

## 흰쥐를 이용한 profenofos의 경구투여 및 피부도포 후 노 중 대사물질 측정

조영주\* · 민경진<sup>†</sup> · 이인선\*\* · 차춘근

계명대학교 공중보건학과, \*농업과학기술원 환경생태과, \*\*계명대학교 TMR센터

### Determination of Urinary Metabolite of Profenofos after Oral Administration and Dermal Application to Rats

Young-Joo Cho\*, Kyung-Jin Min<sup>†</sup>, In-Seon Lee\*\* and Chun-Geun Cha

<sup>†</sup>Department of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

\*National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

\*\*The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

**ABSTRACT** – This study was aimed to determine the urinary metabolite of profenofos, one of the organophosphorus pesticides, as the biomarkers of exposure. Urine samples were collected for 24 hours in metabolic cages after oral administration and dermal application of profenofos to rats. Identification of the derivatized urinary metabolite was determined by GC/MS and excretion time courses of the urinary metabolite was analyzed by GC/MS. Urinary metabolite of profenofos, 4-bromo-2-chlorophenol, was detected in rats urine both after oral administration and dermal application of profenofos. Parent compound was not detected in the experiment. In GC/MS, the mass spectral confirmation for 4-bromo-2-chlorophenol ion was identified at m/z 208. 4-bromo-2-chlorophenol was excreted within 48 hours and 72 hours after oral administration and dermal application of profenofos, respectively. In this study, the same urinary metabolite of profenofos was detected both in oral and dermal exposure. Generally, excretion of the urinary metabolite after oral administration was detected faster than after dermal application. It is suggested that urinary 4-bromo-2-chlorophenol could be used as the biomarkers of exposure to profenofos.

**Key words** □ Profenofos, Metabolite, Urine, GC/MS

농약은 식량증산에 없어서는 안될 필수 농자재이다. 그러나 오·남용에 의한 국민보건 및 환경에 대해 유해성이 문제가 되고 있다. 특히 과다 사용 할 때 환경오염을 일으키며 농약에 따라서는 먹이사슬을 통하여 인체에 축적될 수도 있어 독성문제를 관심을 기울여야 할 물질이다.<sup>1)</sup> 농약은 사용 목적과 작용특성에 따라 살균제, 살충제, 살웅애제, 살서제, 식물생장조절제, 제초제 등으로 나누어진다. 주성분의 조성에 따라 유기인계, 카르바메이트계, 유기염소계, 유기비소계, 페녹시계, 피레스로이드계, 트리아진계 등으로 분류된다.<sup>2)</sup>

유기인계 농약은 일반적으로 생체 내에서 비교적 빠르게 분해, 배설되어 잔류성, 축적성이 적으며, 대량 섭취 할 때는 신경조직의 acetylcholinesterase를 비가역적으로 저해하여 acetylcholine이 축적되므로 신경장애를 일으켜 사망에 이르게 한다.<sup>3)</sup>

유기인계 농약은 cholinesterase 억제 외에도 중추신경계에 작용하여 여러 가지 증상을 유발하는데, 언어장애, 운동실조증,

혼동, 발작, 혼수 등의 증상이 나타날 수 있다. 한편 혈액 중 acetylcholinesterase가 기관지 천식, 간질, 갑상선 기능과다증, 고혈압, 당뇨병 등 일부 질환자에서는 감소되지 않을 수 있다.<sup>4)</sup>

유기인계 농약이 체내로 유입되면 여러 가지 대사과정이 일어나게 되며 대사물질은 대개 24시간 이내에 노에서 검출된다.<sup>5)</sup> 요의 대사물질 측정은 농약에 노출된 사람에게 있어 역학적, 독성학적 연구에 중요한 도구가 되어왔다.<sup>6)</sup> 만약 모 화합물이 변화되지 않고 배설되거나, 하나 또는 두 개의 주요한 대사물질로 배설되고, 배설이 대체적으로 빠르게 일어날 경우 (<72 hours), 대사물질을 간단한 분석기술로 미량까지 측정할 수 있다면 농약 노출에 대한 생체모니터링 지표로서 노 중 대사물질의 측정은 상당한 유용성이 있을 것이다.<sup>7)</sup> EPA의 자료에 의하면 유기인계 농약중 약 80% 정도가 공통적으로 노 중 dialkyl phosphates가 대사물질로 나온다.<sup>8)</sup> 또한 노 중 dialkyl phosphates을 대신하여 acetylcholinesterase 활성도 측정으로 미량까지 감지할 수 있다고 알려져 있다.<sup>9)</sup> 유기인계 농약의 주요한 노출 경로는 피부로서 전체 폭로

<sup>†</sup>Author to whom correspondence should be addressed.

