

## Carbamate계 살충제에 의한 Cholinesterase활성의 저해

김 정 호 · 박 흥 재 · 박 병 윤\*

경산대학교 환경학부 · 인제대학교 환경시스템학부 · 대구가톨릭대학교 환경과학과  
(2002년 3월 18일 접수; 2002년 4월 23일 채택)

## Inhibition of Cholinesterase Activity by Carbamate Insecticides

Jung-Ho Kim, Heung-Jai Park and Byoung-Yoon Park

Dept. Environmental Science, Kyungsan Univ., Kyungsan 712-715, Korea

School of Environmental Science and Engineering, Inje Univ., Kimhae 621-749, Korea

\*Dept. Environmental Science, Catholic Univ., Kyungsan 712-702, Korea

(Manuscript received 18 March, 2002; accepted 23 April, 2002)

This study was carried out with the inhibition of the cholinesterase activity by carbamate insecticides in the chicken *in vivo* and *in vitro*. The optimum pH of cholinesterase was 8.0. The cholinesterase activity used the acetylcholin as substrate in plasma was 24.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein. After oral administration with 0.32 mg/kg of BPMC as carbamate pesticide, the cholinesterase activity was inhibited to 60% of control after 15min *in vivo*. Then the recovery of cholinesterase activity followed to 97% of control after 12hr.  $I_{50}$ , such as concentration required for 50% inhibition of enzyme activity, of phenyl N-methylcarbamate were 329  $\mu\text{g}/\ell$  of XMC, 214  $\mu\text{g}/\ell$  of metolcarb, 111  $\mu\text{g}/\ell$  of BPMC, 107  $\mu\text{g}/\ell$  of propoxur and 104  $\mu\text{g}/\ell$  of isoprocarb.  $I_{50}$  of aromatic N-methylcarbamate were 280  $\mu\text{g}/\ell$  of carbaryl and 114  $\mu\text{g}/\ell$  carbofuran.

Key words : cholinesterase, carbamate insecticide, XMC, metolcarb, BPMC, propoxur, isoprocarb, carbaryl, carbofuran, enzyme-inhibition.

### 1. 서 론

농약은 농산물을 증산하는데 필요한 농업자재로서 안전다수확은 물론 성력 재배에 크게 기여하여 왔다. 그러나 농약의 사용량이 증가함에 따라 농업 지역 뿐만 아니라, 일반 자연환경에서도 농약오염은 관심의 대상이 되고 있다.<sup>1)</sup>

Carbamate계 살충제는 1947년 Swiss의 Ciba Geigy사에서 방향족 carbamate 계 화합물이 살충성이 있음을 발견한 이후에 pyrolan, isolane, dimetan 등을 개발 하였다. 대부분의 carbamate계 살충제는 phenyl N-methylcarbamate와 aromatic N-methylcarbamate이다. 현재 우리나라에서 주로 사용되고 있는 phenyl N-methylcarbamate로는 XMC, metolcarb,

BPMC, propoxur, isoprocarb 등이 있다. Aromatic N-methylcarbamate로는 carbaryl과 carbofuran이 있다.<sup>2)</sup>

생체내의 많은 효소들은 농약처리에 의해 영향을 받는다.<sup>3~5)</sup> Carbamate계 농약은 acetylcholinesterase 활성을 저해함으로써 신경기능 저해제로 작용하게 된다.<sup>6)</sup> 신경전달물질 중에서 특히 acetylcholine을 가수분해하는 효소계는 acetylcholinesterase(E.C. 3.1.1.7, AChE, specific cholinesterase, truecholinesterase, redcell cholinesterase)와 cholinesterase(E.C. 3.1.1.8, ChE, nonspecific cholinesterase, pseudocholinesterase, serum cholinesterase)가 있다.<sup>7)</sup>

Acetylcholinesterase는 신경조직, 적혈구 및 근육 등에 존재하는데 신경전달물질인 acetylcholine에 기질특이성이 있으므로 신경전달에 중요한 역할을 한다. cholinesterase는 혈장, 간장 및 신장 등에 존재

