한국농화학회지 Vol. 26, No. 2, June 1983
J. Korean Agricultural Chemical Society

土壤과 菜蔬中 Phorate(0, 0-diethyl S-ethylthiomethyl phosphorithioate)와 그 代謝產物들의 GLC分析

洪 鍾 旭·李 海 根[1]

慶北大學校 農科大學 農化學科
1. 農村振興廳 農藥硏究所 農藥化學科

(1983년 2월 20일 수리)

Determination of Phorate(0, 0-diethyl S-ethylthiomethyl phosphorodithioate) and its Metabolites in Soil and Vegetables by GLC

Jong-Uck Hong and Hae-Keun Lee[1]

College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea
1. Agricultural Chemicals Research Institutute, O.R.D., Suweon, Korea

Abstract

Gas chromatographic method for the analysis of phorate(0,0-diethyl S-ethyl-thiomethyl phosphorodithioate) and its metabolites in soil and vegetables was studied by using a mixed phase column(10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1 on Gas Chrom Q, 1.8× 2mm i.d, borosilicate glass column). This column can separate completely phorate and its four metabolites except phoratoxon sulfoxide. Retention time of standard mixture ranged 1.8 to 16.1 minutes at column temperature programming from 130 to 200°C at 5°C/min and detector sensitivity was also very high(0.05 to 1.05*ng*). Recoveries from soil and vegetables untreated but fortified with phorate and its three major metabolites at 0.05 and 0.5ppm levels were above 90% for phorate, phorate sulfoxide and phorate sulfone while recovery of phoratoxon metabolite was about 84%.

緖 論

浸透性 殺虫劑인 phorate는 phosphorodithioate 系 有機燐化合物로서 生態界에서는 쉽게 5種의 代謝產物로 酸化되는데, 이의 主要代謝經路는 測鎖의 sulfide가 phorate sulfoxide(P=S,SO)와 phorate sulfone(P=S, SO_2)으로 酸化되는 過程이지만, 小量은 oxygen analog인 phoratoxon(p=O, S)으로 酸化되며 이의 sulfide는 다시 phoratoxon sulfoxide(p=O, SO)와 phoratoxon sulfone(P=O, SO_2)으로 酸化되는 過程이라고 報告되어 왔다(Fig. 1 參照).

phorate의 P=S, SO로의 轉換은 比較的 迅速한데, 이는 植物組織[5], 土壤[6~9] 및 土壤微生物[10,11]에 依해서, 심지어는 殘留分析時 正常的인 抽出方法에 依해서도 惹起됨이 立證되었으나[12], P=S, SO의 P=S, SO_2로의 轉換과 分解는 오랜 時日이 所要되었다는 報告[13]가 있다. 이는 P=S, SO의 極性增加[14]와 加水分解가 잘 일어나지 않는다는 點[15]

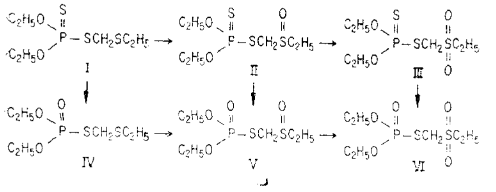

Fig. 1. Metabolic pathway of phorate(Bowman *et al*[4])
Ⅰ. P=S,S(phorate)
Ⅱ. P=S,SO(phorate sulfoxide)
Ⅲ. P=S,SO_2(phorate sulfone)
Ⅳ. P=O,S(phoratoxon)
Ⅴ. P=O,SO(phoratoxon sulfoxide)
Ⅵ. P=O,SO_2(phoratoxon sulfone)

等으로 說明하고 있다.

phorate의 5가지 代謝產物中 P=S, SO와 P=S, SO_2 및 P=O, S는 major metabolites로, P=O,SO와 P=O,SO_2는 minor metabolites로 區分되기도 하는데[5], 이들 代謝產物은 모두 母化合物인 phorate보다 cholinesterase沮害能이 훨씬 더 크므로[16] phorate를 處理한 도마도, 상치, 당근, 배추等 生體로 食用하는 作物들에 對한 殘留分 分析은 母化合物인 phorate뿐만 아니라 이들 代謝產物에 對한 殘留分 分析도 並行되어야 한다고 報告하였다[5].

