

'90국책연구개발사업  
“한 · 독 공동연구”

## 화학물질의 환경독성 평가방법 개발(V)

Development of Environmental Toxicological Methods  
for the Assessment of Chemical Compounds(V)

연구기관

한국화학연구소

과학기술처

# 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "화학물질의 환경독성 평가방법 개발 (V)"의 최종 보고서로 제출합니다.

1991년 7월 일

주관연구기관명 : 한국화학연구소  
안전성연구센터

총괄연구책임자 : 김 용 화

책임연구원 : 이 성 규

연구원 : 오 혜 선

염 동 혁

연구조원 : 윤 흥 길

민 정 은

# 요약문

## I 제 목

### 화학물질의 환경독성 평가방법 개발 (V)

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 목적

현재 사용중이거나 새로이 개발되는 농약, 의약품, 염료 또는 각종 화학약품의 환경독성 평가방법을 확립함으로써 우리나라 정밀화학공업을 지원하고 환경보호를 도모하여 국민보건유지에 기여하고, 동시에 관련연구의 국내 수행시스템의 확립을 목표로 한다.

### 2. 연구개발의 중요성

현대사회는 화학물질과 떼어놓을 수 없고 이러한 관계는 장차 좀 더 심화될 것으로 예상된다. 그러나 화학물질이 인간 및 환경에 가져온 부작용은 무시할 수 없는 문제들을 야기시켰다. 따라서 선진국에서는 이런 예기치 않던 부작용을 극소화하기 위한 노력을 기울여 왔고 판매금지, 제한 등의 극한조치와 원인물질을 추적하기 위한 정기적인 모니터링 제도를 실시하고 있다. 그러나 최근의 이 분야 전문가들의 합일점은 문제를 일으킬 만한 소지가 있는 화학물질을 개발단계에서 제거하므로서, 즉 인간환경에 접하기 전에 도태시키므로서 근원적인 문제해결을 하는것이 최선의 길이라는 것이다.

이러한 시점에서 환경내에서의 위험가능성을 평가하는 방법을 개발, 확립한다는 것은 무공해한 신물질 창출을 가속화 시키는 계기가 될 것이다. 동시

에 이와 같은 방법을 이용하여 기존의 화학물질에 대한 위험 가능성을 제시하여 개선을 유도할 수 있을 것이다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

화학물질의 수서생물에 대한 독성은 실험실적 독성시험을 통해서 실제 환경에서의 독성을 예측하는 것으로 실험실적 결과의 예측성을 높이기 위한 여러가지 연구가 수행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 수중에서 화학물질의 생물이용성 (bioavailability)에 관여하는 중요 인자인 dissolved humic materials(DHM)이 화학물질의 급성독성에 미치는 영향을 규명하고자, 어류와 수서무척추동물을 대상으로 DHM 농도별로 diazinon과 tetrabromobisphenol-A의 독성시험을 실시하였다.

또한, 화학물질의 선택적 어독성의 메카니즘을 비교 대사 연구를 통하여 확립하기 위하여, 유기인계 농약인 phenyl-C-14 diazinon과 diethyl C-14 diazinon 및 송사리와 미꾸리를 이용하였다. 두 어체내의 mixed-function oxidase 및 다른 대사효소계의 활성 차이와 생성된 대사물의 차이를 규명하기 위하여, microsome 및 cytosol 분획을 이용한 *in vitro* 대사반응과 어체내로 직접 흡수 시킨 후의 *in vivo* 대사반응을 비교하여 두 어종에서의 diazinon에 대한 대사활성의 차이를 알 수 있었고, 한편으로는 대사경로를 예측할 수 있었다.

### IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. Dissolved humic materials가 화학물질의 수서생물에 대한 독성에 미치는 영향

Dissolved humic materials(DHM)이 diazinon 및 tetrabromobisphenol-A (TBP)의 독성에 미치는 영향을 보기 위하여 어류인 송사리와 수서무척추동물

인 Daphnia magna에 대한 독성시험 결과는 다음과 같다. 단 본 보고서에서는 송사리에 대한 시험만 완료되어 보고하고, Daphnia magna에 대한 시험은 현재 진행중이다.

1. Diazinon의 송사리에 대한 96 시간 LC50 값은 DHM 무처리가 6.54 mg/L, 0.5 mg/L 처리가 6.58 mg/L, 5 mg/L 처리가 6.5 mg/L, 50 mg/L 처리가 5.99 mg/L으로 DHM 처리간에 유의한 차이가 없었다.
2. TBP의 96 시간 급성독성값도 DHM 무처리가 1.89 mg/L, 0.5 mg/L 처리가 1.85 mg/L, 5 mg/L 처리가 1.86 mg/L, 50 mg/L 처리가 1.93 mg/L으로 DHM 처리로 인한 급성독성값의 차이를 인정할 수 없었다.

이상의 결과만으로는 DHM이 diazinon과 TBP의 어류에 대한 독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단되나, 수서무척추동물 시험까지 검토되어야 DHM의 영향이 분명하게 규명될 것이다. 이러한 영향이 규명되면, 급성독성시험 결과로 환경에서의 영향을 평가할때 예측성을 높일 수 있으며, 아울러 화학물질과 DHM의 상호작용에 대한 체계적인 연구가 추진될 것이다.

## 2. 화학물질의 선택적 어독성 및 비교대사에 관한 연구

2 종의 담수어류인 송사리와 미꾸리에 대한 유기인계 화합물 diazinon의 선택적 어독성에 대한 메카니즘을 두 어종에 대한 in vitro 및 in vivo 비교대사를 통해 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 두 어종에서의 phenyl-C-14 diazinon에 대한 in vitro 대사에서, 주 대사물인 M-II 즉 hydroxy pyrimidinol이 생성되었고, 그 생성량은 송사리가 미꾸리보다 2 배 더 많았으나 두 어종간의 대사경로의 차이는 발견할 수 없었다.
2. 두 어종에서의 phenyl-C-14 diazinon에 대한 in vivo 대사에서, 비교적 소수성 용매인 ethylacetate에 용해되는 주 대사물은 M-II, hydro-

xy pyrimidinol 이었고, 친수성 용매인 methanol에 용해되는 대사물에서는 TLC 상에서 원점에서 이동되지 않는 극성이 강한 대사물 M-P가 생성되었으나 두 어종간의 대사 차이는 거의 없었다.

3. Diethyl-C-14 diazinon을 이용한 동일한 대사 실험과 비교해 볼 때, diethyl-C-14 diazinon의 대사물인 M-1, M-2와는 다른 대사물임을 두 가지 유기용매 체계 하에서 비교, 확인하였다.

따라서, diazinon의 두 어종에 대한 선택적 어독성의 대사 활성의 차이는 약 2 배에서 약 13 배의 차이로 설명할 수 있었다.

본 연구에서의 방법을 이용하여 기존의 유기인계 및 카바마이트계 화합물의 구조에 따른 대사 차이가 있음을 규명함으로써, 새로운 농약 개발 과정에서 환경독성의 예비 스크리닝 방법으로 사용될 수 있을 것이다.

# SUMMARY

## I. Subject

Establishment of Environmental Toxicological Methods for the Risk Assessment of Chemical Compounds (V).

## II. Objectives and Justification

### 1. Objectives

Establishment of the environmental toxicological methods for the assessment of already-in use and new pesticides, pharmaceuticals, dyestuffs, and other industrial chemicals will lead to support the advancement of the fine chemical industry, to secure human and environmental health and to achieve self-sufficiency in the related researches.

### 2. Justification

Nowadays, chemicals have been essential part of modern daily life and this trend will be continued with even stronger intimacy. However, chemicals have posed problems by causing unpredicted adverse effects on human and the environment. Developed countries encounter these problems by imposing strict limit of usage or by introducing regular monitoring system in an attempt to minimize the adverse effect. General concensus of experts in the field is that

the best solution is to prevent the potential environmental pollutants from being introduced into the market.

### III. Area and Scope of the Study in the Period

This study was intended to understand the interactions between dissolved humic material (DHM) and chemicals in aquatic environment to predict more accurately the toxicity of chemicals on aquatic life. Acute toxicities of diazinon and tetrabromobisphenol-A on killifish (Oryzias latipes), and water flea (Daphnia magna) were evaluated with four DHM treatment levels.

Also, in order to clarify the mechanism of selective toxicity of chemical compound by comparative metabolism, we used organophosphorous compound, phenyl-C-14 diazinon, diethyl-C-14 diazinon, and two fish species, killifish and loach. By the in vitro metabolism using microsomal and cytosolic fraction and the in vivo metabolism, we could know the differences of metabolic activity and metabolites between two fish species and could proposed the metabolic pathway of diazinon in killifish and loach.

### IV. Results and Recommendation

1. Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of chemicals to aquatic organisms.

The acute toxicities of diazinon and tetrabromobisphenol-A (TBP) on killifish were determined in terms of four DHM levels ( 0, 0.5, 5, and

50 mg/L). Because the acute toxicity tests for water flea is not completed, the results is not included in this reports.

1. LC50 values for diazinon were 6.54 mg/L, 6.58 mg/L, 6.50 mg/L and 5.99 mg/L in the presence of 0, 0.5, 5, and 50 mg/L of DHM, respectively.
2. LC50 values for TBP were 1.89 mg/L, 1.85 mg/L, 1.86 mg/L, and 1.93 mg/L in the presence of 0, 0.5, 5, and 50 mg/L of DHM, respectively
3. These results indicate that the DHM had no significant influence on the toxicity of diazinon and TBP to killifish.

## 2. Selective toxicity and comparative metabolism of chemical compound to fish

The results from study about the mechanism of selective toxicity of organophosphorous compound, diazinon to two fish species are as follows.

1. In in vitro metabolism of phenyl-C-14 diazinon to two fish species, the major metabolite, M-II, hydroxy pyrimidinol was produced. The amount of hydroxy pyrimidinol produced in killifish was higher 2-fold than that in loach but there was no any difference the metabolic pathway between two fish species.
2. In in vivo metabolism of phenyl-C-14 diazinon, the metabolite, M-II, hydroxy pyrimidinol was dissolved in ethylacetate and the other polar metabolite, M-P, which was dissolved in methanol, was produced also. The polar metabolite, M-P, was not migrated from the start point on TLC plate. But there was no any difference the metabolic pathway between two fish species.
3. When we compared with the results obtained from the same experi-

ment using diethyl-C-14 diazinon, the metabolites, M-1 and M-2, produced from the metabolism of diethyl-C-14 diazinon were different from those of phenyl-C-14 diazinon.

Therefore, we could explain the differences of 2 to 13-fold rates between two fish species.

With using this experiment, it would be a useful method for the prescreening of ecotoxicity of new organophosphorous or carbamate agrochemicals.

# 목 차

제 1 장 서 론 -----	1
제 2 장 Dissolved humic materials가 화학물질의 수생생물에 대한 독성에 미치는 영향	
제 1 절 서 론 -----	3
제 2 절 재료 및 방법	
1. 공시 화학 물질 -----	6
2. Dissolved humic materials (DHM)의 조제 -----	6
3. 급성독성 시험 -----	7
4. 시험물질 분석 -----	9
5. 독성시험 결과의 분석 -----	11
제 3 절 결과 및 고찰	
1. 시험물질의 농도 변화 -----	12
2. Dissolved humic materials (DHM)이 diazinon과 TBP의 독성에 미치는 영향 -----	17
제 4 절 결 론 -----	28
참 고 문 헌 -----	29

### 제 3 장 화학물질의 선택적 어독성 및 비교대사 연구

제 1 절 서 론	33
제 2 절 재료 및 방법	36
1. 재료 및 기기	36
2. 실험방법	
가. 어체 전체로부터 microsomal 분획 및 cytosol 분획의 제조	37
나. Phenyl 기에 표지된 C-14 diazinon의 어체내로의 흡수	37
다. 어체로부터 <i>in vivo</i> 대사물의 추출 및 확인	38
라. Phenyl-C-14 diazinon의 <i>in vitro</i> 대사 및 대사물의 확인	38
제 3 절 결 과	40
제 4 절 고 찰	54
제 5 절 결 론	61
참 고 문 헌	63

# Contents

Chapter 1. Introduction -----	1
Chapter 2. Effects of Dissolved Humic Materials on Acute Toxicity of Chemicals to Aquatic Organisms	
Section 1. Introduction -----	3
Section 2. Materials and Methods	
1. Test chemicals -----	6
2. Preparation of dissolved humic materials -----	6
3. Acute toxicity test -----	7
4. Analysis of test chemicals -----	9
5. Statistical analysis of toxicity test results -----	11
Section 3. Results and Discussion	
1. Concentration of test chemicals in toxicity test -----	12
2. Effects of dissolved humic materials on toxicity of diazinon and TBP -----	17
Section 4. Conclusions -----	28
References -----	29

Chapter 3. Selective Toxicity and Comparative Metabolism of  
Chemical Compound to fish

Section 1. Introduction -----	33
Section 2. Materials and Methods	
1. Reagents and Instruments -----	36
2. Experimental Methods	
1) Preparation of microsomal and cytosol fraction from fish whole body -----	37
2) Absorption of phenyl-C-14 diazinon into the fish -----	37
3) Extraction and Identification of <u>in vivo</u> metabolites of phenyl C-14 diazinon from the fish -----	38
4) <u>In vitro</u> metabolism and identification of metabolites of phenyl-C-14 diazinon -----	38
Section 3. Results -----	40
Section 4. Discussion -----	54
Section 5. Conclusion -----	61
References -----	63

## 표 목 차

표 2-1. Diazinon의 회수율 시험 결과 -----	12
표 2-2. TBP의 회수율 시험 결과 -----	16
표 2-3. 시험용액의 tetrabromobisphenol-A (TBP)의 농도 변화 -----	16
표 2-4. Dissolved humic materials 처리에 따른 diazinon의 송사리에 대한 96 시간 급성독성값 -----	17
표 2-5. Dissolved humic materials 처리에 따른 TBP의 송사리에 대한 96 시간 급성독성값 -----	25
표 3-1. 송사리와 미꾸리에 대한 선택적 독성 차이의 비교 요약 -----	41

# 여 백

## 그림목차

그림 2-1. Diazinon의 대표적 크로마토그램 (1.82 ppm) -----	13
그림 2-2. Diazinon 독성시험기간 동안 각 dissolved humic materials (DHM) 농도별 diazinon의 농도변화 -----	14
그림 2-3. Tetrabromobisphenol-A (TBP)의 대표적 크로마토그램 (1.5 ppm) -----	15
그림 2-4. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선 - 0.5 mg/L DHM -----	18
그림 2-5. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선 - 5 mg/L DHM -----	19
그림 2-6. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선 - 50 mg/L DHM -----	20
그림 2-7. Diazinon 독성시험에 있어서 DHM 농도의 변화 -----	21
그림 2-8. TBP 독성시험에 있어서 DHM 농도의 변화 -----	22
그림 2-9. DHM 처리별 diazinon의 96 시간 급성독성값과 95 % 신뢰구간 -	23
그림 2-10. DHM 처리별 TBP의 96 시간 급성독성값과 95 % 신뢰구간 -----	24

그림 3-1. 정제된 phenyl-C-14 diazinon의 radio chromatogram -----	43
그림 3-2. Microsome 분획에서의 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vitro</u> 대사물 확인 -----	44
그림 3-3. Cytosol 분획에서의 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vitro</u> 대사물 확인 -----	45
그림 3-4. 송사리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vivo</u> 대사물 확인 ----- (Ethylacetate 추출물)	46
그림 3-5. 미꾸리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vivo</u> 대사물 확인 ----- (Ethylacetate 추출물)	47
그림 3-6. 송사리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vivo</u> 대사물 확인 ----- (Methanol 추출물)	49
그림 3-7. 미꾸리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 <u>in vivo</u> 대사물 확인 ----- (Methanol 추출물)	50
그림 3-8. 두 유기용매체계 하에서 전개된 <u>in vivo</u> 대사물의 비교 ----- (Ethylacetate 추출물)	51
그림 3-9. 두 유기용매체계 하에서 전개된 <u>in vivo</u> 대사물의 비교 ----- (Methanol 추출물)	52
그림 3-10. 송사리와 미꾸리에서 예상되는 diazinon의 대사경로 -----	60

# 제 1 장 서 론

1990년도 국제 공동 연구 사업으로 수행된 화학물질의 환경독성 평가 방법 개발 과제는 이제까지의 협력방식에서 진일보하는 전기를 마련하였다. 종전까지의 공동 연구는 주로 훈련생의 파견 및 전문가의 초청으로 기술의 일방적인 도입에 그쳤다고 볼 수 있고, 연구 주제의 상호협의를 거의 이루어지지 못한 채 양국의 관심사만을 각각 병렬적으로 연구해 가는 상황이 현실이었다고 볼 수 있다. 그간 독일과의 공동연구를 통하여 기술적으로 거의 불모지인 국내에 화학물질의 환경화학적 평가 방법이 확립되게 되었으며 이는 국내에서 새로 개발되고 있는 농약 및 산업용 화학물질들을 검토하는 단계에서 적용되고 있으며 행정적으로는 외국으로부터 수입되는 각종 화학물질의 위해성을 평가하여 사전에 규제, 관리하는데에 활용되는 단계에 이르렀다는 것이 큰 의의라고 생각된다. 그러나 실질적인 국제 공동 연구로서의 면모는 갖추어지지 못한 상태에 있었다고 할 수 있다.

이와 같은 현실에 강한 의문점을 제시하고 이를 개선하기 위하여 실질적인 중재역을 시작한 분은 독일 과학기술처 국제공동연구 조정관인 Dr. K. Wiendieck 였고, 실질적인 공동연구는 양국의 공동관심사를 주제로 도출하고 연구업무의 분담을 통하여 연구해 나가는 것이 필요하다는 점을 역설하였으며 특히 이제까지 이런 면에서 미온적이었던 독일측 연구자들에게 공동협력할 수 있는 idea와 체제를 갖추어 갈 것을 촉구한 바 있다. 이와 때를 같이 하여 Dr. Korte소장 후임으로 Dr. Kettrup이 취임하여 공동연구에 적극적인 자세로 임하여 상호간의 proposal 교환이 이루어지게 되었고, 한국측에서 제시한 두가지 proposal 중에서 독일측에도 유용하다고 생각하는 한개 주제가 선정되게 되었으며 한국측은 이에 대한 연구를 시작하게 된 것이다.

물론 원래 제출한 1990년도 연구 계획서의 내용과는 사뭇 다른 주제이긴 하지

만 한국과 독일 양측이 공동으로 연구해 나갈 수 있다는 장기적 전망하에 우선 독일측이 선택한 요구를 수용하게 된 것이다. 본 주제가 선정된 이유로서는 양측의 실험 경험에 의존하기보다는 현실적인 필요성이 우선 순위를 두고 인적, 시설 및 장비의 활용 가능성을 감안하였다.

한.독 양측이 합의하여 수행하게 된 "한.독에서 사용되는 주요 환경오염물질의 위해성 비교 연구"는 전통적인 실험실적으로 수행된 생물독성시험치가 실제 환경에서의 독성과는 상당히 다른 결과를 가져 올 수 있다는 여러 연구 결과를 감안하여 볼 때 화학물질의 국제적 유통에 장애요인이 될 수도 있다는 점에서 중요한 주제로 선정되었다. 실제 환경에서의 독성이 실험실적 독성치와 상이한 주된 이유로서는, 첫째, 어종간의 민감성 차이를 들 수 있고, 둘째로는 환경 조건의 차이를 들 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 두가지로 나누어 첫째는 어종의 민감성 차이를 나타내는데 주요한 지표로 생각되는 대사 경로의 차이를 규명하는 연구를 수행하였고, 둘째로는 한.독의 자연환경수중에 다량 함유된 부식산(humic acid)의 차이에 의한 독성의 차이를 규명하기 위한 예비 시험을 실시하였다. 본 연구를 위하여 대사시험에는 독일측에서 제공한  $^{14}\text{C}$ 이 표지된 diazinon을 사용할 수 있었으며, 독성시험을 위한 공시 생물로서는 한국측에서 장차 사용하기로 합의된 송사리를 사용하였다.

## 제 2 장 Dissolved humic materials가 화학물질의 수서생물에 대한 독성에 미치는 영향

### 제 1 절 서 론

현재 일반적으로 사용되고 있거나 새로이 개발되는 화학물질의 환경 중에서의 생태계에 대한 영향을 추정하는 방법으로서 실험실적인 생물독성시험이 추천되어 사용되고 있으며 세계적으로 그 시험 방법을 통일하기 위한 노력들이 경주되고 있다. 여기에 사용되는 생물들은 수생생태계를 대표하는 어류, 동물성 플랑크톤, 식물성 플랑크톤들이며 이들이 생육하기에 최적인 상태에서 실험이 수행된다. 그러나 실제 환경에서는 시험물질 외에 여러 다른 천연 및 인공 화학물질이 공존하므로써 순수한 실험실적인 독성치와는 달라질 수 있다는 전제하에 그 요인을 밝히기 위한 연구들이 수행되고 있다. 물론 이러한 연구는 두가지 방면에서 접근되고 있다. 첫째는 환경 오염 물질이 환경 중의 고유 구성분과 어떻게 흡착하고 반응하느냐를 추적하므로써 화학적으로 그 동태를 규명하려는 것이고, 둘째로는 시험대상이 복합적이어서 화학적으로 밝히기 어려운 현재 상황에서 독성적인 시험을 지표로 하여 환경 오염 물질 및 환경 고유 물질과의 관계 및 특성을 총량적으로 파악하려는 시도가 있다고 하겠다.

