

유기인계 살충제 Phosalone 원제 중의 불순물 동정 및 독성효과

임금춘* · 허장현 · 한대성

Identification and Toxic effects of Impurities present in the Technical grade of Phosalone

Geum-Choon Lim*, Jang-Hyun Hur, and Dae-Sung Han

Abstract

The purpose of this study was to investigate the identification and the toxicological effects of some impurities present in the technical grade phosalone (94.4%). In instrumental analyses of the technical phosalone, the five impurities such as phosalone oxon, 6-chloro-3-methylthio-2-oxobenzoxazole, 6-chloro-2-oxobenzoxazole, *O,O,S*-triethyl phosphorodithioate (OOSTEPDT) and dichlorophosalone were identified. The bimolecular inhibition rate constants (k_i) indicated that the technical phosalone inhibited both AChE and BuChE about ten times faster than the purified phosalone did. From *in vivo* studies the technical phosalone showed greater inhibition for mouse brain AChE, rat blood ChE's and mouse cytosolic non-specific esterases. It was presumed that some impurities present in the technical phosalone such as phosalone oxon cause such inhibition patterns of the technical phosalone observed in this study.

緒言

Phosalone [O,O-diethyl-S-(6-chloro-2-oxobenzoxazolyl) methyl phosphorodithioate]은 1963년 프랑스 Rhône-Poulenc 사에서 개발되어 Zolone, Rubitox, Azofene 등의 상품명으로 전 세계적으로 사용되고 있으며¹⁾, 국내에서는 1980년대 초부터 미 프랑[(주) 미성], 씨사르[(주) 경농], 힘센[(주) 영

일] 등의 상품명으로 등록되어 있는 약제이다²⁾. Phosalone은 꿀벌에 대한 해가 거의 없고 인축에 낮은 독성을 지녔으며, 곤충에 대한 선택성이 높은 특징이 있어, 포도, 감자, 채소 등의 작물재배에 진딧물, 깍지벌레, 고추벌레, 꿀굴나방 등의 해충방제를 위하여 살충제로 광범위하게 사용되고 있다³⁾.

1987년 미국 California 주 Central Valley에 있는 포도재배 농원에서 해충방제를 위하여 살포된 Zo-

강원대학교 농과대학. College of Agriculture Kangweon National University, Chuncheon, 200-701, Korea.

* (주)경농 경주연구소. Kyungju Research Institute, Kyung Nong Co.

226 Ku Hwang-Dong, Kyungju, Kyung Buk, 780-110.

lone 유제 (34.4%)에 다수의 인부들이 심하게 중독된 3건의 사고가 발생하였다. 이에 대하여 California 주 농무성 조사관이 포도농원 작업 중 중독된 78명의 인부들을 대상으로 진상조사를 행한바, 이들 모두 anti-cholinesterase 제 중독증상을 보였으며, 혈액 cholinesterase도 심하게 저해 되었다고 보고하였다⁴⁾. 이 사고 이후 Winter 등 (1991)⁵⁾은 살포된 Zolone 유제 중 함유된 불순물들에 대한 GC/MS 분석을 행하여 phosalone oxon과 isophosalone을 확인하였다. 그들은 phosalone oxon이 주된 불순물이라고 결론을 지으면서, California 주에서 일어난 중독사고가 약제 중에 함유된 소량의 불순물들에 의한 직접 독성효과 또는 간접적인 독성강화작용에 의한 상승효과 등의 과정을 거쳐 일어 났을 것으로 가정하였다⁵⁾.

본 연구는 phosalone이 지니고 있는 사고의 잠재성에 대한 예방, 약제의 안전사용 및 관리를 위하여 국내에서 사용되고 있는 phosalone 원제 중의 불순물들에 대한 동정과 이들 불순물들에 의한 독성효과를 조사하였다.

