

## 제초제 Methiozolin의 급성독성평가

구석진·권민<sup>1</sup>·박철범<sup>1\*</sup>

목우연구소, <sup>1</sup>호서대학교 안전성평가센터

(2011년 12월 5일 접수, 2011년 12월 18일 수리)

### Evaluation of Acute Toxicity of the Herbicide Methiozolin

Suk-jin Koo, Min Kwon<sup>1</sup> and Cheol-Beom Park<sup>1\*</sup>

Moghu Research Center Ltd., <sup>1</sup>Hoseo Toxicological Research Center, 165 Sechul-ri, Baebang-eup, Asan-city, Chungnam, 336-795 Korea

#### Abstract

We investigated methiozolin acute toxicity using with Sprague-Dawley rats. The results of acute oral toxicity using rats showed LD<sub>50</sub> value of over 2,000 mg/kg bw for methiozolin. The calculate acute dermal LD<sub>50</sub> value of methiozolin was over 4,000 mg/kg. The skin irritation test showed moderately irritation and weak response of eye irritation test was observed in this experimental condition. According to these results, We concluded that methiozolin was Category IV in GHS chemical classification for acute toxicity. Future, we need more chronic toxicity test for safety.

**Key words** Acute toxicity, Herbicide, Methiozolin

## 서론

1894년 DDT의 개발 이후 농약의 오남용으로 인한 생태계 파괴 및 환경오염등의 문제가 야기될 뿐만 아니라, 식품위해성에 대한 인식 변화로 인해 보다 안전한 농약의 개발이 절실하다(Ashton 등, 1981; Brown 등, 1978; Chun 등, 1996; 황 등, 2001). 제초제는 잡초를 제거하여 노동력 절약과 수확량 증대를 위한 농약으로 특정 제초제의 경우 인체독성이 강하여 사회적문제가 되거나 환경생물에 위해성이 나타나 규제된 바 있으나, 일반적으로 제초제는 인체독성이나 환경생물에 대한 독성이 낮은 것으로 알려져 있다. 유효성, 편이성 및 높은 제초 효과를 갖는 제품 개발의 역사 40 여년 중에서 최근 15년 사이에 등장한 새로운 제초제는 기존의 제초제 보다 안전하고 유용한 제품으로 알려져 있다(권 등, 1986; Lyga 등, 1991; Kearney 와 Kaufman, 1988; Hay, 1999; Yogo, 2000).

Methiozolin은 기존 다른 제초제와는 전혀 다른 화학계통에 속할 뿐만 아니라 작용특성 또한 새로운 물질로 식물세포벽 생합성 저해활성을 갖는 다는 사실이 밝혀져 있다(구 등, 2010; Lee 등, 2007). Methiozolin은 이속사졸린계통의 신물질로 이에 대한 연구가 진행된 것이 거의 없다. Methiozolin과 구조적으로 유연관계에 있는 화학물질로는 Rheinheimer 등(1991)이 최초로 합성 및 보고 하였는데, 생물활성에 대한 상세한 자료 제시 없이 일부 화합물이 유체에 대해서 안전성이 있고 발아전처리로 잡초들을 방제한다고 보고한바 있다.

이후 Munro와 Patel(1993)은 isoxazolin에 nitro 기를 포함하는 benzene 환을 도입한 유도체에 대해 보고하였다. 그리고 Morida 등은 isoxazoline에 각종 alkyl, alkoxy 및 allyl 기를 포함하는 유도체를 합성하였고, Uehara 등은 isoxazoline에 Pyrazole 치환제를 도입한 유도체의 합성과 비 제초제로서의 생물활성에 대해 보고하였다(구 등, 2010). 그러나 이들 화합물에서는 특기할 만한 활성이 없었으므로 Ryu 등(2002)은 isoxazoline환에 치환된 thiophene환을 도입한 유도체에

