한국농약과학회지 제2권 제2호(1998)
The Korean Journal of Pesticide Science
Vol. 2, No. 2, pp.10~15(1998)

산화적 활성화 과정을 통한 *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbofuran의 독성발현

양규완 · 이석종[1] · 김성문[1] · 허장현[1*] · 한대성[1]

동부한농화학(주) 농업기술연구소, [1]강원대학교 농업생명과학대학 자원생물환경학부

요 약 : Carbofuran 및 *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbofuran (PSC)의 AChE에 대한 이분자 저해 속도상수(bimolecular inhibition rate constant, k_i)를 관찰하였다. Carbofuran은 7.7×10^5 $M^{-1}\cdot min^{-1}$으로 높은 저해효과를 보이고 있는 반면, PSC는 1.2×10^3 $M^{-1}\cdot min^{-1}$으로 carbofuran에 비하여 AChE에 대한 저해력이 600배 정도 낮은 저해력을 갖고 있는 것으로 관찰되어 독성발현을 위하여 활성화 과정이 필요한 것으로 확인되었다. AChE/mixed function oxidase(mfo) coupling system을 이용한 microsomal oxidative activation 실험에서 PSC의 AChE에 대한 저해력이 control에 비하여 NADPH가 첨가된 oxidase 처리구에서 800배 더 강하게 나타났으며, cytochrome P_{450}의 저해제를 첨가한 oxidase+PBO 처리구에서는 control의 저해 경향과 유사하였다. 또한 생쥐 뇌 AChE에 대한 PSC의 I_{50}은 28 mg/kg인 반면 PBO를 전처리하였을 경우 I_{50}은 57 mg/kg으로 나타나 cytochrome P_{450} 저해제로 인하여 PSC의 저해력이 2배 정도 감소된 것을 관찰할 수 있었고, PSC는 독성발현을 위하여 활성화 과정을 거쳐야 하며, 이 과정에서 cytochrome P_{450}이 작용함을 확인할 수 있었다. PSC와 MCPBA를 반응시켜 산화 과정을 통하여 생성된 독성대사물을 분석한 결과 반응산물의 약 55%가 carbofuran임을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 PSC의 활성화 과정을 통한 독성발현에 cytochrome P_{450}이 중요한 역할을 하는 효소임을 확인할 수 있었고, PSC의 산화적 활성화 과정을 통한 주된 독성대사물이 carbofuran임을 확인할 수 있었다.

Key words : procarbamate, bioactivation, inhibition, acetylcholinesterase, cytochrome P_{450}.

서 론

일반적으로 *N* - methylcarbamate계 살충제는 acethylcholinesterase(AChE)에 대한 강한 저해제로 작용하여 독성을 발현하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 methylcarbamate계 약제인 carbofuran은 집파리와 쥐에 대한 독성이 각각 6.7 μg/g (LD_{50}, 국소처리)과 5.6~11 mg/kg (LD_{50}, 구강투여)으로, 곤충에 대한 활성은 우수한 반면, 포유류에 대해서도 강한 독성을 보이는 단점을 지니고 있다(Kriger 등, 1977; Fukuto, 1988). 이러한 포유류에 대한 강한 독성을 개선하기 위하여 연구자들은 carbamate 구조의 질소원자에 있는 수소원자 대신에 alkyl, arylthio, dialkylaminothio 그리고 *N*-sulfenyl 등 다양한 치환기를 붙여 곤충에 대한 활성은 그대로 유지하면서도 포유류에 대해서는 안전한 procarbamate의 개발을 시도하였다(Fahmy 등, 1983; Fukuto, 1983).

Procarbamate는 곤충과 포유동물의 서로 다른 생리적 차이를 이용하여 선택독성을 유도시킨 약제로, 곤충 체내에서는 독성이 강한 *N*-methyl carbamate로 전환되고, 포유동물 체내에서는 procarbamate 분자내 ester 결합이 끊어져 무독화되는 것으로 추정되고 있으며, 양(1997) 등은 carbosulfan의 활성화 과정에 cytochrome P_{450}이 관여한다는 것을 확인하였다.

