

Endosulfan과 그 분해산물의 Enzyme Immunoassay에 의한 분석법의 개발과 응용

서용택 · 심재한 · 이강봉

Development and Application of Enzyme Immunoassay for Endosulfan Residue Analysis

Yong-Tack Suh, Jae-Han Shim and Kang-Bong Lee

Abstract

An enzyme immunoassay(EIA) was developed for the analysis of insecticide endosulfan and its degradation products. The sensitivity and specificity of the antibody produced were examined. Optimal conditions in the ELISA system for residue analysis were also discussed. A mixed suspension of endosulfan-hemocyanin conjugate(ES-KLH) 1.1 mg/ml and Freund's adjuvant was injected subcutaneously to white rabbits and then collected antisera were tested for titers by indirect ELISA(1/24,000). Because of difficulties in the synthesis of endosulfan peroxidase conjugate, amine derivative of endosulfan-diol was synthesized and it showed 40% of conjugate yields(2mg/ml of conjugate). the highest sensitivity obtained enzyme-conjugate was a concentration of 200ng/ml. The detection limit of endosulfan in ELISA system was 5 ppb on the standard curve. In application of ELISA for residue analysis, the recoveries were really 100% both in the spiked soil and apple sample regardless of endosulfan concentration treated. On the other hand, chlorinated hydrocarbons of similar structure with endosulfan showed low cross-reactivity(2.2%~29.2%).

1. 緒 論

효소 면역 항체법(Enzyme Immunoassay; EIA)은 면역 형광법(Fluorescence Immunoassay)과 함께 1960년대 중반에 개발된 새로운 분석

법인데¹⁾ 이 효소 면역 조직화학적 방법(EIH)은 다른 분야에서도 매우 유용한 것으로 인식되어 최근 그 응용의 폭이 넓어졌다.^{2,3,4,5,6,7,8,9)} 분자량이 작은 분자들의 분석을 위한 면역항체법의 사용은 내분비학이나 임상화학등의 분야로 광범위해지고 있지만

— 본 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 지방대육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.
전남대학교 농과대학 농화학과

Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University Kwangju 500-757, Republic of Korea.

환경독성학 분야로의 응용은 훨씬 뒤떨어진다. 그 이유는 환경화합물들을 아직까지 GC나 HPLC에 의해 적절히 분석할 수 있었기 때문이고 면역항체법의 분석기법이 보통의 환경화학적 분석기법과는 다른 생소한 분야이었기 때문이었다.

광범위하게 사용되는 Thiodna®과 그의 분해산물 잔류 역시 환경 분석화학적 연구에서 지금까지 편리한 분석기법이라고 여겨진 silicagel chromatography와 IRS에 의한 정량적 분석,¹⁰⁾ 그리고 시간이 많이 소모되는 정제단계를 거치는 gas chromatography법¹¹⁾에 의존하여 왔다. 그러나 이제는 간단하고 민감한 방법이 크게 요구되고, 이러한 요구로 인해 대두된 것이 특이한 항체를 사용하고 신속히 분석할 수 있으며 효율적이고 민감한 효소면역항체법이다. 최근에 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)와 같은 면역학적 방법들은 환경 분석화학 분야, 특히 농약에 대한 잔류분석에서 그 응용이 가능하게 되었고 이전보다 더욱 활발한 연구가 진행되고 있다.¹²⁾

본 실험에서는 이 새로운 분석기법의 개발과 응용을 수행하기 위하여 KLH(Keyhole-Limpet Hemocyanin)-endosulfan 결합체를 조제, 이 화합물들을 항원으로 하여 토끼에 대해 면역화하고 그 항체로 competitive ELISA와 indirect ELISA를 실시하였으며 GC에 의한 검출한계와 비교하였다. 또한 유사한 구조의 유기 염소계 농약들과 교차반응성을 조사하여 실제 응용범위를 확인하고자 하였다.