Corresponding Author ; Jung-Ho Kim, Dept. Environmental Science, Kyungsan Univ., Kyungsan 712-715, Korea  
Phone : +82-53-819-1416  
E-mail : jungho@kyungsan.ac.kr

하며 acetylcholine에 기질특이성이 없다. 따라서 혈액 중에서 적혈구에 있는 것은 acetylcholinesterase(AChE)라고 하고, 혈장에 있는 것을 cholinesterase(ChE)라 한다.<sup>7)</sup>

Carbamate계 농약의 경우 cholinesterase(ChE)와 작용하므로, cholinesterase를 이용하여 이들 농약을 검출할 수 있을 것이다.<sup>6)</sup> Carbamate계 구조는 크게 carbamic acid (-CONHR)와 alcohol (-OX)로 구분되는데, alcohol 부분은 구조에 따라서 ChE효소 활성이 달라진다. Carbamic acid (-CONHR)부분에서 R은 N-metyl체가 ethyl과 propyl체보다 높은 ChE효소 활성을 보인다. 또한 N,N-dialkyl체의 생리활성은 N-alkyl체에 비하여 낮으므로 carbamate계 살충제는 -NHCH<sub>3</sub> 일때 가장 활성이 높다.<sup>8)</sup>

자연계 중 유해물질을 검출하는 방법으로 효소를 이용한 bioassay법이 있다. 이 방법은 화학적, 기기적 분석방법 보다 상대적으로 시험과정이 간편하고 짧은 시간내 신속하게 결과를 얻을 수 있다.<sup>9,10)</sup> *in vitro* 조건에서 ChE를 이용한 enzyme inhibition(효소저해)법을 유기인계와 carbamate계 농약의 검출 기법에 이용한다면 이들 농약에 의한 환경오염도의 측정용 지표로 이용될 수 있다. 김<sup>11)</sup>은 이 원리를 이용하여 유기인계 농약에 의한 cholinesterase 활성 저해에 관해 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 cholinesterase를 이용한 enzyme-inhibition법으로 carbamate계 농약을 검출하기 위한 기초 연구로, 현재 우리나라에서 주로 사용되고 있는 carbamate계 농약에 의한 cholinesterase활성 저해를 규명하였다.

## 2. 재료 및 방법

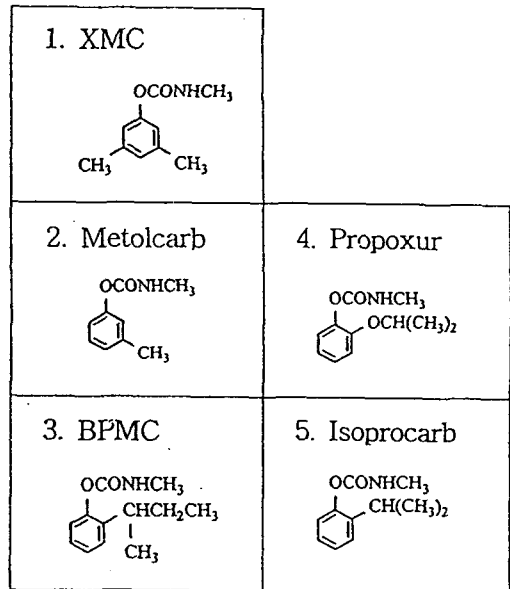
### 2.1. 공시농약 및 동물

Carbamate계 농약은 phenyl N-methylcarbamate 계에 속하는 XMC [3,5-xylyl methyl carbamate], metolcarb [3-mthylphenyl methylcarbamate], BPMC [2-sec-butylphenyl methylcarbamate], propoxur [2-isopropoxyphenyl methylcarbamate]와 isoprocarb [2-isopropylphenyl methylcarbamate]를 사용하였다. Aromatic N-metylcarbamate계는 carbaryl [1-naphthyl methylcarbamate]과 carbofuran [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate]를 택하였다(Fig. 1).<sup>12)</sup> 공시농약은 표준품(순도 99.9% 이상)를 acetone에 용해하여 사용하였다.

공시동물은 부화 후 24시간 된 병아리(Hy-Line W-77, mail) 중에서 43-47g 되는 건전한 개체를 사용하였다.