본 한.독 국제 공동 연구에서 주제로 삼은 부식질에 관한 연구에 국한되어 고찰해 보더라도 전자의 접근 방법은 용해성 유기물이 수중에서 유기 및 무기물과 착화합물을 형성하므로써 화학물질의 물리화학적인 특성이 변하거나 유기화합물의 용해성이 증가한다는 연구들이 있다 (1, 2, 3, 4, 5, 6). 이러한 화학적인 연구들을 통하여 얻어진 괄목할 만한 성과는 유기화합물의  $10g Kow$ 가 4 이하인 경우에는 용해성 부식산에 흡착되는 정도가 거의 무시할 만하다는 Carter와 Suffet<sup>(7)</sup>의 보고와 용해성 유기 탄소 화합물 중에서도 소수

성-산성 분획(HbA)이 난용성 환경 유기 오염물의 흡착에 크게 관여하며, 생체 이용성(bioavailability)은 흡착되지 않은 유리된 오염물의 농도에 의존함을 밝힌 Kukkonen 등<sup>(9)</sup>의 연구라 할 수 있다. 하지만 이러한 연구는 제한된 소수의 대상 화합물과 제한된 부식산 혹은 국지적인 환경에서 채집된 용해성 유기탄소 화합물을 사용하였으므로 시험대상 화합물과 부식산의 범위를 넓혀서 연구할 필요가 있다. 이러한 화학적인 접근방법의 기술적인 난점은 부식산의 순수 분리 방법과 자연적인 상태에서 흡착상태를 표현할 수 있는 적합한 방법의 도출이라 할 수 있는데, 부식산 영향에 관련된 실험방법의 선정시 중요한 선택 및 개선이 필요한 부분이라 생각되고 있다<sup>(9,10,11)</sup>.

이와 동시에 환경 생물에 대한 부식질의 영향은 상당한 진전을 보이고 있는데, 무기물 중에서 Cu<sup>(12)</sup>, Cd<sup>(13)</sup>, Zn<sup>(14)</sup>, Al<sup>(15)</sup>, Cr<sup>(16)</sup> 등의 급성 및 만성적 독성이 부식산의 존재하에서 상승 혹은 저하되는 연구가 진전되었다. 이러한 상승 혹은 저하 효과는 아직 일반적인 규칙성으로 정리되지 못하고 있고, 다만 pH, hardness, 이온 상태에 따라 다른 결론을 내릴 수 있음을 알 수 있다. 또한, 독성과 농축성과의 관계도 법칙성을 찾지 못하고 있다. 이 때 대상으로 삼은 생물은 주로 동물성 플랑크톤과 어류였다. 부식질이 유기오염물의 독성에 미치는 영향은 전통적인 polynuclear aromatic hydrocarbon(PAH), 유기 염소계 화합물 등을 대상으로 수행되었다.<sup>(17,18,19)</sup> 일반적으로 난용성의 유기화합물은 급.만성 독성을 낮추는 것으로 보고되고 있으나 거의 효과가 없는 경우도 많이 나타나고 있다.

이상과 같은 연구결과들을 볼 때, 기본적인 이론이나 실험방법론적인 면에서는 이미 상당히 진전되어 있어서, 한국 및 독일의 환경 중에 존재하는 부식질이 환경 유기 오염 물질에 미치는 영향에 대해서는 대략적인 추측은 가능하나, 현실적으로 많이 사용하고 있는 농약류 및 산업용 화학물질에 대해서는 개별적인 연구가 수행될 필요가 있음을 알 수 있다. 특히 한국 및 독일의

부식질의 특성이 다를 것이라 가정할 수 있고, 이를 실험에 의하여 비교, 검토 하므로써 토양 및 수계의 특성을 감안한 독성치의 해석이 가능하게 될 수 있게 될 것이다.

본 연구에서는 우선 부식산을 가미한 독성시험방법의 확립과 국내에서 관심의 대상이 되는 diazinon, tetrabromobisphenol-A의 독성에 미치는 부식산의 영향에 대하여 실험하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 공 시 화 학 물 질

연구에 사용된 화학물질은 diazinon [0-(2-isopropyl-4-methyl-6) 0, 0-diethyl thiophosphate] 과 tetrabromobisphenol-A(이하 TBP)의 2종 이었다. Diazinon은 유기인계 살충제로 출하량이 많고 (451, 779 kg, AI, 1989년)수용성은 40 ppm 이며, 수서무척추동물에 대한 급성독성이 크기 때문에<sup>(20)</sup> 선정되었고, 한국화학연구소 농약활성연구실에서 95.4%의 원제를 분양 받아 사용하였다. TBP는 방염제로 사용되는 산업용 화학물질로 어류에 대한 급성독성이 높고, 물/옥타놀 분배계수치가 높고, 미생물에 의한 분해가 어렵기 때문에<sup>(21)</sup> 선정하였다. 시험에 사용된 TBP는 이스라엘에서 수입된 (Lot No. 9107)것으로 국도 화학에서 분양 받았다.

독성 시험시 화학물질은 유기용매인 DMSO (dimethyl sulfonoxide, Merck사)에 녹이고, 계면 활성제인 HCO-40(일광 Chemical, 일본)을 첨가한 후, 증류수로 희석하여 처리농도별 시험용액을 조제하였고, 각 농도에 들어가는 첨가제(DMSO+HCO-40)의 양은 OECD지침서<sup>(22)</sup>에 따라 100 mg/L를 넘지 않도록 하였다.

### 2. Dissolved humic materials (DHM)의 조제

연구에 사용된 humic acid(이하 HA)는 Aldrich Chemical Co. 제품 (sodium salt) 으로 토양에서 추출한 HA로 보고 되어 있다.<sup>(2)</sup> 독성 시험시 사용한 DHM은 Aldrich-HA 1 g 을 증류수 1 L에 녹이고, 9,050 x g에서 45분간 원심 분리 시킨 후 A/E 형 glass fiber 여지(Gelman Sci., pore size 1  $\mu$ m)를 통과시켜 입자를 제거한 후 사용하였고,<sup>(23)</sup> 처리 농도는 기존의 문헌<sup>(16)</sup>에 따라 무처리, 0.5, 5, 50 mg/L 으로 처리하였다.

### 3. 급성 독성 시험

#### 가. 공시생물

##### (1) 송사리(Oryzias latipes)

본 시험에 사용된 송사리는 일본산 송사리로 본실험실 사육실(사육조건 : 수온 24~26 °C, 광조건 14시간, 암조건 10시간)에서 계대 사육중인 개체중에서 부화후 6개월 이상된 성체를 독성시험 24시간 전에 선발하여 독성 시험실에서 순화시키면서 절식시켰다. 시험에 사용된 어류의 크기는 체중 0.12~0.25 g 내외, 체장 2.4~3.1 cm 였다. 그리고 공시어를 사육하고 독성 시험에 사용한 회석수는 수도물을 1차로 membrane filter(10 $\mu$ ) 를 통과시킨 후, 활성탄으로 충전한 여과장치를 통과시켜 이물질과 잔류염소를 제거하였다.

수질특성은 전기전도도 95  $\mu$ MHO, 전 alkalinity 25.8 mg/L CaCO<sub>3</sub>, 경도 52.4 mg/L CaCO<sub>3</sub>, 전 NH<sub>3</sub>-N 0.02 mg/L 이하, pH 6.5 이었다.

##### (2) 물벼룩

영국 Shell Research Ltd. 에서 분양받아 계대사육 중인 D. magna 에서 24시간 미만의 어린 물벼룩을 모아 시험에 공시하였다. 물벼룩의 사육 조건은 water bath 에서 수온 20~20.4 °C, 광조건 16시간, 암조건 8시간에서 미국 EPA에서 제시된 방법<sup>(24)</sup>에 따라 사육용액을 만들어 사육하였다. 사육 용액의 수질은 경도 170 mg/L CaCO<sub>3</sub>, pH 8.4~8.5 이며, 먹이는 Scenedesmus subspicatus 를 순수배양하며 매일 1x10<sup>5</sup> cells/ml의 비율로 공급하였다.

#### 나. 급성 독성 시험

송사리에 대한 노출농도는 기존의 문헌<sup>(25)</sup>을 참고하여 노출농도를 대수 등간격으로 설정하였고, 물벼룩에 대한 노출농도는 TBP의 경우는 0.01 mg/L ~10 mg/L 농도에서 예비시험하여 무작용 농도인 1.0 mg/L와 100% immobility 농도인 10 mg/L 사이에서 대수 등간격으로 설정하였고, diazinon의 경우는

기존의 결과<sup>(20)</sup>를 참고하여 설정하였다.

송사리에 대한 시험은 2 L 원형 유리수조에 희석수를 넣고, 설정한 노출농도에 따라 앞에서 조제한 시험용액과 DHM 용액을 일정량 가한 후, 2 L 표선까지 희석수로 맞추고 잘 저어준 후, 2시간 후에 준비된 송사리를 6마리씩 무작위로 공시하였다. 치사판정은 아가미 호흡이 중단된 것을 치사한 것으로 간주 하였고, 발견 즉시 제거하였다. 관찰은 24시간마다 하였고 결과의 분석은 Moving Average-Angle 법<sup>(24)</sup>에 의하여 LC50 값과 95% 신뢰한계를 구하였다.

물벼룩에 대한 시험은 100 ml crystallizing dish 에 먼저 일정량의 사육용액을 넣고 처리농도에 따라 시험용액과 DHM 용액을 일정량 투여한 다음, 사육용액으로 100 ml 표선까지 맞춘 후, 2시간 후에 미리 선발된 물벼룩을 10마리씩 공시하였다. 관찰은 24시간마다 유리봉으로 저어준 후 유영능력을 상실한 것과 치사한 것을 합해 48시간 EC50 값을 위와 같은 방법으로 구하였다.

그리고 독성시험은 송사리, 물벼룩 공히 3회 반복 실시하였다. 또한 송사리와 물벼룩 공히 시험용액 조제시 용매와 계면활성제를 사용한 경우는 대조군을 2개 설치하여 한 대조군에는 시험물질별로 가장 높은 농도에 들어가는 양의 용매 및 계면활성제를 처리하였다.

시험기간 동안 수온과 용존산소, pH 를 매일 측정한 바, 송사리의 시험조건은 수온 24~26 °C, 용존산소 4.5~7.5 mg/L, pH 6~8, 광조건 16시간, 암조건 8시간이었으며, 물벼룩은 수온 20 °C 내외, 용존산소 7~8 mg/L, pH 8.1~8.4, 광조건 16시간, 암조건 8시간이었다. 시험기간 동안은 먹이와 공기를 공급하지 않았고, 시험용액의 교환없이 96시간 (송사리)과 48시간 (물벼룩) 노출시켰다.



### (1) 추출방법

추출시 사용한 용매는 에칠 아세테이트로 일본 Junsei제품의 특급 시약을 사용하여 3회 반복 추출한 후, 감압 농축하여 GC 시료로 하였다. 물에서의 TBP의 회수율 시험은 1 ppm과 0.1 ppm 두농도에서 수행하였으며, 시험방법은 물에 녹인 TBP 용액 10 ml을 취하여 에틸 아세테이트 10 ml로 2분간 3회 반복 추출한 후 감압농축하여 GC 시료로 하였다.

### (2) 기기 및 분석조건

가스 크로마토그래프는 Varian사 모델 3700을 사용하였으며, 분석 조건은 다음과 같다.

검출기 : ECD

칼럼 : 30 m DB-1 fused silica capillary (0.25 mm I.D.)

온도 : 칼럼 : 270 °C

주입구 : 300 °C

검출구 : 320 °C

담체가스 : 질소 : 50 ml/min

다. DHM

시험용액내의 각 농도별(0.5, 5, 50 mg/L) DHM의 농도는 어류의 치사가 없는 저농도에서 매일 시료 50 ml을 취하여 336 nm에서 Spectrophotometer (Shimadzu UV-265)로 측정하여<sup>(15)</sup>, 미리 작성된 검량선에서 농도를 구하였다. 이때 각 DHM 농도의 흡광도에서 대조군의 흡광도를 뺀 값으로 농도를 읽었다.

DHM의 검량선은 앞에서 조제한 DHM용액을 이용하여 10, 20, 50, 80, 100mg/L의 용액을 만들어 50 mg/L 농도 측정용 검량선을 작성하였고, 이 용액들을 10배 및 100배씩 희석하여 5mg/L 및 0.5mg/L의 검량선을 각각 작성하였다.

## 5. 독성시험 결과의 분석

DHM의 처리에 따른 diazinon 및 TBP의 독성 변화는 3회 반복 시험한 급성 독성값은 다음의 식<sup>(24)</sup>에 따라 서로 유의성을 검정한 후, 반복 시험값간에 유의성이 없으면 3반복을 하나의 처리로 묶어 전체적인 급성독성값을 구하였다. 따라서 DHM의 처리에 따른 독성 변화 여부는 이를 독성값을 다시 통계적으로 유의성을 검정하여 유의차가 있는 경우, DHM의 영향이라고 판단하였다.

$$G = \sqrt{\left[ \log_{10} \frac{UL(1)}{LC50(1)} \right]^2 + \left[ \log_{10} \frac{UL(2)}{LC50(2)} \right]^2}$$

여기서

$$H = 10^G$$

$$Z = \frac{\text{Larger LC50}}{\text{Smaller LC50}}$$

$Z > H \longrightarrow$  LC50값은 유의적 차이가 있음

$Z < H \longrightarrow$  LC50값은 유의적 차이가 없음

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 시험물질의 농도 변화

##### 가. Diazinon

시험물질인 diazinon의 회수율 시험 결과는 다음 표 2-1과 같고 대표적인 크로마토그램은 그림 2-1과 같다.

표 2-1. Diazinon의 회수율 시험 결과

처리농도 (ppm)	측정농도 (ppm)	회수율(%)
2.0	1.91 ± 0.25	95.5

시험 용액내의 diazinon 농도 변화는 그림 2-2에서 보는 바와 같이 시험시작 당일에는 목표 농도인 3.6 mg/L 수준이 유지 되고 있으나, 48시간 이후에는 초기 농도의 69%~73%으로 감소되었으며, 시험종료시에는 초기 농도의 62%~67% 수준으로 감소되었다. 따라서 독성 시험 기간 동안 시험용액 내의 diazinon의 농도는 OECD의 권고 수준인 80% 수준을 유지시키지 못하였으나, 본 연구의 목적이 diazinon의 독성에 대한 DHM의 영향 유무를 밝히는 데 있기 때문에 그림 2-2에서 보는 바와 같이 DHM 4개 처리 수준에서 diazinon의 농도 변화가 없으므로 결과의 해석에는 무리가 없을 것으로 사료된다.

##### 나. Tetrabromobisphenol-A (TBP)

TBP의 회수율 시험 결과는 다음 표 2-2와 같고, 대표적인 크로마토그램은 다음 그림 2-3과 같다.

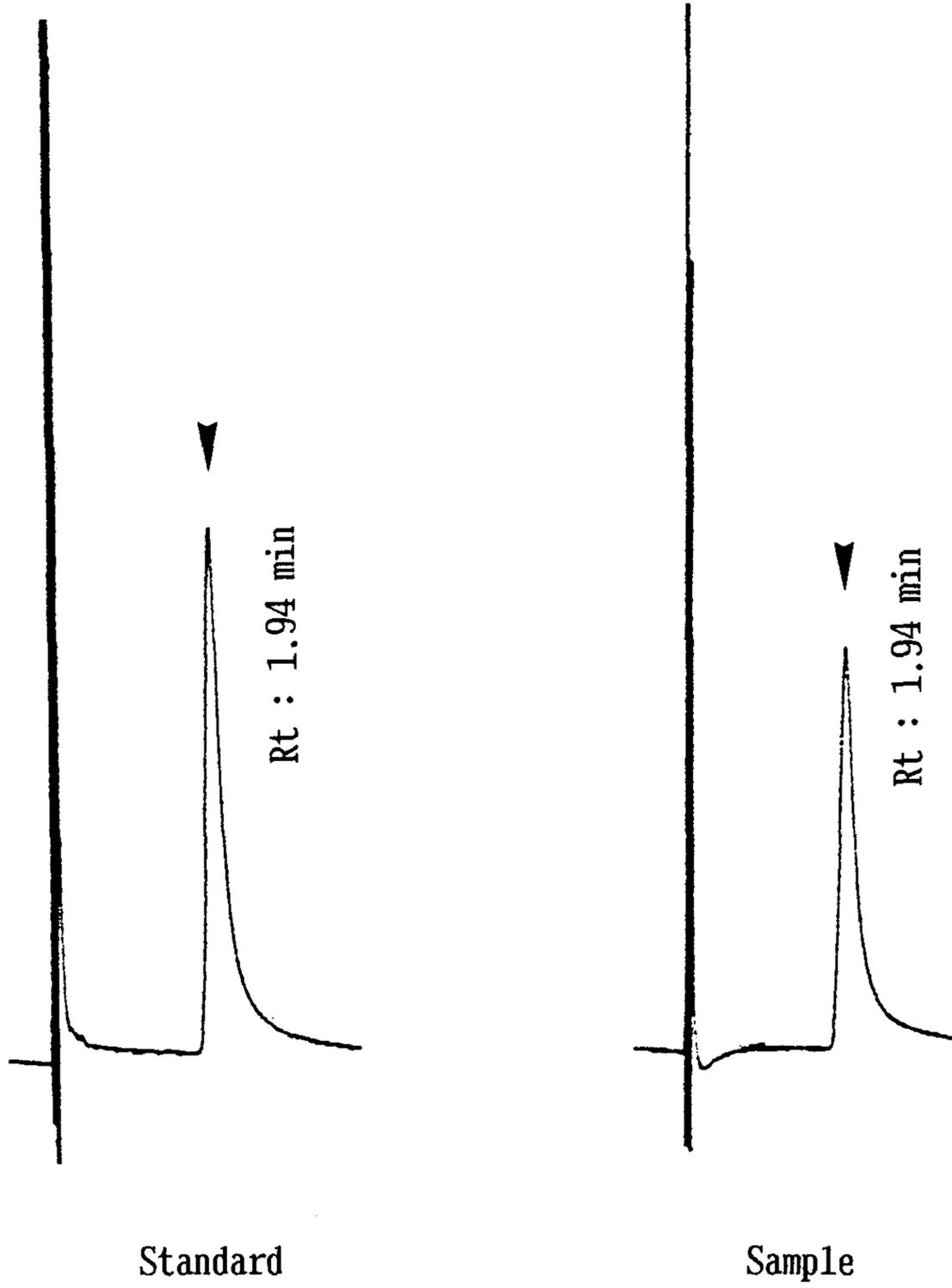


그림 2-1. Diazinon의 대표적 크로마토그램 (1.82 ppm)

