

유도체화 반응에 의한 현미 중 thiosultap의 분석

최정희 · 도정아 · 윤혜정 · 박용춘 · 김재훈 · 최동미*

식품의약품안전평가원 화학물질과

(2010년 1월 19일 접수, 2010년 2월 3일 수리)

Analysis of Thiosultap in Hulled Rice by Derivatization

Jeong-Heui Choi, Jung-Ah Do, Hae-Jung Yoon, Yong-Chun Park, Jae Hun Kim and Dongmi Choi*

Food Chemical Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 194, Tongilro, Eunpyeong-gu, Seoul, 122-704, Republic of Korea

Abstract

Thiosultap, a nereistoxin analog insecticide, registered in China has been used to control selected beetles and Lepidopteran pests on rice, vegetables and fruit trees. Although domestic use of thiosultap is not permitted, it is needed to monitor this insecticide from imported crops because that has been used on crops in many foreign countries, especially China. Thiosultap in hulled rice was determined as nereistoxin derived in basic condition by GC-FPD. This method accomplished ion-associated liquid-liquid partitioning for cleanup, and limit of quantification and linearity performed by the established method were 0.05 mg kg^{-1} and $0.995(r^2)$. The recoveries performed by control hulled rice fortified with thiosultap at 0.5 and 2.5 mg kg^{-1} were $96.1 \pm 7.9 \sim 100.8 \pm 6.1\%$.

Key words GC-FPD, GC-MS, hulled rice, nereistoxin, thiosultap

서 론

Thiosultap(dihydrogen *S,S'*-[2-(dimethylamino)trimethylene]di(thiosulfate))은 바다갯지렁이(*Lumbriconereis heteropoda*)에서 분리 동정된 nereistoxin(NTX)계 농약으로서, 중국에서 개발되어 벼 및 원예작물의 나비목 해충을 방제하기 위하여 사용되어져 왔다(Xia 등, 1995). Thiosultap은 국내에선 사용이 허가되어 있지 않으나 같은 NTX계 농약인 bensultap, cartap, thiocyclam 등은 곡류, 과실류 및 채소류 등에 사용이 허가되어 있다. 특히, thiosultap은 중국산 수입 농산물에 잔류하여 국내에 유입될 가능성이 있으므로, 이와 같이 수입 농산물에 대한 잔류농약 모니터링 수행이 매우 중요하게 인식되고 있으며, 이를 위하여 thiosultap 시험법 확

립이 필수적이다.

Thiosultap 시험법 확립을 위하여 Inoue와 Yamamoto의 ‘작물과 토양 중 bensultap의 시험법’ 연구(1986)를 기초로 하였다. Thiosultap은 Fig. 1에서 보는 것과 같이 화학구조가 monosultap과 매우 유사하여 그 물리화학적 특징이 monosultap과 동일하다(e-Pesticide Manual, 2007). 따라서 thiosultap은 UV 파장에 대한 흡수가 약하기 때문에 액체크로마토그래프(liquid chromatograph, LC) 보다는 기체크로마토그래프(gas chromatograph, GC) 분석이 용이하다(Tao 등, 2007). 또한, thiosultap은 Fig. 2의 유도체화 반응에 의해

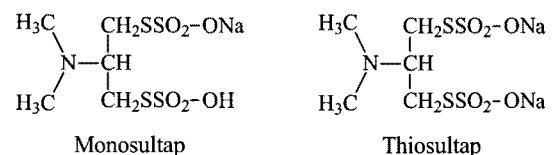


Fig. 1. The chemical structures of monosultap and thiosultap.

*연락처 : Tel. +82-2-380-1674, Fax. +82-2-355-6037

E-mail: mechoi@kfds.go.kr

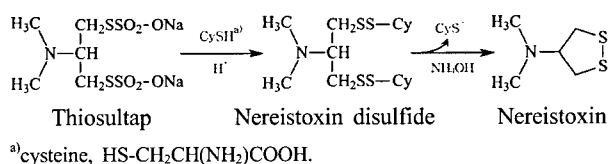


Fig. 2. Inferred derivatization process of thiosultap to nereistoxin.

