

## Phosalone의 활성화과정을 통한 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase에 대한 활성 저해

임금춘<sup>2</sup> · 허장현\*<sup>1</sup> · 한대성<sup>1</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 농과대학 농화학과, <sup>2</sup>(주) 경농 경주연구소

**초록**: 유기인계 살충제인 phosalone의 활성화과정을 통한 독성발현기작에서 cytochrome P<sub>450</sub>의 역할을 조사하기 위하여 시험관 내와 생체 내 system을 이용하였다. Phosalone의 AChE와 BuChE에 대한 이분자 저해 속도상수(k)는 약 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>으로 측정되어 그 자체로는 저해력이 상당히 낮은 약제임이 관찰되었다. AChE 또는 BuChE/MFO coupling system에서는 I<sub>50</sub>값이 control에서 각각 3.7×10<sup>-6</sup>, 2.5×10<sup>-7</sup>M로 관찰되었고, cytochrome P<sub>450</sub>의 조효소인 NADPH를 첨가한 oxidase에서는 1.2×10<sup>-8</sup>과 6.0×10<sup>-9</sup>M로 나타나 약 40~300배 정도의 활성화 효과가 관찰되었다. Cytochrome P<sub>450</sub>의 특이적 저해제인 PB를 처리하였을 때 저해곡선이 control 쪽으로 이동하여 phosalone의 활성화과정에 cytochrome P<sub>450</sub>이 관여하고 있음이 확인되었다. 그러나 생체 내 실험에서 생쥐의 뇌 AChE 활성저해는 phosalone만을 투여한 경우 I<sub>50</sub>이 170 mg/kg, PB를 전처리 하였을 경우에서 42.5 mg/kg으로 나타나 PB 처리에 의하여 오히려 약 4배의 상승효과가 관찰되었으며, 쥐 혈액에서의 AChE와 BuChE 활성저해 결과는 PB 전처리가 phosalone의 저해 경향에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타나 시험관 내 실험에서의 결과와는 상이하게 나타났다(1995년 2월 7일 접수, 1995년 3월 22일 수리).

### 서 론

1980년대 초부터 국내에서 판매되기 시작하여 그 사용량이 증가하고 있는 유기인계 살충제인 phosalone은 꿀벌에 대한 해가 거의 없고 인축에 비교적 낮은 독성을 지녔으며, 곤충에 대한 선택성이 높은 특징이 있는 약제로서, 포도, 감자, 채소등의 작물 재배에서 진딧물, 깍지벌레, 고추벌레, 꿀굴나방 등의 해충 방제를 위한 살충제로 광범위하게 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup>

일반적으로 유기인계 살충제는 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)을 가수분해하는 효소인 acetylcholinesterase(AChE)를 저해하여 독성을 일으키는 것으로 알려져 있는데, 특히 phosphorothionate와 phosphorodithioate 계열의 약제들은 체내에 존재하는 mixed function oxidases(MFO)에 의하여 각각 phosphate와 phosphorothiolate로 활성화되어 독성을 발현하는 것으로 보고되어 있다.<sup>2)</sup> Phosalone의 독성에 관련된 연구는 Greenhalgh 등,<sup>3)</sup> Winter 등<sup>4)</sup>에 의한 불순물 분석 및 동정, Reddy 등<sup>5)</sup>에 의하여 보고된 phosalone에 의한 체내 혈장 glutamic oxaloacetic transaminase 등 몇몇 효소의 변화에 관한 연구, 그리고 1987년 미국 California주 Central Valley 소재 포도농원에서 일어난 phosalone에 의한 중독사고에서 이 사고의 중독자들은 심한 anti-cholinesterase 증상과 혈액 cholinesterase 저해가 관찰되었다는 California주 농무성 보고서<sup>6)</sup> 등이 있으나, phosalone이 독성을 발현하기 위하여 필요한 활성화과정에 관한 연구는 확인할 수 없었다. 본 연구에서는 phosphorodithioate계열인 phosalone이 체내에 있는 MFO에 의하여 활성화되어 AChE와

butyrylcholinesterase(BuChE)를 저해하는 독성기작을 시험관 내(*in vitro*) ChE/MFO coupling system과 쥐 뇌와 혈액 중의 AChE 또는 BuChE를 이용한 생체 내(*in vivo*) system을 사용하여 살펴 보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

