

호소 저해법을 이용한 유기인계 및 Carbamate계 농약의 다성분 잔류 검출

김 정 호

경산대학교 환경학부

Detection for Multiresidue of the Organophosphorus and Carbamate Pesticides by Enzyme-Inhibition Method

Jung-Ho Kim

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

ABSTRACT

This study was carried out with the detection for multiresidue of the organophosphorus pesticides such as malathion, parathion, diazinon, and carbamate pesticide such as carbaryl, by enzyme-inhibition method. The acetylcholinesterase (AChE) and cholinesterase (ChE) activities in chicken brain determined by the Ellman's method were 166.6 and 5.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein, and in chicken plasma were 23.1 and 8.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein, respectively. The optimum pH of AChE and ChE was 8.2 and 7.8, respectively. The K_m of AChE and ChE was 0.034 and 0.045 mM, respectively. I_{50} for AChE and ChE by some organophosphorus was 55.82 and 99.42 mg/L of malathion, 31.16 and 29.13 mg/L of parathion, and 17.89 and 19.62 mg/L of diazinon, respectively. I_{50} for AChE and ChE by carbaryl of carbamate was 0.10 and 0.05 mg/L, respectively. The 0.07 mg/L of drinking water advisory level for carbaryl could be detected with I_{50} of AChE and ChE. Enzyme-Inhibition (EI) method with AChE and ChE was used the multiresidue method to detect the 1 mg/L of the carbamate pesticides.

Key words : Multiresidue method, Enzyme inhibition, Bioindicators, Acetylcholinesterase, Cholinesterase, Organophosphorus pesticides, Carbamate pesticides.

서 론

환경시료 중 농약의 잔류량을 분석하는 데에는 두 종류의 분석학적 접근법이 있다. 이는 단성분 잔류분석법 (SRM, Single-Residue Methods)과 다성분 잔류분석법 (MRM, Multiresidue Method)으로 구분된다. 단성분 잔류분석법은 농약 잔류 규제의

대상인 한 성분의 농약을 정량분석하는 잔류분석법이다. 다성분 잔류분석법은 환경시료 중에서 한 성분보다 많은 다성분 농약을 검출 할 수 있는 잔류분석법이다 (Abad *et al.*, 1998; Bachmann and Schmid, 1999; Bachmann *et al.*, 2000). 단성분 잔류 분석법에 의한 잔류 농약의 정량은 환경 시료 내에 존재하는 농약에 대해서 각각의 농도를 측정한다. 그러나 다성분 잔류분석법은 잔류 농약의 분석 대상이 포괄적이다. FDA를 비롯한 많은 분석 기관은 단성분 잔류분석법으로 농약 잔류량을 정량분

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-53-819-1416, E-mail: kim@ik.ac.kr

석하기 전에 주어진 시료 중에서 잔류 규정을 초과한 시료가 있는지를 알아보기 위한 감시 프로그램에 간편하고 편리한 다성분 잔류분석법을 종종 이용한다.

다성분 잔류분석법을 이용한 잔류 농약의 검사는 농약이 잔류허용기준이나 법적 기준을 초과하여 존재하는가를 빠르고 간편하게 분석할 수 있다 (Saul *et al.*, 1995). 이러한 접근법은 대개 세밀한 분석을 하기에 앞서 실시한다. 다성분 잔류분석법으로는 효소면역분석법, Cholinesterase 효소저해 시험법 등이 있다. 여기서 cholinesterase 효소 저해 시험법은 유기인계 또는 carbamate계 살충제를 검색하는 방법이다 (Evtugyn *et al.*, 1996; Ghindilis *et al.*, 1996; Mionetto *et al.*, 1994).

생체내의 많은 효소들은 농약처리에 의해 영향을 받는다. 유기인계 및 carbamate계 농약은 acetylcholinesterase 활성을 저해함으로써 신경기능 저해제로 작용하게 된다 (Eto, 1974; Kuhr, 1977). 신경전달물질 중에서 특히 acetylcholine을 가수분해하는 효소계는 acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7., AChE, specific cholinesterase, truecholinesterase, redcell cholinesterase)와 cholinesterase (E.C. 3.1.1.8., ChE, nonspecific cholinesterase, pseudocholinesterase, serum cholinesterase)가 있다 (Bergmeyer, 1984). 유기인계 및 carbamate계 농약의 경우 AChE 및 ChE와 작용하므로, 이들 효소를 농약을 검출할 수 있는 biosensor로 이용할 수 있을 것이다 (Aprea *et al.*, 2002).