2. 材料 및 方法

2.1 재료

ELISA를 수행하기 위한 microwell plate는 Nunc 96F와 Ratiolab plate를 사용하였고 Coating buffer로는 50mM의 Na_2CO_3 (pH 9.6) 수용액을 사용하였다. PBS-t(phosphate buffered saline with 0.1% Tween 20; pH 7.4)는 NaCl (150mM), KH_2PO_4 (1.4mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (50mM), KCl (0.2g/l)의 조성으로 조제하였고 기질용액은 100mM NaH_2PO_4 와 100mM citric acid를 혼합한 완충용액 (pH 5.0)에

-phenylenediamine (2.5mM)을 용해시키고 0.5 μ l/ml의 비율로 H_2O_2 (30%/ml)를 첨가하여 사용직전에 조제하였다. 면역반응에 이용된 토끼는 암컷으로 면역주사전에 혈청을 채취하여 indirect ELISA로 그 역가검정을 하였고 역가가 1:10이 하인 토끼만 선별하여 면역반응에 이용하였다. 본 실험에 이용된 시약은 완충용액 제조용과 endosulfan 표준품을 제외하고는 Sigma제품을 사용하였다.

2.2 방법

가) Technical endosulfan의 정제

Technical endosulfan (6g)을 30ml benzene에 녹여 탈염소 활성탄 칼럼 (15g, 16 \times 35mesh, 충전 밀도 0.58, 22mm 내경 유리 칼럼)에 흡착시키고 200ml benzene으로 용출시켰다. 용출된 benzene을 농축하여 endosulfan을 결정화 시키고 endosulfan 결정은 benzene-ether (8:2) 용액으로 70°C에서 3회 재결정시켰다.¹⁰⁾ 이 때 얻어진 endosulfan 순품은 4.54g으로 75.7%의 수율을 나타냈다.

나) Endosulfan alcohol의 합성

정제된 endosulfan (1g)과 HCl (20g)을 80°C수조 상에서 2시간 동안 환류시키고 냉각관을 5g의 HCl과 50ml의 증류수로 조심스럽게 세척하였다. 반응액에 2~3방울의 phenolphthalein 용액을 적가하고 5 N-NaOH 용액으로 중화시켰다. 결정은 여과하여 toluene으로 2회 세척하여 건조시키고 건조 후 융점측정과 IRS분석으로 합성을 확인하였다 (Fig. 1). 합성수율은 86%였으며 Chau등의 방법¹⁰⁾에 비해 높은 수율을 나타냈다. Endosulfan의 융점이 84~87°C임에 반해 합성된 endosulfan diol의 융점은 203~205°C였다.

다) Endosulfan-hemisuccinate의 합성^{5,13)}

Succinic anhydride (750mg)를 250mg의 endosulfan diol이 용해되어 있는 dry pyridine 용액 (10ml)에 첨가하여 100~105°C의 유조 (油槽) 상에서 24시간동안 환류시킨 후 농축하여 pyridine을 제거하였다. 합성물은 5ml의 MeOH에 용해하여 HPLC (UV: 254nm) 상에서 endosulfan-hemisuccinate의 합성을 확인하였으며 합성수율은 80% 정도였다. HPLC 분석 조건은 표 1에 나타났다.

