

## Flupyrazofos 원제 및 정제품의 불순물 조성과 Acetylcholinesterase에 대한 저해 비교

유경렬<sup>1</sup>, 조부연<sup>1</sup>, 박동식, 허장현\*

<sup>1</sup>(주)성보화학 중앙연구소, 강원대학교 농업생명과학대학 생물환경학부

**요약** : 피라졸 계열의 유기인계 살충제인 flupyrazofos(O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothioate)의 합성공정에서 생산된 원제 1(95.4%), 원제 2(97.6%) 그리고 정제품(99.2%)에 대한 불순물 조성과 함량을 조사하였으며, 이들 원제 및 정제품을 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 acetylcholinesterase (AChE) 활성 저해 정도를 비교 검정 하였다. 실험결과 불순물의 조성은 O,O,O-triethylthio-phosphoric acid(TEA), 1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-ethoxy pyrazole(PTMEP), O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphoric acid ester(flupyrazofos oxon), O,S-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothionate (S-ethyl flupyrazofos)이었으며, 이들 불순물들의 함량이 원제 중에서 전반적으로 높았다. *In vitro* 상에서의 AChE 저해는 불순물들이 많은 원제 1에서 가장 빠르게 저해되었으며, 생쥐 뇌 AChE (*in vivo*)에 대한  $I_{50}$ 값은 원제 1과 2가 정제품 보다 40% 이상 높았다. 이는 정제품에 비하여 원제 중에 더 많이 함유된 flupyrazofos oxon과 S-methyl flupyrazofos에 의한 영향일 것으로 판단되었다.(2004년 11월 19일 접수, 2005년 3월 23일 수리)

**색인어** : AChE 저해, flupyrazofos, flupyrazofos 불순물, 유기인계 살충제, 이분자저해속도상수.

Flupyrazofos(그림 1) (O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothioate)는 (주)성보화학 한국화학연구원이 공동으로 개발하여 1996년 국내 최초로 상품화(선봉<sup>®</sup>)된 새로운 피라졸계통의 유기인계 살충제이다. 화학적 구조는 기존의 유기인계와 유사하게 thio 결합과 alkoxide기를 가지고 있으며, aryl group에는 1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazole이 결합된 화합물이다. 이 약제는 배추, 양배추, 유채꽃의 배추좀나방 및 기존 유기인계 및 피레스로이드계 살충제 저항성 나방에 약효가 우수한 것으로 알려져 있으며, 독성 발현 기간은 다른 유기인계 살충제와 같이 acetylcholinesterase(AChE) 활성을 저해하는 것으로 보고되어 있다(송 등, 1998; Chung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004).

본 연구는 flupyrazofos 원제 합성공정 과정에서 생산된 원제 1(95.4%)과 원제 2(97.6%) 그리고 정제품(99.2%)에 대한 불순물의 조성과 함량을 확인하고자 수행되었다. 또한 이들의 target 효소인 AChE에 대한 저해정도를 비교하기 위하여 *in vitro* 상에서 AChE에 대한 biomolecular inhibition rate constant( $k_i$ )와 *in vivo* 상에서 생쥐의 뇌 AChE에 대한 활성 저해를 통하여

불순물 함량이 다른 원제 2종과 정제품의 독성 정도를 비교하고자 하였다.

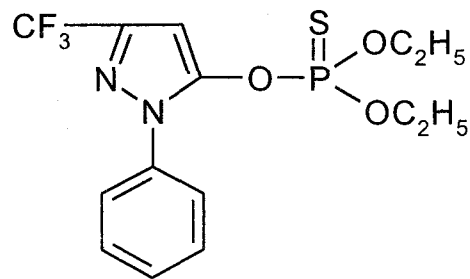


Fig. 1. Chemical structure of flupyrazofos.