NTX로 전환되는데 NTX가 황을 포함하고 있으므로, 인과 황을 함유한 유기화합물에 대하여 선택적인 분석을 수행할 수 있는 불꽃광도검출기(flame photometric detector, FPD)가 검출기로서 적합함을 알 수 있다. 농산물 중 NTX계 농약을 분석하기 위하여 LC-MS(mass spectrometry; Ferrer와 Thurman, 2007; Mezcuca 등, 2009; Nguyen 등, 2009)를 이용한 연구도 보고된 바 있으나 본 연구에서는 기존의 연구방법을 간소화하여 현미 중 thiosultap 시험법을 확립하고자 유도체와 반응과 산염기 분배법, GC-FPD 분석을 이용하였다.

재료 및 방법

시약 및 분석기기

Thiosultap(thiosultap-disodium, 95.5%)은 Dr. Ehrenstorfer 사(독일), acetonitrile과 ethyl acetate, *n*-hexane, methanol은 HPLC급으로 Merck 사(독일), *L*-cysteine hydrochloride anhydrous와 nickel chloride는 Sigma-Aldrich 사(미국), ammonia water와 sulfuric acid, hydrochloric acid 등은 GR급으로 Wako 사(일본) 제품을 구입하여 사용하였다.

현미 시료 중 thiosultap은 GC-FPD(GC-2010, Shimadzu, Japan)로 분석하였고, 검출된 NTX의 확인을 위해 GC-MS(5973, Agilent Technologies, USA)로 분석하였으며, 분석 조건은 각각 Table 1과 2에 나타내었다.

시료 조제

Thiosultap의 추출 및 유도체화 반응

마쇄한 현미 25 g을 250 mL 원심분리기용 튜브에 넣고 2% acidic cysteine 150 mL를 가하여 30분간 진탕 추출하였다. 이를 9900 G, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상등액 120 mL를 별도의 250 mL 원심분리기용 튜브에 취하였다. 여기에 3% nickel chloride와 ammonia water를 각각 4 mL

Table 1. Gas chromatographic conditions for the analysis of nereistoxin derived from thiosultap in hulled rice

Instrument	GC-FPD (GC-2010, Shimadzu, Japan, S filter 394 nm)	
Column	DB-5 (30 m×0.53 mm id, 0.5 μm film thickness, Agilent Technologies, USA)	
Temperature	Injector	230°C
	Oven	100°C
	Detector	240°C
Injection port	Packed inlet	
Injection volume	2 μL	
Flow	Carrier	He, 15 mL min ⁻¹
	Ignition	H ₂ , 80 mL min ⁻¹
		Air, 120 mL min ⁻¹

Table 2. GC-MS conditions for the analysis of nereistoxin derived from thiosultap in hulled rice

Instrument	GC-MS (5973, Agilent Technologies, USA)	
Column	DB-5ms (30 m×0.25 mm id, 0.25 μm film thickness, Agilent Technologies, USA)	
Temperature	Injector	230°C
	Oven	70°C (2 min) → 10°C min ⁻¹ → 150°C (5 min)
	Ion source	230°C
	Interface	250°C
Injection mode	Splitless	
Injection volume	1 μL	
Flow	He, 1 mL min ⁻¹	
Electron energy	70 eV	

씩 첨가하여 5분간 진탕한 후 70°C 수욕상에서 1시간 동안 진탕 반응시켰다.

산염기 분배 및 분석

상기 반응이 끝난 추출액을 냉각시키고, 10 N sulfuric acid를 첨가하면서 pH 5로 맞춘 후 *n*-hexane 50 mL를 가하여 진탕하였다. 이를 9900 G, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액(*n*-hexane 층)을 버린 후 10 N sodium hydroxide를 첨가하면서 pH 9로 맞추었다. 여기에 sodium chloride 12 g과 ethyl acetate 100 mL를 가하여 진탕하고, 다시 7600 G, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상등액(ethyl acetate 층) 80 mL를 감압농축플라스크에 취하여 40°C 수욕상에서 감압농축한 후 잔류물을 methanol 2 mL로 용해하여 GC-FPD로 분석하였다.

