약학회지 제 46 권 제 2 호 93~97 (2002)
Yakhak Hoeji Vol. 46, No. 2

藥學會誌

Methidathion 중독사에 의한 사후혈액 및 조직중 분포

이종숙# · 이재신* · 최동기 · 양희진 · 이상기* · 구기서 · 유영찬*
국립과학수사연구소 서부분소, *국립과학수사연구소

(Received January 28, 2002; Revised April 9, 2002)

Postmortem Distribution of Methidathion in Human Specimens of a Acute Poisoning

Jong Sook Rhee#, Jae Sin Lee*, Dong Ki Choi, Hee Jin Yang,
Sang Ki Lee*, Ki Ser Koo and Young Chan Yoo*
National Institute of Scientific Investigation, Western District Office, Jeollanam-Do 515-822, Korea
**National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-707, Korea*

Abstract — Methidathion is one of the organophosphorus pesticides commonly used for stamping out harmful pests in farming areas. This paper presents a fatality due to methidathion intoxication and describes the distribution of methidathion in postmortem blood and tissues obtained at autopsy. Qualitative identification of methidathion was achieved by TLC, GC and GC/MS, and quantitative analysis was performed by GC with thermionic specific detector (TSD). The analytes in postmortem specimens were extracted by liquid-liquid extraction (LLE) with ethylether. After the ethylether layer was evaporated, the residue was partitioned into hexane and acetonitrile, and the acetonitrile layer was used for analysis. Tissue specimens were homogenized with 4% perchloric acid and applied for LLE. After extraction, the extracts were reconstituted 100 μg pyraclofos (IS, 100 μg/*ml* in methanol) for GC and GC/MS analysis. On analysis of postmortem specimens, methidathion was identified and quantitated. The methidathion concentrations were 2.0 μl/*ml* in blood, 24.4 μg/g in liver, 13.9 μg/g in lung, 21.8 μg/g in kidney, respectively.

Keywords □ methidathion, postmortem specimen, GC, GC/MS, TLC

Methidathion(Fig. 1)은 사과나 오이의 진딧물, 잎말이나방 등의 해충제거에 사용되는 유기인계 살충제로서, 우리 나라에서 수프라사이드, 메치온 등의 상품명으로 시판되는 고독성 농약이다.[1-5] 이 농약의 인체에 대한 치사량은 알려져 있지 않으나, 실험동물인 흰쥐와 토끼에 대한 경구급성독성(LD_{50})은 각각 25~54 mg/kg, 63~80 mg/kg이라고 보고되어 있다.[4]

유기인계농약은 독성이 강하여 종종 자 · 타살목적으로 오용되고 있으며, 1회에 다량을 섭취시 나타나는 주요한 중독증상으로는 두통, 어지러움, 불안, 시야몽롱, 구역, 설사, 근육섬유화, 맥박감소, 호흡억제, 폐부종, 심장마비 등이 보고되어 있다.[6-8] 이 농약은 콜린에스테라제를 비가역적으로 저해함으로써, 아세틸콜린이 체내에 축적되어 호흡곤란 등으로 사망하게 된다고 알려져 있다. 이의 해독제로는 atropine sulfate, pralidoxime(2-PAM), obidoxime(toxogonin) 등이 있다.

약독물을 음독하여 일어난 사망사건의 경우 장기간 방치되어 부패나 변질이 일어나거나 화재발생 등으로 인하여 법과학적 규명이 어려운 사건이 종종 있다. 본 연구의 목적은 이러한 상황에 대비하여 약독물이 다량 축적된 사람의 표적장기조직을 연구하여 독성학적 자료로 활용하고, 그 사인을 규명하고자 함이다.

이에 본 연구실에서는 농약음독에 의한 급성중독으로 사망한 사례에서 TLC, GC/TSD, GC/MS에 의하여 postmortem specimen중 methidathion을 확인하고, GC/TSD에 의하여 정량하였기에 보고하고자 한다.

