 생산에 위한 해충, 병균 및 잡초의 방제와 농산물의 질적 향상 및 농산물의 안정적인 공급에 필수적으로 요구되는 농업자재이지만 대부분이 생물학적 활성이 높은 화합물이며, 재배 환경 중에 살포될 경우 토양을 비롯한 환경 요소 및 수확 농산물 중에 모화합물 또는 분해 대사산물의 형태로 잔류할 가능성이 높아 인체 및 환경에 위해를 일으킬 수 있기 때문에 보다 철저한 관리가 필요하다.

Clothianidin(*(E)*-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine)은 1995년 Takeda Chemical

*교신저자(corresponding Author): Young-Joon Choi
Phone : +82-41-830-8392; Fax : +82-41-833-4682;
E-mail : residue@dbagro.co.kr

Industries(현재 Sumitomo Chemical Takeda Agro Co. Ltd, Japan)에서 개발된 2세대 neonicotinoid 계통 농약으로(Tomlin, 2009) 유기인계나 carbamate계 살충제, ATPase 저해에 의한 axonal transmission을 방해하는 합성 pyrethroid 계 등 기존의 다량 사용되는 살충제에 저항성을 나타내는 해충에 대하여 특히 탁월한 약효를 나타내며 nicotine보다 환경 파괴 가능성 또한 낮은 장점을 가지고 있다(EPA report, 2003). 따라서 국내에서는 지속적인 사용량을 나타내고 있으며(KCPA, 2012), 현재 액상수화제(suspension concentrate, SC), 입제(granule, GR), 수용성입제(soluble granule, SG) 및 수화제(Wettable powder, WP)가 콩류, 인과류, 핵과류, 장과류, 결구엽채류, 엽채류, 엽경채류, 근채류, 박과이외채소류, 박과채소류 등에 사용·등록이 되어 있으며(KCPA, 2012), 그에 따라 잔류허용기준(Maximum residue limit, MRL)도 41개 농산물 또는 농산물 그룹에 기준이 설정되어 있다(MFDS, 2013).

한편 현재까지 알려진 Clothianidin의 대사과정으로는 쥐와 같은 포유동물에서 Thiazolynitroguanidine(TZNG), Methylnitroguanidine(MNG), 2-methylthiothiazole-5-carboxylic acid(MTCA), Thiazolymethylurea(TZMU), Thiazolylurea(TZU), Nitroguanidine(NTG) 및

Methylguanidine(MG)가 대사산물로 생성되었으며(Yokota *et al.*, 2003), 사과와 옥수수 등의 작물체내에서는 TZMU, N-2-Chlorothiazol-5-ylmethyl-N-hydroxy-N'-methyl-N''-nitroguanidine(THMN), O-β-D-Glucopyranosyl-THMN(THMN-glu), TZNG, Thiazolymethylguanidine(TMG), MNG, Chlorothiazolecarboxylic acid(CTCA), TZU, MG 및 NTG가 생성되었다. 토양과 물에서는 TZNG, TZMU, MNG, TMG 및 Methylaminoimidazole(MAI)가 대사산물로 생성되었다(FAO Report, 2010)(Fig. 1). 즉, Clothianidin이 Demethylation과 Denitration에 의해 구조적으로 비슷한 TZNG와 TZMU 그리고 TMG를 생성하며, TMG는 다시 Cyclization 반응에 의해 MAI로 형성된다. 또한, Thiazolymethyl과 Guanidine 부분 사이의 C-N 결합의 절단으로 Polar한 대사산물인 MNG가 형성된다(FAO Report, 2010). 이러한 대사과정을 통하여 분해, 소실되는 Clothianidin에 대한 국내 농업환경 중 행적 및 잔류성에 관한 연구를 위해서는 토양 및 토양수 중 Clothianidin 및 그 대사산물에 대한 분석법 개발이 시급하다. 그러나 현재까지 알려진 바로는 Neonicotinoid계 살충제들의 모화합물만을 동시분석한 논문(Park, 2004)과 작물체 중 Clothianidin만을 분석한 것(Na *et al.*, 2013, Park *et al.*, 2012, Hem *et*