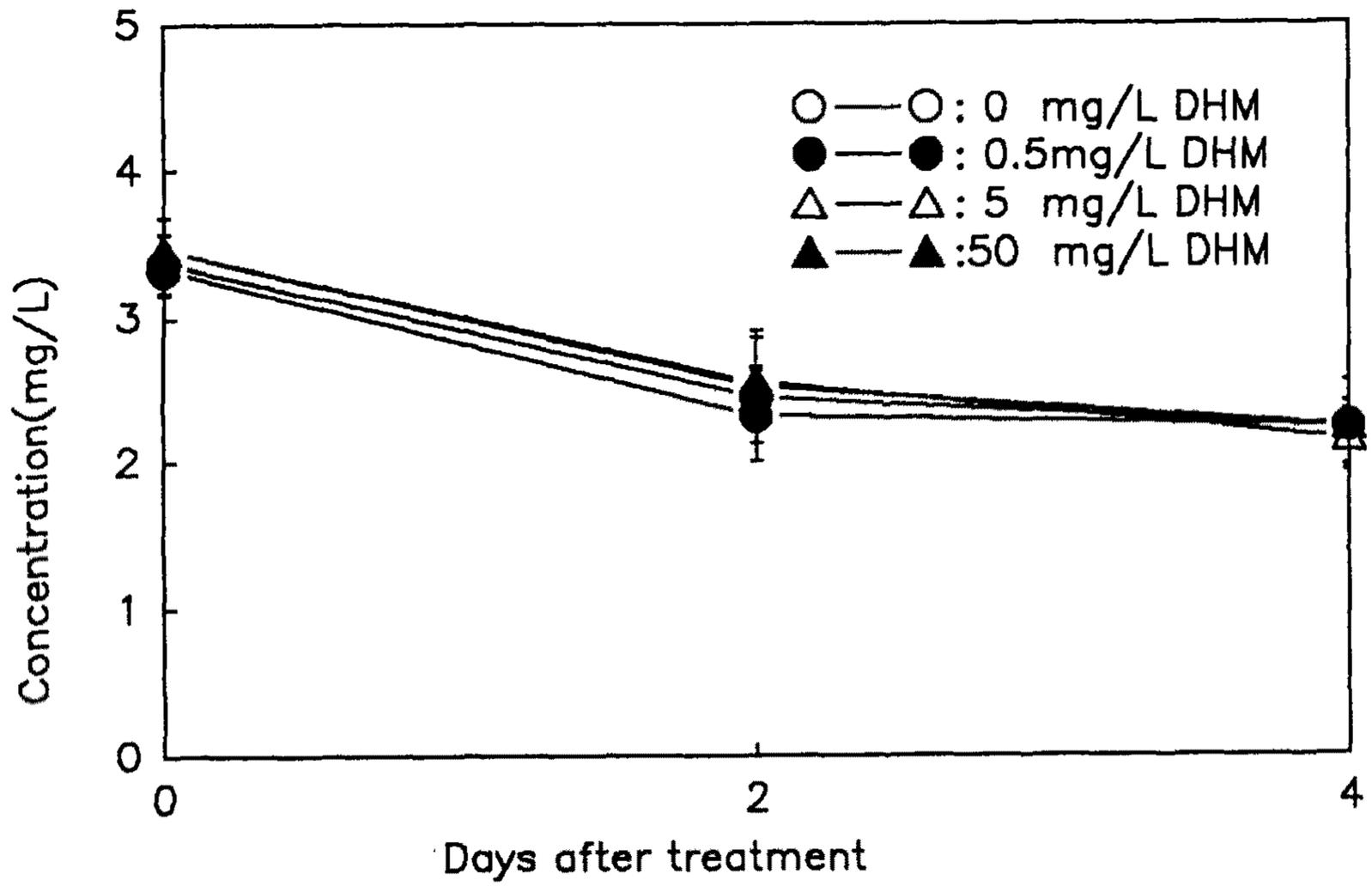


그림 2-2. Diazinon 독성시험기간 동안 각 dissolved humic materials (DHM) 농도별 diazinon의 농도변화

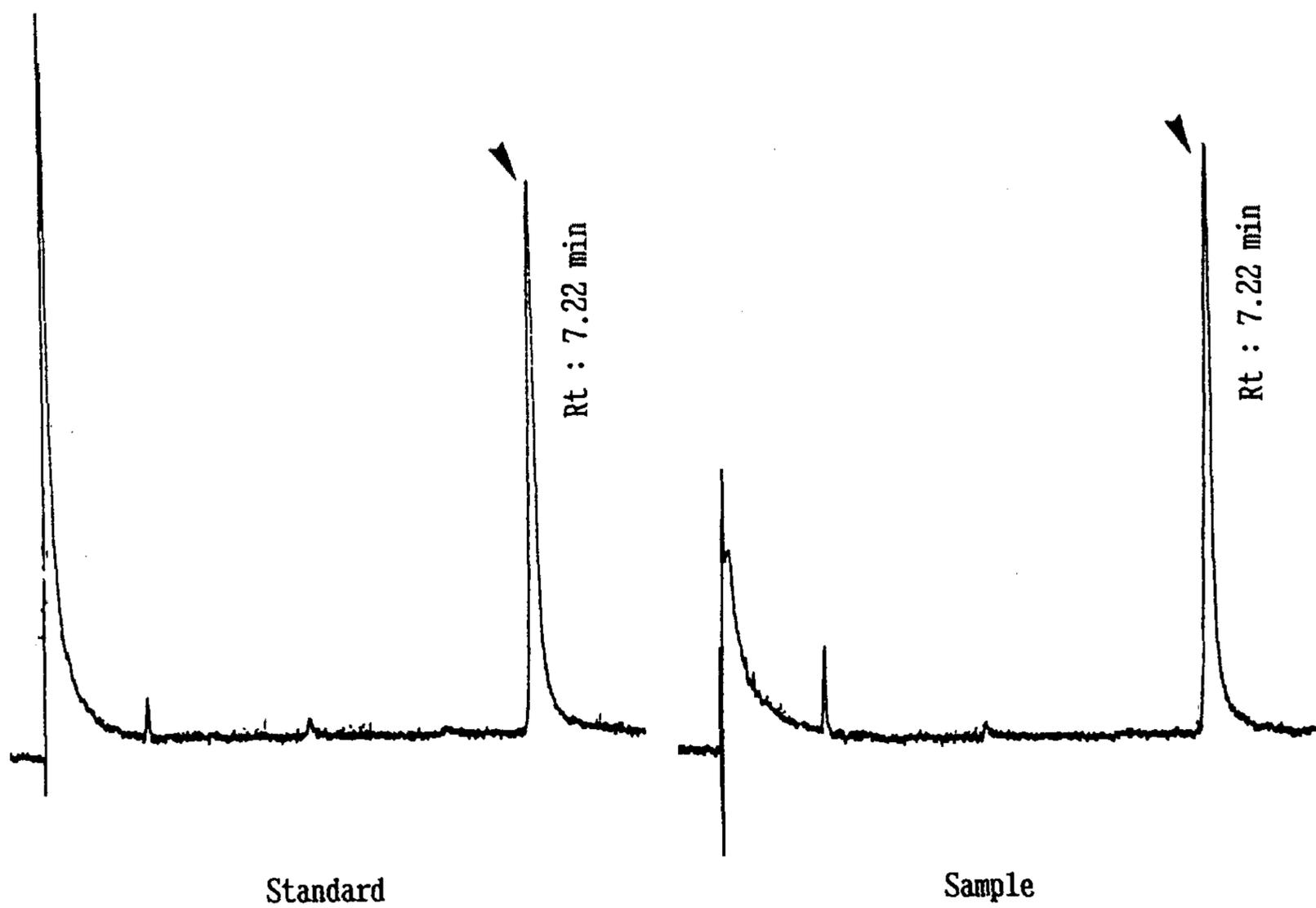


그림 2-3. Tetrabromobisphenol-A(TBP)의 대표적 크로마토그램 (1.5 ppm)

표 2-2. TBP의 회수율 시험 결과

처리농도	회수율, %
1.0 ppm	89.7 ± 2.9
0.1 ppm	109 ± 20

시험용액내 TBP의 농도 변화를 분석한 결과에 의하면 (표 2-3), TBP 농도는 시험시작 24시간 후에 초기 농도의 약 36%~61% 수준에 이르고, 48시간 후에는 19%~27% 수준에 이르렀으나, 72시간 후에는 다시 증가하였고, 4일 후에는 TBP 농도의 증감이 처리에 따라 교차하였으나, 반복간 차이가 많았기 때문에 단언하기 어렵다. 그런데 이와 같이 물 속에서 TBP의 농도가 빠르게 소실되는 사실은 상당히 예외적인 것으로 일반적인 TBP의 미생물에 의한 분해성은 낮은 것으로 알려져 있기 때문에<sup>(21)</sup> 다른 경로에서의 분해 또는 흡착 가능성에 대하여 검토해 보아야 할 것이다. 또한 DHM을 처리하지 않은 시험용액에서 TBP의 농도가 처리한 용액에서의 TBP 농도 보다 유의하게 높은 이유는 DHM

표 2-3. 시험용액내 tetrabromobisphenol-A(TBP)의 농도 변화

Treatment	Concentration (mg/L)				
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day
0mg/L DHM	1.38 ± 0.11	0.53 ± 0.16	0.26 ± 0.07	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.31
0.5mg/L DHM	1.04 ± 0.20	0.63 ± 0.05	0.25 ± 0.008	0.50 ± 0.02	0.15 ± 0.14
5mg/L DHM	1.11 ± 0.02	0.40 ± 0.09	0.25 ± 0.002	0.50 ± 0.02	0.15 ± 0.18
50mg/L DHM	1.02 ± 0.17	0.48 ± 0.09	0.28 ± 0.12	0.61 ± 0.04	0.66 ± 0.11

이 TBP의 회수율에 영향을 주지 않았나 생각되므로 추후에 DHM을 처리한 경우의 TBP 회수율 시험에 의하여 확인되어야 할 것이다.

다. Dissolved humic materials (DHM)

DHM을 처리한 시험용액에서 시험기간동안 DHM의 농도를 분석하기 위한 표준곡선은 각 농도(0.5, 5, 50 mg/L DHM)별로 그림 2-4, 2-5, 2-6 과 같다.

시험용액에서의 DHM의 농도는 diazinon 과 TBP 공히 시험기간인 4일 동안 농도가 거의 일정하게 유지되고 있음을 알 수 있었다.(그림2-7,그림2-8)

2. Dissolved humic materials (DHM)이 diazinon과 TBP의 독성에 미치는 영향

Diazinon의 송사리에 대한 96시간 급성독성시험 결과를 보면 다음 표 2-4, 그림 2-9와 같다.

시험결과에 의하면 DHM을 처리하지 않은 급성독성값과 DHM을 0.5mg/L, 5mg/L, 50mg/L 처리한 급성독성값간에는 유의할 만한 차이를 보여주지 않았으므로 본 처리수준의 DHM은 diazinon의 급성독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

표 2-4. Dissolved humic materials 처리에 따른 diazinon의 송사리에 대한 96시간 급성독성값.

DHM (mg/L)	96hr-LC50 (mg/L) (95% confidence limit)	Significance
0	6.54*(5.86-7.41)	-
0.5	6.58 (6.08-7.19)	NS**
5	6.50 (5.86-7.30)	NS
50	5.99 (5.24-7.05)	NS

\* Data from three replicates

\*\* Not significantly different from control (0 mg/L)