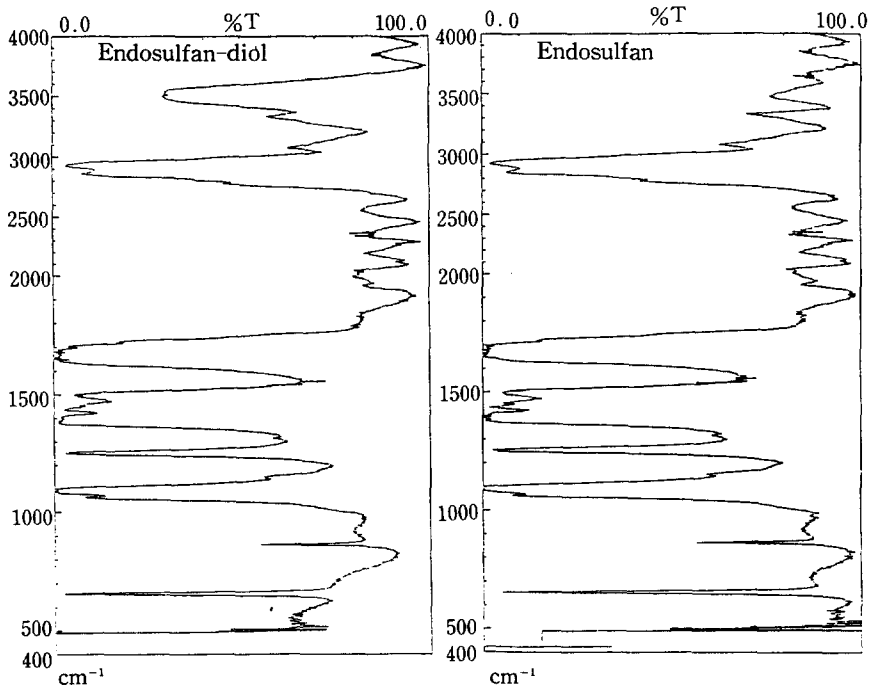


Figure 1. Examination of synthetic endosulfan - diol by IRS

Table 1. Condition of HPLC Analysis for Endosulfan-Hemisuccinate

Detector	: UV Detector (254nm, Waters 486 tunable absorbance detector)
Column	: Reverse phase C-18 (μ -bondapak, 10 micron) 3.9mm \times 30cm (ID) Stainless steel Particle Size/Shape : 10 μ /Irregular Nominal pore Size (Range) : 125 (30-300) Å Carbon 10% Load, End Capped.
Mobile phase	: 10% Deionized Water in MeOH
Mobile phase Delivery System & Injector	: Waters 510 pump
Flow Rate	: 1.0ml/min
Integrator Attenuation	: 128
Injection Volume	: 20 μ l
Analysis Time	: 5min

라) 항원의 조제

항원이 면역동물의 체내에서 면역반응을 야기시킬 수 있고 면역기간동안 체내에 잔류할 수 있게 하기 위해서 hapten인 endosulfan에 활성 ester group을 형성시켜 담체단백질 (KLH)을 결합시키고자 하였다. 활성 ester group을 조제하기 위하여 endosulfan-hemisuccinate (50mg)를 1ml의 DMF (dimethyl formamide)에 용해시켜 30mg의 dicyclohexyl carbodiimide와 35mg의 N-hydroxy succinimide를 첨가하였다. 반응액을 25°C에서 1시간 배양한 후 침전된 dicyclohexyl urea를 원심분리로 제거하고 3.5ml의 DMF와 2ml의 NaHCO₃ (0.1M) 혼합액에 50mg의 KLH를 용해시켜 상기의 반응액에 적가시키면서 교반하였다. 반응이 완결된 후 4°C에서 PBS-t에 대해 24시간 동안 투석하고 -20°C에서 면역주사기간까지 보관하였다. 조제된 항원의 단백질 함량은 Bradford법¹⁾

으로 측정하였으며 면역에 이용할 항원용액은 1.1 mg/ml의 단백질 함량을 지닌 용액으로 희석하였다.

마) 면역화와 항체형성

조제된 endosulfan-hemocyanin결합체를 0.5ml의 PBS-t에 용해하여 0.5ml의 Freund's complete adjuvant와 혼합시켰다. 혼합은 2개의 주사기를 teflon tube로 연결하여 실시하였고, 혼합이 완료된 항원액을 토끼의 목 부분에 피하주사하였다. 최초의 주사로부터 3주일 후에 다시 같은 양의 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 면역촉진 주사하였고, 그로부터 3주일 후에 같은 촉진주사를 실시하였다. 최종 주사 2주후에 토끼의 이(耳) 정맥으로부터 항혈청을 채혈하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 방치후 분리된 항혈청을 원심분리로(10,000g, 15분) 제거하고, 0.1ml씩 분리하여 -20°C에서 분석시까지 보관하였다. 항혈청의 역가검사는 indirect ELISA로 실시하였는데 이때는 항원과 다른 담체단백질인 BSA(Bovine Serum Albumin)와 endosulfan의 결합체를 조제하여 실시하였다. Endosulfan-BSA 결합체의 조제를 위해서는 Samokin과 Filimonov¹⁵⁾의 방법에 따라 BSA를 다음과 같이 succinylation시켰다.

