

영어중 Endosulfan의 殘留分析을 위한 Radioimmunoassay(RIA)의 開發

李康奉·沈在漢·徐鎔澤

Development of Radioimmunoassay(RIA) for Residue Analysis with Endosulfan in Water and Carp(*Cyprinus carpio L.*)

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

Abstract

The established methods in the residue analysis of endosulfan require an extensive sample clean-up prior to quantification by relatively complex equipment. A radioimmunoassay(RIA) provides a simple procedure with theoretically higher sensitivity and specificity necessitating only a minimum of sample clean-up. Endosulfan-specific antibodies were developed in rabbits by using a bovine serum albumin(BSA) conjugate wherein the alcohol form of endosulfan was multiply bound to the protein via succinylation. Produced antibodies showed the high titers to endosulfan-BSA(1 : 32,000). An RIA method was developed in water and carp by using ¹⁴C-labeled endosulfan as a tracer. The lowest detection amount of endosulfan was 1 ng in the liver, kidneys, gut and water samples, and 3 ng in the whole body sample of carp without any clean-up, corresponding to 0.1 ppb of endosulfan.

緒論

광범위한 非浸透性 殺蟲劑인 endosulfan(Thio-dan, 6,7,8,9,10,10-hexa-chloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahy-

dro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxa thiepin 3-oxide)은 有機鹽素系 農藥들과 cyclodiene계 農藥들의 使用中止와는 달리 계속해서 使用되고 있는 農藥이다. 有機鹽素系 農藥들에 대한 殘留分析法은 오래전

全南大學校 農科大學(College of Agriculture Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)
“본 연구는 한국학술진흥재단의 1992년도 자유공모과제 지원에 의해 수행되었음.”

부터 많은 研究가 진행되어 왔다. 이 중에서 endosulfan의 경우에는 GLC(gas liquid chromatograph)에 의한 機器分析法이 널리 알려져 많은 研究者들이 이 方法을 이용하여 왔다¹⁾. Rao²⁾는 endosulfan을 魚類로부터 效率的으로 分析하기 위해 새로운 clean-up 方法을 소개하였고 Chau와 Therry¹⁾는 α -와 β -異性體를 單一成分으로 分析하기 위해 diacetate form으로의 誘導體化 過程을 소개하였다. Kavadia와 Noor³⁾는 옥수수에서 endosulfan의 残留量을 報告하였고 Moats⁴⁾는 野菜와 肉類에서의 残留分析法을 소개하였다. 또한 Pokharkar와 Deth⁵⁾는 果實에서의 残留分析과 半減期, 洗滌效果를 研究하였으며 한편 5.6 kg/ha의 endosulfan을 土壤에 處理하였을 때 약 60%가 水分과 함께 土壤 속으로 浸透되고 處理된 量의 0.6%가 水中으로流失된다는 報告⁶⁾ 등도 있다. 이 藥劑는 水中으로 浸透되면 ppb濃度로도 충분히 그 毒性을 나타내는 魚毒性 農藥으로 알려져 있다.

하지만 GLC에 의한 分析方法은 그 方法에 限界가 있어 아주 낮은 檢出界限까지 檢出이 힘들고 試料抽出 및 精製過程이 복잡하여 效率적인 방법이라고 할 수는 없는 실정이다. 이러한 短點을 극복하기 위해 開發된 새로운 分析法이 免疫測定法(Immunoassay)이고 이러한 分析法에 의한 새로운 分析法의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 일반적으로 免疫測定法에 의한 農藥의 残留分析은 GLC나 HPLC를 이용한 分析보다 敏感度나 檢出能, 特異性이 훨씬 높은 것으로 알려져 있으며⁷⁾ 分析時間이 적게 소모되고 간단할 뿐만 아니라 再現性과 應用範圍가 크기 때문에 残留分析에 매우 有用한 方法이라 할 수 있다.