phorate와 그 代謝產物들에 對한 殘留分 分析方法으로는 比色法[3,17], cholinesterase沮害法[18], 生物檢定[19,20], thin-layer chromatography[3,21], 및 gas chromatography(GLC)等[4,22,23] 여러가지 方法이 試圖되어 왔으나 그 中에서도 GLC方法이 가장 많이 研究되어왔는데, 初期에는 electron capture detector[22]와 emission spectroscopic detector[23]를 그후에는 flame photometric detector[4]를 利用하여 土壤과 植物體中 phorate와 그 代謝產物들의 殘留分을 檢索하였다. GLC分析時 母化合物과 이들 代謝產物을 同時에 檢索하고저 할 때에는 分析技術上 어려움에 直面하게 되는데, 이는 GLC column上에서 이들 化合物의 分離가 容易하지 않기 때문이었다[12]. 그러므로 보다 좋은 分離를 얻기 爲하여 여러 種類의 液相이 利用되었으나 이 모든 化合物들을 同時에 分離할 수 있는 單一의 液相은 發見되지 않았으며 column溫度의 變更 또는 temperature programming으로 P=S,S와 P=O,S를, P=S,SO와 P=S,SO_2를 分離하는데 成功하였다는 報告는 많으나[4,13,24], 實際로 適用하는데는 어려움이 많기 때문에 Watt等[25]은 QF-1과 DC-200의 mixed phase column을 利用하였으며, 最近에 Boshoff等[5]은 OV-17과 OV-225의 含量(%)과 組成比를 달리하여 phorate와 그 代謝產物들의 分離를 模索하였다. 따라서 本 試驗은 phorate와 그 代謝產物들에 對한 GLC分析을 爲하여, 10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1(2 : 1 : 1, w/w/w/)을 液相으로 하는 mixed phase column을 만들어 phorate와 그 代謝產物들의 殘留分 分析에의 利用 可能性을 檢討하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 標準農藥混合液의 調製

Phorate와 그 代謝產物들의 標準品은 American cyanamid社로 부터 分壤받아 使用하였다. 0.2~5.0ppm의 標準農藥混合液을 만들기 爲하여 먼저 이들 化合物을 各各 acetone에 溶解한 母液(1.0 mg/ml)을 만들고, GLC의 感度를 考慮하여 phorate(p=S,S)와 P=O,S는 各各 0.2ppm, P=S,SO와 P=S,SO_2는 各各 1.0ppm, 그리고 P=O,SO_2는 5.0ppm이 되도록 isooctane에 녹여 使用하였다. P=O,SO는 P=O,S와의 GLC分離가 困難하여 除外하였다. 本 試驗에 使用한 acetone과 isooctane은 和光製品(日本)인 EP級을 再蒸溜하여 使用하였다.

2. GLC分離

Phorate와 그 代謝產物들의 GLC分析은 flame photometric detector (FPD)가 附着된 Tracor

Table 1. GLC operating conditions for analysis of phorate and its metabolites

Detector	Flame photometric detector
Column	1.8×2mm ID, borosilicate glass column
Packing material	10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1(2 : 1 : 1, w/w/w) on Gas Chrom Q(80~100 mesh)
Temperature	Column; programmed from 130 to 200°C at 5°C/min
	Injection port 205°C, Detector block 210°C
Gas flow rate(ml/min)	Fuel; H_2 50, Air 80
	Carrier; N_2 50

Model 550 gas chromatograph를 利用하여 Table 1의 分析條件으로 chromatogram을 얻었다

使用된 column은 10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1(2 : 1 : 1, w/w/w) on Gas Chrom Q(80~100 mesh)을 1.8m×2mm i.d.의 borosilicate glass column(mixed phase column)으로, 205°C에서 72時間 aging하여 사용하였다.

phorate와 그 代謝產物들의 分離能을 높이기 爲하여 column 溫度를 150~200°C(5°C/min), 130~200°C(5°C/min) 및 120~200°C(3°C/min)로 programming 하였다.

3. 回收率試驗

가. 試料調製 : phorate無處理 土壤과 거기서 栽培한 무우와 당근을 對象으로 하였으며, 土壤은 1 inch auger로 10cm 깊이의 土壤을 採取하고 잘 混合한 후 2mm 체를 通過시켰으며, 무우와 당근은 播種 2個月 후에 採取, 잎과 뿌리로 兩分한후 Hobart food chopper에서 部位別로 細切하였다.