BSA 100mg을 20ml의 0.1M borate 완충용액(pH 3.0)에 용해시킨 후 550mg의 succinic anhydride를 소량씩 30분동안 첨가하면서 교반하였다. 이 때의 pH는 3N NaOH를 첨가하면서 9.0~9.3 사이를 유지시켰다. 반응후 5L의 0.01M triethylamine 용액에 대해 3회 투석하고 동결건조하였다. 동결건조된 BSA를 DMF에 용해시킨 용액(14.6mg/ml, 20ml) 100 μ l에 4%(v/v) N-methyl morpholine(2 μ mol)이 용해된 DMF용액 5.6 μ l와 4%(v/v) isobutylchloroformate가 용해된 DMF용액(2 μ mol) 6.7 μ l를 0°C ice bath상에서 혼합하여 15분간 배양하고 -15°C에서 30분간 재배양하였다. 배양후 상기 반응액 11.2 μ l를 700 μ l의 DMF에 용해되어 있는 endosulfan diol(0.5 mg)에 첨가하고 PBS-t에 대해 48시간 투석한 후 -20°C에 저장하였다.

바) indirect ELISA에 의한 항체의 역가검정

96-well microtiter plate(Nunc 96F)에 endosulfan-BSA 결합체 200 μ l를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 배양하여 항원을 부동화시켰다. 항원을 부동화시킨 후에 PBS-t로 2회 세척하고 PBS 완충용액에 연속 희석된 항혈청액(1:2000)을 200 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 항혈청액을 제거하고 다시 PBS-t로 3회 세척한 후 anti-rabbit-Ig G-antibody peroxidase conjugate(1:1000) 용액(200 μ l)을 첨가하고 30분간 25°C에서 배양하였다. 배양후 PBS-t로 3회 세척하고 o-phenylene diamine 용액을 기질로 첨가하고 30분 후에 60% H₂SO₄용액 50 μ l씩을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 microtiter plate는 492nm에서 흡광도를 측정하여 그 역가를 결정하였다.

사) Endosulfan-peroxidase결합체 제조

Endosulfan diol(100mg)을 1ml의 DMF에 용해하여 carbonyldiimidazole(50mg)이 용해되어 있는 1ml의 DMF와 혼합하고 이를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 2ml의 ethylenediamine을 첨가하여 25°C에서 1시간 동안 재배양하였다. Peroxidase의 산화처리에는 Nakane와 Kawaoi의 방법¹⁶⁾에 따라 NaIO₄를 이용하여 실시하였으며 산화반응을 완결시킨 후에 5mg의 peroxidase를 4mg의 endosulfan amine 유도체가 용해되어 있는 3ml의 DMF/phosphate buffer(200mM, 1:1) 용액에 3시간 30분 동안 첨가하면서 충분히 교반시켰다. 최종적으로 endosulfan-enzyme 결합체를 2% DMF가 함유된 PBS-t에 대해 투석하고 bradford법에 의한 단백질 정량을 실시하여 -20°C에 보관하였다.