##### 1) Phosalone의 정제

(주) 경농으로 부터 입수한 phosalone 원재 [O,O-die-thyl-s-(6-chloro-2-oxobenzoxazoliny)l methyl phosphorodithioate, 94.4%]를 silica gel 50 g이 충전된 크로마토그래프용 칼럼(내경 3 cm)을 이용하여 hexane: ethyl acetate(3:1)로 정제하였다. 정제된 phosalone은 분석용 TLC(Silica gel F<sub>254</sub>, 0.25 mm thickness, Merck Co., German)상에서 phosalone 위치를 palladium chloride 용액(Aldrich Chem. Co., U.S.A.)으로 발색시켜 확인하였다. 정제 phosalone을 각각 CDCl<sub>3</sub>와 acetone에 녹여 <sup>1</sup>H-NMR(Jemini-200, Varian Co., U.S.A)과 GC/MS(Finnigan-Tracer, U.S.A)를 사용하여 분자구조를 확인하였다.

##### 2) 공시 동물

생쥐(ICR계 mouse, 18~20 g)와, 쥐(SD계 rat, 150~180 g)의 수컷을 (주) 고려 실험동물개발에서 구입하여 2~3 일 동안 실험실에서 순화시킨 다음 사용하였다.

#### 실험 방법

1) AChE 및 BuChE에 대한 이분자 저해 속도상수(k) 측정<sup>7,8)</sup>

찾는말: 유기인계 살충제, Phosalone, acetylcholinesterase 저해, 독성, 활성화  
\*연락처자

Ellman(1961) 분석방법<sup>9)</sup>으로 5 ml 시험관에 electric eel AChE 또는 horse serum BuChE(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 4 units와 phosalone( $6.7 \times 10^{-4} \sim 1.67 \times 10^{-7}$  M)을 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.6) 3 ml에 녹인 후, 항온수조(37°C)에서 반응 시켰다. 기질인 0.1 M acetylthiocholine(ASCh) 또는 butyrylthiocholine(BuSCh) (Sigma Chem. Co., U. S. A.) 용액 0.1 ml와 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB, Sigma Chem. Co., U.S.A.) 용액 [DTNB 13.2 mg, NaHCO<sub>3</sub> 5 mg, 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.6)] 2.8 ml가 담겨진 cuvette에 반응혼합액 0.1 ml를 넣고 2분 간격으로 UV-visible 분광도계(Model U-3210, Hitachi Co., Japan)로 412 nm에서 활성도를 측정하였으며, Aldridge(1950) 방법<sup>10)</sup>으로 phosalone의 AChE, BuChE에 대한  $k_i$  값을 계산 하였다.

$$k_i = \frac{\ln A_0/A_t}{[I]_t}$$

$A_0$ : 초기 효소의 활성

$A_t$ : t시간 후의 효소의 활성

[I]: 저해제의 농도

2) AChE 및 BuChE/MFO coupling system을 이용한 활성화 효과<sup>11,12)</sup>

생쥐의 간으로부터 Hur 등(1992)의 방법<sup>12)</sup>으로 microsomes을 추출한 후에, Bradford(1976)방법<sup>13)</sup>으로 단백질 정량을 하였다. Cytochrome P<sub>450</sub>을 함유한 microsomal protein 0.1 mg과 보조인자인  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH, Sigma Chem. Co., U.S.A.) (0 또는 2  $\mu$ mole), cytochrome P<sub>450</sub>의 저해제인 piperonyl butoxide(PB, Fluka Chemie AG, Switzerland) (0 또는 3  $\mu$ mole), phosalone( $10^{-8} \sim 10^{-4}$  M), AChE 또는 BuChE 4 units을 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.6) 3 ml에 녹여 37°C에서 30분간 항온반응 시킨 후, Ellman(1961) 방법<sup>9)</sup>을 이용하여 AChE 또는 BuChE의 활성 저해정도를 측정하였다.

