

쥐에서 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 ^{14}C -carbofuran의 독성과 *in vitro* 대사에 미치는 영향

한성수* · 임요섭¹

원광대학교 생명자원과학대학 농화학과, ¹순천대학교 농과대학 농화학과

요약 : Phenobarbital sodium(PB) 또는 3-methylcholanthrene(3-MC)이 살충제 carbofuran의 쥐에 대한 독성과 이의 독성경감효과를 구명하기 위하여 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여한 후 쥐의 생존율을 조사하였고, 쥐에서 carbofuran의 *in vitro* 대사에 미치는 영향을 구명하기 위하여 쥐 간의 추출액에 이들을 단독 또는 조합으로 처리한 후 대사산물을 조사하였다. 쥐에 대한 carbofuran의 LD_{50} (96hrs)은 6.9 mg/kg이었고, 주 대사산물의 독성은 3-hydroxycarbofuran > 3-ketocarbofuran > 3-hydroxycarbofuran phenol 순으로 높게 나타났으며, 모화합물보다는 그 독성이 매우 낮았다. 쥐의 생존율은 carbofuran 8.4 mg/kg만을 투여했을 때 0%이었으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC 20 mg/kg을 각각 조합투여시 60~80%로 높아졌고, 60 mg/kg 투여시에는 100% 생존하여 PB 및 3-MC의 carbofuran에 대한 독성경감 효과가 매우 컸다. 간 추출액에서 *in vitro* 대사의 대부분은 microsomal fraction에서 이루어지고 있었다. Carbofuran 단독처리시 주 대사산물은 3-hydroxycarbofuran이었으나 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합처리시 3-ketocarbofuran이었다. 또한, 기질 및 처리별 대사산물의 생성율을 조사한 결과 microsomal fraction에 carbofuran 단독 및 PB 또는 3-MC와의 조합처리 모두 co-factor로서 NADP+G-6-P+G-6-P-DG 첨가시(phase I system) 가장 높았고, 105,000×g 상정액에서는 carbofuran 단독처리의 경우 co-factor로서 NADPH+ GSH 첨가시(phase II system)에 그리고 PB 또는 3-MC와 조합처리의 경우 co-factor 중 NADPH+FAD 첨가시(phase II system)에 가장 높았다. 대사산물 생성율은 carbofuran 단독처리보다 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합처리에서 2~3배 높았다. (1998년 2월 13일 접수, 1998년 7월 30일 수리)

Key words : carbofuran, phenobarbital sodium, 3-methylcholanthrene, microsomal fraction, phase II system.

서 론

농약은 농작물의 유해생물 방제에 필수 불가결한 농업생산 자재로서 농업생산성 향상과 더불어 사용량이 증대되고 있는 실정이다. 그러나 사용된 농약은 농약의 종류, 살포방법, 기후, 식생 및 경작형태 등에 따라 차이를 보이기는 하지만 농약의 궁극적인 목적인 병충해 및 잡초방제를 수행한 후 즉시 분해·소실되지 않고 그대로 또는 변환된 화합물 형태로 작물, 토양 및 수계 등에 잔류하여 표적 생물 뿐만 아니라 비표적 생물에도 피해를 줄 수 있으며 자연환경에 축적될 경우 식품연쇄를 통한 생태계에 위해문제를 야기할 수도 있다(권, 1974). 이 밖에도 오용과 남용 등에 의한 피해(정, 1978)나 비닐하우스 등의 밀폐된 공간 내에서의 작업으로 인한 흡입 중독(김 등, 1970), 그리고 자살 목적으로 음용한 경우에

있어서의 중독(허 등, 1984) 등 인축에 대한 급성적 위해 유발 가능성도 있으며(임, 1982), 특히 농촌 인구의 고령화로 인해 농약사용 중 위해가능성이 높은 실정이다.

그러나 많은 연구들은 농약의 독성과 대사(Mattson 등, 1958; Bull과 Lindquist, 1966; Bourke 등, 1968; Clemons과 Menzer, 1968; Casida, 1970; Yang 등, 1971; Neal, 1972; Black과 Coon, 1973; Haugen 등, 1976; Yoneyama와 Matsumura, 1981; Rao 등, 1984; 신 등, 1984)에 관한 것으로서 농약의 부작용으로 부터 인축을 보호하기 위한 연구는 매우 적으며 농약의 해독(Murphy와 Dubois, 1957; Taylor 등, 1965), 효소유도체 phenobarbital sodium(PB)과 3-methylcholanthrene(3-MC)이 섬유모세포(한과 임, 1997)와 세포조직의 형태(임과 한, 1997)에 미치는 영향 등에 관한 연구가 인축이 농약에 중독되었을 경우 독성을 경감시킬 수 있는 해독제 개발에 관한 연구의 일부일 뿐이다.

따라서 본 연구에서는 phenobarbital sodium(PB) 또는 3-

* 연락저자

methylcholanthrene(3-MC)이 살충제 carbofuran의 쥐에 대한 독성과 이의 독성경감효과를 구명하기 위하여 이들을 단독 또는 조합으로 경구투여한 후 쥐의 생존율을 조사하였고, 쥐에서 carbofuran의 *in vitro* 대사에 미치는 영향을 구명하기 위하여 쥐 간의 추출액에 이들을 단독 또는 조합으로 처리한 후 대사산물을 조사하였다.