현재까지 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)나 radioimmuno assay(RIA)에 의해 分析되어진 農藥은 약 40여 種인데 이 중 RIA에 의해 分析되어진 化合物은 benomyl⁸⁾, parathion⁹⁾, paraquat¹⁰⁾, 2,4-D⁷⁾, IAA¹¹⁾, PCBs¹²⁾, chloramphenicol¹³⁾ 등으로 ELISA에 의한 것보다 그 種類는 많지 않다.

초기에 RIA는 ELISA보다 그 敏感度와 正確性이 뛰어난 方法으로 널리 사용되었으나 放射性 同位元素의 사용으로 인한 露出危險性 때문에 酶素을 사용하게 되었고 그로 인해 最近에는 ELISA 技法을 많이 사용하고 있는 실정이다. 하지만 이러한 RIA나 ELISA 技法 모두가 1980 年代 들어 農藥分野에 시도되었던 方法으로 두 가지 技法 모두가 유용하게 農藥의 残留分析을 위해 사용될 수 있을 것이다.

本研究에서는 既存의 分析方法을 이용해서는 供試魚인 英어와 水中에서 endosulfan의 残留量을 測定하기 어렵다는 점을 감안하여 새로이 RIA에 의한 残留分析法을 開發하여 이를 ELISA에 의한 分析法, GLC에 의한 分析法과 比較検討하고자 하였다.

材料 및 方法

1. 材料

¹⁴C-endosulfan α -isomer(2.96 MBq/mg, 99 % up)는 International Isotopes Münich(Germany)로부터 구입하였고 bovine serum albumin(BSA), triethylamine, dimethylformamide(DMF), isobutylchloroformate(IBC), N-methylmorphorine, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, keyhole limpet hemocyanine(KLH), charcoal (RIA用), dextran, o-phenylene diamine은 Sigma 제품을 사용하였고 그밖의 試藥은 特級을, 용매(methanol, acetone, chloroform, hexane)는 農藥殘留分析用 또는 HPLC用을 사용하였다.

Gas chromatograph는 ECD를 장착한 Pye Unicam 304 모델을, high performance liquid chromatograph는 Waters 510 pump와 486 UV tunable detector를 사용하였으며 liquid scintillation counter(LSC)는 LKB 모델을 사용하였다.

2. 方法

i) 抗原의 調劑

Endosulfan에 대한 抗體 生產을 위해 사용된 抗

原은 endosulfan-BSA conjugate 였으며 Samokin 과 Filimonov¹⁴⁾의 方法에 따라 다음과 같이 BSA를 succinylation 시켜 hapten인 endosulfan diol과 conjugation 시켰다. BSA(100 mg)를 20 ml의 0.1 M borate 緩衝溶液(pH 9.3)에 溶解시킨 후 550 mg의 succinic anhydride를 소량씩 30 분 동안 添加하면서 교반하였다. 이때의 pH는 3N NaOH 水溶液을 이용하여 9.0–9.3 사이를 維持시켰다. 反應 후 0.01 M triethylamine 溶液에 대해 3회 透析하고 凍結乾燥하였다. 동결건조된 BSA(14.6 mg/ml)를 DMF (20 ml)에 溶解시키고 이 중 100 μl를 4 % (v/v) IBCF가 溶解된 DMF 溶液(6.7 μl)과 4 % (v/v) N-methylmorphorine이 溶解된 DMF 溶液(5.6 μl)에 添加하여 0 °C의 ice bath상에서 15分間 培養하고 계속해서 –15 °C에서 30 分間 再培養하였다. 培養後 上記 反應液 11.2 μl를 endosulfan diol(0.5 mg)이 溶解되어 있는 DMF 溶液(700 μl)에 添加하고 phosphate buffered saline-Tween 20(PBS-t)에 대해 48 時間 동안 透析한 후 –20 °C에 保管하였다.