3) 생쥐 뇌 AChE 활성저해<sup>7)</sup>

생쥐 뇌 AChE의 활성저해를 관찰하기 위하여 Phosalone을 propylene glycol에 녹여 생쥐(18~20 g, 수컷)에 0, 50, 100, 150, 200 mg/kg을 투여한 다음, 2시간 후 생쥐의 뇌를 적출하였다. PB 효과를 관찰하기 위하여 PB 200 mg/kg을 propylene glycol에 녹여 phosalone 투여 1시간 전에 복강투여를 하였다. 뇌 100 mg당 0.1 sodium phosphate 완충용액(pH 7.6) 1 ml를 넣고 homogenizer로 마쇄하였다. 냉동원심분리기(한일기기, 한국)를 사용하여 2,000 g에서 15분간 원심분리를 한 후, 상정액을 취하여 Bradford(1976) 방법<sup>13)</sup>으로 단백질 함량을 정량하였고, 단백질 2 mg에 해당하는 상정액을 취하여 Ellman(1961) 방법<sup>9)</sup>으로 뇌 AChE에 대한 I<sub>50</sub> 값을 측정하였다.

4) 쥐 혈액의 적혈구 AChE와 혈장 BuChE의 활성 저해<sup>7,12)</sup>

Phosalone을 propylene glycol에 녹인 후, 쥐에 각각 150 mg/kg씩 복강투여하였다. 0, 5, 15, 30분 그리고 1, 2, 4, 8, 12, 24시간 후 꼬리 정맥에서 Heparinized micropipette(44.7  $\mu$ l)으로 혈액을 취하여 냉동 원심분리기(Beckman Co.) 2,000 g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 혈장(상등액)중 20  $\mu$ l를 취하여 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.6)로 최종부피 1 ml로 한 후, BuChE 활성 측정시료로 사용하였다. 적혈구(침전물)에 0.1 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.6) 1 ml를 넣고 원심분리하여 잔여 혈장을 제거하고, 다시 pellets에 2% Triton X-100 (Sigma Chem. Co., U.S.A.) 용액 100  $\mu$ l를 넣고 교반을 한 다음에 0.1 M sodium phosphate 완충용액 2 ml로 희석하여 AChE 활성측정을 위한 시료로 사용하였다. AChE 또는 BuChE에 대한 활성 저해 측정은 Ellman(1961) 방법<sup>9)</sup>을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### AChE, BuChE에 대한 이분자 저해 속도상수( $k_i$ )

Phosalone의 AChE에 대한 저해력을 보기 위하여 이분자 저해 속도상수( $k_i$ )를 측정하였다. 이분자 저해속도 상수( $k_i$ )는 저해제 농도  $6.7 \times 10^{-4}$  M에서  $2.0 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,  $6.7 \times 10^{-5}$  M에서  $4.0 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>으로 나타나 평균  $3.0 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> 측정되었다. BuChE에 대한 Phosalone의  $k_i$  값은  $1.67 \times 10^{-3}$  M에서  $1.5 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,  $8.0 \times 10^{-4}$  M에서  $1.8 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>으로 평균  $1.7 \times 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>이었다. 실험결과 공시약제인 phosalone에 의한 두 cholinesterases간의 뚜렷한 저해속도의 차이는 관찰되지 않았다. 관찰된  $k_i$  값  $\sim 10^2$  M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>은 phosalone 자체로는 해당 효소들에 대한 저해제로서의 능력이 거의 없는 낮은 값을 나타내는 것이며, 결국 이 약제가 다른 thiono계 유기인계 살충제에서처럼 체내에서 활성화과정<sup>2)</sup>을 통하여 저해력이 강한 대사물질로 전환됨으로써 독성을 일으키는 것으로 사료되었다.

### AChE, BuChE/MFO coupling system에서의 활성화 효과

Phosalone의 AChE에 대한 저해곡선에서 측정된 I<sub>50</sub>는 control에서  $3.7 \times 10^{-6}$  M, NADPH를 첨가하여 cytochrome P<sub>450</sub>의 기능이 완전한 system인 oxidase에서  $1.2 \times 10^{-8}$  M로 약 300배 정도의 활성화 효과가 관찰되었다(Fig. 1). 이것은 phosalone이 cytochrome P<sub>450</sub>에 의하여 산화되어 아마도 phosalone-oxon으로 전환되고, 이 전환된 산화물이 AChE를 강하게 저해하는 것으로 설명할 수 있었다. 더우기 cytochrome P<sub>450</sub>의 저해제인 PB를 oxidase system에 첨가하였을 때 활성화 효과가 급격히 감소되어 I<sub>50</sub>값이 약  $10^{-6}$  M로 즉, control에서와 유사하게 관찰되었는데, 이로서 phosalone의 독성발현에 cytochrome P<sub>450</sub>이 상당히 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