나. 藥劑處理 : 土壤과 菜蔬試料 200g을 aluminum foil에 골고루 펴고 0.05와 0.5ppm이 되도록 acetone에 溶解한 phorate와 3種의 主要代謝產物 (p=S,SO, P=S,SO_2, P=O,S)의 標準溶液을 各各 處理하고 잘 混合한 후 N_2gas로 acetone을 揮散시킨 즉시 50g씩 3反覆으로 精秤하였다. 그런데 minor metabolites인 P=O,SO와 P=O,SO_2는 實際 環境試料中의 濃度가 매우 낮아 檢出限界 未滿으로 殘存하는 경우가 많기 때문에 本 回收率試驗에서는 이 두化合物을 供試하지 않았다.

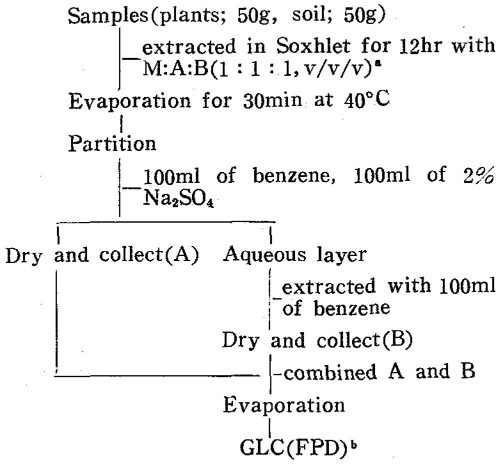

Fig. 2. Flow diagram for extraction of phorate and its metabolites from soil and vegetables

a. methanol: acetone: benzene

b. flame photometric detector

다. 農藥分析 : 土壤과 部位別 菜蔬中 殘留農藥의 抽出은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 methanol-acetone-benzene(1 : 1 : 1, v/v/v)混合溶液[8] 250 ml로 Soxhlet裝置에서 12時間 抽出하였으며 抽出中 溶媒의 交換은 時間當 6~8回이었다.

土壤과 菜蔬試料中에는 이들 化合物의 分析을 干涉하는 物質이 存在하지 않아 精製過程은 省略할 수 있었다.

結果 및 考察

1. GLC分離

phorate와 그 代謝產物中 P=O,SO를 除外한 5가지 化合物은 mixed phase column에서 column 溫度가 130~200°C(50°C/min)일때 分離가 可能하였으나 baseline分離는 얻지 못하였다(Fig. 3-A).

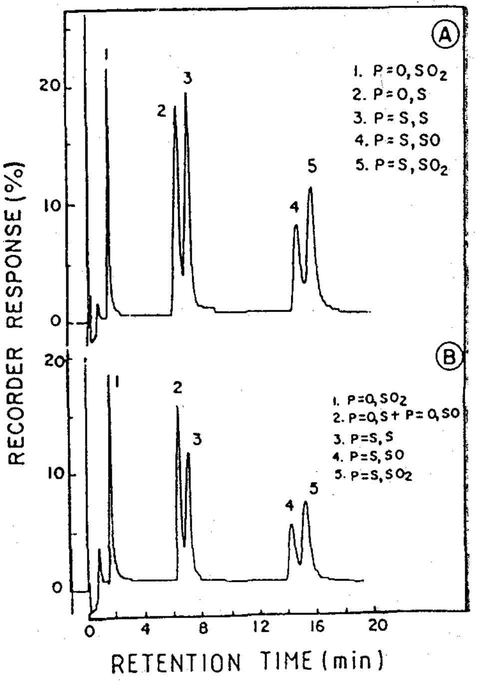

Fig. 3. Separation of phorate and its metabolites by GLC on a mixed phase column(10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1 on Gas Chrom Q)
Column temp.: programmed from 130 to 200°C at 5°C/min, Carrier: N_2 at 50ml/min A: P=O, SO absent, B: P=O,SO added

