

현주를 이용한 IBP의 경구투여 및 피부도포 후 요중 대사물질 측정

민경진[†] · 조영주* · 차춘근

계명대학교 공중보건학과 *농업과학기술원 환경생태과

Determination of urinary metabolite of IBP after oral administration and dermal application to rats

Kyung Jin Min[†] · Young Joo Cho* and Chun Geun Cha

Department of Public Health, Keimyung University

*National Institute of Agricultural Science and Technology

ABSTRACT

This study was aimed to determine the urinary metabolite of IBP, one of the organophosphorus pesticides, as the biomarkers of exposure. Urine samples were collected for 24 hours in metabolic cages after oral administration and dermal application of IBP to rats. Identification of the derivatized urinary metabolite was determined by GC/MS and excretion time courses of the urinary metabolite was analyzed by GC/FPD. Urinary metabolite of IBP, diisopropyl phosphorothioate, was detected in rats urine both after oral administration and dermal application of IBP. Parent compound was not detected in the experiment.

In GC/MS, the mass spectral confirmation for diisopropyl phosphorothioate ion was identified at m/z 254. Diisopropyl phosphorothioate was excreted within 48 hours and 72 hours after oral administration and dermal application of IBP, respectively.

In this study, the same urinary metabolite of IBP was detected both in oral and dermal exposure. Generally, excretion of the urinary metabolite after oral administration was faster than after dermal application. It is suggested that urinary diisopropyl phosphorothioate could be used as the biomarkers of exposure to IBP.

Keywords : IBP, Metabolite, Urine, GC/FPD, GC/MS

I. 서 론

유기염소계 농약은 환경 및 생태계에 오염문제를 야기시킴으로써 많은 나라에서 사용이 금지되었거나 독성 또는 생물농축의 결과로 인해 사용이 제한된 이후 유기인계 농약의 사용량이 전세계적으로 증가하고 있으며 그 결과, 지하수와 음용수 및 음식물에서 검출되고 있다.¹⁾

유기인계 농약의 생체 내 분포는 호흡기계, 경구 또는 경피를 통하여 일어난다. 대부분 유기인계 농약은 친지질성이며 흡입 또는 섭취를 통해 빨리 흡수되며 피부흡수는 느리나 만약 만성폭로가 되면 심각한 중독현상을 일으킬 수 있다.²⁾

유기인계 농약은 체내에 축적되지 않는 phosphate ($P=O$) 또는 phosphorothioate ($P=S$) 에스 테르 결합 화합물이며 비잔류성으로 만성독성 보다는 급성 독성 증상을 유발시키는 것으로 보고되고 있다.³⁾ EPA에서 규정한 유기인계 농약류 가운데 약 80% 정도가 공통적으로 요 중 dialkyl phosphates가 대사물질이다.⁴⁾

한편 esterases는 세 가지로 분류되는데 유기인계 농약을 가수분해할 수 있는 A-esterases, 유기인계 농약에 의해 전형적으로 방해를 받는 B-esterases인 cholinesterase (ChEs)와 carboxylesterases (CaEs), 농약과 상호작용을 일으키지 않는 C-esterases가 있다.⁵⁾ 요 중 대사물질들 중에서 alkylphosphates는 A-esterases에 의해 가수분해되어 생성되는 물질로 DMP (O,O -dimethyl phosphate), DEP (O,O -diethyl phosphate),

[†]Corresponding author : Dept. of Public Health Keimyung Univ.
Tel: 053-580-5229, Fax : 053-580-5469
E-mail : kjm422@kmu.ac.kr

DMTP (O,O-dimethyl phosphorothioate), DETP (O,O-diethyl phosphorothioate), DMDTP (O,O-dimethyl phosphorodithioate), DEDTP (O,O-diethyl phosphorodithioate) 등이 알려져 있다.⁶⁾

유기인계 농약의 대사물질에 관한 연구는 Shafik 등이 GC를 이용하여 요 중 dialkyl phosphates를 분석한 보고 이래로 많은 연구자들의 연구대상이 되어 왔다.⁷⁾ 요 중 dialkyl phosphates 측정은 유기인계 농약의 폭로수준을 평가하는데 강력한 수단이 될 수 있다. 이것을 측정할 때 어려운 점은 이들 화합물이 수용성이 높고 요에서 이온화되어 있어 일반유기용매로 추출이 어렵다. 또한, 낮은 증기압과 큰 극성으로 인해 GC로 분석하기 위해서는 휘발성과 감도를 높이기 위해 반드시 유도체화 과정을 거쳐야 한다는 것이다.⁸⁾

이러한 이유로 요 중 dialkyl phosphates를 측정하는데 빠르고 신뢰성 있는 방법을 개발할 필요성이 있다. 요 중 dialkyl phosphates 추출법은 용매추출법⁹⁾, 음이온교환수지법¹⁰⁾, 고체상추출법¹¹⁾, 동결건조법¹²⁾과 azeotropic distillation법⁶⁾ 등이 보고되어 왔다.