재료 및 방법

공시약제

원제 phosalone은 (주) 경농으로부터 입수한 phosalone 원제 (94.4%)를 그대로 사용하였으며, 분석용 TLC (Silica gel F254, 0.25mm thickness, Merck Co., Germany)를 이용하여 함유된 불순물들의 존재를 확인하였다. 정제 phosalone은 원제 phosalone으로부터 silica gel 50 g이 충전된 chromatographic column (내경 3 cm, 길이 50 cm)을 이용하여 hexane : ethyl acetat. (3 : 1)로 분리 정제하여 얻었다. 정제된 phosalone은 분석용 TLC와 ³¹P-NMR (Bruker WM-300 spectrometer, U.S.A.)을 이용하여 단일성분만 존재하는 것을 확인하였으며, 분자구조는 ¹H-NMR (Jemini-200, Varian Co., U.S.A.)와 GC/MS (Finnigan-Tracker, U.S.A.)를 사용하

여 확인하였다.

공시동물

생쥐 (ICR계 mouse, 18~20 g), 쥐 (SD계 rat, 150~180 g)의 수컷을 (주) 고려실험동물개발에서 구입하여 2~3일 동안 실험실에서 순화시킨 다음 사용하였다.

원제 phosalone의 GC/MS 및 ³¹P-NMR 분석

원제 phosalone을 acetone에 녹여 GC/MS (Finnigan-Tracker, U.S.A.)로 분석하였다. 분석용 column은 DB-5 (0.25 μ m \times 30 m, J&W Scientific Co.)를 사용하였으며, column 온도는 100°C 에서 3분간 머무른 후, 250°C 까지 분당 10°C 씩 온도가 상승되도록 program하였고, injection port 210°C, detector 230°C, transfer line 270°C로 하였다. Carrier gas는 고순도 helium을 사용하였다.

원제 phosalone을 내경 5 mm NMR tube에서 CDCl₃에 녹인 후, ³¹P-NMR 분석 (Bruker WM-300 spectrometer, U.S.A.)을 행하였다. O,O,O-Trimethyl phosphate를 내부표준물질로 사용하였다.

AChE 및 BuChE에 대한 이분자 저해 속도상수 (k_i) 측정^{6,7,8)}

Ellman(1961) 분석방법⁹⁾으로 5 ml 시험관에 AChE 또는 BuChE (Sigma Chem. Co., U. S. A.) 4 units와 원제 및 정제 phosalone $6.7 \times 10^{-4} \sim 1.67 \times 10^{-7}$ M을, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)로 최종부피 3 ml로 한 다음 항온수조 (37°C)에서 반응 시켰다. 기질인 0.1M acetylthiocholine (ASCh) 또는 butyrylthiocholine(BuSCh) (Sigma Chem. Co., U. S. A.) 용액 0.1 ml와 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB, Sigma Chem. Co., U. S. A.)용액[DTNB 13.2 mg, NaHCO₃ 5 mg, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.6)] 2.8 ml가 담겨

진 cuvette에 효소 반응액을 0.1 ml 넣고 2분 간격으로 UV spectrophotometer(Model U-3210, Hitachi Co., Japan)로 412 nm에서 활성을 측정하였다. Aldridge(1950)방법¹⁰⁾으로 원제 및 정제 phosalone의 AChE, BuChE에 대한 k_i 값을 계산 하였다.

생체 내 생쥐 뇌 AChE 활성저해^{6,8)}

생쥐 뇌 AChE의 활성저해를 관찰하기 위하여 원제 및 정제 phosalone을 propylene glycol에 녹여 생쥐 (18~20 g, 수컷)에 0, 50, 100, 150, 200 mg/kg을 투여한 다음, 2시간 후 생쥐의 뇌를 적출하였다. 뇌 100 mg당 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.6) 1 ml를 넣고 homogenizer로 마쇄하였다. 냉동원심분리기 (Hanil Co., Korea)를 사용하여 2,000 g에서 15분간 원심분리를 한 후 상정액을 취하여 Bradford (1976) 방법¹¹⁾으로 단백질 함량을 정량하였고, 단백질 2 mg에 해당하는 상정액을 이용하여 Ellman (1961) 방법⁹⁾으로 뇌 AChE에 대한 I_{50} 값을 측정하였다.