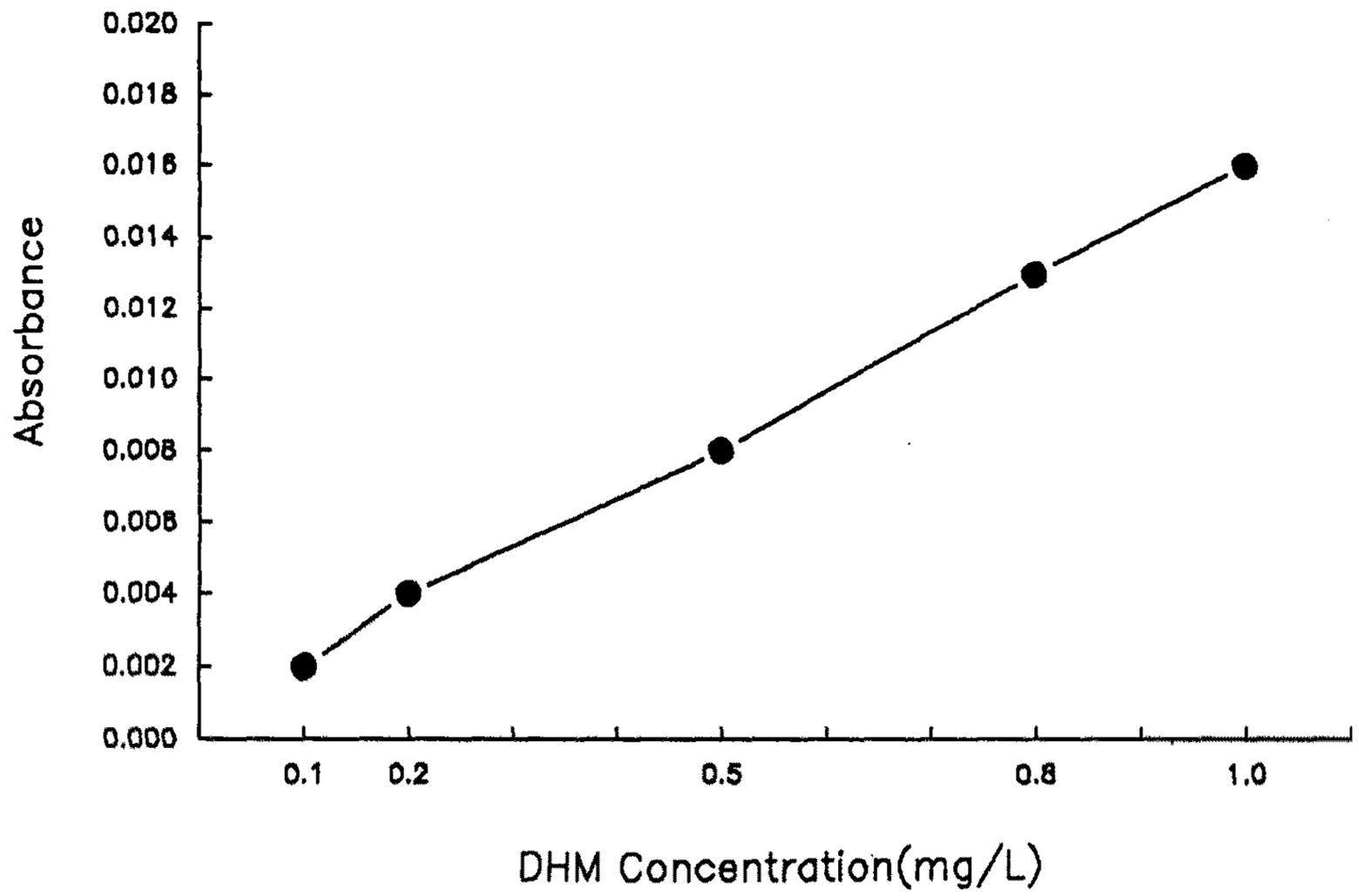


그림 2-4. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선  
- 0.5 mg/L DHM

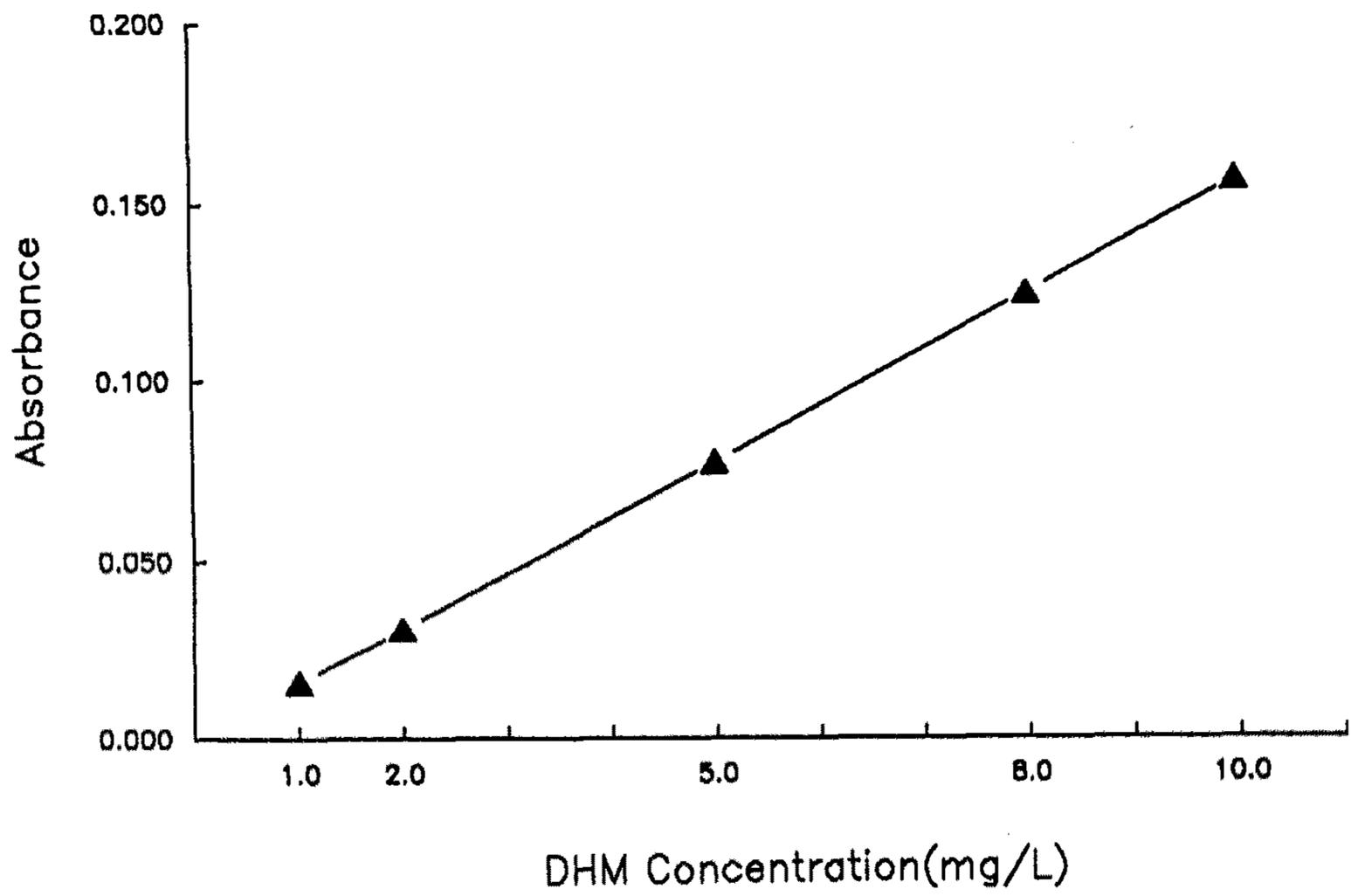


그림 2-5. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선  
- 5 mg/L DHM

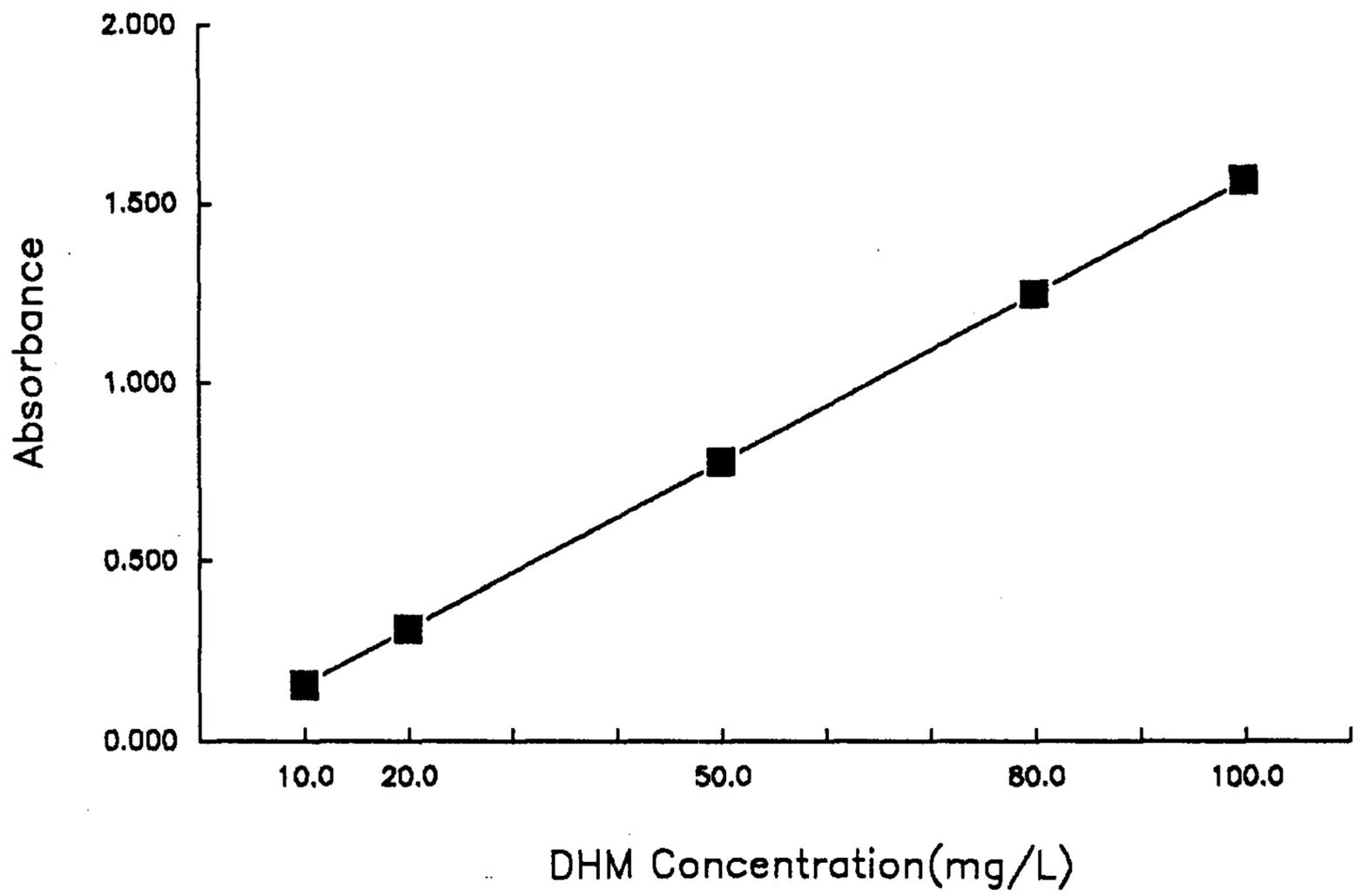


그림 2-6. Dissolved humic materials(DHM)의 표준 곡선  
- 50 mg/L DHM

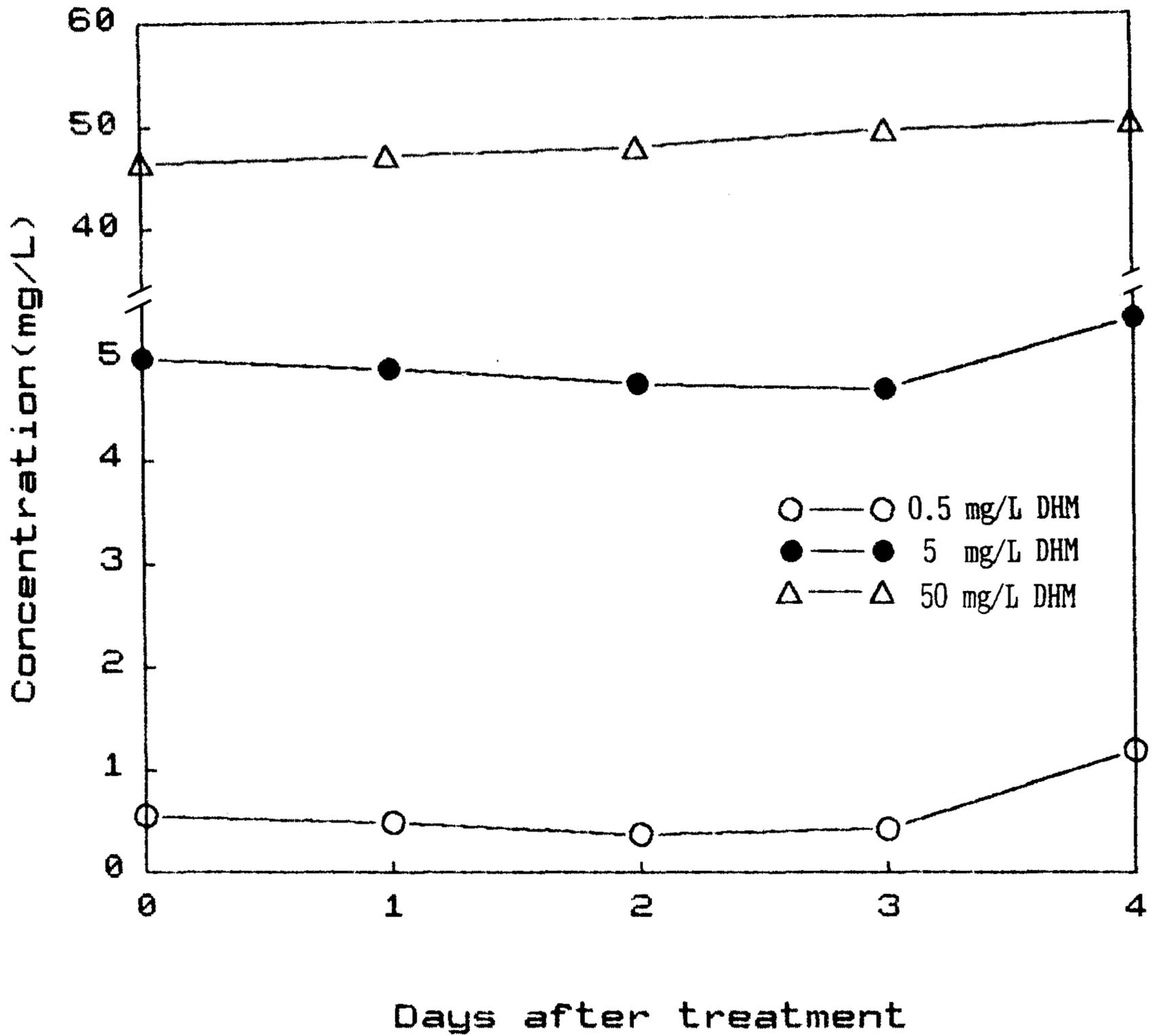


그림 2-7. Diazinon 독성시험에 있어서 DHM 농도의 변화

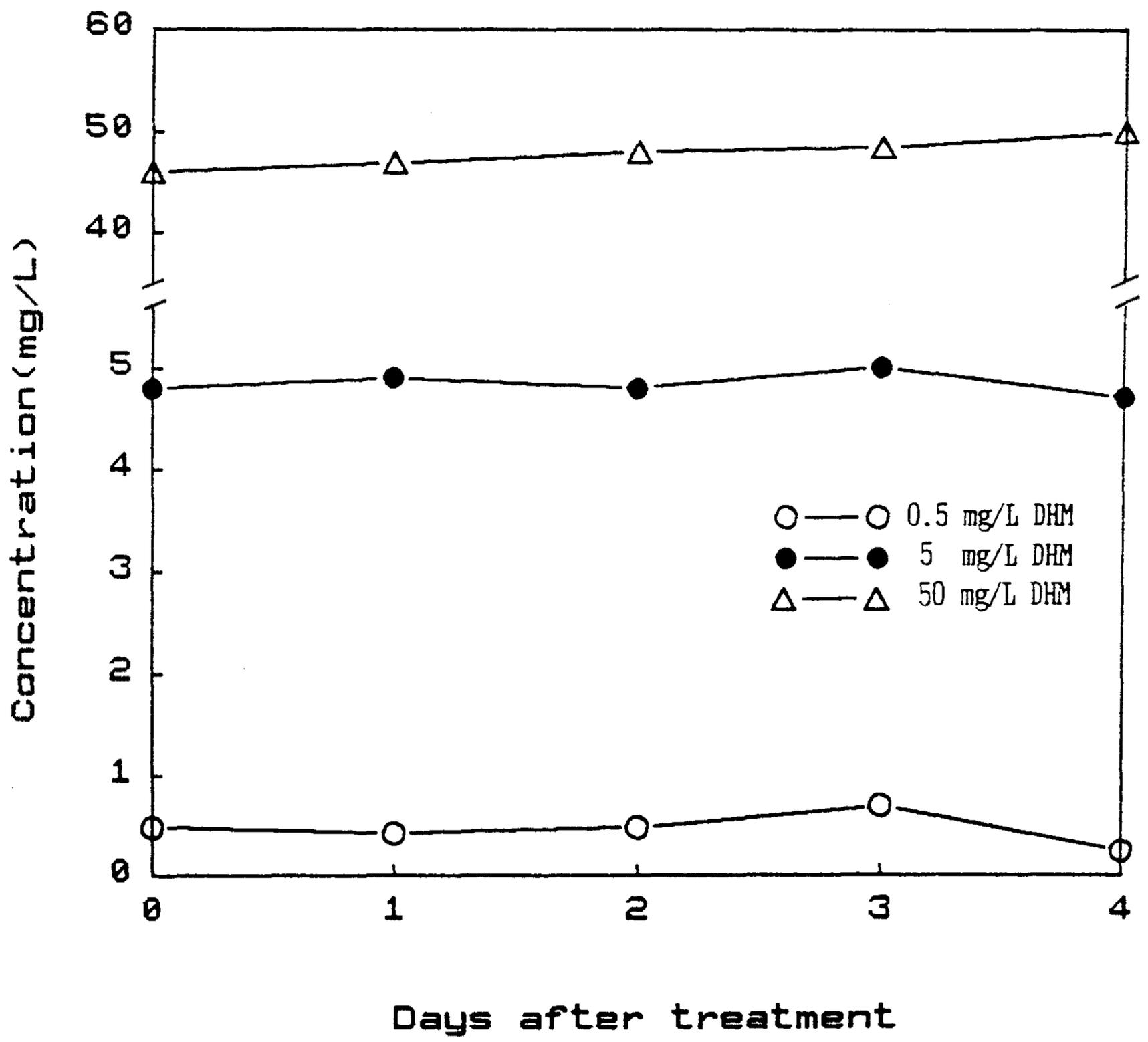


그림 2-8. TBP 독성시험에 있어서 DHM 농도의 변화

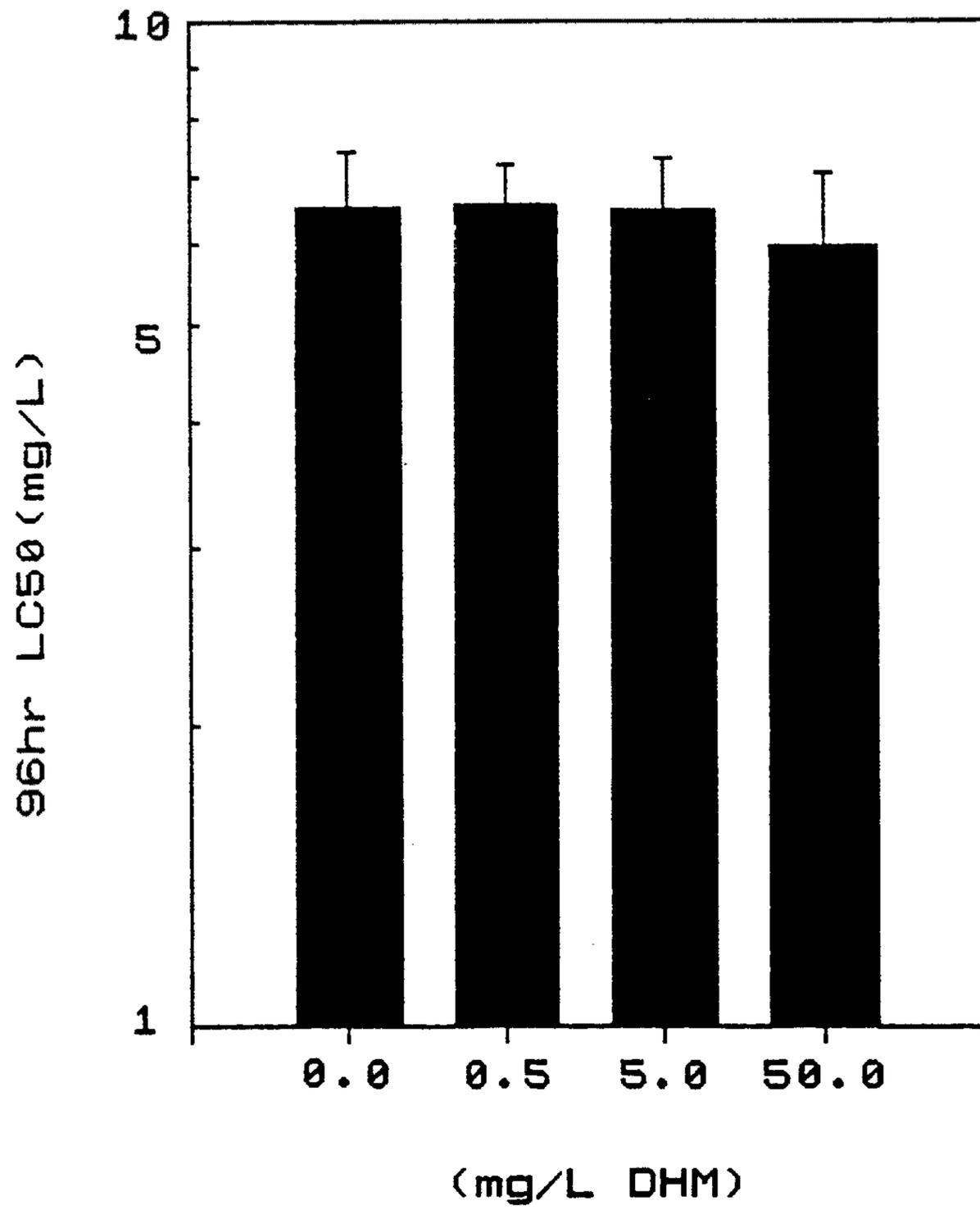


그림 2-9. DHM 처리별 diazinon의 96 시간 급성독성값과 95 % 신뢰구간

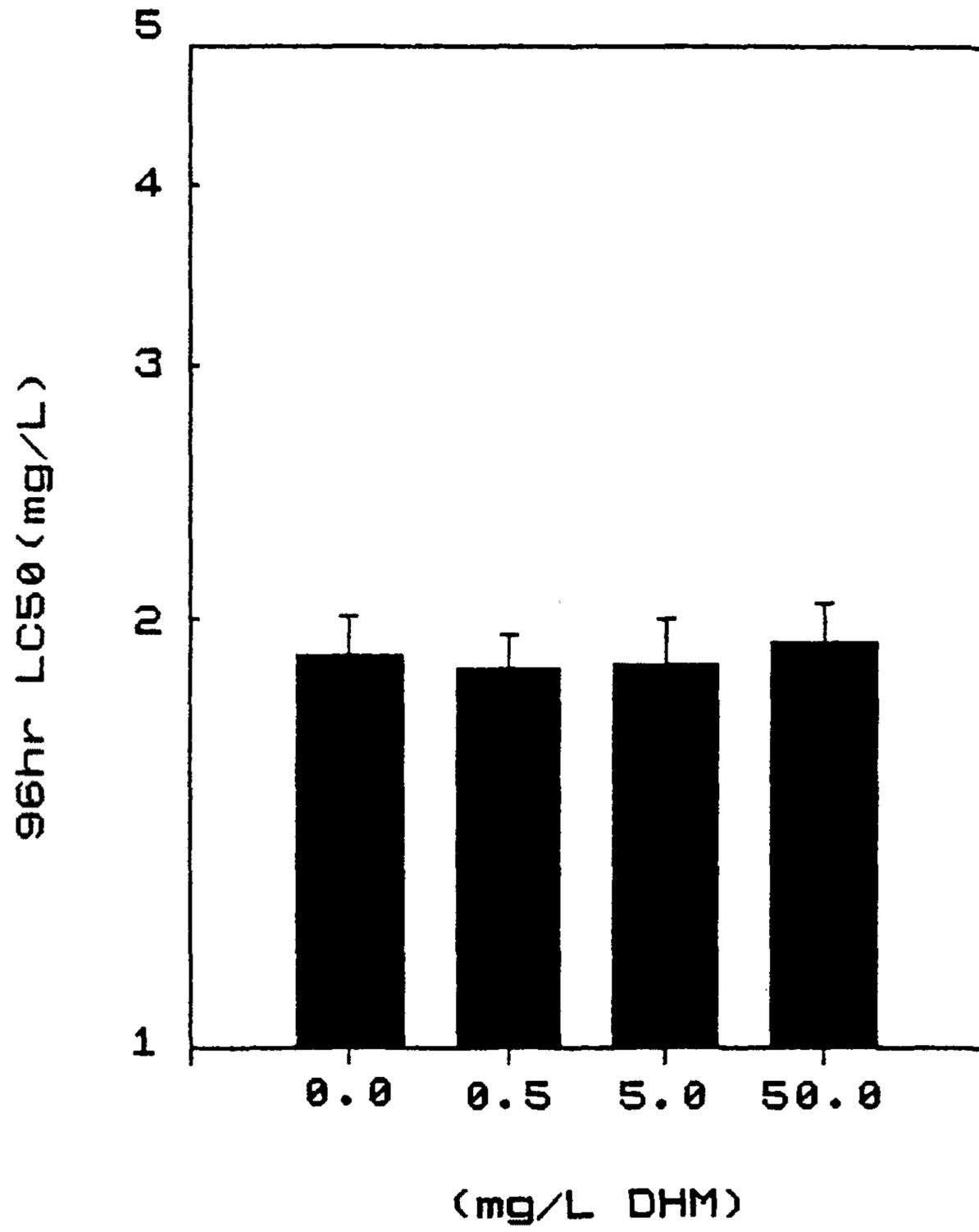


그림 2-10. DHM 처리별 TBP의 96 시간 급성독성값과 95 % 신뢰구간

TBP의 송사리에 대한 96시간 급성독성값을 보면 표 2-5와 그림 2-10과 같다. TBP의 경우도 DHM을 처리하지 않은 값과 DHM을 0.5 mg/L, 5 mg/L 및 50 mg/L로 처리한 값을 비교해 보면, DHM 처리로 인한 급성 독성값의 변화를 인정할 수 없었다. 따라서 본 처리 수준에서의 DHM 농도는 TBP의 독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

표 2-5. Dissolved humic materials 처리에 따른 TBP의 송사리에 대한 96시간 급성독성값.

DHM (mg/L)	96hr-LC50 (mg/L) (95% confidence limit)	Significance
0	1.89* (1.77-2.01)	-
0.5	1.85 (1.73-1.95)	NS**
5	1.86 (1.72-2.00)	NS
50	1.93 (1.80-2.05)	NS

\* Data from three replicates.

\*\* Not significantly different from control (0 mg/L)

그런데 일반적으로 물속에 존재하고 있는 DHM은 물속에 있는 소수성(hydrophobic) 유기화학물질들과 결합 또는 흡착하여 화학물질의 수용성을 크게 하거나 '2', 생물이용성(bioavailability)을 낮춤으로써 어체내로의 화학물질의 흡수가 줄어 독성이 낮아 진다고 알려져 있다. (26)

즉 Ortego 와 Benson이 연구한 결과에 따르면 DHM 50 mg/L와 100mg/L 처리가 fenvalerate 와 permethrin 의 독성을 변화(감소) 시켰으며, 독성변화의 정도는 DHM의 종류에 따라 다르다. 즉 Aldirch-HA 는 aquatic-HA 또는 aquatic HA 또는 fulvic acid 보다 독성에 더 크게 영향 하며, 동일한 pyrethroid 농약이라고 하더라도 그 구조의 차이로 인하여 DHM과의 상호작용이 서로 다르게

나타난다.<sup>(26)</sup> 또 Benson 과 Long<sup>(27)</sup>에 따르면 HA는 azinphos-methyl, chlorpyrifos의 독성을 감소시켰으나, 반면에 methyl parathion 과 carbaryl의 독성은 증가 시켰다. 그리고 carbofuran의 경우도 낮은 HA 농도 (0.5 와 5.0 mg/L)에서 독성이 감소하였으나, 50 mg/L 와 100 mg/L 농도에서는 유의한 변화가 없었다. 따라서 HA 와 농약의 독성발현에는 농약의 특성에 따라 독성이 증가 또는 감소 되는 현상이 나타나는 것으로 믿어진다. 그리고 Fan 등<sup>(28)</sup>은 HA 가 Daphnia magna에 대한 fenvalerate 의 독성을 크게 낮췄으나 (0.82  $\mu$ g/L  $\rightarrow$  3.32  $\mu$ g/L), methoprene의 경우에는 독성이 다소 감소되었으나, 통계적으로 유의한 수준은 아니며, Day<sup>(23)</sup>는 pyrethroid 계 농약 (deltamethrin, fenvalerate, cyhalothrin)의 독성은 HA 농도가 증가함에 따라 감소한다고 하였다.

일반 화학물질의 독성과 HA 의 관계에 대해선 Kukkonen 과 Oikari<sup>(17)</sup>는 2,4,6 - trichlorophenol 의 독성이 HA 존재하에서 약 34% 정도 감소하였으나, H-dehydroabiatic acid의 독성은 HA 존재하에서 오히려 크게 증가하며, methyl-parathion의 독성은 HA 존재하에서 변화가 없다고 보고한 바 있으며, Oris 등<sup>(19)</sup>은 HA 가 anthracene 의 fathead minnow 와 Daphnia 에 대한 급성독성을 감소시켰다고 하였다.

그러므로 위와 같은 기존의 연구 결과들을 정리해보면, 화학물질의 수생생물에 대한 독성에 미치는 DHM의 영향은 일률적으로 작용하는 것이 아니고, 화학물질의 구조적 특성 및 이화학적 특성에 따라서 독성을 감소시키는 경우, 영향이 없는 경우, 독성을 증가시키는 경우 등으로 나눌수 있다고 생각된다. 따라서 본 연구에서 사용한 diazinon 과 TBP 의 어류에 대한 독성은 DHM에 의하여 영향을 받지 않는 물질이라고 판단되나, 이러한 현상학적 결과를 설명해 줄 수 있는 연구들 즉, HA와 시험물질들과의 흡착정도, 시험물질의 생물이용성(bioavailability) 또는 생체축적성에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

그 외에 이러한 독성시험에 사용되는 공시생물에 따른 결과의 차이에 대해서도 유의해야 하는바, 위에서 언급한 대부분의 연구에서 사용된 독성 측정 수단은 미생물인 photobacterium 와 daphnids가 주종을 이루며, 어류의 경우도 치어를 사용하고 있다.

따라서 본 연구에서도 현재 수행되고 있는 daphnids 에 대한 시험결과가 나오면, 이러한 관련성들이 다소 밝혀 질 것으로 사료된다.

## 제 4 절 결 론

Diazinon과 TBP의 송사리에 대한 급성독성시험 결과, 96시간 LC50값들은 DHM 처리에 따른 영향이 인정되지 않았다. 따라서 송사리에 대한 연구 결과만으로 볼 때 DHM은 diazinon과 TBP의 어독성에 영향을 주지 않는 것으로 판단되나, 현재 진행되고 있는 물벼룩 (*Daphnia magna*)에 대한 연구 결과가 나올 때까지는 단정적 결론은 유보되어야 할 것이다. 그리고 이러한 독성시험 결과들을 설명해 줄 수 있는 DHM과 화학물질의 흡착관계, 생물이용성 (bioavailability) 또는 생물 축적에 관한 연구가 앞으로 추진되어야 DHM과 화학물질과의 상호관계가 명확히 규명되어 본 연구가 추구하는 목표가 달성될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. McCarthy, J. F. and B. D. Jimenez. 1985. Interactions between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dissolved Humic Material : Binding and dissociation, *Environ. Sci. Technol.* 19, 1072-1076.
2. Chiou, C. T., R. Malcolm, T. Brinton and D. Kile. 1986. Water Solubility Enhancements of Some Organic Pollutants and Pesticides by Dissolved Humic and Fulvic Acids. *Environ. Sci. Technol.* 20, 502-507.
3. Carter, C. W. and I. H. Suffet. 1982. Binding of DDT Dissolved Humic Materials, *Environ. Sci. Technol.* 16, 735-740.
4. Stackhouse, R. A. and W. H. Benson. 1988. The Influence of Humic Acid on the Toxicity and Bioavailability of Selected Trace Metals. *Aquat. Toxicol.*, 13, 99-108.
5. Cranston, R. E. and J. W. Murray. 1980. Chromium Species in the Columbia River and Estuary. *Limnol. Oceanogr.* 25, 1104-1112.
6. Giesy, J. P. and J. J. Alberts. 1982. Trace Metal Speciation : The Interaction of Metals with Organic Constituents of Surface Waters. *Workshop Proceedings : the Effects of Trace Elements on Aquatic Ecosystems*, March 23-24, Raleigh, NC. pp. 1-31.
7. Carter, C. W. and I. H. Suffet. 1983. Interactions between Dissolved Humic Acid and Fulvic Acids and Pollutants in Aquatic Environments. *ACS Symposium Series 225. In : Fate of Chemicals in the Environment.* (R. L. Swann and A. Eschenroeder eds.)
8. Kukkonen, J., J. F. McCarthy and A. Oikari. 1990. Effects of XAD-8

- Fractions of Dissolved Organic Carbon on the Sorption and Bioavailability of Organic Micropollutants. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19, 551-557.
9. Thurman, E. M. and R. L. Malcolm. 1981. Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, Environ. Sci. Technol., 15, 463-466.
  10. Landrum, P. F., S. R. Nihart, B. J. Eadle, and W. S. Gardner. 1984. Reverse-Phase Separation Method for Determination Pollutants Binding to Aldrich Humic Acid and Dissolved Organic Carbon of Natural Waters, Environ. Sci. Technol. 18, 187-192.
  11. Landrum, P. F., M. D. Reinhold, S. R. Nihart, and B. J. Eadle. 1985. Predicting the Bioavailability of Organic Xenobiotics to Pontoporeia hoyi in the Presence of Humic and Fulvic Materials and Natural Dissolved Organic Matter, Environ. Toxicol. Chem. 4, 459-467.
  12. Winner, R. W. 1984. The Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium and Copper As Affected by Humic Acid, Aquat. Toxicol. 5, 267-274.
  13. \_\_\_\_\_ . 1986. Interactive Effects of Water Hardness and Humic Acid on the Chronic Toxicity of Cadmium to Daphnia pulex. Aquat, Toxicol. 8, 281-293.
  14. Winner, R. W. and J. D. Gauss. 1986. Relationship between Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Copper, Cadmium, and zinc As Affected by Water Hardness and Humic Acid. Aquat. Toxicol. 8, 149-161.
  15. Witters, H. E., S. V. Puymbroeck, J. H. D. Vangenechter and O. L. J. Vanderborcht, 1990. The Effects of Humic Substances on the Toxicity of Aluminium to Adult Rainbow Trout, Oncorhynchou mykiss (Walbaum),

- J. fish Biol., 37, 43-53.
16. Stackhouse, R. A. and W. H. Benson. 1989. The Effects of Humic Acid on the Toxicity and Bioavailability of Trivalent Chromium, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 17, 105-111.
  17. Kukkonen, J. and A. Oikari. 1987. Effects of Aquatic Humus on Accumulation and Acute Toxicity of Some Organic Micropollutants. *The Sci. of the Total Environ.*, 62, 399-402.
  18. Kukkonen, J., A. Oikari, S. Johnsen, and E. Gjessing. 1989. Effects of Humus Concentrations on Benzo(a)pyrene Accumulation from Water to Daphnia magna : Comparison of Natural Waters and Standard Preparations. *The Sci. of the Total Environ.*, 79, 197-207.
  19. Oris, J. T., A. T. Hall and J. D. Tylka. 1990. Humic Acids Reduce the Photo-Induced Toxicity of Anthracene to Fish and Daphnia. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 575-583.
  - 20 김용화 외 5인, 1991. 농약이 자연생태계에 미치는 영향 연구, 별책, 환경처
  21. 김용화 외 6인, 1989. 합성화학물질의 안전성시험 (II), 환경청
  22. OECD, 1984. OECD Guideline-Effects on Biotic Systems.
  23. Day, K. E. 1991. Effects of Dissolved Organic Carbon on Accumulation and Acute Toxicity of Fenvalerate, Deltamethrin and Cyhalothrin to Daphnia magna (Straus), *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 91-101.
  24. U. S. EPA, 1985. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms (3rd. ed.), EPA/600/4-85/013
  25. 신천철, 이성규, 노정구, 1988. 농약의 노출시간에 따른 급성어독성의 변화, *한국환경농학회지*, 7(2), 124-129.