효소를 이용한 다성분 잔류분석법은 화학적, 기학적 분석방법 보다 상대적으로 시험과정이 간편하고 짧은 시간 내 신속하게 결과를 얻을 수 있다 (Collier *et al.*, 2002). *in vitro* 조건에서 AChE와 ChE를 이용한 효소저해법을 유기인계와 carbamate계 농약의 검출 기법에 이용한다면 이들 농약에 의한 환경오염도의 측정용 지표로 이용될 수 있으므로 이는 농약의 생물학적 검색기법으로 응용되고 있다 (Ivanov *et al.*, 2002).

현재 먹는 물 관리법에 의한 먹는 물 수질기준에서 농약으로는 신경저해제에 속하는 유기인계 농약과 carbamate계 농약의 허용기준을 설정하고 있다. 유기인계 농약으로는 malathion이 0.25 mg/L, parathion은 0.06 mg/L, diazinon은 0.02 mg/L을 넘지 못하게 규정하고 있다. Carbamate계 농약으로는

carbaryl 한가지만 규제하고 있는데 0.07 mg/L을 넘지 못하게 하고 있다 (환경부, 2002). 먹는 물 수질 기준에서 규제하고 있는 유기인계와 carbamate계 농약의 화학적 분석에 앞서 효소저해법으로 이들 농약을 조기에 쉽고 빠르고 검출할 수 있기 때문에, enzyme inhibition기술을 개발할 필요성이 크게 요구되고 있다. *in vitro* 조건에서 enzyme inhibition 방법으로 측정된 각종 유기인계 및 carbamate계 농약과 AChE 및 ChE활성 저해와의 관계는 유기인계 및 carbamate계 농약의 검출 기법 개발에 응용할 수 있다.

AChE와 ChE를 이용해서 Reybier 등 (2002)은 potentiometric ChE biosensors를, Gulla 등 (2002)은 amperometric ChE biosensors를, Dzyadevych 등 (2002)은 conductometric ChE biosensors에 관해 보고하였다. Collier 등 (2002)은 ChE biosensors를 이용해서 양의 털에 잔류된 diazinon과 chlordane 등의 유기인계농약을 검정하였다. Albareda 등 (2001)과 Dzyadevych과 Chovelon (2002)은 AChE와 ChE를 이용한 생물 검정법으로 물 중에서 유기인계 농약과 carbamate계 농약의 검출에 대해 보고한 바 있다. 그러나 효소저해법을 이용한 음용수 허용기준 설정 농약인 malathion, parathion, diazinon과 carbaryl에 대해 연구 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 AChE와 ChE를 이용한 효소저해법으로 음용수 허용기준 설정에서 제시된 유기인계 및 carbamate계의 농약의 다성분 검출기법을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시농약 및 동물

본 연구에 사용된 유기인계 농약은 malathion [S-1, 2-bis (ethoxycarbonyl)ethyl O, O-dimethyl phosphorodithioate], parathion [O-4-nitrophenyl O, O-diethyl phosphorothioate]과 diazinon [O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl O, O-diethyl phosphorothioate]을 택하였다. Carbamate계 농약은 carbaryl [1-naphthyl methylcarbamate]을 택하였다 (Tomlin, 2000). 공시농약은 농약연구소에서 분양 받은 표준품(순도 99.9% 이상)을 acetone에 용해하여 사용하였다.

공시동물은 부화 후 1일된 병아리(Hy-Line W-77, mail) 중에서 43~47 g 되는 건전한 개체를 사용하였다.