### 2.2. Cholinesterase 활성도 측정

## A) Phenyl N-methylcarbamate



## B) Aromatic N-methylcarbamate

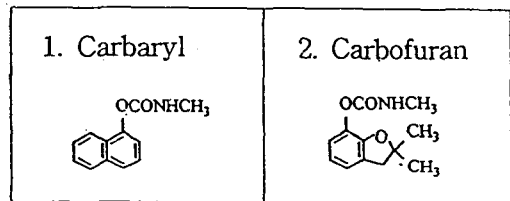


Fig. 1. The structure of A) phenyl and B) aromatic N-methylcarbamate insecticides.

ChE 및 AChE활성 측정은 Ellman 등<sup>13)</sup>의 방법에 준하여 다음과 같이 하였다. ChE 조효소액은 병아리의 경부를 절단하고 heparin으로 처리된 원심분리관에 혈액을 채취한 후, 이를 3000rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액인 혈장을 사용하였다. AChE 조효소액은 병아리의 뇌 전부를 취하여 인산완충용액(0.1 M, pH 8.0)를 무게의 2배 첨가하고 균질화한 다음 15,000 rpm(4℃)으로 20분간 원심 분리한 후 상등액을 사용하였다.

기질로는 acetylthiocholine iodide(0.075 M)과 butyrylthiocholine iodide(0.075 M)를 사용하였다. 효소활성 측정은 25℃에서 인산완충용액(0.1 M, pH 7.8) 3 mL, 기질 50 μl, dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB 0.01 M) 50 μl에 조효소액 50μl을 가한다. 1분 후 cholin과 DTNB과 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate을 spectrophotometer(Shimadzu U.V-200)로 412 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 μ

mol acetylthiocholine/min/g protein으로 나타내었다. 여기서 단백질 정량은 Lowry 등<sup>14)</sup>의 방법에 준하였으며, 표준품은 bovine serum albumin(Sigma제)를 사용하였다. ChE의 pH 영향은 인산완충용액에서 20시간 항온한 후 효소활성을 측정하였다.

2.3. In vivo 실험

BPMC의 투여량은 0.32 mg/kg으로 하였다. 투여 부피를 100  $\mu$ l되게 경구 투여한 후 시간별로 혈장 ChE와 뇌AChE활성을 측정하였다.

2.4. In vitro 실험

인산완충용액(0.1M pH 7.8) 3 mL에 ChE 효소액 50  $\mu$ l과 공시농약을 50  $\mu$ l 가하였다. Enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 필요한 항온시간은 일정하게 30분으로 하였으며, 37°C에서 30분 후 ChE 활성을 측정하였다. 대조구는 acetone를 동일량 첨가하였으며 효소활성의 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

여기서 A는 대조구의 ChE 활성이며, B는 농약 처리구의 ChE 활성이다. 저해율의 비교는 효소활성의 50%가 저해되는데 필요한 반응액 중의 농도인 I<sub>50</sub>으로 표현하였으며, pI<sub>50</sub> = -log I<sub>50</sub>이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ChE의 최적pH와 활성도

ChE의 pH에 대한 상대적 활성도는 Fig. 2와 같다. ChE의 최적 pH는 8.0이었으며, ChE 활성도 측정은 pH 8.0에서 하였다. Ellman 등의<sup>13)</sup>방법으로 혈장 ChE와 뇌 AChE 활성을 측정한 결과 Table 1과 같다. 혈장에서 기질로 acetylthiocholine iodide와 butrylthiocholine iodide일 때 효소활성은 각각 24.6  $\mu$ mol/min/g protein과 8.7  $\mu$ mol/min/g protein이었다. 뇌에서는 각각 173.2  $\mu$ mol/min/g protein과 6.0  $\mu$ mol/min/g protein이었다. 뇌에서는 butrylthiocholine iodide보다 acetylthiocholine iodide에 기질 특이성이 나타났다.