2) 免疫化와 抗體의 生產

調剤된 抗原은 蛋白質 含量으로 1 mg/ml이 되게 0.14 N NaCl 溶液에 회석하여 Freund's complete adjuvant(1 ml)와 1:1로 混合하여 emulsion mixture를 調剤하고 이를 生後 4 個月 이상된 집토끼(♀, 평균체중 8.4 kg)의 등과 목부분에 5–8 部位로 나눠 皮下注射하였다. 주사 3 주 후에 다시 抗原을 Freund's incomplete adjuvant와 混合하여 같은 方式으로 注射하였다. 이 最初의 免疫促進注射 이후로는 每 3 週 間隔으로 면역촉진주사를 實施하였으며 每 注射 1 週日 後에는 토끼 귀의 靜脈으로부터 小量의 血液을 採取하여 抗體의 生成을 確認하였다. 最終採血은 最初의 注射로부터 14 주 후에 實施하였으며 採血한 抗血清液은 4 °C에서 하룻밤 放置하여 血清을 分離하고 分리액은 다시 원심분리(5,000 rpm, 15분)하여 그 上澄液을 抗體原으로 사용하였다.

3) 抗體의 力價檢定

Endosulfan-BSA에 대해 生成된 抗體의 力價檢定은 indirect ELISA와 double immunodiffusion (DID), Western blot으로 確認하였다. Indirect ELISA는 李 등¹⁵⁾의 方法에 따라 實施하였으며 DID는 Catty¹⁶⁾의 方法에 따라, Western blot은 Towbin¹⁷⁾의 方法에 따라 實施하였다. 여기서 indirect ELISA에 사용되는 被覆抗原은 李 등¹⁵⁾과 같은 過程으로 合成한 endosulfan-keyhole limpet hemocyanin(KLH) conjugate를 사용하였다.

4) Dextran-coated charcoal(DCC)의 調剤

RIA 過程에 사용되는 DCC는 Kahn 등¹⁸⁾의 方法에 따라 250 mg의 RIA 用 活性炭과 25 mg의 dextran을 100 ml의 PBS에 混合시키고 여기에 0.1 g의 gelatin을 添加하여 잘 混合하여 製造하였다. 이 DCC는 1 週日 단위로 새로이 調剤하여 사용하였으며 평상시에는 4 °C에서 保管하다가 사용하기 전에는 0 °C로 冷却시켜 사용하였다.

5) 잉어에서 endosulfan의 抽出

잉어의 各 組織(肝, 腎臟, 中臟)과 體重을 測定한 후 無水 Na₂SO₄(組織의 2 倍量)와 MeOH(組織의 5 倍量)을 이용하여 glass homogenizer에서 마쇄하여 30 分間 振湯抽出하였다. 抽出液은 Büchner 箔 대기(Whatman No. 60)에서 濾過하여 濾液을 減壓濃縮하고 最終容量은 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 溶解하여 5 ml로 하였다. 全體 몸통시료에 대한 濾液은 完全濃縮하여 hexane으로 再溶解한 후 Florisil column(5 g, 20 × 450 mm)에서 精製[3 % acetone/hexane(v/v)]하여 最終溶量을 20 ml로 하여 RIA 分析에 사용하였다.

6) Radioimmunoassay(RIA)

非標識 endosulfan의 標準品 또는 試料液(100 μl, DMSO)을 RIA 用 試驗管(10 × 75 mm)에 添加하고 抗血清液(200 μl, 1:1,000)을 添加하여 4 °C

에서 1 時間 동안 培養하였다. 培養 후 ^{14}C -endosulfan /DMSO(0.05 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 100 μl)를 添加하여 4 °C에서 2 時間 동안 再培養하였다. 培養液에 DCC(500 μl)를 添加하여 20 分동안 室溫에서 培養한 후 1,500 rpm으로 10 分間 遠心分離하여 上澄液(200 μl)을 조심스럽게 取하여 LSC로 計測하였다. RIA 過程은 Fig. 1에 圖示하였다.

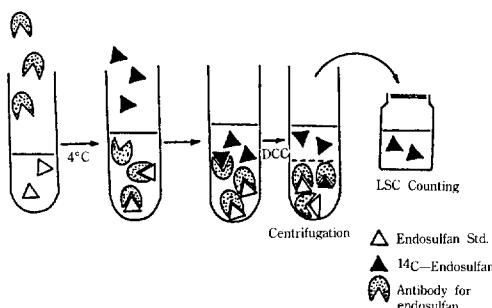


Fig. 1. A protocol of endosulfan radioimmunoassay.