Flupyrazofos 원제 1(95.4%)과 원제 2(97.6%)는 성보화학(주)으로부터 분양받았으며, 정제품(99.2%)은 원제 2를 실험실에서 silica gel (Merk 60 mesh, Germany)이 충전된 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 혼합용매 (n-hexane : ethylacetate = 20 : 1)로 분리 정제한 후 사용하였다. Flupyrazofos 원제 및 정제품에 함유된 불순물은 Gas Liquid Chromatograph/Mass Spectroscopic Detector(Shimadzu QP1000, Japan)를 사용하여 분석하였으며(그림 2), 이중 4개의 물질은 mother ion과 fragmentation 양상을 확인하여 동정하였다. 불순물의

\*연락처

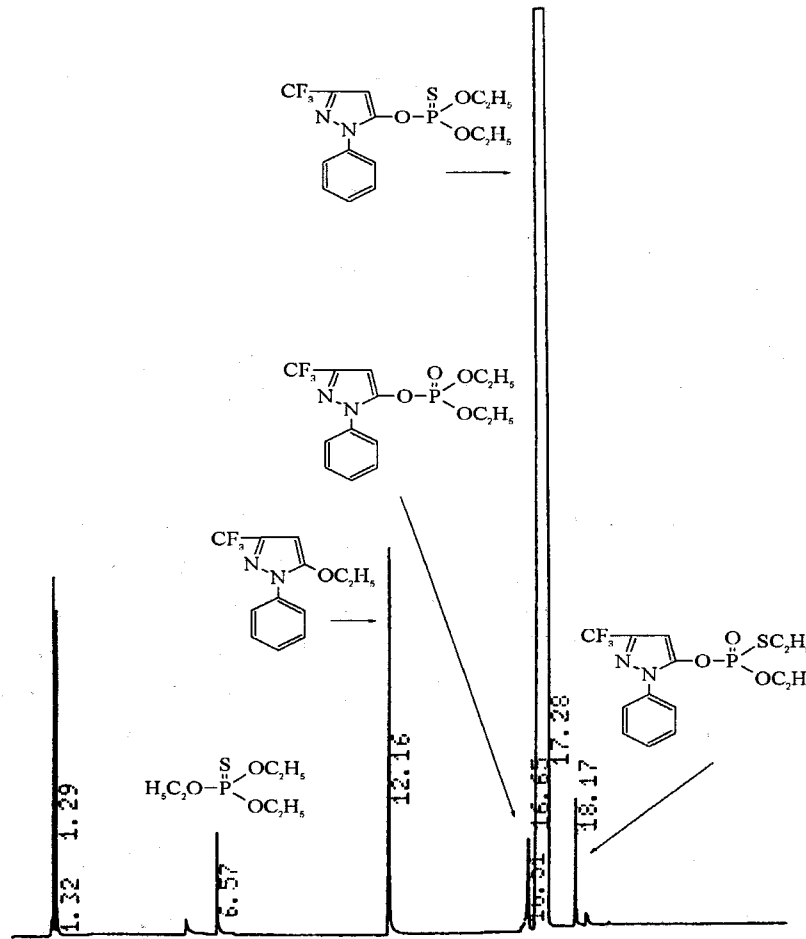


Fig. 2. Chromatogram of technical flupyrzofos(95.4%) and its impurities by gas chromatograph with mass detector

종류는 주요 불순물의 양을 총면적비로 나타낸 표 1에서 보는바와 같이 O,O,O-triethylthio-phosphoric acid(TEA), 1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-ethoxy pyrazole (PTMEP), O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphoric acid ester(flupyrzofos oxon), O,S-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothionate(S-ethyl flupyrzofos) 등으로 조와 한 (1992)이 보고한 flupyrzofos 열분해 시 생성되는 분해산물들과 유사함을 보였다.

Flupyrzofos 원제 및 정제품에 함유된 불순물은 미확인 물질을 제외하고 PTMEP의 함량이 가장 높았으며, 그 외 flupyrzofos oxon, S-methyl flupyrzofos 그리고 TEA 등의 순이었다. 각 불순물의 함량은 정제품에 비하여 원제에서 전반적으로 높은 비율로 존재하였다.

