

## 유기인계 및 Carbamates 농약에 의한 Acetylcholinesterase 활성의 저해

김 정 호 · 김 영 호\*

경산대학교 환경학부 · 혜전전문대학 호텔제과제빵과

(1997년 10월 5일 접수)

## Inhibition of Acetylcholinesterase Activity on the Organophosphorus and Carbamate Pesticides

Jung-Ho Kim and Young-Ho Kim\*

Faculty of Environmental Science and Engineering, Kyungsan University, Kyungsan, 712-240

\*Dept. of Hotel Baking Science and Technology, Hyejeon Junior College, Honsung, 350-800

(Manuscript received 5 October 1997)

The effects of organophosphorus and carbamate pesticides were examined inhibition of the acetylcholinesterase activity in the chicken brain with enzyme - inhibition methods. The acetylcholinesterase activity in chicken brain determined by the Ellman method was 167  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein. The optimum pH of acetylcholinesterase was 8.2.  $\text{pI}_{50}$  of acetylcholinesterase by some organophosphorus were 3.80M of phosphorodithioate, 4.04M of phosphorothioate, 6.33M of phosphate, and 6.60M of phosphrothiolate.  $\text{pI}_{50}$  of acetylcholinesterase by some carbamates were 5.10M of XMC, 5.90M of carbofuran, 6.16M of isoprocarb, 6.30M of carbaryl, 6.47M of BPMC, and 6.77M of propoxur.  $\text{pI}_{50}$  of carbamates selected was similar to that of phosphorothioate and phosphate organophosphates

Key words : Acetylcholinesterase, Organophosphorus pesticides, Carbamate pesticides, Enzyme - inhibition.

### 1. 서 론

농약은 정도의 차이는 있으나 독성을 가지고 있어 잘못 사용하면 인체에 해를 주거나 환경을 오염시킬 가능성을 내포하고 있다. 따라서 생물에 유해반응을 일으키는 농약의 독성에 관한 평가방법은 그 물질에 대한 허용기준을 설정하거나 유해정도를 검토하는데 매우 중요하다.

생체내의 많은 효소들은 농약처리에 의해 영향을 받는다고 보고 되어 왔다(Matsumura, F., 1975; Sole et al., 1995; Tseng et al., 1995). 특히 신경전달계에 관련되는 acetylcholinesterase(AChE)는 유기인계 및 carbamate계 농약에 의해 저해된다. 유기인계 및 carbamate계 농약은 AChE 활성을 저해함으로써 신경기능저해제로 작용하게 된다(Eto, 1974; Kuhr et al. 1977).

Acetylcholine을 가수분해하는 효소계는 acetylcholinesterase(E. C. 3. 1. 1. 7., AChE)있다(Bergmeyer, 1984). AChE는 신경조직, 적혈구 및 근육 등에 존재하는데 신경전달물질인 acetylcholine에 기질 특이성이 있으므로 신경전달에 중요한 역할을 한다.

농약의 환경 오염을 구명하기 위해 농약의 독성작용에 관한 연구가 필요하며, 특히 AChE 활성저해에 대한 연구가 요구된다. 따라서 유기인계와 carbamate계 농약에 의한 acetylcholinesterase 활성의 저해 양상을 규명할 필요가 있다.

Schnitzerling et al.(1982)은 소의 AChE에 대한 Ki 값은 유기인계와 carbamate계의 화학 구조에 따라 다르다고 하였으며, Bracha et al.(1968)은 AChE에 대한 phosphate와 phosphorothiolate의  $I_{50}$ 값을 비교 하였는데, AChE활성 저해율이 큰 화합물 일수록 AChE의 esteratic site에 친화력이 더 크다고 하였다. 또한 Davies et al.(1983)은 rat뇌 중에서 AChE에 대한 유기인계 살충제의  $I_{50}$ 을 비교 하였다. 한편 Rrinders et al.(1983)은 병아리 뇌중 neurotoxic esterase 값을 비교 하였고, 또한 Hollebone et al. (1995)은 각종 외인성 물질이 monoxygenase효소에 미치는 영향에 관해 보고하였다.