7) 回收率 試驗 및 檢出限界

잉어의 各 組織과 전체 몸통의 마쇄액에 acetone에 溶解시킨 endosulfan 標準溶液을 試料 무게에 대해 각 0.5, 0.1, 0.05, 그리고 0.01 ppm이 되게 處理한 후 上記 抽出方法과 RIA 過程에 따라 分析하여 標準檢量線上에서 그 回收率을 計算하였다. 또한 RIA에 의한 endosulfan 分析法의 檢出限界는 最小 檢出量과 試料 稀釋容量을 이용하여 다음과 같이 計算하였다.

$$\text{檢出限界} (\text{ng/ml}) = \text{MA} \times (\text{FD} / \text{SV} \times \text{SW})$$

여기서 MA는 標準檢量線 上에서 linearity가 있으며 blank와 區別되는 最小 檢出量(ng)을 말하며 FD는 試料의 最終 稀釋容量(ml), SV는 RIA 分析을 위해 사용된 試料의 부피, SW는 最初試料의 무게(g)를 말한다.

8) GC-ECD 및 ELISA에 의한 殘留분석

GC-ECD에 의한 endosulfan의 殘留분석은 Rao²⁾

의 方법에 따라 실시하였고 ELISA에 의한 殘留분석은 李 등¹⁵⁾의 方법에 따라 실시하였다.

結果 및 考察

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의한 endosulfan의 殘留分析法¹⁵⁾에서와 마찬가지로 抗原을 調劑하고 토끼에 대해서 免疫注射를 실시하여 endosulfan-BSA에 대한 抗體를 生產하였다. 生產된 抗體는 李 등¹⁵⁾의 方法에 따라 indirect ELISA를 실시하여 그 역가를 調査하였고 DID(double immuno diffusion)와 western blotting으로 재확인하였다. Fig. 2에는 western blotting으로 抗體의 역가를 확인한 그림을 나타냈는데 BSA만을 반응시킨 對照區에서는 아무런 band도 보이지 않았다.

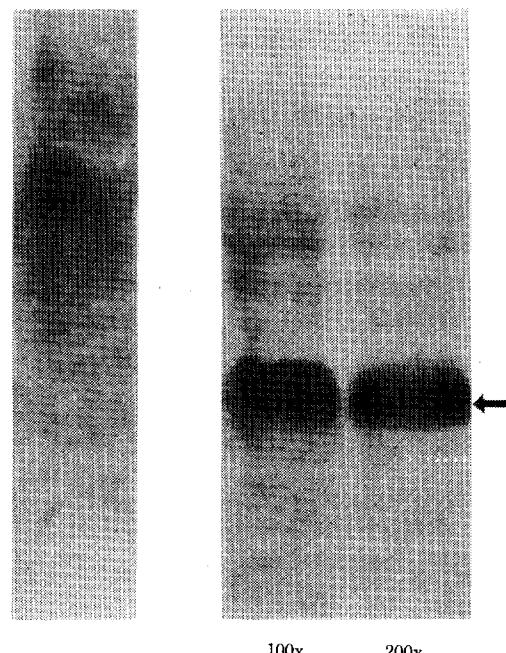


Fig. 2. Western blotting pattern of endosulfan-BSA to confirm the antibody activity for endosulfan.

으나 endosulfan-BSA를 100배, 200배 稀釋시킨 抗體와 各各 反應시킨 領域에서는 뚜렷한 역가를 가지는 것임을 알 수 있었다. DID에 의한 抗體의 역가 調査結果는 Fig. 3에 나타냈는데 抗體를 각각 4배, 16배, 32배 稀釋하여 抗原과 反應시켰을 때 뚜렷한 免役沈降線이 形成됨을 볼 수 있었다. 이로써 endosulfan-BSA에 대해 生成된 抗體는 endosulfan에 대해 역가를 지님이 확인되었다. 한편, indirect ELISA를 통해 이 抗體의 反應力價는 1:32,000임을 確認하였다.