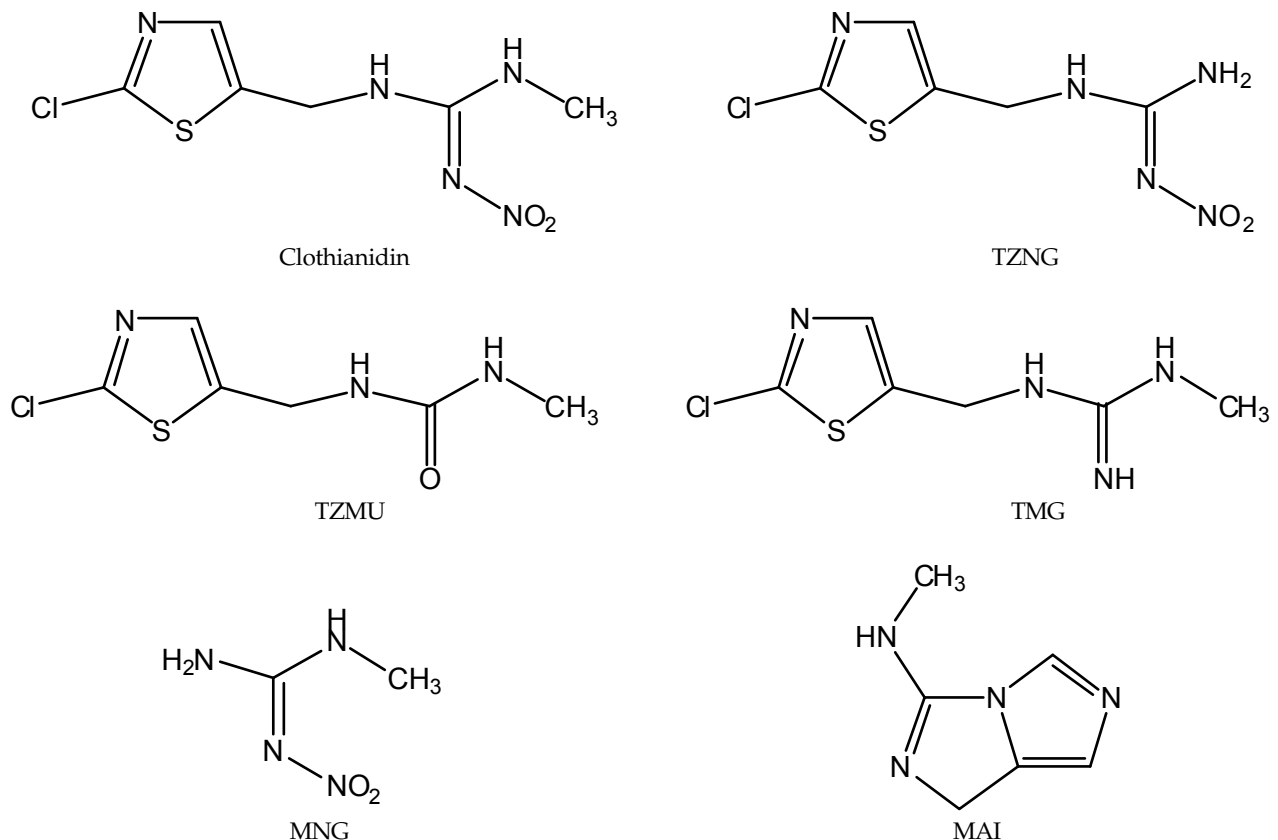


Fig. 1. The chemical structures of clothianidin and metabolites. TZNG, Thiazolynitroguanidine; TZMU, Thiazolymethylurea; TMG, Thiazolymethylguanidine; MNG, ethylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole

Table 1. Physicochemical characteristics of soils used

Soil origin	Designation	Texture	Soil separate (%)			pH (1:5)	OM (%)	Cation Exchange Capacity (cmol(+)/kg)
			Sand	Silt	Clay			
Paddy	Iksan 1	CL	33.0	35.0	32.0	5.0	3.4	9.3
Upland	Iksan 2	SL	63.0	27.0	10.0	4.9	1.6	5.4

CL, Clay Loam; SL, Sandy Loam

al., 2012, Chang *et al.*, 2012), 대사산물을 포함하여 분석한 것(Kim *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2012)만이 일부 있을 뿐 토양에서의 Clothianidin 및 대사산물에 대한 분석법은 아직 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 Clothianidin의 농업 환경 중 행적 및 잔류성 연구를 위해 토양 중 clothianidin 및 5가지 대사산물(TZNG, TZMU, MNG, TMG, MAI)의 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 화합물

본 연구에서 사용한 Clothianidin과 주요 대사산물로 알려진 MAI, MNG, TMG, TZNG, TZMU의 표준품은 Sumitomo Chemical Company(Japan)로부터 분양 받았으며 그 순도는 각각 99.7%, 99.0%, 99.3%, 98.9%, 100.0% 및 99.3%이었다. 이들 표준품을 각각 Acetonitrile(Clothianidin, TZNG, TZMU), methanol(MNG, MAI) 및 Deionized water(TMG)에 용해시켜 1,000 mg/L의 표준용액을 조제, 4°C에서 냉장보관 하였으며 필요시마다 일정량을 취하여 Deionized water에 희석, 사용하였다.

시험 토양

본 연구의 시험토양으로는 전북 익산지역 인접 지점의 논과 밭포장으로 부터 토양의 표토를 채취하여 음건한 후 2 mm 체를 통과시킨 다음 실온에서 건조시킨 풍건세토를 사용하였으며, 시험에 사용된 토양은 각각 식양토(Clay loam) 및 사양토(Sandy loam)로 국내 논토양과 밭토양의 대표적인 토양이었다(Table 1).

시험 토양수

토양수시료는 논토양 잔류시험에 사용되어지는 토양의 표토를 채취하여 음건한 후 2 mm 체를 통과시킨 다음 실온에서 건조시킨 풍건세토를 시험 pot(27 cm X 20 cm X H13.5 cm)에 3 cm 높이(1750 ± 10 g)로 채우고 지하수를 가한 다음 토양을 저어 썰레질한 후 물 표면의 부유물을 제거하고 지면을 고른 다음 물 높이를 5 cm 높이로 조정한 후 14일간 방치한 다음 토양입자 등이 혼입되지 않도록 토양수시료를 1 L 이상 채취하여 사용하였다. 이 때 방치기간 동안 물은 소실량 만큼 매일 보충하였다.

시약 및 기기

본 연구에서 사용한 농약의 추출 및 정제용 유기용매는 잔류분석용 또는 High-performance liquid chromatography (HPLC)용을, 무기 시약은 분석용 특급을 사용하였다. Solid-phase extraction(SPE) Cartridge로는 Supelclean™ LC-18(500 mg, 3 mL, Supelco, USA) 및 LC-Strong cation-exchanger (SCX) (500 mg, 3 mL, Supelco, USA)와 Hydromatrix media(ChemElut™ 20 mL, Varian, USA)는 구입 후 전용의 Vacuum manifold 장치에 장착하여 사용하였다. 또한, 본 연구에서 사용한 주요 기구 및 기기는 HPLC(Hewlett Packard 1100 series, USA), Ultraviolet-visible(UV-VIS) Scanning spectrophotometer(Shimadzu UV-2101 PC, Japan), High-speed refrigerated centrifuge(Hitachi Himac CR21, Japan) 등이었다.