유도체화 방법으로 연구 초기에 주로 사용되었던 diazoalkane을 이용한 메틸화, 에틸화 등 대부분 alkylation 방법⁷⁾이었으나 유도체 시약이 가지는 독성, 발암성, 폭발성의 위험으로 인해 새로운 방법이 시도되었다. 1-(4-nitrobenzyl)-3-(4-tolyl)triazene을 이용한 alkylation,¹²⁾ TMAH (trimethyl ammonium hydroxide) 및 TBAH tetrabutyl ammonium hydroxide)를 사용하여 GC 및 GC/MS 주입부의 높은 온도를 이용한 alkylation 법¹³⁻¹⁴⁾과 PFB-Br (pentafluorobenzyl bromide) 및 BTT (3-benzyl-1-p-toly triazene)를 이용한 benzylation 방법¹⁵⁻¹⁶⁾이 있다. PFB-Br은 diazoalkane과 triazene 시약과 비교했을 때 DETP와 DMTP 단일반응물질을 생성할 수 있다는 이점이 있다.⁶⁾ 한편 국내적으로는 tri-sil (HMDS: TMCS: pyridine=2:1:10) 시약을 이용한 silylation 방법⁴⁾이 사용되었다.

유도체화 된 dialkyl phosphates의 분석기기로는 GC/FPD¹²⁻¹⁵⁾를 사용하여 정성 및 정량분석하며 대사물질을 동정하기 위해서 GC/MS¹⁴⁾ 및 NMR¹⁷⁾을 사용해왔다.

한편 독성물질의 주된 신체 투과경로는 호흡기계, 경구 및 경피이다. 경피 흡수의 경우는 흡수량의 측정도 어렵지만, 입과 기도와 같이 농약의 흡수에 따른 생체의 영향을 쉽게 느끼지 못하기 때문에 체내 흡수

량에 대한 연구도 자연히 소홀히 취급되어 왔다. 아직 까지 피부와 관련된 대사물질에 관한 연구가 미비하며 특히 유기인계 농약 등의 유해물질은 여러 가지 경로를 거쳐 인체에 흡수되는데 그 중 피부폭로가 주요 경로이므로 이들 농약에 대한 폭로여부와 그 대사물질에 대한 연구는 이들 농약의 유해성 평가 자료로 활용할 수 있다는 측면에서 중요한 의의를 갖는다.

본 연구에 사용된 유기인계 농약은 상표명이 키타진이며 도열병 살균제인 IBP를 흰쥐에 경구투여 및 피부도포 후 요를 채취하여 대사물질을 확인함으로써 폭로경로에 따른 요 중 대사물질을 비교하고 아직 밝혀지지 않은 대사물질을 확인하여 이 농약을 생체 모니터링 하는데 기초자료로 제시하고자 한 것이다.

II. 연구방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물은 체중 150~200g (5~6주령)의 Sprague Dawley종의 수컷 흰쥐를 구입하여 사육실에서 일주일 이상 물과 흰쥐용 사료를 자유로이 공급하면서 적응시켰다. 대조군 (normal control group, NC), propylene glycol 처리군 (propylene glycol treatment control group, PGTC)과 농약 처리군 (treatment group)으로 구분하여 각각 5마리씩 실험에 사용하였다.

2) 실험농약

실험농약은 현재 국내에서 시판되는 유기인계 농약인 IBP [S-benzyl O, O-diisopropyl phosphoro-dithioate, 95.5%, (주)경농]를 사용하였다.

2. 기기 및 시약

실험에 사용된 기기로는 요 중 대사물질을 동정하기 위해서 Hewlett Packard(HP) 6890 GC에 연결된 HP 5972A MSD (mass selective detector)를 사용하였고, FPD (flame photometric detector, phosphorus mode)가 장착된 GC (Shimadzu, GC-14A), 화전증발농축기 (Rikakikai, NE-IS), 원심분리기 (Hanil Science, HA-1000-3) 및 그 외 실험실에서 사용하는 일반기기를 사용하였다. 유도체 시약인 TBAH (tetrabutylammonium hydroxide, 1.0M in methanol)은 Aldrich사, 그 외 일반시약은 잔류농약 분석용으로 Wako사 제품을 구입하여 사용하였다.

3. 실험방법

1) 추출방법

이 연구에 사용된 추출용매는 Richardson과 Seiber의 방법¹⁴⁾에 따라 5% ethanol/ethyl acetate를 사용하였다. 요 시료 1mL를 채취하여 원심분리용 시험관에 취하고, 6N-HCl 1mL를 넣고 1분간 vortex로 혼합한 후 5% ethanol/ethyl acetate 1mL를 넣고 2분간 vortex로 혼합하였다. 2000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 반복추출 한 상층액을 합하여 35°C에서 감압 농축 후 ethyl acetate 1mL를 넣고 완전히 녹였다.

2) 유도체화 방법

유도체화 방법은 GC/MS 및 GC 주입부의 높은 온도를 이용한 butylation 방법을 사용하였다. 추출방법에 따라 처리된 모든 시료에 Richardson과 Seiber의 방법¹⁴⁾에 따라 TBAH 40μL를 넣고 1분간 격렬하게 혼합반응시켜 유도체를 만들었다.

3) 분석방법

유도체화 된 시료 2μL씩 GC/MS 및 GC/FPD에 주입하여 분석하였다. 요 중 대사물질을 동정하기 위한 GC/MS의 분석조건 및 뇌 중 대사물질의 시간별 배설량을 측정하기 위한 GC/FPD의 분석조건은 Table 1과 같다. GC/MS 조건으로 초기온도 100°C이며, 3°C/min으로 150°C까지 올린 후 분당 10°C/min으로 300°C까지 올렸다. 한편 GC/FPD 조건으로 초기온도

100°C이며, 3°C/min으로 150°C까지 올린 후 분당 10°C/min으로 270°C까지 올렸다.