아) Endosulfan 잔류량 분석을 위한 competitive ELISA

Competitive ELISA는 Van Weeman과 Schnuurs등의 방법⁸⁾에 따라 실시하였다. Microtiter plate에 200 μ l의 항체 용액을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 배양하고 PBS-t로 3회 세척하였다. 세척 후에 blocking 완충용액인 1% BSA/PBS(100 μ l)를 첨가하여 37°C에서 1시간 재배양

하고 PBS-t로 3회 세척하였다. 상기 plate에 150 μ l의 시료액(endosulfan 함유액)과 50 μ l의 endosulfan-peroxidase conjugate(200ng/ml) 용액을 동시에 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하고 결합되지 않은 conjugate는 PBS-t로 3회 세척하여 제거하였다. 여기에 200 μ l의 o-phenylenediamine 기질용액을 첨가하고 30분동안 25°C에서 배양하였으며 50 μ l의 60% H₂SO₄ 용액의 첨가로 반응을 종결시켰다. 각 well의 O.D 값은 492nm(Titertek Multiscan MC Spectrometer, U.S.A)에서 측정하고 O.D 값을 표준 검량선에 비교하여 endosulfan의 잔류량을 결정하였다.

자) ELISA를 이용한 회수율 시험

10 ppb와 100 ppb의 농도로 endosulfan이 처리된 토양과 사과 시료(10g)에 각각 50ml의 DMF를 첨가하여 1시간동안 교반시킨 후 Büchner 깔대기 상에서 여과하고 여액은 100ml용량플라스크에 모아 표선까지 DMF로 채웠다. 용량 플라스크의 추출액을 다른 정제 과정 없이 적당한 농도로 물을 사용해 희석하고 앞서 말한 competitive ELISA과 정대로 실시하여 검량곡선과 비교, 잔류량을 결정하였다.

3. 結果 및 考察

Endosulfan alcohol의 합성과정에서 LiAlH₄와 tetrahydrofuran(THF)을 이용한 환원반응은 까다로울 뿐만 아니라 수율도 낮은 편이었다. 그래서 산 가부분해 방법¹⁰⁾을 이용하여 상당히 높은 수율과 순도를 얻을 수 있었다. Endosulfan diol과 succinic anhydride의 반응으로 생성된 endosulfan-hemisuccinate는 HPLC로 분석하였다. 항원으로 사용된 Endosulfan-hemocyanin conjugate에 대한 항혈청의 항체 역가는 1:24,000의 높은 값을 나타냈는데 이로 인해 competitive ELISA를 이용한 endosulfan 잔류 분석시에는 항혈청과 coating buffer를 1:2,000의 비율로 희석하여 사용할 수 있었다. Endosulfan-peroxidase(HRPO) conjugate의 조제시에는 endosulfan의 강한 소수성 때문에 담체단백질이나 효소 역시 물에 대한 불

용성이 되어 반응과정중에 효소의 불활성화나 침전이 발생하는 결과가 되었다. 이러한 효소의 불활성화는 endosulfan의 amine 유도체를 합성함으로써 해결되었고 이로 인해 endosulfan diol의 소수성이 감소되었다. 그래서 endosulfan diol의 amine 유도체와 NaIO₄ 산화 반응을 거친 peroxidase의 결합은 단백질 함량을 기준으로 약 40% 정도의 합성수율을 보였다. 그러나, 이러한 방법은 결합되지 않은 peroxidase의 양이 여전히 많다는 점에서 endosulfan-peroxidase conjugate의 용해도와 결합수율을 증가시키는 방법에 대해 더욱 연구가 필요하다고 생각되었다. 한편으로는 endosulfan-peroxidase conjugate의 낮은 용해성과 활성에도 불구하고 이러한 낮은 용해성이 항원에서는 오히려 면역동물 체내에서 높은 항체 생성효과를 갖게 해 준다는 사실¹⁵⁾이 항체의 역가로서 입증되었다.

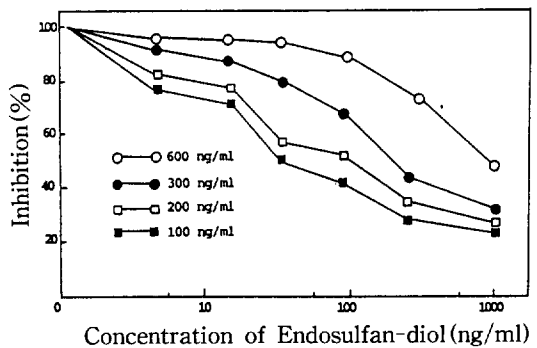


Figure 2. Effect of various endosulfan-enzyme conjugate concentration on the sensitivity of competitive ELISA for endosulfan