재료 및 방법

시험 동물

이 실험에 사용된 시험동물은 대한실험동물센터(충북 음성)에서 번식 사육한 80~100g의 SPF Albino Rat(웅성 Sprague Dawley계)를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 190±10g의 체중을 가진 쥐만을 선별하여 실험을 수행하였다. 순화시 사육온도는 23±1°C, 습도는 55~60%, 광도는 인공조명으로 명암을 각각 12시간으로 유지시켜 주었으며 먹이와 물은 삼양식품 rat용 사료(제322-4호)와 1차 증류수를 일정량씩 공급하여 자유로이 섭식할 수 있도록 하였고 깔짚은 3일을 주기로 교체하여 분비물로 인한 스트레스를 방지하였다.

시약 및 기기

시험 농약인 살충제 carbofuran(순도 : 99.9%)은 국립보건원에서 분양받았으며, phenobarbital sodium [5-ethyl-5-phenyl-2,4,6-(1H,3H,5H) pyrimidinetrione mon-osodium salt, 순도 : 97.5%]과 3-methylcholanthrene (2-dihydro-3-methylbenzofuran, 순도 : 99%)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 대사실험에 사용된 ¹⁴C-carbofuran은 benzofuran 핵 3번 탄소가 ¹⁴C으로 표지된 것으로 국제원자력기구(International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria)로부터 분양받았다. Specific activity는 280.83 MBq/mmol이었으며, 순도는 TLC radioscanner에 의해 확인한 결과 99% 이상이었다. 비표지 대사실험에 사용한 carbofuran(순도 : 99.5%), 3-hydroxycarbofuran (순도 : 97.4%) 및 3-ketocarbofuran (순도 : 95%)표준품은 FMC Co.(U.S.A)로부터 분양받아 사용하였다.

Carbofuran phenol, 3-hydroxycarbofuran phenol 및 3-ketocarbofuran phenol 표준품은 각각 해당하는 carbofuran 및 그 유도체와 potassium hydroxide를 1 : 1(mmol:mmol)

의 비율로 소량의 methanol에 녹여서 가수분해한 후 0.1N HCl 수용액으로 산성화시킨 다음 여기에 diethyl ether 20 ml를 가하여 추출한 후, MgSO₄로 건조시켜 이를 여과하고 감압농축하여 얻었으며, 수율은 각각 88%, 83%, 72%이었다. 상기의 방법으로 추출한 phenol류 화합물의 순도를 TLC상에서 단일 spot임을 확인한 후 사용하였다. Bovine serum albumin (BSA), acetylthiocholine iodide (AThCh), butyrylthiocholine iodide (BuThCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) : DTNB, glutathione reduced, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), glucose-6-phosphate (G-6-P), nicotinamide adenine dinucleotide reduced form(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), cytochrome C, glycogen, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P-DG), flavin adenine dinucleotide(FAD), uridine diphosphoglucuronic acid(UDPGA), sodium deoxycholate, trichloroacetic acid(TCA) 및 florisil(100~200mesh) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, U.S.A.)에서, K₂EDTA, p-nitrophenol 및 coomassie brilliant blue G-250 등은 Fluka Chemika AG.(Buchs, Switzerland)에서, 3,4-dichloronitro-benzene(DCNB)과 p-nitroanisole은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, U.S.A.)에서, sodium hydrosulfite와 potassium ferrocyanide는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서, thin layer chromatography(TLC) plate는 Merck Co.(Darmstadt, Germany)의 silica gel 60 F₂₅₄ 제품을, CO gas(grade : ultra high purity)는 Air Products and Chemicals, INC.(Allentown, PA 18195, U.S.A.)에서, bis-MSB (p-Bis-(2-methylstyryl)benzene), liquid scintillation cocktail for aqueous sample 및 Biosolv[®]는 Beckman (U.S.A.)에서, 그리고 기타 시약은 상기 회사들의 잔류 분석용과 TLC용 및 특급을 각각 구입하여 사용하였다.

기기는 pH meter(Fisher Accumet[®], U.S.A.), homogenizer (IKA ultra turrax T-25, Japan), centrifuge(Du Pont Sorvall RC-5C, U.S.A.), ultracentrifuge(Hitachi 70P-70, Japan), UV-visible spectrophotometer(Varian DMS-200, Australia), deep freezer(Revco 13-989-12, U.S.A.), shaking water bath (Dongyang 2650, Korea), rat cage(Daejong DJ-102, Korea),

rat metabolic cage(Daejong DJ-301, Korea), operating table (Daejong DJ-2412, Korea), mechanical convection oven(Jeil C-DM3, Korea), separatory funnel shaker (Jeil C-SFS, Korea), shaking incubator (Vision KMC - 8480SF, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi R - 114A, Switzerland), TLC set (Toyo HC - 10, Japan), TLC radioscanner (Berthold LB-2723, France), Highest Ultraviolet Intensity Lamp (Spectronics ENF-240C, U.S.A.) 및 liquid scintillation counter (Beckman LS-6500, U.S.A.) 등을 사용하였다.