유기인계나 carbamate계의 화학구조와 AChE 활성저해간의 관계를 연구하는 것은 이들 농약에 의한 중독 진단, 약제를 다루는 사람들의 안전기준 설정 및 환경

오염도의 측정용 지표로 이용될 수 있다. 또한 *in vitro* 조건에서 AChE 활성저해를 규명함으로써 E I (Enzyme Inhibition) 방법으로 유기인계 및 carbamate계 농약의 검출 기법에 이용 할 수 있다(유홍일 외, 1991; 정금희, 1997).

따라서 본 연구에서는 각종 유기인계와 carbamate 계의 화학구조 차이에 따른 AChE 활성 저해와의 관계를 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시농약 및 공시동물

본 연구에 사용된 유기인계 농약은 phosphorodithioate형으로 malathion[S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate]과 phorate[S-ethylthiomethyl O,O-diethyl phosphorodithioate]을 택하였다. phosphorothioate형으로 parathion[O-4-nitrophenyl O,O-diethyl phosphorothioate]과 diazinon[O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-diethyl phosphorothioate]을 택하였으며, phosphate형으로는 chlorfenvinphos[2-chloro -1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl diethyl phosphate]와 DDVP[2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate]을 선택하였다. 또한 phosphorothiolate형으로 terbufosoxon[S-tert-butylthiomethyl O,O-diethyl phosphorothiolate]과 phrotoxon[S-ethylthiomethyl O,O-diethyl phosphorothiolate]을 택하였다(Tomlin, 1994).

carbamate계 농약은 N-methylcarbamate계에 속하는 XMC[3,5-xylyl methyl carbamate], carbofuran [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate], isoprocarb[2-isopropylphenyl methylcarbamate], carbaryl[1-naphthyl methylcarbamate], BPMC[2-sec-butylphenyl methylcarbamate]와 propoxur[2-isopropoxyphenyl methylcarbamate] 등 6종류를 택하였다(Tomlin, 1994). 공시농약은 표준품(순도 99.9% 이상)를 acetone에 용해하여 사용하였다.

공시동물은 부화 후 24시간 된 병아리(Hy-Line W-77, mail) 중에서 43-47g 되는 건전한 개체를 사용하였다.

### 2.2 Acetylcholinesterase 활성도 측정

AChE활성 측정은 Ellman et al.(1961) 방법에 준하여 다음과 같이 하였다. 병아리의 경부를 절단하고 뇌 전부를 취한다. 여기에 뇌 용량 2배(w/w)의 인산완충용액(0.1M, pH 8.4)첨가하고 균질화한다. 그리고 1500rpm(4℃)으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 AChE효소액으로 사용하였다.

AChE활성 측정은 25℃에서 인산완충용액(0.1M pH8.4) 3ml, acetylthiocholine iodide(0.075M)50μl, dithioisnitrobenzoic acid(DTNB 0.01M) 50μl 및 효소액 50μl을 가한다. 1분 후 cholin과 DTNB와 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 spectrophotometer

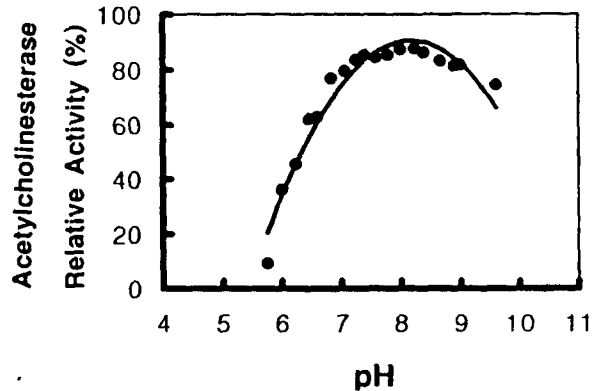


Fig. 1. Effect of pH on the acetylcholinesterase activity.

(Shimadzu U.V-200)로 412nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 μmol acetylthiocholine/min/g protein으로 나타내었다. 여기서 단백질 정량은 Lowry et al. (1951) 방법에 준하였으며, 표준품은 bovine serum albumin(Sigma 제)를 사용하였다.