결과 및 고찰

유도체화 반응을 위한 cysteine 용액의 농도와 pH의 영향

Fig. 2에서 보는 바와 같이 thiosultap은 산 조건에서 cysteine과 반응하여 중간생성물인 NTX disulfide를 형성한 후 염기 조건에서 쉽게 NTX로 전환되므로 NTX의 높은 회수율을 위해서는 정량적이고 안정적인 NTX disulfide의 생성이 중요하다. 따라서 Inoue와 Yamamoto는 bensultap의 유도체화 실험에서 cysteine 용액의 농도와 pH에 따른 NTX disulfide의 생성 및 NTX의 추출효율을 실험하였다. 그 결과 cysteine 용액의 농도 1%에서는 평균 71.6%의 NTX 추출효율을 보인 것에 반해 2%에서는 77.9%의 효율을 보였다. 따라서 본 연구에서는 2% cysteine을 사용하였다. 또한 2% cysteine의 pH에 대한 Inoue와 Yamamoto의 실험결과에서는, pH 2에서 반응 시간 30분 이내에 NTX disulfide의 생성이 불충분하였고 pH 6에서는 반응개시 직후부터 NTX disulfide 생성이 감소하였으나 pH 4에서는 반응 시간 30분에 NTX disulfide의 농도가 최대가 되었다. 따라서 본 연구에서는, thiosultap을 2% cysteine과 30분 동안 반응시킨 후 GC-FPD로 분석한 결과, pH 1.8(pH를 맞추지 않은 2% cysteine)에서는 peak area의 상대표준편차가 58.6%이었으나 pH 4에서는 상대표준편차가 14.5%로 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 2% cysteine의 pH가 1.8일 때 NTX disulfide의 생성이 불충분하고, 반응시간 30분 동안 안정적인 생성이 불가하였기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 thiosultap을 추출

하여 NTX disulfide를 형성하기 위한 cysteine 용액의 농도는 2%, pH는 4로 결정하였다.

산염기 분배

농산물은 다양한 matrix를 가지고 있어 정제가 불가피하므로 NTX disulfide로부터 전환된 NTX를 효과적으로 정제하기 위하여 산염기 분배법을 사용하였다. NTX는 중성 및 산 조건에서 이온화(protonation)되어 수용해도가 증가하므로 비극성 유기용매를 이용한 액-액 분배법으로 극성이 낮은 불순물을 제거할 수 있다. 따라서 추출액의 pH를 5, 6 및 7로 맞춘 후 *n*-hexane 50 mL를 가하여 액-액 분배한 결과 손실된 NTX는 각각 0.7, 8.0 및 28.0%이었다. 따라서 추출액 중 불순물을 제거함과 동시에 NTX의 손실을 최소화하기 위하여 추출액의 pH를 5로 맞추어 *n*-hexane으로 액-액 분배하였다.

이와 같이 산 조건에서 이온화된 NTX는 염기 조건에서 이온화가 억압, 비이온성의 3차 amine 형태가 되어 유기용매에 대한 용해도가 상대적으로 증가하게 된다(식품의약품안전평가원, 2009). 따라서 추출액의 pH를 높이면 유기용매에 의해 수용액상에 존재하는 NTX를 선택적으로 추출할 수 있을 뿐만 아니라 극성 불순물을 제거할 수 있다. 상기 pH 5의 추출액을 다시 pH 8, 9, 10 및 11로 맞춘 후 ethyl acetate 100 mL로 액-액 분배하였으며, 그 결과 NTX의 회수율은 각각 106, 105, 65 및 67%로 나타났다. 그러나 높은 회수율을 보인 pH 8 시료의 chromatogram에서 다소의 불순물과 불안정한 기준선이 관찰되어 추출액 중 NTX를 추출하기 위하여 추출액의 pH를 9로 맞추어 ethyl acetate로 액-액 분배하였다.

Inoue와 Yamamoto의 연구 또한 산염기 분배법을 사용하였으나 1,050 mL의 유기용매를 사용한 3단계의 분배과정, 3회의 농축과정을 통해 NTX를 추출한 반면, 본 연구에서는 150 mL의 유기용매와 2단계 분배 및 1회의 농축과정으로 유기용매의 사용량이 크게 감소되었을 뿐만 아니라 추출과정도 간소화되어 신속한 시험을 수행할 수 있었다. 또한 Inoue와 Yamamoto의 연구와는 달리 산염기 분배법 최적의 pH를 설정하여 추출효율을 극대화할 수 있었다.

최적 분석조건 확립

유도되어진 NTX는 휘발성이 높기 때문에 비교적 낮은 온도(100°C)에서도 4.9 min의 머무름시간을 나타내었다. NTX의 감도와 현미 시료 추출물 중 방해물질과의 겹침을 고려하여 GC-FPD 분석조건을 확립하였다(Table 1).