Carbofuran과 그 대사산물의 급성경구독성

Carbofuran의 쥐에 대한 반수치사량(LD₅₀)을 구하기 위해 1 cage당 5마리씩 10마리를 1 처리군으로 2 반복하여 한 처리당 20마리의 쥐를 사용하였다. 약제투여는 동물 개체의 중량을 185±5 g과 195±5 g의 두 처리군으로 나누어 약량을 계산 투여하였다. 투여량은 LD₅₀ 추정치인 8 mg/kg(Tomlin, 1994)과 11 mg/kg(Kuhr 등, 1976)에 근접한 수준으로 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 mg/kg의 투여약량이 되도록 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용하여 stock solution을 만든 후 DMSO 0.5 ml에 각각의 농도가 포함 되도록 working solution을 만들어 경구투여용 주사기로 0.5 ml씩 경구 투여하였으며 대조군에는 0.5 ml의 DMSO만을 투여하였다. 쥐의 치사율은 약제투여 후 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 96시간마다 기록하였으며, 치사된 쥐는 곧바로 cage에서 제거하였고, 대조구와 비교하여 5%이상의 치사율이 나타날 경우에는 재실험을 행하였다. Finney법 (1971)에 의한 probit분석으로 carbofuran의 LD₁₀~LD₉₅값을 구하였다.

주 대사산물인 3-hydroxycarbofuran, 3-ketocarbofuran, 3-hydroxycarbofuran phenol, 3-ketocarbofuran phenol 및 carbofuran phenol 등에 대하여는 1 cage당 5마리를 1 처리군으로 2 반복하여 한 처리당 10마리의 쥐를 사용하였다. 약제투여는 195±5 g의 쥐만을 선별, 약량을 계산하여 투여하였다. 투여량은 8, 16, 32, 56 mg/kg이 되도록 하여 전술한 carbofuran독성실험의 경우와 동일한 방법으로 실시하여 생존율을 조사하였다.

PB 및 3-MC가 carbofuran의 독성경감에 미치는 영향

투여량 : Carbofuran의 투여량[0, 2.1(LD₁₀), 3.8(LD₂₅), 6.9(LD₅₀), 8.4 mg/kg(LD₉₅)]과 PB 및 3-MC의 투여량(0, 20,

40, 60, 80, 100 mg/kg)을 각각 조합으로 투여하여 1 처리군당 20마리씩의 흰쥐에 투여하였다. 약제 조제시 PB는 saline에, 3-MC는 corn oil에 녹여 stock solution을 만들었으며, 각각 0.5 ml당 전술한 양이 포함되도록 각각 working solution을 만들어 투여하였다. 투여방법은 경구 투여용 주사기로 carbofuran을 투여한 다음 PB 또는 3-MC를 약량별로 투여한 뒤 치사수와 생리적인 조사를 경시적으로 행하여 독성경감 효과를 조사하였다. 또한 PB와 3-MC 자체의 독성 유무를 관찰하기 위해 10마리를 1 처리군으로 PB와 3-MC만을 100, 200, 300, 400 mg/kg을 각각 경구투여하여 자체 독성 여부를 조사하였다.

투여시기 및 투여횟수 : 쥐에 carbofuran을 투여한 다음 경과시간과 투여횟수를 달리하여 PB 및 3-MC를 투여하였다. 투여시간 및 투여횟수는 각각 10분, 30분, 60분 1회 투여와 10분과 30분, 30분과 60분 2회 투여 및 10분과 30분 및 60분의 3회 투여하였다. 투여약량은 carbofuran의 경우 LD₉₅(96 hr)값인 8.4 mg/kg을 그리고 PB 및 3-MC의 경우 20 mg/kg을 투여하였으며, 공시동물수는 1처리군당 20마리로 하였다.

¹⁴C-carbofuran의 *in vitro* 대사시험

In vitro 대사에서는 간 추출액에 ¹⁴C-carbofuran(1.35 µg)과 PB(60 ppm) 또는 3-MC(60 ppm)을 조합으로 처리하여 대사물질의 생성과 이에 미치는 co-factor의 영향을 시험관내 반응으로 비교하였다.

효소 조제 : Carbofuran이 대사되는 과정과 대사과정에 미치는 PB 및 3-MC의 영향을 *in vitro*에서 확인하기 위해 쥐의 간 2 g씩을 cold room(3-4°C)에서 취한 후 Dorough(1968)와 Donald 등(1989)의 방법을 이용하여 첫 번째 처리군인 microsomal suspension은 채취한 쥐의 간을 4°C로 냉각된 1 mM EDTA 함유 1.15% KCl용액으로 세척한 후 같은 용액 10 ml를 가하여 glass homogenizer로 완전히 균질화 시킨 다음 2중 가제로 여과하여 10,000×g에서 20분간 원심분리하고 상정액을 다시 초고속원심분리기에서 105,000×g로 60분간 원심분리하여 얻은 microsomal pellet을 4°C로 냉각된 1 mM EDTA와 20% glycerol 함유 0.1M 인산 완충용액(pH 7.4) 5 ml를 가하여 glass homogenizer로 균질화시킨 효소액을 만들었다. 두 번째 처리군은 채취한 쥐의 간을 4°C로 냉각된 1

mM EDTA 함유 1.15% KCl용액으로 세척한 후 4°C로 냉각된 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 10 ml를 넣어 glass homogenizer로 완전히 마쇄하여 균질화시킨 다음 2중 가제로 여과하고 이를 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 효소원으로 사용하였다. 세번째 처리군은 채취한 쥐의 간을 4°C로 냉각된 1mM EDTA 함유 1.15% KCl용액으로 세척한 후 4°C로 냉각된 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 10 ml를 넣어 glass homogenizer로 완전히 마쇄 균질화시켜 2중 가제로 여과하고 10,000×g에서 30분간 원심분리한 상정액을 다시 초고속 원심분리기를 이용 105,000×g에서 1시간 원심분리한 상정액을 효소원으로 하였다. 첫번째와 두번째 및 세번째 처리군 모두 4°C의 조건으로 보존하면서 신속하게 다음 실험을 수행하였으며 각각 단백질정량(Black과 Coon, 1986)을 실시하여 2 mg/ml가 되게하여 사용하였다.