\*연락처 : Tel. +82-41-540-9676, Fax. +82-41-540-9839

E-mail: cbpark@hoseo.edu

대해 보고하였으며, Hwang 등(2005)은 이중 5-(2,6-Difluorobenzyloxymethyl)-5-methyl-3-(3-methyl-thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-isoxazole의 벼 제초제로서 이용을 시도하였고, 구와 황(2007)은 methiozolin이 온실 발아조건에서 발아 전 처리 시 100~500g ha<sup>-1</sup> 약량으로 콩, 옥수수, 목화, 밀, 벼 등 주요작물에 대해 높은 안전성을 가지면서 피, 강아지풀, 미국개기장, 바랭이 등 화본과 잡초만을 선택적으로 방제해 잔디 제초제로서 유효하다고 보고하였다. Methiozolin에 대한 독성 연구는 현재까지 미미한 실정이다. 따라서 새로 개발된 제초제의 경우 사용 전 인체 독성에 대한 연구는 매우 중요하다. 급성 경구 독성의 시험방법은 각 국가마다 다양한 규정을 권장하고 있다. OECD의 급성 경구 독성 시험방법은 동물의 수를 줄이고 급성 경구 독성 시험에서 확보할 수 있는 충분한 결과를 얻을 수 있다(OECD, 2001). 현재 한국에서의 규정은 OECD의 방법을 준용하는 추세이며, 급성 경구 독성의 시험법으로 OECD의 방법을 따라서 수행하는 시도는 지속적으로 되어 왔다. 급성 경피독성시험의 경우 독성이 적은 경우에 단일 용량으로 시험을 수행할 수 있는 과학적 근거가 있을 경우 시도 할 수 있다. 피부자극성 시험은 농약의 인체 피부에 미치는 영향을 알아보기 위한 시험으로 토끼를 사용하며 홍반 부종 등의 평가지표를 사용하여 검토한다. 안점막 자극성 시험은 역시 토끼를 사용하며 홍채와 결막 각막을 독성학적으로 평가하여 그 독성을 검토한다.

따라서 본 연구에서는 methiozolin에 대한 급성 독성, 즉 급성 경구 독성, 급성 경피 독성, 피부자극성 시험, 안자극성 시험 등을 통해 해당 독성을 평가하고 인체 독성의 자료로 삼고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험물질

시험물질은 목우연구소에서 제공 받아 냉장보관하면서 시

험에 사용하였다.

### 시험동물 및 사육환경

8주령의 암수 특정병원체 부재 Sprague-Dawley 랫드를 ㈜오리엔트바이오로부터 구입하여 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시켜 급성의 경우 군당 3마리 경피시험의 경우 군당 5마리씩 분배하여 사용하였다.

피부자극 및 안점막 자극성 평가에는 2.0-2.5 g 정도의 암컷 New Zealand White rabbit를 각 군당 6마리씩 사용하였다. 모든 실험동물은 썬타코 바이오코리아에서 구입하여 사용하였다. 동물사육실은 온도 20 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 200~300 Lux로 유지하였다. 랫드의 경우 랫드용 와이어 케이지(500×300×200 mm, 대종기기 제작)에 2마리씩 넣어 사육하였고, 토끼는 스텔레스 사육상자(380×480×300 mm, 정도산업)에 1마리씩 넣어 사육하였고, 음수와 사료는 자유로이 급여하였다.

### 급성경구독성시험

급성경구독성시험은 18시간 절식 후 최대 용량인 2,000 mg/kg bw 강제 경구 투여하여 반수이상 생존하면 LD<sub>50</sub> > 2,000 mg/kg으로 실험을 종료하였고(OECD TG423), 산출된 LD<sub>50</sub> 값으로 독성을 구분하였다(Table 1).

