

Cholinesterase 저해 활성을 이용한 유기인계 농약의 효소적 분석

김 정 호

경산대학교 자연과학대학 환경학부

요약 : 유기인계 농약에 대한 cholinesterase(ChE)활성저해 관계를 규명 하고자 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 하였다. 병아리 혈장의 ChE 활성은 $23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein이었다. *in vivo*에서 terbufos의 투여량을 LD₅₀의 0.2배(0.362 mg/kg)와 0.5배(0.905 mg/kg)로 투여하였을 경우, 투여 15분 후에 ChE 활성이 각각 36%와 96%까지 저해되었으며 그후 회복이 일어났다. *in vitro*에서 유기인계의 P에 S가 결합된 P=S구조의 phosphorodithioate와 phosphorothioate의 Ki는 $74\sim 322 \text{mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 로 낮았다. 그러나 P에 S가 산화되어 O가 결합된 P=O구조의 phosphate와 phosphorothiolate의 Ki는 $13898\sim 79610 \text{mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 로 높았다. 따라서 P=S가 P=O로 산화됨으로서 ChE의 저해도가 커져서 독성이 강해짐을 확인하였다. phosphorodithioate와 phosphorothioate형의 pI₅₀값은 $21\sim 102 \text{mg}/\text{L}(\text{ppm})$ 이었다. 그러나 phosphate와 phosphorothiolate형의 pI₅₀값은 $0.519\sim 0.071 \text{mg}/\text{L}(\text{ppm})$ 이었다. 즉 ChE를 이용한 enzyme-inhibition(EI)법을 유기인계 농약의 정성적 검출에 이용한다면, P=O구조인 phosphate와 phosphorothiolate형은 1ppm이하 즉 ppb단위까지 정성적 검출이 가능하다.(2000년 11월 20일 접수, 2000년 11월 30일 수리)

Key words : Cholinesterase, Organophosphorus pesticides, Enzyme-inhibition.

서 론

생물에 유해반응을 일으키는 농약의 독성에 관한 평가방법은 그 농약의 유해정도를 검토하는데 매우 중요하다. 이들 농약처리에 의해 생체내의 많은 효소들은 영향을 받는다(Matsumura, 1975; Sole 등, 1995; Tseng과 Cooney, 1995; 임과 한, 1999). 특히 신경전달계에 관련되는 acetylcholinesterase는 유기인계 농약에 의해 저해된다. 유기인계 농약은 acetylcholinesterase 활성을 저해함으로써 신경기능 저해제로 작용하게 된다(Eto, 1974).

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).

Acetylcholinesterase는 신경조직, 적혈구 및 근육 등에 존재하는데 신경전달물질인 acetylcholine에 기질특이성이 있으므로 신경전달에 중요한 역할을 한다. 한편 cholinesterase는 혈장, 간장 및 신장 등에 존재하며 acetylcholine에 기질특이성이 없다. 따라서 적혈구에 있는 것은 acetylcholinesterase(AChE)라고 하고, 혈장에 있는 것을 pseudocholinesterase 즉 cholinesterase(ChE)라 한다. *in vitro* 실험에서 혈액을 이용할 경우 적혈구보다 혈장을 조효소로써 사용하기가 편리하기 때문에 혈장이 cholinesterase(ChE)의 효소원으로 사용될 수 있다.

Acetylcholine는 cholinesterase에 의해 가수분해되어 choline과 acetic acid로 된다. 여기서 cholinesterase활성의 측정은 acetylcholine량을 측정하는 Hesterin법(1949), acetic

acid량을 측정하는 Michel법(1949)과 choline량을 측정하는 Ellman법(1961)이 있다. 여기서 Ellman법은 기질로 사용된 acetylthiocholine이 가수분해되어 생성된 thiocholine을 dithiobisnitrobenzoic acid와 반응시켜 생성된 5-thio-2-nitrobenzoic acid를 비색정량하는 방법이다. Ellman법은 시험방법이 비교적 간단하며 짧은 시간에 측정할 수 있고 감도가 높기 때문에 cholinesterase활성 측정에 많이 사용된다.