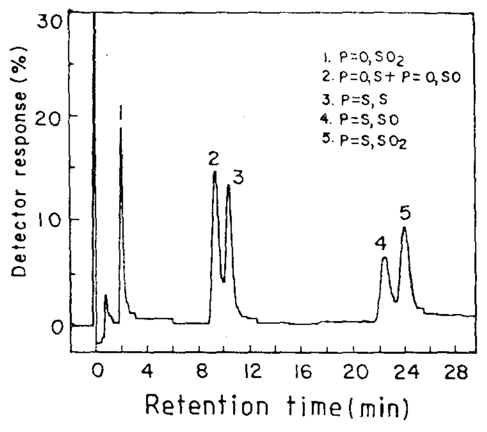

Fig. 4. Chromatograms of phorate and its metabolites on a mixed phase column(refer to Fig. 3)
Column temp.: programmed from 120 to 200°C at 5°C/min, Carrier: N_2 at 50ml/min

chromatogram B의 2番 peak는 P=O,S와 P=O,SO가 分離되지 않았음을 보여준다. 그래서 보다 더 좋은 分離를 얻기 爲하여 column溫度의 programming range를 120~200°C로, programming rate를 3°C/min로 設定하여도 P=O,S와 P=O,SO는 分離되지 않았다(Fig. 4).

phorate와 그 代謝產物들의 GLC分析時 問題點은 P=S,S와 P=O,S 그리고 P=S,SO와 P=S,SO_2의 分離가 어려웠다는 點인데, 本 mixed phase column 使用時 그들의 分離가 良好하였으며 두가지 temp. programming法에서의 分離能은 對等하였으므로 실제 試料中의 殘留量 分析時는 130~200°C(5°C/min)에서 行하였다.

Watts[25] 等은 10% DC-200만으로는 P=S,SO와 P=S,SO_2가 分離되지 않았으며 15% QF-1+10% DC-200(1 : 1, w/w)을 利用하면 上記 두 化合物의 分離는 可能하였으나 P=S,S와 P=O,S는 分離되지 않았다고 報告하였다. 그래서 Bowman等[4]은 column溫度를 變更하여 2番 注入함으로써 DC-200만으로도 p=O,S와 P=S,S 그리고 P=S,SO와 P=S,SO_2를 分離할 수 있었다고 報告한 바 있다. 또한 OV-101, OV-17, OV-210 및 OV-225를 5% 되게 Gas chrom Q에 被覆한 column로 column溫度를 200°C의 等溫과 programming(150~300°C, 15°C/min)했을때 여러種類의 有機燐系農藥의 保指時間을 調査한 結果, 4가지 液相은 모두 等溫과 programming條件下에서도 P=S,SO와 P=S,SO_2를 分離하지 못하였으나, OV-210만이 200°C의 等溫에서 上記 두 化合物을 分離할수 있었으며 OV-225를 除外한 나머지 column은 P=O,S와 P=S,S의 分離가 可能하였다는 報告가 있다[26].

2. 保指時間과 檢出感度

phorate와 그 代謝產物들에 對한 保指時間과 檢出感度는 Table 2에서 보는 바와 같이, P=O,S와 P=O,SO의 保指時間은 130~200°C(5°C/min)와 150~200°C(5°C/min)의 column 溫度에서 各

Table 2. Retention times and detector sensitivity for phorate and its metabolities on mixed column[a]

Compounds	Retention time(min)				Sensitivity[d]
	130~200°C(5°C/min)[b]		150~200°C(5°C/min)[b]		
	Actual	Relative[c]	Actual	Relative[c]	
P=S,S	7.31	1.00	4.16	1.00	0.05
P=S,SO	14.83	2.03	10.77	2.59	0.60
P=S,SO_2	16.06	2.20	12.06	2.90	0.50
P=O,S	6.30	0.86	3.62	0.87	0.05
P=O,SO	6.0	0.86	3.62	0.87	3.15
P=O,SO_2	1.83	0.25	0.79	0.19	1.05

a. 10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1 on Gas Chrom Q(80~100 mesh), 1.8m×2mm ID
b. programming range and rate
c. relative to phorate
d. pesticide(in nanograms) required to give 2%(0.2 inch) peak height when column temperature was programmed between 130~200°C(5°C/min) at 8×10^{-8} AFS.