### 급성경피독성시험

농촌진흥청 독성시험과 기준과 방법(제 5조 제1항 제 3호)을 참조하고 인축독성 시험기준과 방법에 따라 수행하였다. 급성경피독성시험은 투여 최대용량을 4,000 mg/kg bw으로 처리하였다. 시험물질 처리 하루 전 랫드의 등 부위를 제모 하였고, 시험물질 처리 24 시간 후에 제거 하였다. 반수이상 생존하면 시험을 종료하였다(농촌진흥청 2009a). 산출된 LD<sub>50</sub> 값으로 국내 농약관리법 급성독성정도에 따른 농약구분에 따

**Table 1.** Classification systems of acute toxicity for pesticides in Korea and Globally Harmonized classification System (GHS)

Class <sup>a)</sup>	Classification criteria			
	LD <sub>50</sub> (mg/kg bw)			
	Acute oral		Acute Dermal	
	Solids	Liquids	Solids	Liquids
I (Extremely)	<5	<20	<10	<40
II (Highly)	≥5, <50	≥20, <200	≥1, <100	≥40, <400
III (Moderately)	≥50, <500	≥200, <2,000	≥100, <1,000	≥400, <4,000
IV (slightly)	≥500	≥2,000	≥1,000	≥4,000

<sup>a)</sup> Classification Systems of Acute toxicity for pesticides in Korea

**Table 2.** Irritation index of skin and eye

	Irritation index	
	Skin (P.I.I. <sup>a)</sup> )	Eye (A.O.I. <sup>b)</sup> )
Non	≥1.0	≥10
Slightly	1.1~2.0	10.1~30.0
Moderately	2.1~5.0	30.1~60.0
Severely	≥5.1	≥60.1

<sup>a)</sup> P.I.I.: Primary Irritation index

<sup>b)</sup> A.O.I.: Acute Ocular Irritation Index

**Table 3.** Mortality in rat treated orally with test material, methiozolin

Step	Dose (mg/kg)	Mortality (dead / total)
		Female
1 step	2 000	0 % (0 / 3) <sup>a)</sup>
2 step	2 000	0 % (0 / 3)

<sup>a)</sup> No. of dead animals / No. of tested animals

라 독성을 구분하였다(Table 1).

### 피부자극성 시험

피부자극성 시험은 약제 처리 하루 전 제모 후 시험당일 척추를 중심으로 앞 쪽 2부위(비찰과, 찰과)에 시험물질과 뒤 쪽 2부위(비찰과, 찰과)에 증류수를 각 0.5 mL 처리하여 4시간 동안 고정하였다(농촌진흥청, 2009a). 처리물을 제거한후 1, 24, 48과 72시간 후 홍반과 가피형성 및 부종 정도를 관찰하였고, 피부 반응 평가표에 따라 평가하였다(Table 2).

### 안점막자극성 시험

안점막 자극성 시험은 토끼 한쪽 눈 하안검에 시험물질 0.1 mL 을 점안하였고, 무 처리한 다른 쪽 눈은 대조군으로 사용하였다. 시험물질 처리 1, 24, 48 및 72시간 후에 홍채, 각막과 결막의 임상증상을 관찰하여 안반응의 평가표에 따라 채점하여(농촌진흥청, 2009a), 시험물질의 자극 정도를 분류하였다 (Table 2).

## 결과 및 고찰

### 급성경구독성시험

급성경구독성시험은 시험동물수를 최소로 하는 OECD TG423으로 수행하였다. 시험기간 중 사망동물 관찰결과(Table 2) 최대

**Table 4.** Mortality in rat treated dermal with test material, methiozolin

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (dead / total)	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5) <sup>a)</sup>	0% (0 / 5)
G2	4,000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

<sup>a)</sup> No. of dead animals / No. of tested animals

용량 2,000 mg/kg bw에서 14일까지 관찰한 결과 사망동물이 없었다. 시험 종료후 모든 동물을 부검한 결과 특이한 부검소견은 관찰되지 않았다. 14일까지 시험기간 동안 특이한 임상증상은 없었으며, 체중증가 또한 별다른 이상은 관찰되지 않았다.