농약에 의한 환경 오염을 구명하기 위해 농약의 독성작용에 관한 연구가 필요하며, 특히 cholinesterase 활성저해에 대한 연구가 요구된다. 따라서 유기인계 농약에 의한 cholinesterase 활성의 저해 양상을 규명할 필요가 있다. 유기인계의 화학구조와 cholinesterase 활성저해간의 관계를 연구하는 것은 이들 농약에 의한 중독진단, 약제를 다루는 사람들의 안전기준 설정 및 환경오염도의 측정용 지표로 이용될 수 있다(유 등, 1991; 정, 1997). 또한 *in vitro* 조건에서 cholinesterase 활성저해를 규명함으로써 EI(Enzyme-Inhibition) 방법을 유기인계 농약의 검출 기법에 이용할 수 있다(Chiu 등, 1991)

따라서 본 연구에서는 EI(Enzyme-Inhibition)방법을 개발하기 위해서 각종 유기인계의 화학구조 차이에 따른 cholinesterase 활성 저해와의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험농약 및 동물

본 연구에 사용된 유기인계 농약은 그림 1과 같이 phosphorodithioate형으로 malathion[S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate], phenthoate [S- α -ethoxycarbonylbenzyl O,O-dimethyl phosphorodithioate], terbufos[S-*tert*-butylthiomethyl O,O-diethyl ph-

*연락처

osphorodithioate]와 phorate[O,O-diethyl S-ethylthiomethyl phosphorodithioate]을 택하였다. phosphorothioate 형으로는 parathion[O-4-nitrophenyl O,O-diethyl phosphorothioate]과 diazinon[O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-diethyl phosphorothioate]을 택하였다.

phosphate형으로는 dimethylvinphos[2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl dimethyl phosphate], chlorfenvinphos[2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl diethyl phosphate]와 dichlorvos[2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate]을 선택하였다. 또한 phosphorothiolate형으로 terbufosoxon[S-tert-butylthiomethyl O,O-diethyl phosphorothiolate]과 phrotoxon[S-ethylthiomethyl O,O-diethyl phosphorothiolate]을 택하였다(Tomlin, 1994).

시험농약은 표준품(순도 : 99.9% 이상)를 acetone에 용해하여 사용하였다. 시험동물은 부화 후 24시간 된 병아리 (Hy-Line W-77, mail) 중에서 43-47 g 되는 건전한 개체를 사용하였다.

Cholinesterase 활성도 측정

ChE활성 측정은 Ellman 등(1961) 방법에 준하여 다음과 같이 하였다. 병아리의 경부를 절단하고 heparin으로 처리된 원심분리관에 피를 채취한다. 이를 3000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 ChE 효소액으로 사용하였다.

ChE활성 측정은 25℃에서 인산완충용액(0.1 M, pH 7.8) 3 mL, acetylthiocholine iodide(0.075 M) 50 μL, dithio-bisnitrobenzoic acid (DTNB 0.01 M) 50 μL 및 효소액 50 μL을 가한다. 1분 후 cholin과 DTNB와 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate을 spectrophotometer(Shimadzu U.V-200)로 412 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 μmol acetylthiocholine/min/g protein으로 나타내었다. 여기서 단백질 정량은 Lowry 등(1951) 방법에 준하였으며, 표준품은 bovine serum albumin(Sigma 사)를 사용하였다.

In vivo 실험

Terbufos의 투여량은 terbufos LD₅₀(1.81 mg/kg)의 0.2배와 0.5배에 해당하는 0.362 mg/kg과 0.905 mg/kg으로 하였다(김, 1986). 투여부피를 100 μL되게 경구 투여한 후 시간별로 ChE 활성을 측정하였다.

In vitro 실험

인산완충용액(0.1M pH 7.8) 3 mL에 ChE 효소액 50 μL과 공식농약을 50 μL 가하고 37℃에서 30분간 항온시킨다. 그후 ChE 활성을 측정하였다. 대조구는 acetone를 동일량 첨가하였으며 효소활성의 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 대조구의 ChE 활성이며, B는 농약 처리구의 ChE 활성이다. 저해율의 비교는 효소활성의 50%가 저해되는데 필요한 반응액 중의 log농도인 pI₅₀으로 하였으며, pI = -log I이다.