Acetylcholine은 ChE에 의해 가수분해되어 choline과 acetic acid로 된다. 여기서 ChE활성의 측정은 choline량을 측정하는 Ellman법<sup>13)</sup>이 있다. Ellman법은 기질로 사용된 acetylthiocholin이 가수분해되어 생성된 thiocholine을 dithiobisnitrobenzoic acid와 반응시켜 생성된 5-thio-2-nitrobenzoic acid를 비색정량하는 방법이다. Ellman법은 시험방법이 비교적 간단하며 짧은 시간에 측정할 수 있고 감도가 높기 때문에 cholinesterase활성 측정에 많이 사용된다.<sup>11)</sup>

본 실험에서도 Ellman법을 사용하였다. *in vitro* 실험에서는 혈액을 이용할 경우 적혈구보다 혈장을 조효소로써 사용하기가 편리하기 때문에, 혈장을 ChE의 효소원으로 사용하였다.

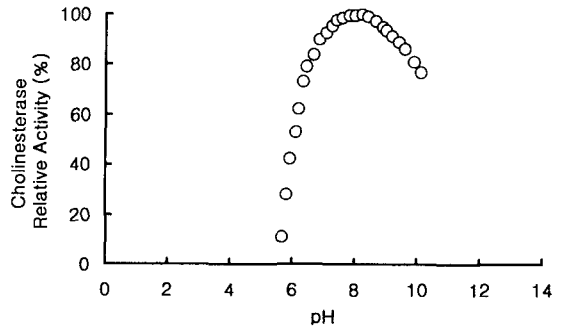


Fig. 2. Effect of pH on the cholinesterase activity with plasma in chicken.

Table 1. Acetylcholinesterases and cholinesterases activities in the chickens(n=5)

Tissues	Substrate	
	Acetylthiocholine	Butrylthiocholine
	(Unit: $\mu$ mol/min/g protein)	
Plasma	24.6±0.8	8.7±0.7
Brain	173.2±5.2	6.0±0.5

3.2. *in vivo*에서 ChE 활성 저해

*in vivo*상태에서 carbamate계 살충제에 의한 ChE와 AChE활성 저해를 확인하기 위해 carbamate계 농약 중 BPMC을 경구 투여 한 후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. BPMC의 조류 중 어린 물오리의 경구독성은 323 mg/kg이며<sup>12)</sup>, 이를 참고로 하여 0.001배에 해당하는 0.32 mg/kg을 투여하였다. 투여 15분에 후에 혈장ChE와 뇌AChE 활성이 각각 대조구의 58%와 53%까지 저해되었다. *in vivo*에서 carbamate 농약에 의한 혈장 ChE와 뇌 AChE 저해를 확인하였다.

투여 12 시간 후에 ChE활성은 96%로, AChE활성은 97%로 급격하게 회복되었다. 이와 같이 carbamate 농약 투여 후 시간이 경과함에 따라 효소 활성의 회복이 일어났다. ChE의 esteratic site와 anionic site에 각각 carbamate가 결합되어 carbamylation된다. 이는 다시 가수분해로 빠르게 decarbamylation되어서 ChE 활성의 회복이 이루어진다.<sup>6)</sup>

3.3. Phenyl N-methylcarbamate계에 의한 ChE 활성 저해

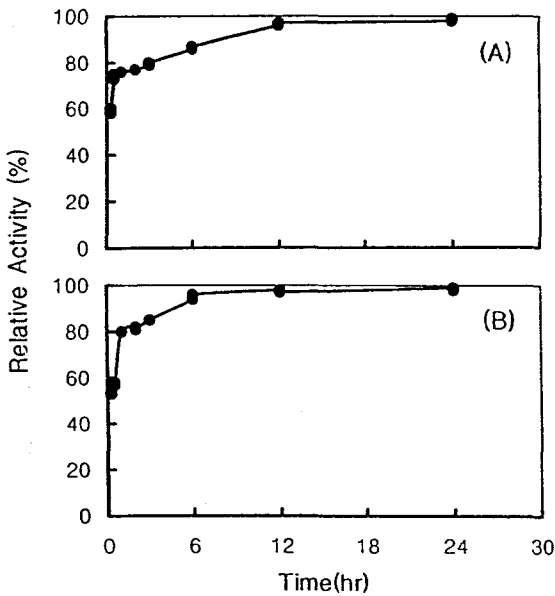
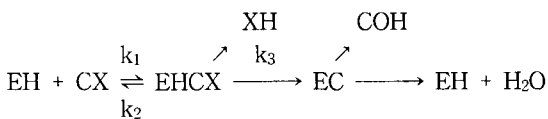


Fig. 3. Response of (A) cholinesterase activity with plasma and (B) acetylcholinesterase activity with brain in chicken by oral administration of fenobucarb with 0.32 mg/kg *in vivo*.

