

쥐에서 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene이 ¹⁴C-carbofuran의 대사에 미치는 영향

임요섭* · 한성수¹⁾

순천대학교 농업생명과학대학 환경농업과학부*, 원광대학교 생명자원과학대학 농화학과¹⁾

(2002년 1월 8일 접수, 2002년 2월 20일 수리)

Effect of Phenobarbital Sodium and 3-Methylcholanthrene on Metabolism of ¹⁴C-carbofuran in Rat

Yo-Sup Rim* and Seong-Soo Han¹⁾ (Division of Environment and Agricultural Science, College of Agriculture and Life Science, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea, ¹⁾Department of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea)

Abstract : In order to elucidate the effect of phenobarbital sodium (PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on metabolism of insecticide carbofuran in rat. Carbofuran metabolites and its formation rates were determined when orally administered ¹⁴C-carbofuran alone and its combination with PB or 3-MC to rat. ¹⁴C-carbofuran administered orally, alone or in combination with PB or 3-MC, was secreted rapidly within 48 hrs. That is, 79.9 to 81.1% of the original radioactivity was secreted into the urine and 5.7 to 6.5% into the feces. The secretion rate was faster in the combined administration than that in carbofuran alone. Metabolites of carbofuran in main organs, urine, feces and blood of rat were largely 3-hydroxycarbofuran, 3-ketocarbofuran, 3-hydroxycarbofuran phenol, 3-ketocarbofuran phenol, and carbofuran phenol, the major ones being 3-hydroxycarbofuran and 3-ketocarbofuran, respectively, in all administrations of carbofuran alone, carbofuran+PB and carbofuran+3-MC. In addition, formation rate of the two major metabolites detected in the urine was 17.4% and 12.8%, respectively, when carbofuran alone was administered. Meanwhile, when carbofuran was administered with PB or 3-MC, they were 8.6% and 23.5, respectively. These results indicate that the oral administration of PB or 3-MC can reduce carbofuran toxicity by fastening and stimulating the carbofuran metabolism in rat.

Key words ; carbofuran metabolism, phenobarbital sodium, 3-methylcholanthrene, metabolites, insecticide carbofuran.

서 론

Acetylcholinesterase (AChE)와 butyrylcholinesterase (BuChE)의 저해제인 carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate)은 근무력증 치료제 physostigmine¹⁾을 전구물질로 하여 개발한 농약²⁾으로서 세계적으로 많은 양이 사용되고 있고, 우리나라에서도 1995년 유효성분량으로 726톤이 입제로 제조되어 수도와 당근, 담배, 옥수수, 사과, 땅콩, 마늘 등에 사용되고 있는 침투성 살충제³⁾로 cholinesterase (ChE)를 강력히 저해하

로 살충 효과를 나타내는 화합물이다⁴⁾.

Carbofuran의 대사과정을 살펴보면, 주 대사산물은 수도체에 3-hydroxycarbofuran⁵⁾, 박테리아에서 carbofuran phenol⁶⁾, 버뮤구에서 3-ketocarbofuran phenol⁷⁾, 집파리에서 3-hydroxycarbofuran과 3-ketocarbofuran⁸⁻¹⁰⁾, 쥐에서 3-hydroxycarbofuran^{8,9)}으로 생물 종간에 차이가 있었는데, 대사 속도는 동물체에서 식물체에 서보다 빠르다고 알려져 있다²⁾.

한과 임¹¹⁾은 carbofuran 주 대사산물들의 쥐에 대한 독성실험에서 독성은 3-hydroxycarbofuran>3-ketocarbofuran>3-hydroxycarbofuran phenol 순으로 높게 나타났으며, *in vitro* 대사실험에서 주 대사산물은 carbofuran 단독처리시 3-hydroxycarbofuran이었으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합처리시에는 3-ketocarbof-

*연락처:

Tel: +82-61-750-3296 Fax: +82-61-752-8011

E-mail: ysrims@sunchon.ac.kr

uran이라고 밝힌 바 있고, 임¹²⁾은 쥐에 carbofuran을 단독처리했을 때보다 carbofuran과 PB 또는 3-MC를 조합처리했을 때 해독 효소들의 활성을 증가시켰다고 하였다. 이와 같은 결과들을 살펴보면, carbofuran 중독시 PB나 3-MC를 투여함으로써 독성이 보다 낮은 물질로 대사되고, 해독효소의 활성을 증강시킴으로써 대사를 빠르게 하여 carbofuran의 독성이 경감되고 있음을 시사해 주고 있다.

따라서 본 연구에서는 효소유도체 PB나 3-MC가 쥐에 대한 carbofuran의 독성경감에 미치는 영향을 *in vivo* 대사실험에서 규명하고자 쥐에 이들을 단독 또는 조합처리한 후 경시적으로 쥐의 주요 장기(간, 콩팥, 창자), 대소변 및 혈액을 취하여 이들 중 carbofuran의 대사산물과 그의 생성율을 조사하여 비교분석하였다.

재료 및 방법

시험 동물

이 실험에 사용된 동물은 대한실험동물센터(충북 음성)에서 번식 사육한 80~100 g의 SPF Albino Rat(웅성 Sprague Dawley계)를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 190±10 g의 체중을 가진 쥐만을 선별하여 실험을 수행하였다. 순화시 사육온도는 23±1°C, 습도는 55~60%, 광도는 인공조명으로 명암을 각각 12시간으로 유지시켜 주었으며 먹이와 물은 삼양식품 rat용 사료(제322-4호)와 1차 증류수를 일정량씩 공급하여 자유로이 섭취할 수 있도록 하였고 깔짚은 3일을 주기로 교체하여 분비물로 인한 스트레스를 방지하였다.

시약 및 기기

시험 농약인 살충제 carbofuran(순도: 99.9%)은 국립보건원에서 분양받았으며, phenobarbital sodium[5-ethyl-5-phenyl-2,4,6-(1H,3H,5H) pyrimidinetrione monosodium salt, 순도: 97.5%], 3-methylcholanthrene (2-dihydro-3-methyl-ben[*j*]-aceanthrylene, 순도: 99%)과 florasil (100~200 mesh)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 대사실험에 사용된 공시 약제 ¹⁴C-carbofuran은 benzofuran 핵 3번 탄소가 ¹⁴C으로 표지된 것으로 국제원자력기구(International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria)로부터 분양받았다. Specific activity는 280.83 MBq/nmole 이었으며 방사화학적 순도는 TLC radioscanner에 의해 확인한 결과 99% 이상이었다. 비표지 대사실험에 사용한 carbofuran(순도: 99.5%), 3-hydroxycarbofuran(순도: 97.4%) 및 3-ketocarbofuran(순도: 95%) 표준품은 FMC Co. (U.S.A.)로부터 분양받아 사용하였다. Carbofuran phenol, 3-hydroxycarbofuran phenol 및 3-ketocarbofuran phenol 표준품은 각각 해당하는 carbofuran 및 그 유도체와 potassium hydroxide를 1 : 1 (mmol : mmol)의 비율로 소량의 methanol에 녹여서 가수분해한 후 0.1 N HCl 수용액으로 산성화시킨 다음 여기에 diethyl ether 20 mL

를 가하여 추출한 후, MgSO₄로 건조시켜 이를 여과하고 감압농축하여 얻었으며, 수율은 각각 88, 83 그리고, 72%이었다. 상기의 방법으로 추출한 phenol류 화합물의 순도를 TLC상에서 단일 spot임을 확인한 후 사용하였다. K₂EDTA, *p*-nitrophenol은 Fluka Chemika AG. (Buchs, Switzerland)에서, thin layer chromatography plate는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)에서, 그리고 기타 시약은 잔류분석용과 특급을 각각 구입하여 사용하였다.