4) 요 중 대사물질 측정

IBP를 경구투여 한 실험에서 대조군 (NC)은 물과 사료만을 공급하였으며, propylene glycol 처리군 (PGTC)은 propylene glycol만을 5mL/kg씩 경구투여하였고, 농약 처리군 (treatment)은 IBP를 propylene glycol에 녹여 급성 경구독성 (LD₅₀ male rat: 490mg/kg)의 1/10 농도로 zonde를 이용하여 경구투여 하였다.¹⁸⁾

한편, 피부도포 한 실험에서는 실험일 24시간 전에 먼저 실험동물의 복부털을 제모기로 5×6cm 이상 크기의 넓이로 면도한 다음 2.5×2.5cm 크기 면적의 거즈에 IBP를 일정하게 묻혀 면도된 부위에 도포한 다음 의료용 반창고로 고정시켰다.¹⁹⁾ 대조군 (NC)은 피부에 아무 것도 도포시키지 않았으며 물과 사료만을 공급하였고, propylene glycol 처리군 (PGTC)은 propylene glycol만을 5mL/kg씩 피부 도포시켰고, 농약 처리군 (treatment)은 IBP를 propylene glycol에 녹여 급성 경피독성 (LD₅₀ male rat: 4000mg/kg)의 1/10 농도로 피부에 도포하였다. 쥐 한 마리씩을 각 metabolic cage에 넣어 물과 사료를 공급하면서 24시간 동안 뇌를 채취하여 추출방법에 따라 추출하고 유도체화 시켜 GC/MS로 대사물질을 동정하였다. 채취된 모든 시료는 분석 전까지 -20°C로 냉동 보관하였다.

Table 1. GC/MS and GC/FPD conditions for the analysis of urinary metabolite

Item	GC/MS	GC/FPD
Instrument	Hewlett-packard 6890	Shimadzu GC-14A
GC conditions		
Column	HP-5MS capillary 30m×0.25mm (I.D.)	DB-17 capillary 30m×0.53mm (I.D.)
Temperature	Col. initial temp. 100°C initial time 0 min rate 3, 10°C/min final temp. 150, 300°C final time 0 min Inj. 280°C -	Col. initial temp. 100°C initial time 0 min rate 3, 10°C/min final temp. 150, 270°C final time 0 min Inj. 280°C Det. 300°C
Carrier gas	He, 0.7mL/min	N ₂ , 1mL/min
Air	-	60kPa
Hydrogen	-	60kPa
Type of injection	Split (1/10)	Split (1/10)
Injection volume	2μL	2μL
Detector	-	FPD
MS conditions		
MS	HP 5972A MSD	
Ionization mode	Electron impact	
Mass range	50-550 m/z	
Electron energy	70 eV	

5) 요 중 대사물질의 시간별 배설량 측정

IBP를 경구투여 및 피부도포 후 요 중 대사물질의 시간에 따른 배설량을 측정하기 위해 농약 처리된 쥐 한 마리씩을 각 metabolic cage에 넣어 물과 사료를 공급하면서 6, 12, 24, 48, 72, 96시간의 뇨를 채취하여 전술한 방법에 따라 실험처리 한 후 GC/FPD로 분석하였다. 요 중 대사물질의 시간별 배설량은 총 배설량 (peak area)에 대한 시간별 배설량 (peak area)을 백분율로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 요 중 대사물질 측정

1) 경구투여 후 요 중 대사물질 측정

흰쥐에 IBP를 경구투여 후 요 중 대사물질을 측정한 결과는 다음과 같다. 대조군 (NC), propylene glycol 만을 투여한 쥐 (PGTC) 및 IBP를 투여한 쥐 (treatment)에서 각각 24시간 동안 요를 채취하여 분석한 GC/MS의 total ion chromatogram은 Fig. 1 (A), (B), (C)와 같다.

농약 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate는 14분대에서 나타났다. GC/MS의 분석결과에서 대조군과 propylene glycol 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. Diisopropyl glycol의 주요 조각 이온은 m/z=254, 198, 170, 115로 추정되었고 total ion chromatogram과 질량 스펙트럼은 Fig. 2와 같다.

요 중 대사물질의 시간별 배설량을 측정하기 위해 분석한 GC chromatogram은 Fig. 3 (A), (B), (C)와 같다. 농약 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate는 11분대에서 나타났다. 대조군과 propyl glycol 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. 한편, diisopropyl phosphorothioate 외 다른 대사물질을 알아보고자 유도체화 하지 않은 시료를 GC/MS로 추정한 결과 다른 대사물질은 찾아볼 수 없었다.

2) 피부도포 후 요 중 대사물질 측정

흰쥐에 IBP를 피부도포 후 요 중 대사물질을 측정한 결과는 다음과 같다. 대조군 (NC), propylene glycol 만을 투여한 쥐 (PGTC) 및 IBP를 투여한 쥐 (treatment)에서 각각 24시간 동안 요를 채취하여 분석한 GC/MS의 total ion chromatogram은 Fig. 4 (A), (B), (C)와 같다.