### 2.3 In vitro 실험

인산완충용액(0.1M pH8.4) 3ml에 AChE효소액 50μl과 계산된 농도로 희석한 공시농약을 50μl 가하고 37℃에서 30분간 항온 시킨다. 그후 Ellman et al. (1961)방법에 따라 AChE 활성을 측정하였다. 대조구는 acetone를 동일량 첨가하였으며 효소활성의 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

여기서 A : 대조구의 AChE 활성

B : 농약 처리구의 AChE 활성

저해율의 비교는 효소활성의 50%가 저해되는데 필요한 반응액 중의 농도인 I<sub>50</sub>으로 하였으며, pI = -log I이다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 AChE의 최적 pH와 반응시간

AChE 활성도 측정방법은 AChE 반응으로 생성된 choline를 측정하는 Ellman et al.(1961)법이 있는데, 이 방법으로 측정한 병아리 뇌의 AChE 활성도는 167 μmol/min/g protein 이었다. AChE의 pH에 대한 상대적 활성도는 Fig. 1과 같았다. AChE의 최적 pH는 8.2로 나타났으며, AChE활성도 측정시 완충용액의 pH는 8.4로 하였다.

한편 저해제가 AChE와 반응하여 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 소용되는 시간을 검토할 필요가 있다. AChE효소액에 carbamate계에 속하는 BPMC를 각각 3.50×10<sup>-7</sup>M과 7.41×10<sup>-7</sup>M 첨가하고 시간별로 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다. 60분까지 log 일차반응이었다. 따라서 *in vitro* 실험에서 항온시간은 공시농약의 실험농도구간에서 log 일차반응에 속

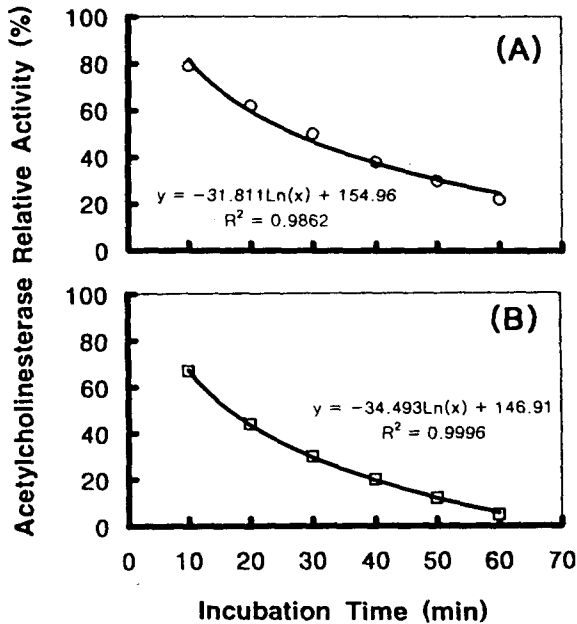


Fig. 2. Effect of incubation time on the acetylcholinesterase activity. [(A) BPMC  $3.50 \times 10^{-7}$ , (B) BPMC  $7.41 \times 10^{-7}$ ]

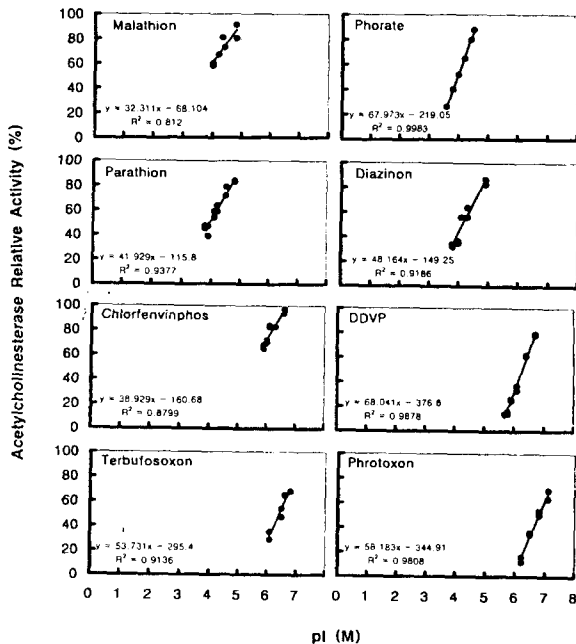


Fig. 3. Inhibition of acetylcholinesterase activity on the organophosphorus pesticides.

하는 30분을 택하였다.