Procarbamate 계열의 시험약제인 *N* - dimethoxyphosphinothioyl carbofuran(PSC)은 곤충에 대한 독성은 carbofuran과 거의 유사하지만 (LD_{50} housefly, 13 μg/g), 포유류에 대한 독성은 carbofuran보다 10~20배 정도 낮은(LD_{50}, mouse, 150~190 mg/kg) 약제이다(Fukuto 등, 1970; Fukuto 등, 1983). 이러한 선택성을 지닌 PSC의 작용기작은 곤충에서는 산화와 가수분해 작용을 받아 P-N 결합이 끊어진 후 carbofuran으로 전환되어 독성을 발현하지만, 포유동물에서는 esterase 등에 의하여 먼저 phenol계 대사물 등으로 전환되어 체외로 배설되는 것으로 제안되어 왔다(Kriger 등, 1977; Fukuto, 1988, 그림 1).

* 연락저자

현재까지 PSC의 정확한 선택독성 작용기작에 대하여는 체계적인 연구가 진행되지 않고 있어 연구가 필요한 실정이며, 선택독성 기작에 대한 이해가 앞으로 개발될 새로운 약제들의 분자설계에 도움이 될 것으로 기대된다.

본 연구는 procarbamate인 PSC의 생체내 대사과정을 통한 활성화 과정에 참여할 가능성이 있는 cytochrome P_{450}에 의한 활성화 효과를 *in vitro*와 *in vivo* system을 이용하여 확인하고, 또한 이러한 산화 작용에 의하여 생성된 독성 대사물을 검정하여 PSC의 독성발현 기작의 일부를 추구(追究)하고자 하였다.

재료 및 방법

시험약제

Carbofuran 원제(76%)를 (주) 경농에서 분양받아 *n*-hexane과 소량의 ethyl acetate로 재결정하여 순도 99% 이상이 되게 정제하여 사용하였다.

N-Dimethoxyphosphinothioyl carbofuran(PSC)은 실험실에서 합성한 후, 이를 silica gel(70~230 mesh, Merck Chem. Co., Germany) 50 g이 충진된 chromatographic column(내경 3 cm, 길이 50 cm)에 넣고 *n*-hexane : ethyl acetate(13 : 3, v/v) 혼합용매를 전개용매로 이용하여 정제하였다. 정제된 약제는 HPLC(Waters, U.S.A.)를 이용하여 99% 이상의 순도를 확인한 후 사용하였다.

시험동물 및 microsomal 단백질 조제

시험동물로는 생쥐 Institute of Cancer Research계(ICR계) 18~20 g, 쥐 Sprague Dawley계(SD계) 160~180 g의 수컷을 한림대학교 동물사육부(춘천시, 교동)와 한라실험동물산업(천안시, 봉명동)에서 구입한 후 실험실에서 2~3일 순화시킨 후 사용하였다. Cytochrome P_{450}을 함유하고 있는 microsome 단백질은 생쥐 간으로부터 10,000 g와 105,000 g에서 원심분리하여 얻었고(Hur 등, 1992), microsomal oxidase는 정량(Bradford, 1976)한 후 -77℃ 냉동고에서 3개월까지 보관하면서 실험에 사용하였다.

N-Dimethoxyphosphinothioyl carbofuran (PSC)의 합성

Carbofuran phenol(2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol) 0.1mmole (16.02 g)과 phosgene 0.15 mmole (14.84 g)을 반응시켜 carbofuran chloroformate(2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol-7-yl chloroformate)를 합성하였다(Clay, 1981). 그리고 dimethylchlorothiophosphate 0.1 mmole (16.1 g 을 methylamine hydrochloride 0.1mmole(6.75 g)과 반응시켜 *O,O*-dimethyl *N*-alkylphosphoamidothioates를 합성하였으며, 이를 carbofuran chloroformate와 반응시켜 PSC를 최종 합성하였다(Baker 등, 1966). PSC의 구조결정은 ^{1}H-NMR (Jemini 200, Varian Instrument Co., U.S.A.)과 mass spectroscopy(MS-QP 1000A, Shimadzu Instrument Co., Japan)를 이용하여 확인하였다.