토양 잔류분석법

토양 중 Clothianidin과 그 대사산물의 잔류량 측정에 사용한 분석법을 Fig. 2에 도시하였다. Clothianidin, MAI, MNG, TZNG 및 TZMU의 경우 토양시료 50 g에 증류수 50 mL를 가하여 10분간 습윤화하였다. 토양시료에 추출용매 (0.1 M NH₄OH를 함유한 Methanol 용액) 100 mL를 가하고 1시간 동안 진탕한 후 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. Büchner funnel을 사용하여 상등액을 감압 여과한 다음 여분의 50 mL 추출용매로 용기 및 잔사를 다시 씻어 내려 앞서의 여액과 합하였다. 추출액을 50°C에서 5 mL 정도 남을 때까지 농축한 후 10 mL Volumetric flask에 옮기고 증류수로 눈금을 맞추었다. Clothianidin, MNG, TZNG 및 TZMU 정제를 위하여 Vacuum manifold 위에 ChemElut™를 올려놓고 정용액 10 mL 중 5 mL를 취하여 가한 다음 30분간 방치한 후 *n*-hexane 100 mL로 용출시켜 이 분획은 버렸다. 재차 200 mL의 Ethyl acetate로 용출시켜 이 분획을 받고 40°C 수욕상에서 감압 농축한 후 건조시켰다. 건조물을 5 mL의 Deionized water로 재용해하여 HPLC의 분석시료로 사용하였다. MAI의 분석을 위해서는 Vacuum manifold 장치위에 LC-SCX SPE tube를 장착하고 Methanol 5 mL, Deionized water 5 mL로 활성화시킨 다음 10 mL의 농축시료 중 4 mL를 취하여 Cartridge에 가한 후 Methanol/Deionized water(60/40, v/v) 혼합용매 10 mL로 용출시켜 이 분획은 버렸다. 재차 추출용매 5 mL로 용출시켜 이 분획을 받은 후 40°C 수조에서 감압 농축한 후 건조시켰다. 건조물을 4 mL의 Deionized water로 재용해하여 HPLC의

분석시료로 사용하였다. TMG의 경우 토양시료 50 g에 증류수 50 mL를 가하여 10분간 습윤화하였다. 토양시료에 100 mL의 1% NH_4OAC 의 Methanol 용액을 가하고 1시간 동안 진탕한 후 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, Büchner funnel을 사용하여 감압 여과하였다. 용기 및 잔사를 여분의 추출용매 50 mL로 다시 씻어 내려 앞서의 여액과 합하였다. 추출액을 50°C에서 5 mL 정도 남을 때까지 농축한 후 10 mL Volumetric flask에 옮기고 증류수로 눈금을 맞추었다. Vacuum manifold 장치위에 LC-18 SPE tube를 장착하고 Methanol 5 mL, 1% NH_4OAC 수용액 5 mL로 활성화시킨 다음 위의 정용액 10 mL 중 5 mL를 취하여 Cartridge에 가한 후 Deionized water 10 mL, *n*-hexane/Ethyl acetate(50/50, v/v) 혼합용매 20 mL를 차례로 용출시켜 이들 분획은 버렸다. Cartridge에 재차 Methanol 50 mL로 용출시켜 이 분획을 받은 후 40°C 수조에서 감압 농축한 후 건고시켰다. 건고물을 5 mL의 Deionized water로 재용해하여 HPLC의 분석시료로 사용하였다.

토양수 잔류분석법

토양수 중 Clothianidin 및 대사산물의 잔류량 분석에 사용한 분석법을 Fig. 2에 도시하였다. 토양수시료는 논토양 잔류시험에 사용되어지는 토양의 표토를 채취하여 음건한 후 2 mm 체를 통과시킨 후 실온에서 건조시킨 풍건세토를 시험 pot(27 cm X 20 cm X H13.5 cm)에 3 cm 높이(1750 ± 10 g)로 채우고 지하수를 가한 후 토양을 저어 썰레질한 다음 물 표면의 부유물을 제거하고 지면을 고른 후 물 높이를 5 cm 높이로 조정한다. 다음 14일간 방치한 후 토양입자 등이 혼입되지 않도록 토양수시료를 1L 이상 채취하였다. 이 때 방치기간 동안 물은 소실량만큼 매일 보충하였다. 토양수 분석법을 위해서 시료 50 mL를 300 mL Round-bottomed flask에 취한 다음 Methanol 50 mL를 가하여 50°C에서 5 mL정도 남을 때까지 농축한 후, 10 mL Volumetric flask에 옮기고 증류수로 눈금을 맞추었다. 분배 및 정제방법은 토양시료 조제 시와 동일한 방법으로 수행하였다.