Flupyrzofos 원제 1, 2 및 정제품에 대한 AChE의 활성 측정(*in vitro*)은 Ellman 등(1961)이 사용한 방법을 이용하였으며, 측정을 위한 반응 시약은 0.01 mM

Table 1. Total area ratio of impurities in flupyrzofos on gas chromatogram

Compound	Total area ratio (%)					
	TEA	PTMEP	Flupyrzofos-oxon	Flupyrzofos	S-Ethyl flupyrzofos	Unknown
Technical 1 (95.4%)	0.41	2.03	0.85	93.79	0.65	2.27
Technical 2 (97.6%)	0.52	0.87	0.33	97.39	0.08	0.81
Purified (99.2%)	ND <sup>a)</sup>	0.50	0.31	98.57	0.14	0.48

<sup>a)</sup> not detected

Table 2. Bimolecular inhibition rate constants( $k_i$ ) of two flupyrzofos technical grades and purified flupyrzofos

Compound	Concentration (M)	$k_i$ for AChE (M min. <sup>-1</sup> )
Technical 1 (95.4%)	$3 \times 10^{-5}$	$5.9 \times 10^3$
Technical 2 (97.6%)	$3 \times 10^{-5}$	$5.0 \times 10^3$
Purified (99.2%)	$3 \times 10^{-5}$	$4.8 \times 10^3$

acetylthiocholine iodide 1.0 mL, 0.1 mM 5-5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic acid)(DTNB) 용액 2 mL, 인산 완충용액 57 mL(pH7.4)를 사용하기 직전에 혼합하여 조제하였다. 이 혼합용액 중 965  $\mu$ L를 취하여 1 mL의 cuvette에 넣고 acetylcholinesterase(4 unit 0.1 mL<sup>-1</sup>, AChE electric eel V-S type, Aldridge Chemical Co., USA) 30  $\mu$ L를 가한 후 ethanol에 용해한 flupyrzofos (원제 1, 2와 정제품) 3  $\mu$ L를 신속히 가하였다. 그 다음 37°C에서 3, 6, 9, 12분에 각각 흡광도(412 nm)를 측정하였다.

AChE의 활성 저해에 따른 bimolecular inhibition rate constant( $k_i$ )값 측정은 Aldridge(1950)와 Holligworth(1989)의 방법을 이용하였다. 측정된  $k_i$ 값은 시간에 따른 약제의 AChE 저해 속도를 나타내는 것으로, 값이 클수록 효소의 저해속도가 빠름을 의미하는 것이다. 불순물 함량이 다른 flupyrzofos 원제 및 정제품의  $k_i$  값은 표 2에 나타난 것과 같이 원제 1 > 원제 2 > 정제품의 순으로 순도가 낮을수록, 즉 불순물 함량이 증가할수록 효소저해 속도가 높아짐을 알 수 있었다.

Flupyrzofos 원제 및 정제품에 함유된 불순물의 함량차이가 *in vivo* 상에서 생쥐 뇌 AChE의 저해력에 미치는 영향을 비교하였다. 불순물 함량이 다른 flupyrzofos 원제와 정제품을 propylene glycol에 용해하여 0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>수준으로 18~20 g 되는 수컷 생쥐(ICR계, 고려실험동물개발주식회사)에 복강 주사하였으며, 약제투여 후 물과 음식물 공급을 중단하고, 1시간 후 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌를 0.5 mL의 인산완충용액(pH 7.4)과 함께 마쇄 하여 원심분리한 후 조효소 추출물을 얻었다. 추출물 100  $\mu$ L에 37°C에서 2분간 항온 시킨 반응 시약 2.9 mL를 신속히 가한 후 *in vitro* 실험과 동일하게 AChE 활성도를 측정하여 I<sub>50</sub> 값을 산출한 후 저해력을 비교하였다.