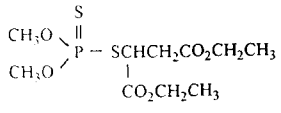
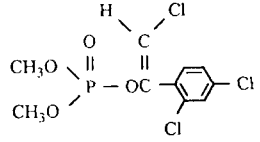
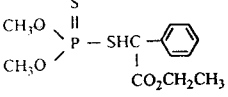
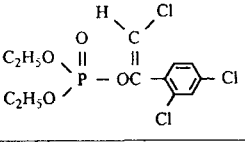
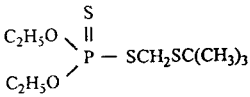
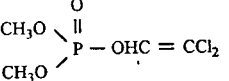
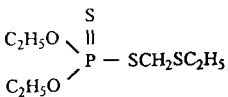
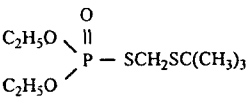
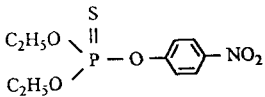
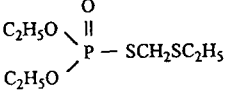
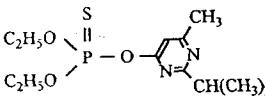
<p>1. Malathion</p> 	<p>7. Dimethylvinphos</p> 
<p>2. Phenthoate</p> 	<p>8. Chlorfenvinphos</p> 
<p>3. Terbufos</p> 	<p>9. Dichlorvos</p> 
<p>4. Phorate</p> 	<p>10. Terbufosoxon</p> 
<p>5. Parathion</p> 	<p>11. Phrotoxon</p> 
<p>6. Diazinon</p> 	

Fig. 1. The structure of some organophosphorus pesticides.

결과 및 고찰

in vivo에서 ChE 활성 저해

in vivo상태에서 유기인계 농약에 의한 ChE 활성 저해를 확인하기 위해 유기인계 농약 중 terbufos을 택하여 경구 투여 후 ChE 활성을 측정하한 결과는 그림 2와 같다.

Terbufos LD₅₀의 0.2배 해당하는 0.362 mg/kg을 투여한 경우와 0.5배에 해당하는 0.905 mg/kg을 투여한 경우, 투여 후 15분에 대조구 ChE 활성의 36%와 96%까지 저해

되었다. 여기서 대조구의 ChE 활성은 $8.31 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein이다. 이와 같이 *in vivo*에서 유기인계 농약에 의한 병아리의 ChE 활성 저해를 확인하였다.

Terbufos LD₅₀의 0.2배를 투여 한 경우, 투여후 15분에 대조구 ChE 활성의 64%였다. 그러나 2 시간 후에는 85%, 6 시간 후에는 98%로 급격하게 회복되었다. Terbufos LD₅₀의 0.5배를 투여 한 경우, 투여 후 15분에는 대조구 ChE 활성의 약 4%였다. 그러나 2 시간 후에는 20%, 3 시간 후에는 34%, 6 시간 후에는 41%, 11 시간 후에는 54%로 서서히 회복되었다. 이와 같이 유기인계 농약 투여 후 시간이 경과함에 따라 ChE 활성의 회복이 일어났다. 이는 ChE의 esteratic site와 anionic site에 각각 유기인계의 P 원자와 치환기가 결합되어 인산화되었다가, 다시 가수분해로 탈인산화되어서 ChE 활성의 회복이 이루어진 것이다 (임과 한, 1999; Eto, 1974).

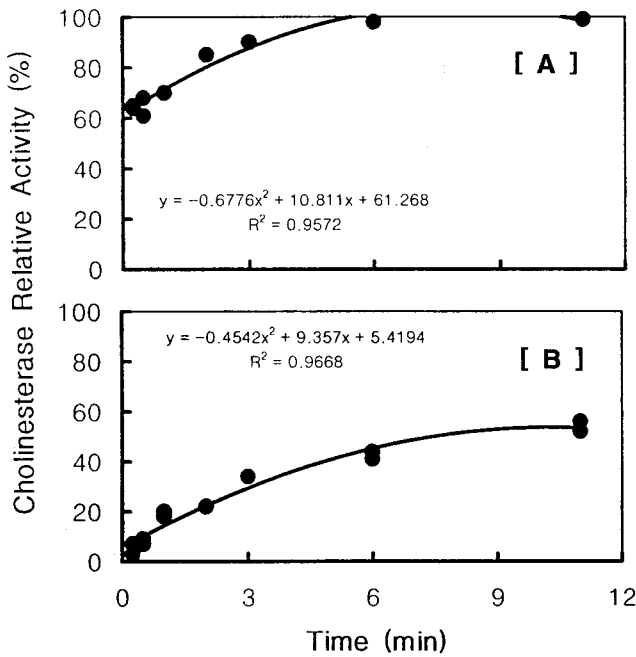


Fig. 2. Response of cholinesterase activity in chicken by oral administration of terbufos with (A) 0.362 mg/kg and (B) 0.905 mg/kg *in vivo*.