농약 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate는

14분대에서 나타났다. GC/MS의 분석결과에서 대조군과 propylene glycol 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. Diisopropyl glycol의 주요 조각 이온은 m/z=254, 198, 170, 115로 추정되었고 total ion chromatogram과 질량 스펙트럼은 Fig. 5와 같다.

요 중 대사물질의 시간별 배설량을 측정하기 위해 분석한 GC chromatogram은 Fig. 6 (A), (B), (C)와 같다. 농약 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate는 11분대에서 나타났다. 대조군과 propyl glycol 처리군에서 diisopropyl phosphorothioate의 분석에 영향을 미치는 간섭물질이 없었다. 한편, diisopropyl phosphorothioate 외 다른 대사물질을 알아보고자 유도체화 하지 않은 시료를 GC/MS로 추정한 결과 다른 대사물질은 찾아볼 수 없었다.

현재까지 알려진 유기인계 농약의 대사물질인 dialkyl phosphates는 DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 및 DEDTP이다. 요 중 alkyl phosphates 대사물질 측정은 dimethyl 기 또는 diethyl 기를 가진 유기인계 농약인 경우에만 제한되어 왔다.²⁰⁾ 그러나 아직 propyl 기를 가진 유기인계 농약인 IBP의 대사물질을 측정한 결과 alkyl phosphates류인 diisopropyl phosphorothioate를 추정할 수 있었다. 이 실험결과 흰쥐에 IBP를 경구투여 및 피부도포 후 요 중 대사물질은 diisopropyl phosphorothioate로 동일하였다 (Fig. 7).

2. 요 중 대사물질의 시간별 배설량 측정

1) 경구투여 후 요 중 대사물질의 시간별 배설량 측정

IBP를 쥐에 경구투여 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 동안 요 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate의 총 배설량에 대한 시간별 배설량을 백분율로 나타난 결과는 Table 2와 같다. IBP의 요 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate가 48시간 내 98.5%가 배설되었고 6시간에 가장 많은 양이 배설되었다. 96시간 이후는 배설되지 않은 점으로 보아 IBP가 체내로 흡수된 후 수 시간 내 빠르게 분해되어 요 중 대사물질로 배설됨을 알 수 있었다.

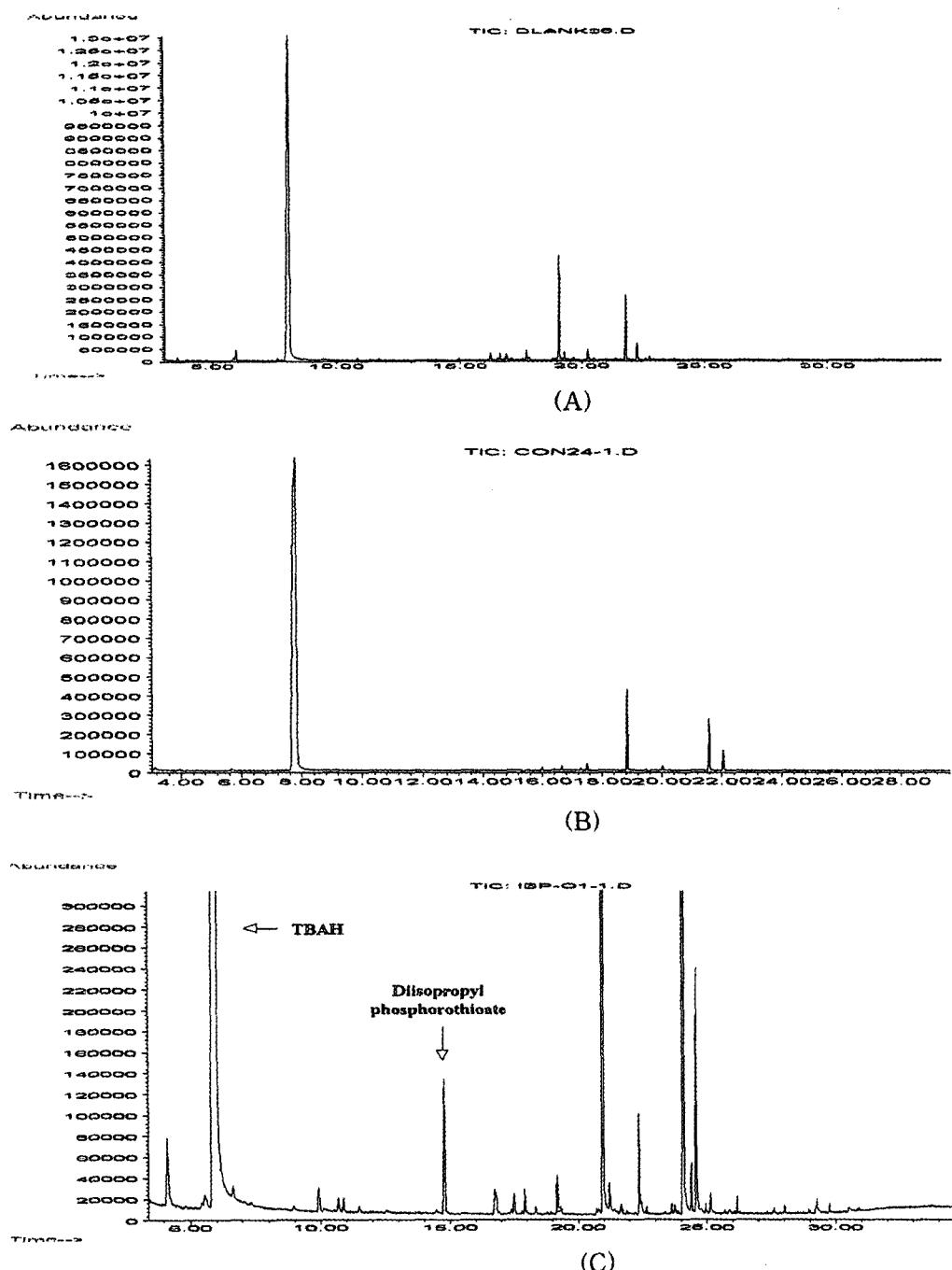


Fig. 1 GC/MS total ion chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine (C) in oral administration of IBP to rats.
 (NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)