### 3.2 유기인계 농약

유기인계농약으로 phosphorodithioate형, phos-

Table 1.  $I_{50}$  and bimolecular rate constant( $K_i$ ) of acetylcholinesterase by some organophosphorus pesticides

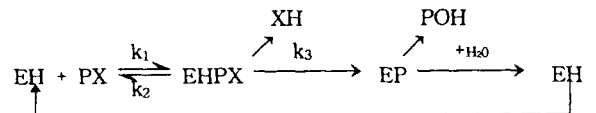
Compounds	$I_{50}(M)$	$K_i(\text{moles}^{-1} \text{min}^{-1})$
Malathion	$2.21 \times 10^{-4}$	104
Phorate	$1.10 \times 10^{-4}$	210
Parathion	$1.10 \times 10^{-4}$	210
Diazinon	$7.29 \times 10^{-5}$	317
Chlorfenvinphos	$3.99 \times 10^{-6}$	5,806
DDVP	$5.29 \times 10^{-7}$	43,793
Terbufosoxon	$3.72 \times 10^{-7}$	62,275
Phrotoxon	$1.63 \times 10^{-7}$	142,126

phorothioate형, phosphate형 phosphorothioate형 등 4가지형태의 pI값에 대한 AChE활성도는 Fig. 3과 같았다.

$I_{50}$ 값은 AChE효소의 활성도가 반으로 저해되는데 필요한 저해제의 농도로써,  $I_{50}$ 값이 적을수록 AChE효소에 강한 저해제가 된다. Table 1에서와 같이  $I_{50}$ 은 phosphorodithioate형태인 malathion이  $2.21 \times 10^{-4}M$ , phorate가  $1.10 \times 10^{-4}M$  이었다. 그리고 phosphorothioate형태인 parathion은  $1.10 \times 10^{-4}M$ , diazinon은  $7.29 \times 10^{-5}M$ 이었다. 또한 phosphate형태인 chlorfenvinphos  $3.99 \times 10^{-6}M$ , DDVP는  $5.29 \times 10^{-7}M$  이었다. 한편 phosphorothioate형으로 terbufosoxon은  $3.72 \times 10^{-7}M$ , phrotoxon은  $1.63 \times 10^{-7}M$ 이었다.

$I_{50}$  값은 phosphorodithioate형태를 기준으로 할 때 phosphorothioate형태는 0.5498배, phosphate형태는 0.0136배, phosphorothioate형 0.0018배 적었다. 이와 같이 유기인계 형태에 따라  $I_{50}$  값이 각각 다르게 나타나는 것은 AChE의 anionic site와 esteratic site의 결합거리와 입체형태 등과 유기인계 농약 형태와의 상호 친화력 차이 때문이다. 즉  $I_{50}$  값이 적으면 AChE의 활성기와 농약과의 친화력은 커지게 되고, 따라서 신경독성이 더 강해진다(Eto, 1974; Matsumura, 1975).

여기서 유기인계의 AChE에 대한 작용기구를 살펴보면, AChE의 esteratic site와 anionic site에 각각 유기인계의 p원자와 치환기가 결합되어 인산화되는데, 이는 다시 가수분해로 탈인산화되어서 AChE 활성회복이 이루어진다. 이때 탈인산화 과정이 매우 느리게 일어나기 때문에 이 단계가 AChE 활성저해단계가 된다. 이러한 과정을 간략하게 반응식으로 나타내면 다음과 같다(Eto, 1974).



여기서  $K_i = \frac{k_1 \times k_3}{k_2}$  (이분자 속도정수)는 저해율의 특성

을 나타내는 지표로 사용된다.  $I_{50}$  과의 관계는  $K_i = \frac{0.695}{I_{50} \times T}$  (T:반응시간 30분)이다(Eto, 1974). 유기인계 중

Table 2.  $I_{50}$  and bimolecular rate constant( $K_i$ ) of acetylcholinesterase by some carbamate pesticides

Compounds	$I_{50}(M)$	$K_i(\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1})$
XMC	$7.91 \times 10^{-6}$	2,928
Carbofuran	$1.24 \times 10^{-6}$	18,682
Isoprocarb	$6.83 \times 10^{-7}$	33,918
Carbaryl	$4.97 \times 10^{-7}$	46,613
BPMC	$3.34 \times 10^{-7}$	64,870
Propoxur	$1.68 \times 10^{-7}$	137,896