ChE의 최적 pH와 반응시간

인산완충용액을 사용하여 pH를 조정한 용액에서 ChE의 상대적 활성도는 그림 3과 같았다. pH 6.0에서는 42.2%였고, pH 7.0에서는 92.8%였다. pH 8.0에서는 98.7%였고, pH 9.6에서는 87.1%로 감소하였다. 여기서 ChE의 최적 pH는 7.8이었으며, 따라서 ChE 측정용액의 pH는 7.8로 하였다.

저해제는 ChE와 반응하여 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데, 이에 소용되는 시간을 검토할 필요가 있다. 유기인계에 속하는 dichlorvos을 3.63×10^{-7} M과 7.24×10^{-7} M로 ChE 효소액에 각각 첨가하고 시간별로 효소활성을 측정된 결과는 그림 4와 같았다. *in vitro* 실험에서

enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 필요한 항은시간은 재현성이 있는 30분을 택하였다.

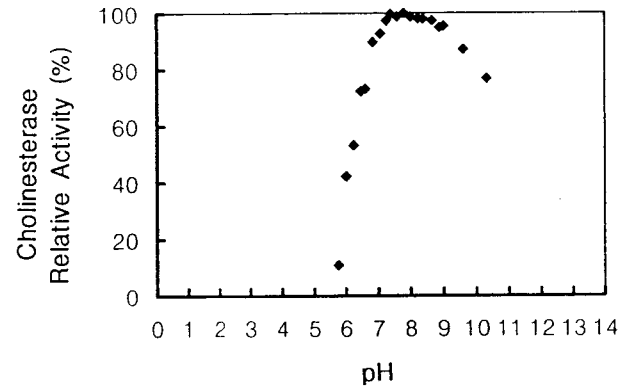


Fig. 3. Effect of pH on the cholinesterase activity in chicken plasma.

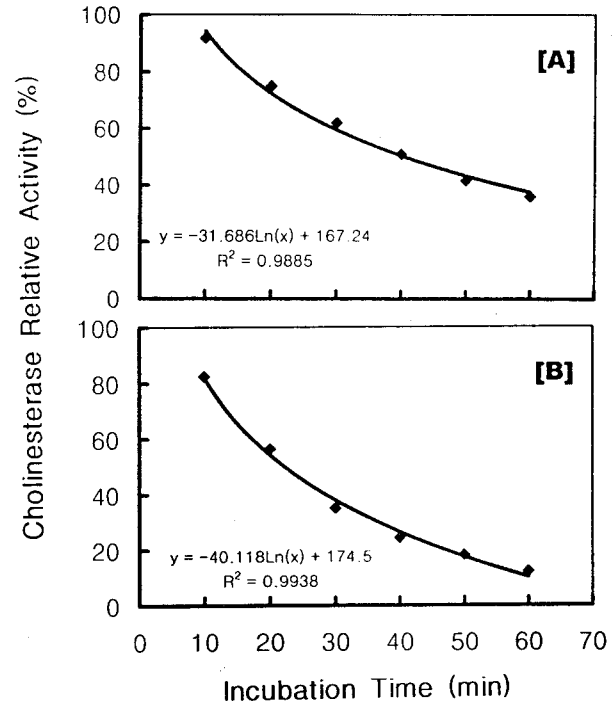


Fig. 4. Effect of preincubation time on the cholinesterase activity by dichlorvos with (A) 3.63×10^{-7} M and (B) 7.24×10^{-7} M.

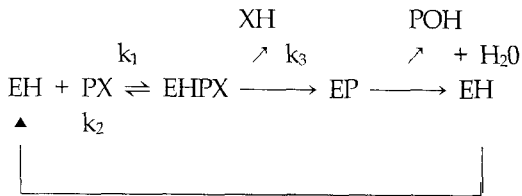
*in vitro*에서 pI₅₀과 Ki

유기인계농약에 의한 ChE활성의 저해양상으로 phosphorodithioate형은 그림 5와 같다. phosphorothioate형은 그림 6, phosphate형은 그림 7, phosphorothiolate형은 그림 8과 같았다.

그림 5~8에서 계산한 pI₅₀값은 표 1과 같다. pI₅₀은 ChE의 활성도가 50%로 저해되는데 필요한 저해제의 log농도로써, pI₅₀값이 적을수록 ChE에 강한 저해제가 된다.

여기서 유기인계의 ChE에 대한 작용기구를 살펴보면,

ChE의 esteratic site와 anionic site에 각각 유기인계의 p 원자와 치환기가 결합되어 인산화된다. 이는 다시 가수분해로 탈인산화되어서 ChE 활성의 회복이 이루어진다. 이때 탈인산화 과정이 매우 느리게 일어나기 때문에 이 단계가 ChE 활성 저해단계가 된다. 이러한 과정을 반응식으로 나타내면 다음과 같다(Eto, 1974).



