

효소 저해법을 이용한 Carbamate계 농약의 다성분 잔류분석법 개발

김 정 호

대구한의대학교 소방방재환경학과
(2008년 7월 17일 접수; 2008년 9월 23일 수정; 2008년 9월 28일 채택)

Development of Multi-Residue Methods for Carbamate Pesticides by the Enzyme Inhibition Test

Jung-Ho Kim

Department of safety & Environmental Prevention, Daegu Haanny University, Gyeongbuk, 712-715, Korea
(Manuscript received 17 July, 2008; revised 23 September, 2008; accepted 28 September, 2008)

Abstract

This study was carried out with the detection for multiresidue of the carbamate pesticide such as carbaryl and cabofuran by enzyme-inhibition method. The check time for determination of acetylcholinesterase(AChE) activity was selected at 60 sec. The AChE activity in chicken brain determined by the Ellman's method was 162 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein. I_{50} for AChE by carbamate pesticide with wet kit was 0.169 mg/L of carbaryl and 0.089 mg/L of cabofuran, respectively. The incubation time for enzyme kit with substrate kit was 30min for determination of AChE activity. Enzyme kit with substrate kit was stable at 4°C and 25°C for 5 days. Limit detection concentration of carbaryl with dry kit for AChE was 0.05 mg/L. The dry kit such as wet kit applied Enzyme-Inhibition(EI) method with AChE was confirmed the multiresidue method to detect the carbamate pesticides.

Key Words : Enzyme inhibition, Acetylcholinesterase, Multiresidue method, Carbamate pesticides

1. 서 론

농약은 농작물의 생산량과 질을 높이기 위해 현대의 농업에 필요한 농자재이다. 이렇게 사용된 농약은 자연생태계와 식품 중에 잔류하게 된다¹⁾. 농약은 정도의 차이는 있으나 독성을 가지고 있어 잘못 사용하면 인축에 해를 주거나 환경을 오염시킬 가

능성을 내포하고 있다. 따라서 생물에 유해반응을 일으키는 농약의 잔류 평가방법은 그 물질에 대한 허용기준을 설정하거나 유해정도를 검토하는데 매우 중요하다²⁾. 농약의 안전성을 평가하기 위해서는 잔류된 농약의 농도를 측정할 필요가 있다. 그러나 잔류농약은 농도가 매우 낮아 분석에 고도의 기술이 필요한 분야이다.

자연생태계나 식품 중에 잔류된 시료 중의 잔류 농약을 분석하는 데에는 두 가지 방법이 있다. 잔류 농약 중 한 가지 성분의 농약을 정량분석 하는 단성분 잔류분석법(SRM, Single-Residue Methods)과 각

Corresponding Author : Jung-Ho Kim, Department of safety & Environmental Prevention, Daegu Haanny University, Gyeongbuk 712-715, Korea
Phone: +82-53-819-1416
E-mail: kim@dhu.ac.kr

각의 성분을 구별하지 않고 다성분 농약을 검출 할 수 있는 다성분 잔류분석법(MRM, Multi-Residue Methods)이 있다³⁾.

여기서 다성분 잔류분석법은 잔류 농약의 분석시간이 짧으며 분석대상이 포괄적이므로, 잔류 농약을 빠르고 간편하게 검색할 수 있다. 따라서 FDA를 비롯한 많은 분석 기관은 단성분 잔류분석법으로 농약 잔류량을 완벽하게 정량분석하기 전에 잔류 규정을 위반한 시료가 있는지를 알아보기 위한 감시 프로그램에 간편하고 편리한 다성분 잔류분석법을 종종 이용한다. 미국의 경우 다성분 잔류분석법은 농약 등록업자에 의해 EPA에 제출되어 PAM II에 등재되어 있다. 다성분 잔류분석법으로는 cholinesterase 효소저해시험법(cholinesterase enzyme inhibition tests), 효소면역분석법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays)등이 있다³⁾.