AChE에 대한 이분자 저해 속도상수(k_i) 측정

Carbofuran 및 PSC의 AChE(electric eel AChE, V-S type, 1,000units/mg protein, Sigma Chemical Co., U.S.A.)에 대한 저해력을 측정하기 위하여 이분자 저해속도 상수(k_i)를

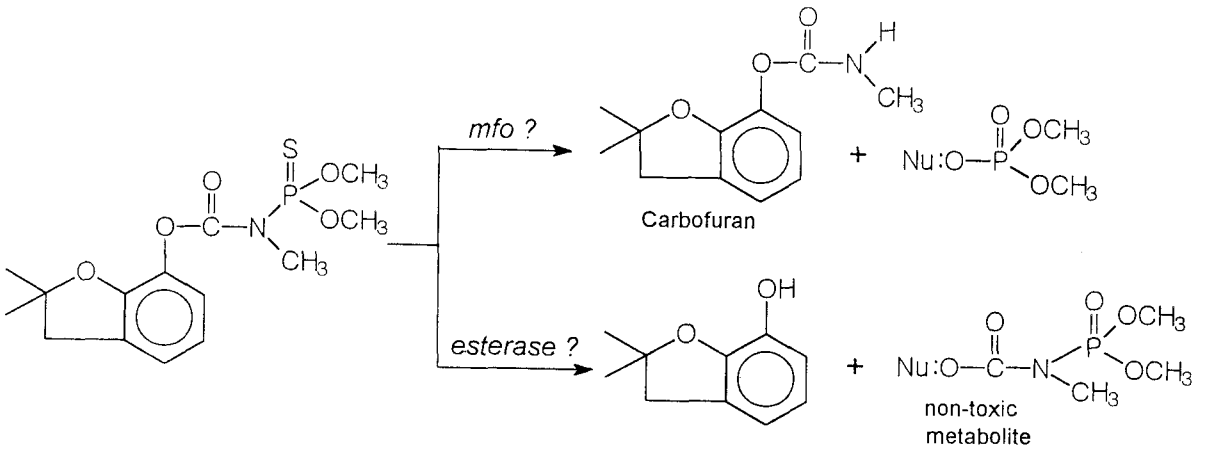


Fig. 1. Proposed metabolic pathway of "Procarbamates" in insects and mammals (Kriger 등, 1977; Fukuto, 1988).

측정하였다. AChE의 활성 측정은 Ellman(1961)의 방법을 이용하였고, AChE의 저해정도는 Aldridge(1950)의 방법을 이용하여 k_i로 나타내었다(양 등, 1997).

기내 microsomal oxidative activation 효과

Cytochrome P_{450}에 의한 활성화 효과는 acetyl cholinesterase(AChE)/mixed function oxidase(MFO) coupling system에서 Ellman(1961)의 방법을 이용하여 관찰하였다(Wing 등, 1983; Hur 등, 1992; 양 등, 1997).

Microsome 단백질 0.1 mg, cytochrome P_{450}의 cofactor인 β-nicotinimide adenine dinucleotide, reduced form(NADPH, Sigma Chem. Co., U.S.A.)(+)(-) 67 μM, cytochrome P_{450}의 선택적 저해제인 piperonyl butoxide(PBO, Fluka Chem. Co., Switzerland)(+)(-) 100 μM, AChE 4 units과 methanol에 녹인 PSC(10^{-1}~10^{-8} M) 5 ㎕를 넣고, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.6)로 3 ㎖ 부피를 만들었다. Carbofuran과 PSC 처리구는 37℃에서 각각 30분간 반응시킨 후, 반응액 100 ㎕를 취하여 Ellman(1961)의 방법으로 AChE의 활성을 측정하였다.

생체내 생쥐 뇌 AChE의 독성발현

Cholinesterase 저해의 주된 지표인 뇌 AChE에 대한 저해제로서의 PSC의 독성발현 경향을 확인하기 위하여 propylene glycol(J. T. Baker, U.S.A.)에 녹인 PSC를 0, 20, 50, 70, 100, 150 mg/kg의 수준으로 생쥐에 복강투여하였다. 투여 1시간 후 생쥐의 뇌를 취하여 100 mg당 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6) 1㎖를 넣고 균질마쇄한 후 2000 g에서 15분간 원심분리하였으며, 상징액을 단백질 정량방법(Bradford, 1976)으로 AChE의 활성을 측정하였다. Cytochrome P_{450}의 저해에 따른 PSC의 독성발현 경향을 살펴보기 위하여 PBO를 200 mg/kg으로 복강투여하고 1시간 뒤 PSC를 다시 투여한 후, 위와 동일한 방법으로 뇌를 추출하여 AChE의 활성을 측정하였다(Hur 등, 1992; 양 등, 1997).

