

## 생쥐에서 Cytochrome P-450 효소계에 의한 $\alpha$ -Endosulfan의 시험관내 대사시험

김인선 · 이강봉 · 심재한 · 서용택\*

전남대학교 농화학과

**초록** : 생쥐(*Balb/C*) 간과 신장의 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의한  $\alpha$ -endosulfan의 시험관내 대사시험을 수행하였다.  $\alpha$ -Endosulfan은 endosulfan lactone(EL), endosulfan hydroxyether(EHE), endosulfan alcohol(EA), endosulfan sulfate(ES), endosulfan ether(EE) 그리고  $\beta$ -endosulfan( $\beta$ -E) 등으로 대사되었으며 주요 대사산물은 간에서 EL(13.2 %) 및 EA(11.5 %)이었으며 신장에서 EA(17.4%) 및 EHE(19.3%)이었다. Microsome 배양액중 유기용매 추출성 대사산물은 63.4%이었으며 수용성 대사산물은 37.1%이었다. 수용성 대사산물은 EA(83.9 %), EHE(4.5%) 그리고 ES(2.3%)로서 주요 수용성 대사산물은 EA이었다. Piperonyl butoxide는  $\alpha$ -endosulfan으로부터 EE의 생성을 86%, EA의 생성을 92% 그리고 EHE, EL 및 ES의 생성을 대부분 저해하였다(1995년 9월 19일 접수, 1995년 10월 16일 수리).

### 서 론

동식물체내에서 농약의 해독 및 분해에 관여하는 효소계로는 가수분해반응을 하는 esterase와 산화 및 환원시키는 mixed function oxidase(MFO)계가 있다. Cytochrome P-450 효소계는 이에 관련된 중요한 해독효소계의 하나로서 주로 산화반응에 관여하며 간의 microsome에 국재한다. Cytochrome P-450 효소계에 의한 일련의 대사반응들은 aryl 및 aromatic dealkylation 반응,<sup>1)</sup> epoxidation 반응<sup>2)</sup> 그리고 desulfuration 반응<sup>3,4)</sup> 등이 대표적이다. 이들 반응들은 체내에 유입된 약제의 구조를 수용성이 증가된 형태로 대사시켜 약제가 체내에서 쉽게 제거되게 함으로서 약제의 해독 및 분해에 관여한다. 농약의 독성이 모화합물에서 뿐만 아니라 효소계에 의해 활성화된 대사산물에 있다고 볼 때 농약의 독성적 평가를 위해서는 그 분해산물의 규명 또한 매우 중요하다고 할 수 있다. 대사산물이 독성을 발휘하는 경우에 있어서 cytochrome P-450 효소계의 mixed function oxidase(MFO)에 의해 약제의 모화합물이 활성화되어 선택적 독성이 더욱 증가된 경우도 많다.<sup>5-8)</sup> 대사 산물의 규명을 통한 약제의 독성을 평가하는 방법으로 체내에 존재하는 효소계와 유사한 조건에서 실시하는 시험관내 (*in vitro*)시험이 많이 이용되고 있다.<sup>9-11)</sup> Cytochrome P-450 효소계에 의한 약제의 대사시험에서 이러한 실험도 실험동물에서 적출한 간의 microsome을 이용하여 적절한 환원체계를 구성함으로써 수행할 수 있다. 또 Cytochrome P-450 효소계는 piperonyl butoxide나 aminobenzotriazole 같은 저해제<sup>12)</sup>에 의해 효소활성이 저해되므로 이 효소계에 의한 분해산물이 약제의 독성적 특성에 관여하는지를 쉽게 알 수 있다. 이와같이 시험관내 대

사시험은 약제의 분해에 있어 혼합된 효소체계가 아니라 선택된 효소체계에 한정되므로 약제의 독성평가에 매우 유용하다.