쥐 혈액의 erythrocyte AChE와 plasma BuChE의 활성 저해^{6,8,12)}

원제 및 정제 phosalone을 propylene glycol에 녹인 후 쥐에 각각 150 mg/kg씩 복강투여하였다. 0, 5, 15, 30분 그리고 1, 2, 4, 8, 12, 24시간 후 꼬리 정맥에서 heparinized micropipette(44.7 μ l)으로 혈액을 취하여 냉동원심분리기(Beckman Co., German) 2000 g에서 10분 동안 원심분리를 하였다. Plasma(상정액)중 20 μ l를 취하여 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.6)로 최종부피 1 ml로 한 후 BuChE 활성 측정 시료로 사용하였다. Erythrocyte (침전물)에 0.1M sodium phosphate buffer(pH7.6) 1 ml를 넣고 원심분리하여 잔여 plasma를 제거한 후, 다시 pellets에 2% Triton X-100 (Sigma Chem. Co., U. S. A.) 용액 100 μ l를 넣고 교반을 한 다음 0.1M sodium phosphate buffer 2 ml로 희석하여 AChE 활성측정을 위한 시료로 사용하였다. AChE 또는 BuChE에 대한 활성 저해 측정은 Ellman(1961) 방법⁹⁾을 이용하였다.

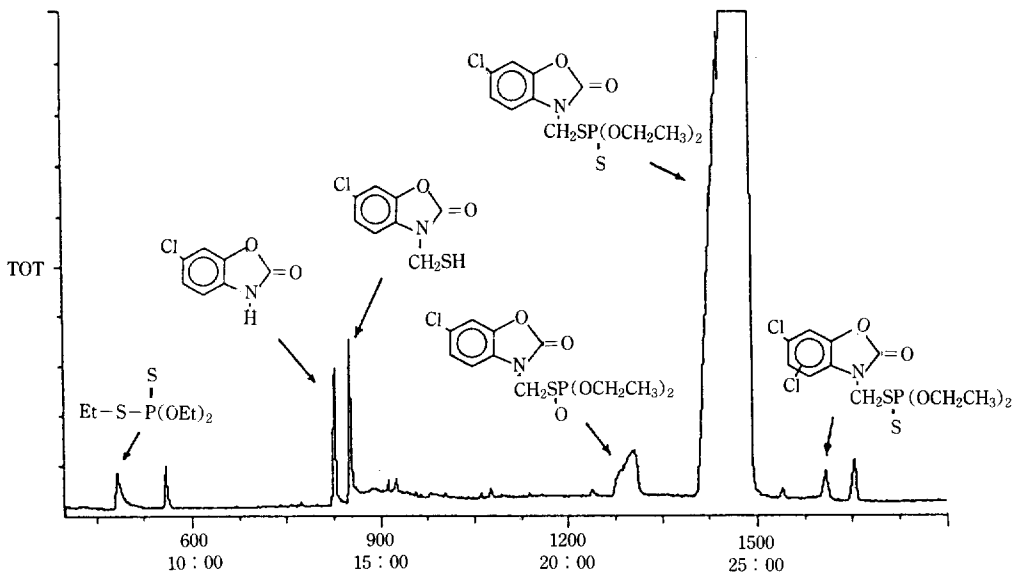


Fig. 1. GC/MS chromatogram of the Technical Phosalone.

결 과

원제 phosalone의 불순물 동정

Figure 1은 원제 phosalone의 GC/MS chromatogram으로 주성분인 phosalone (m/z 367, 92.5%) 이외에 8개의 불순물이 관찰되었다. 이들 중 phosalone oxon (m/z 351, 2.7%), 6-chloro-3-methylthio-2-oxobenzoxazole (m/z 215, 1.26%), 6-chloro-2-oxobenzoxazole (m/z 169, 1.3%), O,O,S-triethylphosphorodithioate (OOSTEPDT) (m/z 214, 0.7%), dichlorophosalone (m/z 401, 0.5%)을 확인 할 수 있었다.