여기서 EH는 ChE 효소이며, PX는 유기인계 농약이다.

또한 $K_i = \frac{k_1 \times k_3}{k_2}$ (이분자 속도정수)는 저해율의 특성을 나타내는 지표로 사용된다. I_{50} 과의 관계는 $K_i = \frac{0.695}{I_{50} \times T}$

(T: 반응시간 30분)이다(Eto, 1974).

여기서 유기인계 종류별 K_i 는 표 1과 같았다. K_i 는 phosphorodithioate형으로 malathion이 $74 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, phenthoate가 $100 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, terbufos가 $187 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이었으며 phorate는 $208 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이었다. phosphorothioate형으로 parathion은 $226 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, diazinon은 $322 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이었다.

phosphate형으로는 dimethylvinphos가 $13898 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, chlorfenvinphos는 $15466 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, dichlorvos는 $47628 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이었다. 또한 phosphorothiolate형으

로 terbufosoxon은 $59424 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$, phrotoxon은 $79610 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 이었다.

Table 1. pI_{50} and bimolecular rate constant(K_i) of cholinesterase by some organophosphorus pesticides

Compound	pI_{50} (M)	K_i ($\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Malathion	3.50	74
Phenthoate	3.63	100
Terbufos	3.90	187
Phorate	3.95	208
Parathion	3.99	226
Diazinon	4.14	322
Dimethylvinphos	5.77	13898
Chlorfenvinphos	5.82	15466
Dichlorvos	6.31	47628
Terbufosoxon	6.40	59424
Phrotoxon	6.53	79610

유기인계 P에 S가 결합된 P=S형으로 phosphorodithioate와 phosphorothioate형의 K_i 는 $74 \sim 322 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 로 낮았다. 그러나 P의 S가 산화된 P=O형으로 phosphate형, phosphorothiolate형의 K_i 는 $13898 \sim 79610 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ 로 높았다. Terbufos의 경우 P의 S가 O로 산화됨으로서 K_i 가 317배 높아졌다. 따라서 P의 S가 O로 산화되면 ChE의 저해도가 크져서 독성이 강해짐을 확인하였다.