m-Chloroperoxybenzoic acid (MCPBA)에 의한 산화

생체내의 mixed function oxidases(mfo) 작용에 의한 산화적 대사산물을 *in vitro*에서 화학적 방법으로 관찰하기 위하여 유기 산화제인 *m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA, Aldrich Chem. Co., U.S.A.)를 사용하여 산화에 의한 PSC의 반응산물을 살펴보았다.

PSC 34.5 g을 CH_2Cl_2 10 ㎖에 녹인 후, 37℃에서 1시간 동안 MCPBA 0.58 g과 반응시켰다. 반응물을 50 ㎖ 플라스크에 옮기고 회전식 감압증류기로 용매를 제거한 다음 최종 CH_2Cl_2 2 ㎖에 녹였다. 이를 silica gel TLC (20×20 cm, *n*-hexane : EtOAc = 1 : 1 (v/v))에서 전개시킨 후, 각각의 spots을 분리 정제하여, ^{1}H-NMR로 구조확인을 하였고 HPLC/UV(285 nm)로 정량분석을 하였다.

결과 및 고찰

AChE에 대한 이분자 저해 속도상수 측정

표 1은 carbofuran과 PSC의 이분자 저해 속도상수를 나타낸 것이다. PSC의 경우 k_i 값이 1.2×10^3 $M^{-1}\cdot min^{-1}$으로 모화합물인 carbofuran에 비하여 AChE 저해제로서의 저해속도가 600배 정도 낮았다. 이러한 결과는 Fukuto 등(1933)이 보고한 바와 같이 PSC는 dimethoxyphosphinothioyl 부분이 delay factor로 작용함으로써 저해속도가 느릴 것이라는 결과와 일치하는 것으로, PSC의 집파리에 대한 LD_{50}이 13 ㎍/g으로 강한 살충력을 보이는 것을 고려한다면, PSC는 독성을 발현하기 위하여 반드시 독성이 강한 물질로 전환되는 활성화 과정을 거쳐야만 한다는 것으로 가정되었다.(Fahmy 등, 1970; Fahmy 등, 1974; Kriger, 1977; Fahmy 등, 1983).

Table 1. Bimolecular inhibition rate constants of PSC and carbofuran as an inhibitor of AChE[a)]

Compound	Concentration [M][b)]	(Slop)b[c)]	r^2	k_i ($M^{-1}\cdot min^{-1}$)
Carbofuran	1.67×10^{-7}	0.1290	0.84	7.7×10^5
PSC	1.67×10^{-4}	0.2080	0.91	1.2×10^3

[a)]Acethylcholinesterase obtained from electric eel.

[b)]Concentration of inhibitor in incubation mixture.

[c)](Slope)b = $\ln[A_0]/\ln[A_i]$.

AChE/MFO coupling system에서 PSC와 carbofuran의 microsomal oxidative activation 효과

그림 2는 control, oxidase, oxidase+PBO 처리구에서 PSC의 AChE 저해제로서의 cytochrome P_{450}에 의한 활성

화 효과를 나타낸 것이다. AChE에 대한 PSC의 저해정도를 I_{50}를 기준으로 볼 때 control, oxidase, oxidase+PBO 처리구에서 각각 4.69×10^{-4} M, 3.75×10^{-7} M 그리고 1.94×10^{-5} M이었다. Oxidase system에서 PSC의 AChE에 대한 저해력은 control과 비교하여 약 800배 증가되었고, cytochrome P_{450}의 선택적 저해제인 PBO를 처리한 oxidase+PBO system에서 AChE에 대한 저해력이 oxidase system에 비해 200배 정도 감소하였다.

Cytochrome P_{450}의 cofactor인 NADPH를 처리하였을 때 PSC의 저해력이 강해지고, PBO를 처리하였을 때 저해력이 약해지는 결과를 통하여 PSC의 활성화 과정에 cytochrome P_{450}이 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.