2. 효소 활성도 측정

AChE 및 ChE 활성도 측정은 Ellman (1961) 등의 방법에 준하여 다음과 같이 하였다. AChE 효소액은 시험동물의 뇌 전부를 취하여 인산완충용액(0.1 M, pH 8.2)을 무게의 2배 첨가하고 균질화 한 다음 15,000 rpm (4°C)으로 20분간 원심 분리한 후 상등액을 사용하였다. ChE 효소액은 실험동물의 경부를 절단하고 heparin으로 처리된 원심분리관에 혈액을 채취한 후, 이를 3000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 사용하였다.

기질로는 acetylthiocholine iodide (0.075 M)과 butyrylthiocholine iodide (0.075 M)를 사용하였다. 효소활성 측정은 25°C에서 인산완충용액(0.1 M, AChE는 pH 8.2, ChE는 pH 7.8) 3 mL, 기질 50 µL, dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB 0.01 M) 50 µL에 효소액 50 µL을 가한다. 1분 후 cholin과 DTNB와 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 spectrophotometer (Shimadzu UV-200)로 412 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 µmol acetylthiocholine/min/g protein으로 나타내었다. 여기서 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하였으며, 표준품은 bovine serum albumin (Sigma 제)을 사용하였다. pH 영향은 인산완충용액에서 20시간 항온한 후 효소활성을 측정하였다.

3. 효소저해 실험

인산완충용액(0.1 M) 3 mL에 효소액 50 µL과 공시농약을 50 µL을 가하였다. Enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 필요한 항온시간은 일정하게 30분으로 하였으며, 37°C에서 30분 후 효소 활성을 측정하였다. 대조구는 acetone를 동일량 첨가하였으며, 효소활성의 저해율은 다음과 같이 계산한다.

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

여기서 A는 대조구의 효소 활성이며, B는 농약 처리구의 효소활성이다. 저해율의 비교는 효소활성의 50%가 저해되는데 필요한 반응액 중의 농도인

I₅₀으로 표현하며, pI₅₀ = -log I₅₀이다.

결과 및 고찰

1. 효소 활성도

Ellman 등(1961)의 방법으로 뇌AChE와 혈장 ChE 활성을 측정한 결과 Table 1과 같다. 뇌에서 기질로 acetylthiocholine iodide와 butyrylthiocholine iodide일 때 효소활성은 각각 166.67 µmol/min/g protein과 5.80 µmol/min/g protein이었다. 혈장에서는 기질로 acetylthiocholine iodide와 butyrylthiocholine iodide일 때 각각 23.12 µmol/min/g protein과 8.32 µmol/min/g protein이었다. 따라서 뇌에서는 butyrylthiocholine iodide보다 acetylthiocholine iodide에 기질 특이성이 나타났다. Acetylcholinesterase는 신경조직, 적혈구 및 근육 등에 존재하는데 신경전달물질인 acetylcholine에 기질특이성이 있으므로 신경전달에 중요한 역할을 한다. Cholinesterase는 혈장, 간장 및 신장 등에 존재하며 acetylcholine에 기질특이성이 없다. 이에 혈액 중에서 적혈구에 있는 것은 acetylcholinesterase (AChE)라고 하고, 혈장에 있는 것을 cholinesterase (ChE)라 한다(Bergmeyer, 1984).

Acetylcholine은 AChE 및 ChE에 의해 가수분해되어 choline과 acetic acid로 된다. 여기서 AChE 및 ChE활성의 측정은 choline량을 측정하는 Ellman법(1961)이 있다. Ellman법은 기질로 사용된 acetylthiocholin이 가수분해되어 생성된 thiocholine을 dithiobisnitrobenzoic acid와 반응시켜 생성된 5-thio-2-nitrobenzoic acid를 비색정량하는 방법이다. Ellman법은 시험방법이 비교적 간단하며 짧은

Table 1. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in brain and plasma of chickens

Tissue	Substrate	
	Acetylthiocholine µmol/ min/g protein	Butyrylthiocholine µmol/ min/g protein
Brain	166.67 ± 3.8 ¹⁾	5.80 ± 0.35
Plasma	23.12 ± 0.38	8.32 ± 1.57

¹⁾n = 5, Mean ± SD

시간에 측정할 수 있고 감도가 높기 때문에 본 연구에서는 AChE 및 ChE 활성 측정에 사용하였다.