기기는 pH meter (Fisher Accumet[®], U.S.A.), homogenizer (IKA ultra turrax T-25, Japan), centrifuge (Du Pont sorvall RC-5C, U.S.A.), ultracentrifuge (Hitachi 70P-70, Japan), UV/Vis spectrophotometer (Varian DMS -200, Australia), deep freezer (Revco 13-989-12, U.S.A.), shaking water bath (Dongyang 2650, Korea), rat cage (Daejong DJ-102, Korea), rat metabolic cage (Daejong DJ-301, Korea), operating table (Daejong DJ-2412, Korea), mechanical convection oven (Jeil C-DM3, Korea), shaking incubator (Vision KMC-8480SF, Korea) 등을 사용하였다.

¹⁴C-carbofuran의 *in vivo* 대사실험

화합물 처리 및 분석시료준비. Carbofuran의 *in vivo* 대사실험에서는 쥐에 대한 carbofuran의 LD₅₀ 값인 3.8 mg/kg (¹⁴C-carbofuran 13.5 μg과 비표지 carbofuran 3.7865 mg)과 PB (60 mg/kg) 또는 3-MC (60 mg/kg)을 독성 및 효소활성 실험¹²⁾에서와 같은 방법으로 조제하여 단독 또는 조합으로 경구투여하였다. 그 후 경시적(0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96 hr)으로 쥐를 취하여 마취시킨 다음 쥐의 복벽을 절개하여 장기(간, 콩팥, 창자)와 혈액을 각각 취하였고, 대변과 소변은 대사 cage를 이용하여 3시간 간격으로 각각 채취하여 곧 바로 장기와 배설물은 냉동고(-70°C)에, 혈액은 응고 방지를 위해 K₂EDTA가 들어 있는 시험관에 넣어 잘 혼합시킨 후 냉장고(2~4°C)에 넣어 보관하면서 실험에 사용하였다.

장기 중 대사산물. 냉동한 각 조직 2 g을 취하여 가늘게 칼로 자른 다음 30 mL acetone을 넣고 homogenizer를 이용 20,000 rpm의 속도로 3분간 마쇄하였다. 마쇄한 조직은 Büchner funnel를 이용하여 여과지(Whatman No. 5)로 여과하고 잔류물을 30 mL의 acetone으로 씻어 여과액을 합하였다. 이 여과액 60 mL를 300 mL 분액여두에 옮기고 45분간 정치시켜 바닥에 침전된 기름층을 제거한 다음 250 mL 증류 플라스크에 여과액을 옮기고 감압 농축기(50°C)를 사용하여 30 mL 정도로 농축시켰다. 여기에 0.25 N HCl 30 mL를 첨가한 다음 다시 농축시켜 acetone을 모두 제거시킨 농축 flask는 -10°C의 냉동고에 1시간 30분 동안 정치시켜 잔여 지방과 oil을 응고시킨 후 즉시 여과하고, 0.25 N HCl 30 mL로 씻어 여과액과 합하였다. 이 여과액은 30 mL씩의 dichloromethane으로 3회 추출하여 물층은 바로 방사능 측정을 하였고, 90 mL의 dichloromethane층은 5 g의 무수 Na₂SO₄로

탈수시킨 다음 30 mL 정도로 농축시켜 여기에 30 mL의 acetonitrile을 추가한 후 다시 농축하여 이들 용매를 완전히 제거하였다. 농축잔사는 1 mL의 acetonitrile로 2회 녹여 Florisil (100-200 mesh, 4% water) 10 g을 benzene 50 mL로 습식충진시킨 정제용 column [1.5 (i.d.) × 30 (L.) cm]에 옮겼다. 정제용 column은 250 mL의 benzene을 유출시켜 수기에 받아 감압농축하고 benzene 1 mL로 정용한 다음 이 중 0.1 mL는 총 방사능 측정에 사용하고 나머지 0.9 mL는 TLC로 대사산물을 분리하는데 사용하였다. TLC plates는 120°C에서 15분간 활성화시킨 후 데시케이터에 넣어 실온이 되게 한 다음 꺼내어 26°C의 fume hood 내에서 TLC plate 하단의 2 cm되는 지점에 benzene으로 용해시킨 대사산물들의 standard 혼합용액과 분석시료액들을 2 cm 간격으로 점적한 다음 40°C에서 30분간 건조시켰다. 전개소에서 diethyl ether:n-hexane (3:1, v/v)의 혼합 용매로 17 cm까지 전개시킨 후 40°C에서 30분간 건조시켰다. TLC상에 분리된 대사산물 중 3-ketocarbofuran과 3-ketocarbofuran phenol은 암실에서 UV lamp (365 nm)에 노출시켜 방사된 푸른 형광빛에 의해 확인하였다. 기타 대사산물은 1.5 N methanolic potassium hydroxide solution을 분사하여 40°C에서 20분간 건조시킨 후 p-nitrobenzene diazonium fluoroborate solution(diethyl ether와 methanol (1:1, v/v) 혼합물 50 mL에 p-nitrobenzene diazonium fluoro- borate 0.05 g을 넣고 10분 동안 진탕시킨 용액)으로 발색시켜 확인하였다. 대사산물의 정량은 TLC plate로부터 각 대사산물을 scraping하여 scintillation vials에 넣고 LSC로 방사능을 측정하였다. LSC 측정 시 유기용매 시료는 bis-MSB 0.125 g과 PPO (2,5-diphenyloxazole) 5 g을 toluene 1 L에 녹인 용액 10 mL, 수용액 시료는 liquid scintillation cocktail 용액 (Biosolv[®]) 10 mL를 각각 넣어 2분간 교반한 후 측정하였다.

혈액 중 대사산물 : 혈액 중 대사산물 시험은 Holden과 Cook¹³⁾의 방법에 따라 삼각 플라스크에 냉장한 혈액 3 mL를 취하여 30 mL의 acetone을 넣고 진탕기에서 720 rpm으로 10분간 진탕한 후 Whatman No. 5 여과지로 여과하고 30 mL의 acetone을 추가 사용하여 여과지 및 혈액 잔류물을 씻어 여과액을 합하였다. 이 여과액 60 mL를 300 mL 분액여두에 옮기고 45분간 정치시켜 바닥에 침전된 기름층을 제거하였으며 장기에서와 같은 방법으로 대사산물을 확인, 정량하였다.

배설물 중 대사산물 : 대변과 소변에서의 대사산물 실험은 Metcalf 등⁹⁾의 방법에 준하여 수행하였다. 먼저 소변 중 대사산물 실험은 경시적으로 채취한 소변에 60 mL의 diethyl ether를 2회로 나누어 각 5분간씩 진탕하여 분배추출하였다. Diethyl ether층의 시료액을 5 g의 무수 Na₂SO₄로 탈수시킨 후 감압농축한 다음 benzene 1 mL로 정용하였으며, 물층은 HCl로 0.125 N이 되게 한 후 50°C로 조절된 incubator에서 16시간 동안 가수분해시

킨 다음 30 mL씩의 diethyl ether로 2회 추출하여 5 g의 무수 Na₂SO₄로 탈수시켜 감압농축후 benzene 1 mL로 정용한 시료중에서 0.1 mL를 취하여 방사능을 측정하였다. 남은 유기용매층과 물층으로부터 추출한 유기용매층을 합하여 TLC plate에 점적 후 diethyl ether:n-hexane (3:1, v/v) 혼합용매로 전개한 다음 장기에서와 같은 방법으로 carbofuran 및 그의 대사산물을 확인, 정량하였다. 한편, 대변 중 대사산물 실험은 경시적으로 채취한 대변에 80 mL의 acetone을 넣고 조직에서와 동일한 방법으로 마쇄한 후 5시간 진탕시킨 다음 5 g의 무수 Na₂SO₄로 탈수시킨 후 2 mL로 감압농축시켰다. 이 농축시료를 정제용 column에 옮겨 diethyl ether:n-hexane (3:1, v/v) 혼합용액 330 mL로 유출시킨 용출액을 농축시킨 후 1 mL의 benzene으로 정용한 다음 0.1 mL를 취하여 방사능을 측정하였으며, 나머지 시료는 TLC plate에 점적 후 diethyl ether: n-hexane (3:1, v/v) 혼합용매로 전개한 다음 소변에서와 같은 방법으로 carbofuran 및 그의 대사산물을 확인, 정량하였다.