Flupyrzofos를 생쥐에 복강투여한 후 생쥐의 뇌에서 AChE를 분리하여 AChE의 활성 저해양상을 I<sub>50</sub>로 비교 관찰한 결과 그림 3에서 보는바와 같이 flupyrzofos의 AChE 활성 저해 정도는 원제 1, 원제 2 > 정제품 순으로 이때의 I<sub>50</sub>값은 원제 1과 원제 2에서 각각 31 mg kg<sup>-1</sup>, 정제품에서 50 mg kg<sup>-1</sup>이었다. 이

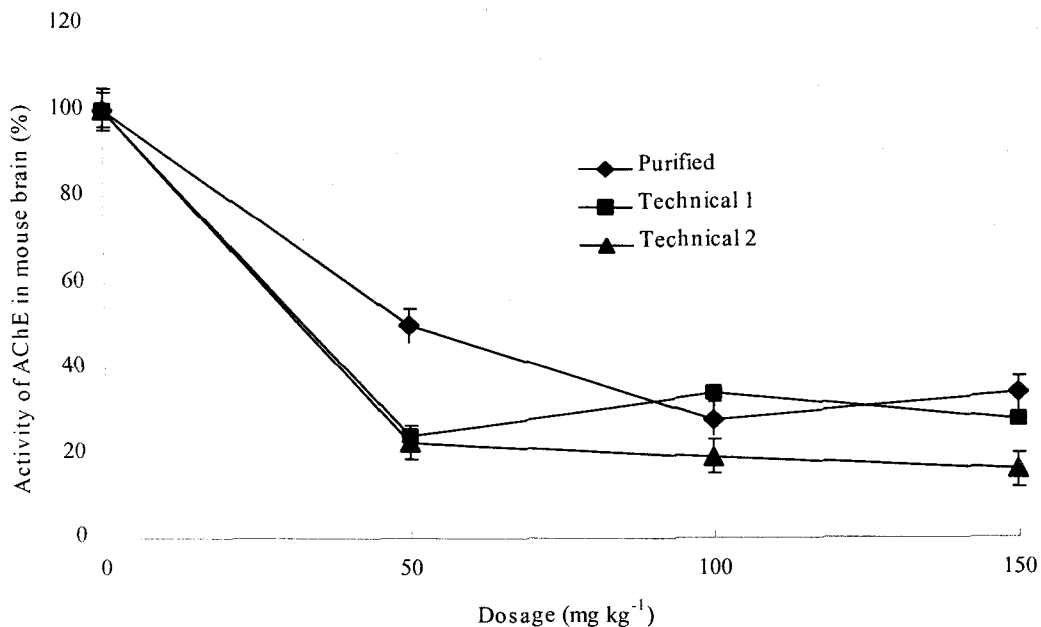


Fig. 3. Inhibition of mouse brain AChE by technical 1, 2 and purified flupyrzofos. Vertical bars represent standard error of the mean.

러한 원제들의 40% 저해력 증가 원인은 원제 중 함유된 일부 불순물들에 의한 영향 때문인 것으로 설명될 수 있을 것이다.

유기인계 농약은 체내에서 여러 가지의 oxygenase에 의하여 산화되어 oxon형태로 변환되며 활성 저해가 증가되는 것으로 알려져 있다(김과 홍, 1987; 김 등, 1988). Flupyrzofos 중 oxon의 양은 원제 1이 가장 많은 0.85%, 원제 2는 0.33%, 정제품은 0.31%이었다. 따라서 *in vitro* 와 *in vivo* 실험 결과 모두에서 flupyrzofos 정제품의 독성이 적은 것으로 나타난 것은 불순물로 존재하는 flupyrzofos oxon에 의한 영향일 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 한편 phosphorothiolate 계열의 유기인계 살충제들은 그 자체는 AChE에 대한 저해력이 낮지만 체내에서 산화적으로 활성화되어 sulfoxide와 sulfone 형태로 전환되면서 강력한 AChE 저해제로 작용하는 것으로 보고되어 있다(Vale, 1998). 본 연구결과 flupyrzofos 원제 중 함유된 주요 불순물 중 하나로 확인된 S-methyl flupyrzofos 경우에도 *in vivo* 실험을 통하여 생쥐 체내에서 활성화 과정을 겪으면서 저해력이 증가하여 독성에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되었다. 특히 원제 1 중 S-methyl flupyrzofos 함량이 0.65%로 정제품의 0.14%에 비하여 4~5배 정도 높아서 생쥐 뇌 AChE의 저해력에 어떤 형태든 영향을 미쳤을 것으로 사료되었다.