BuChE에 대한 phosalone의 I<sub>50</sub>는 control에서  $2.5 \times 10^{-7}$  M, oxidase에서  $6.0 \times 10^{-9}$  M로 나타나 약 40배 정도의

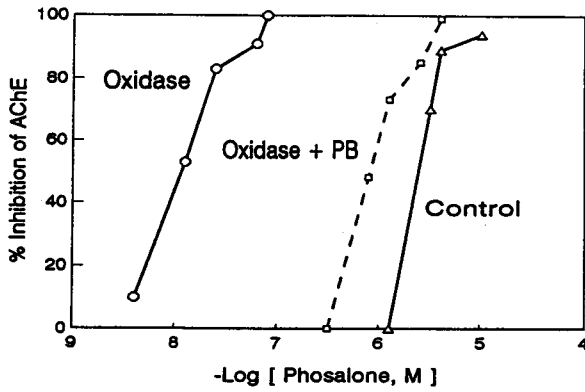


Fig. 1. Bioactivation effect of phosalone in AChE/MFO coupling system. PB(3  $\mu$ mole) was added to the microsomes(0.1 mg protein) for 10 minutes before phosalone addition. The PB alone did not inhibit electric eel AChE(4 units) in the presence or absence of NADPH(3  $\mu$ mole). At 30 minutes(37°C) after phosalone addition, 100  $\mu$ l of mixture was assayed directly for AChE activity. Controls received acetone alone.

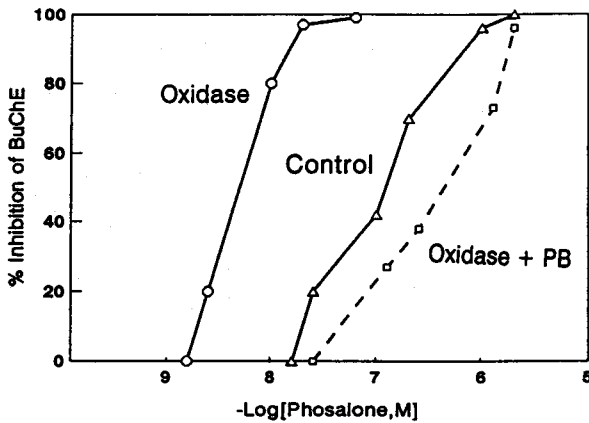


Fig. 2. Bioactivation effect of phosalone in BuChE/MFO coupling system. Experimental conditions were the same as those described in Fig. 1., except using horse serum BuChE instead of AChE.

활성화 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이 oxidase에 PB를 첨가하였을 때  $I_{50}$  값이  $8.0 \times 10^{-7} M$ 로 측정되어 AChE에서와 같이 phosalone이 동일한 활성화 과정을 거쳐 BuChE에 대하여 독성을 발현하는 것으로 보여졌다.

**생쥐의 뇌 AChE 활성화저해**

공시동물인 생쥐에게 phosalone 0, 50, 100, 150, 200 mg/kg을 투여한 후, 저해된 뇌 AChE의 활성을 측정하였다. Phosalone의 활성화에 주된 효소계인 cytochrome P<sub>450</sub>의 활성을 저해하였을 경우의 영향을 비교하기 위하여 cytochrome P<sub>450</sub> 저해제인 PB(200 mg/kg)를 약제투여 1시간 전에 전 처리하였다. 생쥐의 뇌 AChE 활성화저해곡선은 PB를 전 처리한 후, phosalone을 투여하였을 경우가 phosalone만을 투여하였을 경우에서 보다 저해효과가 증가하였음을 보였다(Fig. 3). 생쥐의 뇌 AChE

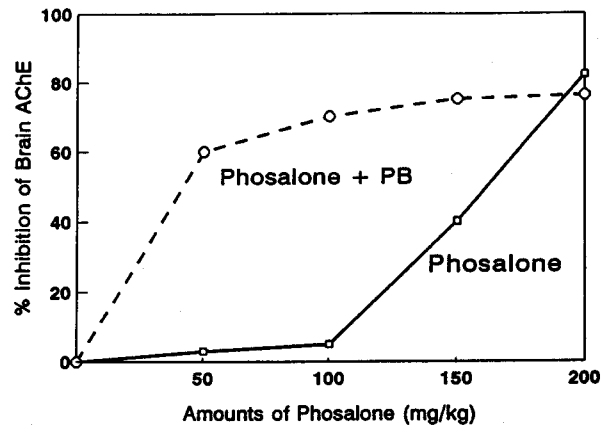


Fig. 3. Inhibition of mouse brain AChE by phosalone. White mice were treated PB(200 mg/kg) 1 hour before being challenged with phosalone administered intraperitoneally in 25  $\mu$ l of propylene glycol; controls received the solvent alone. Brain AChE activity was determined 2 hours after the challenge.