Enzyme-Inhibition법에서는 저해제가 효소와 반응하여 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 소요되는 시간을 검토할 필요가 있다. ChE효소액에 carbaryl를  $9.28 \times 10^{-7} M$  첨가하고 시간별로 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같았다. *in vitro* 실험에서 enzyme-inhibitor 복합체를 형성하는데 필요한 항온시간은 재현성이 있는 30분을 택하였다.

Phenyl N-methylcarbamate계에 대한 ChE활성의 저해양상은 Fig. 5와 같았다. 효소 활성이 50%로 저해되는데 필요한 농도인  $I_{50}$ 를 ppb ( $\mu g/l$ )로 계산하면 Table 2와 같다. XMC는  $329 \mu g/l$ 였고, metolcarb은  $214 \mu g/l$ 였다. BPMC는  $111 \mu g/l$ , propoxur는  $107 \mu g/l$ , isoprocarb는  $104 \mu g/l$ 이었다. 여기서  $I_{50}$ 은 적을수록 ChE에 강한 저해제가 된다.

Carbamate계와 ChE에 대해서 작용기구를 살펴보면 반응식은 다음과 같다.<sup>6)</sup>



여기서 EH는 ChE 효소이며, CX는 carbamate 농약이다. 여기서 이분자 속도상수( $K_i = k_1 \times k_3 / k_2$ )

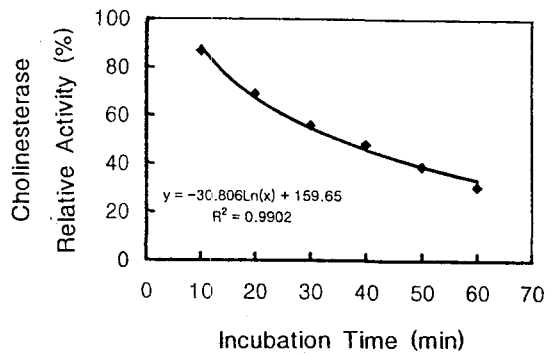


Fig. 4. Effect of preincubation time on the cholinesterase activity by carbaryl with  $9.28 \times 10^{-7} M$

Table 2.  $I_{50}$  and bimolecular rate constant( $K_i$ ) of cholinesterase by phenyl N-methylcarbamate insecticides *in vitro*

Compounds	$I_{50}^1)$ ( $\mu g/l$ )	$pI_{50}^2)$ (M)	$K_i$ ( $moles^{-1}min^{-1}$ )
XMC	329	5.71	12,618
Metolcarb	214	5.98	17,882
BPMC	111	6.17	43,265
Propoxur	107	6.28	45,294
Isoprocarb	104	6.26	43,052

1)  $I_{50}$ : Concentration required for 50% inhibition of enzyme activity

2)  $pI_{50} = -\log I_{50}$

는 저해율의 특성을 나타낸다. 여기서 이분자 속도상수의 계산은  $K_i = 0.695 / I_{50} \times T$  (T: 반응시간 30분)로 하였다.<sup>6)</sup>

Phenyl N-methylcarbamate계의 이분자 속도상수( $K_i$ )는 XMC가  $12,618 moles^{-1}min^{-1}$ 였고, metolcarb은  $17,882 moles^{-1}min^{-1}$ 였다. BPMC는  $43,625 moles^{-1}min^{-1}$ , propoxur는  $45,294 moles^{-1}min^{-1}$ , isoprocarb는  $43,052 moles^{-1}min^{-1}$ 이었다.