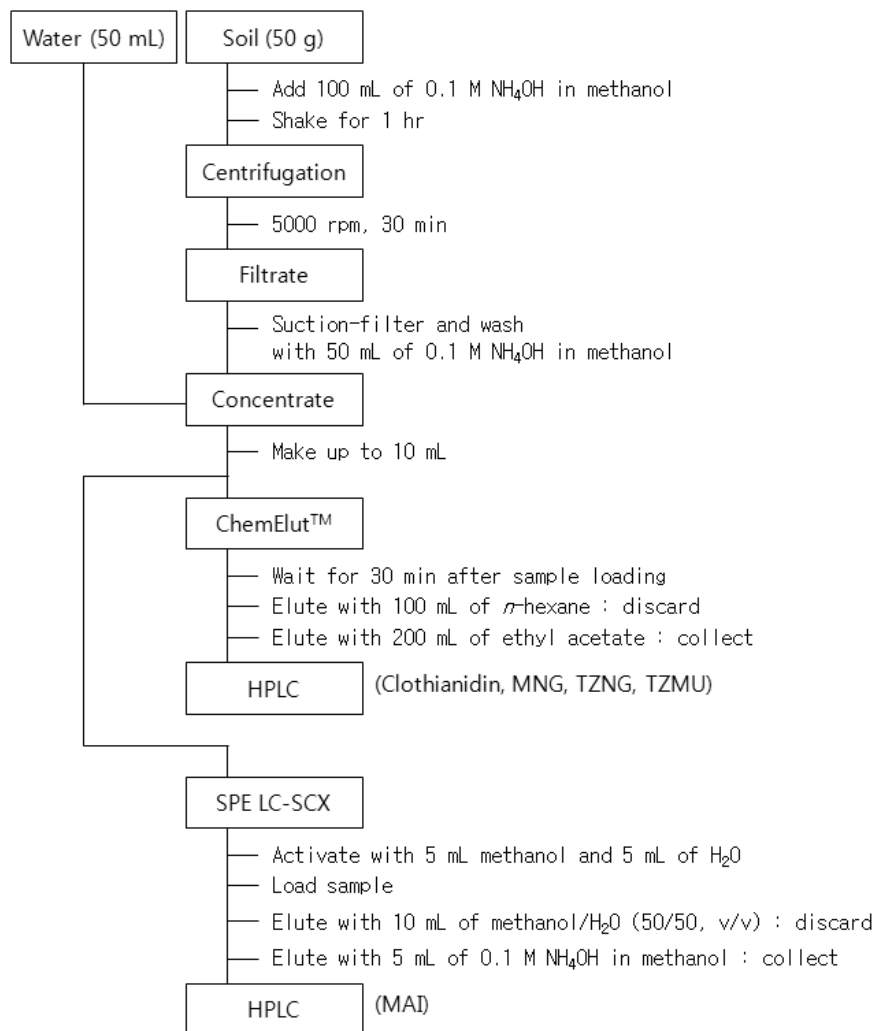


Fig. 2. Analytical scheme of clothianidin and its metabolites. TZMU, Thiazolylmethylurea; TZNG, Thiazolylnitroguanidine; MNG, Methylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole

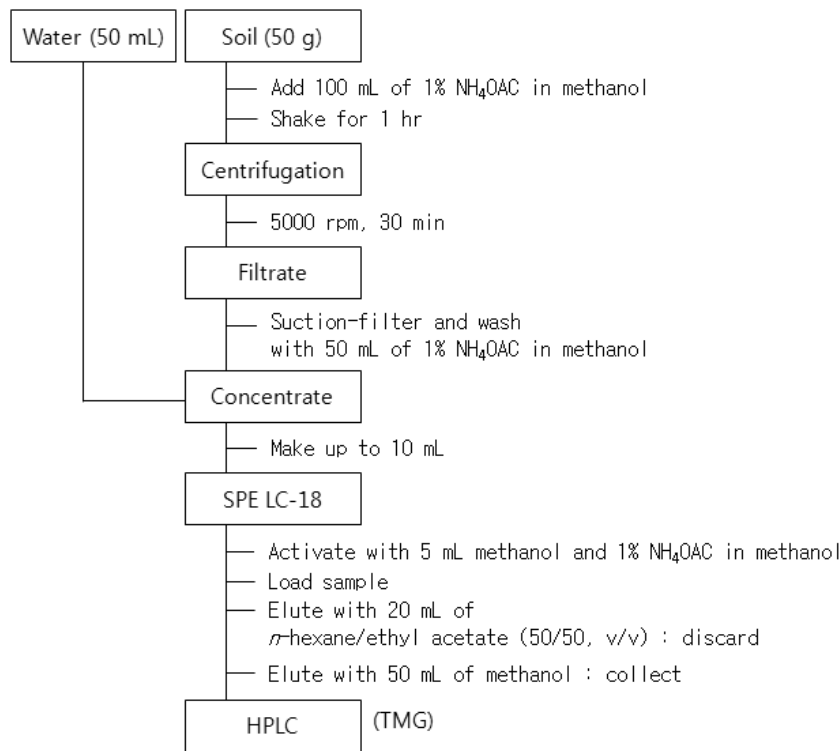


Fig. 2. Analytical scheme of clothianidin and its metabolites (continued). TMG, Thiazolymethylguanidine

기기분석

본 연구에서 Clothianidin 및 대사산물 분석 시 사용한 HPLC의 분석조건은 Table 2와 같다. 이 기기분석 조건하에

서 모화합물인 Clothianidin의 머무름시간은 9.8분이었으며, 대사산물 MAI, MNG, TMG, TZMU 및 TZNG의 머무름 시간은 각각 4.0분, 7.9분, 7.2분, 4.4분 및 6.9분이었다.

Table 2. HPLC operating parameters for the analysis of clothianidin and its metabolites

Instrument	Hewlett Packard series 1100 High-performance liquid chromatography system equipped with ChemStation and 1100 autosampler
Detector	Hewlett Packard G1315 UV/VIS photodiode array detector
Column	Symmetry C18, 3.9 mm i.d.× 150 mm, 4 μm spherical, Waters, USA (Clothianidin, TZNG, TZMU) Inertsil ODS3, 4.6 mm i.d.× 250 mm, 5 μm spherical, GL Science, Japan (MNG) Capcell Pak C18, 4.6 mm i.d.× 150 mm, 5 μm spherical, Shiseido Fine Chemicals, Japan (MAI, TMG)
Column temp.	40°C
Mobile phase ^a	Acetonitrile/deionized water (10/90, v/v) (Clothianidin, TZNG, TZMU) Deionized water (MNG) Acetonitrile/A ^a (20/80, v/v) (TMG) Acetonitrile/A ^a (15/85, v/v) (MAI)
Flow rate	1.5 mL/min (Clothianidin, TZNG, TZMU) 1.0 mL/min (MAI, MNG, TMG)
UV detection	269 nm (Clothianidin, MNG, TZMU) 250 nm (MAI, TMG, TZNG)
Sample size	40 μL (Clothianidin, MNG, TZNG, TZMU) 80 μL (MAI, TMG)