배양 : 25 ml의 삼각플라스크에 상기의 3가지 방법으로 추출한 각각의 효소원 2ml를 취하여 phase I과 phase II에 의한 대사산물 확인 시험을 행하였다. Phase I에 의한 대사산물확인 시험에서는 NADPH generating system(20 mM G-6-P, 1.8 unit G-6-P-DG, 20 mM NADP를 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 녹여서 조제하였다.) 1 ml와 상기의 3개 처리군의 효소액을 각각 혼합하고 37°C 암조건에서 1분간 배양한 후 여기에 ¹⁴C-carbofuran(1.35 µg/0.2 ml DMSO) 과 PB(60 ppm/0.2 ml saline) 또는 3-MC(60 ppm/0.2 ml corn oil)를 조합으로 처리하여 37°C의 암조건에서 2시간 동안 진탕배양하였다. Phase II에 의한 대사산물확인 시험은 1 ml의 20 mM NADPH 처리군과 20 mM NADPH(1 ml) + 20 mM FAD(1 ml) 처리군 및 20 mM NADPH(1 ml) + 15 mM의 GSH (1 ml) 처리군으로 나누어 상기 3개 처리군의 효소액을 각각 혼합하고 상기의 방법과 같이 배양한 후 여기에 ¹⁴C-carbofuran(1.35 µg/0.2 ml DMSO)과 PB (60 ppm/0.2 ml saline) 또는 3-MC(60 ppm/0.2 ml corn oil)를 조합으로 처리한 다음 반응액에 질소가스를 1분간 포화시켜 37°C의 암조건에서 2시간 동안 진탕배양하였다. 배양시킨 각각의 시료에 5 ml의 diethyl ether를 넣어 반응을 중지시키고 삼각플라스크내의 반응액을 20 ml의 원심분리관에 옮겼다. 다시 1 ml의 3차 증류수와 5 ml의 diethyl ether로 삼각플라스크를 헹구어 원심분리관에 합하고 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 취

하여 100 ml separatory funnel에 옮기고 원심분리관에 다시 2 ml의 증류수와 5 ml의 diethyl ether를 넣어 vortex mixer로 5분간 격렬히 진탕시켜 재 원심분리한 상정액을 funnel에 추가한 다음 5분간 shaking한 후 정치시켰다. 유기용매층을 100 ml의 삼각플라스크에 취하고 다시 물층은 20 ml의 diethyl ether로 3회 반복 추출하여 합하였다. 물층은 바로 liquid scintillation counter로 방사능측정을 행하였고, 유기용매층이 들어있는 삼각플라스크에는 무수황산나트륨 5 g을 넣고 격렬히 흔들어 탈수한 다음 농축수기에 옮기고 다시 10 ml의 diethyl ether로 무수황산나트륨을 3회 헹구어 수기에 합하였다. Diethyl ether층에 무수황산나트륨 1 g을 다시 넣어 탈수 시키면서 감압농축하고 5 ml로 정용하여 이중 0.5 ml를 취하여 유기용매층의 방사능을 측정하였고, 나머지는 질소가스를 통과시키면서 다시 농축시켜 0.9 ml의 benzene으로 정용한 다음 *in vivo*에서와 같은 방법(임, 1997)으로 TLC plate에 점적후 diethyl ether:n-hexane (3:1, v/v) 혼합용매로 전개시켜 carbofuran 및 그의 대사산물을 확인·정량하였다.

결과 및 고찰

Carbofuran 대사산물의 독성

5가지 주요 대사산물의 급성경구독성은 LD₅₀치를 기준으로 carbofuran과 비교할 때 표 1에서 보는 바와 같이 carbofuran에 비해 3-hydroxycarbofuran이 1/3, 3-ketocarbofuran이 1/4, 3-hydroxycarbofuran phenol이 1/7 정도로 독성이 낮게 나타났으며, 3-ketocarbofuran phenol과 carbofuran phenol은 최고 투여량인 56 mg/kg 투여구에서도 100%의 생존율을 나타내었다.

한편, 각 대사산물의 경구투여후 치사되는데 걸리는 시간은 대사물질의 독성정도에 비례하여 3-hydroxycarbofuran은 50~70분 사이에, 3-ketocarbofuran은 70~90분 사이에, 3-hydroxycarbofuran phenol은 90~180분 사이에 치사되었다. 이러한 결과로 보아 carbofuran의 대사산물도 어느 정도 독성이 있었지만 carbofuran에 비하면 매우 낮았고, 3-hydroxycarbofuran은 3-ketocarbofuran에 비해, 3-hydroxycarbofuran phenol은 3-ketocarbofuran phenol에 비해 독성이 높게 나타난 것은 같은 계열의 살충제인 carbaryl의 대사산물 시험에서 기본 구조식(carbamoyl moiety와 ester bond)을 지닌 4-hydroxy 및 5-hydroxy 유

Table 1. Acute oral toxicity of carbofuran metabolites in rat

Dosage (mg/kg)	Carbofuran metabolites				
	3-Hydroxy-carbofuran	3-Keto-carbofuran	3-Hydroxycarbofuran phenol	3-Ketocarbofuran phenol	Carbofuran phenol
	Survival(%)				
8	100	100	100	100	100
16	80	90	90	100	100
32	40	60	70	100	100
48	0	30	50	100	100
56	0	0	10	100	100

도체는 carbaryl과 유사하거나 오히려 강력한 AChE 저해 능이 있는데 비해 가수분해산물인 phenol류는 AChE의 저해능이 거의 없었다(Oomithan과 Casida, 1968)는 보고에 비추어 볼 때 carbofuran의 대사에서도 대사 산물인 3-hydroxycarbofuran과 3-hydroxycarbofuran phenol의 3-hydroxy기가 AChE의 활성을 저해시키는 것으로 보인다.