Carbamate계 살충제의 생리활성은 phenyl기에 도입되는 치환기의 종류 및 위치에 따라서 크게 다르다. iso-propyl치환기를 가진 isoprocarb와 sec-butyl치환기를 가진 BPMC는 dimethyl이나 methyl치환기를 가진 XMC나 metolcarb보다 저해력이 2-3배 강하게 나타났다. 이는 치환기의 크기가 iso-propyl, sec-butyl의 경우 ChE의 저해력이 가장 크고 이보다 크거나 적으면 저해력이 적다는 일반적 이론과 일치하였다.<sup>8)</sup>

이와 같이 carbamate 형태에 따라  $K_i$ 값이 각각 다르게 나타난 것은 ChE의 anionic site와 esteratic

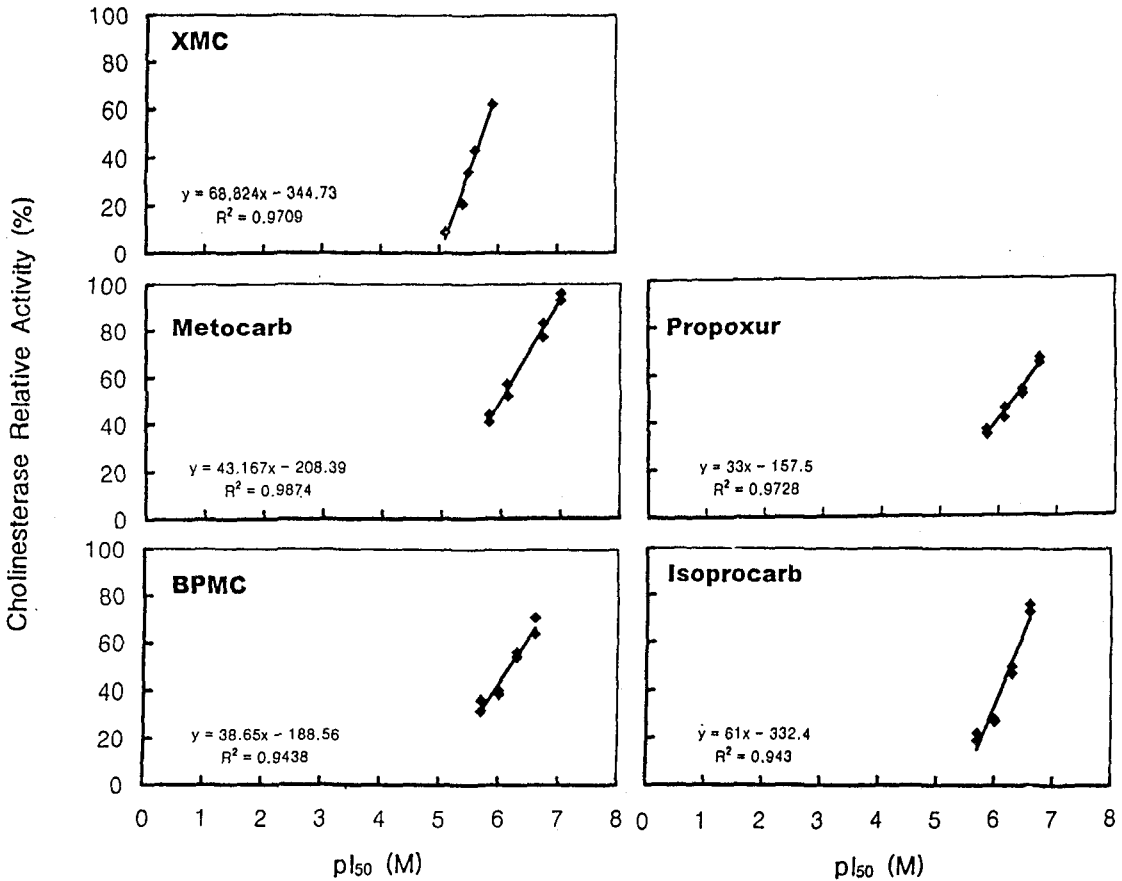


Fig. 5. Inhibition of cholinesterase activity by the phenyl N-methylcarbamate insecticides *in vitro*.

site의 결합거리, 입체형태 등과 carbamate 농약과의 상호 친화력 차이 때문이다. 즉 Ki 값이 크지면 ChE의 활성기와 carbamate 농약과의 친화력은 커지게 되고, 독성이 더 강해진다.<sup>15)</sup>