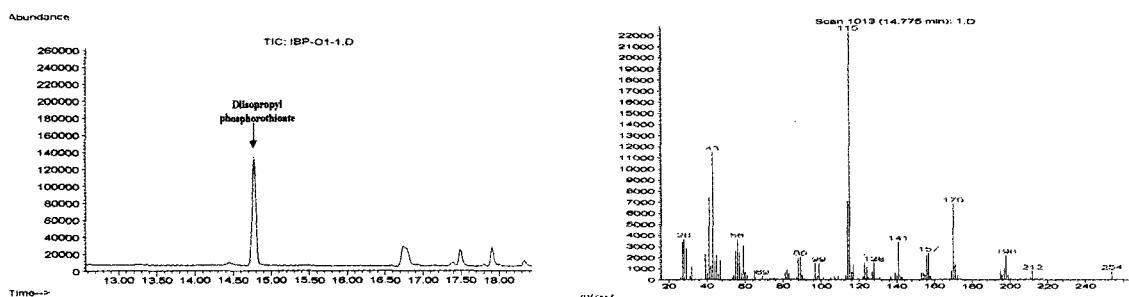


Fig. 2 GC/MS total ion chromatogram and mass spectrum of urinary metabolite (diisopropyl phosphorothioate) in oral administration of IBP to rats.

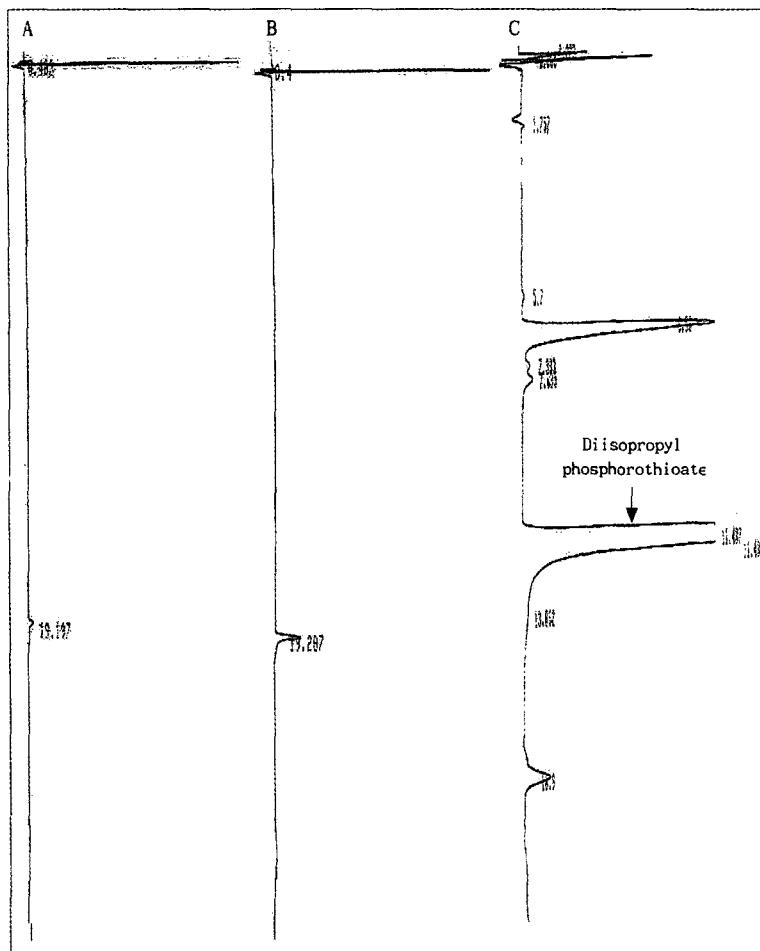


Fig. 3 GC/FPD chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine(C) in oral administration of IBP to rats.
(NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)