## 인용문헌

- Aldridge, W. N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to mechanism (E605) and analogues. *J. Biochem.* 46:451~456.
- Chung, M. K., J. C. Kim and S. S. Han (2002) Developmental toxicity of flupyrzofos, a new organophosphorus insecticide, in rats. *Food Chem. Toxicol.* 40:723~729.
- Elliman, G. L., K. D. Coutney, V. Address and R. M. Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88~91.
- Holligworth, R. H. (1989) Investigations into the chemistry, toxicology, metabolism and possible mode of action O-ethyl S-methylethylphosphonothioate, Ph.D. Dissertation, University of California, Riverside. 46~52.
- Kim, S. K., K. G. Lee, H. W. Kim, S. E. Yoo, K. J. Hwang and Y. D. Gong (2004) Insecticidal activity of flupyrzofos KH502 against *Plutella xylostella*: a CoMFA study. *Korean. J. Pestic. Sci.* 8(3):162~167.
- Vale, J. A. (1998) Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol. Lett.* 102:649~652.
- 김정호, 홍종욱 (1987) 유기인계 살충제 Phorate가 acetylcholinesterase 활성에 미치는 영향. *한국환경농학회지* 6(2):77~83.
- 김영배, 이성규, 김용화, 노정구 (1988) Diazinon과 carbofuran의 송사리(*Oryzias latipes*)와 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 선택적 독성과 acetylcholinesterase 저해. *한국환경농학회지* 7(2):117~123.
- 송시환, 김형진, 신천철, 임광현, 하창수, 한상섭 (1998) KH-502의 랫트 및 마우스를 이용한 급성독성시험. *한국독성학회지* 14(2):227~235.
- 조부연, 한대성 (1992) 신규 살충제인 O,O-diethyl O-(1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-pyrazoyl) thiophosphoric acid ester (KH-5-2)의 열에 의한 분해성. *한국환경농학회지* 11(3):225~234.

---

**Inhibition of acetylcholinesterase activity by impurities in technical grades and purified flupyrazofos**

Kyoung-Youl You<sup>1</sup>, Boo-Yeon Cho<sup>1</sup>, Dong-Sik Park and Jang-Hyun Hur<sup>\*</sup>(<sup>1</sup>Research Institute SUNGBO Chemicals Co., Ltd., Ansan 425-100, Korea, Division of Biological Environment, College of Agricultural and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

**Abstract** : Flupyrazofos (O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothioate) is an organophosphorus insecticide with a pyrazole moiety which is newly developed and commercialized by SUNGBO chemical company and Korean Research Institute of Chemical Technology for effectively control against diamond back moth. This study was conducted to determine the composition and quantity of impurities in technical 1 (94.5%), technical 2 (97.6%) and purified (99.2%) flupyrazofos using GLC/MSD. Bimolecular inhibition rate constant( $k_i$ ) with acetylcholinesterase (*in vitro*) and  $I_{50}$  with mouse brain acetylcholinesterase (*in vivo*) were measured for comparing inhibitory patterns of two technicals and purified flupyrazofos. Impurities of flupyrazofos were identified as O,O,O-triethylthio-phosphoric acid (TEA), 1-phenyl-3-trifluoromethyl-5-ethoxy pyrazole (PTMEP), O,O-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphoric acid ester (flupyrazofos oxon), and O,S-diethyl O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazo-5-yl phosphorothionate (S-ethyl flupyrazofos). In *in vitro*, technical 1 showed the fastest inhibition on AChE activity among them. And technical 1 and 2 showed 40% higher *in vivo* inhibition against mouse brain AChE than purified flupyrazofos did. These results could be caused by the impurities such as flupyrazofos oxon and S-methyl flupyrazofos contained in technical grades of flupyrazofos.

**Key words** : AChE inhibition, flupyrazofos, flupyrazofos oxon, organophosphorus insecticide, S-methyl flupyrazofos.

---

\*Corresponding author (Fax : +82-33-241-6640, E-mail : jhhur@kangwon.ac.kr)