원제 phosalone의 ³¹P-NMR 분석에서 주성분인 phosalone (89.2 ppm) 이외에 22.6, 90.1, 93.5 ppm에서 3개의 불순물로 간주되는 peak가 관찰되었다.(Figure 2) 90.1 ppm에서 관찰된 peak는 Greenhalgh 등 (1988)¹³⁾에 의하여 보고된 OOSTEPDT인 것으로, 22.6 ppm에서 관찰된 peak는 Win-

ter 등 (1991)⁵⁾의 GC/MS 분석을 통하여 확인된 phosalone oxon으로 추정되었다.

AChE에 대한 이분자 저해 속도상수 (k_i)^{6,7,8)}

이분자 저해 속도상수 (k_i) 는 원제 phosalone의 경우 6.7×10⁻⁵M에서 5.5×10³M⁻¹min⁻¹으로, 6.7×10⁻⁶M에서 5.8×10³M⁻¹min⁻¹으로 나타났으며, 정제 phosalone의 경우⁸⁾에는 6.7×10⁻⁴M에서 2.0×10²M⁻¹min⁻¹으로, 6.7×10⁻⁵M에서 4.0×10²M⁻¹min⁻¹으로 측정되었다. 원제 및 정제 phosalone의 평균 k_i 값은 각각 5.7×10³M⁻¹min⁻¹과 3.0×10²M⁻¹min⁻¹으로 관찰되어, 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 약 10배 정도 빠르게 AChE 활성을 저해하는 것으로 확인되었다.

BuChE에 대한 이분자 저해 속도상수 (k_i)^{6,7,8)}

이분자 저해 속도상수 (k_i) 는 원제 phosalone의 경우 1.67×10⁻⁴M에서 2.1×10³M⁻¹min⁻¹으로, 8.0

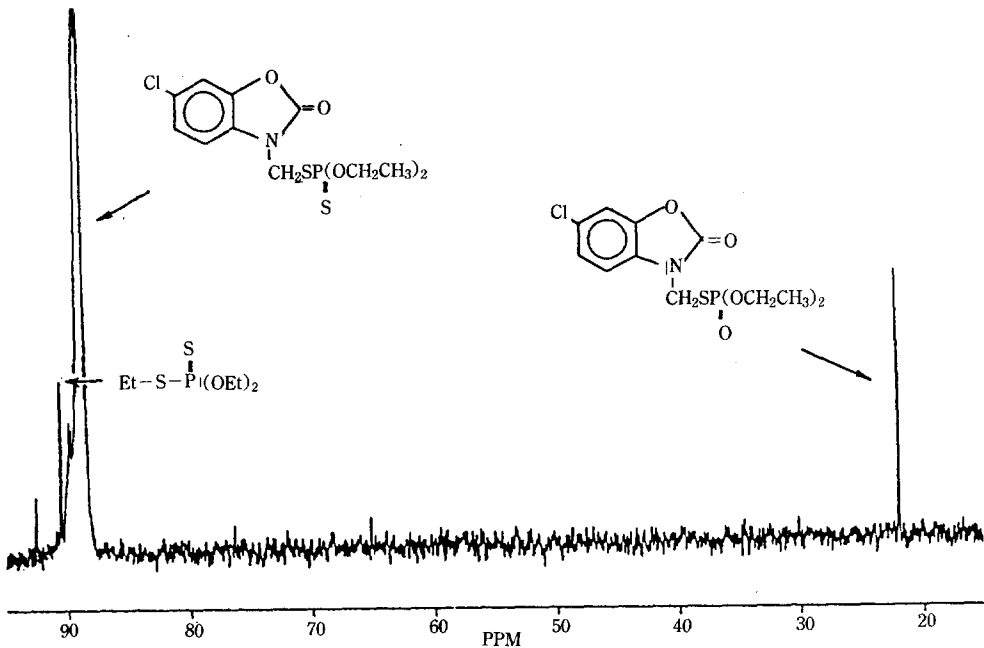


Fig. 2. ³¹P-NMR spectrum of the Technical Phosalone.