생체내의 많은 효소들은 농약처리에 의해 영향을 받는다. 유기인계 및 carbamate계 농약은 acetylcholinesterase 활성을 저해함으로써 신경기능 저해제로 작용하게 된다^{4,5)}. 신경전달물질 중에서 특히 acetylcholine을 가수분해하는 효소계는 acetylcholinesterase(E.C. 3.1.1.7., AChE, specific cholinesterase, true cholinesterase, redcell cholinesterase)와 cholinesterase(E.C. 3.1.1.8., ChE, nonspecific cholinesterase, pseudocholinesterase, serum cholinesterase)가 있다⁶⁾.

유기인계 및 carbamate계 농약은 AChE 활성을 저해함으로써 신경기능 저해제로 작용^{5,6)}하므로 acetylcholinesterase 효소의 저해 양상을 측정한다면 유기인계 및 carbamate계 농약을 정성분석 할 수 있다. 효소저해기술은 효소저해제의 미량분석에 이용될 수 있다. 따라서 최근 문제시 되고 있는 carbamate계 및 유기인계 농약의 화학적 분석에 앞서 효소저해법으로 이들 농약을 쉽고 빠르고 검출할 수 있을 것이다⁷⁾.

Albareda 등⁸⁾과 Dzyadevych과 Chovelon⁹⁾은 AChE와 ChE를 이용한 생물 검정법으로 물 중에서 유기인계 농약과 carbamate계 농약의 검출에 대해 보고하였다. Collier 등¹⁰⁾은 ChE biosensors를 이용해서 양의 털에 잔류된 diazinon과 chlorfenvinphos등의 유기인계 농약을 검정하였다. 김 등¹⁾은 습식법에 의한 carbamate계 농약의 구조에 따른 효소저해율에 대해

보고하였으며, 김²⁾은 유기인계농약과 carbamate계 농약의 구조에 따른 AChE 효소의 저해형태에 대해 습식법으로 실험하였다. 또한 김³⁾은 습식법에 의한 유기인계농약과 carbamate계 농약의 다성분 잔류검출에 대해 보고하였으며, 김¹¹⁾은 ChE 저해 활성을 이용한 유기인계 농약의 효소적 분석을 하였다.

효소활성의 측정은 용액상태에서 측정하는 습식법과 종이나 분말 등과 같은 상태에서 측정하는 건식법으로 대별할 수 있다. 지금까지의 유기인계 및 carbamate계 농약에 의한 AChE 효소의 저해에 관한 연구는 모두 습식법에 의한 방법이며 건식법에 의한 연구보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 종이를 이용한 건식법에 의한 carbamate계 농약의 검출 기법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시 농약 및 효소원

본 연구에 사용된 carbamate계 농약으로는 aromatic N-methylcarbamate계는 carbaryl[1-naphthyl methylcarbamate]과 carbofuran[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate]을, phenyl N-methylcarbamate계는 BPMC[2-sec-butylphenyl methylcarbamate], propoxur[2-isopropoxyphenyl methylcarbamate]와 isoprocarb[2-isopropylphenyl methylcarbamate] 및 metolcarb [3-methylphenyl methylcarbamate]를 택하였다. 공시농약은 표준품(순도 99.9% 이상)을 methyl alcohol에 용해하여 사용하였다¹²⁾.

효소원으로 사용된 공시동물은 부화 후 1일된 병아리(Hy-Line W-77, mail) 중에서 42~48 g 되는 건전한 개체를 사용하였다. AChE 조효소액은 병아리 뇌 전부를 취하여 인산완충용액(0.1 M, pH 7.8)을 무게의 2배를 첨가하고 균질화한 다음 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상등액을 사용하였다¹³⁾.

2.2. 습식 측정

습식 측정에 이용된 AChE 활성 측정은 Ellman 등의 방법¹⁴⁾에 준하여 다음과 같이 하였다. 기질로는 acetylthiocholine iodide(0.075 M)을 사용하였다. 효소활성 측정은 25°C에서 인산완충용액(0.1 M, pH 7.8) 3 mL, 기질 50 µl, dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB 0.01 M) 50 µl에 조효소액 100 µl을 가했다.