본 실험의 공시약제 endosulfan은 포유류보다 어류에서 독성이 강한 약제로서 최근에 어류에서는 대사산물의 연구를 통해 독성적 평가가 일부 진행되어 왔으나<sup>13,14)</sup> 포유류에서는 이러한 평가가 미비한 실정이다. 이에 본 실험에서는 mixed function oxidase(MFO)의 cytochrome P-450 효소계에 의한 endosulfan의 시험관내 대사시험을 통해 이 약제에 대한 독성적 평가에 도움을 주고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

<sup>14</sup>C- $\alpha$ -endosulfan(2.96 MBq/mg)은 International Isotopes Munich(Germany)에서 구입하여 TLC scanner 상에서 순도 99% 이상임을 확인하여 사용하였으며 비표지  $\alpha$ -endosulfan의 표준품(96% up)은 농약연구소에서 분양받아 사용하였다. Glucose-6-phosphate(G-6-P), G-6-P dehydrogenase (G-6-P DH) 및 NADP, glycerol, piperonyl butoxide,  $\beta$ -glucuronidase(Type X-A, sulfatase 및 phosphatase 활성 함유) 그리고 Florisil 등은 Sigma(USA)제품을, silica gel과 TLC(thin layer chromatography) plate는 Merck(Germany) 제품을, 그밖의 시약은 Junsei(Japan) 특급을, 용매들은 HPLC용 용매 및 농약잔류분석용을 사용하였다. Endosulfan의 대사산물은 이<sup>13)</sup>로부터 합성되어 GC/MS, IR 및 NMR로 그 구조가 확인된 것을 사용하였고 endosulfan sulfate 만은 Supelco(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

찾는말 : Endosulfan, *In vitro* metabolism, Microsomal cytochrome P-450 monooxygenase, Piperonyl butoxide(PB).

\*연락처

## 사용기기

$^{63}\text{Ni}$ -ECD가 장착된 GLC(gas liquid chromatograph, Shimadzu 14B series, Japan), HPLC(high performance liquid chromatograph, Waters 510, USA), LSC(liquid scintillation counter, LKB, USA), TLC autoradiograph scanner(Trace master 20, USA) 등이었다.

## 방법

### (1) Microsome의 조제

전남대학교 수의과 대학에서 분양 받아 실험실 조건으로 2주 이상 순화시킨 공시동물(Balb/c male mouse, 4주령, 20~27 g)중 상태가 양호한 것을 골라 간과 신장을 4°C 저온실에서 채취하여 김 등<sup>15)</sup>의 방법에 준하여 1 mM EDTA가 함유된 1.15% KCl 용액으로 세척한 후 동 용액 15 ml를 이용하여 glass homogenizer로 완전히 균질화시켰다. 균질액은 이중가제를 이용하여 여과한 후 10,000×g에서 10분간 원심분리한 다음 그 상정액을 다시 105,000×g에서 1시간동안 원심분리하여 microsomal pellet를 얻었다. Microsomal pellet는 1 mM EDTA가 함유된 1.15% KCl용액 3 ml로 3회 세척 후 1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산완충용액(pH 7.4)를 이용하여 microsomal 현탁액을 만들어 단백질 함량이 0.5 mg/ml가 되게 희석하여 실험에 사용하였다.

### (2) $\alpha$ -Endosulfan의 시험관내(*in vitro*) 대사시험

상기 방법에 따라 얻은 microsomal 현탁액에 김<sup>16)</sup>의 방법에 준하여 1.0 mM EDTA, 0.25 mM NADP, 2.5 mM G-6-P, 1 unit G-6-P DH가 함유된 50 mM 인산완충 용액(pH 7.4)을 가해 최종 부피를 2 ml로 맞춘 후 37°C 조건의 항온기에서 암조건으로 2분간 진탕배양시킨 다음 2  $\mu\text{l}$ 의 acetone에 함유된  $\alpha$ -endosulfan과  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -endosulfan을 각각 10  $\mu\text{g}$ 과 1.0  $\mu\text{Ci}$ 가 되게 반응액에 처리하고 대조군에는 동일한 양의 acetone만을 처리하여 잘 혼합시켜 상기 조건의 항온기에서 30분간 재배양시켰다. 배양이 끝난 후 95% 에탄올 2 ml를 가해 반응을 중지시킨 다음 10,000 rpm의 원심 분리기에서 20 분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상정액은 hexane을 이용하여 약제의 대사산물이 더이상 추출되지 않을 때까지 분배추출하였다. 분배된 유기용매층은 질소개스로 40°C 수조에서 완전 농축 후 초산완충용액에 함유된  $\beta$ -glucuronidase를 1,000 units가 되게 가해 배양액의 pH를 3.8로 맞춘 후 38°C에서 10시간 동안 진탕배양하였다. 배양이 끝난 다음 다시 hexane으로 분배 추출하여 농축후 비표지약제 처리구의 경우 정제를 하였다. 정제는 농축물을 hexane 5 ml로 재용해하여 10 g의 Florisil을 hexane 50 ml를 이용하여 습식 충전시킨 glass column(2.2 cm i.d.×50 cm length)에서 2% acetone이 함유된 hexane 200 ml로 분출시켜 실시하였다.