의 87%를 차지한다고 알려져 있다. 따라서, 급성중독이 강한 유기인계 농약의 부적절한 취급은 심각한 중독을 일으킬 수 있으므로 경피흡수량은 반드시 조사해야 한다.<sup>10,11)</sup> 농약의 급성독성 효과는 쉽게 나타나지만 장기간 폭로나 저농도로 인한 만성독성 효과는 밝혀 내기가 어렵다고 알려져 있다.<sup>12)</sup>

경피흡수에는 세 가지 경로가 가능하다. 표피를 통한 진피로의 확산, 땀관을 통한 투과, 모낭을 통한 투과 등이다. 땀관과 모낭을 통한 경로는 혈관이 많은 진피층에 비교적 쉽게 도달할 수 있을 것으로 생각되지만, 표피세포를 통한 흡수는 넓은 표면적 때문에 독성물질의 주된 투과경로가 되며 피부가 주위환경에 계속적으로 노출되어 있기 때문에 피부흡수는 화학물질이 체내에 유입되는 주요한 경로일 수 있다.<sup>13)</sup> 따라서, 유기인계 농약에 대한 피부노출과 그 대사물질에 대한 연구는 유기인계 농약의 유해성 평가를 위하여 중요한 의의를 갖는다.

이 연구에 사용된 유기인계 농약은 상표명이 세레크론으로 진딧물, 담배나방약으로 사용되며 어독성 1급 농약인 profenofos 원제를 흰쥐에 경구투여 및 피부도포 후 뇨를 채취하여 대사물질을 확인함으로써 노출경로에 따른 뇨 중 대사물질을 비교하고 아직 밝혀지지 않은 대사물질을 확인하여 이 농약의 유해성 평가를 위한 기초자료로 제시하고자 한 것이다.

**실험재료 및 방법**

**실험재료**

**실험동물**

실험동물은 체중 150~200 g (5~6주령)의 Sprague Dawley 종의 수 흰쥐를 구입하여 사육실에서 일주일 이상 물과 사료를 자유로이 공급하면서 적응시켰다. 대조군 (normal control group, NC), propylene glycol 처리군 (propylene glycol treatment control group, PGTC)과 농약 처리군 (treatment group)으로 구분하여 각각 5마리씩 실험에 사용하였다.

**실험농약**

실험농약은 현재 국내에서 등록되어 있는 유기인계 농약인 profenofos 원제 [O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate, 96.3%, (주)경농]를 사용하였다.

**기기 및 시약**

실험에 사용된 기기로는 뇨 중 대사물질을 동정하기 위해서 Hewlett Packard (HP) 6890 GC에 연결된 HP 5972A MSD (mass selective detector)를 사용하였고, 회전증발농축기 (Rikakikai, NE-IS), 원심분리기 (Hanil Science, HA-1000-3) 및 그 외 실험실에서 사용하는 일반기기를 사용하였다.

유도체 시약인 TBAH (tetrabutylammonium hydroxide, 1.0 M in methanol)는 Aldrich사, 그 외 일반시약은 잔류농약 분석용으로 Wako사 제품을 구입하여 사용하였다.

**실험방법**

**분석방법**

이 연구에 사용된 대사물의 분석방법은 Richardson과 Seiber의 방법<sup>14)</sup>에 따랐다. 요 시료 1 ml를 채취하여 원심분리용 시험관에 취하고, 6N-HCl 1 ml를 넣고 1분간 vortex mixer로 혼합한 후 5% ethanol/ethyl acetate 1 ml를 넣고 2분간 vortex mixer로 다시 혼합하였다. 2000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 반복추출한 상층액을 합하여 35°C에서 감압 농축 후 ethyl acetate 1 ml를 넣고 완전히 녹였다. 이 용액에 TBAH 40 µl를 넣고 vortex mixer로 다시 격렬하게 혼합반응시켜 유도체를 만들고, 유도체화 된 시료 2 µl를 GC/MS에 주입하여 분석하였다. 요 중 대사물질을 동정하기 위한 GC/MS의 분석조건은 Table 1과 같다. GC/MS 조건으로 초기온도 80°C이며, 5°C/min으로 150°C까지 올린 후, 10°C/min으로 300°C까지 올렸다.