결과 및 고찰

장기 중 carbofuran과 그의 대사산물 총량의 경시적 변화

쥐에 대한 C¹⁴-carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여후 경시적으로 추출한 간, 콩팥, 소장, 대장 중에 있는 carbofuran과 대사산물 총량의 경시적변화는 Table 1, 2 및 3에 나타내었다. Carbofuran과 그의 대사산물의 장기 중 잔류분포를 살펴보면 carbofuran 단독투여군은 Table 1에 나타낸 바와 같이 carbofuran 투여후 12시간 까지도 잔류된 carbofuran의 양에 비해 대사산물의 양이 현저하게 낮게 나타나 carbofuran의 대사가 순조롭지 못함을 알 수 있었고, 특히 carbofuran에 대한 쥐의 처사시간대인 1~3시간에서의 결과를 보면 약 15%만 대사되고 대사되지 않은 carbofuran의 잔류량이 약 52%로 매우 높음을 알 수 있었다.

Table 1. Percentage of the respective ¹⁴C-carbofuran and its metabolites in main organs and blood of rats after the administration of carbofuran alone

Time after treatment(hr)	Carbofuran	Metabolites
	%	
0.5	21.93	2.77
1	33.83	6.87
3	18.50	8.43
6	17.34	9.23
12	7.31	8.05
24	3.74	3.25
48	2.55	3.39
72	0	1.73
96	0	0.35

Table 2. Percentage of the respective ^{14}C -carbofuran and its metabolites in main organs and blood of rats after the combined administration of carbofuran and PB

Time after treatment(hr)	Carbofuran	Metabolites
	%	
0.5	22.17	2.77
1	18.25	25.47
3	9.17	21.74
6	4.80	20.33
12	1.32	16.72
24	1.54	6.39
48	0.06	5.89
72	0.05	1.23
96	0	0.22

Table 3. Percentage of the respective ^{14}C -carbofuran and its metabolites in main organs and blood of rats after the combined administration of carbofuran and 3-MC

Time after treatment (hr)	Carbofuran	Metabolites
	%	
0.5	22.02	2.78
1	12.14	36.13
3	9.62	30.43
6	1.76	14.26
12	0.52	10.27
24	0.48	5.86
48	0.02	3.02
72	0	1.24
96	0	0.22

그러나 carbofuran과 PB 조합투여군은 Table 2에 나타낸 바와 같이 약제투여 30분후에는 carbofuran 단독투여군과 비슷한 양상을 보였으나 조합투여 1~3시간에는 대사산물의 양이 약 47% 정도로서 carbofuran 단독투여군보다 매우 빠른 속도로 대사가 이루어지고 있음을 알 수 있었다. Carbofuran과 3-MC 조합투여군 (Table 3)의 경우에서도 carbofuran과 PB 조합투여군 (Table 2)의 경우와 비슷한 양상을 나타내었으나 투여 후 1~3시간대에 약 66%를 대사시켜 carbofuran과 PB 조합투여군보다 대사가 더 순조롭게 이루어짐을 알 수 있었다. 특히 carbofuran 단독투여군의

경우 주요 치사시간대인 1~3시간에 carbofuran의 잔류량이 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여군에 비해 약 2~3배 정도 높게 나타났을 뿐만 아니라, carbofuran 단독투여군은 투여후 24 시간에도 약 4%의 carbofuran 잔류량이 나타났으나 carbofuran과 PB 조합투여군의 경우 12시간대에, carbofuran과 3-MC 조합투여군의 경우 6시간대에 이보다 훨씬 적은 잔류량을 나타내 대사속도도 빠름을 알 수 있었다.

간에서의 주 대사산물의 경시적 변화

쥐의 주요 장기와 혈액 중의 carbofuran과 5가지 주요 대사산물의 경시적변화를 조사하였는 바, 먼저 간에서의 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여에 따른 결과 (Fig. 1)를 살펴 보면, carbofuran 단독투여군 (Fig. 1a)의 경우 약제투여 직후 (30분)부터 12시간까지 주 대사산물이 3-hydroxycarbofuran이고 일부는 3-ketocarbofuran 등 다른 4가지 대사산물로 나타났는데, 이는 쥐에서의 주 대사산물이 3-hydroxycarbofuran이라는 Metcalf 등⁸⁾ 및 Dorough⁹⁾의 보고와 일치하였고, 이렇게 대사된 3-hydroxycarbofuran은 직접 glucose, glucuronic acid, sulfate 및 phosphate 등과 conjugation 되어 수용성물질로 배설되거나¹⁴⁾, 3-ketocarbofuran으로 산화된 다음 가수분해되는⁷⁾ 등의 대사과정을 거칠 것으로 사료된다. 또한, carbofuran 단독투여의 경우 carbofuran의 잔류량이 주 대사산물의 생성량보다 더 많았을 뿐만 아니라 5가지 주 대사산물 중 가장 독성이 강한 3-hydroxycarbofuran으로 대사되고 있는 본 실험결과는 대사과정에서도 독성이 나타나 48시간까지 AChE와 BuChE의 효소활성을 억제시켰다고 임¹²⁾이 보고한 *in vivo* 효소활성실험의 결과를 잘 입증해 주고 있다.

Carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 1b)에서는 약제투여 30분까지는 carbofuran 단독투여군의 결과와 비슷한 경향을 나타냈으나 조합투여 1시간 후부터는 대사산물의 양이 급격히 증가하여 3시간째에는 carbofuran의 잔류량보다 더 높게 나타났을 뿐만 아니라 주 대사산물이 3-hydroxycarbofuran보다 상대적으로 독성이 낮은 3-ketocarbofuran으로 나타났다. 한편, carbofuran과 3-MC의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 1c)에서는 약제투여 30분 후에는 carbofuran 단독투여군 및 carbofuran과 PB의 조합투여군의 결과와 비슷한 양상을 나타냈으나 투여 1시간째에는 3-ketocarbofuran의 생성량이 carbofuran의 잔류량보다 약 2.5 배 높게 나타나 주 대사산물이 carbofuran과 PB의 조합투여군의 결과와 같은 3-ketocarbofuran임을 알 수 있었으나, carbofuran과 PB의 조합투여군보다 더 빠른 속도로 대사시킴을 의미하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 carbofuran 투여후 PB나 3-MC를 투여함으로써 carbofuran을 빠른 속도로 대사시켜 쥐의 생존율을 높이게 한 것이라 볼 수 있고, 효소활성측정의 결과¹²⁾에서 AChE 활성은 6시간부터, BuChE 활성은 3시간부터 회복되기 시작하여 각각 12~24시간 및 6~12시간만에 정상적인 효소활성이었다고