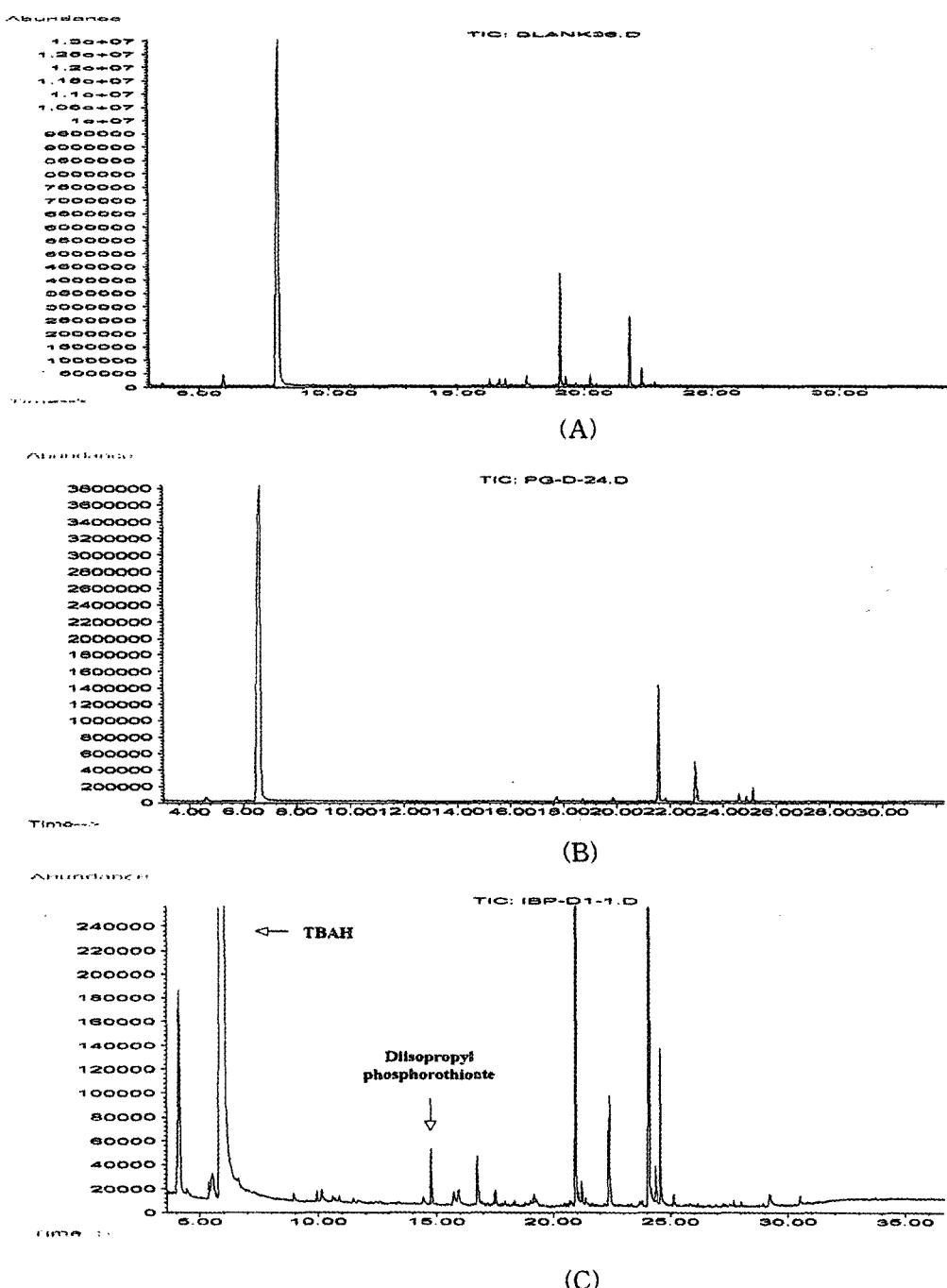


Fig. 4 GC/MS total ion chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine (C) in dermal application of IBP to rats.
(NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)

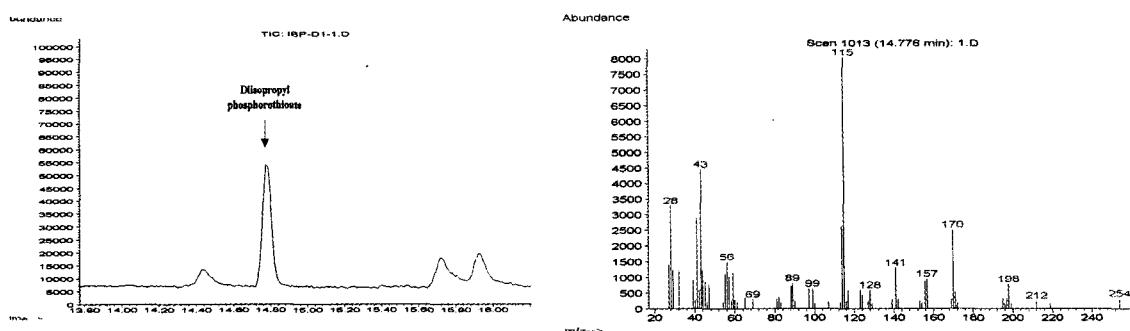


Fig. 5 GC/MS total ion chromatogram and mass spectrum of urinary metabolite (diisopropyl phosphorothioate) in dermal application of IBP to rats.