**Table 1. GC/MS conditions for the analysis of urinary metabolite.**

Item	GC/MS
Instrument	Hewlett-packard 6890
<b>GC conditions</b>	
Column	HP-5MS capillary 30 m × 0.25 mm (I.D.)
Temperature	Col. initial temp. 80 initial time 0 min rate 5, 10°C/min final temp. 150, 300°C final time 0 min Inj. 280°C
Carrier gas	He, 0.7 ml/min
Air	-
Hydrogen	-
Type of injection	Split (1/10)
Injection volume	2 µl
Detector	-
<b>MS conditions</b>	
MS	HP 5972A MSD
Ionization mode	Electron impact
Mass range	50-550 m/z
Electron energy	70 eV

### 실험동물에 대한 농약처리 및 뇨 시료 채취

Profenofos의 경구투여 실험에서 대조군은 물과 사료만을 공급한 군 (NC)과, propylene glycol을 5 ml/kg씩 경구투여한 군 (PGTC)으로 하였으며, 농약 처리군 (treatment)은 profenofos를 propylene glycol에 녹여 급성 경구독성 (LD<sub>50</sub> male rat: 358 mg/kg)의 1/10 농도로 zonde를 이용하여 경구투여하였다.<sup>15)</sup>

한편, 피부도포 한 실험에서는 실험일 24시간 전에 먼저 실험동물의 복부털을 제모기로 5×6 cm 이상 크기의 넓이로 면도한 다음 2.5×2.5 cm 크기 면적의 거즈에 profenofos를 일정하게 묻혀 면도된 부위에 도포 한 다음 의료용 반창고로 고정시켰다.<sup>16)</sup> 대조군은 피부에 아무 것도 도포시키지 않은 군 (NC)과, propylene glycol 처리군 (PGTC)은 propylene glycol만을 5 ml/kg씩 피부 도포시켰고, 농약 처리군 (treatment)은 profenofos를 propylene glycol에 녹여 급성 경피독성 (LD<sub>50</sub>

male rat: 3300 mg/kg)의 1/10 농도로 피부에 도포하였다.

쥐 한 마리씩을 각 metabolic cage에 넣어 물과 사료를 공급하면서 24시간 동안 뇨를 채취하여 추출방법에 따라 추출하고 유도체화 시켜 GC/MS로 대사물질을 동정하였다. 채취된 모든 시료는 분석 전까지 -20°C로 냉동 보관하였다.

한편, profenofos를 경구투여 및 피부도포 후 뇨 중 대사물질의 시간에 따른 배설량을 측정하기 위해 농약 처리된 쥐 한 마리씩을 각 metabolic cage에 넣어 물과 사료를 공급하면서 6, 12, 24, 48, 72, 96시간의 뇨를 채취하여 전술한 방법에 따라 실험처리 한 후 GC/MS로 분석하였다. 요 중 대사물질의 시간별 배설량 측정은 총 배설량 (peak area)에 대한 시간별 배설량 (peak area)을 백분율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 경구투여 후 뇨 중 대사물질 측정

원위에 profenofos를 경구투여 후 뇨 중 대사물질을 측정 한 결과는 다음과 같다. 대조군 (NC), propylene glycol만을 투여한 쥐 (PGTC) 및 profenofos를 투여한 쥐 (treatment)에서 각각 24시간 동안 뇨를 채취하여 분석한 GC/MS의 total ion chromatogram은 Fig. 1 (A), (B), (C)와 같다. 농