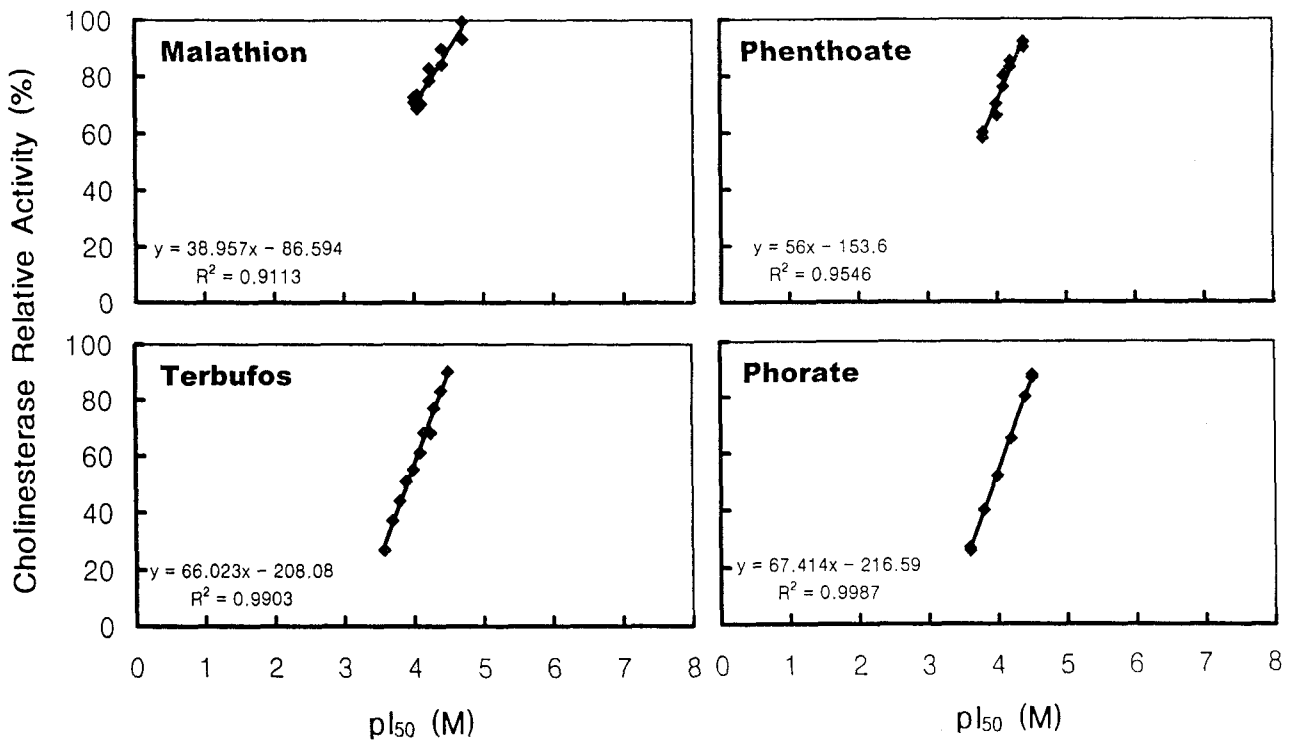


Fig. 5. Inhibition of cholinesterase activity on the phosphorodithioate organophosphorus pesticides *in vitro*.

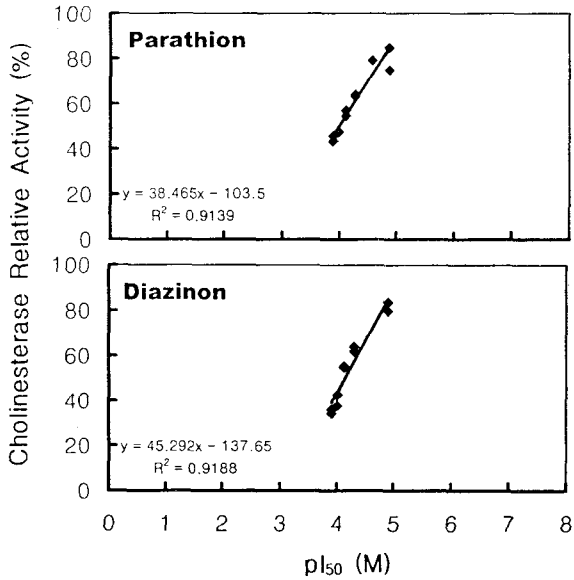


Fig. 6. Inhibition of cholinesterase activity on the phosphorothioate organophosphorus pesticides *in vitro*.

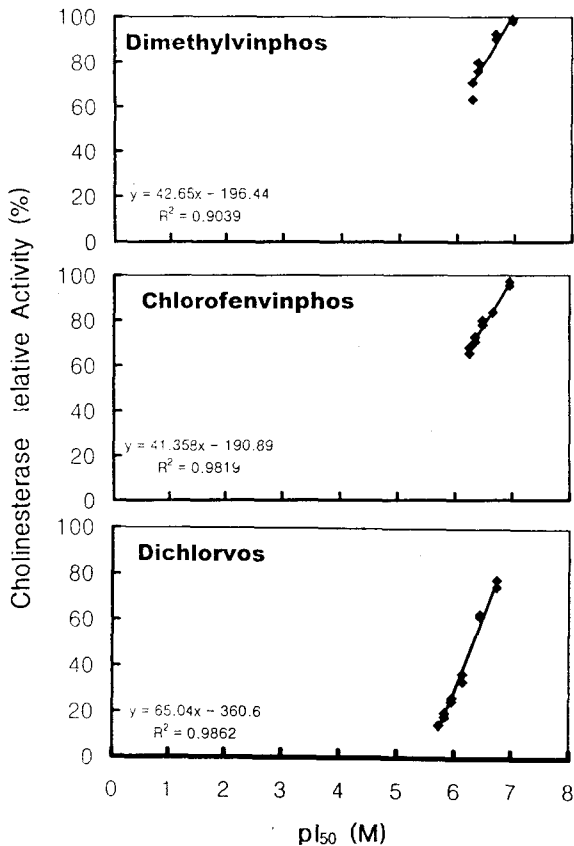


Fig. 7. Inhibition of cholinesterase activity on the phosphate organophosphorus pesticides *in vitro*.

이와같이 유기인계 형태에 따라 Ki 값이 각각 다르게 나타나는 것은 ChE의 anionic site와 esteratic site의 결합거리와 입체형태 등과 유기인계 농약 형태와 상호 친화력 차이

때문이다. 즉 Ki 값이 크면 ChE의 활성기와 유기인계 농약과의 친화력은 커지게 되고, 따라서 신경독성이 더 강해진다(Eto, 1974; Matsumura, 1975).