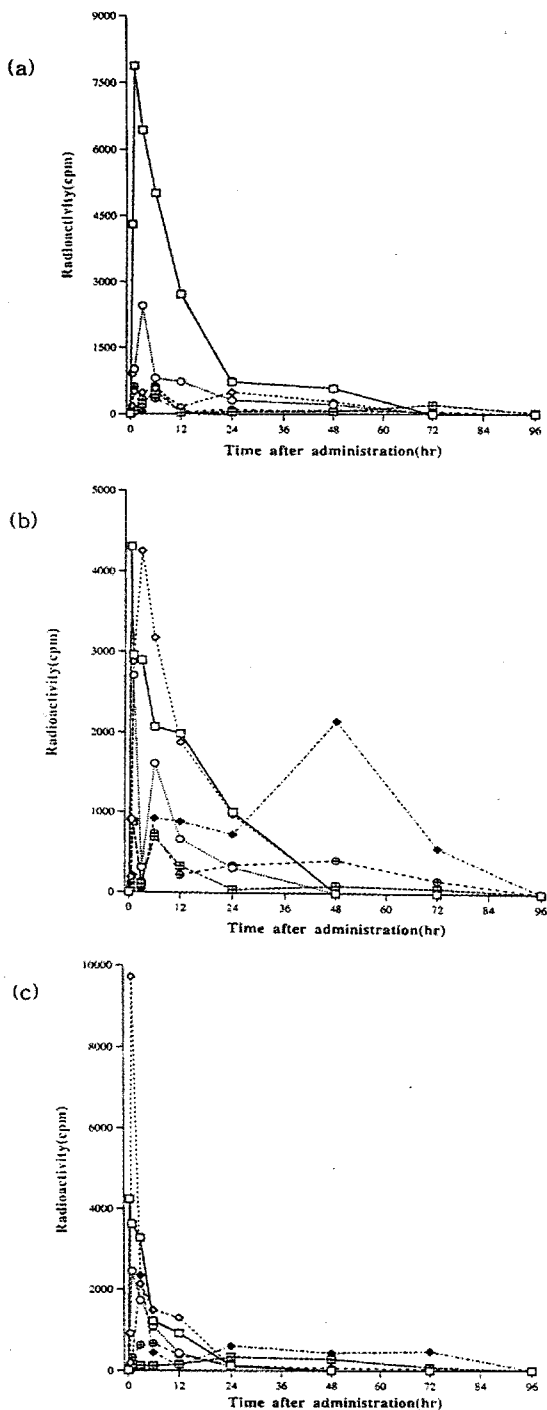


Fig. 1. Distribution of carbofuran and its metabolites in the liver of the rat treated with the ¹⁴C-carbofuran(a), ¹⁴C-carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ¹⁴C-carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).
 —□— carbofuran; —○— 3-hydroxycarbofuran; —◇— 3-ketocarbofuran; —⊠— carbofuran phenol; —⊕— 3-hydroxycarbofuran phenol; —◆— 3-ketocarbofuran phenol.

하였는 바, 이러한 효소활성의 증가가 carbofuran 대사를 빠르게 이루어지게 한 것이라 판단된다. 또한, 이러한 실험결과들로 미루어 볼 때 투여량과 투여시기 및 투여횟수별 생존율¹¹⁾ 시험에서 투여량과 투여시기 등이 동일한 조건에서 carbofuran 단독투여보다 carbofuran과 3-MC 또는 carbofuran과 PB의 조합투여시 쥐의 생존율이 높은 원인이 되었다고 생각한다.

콩팥에서의 주 대사산물의 경시적 변화

콩팥에서의 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여에 따른 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. Carbofuran 단독투여군 (Fig. 2a)의 경우 간에서의 결과 (Fig. 1)와 유사하였으나 약제투여 30분 후에는 carbofuran의 잔류량이 간에서의 잔류량보다 현저히 낮았고 1시간째에 급격히 증가된 것으로 보아 대부분의 carbofuran은 간에서 대사된 후 콩팥으로 이동됨을 추정할 수 있었다. 또한 투여 후 12시간 까지 carbofuran 보다는 독성이 현저히 낮지만 주요 대사산물 중 가장 독성이 강한 3-hydroxycarbofuran이 다른 주 대사산물보다 높게 생성되는 결과를 나타내 간에서의 결과와 유사하였다.

Carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 2b)는 약제투여 30분 후에는 carbofuran 단독투여군의 결과와 비슷한 경향을 나타냈으나 쥐의 carbofuran에 대한 치사시간대인 1~3시간에 3-ketocarbofuran>3-hydroxycarbofuran>carbofuran 순으로 나타났고 6시간째부터 3-hydroxycarbofuran phenol과 carbofuran phenol 등 독성이 매우 낮은 대사산물량이 증가하는 것으로 보아 carbofuran 단독투여군보다 빠른 속도로 무독화됨을 알 수 있었다.

Carbofuran과 3-MC의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 2c)에서도 carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과와 유사한 양상을 나타내었으나, 조합투여 후 3시간째부터 2차 대사산물인 3-hydroxycarbofuran phenol과 3-ketocarbofuran phenol 및 carbofuran phenol의 양이 급격히 증가되는 것으로 보아 이들의 조합투여가 carbofuran과 PB의 조합투여군보다 더욱 빠르게 대사되는 것으로 생각된다.

소장에서의 주 대사산물의 경시적 변화

소장에서의 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여에 따른 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. Carbofuran 단독투여군 (Fig. 3a)의 경우 carbofuran의 잔류량이 경구투여 30분부터 1시간까지 간과 신장에서의 잔류량보다 현저히 높다가 간과 콩팥에서 대사되기 시작하는 1시간 이후에 낮아지는 결과를 보여 소장이 carbofuran의 주요 흡수기관임을 알 수 있었고, carbofuran의 잔류량이 3시간째 이후부터 급격히 낮아져 48시간 이후에는 거의 나타나지 않아 소장에서의 carbofuran 흡수는 48시간 이내에 많이 이루어지는 것으로 생각된다.

Carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 3b)에서는 약

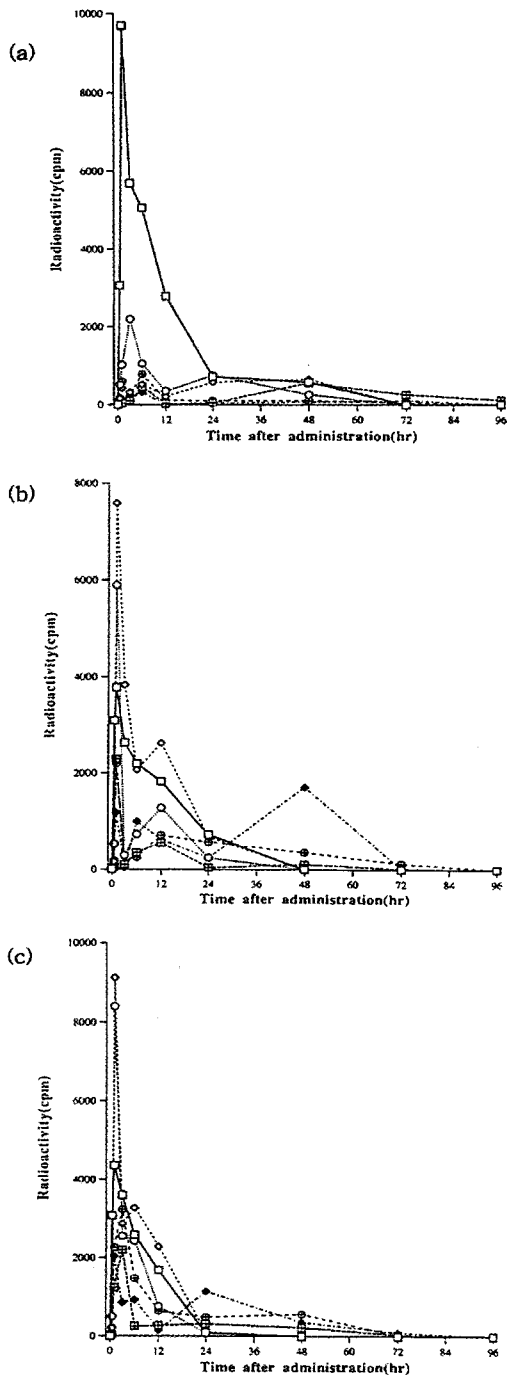


Fig. 2. Distribution of carbofuran and its metabolites in the kidney of the rat treated with the ^{14}C -carbofuran(a), ^{14}C -carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ^{14}C -carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).
 —□— carbofuran; —○— 3-hydroxycarbofuran; —◇— 3-ketocarbofuran; —▣— carbofuran phenol; —⊕— 3-hydroxycarbofuran phenol; —◆— 3-ketocarbofuran phenol.