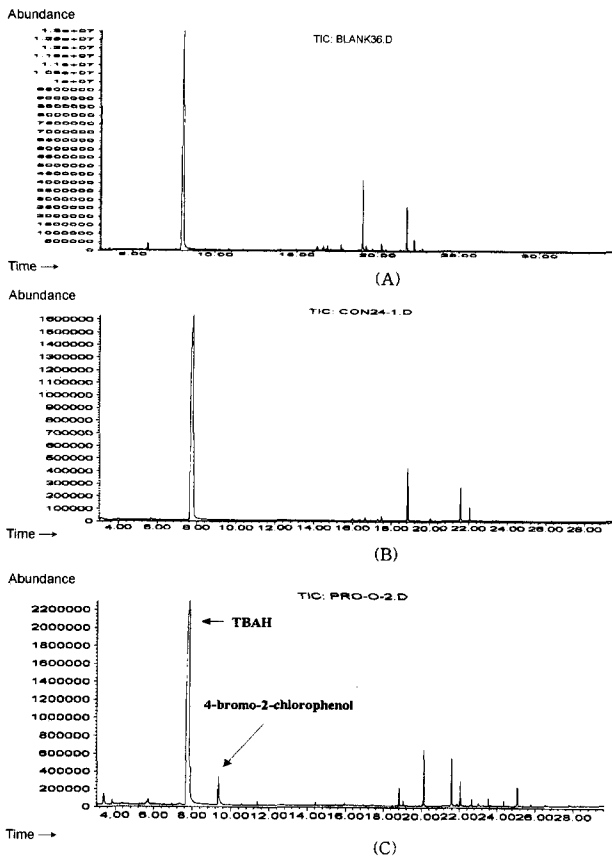


Fig. 1. GC/MS total ion chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine (C) in oral administration of profenofos to rats. (NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)

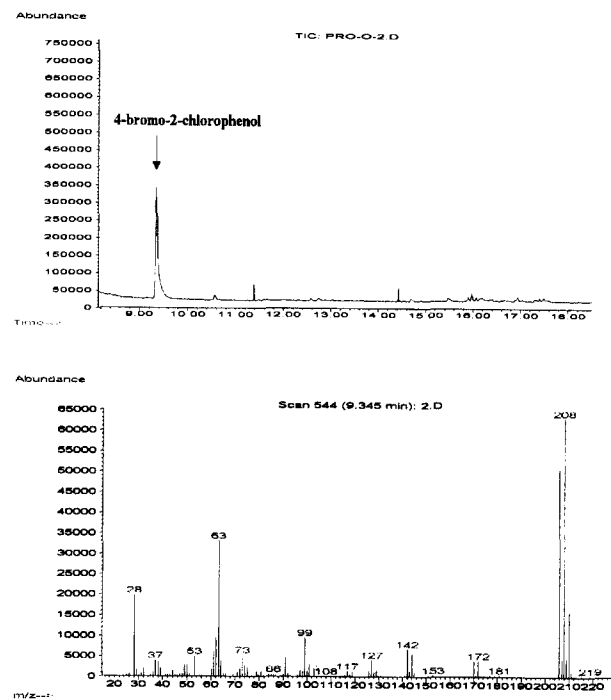


Fig. 2. GC/MS total ion chromatogram and mass spectrum of urinary metabolite (4-bromo-2-chlorophenol) in oral administration of profenofos to rats.

약 처리군에서 4-bromo-2-chlorophenol은 9분대에서 나타났다. GC/MS의 분석결과에서 대조군과 propylene glycol 처리군에서 4-bromo-2-chlorophenol의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. 4-bromo-2-chlorophenol의 주요 조각 이온은  $m/z=208, 142, 99, 63$ 으로 추정되었고 total ion chromatogram과 질량 스펙트럼은 Fig. 2와 같다. 4-bromo-2-chlorophenol의 질량 스펙트럼은 민과 차<sup>17)</sup>의 연구자료에 근거하여 주요조각이온을 추정하였다. 한편, 4-bromo-2-chlorophenol 외 다른 대사물질을 알아보고자 유도체화 하지 않은 시료를 GC/MS로 추정한 결과 다른 대사물질을 찾아볼 수 없었다.

**피부도포 후 뇨 중 대사물질 측정**

흰쥐에 profenofos를 피부도포 후 뇨 중 대사물질을 측정 한 결과는 다음과 같다. 대조군 (NC), propylene glycol 만을 투여한 쥐 (PGTC) 및 profenofos를 투여한 쥐 (treatment)에