26. Ortego, L. S. and W. H. Benson. 1991. Effects of Dissolved Humic Materials on the Toxicity of Selected Pyrethroid Insecticides.  
(In press)
27. Benson, W. H. and S. F. Long. 1991. Evaluation of Humic-Pesticide Interactions on the Acute Toxicity of Selected Organophosphate and Carbamate Insecticides, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 21, (In press)
28. Fan, G. T., K. R. Solomon and B. K. Burnison. 1990. The Effect of Natural Dissolved Organic Matter on Fenvalerate Toxicity to Daphnia magna, Soc. of Environ. Toxicol. Chem (SETAC) Poster Presentation, Arlington, Virginia, U. S. A.

## 제 3 장 화학물질의 선택적 어독성 및 비교 대사에 관한 연구

### 제 1 절 서 론

Diazinon 은 한국의 수도작에서 가장 많이 사용되는 살충제 중의 하나이다. Diazinon의 실험실적 독성시험에 의하면 미꾸리가 송사리에 비해서 약 14배 민감함을 강등<sup>(1)</sup>이 시사한 바 있고 이러한 현상은 본 연구가 진행중인 1986년 양등<sup>(2)</sup>에 의하여 재확인되었다. 양등에 의해서는 관행적인 살포에 의하여 논물에서 치사농도가 가능함을 증명한 바도 있다. 이러한 현상은 diazinon이 오랜기간 동안 논에서 광범위하게 사용되었을 때 미꾸리가 멸종될 수 있다는 것을 시사하고 있다. 이 문제는 diazinon의 문제에만 국한되는 것이 아니라 기존의 농약이나 새로이 개발되는 농약들에 대해서도 충분히 적용될수 있을 것이다. 문제의 근본 원인은 현재 한국의 농약 등록 체계가 오직 한개의 어종인 잉어만의 급성독성실험에 의하여 사용이 승인되는 데에 있다. 즉 1개 어종에 의하여 승인된 화학물질이 선택적 어독성으로 인하여 다른 어종에는 치명적인 영향을 준다면 이는 환경 생물 중의 민감종에 대한 보호책은 되지 못하여서 자칫 생태계의 균형을 손상시키는 결과를 초래하게 되는 것이다. 이러한 의미에서 환경 생물에 대한 화학 물질의 영향평가에 있어서는 실험대상 어류를 다양화할 필요성이 있으나, 수많은 화합물을 개발하는 단계에서 많은 어종에 대하여 독성을 일일이 평가한다는 것은 막대한 노력과 시간이 소요되므로 예비적으로 검색하는 방법을 통하여 환경에서 문제를 일으킬 가능성이 있는 화합물을 사전에 검색하는 체계가 필요하다. 그러므로 수많은 화학 물질이 개발되어지는 이 시점에서, 각 종들간의 선택적 독성의 메카니즘을 이해하고 어류에 대한 독성을 간단한 *in vitro* 방법으로 정확하게 예측할 수 있는 방법을 고안한다는 것은 보다

효율적인 화학물질 개발의 일익을 담당하는 작업이라 생각된다.

급성어독성과 생화학적인 지표들 - 흡수, 배설, 대사, 효소저해 - 과의 상관성에 관하여는 각기 다른 화합물과 다른 어종을 가지고 많은 연구가 되어 왔고 특히 살충제에 대하여는 상당한 연구가 진행되어 왔었다. 이 중에서 유기인계 및 카바메이트계 살충제의 주요한 중독작용 기작은 동물의 신경조직에서 acetylcholinesterase(AchE)의 저해에 의한 것이고, 이 화학물질의 산소 유도체가 더욱 더 독성이 강한것으로 알려져 있다<sup>(3)</sup>. 1972년 Yang 등은 쥐와 집파리의 간 마이크로솜 분획에서의 diazinon 대사에 관여하는 효소체계는 NADPH와 산소가 필요하며, 이로써 diazinon은 diazoxon으로 전환되고 궁극적으로는 diethylphosphorothioic acid와 diethylphosphoric acid로 가수분해 된다고 보고하였다<sup>(4,5)</sup>. 비록 어류에서의 독성과 대사에 대한 연구들은 많이 있다고 할지라도 유기인계 살충제와 독성과의 관계에 대한 노력은 거의 없었다. 그러나 Benke 등은 sunfish의 뇌와 근육조직으로 실험한 바, IC50를 측정하여서는 methyl parathion과 parathion의 20배 급성독성 차이를 설명할 수 없었고 methylparathion의 가수분해가 parathion보다 약 5배인 것으로 생체내의 해독대사 속도가 독성차이를 내게하는 요인으로 보고하였다<sup>(6)</sup>. 1982년 Wang 과 Murphy는 유기인계 농약으로 젓먹이동물을 포함한 수생생물의 AchE저해를 비교 연구하여 어종간의 AchE 민감도 차이는 인산화의 친화성과 반응속도에 따라서 다르다고 보고하였다<sup>(7)</sup>. 또한 1983년 Kanazawa는 담수어류인 잉어과에 속하는 Pseudorasbora parva를 이용하여 12개 유기인계 농약과 9개 카바메이트계 농약의 IC50를 측정하고 화합물에 따른 in vitro AchE활성의 저해도를 비교하였고, 이중 6개 농약에 대해서는 in vivo 시험에 의한 AchE 활성도와 생리적 효과에 대한 관찰을 행한 바 유의적인 관계가 없음을 보고하였다<sup>(8)</sup>. 한편 Glutathione(GSH)에 의존하여 가수분해되는 해독작용의

중요성이 sunfish와 생쥐에서 parathion과 methyl parathion의 독성차이를 설명해 주었다<sup>(6)</sup>. 1982년 Fujii와 Asaka는 담수어류와 해수어류간의 diazinon에 의한 독성차이의 원인이 주로 간의 cytochrome P-450양 차이에 의한 가수분해 활성 차이이기 때문이라고 주장하였으나 정량적인 상관관계에 대해서는 연구가 미흡하였다<sup>(9)</sup>.

이와같이 유기인계 및 카바메이트계 농약의 어류에 대한 선택적 급성독성을 생화학적으로 설명하기위한 비교연구는 단편적이어서 일괄하여 결론지을 수 없으나 주로 AchE에 대한 민감도의 차이, 대사경로의 차이, 흡수 및 배설의 차이로 요약될 수 있다. 이미 본 연구실에서는, AchE 저해도로 부분적으로나마 diazinon에 대한 두 어종의 민감도를 설명해줄 수 있었고 마이크로솜 분획을 이용한 AchE 활성차이로 간접적인 mixed function oxidase의 활성을 측정하여 대사속도의 차이를 설명하였다. 또한 C-14이 diethyl 기에 표지되어있는 diazinon을 이용한 흡수실험으로 두 종간의 흡수량상이 상이함을 보여주었다. 그러나 diazinon의 독성과 메카니즘에 관한 많은 연구가 진행되어 왔어도 송사리와 미꾸리간의 선택적 독성차이의 크기를 설명하기위한 확실한 증거가 제시되지 못했기 때문에, 대사경로 및 대사물들의 차이와 확인의 필요성이 대두되었다. 그러므로 본 연구에서는 송사리와 미꾸리에 대한 diazinon의 급성 독성치(LC50)를 정성 및 정량적으로 분석하고자 C-14이 phenyl 기에 표지된 diazinon을 이용하여 흡수된 diazinon의 *in vivo* 대사물들과 microsome 분획과 cytosol 분획을 이용한 *in vitro* 대사물들을 비교, 확인하고자 하였고, 여기서 얻은 결과를 이전의 연구 결과 얻은 diethyl-C-14 diazinon의 대사물과 비교하여 송사리와 미꾸리에서의 diazinon의 대사경로를 확인해 보고자 하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 재 료 및 기 기

#### 가. 시 약

Diazinon(0,0-diethyl 0-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl]phosphorothioate :CA)은 분석용 시약으로 U.S.EPA(Research Triangle park, NC)에서 공급 받았으며 정제없이 그대로 사용하였으며, 명시된 순도는 99.4%였다. C-14이 6-membered ring group에 표지되어 있는 C-14 diazinon의 specific activity는 0.031  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  인 것을 독일의 GSF로부터 분양받아 냉동고에 저장하면서 사용하였다. 수송, 저장중 분해가 일어났을 가능성을 가정하고 thin layer chromatography(Silica gel 60 G, Merck Co)를 이용하여 분리, 정제한 후 방사화학적 순도가 radio TLC scanner ( Berthold TLC analyzer)에서 99%이상의 정제도임을 확인한 뒤 사용하였다.

Scintillation cocktail은 Packard insta-gel과 Packard pico-fluor 30을 이용하였다. Glutathion, NADPH, Tris-HCl 및 Potassium phosphate 등의 생화학적 시약은 Sigma 회사에서 구입하여 사용하였고, 그 밖의 모든 시약들과 유기용매들도 분석용 최고품을 사용하였다.

#### 나. 공 시 어 류

본 실험에 사용한 어류는 일본산 송사리(Killifish : Oryzias latipes)와 미꾸리(Loach : Misgurnus anguillicaudatus)로 송사리는 수온 23 °C-24 °C 에서 광조건 16시간 암조건 8시간의 사육실에서 계대사육중인 개체중에서 선발하였고, 미꾸리는 시장에서 구입하여 본 연구실의 사육실 조건에서 15일 이상 순화시킨 후 사용하였으며, 공시어류는 두 어종 공히 실험시작 24시간 전에 절식시켰다. 잉어대신 송사리를 공시한 이유는 급성독성값이 비슷하고 본 연구실에서 사육하고 있으므로 균질한 개체를 쉽게 구할 수 있기

때문이다.

#### 다. 기기 및 실험조건

방사선 동위원소의 양은 Packard사 제품 Tri-carb 1500 liquid scintillation analyzer를 사용하였고, *in vitro* 및 *in vivo* 대사물의 위치확인에는 Berthold사 제품의 TLC linear analyzer를 사용하였다. 그밖의 고속 및 초고속 원심분리기는 Beckman사 제품을 이용하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 어체 전체로부터 Microsomal fraction 및 Cytosol fraction의 제조<sup>(10)</sup>

시료인 송사리와 미꾸리로부터의 microsome 분획의 제조는 다량의 간 조직을 얻기가 어려워서 어체 전체 조직으로부터 분리하였다. 시료를 여과지 위에서 수분을 제거하고 무게를 잰 후, 작은 토막으로 잘랐다. 여기에 50 mM HEPES buffer(pH 7.4) 속에 0.154 M KCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol을 포함하는 균질화 배지를 시료 무게에 대해 3배 부피로하여 4 °C에서 느린속도로 균질화하여 20 % (W/V)의 균질액을 만들었다. 균질액은 10,000 x g에서 20분 동안 고속 원심분리하여 상등액만을 취하였고, 상등액은 105,000 x g에서 60분 동안 초고속 원심분리하여 microsome 침전과 cytosol 분획을 분리하였다. Microsome 침전은 10 mM HEPES buffer(pH 7.4) 속에 0.154 M KCl, 1 mM EDTA, 20 % Glycerol을 포함하는 저장 배지로 용해시킨 후 1ml씩 분주하여 -80 °C에 보관하면서 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry 등<sup>(11)</sup>의 방법에 따라 결정하였다.

### 나. Phenyl 기에 표지된 C-14 Diazinon 의 어체내로의 흡수

분양받은 C-14 diazinon 의 정제는 ethylacetate : chloroform : benzene : n-propanol = 2 : 1 : 2 : 1의 배율인 전개용매 체계에서 thin layer chromatography 를 한 후 methanol로 추출하였고, 그 정제도는 TLC scanner

(Berthold TLC linear analyzer 2840)로 확인하여 사용하였다. 각 수조에는 송사리 마리당 100 ml, 미꾸리 마리당 500 ml이 되도록 0.069 ppm의 C-14 diazinon과 C-14이 표지되어 있지 않은 diazinon을 1 : 10의 비율로 만들어 주어, 2, 4, 6, 10, 15, 20시간이 될때까지 흡수 시켰고, 비교군에는 C-14 diazinon을 흡수시키지 않았다.

#### 다. 어체로부터 in vivo 대사물의 추출 및 확인

어체로 흡수된 C-14 diazinon의 추출은 Takimoto 등<sup>(12)</sup>의 방법을 이용하였다. 각 시간별로 흡수한 시료는 얼음물에서 기절시킨 후 시료 주위의 물기를 Whatman paper No.1으로 제거하고 총 무게를 잰 후 급냉시켰다. 급냉된 시료는 작은 토막으로 자른 후 20 ml의 methanol과 함께 완전히 균질화 시켜서 27,000 x g에서 고속 원심분리하고 methanol상등액을 질소 가스 하에서 완전히 건조시킨 후 300  $\mu$ l의 ethyl acetate 및 methanol로 각각 재 용해 시켰다. 각 단계별로 동위원소의 양을 측정하였고 최종 시료에서 알고 있는 양을 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol = 2 : 1 : 2 : 1인 유기용매와 Acetonitrile : water = 85 : 15인 전개 용매 하에서 thin layer chromatography를 수행한 후 Berthold TLC analyzer로 peak를 확인한 다음, 0.5cm의 간격으로 silica gel을 긁어 LSC로 측정하였다.

#### 라. Phenyl-C-14 Diazinon의 in vitro 대사 및 대사물의 확인

Phenyl-C-14 diazinon의 in vitro에서의 대사는 가.에서 얻어진 microsome 분획과 cytosol 분획을 이용하였다. Microsome분획에서의 대사는 0.5  $\mu$ mol의 정제된 C-14 diazinon (152.2  $\mu$ g), 50  $\mu$ mol의 NADPH, 13.57 mg/ml의 단백질을 포함하는 microsome 분획과 0.1 M KPi buffer (pH 7.4)를 총 2 ml로하는 반응액에 산소를 공급하면서 27 °C, water bath에서 2 시간 동안 120 rpm의 속도로 흔들어서 주었다. 반응의 정지는 차가운 TCA 용액이 2 % 미만인 되도록 첨가하였고, 0 °C 에서 30분간 정제시킨 후 27,000 x g

(15,000 rpm)에서 4 °C를 유지하면서 20분동안 고속 원심분리 하였다. 반응 상등액은 라.에서와 같은 방법으로 thin layer chromatography한 후 같은 방법으로 LSC로 측정하였다.

Cytosol 분획에서의 대사는 0.5  $\mu\text{mol}$ 의 정제된 C-14 diazinon, 80 mM의 glutathione, 13.57 mg/ml의 단백질을 포함하는 cytosol 분획과 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer를 총 2 ml로 하는 반응액에 산소공급없이 27 °C, water bath에서 2 시간 동안 120 rpm의 속도로 흔들어 주었다. 반응 대사물은 위와 동일한 방법으로 확인하였다.

### 제 3 절 결 과

본 연구실에서는 이미 diazinon에 대한 송사리와 미꾸리의 선택적 독성을 규명하기 위해서 diethyl 기에 C-14이 표지되어 있는 diazinon을 이용하여 AchE에 대한 저해도, 어체내로의 흡수량 및 대사속도의 차이를 다음과 같이 규명하였었고, 결과 요약은 표 3-1과 같다. 즉,

1. 신경계의 중요 효소인 AchE에 대한 저해도는 미꾸리가 송사리보다 약 22 배 더 민감하였다.
2. Microsome 분획의 mixed-function oxidase 활성은 송사리가 미꾸리보다 약 33 배 더 강했다.
3. C-14 diazinon의 초기 흡수율은 송사리가 미꾸리보다 약 4.5 배 더 많았으므로 독성은 미꾸리에서 4.5 배 더 높았다.
4. Diethyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물 중에서 ethyl acetate에 녹아 나오는 대사물 중 TLC 상에서 거의 전개되지 않는 극성이 아주 강한 대사물들이 약 13 배 정도 더 많이 생성되어었다.
5. Diethyl-C-14 diazinon의 microsome 분획 및 cytosol 분획과의 in vitro 대사실험 결과, microsome 분획에서 보다도 cytosol 분획에서 분해 활성이 더 높았으나 두 어종간의 대사 경로 및 대사물의 현격한 차이는 거의 없었다.

이와같은 결과로 부터, diazinon에 대한 미꾸리의 급성독성이 14 배나 민감한 메카니즘을 규명할 수 있었으나, 송사리와 미꾸리 체내에서의 diazinon의 대사 경로 및 대사물은 확인할 수가 없었다. 따라서 본 연구의 중점은 C-14이 다른 위치에 표지되어 있는 ring-C-14 diazinon을 이용하여 diethyl diazinon의 대사물과 비교하여 송사리 및 미꾸리에서의 대사경로 및 대사물의 차이를 확인하고자 하였다.

표 3-1. 송사리와 미꾸리에 대한 선택적 독성 차이의 비교 요약

Contribution factors	Toxicity (Relative strength or contribution)	
	Killifish	Loach
IC50 <sup>a</sup>	1	22
MFO activity		
<u>in vitro</u>	1	33.4 <sup>b</sup>
<u>in vivo</u>	1	13 <sup>c</sup>
Absorption for initial 2.5hrs	4.5 <sup>d</sup>	1
LC50 at 96 hour	1	14
LD50 at starting	1	63 <sup>e</sup>
AchE activity	1	1.4

<sup>a</sup> IC50 value for diazoxon

<sup>b</sup> This value was calculated by  $[\text{IC50}(\text{DZ+MF})/\text{IC50}(\text{DZ})]$  killifish/  
 $[\text{IC50}(\text{DZ+MF})/\text{IC50}(\text{DZ})]$  Loach

<sup>c</sup> This was the ratio of polar metabolites on TLC and was determined at the time when it was maximum

<sup>d</sup> Absorption ratio at starting point before metabolizing

<sup>e</sup> LD50 = mg/g-body Wt. at starting point = (LC50 x c)

Pyrimidine ring에 C-14이 표지되어 있는 diazinon의 정제도는 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol = 2 : 1 : 2 : 1인 유기용매와 acetonitrile : water이 85 : 15 인 유기용매 하에서 전개한 뒤 methanol로 추출 하였을때 모두 99 % 이상의 높은 정제도를 보였다. 그림 3-1은 정제된 ring-C-14 diazinon의 TLC를 TLC linear analyzer로 확인한 것이다.