### (3) 대사산물의 확인

대사산물의 확인은 약제가 처리되지 않은 대조군 및 endosulfan의 대사산물의 표준품과 시료의 대사산물의 GLC column상에서의 머무름 시간을 기준으로 하였다.

분석 기기는 검출기  $^{63}\text{Ni}$ -ECD가 장착된 GLC였으며 분석용 column은 5% SE-30과 DC-200이 3:1(g/g)의 비율로 혼합 충전된 유리 column(4 mm i.d.×2 m)이었다. 분석온도는 column, injector, detector의 온도가 각각 210, 300, 300°C로서 이동상 질소개스의 유속은 52 ml/min였다. 또  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -endosulfan이 처리된 시료는 TLC 전개를 통해 TLC autoradiograph scanner로 대사산물의 생성정도를 확인하였고 TLC plate상에서 각각의 대사산물의 확인은 해당 Rf 지점을 긁어 모아 acetone으로 진탕추출한 다음 HPLC 분석을 통해서 표준품과 비교하여 수행하였다. HPLC는 Waters 510으로서 검출기는 486 tunable UV 검출기를 사용하여 UV 215 nm에서 분석하였고 이동상은 10% 초산이 함유된 70% methanol 수용액으로 그의 유속은 1.7 ml/min이었다. 분석 column은 Waters  $\mu$ -Bondapak C-18(3.9  $\mu\text{m}$  thickness×300 mm length) stainless column이었다. 또 사용한 TLC plate는 silica gel 피복 alumina TLC plate로서 사용전에 130°C에서 15분간 활성화시킨 후 desiccator에서 실온까지 냉각시켜 사용하였다. TLC 전개는 30±2°C 온도조건에서 heptane/benzene(1:1, v/v)의 용매계로 수행하였다. 한편 수용액층은 비표지약제 처리구의 경우 시료용매가 모두 제거될 때 까지 질소 농축한 다음 초산완충용액에 함유된  $\beta$ -glucuronidase를 1,000 units가 되게 배양액에 가해 pH 3.8로 맞춘 후 38°C에서 16 시간 동안 진탕배양하였다. 배양이 끝난 후 ethyl acetate 3 ml로 3회 분배추출하여 분배된 유기용매층은 질소 농축한 다음 상기조건의 HPLC를 이용하여 분석하였다.

### (4) Endosulfan 대사의 저해시험

Cytochrome P-450 효소계에 의한  $\alpha$ -endosulfan의 대사 여부를 조사하기 위해 이 효소계의 저해제인 piperonyl butoxide를 처리하여 대사의 저해시험을 하였다. 대사 저해시험은 김<sup>16)</sup>의 방법에 준하여 상기과정에서 얻은 microsome에 최적저해 농도의 piperonyl butoxide가 함유된 30  $\mu\text{l}$ 의 에탄올을 약제처리 10분 전에 배양액에 가하여 상기 과정의 대사시험과 동일하게 실시하였다. 저해시험의 확인은 유기용매층을 상기의 기기분석 조건의 GLC 분석을 통해 약제 및 piperonyl butoxide가 함께 처리된 시료구와 약제만 처리된 대조군의 대사산물의 생성정도를 비교함으로써 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### Endosulfan의 시험관내(*in vitro*) 대사시험