60초 후에 choline과 DTNB와 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 spectrophotometer(Shimadzu U.V-200)로 412 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 $\mu\text{mol acetylthiocholine}/\text{min}/\text{g protein}$ 으로 나타내었다. 여기서 단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 준하였으며, 표준품은 bovine serum albumin(Sigma 제)을 사용하였다.

인산완충용액(0.1M pH 7.8) 3 mL에 AChE 효소액 100 μl 과 공시농약을 50 μl 가하였다. 효소 저해제 복합체를 형성하도록 37°C에서 30분간 유지한 후 AChE 활성을 측정하였다. 대조구는 methyl alcohol을 동일량 첨가하였으며 효소활성의 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 대조구의 AChE 활성이며, B는 농약 처리구의 AChE 활성이다. 저해율의 비교는 효소활성의 50%가 저해되는데 필요한 반응액 중의 농도인 I_{50} 으로 표현하였다¹³⁾.

2.3. 건식 측정

건식측정을 위해 효소와 기질 disc를 각각 제조하였다. 효소 disc 제조는 가로 세로 1 cm 크기의 Whatman No. 1 종이 1개에 인산완충용액(0.1 M, pH 7.8), AChE 조효소액 20 μl , triton X-100(0.1%) 20 μl , EDTA(0.1M, 1%) 20 μl 를 차례로 첨가한 후 건조시켰다. 기질 흡착 disc 제조는 가로세로 1 cm 크기의 Whatman No. 1 종이 1개에 ferricyanide 수용액 20 μl , 0.1M indoxylacetate 20 μl 를 각각 첨가하여 건조시켰다.

건식 kit의 발색을 위해, 효소 disc를 시료에 3분간 침지한 후 효소 disc와 기질 disc를 포개었다. 30분 경과 후 푸른색이 나타나는지 확인하였다. 여기서 carbamate계 농약이 없는 대조구는 발색이 되어 짙은 보라색을 띤 푸른색이 나타났으며, carbamate계 농약이 있으면 발색이 되지 않아 무색으로 나타났다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효소저해법

Acetylcholine은 AChE에 의해 가수분해되어 choline과 acetic acid로 된다. 여기서 AChE활성의 측정

은 choline량을 측정하는 Ellman 법¹⁴⁾이 있다. Ellman 법은 기질로 사용된 acetylthiocholin이 가수분해되어 생성된 thiocholine을 dithiobisnitrobenzoic acid와 반응시켜 생성된 5-thio-2-nitrobenzoic acid를 비색정량하는 방법이다. Fig. 1은 thiocholine과 dithiobisnitrobenzoic acid의 반응에 의해 생성된 5-thio-2-nitrobenzoic acid의 흡광도를 측정한 것이다. 반응은 초단위로 매우 빠르게 일어났으며 효소량이 100 μl 일 경우는 60초가 되면 반응이 완료되었다. 따라서 AChE 활성측정을 위한 흡광도 측정시간은 60초로 하였다. 이렇게 측정한 AChE 활성은 162 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g protein}$ 이었다.

Fig. 2는 carbamate계 농약에 속하는 cabaryl 농약의 첨가농도에 따른 효소활성 저해를 알아보기 위해 흡광도를 측정한 것이다. Carbamate계 농약이 AChE와 효소-저해제 복합체를 형성하므로, Fig. 2와

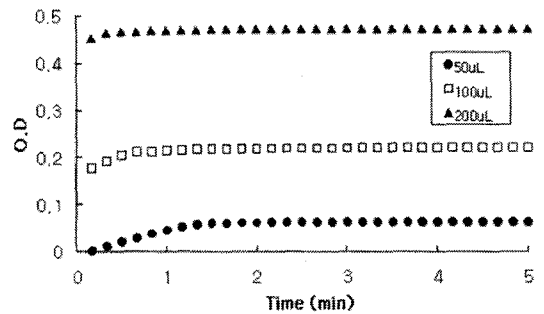


Fig. 1. Detection of acetylcholinesterase activity with Ellman method added enzyme of 50 μl , 100 μl and 200 μl , respectively.