$\times 10^{-5}M$ 에서 $5.8 \times 10^3 M^{-1} min^{-1}$ 으로 나타났으며, 정제 phosalone의 경우⁸⁾에는 $1.67 \times 10^{-3}M$ 에서 $1.5 \times 10^2 M^{-1} min^{-1}$ 으로, $8.0 \times 10^{-4}M$ 에서 $1.8 \times 10^2 M^{-1} min^{-1}$ 으로 측정되었다. 원제 및 정제 phosalone의 평균 k_i 값은 각각 $2.2 \times 10^3 M^{-1} min^{-1}$ 과 $1.7 \times 10^2 M^{-1} min^{-1}$ 으로 관찰되어, 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 약 10배 정도 빠르게 BuChE 활성을 저해하는 것으로 확인되었다.

Mouse brain AChE 저해^{6,8)}

불순물이 함유된 원제 phosalone과 정제 phosalone의 *in vivo* mouse 뇌 AChE의 저해에 미치는 영향을 관찰하였다.(Figure 3) 두 약제 모두 전형적인 anti-cholinergic 증상을 보였으며, 투여량이 많을수록 뇌 AChE가 심하게 저해되는 경향을 보였다. Mouse 뇌 AChE에 대한 원제 phosalone의 I_{50} 은 110 mg/kg, 정제 phosalone은 170 mg/kg으로 나타나, 원제 phosalone이 정제 phosalone보다 약 35% 정도 강하게 뇌 AChE의 활성저해를 일으키는 것으로 관찰되었다.

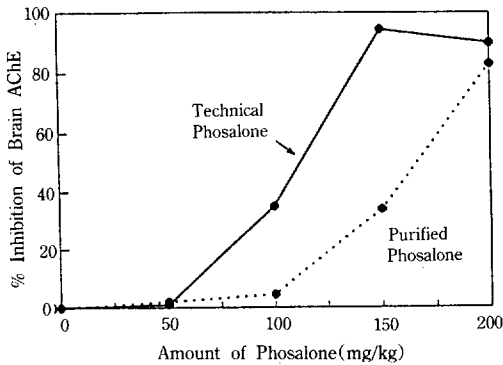


Fig. 3. Inhibition of mouse brain AChE by the Technical and the Purified Phosalone.

Rat 혈액 ChE 저해^{6,8,12)}

원제 및 정제 phosalone 각각 150 mg/kg을 쥐에 복강투여하고 시간의 경과에 따라 꼬리 정맥에서

혈액을 취한 후, 혈액 erythrocyte AChE와 plasma BuChE의 활성저해를 살펴보았다.(Figure 4) Erythrocyte AChE의 경우 원제 Phosalone에서 65%, 정제 phosalone에서 52%의 활성저해가 나타났으며, plasma BuChE의 경우 원제 phosalone에서 64%, 정제 phosalone에서 58%의 활성저해가 관찰되었다. 전체적으로 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 약간 더 심하게 저해하는 경향을 보였다. 또한 두

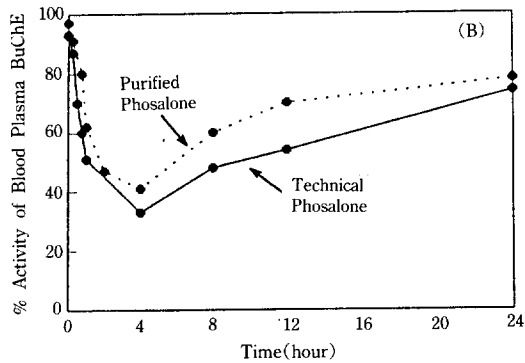
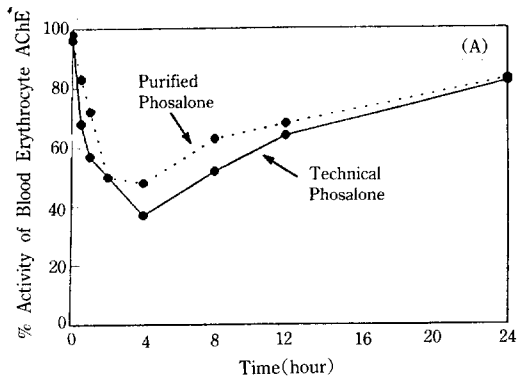