2. 효소의 특성

인산완충용액을 사용하여 pH를 조정한 용액에서 ChE의 상대적 활성도는 Fig. 1과 같았다. 여기서 AChE 및 ChE의 최적 pH는 8.2와 7.8이었다. 따라서 AChE 및 ChE 측정용액의 pH는 8.2와 7.8로 하였다.

기질과 효소 반응속도를 Lineweaver-Burk plot (Stryer, 1981)하면 Fig. 2와 같다. AChE 및 ChE의 Km은 각각 0.034와 0.045 mM 이었다. 여기에 저해제로 유기인계 농약 Malathion을 5.00×10^{-4} M 첨가하여 저해를 조사하였다. Malathion의 I₅₀은 AChE 및 ChE에서 각각 1.69×10^{-4} 및 3.01×10^{-4} M이며 (Table 2), 이를 기준으로 1.5~3배의 농도를 택하였다. 저해제 malathion이 첨가된 AChE+I 및 ChE+I의 Km은 각각 대조구 보다 높은 0.052와 0.048 mM 이었으며 저해가 나타났다.

일반적으로 효소반응은 다음 식과 같이 효소와 기질이 반응한다 (Stryer, 1981).



(E: 효소, S: 기질, P: 생성물)

여기서 저해제 (I)가 첨가되면 저해제가 기질보다 효소와 친화력이 더 큰 경우 저해제와 결합하여 효소-저해제 복합체 (EI)가 형성된다.

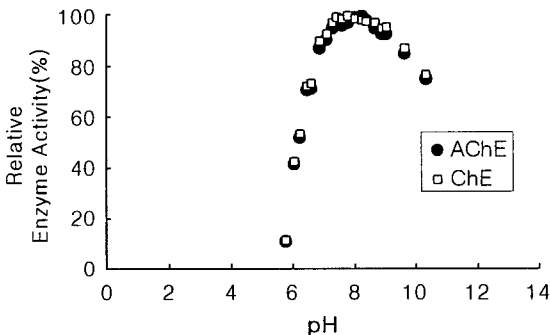
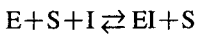


Fig. 1. Effect of pH on the acetylcholinesterase and cholinesterase activity.

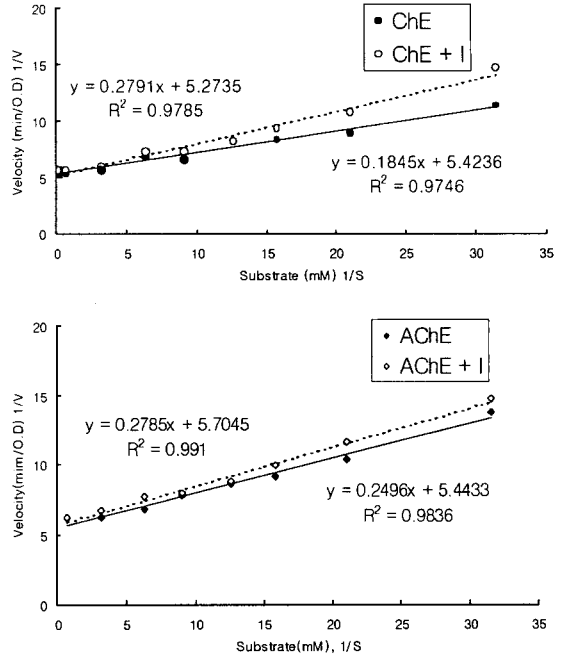


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of the acetylcholinesterase and cholinesterase activity.

이때 저해제 (I)를 검출하기 위해 효소 저해율을 측정할 수 있는데 이를 Enzyme-Inhibition (EI)법 (유홍일 등, 1991)이라 한다. 여기서 Fig. 2에서와 같이 유기인계 농약에 의한 AChE+I 및 ChE+I의 한 저해가 나타났다 (Stryer, 1981).

유기인계농약과 carbamate계 농약은 유기염소계 농약보다는 잔류기간이 짧으나 신경전달 효소인 AChE와 ChE을 저해하여 생태독성이 강하다. 따라서 이러한 AChE와 ChE을 저해를 생물학적 검정 지표 (Biomarker)로 이용하면 유기인계농약과 carbamate계 농약을 검출할 수 있다 (Varo et al., 2002).