PB 및 3-MC가 살충제 carbofuran의 독성에 미치는 영향

투여량 : 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이 carbofuran의 쥐에 대한 LD₅₀치는 6.9mg/kg이었으며 phenobarbital sodium (PB) 및 3-methylcholanthrene (3-MC)의 자체독성 평가를 위한 PB 및 3-MC의 투여량별 실험에서 PB 및 3-MC 모두 400 mg/kg 투여군까지 생존율에 전혀 영향을 미치지 않았다.

Carbofuran과 PB의 조합투여량별 쥐의 생존율은 PB만 투여한 실험군에서의 생존율은 무투여군과 동일하였고,

carbofuran만을 투여한 실험군에서의 생존율은 carbofuran의 농도가 높을 수록 생존율이 현저히 감소하였다. 그러나 carbofuran과 PB를 조합투여한 실험군에서의 생존율은 carbofuran만을 투여한 실험군보다 높았다. 특히 LD₉₅ 값인 8.4 mg/kg 투여군에서는 carbofuran만을 투여한 실험군의 생존율이 0%인데 비해 carbofuran과 PB를 함께 투여한 실험군에서는 PB 20 mg/kg 투여군에서 60%, 40mg/kg 투여군에서 80%, 60 mg/kg 투여군에서 100%의 생존율을 나타내 PB의 투여량이 증가할 수록 생존율도 증가함을 알 수 있었다. 한편, carbofuran과 3-MC와의 조합투여에 따른 쥐의 생존율은 표 3에서 보는 바와 같이 PB에서와 비슷한 경향을 보여 3-MC만 투여한 실험군에서의 생존율은 무투여군과 동일하였고, carbofuran 3.8mg/kg 및 6.9mg/kg 투여군에 3-MC 20mg/kg을 조합투여시 각각 100%와 80%의 생존율을 보여 같은 량의 PB투여군 보다 높은 생존율을 나타낸 것으로 보아 3-MC의 해독효과는 PB보다 크다는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of phenobarbital sodium (PB) on detoxification of carbofuran to rat

Carbofuran dosage (mg/kg)	PB dosage(mg/kg)					
	0	20	40	60	80	100
	-----Survival(%)-----					
0	100	100	100	100	100	100
2.1	90	100	100	100	100	100
3.8	80	80	100	100	100	100
6.9	50	60	80	100	100	100
8.4	0	60	80	100	100	100

Table 3. Effect of 3-methylcholanthrene (3-MC) on detoxification of carbofuran to rat

Carbofuran dosage (mg/kg)	3-MC dosage(mg/kg)					
	0	20	40	60	80	100
	-----Survival(%)-----					
0	100	100	100	100	100	100
2.1	90	100	100	100	100	100
3.8	80	100	100	100	100	100
6.9	50	80	80	100	100	100
8.4	0	80	80	100	100	100

이러한 실험 결과는 한 등(1996)이 어류에 대하여 실험한 carbofuran의 독성경감에 대한 PB 및 3-MC의 효과와 비슷한 경향을 보였다.

Table 4. Effect of application frequency of phenobarbital sodium(PB) and 3-methylcholanthrene (3-MC) on detoxification of carbofuran(LD₉₅)* to rat

Application frequency	Lapse time after carbofuran treatment(min)	Dosage(20mg/kg)		
		Untreated	PB	3-MC
----- Survival(%) -----				
1	10	0	70	85
	30	0	60	80
	60	0	20	25
2	10, 30	0	90	90
	10, 60	0	80	85
	30, 60	0	75	85
3	10, 30, 60	0	90	95

*Dosage of carbofuran is 8.4 mg/kg.

투여시기 및 투여횟수 : Carbofuran과 PB 또는 3-MC의 투여시기 및 횟수별 조합투여에 따른 쥐의 생존율은 표 4에서 보는 바와 같이 carbofuran만을 투여한 실험군에서의 생존율은 0%이었고 carbofuran과 PB 또는 3-MC의 조합투여군에서는 생존율이 높게 나타났으며 carbofuran 투여 후 이들 경감제 투여시간이 짧을 수록, 투여 횟수가 많을 수록 생존율이 높은 경향을 보였다. 투여 횟수에 비례하여 생존율이 증가한 것은 결국 투여량의 증가에 기인하는 것으로 볼 수 있었다.