Endosulfan-peroxidase conjugate의 농도에 따른 민감도의 효과는 그림 2에 나타났다. 가장 높은 민감도는 100ng/ml이었으나 흡광도의 절대값이 너무 낮았으므로(100% 최대 흡광도; 0.26) 200ng/ml를 사용하여 충분히 높은 흡광도(100% 최대 흡광도; 0.75)와 민감도를 얻을 수 있었다. 결과적으로 competitive ELISA를 수행하기 위해 1회 시험/시료에 사용된 conjugate의 양은 약 10ng이었다. 그림 3에 competitive ELISA를 수행하기 위한 Endosulfan의 검량선을 나타냈는데 여기서 민감도는 5ng.ml, 즉 5ppb까지 검출이 가능했으며 검출

최대 농도는 50% 발색저해도에 비교해 약 0.5ppm을 나타냈다. 한편 ELISA를 endosulfan의 잔류분석에 이용하기 위해서는 endosulfan의 유도체와 그 분해산물들에 대한 민감도 역시 조사해야 하므로 α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan-ether, endosulfan diol, technical endosulfan에 대해서 그 민감도를 조사해 본 결과(표 2) endosulfan diol이 105.20%로 가장 높았고 endosulfan ether가 57.14%로 가장 낮았으며 또한 β -endosulfan이 α -endosulfan보다 그 민감도가 뛰어났다. Endosulfan diol이 endosulfan에 비해 그 민감도가 더 높은 이유는 endosulfan diol을 항원 조제시 hapten으로 사용하였기 때문이라고 추측되었다.

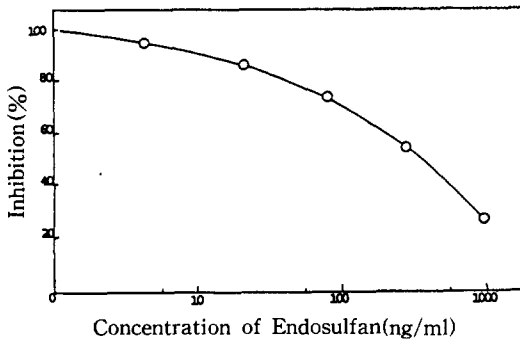


Figure 3. ELISA standard curve for endosulfan

Table 2. Sensitivity of EIA for Endosulfan Degradation Products with Regard to Endosulfan*

Degradation Product	Sensitivity (%)
Endosulfan	100
Endosulfan-diol	105.20
Endosulfan-ether	57.14
α -Endosulfan	61.53
β -Endosulfan	82.47

*Sensitivity is expressed as that concentration of endosulfan causing a 50% inhibition of binding $\times 100$, divided by the concentration of the endosulfan degradation product (50% inhibition conc.)

아울러 유사한 구조의 유기염소계농약등에 대해서도 교차 반응성(cross-reactivity)을 조사한 결과(그림 5) captan, γ -BHC, DDT, 2,4-D, aldrin 등은 상대적으로 낮은 교차 반응성을 보였는데 각각 2.2%, 3.6%, 12.9%, 13.7%, 15.2%였으며 chlorothalonil과 captafol은 각각 22.04%와 29.23%의 교차 반응성을 나타냈다.

이 교차 반응은 endosulfan이 존재하지 않은 well에 각 약제를 첨가하여 항체와 결합할 수 있는 능력을 발색도 비교로 산출하였다. 이같이 다른 약제에 대한 항체의 교차 반응적 특성은 각각 장단점을 지니는데, 그 장점은 포장 시험에서 교차 반응성을 가지는 약제의 존재 유무를 동시에 파악할 수 있다는 것이고 단점은 endosulfan이 교차 반응성을 나타내는 다른 약제와 혼합되어 있을 때 endosulfan의 정확한 정량이 어렵다는 것이다. 이러한 정량적인 문제를 해결하기 위해서는 단클론 항체(monoclonal antibody)의 조제¹⁷⁾가 필요할 것이다.