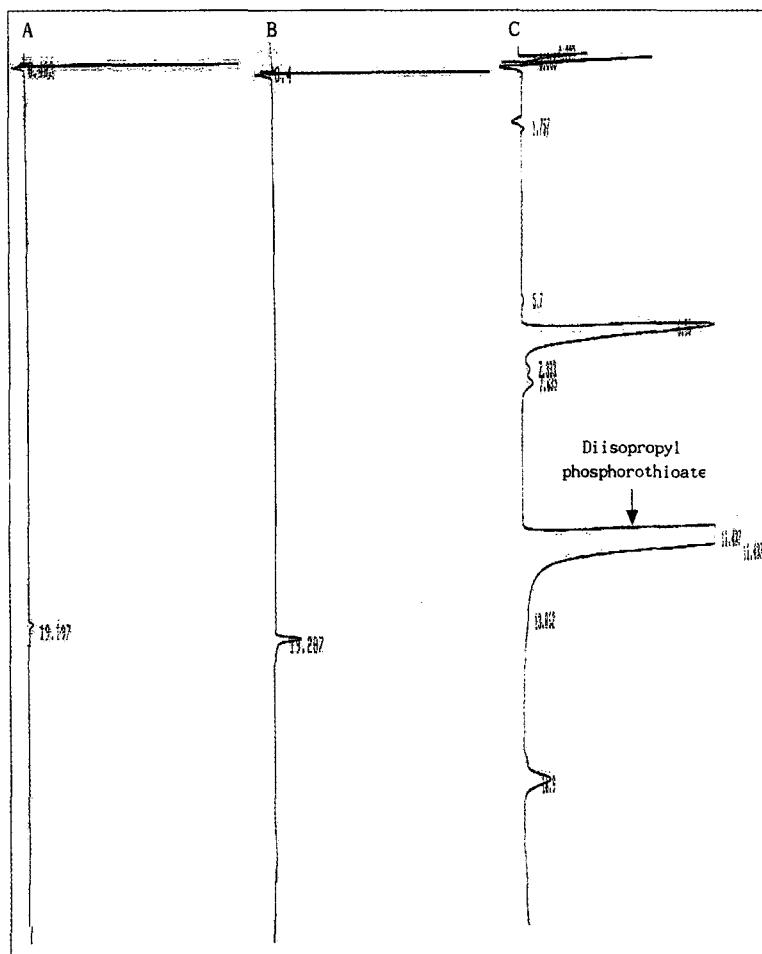
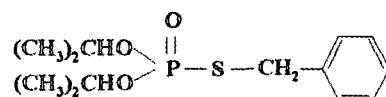
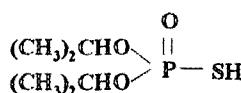


Fig. 6 GC/FPD chromatograms of NC urine (A), PGTC urine (B), and treatment urine (C) in dermal application of IBP to rats.
(NC: normal control group, PGTC: propylene glycol treatment group)



IBP(M.W.288.3)



Diisopropyl phosphorothioate

(M.W.198.0)

Fig. 7 Proposed urinary metabolite of IBP in rats.

Table 2. Excretion time course of urinary diisopropyl phosphorothioate in oral administration of IBP to rats

	Percentage of time course (hours)					
	6	12	24	48	72	96
Diisopropyl phosphorothioate	66.20	15.23	10.99	6.09	1.50	*ND
	± 3.21	± 0.61	± 0.40	± 0.27	± 0.04	

Oral dose level: 49mg/kg (1/10 of LD₅₀).

*ND: not detected

Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments and one experiment used five rats.

Table 3. Excretion time course of urinary diisopropyl phosphorothioate in dermal application of IBP to rats

	Percentage of time course (hours)					
	6	12	24	48	72	96
Diisopropyl phosphorothioate	66.20	15.23	10.99	6.09	1.50	*ND
	± 3.21	± 0.61	± 0.40	± 0.27	± 0.04	

Dermal dose level: 400mg/kg (1/10 of LD₅₀).

*ND: not detected

Each value represents the mean ± S.E. of 3 experiments and one experiment used five rats.

2) 피부도포 후 요 중 대사물질의 시간별 배설량 측정

IBP를 경구에 피부도포 후 6, 12, 24, 48, 72, 96시간간 동안 요 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate의 총 배설량에 대한 시간별 배설량을 백분율로 나타난 결과는 Table 3과 같다. IBP의 요 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate가 48시간 내 90.3%가 배설되었고 12시간에 가장 많은 양이 배설되었으며, 96시간 이후는 배설되지 않았다.

IBP의 투여경로에 따른 시간별 배설량의 비교는 Fig. 8과 같다. 투여경로에 따라 diisopropyl phosphorothioate에 대한 요 중 반감기를 일분획 모형 (one-compartment model)으로 측정한 결과 경구투여 후 6시간 미만이고, 피부도포 후 13.9시간으로 경구투여보다 피부도포 할 때 배설이 지연됨을 알 수 있었다.

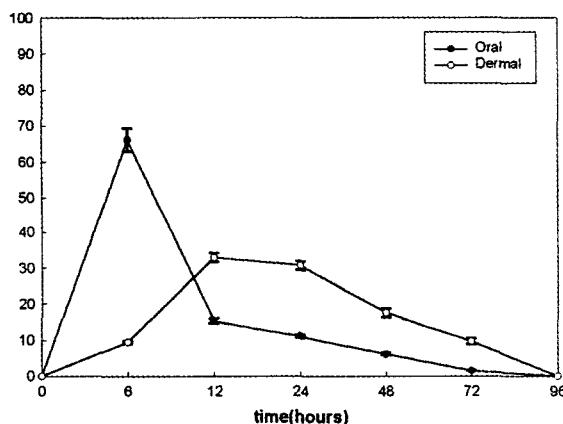


Fig. 8 Comparison of excretion time courses of urinary diisopropyl phosphorothioate in oral and dermal exposure of IBP to rats.