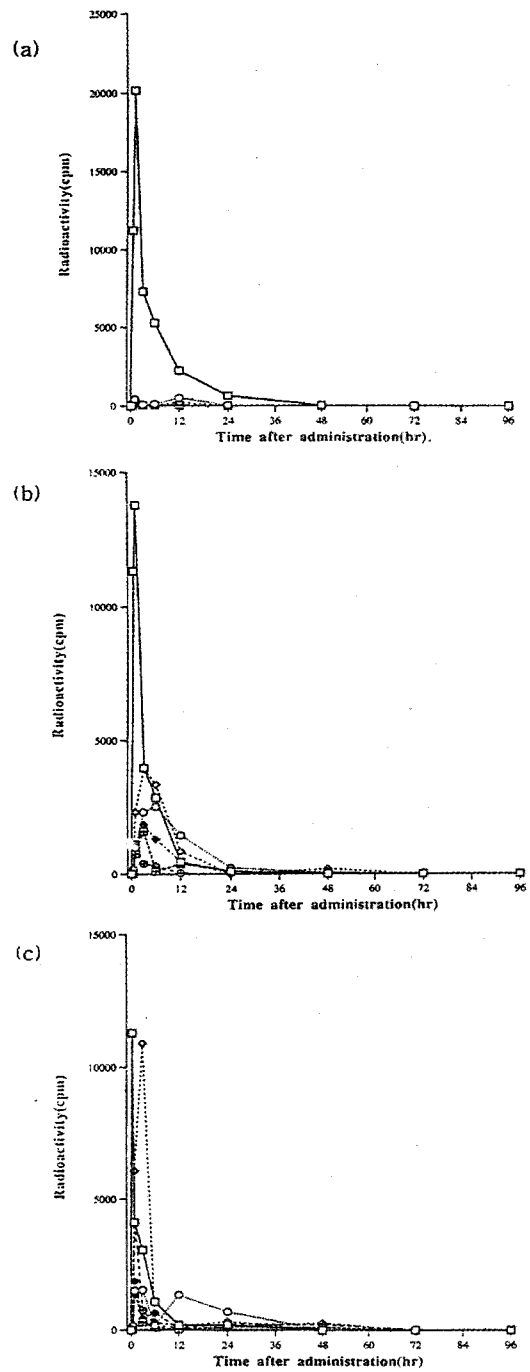


Fig. 3. Distribution of carbofuran and its metabolites in the small intestine of the rat treated with the ^{14}C -carbofuran(a), ^{14}C -carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ^{14}C -carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).
 —□— carbofuran; —○— 3-hydroxycarbofuran; —◇— 3-ketocarbofuran; —▣— carbofuran phenol; —⊕— 3-hydroxycarbofuran phenol; —◆— 3-ketocarbofuran phenol.

제투여 30분까지는 carbofuran 단독투여군의 결과와 비슷한 경향을 나타냈으나, 그 후 시간이 경과함에 따라 carbofuran의 잔류량이 carbofuran 단독투여군 보다 현저히 낮게 나타났을 뿐만 아니라 3-ketocarbofuran 등 주요 5가지 대사산물의 총 생성잔류량이 carbofuran의 잔류량보다 오히려 높게 나타난 결과는 간과 콩팥에서의 carbofuran 대사 결과와 유사함을 알 수 있었다.

Carbofuran과 3-MC의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 3c)에서도 carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과와 유사한 양상을 나타내었으나, 조합투여 후 3시간째에는 3-ketocarbofuran 등 주 5가지 대사산물의 총량이 carbofuran의 잔류량보다 3배 이상으로 carbofuran과 PB의 조합투여군보다 대사속도가 빠름을 알 수 있었다.

대장에서의 주 대사산물의 경시적 변화

대장에서의 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여에 따른 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 carbofuran 단독투여군이나 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여군 모두 약제투여 30분에는 carbofuran을 포함한 대사산물이 검출되지 않아, 경구투여한 carbofuran이 대장에 이동되기까지는 30분 이상이 소요됨을 알 수 있었다. 투여약제인 carbofuran과 그의 대사산물의 잔류양상은 carbofuran 단독투여군 (Fig. 4a)의 경우 carbofuran의 잔류량이 투여후 12시간까지는 계속 증가하다가 12시간 이후부터 점차 낮아져 48시간에는 매우 적은 양만이 잔류하는 양상을 보였다. 주 대사산물도 약제투여후 24시간까지 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol > carbofuran phenol 순으로 잔류되었다. 또한, 약제투여후 생성잔류물 중 3-ketocarbofuran은 24시간까지 그리고 3-hydroxycarbofuran은 약제투여후 48시간까지 잔류되었다. 이상의 결과와 carbofuran 단독투여군의 효소활성 실험결과¹²⁾를 결부시켜 보면 carbofuran의 잔류량이 24시간 이후에는 매우 낮았음에도 불구하고 AChE와 BuChE의 활성이 48시간까지 저해받았던 것은 대사산물의 독성¹¹⁾에서 나타낸 바와 같이 3-hydroxycarbofuran과 3-ketocarbofuran의 독성에 기인한 것이라 사료된다.

Carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 4b)에서 약제투여 30분까지는 carbofuran 단독투여군 (Fig. 4a)의 결과와 같은 경향을 나타냈으나 생성물의 잔류양상은 다르게 나타나 경구투여후 carbofuran의 잔류량이 매우 낮게 나타났음은 물론 12시간까지 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran phenol > 3-hydroxycarbofuran phenol 순으로 높게 나타나 빠른 대사로 무독화시켜 쥐의 생존을 가능하게 함을 알 수 있었다. Carbofuran과 3-MC의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 4c)에서도 carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과와 유사한 양상을 나타내었으나 carbofuran과 3-MC의 조합투여가 carbofuran과 PB의 조합투여보다 더 빠르게 대사되는 경향을 보였다.

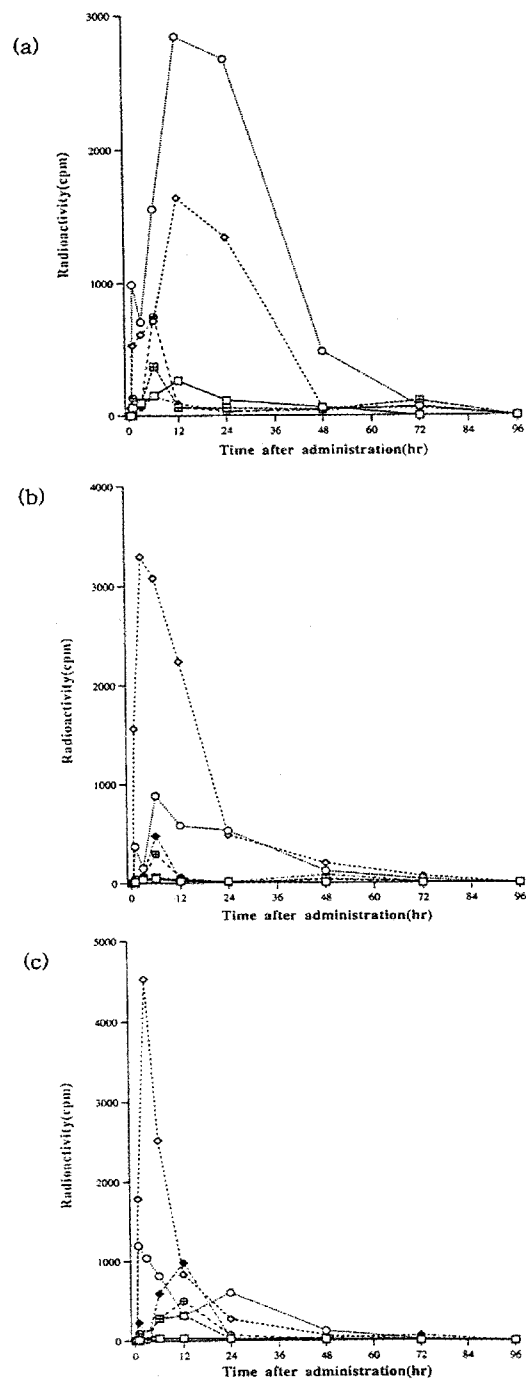


Fig. 4. Distribution of carbofuran and its metabolites in the large of the rat treated with the ¹⁴C-carbofuran(a), ¹⁴C-carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ¹⁴C-carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).
 —□— carbofuran; —○— 3-hydroxycarbofuran; —◇— 3-ketocarbofuran; —⊠— carbofuran phenol; —⊕— 3-hydroxycarbofuran phenol; —◆— 3-ketocarbofuran phenol.