最適의 RIA 分析 條件을 決定하기 위해 調劑된

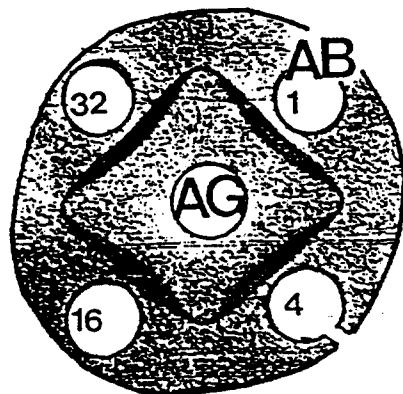


Fig. 3. Double immunodiffusion pattern of the antiserum against the immunogen.

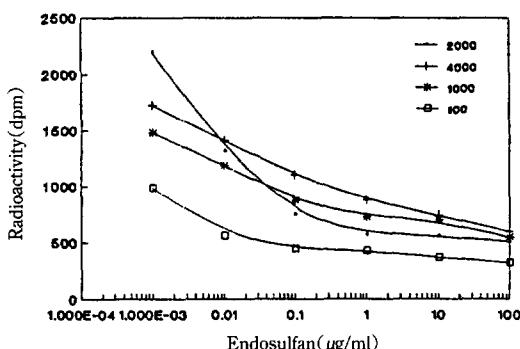


Fig. 4. Antiserum dilution curves for endosulfan.

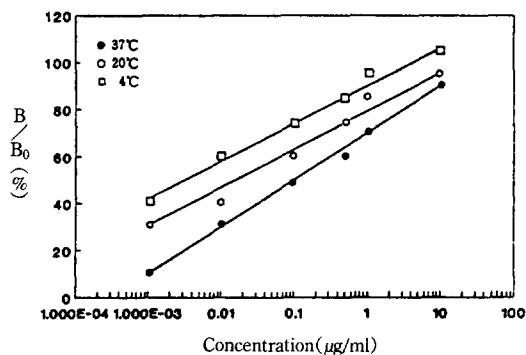


Fig. 5. Effect of the varying incubation temperatures on the radioimmunoassay of endosulfan.

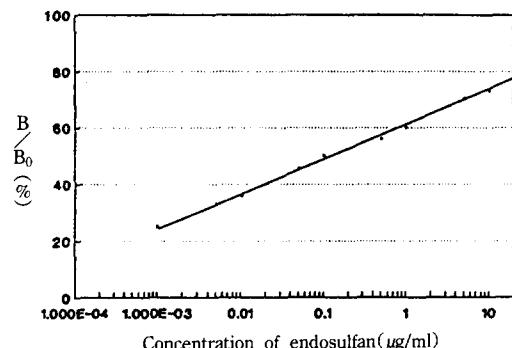


Fig. 6. A standard calibration curve of endosulfan for RIA.

抗體의 最適稀釋倍數를 調査하여 Fig. 4에 나타냈다. 여기에서 抗體를 100배, 1000배, 4000배 稀釋하여 RIA를 실시한 경우에는 endosulfan의 濃度에 대해 그 기울기 값이 너무 낮아 RIA 分析에 적절치 못한 것으로 나타났고, 2000배 稀釋한 抗體의 경우에는 그 기울기나 檢出領域이 適切하여 本 實驗에서의 RIA를 위한 抗體의 稀釋倍數로 결정하였다. RIA 실시의 첫 단계인 endosulfan이 함유되어 있는 試驗管에 抗體(1:2000)를 添加한 후의 培養反應에서 最適培養溫度를 調査한 結果를 Fig. 5에 나타냈다. 培養溫度는 4 °C나 20 °C, 37 °C에서 모두 적절한 結果를 보였으나 4 °C의 培養時 B/B_0 (비결

Table 1. Cross-reactivity and I_{50} values on the other pesticides and metabolites with the antiserum of endosulfan.