Microsome 분획 및 cytosol 분획에 의한 ring-C-14 diazinon의 in vitro 대사의 결과는 그림 3-2와 그림 3-3에서 보듯이 thin layer chromatography에서 Rst 값이 약 0.5인 주 대사물 M-II 만이 생성되었다. 송사리에서의 M-II의 생성량이 미꾸리에서의 그 양보다 약 10 % 정도 더 많았으나, 두 어종간의 커다란 차이는 볼 수 없었다. 이러한 결과는 in vitro 대사실험의 결과로는 실제로 어체내에서 일어나는 대사활성의 진정한 값을 알 수 없음을 제시하는 것이고, 이전에 얻었던 microsome 분획에 의한 두 어종간의 mixed-function oxidase 활성의 현저한 차이를 설명할수가 없기 때문에 in vivo에서의 대사연구가 필요하였다. 그러나 diethyl-C-14 diazinon을 이용한 이전의 연구에서 24시간 간격으로 96시간까지 두 어종이 흡수한 C-14 diazinon의 어체내 대사 산물을 TLC 한 결과, 두 어종간의 정량적인 차이가 특별하게 없었기때문에 흡수시작 20 시간 이내에서 두 어종간의 체내대사의 차이가 있기를 기대하였었고, diethyl-C-14 diazinon 의 경우 15 시간 이내에 극성이 아주 강한 대사물들이 송사리가 미꾸리에서 보다 13 배 더 많이 생성되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 더 확실히 증명하기 위해서 phenyl-C-14 diazinon을 이용한 동일한 실험을 수행한 결과, 그림 3-4와 그림 3-5와 같았다. 질소 가스 하에서 완전히 증발시킨 각 시료를 ethylacetate로 재 용해시킨 후 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol이 2 : 1 : 2 : 1인 유기용매 하에서 전개시켰을 때 송사리의 경우 (그림 3-4)와 미꾸리의 경우 (그림 3-5) 모두에서 Rst 값이 약 0.5인 주 대사물 M-II 만이 생성되었

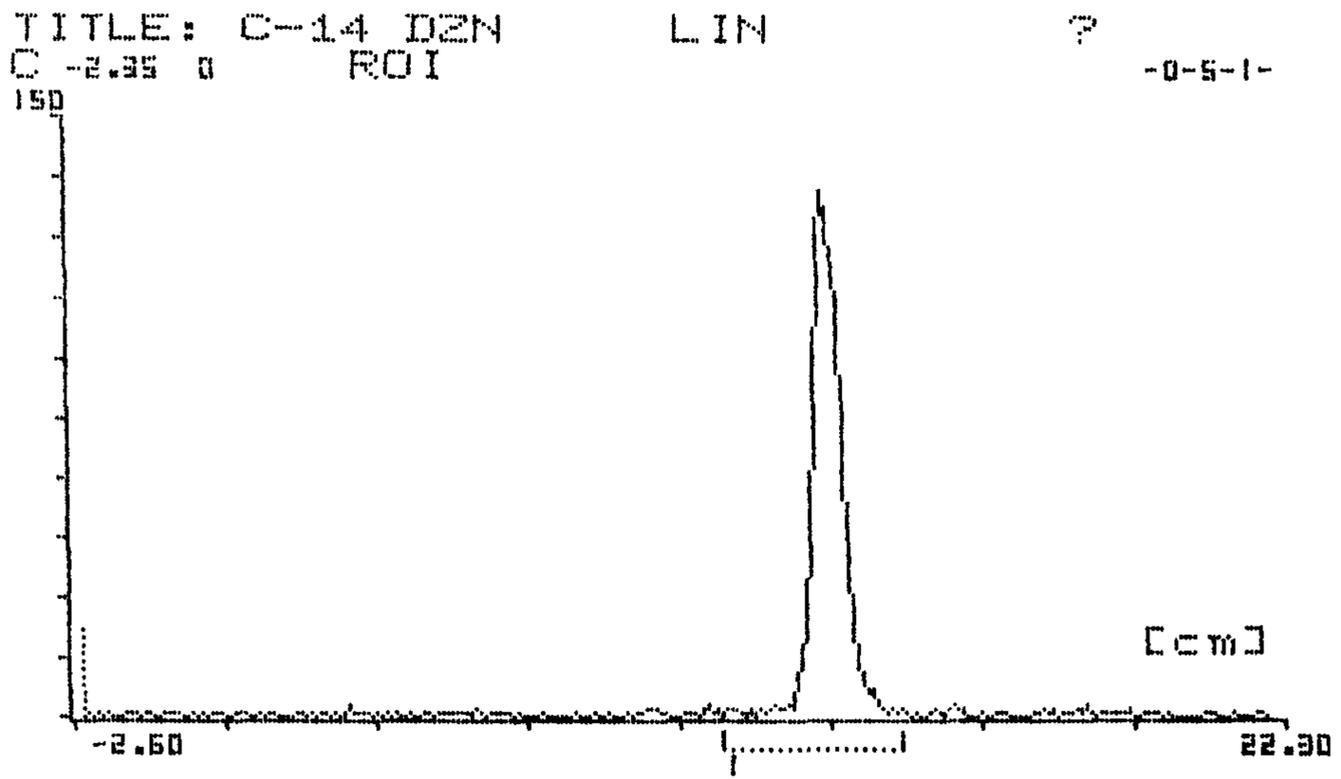


그림 3-1. 정제된 phenyl-C-14 diazinon의 radio chromatogram

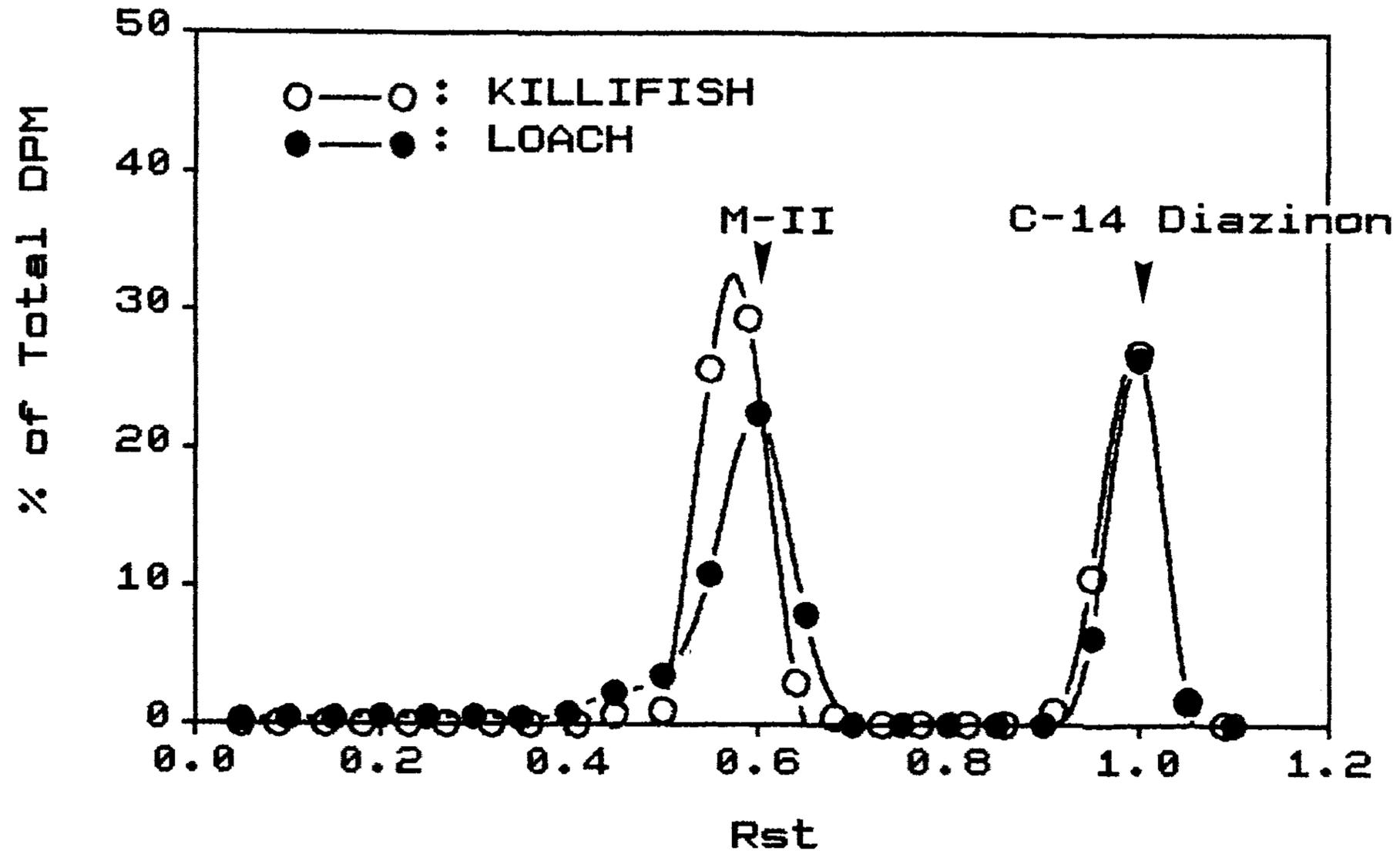


그림 3-2. Microsome 분획에서의 phenyl-C-14 diazinon의 in vitro 대사물 확인

$$Rst = \frac{\text{Distance of sample spot from start point}}{\text{Distance of reference material spot from start point}}$$

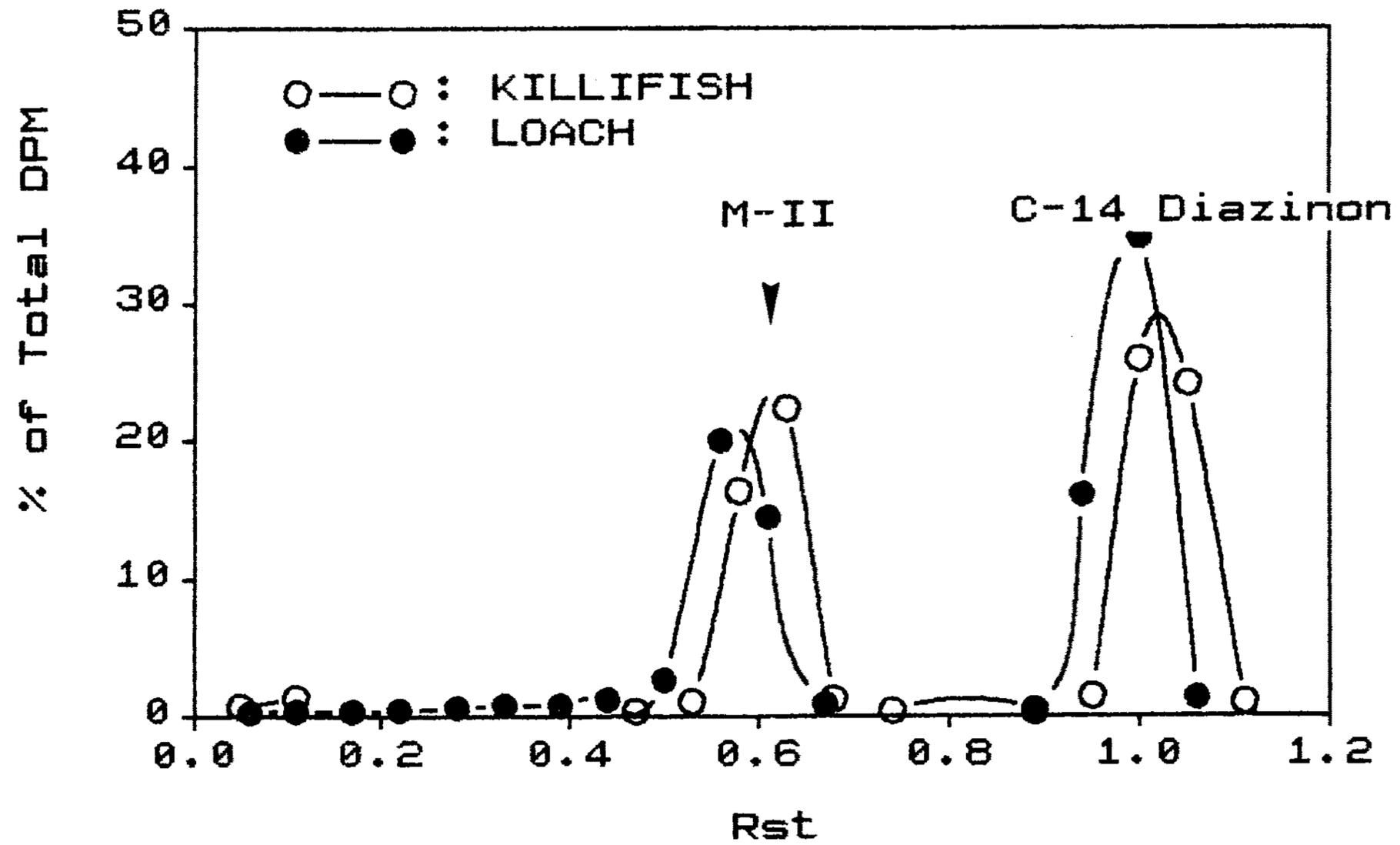


그림 3-3. Cytosol 분획에서의 phenyl-C-14 diazinon의 in vitro 대사물 확인

$$R_{st} = \frac{\text{Distance of sample spot from start point}}{\text{Distance of reference material spot from start point}}$$

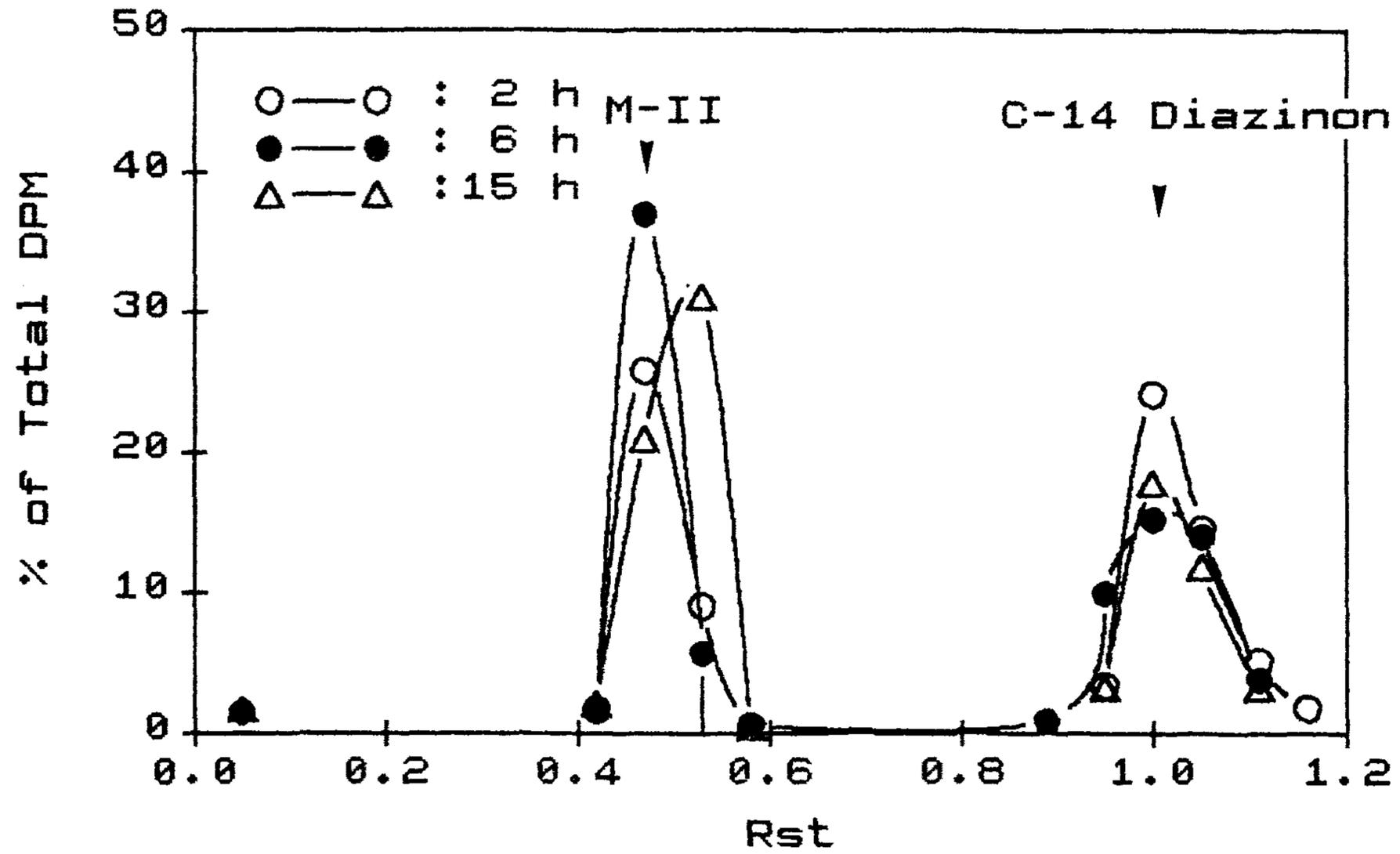


그림 3-4. 송사리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물 확인 (Ethylacetate 추출물)

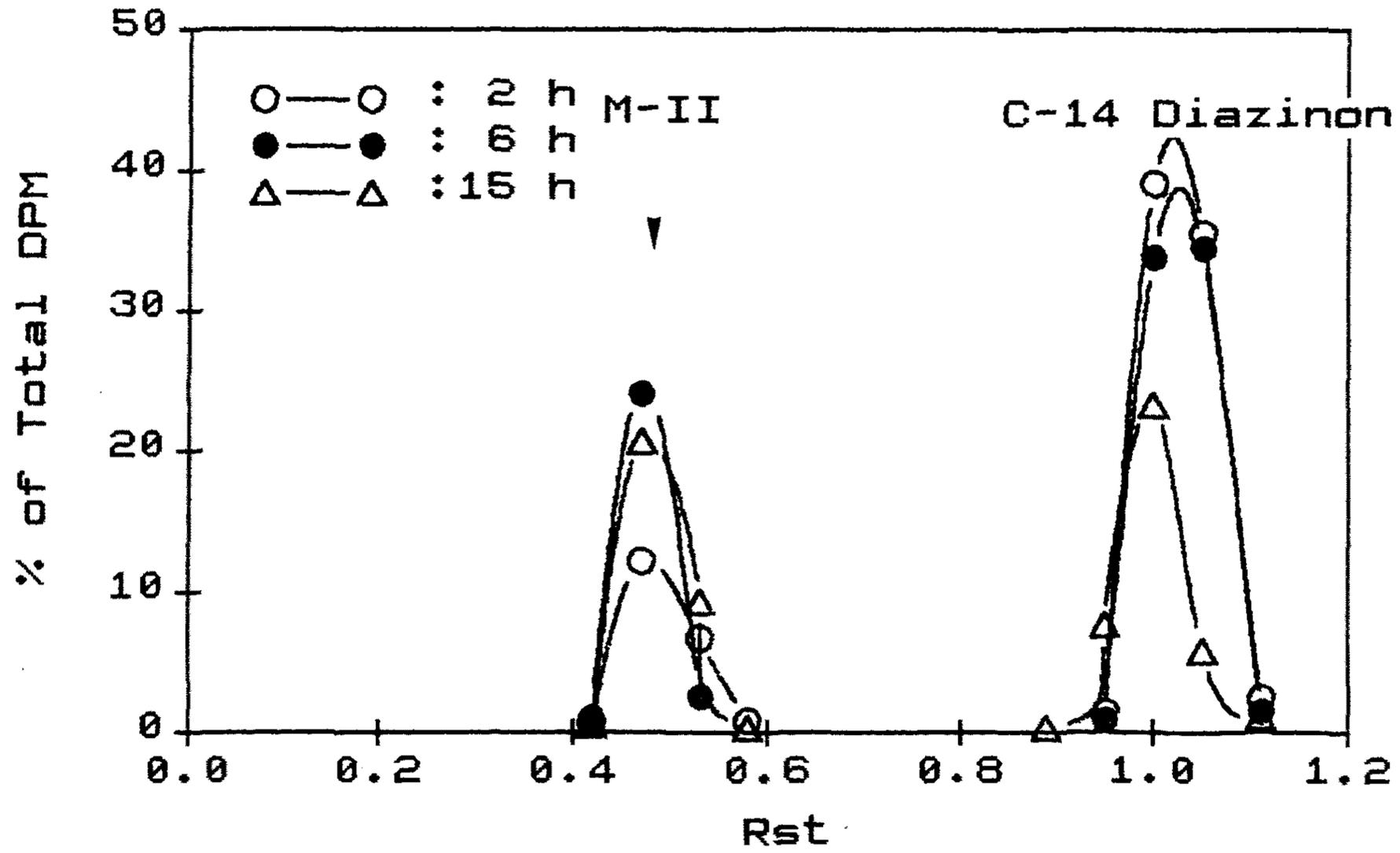


그림 3-5. 미꾸리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물 확인 (Ethylacetate 추출물)

다. 이것은 *in vitro*에서와 같은 결과이지만 주 대사물인 M-II의 두 어종간의 *in vivo* 생성량을 비교해보면, 송사리가 미꾸리보다 약 2 배 더 많이 생성되었음을 알 수 있었다. 또한 주 대사물 M-II의 성질은 ethylacetate에 녹아 나오는 것으로 보아 비교적 소수성이 강한 대사물임을 추측할 수가 있었다.

Ethyl acetate에는 용해되지 못하는 극성이 강한 대사물들의 생성 여부를 확인하기 위하여, 동일한 시료를 methanol로 재 용해 시킨 후 동일한 유기용매 조건 하에서 TLC를 수행한 결과, 그림 3-6과 그림 3-7의 결과를 얻을 수 있었다. 그림 3-6은 시간에 따른 송사리의 *in vivo* 대사물의 변화를 그림 3-7은 미꾸리의 그것을 나타낸 것으로 두 어종 모두에서 Rst 값이 0.5인 주 대사물 M-II 이외에 원점에서 전개되지 않는 아주 극성이 강한 대사물, M-P가 생성되었음을 알 수 있었으나, 두 어종간의 대사물 및 대사물 양의 차이는 거의 볼 수가 없었다. 그러나 미꾸리의 경우 15 시간 때의 대사 추출물에서 Rst 값이 0.25 정도인 대사물 M-I이 출현 하였으나, 20 시간 때에는 M-I이 없는 것으로 보아 M-I이 다른 대사물로 더욱 더 대사되었거나 아니면 TLC 하는 동안의 미전개 되어버린 주 대사물 M-II일 수도 있을것이다. 그러나 두 어종간의 methanol에 용해되는 대사물의 양이나 대사물 양의 차이는 거의 보이지 않았다.

지금까지의 모든 TLC의 결과들은 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol이 2 : 1 : 2 : 1인 유기용매(A) 하에서 수행하였기 때문에, 이 유기용매 하에서는 서로 겹쳐 있을지도 모르는 다른 대사물의 존재 여부를 확인하기 위하여 조금 더 극성이 강한 acetonitrile : water가 85 : 15인 유기용매 3-8은 ethylacetate에 녹아나온 대사물의 결과이고 그림 3-9는 methanol에 녹아나온 대사물의 결과로, 두 용매체계 하에서 대사물의 전개된 위치만이 약간씩 이전 되었을 뿐 다른 새로운 대사물은 생성되지 않았음을 알 수 있다.