Thiosultap에서 유도된 NTX를 확인하기 위하여 GC-MS

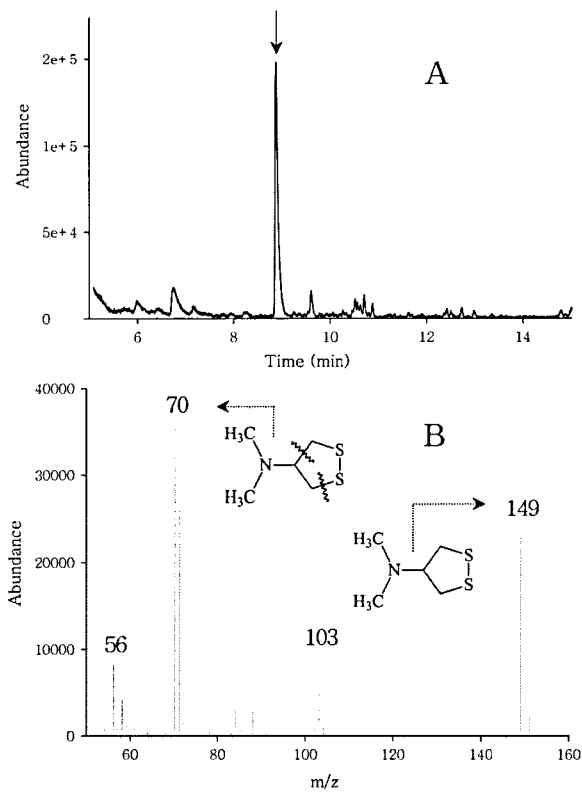


Fig. 3. Total ion chromatogram (A) and GC mass spectrum (B) of the nereistoxin derived from thiosultap.

를 이용하였고 그 분석조건은 Table 2에 나타내었다. 분자량 50~200 Da의 범위에서 NTX의 total ion chromatogram (TIC)과 GC mass spectrum을 Fig. 3에 나타내었다. TIC 중 NTX의 scan mass spectrum을 확인한 결과 높은 abundance를 보인 peak의 fragment mass ion은 m/z 149와 70이었으며, m/z 149는 NTX의 분자량($C_5H_{11}NS_2$)이고 m/z 70은 CH_3S_2 의 손실($149-79$)로 발생된 것이다(Tao 등, 2007).

Thiosultap의 검량선과 시험법의 정량한계 및 회수율

Thiosultap의 유도체화 반응에 의해 생성된 NTX의 직선성은 $0.4\sim 8.0\text{ mg L}^{-1}$ 범위에서 상관계수(r^2) 0.995로 높은 직선성을 보였다. 본 시험법의 선택성을 평가하기 위하여 표준용액과 무처리 시료, 처리구 시료의 chromatogram을 서로 비교한 결과 Fig. 4와 같이 방해물질과의 겹침 없이 높은 선택성을 확인할 수 있었다. 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 signal-to-noise 비율 10을 기준으로 측정한 결과 0.05 mg kg^{-1} 이었다. 처리농도 0.5와 2.5 mg kg^{-1} 에서 thiosultap의 회수율 실험을 수행하였고, 각 농도에서 회수율은 평균 100.8 ± 6.1 과 $96.1\pm 7.9\%$ 이었다(Table 3). 따라서 현미 중 thiosultap을 분석하기 위한 본 시험법의 감도와 선택성,