^a A=Aqueous solution containing 0.05 M sodium acetate, 0.005 M sodium octyl sulfonic acid, and 0.15 M acetic acid (pH 4.2). TZMU, Thiazolymethylurea; TZNG, Thiazolynitroguanidine; MNG, Methylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; TMG, Thiazolymethylguanidine

회수율 시험

각 시료별 잔류분석법을 검증하기 위하여 무처리시료에 대하여 회수율 시험을 실시하였다. 즉, 공시한 토양 2종 및 토양수 무처리시료에 Clothianidin과 대사산물 5종의 표준 용액을 0.05-0.25 mg/kg 및 0.01-0.05 mg/L 범위에서 각각 2수준 3반복으로 처리하고 앞서 기술한 분석과정을 수행, 회수율 및 분석오차를 산출하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 대상 화합물의 분리 및 검출

Clothianidin은 증기압이 3.8×10^{-8} mPa (20°C)이고 옥타놀/물 분배계수인 $\log P_{ow}$ 가 0.7 (25°C)로 보고되어(Tomlin, 2009, FAO Report, 2010) 비휘발성 극성화합물 부류에 속한다. 또한 주요 대사산물들도 초기 대사반응이 일어남에 주로 극성이 높은 작용기(Functional group)가 분자내에 도입, 그 극성이 Clothianidin과 동등 또는 그 이상일 것으로 예측하였다. Clothianidin과 주요 대사산물들의 물 및 유기

용매에 대한 용해도를 살펴보면 물과 Methanol 등 극성 용매에 대한 용해도가 높고 *n*-hexane과 같은 비극성 용매에 녹지 않는 것으로 보고되어(Tomlin, 2009) 위와 같은 예측을 확인할 수 있었다. 따라서 clothianidin 및 주요 대사산물의 잔류분석법으로는 gas chromatography 보다는 HPLC에 의한 분석을 시도하였다. Clothianidin 및 5종 대사산물들의 Ultraviolet(UV) 흡수 Spectrum을 조사한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 모화합물과 대사산물들은 250 nm와 269 nm에서 $3.8 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 의 높은 흡광계수를 나타내어 HPLC용 검출기 중 UV 흡광검출기에 의한 분석이 가능할 것으로 판단되었다.

기기분석 시 분리용 컬럼으로는 일반적으로 Buffer 를 이용하여 pH 를 조절할 수 있으며 중성화합물 뿐만 아니라 이온성을 띄고 있는 물질들도 ion-pair 기법을 이용하여 분리할 수 있는 Octadecyl silica 컬럼을 이용하여 모화합물과 대사산물의 동시분석을 시도하였으나 MNG의 경우 다른 대사산물에 비해 극성이 높아 C18 column에서의 머무름 시간이 너무 짧고 시료중의 불순물에 의한 간섭이 관찰되었다. 또한 MAI와 MNG를 제외한 모화합물 및 기타 대사산물들은 화학구조에서 Guanidine기와 Chlorothiazole ring을 모두 보유하고 있고, Chromatogram 상의 머무름 시간을 좌우하는 극성차이를 크게 유발할 구조상의 차이가 크지 않아 Peak overlapping 현상이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 UV 최대 흡수파장과 화합물간 분리 및 분석시간을 감안하여 Clothianidin과 TZNG는 동시 분석하고 TZMU, MAI, MNG 및 TMG는 개별적으로 분석하는 방법을 개발하였다.

시료의 분배 및 정제

Clothianidin 및 5종 대사산물들은 모두 질소를 함유하는 화합물로 질소원자의 포화여부에 따라 중성 또는 약염기성을 나타낸다. 해리 혹은 해리 가능한 화합물을 추출하기 위하여는 이온억압(Ion-suppression)조건 하에서 유기용매로 추출하는 방법 또는 이온화(Ionization)조건 하에서 수용액으로 추출하는 방법을 사용할 수 있는데 본 연구에서는 중성 화합물들과의 동시 추출을 위하여 전자의 방법을 채택하였다. 즉, 약염기성 NH_4OH 를 첨가하여 해리 가능한 작용기를 이온억압하고, 극성특성을 고려하여 methanol을 이용하여 모화합물, MAI, MNG, TZMU 및 TZNG를 동시 추출하였으며, TMG의 경우에는 NH_4OH 보다는 중성의 NH_4OAC 를 첨가, 이온강도를 증가시키는 방법으로 추출하였다. 추출액의 분배 과정으로는 분액여두상에서 서로 섞이지 않는 극성/비극성 용매조합을 사용하는 것이 일반적이나 Clothianidin 및 대사산물은 극성 용매에는 가용되는 반면 비극성 용매에는 난용으로 추출용매를 제거하지 않고서는 이 방법의 적용이 어려울 것으로 예상되어 분배효율을 높이기 위해 추출용매를 농축한 후 Sodium chloride로 포화시켜 유기용매로 액액분배를 시도하였다. 분배용매의 조성을 달리한 유기용매로 분배효율을 측정해 본 결과를 Table 3에 나타내었으며, 각 화합물 모두 Dichloromethane에 비해 Ethyl acetate를 이용하는