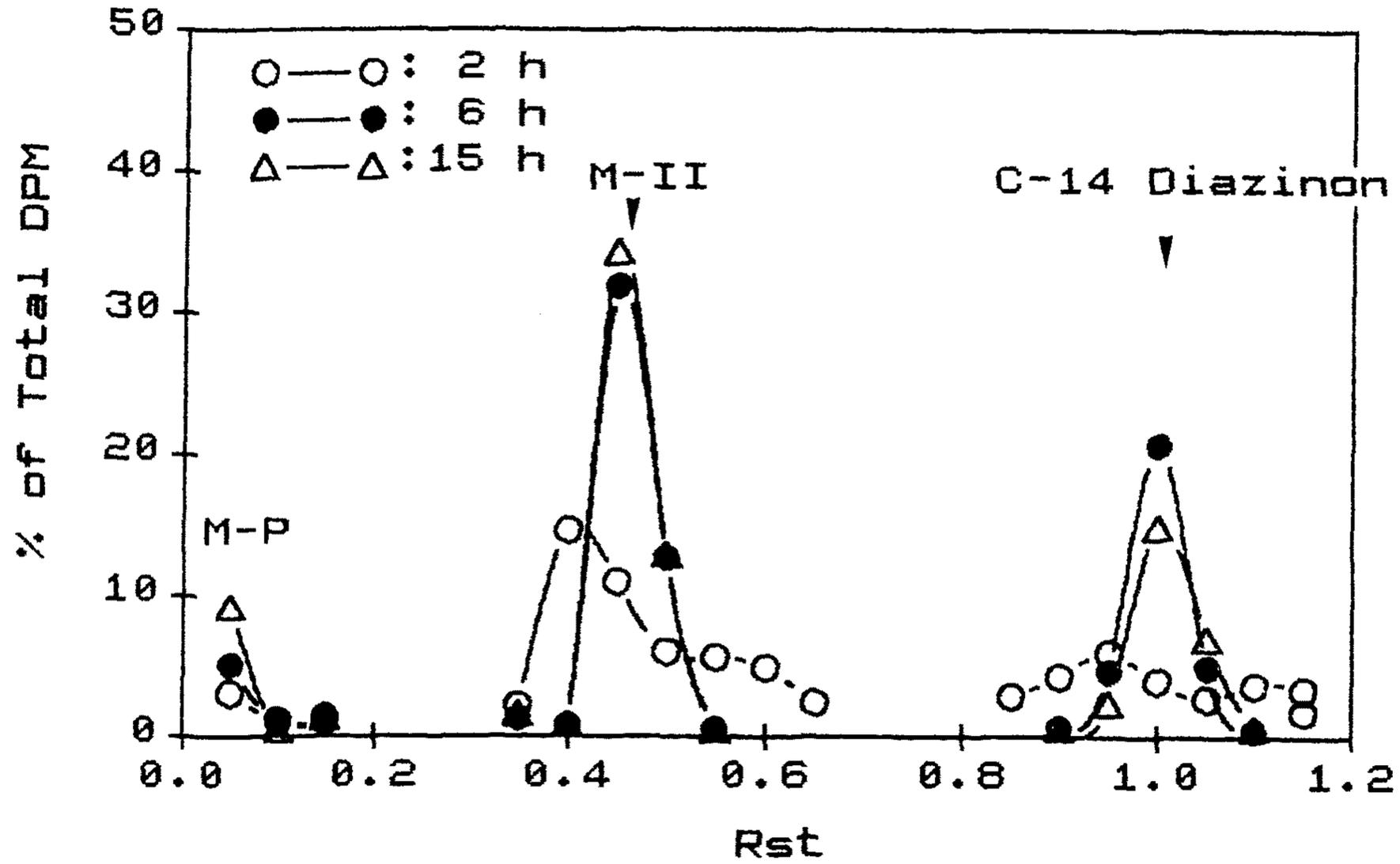


그림 3-6. 송사리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물 확인 (Methanol 추출물)

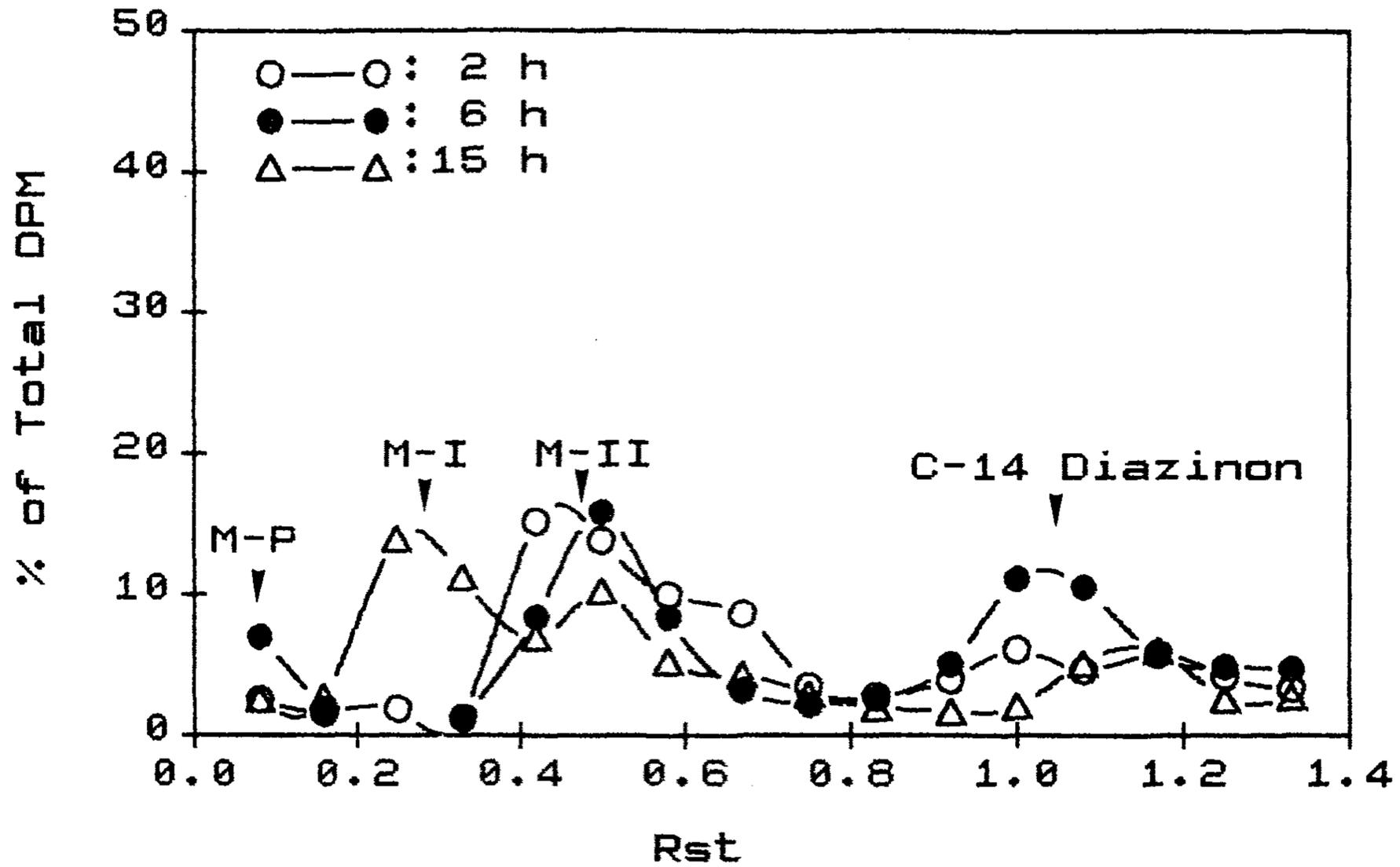


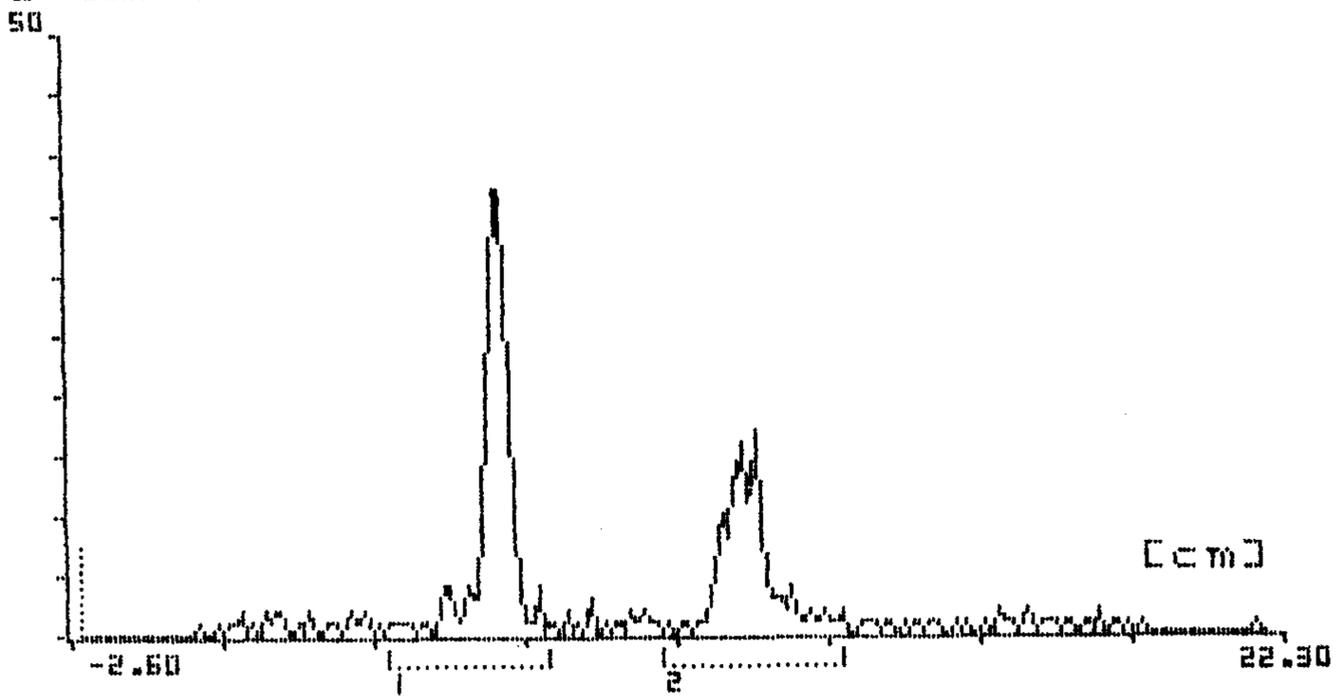
그림 3-7. 미꾸리에서 시간에 따른 phenyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물 확인 (Methanol 추출물)

**A**

TITLE: C-14 MTB-K15 LIN  
C -2.35 0 ROI

?

-0-5-1-



**B**

TITLE: C-14 MTB-K15 LIN  
C -2.35 0 ROI

?

-0-9-1-

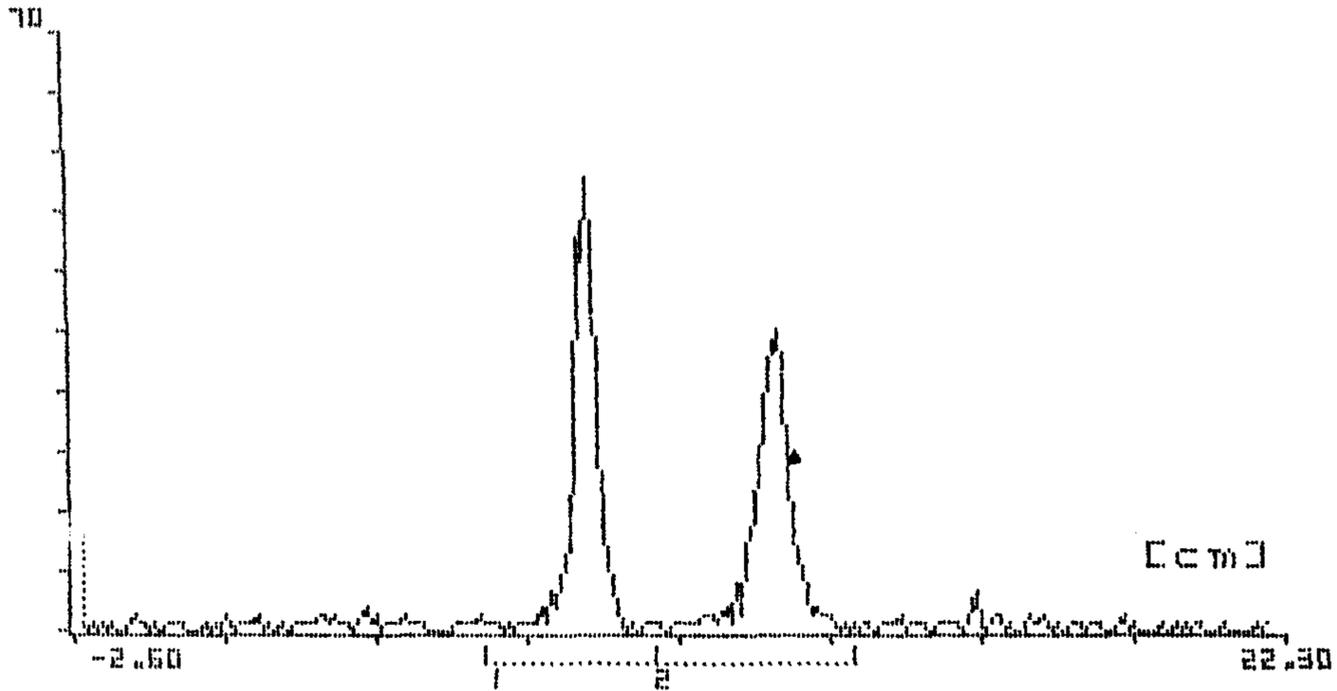


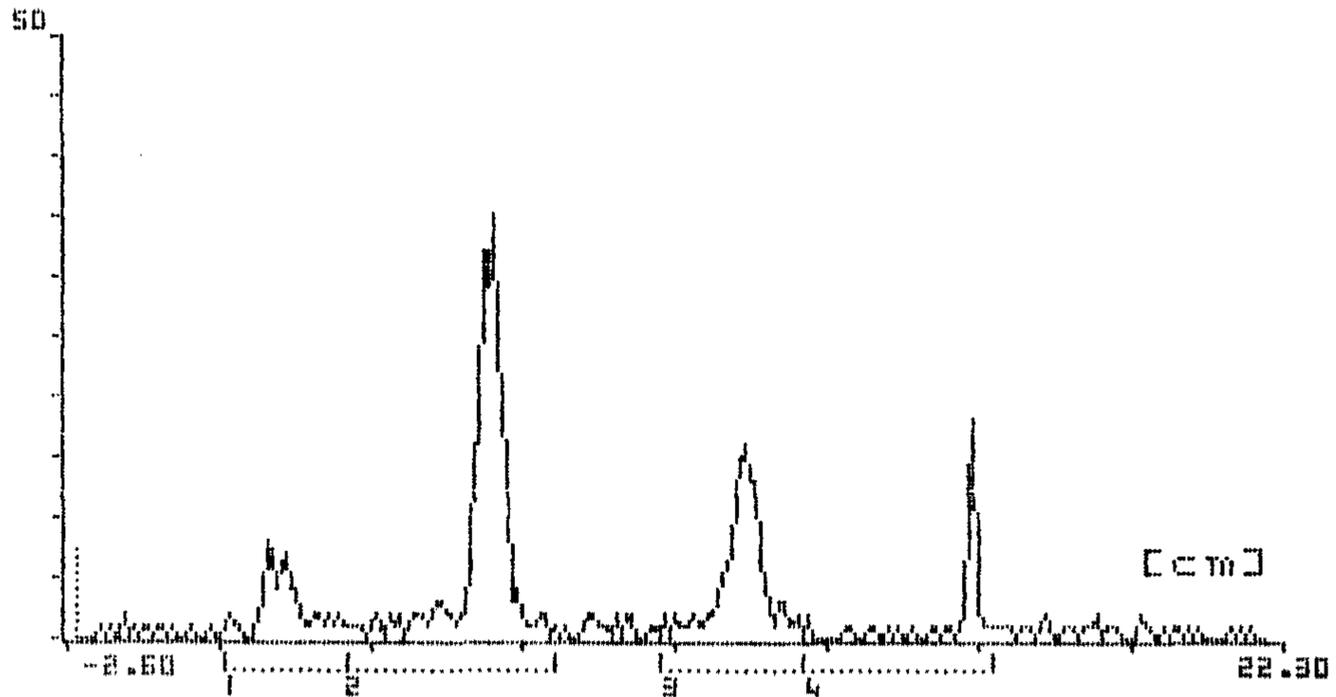
그림 3-8. 두 유기용매체계 하에서 전개된 in vivo 대사물의 비교  
(Ethylacetate 추출물)  
A ; ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol  
= 2 : 1 : 2 : 1  
B ; acetonitrile : water = 85 : 15

**A**

TITLE: C-14 MTB-K20 LIN  
C -2.35 0 ROI

?

-0-5-1-



**B**

TITLE: C-14 MTB-K15 LIN  
C -2.35 0 ROI

?

-0-5-1-

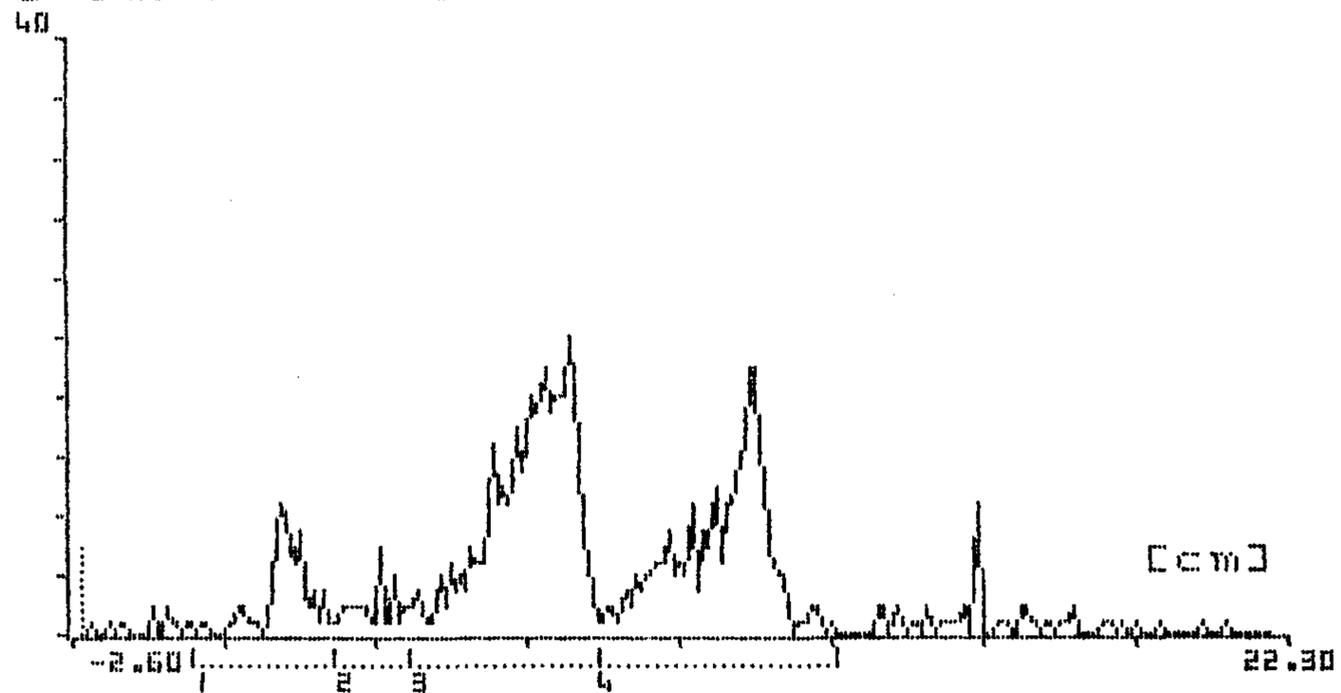


그림 3-9. 두 유기용매체계 하에서 전개된 *in vivo* 대사물의 비교  
(Methanol 추출물)

A ; ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol  
= 2 : 1 : 2 : 1

B ; acetonitrile : water = 85 : 15

즉, 주 대사물인 M-II의 Rst 값은 유기용매 A 에서는 약 0.5 이었던 것이 유기용매 B에서는 약 0.65 정도로 이전되며, 극성이 강한 대사물인 M-P는 거의 이동이 없었음을 알 수 있었다.

## 제 4 절 고 찰

최근 어류에서 독성을 일으키는 기작이나 독성물질의 대사에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 본 연구실에서도 수도작에서 관행적으로 살포되는 농약인 diazinon에 의해서 생육에 영향을 받는 어종간의 선택적 독성을 연구하고자 우선적으로 생화학적인 고찰을 시도하였었다.