Compound	Structure	I_{50} (ng/ng)	CR(%)*
Endosulfan		5.0	100
Endosulfan diol		4.8	105.2
Endosulfan ether		8.8	57.1
Captan		<200	>2.5
BHC		<200	>2.5
Chlorothalonil		<200	>2.5
2,4-D		<200	>2.5
Captafol		154.8	3.2
Aldrin		<200	>2.5

* Cross-reactivity is expressed as the concentration of endosulfan causing a 50% inhibition of binding $\times 100$, divided by the concentration of the other compounds (50% inhibition).

합 표지 화합물/총 표지 화합물)가 거의 100 %에 이르러 RIA의 敏感度를 높일 수 있는 條件이었다. 그래서 4 °C의 培養條件이 最適 温度條件이라고 할 수 있었다. 이러한 條件은 benomyl⁸⁾의 경우나 IAA¹¹⁾, parathion⁹⁾의 경우와 同一하게 나타났고 2,4-D⁷⁾의 室溫에서와 chloramphenicol¹³⁾의 0 °C에서의 培養條件과는 차이가 있었다.

RIA에 의한 endosulfan 標準品의 檢量線은 Fig. 6에 나타했는데 여기서의 最小檢出量은 1 ng이었고 檢出 범위는 1 ng ~ 20 µg로 상당히 넓은 濃度範圍의 分析이 가능한 것으로 나타났다. ELISA에 의한 endosulfan의 殘留分析에서는 5 ppb의 檢出限界¹⁵⁾를 나타냈고 RIA에 의한 다른 藥劑들의 最小檢出量은 benomyl에서는 1.25 ng, parathion에서는 4.0 ng, paraquat에서는 0.1 ng, 2,4-D는 13.0 ng, IAA는 94.0 pg, PCB에서는 0.1 ng, chloramphenicol에서는 10.0 pg으로 報告되었다. 이러한 RIA에 의한 農藥의 殘留分析에서 endosulfan의 경우는 그 敏感度가 높은 편에 속했다. 이처럼 RIA를 위한 條件이 결정된 후 직접 RIA를 이용하여 endosulfan을 本 實驗의 供試水와 供試魚의 組織에 대해 回收率試驗을 실시하였다. Fig. 7에는 供試水와 供試魚에 대한 檢量線을 나타냈다. 供試魚에서는 干涉物質로 인해 供試水에 비해 敏感度가 더 낮았고 檢出領域도

더 작게 나타났다.

Endosulfan-BSA에 대해 生成된 抗體를 이용하여 endosulfan 代謝物質이나 기타 有機鹽素系, 構造가 類似한 藥劑, 同一時期에 處理되는 代表的인 8개 藥劑에 대해 交叉 反應性을 調查한 結果(Table 1) endosulfan alcohol과 endosulfan ether에 대해서만 각각 105.2, 57.1 %의 交叉 反應性을 나타냈고, captafol에 대해서도 3.2%의 낮은 反應性을 보였을 뿐 기타 藥劑들에 대해서는 모두 2.5 % 이하의 反應性을 지닌 것으로 나타났다. 여기서 endosulfan alcohol의 交叉 反應性이 높은 이유는 抗原 調劑시 endosulfan alcohol을 이용하여 BSA와 conjugate를 調劑한 후 그것에 대해 抗體가 形成 되었기 때문일 것으로 생각되었다. 이러한 交叉 反應性的 問題는 本 實驗에서와 같이 polyclonal Ab를 사용하지 않고 monoclonal Ab를 調劑하여 사용하면 解決되지만 本 實驗에서는 endosulfan 代謝物質에 대해서만 交叉 反應性을 지니고 있기 때문에 本 實驗에서 調劑된 抗體는 그대로 有用한 것이었다.