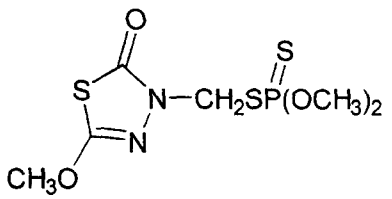

Fig. 1 – Chemical structure of methidathion.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 061-393-8443 (팩스) 061-393-8444
(E-mail) rheejs@nisi.go.kr

실험방법

시약 – Methidathion($C_6H_{11}O_4PN_2S_3$, Mw 302.33)과 pyraclofos는 Chem Service사의 표준품을 사용하였으며, 그 이외의 시약은 시판 특급을 사용하였다.

기기 – 가스크로마토그라프(GC)는 검출기로 TSD가 장착되어 있는 Varian 3400 Gas Chromatograph(USA)를, 가스크로마토그라프/질량스펙트럼(GC/MS)은 Varian SATURN 2000(USA)을 이용하였으며 이 때 각 기기의 분석조건은 Table I 및 Table II와 같다.

시료 – 199x 년 9월 00집 보일러실에서 47세 남자 김00가 자녀문제로 부부싸움후, 가출 7일만에 사망한 채, 그의 여동생에 의해 발견되어 00 경찰서에 신고되었다. 사인규명을 위하여 국립과학수사연구소 서부분소에서 부검이 시행되었으며, 특이할만한 외부소견이나 장기조직의 병변을 보지 못하는 등 부검소견이 있어, 이에 사후검체중 혈액, 위내용물, 간조직, 폐조직 및 신장조직에서 약독물검사를 시행하였다.

생체시료중 methidathion의 확인 – 생체시료인 위내용물중 약독물은 Stas-Otto법으로 추출하였다. 각 시료의 주석산산성에서 추출한 분획에서 박층크로마토그라프를 시행한 결과 유기인계 농약에 대한 양성반응이 관찰되었다. 전개용매는 chlorform/ethanol(9 : 1), benzene 및 hexane/acetone(9 : 1)을 사용하였고, TLC plate는 silica gel 60 F254(Merck Co.)를 사용하였으며, 정색제는 드라겐돌프시액, 산성염화백금산요오드시액, 염화팔라듐시액으로 발색하였다.[9] 정색된 일정한 위치의 반점을 preparative TLC로 정제하여 이를 가스크로마토그라피(GC), 가스크로마토그라피/질량분석기(GC/MS)에 주입하여 methidathion의 표준품과 동일한 retention time의 peak를 관찰하였으며, 이 peak에 대한 질량스펙트럼의 fragmentation pattern이 methidathion임을 확인하였다.

혈액 및 조직중 methidathion의 확인 및 정량 – 시험관에 혈액 1 ml를 정확하게 취하여 ethylether 5 ml로 추출하였다. 추출액을 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층부의 ether 층을 25°C 이하의 온도에서 감압 농축한 다음, 잔사를 hexane/acetonitrile(5 : 1) 혼합액 6 ml에 녹인 다음 vortex후 원심분리(3,000 rpm, 5분)하여 하층의 acetonitrile 층을 감압 농축하였다.[10-11] 잔사에 내부표준용액인 pyraclofos 100 μg/ml 100 μl를 가한 후 그 액 1 μl를 GC나 GC/MS에 주입하였다. 각 장기조직은 가위로 2-3 mm의 조각으로 하여 약 1 g을 정밀히 달아 4% perchloric acid 4 ml를 가하여 균질화하였다. 이를 30분동안 sonication하여 균질화한 액을 장기조직의 시료용액으로 하여 혈액과 동일한 방법으로 시행하였다

검량선의 작성 – GC에 의하여 혈액 등의 생체시료 중에서 methidathion을 정량하기 위하여 0~30 μg/ml 범위의 methidathion 표준용액에 대하여 검량선을 작성하였다. Methidathion의 표준품 10 mg을 정확히 달아 메탄올에 용해하여 1.0 mg/ml의 표준원액을 조제하였다. 이를 증류수로 희석하여 1, 3, 10, 30 μg/ml의 표준용액을 조제하였다. 내부표준용액은 pyraclofos를 메탄올에 100 μg/ml의 농도로 용해하여 사용하였다. 검량선은 methidathion 1, 3, 10, 30 μg/ml의 표준용액 1 ml를 혈액과 동일한 방법으로 추출한 후, GC/TSD에 주입하여 얻은 크로마토그람에서 내부표준물질에 대한 피크면적비를 구하여 작성하였다.