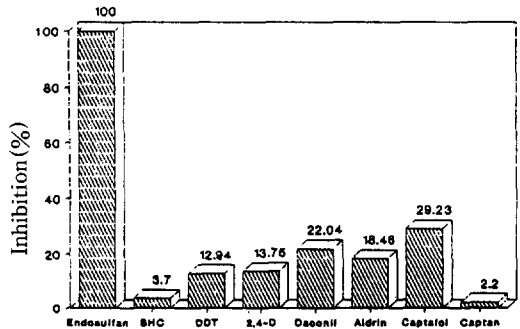


Figure 4. Cross reactivity of endosulfan to other chlorinated pesticides

ELISA 기법을 endosulfan의 잔류분석에 응용하는 단계로 토양과 사과시료를 선택하여 그 회수를 측정하였다. 공시토양과 사과에 각각 처리한 10 ppb와 100ppb의 회수율을 ELISA 검량선에 비교한 결과(그림 5, 표 3) 토양에서는 10 ppb 처리구에서 97.45%, 100 ppb 처리구에서는 98.40%를 나타냈고 사과에서는 각각 97.74%, 100.55%로 두 시료 모두 농도에 관계없이 100%에 가까운 회수율을 나타냈다. 이 결과는 ELISA기법이

endosulfan의 잔류 분석에 적용될 수 있음을 시사하고 있다.

다른 한편으로는 ELISA기법과 GC분석 사이의 검출한계를 조사하여 두 방법의 민감도를 비교하였는데 GC의 검출한계가 10 ppb인데 반해 ELISA에서는 5ppb의 검출한계로 ELISA가 GC-ECD보다 endosulfan의 검출능이 뛰어난을 나타냈으며 이러한 ELISA기법이 사과 및 토양 중에서 endosulfan과 그 분해 산물의 잔류량 분석에서는 간편하고 정확한 방법임을 나타냈다. 이 방법의 사용으로 동시에 많은 양의 시료를 분석할 수 있었으며 훨씬 간편하게 조작할 수 있었다. 결과적으로 endosulfan의 잔류량 분석을 위한 ELISA 기법을 환경화학적 연구에서 요구되는 강력한 분석수단으로 이용될 수 있으며 아울러 다른 농약들의 잔류 분석을 위한 새로운 ELISA 기법의 개발 역시 계속적으로 수행되어야 한다고 생각되었다.