In vitro 대사

Carbofuran의 대사에 미치는 phase I 및 II 대사체계의 영향을 조사하고 이들 체계 중 PB와 3-MC가 어느 체계에 작용하여 carbofuran의 대사에 영향을 주는가를 구명하기 위해 쥐의 간으로부터 추출·조제한 microsomal fraction과 105,000×g 상징액 및 10,000×g 상징액에 ¹⁴C-carbofuran, ¹⁴C-carbofuran과 PB, ¹⁴C-carbofuran과 3-MC를 처리한 후 여기에 다시 cofactor로서 phase I system에 해당하는 NADP + G-6-P + G-6-P-DG와 phase II system에 해당하는 NADPH와 FAD, GSH를 단독 또는 조합으

Table 5. Effect of co-factors added to the microsomal fraction and the soluble subcellular fractions of rat on metabolism after ¹⁴C-carbofuran treatment

Type of fraction	Co-factor added	Carbofuran	3-Hydroxy carbofuran	3-Ketocarbofuran	%		
					Carbofuran phenol	3-Hydroxycarbofuran phenol	3-Ketocarbofuran phenol
Microsomal	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	84.4	6.21	3.57	0.31	1.10	0.54
	NADPH	90.1	2.75	1.89	0.40	0.41	0.50
	NADPH+FAD	89.2	3.14	2.30	0.46	0.50	0.47
	NADPH+GSH	88.7	3.22	2.53	0.31	0.76	0.57
	None	92.2	2.58	0.76	0.25	0.39	0.39
105,000×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	93.5	2.51	0.76	0.25	0.73	0.47
	NADPH	92.9	2.78	1.84	0.44	0.57	0.48
	NADPH+FAD	87.6	4.01	2.42	0.48	0.94	0.51
	NADPH+GSH	85.3	5.10	3.68	0.52	1.32	0.60
	None	95.7	0.81	0.52	0.20	0.39	0.41
10,000×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	75.9	10.7	5.58	1.33	2.87	0.64
	NADPH	87.8	3.19	0.68	0.86	1.96	0.75
	NADPH+FAD	83.3	6.39	3.25	0.60	2.92	0.70
	NADPH+GSH	81.1	6.41	4.40	0.65	2.78	0.80
	None	91.6	2.62	0.91	0.35	0.45	0.42

로 처리하여 대사산물 생성을 조사한 결과는 표 5, 6 및 7에 나타낸 바와 같다.

Carbofuran 단독처리군(표 5)에서의 대사산물 생성을 살펴 보면 microsomal fraction에서는 phase I system에 해당하는 NADP + G-6-P + G-6-P-DG를 혼합하여 cofactor로 처리했을 때 높은 대사생성율을 나타냈으며, 105,000 ×g 상징액의 경우 phase II system에 해당하는 NADPH + GSH 혼합처리군에서 높은 대사생성율을 나타내었다. 또한 10,000 ×g 상징액에서는 phase I system에 해당하는 co-factor 처리시 가장 높은 대사생성율을 나타내었는데 주 대사산물은 3-hydroxycarbofuran이었다.

Carbofuran과 PB의 조합처리군(표 6)에서의 대사산물 생성을 살펴 보면 microsomal fraction에서는 phase I system에 해당하는 co-factor 처리시, 105,000 ×g 상징액에서는 phase II system에 해당하는 cofactor 중 NADPH + FAD 처리시 높은 대사생성율을 나타내어 carbofuran 단독처리군(표 5)과 약간 다른 양상을 나타내었다.

또한 10,000 ×g 상징액에서는 phase I system에 해당하는 co-factor 처리시 가장 높은 대사생성율을 나타냈다. 대사산물에서도 차이를 보였는데, microsomal fraction에

서 주 대사산물은 3-ketocarbofuran으로 나타나 3-hydroxycarbofuran이 주 대사산물이었던 carbofuran 단독처리군과 다른 양상을 나타냈고, 특히 microsomal fraction에서 주 대사산물인 3-ketocarbofuran의 생성비율이 36.8%로 매우 높게 나타났다. Carbofuran과 3-MC의 조합처리군(표 7)에서의 대사산물 생성을 살펴 보면 microsomal fraction에서는 phase I system에 해당하는 co-factor 처리시, 105,000 ×g 상징액에서는 phase II system에 해당하는 co-factor 중 NADPH + FAD 처리시, 10,000 ×g 상징액에서는 phase I system에 해당하는 co-factor 처리시 가장 높은 대사생성율을 나타냈다. Microsomal fraction에서의 주 대사산물은 3-ketocarbofuran으로서 carbofuran과 PB의 조합처리군(표 6)과 동일하였으나 생성율은 59.3%로써 carbofuran과 PB의 조합처리군보다 많았다.

이들 결과를 살펴 보면 PB나 3-MC는 105,000 ×g 상징액에 존재하는 효소계에도 관여하여 대사시키지만, 주로 microsomal fraction에 있는 효소계에 작용하는 것이 확인되었으며, 이는 벼멸구의 carbofuran 대사시험에서 carbofuran이 oxidase에 의해 산화되어 3-ketocarbofuran으로 대사된다는 결과(박, 1989)에 비추어 PB나 3-MC는

Table 6. Effect of co-factors added to the microsomal fraction and the soluble subcellar fractions of rat on metabolism after combination treatment of ¹⁴C-carbofuran and PB

Type of fraction	Co-factor added	Carbofuran	3-Hydroxy carbofuran	3-Ketocarbofuran	Carbofuran phenol	3-Hydroxycarbofuran phenol	3-Ketocarbofuran phenol
----- % -----							
Microsomal	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	52.2	3.64	36.8	0.44	1.06	0.36
	NADPH	89.2	2.94	1.81	0.54	1.94	0.74
	NADPH+FAD	74.2	5.44	8.06	2.38	2.25	1.31
	NADPH+GSH	76.4	5.56	8.19	1.34	1.48	0.94
	None	89.3	1.63	2.54	0.25	2.20	0.56
105,000 ×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	90.7	3.20	2.90	0.46	1.21	0.46
	NADPH	88.1	3.10	1.76	0.62	2.10	0.84
	NADPH+FAD	78.8	4.50	3.01	2.06	3.10	1.54
	NADPH+GSH	80.1	4.10	3.40	1.42	2.14	0.98
	None	92.1	1.46	1.67	0.85	2.17	0.46
10,000 ×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	47.1	2.89	41.4	2.40	2.11	0.43
	NADPH	84.9	5.38	1.29	0.80	2.13	0.81
	NADPH+FAD	70.4	6.56	10.3	1.47	4.31	1.13
	NADPH+GSH	73.1	6.06	11.2	1.41	2.44	1.06
	None	87.8	1.39	2.74	0.50	3.16	0.83

주로 MFO(mixed function oxidase)효소계에 작용한다고 볼 수 있으며, 3-MC가 PB보다 대사산물 생성율이 높은 것으로 보아 3-MC가 PB보다 이들 효소활성에 더 큰 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다.