供試魚의 各 組織과 供試魚에 대해 RIA에 의한 回收率試驗結果를 GC-ECD方法 및 ELISA에 의한 回收率結果와 비교하여 보면(Table 2) 3 가지 方法中 ELISA에 의한 回收率이 가장 낮았고 RIA에 의한 回收率結果가 가장 높게 나타났다. 供試魚의 組織 중에서는 gut에서 回收率이 가장 낮았고 肝組織에서 가장 높은 值을 보였다. 供試水에서는一般的으로 90 % 이상의 높은 回收率을 보였으며 이들의 檢出限界는 RIA가 0.1, GC-ECD가 2.0, ELISA가 5.0 ng/ml 順으로 나타났다. 이상의 結果를 要約하면, endosulfan은 ppb 水準의 濃度로 水中生物에 毒性을 나타내기 때문에 水質이나 魚類에서의 endosulfan의 檢出을 위해서는 RIA方法이 높은 敏感度를 지닌 簡便하고 有用한 方法이 될 것이다. 이 endosulfan을 RIA로 分析하기 위해서는 endosulfan-protein conjugate를 抗原으로 하여 抗體를 調劑한 후 그 역가와 交叉 反應性을 調査하여야 한다. 本 實驗에서는 1:32,000의 역가와 endosulfan

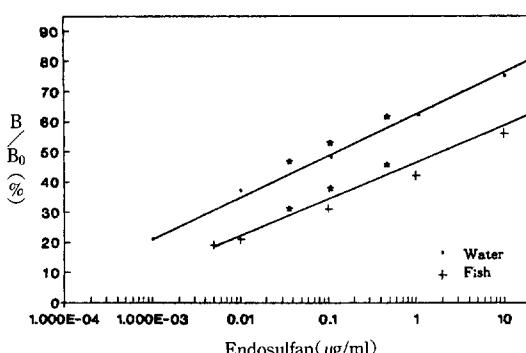


Fig. 7. Standard curves of recovery test in water and fish (* : spiking concentration for recovery test).

Table 2. Comparison of recoveries for endosulfan in tissues of carp and water among GLC, ELISA, and RIA.

Sample	Recovery (%)								
	GLC ^a			ELISA ^b			RIA ^c		
	0.5	0.1	0.05	0.5	0.1	0.05	0.5	0.1	0.05
Liver	91.2	89.6	86.4	78.2	74.3	91.0	90.8	93.4	98.2
Kidney	88.1	92.3	85.7	76.0	71.5	81.7	89.2	88.3	93.7
Gut	79.5	82.4	80.8	67.4	77.1	70.6	91.3	94.6	90.8
Whole body	89.1	84.8	86.2	77.5	73.9	72.1	88.4	91.1	85.2
Water	93.7	96.2	93.5	89.1	98.7	96.4	91.7	97.6	94.0
Detection Limit (ng/ml)			2.0		5.0			0.1	

a : Means of 2 replicates, b : means of 8 replicates, and c : means of 3 replicates.

代謝物質以外의 化合物에서는 거의 反應性이 나타나지 않았다. RIA 最適條件은 抗體와 試料溶液을 混合한 후 4 °C에서 1 時間 培養하고 ¹⁴C-標識 endosulfan의 添加 후 다시 4 °C에서 2 時間 培養, 培養 後에는 dextran coated charcoal(DCC)을 添加하고 室溫에서 15~30 分 放置 後 1,500 rpm에서 10 分간 원심분리하여 上澄液을 LSC 計測하는 것 이었다.

要 約

Endosulfan의 殘留分析을 위한 RIA(radioimmuno assay)는 endosulfan alcohol(EA)-BSA conjugate를 抗原으로 하여 침투기에서 免疫抗體를 生產하였다. 生產된 免疫抗體의 力價는 1:32,000 으로 endosulfan과 EA 以外의 類似化合物에서는 거의 反應性을 나타내지 않았으며 RIA를 위한 最適稀釋倍數는 1:2,000 으로 나타났다. RIA의 最適培養溫度는 4 °C 이었으며 endosulfan의 檢出範圍는 1 ng~20 µg 이었고 最小檢出量은 1 ng 이었다. RIA 技法을 利用하여 잉어의 各 組織과 供試水에서 實시한 回收率 試驗 結果는 GLC/ECD나 ELISA를 利用한 回收率보다 우수하게 나타났다. 試料에서 RIA에 의한 endosulfan의 檢出限界는 0.1 ppb 였다.