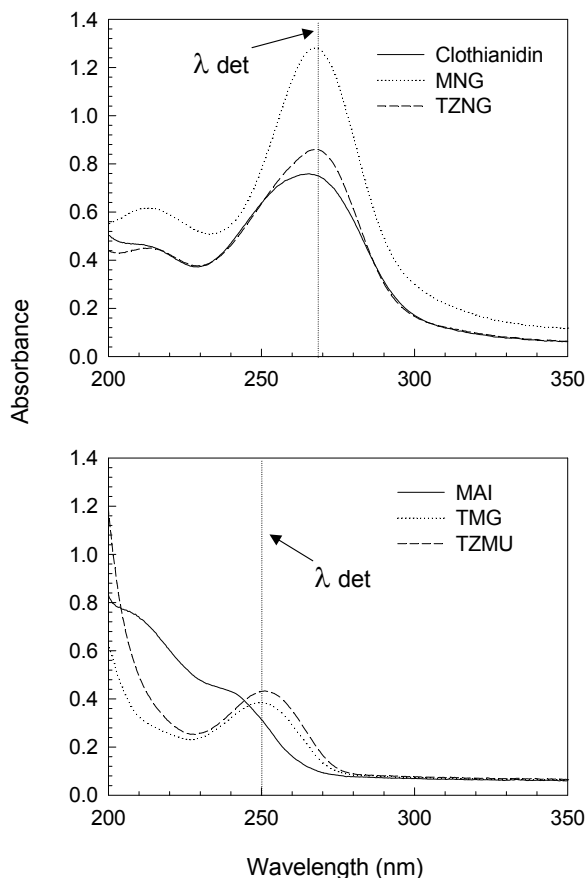


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of clothianidin and its metabolites.

TZMU, Thiazolylmethylurea; TZNG, Thiazolylnitroguanidine; MNG, Methylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; TMG, Thiazolylmethylguanidine

것이 더 높은 분배효율을 보였으나 MNG, MAI만은 분배효율이 50% 미만으로 낮았다.

Table 3. Recovery of clothianidin and its metabolites from liquid-liquid partition of saturated saline water

Compound	Recovery (%) ^a		
	A	B	C
Clothianidin	NR ^b	92.3± 3.6	95.4± 4.4
TZMU	NR	91.5± 1.2	97.9± 5.3
TZNG	NR	62.5± 2.1	95.0± 3.7
MNG	NR	6.0± 4.9	53.1± 6.6
MAI	NR	NR	NR
TMG	NR	46.0± 5.1	49.1± 5.9

^a Mean values of triplicate sample with standard deviations. A, triple partition with each 50 mL of n-hexane; B, triple partition with each 50 mL of dichloromethane; C, triple partition with each 50 mL of ethyl acetate.

^b NR, not recovered.

TZMU, Thiazolylmethylurea; TZNG, Thiazolylnitroguanidine; MNG, Methylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; TMG, Thiazolylmethylguanidine

따라서 분배효율을 향상시키고자 비흡착성 구조토를 매질로서 이용한 표면분배(Surface partition)법을 시도하였다. ChemElutTM와 같은 Hydromatrix media에 추출 수용액을 가하면 흡수되어 표면적이 넓은 구조토 표면에 균일한 피막을 형성한다. 여기에 물과 섞이지 않는 유기용매를 가하면 수용성 피막의 두께가 매우 얇으므로 유기용매간에 보다 높은 분배효율을 얻을 수 있다. 예비시험 결과 Table 4와 같이 n-hexane 용출시 용출되는 분석대상 화합물이 없었으며 Ethyl acetate 용출시 MAI를 제외하고 모두 90% 이상이 용출되어 본 분석법의 분배법으로 이용가능성이 우수하였다.

또한 분석대상 성분이 용출되지 않는 n-hexane을 우선적으로 용출시켜 시료 중 비극성 불순물을 대부분 제거하는 것

이 가능하였다. 따라서 본 연구에서는 Clothianidin, MNG, TZNG 및 TZMU 분석시 분배효율은 대등하지만 MNG의 높은 분배 효율이 높은 ChemElutTM를 이용하여 적용하였다. 반면 MAI만은 50% 미만의 분배효율을 나타내어 분배과정을 생략하고 정제과정을 적용하였다. 정제방법으로는 염기성 시료에 대한 높은 선택성을 가지는 SPE SCX에 알칼리 조건하의 유기용매를 사용하는 방법으로 정제방법을 확립하였으며, TMG의 정제방법으로는 비극성의 고정상을 이용하여 극성이나 중간 극성의 불순물로부터 상대적으로 비극성 화합물을 분리하기 위하여 사용되는 역상 분배용 Cartridge인 SPE LC-18를 이용하여 TMG의 정제방법을 확립한 결과 MAI와 TMG 모두 90% 이상 용출되는 것이 확인되었으며, Fig. 4 및 Fig. 5에 나타난 바와 같이 분석대상 성분 부근의 간섭이 관찰되지 않았다. 따라서 Clothianidin과 대사산물의 검출한계는 HPLC에서의 최소 검출량으로부터 직접 산출할 수 있었다. 또한 시료의 정제정도가 높고 시료 용액 중 늦게 용출되는 불순물도 없어 기기분석 시 시료의 연속적 주입이 가능하였다.

분석법의 검출한계 및 회수율

확립되어진 잔류분석법의 Clothianidin 및 5종 대사산물에 대한 검출한계는 토양시료에서 0.005 mg/kg으로 이러한 검출농도는 토양 10 cm 깊이를 기준으로 한 초기 살포농도 0.24 mg/kg의 약 1/50을 검출할 수 있어 토양 중 Clothianidin의 잔류성을 구명하는데 충분한 수준으로 판단되었다. 또한 토양수시료의 검출한계는 0.001 mg/L으로 눈물깊이 5 cm를 기준으로 한 최대 가능농도 0.48 mg/L의 1/480을 검출할 수 있어 Clothianidin의 토양수를 통한 이동성을 정밀하게 추적할 수 있는 감도였다.

무처리 토양시료에는 0.05와 0.25 mg/kg, 무처리 토양수시료에는 0.01과 0.05 mg/L의 농도로 Clothianidin과 그 대사산물들을 각각 2수준 3반복으로 처리하여 분석법의 회수율 및 분석오차를 조사한 결과는 Table 5와 같다.