또한 상기의 co-factor의 사용에 따른 대사산물 생성의 결과에서 10,000×g 상정액에서의 대사산물이 microsomal fraction과 105,000×g 상정액 단독으로 co-factor를 사용하여 실험한 결과보다 많은 대사산물을 나타낸 것으로 미루어보아 carbofuran은 microsomal fraction과 105,000×g 상정액의 각 효소들이 상호 보완적으로 관여하여 대사시키지만 주로 MFO에 의한 대사가 이루어진 뒤 UDPGT나 GST에 의해 추가적인 해독작용이 이루어진다고 추정된 *in vivo* 효소활성의 결과(임, 1997)를 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 1997학년도 원광대학교 교비지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

Black, A. L., Y. C. Chiu, M. A. H. Fahmy and T. R. Fukuto (1973). Selective toxicity of N - sulfenylated derivatives of insecticidal methylcarbamate esters. *J. Agr. Food Chem.* 21(5):747~751.

Black, S. D. and M. J. Coon (1986) *Cytochrome P-450*; P. Ortiz de Monte-Illano Ed., Plenum, New York.

Bourke, J. B., E. J. Broderick, L. R. Hackler and P. C. Lippold (1968) Comparative metabolism of malathion-C¹⁴ in plants and animals. *J. Agr. Food Chem.* 16(4):585~589.

Bull, D. L. and D. A. Lindquist (1966) Metabolism of 3-hydroxy-N-methyl-cis-crotonamide dimethyl phosphate (azodrin) by insects and rats. *J. Agr. Food Chem.* 14:105~109.

Casida, J. E. (1970) Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agr. Food Chem.* 18(5):753~772.

Clemons, G. P. and R. E. Menzer (1968) Oxidative

Table 7. Effect of co-factors added to the microsomal fraction and the soluble subcellar fractions of rat on metabolism after combination treatment of ¹⁴C-carbofuran and 3-MC

Type of fraction	Co-factor added	Carbofuran	3-Hydroxy carbofuran	3-Ketocarbofuran	Carbofuran phenol	3-Hydroxycarbofuran phenol	3-Ketocarbofuran phenol
----- % -----							
Microsomal	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	29.9	2.74	59.3	0.29	1.16	0.40
	NADPH	86.8	2.90	2.01	0.61	1.88	0.81
	NADPH+FAD	76.8	6.75	7.64	1.25	2.13	1.00
	NADPH+GSH	80.5	4.81	9.04	1.13	2.06	0.88
	None	88.1	2.54	1.88	0.81	0.93	0.71
105,000×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	92.9	3.45	2.20	0.31	1.11	0.33
	NADPH	89.7	2.92	1.82	0.74	1.91	1.10
	NADPH+FAD	80.2	3.69	3.19	3.13	4.25	1.98
	NADPH+GSH	83.7	4.95	5.10	1.38	2.14	0.89
	None	91.8	1.50	1.56	0.63	1.41	0.73
10,000×g soluble	NADP+G-6-P +G-6-P-DG	26.8	1.52	62.2	1.39	2.17	0.43
	NADPH	86.1	5.44	1.34	0.89	1.89	0.61
	NADPH+FAD	72.7	6.94	9.01	1.38	5.29	0.88
	NADPH+GSH	74.3	5.88	11.3	1.50	2.38	1.00
	None	88.0	2.59	2.94	0.83	0.98	0.67