생쥐의 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의한  $\alpha$ -endosulfan의 대사 실험의 autoradiogram 결과를 Fig. 1에 나타냈다. TLC plate 상에서  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -endosulfan( $\alpha$ -E)의 Rf 지점을 긁어 모아 용매 추출 및 농축 후 다시 TLC 전개를 실시한 다음 X-ray(Fuji, Japan) film에 노출시킨 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이  $\alpha$ -E 외에도  $\beta$ -endosulfan( $\beta$ -E)와 endosulfan ether(EE)가 검출되어 TLC scanner 상에서 나타난  $\alpha$ -E와 그의 바로 근접 한 대사산물은

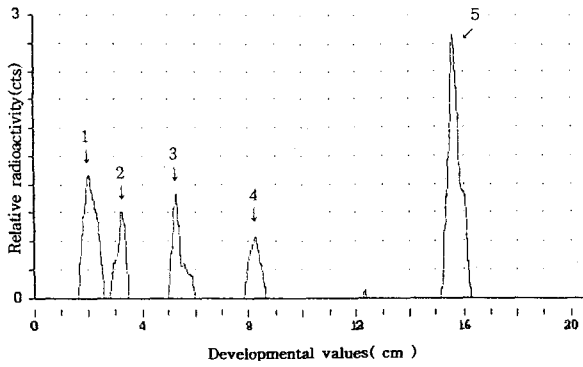


Fig. 1. TLC autoradiogram of  $^{14}\text{C}$ -endosulfan and its metabolites from *in vitro* test with mouse liver. TLC plate was developed upto 20 cm by heptane/benzene(1 : 1, v/v) solvent system. 1, endosulfan lactone(EL); 2, endosulfan hydroxyether(EHE); 3, endosulfan alcohol(EA); 4, endosulfan sulfate(ES); 5,  $\alpha$ -endosulfan( $\alpha$ -E).

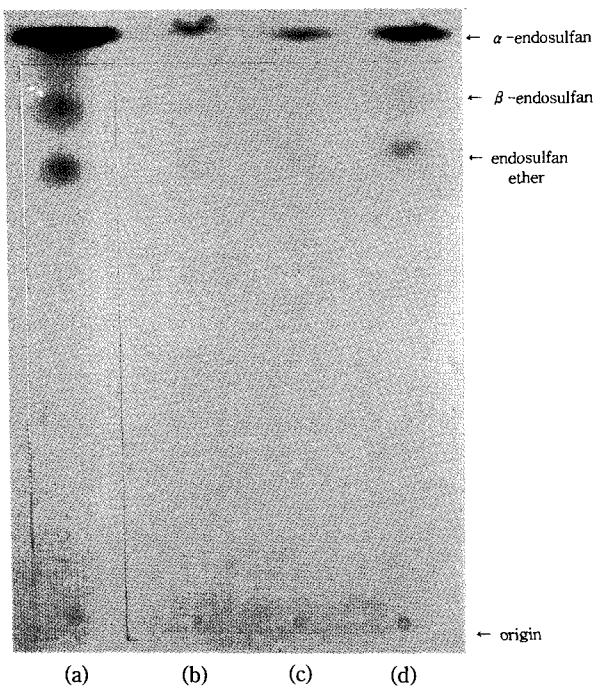


Fig. 2. Autoradiogram of  $^{14}\text{C}$ -endosulfan and its metabolites from *in vitro* test of mouse liver and kidney. The spot of 15~16 cm region on Fig. 1 was scraped and extracted with acetone then developed on TLC plate by heptane/benzene(1 : 1, v/v) and acetone/heptane(1 : 4, v/v) containing 1% acetic acid solvent system. The X-ray film was exposed for 15 days. a, kidney incubates(100  $\mu\text{l}$  spot); b, kidney incubates(10  $\mu\text{l}$  spot); c, liver incubates(10  $\mu\text{l}$  spot); d, liver incubates(100  $\mu\text{l}$  spot).