各 6.3과 3.6分으로서 同一하였으며, 나머지 4化合物의 保指時間은 130~200°C(5°C/min)의 column 溫度에서 1.8~16.1分 範圍이었다. Oxon化合物 (P=O,S, P=O,SO, P=O,SO_2)은 모두 母化合物인 phorate보다 먼저 分離되었다. 또한 phorate에 對한 relative retention time(P=S,S : 1.00)은 130~200°C(5°C/min)에서는 0.25~2.20, 150~200°C (5°C/min)에서는 0.19~2.90範圍이었다. 한편 0.2 inch(2%)의 peak 높이를 얻는데 必要한 各 化合物의 무게(ng)로 表示된 GLC의 檢出感度는 0.05~3.15ng 範圍이었는데, Oxon 化合物의 酸化物인 P=O,SO의 檢出感度는 다른 化合物에 比해 매우 낮아 P=O,SO_2의 $\frac{1}{2}$, P=S,SO와 P=S,SO_2의 $\frac{1}{6}$에 不過하였다. 反面 P=S,S와 P=O,S의 檢出感度는 매우 높아 0.05ng이었으며, P=S,SO와 P=S,SO_2는 이 보다 多少 낮은 0.5ng 程度이었다.

本 試驗에서 얻은 各 化合物들의 感度는 5% DEGS[27]보다는 多小 떨어지나 4% QF-1[9]과는 비슷하였다. 全般的으로 10% DC-200[25]보다는 높은 水準이었다. P=O,SO와 P=O,SO_2의 낮은 感度는 emission spectroscopic detector 使用時 이들의 感度는 他 化合物에 比해 매우 낮었다는 Bache와 Lisk[23]의 報告와 一致한다.

3. 回收率

土壤과 部位別 菜蔬中 phorate와 主要代謝產物들의 回收率은 0.05와 0.5ppm 水準에서 모두 90% 以上의 높은 回收率을 얻었으며, 土壤에서 보다 植物體에서 多少 높은 傾向이나 一定하지는 않았다(Table 3). P=S,SO의 回收率은 對象試料와는 無關하게 모든 試料에서 他 化合物보다 越等히 높은 水準인데 反해 P=O,S의 回收率은 多少 낮은 84%이었다. 두 水準과 各 試料에서 얻은 總回收率은 P=S,S가 91%, P=S,SO는 99% 그리고 P=S,SO_2는 93% 이었다. P=O,S의 回收率이 他 化合物에 比해 多少 낮은 結果는 chloroform-methanol (9 : 1, v/v)로 Soxhlet裝置에서 8時間 抽出時 P=O,S의 回收率은 62% 였다는 Bowman等[4]의 報告보다는 훨씬 높은 水準인데, P=O,S의 回收率이 낮은 理由에 對해 그들은 不安定한 이 化合物의 長時間 抽出로 因한 分解로 推定하였다.

結論的으로 本 試驗에서 使用한 mixed phase column(10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1 on Gas Chrom Q)은 비록 6가지 化合物을 同時에 分離하지는 못하였으나 column溫度를 programming함으로써 P=O,SO를 除外한 5가지 化合物의 分離가 可能하였다. 그런데 P=O,SO는 minor metabolite[5]로서 慣行藥量處理時 實際로 環境試料中에 存殘하는 濃度는 매우 낮아 檢出限界 未滿으로 殘留하기 때문에 本 mixed phase column은 環境試料中 phorate와 그 代謝產物들의 殘留分分析에 利用이 可能할 것이며, 土壤과 菜蔬試料를 methanol-acetone-benzene (1 : 1 : 1, v/v/v)으로 Soxhlet 裝置로 抽出하고 benzene으로 이들 化合物을 分離한 후 FPD-GLC로 分析하면 殘留分 分析을 干涉하는 物質이 存在하지 않아 精製過程을 省略할 수 있어 經濟的이었다. 또한 各 化合物에 對한 檢出感度도 매우 높아 0.05~3.15ng範圍이었다 (Table 3). 따라서 本 mixed phase column은 分離와 感度面에서 그 性能이 優秀하여 phorate의 分解와 代謝의 硏究에 效率的으로 利用될 수 있을 것으로 思料된다.

Table 3. Recovery of phorate and its three major metabolites from untreated, fortified soil and vegetables

Samples	% recovery[a]							
	0.05ppm				0.5ppm			
	P=S,S	P=O,S	P=S,SO	P=S,SO_2	P=S,S	P=O,S	P=S,SO	P=S,SO_2
Soil	91.6	86.6	92.1	93.4	90.5	85.6	96.8	94.2
Radish roots	88.3	87.2	100.1	94.3	91.1	84.0	99.4	90.8
Radish foliage	92.2	82.5	99.8	93.7	92.5	83.2	97.6	92.6
Carrot roots	92.1	79.7	102.0	92.4	89.2	81.9	104.4	91.7
Carrot foliage	91.2	85.3	97.6	94.7	91.7	85.2	99.5	91.2

a. mean of triplicate

要 約

phorate와 그 代謝產物들의 殘留分 分析方法을 確立코자 10% DC-200+8% Reoplex-400+2% QF-1(2 : 1 : 1, w/w/w) on Gas Chrom Q(80~100 mesh), 1.8m×2mm ID, borosilicate glass column인 mixed phase column을 利用, flame photometric detector가 附着된 gas chromatograph로 調査하였다.