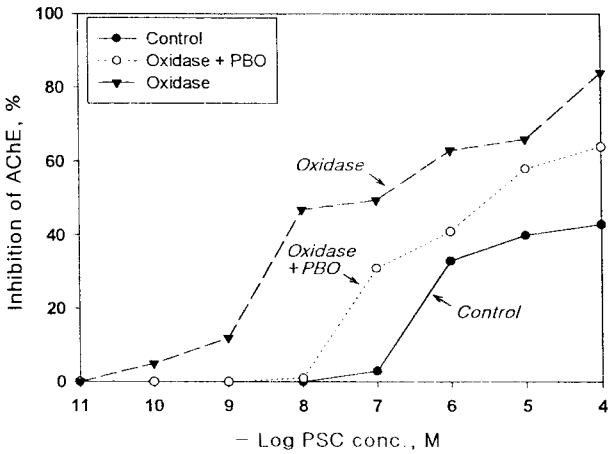
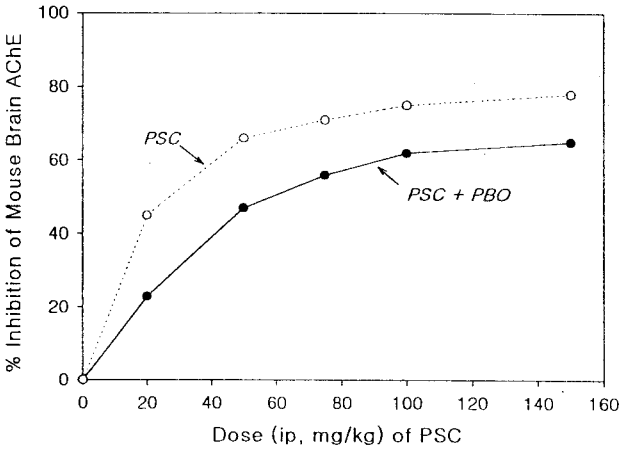


Fig. 2. Microsomal oxidative activation of PSC as an inhibitor of electric eel AChE.

생쥐 뇌 AChE에 대한 저해

In vitro system에서 확인된 PSC의 cytochrome P_{450}에 의한 활성화 과정을 *in vivo* system에서 확인하기 위하여 뇌 AChE 활성저해 경향을 조사하였다. 그림 3은 PSC를 0, 20, 50, 70, 100, 150 mg/kg의 수준으로 생쥐에 복강투여하였을 때 , 2시간 전에 PBO를 처리한 PSC+PBO 처리구와 PSC만 처리한 Control 처리구에서 brain AChE 저해제로서 PSC의 독성효과를 나타낸 것이다. Control에서 I_{50}은 28 mg/kg이었고, PSC+PBO 처리구에서 I_{50}이 57 mg/kg으로 cytochrome P_{450}에 의한 활성화 과정을 PBO를 전처리하여 저해하였을 때 PSC의 AChE에 대한 저해력이 2배 정도 감소되어 *in vivo* system에서도 cytochrome P_{450}이 PSC의 활성화 과정에 참여하고 있음을 확인할 수 있었다.



Fig, 3. Inhibition of mouse brain AChE by PSC.

Oxidation system에 의한 PSC의 독성대사물 생성

Cytochrome P_{450}에 의한 PSC의 주된 독성대사물을 확인하기 위하여 *in vitro*에서 cytochrome P_{450}의 역할을 모방하는 것으로 알려진 MCPBA를 PSC와 반응시켜 산화에 의한 PSC의 반응산물을 확인하였다(Fahmy와 Fukuto, 1972; Wing, 1983, 1984; 양 등, 1997).

반응생성물들을 TLC로 정제한 후, ^{1}H-NMR로 구조분석한 결과 산화대사물 중 carbofuran이 관찰되었으며, HPLC분석에서 PSC가 carbofuran으로 55% 전환된 것을 확인할 수 있었고(표 2), carbofuran phenol(7-OH) 19%와 기타물질 등으로 약 26% 전환되는 것을 관찰하였다. MCPBA와 PSC의 주된 반응산물이 carbofuran인 것을 볼 때, 생체내에서도 PSC의 산화에 의하여 독성대사물질인 carbofuran으로 전환되어 독성을 발현한다고 추정할 수 있었다.