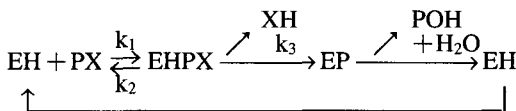
3. 유기인계 농약

유기인계농약으로 malathion, parathion, diazinon의 pI와 효소 활성도와의 관계는 Fig. 3과 같았으며, 여기서 계산된 I₅₀과 Ki는 Table 2와 같다. pI₅₀은 효소의 활성도가 50%으로 저해되는데 필요한 저해제의 log 농도이다. I₅₀ 값은 효소의 활성도가 반으로 저해되는데 필요한 저해제의 농도로써, I₅₀ 값이 적을수록 효소에 강한 저해제가 된다. Malathion, parathion, diazinon의 AChE I₅₀ 값은 각각 55.82,

31.16 및 17.89 mg/L이었고, ChE I₅₀ 값은 99.42, 29.13 및 19.62 mg/L이었다.

유기인계농약은 크게 P=S형과 산화형태인 P=O형으로 구분할 수 있는데 일반적으로 P=S형이 P=O형 보다 1000~10000배 정도 독성이 약하다 (Eto, 1974). Malathion, parathion, diazinon은 모두 P=S형이기 때문에 I₅₀ 값이 크게 나타났으며, carbamate계인 carbaryl보다 매우 크게 나타났다 (Table 2). 먹는 물 관리법에 의한 먹는 물 수질기준으로 malathion은 0.25 mg/L, parathion은 0.06 mg/L, diazinon은 0.02 mg/L (환경부, 2002)로 본 실험에서의 AChE와 ChE에 대한 pI₅₀은 먹는 물 수질기준의 허용농도보다 상당히 높았다. 따라서 먹는 물 수질 기준값을 검정하기 위해서 물 시료의 추출 및 농축 과정을 거쳐 유기인계 농약의 잔류 농도를 높게 한다면 효소저해법을 적용할 수 있다. 또한 검출감도가 높은 potentiometric ChE biosensors (Reyber *et al.*, 2002), amperometric ChE biosensors (Gulla *et al.*, 2002), conductometric ChE biosensors (Dzyadevych *et al.*, 2002)와 같은 방법을 이용하면 된다.

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

특성을 나타내는 지표로 사용된다. I₅₀과의 관계는 $K_i = \frac{0.695}{I_{50} \times T}$ (T: 반응시간 30분)이다 (Eto, 1974). 유기인계 종류별 K_i는 Table 2와 같았다. AChE에서 malathion의 K_i는 137 moles⁻¹ mim⁻¹이었으며, parathion의 경우 216 moles⁻¹ mim⁻¹이며, diazinon은 393 moles⁻¹ mim⁻¹이었다. 이와 같이 유기인계 형태

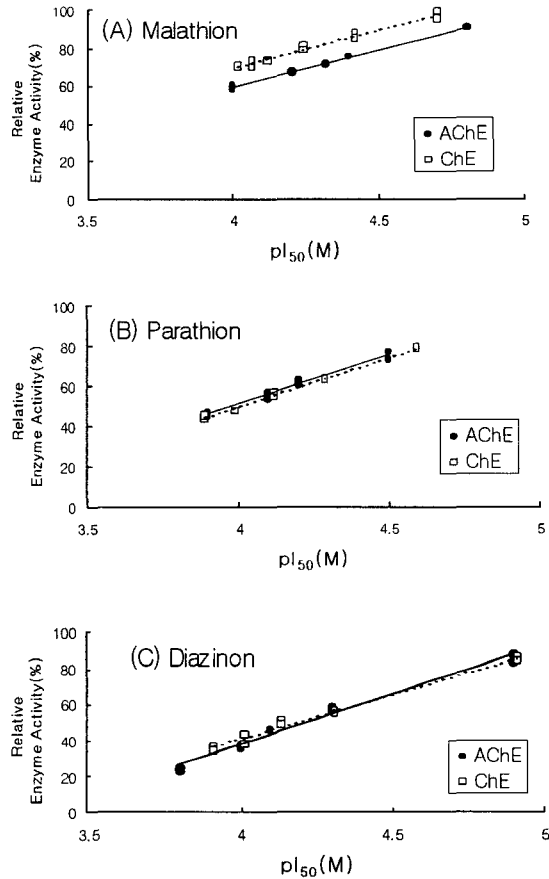


Fig. 3. Inhibition of acetylcholinesterase and cholinesterase activity on the organophosphorus pesticides, such as (A)malathion, (B)parathion, and (C)diazinon.