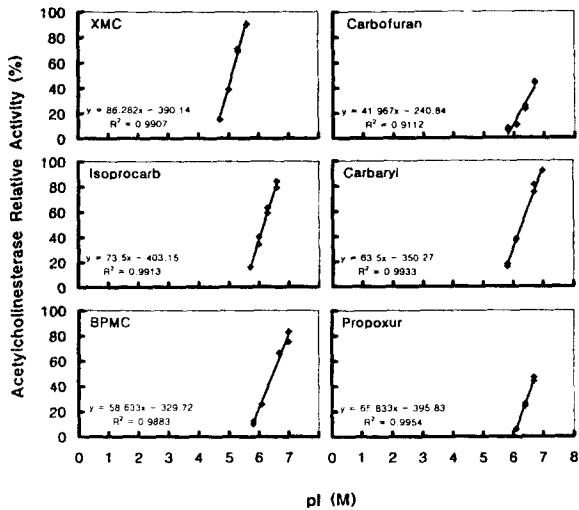


Fig. 4. Inhibition of acetylcholinesterase activity on the carbamate pesticides.

류별  $K_i$ 는 Table 1과 같았다. malathion의  $K_i$ 는  $104 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$  이었다. phrotoxon의 경우  $142,126 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 으로 AChE와 저해제의 친화력이 커질수록 커졌다.

### 3.3 Carbamate계 농약

Carbamate계 6가지 농약의  $pI_{50}$ 값에 대한 AChE활성도는 Fig. 4와 같았다. carbamate계는 AChE가 carbamyl화되어 효소활성이 저해되는데(Kuhr et al., 1977),  $K_i$  값은 Table 2와 같았다. 여기서  $K_i$ 값을 살펴보면 XMC는  $2,928 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , carbofuran은  $18,682 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다. 그리고 carbaryl은  $46,613 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , BPMC는  $64,870 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , propoxur는  $137,896 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다.

본 실험에서 선택한 몇 가지 N-methylcarbamate계에 대한 AChE의  $pI_{50}$ 값을 유기인계와 비교하여 보면 Fig. 5와 같다. 6가지 N-methylcarbamate계에 대한  $pI_{50}$ 값의 평균은 6.11이다. 유기인계농약으로  $pI_{50}$ 값의 평균은 phosphorodithioate형이 3.80, phosphorothioate형이 4.04였고, phosphate형은 6.33, phosphrothiolate형은 6.60이었다. 따라서 6가지 N-me-

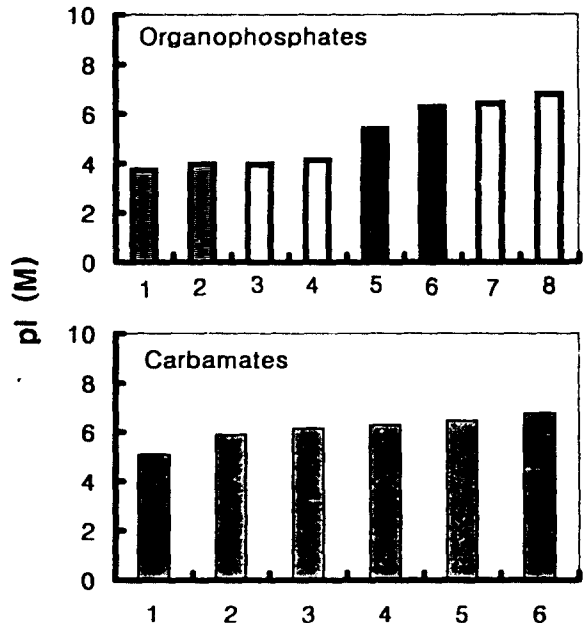


Fig. 5.  $pI_{50}$  of acetylcholinesterase by some organophosphorus and carbamate pesticides.

[Organophosphates; 1.malathion 2.phorate 3.parathion 4.diazinon 5.chlorfenvinphos 6.DDVP 7.terbufosoxon 8.phrotoxon, Carbamate; 1.XMC 2.carbofuran 3.isoprocarb 4.carbaryl 5.BPMC 6.propoxur]

tylcarbamate계는 phosphate형과 phosphrothiolate형과 비슷한 수준의 저해율을 나타내었다.