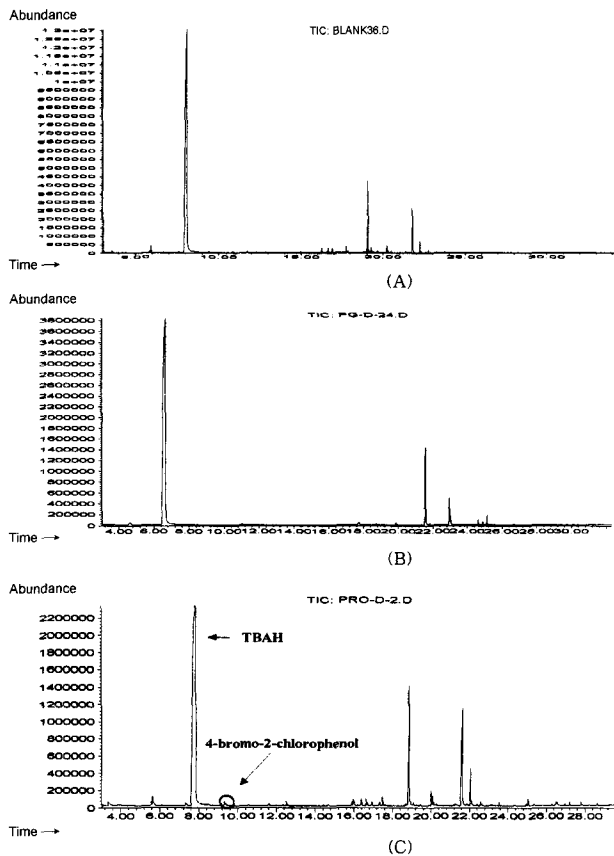


Fig. 3. GC/MS total ion chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine (C) in dermal application of profenofos to rats. (NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)

서 각각 24시간 동안 뇨를 채취하여 분석한 GC/MS의 total ion chromatogram은 Fig. 3 (A), (B), (C)와 같다. 농약 처리군에서 4-bromo-2-chlorophenol은 9분대에서 나타났다. GC/MS의 분석결과에서 대조군과 propylene glycol 처리군에서 4-bromo-2-chlorophenol의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. 4-bromo-2-chlorophenol의 주요 조각 이온은  $m/z=208, 142, 99, 63$ 으로 추정되었고 total ion chromatogram과 질량 스펙트럼은 Fig. 4와 같다. 4-bromo-2-chlorophenol의 질량 스펙트럼은 민과 차<sup>17)</sup>의 연구자료에 근거하여 주요조각이온을 추정하였다. 한편, 4-bromo-2-chlorophenol 외 다른 대사물질을 알아보고자 유도체화 하지 않은 시료를 GC/MS로 추정한 결과 다른 대사물질을 찾아볼 수 없었다.

유기인계 농약에 대한 폭로평가인자로 뇨 중에서 alkyl phosphates와 phenolic 대사물질을 측정함으로써 결정짓는데, 대부분의 유기인계 농약은 6개의 alkyl phosphates 대사물질을 가지고 있기 때문에 대사물질을 측정하는데 alkyl phosphates의 검출이 더 나은 측정법이며, 뇨 중 phenolic 대사물질의 검출은 특정한 농약에 폭로된 경우에만 확인된다.<sup>18)</sup> 따라서 profenofos인 경우 뇨 중 phenolic 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol이 배설되는 점으로 미루어보아 profenofos에 폭로된 경우 4-bromo-2-chlorophenol이 생체모니터링의 지표

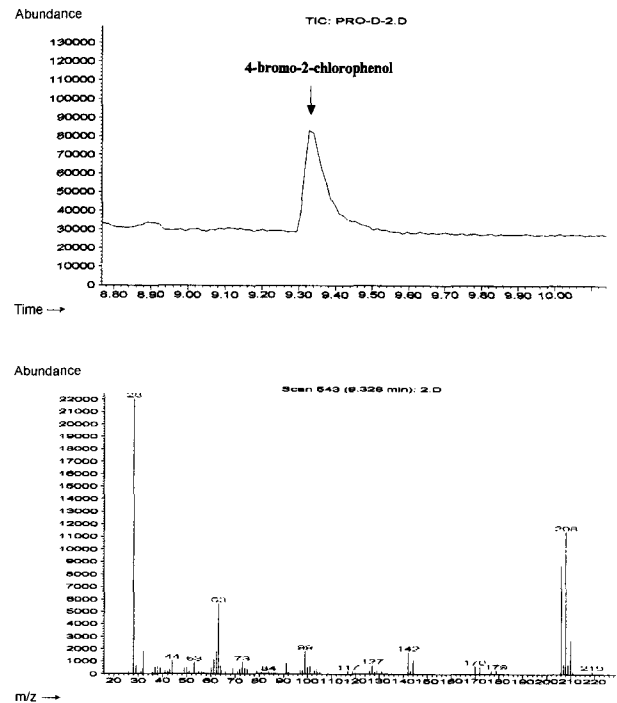


Fig. 4. GC/MS total ion chromatogram and mass spectrum of urinary metabolite (4-bromo-2-chlorophenol) in dermal application of profenofos to rats.