실제로 생체내에서의 독성기작의 지표는 급성독성값인 LC50 으로 알 수 있는데, 그 값에 있어서 송사리가 미꾸리보다 약 14 배 정도 높은 것은, diazinon 에 대한 송사리의 상대적인 저항성을 설명해주는 것이다. 이러한 LC50 의 상대적 독성차이를 설명하는데 있어서, 신경계의 중요한 효소인 acetylcholinesterase 에 대한 저해도가 송사리와 미꾸리에 대한 diazinon의 선택적 독성을 설명해주는 주요 요소라는 것은 이미 확증되었었으나, 어체에 대한 diazinon 의 흡수도 또한 유기인계 살충제의 선택적 독성을 해석하는데에 복합적인 요소라고 인정되었었고 실험 결과는 송사리가 미꾸리보다 diazinon 을 약 4.5 배 더 흡수하는 것으로 나타났었다. 여기에서 송사리의 어체내에 더 많은 양을 저장하고 있으면서도 낮은 독성을 나타낸다는 것은, 더 활성이 강한 diazinon 의 해독대사가 있음을 가르쳐준다. 이러한 범주 내에서, Kanazawa<sup>(8)</sup>는 여러가지 유기인계 및 카바메이트계 살충제들에 의한 어류 뇌에서 AchE 의 in vivo 저해와 어독성간의 관계를 연결시켜 보고자 하였으나 일관된 상관관계를 발견할 수 없었다. 본 연구에서 밝혀진 또다른 중요 요소는 송사리가 미꾸리보다 diazinon을 훨씬 더 활발하게 대사시킨다는 사실이었다. 비록 AchE 의 저해와 in vitro 상에서 microsome 분획의 첨가에 의한 대사물 확인실험만으로 대사활성의 명확한 증거를 보이는 것은 부족하지만, in vivo에서 송사리는 diazinon을 상대적으로 독성이 없는 다른 대사물들로 전환시키는 정도가 미꾸리보다 약 13 배 더 높다는 것이 확인되

있었다. 표 3-1은 이 3 가지 요소들 즉, AchE 저해도, 흡수도 및 대사활성을 급성독성과 연관시켜 정량적으로 계산한 뒤 요약해 놓은 것이다. 이 결과는 세가지 요소들 중 어느 한가지 만으로는 LC50 값이나 LD50 값을 예측할 수 없다는 것을 증명해주고 있다. 다시 말해서 세가지 요소들을 함께 고려한 비율이어야만 일반적인 독성의 지표인 LC50 값과 LD50 값의 유용한 지표로서 사용될 수 있다고 사료된다.

몇몇 연구자들은 대사활성이 어류의 간 microsome 분획에서의 cytochrome P-450 양과 밀접한 관계가 있다고 주장했었다<sup>(9)</sup>. 그러나 분광학적으로 결정된 microsome 분획에서의 cytochrome P-450 의 양은 존재하고 있는 모든형태의 cytochrome P-450의 합을 반영할 뿐 isozyme의 형태나 특정 isozyme에 대한 어떠한 특징도 나타낼 수가 없으며, 둘째, 분광학적으로 결정된 그 cytochrome P-450이 모든 촉매기능을 갖는다고 볼 수도 없으며, 셋째, microsome의 활성은 isozyme 의 상대적인 양과 세포막에서 그것들의 기능에 의존한다는 이유때문에 주어진 기질인 diazinon에 대한 microsome 분획에서의 활성이 다른 기질에까지 적용될 수는 없는 것이다<sup>(13)</sup>. 이전의 연구결과로 보면 송사리의 전체적인 대사활성이 미꾸리보다 약 33 배 더 강한 것으로 mixed-function oxidase 활성의 간접적인 측정을 통해 계산 되었었다. 우리의 계산 방법에 의하여 결정된 33 배의 활성 차이가 두 어종간의 mixed-function oxidase 활성차이를 표현하는 최적의 방법이라고 볼 수는 없지만, 두 어종에서 microsome 분획의 첨가에 의한 IC50 값의 현저한 변화는 중요한 결과임을 간과할 수는 없다. 만일 두 어종이 intoxication 반응을 더욱 더 좋아한다면 독성은 microsome 분획 첨가로 더욱 증가했을 것이고 그래프는 microsome을 넣지 않았을 때보다 더욱 더 기울기가 커졌을 것이다. 사실, 집파리와 쥐를 가지고 실험한 Yang<sup>(4,5)</sup> 등의 결과에 의하면, diazinon에 의한 송사리의 선택적 저항이 diazinon의 빠른 분해 뿐만아니라 유기체 내에서 독성이 강한

산소 유도체의 축적 속도에 의해 결정될 수 있다는 가능성을 배제할 수는 없다. 따라서 in vivo 대사실험을 통한 diazoxon과 같은 산소 유도체의 생성 여부를 확인하여야 하며, 또한 diazoxon이 생성되었다면 송사리와 미꾸리간의 정량적인 차이도 규명되어야 할 것이다.

Yang<sup>(4,5)</sup> 등은 집파리와 쥐에 대한 in vitro 대사 실험에서 TLC로서 전체 중의 1% 미만인 diazoxon을 확인하였었고, Hogan<sup>(14)</sup> 등도 어류의 microsome 분획에 의한 in vitro 대사 실험을 한 뒤 TLC 상에서 nmole 단위의 diazoxon을 확인하였었으나, 본 연구의 결과에서는 diazoxon의 생성을 in vitro 및 in vivo 실험 모두에서 확인하지 못하였다.

Yang과 Hogan<sup>(4,5,14)</sup> 등에 의하면, diazinon의 주요 분해 대사물이 diethyl phosphorothioic acid, diethyl phosphoric acid임을 확인하였었고, 그들 나름대로의 대사 경로를 제안 하였으나 각 대사물들의 명확한 증거는 제시하지 못했었다. 이에 대하여, 본 연구에서는 이미 diethyl-C-14 diazinon을 이용해서 얻어진 결과와 phenyl-C-14 diazinon을 이용한 이번 연구결과를 함께 비교하여 송사리와 미꾸리의 대사활성의 정량적 차이의 확인 뿐만 아니라 이 화합물의 어체내에서의 대사경로를 추적하고자 하였다.

Phenyl-C-14 diazinon에 대한 microsome 및 cytosol 분획의 in vitro 대사 실험에서는 Rst 값이 약 0.5 정도인 주 대사물 M-II만이 생성되었는데, 이 대사물은 TLC 상에서 표준 화합물과 비교했을때 hydroxy pyrimidinol이라고 사료된다. 또한, in vivo 대사실험에서 ethylacetate에 용해되는 비교적 소수성을 띄는 대사물로는 두 어종 모두에서 in vitro에서와 같은 hydroxy pyrimidinol만이 생성되었고, methanol에 용해되는 동일 시료의 대사물로는 hydroxy pyrimidinol 이외에 극성이 아주 강하여 원점에서 전개되지 않는 대사물 M-P가 함께 확인되었는데, C-14이 pyrimidine ring에 표지되어 있음을 고려해 볼 때 diethyl phosphorothioic acid나 diethyl phosphoric acid는

아니고 한개의 ethyl 기가 떨어져 나간 desethyl diazinon이거나 hydroxy pyrimidinol이 더 가수분해되거나 산화되어 conjugate와 같은 극성이 아주 강한 대사물로 전환된 것으로 사료된다. 또한, 흡수시간이 지남에 따라 대사물 M-II와 M-P의 양이 점차적으로 증가하는 것으로 보아 대사물 M-P는 대사물 M-II인 hydroxy pyrimidinol에서 전환되는 것으로 사료되며, diazinon은 대사효소계의 활성을 저해함이 없이 오히려 대사활성을 더욱 더 증가시키는 것으로 사료된다. 그러나 송사리의 경우 미꾸리보다 주 대사물 M-II의 생성량이 2 배 더 많았기 때문에 diazinon의 -P-O- 결합이 깨어지는 대사 속도가 미꾸리보다 송사리에서 2 배 더 빠르다고 볼 수 있다.

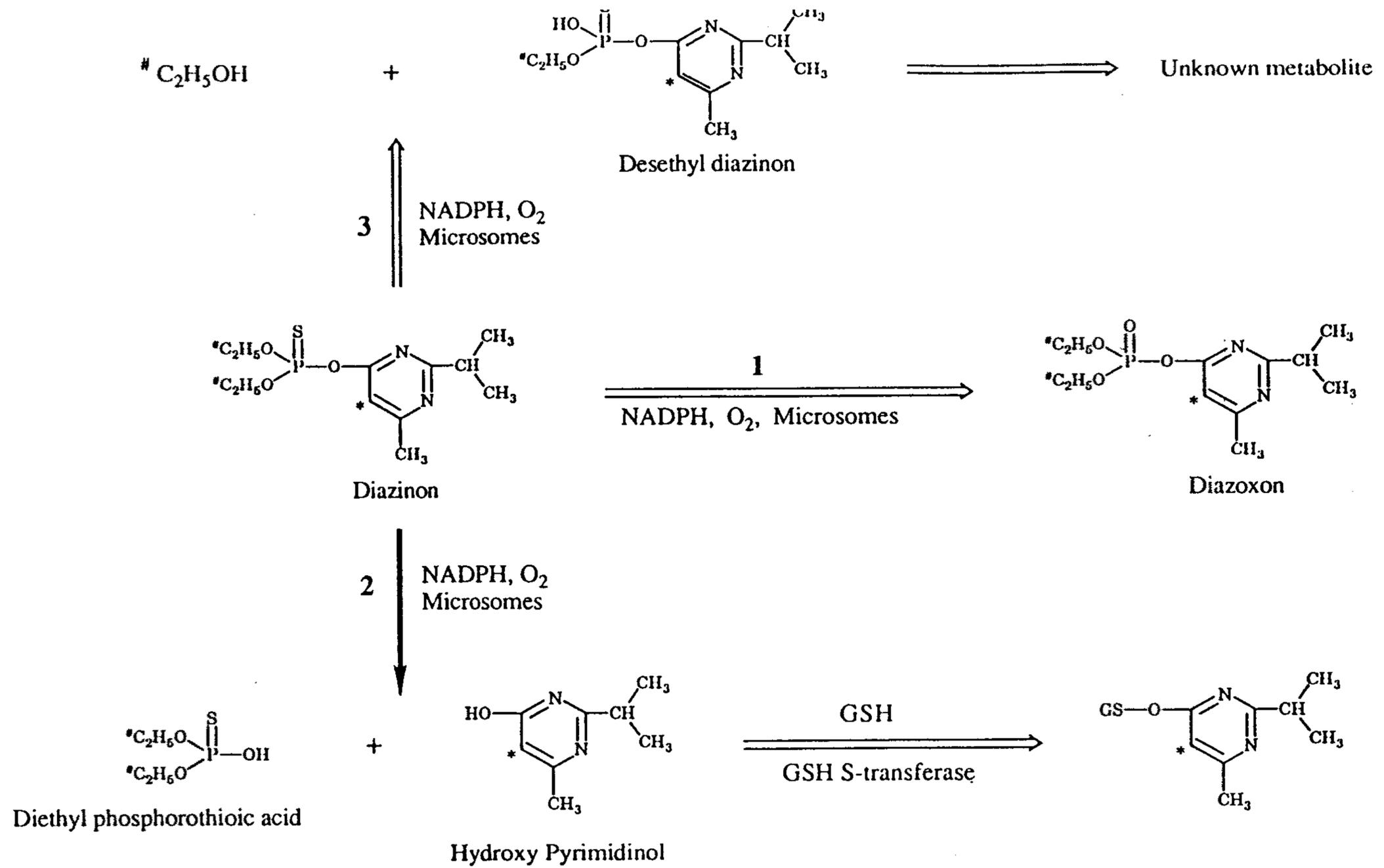
한편, 동일한 실험조건 하에서 diethyl-C-14 diazinon에 대한 in vitro 및 in vivo 실험결과와 비교해 보면, 역시 in vitro에서는 두 어종간의 대사물 및 대사물 양의 차이가 없이 acetonitrile : water이 85 : 15인 유기용매 하에서 TLC 하였을때 Rst 값이 약 0.2인 대사물 M-1과 약 0.5 정도인 주 대사물 M-2가 생성되었으나, in vivo에서는 ethylacetate에 용해되어 나오는 대사물들이 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol이 2 : 1 : 2 : 1 인 유기용매 하에서 TLC를 수행 하였을때 원점에서 약간만 전개되는 즉, Rst값이 약 0.15 정도인 극성이 매우 강한 대사물들이 생성되었었다. 이들 극성이 강한 diethyl-C-14 diazinon의 대사물 M-1과 M-2가 과연 phenyl-C-14 diazinon의 대사물인 M-P 및 M-II와 같은 대사물질인지 아닌지를 확인하기 위하여 phenyl-C-14 diazinon의 대사물들을 ethylacetate : chloroform : benzene : 1-propanol = 2 : 1 : 2 : 1인 유기용매와 acetonitrile : water = 85 : 15인 유기용매 하에서 TLC 하였을때 M-P와 M-II의 Rst 값은 M-II만이 약 0.55에서 약 0.4 정도로 변했을 뿐 diethyl-C-14 diazinon에서의 M-1과 M-2처럼 모두 원점으로 이동하지 않았기 때문에 M-P, M-II와 M-1, M-2는 서로 다른 대사물임을 알 수 있었다. Diethyl-C-14의 경우, C-14이 ethyl 기

에 표지되어 있음을 고려해 볼때, 극성이 강한 대사물은 한개의 ethyl 기가 떨어져 나간 desethyl diazinon이거나 pyrimidine ring에 위치한 methyl기나 isopropyl 기가 hydroxylation 되어버린 대사물과 diethyl phosphorothioic acid 및 diethylphosphoric acid를 포함하고 있을 것으로 사료된다. 특히, phenyl-C-14 diazinon의 대사물인 M-II 즉, hydroxy pyrimidinol의 생성이 사실이라면 그에 따른 diethyl phosphorothioic acid 및 diethyl phosphoric acid가 함께 생성되어야 하기때문에 phenyl-C-14 diazinon에서는 C-14의 표지 위치 상으로 확인되지 않았던 그 대사물들이 diethyl-C-14 diazinon을 이용한 실험에서는 C-14이 diethyl 기에 표지되어 있으므로 hydroxy pyrimidinol이 생성된 비율과 같은 비율로 생성되었어야 한다. 송사리의 경우, phenyl-C-14 diazinon으로 부터 생성된 hydroxy pyrimidinol의 생성량(35 %) 과 diethyl-C-14 diazinon으로 부터 생성된 원점의 극성이 강한 대사물의 생성량(28 %)의 비율이 거의 비슷하였으나, 미꾸리의 경우는 약 18 % 생성된 hydroxy pyrimidinol의 양과 약 3 % 생성된 극성이 강한 대사물의 양의 비율이 서로 일치하지 않았다. 이렇게 생성된 대사물의 양의 비율이 일치하지 않는 이유를 고려해 본다면, diethyl-C-14 diazinon의 대사 실험에서 실험과정중 오류가 있었거나, 아니면 diazinon의 흡수 초기에 송사리에 서는 강하지만 미꾸리에서는 아주 약한 상태로 진행되다가 흡수시작 20 시간이 되어야 비로소 강한 활성을 띄는 다른 대사경로가 있을지도 모를 것이다. 따라서, diethyl-C-14 diazinon을 이용한 in vivo 대사실험을 재확인 하여 명확한 증거를 제시해야 할 것으로 사료된다.

이와같은 결과로 부터, phenyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물과 diethyl-C-14 diazinon의 in vivo 대사물이 서로 다르다는 것을 알 수 있었고, 송사리와 미꾸리 내에서의 diazinon의 대사 경로는 적어도 3가지의 경로를 갖고 있으며, 그 중에서도 주요 대사경로는 -P-O- 결합이 가수분해 된 후 hydroxy

pyrimidinol과 diethyl phosphorothioic acid로 되는 경로이며, 송사리와 미꾸리 두 어종간의 대사경로의 차이는 없고 단지 대사속도의 차이만이 있는 것으로 생각된다. 사실 이러한 대사물들이 phase I 반응 혹은 더 잘 배설될 수 있도록 반응시켜 주는 phase II 반응에 의해서 생성된 대사물 및 극성이 강한 conjugate 인지는 모르지만 conjugation반응에 의해서 생성된 대사물들이 conjugate되지 않은 화합물들보다 독성이 약하다는 것은 사실인 것이다. 무엇보다도 phenyl-C-14 diazinon을 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 대사실험 결과로서, diazinon에서 가수분해된 hydroxy pyrimidinol 생성량이 송사리가 미꾸리보다 2 배 정도 더 많았고, diethyl-C-14 diazinon에서 대사된 극성이 강한 대사물의 생성량이 송사리가 미꾸리보다 약 13 배 더 많았기 때문에 이것을 함께 고려해 볼 때 송사리는 적어도 약 2 배에서 13 배의 차이로 더 강한 대사효소계의 활성을 갖고 있다고 결론 지을 수 있으며, 이로써 간접적으로 측정했던 두 어종간의 mixed-function oxidase의 33 배의 차이를 부분적으로 설명할 수 있었다.

지금까지의 diethyl-C-14 diazinon과 phenyl-C-14 diazinon을 이용한 송사리와 미꾸리에서의 *in vivo* 대사실험 결과로부터 그림 3-10과 같은 diazinon의 대사경로를 가정할 수 있었다.



# : Diethyl-C-14 diazinon

\* : Phenyl-C-14 diazinon

그림 3-10. 송사리와 미꾸리에서 예상되는 diazinon의 대사경로

## 제 5 절 결 론

본 연구에서는 diazinon 및 diazoxon의 송사리와 미꾸리에 대한 선택적 어독성 기작의 메카니즘을 규명하고자 C-14이 phenyl 기에 표지된 diazinon을 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 비교 대사 실험을 수행하였다.

diazinon 대사에 관여하는 mixed-function oxidase를 포함하는 microsome분획 및 cytosol 분획을 얻어 *in vitro* 대사를 비교하였으며, 두 어종에 C-14 diazinon을 직접 흡수 시킨 후 20 시간안의 대사 양상을 *in vivo* 실험으로 비교, 확인 하였다. 여기에서 얻어진 결과로 부터, 두 어종간의 급성 어독성 (LC50값)의 차이를 명확하게 설명할 수 있었고, 아울러서 두 어종에서의 diazinon의 대사경로를 가정할 수 있었다.

1. Microsome 분획 및 cytosol 분획에 의한 *in vitro* 대사 실험으로서는 두 어종간의 차이를 발견할 수 없었고, 단지 생성되는 주요 대사물만 예측할 수 있었다.
2. Ethylacetate에 용해되는 주 대사물은 hydroxy pyrimidinol 이었으며, methanol에 용해되는 주 대사물은 hydroxy pyrimidinol 이외에 TLC 상에서 전개되지 않는 극성이 강한 대사물이 생성되었고, 이 대사물은 hydroxy pyrimidinol로 부터 대사되어진 것으로 사료된다.
3. 송사리와 미꾸리간의 *in vivo* 대사물의 양이 송사리가 2 배 더 많았으므로 송사의 대사활성이 적어도 2 배 더 강함을 알 수 있었다.
4. Diethyl-C-14 diazinon의 *in vivo* 대사 형태와 비교해 볼때, 송사리와 미꾸리 체내에서의 diazinon의 대사경로는 적어도 3가지로 분리되어 진행되며 주요 대사경로는 -P-O- 결합이 가수분해되는 경로임을 예상할 수 있었다.

본 연구에서는 송사리와 미꾸리에 대한 diazinon의 선택적 독성의 메카니

증을 정량적으로 확인하기 위하여 대사실험 위주로 연구하였으며, 이전에 수행되었던 연구결과와 함께 고려해 봄으로서 두 어종간의 선택적 독성 차이를 명확하게 설명할 수 있었다.

따라서, 두 어종에서의 diazinon의 대사경로를 예상할 수는 있었지만, 앞으로는 생성된 대사물의 정확한 확인 실험이 더 필요하다고 사료된다.

이러한 종류의 연구는 수많은 화합물질들이 창출되는 현 시점에 있어서 화합물의 합성 구도를 정하는 것 뿐만아니라 다양한 환경 생물에 대한 화합물의 독성학적인 영향 등을 예견하고 이들로부터 환경 생물을 보호한다는 측면에서 앞으로 더욱 더 확장 되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. 강 수원, 1977. 최신 담수양어학, 선진문화사, 309.
2. 양 재설, 신 진섭, 이 해근, 1986. 수중 농약 성분이 어류 독성에 미치는 영향 시험, 시험 연구 보고, 농약 연구소, 농촌진흥청, 213-221.
3. Edwards, R. and P. Millburn, 1985. The metabolism and toxicity of septicides to fish, In insecticide(Huston, D.H. and Roberts, T.R. eds.) John wiley & Sons, Chichester, 249-274.
4. Yang, R.S.M., E. Hodgson, W.C. Dauterman, 1971a. In vitro metabolism of diazinon and diazoxon in rat liver, J. Agric. Food Chem., 19, 10-15.
5. Yang, R.S.M., E. Hodgson, W.C. Dauterman, 1971b. In vitro metabolism of diazinon and diazoxon in susceptible and resistant houseflies, 19, 14-19.
6. Benke, G.M., K.L. Cheever, F.E. Mirer, S.D. Murphy, 1974. Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion in sunfish and mice, Toxicology and Applied Pharmacology, 28, 97-109.
7. Wang, C. and S.D. Murphy, 1982. Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides, Toxicology and Applied Pharmacology, 66, 409-419.
8. Kanazawa, J., 1983. In vitro and in vivo effects of organophosphorus and carbamate insecticides on brain acetylcholinesterase activity

- of fresh-water fish, Topmouth gudgeon, Bull. Natl. Agric. Sci., Ser.C, 37, 19-30.
9. Fujii, Y. and S. Asaka, 1982. Metabolism of diazinon and diazoxon in fish liver preparations, Bull. Environm. Contam. Toxicol. 29, 455-460.
  10. Brian, G. Lake, 1987. Biochemical Toxicology - a practical approach, IRL press, 183-213.
  11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J., 1951. A new rapid protein determination using foline's reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-268.
  12. Takimoto, Y., M. Ohshima, H. Yamada, and J. Miyamoto, 1984. Fate of fenitrothion in several developmental stages of the killifish (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13, 579-587.
  13. Bend, J.R., and M.O. James, In Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology, Academic press, New York, 20, 123-135.
  14. Hogan, J.W., 1972. Metabolism of diazinon by fish liver microsomes. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 8, 61-64.