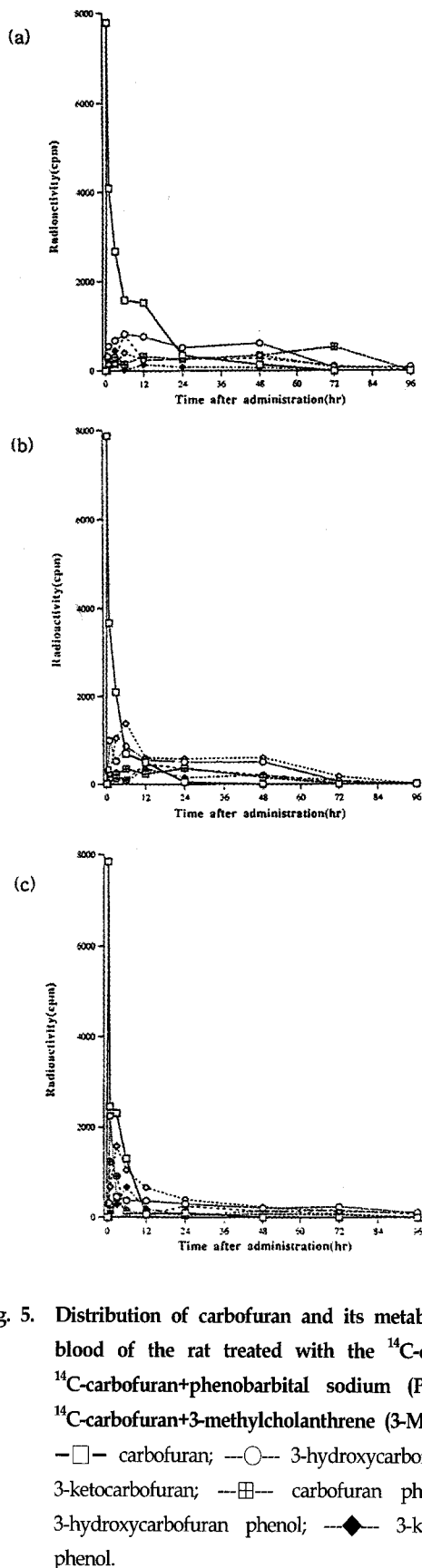


Fig. 5. Distribution of carbofuran and its metabolites in the blood of the rat treated with the ^{14}C -carbofuran(a), ^{14}C -carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ^{14}C -carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).

—□— carbofuran; —○— 3-hydroxycarbofuran; —◇— 3-ketocarbofuran; —◻— carbofuran phenol; —⊕— 3-hydroxycarbofuran phenol; —◆— 3-ketocarbofuran phenol.

혈액 중 carbofuran과 그의 대사산물의 경시적 변화

혈액 중 대사산물의 경시적변화는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. Carbofuran 단독투여군 (Fig. 5a)의 경우 약제투여 후 30분에는 잔류된 carbofuran의 양은 흡수기관인 소장보다는 낮았으나 주요 대사기관인 간이나 콩팥보다 높은 양상을 보였고 그 후부터는 점점 낮아진 결과로 보아 소장을 통해 흡수된 carbofuran이 혈액을 통해 간을 비롯한 조직으로 이동되고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 carbofuran phenol 등의 2차 대사산물이 carbofuran의 경구 투여후 72시간째에 증가되는 결과로 미루어 간 등의 조직에서 대사되어 나오는 대사산물이 혈액을 통해 다시 이동되고 있다는 추측이 가능하였다. 또한, 잔류양상도 carbofuran 단독투여군의 간과 콩팥의 12시간까지의 결과와 같이 carbofuran > 3-hydroxycarbofuran 순으로 높게 나타나 대사산물의 이동이 혈액을 통해 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

Carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 5b)에서 약제 투여후 30분에는 carbofuran 단독투여군의 경우와 같은 경향을 나타냈으나 대사산물의 잔류양상은 다르게 나타나 약제투여후 6시간째에는 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran > carbofuran 순으로 높게 나타났으며 이는 대사속도가 빠르게 나타난 carbofuran과 PB의 조합투여군의 간과 콩팥에서의 결과와 유사하였다. Carbofuran과 3-MC의 조합투여에 따른 결과 (Fig. 5c)에서도 carbofuran과 PB의 조합투여에 따른 결과와 유사한 양상을 나타내었으나 carbofuran과 3-MC의 조합투여가 carbofuran과 PB의 조합투여보다 더 빠르게 대사되었다.

배설물 중 총 ^{14}C -radioactivity의 경시적 변화

^{14}C -Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여에 따른 배설물 (소변, 대변)에서의 총 누적대사량의 경시적 변화는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 48시간내에 소변과 대변을 통해 배설된 ^{14}C -radioactivity 총량을 보면 소변(Fig. 6a)에서는 carbofuran 단독투여군의 경우 79.9%, carbofuran과 PB 조합투여군의 경우 81.1%, carbofuran과 3-MC 조합투여군의 경우 80.1%가 배설되었으며, 대변 (Fig. 6b)에서는 carbofuran 단독투여군의 경우 5.7%, carbofuran과 PB 조합투여군의 경우 5.9%, carbofuran과 3-MC 조합투여군의 경우 6.5%가 배설되어 투여군간에 차이가 없었다. 그러나 경시적변화를 살펴 보면 소변에서는 carbofuran 단독투여군의 경우 약제투여후 24시간까지 약 37%를 배설시킨데 비해 carbofuran과 PB 조합투여군은 약제투여후 12시간까지 약 37%를, carbofuran과 3-MC 조합투여군은 약제투여후 12시간까지 약 43%를 배설한 것으로 나타나 carbofuran 단독투여보다 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여군이 12시간 빠르게 배설됨을 알 수 있었다. 또한 대변 (Fig. 6b)에서의 경시적 변화에서도 배설량은 적지만 유사한 경향을 나타내었다.

이상의 결과와 주요 해독효소군인 간의 GST, UDPGT, cytochrome P-450 효소계의 효소활성 실험결과¹²⁾와 결부시켜 고

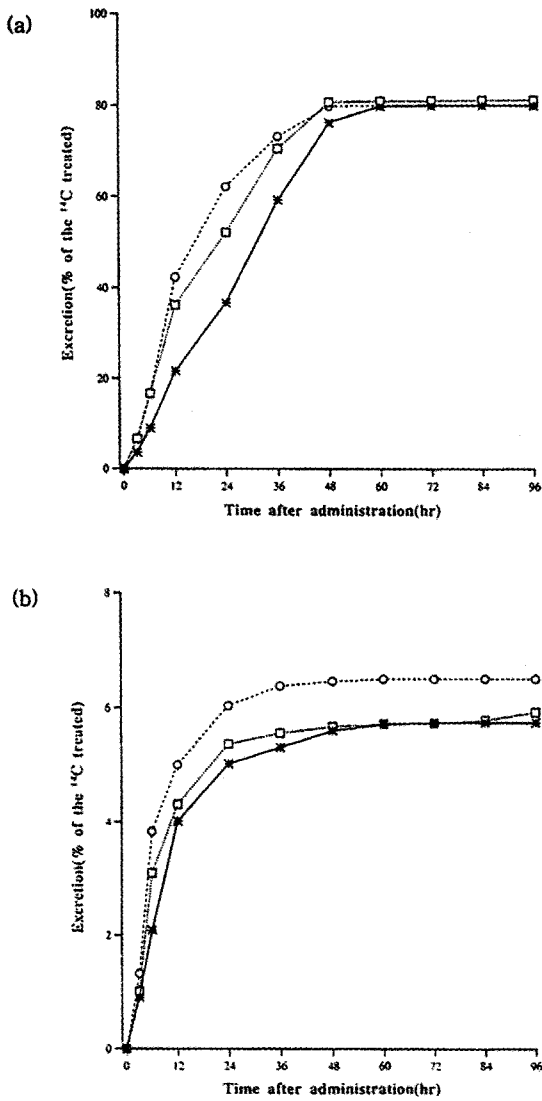


Fig. 6. Cumulative excretion of total ¹⁴C-radioactivity in urine (a) and feces (b) of the rat treated with the ¹⁴C-carbofuran, phenobarbital sodium (PB) or 3-methylcholanthrene (3-MC).