### 급성 경피독성 시험

농촌진흥청 고시에 의거하여 부형제에 투여최대용량을 4,000 mg/kg으로 하여 시험한 결과는 Table 4와 같다.

시험물질 투여군에서 관찰기간동안 특이증상이 관찰되지 않았고, 시험종료 후의 부검시 육안적 관찰결과 특별한 증상은 없었다. 따라서 급성 경피독성은 LD<sub>50</sub> 4,000 mg/kg bw 이상으로 저독성으로 구분되었다.

### 피부자극성시험

시험물질에 대한 시험결과는 Table 5에 나타냈다. 시험물질 투여한 후 찰과 부위와 비찰과 부위 모두 자극성이 관찰되었으나 그 정도가 적어 약한 자극성으로 분류되었다.

### 안점막자극성시험

시험물질에 대한 안점막 평가 결과는 Table 6에 나타냈다. 시험물질투여한 후 1, 24, 48 및 72시간 관찰한 결과 시험물질에 대한 독성이 약하게 나타나 약자극성으로 분류되었다.

농촌진흥청에서 제시한 농약관리법 및 고시 중 농약등록 기준에서는 제품농약의 경우 등록기준 및 등록보류기준이 명확히 명시되어있다(농촌진흥청, 2009b). 제품 농약의 경우, 인축 독성시험성적중 급성독성이 맹독성, 고독성 농약으로 분류되는 농약과 피부자극지수가 1.5이상, 급성 안점막 자극 지수(AOI)가 60이상인 농약은 등록을 보류할 수 있으나, 살포자에 대한 안전성이 확보 되거나 라벨 주의사항을 강화함으로써 자극 문제를 완화할 수 있을 경우 등록할 수 있다고 하였다(농촌진흥청, 2009b). Methiozolin은 제초제로서 급

**Table 5.** Results of skin reaction of test material, methiozolin

Animal No.	Chance	Erythema & Eschar				Edema			
	Phases <sup>1</sup>	1	24	48	72	1	24	48	72
1		1	2	4	4	1	1	1	1
2		1	2	2	3	1	1	1	1
3		1	2	2	4	1	1	1	1

**Table 6.** Ocular irritation reaction of test material, methiozolin

Animal. No.		1	2	3	Mean	
Cornea	Degree of opacity (A)	1 hr	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0
		72 hr	0	0	0	0
	Diffuse areas of Opacity (B)	1 hr	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0
		72 hr	0	0	0	0
Iris (C)	1 hr	0	0	0	0	
	24 hr	0	0	0	0	
	48 hr	0	0	0	0	
	72 hr	0	0	0	0	
Conjunctiva	Redness (D)	1 hr	1	1	1	1.00
		24 hr	2	2	2	2.00
		48 hr	3	2	2	2.33
		72 hr	3	1	2	2.00
	Chemosis (E)	1 hr	2	2	2	2.00
		24 hr	2	2	2	2.00
		48 hr	3	2	2	2.33
		72 hr	3	3	2	2.67

성경구독성시험의 경우 2,000 mg/kg bw 투여할 때에 아무런 이상 증상도 관찰되지 않았다. 이는 내부적으로 수행한 소핵시험에서 마우스에 투여하였을 때 나타난 결과와 일치하였다. 농약의 경우 5,000 mg/kg bw의 투여는 국가마다 다른 입장을 취하고 있는데 OECD의 경우 2,000 mg/kg bw에서 독성이 나오지 않을 경우처럼 저독성 물질의 화학물질이면 굳이 5,000 mg/kg bw의 투여를 권장하지 않고 있다. 해당 용량의 투여는 과학적으로 타당성이 있거나 기타 투여할 만한 사유가 있는 경우에 권장된다. 시험물질의 경우 2,000 mg/kg bw에서 독성이 나타나지 않았으므로 저독성 물질로 판단되며 한국 GHS의 카테고리에서는 저독성물질(IV)로 분류된다. 급성경피독성의 경우는 4,000 mg/kg bw 이상의 경우에 이에 해당되며 시험물질은 급성경피독성이 약한 물질로 판단된다. 피부자극성 시험은 찰과의 경우와 비찰과의 경우로 분류해서 시험을 하며 이는 인체 피부에 상처를 입는 경우