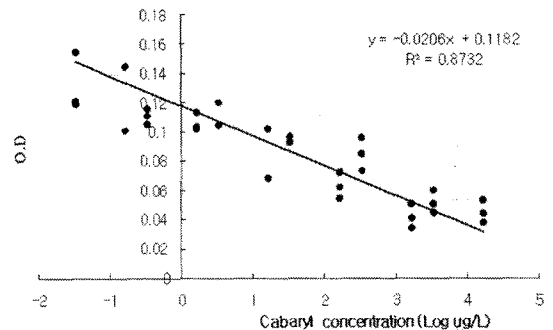


Fig. 2. Plot of the acetylcholinesterase inhibition with cabaryl.

같이 carbaryl 농도를 높게 할수록 흡광도와 낮아졌다. 이러한 AChE 저해를 생물학적 검정에 이용하면 유기인계 및 carbamate계 농약을 검출할 수 있다^{3,11)}. 따라서 본 연구에서는 효소저해법을 이용하여 carbamate계 농약을 검출하기 위한 습식 및 건식법을 개발하였다.

3.2. 습식법에 의한 carbamate계 농약 검출

Carbamate 농약에 속하는 carbaryl의 첨가농도와 효소 활성도 저해와의 관계는 Fig. 3과 같았다. 여기서 AChE의 효소활성을 50% 저해하는데 필요한 carbaryl의 농도 I₅₀은 0.169 mg/L이었다. 효소활성을 40%, 30%, 20% 저해 하는데 필요한 carbaryl의 농도 I₄₀, I₃₀ 및 I₂₀은 각각 0.046 mg/L, 0.013 mg/L 및 0.04 mg/L이었다.

Carbaryl의 I₅₀을 먹는물 관리법¹⁷⁾에 의한 먹는물 수질기준에 적용해 볼 수 있다. 먹는물 수질기준으로 carbaryl은 0.07 mg/L이므로 carbaryl의 I₄₀은 0.046 mg/L은 먹는물 수질기준의 허용농도보다 낮아, 음용수 중에 있는 carbaryl을 0.07 mg/L 이하까지 측정 가능할 수 있다. 이와 같이 AChE 효소를 이용하여 carbamate계 농약에 의한 AChE 효소 활성 저해도를 측정한다면, carbaryl 농약의 정성적 검출이 가능하다.

Carbaryl을 포함한 다른 종류의 carbamate계 농약의 I₅₀은 Table 1과 같았다. Carbamate 농약의 I₅₀은 대부분 0.071-0.169 mg/L 범위였다. 따라서 본 연구에서 확인된 효소 저해법을 이용하면 먹는물 중에서 carbamate계 다성분 농약을 빠르고 간편하게 측정할 수 있는 습식 검색용 kit로 개발할 수 있을 것이다.

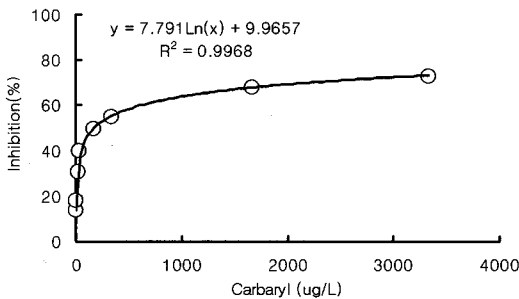


Fig. 3. Inhibition of acetylcholinesterase activity with carbaryl.