*in vitro* 조건에서 EI ( Enzyme Inhibition) 방법으로 측정된 각종 유기인계 및 carbamate계 농약과 AChE 활성 저해와의 관계는 유기인계 및 carbamate계 농약의 검출 기법 개발에 응용할 수 있다(유홍일 외,1991; 정금희, 1997). 또한 EI ( Enzyme Inhibition) 방법을 이용하여 자연환경 중 유기인계 및 carbamate계 농약을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 새로운 Bioassay 법으로 응용할 수 있을것이다.

### 4. 요약

유기인계 및 carbamate계 농약에 대한 acetylcholinesterase 활성저해 관계를 규명 하고자 *in vitro* 실험을 하였다.

병아리 뇌의 AChE 활성도는  $167 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein 이었다. AChE의 최적 pH는 8.2였다. 저해제가 AChE 반응하여 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 소요되는 시간은 60분까지 log 일차반응이었다.

유기인계농약에서  $pI_{50}$ 값의 평균은 phosphorodithioate형이 3.80, phosphorothioate형이 4.04였고, phosphate형은 6.33, phosphrothiolate형은 6.60이었다. 6가지 N-methylcarbamate계에 대한  $pI$

50값의 평균은 6.11이다. 따라서 6가지 N-methylcarbamate계는 phosphate형과 phosphorothiolate형과 비슷한 수준의 저해율을 나타내었다. 따라서 AChE 활성 저해는 유기인계와 carbamate계의 화학구조와 상관관계가 있었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 경산대학교 기린연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 유홍일, 이해근, 전성환, 1991, 농약잔류 분석방법, 동화기술, 서울, 79-84pp.
- 정금희, 1997, 산업폐수의 환경독성평가방법, In 환경연구노트, 인제대학교 환경연구소, 6, 19-36.
- Bergmeyer, H.H., 1984, *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., Vol. IV, Verlagchemie, 52-74pp.
- Bracha, P. and R.D. O'Brien, 1968, Trialkyl phosphate and phosphorothiolate anticholinesterases. II. Effects of chain length on potency, *Biochem.*, 7, 1555-1559.
- Davies, D.B. and B.J. Holub, 1983, Comparative effects of organophosphorus insecticides on the activities of acetylcholinesterase diacylglycerol kinase and phosphatidylinositol phosphodiesterase in rat brain microsomes, *pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 92-99.
- Ellman, G.L., K.D. Courtney, Jr. V. Andres and R. M. Featherstone, 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- Eto, M., 1974, *Organophosphorus pesticides-organic and biological Chemistry*, CRC press, 1-368pp.
- Hollebone, B.R., L.J. Brownlee, D. Davis, N. Michelin and D. Purdy, 1995, A mechanistic structure-activity relationship for hepatic polysubstrate monooxygenase, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 29-41.
- Kuhr, R.J. and H.W. Dorough, 1977, *Carbamate insecticides-chemistry, biochemistry, and toxicology*, CRC Press, 41-142pp.
- Lowry, O.H., N.J. Roesbrough, A.L. Favre and R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Matsumura, F., 1975, *Toxicology of insecticides*, Plenum Press, New York, 105-164pp.
- Reinders, J.H., L.G. Hansen, R.L. Metcalf and R.A. Metcalf, 1983, *In vitro* and *in vivo* inhibition of chicken brain neurotoxic esterase by leptonos analogs, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 67-75.
- Schnitzerling, H.J., J. Nolan and P.A. Davey, 1982, A comparative study of the reactivity of acetylcholinesterases of the cattle tick *Boophilus microplus* and cattle erythrocytes with organophosphorus and carbamate inhibitors, *pestic. Biochem. Physiol.*, 18, 216-225.
- Sole, M., C. Porte and J. Albaiges, 1995, Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 157-164.
- Tomlin C., 1994, *The pesticide manual-Incorporating the agrochemical handbook*, 10th ed., British crop protection council, United Kingdom.
- Tseng R.K. and J.J. Cooney, 1995, Action of tributyltin on enzymes of four bacteria, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1113-1121.