Table 2. Formation of PSC metabolites in a chemical oxidation using meta-chloroperoxybenzoic acid

Metabolites(%)[a]			
PSC	Carbofuran	7-OH[b]	Unknowns
5	55	19	20

[a]Percents of total applied amount.

[b]2,3-dihydro 2,2-dimethyl benzofuranol.

본 연구를 통하여 procarbamate 계통의 실험적인 약제인 PSC는 충체내에서 활성화 과정을 통하여 AChE에 대한 저해력이 강한 화합물로 전환되어야만 독성을 발현할 수 있으며, 이 과정에서 cytochrome P_{450}이 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 체내 mfo의 역할과 유사한 작용을 하는 것으로 알려진 MCPBA와 반응시켜 PSC를 산화시킨 결과 AChE에 대한 저해력이 강한 carbofuran이 55% 생성된 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 유기인계 농약은 분자내의 인(P) 원자에 결합되어 있는 황(S) 원자가 산소(O)로 산화되어 이탈기가 떨어져 나가는 과정에 의하여 AChE를 저해하는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 시험약제인 PSC의 활성화 과정도 그림 4와 같이 인 원자에 결합되어 있는 황 원자가 cytochrome P_{450}에 의하여 산소 원자로 치환된 후 생체내의 친핵체에 의하여 독성물질인 carbofuran으로 전환되어 독성을 발현하는 것으로 가정하여 볼 수 있었다. 이러한 연구결과는 활성화 과정을 통하여 용이하게 이탈될 수 있는 독성이 강한 화합물들의 유도체들을 설계하는 기초이론으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

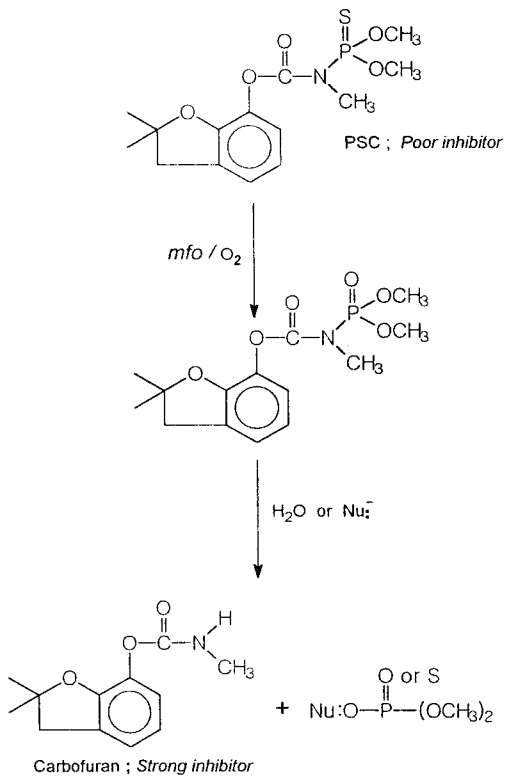


Fig. 4. Suggested scheme for bioactivation of PSC.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단의 1995년 핵심전문연구과제의 연구비(951-0100-001-2) 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

Aldridge, W. N. (1950) Some properties of cholinesterase with particular reference to mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. J. Biochem. 46:451.

Baker, J. W. R. E. Stenseth and Leo C. D. Groenweghe (1966) Thermal rearrangement of phosphorodihalidothioites. A new synthesis of phosphonothioic dihalides. J. Ameri. Chem. Soci. 88:3041~3045.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem. 72:248~254.

Clay, V. E. (1981) Toxicology and mode of action of *N*-(alkyl alkylcarbamylsulfenyl) derivartives of methomyl and oxamyl in swiss white mice. University of California, Riverside. Ph.D. Dissertation. 106~131.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress and R. M. Featherstone (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7:88~90.

Fahmy M. A. H., T. R. Fukuto (1972) Oxidative rearrangrment of *N*-dimethoxyphosphinothioyl carbamate esters. Tetrahedron Letter. 41:4245~4248.