활성 저해곡선으로 부터 측정된  $I_{50}$  값을 비교하면 phosalone만을 투여한 경우에서 170 mg/kg, PB 전처리하고, phosalone을 투여한 경우에는 42.5 mg/kg으로 나타났으며, PB 전처리로 인하여 약 4배의 상승효과가 관찰되었다. 이는 cytochrome P<sub>450</sub>에 의한 phosalone의 활성화 과정이 뚜렷하게 관찰된 시험관 내 coupling system을 이용한 실험결과와는 상이함을 보여주는 것이었다.

**쥐 혈액의 AChE, BuChE 활성 저해**

약제 투여를 한 후, 시간의 경과에 따라 적혈구 AChE의 활성 저해경향을 살펴 본 결과, 4시간 후에 가장 심하게 활성 저해가 나타났다. 약제 처리전의 적혈구 AChE의 활성에 비교하여 약 52%의 활성 저해가 관찰되었으며, 4시간 이후부터는 완만한 속도로 효소의 활성이 회복되었다(Fig. 4). 협력제인 PB를 전처리하였을 경우에도 phosalone만을 처리하였을 경우의 저해곡선과 거의 유사한 경향을 보였는데, 이는 생체 내에서 PB가 phosalone의 AChE 활성 저해에 미치는 영향이 크지 않음을 보여주는 것이었다.

Plasma BuChE의 경우도 적혈구 AChE와 비슷하게 약제 투여 4시간 후, 가장 심한 활성 저해를 보였으며 58%의 활성 저해를 나타냈다(Fig. 5). 약제투여 후 4시간 이후 부터는 두 효소의 활성이 완만한 속도로 회복되었으며, 24시간이 지난 이후에는 효소활성의 20~30% 정도의 저해가 관찰되었다. 적혈구 AChE의 경우에서와 마찬가지로 PB를 전처리 하였을 때 관찰된 혈장 BuChE 활성저해 경향이 phosalone 단독처리 경우와 크게 상이하지 않았다.

본 실험에서도 생쥐의 뇌 AChE 활성화저해 결과에서와 마찬가지로 생체 내에서의 PB 효과가 시험관 내에서 AChE 또는 BuChE/MFO coupling system을 이용한 활성화 과정 실험에서 관찰된 결과와는 상당히 다르게 나타남을 볼 수 있었다.

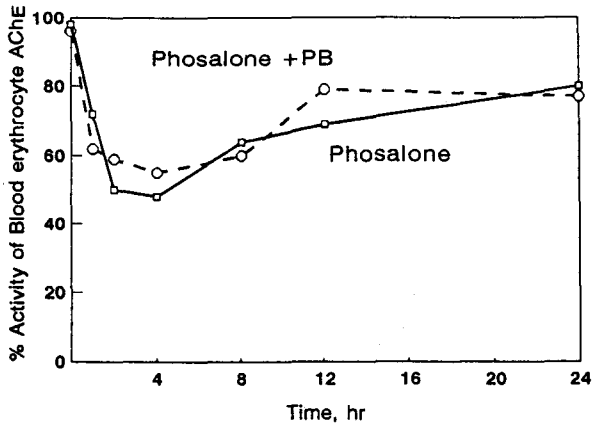


Fig. 4. Inhibition of rat blood erythrocyte AChE activity by phosalone. Phosalone was administered intraperitoneally at 150 mg/kg, or some cases, at this dose 1 hour after the rats were treated intraperitoneally with PB at 200 mg/kg. Blood samples (44.7  $\mu$ l) were taken from a tail vein using a heparinized micropipet.