회수율 시험 – 증류수 1 ml에 methidathion 5, 10 μg을 첨가하여 시료와 동일한 방법으로 추출하여 농축후 내부표준용액 100 μl를 가하여 얻은 내부표준물질에 대한 시료의 피크면적비를 앞서 작성한 검량선에 적용하여 회수율을 구하였다. 또한, methidathion을 함유하지 않은 혈액 1 ml에 methidathion 5, 10 μg을 첨가하여 시료와 동일한 방법에 따라 처리하여 혈액에 대한 회수율을 구하였다.

Table I – GC conditions

Gas Chromatograph	: Varian STAR 3400 Gas Chromatograph programmed with STAR software (USA)
Column	: DB-5 Column (0.25 mm × 15 m, thickness 250 μm)
Detector	: TSD
bead current	3.2 A
baseline	0.17 mV
Column temp.	: 100°C (1 min)->260°C (15 min), prog. rate 10°C/min
Injector temp.	: 270°C
Detector temp.	: 280°C
Column flow rate(He)	: 1 ml/min

Table II – GC/MS conditions

GC/MS	: Varian SATURN 2000 (USA)
Column	: DB-1MS (0.25 mm × 15 m, thickness 250 μm)
Column temp.	: 100°C(1 min)->250°C(13 min), prog. rate 20°C/min
Injector temp.	: 260°C
Ion trap temp.	: 200°C
Electron multiplier voltage	: 2100 V
Ion mode	: EI
Split ratio	: 100 : 1
Mass range	: 50 to 650 m/z
Flow rate of carrier gas(He)	: 1 ml/min.

결과 및 고찰

Methidathion을 음독하여 사망한 사람의 위내용물에서 TLC에 의하여 약독물을 screening하였을 때, 전개용매가 chlorform/ethanol(9 : 1)인 경우 Rf값이 약 0.8에서 반점이 관찰되었으며, 이 반점은 드라겐돌프시액에 의해 주황색으로, 산성염화백금산요오드시액에 의해 황색으로, 염화팔라듐시액에 의해 황색으로 즉, 유기인계 농약에 대하여 양성으로 정색되었다. 이 반점을 정

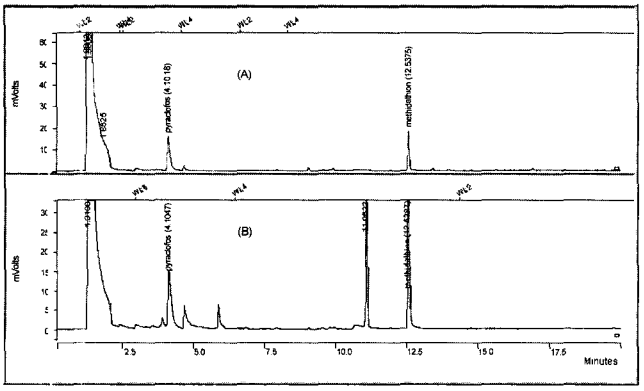

Fig. 2 – Gas chromatograms of methidathion standard(A) and blood extract(B).

제하여 GC/TSD 및 GC/MS에 의해 methidathion임을 확인하였다. 추출용매는 chlorform/ethanol(9 : 1), benzene 및 hexane/acetone(9 : 1)으로 하여 methidathion 표준품과 TLC를 시행하여 재차 비교 확인하였다. 혈액, 간장, 폐 및 신장조직에서 methidathion의 추출에는 액액추출법을 사용하였으며, 장기조직은 homogenizer를 이용하여 균질화시킨 후 추출하여 GC/TSD에 의하여 확인 및 정량을 하였고, 이를 GC/MS에 의하여 재확