Fig. 4. Inhibition of rat blood erythrocyte AChE (A) and plasma BuChE (B) activity by the Technical and the Purified Phosalone.

약제 모두 약제 투여 4시간 후에 가장 심한 활성저해를 보였으며, 시간이 경과하면서 효소의 활성이 점차적으로 회복되는 경향을 보였다.

Cytosolic non-specific esterases 저해¹²⁾

원제 및 정제 phosalone에 의한 *in vitro*와 *in vivo* 상에서의 cytosolic esterases의 활성저해를 native-PAGE를 이용하여 살펴 보았다. *In vitro* 실험에서 원제 phosalone은 $5 \times 10^{-5}M \sim 5 \times 10^{-4}M$ 에서, 정제 phosalone의 경우 $5 \times 10^{-4}M$ 에서 esterases의 활성을 저해하여, 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 10배 정도 더 심하게 효소의 활성을 저해하는 것으로 관찰되었다.(Figure 5) *In vivo* 상에서는 원제 phosalone을 200 mg/kg을 투여하였을때 non-specific esterases의 활성이 저해되는 것이 관찰된 반면, 정제 phosalone은 약제투여 전 처리구에서 뚜렷한 저해가 관찰되지 않았다.(Figure 6) 결국 *in vitro* 실험에서와 같이 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 cytosolic non-specific esterases를 더욱 심하게 저해하는 것으로 나타났다.

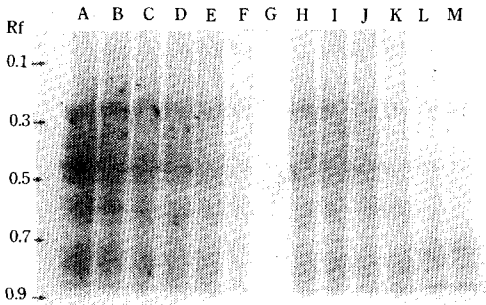


Fig. 5. Inhibition of mouse liver cytosolic esterases by the Technical and the Purified Phosalone. [Control: A, H; Technical Phosalone: B ($5 \times 10^{-6}M$), C ($2.5 \times 10^{-5}M$), D ($5 \times 10^{-5}M$), E ($2.5 \times 10^{-4}M$), F ($5 \times 10^{-4}M$); Purified Phosalone: I ($5 \times 10^{-6}M$), J ($2.5 \times 10^{-5}M$), K ($5 \times 10^{-5}M$), L ($2.5 \times 10^{-4}M$), M ($5 \times 10^{-4}M$)].

고 찰

원제 phosalone에 대한 GC/MS 분석에서 주성분

인 phosalone이외에 8개의 불순물 peak들을 관찰하였다. 가장 함량이 높은 불순물은 phosalone oxon (m/z 351, 2.7%)이었으며, 그 외에 6-chloro-2-oxobenzoxazole (m/z 169, 1.3%), 6-chloro-3-methylthio-2-oxobenzoxazole (m/z 215, 1.26%), O,O,S-triethylphosphorodithioate (OOSTEPDT) (m/z 214, 0.7%), dichlorophosalone (m/z 401, 0.5%) 순으로 나타났다. Winter 등 (1991)⁵⁾은 GC/MS분석