Schnitzerling 등(1982)은 소의 AChE에 대한 Ki값은 유기인계의 화학 구조에 따라 다르다고 하였으며, Bracha와 O'Brien 등(1968)은 AChE에 대한 phosphate와 phosphorothiolate의 I50값을 비교하였는데, AChE활성 저해율이 큰 화합물 일수록 AChE의 esteratic site에 친화력이 더 크다고 하였다.

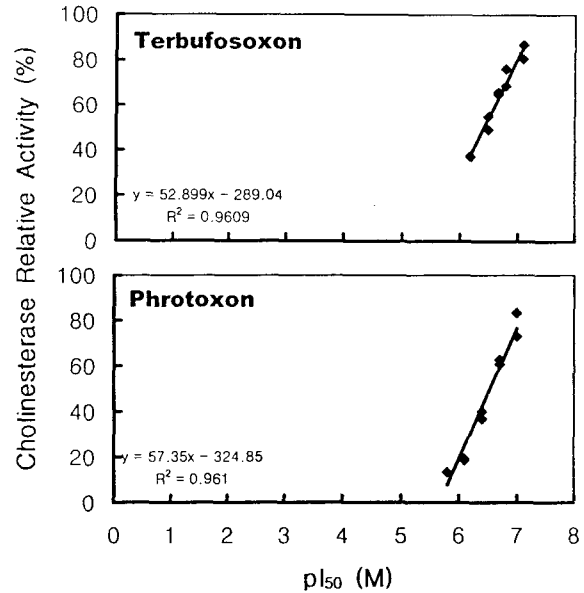


Fig. 8. Inhibition of cholinesterase activity on the phosphorothiolate organophosphorus pesticides *in vitro*.

Enzyme Inhibition 법

유기인계 농약에 대한 각각의 pI50값을 mg/L(ppm)로 환산하면 그림 9와 같다. P=S구조로 phosphorodithioate와 phosphorothioate형의 pI50값은 21~102 mg/L이었다. 그러나 P=O구조로 phosphate형, phosphorothioate형의 pI50값은 0.519~0.071 mg/L이었다.

유기인계 농약에 의한 ChE 활성 저해 측정은 짧은 시간 내에 매우 간단하고 빠르게 측정할 수 있다. 따라서 EI(Enzyme-Inhibition) 방법은 자연계에 있는 유기인계 농약을 빠르고 쉽게 검출할 수 있는 생물검정방법이 될 수 있다. 즉 P=O구조를 가진 phosphate형, phosphorothioate형은 자연계 중에 있는 1 ppm이하 즉 ppb단위까지 측정 가능하다. 이와 같이 ChE 효소를 이용하여 유기인계 농약에 의한 ChE 활성 저해도를 측정한다면, 유기인계 농약의 정성적 검출이 가능할 것이다.

현재 먹는 물 관리법에 의한 먹는 물 수질기준은 malathion이 0.25 mg/L, parathion은 0.06 mg/L, diazinon은 0.02 mg/L과 fenitrothion 0.04 mg/L을 넘지 못하게 규정하고 있다(환경부, 2000). 먹는 물의 수질기준에서 제시한 malathion, parathion, diazinon과 fenitrothion은 모두 P=S구조이다. 따라서 본 실험에서의 ChE에 대한 pI50은

malathion이 102 mg/L, parathion은 29 mg/L, diazinon은 21 mg/L으로 먹는물 수질기준의 허용농도보다 상당히 높았다.

in vitro 조건에서 EI(Enzyme Inhibition) 방법으로 측정 한 유기인계 농약과 ChE활성 저해와의 관계는 유기인계 농약의 검출 기법 개발에 응용할 수 있다. 이는 자연 환경 중 유기인계 농약을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 새로운 bioassay법이 될 수 있다.