—*— carbofuran; ---□--- carbofuran+PB; ---○--- carbofuran+3-MC

찰해 보면 GST 효소활성의 경우 carbofuran 단독투여는 약제투여 후 24시간에 최대활성을 보였으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여군은 12시간에 최대활성을 보였을 뿐만 아니라 활성도 20% 이상 높게 나타났다. 또한 UDPGT나 cytochrome P-450 효소계의 효소활성의 경우 활성의 정도와 양상은 다르지만 대부분의 경우 carbofuran 단독투여는 약제투여 후 6~12시간대에 최대 활성을 나타냈으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여군은 3~6시간대에 최대활성을 보였다. 따라서 carbofuran 단독투여군

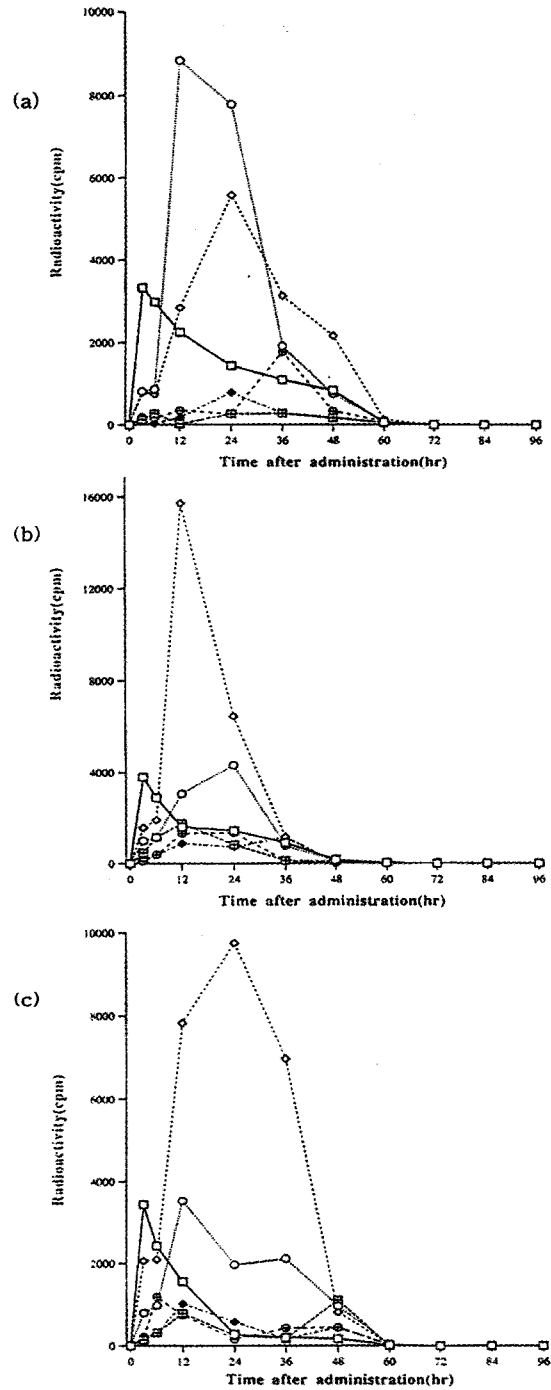


Fig. 7. Distribution of carbofuran and its metabolites in the urine of the rat treated with the ¹⁴C-carbofuran(a), ¹⁴C-carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ¹⁴C-carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).

—□— carbofuran; ---○--- 3-hydroxycarbofuran; ---◇--- 3-ketocarbofuran; ---⊠--- carbofuran phenol; ---⊕--- 3-hydroxycarbofuran phenol; ---◆--- 3-ketocarbofuran phenol.

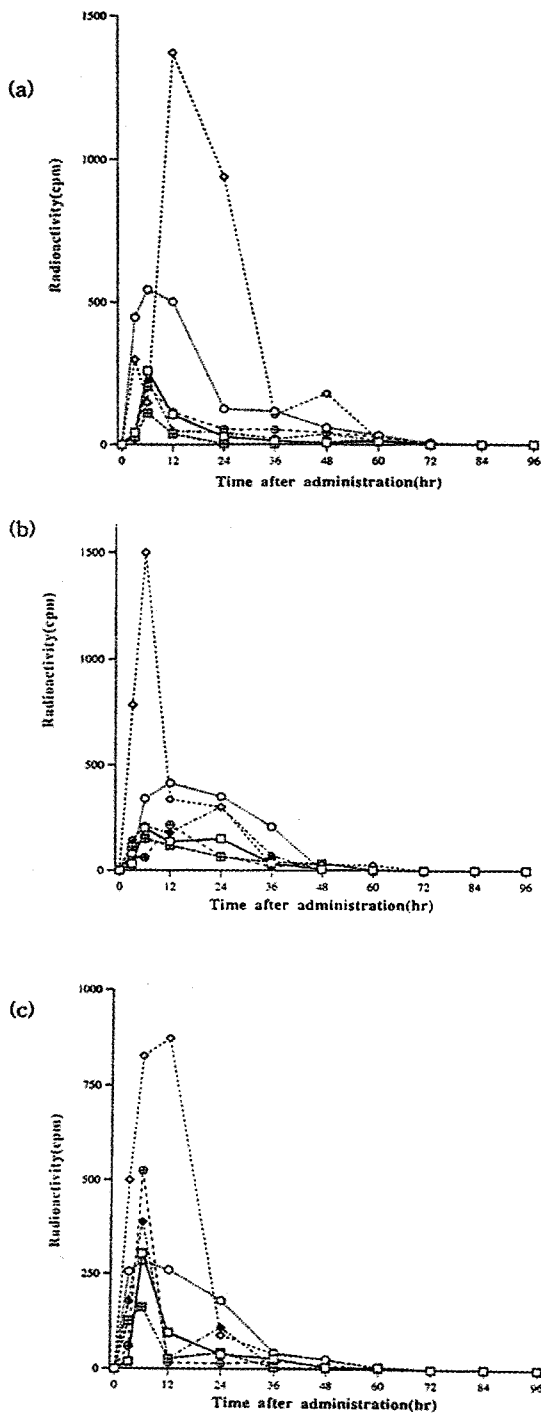


Fig. 8. Distribution of carbofuran and its metabolites in the feces of the rat treated with the ^{14}C -carbofuran(a), ^{14}C -carbofuran+phenobarbital sodium (PB) (b), and ^{14}C -carbofuran+3-methylcholanthrene (3-MC) (c).

—□— carbofuran; ---○--- 3-hydroxycarbofuran; ---◇--- 3-ketocarbofuran; ---田--- carbofuran phenol; ---⊕--- 3-hydroxycarbofuran phenol; ---◆--- 3-ketocarbofuran phenol.

보다 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여군이 이물질인 carbofuran을 배설이 쉬운 대사산물로 더 빠르게 분해시켜 대사된 것이라고 판단된다. 또한, 상기의 결과 중 48시간내에 소변과 대변을 통해 배설된 ^{14}C -radioactivity 총량이 단독투여군이나 조합투여군 모두 소변의 경우 79.9~81.1%, 대변은 5.7~6.5%로 나타나 쥐에서의 carbofuran 대사시 소변을 통해 90%가, 대변을 통해 3% 정도가 배설된다는 Kühr²⁾와 Dorough⁹⁾의 보고와는 약간의 차이를 나타냈으나 carbofuran은 주로 소변을 통해 배설됨을 알 수 있었다.