$\beta$ -E나 EE이라는 이 등<sup>14)</sup>의 보고와 일치하였다. 따라서  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -endosulfan은 TLC autoradiograph scanner 분석 결과 생쥐 간의 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의해 endosulfan lactone(EL, 13.2%), endosulfan hydroxyether(EHE, 6.8%), endosulfan alcohol(EA, 11.5%) 그리고 endosulfan sulfate(ES, 3.8%) 등으로 대사되었으며 EA와 EL이 주요 대사산물임을 알 수 있었다. 또한 생쥐 신

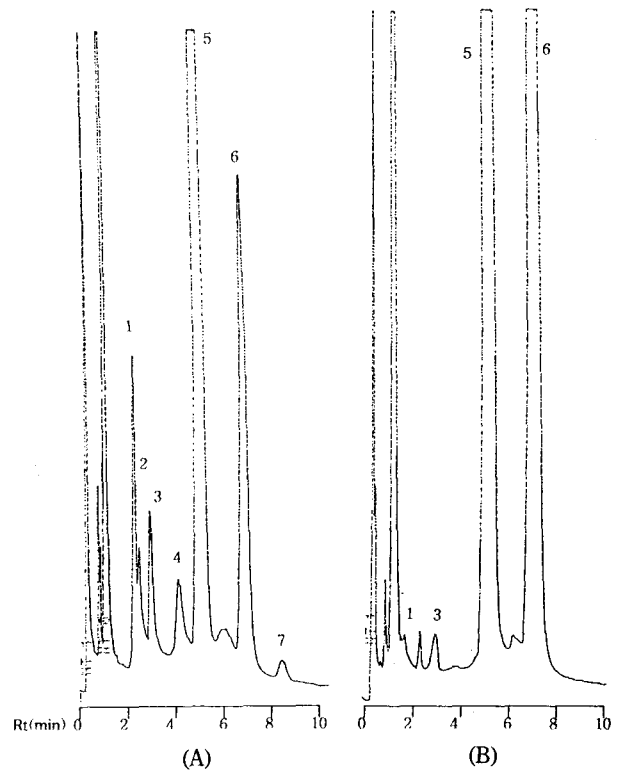


Fig. 3. GLC chromatograms of endosulfan and its metabolites from *in vitro* test with mouse liver following endosulfan treatment(A) and endosulfan+piperonyl butoxide treatment(B). 1, endosulfan ether(EE); 2, endosulfan hydroxyether(EHE); 3, endosulfan alcohol(EA); 4, endosulfan lactone(EL); 5,  $\alpha$ -endosulfan( $\alpha$ -E); 6,  $\beta$ -endosulfan( $\beta$ -E); 7, endosulfan sulfate(ES).

장의 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의해서도  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -endosulfan은 간에서의 유사하게 대사되었는데 EHE(19.3%)와 EA(7.4%)가 주요 대사산물이었다. 이러한 결과는 endosulfan이 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의해 모화합물 보다 수용성이 증가된 형태의 대사산물로 대사됨을 시사하였다.

간에서의 대사산물 생성은 신장에서 보다 전반적으로 높은 경향을 보였는데 이는 cytochrome P-450 효소계에 의한 endosulfan의 대사가 주로 간에서 이루어짐을 의미하였다. 대사산물중 EHE의 생성은 간에서 보다 신장에서 잘 이루어졌으며 이는 EHE의 생성은 간에서 보다 신장에서 빠르고 잘 이루어 진다는 Rao<sup>10)</sup>의 보고와 일치하였다.

비표지  $\alpha$ -endosulfan의 대사시험에서 대사산물중 수용성이 낮거나 비수용성 또는 microsome에 존재하는 여러 전구물질과 결합 되지 않은 대사산물을 유기용매로 더이상 추출되지 않을 때까지 분배추출하여 GLC 분석한 결과는 Fig. 3에서 보여준 것처럼 표지 endosulfan의 경우와 유사하였으며 GLC에서 대사산물의 검출 순서는 EE(14.3%), EHE(3.7%), EA(5.4%), EL(3.2%),  $\alpha$ -E(42.1%),  $\beta$ -E(25.1%) 그리고 ES(0.7%) 순으로 검출되어 이 등<sup>14)</sup>의 보고와 일치하였다.