Fahmy M. A. H., T. R. Fukuto, R. O. Mayer and R. B. March (1970) The selective toxicity of new *N*-phosphorothioylcarbamate ester. J. Agric. Food Chem. 18:793~796.

Fahmy M. A. H. and T. R. Fukuto (1983) Rational and chemistry of proinsecticidal methylcarbamates. *In* : Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem. : Human Welfare and the Environment 1:193~201.

Fahmy M. A. H., Y. C. Chiu and T. R. Fukuto (1974) Selective toxicity of *N*-substituted biscarbamoyl sulfides.

J. Agric. Food Chem. 22:59~62.

Fukuto, T. R. (1983) Structure-activity relationships in derivatives of anticholinesterase insecticides. *In* : Proc. 5th Int. Congr. Pestic. Chem. Human Welfare and the Environment 1:203~212.

Fukuto, T. R. (1988) Approaches to the design of organic insecticides. J. Pesti. Sci. 13:137~150.

Hur, J. H., S. Y. Wu and J. E. Casida (1992) Oxidative chemistry and toxicology of S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF defoliant). J. Agric. Food Chem. 40:1703~1709.

Kriger, R. I., P. W. Lee, M. A. H. Fahmy, M. Chen and T. R. Fukuto (1977) Metabolism of 2, 2 - dimethyl - 2. 3 - dihydrobenzofuranyl - 7 - *N* - dimethoxy phosphinothioyl -*N*-methylcarbamate in the house fly, rat, and mouse. Pestic. Biochem. Physiol. 6:1~17.

Wing, K. D., A. H. Glickman and J. E. Casida(1983) Oxidative bioactivation of S-alkyl phosphorothioate pesticide : stereospecificity of profenofos insecticide activation. Science. 219:63~65.

Wing, K. D., A. H. Glickman and J. E. Casida (1984) Phosphorothioate pesticide and related compound : Oxidative bioactivation and aging of the inhibited acethylcholinesterase. Pestic. Biochem. Physiol. 21:22~30.

양규완, 홍순성, 이석종, 김성문, 허장현, 한대성 (1997) 산화적 활성화 과정을 통한 carbosulfan의 독성발현. 농약과학회지 1:28~34.

허장현, 한대성, 양규완 (1995) Procarbamate계 신농약 개발을 위한 기존 약제들의 생체내 bioactivation 과정과 독성발현 기작에 관한 연구. 농촌진흥청 농업논문집 37:107~118.

Toxic action of *N*-dimethylphosphinothioyl carbofuran by oxidative activation process

Kyew-Wan Yang, Seog-Jong Lee[1], Songmun Kim[1], Jang-Hyun Hur[1*] and Dae-Sung Han[1] (*Agricultural Technical Research Institute, DongBu Hannong Chemical, #175-1, Botong-ri, Jeongnam-myun, Hwasung-gun, Kyungki-do, 445-960, Korea, and* [1]*Division of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea*)

Abstract : The bimolecular inhibition rate constants of carbofuran and *N*-dimethylphosphinothioyl carbofuran(PSC) to acetylcholinesterase(AChE) were 7.7 × 10^5 $M^{-1} \cdot min^{-1}$ and 1.2 × 10^3 $M^{-1} \cdot min^{-1}$, respectively. These results showed that PSC required a bioactivation process for its toxic action because it didn't inhibit the target enzyme effectively. The potency of PSC as an inhibitor of AChE increased when PSC and AChE were incubated with microsomes fortified with NADPH compared with microsome alone. Piperonyl butoxide(PBO) addition to these coupled systems greatly reduced the inhibition of the target enzyme by blocking the bioactivation process. *In vivo* inhibition study of mouse brain AChE, I_{50} value for AChE was 28 mg/kg for PSC and the value increased to 57 mg/kg when PBO was pretreated. This result showed that cytochrome P_{450} would also play a role in the bioactivation process of PSC *in vivo*. And conversioin of carbofuran from PSC was 55 % in a chemical oxidation system using meta-chloroperoxybenzoic acid. The oxidative activation of PSC to carbofuran was shown to be essential for showing its toxicological action and cytochrome P_{450} was identified as an important enzyme which participated in this process.

---

* Corresponding author