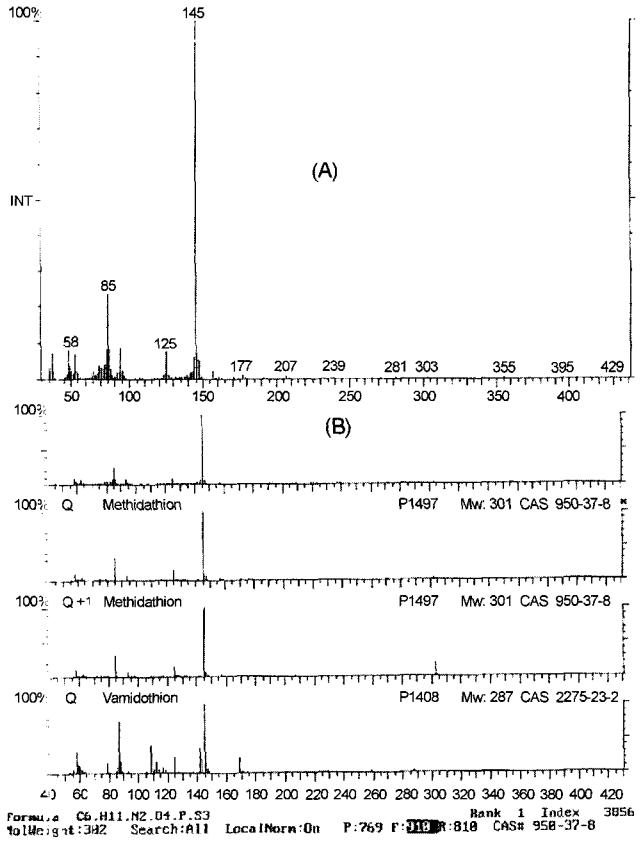

Fig. 3 – Mass spectrum(A) of methidathion for postmortem blood extract and its library search result(B).

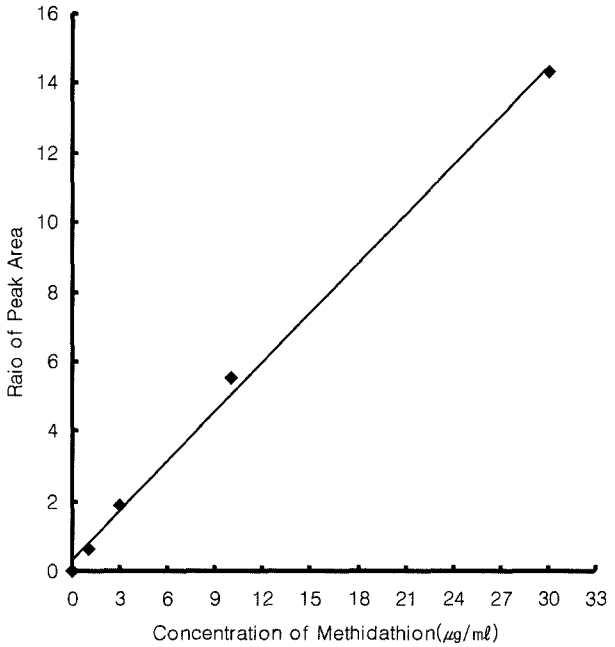

Fig. 4 – Calibration curve of methidathion in distilled water by GC/TSD.

인하였다. 이에 대한 가스크로마토그람과 질량스펙트럼은 Fig. 2와 Fig. 3에 표시하였다. Fig. 2의 (A)는 methidathion 표준품에 대한 gas chromatogram으로 4.1분에서 내부표준물질인 pyraclofos가, 12.5분에 methidathion이 관찰되었고, Fig. 2의 (B)는 혈액을 추출한 gas chromatogram으로 표준품에서와 같이 4.1분에 내부표준물질이, 12.5분에 methidathion이 관찰되었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 혈액으로 추출하여 측정된 mass spectrum(A)은 methidathion library search의 결과(B)와 동일한 물질로 확인되었다.