소변중 주 대사산물의 경시적 변화

소변에서의 carbofuran 및 그의 5가지 주 대사산물의 경시적 변화는 Fig. 7에 나타낸 바와 같다. Carbofuran 단독투여군 (Fig. 7a)의 쥐에서는 48시간까지 carbofuran이 배설되고 있었으나 carbofuran과 PB 조합투여군 (Fig. 7b)의 경우에는 36시간까지만 배설되었고, carbofuran과 3-MC 조합투여군 (Fig. 7c)은 48시간까지 배설되었으나 배설량이 24시간 이후에는 매우 낮아 초기에 배설되는 속도가 매우 빠름을 알 수 있었다. 한편, 배설되는 대사산물의 종류에서도 차이가 있었는데 그 결과는 약제투여후 12시간까지 대사되어 배설되는 주 대사산물이 carbofuran 단독투여군에서는 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran > carbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol > 3-ketocarbofuran phenol > carbofuran phenol 순으로 나타났고, 5가지 주 대사산물 총량 중 3-hydroxycarbofuran 45.2%, 3-ketocarbofuran 32.1%, carbofuran 8.5%, 나머지 대사산물 4.9%로 나타나 대사산물 중 독성이 강한 3-hydroxycarbofuran¹¹⁾이 차지하는 비율이 월등히 높았다.

Carbofuran과 PB (Fig. 7b) 또는 carbofuran과 3-MC 조합투여군 (Fig. 7c)에서는 약제투여후 12시간까지 대사되어 배설되는 주 대사산물이 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran > carbofuran phenol > carbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol > 3-ketocarbofuran phenol 순으로 나타났으며, 5가지 주 대사산물 총량 중 차지하는 비율은 각각 3-ketocarbofuran이 66.8%와 55.2%, 3-hydroxycarbofuran이 13%와 25.2%, 나머지 대사산물이 20.2%와 19.6%로 나타나 독성이 약한 3-ketocarbofuran이 차지하는 비율이 가장 높았다.

대변 중 주 대사산물의 경시적 변화

대변에서의 carbofuran과 그의 5가지 주 대사산물의 경시적 변화는 Fig. 8에 나타낸 바와 같다. Carbofuran 단독투여군 (Fig. 8a)의 경우 48시간까지 carbofuran이 배설되고 있었으나 carbofuran과 PB 조합투여군 (Fig. 8b)의 경우에는 36시간까지만 배설되었고, carbofuran과 3-MC 조합투여군 (Fig. 8c)에서는 48시간까지 배설되었으나 배설량이 24시간 이후에는 매우 낮아 조합투여후 초기 배설속도가 빠름을 알 수 있었다. 12시간까지 대사되어 배설되는 대사산물의 종류에서도 차이가 있었는데, carbofuran

단독투여군은 주 대사산물이 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran > carbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol > 3-ketocarbofuran phenol > carbofuran phenol 순으로 나타났다. Carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여군의 경우에는 주 대사산물이 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol > carbofuran > 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran phenol 순으로 배설량은 적었지만 소변에서의 주 대사산물의 변화와 비슷한 양상을 보였다.

따라서 소변과 대변으로 배설되는 carbofuran과 주 대사산물의 양으로 나타난 상기의 결과로 미루어 carbofuran 단독투여군의 경우 주 대사산물이 독성이 강한 3-hydroxycarbofuran 이었기 때문에 carbofuran이 대사되어 배설되는 과정에서도 대사산물에 의한 독성이 작용되었을 것으로 추정할 수 있었고, carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여군은 상대적으로 독성이 약한 대사산물이 주로 배설되고 있어 대사되는 과정에 독성이 약하게 작용함으로써 쥐의 생존을 가능하게 한 것이라 볼 수 있다.

요 약

쥐에서 carbofuran 대사에 미치는 phenobarbital sodium (PB) 또는 3-methylcholanthrene (3-MC)의 영향을 조사하기 위하여 쥐에 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여한 후 일정 간격으로 쥐의 주요 장기, 대변, 소변 및 혈액 중 대사산물의 종류와 생성율을 조사하였다. Carbofuran 단독투여와 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여 모두 경구투여 후 48시간 이내에 빠르게 배설되어 ¹⁴C-carbofuran 총 투여량의 79.9~81.1%가 소변으로, 5.7~6.5%가 대변으로 배설되었는데, 배설속도는 carbofuran 단독투여보다 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여에서 빨랐다.

쥐의 주요 장기, 대소변 및 혈액 중의 carbofuran의 대사산물은 공통적으로 3-hydroxycarbofuran, 3-ketocarbofuran, 3-hydroxycarbofuran phenol, 3-ketocarbofuran phenol과 carbofuran phenol이었고, 주요 대사산물은 3-hydroxycarbofuran과 3-ketocarbofuran이었는데, 주요 대사산물의 경우 carbofuran만의 투여에서는 3-hydroxycarbofuran이었으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여는 3-ketocarbofuran이었다.

소변 중 carbofuran의 2가지 주 대사산물의 생성율은 carbofuran 단독투여시 3-hydroxycarbofuran 17.4%와 3-ketocarbofuran 12.8%이었고, carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합투여시 3-hydroxycarbofuran 8.6%와 3-ketocarbofuran 23.5%로서, carbofuran 단독투여와 carbofuran과 PB 또는 3-MC 투여사이에 대사산물의 종류는 같았으나 생성율에는 큰 차이가 있었다. 이와 같은 결과는 쥐에 carbofuran 투여 후 PB나 3-MC를 투여함으로써 carbofuran의 대사가 빠르게 이루어지고, 주 대사산물 중 3-hydroxycarbofuran보다 독성이 낮은 3-ketocarbofuran으로의 대사가 빠르게 이루어지기 때문에 carbofuran의 독성이 경감되어 쥐가 생존할 수 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 원광대학교 교비지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Chung, J. H. (1978) Hazards due to organic phosphorus pesticides, *J. of Korean Medical Association* 21, 359-364.
2. Kuhr, R. J. (1968) Metabolism of carbamate insecticide chemicals in plants and insects, *J. Agr. Food Chem.* 18, 1023-1030.
3. Agricultural Chemicals Industrial Association (1996) *Agrochemicals Year Book*, Munseon Planning Press, Seoul, Korea.
4. Loewenstein, Y., Denarie, M., Zakut, H. and Soreq, H. (1993) Molecular dissection of cholinesterase domains responsible for carbamate toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 87, 209-216.
5. Lee, Y. D. (1988) Studies on the metabolism and fate of carbofuran in rice paddies, Ph. D. Thesis, Seoul National University, Seoul.
6. Chaudhry, G. R. and Ali, A. N. (1988) Bacterial metabolism of carbofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1414-1419.
7. Park, H. M. (1989) Studies on the resistance mechanism of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* STAL.) against fenobucarb, carbofuran and diazinon, Ph. D. Thesis, Seoul National University, Seoul.
8. Metcalf, R. L., Fukuto, T. R., Collins, C., Borck, K., El-Aziz, S. A., Munoz, R. and Cassil, C. C. (1968) Metabolism of 2,2-dimethyl-2,3-dihydrobenzo-furanyl-7-N-methylcarbamate (furan) in plants, insects, and mammals, *J. Agr. Food Chem.* 16, 300-311.
9. Dorough, H. W. (1968) Metabolism of furadan(NIA-10242) in rats and houseflies, *J. Agr. Food Chem.* 16, 319-325.
10. Lichtenstein, E. P., Kunstman J. L., Fuhremann, T. W. and Liang, T. T. (1979) Effects of atrazine on the toxicity; penetration and metabolism of carbofuran in the housefly, *J. Econ. Entomol.* 72, 780-788.
11. Han, S. S. and Rim, Y. S. (1998) Effect of phenobarbital sodium and 3-methylcholanthrene on metabolism *in vitro* and toxicity of ¹⁴C-carbofuran in rat, *Kor. J. of Pesticide Science* 2, 29-38.
12. Rim, Y. S. (1997) Elucidation of the mechanisms on inhibition of the enzyme activities of rats by the insecticide

- carbofuran and detoxification by phenobarbital sodium or 3-methylcholanthrene, Ph. D. Thesis, Wonkwang University, Iksan, Jeonbug, Korea.
13. Holden, E. R. and Cook, R. F. (1986) Pesticide Analytical Manual(vol. II), FDA, USA.
14. Kuhr, R. J. and Dorough, H. W. (1976) Carbamate Insecticides; Chemistry, Biochemistry, and Toxicology, CRC Press, USA.