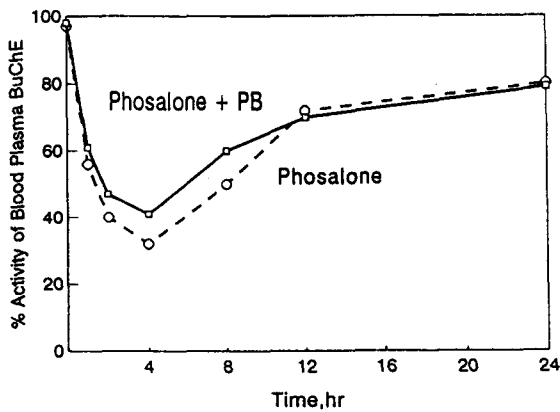


Fig. 5. Inhibition of rat plasma BuChE activity by phosalone. Experimental procedure was the same as described in Fig. 4.

#### 시험관 내와 생체 내에서의 활성저해 비교

이상의 결과로부터 시험관 내 AChE/MFO coupling system에서는 PB처리시 cytochrome P<sub>450</sub>의 활성이 저해되어 활성화과정을 통한 AChE의 저해가 일어나지 않은 반면, 생체 내 쥐 뇌 AChE저해 실험에서는 PB전처리에 의하여 오히려 저해가 증가하는 모순된 경향을 보임을 관찰할 수 있었다.

일반적으로 체내에서 농약 대사에 관여하는 효소계들이 약제의 활성화과정에만 참여하는 것이 아니라 무독화 과정에도 참여를 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 cytochrome P<sub>450</sub>은 강력한 산화력으로 일부 농약을 활성화시켜 독성강화를 유도하는 작용을 하는 동시에 약제를 무독화시키는 효소계로 알려져 있다. 예를 들어 parathion이 시험관 내 AChE/MFO coupling system에서는 NADPH와 PB처리를 통하여 cytochrome P<sub>450</sub>이 활성화에 참여하는 것이 확인되었지만, 생체 내 실험에서는 오히려 PB 전처리가 parathion의 독성을 증가시

키는 것으로 보고되었다.<sup>2,11,14</sup> 제초제로 사용되는 S,S,S-tributyl phosphorotrithioate(DEF)는 분자내 thioalkyl기가 cytochrome P<sub>450</sub>에 의하여 sulfoxide 또는 sulfone으로 전환되어 활성화되는 반면, 같은 효소계에 의하여  $\alpha$ -탄소 hydroxylation 즉, 무독화과정도 동시에 진행이 될 수 있는데, 이 약제 역시 PB 효과에 대한 시험관 내 AChE/MFO coupling system과 생체 내 쥐 혈액 AChE, BuChE의 저해 실험 결과가 모순되게 관찰되었다고 보고되었다.<sup>12</sup>

본 실험을 통하여 생체 내 실험의 PB 효과에 대한 결과들이 시험관 내 실험의 AChE 또는 BuChE/MFO coupling system을 이용한 활성화 과정 실험에서 관찰된 현저한 PB 효과와는 상반되는 결과를 보였는데, 이는 parathion과 DEF에 대한 연구결과에서 보여준 경향과 유사한 것이었다. 이것은 cytochrome P<sub>450</sub> 산화효소계의 기능이 강조된 시험관 내 coupling system에서는 phosalone이 산화효소에 의하여 phosalone-oxon으로 전환되면서 AChE 또는 BuChE의 활성을 강하게 저해하는 것으로 보여졌으며, 이러한 활성화 과정은 phosalone의 k<sub>i</sub>값을 기초하여 볼때 약제의 독성발현을 위하여 필수적인 것으로 생각되었다. 그러나 생체 내에서 PB처리시 쥐의 혈액 ChE의 저해 경향이 별로 영향을 받지 않은 점이나 쥐의 뇌 AChE의 활성이 오히려 저해된 것은, cytochrome P<sub>450</sub> 산화효소계 중 활성화에 관여하는 isozyme들이 PB에 의하여 영향을 받지 않았거나, 오히려 유도되었기 때문인 것으로, 또는 무독화에 참여하는 일부 isozyme들이 PB에 의하여 저해를 받은 것 때문이라는 가정을 할 수 있었다.<sup>15</sup> 더우기 생체 내에서는 cytochrome P<sub>450</sub> 이외에 esterases, glutathione 등의 농약 대사에 참여하는 다른 효소들이 phosalone의 활성화와 무독화과정에 복합적으로 작용할 수 있기 때문에, 시험관 내 실험에서처럼 PB 효과를 명료하게 설명하는데 어려움이 있었다. 생체 내에서의 복잡한 대사과정을 보다 합리적으로 예측하고 이해하기 위해서는 효율적이면서도 간편한 시험관 내 모형계들을 개발하기 위한 지속적이고 체계적인 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