생체시료에서 methidathion을 GC/TSD에 의하여 정량하기 위하여 0~30 μg/ml 범위의 표준용액에 대하여 시료와 같이 추출 후 GC 크로마토그람을 측정하여 검량선을 작성하였을 때 Fig. 4에 나타난 바와 같이 상관계수가 0.998이었다. 증류수에 methidathion을 첨가한 후, 추출하여 얻은 회수율은 5 μg의 경우 99.0%, 10 μg의 경우 96.7%이었으며, 혈액중 회수율은 5 μg의 경우 97.6 %, 10 μg의 경우 76.6%이었다(Table III). 회수율

Table III – Recovery of methidathion added to distilled water and blood

Matrix	Added amount (μg)	Found amount (μg, Mean ± SD*)	Recovery (%)
Distilled water	5.0	4.95 ± 0.43	99.0
	10.0	9.67 ± 0.28	96.7
Blood	5.0	4.88 ± 0.28	97.6
	10.0	7.66 ± 0.13	76.6

*Data are expressed as means±SD (n=7)

시험에서 증류수에 비하여 혈액중 회수율은 다소 감소하는 경향을 보였다. 이는 혈액에 함유되어 있는 많은 단백질 등 불순물로 인한 matrix effect의 결과로 사료된다.

일본의 한 통계에 의하면 1987년~1990년 일본에서 유기인계 농약에 의한 급성중독 사례건수는 1397건이었다.[12] Methidathion을 음독하여 자살을 기도한 사례(47세, 남자)에서 병원래원 당시 이의 혈중농도는 병원치료 제 1 일 2.8 μg/ml, 제 2 일 1.2 μg/ml, 제 3 일 0.8 μg/ml, 제 8 일 0.09 μg/ml으로 점차 감소하였고, atropine, activated charcoal, PAM 등 병원의 응급처치 치료과정으로 15일후 완전히 회복되었다(제 1 례).[13] 또한, 음독 22일후 사망한 사례(74세, 남자)에서는 병원에 도착 당시 6.2 μg/ml이었고, 제 2 일 8.3 μg/ml, 제3일 4.5 μg/ml, 제 4 일 3.1 μg/ml, 제 8 일 0.1 μg/ml으로 점차 감소하였으나, 사후 혈중농도는 0.08 μg/ml이었다고 보고하였다(제 2 례).[13] 그리고, 음독 34시간 후 사망한 사례(70세, 남자)에서 병원에 도착할 때 혈중 농도는 3.3 μg/ml이었으나, 사후 혈액과 장기 조직중 methidathion의 농도는 혈액 1.8 μg/ml, 신장 4.5 μg/g, 간장 6.4 μg/g, 폐 3.9 μg/g, 심장 5.2 μg/g, 뇌조직 1.34 μg/g이라고 보고하였다(제 3 례).[13] Methidathion 약 6.2 g을 음독한 후 3회의 혈액관석과 atropine, pralidoxime 투여 등의 응급처치후 급성중독으로 사망한 사례(50세, 67 kg, 남자)에서 응급실에 도착직후 혈장중 methidathion의 농도는 1675 μg/ml이었으나, 6일후 7 μg/ml로 감소하였으며, 소변에서는 539 μg/ml에서 7일후 7 μg/ml로 감소하였고, 위액에서는 53415 μg/ml에서 8일후 12 μg/ml로 감소하였다(제 4 례).[14]

본 연구에서 methidathion을 음독 사망한 사례에서 GC/TSD를 사용하여 methidathion을 정량한 결과, 사후 사람의 혈액 및 장기조직에서 methidathion의 함량은 혈액에서 2.0 μg/ml이었고, 간장에서는 24.4 μg/g, 폐에서는 13.9 μg/g, 신장에서는 21.8 μg/g이 검출되었다. 따라서 본 사례의 경우 혈중농도가 2.0 μg/ml으로 제 1 례의 초기 혈중농도보다 낮고, 연령이 동일한 성인이므로, 음독후 신속하게 응급처치 등을 시행하였다면 제 1 례의 경우와 같이 생존할 수 있었으리라 사료된다. 또한, 본 사례는 간장과 신장조직중 methidathion의 함량이 혈액에 비해 약 10배이상 높게 검출되었으며, 제 3 례의 경우와 같이 사람의 간장, 신장조직에 methidathion이 다량 축적됨을 알 수 있었으며, 이로부터 부패 등이 진행되어 사인규명에 어려움이 있을 경우 이들 장기조직 검체의 활용이 가능하리라 본다.