에 따라 K_i 값이 각각 다르게 나타난 것은 AChE의 anionic site와 esteratic site의 결합거리와 입체형태 등과 유기인계 농약 형태와 상호 친화력 차이 때문이다. 즉 K_i 값이 크면 AChE와 ChE의 활성기와 유기인계 농약과의 친화력은 커지게 되고, 따라서 신경독성이 더 강해진다 (Matsumura, 1975).

4. Carbamate계 농약

Carbamate 농약에 속하는 carbaryl의 pI와 효소 활성도와의 관계는 Fig. 4와 같았으며, 여기서 계산된 I₅₀과 K_i는 Table 2와 같다.

Carbamate계는 AChE와 ChE가 carbamyl화 되어 효소활성이 저해되는데 (Kuhr, 1977) K_i값은 Table 2

Table 2. I₅₀ and bimolecular rate constant (K_i) of acetylcholinesterase (AChE) and cholinesterase (ChE) by some organophosphate (OP) and carbamate (Ca) pesticides

		AChE				ChE			
Pesticides		pI ₅₀ (M)	I ₅₀ (M)	I ₅₀ (mg/L)	K _i (moles ⁻¹ min ⁻¹)	pI ₅₀ (M)	I ₅₀ (M)	I ₅₀ (mg/L)	K _i (moles ⁻¹ min ⁻¹)
OP	Malathion	3.77	1.69 × 10 ⁻⁴	55.82	137	3.52	3.01 × 10 ⁻⁴	99.42	76
	Palathion	3.97	1.07 × 10 ⁻⁴	31.16	216	4.00	1.00 × 10 ⁻⁴	29.13	231
	Diazinon	4.23	5.88 × 10 ⁻⁵	17.89	393	4.19	6.45 × 10 ⁻⁵	19.62	359
Ca	Carbaryl	6.30	5.01 × 10 ⁻⁷	0.10	46,240	6.55	2.82 × 10 ⁻⁷	0.05	82,151

와 같았다. 여기서 carbaryl의 K_i는 AChE가 46,240 moles⁻¹ min⁻¹, ChE가 82,151 moles⁻¹ min⁻¹이었다. Carbamate계 구조는 크게 carbamic acid (-CONHR)와 alcohol (-OX)로 구분되는데, alcohol 부분은 구조에 따라서 효소 활성이 달라진다. Carbamic acid (-CONHR)부분에서 R은 N-metyl체가 ethyl과 propyl체보다 효소 활성저해가 크다. 또한 N,N-dialkyl체의 생리활성은 N-alkyl체에 비하여 낮으므로 carbamate계 살충제는 -NHCH₃일 때 가장 활성이 높다(정영호와 박영선, 1990). 이와 같이 Carbamate계 농약도 구조에 따라서 저해도가 달라질 수 있다.

Carbaryl의 AChE 및 ChE의 I₅₀ 값은 각각 0.10 및 0.05 mg/L이었다(Table 2). 먹는 물 관리법에 의한 먹는물 수질기준으로 carbaryl은 0.07 mg/L이다(환경부, 2002). 따라서 본 실험에서의 AChE와 ChE에 대한 pI₅₀은 먹는 물 수질기준의 허용농도와 비슷하며, 음용수 중에 있는 carbaryl을 1 mg/L 이하까지 측정 가능하다. 이와 같이 AChE 및 ChE 효소를 이용하여 carbamate계 농약에 의한 AChE 및 ChE 효소 활성 저해도를 측정한다면, carbaryl 농약의 정성적 검출이 가능하다.