Table 1. I₅₀ for inhibition of acetylcholinesterase activity with carbamate pesticides

Carbamate pesticides	I ₅₀ (mg/L)
BPMC	0.076
Carbaryl	0.169
Cabofuran	0.089
Isoprocarb	0.072
Metolcarb	0.129
Propoxur	0.071

3.3. 건식법에 의한 carbamate계 농약 검출

효소 disc와 기질 disc를 겹쳐 푸른색으로 발색되는데 걸리는 시간은 Fig. 4와 같다. 효소와 기질의 반응에 의한 발색에는 20분이 소요되었으므로 본 실험에서는 효소 disc와 기질 disc를 겹쳐 반응하는데 필요한 시간을 30분으로 하였다.

효소 disc와 기질 disc의 안전성은 Table 2와 같았다. 일반적으로 효소는 매우 불안정하여 효소활성을 쉽게 잃어버릴 수 있다. AChE 효소 disc는 5일까지는 실활 되지 않았으며, 이는 저온인 4°C와 동일하게 25°C에서 실활 되지 않았다. 따라서 건식 kit을 상온에서 며칠간 사용 할 수 있었다.

Carbamate계 농약으로 carbaryl의 농도별 발색은 Table 3과 같았다. Carbamate계 농약이 있는 시료에서는 효소저해법에 의해 효소 disc의 활성이 없어지고 따라서 효소와 기질을 겹친 색은 무색이 된다.

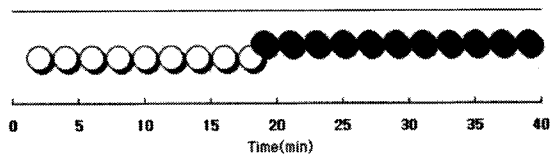


Fig. 4. Development of color with dry kit made by acetylcholinesterase for detection of carbamate pesticides.

Table 2. Stability of dry kit made by acetylcholinesterase for detection of carbamate pesticides

Temperature (°C)	Time (day)			
	0	1	3	5
4	● ¹⁾	●	●	●
25	●	●	●	●

1) ● negative, ○ positive

Table 3. Detection of carbamate pesticides with dry kit made by acetylcholinesterase

Carbamate pesticides	Concentration (mg/L)															
	0	0.0001	0.0005	0.001	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	1	5	10	50	500	1000
Cabaryl	● ¹⁾	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Cabofuran	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

1) ● negative, ○ positive

Carbamate계 농약의 농도에 따른 발색은 Table 3과 같이 carbaryl이 0.05 mg/L보다 높으며 AChE 효소의 활성이 저해가 되어 무색으로 나타났다. 그러나 0.05 mg/L보다 낮은 농도에서는 저해가 발색에는 영향을 미치지 못하여 disc가 푸른색으로 발색이 되었다. 따라서 건식 kit의 carbaryl에 대한 검출한계는 0.05 mg/L이었으며, 또한 carbofuran도 0.05 mg/L 이었다.

이를 먹는물 수질기준에 적용해 본다면, 현재 먹는물 관리법¹⁷⁾에서는 carbamate계 농약으로는 carbaryl 한 가지만 규제하고 있으며, 농도가 0.07 mg/L을 넘지 못하게 하고 있다. 한편 건식 kit의 검출한계가 carbaryl이 0.05 mg/L이므로 먹는물 수질기준 0.07 mg/L 보다 낮기 때문에 건식 kit에 의해 수중의 carbaryl 농약을 검출할 수 있을 것으로 사료된다.

건식 kit의 carbamate계 농약 검출한계는 0.05 mg/L 수준으로, 습식법의 0.071-0.169 mg/L 범위와 비슷하였다. 따라서 건식 kit는 습식법에 준하여 carbamate계 잔류농약을 간단하고 빠르게 검출할 수 있는 다성분 잔류분석용 kit로 사용가능성을 확인하였다.