参考文獻

- Chau, A. S. Y. and Therry, K. (1972). Confirmation of pesticide residue identity. IV. Derivative formation in soil matrix for the confirmation of α -and β -endosulfan by chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **55**(6) : 1232~1238.
- Rao, D. M. R. and Murty, A. S. (1981). Improved clean-up technique for estimation of endosulfan residues from fish tissues under tropical conditions, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64** : 340~342.
- Kavadia, V. S. and Noor, A. (1978). Movement and residues of endosulfan in maize plants, Ind. J. Agric. Sci., **48**(3) : 176~178.
- Moats, W. A. (1966). Analysis of diary products for chlorinated insecticide residues by thin layer chromatography, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **49**(4) : 795~801.
- Maija, P. and Tommy, A. (1987). Subcellular location and properties of cytochrome P-450 and UDP-glucuronyltransferase in the rainbow trout kidney, Biochem. Phar., **36**(10) : 823~

- 829.
6. Willis, G. H., McDowell, L. L., Southwick, L. M. and Smith, S. (1987). Methoxychlor and endosulfan concentration in unit-source runoff and in channel flow of a complex watershed, *Transactions of the ASAE*, **30**(2) : 394–399.
 7. Christopher, J. H., Raymond, J. A. and Kim, K. K. (1989). Immunoassay for the detection of 2,4-D and picloram in river water and urine, *J.Agric.Food Chem.*, **37** : 981–984.
 8. William, H. N. and Shield, J. Brain. (1981). A radioimmunoassay for benomyl and methyl 2-benzimidazolecarbamate on food crops, *J.Agric. Food Chem.*, **29** : 220–222.
 9. Charles, D. E., Remo, P. V. and Ralph, O. M. (1981). Development of a radio-immunoassay for parathion, *J. Agric. Food Chem.*, **29** : 559–563.
 10. Niewola, Z., Walsh, S. T. and Davies, G. E. (1983). Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) for paraquat, *J. Immunopharmacol.*, **5**(3) : 211–218.
 11. Peter, V. and Aloysius, W. (1988). A specific radioimmunoassay for the determination of low quantities of indole-3-acetic acid in spruce needles of healthy and damaged trees, *J. Plant Physiol.*, **133** : 320–324.
 12. Milan, F., Karel, H. and Iva, D. (1992). Development of a microcolumn radioimmunoassay for screening of polychlorinated biphenyls in milk and animal fats, *J. Agric. Food Chem.*, **40** : 1559–1565.
 13. Dieter, A. and Somogyi, A. (1985). Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk, and meat: Comparison of gas chromatography and radioimmunoassay, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(5) : 984–990.
 14. Samokhin, G. P. and Filimonov, J. N. (1985). Coupling of pesticides to protein carriers by mixed anhydride procedure, *Anal. Biochem.*, **145** : 311–322.
 15. 李康奉, 沈在漢, 徐鎔澤. (1992). Endosulfan과
分解產物의 enzyme immunoassay에 의한 分析
法의 開發과 應用, 韓國環境農學會誌, **11**(1) : 59
– 66.
 16. Catty, J. G. (1971). “Double immunodiffusion for Ab screening in agarose gel” antibodies, *Methods in Molecular Biology*, Humana, Press, **1** : 301–309.
 17. Towbin, M. J. (1988). Western blotting for immunogen, “Antibodies,” A lab.manual, Cold Spring Harbor Laboratory : 471–510.
 18. Kahn, D., Andrieu, J. M. and Dray, F. (1974). Evaluation of some binding parameters of hapten-antibody complexes using dextran-coated charcoal to separate the bound and free fractions, *Immunochemistry*, **11** : 327–332.