IV. 결 론

흰쥐를 이용하여 IBP를 경구투여 및 피부도포 후 요 중 대사물질을 GC/MS로 측정하였고, GC/FPD로 요 중 대사물질의 시간별 배설량을 측정한 결과는 다음과 같다.

IBP를 경구투여 후 뇌 중 대사물질은 diisopropyl phosphorothioate이며, GC/MS로 분석한 결과 diisopropyl phosphorothioate는 m/z=254에서 분자이온을 추정하였다. IBP를 피부도포 후 요 중 대사물질은 경구투여와 동일한 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate였다. 모 화합물이나 diisopropyl

phosphorothioate와 다른 대사물질은 검출되지 않았다.

IBP를 경구투여 후 뇌 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate의 시간별 배설량은 6시간에 가장 많은 양이 배설되었다. 또한 48시간 내 98.5%가 배설되었고 96시간 이후는 대사물질이 배설되지 않았다. 한편 IBP를 피부도포 후 뇌 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate의 시간별 배설량은 12시간에 가장 많은 양이 배설되었으며, 48시간 내 90.3%가 배설되었고 96시간 이후는 대사물질이 배설되지 않았다.

IBP의 뇌 중 대사물질인 diisopropyl phosphorothioate는 IBP의 생체모니터링 지표물질로서 사용될 수 있을 것이라고 생각되며, 뇌 중 diisopropyl phosphorothioate의 시간별 배설량을 측정한 결과 경구투여보다 피부도포 할 때 배설이 지연된다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Serrano, R., López, F.J., Roig-Navarro and Hernández, F.: Automated sample clean-up and fractionation of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl and metabolites in mussels using normal-phase liquid chromatography. *J. of Chromatography A*, 778, 151-160, 1997.
- Vale, J. A.: Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus OP insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102, 1998.
- Nauman, C. H : Biomarkers of human exposure to pesticides. ACS, New York, 43-61, 1994.
- Park, S. S., Pyo, H., Lee, K. J., Park, S. J. and Park, T. K : The analysis of common metabolites of organophosphorus pesticides in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 19(1), 45-50, 1998.
- Basack, S. B., Oneto, M. L., Fuchs, J. S., Wood, E. J. and Kesten, E. M : Esterases of Corbicula fluminea as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 569-576, 1998.
- Aprea, C., Sciarra, G. and Lunghini, L : Analytical method for the determination of urinary alkylphosphates in subjects occupationally exposed to organophosphorus pesticides and in the general population. *J. of Analytical Toxicology*, 20, 559-563, 1996.
- Shafik, M. T., Bradway, D., Biros, F. J. and Enos, H. F :

- Characterization of alkylation products of diethyl phosphorothioate. *J. of Chromatography A*, 778, 151-160, 1997.
- 8) Fest, C. and Schmidt, K. L : The chemistry of organophosphorus. Springer-Verlag, Berlin, 337, 1973.
- 9) Bradway, D. E. and Shafik, T. M : Malathion exposure studies. Determination of mono- and dicarboxylic acids and alkyl phosphates in urine. *J. Agr. Food Chem.*, 25(6), 1342-1344, 1977.
- 10) Lores, E. M. and Bradway, D. E : Extraction and recovery of organophosphorus metabolites from urine using an anion exchange resin. *J. Agr. Food Chem.*, 25(1), 75-79, 1977.
- 11) Muan, B. and Skare, J. U : A method for the determination of the main metabolites of malathion in biological samples. *J. Agr. Food Chem.*, 37(4), 1081-1085, 1989.
- 12) Takade, D. Y., Reynold, J. M. and Nelson, J. H : 1-(4-Nitrobenzyl)-3-(4-tolyl)triazene as a derivatizing reagent for the analysis of urinary dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides by gas chromatography. *J. Agr. Food Chem.*, 27(4), 746-753, 1979.
- 13) Churchill II, F. C., Ku, D. N. and Miles, J. W : Gas-liquid chromatographic inlet block derivatization of organophosphorus pesticides and related dialkyl phosphorothioates. *J. Agr. Food Chem.*, 26(5), 1108-1112, 1978.
- 14) Richardson, E. R. and Seiber, J. N : Gas chromatographic determination of organophosphorous insecticides and their dialkyl phosphate metabolites in liver and kidney samples. *J. Agr. Food Chem.*, 41(3), 416-422, 1993.
- 15) Daughton, C. G., Cook, A. M. and Alexander, M : Gas chromatographic determination of phosphorus-containing pesticide metabolites via benzylation. *Analytical Chemistry*, 51(12), 1949-1953, 1979.
- 16) Bradway, D. E., Moseman, R. and May, R. : Analysis of alkyl phosphates by extractive alkylation. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 26, 520-523, 1981.
- 17) Ali, F. A. F. and Fukuto, T. R : Toxicity of O,O,S-trialkyl phosphorothioates to the rat. *J. Agr. Food Chem.*, 33(1), 126-130, 1982.
- 18) Tomlin, C : The pesticide manual. 10th, Crop Protection Publications, U.K., 1994.
- 19) Marco, G. J., Simoneaux, B. J., Williams, S. C., Cassidy, J. E., Bissig, R. and Muecke, W : Dermal exposure related to pesticide use. ACS, Washington, D. C., 43-61, 1985.
- 20) He, F : Biological monitoring of occupational pesticides exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 65, S69-S76, 1993.