한편 HPLC 분석에서는 Fig. 4에서 보여준 것처럼 EA,

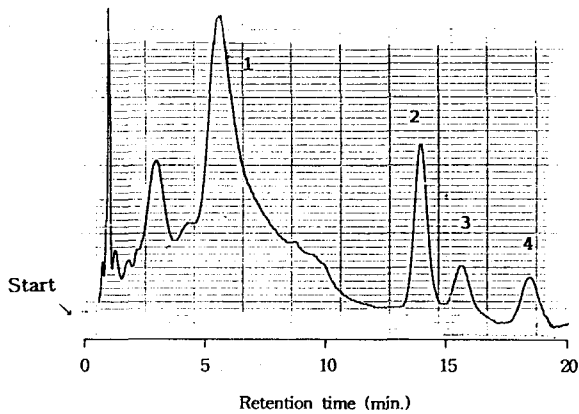


Fig. 4. HPLC chromatogram of endosulfan and its metabolites from *in vitro* test of mouse liver micorsome. The microsomal incubates was extracted with hexane and organic phase was discarded then aqueous of glucuronidase in acetate buffer(pH 3.8). 1, microsome impurities; 2, endosulfan alcohol(EA); 3, endosulfan sulfate (ES); 4, endosulfan hydroxyether(EHE).

EHE 그리고 ES 등이 대사산물로 검출되었으며 HPLC 분석을 통한 방사능( $^{14}C$ )은 분석의 전체 방사능중 EA가 83.9%, ES가 2.3% 그리고 EHE가 4.5%로 나타나 주요 수용성 대사산물은 EA이었다. 특히 EA는 HPLC 검출기에서 적용된 UV의 어느 파장에서나 다른 대사산물에 비해 높은 검출율을 보였다. 이 결과는 유기 용매 분배 추출과정에서 유기용매에 추출되는 대사산물을 더이상 추출되지 않을 때까지 추출하여 제거한 다음 glucuronidase와 산가수분해를 한 후 다시 유기용매로 추출하여 HPLC 분석을 한 결과로서 endosulfan의 수용성이 강한 대사산물이라 할 수 있는 EA 및 EHE 그리고 ES 등은 microsome내에 존재하는 전구물질들과 결합되어 존재함을 의미하였다. 이는 지속적인 가수분해 과정을 통한 유기용매 분배 추출과정 수행시에 이들 대사산물이 더욱 많이 검출되는 결과를 볼 때도 그러하였다. 특히 EA는 그의 -OH기가 glucuronic acid와 conjugation될 가능성이 높으므로 다른 대사산물에 비해 가수분해와 유기용매 분배추출과정에서 추출되지 않고 수용성인 상태로 많이 남아 있을 것으로 생각되었다. 이 등<sup>14)</sup>은 시험관내 대사시험을 통해 EA가 glucuronic acid conjugation이 됨을 밝힌 바 있으며 본 실험의 결과도 이와 유사하였다. 이들 대사산물은 glucuronidase 첨가시 보다 산가수분해시에 검출정도가 2.3배 높음을 볼 때 충분한 산가수분해 과정을 통해 수용성 대사산물이 microsome내의 전구물질과 결합이 깨질 수 있음을 시사하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때  $\alpha$ -endosulfan은 생쥐의 cytochrome P-450 효소계에 의해 EL, EHE, EA, ES, EE 그리고  $\beta$ -E 등으로 대사됨을 알 수 있었으며 주요 대사산물은 EA, EHE 및 EL 등이었다. 이를 통해 시험관내 대사시험에서  $\alpha$ -endosulfan의 대사경로는  $\alpha$ -E의 C-O 결합 부위에서 sulfite 잔기의 회전에 따른 새로운 형태의 C-O 결합으로  $\alpha$ -E의  $\beta$ -E로의 상호 입체적인