자연계 시료에서 AChE 및 ChE의 저해가 나타난다면 AChE 및 ChE 저해물질이 함유되어 있다는 의미이며, 여기에는 AChE 및 ChE의 저해에 특이성이 있는 carbamate계 농약이 존재할 가능성이 있다는 증거이다. 따라서 빠르고 간편한 AChE 및 ChE 저해법으로 carbamate계 농약의 함유 가능성을 측정하고, 여기서 AChE 및 ChE의 저해가 나타난다면 다른 기기분석적인 방법으로 carbamate계 농약의 농도를 측정하면 된다(Saul et al., 1995). 여기서 AChE 및 ChE 활성 저해 측정은 Ellman 등(1961)의 방법으로 짧은 시간 내에 매우 간단하고

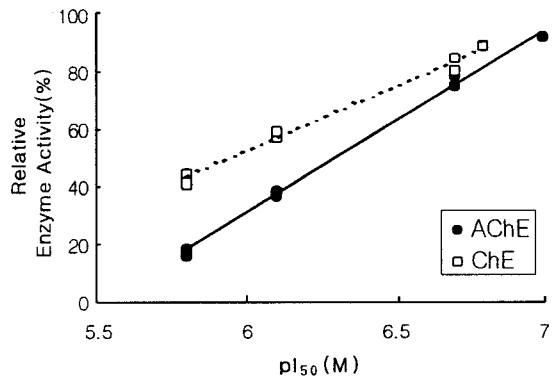


Fig. 4. Inhibition of acetylcholinesterase and cholinesterase activity on the carbamate pesticides, such as carbaryl.

빠르게 측정할 수 있다.

Albareda-sirvent 등(2002)은 AChE와 ChE을 이용한 생물 검정법으로 먹는 물 중에서 유기인계 농약과 carbamate계 농약을 검출하였다. 여기서 검출한계는 유기인계 농약으로 paraoxon이 1 × 10⁻¹⁰ M 이었고, carbamate계 농약으로 carbofuran이 1 × 10⁻¹¹ M이었다. 생물 검정법은 HPLC, GC 등과 같은 기기분석법보다는 다양하고도 정확한 분석성능은 적으나, 매우 빠르고 간편하게 측정할 수 있는 장점을 가진다(Albareda-sirvent et al., 2002).

따라서 본 연구에서 확인된 enzyme inhibition법을 이용하면 먹는 물 중에서 carbamate계 다성분 농약을 빠르고 간편하게 측정할 수 있는 간이 검색용 Kit로 개발할 수 있다.

요 약

Enzyme-Inhibition 방법으로 다성분 잔류 농약의

검출 기법을 개발하기 위해, 음용수 허용기준 설정 농약인 유기인계 농약으로 malathion, parathion, diazinon과 carbamate 농약으로 carbaryl에 대한 acetylcholinesterase (AChE)과 cholinesterase (ChE) 활성저해 관계를 규명하였다.

병아리 뇌의 AChE와 ChE 활성도는 각각 166.6 및 5.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein 이었고, 혈장에서는 각각 23.1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein과 8.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein이었다. AChE와 ChE의 최적 pH는 각각 8.2 및 7.8이었다. Km은 0.034 및 0.045 mM 이었다.

유기인계농약에서 AChE와 ChE의 I_{50} 값의 malathion이 55.82 및 99.42 mg/L이었고, parathion은 31.16 및 29.13 mg/L이었고, diazinon은 17.89 및 19.62 mg/L이었다.

Carbamate농약인 carbaryl의 AChE와 ChE의 I_{50} 값의 0.10 및 0.05 mg/L이었다. 먹는 물 관리법에 의한 carbaryl의 먹는 물 허용 수질기준인 0.07 mg/L을 AChE와 ChE의 I_{50} 에서 검출할 수 있다. AChE 및 ChE을 이용한 enzyme-inhibition(EI)법은 carbamate 농약인 carbaryl을 먹는 물 허용 수질기준인 0.07 mg/L까지 검출 할 수 있으므로, 다성분 잔류분석법(MRM, Multiresidue Method)으로 이용할 수 있다. 따라서 Enzyme Inhibition 방법을 이용하여 자연환경 중 carbamate계 농약을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 새로운 bioassay법으로 응용할 수 있다.