#### 감사의 글

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

#### 참고 문헌

1. 농약공업협회 (1994) '93 농약사용지침서. 427-429.
2. Eto, M. (1974) Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry, C.R.C. Press, Cleveland, OH. 158-192.
3. Greenhalgh, R., B. A. Blackwell, C. M. Preston and W. J. Murray (1983) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analysis of technical organophosphorus insecticides for toxic contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 31, 710-713.
4. Winter, C. K. and A. D. Jones (1991) Artifact formation

- in the GC/MS analysis of Zolone EC(Phosalone) insecticide formulation. *J. Agric. Food Chem.* **39**(6), 1113-1117.
5. Reddy, S. J., D. C. Reddy, V. Kalarani and R. Ramamurthi (1989) Chronic toxicity of phosalone to rats: effect on erythropoiesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 893-898.
  6. O'Malley, M. (1988) Priority Investigations Involving Phosalone in Fresno and Madera Counties, 1987; Workers Health and Safety Branch Publication HS-1487; California Department of Food Agriculture. Sacramento.
  7. Armstrong, D. J. (1984) Synthesis, Resolution, Toxicity, and Possible Mode of Action of Some Simple O,S-Dialkyl Phosphonothioates, Ph. D. Dissertation, University of California, Riverside, 26-48.
  8. 허장현, T. R. Fukuto, 한대성 (1991) 화학적, 대사적 산화 반응 중 생성되는 S-oxide를 이용한 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)의 독성기작에 관한 연구. *한국환경농학회지* **10**(2), 167-177.
  9. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress, and R. M. Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88.
  10. Aldridge, W. N. (1950) Some properties of specific cholinesterases with particular reference to mechanism(E605) and analogues. *J. Biochem.* **46**, 451.
  11. Wing, K. D., Glickman, A. H. and Casida, J. E. (1983) Oxidative bioactivation and S-alkyl phosphorothiolate pesticides; Stereospecificity of Profenofos insecticide activation. *Science* **219**, 63-65.
  12. Hur, J. H., S. Y. Wu, and J. E. Casida (1992) Oxidative chemistry and toxicology of S,S,S-tributyl phosphorotri-thioate(DEF Defoliant). *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1703-1709.
  13. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
  14. Nakatsugawa, T., N. M. Tolman and O. A. Dahm (1968) Degradation and activation of parathion analogs by microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1517-1528.
  15. Lewandowski, M., Y. C. Chui, P. E. Levi and E. Hodgson (1990) Differences in induction of hepatic cytochrome P<sub>450</sub> isozymes by mice in eight methylenedioxyphenyl compounds. *J. Biochem. Toxicol.* **5**, 47-55.

#### Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Phosalone via Bioactivation

Geum Choon Lim<sup>2</sup>, Jang-Hyun Hur<sup>1\*</sup> and Dae-Sung Han<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kangweon National University, Chuncheon, 200-701, Korea, <sup>2</sup>Kyungju institute, Kyungnong Corp., Kyungju, 780-110, Korea)

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate a role of cytochrome P<sub>450</sub> for the toxicity of the phosalone in *in vitro* and *in vivo* bioactivation systems. The bimolecular inhibition rate constants(k<sub>i</sub>) of the phosalone to acetylcholinesterase(AChE) and butyrylcholinesterase(BuChE) were approximately 10<sup>2</sup>M<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, respectively, which meant a poor inhibitor. The potency of the phosalone as an inhibitor of AChE and BuChE was increased about 300 and 40 fold, respectively, when the inhibitor and the ChE were incubated with microsomes fortified with NADPH compared with microsome alone. Piperonyl butoxide(PB) addition to these coupled systems greatly reduced the inhibition of both target enzymes by blocking a bioactivation process. The I<sub>50</sub> value of the Phosalone alone for rat brain AChE was 170 mg/kg. When PB was pretreated, that value was altered to 42.5 mg/kg. PB pretreatment synergized the inhibition of brain AChE with four times. Rat blood erythrocyte AChE and plasma BuChE were similarly inhibited *in vivo* by the phosalone and PB pretreatment didn't affect significantly the pattern of the inhibition. The *in vivo* studies showed different results in the role of cytochrome P<sub>450</sub> from those of the *in vitro* studies.

\*Corresponding author