### 3.4. Aromatic N-methylcarbamate계에 의한 ChE 활성 저해

Aromatic N-methylcarbamate계에 속하는 carbaryl과 carbofuran대한 ChE활성의 저해양상은 Fig. 6과 같았다. ChE 효소 활성의 I<sub>50</sub> 과 Ki는 Table 3과 같다. Carbaryl의 I<sub>50</sub>과 Ki는 280 μg/l과 16,646 moles l<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>이었고, carbofuran은 114 μg/l과 44,971 moles l<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>이었다. Carbofuran대한 pI<sub>50</sub>은 6.28이었으며, 집파리에서 6.60이라는 문헌값과<sup>6)</sup> 유사한 경향이였다. 일반적으로 효소반응은 다음 식과 같이 효소와 기질이 반응한다.



여기서, E:효소, S:기질, P:생성물

저해제가 첨가되면 저해제가 기질보다 효소와 친화력이 더 큰 경우 저해제와 결합하여 효소-저해제 복합체(EI)가 형성된다.



여기서, I:저해제

이때 저해제를 검출하기 위해 효소 저해율을 측정할 수 있는데 이를 Enzyme-Inhibition(EI)법<sup>9)</sup>이라 한다.

현재 먹는물 관리법에 의한 먹는물 수질기준에서 농약으로는 신경저해제에 속하는 유기인계 농약과 carbamate계 농약의 허용기준을 설정하고 있다. 유기인계 농약으로는 malathion이 0.25 mg/l, parathion은 0.06 mg/l, diazinon은 0.02 mg/l과 fenitrothion 0.04 mg/l을 넘지 못하게 규정하고 있다. Carbamate계 농약으로는 carbaryl 한가지만 규제하고 있는데, 0.07 mg/l을 넘지 못하게 하고 있다.<sup>16)</sup> *in vitro* 조건에서 Enzyme Inhibition(EI)법으로 측정된 carbaryl 농약의 ChE활성 저해는 carbaryl 농

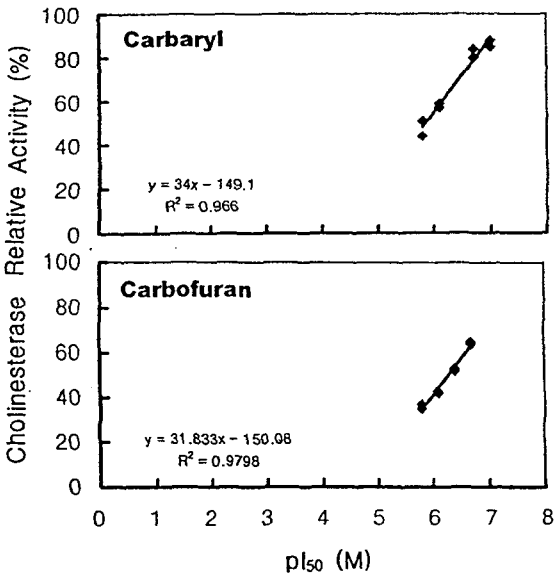


Fig. 6. Inhibition of cholinesterase activity by aromatic N-methylcarbamate insecticides *in vitro*.

약의 검출 기법 개발에 응용할 수도 있다. 김<sup>11)</sup>은 cholinesterase활성 저해법을 이용한 유기인계 농약의 검출가능성을 보고한 바 있다.

자연계 시료에서 ChE의 저해가 나타난다면 ChE 저해물질이 함유되어 있다는 의미이며, 여기에는 ChE의 저해에 특이성이 있는 유기인계나 carbamate계 농약이 존재할 가능성이 있다는 증거이다. 따라서 빠르고 간편한 ChE 저해법으로 carbamate계 농약의 함유 가능성을 측정하고, 여기서 ChE의 저해가 나타난다면 다른 기기분석적인 방법으로 carbamate계 농약의 농도를 측정하면 될 것이다. ChE 효소를 이용하여 carbamate계 농약에 의한 ChE 활성 저해도를 측정한다면, carbamate계 농약의 검출이 가능하다. 여기서 ChE 활성 저해 측정은 Ellman 등<sup>13)</sup>방법으로 짧은 시간 내에 매우 간단하고 빠르게 측정할 수 있다.