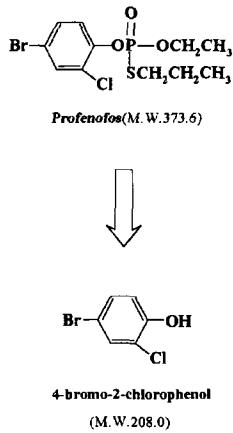


Fig. 5. Proposed metabolite of profenofos in rats.

물질로 사용될 수 있을 것이라 생각된다. 한편 4-bromo-2-chlorophenol은 profenofos의 가수분해, 광분해, 생분해 산물로도 추정된 바 있다.<sup>17)</sup> 이 실험결과 환쥐에 profenofos를 경구투여 및 피부도포 후 뇨 중 대사물질은 4-bromo-2-chlorophenol로 추정되어 환경 내 분해생성물과도 동일함을 알 수 있었다 (Fig. 5).

**경구투여 후 뇨 중 대사물질의 시간별 배설량 측정**

Profenofos를 쥐에 경구투여 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 동안 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol의 총 배설량에 대한 시간별 배설량을 백분율로 나타낸 결과는 Table 2와 같다. Profenofos의 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol이 48시간 내 95%가 배설되었고 12시간에 가장 많은 양이 배설되었으며, 72시간 이후는 배설되지 않았다.

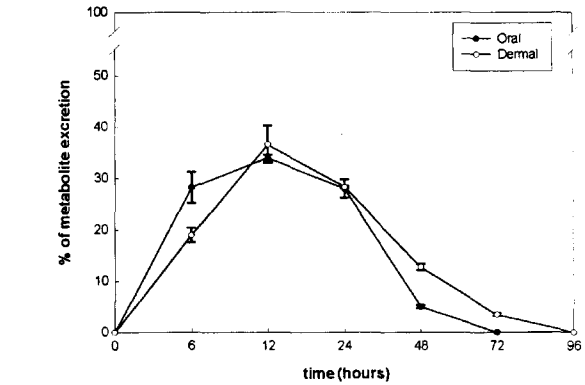


Fig. 6. Comparison excretion time courses of urinary 4-bromo-2-chlorophenol in oral and dermal exposure of profenofos to rats.

**피부도포 후 뇨 중 대사물질의 시간별 배설량 측정**

Profenofos를 쥐에 피부도포 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 동안 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol의 총 배설량에 대한 시간별 배설량을 백분율로 나타낸 결과는 Table 3과 같다. Profenofos의 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol이 48시간 내 87%가 배설되었고 12시간에 가장 많은 양이 배설되었으며, 96시간 이후는 배설되지 않았다. Profenofos의 투여경로에 따른 시간별 배설량의 비교는 Fig. 6과 같다. 투여경로에 따라 4-bromo-2-chlorophenol에 대한 뇨 중 반감기를 일분획 모형 (one-compartment model)으로 측정한 결과 경구투여 후 8.9시간이었고 피부도포 후 10.3시간이었다. 경구투여보다 피부도포 후 배설이 지연됨을 알 수 있었다.

Table 2. Excretion time course of urinary 4-bromo-2-chlorophenol in oral administration of profenofos to rats.

	Percentage of time course (hours)					
	6	12	24	48	72	96
4-bromo-2-chlorophenol	28.16 ± 3.04	33.86 ± 0.72	27.92 ± 1.75	5.05 ± 0.24	*ND	ND

Oral dose level: 35.8 mg/kg (1/10 of LD<sub>50</sub>).

\*ND: not detected.

Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments and one experiment used five rats.

Table 3. Excretion time course of urinary 4-bromo-2-chlorophenol in dermal application of profenofos to rats.

	Percentage of time course (hours)					
	6	12	24	48	72	96
4-bromo-2-chlorophenol	18.93 ± 1.42	36.56 ± 3.69	28.28 ± 0.19	12.74 ± 0.59	3.50 ± 0.29	*ND

Dermal dose level: 330 mg/kg (1/10 of LD<sub>50</sub>)

\*ND: not detected

Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments and one experiment used five rats.