Table 4. Recovery of clothianidin and its metabolites on a hydromatrix column, ChemElutTM

Compound	Recovery (%) ^a			
	A	B	C	Total
Clothianidin	NR ^b	87.2± 1.6	3.9± 0.5	91.0± 1.2
TZMU	NR	90.4± 0.7	2.1± 0.8	92.5± 0.5
TZNG	NR	99.6± 0.3	NR	99.6± 0.3
MNG	NR	78.6± 1.9	20.4± 1.4	98.9± 2.1
MAI	NR	30.6± 2.2	13.3± 2.6	43.9± 1.6
TMG	NR	90.7± 2.1	3.5± 0.7	90.7± 1.5

^a Mean values of triplicate sample with standard deviations. A, 100 mL of n-hexane; B, 0~100 mL of ethyl acetate; C, 100~200 mL of ethyl acetate.

^b NR, not recovered.

TZMU, Thiazolylmethylurea; TZNG, Thiazolylnitroguanidine; MNG, Methylnitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; TMG, Thiazolylmethylguanidine

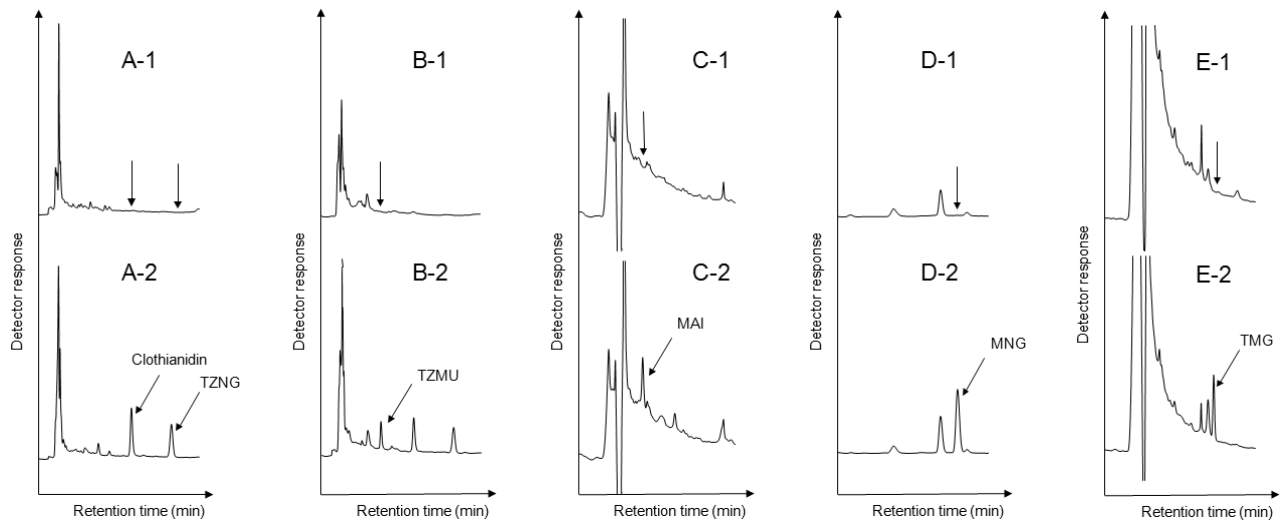


Fig. 4. Typical HPLC chromatograms of soil extracts.

A-1, B-1 and C-1, control; A-2, fortified with clothianidin and TZNG at 0.05 mg/kg each;

B-2, fortified with TZMU at 0.05 mg/kg; C-2, fortified with MAI at 0.05 mg/kg;

D-1 and E-1, control; D-2, fortified with MNG at 0.05 mg/kg; E-2, fortified with TMG at 0.05 mg/kg.

TZMU, Thiazolymethylurea; TZNG, Thiazolynitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; MNG, Methylnitroguanidine; TMG, Thiazolymethylguanidine

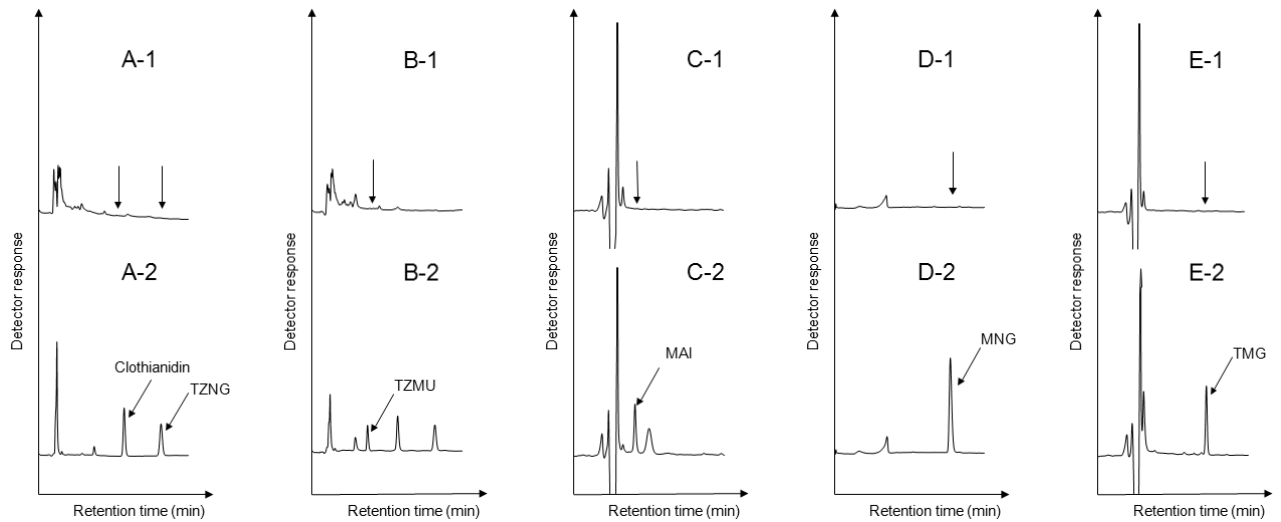


Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of water extracts.