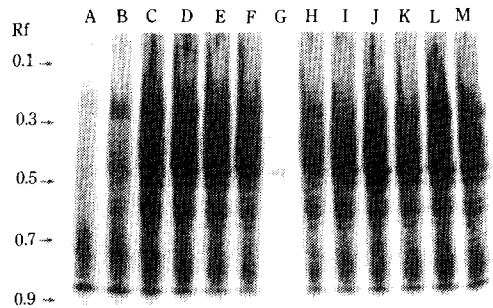


Fig. 6. Inhibition of mouse liver cytosolic esterases by the Technical and the Purified Phosalone. [Blank: G; Control: E, F, L, M; Technical Phosalone: A (200mg/kg), B (150mg/kg), C (100mg/kg), D (50mg/kg); Purified Phosalone: H (200mg/kg), I (150mg/kg), J (100mg/kg), K (50mg/kg)].

을 이용한 phosalone (Zolone E.C. 34.4%)중 함유된 불순물의 동정에서 phosalone oxon을 확인하여 본 실험결과와 일치함을 보였다. 또한 OOSTEPDT는 Greenhalgh 등 (1983)¹³⁾이 ³¹P-NMR을 이용하여 phosalone 원제 중 함유된 불순물임을 보고하였는데, 본 실험에서도 이 불순물의 존재 (90.1 ppm)를 확인할 수 있었으며, 22.6 ppm에서 관찰된 주된 불순물의 peak는 monothiolate 구조를 가진 phosalone oxon으로 추정되었다. 일반적으로 phosphate는 0 ppm, monothiolate는 20 ppm, dithiolate는 40 ppm, thionate는 60 ppm, 그리고 phosalone과 같은 dithiolothiono계열의 인 화합물들은 90 ppm 전후에

서 chemical shift를 보이는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

원제 및 정제 phosalone의 *in vitro*와 *in vivo*에서 AChE, BuChE 및 cytosolic esterases에 대한 활성 저해 비교 실험에서 불순물을 함유한 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 *in vitro*에서 target enzyme인 AChE와 BuChE를 모두 약 10배 정도 빠른 속도로 저해하였고, cytosolic esterases에 대해서도 역시 10배 정도 더 강한 저해력을 보였다. *In vivo* 실험을 통하여 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 생쥐의 뇌 AChE를 약 35% 더 저해하는 것으로 관찰되었으며, 쥐의 혈액 erythrocyte AChE와 plasma BuChE 그리고 cytosolic non-specific esterases의 활성도 더 심하게 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험을 통하여 원제 phosalone이 정제 phosalone에 비하여 전체적으로 더 강한 독성효과를 보이는 것으로 관찰되었는데, 이러한 결과는 원제 phosalone 중 함유된 소량의 불순물들에 의하여 일어났을 것이라는 가정을 할 수 있었다. 더욱이 GC/MS를 통하여 동정된 불순물 중 가장 함량이 많은 phosalone oxon의 경우 AChE의 serine hydroxyl기로 부터 친핵 공격을 받아 효소를 인산화하여 활성을 저해하기 쉬운 구조를 가지고 있어¹⁵⁾, 이 불순물을 함유한 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다도 target enzyme들을 더 강하게 저해하였을 것이라고 설명할 수 있었다. 일반적으로 유기인계 농약은 phosphorothionate 또는 phosphorodithioate 형태이지만, 체내에 들어가 MFO 효소의 작용에 의하여 desulfuration되어 phosphate 또는 phosphorothiolate 형태, 즉 oxon 형태로 변환된 후 약제의 독성이 발현되는 것으로 알려져 있어, 이러한 가능성을 더욱 뒷받침해 주고 있다¹⁵⁾. 그러나 동정된 각 불순물들의 독성학적인 특징들이 아직도 체계적으로 검토되어지지 않아, 불순물들이 해당 효소의 활성에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 결론을 유도할 수는 없었다. 유기인계 살충제인 phosalone의 안전 사용과 관리를 위하여 불순물들을 분리, 정제하거나, 또는 합성하여 이들의 독성학적 특성을 검토하는

연구가 필요한 것으로 사료되었다.