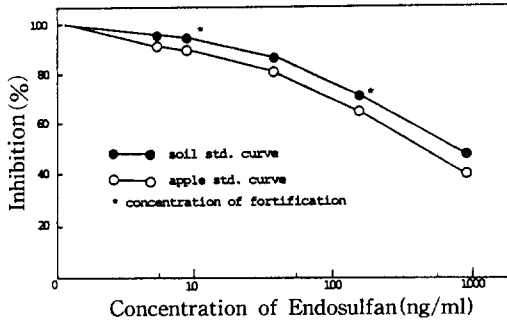


Figure 5. ELISA curves for recovery test in soil and apple

Table 3. EIA Recovery Values for Soil and Apples

Spiking Level (ppb)	Recovery (%)	
	Soil	Apple
10	97.45	97.75
100	98.40	100.55

4. 要 約

Endosulfan을 복잡한 시료조제과정이 필요치 않은 ELISA기법으로 분석법을 정립하고자 하였다. 항원조제를 위한 endosulfan alcohol의 합성은 86%의 수율을 보였고 endosulfan hemisuccinate는 HPLC로 그 합성을 확인하였다. Endosulfan-hemocyanin(KLH) 결합체의 수율은 3.57mg/ml였으며 이 항원은 1.1mg/ml로 희석하여 토기에 대해 피하주사로서 면역시켰고 8주 후에 채혈된 항체 용액은 indirect ELISA로 1 : 24,000의 역가를 결정하였다. 또한 endosulfan-peroxidase 결합체는 약 40%의 결합수율인 2mg/ml로 조제되었으며 이 결합체는 높은 흡광도와 민감도를 나타내는 200 ng/ml의 농도로 사용하였다. ELISA 분석에 의한 endosulfan의 검출한계는 5 ppb였으며 분해산물인 endosulfan ether와 endosulfan alcohol의 endosulfan 항체에 대한 민감도는 각각 57.14%, 105.20%였다. 유사한 유기염소계 농약들에 대한 교차반응성은 captan이 2.2%로 가장 낮게 나타났고 Captafol이 29.33%로 가장 높게 나타났다. ELISA에 의한 잔류 분석을 토양과 사과에서 응용 시험한 결과 토양에서는 10 ppb와 100 ppb에서 각각 97.45%, 98.40%의 회수율을 보였고 사과에서는 각각 98.40%, 100.55%의 회수율을 나타냈다.

5. 參 考 文 獻

- Engvall, E and Perlmann, P.(1971) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Immuno Chemistry, 8, 871~876.
- Clyne, D.H and Pollak, V.E.(1973) : Antibody Enzyme Conjugates : The preparation of Inter-Molecular Conjugates of Horseradish Peroxidase and Antibody and their Use in Immunohistology of Renal Cortex, J.Histochem., 21(3), 233~239.
- Jung, F; Meyer, H.H.D; Hamm, R. T.(1989) Development of a Sensitivie

- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Fungicide Fenpyropimorph, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 1183~1188.
4. Kelly, M.M. ; Zahnow, E.W ; Petersen, W.C ; Toy, S.T.(1985) Chlorosulfuron Determination in Soil Extracts by Enzyme Immunoassay, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 962~972.
 5. Newsome, W.H. ; Shields, J.B.(1985) An enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Metalaxyl in foods., *J.Agric. Food Chem.*, 33, 528~535.
 6. Singh, P ; B.P. ; Sharkov, N.(1989) Enzyme Immunoassay for Screening of sulfamethazine in Swine, *J.Agric. Food Chem.*, 37, 109~120.
 7. Van Emon, J ; Hammock, B.D.(1986) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Paraquat and its Application to Exposure Analysis. *Anal. Chem.*, 58, 1866~1875.
 8. Van Weeman, B.K ; Schnuurs, A.H.(1971) Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates, *FEBS Lett.*, 15, 232~241.
 9. Wing, K.D. ; Hammock, B.D.(1988) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Analysis of the Thiocarbamate Herbicide Molinate, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 863~874.
 10. Chau, A.S.Y.(1969) : Derivative Formation for the confirmation of Endosulfan by Gas Chromatography, *J.AOAC*, 52(6), 1240~1248.
 11. Zweig, G ; Archer, T.E.(1960) Quantitative Determination of Thiodan by Gas Chromatography, *J.Agric. Food Chem.*, 8, 190~21.
 12. Jensen, R.H ; Watkins, B ; Van Emon, J ; Bigbee, C ; Stanker, L.H.(1989) An Immunoassay for Phrethroids : Depection of permethrin i Meat, *J.Agric. Food Chem.*, 37, 834~840.
 13. Hammock, B.D. Li, Q.X and Braun, A. L.(1989) Use of Immunochemical Technics for the Analysis of Pesticids, *Pestic. Sic.*, 26, 303~310.
 14. Bradford, M.M.(1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248~254.
 15. Samokin, G.P ; Filimonov, J.N.(1985) Coupling of Peptides to Protein Carriers by Mixed Anhydride Procedure, *Anal. Biochem.*, 145, 311~322.
 16. Nakane, P.K ; Kawaoi, A(1974) Peroxidase-Labeled Antibody ; A New Method of Conjugation, *J. Histochem.*, 22, 1084~1091.
 17. Harrison, R.O, Colon Brimfield, A.A. and Nelson, J.O.(1989) : Development of a Monoclonal Antibody Based Enzyme Immunoassay Method for Analysis of