A-1, B-1 and C-1, control; A-2, fortified with clothianidin and TZNG at 0.01 mg/kg each;

B-2, fortified with TZMU at 0.01 mg/kg; C-2, fortified with MAI at 0.01 mg/kg;

D-1 and E-1, control; D-2, fortified with MNG at 0.05 mg/kg; E-2, fortified with TMG at 0.05 mg/kg.

TZMU, Thiazolymethylurea; TZNG, Thiazolynitroguanidine; MAI, Methylaminoimidazole; MNG, Methylnitroguanidine; TMG, Thiazolymethylguanidine

토양 및 토양수시료의 경우 Clothianidin 및 5종 대사산물의 회수율은 87.4-104.3% 범위로 잔류분석 기준인 회수율 70-120% 이상을 모두 만족하였으며 분석법의 오차도 토양 및 토양수시료에서 5% 미만으로 나타나 높은 재현성을 보였다[농진청고시 제2012-13호 농약의 등록기준(별표 14) 잔류성 시험의 기준 및 방법]. 따라서 본 연구에서 확립한 Clothianidin과 5종 대사산물의 잔류분석법은 우수한 검출감도, 분석효율 및

재현성을 나타내어 환경 중 Clothianidin의 행적 및 잔류수준을 평가하는데 적합하다고 판단되었다.

References

Chang H.R., Kang H.R., Do J.A., Oh J.H., Hwang I.K., Kwon K.S., Im M.H., Kim K., 2012. Residue Studies of

Table 5. Recovery of clothianidin and its metabolites from fortified soil and water samples

Sample	Fortification ^a (mg/kg)	Recovery ^b (%)	Detection limit ^a (mg/kg)	Sample	Fortification ^a (mg/kg)	Recovery ^b (%)	Detection limit ^a (mg/kg)
Clothianidin				TMG			
Upland soil	0.05	96.2± 1.9	0.005	Upland soil	0.05	93.3± 1.2	0.005
	0.25	97.3± 0.3			0.25	83.8± 1.5	
Paddy soil	0.05	90.6± 1.3	0.005	Paddy soil	0.05	87.2± 2.5	0.005
	0.25	91.5± 2.3			0.25	83.7± 2.2	
Water	0.01	100.0± 0.2	0.001	Water	0.01	96.4± 2.3	0.001
	0.05	106.8± 0.3			0.05	94.7± 1.6	
MAI				TZNG			
Upland soil	0.05	84.1± 3.4	0.005	Upland soil	0.05	97.2± 1.0	0.005
	0.25	87.6± 2.1			0.25	96.3± 1.0	
Paddy soil	0.05	88.1± 3.8	0.005	Paddy soil	0.05	88.6± 2.1	0.005
	0.25	85.4± 2.9			0.25	86.2± 2.7	
Water	0.01	82.9± 6.6	0.001	Water	0.01	103.4± 0.3	0.001
	0.05	86.4± 4.6			0.05	110.5± 0.3	
MNG				TZMU			
Upland soil	0.05	94.8± 1.2	0.005	Upland soil	0.05	103.3± 2.1	0.005
	0.25	96.1± 0.3			0.25	105.3± 1.0	
Paddy soil	0.05	88.5± 2.6	0.005	Paddy soil	0.05	97.7± 0.5	0.005
	0.25	90.0± 1.7			0.25	102.7± 1.2	
Water	0.01	101.1± 0.5	0.001	Water	0.01	104.0± 1.4	0.001
	0.05	104.4± 0.4			0.05	107.2± 0.8	

^a mg/L for water sample; ^b Mean recovery of triplicate samples with standard deviation;

MAI, Methylaminoimidazole; MNG, Methylnitroguanidine; TMG, Thiazolymethylguanidine; TZNG, Thiazolynitroguanidine; TZMU, Thiazolymethylurea

Difenoconazole and Thiamethoxam during Cultivation of Sweet Persimmon for Export. *Korean J Environ Agric.* 31, 248-254.

Chen, M.F., Huang, J.W., Wong, S.S., Li, G.C., 2005. Analysis of Insecticide Clothianidin and Its Metabolites in Rice by Liquid Chromatography with a UV Detector, *J. Food Drug Analysis*, 13, 279-283.

Hem L., Park J.H., Shim J.H., 2012. Residual Analysis of Insecticides (Lambda-cyhalothrin, Lufenuron, Thiamethoxam and Clothianidin) in Pomegranate Using GC- μ ECD or HPLC-UVD. *Korean J. Environ Agric.* 29, 257-265.

Kim, B.M., Park, J.S., Choi, J.H., Abd El-Aty, A.M., Na, T.W., Shim, J.H., 2012. Residual determination of clothianidin and its metabolites in three minor crops via tandem mass spectrometry. *Food chemistry* 131, 1546-1551.

Na E.S., Lee Y.J., Kim K.J., Kim S.S., Lee K.S., 2013. Establishment of Pre-Harvest Residue Limits of Clothianidin and Thiacloprid in Ginseng, *Korea J. Pestic. Sci.* 17, 155-161.

Park, C.J., 2004. Development of the Analytical Method for Multiple Residues of Neonicotinoid Unsecticides in Crops. Department of Natural Resources Graduate School, Daegu University Gyeongbuk Korea.

Park J.H., Lim J.S., Yoon J.Y., Moon H.R., Han Y.H., Lee Y.J., Lee K.S., 2012. Establishment of Pre-Harvest Residue Limits(PHRLs) of Insecticide Clothianidin and Fungicide Fluquinconazole on Peaches during Cultivation Period, *Korean J. Environ Agric.* 31, 271-276.

Tomlin, C.D.S., 2009. The Pesticide Manual(15th), pp. 229-230.

Yokota, T., Mikata, K., Nagasaki, H., & Ohta, K., 2003. Absorption, tissue distribution, excretion, and metabolism of clothianidin in rats, *J. Agric. Food Chem.* 51, 7066-7072.