의 수를 생각해서 방법에 포함되어있다. 시험물질은 찰과 비찰과 모두 피부자극지수가 2이하로 약한 피부자극이 있는 것으로 사료된다. 안점막자극성시험에서는 홍채의 변화와 각막결막의 변화를 측정하여 점수화 한다. 시험물질은 안점막 자극성 지수가 낮은 결과를 보여 약한 자극성 물질로 판단된다. Methiozolin의 제초제로서의 작용기전은 잘 알려져 있지 않지만, 수경상태에서 옥수수 뿌리에 [<sup>14</sup>C] glucose를 이용하여 세포벽 생합성 저해 정도를 측정한 결과 1 μM 농도에서 cellulose 및 hemicellulose의 생합성을 50% 이상 저해하는 것을 볼때 식물세포벽 생합성 저해활성을 갖는 다고 한다 (Lee 등, 2007). 내부적으로 수행한 염색체 이상시험에서 methiozolin은 chinese hamster lung cell의 세포증식을 억제한 결과를 얻었다. Methiozolin의 세포독성이 알려진 작용기전에 의한 결과로 보고된 바가 없으나, 많이 사용되는 제초제 Glyphosate는 인간의 제대, 발생 및 태반 세포에서 세포

사멸사와 괴사를 야기하는 것으로 보고 되었다(Benachour 등, 2009). 또한 랫드 고환 세포에서 괴사 및 세포사를 야기 하였는데 테스토스테론의 저하를 일으킨다고 한다(Clair 등, 2011). 원제와 유제(시험물질)의 피부에 대한 시험 결과를 비교 해본 결과 유제에서만 피부 자극이 나온 것으로 보아 methiozolin의 약한 피부 및 안점막 독성은 용매에 의한 영향으로 사료된다. 이상으로 본 시험결과 methiozolin은 급성 경구독성 및 급성경피독성이 없고, 안자극 및 약한 피부자극 성이 있으나 농약등록기준에 적합하므로 안전한 제초제로서 판단된다. 인체 독성을 위해서는 보다 다양한 번식독성시험을 포함한 반복투여독성시험 등의 만성, 아만성 독성 시험을 통해 보다 인체의 안전성을 확보하는 연구가 수행되어야 한다고 사료된다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Ashton, F.M. and A.S. Crafts (1981) Mode action of herbicides. 2nd Ed. J. Wiley & Sons, New York. p. 34.  
 Benachour, N. and G.E. Seralini (2009) Glyphosate Formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(1):97~105.  
 Brown, A.W.A. (1978) Ecology of pesticides. J. Wiley and Sons, New York. P325.  
 Chun, J.C. and S.Y. Ma (1996) Herbicidal property and soil behavior of new herbicide azimusulfuron. *korean J. environ. Agric.*, 15(4):501~505.  
 Clair, E., R. Mesnage, C. Travert, G.E. Seralini (2011) A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol In Vitro*. 19: Epup.  
 Hay, J.V. (1999) Herbicide discovery in the 21st century- a look into the crystal ball. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 233(Pesticide Chemistry and Bioscience):55~65.  
 Hwang, I.T., H.R. Kim, D.J. Jeon, K.S. Hong, J.H. Song, K.Y. Cho (2005) 5-(2,6-Difluoro-benzyloxymethyl)-5-methyl-3-(3-methyl-thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-isoxazole as a useful rice herbicide. *J. Agric. Food Chem.* 53:8639~8643.