本 mixed phase column은 비록 phorate와 5가지 代謝產物을 同時에 分離하지는 못하였으나 column溫度를 programming(130~200°C, 5°C/min)함으로써 phoratoxon sulfoxide를 除外한 5가지 化合物의 分離가 可能하였다(phoratoxon sulfoxide는 phoratoxon과 중첩되었음). 또한 檢出感度도 매우 높아 0.05~3.15ng範圍이었다.

한편 土壤과 菜蔬에 處理한 phorate와 그 代謝產物들을 methanol-acetone-benzene(1 : 1 : 1, v/v/v)으로 Soxhlet裝置에서 12時間 抽出한 후 benzene으로 이들 化合物을 分離한 結果 90%以上의 높은 回收率(phoratoxon은 約 84%)을 얻었다.

따라서 本 mixed phase column은 分離와 感度面에서 그 性能이 優秀하여 phorate의 分解와 代謝의 硏究에 效率的으로 이용될 수 있을 것이다.

參 考 文 獻

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Pesticide Residues in Food. 1977 evaluations, 363(1978)
2. Bowman, J.S. and Casida, J.E.: J. Econ. Entomol., 51 : 838(1958)
3. Blinn, R.C.: J. Assoc. Off. Agric. Chem., 46 : 952(1963)
4. Bowman, M.C., Beroza, M. and Harding, J.A.: J. Agric. Food Chem., 17 : 138(1969)
5. Boshoff, P.R. and Pretorius, V.: J. Agric. Food Chem., 27 : 626(1979)
6. Getzin, L.W. and Chapman, R.K.: J. Econ. Entomol., 53 : 47(1960)
7. Suett, D.L.: Pestic. Sci., 2 : 105(1971)
8. Lichtenstein, E.P., Fuhremann, T.W., Schulz, K.R., and Liang, T.T.: J. Econ. Entomol., 66 : 863(1973)
9. Getzin, L.W. and Shanks, C.H., J.R.: J. Econ. Entomol., 63 : 52(1970)
10. Kaufman, D.D.: Pesticides in Soil and Water. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., Wisconsin USA, 133(1974)
11. Ahmed, M.K., and Casida, J.E.: J. Econ. Entomol., 51 : 59(1958)
12. Brown, M.J.: J. Agr. Food Chem., 23 : 334 (1975)
13. Saunders, J.L. and Getzin, L.W.: J. Econ. Entomol., 66 : 530(1973)
14. Bowman, B.T. and Sans, W.W.: J. Environ, Sci. Health, Part B. B 14, 6 : 625~634(1979) in J. Agric. Food Chem., 29 : 733(1981)
15. Melnikov, N.N.: XXVI. Organophosphorus compounds. Residue Reviews, 36 : 364(1971)
16. Bowman, J.S. and Casida, J.E.: J. Agr. Food Chem., 5 : 192(1957)
17. Giang, P.A. and Schechter, M.S.: J. Agr. Food Chem., 8 : 51(1960)
18. Mendoza, C.E.: Residue Reviews, 43 : 105 (1972)
19. Parker, B.L. and Dewey, J.E.: J. Econ. Entomol., 58 : 106(1965)
20. Harris, C.R.: Can. Entmol., 109 : 1115(1977)
21. Grant, D.S., Sherwood, C.R. and McCully, K.A.: J. Chromatogr., 44 : 67(1969)
22. Egan, H., E.W. Hammond, and Thomson: J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 89 : 175(1964)
23. Bache, C.A. and Lisk, D.J.: J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 49 : 647(1966)
24. Bowman, M.C. and Beroza, M.: J. Assoc. Off. Agric. Chem., 53 : 499(1970)
25. Watts, R.R. and Storherr, R.W.: J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 52 : 513(1969)
26. Bowman, M.C. and Beroza, M.: J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 52 : 1231(1969)
27. McLeod, H.A., Mulkins, G., and Rao, S.L. N.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., 4 : 224 (1969)