- metabolism phosphamidon in rats and a goat. J. Agr. Food Chem. 16:312~318.
- Donald, E. M., P. N. William and E. L. Patricia (1989) Selective inhibition of cytochrome P-450 isozymes by the herbicide synergist tridiphane. Pestic. Biochem. Physiol. 35:42~49.
- Dorough, H. W. (1968) Metabolism of furadan(NIA-10242) in rats and house flies. J. Agr. Food Chem. 16(2):319~325.
- Finney, D. J. (1971) Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press. England.
- Haugen, D. A., M. S. Coon and D. W. Nebert (1976) Induction of multiple forms of mouse liver cytochrome P-450 ; Evidence for genetically controlled *de novo* protein synthesis in response to treatment with β -naphthoflavone or phenobarbital. J. Biol. Chem. 251(6): 1817~1827.
- Kuhr, R. J. and H. W. Dorough (1976) Carbamate Insecticides; Chemistry, Biochemistry, and Toxicology. CRC Press, USA.
- Mattson, A. M., J. T. Spillane and G. W. Pearce (1958) Dimethyl 2,2-di-chlorovinyl phosphate(DDVP), an organic phosphorus compound highly toxic to insects. J. Agr. Food Chem. 3(4):319~325.
- Murphy, S. D. and K. P. Dubois (1957) Quantitative measurement of inhibition of the enzymatic detoxification of malathion by EPN(ethyl p-nitrophenyl thionobenzenephosphate). Amer. Cancer Soc. 96:813~818.
- Neal, R. A. (1972) A comparison of the *in vitro* metabolism of parathion in the lung and liver of the rabbit. Toxicol. Appl. Pharm. 23:123~130.
- Oonnithan, E. S. and J. E. Casida (1968) Oxidation of methyl- and dimethylcarbamate metabolites of the insecticide chemicals by microsomal enzymes and anticholinesterase activity of the metabolites. J. Agr. Food Chem. 6:28~44.
- Rao, K. S. P., C. S. Chetty and D. Desaiah (1984) *In vitro* effects of pyrethroids on rat brain and liver ATPase activities. J. Toxicol. Environ. Health 14:257~265.
- Taylor, W. J. R., E. L. Thomas and E. A. Sellers (1965) Effect of a combination of atropine, metaraminol and pyridine aldoxime methansulfonate (AMP therapy) on normal human subjects. Canad. Med. Ass. J. 93:957~961.
- Tomlin, C. (1994). The Pesticide Manual; In corporating The Agrochemicals Hand Book. 10th Edition. BCPC, U.K.
- Yang, R. S., H. E. Hodgson and W. C. Dauterman (1971) Metabolism in *in vitro* of diazinon and diazoxon in rat liver. J. Agr. Food Chem. 19:10~13.
- Yoneyama, K. and F. Matsumura (1981). Reductive metabolism of heptachlor, parathion, 4,4-dichlorobenzophenone, and carbophenothion by rat liver systems. Pesti. Biochem. Physiol. 15:213~221.
- 권숙표 (1974) 농약과 공해. 대한의학협회지 17(11):843~849.
- 김진수, 이형호, 김홍영, 홍원균, 이복희 (1970) Parathion 중독 52 예에 대한 임상적 관찰. 대한내과학회잡지 13(2):73~79.
- 박형만 (1989) Fenobucarb, carbofuran and diazinon에 대한 벼멸구의 저항성 기작에 관한 연구. 서울대학교 박사 학위 논문.
- 신진섭, 최승윤, 이창업, 최인후 (1984) 흰쥐에 대한 phosphamidon 및 endosulfan의 아급성독성에 관한 연구. 서울대학교 농학연구 9(2):9~15.
- 임요섭 (1997) 살충제 carbofuran에 의한 쥐의 효소활성저해와 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene의 해독기작구명. 원광대학교 박사학위논문.
- 임요섭, 한성수 (1997) Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene에 의한 억제효과. 한국환경농학회지 16(1): 61~66.
- 임현술 (1982) 일부농촌 지역에서의 농약에 의한 인체의 피해 현황에 관한 조사 연구. 예방의학회지 15:205~211.
- 정종학 (1978) 유기인제 농약으로 인한 피해. 대한의학협회지. 21(5):359~364.
- 한성수, 임요섭 (1997) 살충제 carbofuran이 쥐의 NIH3T3 섬유모세포에 끼치는 세포 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene의 수복효과. 한국환경농학회지 16(2)

:149~155.

한성수, 임요섭, 정재훈 (1996) 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 이스라엘잉어의 효소활성에 미치는 영향. 한국농화학회지 39(1):78

~83.

허기석, 김형진, 신대균, 신명진, 손창학, 김문중 (1984) Atropine 투여용법에 따른 유기인제 중독증의 예후 비교. 대한내과학회잡지 27(1):81~87.

Effect of phenobarbital sodium and 3-methylcholanthrene on metabolism *in vitro* and toxicity of ^{14}C -carbofuran in rat

Seong-Soo Han* and Yo-Sup Rim¹ (Department of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea, and ¹Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Suncheon National University)

Abstract : In order to elucidate the effect of phenobarbital sodium(PB) and 3-methylcholanthrene(3-MC) on metabolism *in vitro* and toxicity of ^{14}C -carbofuran in rat, they were administered by the chemicals, alone or in combination, and their survival ratios and metabolites were investigated. The LD_{50} (96 hrs) value of carbofuran to rats was 6.9 mg/kg. The toxicities of the major metabolites were in the decreasing order of 3-hydroxycarbofuran, 3-ketocarbofuran, 3-hydroxycarbofuran phenol and were much lower than that of the parent compound. When the rats were orally administered by the dose of carbofuran alone, 8.4 mg/kg, the survival ratio was 0%, whereas that was raised up to 60~80% with 20 mg/kg of PB or 3-MC, and 100% with 60 mg/kg of PB or 3-MC. Their metabolism *in vitro* occurred in the microsomal fraction. In case of carbofuran alone, the major metabolite was 3-hydroxycarbofuran. When carbofuran with PB or 3-MC, on the other hand, was treated, it was 3-ketocarbofuran. In addition, when the co-factor(NADP+G-6-P+G-6-P-DG) was added to the microsomal fraction(phase I system), and a mixture of NADPH+GSH to the 105,000g supernatant(phase II system) taken by carbofuran alone, each metabolites were produced by the maximum levels, respectively. In case of the carbofuran treatment with PB or 3-MC, the microsomal fraction of phase I system produced the maximum levels of metabolites, as in the treatment of carbofuran alone, whereas the 105,000g supernatant supplemented with the co-factor NADPH+FAD(Phase II system) was brought about the maximum production of metabolites. The ratio of the formation of metabolites was 2 to 3 times higher in the combined treatment of carbofuran with PB or 3-MC than in the treatment of carbofuran alone.

* Corresponding author