결 론

법과학분야에서 경구에 의한 중독이 의심되는 경우에 1차 예비실험은 위내용물을 대상으로 Stas-Otto법에 의하여 약독물을 추출하는데, 본 사례의 경우에 postmortem specimen인 위내용물에서 약독물을 추출, 박층크로마토그라피(TLC)에 의한 전개후 정색제를 분무한 결과, 산성분획에서 일정한 위치의 반점이 드라겐돌프시액에 의해 주황색으로, 산성염화백금산요오드시액에 의해 황색으로, 염화팔라듐시액에 의해 황색으로 정색되었다. 이 위치의 반점을 preparative TLC로 정제한 후 GC와 GC/MS를 측정하여 표준품과 비교한 결과 methidathion임을 확인하였으며, postmortem specimen인 혈액, 간장, 폐 및 신장에서도 methidathion을 확인하였다. 그리고, postmortem specimen에서 methidathion의 함량은 혈액에서 2.0 μg/ml, 간장에서 24.4 μg/g, 폐에서 13.9 μg/g, 신장에서는 21.8 μg/g이었다.

이상과 같은 시험결과 methidathion 농약을 음독하였을 때 methidathion이 가장 높게 검출된 인체조직은 간장이었으며, 다음으로 신장조직, 폐조직 순이었다.

문 헌

1) Jackson J. V., Moss M. S. and Widdop B. : *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in pharmaceutical, body fluids, and post-mortem material* 2nd ed., The Pharmaceutical Press (1986).
2) Baselt, R.C. and Cravey, R.H., Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man 4th ed., Chemical Toxicology Institute (1995).
3) Amdur M. O., Doull J. and Klaassen C. D., *CASARETT AND DOILL'S TOXICOLOGY* 4th ed., Pergamon Press (1991).
4) Tomlin C. D. S., The Pesticide Manual 7th ed., British Crop Protection Council, p. 811 (1997).
5) '99 농약사용지침서, 농약공업협회, p.284 (1999).
6) Dreisbach R. H., Robertson W. O. : *Handbook of Poisoning: Prevention, Diagnosis & Treatment* 12th ed., Appleton & Lange, p.112 (1987).
7) Henderson J. D., Yamamoto J. T., Fry D. M., Seiber J. N., Wilson B. W. : Oral and dermal toxicity of organophosphate pesticides in the domestic pigeon (Columba livia), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**(5), 633 (1994).
8) Gaines T. B. and Linder R. E. : Acute toxicity of pesticides in adult and weanling rats, *Fundam. Appl. Toxicol.* **7**(2), 299 (1986).
9) Futagami K., Narazaki C., Kataoka Y., Shuto H. and Oishi R. : Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **704**, 369 (1997).
10) Teitelman U., Adler M. and Levy I. : Treatment of massive poisoning by the organophosphate pesticide methidathion, *Clin. Toxicol.* **8**(3), 277 (1975).
11) Lee S. K., In S. W., Park Y. S., Chung Y. H. and Koo K. S. : *Annual Report of N.I.S.I.* **28**, 356 (1996).
12) Cho Y., Matsuoka N. and Kamiya A. : Determination of

organophosphorous pesticides in biological samples of acute poisoning by HPLC with diode-array detector, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **45**(4), 737 (1997).

13) Tsatsakis A. M., Aguridakis P., Michalodimitrakis M. N. : Tsakalov A. K., Alegakis A. K., Koumantakis E. and Troulakis G. : Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete, *Vet. Hum. Toxicol.* **38**(2), 101 (1996).

14) Zoppellari R., Targa L., Tonini P. and Zatelli R. : Acute poisoning with methidathion :- a case, *Hum. Exp. Toxicol.* **9**(6), 415 (1990).