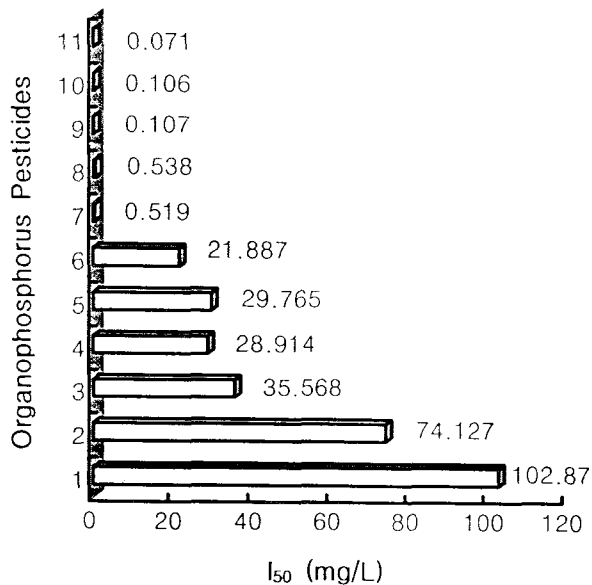


Fig. 9. pI_{50} (mg/L) of cholinesterase by some organophosphorus pesticides with 1. malathion, 2. phenthoate, 3. terbufos, 4. phorate, 5. parathion, 6. diazinon, 7. dimethylvinphos, 8. chlorfenvinphos, 9. dichlorvos, 10. terbufosoxon and 11. phrotoxon.

감사의 글

본 연구는 동일문화장학재단 2000년 학술연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Bergmeyer, H. H. (1984) Methods of enzymatic analysis. pp.52~74, 3rd ed., Vol. IV, Verlagchemie.
 Bracha, P. and R. D. O'Brien (1968) Trialkyl phosphate and phosphorothiolate anticholinesterases. II. Effects of chain length on potency. *Biochem.* 7:1555~1559.
 Chiu, C. S., C. H. Kao and E. Y. Cheng (1991) Rapid bioassay of pesticide residue(RBPR) on fruits and vegetables. *agricultural Research of China.* 40:188~203.

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.
 Eto. M. (1974) *Organophosphorus pesticides-organic and biological chemistry.* CRC press.
 Hesterin, S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Bio. Chem.* 180:249~261
 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.
 Matsumura, F. (1975) *Toxicology of insecticides.* pp.105~164, Plenum Press, New York,
 Michel, H. O. (1949) An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 34:1564~1568.
 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.
 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.
 Tomlin C. (1994) *The pesticide manual-incorporating the agrochemical handbook,* 10th ed., British crop protection council, United Kingdom.
 Tseng R. K. and J. J. Cooney (1995) Action of tributyltin on enzymes of four bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:1113~1121.
 김정호 (1986) 유기인계 살충제가 병아리의 acetylcholinesterases 활성에 미치는 영향. 경북대학교, 박사학위논문.
 정금희 (1997) 산업폐수의 환경독성평가방법. *In* 환경연구 노트, 인제대학교 환경연구소, 6:19~36.
 유홍일, 이해근, 전성환 (1991) 농약잔류 분석방법. pp.79~84, 동화기술, 서울.
 임요섭, 한성수 (1999) 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 쥐의 효소활성에 미치는 영향. *한국농약과학회지* 3(3):27~36.
 환경부 (2000) <http://envinews.co.kr/> 환경자료/환경법률/data/먹는물관리법.html
 환경부 (2000) <http://nkkfem.or.kr/sub3/먹는물기준.htm>

Enzymatic Analysis of Organophosphorus Pesticides Using Cholinesterase Inhibition Activities

Jung-Ho Kim(Dep. of Environmental Science and Engineering, Kyungsan University, Kyungsan 712-715 Korea)

Abstract : The effects of organophosphorus were examined with inhibition of the cholinesterase activity on the chicken plasma *in vivo* and *in vitro*. The cholinesterase activity in chicken plasma determined by the Ellman method was $23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein. After oral administration with 0.2 and 0.5 times of organophosphorus terbufos LD_{50} (1.81 mg/kg), cholinesterase activity were inhibited to 36% and 96% of control after 15min *in vivo*, respectively. After oral administration with 0.2 and 0.5 times of terbufos LD_{50} (1.81 mg/kg), then the recovery of cholinesterase activity followed to 99% and 56% of control after 11hr, respectively. K_i of phosphorodithioate and phosphorothioate with P=S was $74\sim 322 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$ *in vitro*. K_i of phosphate and phosphorothiolate with P=O was $13898\sim 79610 \text{ mole}^{-1}\text{min}^{-1}$. Toxicology of organophosphorus with P=S was higher than that of organophosphorus with P=O by oxidation. pI_{50} of phosphorodithioate and phosphorothioate with P=S was $21\sim 102 \text{ mg}/\text{L}$. pI_{50} of phosphate and phosphorothiolate with P=O was $0.519\sim 0.071 \text{ mg}/\text{L}$. Enzyme-Inhibition method with cholinesterase was the rapid bioassay method to detect the organophosphorus pesticides *in vitro*.

* Corresponding author (Fax. : +82-53-814-1412, E-mail : jungho@kyungsan.ac.kr)