#### 4. 요약

Carbamate 농약에 대한 cholinesterase(ChE)활성 저해 관계를 규명 하고자 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 하였다. ChE의 최적 pH는 8.0이었다. 병아리 혈장의 ChE 활성은 기질로 acetylcholin를 사용할 경우 24.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein이었다. *in vivo*에서 BPMC을 0.32 mg/kg 경구 투여한 15분 후에 ChE 활성이 60% 까지 저해되었으며 그후 12시간 후에 97% 까지 회복이 일어났다. *in vitro*에서 효소 활

Table 3.  $I_{50}$  and bimolecular rate constant(Ki) of cholinesterase by aromatic N-methylcarbamate insecticides *in vitro*

Compounds	$I_{50}^{1)}$ ( $\mu\text{g}/\ell$ )	$pI_{50}^{2)}$ (M)	Ki ( $\text{moles}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
Carbaryl	280	5.85	16,646
Carbofuran	114	6.28	44,971

1)  $I_{50}$ : Concentration required for 50% inhibition of enzyme activity 2)  $pI_{50} = -\log I_{50}$

성이 50%로 저해되는데 필요한 농도인  $I_{50}$ 이 Phenyl N-methylcarbamate계에 XMC는 329  $\mu\text{g}/\ell$ 였고, metolcarb은 214  $\mu\text{g}/\ell$ 였다. BPMC는 111  $\mu\text{g}/\ell$ , propoxur는 107  $\mu\text{g}/\ell$ , isoprocarb는 104  $\mu\text{g}/\ell$ 이었다. Aromatic N-methylcarbamate계에 속하는 carbaryl의  $I_{50}$ 은 280  $\mu\text{g}/\ell$ 이었고, carbofuran 114  $\mu\text{g}/\ell$ 이었다.

#### 감사의 글

본 연구는 2000년도 경상대학교 기린연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고 문헌

- Kim, J. H., and S. E. Feagley, 1998, Adsorption and leaching of trifluralin, metolachor and metribuzin in a commerce soil, *J. Environ. Sci. Health*, B33(5), 529-546.
- 정영호, 김장억, 김정환, 이영득, 임치환, 허장현, 2000, 최신농약학, 시그마프레스, 148pp.
- Sole, M., C. Porte and J. Albaiges, 1995, Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel mytilus galloprovincialis, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 157-164.
- Tseng, R. K., and J. J. Cooney, 1995, Action of tributyltin on enzymes of four bacteria, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1113-1121.
- 임요셉, 한성수, 1999, 살충제 carbofuran과 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene 이 쥐의 효소활성에 미치는 영향, *한국농약과학회지*, 3(3), 27-36.
- Kuhr, R. J., 1977, Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology, CRC Press, Ohio.
- Bergmeyer, H. H., 1984, Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. IV, Verlagchemie,

- 52-74pp.
- 8) 정영호, 박영선, 1990, 농약학, 전국농업기술자협회, 문선사.
  - 9) 유홍일, 이해근, 전성환, 1991, 농약잔류 분석방법, 동화기술, 79-84pp.
  - 10) 정금희, 1997, 산업폐수의 환경독성평가방법, 환경연구노트, 인제대학교 환경연구소, 6, 19-36.
  - 11) 김정호, 2001, Cholinesterase 저해 활성을 이용한 유기인계 농약의 효소적 분석, 한국농약과학회지, 5(1), 12-18.
  - 12) Tomlin, C., 1994, The pesticide manual-incorporating the agrochemical handbook, 10th ed., British crop protection council, United Kingdom.
  - 13) Ellman, G. L., K. D. Courtney, Jr. V. Andres and R. M. Featherstone, 1961, A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol., 7, 88-95.
  - 14) Lowry, O. H., N. J. Roesbrough, A. L, Favr and R. J., Randall, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
  - 15) Matsumura, F., 1975, Toxicology of insecticides, Plenum Press, New York, 105-164pp.
  - 16) 환경부, 2002, <http://nkkfem.or.kr/sub3/먹는물기준.htm>.