

PE1 효소저해법을 이용한 유기인계 및 Carbamate계 농약의 다성분 잔류 검출

김정호¹, 김정배*, 박문기¹, 문영수¹

¹경산대학교 환경학부, 계명대학교 환경학부*

1. 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.

단성분 잔류분석법에 의한 잔류 농약의 정량은 환경 시료 내에 존재하는 농약에 대해서 각각의 농도를 측정한다. 그러나 다성분 잔류분석법은 잔류 농약의 분석대상이 포괄적이다. FDA를 비롯한 많은 분석 기관은 단성분 잔류분석법으로 농약 잔류량을 정량분석하기 전에 주어진 시료 중에서 잔류 규정을 초과한 시료가 있는지를 알아보기 위한 감시 프로그램에 간편하고 편리한 다성분 잔류분석법을 종종 이용한다.

다성분 잔류분석법을 이용한 잔류 농약의 검색은 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 효소면역 분석법, 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, pseudo-cholinesterase, serum cholinesterase)가 있다(Bergmeyer, 1984). 유기인계 및 carbamate 계 농약의 경우 AChE 및 ChE와 작용하므로, 이들 효소를 농약을 검출 할 수 있는 biosensor로 이용 할 수 있을 것이다(Aprea et al., 2002).

효소를 이용한 다성분 잔류분석법은 화학적, 기기적 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 수질기준에서 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 측정한 각종 유기인계 및 carbamate계 농약과 AChE 및 ChE활성 저해와의 관계는 유기인계 및 carbamate계 농약의 검출 기법 개발에 응용할 수 있다.

지금까지 효소저해법을 이용한 음용수 허용기준 설정 농약인 malathion, parathion, diazinon과 carbaryl에 대해 연구 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 AChE와 ChE을 이용한 효소저해법으로 음용수 허용기준 설정에서 제시된 유기인계 및 carbamate계의 농약의 다성분 검출기법을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 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).

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

2.2. 효소 활성도 측정 및 저해 실험

AChE 및 ChE 활성도 측정은 Ellman(1961)등의 방법에 준하였다.

저해율 조사하기위해 인산완충용액(0.1M) 3 mL에 효소액 50 μ L과 공시농약을 50 μ L을 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 I_{50} 으로 표현하며, $pI_{50} = -\log I_{50}$ 이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효소 활성도

Ellman등(1961)의 방법으로 뇌AChE와 혈장ChE 활성을 측정한 결과, 뇌에서 기질로 acetylthiocholine iodide와 butyrylthiocholine iodide일 때 효소활성은 각각 166.67 μ mol/min/g protein과 5.80 μ mol/min/g protein이었다. 혈장에서는 기질로 acetylthiocholine iodide와 butyrylthiocholine iodide일 때 각각 23.12 μ mol/min/g protein과 8.32 μ mol/min/g protein이었다.

3.2. 효소의 특성

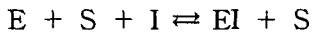
기질과 효소 반응속도를 Lineweaver-Burk plot(Stryer, 1981)하면, AChE 및 ChE의 K_m 은 각각 0.034와 0.045 mM 이었다. 여기에 저해제로 유기인계 농약 Malathion을 5.00×10^{-4} M 첨가하여 저해를 조사하였다. Malathion의 I_{50} 은 AChE 및 ChE에서 각각 1.69×10^{-4} 및 3.01×10^{-4} M이며(Table 2), 이를 기준으로 1.5-3배의 농도를 택하였다. 저해제 malathion이 첨가된 AChE+I 및 ChE+I의 K_m 은 각각 대조구 보다 높은 0.052와 0.048 mM이었으며 저해가 나타났다.

일반적으로 효소반응은 다음 식과 같이 효소와 기질이 반응한다.



(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.



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+I의한 저해가 나타났다(Stryer, 1981).

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

3.3. 유기인계 및 Carbamate 농약

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.

Carbaryl의 AChE 및 ChE의 I_{50} 값은 각각 0.10 및 0.05 mg/L이었다. 먹는 물 관리법에 의한 먹는물 수질기준으로 carbaryl은 0.07 mg/L이다(환경부, 2002). 따라서 본 실험에서의 AChE와 ChE에 대한 pI_{50} 은 먹는 물 수질기준의 허용농도와 비슷하며, 음용수 중에 있는 carbaryl을 1 mg/L이하까지 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 Ellman등(1961)의 방법으로 짧은 시간 내에 매우 간단하고 빠르게 측정할 수 있다.

Albareda-sirvent등(2002)은 AChE와 ChE을 이용한 생물 검정법으로 먹는 물 중에서 유기인계농약과 carbamate계 농약을 검출하였다. 여기서 검출한계는 유기인계 농약으로 paraoxon이 1×10^{-10} M이었고, carbamate계 농약으로 carbofuran이 1×10^{-11} M이었다. 생물 검정법은 HPLC, GC등과 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 다성분 잔류분석법(MRM, Multiresidue Method)으로 이용할 수 있으며, 간이 검색용 Kit로 개발할 수 있다.

참 고 문 헌

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.