Kearney, P.C. and D.D. Kaufman (1988) Herbicides. Chemistry, degradation, and mode of action. 430p. Marcel Dekker, Inc, New York.  
 Lee, J.N., S.J. Koo, K.H. Hwang, I.T. Hwang, D.J. Jeon, H.R. Kim (2007) Mode of action of a new isoxazolin compound. *Asian pacific weed science society coonference* pp. 591~601.  
 Lyga, J.W., R.M. Patera, G. Theodoridis, B.P. Halling, F.W. Hotzman, M.J. Plummer (1991) Synthesis and quantitative structure-activity relationships of herbicidal N-(2-Fluro-5-methoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimides., *J. Agric Food Chem.* 39:1667~1673.  
 Munro, D. M., and S.B. Patel (1993). Herbicidal compounds. US Patent 5, 262, 388.  
 OECD. (2001) TG 423 Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline for testing of chemicals. Section 4. pp 1~14.  
 Rheinheimer, J., K. Eicken, H. Theobald, T. Kueenhoechner, F.O. Westphalen, B. Wuerzer, J. Frank, N. Meyer (1991) Isoxazolines, their preparation and their use. Us patent 4, 983, 210.  
 Ryu, E. K., H.R. Kim, D.J. Jeon, J.W. Song, K.M. Kim, K.S. Hong (2002) Preparation of herbicidal 5-benzlyoxymethyl 1,2-isoxazoline derivatives of weed control in rice. Patent No. WO 200209185.  
 Yogo, Y. (2000) Challenge to discovery of novel action site of herbicides. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 25(3):276~280.  
 권용웅, 조광연, 소창호, 이강휘, 조용섭 (1986) 제초제 연구동향과 신규제초제 개발전망, *한국잡초학회지* 6(1):138~148.  
 구석진, 황기환 (2007) 제초성 5-벤질옥시메틸-1,2 이속사졸린 유도체 화합물의 용도, *대한민국특허 제 10-0814420*.  
 구석진, 황기환, 전만석, 김성현, 임종수, 이동국, 정근희, 고영관, 류재욱, 구동완, 우재춘 (2010) 신규 잔디 제초제 메티오졸린(methiozolin)의 개발. *한국잡초학회지* 30(4):323~329.  
 농촌진흥청 (2009a) 농약 관리법령 및 고시, 훈령집 (발간등록번호 11-1390000-002515-01). 인축 독성 시험기준과 방법 pp. 246-252. 대한민국.  
 농촌진흥청 (2009b) 농약 관리법령 및 고시, 훈령집 (발간등록번호 11-1390000-002515-01). 농약의 인축독성 시험성적서 검토기준. pp. 171-179, 247-252.  
 황인택, 문영희, 한성수, 전재철 (2001) 제초제와 환경. *한국 잡초학회지* 21(2):146~166.

---

## 제조제 Methiozolin의 급성독성평가

구석진 · 권 민<sup>1</sup> · 박철범<sup>1\*</sup>

목우연구소, <sup>1</sup>호서대학교 안전성평가센터

**요 약** 본 연구는 새롭게 개발된 제조제인 methiozolin의 인체 안전성을 평가하기 위해 급성독성시험을 수행하였다. 랫드를 이용한 급성 독성 시험에서 2,000 mg/kg의 용량을 고용량으로 하여 단계적으로 투여한 결과 methiozolin의 LD<sub>50</sub>은 2,000 mg/kg bw 이상이었다. 급성 경피독성시험결과 시험물질을 고용량 4,000 mg/kg을 투여한 결과 별다른 사망동물이 발생하지 않아 시험물질의 LD<sub>50</sub>이 4,000 mg/kg bw 이상으로 나타났다. 피부자극성 시험결과 시험물질의 약한자극성이 나타났으며, 안점막 자극성 시험결과 약한 자극성이 있었다. 이상의 연구 결과 경구 독성의 경우 methiozolin은 GHS 카테고리 IV에 해당하는 물질로 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 methiozolin은 안전한 제조제로서 추후 만성 독성 연구가 필요하다고 판단된다.

**색인어** 급성독성, 피부자극성, 안자극성, Methiozolin

---