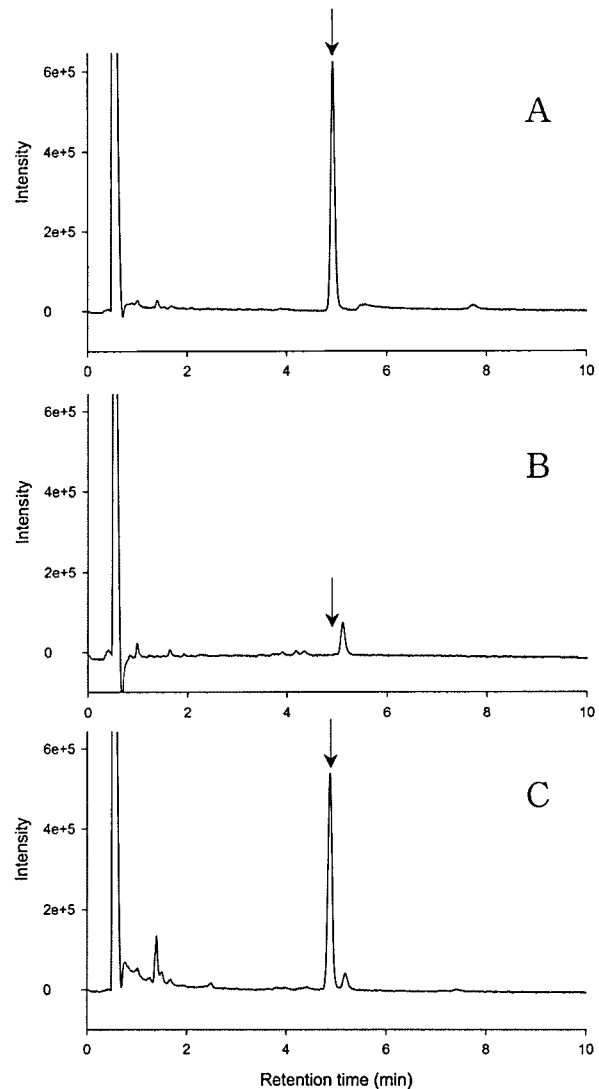


Fig. 4. Representative GC-FPD chromatograms of the nereistoxin derived from thiosultap standard (A), control hulled rice (B) and fortified hulled rice extract (C) at 0.5 mg kg^{-1} , respectively.

Table 3. Limit of quantification (LOQ) and recoveries of thiosultap in hulled rice

Sample	Concentration fortified (mg kg^{-1})	Recovery ^{a)} (%)	LOQ (mg kg^{-1})
Hulled rice	0.5	100.8 ± 6.1	0.05
	2.5	96.1 ± 7.9	

a) Mean of triplicate determinations.

회수율 모두 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 2009년 식품의약품안전평가원 ‘잔류농약 안전

성평가 및 정밀분석체계 연구'의 연구비 지원으로 수행된 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Chiba S. and Y. Nagawa (1971) Effects of nereistoxin and its derivatives on the spinal cord and motor nerve terminals. *Japanese Journal of Pharmacology*, 21:175~184.
- e-Pesticide Manual, (2007) BCPC (British Crop Production Council). <http://www.agropages.com/database.htm>.
- Ferrer I. and E. M. Thurman (2007) Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1175: 24~37.
- Inoue M. and A. Yamamoto (1986) An analytical method of bensultap residues in crops and soils. *Journal of Pesticide Science*, 11:547~555.
- Mezcua M., O. Malato, J. F. García-Reyes, A. Molina-Díaz and A. R. Fernández-Alba (2009) Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81:913~929.
- Nguyen T. D., K. J. Lee, M. H. Lee and G. H. Lee (2009) A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, Online published.
- Sattelle D. B., I. D. Harrow, J. A. David, M. Pelhate and J. J. Callec (1985) Nereistoxin: Actions on a CNS acetylcholine receptor/ion channel in the cockroach *Periplaneta Americana*. *Journal of Experimental Biology*, 118:37~52.
- Tao C. -J., J. -Y. Hu and J. -Z. Li (2007) Determination of insecticide monosultap residues in tomato and soil by capillary gas chromatography with flame photometric detection. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 52(5):295~304.
- Xia S. J., S. S. Zhao, X. D. Wang, Q. K. Xue, H. Yan, P. Q. Zhou, E. P. Liang, C. X. Zhang and T. Xia (1995) Studies on in Vitro metabolism of 7-N,N-dimethylamino-1,2,3,4,5-pentathiocyclooctane by rat liver microsomes pretreated with phenobarbital. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51:48~56.
- 식품의약품안전평가원 (2009) 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서, p.190.

유도체화 반응에 의한 현미 중 thiosultap의 분석

최정희 · 도정아 · 윤혜정 · 박용춘 · 최동미*

식품의약품안전평가원 화학물질과

요 약 Thiosultap은 중국에서 사용되고 있는 nereistoxin계 살충제로 국내에는 등록되지 않아 중국산 농산물 수입시 잔류 농약 안전관리를 위한 시험법 마련이 시급한 실정이다. 이에 본 연구에서는 현미 중 thiosultap을 염기조건에서 nereistoxin으로 유도체화하여 GC-FPD로 분석하는 시험법을 개발하였다. 산염기 분배를 이용한 정제 조건을 확립하였으며, 확립된 시험법에 의한 정량한계와 직선성을 측정된 결과 각각 0.05 mg kg^{-1} 과 $0.995(r^2)$ 이었다. 무처리 현미에 thiosultap 0.5 와 2.5 mg kg^{-1} 을 처리하여 회수율을 측정된 결과는 $96.1 \pm 7.9 \sim 100.8 \pm 6.1\%$ 로 양호한 결과를 나타내었다.

색인어 GC-FPD, GC-MS, 현미, nereistoxin, thiosultap