참 고 문 헌

- 유홍일, 이해근, 전성환, 농약잔류 분석방법, 동화기술 1991.
- 정영호, 박영선, 농약학, 전국농업기술자협회, 문선사 1990.
- 환경부, <http://nkkfem.or.kr/sub3/먹는물기준.htm>. 2002.
- Abad, J.M., Pariente, F., Hernandez, L., Abruna, H.D., and Lorenzo, E. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using piezoelectric biosensors. *Analytical Chemistry* 1998; 70 : 2848-2855.
- Albareda-Sirvent M., Merkoci A., and Alegret S. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology. *Analytica Chimica Acta* 2001; 442 : 35-44.
- Apra C., Colosio C., Mammone T., Minoia C., and Maronib M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J. Chromatogr.* 2002; B769 : 191-219.
- Bachmann, T.T., Leca, B., Villatte, F., Marty, J.-L., Fournier, D., and Schmid, R.D. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multiresidue biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosensors and Bioelectronics* 2000; 15 : 193-201.
- Bachmann, T.T., and Schmid, R.D. A disposable, multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution. *Analytica Chimica Acta* 1999; 401 : 95-103.
- Bergmeyer, H.H. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed., Vol. IV, Verlagchemie. 1984; 52-74.
- Collier W.A., Clear M., and Hart A.L. Convenient and rapid detection of pesticides in extracts of sheep wool. *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17 : 815-819.
- Dzyadevych S.V., and Chovelon J.-M. A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using lumistox test and conductometric biosensor technique. *Materials and Engineering.* 2002; C21 : 55-60.
- Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., and Chovelon J.-M. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Analytica Chimica Acta* 2002; 459 : 33-41.
- Ellman, G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., and Featherstone R.M. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7 : 88-95.
- Eto, M., *Organophosphorus pesticides-organic and biological Chemistry*, CRC. 1974.
- Evtugyn, G.A., Budnikov, H.C., and Nikolskaya, E.B. Influence of surface-active compounds on the response and sensitivity of cholinesterase biosensors for inhibitor determination. *Analyst* 1996; 121 : 1911-1915.
- Ghindilis, A.L., Morzunova, H.C., Barmin, A.V., and Kurochkin, I.N. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics* 1996; 11 : 837-880.
- Gulla K.C., Gouda M.D., Thakur M.S., and Karanth N.G. Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1597 : 133-139.
- Ivanov A.N., Lukachova L.V., Evtugyn G.A., Karyakina E.E., Kiseleva, S.G. Budnikov H.C., Orlov A.V., Karpacheva G.P., and Karyakin A.A. Polyaniline-modified cholinesterase sensor for pesticide determination. *Bioelectrochem.* 2002; 55 : 75-77.

- Kuhr, R.J., Carbamate insecticides; chemistry, biochemistry, and toxicology, CRC, Ohio. 1977.
- Lowry, O.H., Roesbrough N.J., Favre A.L and R.J., Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 1951; 193 : 265–275.
- Matsumura, F., Toxicology of insecticides, Plenum Press, New York. 1975; 105–164.
- Mionetto, N., Marty, J.L., and Karubc, I. Acetylcholinesterase in organic solvents for the detection of pesticides: biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics* 1994; 9 : 463–470.
- Reybier K., Zairi S., Jaffrezic–Renault N., and Fahys B. The use of polyethyleneimine for fabrication of potentiometric cholinesterase biosensors. *Talanta* 2002; 56 : 1015–1020.
- Saul, J.S., Zomer, E., Puopolo, D., Charm, S.E. Use of a new rapid bioluminescence method for screening organophosphate and N-methylcarbamate insecticides in processed baby food. *J. Food Protection* 1995; 59 : 303–311.
- Stryer L. *Biochemistry*. 2nd ed. Freeman & Com. USA. 1981; 103–134.
- Tomlin C., *The pesticide manual*, 12th ed., British crop protection council, United Kingdom. 2000.
- Varo I., Navarro J.C., Amat F., and Guilhermino L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *artemia salina* and *artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 2002 ; 48 : 563–569.