

# 유기인계 및 Carbamates 살충제에 의한 Acetylcholinesterase활성의 저해

김 정 호

경산대학교 자연과학대학 환경학부

## 1. 서론

농약은 정도의 차이는 있으나 독성을 가지고 있어 잘못 사용하면 인축에 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 기질특이성이 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.

유기인계나 carbamate계의 화학구조와 AChE 활성저해간의 관계를 연구하는 것은 이들 농약에 의한 중독진단, 약제를 다루는 사람들의 안전기준 설정 및 환경오염도의 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 carbamate계의 화학구조 차이에 따른 AChE 활성 저해와의 관계를 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시농약 및 공시동물

본 연구에서는 8가지 유기인계 농약과 6가지 carbamate계 농약 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 15000rpm(4℃)으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 AChE효소액으로 사용하였다.

AChE활성 측정은 25℃에서 인산완충용액(0.1M pH8.4) 3ml, acetylthiocholine iodide(0.075M)50 $\mu$ l, dithiobisnitrobenzoic acid(DTNB 0.01M) 50 $\mu$ l 및 효소액 50 $\mu$ l을 가한다. 1분 후 cholin과 DTNB와 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate을 spectrophotometer(Shimadzu U.V-200)로 412nm에서 측정하였다. 효소의 활성은  $\mu$  mol 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 50 $\mu$ l과 계산된 농도로 희석한 공시농약을 50 $\mu$ l 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  $I_{50}$ 으로 하였으며,  $pI = -\log I$ 이다.

## 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  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein 이었다. AChE의 최적 pH는 8.2로 나타났으며, AChE활성도 측정 시 완충용액의 pH는 8.4로 하였다.

한편 저해제가 AChE와 반응하여 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 소용되는 시간을 검토할 필요가 있다. AChE효소액에 carbamate계에 속하는 BPMC를 각각  $3.50 \times 10^{-7}\text{M}$ 과  $7.41 \times 10^{-7}\text{M}$  첨가하고 시간별로 효소활성을 측정한 결과 60분까지 log 일차반응이었다. 따라서 in vitro 실험에서 항온시간은 공시농약의 실험농도구간에서 log 일차반응에 속하는 30분을 택하였다.

### 3.2 유기인계 농약

$I_{50}$ 값은 AChE효소의 활성도가 반으로 저해되는데 필요한 저해제의 농도로써,  $I_{50}$ 값이 적을수록 AChE효소에 강한 저해제가 된다.

$I_{50}$ 은 phosphorodithioate형태인 malathion이  $2.21 \times 10^{-4}\text{M}$ , phorate가  $1.10 \times 10^{-4}\text{M}$  이었다. 그리고 phosphorothioate형태인 parathion은  $1.10 \times 10^{-4}\text{M}$ , diazinon은  $7.29 \times 10^{-5}\text{M}$ 이었다. 또한 phosphate형태인 chlorfenvinphos  $3.99 \times 10^{-6}\text{M}$ , DDVP는  $5.29 \times 10^{-7}\text{M}$ 이었다. 한편 phosphrothiolate형으로 terbufosoxon은  $3.72 \times 10^{-7}\text{M}$ , phrotoxon은  $1.63 \times 10^{-7}\text{M}$ 이었다.

$I_{50}$  값은 phosphorodithioate형태를 기준으로 할 때 phosphorothioate형태는 0.5498배, phosphate형태는 0.0136배, phosphrothiolate형 0.0018배 적었다. 이와 같이 유기인계 형태에 따라  $I_{50}$  값이 각각 다르게 나타난 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).

### 3.3 Carbamate계 농약

carbamate계는 AChE가 carbamyl화되어 효소활성이 저해되는데(Kuhr et al., 1977),  $K_i$ 값을 살펴보면 XMC는  $2,928 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , carbofuran은  $18,682 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , isoprocarb은  $33,918 \text{ moles}^{-1} \text{ min}^{-1}$  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, 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-methylcarbamate계는 phosphate형과 phosphrothiolate형과 비슷한 수준의 저해율을 나타내었다.

#### 4. 요약

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

유기인계농약에서  $PI_{50}$ 값의 평균은 phosphorodithioate형이 3.80, phosphorothioate형이 4.04였고, phosphate형은 6.33, phosphrothiolate형은 6.60 이었다. 6가지 N-methylcarbamate계에 대한  $PI_{50}$ 값의 평균은 6.11이다. 따라서 6 가지 N-methylcarbamate계는 phosphate형과 phosphrothiolate형과 비슷한 수준의 저해율을 나타내었다. 따라서 AChE 활성 저해는 유기인계와 carbamate계의 화학구조와 상관관계가 있었다.

*in vitro* 조건에서 EI ( Enzyme Inhibition) 방법으로 측정된 각종 유기인계 및 carbamate계 농약과 AChE활성 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 carbamate 계 농약을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 새로운 Bioassay 법으로 응용할 수 있을 것이다.

#### 참고문헌

1. 유홍일, 이해근, 전성환, 1991, 농약잔류 분석방법, 동화기술, 서울, 79-84pp.
2. 정금희, 1997, 산업폐수의 환경독성평가방법, *In* 환경연구노트, 인제대학교 환경연구소, 6, 19-36.
3. Bergmeyer, H.H., 1984, Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. IV, Verlagchemie, 52-74pp.
4. Bracha, P. and R.D. O'Brien, 1968, Trialkyl phosphate and phosphorothiolate anticholinesterases. II. Effects of chain length on potency, *Biochem.*, 7, 1555-1559.
5. 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.
6. 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.
7. Eto. M., 1974, Organophosphorus pesticides-organic and biological Chemistry, CRC press, 1-368pp.

8. 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.
9. Kuhr, R.J. and H.W. Dorough, 1977, Carbamate insecticides-chemistry, biochemistry, and toxicology, CRC Press, 41-142pp.
10. 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.
11. Matsumura, F., 1975, Toxicology of insecticides, Plenum Press, New York, 105-164pp.
12. 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 leptophos analogs, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20, 67-75.
13. 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.
14. 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.
15. Tomlin C., 1994, The pesticide manual-Incorporating the agrochemical handbook, 10th ed., British crop protection council, United Kingdom.
16. Tseng R.K. and J.J. Cooney, 1995, Action of tributyltin on enzymes of four bacteria, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1113-1121.