변환,  $\alpha$ -E의 가장 적절한 대사방법으로 가수분해 반응을 통한 EA로의 대사, cytochrome P-450 효소계에 의한  $\alpha$ -E 및  $\beta$ -E의 ES로의 대사 그리고 EA의 EE 및 EL로의 대사 등 일 것으로 생각되었다. 본 실험에서 ES와 EA를 대사시험에 사용하여 대사산물을 규명해 본 결과 ES의  $\alpha$ -E 및 EA로의 대사는 보였으나  $\beta$ -E로의 대사는 보이지 않아 ES는  $\alpha$ -E에서 대사될 수 있음을 알 수 있었다. 또 EA의 경우 EE로의 대사는 매우 빨랐고 EHE 및 EL의 생성이 점점 증가함을 보였다. 이러한 결과는 EA  $\rightarrow$  EE  $\rightarrow$  EHE  $\rightarrow$  EL과 같은 대사과정이 가능하리라 생각되었다. Endosulfan의 전반적인 대사과정을 볼 때 가수분해에 의한 EA의 생성이 가장 적절할 것이라 생각되었으며 cytochrome P-450 효소계는 endosulfan의 대사과정에서 주요 역할을 하는 대사 초기보다도 대사의 각 단계에서 촉진적인 역할을 한 것으로 보였다. 한편 ES는 어류와 포유류에서 갖는 독성적 차이와 관계가 깊을 것으로 생각되었는데 이는 ES가  $\alpha$ -E와  $\beta$ -E의 대사 중간 단계에서 생길 수 있는 대사산물이라는 보고<sup>10,17)</sup>와 어류에서 대사산물로 나타나지 않는다는 보고<sup>14)</sup>를 볼 때 endosulfan의 대사산물중 주로 독성을 야기하는  $\beta$ -E의 ES로의 대사<sup>17)</sup>가 느리거나 안되어  $\beta$ -E가 체내에 축적됨에 따라 독성이 야기될 수 있다는 점에서 그러하였다.

#### Endosulfan 대사의 저해시험

생쥐에서  $\alpha$ -endosulfan의 cytochrome P-450 효소계에 의한 대사의 여부를 알아보기 위해 cytochrome P-450 효소계의 저해제인 piperonyl butoxide(PB)로 저해시켜 대사시험을 수행하였다. 저해시험 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이  $\alpha$ -endosulfan은 microsomal cytochrome P-450 효소계에 의해  $\beta$ -E, EE, EL, ES, EHE 그리고 EA 등으로 대사됨을 GLC/ECD를 통해 확인할 수 있었는데 이러한 대사산물의 생성은 PB에 의해 강력히 저해됨을 알 수 있었다. 나머지 대사산물이 GLC/ECD의 감도에서 검출 정도가 매우 낮거나 검출되지 않을 수 있다는 것을 감안할 때 PB는 EE나 EHE의 생성을 현저하게 저해함을 알 수 있었다. 한편  $\beta$ -E의 생성은 저해정도가 낮았는데 이는 endosulfan의 대사과정중  $\alpha$ -E의  $\beta$ -E로의 대사가 cytochrome P-450 효소계와 직접적인 관련이 없다는 것을 시사하였다. 대사산물의 생성 정도를 PB가 처리되지 않을 때와 비교해 볼 때 PB는 EE의 생성을 86%, EA의 생성을 92%, EHE, EL 그리고 ES의 생성들을 대부분 저해하여 PB에 의해 거의 모든 극성 대사산물의 생성이 저해됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들은  $\alpha$ -endosulfan이 cytochrome P-450 효소계에 의해 대사될 수 있음을 시사하였다.

#### 감사의 글

본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 연구비(02G 0163)의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에