다성분 잔류분석법에 의해 자연계 시료에서 AChE의 저해가 나타나서 건식 kit가 무색이 된다면 AChE 저해물질이 함유되어 있다는 의미이다. 여기에는 AChE의 저해에 특이성이 있는 carbamate계 농약을 포함한 유기인계 농약이나 또 다른 AChE의 저해화학물질이 존재할 가능성이 있다. 따라서 건식 kit에 저해가 나타난다면 다른 단성분 잔류분석법으로 carbamate계 농약을 비롯한 이들 화학물질의 농도를 측정하면 될 것이다.

4. 결 론

본 연구에서는 효소저해 방법을 이용하여 carba-

mate계 농약의 검출 기법을 개발하고자 하였다.

습식법에서 AChE 활성측정을 위한 흡광도 측정 시간은 60초로 하였으며, 이렇게 측정된 AChE 활성은 162 μmol/min/g protein이었다. carbaryl과 cabofuran의 AChE의 효소활성을 50 % 저해하는데 필요한 농도 I₅₀은 각각 0.169 mg/L와 0.089 mg/L이었다.

건식법에서 효소 disc와 기질 disc를 겹쳐 발색에 필요한 반응시간은 30분으로 하였다. 효소 disc와 기질 disc의 안전성은 4°C와 25°C에서 5일 동안 실행되지 않았다. 건식 kit의 carbaryl과 carbofuran에 대한 검출한계는 모두 0.05 mg/L이었다.

건식 kit의 carbamate계 농약 검출한계는 0.05 mg/L 수준으로, 습식법의 0.071-0.169 mg/L 범위와 비슷하였다. 따라서 건식 kit는 습식법에 준하여 carbamate계 잔류농약을 간단하고 빠르게 검출할 수 있는 다성분 잔류분석용 kit로 사용가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 대구·경북 지방중소기업청의 2003년 산·학·연 공동기술개발 컨소시엄 사업으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 김정호, 박홍재, 박병윤, 2002, Carbamate계 살충제에 의한 cholinesterase활성의 저해, 한국환경과학회지, 11(4), 391-397.
- 2) 김정호, 김영호, 1998, 유기인계 및 carbamates 농약에 의한 acetylcholinesterase 활성의 저해, 한국환경과학회지, 7(1), 52-56.
- 3) 김정호, 2002, 효소 저해법을 이용한 유기인계 및 carbamate계 농약의 다성분 잔류 검출, 환경독성학회지, 17(3), 265-272.
- 4) Eto M., 1974, Organophosphorus pesticides-organic

- and biological chemistry, CRC.
- 5) Kuhr R. J., 1977, Carbamate insecticides; chemistry, biochemistry, and toxicology, CRC, Ohio.
 - 6) Bergmeyer H. H., 1984, Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. IV, 52-74.
 - 7) 유홍일, 이해근, 전성환, 1991, 농약잔류 분석방법, 동화기술.
 - 8) Albareda-Sirven M., Merkoci A., Alegret S., 2001, Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology. *Analytica Chimica Acta*, 442, 35-44.
 - 9) Dzyadevych S. V., Chovelon J. M., 2002, A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using lumistox test and conductometric biosensor technique. *Materials and Engineering*. C21, 55-60.
 - 10) Collier W. A., Clear M., Hart A. L., 2002, Convenient and rapid detection of pesticides in extracts of sheep wool. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 815-819.
 - 11) 김정호, 2001, Cholinesterase 저해 활성을 이용한 유기인계 농약의 효소적 분석, *농약과학회지*, 5, 12-18.
 - 12) Tomlin C., 2000, The pesticide manual, 12th ed., British crop protection council, United Kingdom.
 - 13) 김정호, 1987, 유기인계 살충제가 병아리의 acetylcholinesterase 활성에 미치는 영향, 박사학위논문, 경북대학교, 대구.
 - 14) Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr.V., Featherstone R. M., 1961, A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
 - 15) Lowry O. H., Roesbrough N. J., Favre A. L., Randall R. J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
 - 16) Matsumura F., 1975, Toxicology of insecticides, Plenum Press, New York, 105-164.
 - 17) <http://www.klaw.go.kr/DRF/MDRFLawService.jsp?OC=me&ID=00165>