## 감사의 글

통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전

## 국문요약

원취를 이용하여 profenofos를 경구투여 및 피부도포 후 뇨 중 대사물질과 뇨 중 대사물질의 시간별 배설량을 GC/MS로 측정된 결과는 다음과 같다. Profenofos를 경구투여 후 뇨 중 대사물질은 4-bromo-2-chlorophenol이며, GC/MS로 분석한 결과 4-bromo-2-chlorophenol는 m/z=208에서 분자이온을 추정하였다. Profenofos를 피부도포 후 뇨 중 대사물질은 경구투여와 동일한 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol이었다. 모 화합물이나 4-bromo-2-chlorophenol의 다른 대사물질은 검출되지 않았다. Profenofos를 경구투여 후 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol의 시간별 배설량은 12시간에 가장 많은 양이 배설되었다. 또한 48시간 내 95%가 배설되었고 72시간 이후는 대사물질이 배설되지 않았다. 한편 profenofos를 피부도포 후 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol의 시간별 배설량은 12시간에 가장 많은 양이 배설되었으며, 48시간 내 87%가 배설되었고 96시간 이후는 대사물질이 배설되지 않았다. Profenofos의 뇨 중 대사물질인 4-bromo-2-chlorophenol는 profenofos의 생체모니터링 지표물질로서 사용될 수 있을 것이라고 생각되며, 뇨 중 4-bromo-2-chlorophenol의 시간별 배설량을 측정된 결과 경구투여보다 피부도포 후 배설이 지연된다는 것을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. 농약공업협회: 99' 농약년보. 농약공업협회 (1999).
2. 정영호, 박영선: 농약학. 전국농업기술자협회, 문선사, (1990).
3. Levi, P. E.: Modern toxicology. Elsevier, New York, 185-232 (1987).
4. Zenz: Occupational medicine. 2nd, Medical Publishers, Chicago. (1988).
5. Aprea, C., Sciarra, G., Orsi, D., Boccalon, P., Sartorelli, P. and Sartorelli, E.: Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). *The Science of the Total Environment*, **177**, 37-41 (1996).
6. Draper, W. M., Wijekoon, D. and Stephens, R. D.: Determination of malathion urinary metabolites by isotope dilution ion trap GC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1796-1801 (1991).
7. Fenske, R. A. and Leffingwell, J. T.: Method for the determination of dialkyl phosphate metabolites in urine for studies of human exposure to malatjion. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 995-998 (1989).
8. Park, S. S., Pyo, H., Lee, K. J., Park, S. J. and Park, T. K.: The analysis of common metabolites of organophosphorus pesticides in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **19**, 45-50 (1998).
9. Nutley, B. P. and Cocker, J.: Biological monitoring of workers occupationally exposed to organophosphorus pesticides. *Pestic. Sci.*, **38**, 315-322 (1993).
10. Franklin, C. A., Fenske, R. A., Greenhalgh, R., Mathieu, L., Denley, H. V., Leffingwell, J. T., Spear, R. C.: Correlation of urinary pesticide metabolite excretion with estimated dermal contact in the course of occupational exposure to guthion. *J. of Toxicology and Environmental Health*, **7**, 715-731 (1981).
11. Maroni, M., Fait, A. and Colosio, C.: Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, **107**, 145-153 (1999).
12. He, F.: Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. *Toxicology Letters*, **108**, 277-283 (1999).
13. Wester, R. C., Sedik, L., Melendres, J., Logan, F., Maibach, H. I. and Russell, I.: Percutaneous absorption of diazinon in humans. *Fd. Chem. Toxic.*, **31**, 569-572 (1993).
14. Richardson, E. R. and Seiber, J. N.: Gas chromatographic determination of organophosphorus insecticides and their dialkyl phosphate metabolites in liver and kidney samples. *J. Agr. Food Chem.*, **41(3)**, 416-422 (1993).
15. Tomlin, C.: The pesticide manual. 10th, Crop Protection Publications, U.K., 1994.
16. Marco, G. J., Simoneaux, B. J., Williams, S. C., Cassidy, J. E., Bissig, R. and Muecke, W.: Dermal exposure related to pesticide use. ACS, Washington, D. C., 43-61, 1985.
17. 민경진, 차춘근: Phosphamidon과 profenofos의 광분해성. *환경위생학회지* **26**, 49-58 (2000).
18. Coye, M. J., Lowe, J. A. and Maddy, K. J.: Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites. *J. of Occup. Med.*, **28**, 628-636 (1986).