요 약

본 연구는 원제 phosalone (94.4%)에 함유된 불순물들의 동정과 원제 및 정제 phosalone의 *in vitro*와 *in vivo*에서의 독성효과를 조사하였다. 원제 phosalone에 대한 GC/MS 분석에서 phosalone oxon, 6-chloro-3-methylthio-2-oxobenzoxazole, 6-chloro-2-oxobenzoxazole, *O,O,S*-triethylphosphorodithioate (OOSTEPDT), dichlorophosalone 등 5개의 불순물이 동정되었으며, ³¹P-NMR 분석에서 OOSTEPDT와 phosalone oxon 등 2종의 불순물이 확인되었다. *In vitro*에서 원제 Phosalone과 정제 phosalone의 AChE와 BuChE에 대한 k_i 값을 비교한 결과, 원제 phosalone이 정제 phosalone보다 약 10배 빠르게 ChE를 저해하는 것으로 나타났으며, cytosolic esterases에 대해서도 10배 정도 더 강한 저해력을 보였다. *In vivo*에서도 원제 phosalone이 정제 phosalone 보다 생쥐의 뇌 AChE의 활성을 약 35% 더 저해 하였으며, 쥐의 혈액 erythrocyte AChE와 plasma BuChE 그리고 cytosolic esterases의 활성도 더 심하게 저해하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 원제 phosalone 중 함유된 불순물들에 의한 것으로 사료되었으며, 특히 phosalone oxon에 의한 것으로 추정되었다.

감사의 글 : 이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. The Pesticide Manual (1991). A World Compendium, 9th, C. R. Worthing, The British Crop Protection Council.
2. 농약공업협회 (1994). 농약연보.
3. 농약공업협회 (1994). '93 농약사용지침서.

4. O'Malley, M. (1988). Priority Investigations Involving phosalone in Fresno and Madera Counties, 1987; Worders Health and Safety Branch Publication HS-1487; California Department of Food and Agriculture: Sacramento.
5. Winter, C. K. and A. D. Jones (1991). Artifact formation in the GC/MS analysis of Zolone EC (phosalone) insecticide formulation. *J. Agric. Food Chem.*, **39**(6) : 1113-1117.
6. Armstrong, D. J. (1984). Synthesis, resolution, toxicity, and possible mode of action of some simple O,S-dialkyl phosphonothioates, Ph. D. dissertation, University of California, Riverside : 26-48.
7. 허장현, T. R. Fukuto, 한대성 (1991). 화학적, 대사적 산화반응 중 생성되는 S-oxide를 이용한 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)의 독성기작에 관한 연구. *한국환경농학회지*, **10**(2) : 167-177.
8. 임금춘, 허장현, 한대성 (1995). Phosalone의 활성화과정을 통한 Acetylcholinesterase와 Butyrylcholinesterase에 대한 활성 저해. *한국농화학회지*, **38**(2) : in review.
9. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress, and R. M. Featherstone (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **7** : 88.
10. Aldridge, W. N. (1950). Some properties of specific cholinesterases with particular reference to mechanism(E605) and analogues, *J. of Biochem.*, **46** : 451.
11. 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.
12. Hur, J. H., S. Y. Wu, and J. E. Casida (1992). Oxidative chemistry and toxicology of S,S,S-tributyl phosphorotrithioate(DEF Defoliant). *J. Agric. Food Chem.*, **40** : 1703-1709.
13. Greenhalgh, R., B. A. Blackwell, C. M. Preston and W. J. Murray (1983). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analysis of technical organophosphorus insecticides for toxic contaminants. *J. Agric. Food. Chem.* **31** : 710-713.
14. Wu, S. Y., R. F. Toia and J. E. Casida. (1992). Phosphorothiolate sulfoxides and sulfones: NMR characteristics and reactivity. *J. Agric. Food Chem.* **40** : 1425-1431.
15. Eto, M. (1974). *Organophosphorus pesticides : Organic and biological chemistry*, C.R.C. Press, Cleveland, OH.