감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Fonne-Pfister, R., J. Guadin, K. Kreuz, K. Ramsteiner and E. Ebert (1990) Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P-450 dependent monooxygenases system from maize. *Pestic. Biochem. Physiol.* **37**, 165-173.
2. Norio, K., H. Nobuaki and I. Reji (1984) Cytochrome P-450 content and aldrin epoxidation to dieldrin in isolated rat hepatocytes. *Pestic. Biochem. Physiol.* **21**, 63-73.
3. Patrica, E. L., M. H. Robert and H. Ernest (1988) Differences in oxidative dearylation and desulfuration of fenitrothion by cytochrome P-450 isozymes and in the subsequent inhibition of monooxygenase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **32**, 224-231.
4. Kinsler, S., P. E. Levi and E. C. Hodgson (1988) Hepatic and extrahepatic microsomal oxidation of phorate by the cytochrome P-450 and FAD-containing monooxygenase systems in the mouse. *Pestic. Biochem. Physiol.* **31**, 54-60.
5. Kulkarni, A. P. and E. C. Hodgson (1980) Metabolism of insecticides by mixed function oxidase system. *Pharmacol. Ther.* **8**, 379-384.
6. Mark, A. B., Y. C. Timmy and M. Philip (1987) Hydrolytic activation versus oxidative degradation of assert herbicide, an imidazolinone aryl-carboxylase, in susceptible wild oat wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* **27**, 24-29.
7. Nakatsugawa, T., N. M. Tolman and O. A. Dahm (1968) Degradation and activation of parathion analogs by microsomal enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1517-1528.
8. Eto, M. (1974) In "Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry", C. R. C press, Cleveland, 158-192.
9. Numan, I. T., M. Q. Hassan and S. J. Stohs (1990) Protective effects of antioxidants and lethality in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 302-306.
10. Rao, D. M. R. (1989) Studies on the relative toxicity and metabolism of endosulfan to the indian major carp Catla catla with special reference to some biochemical changes induced by the pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**, 220-229.
11. Shiddiqui, M. K. J., F. Anjum and S. H. S. Qadri (1987) Some metabolic changes induced by endosulfan in hepatic and extra hepatic tissues of rat. *J. Environ. Sci. Health* **B22** (5), 553-564.
12. Cabanne, F., D. Huly, D. Gallardan, R. Scalla and F. Durst (1987) Effects of the cytochrome P-450 inactivation 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlorotoluon and isoproturon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 371-380.
13. 이강봉, 심재한, 서용택 (1994) *In vitro* 시험에 의한 잉어 (Cyprinus carpio L.) 체내 endosulfan의 대사. 한국농화학회지 **37**, 194-202.
14. 이강봉, 심재한, 서용택 (1994) *In vivo* 시험에 의한 잉어 체내  $^{14}$ C-endosulfan의 대사. 한국농화학회지 **37**, 203-209.
15. 김인선, 이강봉, 심재한, 서용택 (1995) Endosulfan이 흰쥐 체내의 cytochrome P-450 효소계에 미치는 영향. 한국농화학회지 **38**, 168-173.
16. 김인선 (1995) Endosulfan의 mouse(Balb C.) 체내 대사와 cytochrome P-450 효소계에 미치는 영향. 전남대학교 석사학위 논문.
17. Naiter, M. C. and A. M. Mahtout (1977) Metabolism of endosulfan I, endosulfan II and endosulfan sulfate in tobacco leaf. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 32-35.

#### **In Vitro Metabolism Study of $\alpha$ -Endosulfan with Microsomal Cytochrome P-450 Monooxygenase System in Mouse**

In-Seon, Kim, Kang-Bong, Lee, Jae-Han, Shim and Yong-Tack, Suh\*(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

**Abstract:** *In vitro* metabolism study of  $\alpha$ -endosulfan by liver and kidney microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system of the mouse(Balb/C) was performed.  $\alpha$ -Endosulfan was metabolized to endosulfan lactone(EL), endosulfan hydroxyether(EHE), endosulfan alcohol(EA), endosulfan sulfate(ES), endosulfan ether(EE) and  $\beta$ -endosulfan( $\beta$ -E). The main metabolites of  $\alpha$ -endosulfan were EL(13.2%) and EA(11.5%) in liver microsome and EA(17.4%) and EHE(19.3%) in kidney microsome. The  $^{14}$ C-activity of organic extractable fraction and water soluble fraction were 63.4% and 31.7% in liver microsome incubates respectively. The water soluble metabolites were EA(83.9%), EHE(4.5%) and ES(2.3%). Piperonyl butoxide treatment inhibited the formation of EE by 86%, EA by 92% and EHE, EL and ES were barely formed.

\*Corresponding author