

우리 나라 주요 하천유역에 서식하는 양서류 및 어류의 유기질소계 농약류 축적

오동진 · 김영복 · 이지영 · 문지용 · 정기호*
부산대학교 화학과*
(2002. 4. 16 접수)

Accumulation of Organonitrogen Pesticides in Fishes and Amphibians from the Basin of Major Rivers of S. Korea

Dong-Jin Oh, Young-Bok Kim, Ji-Young Lee, Ji-Yong Moon and Gi-Ho Jeong*
Dept. of Chemistry, Pusan National University, Busan, 609-735, S. Korea
(Received Apr. 16, 2002)

요 약 : 본 연구는 우리 나라 수계에 서식하는 어류와 양서류에 대해 trifluralin, atrazine, metribuzin, alachlor, malathion, nitrofen, permethrin, cypermethrin, fenvalerate, parathion 등의 유기농약의 잔류실태를 조사한 것이다. 전국의 주요 하천 유역 31개 지점에서 양서류와 어류를 채집하였으며, 이들의 근육 부분을 최종 분석시료로 하였다. 전처리 과정에서 아세토니트릴로 추출한 후 n-헥산으로 씻어 지질성분을 제거하고 정제수를 넣고 디클로로메탄으로 재추출하였다. 추출액을 탈수·농축하여 플로리실 컬럼으로 정제한 후 동위원소 표준물질을 첨가하여 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 검출된 농도 범위는 양서류에서는 0.17~6.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 그리고 어류에서는 cypermethrin이 최대 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 비롯해서 0.26~16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 검출되었다.

Abstract : In this study, we determined distribution status of organonitrogen pesticides such as trifluralin, atrazine, metribuzin, alachlor, malathion, nitrofen, permethrin, cypermethrin, fenvalerate, and parathion accumulated in the fresh water fishes and amphibians. We collected those samples at 31 sites from the basin of major rivers, and separated the muscular tissue as a final sample for analysis. In the pretreatment process, lipid was eliminated by using acetonitrile and n-hexane, and pesticides were reextracted with dichloromethane. The extract was dehydrated and concentrated, and then cleaned it up by passing the Florisil column, and pesticide content was finally determined by using a GC-MS system after introducing isotope labelled references. The accumulation level was observed in the range of 0.17~6.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in amphibians and 0.26~16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in fishes including cypermethrin as 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words : organonitrogen pesticides, fishes, amphibians

1. 서 론

농약은 현대 농업에서 작물의 생육환경 개선과 수확 후 저장단계에 있어 다양하게 사용되고 있으며 작물, 토양, 음용수 뿐만 아니라 먹이사슬을 통하여 생물체에 계속 잔류하여 축적되어지고 있다.^{1,2} 대부분의 잔류농약은 유기화합물이며 살충제로서는 DDT, BHC

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)51-510-2246 Fax : +82+(0)51-510-3294
E-mail : ghjeong@pusan.ac.kr

등의 유기염소계 농약, parathion, malathion 등의 유기 인계 농약, 그리고 BPMC 등의 카바메이트계 농약이 사용되고 있으며, 제조제로서는 2,4-D, 2,4,5-T, alachlor 등이 사용되고 있다.^{2,4}

농약 사용의 증가로 인하여 파충류, 어류, 조류, 포유류 등 야생동물의 생물 농축의 정도가 증가되고 있으며 유해성도 계속해서 증명되고 있다.³ 최근에는 특정한 종을 선정하고 각각의 종이 서식하는 환경과 생물 농축의 잔류성 부위등이 조사되고 있으며 점차로 낮은 농도에서도 생육이나 번식에 영향을 주는 물질들이 계속 알려지고 있다.⁵ 오염된 물을 섭취한 물고기와 야생동물에 대한 잔류농약 조사는 개체수 감소, 수컷의 생식기능 저하, 성징결여 등 생태 환경의 변화에 영향을 미칠 수 있는 인자에 대한 기초자료를 제공하는 것이다.^{3,6}

내분비계 장애물질은 각종 생체호르몬의 합성, 분비, 생체내 수송, 수용체와의 결합, 호르몬 작용 및 분해 등의 과정에 작용하여 정상 호르몬 작용을 방해하는 성질을 가진 외인성 물질을 말한다.⁷ 내분비계 장애를 일으킬 수 있다고 추정되는 물질로는 각종 산업용 화학물질, 살충제 제조제 등의 농약류, 유기중금속류, 다이옥신류, 호르몬 유사물질, 그리고 합성에스테로젠류 등이 있다. 현재 WWF에서 규정한 67종의 내분비계 장애물질 중 농약류가 41종이 선정되어 있으며 일본 후생성에서는 142종의 내분비계 장애물질 중 75종을 농약류로 분류하고 있다. 우리나라는 WWF의 분류 방식을 주로 참고하고 있다.⁸

핀란드, 덴마크, 미국 등의 여러 나라에서 과거 수십년 간에 걸쳐 지속적으로 여성의 유방암 발병율이 높아지고 있으며, 남성에 있어서도 스칸디나비아, 발트해 연안의 나라들, 독일, 뉴질랜드 등 여러 나라에서 고환암과 전립선암의 발병율이 지속적으로 높아지고 있음이 알려졌다. 이러한 현상은 환경 오염의 심각성과 특히 내분비계 장애물질이 인간에게 미치는 유해한 영향들을 보여주는 예이다.^{9,11}

본 연구에서 분석한 항목들 중 atrazine과 malathion의 경우 다량 흡수시 호흡기, 두통, 현기증 등을 일으키며, 만성 노출시 발암성 및 유전성 돌연변이가 발생할 수 있다. 또한 parathion은 가장 오래 사용해온 농약 중 하나로서 세계보건기구(WHO)에서 고독성으로 분류하고 있으며 어류나 조류에 대한 독성이 특히 강한 편이다. 단기간 다량의 흡입은 메스꺼움, 복통, 현

기증 등을 일으키고 심하면 호흡정지, 마비, 말더듬의 증세가 나타나고 만성 노출시 발암 및 유전성 돌연변이가 발생할 수 있다. Fenvalerate와 cypermethrin과 같은 pyrethroid 계통의 농약은 토양이나 지표수에서 햇빛에 의해 분해가 잘 되나 물에 잘 녹지 않고 옥탄올-물 분배계수가 5-6.6 정도의 범위로 환경 잔류성이나 생체 농축성이 높고 특히 물고기에 대한 급성 독성이 강해서 수계의 직접 처리가 금지되어 있다.⁸

본 연구는 생태계에 잔류하고 있는 유기질소계 농약의 잔류 실태를 조사할 목적으로 수행되었다. 시료로서 전국의 하천, 호소, 습지 등에서 서식하는 어류와 양서류 각각 2종을 선택하였다. 분석된 항목들은 제조제 및 살충제로 널리 사용되고 있는 trifluralin, atrazine, metribuzin, alachlor, malathion, nitrofen, permethrin, cypermethrin, fenvalerate, parathion 등이다.

2. 실험

2.1 시료의 채취

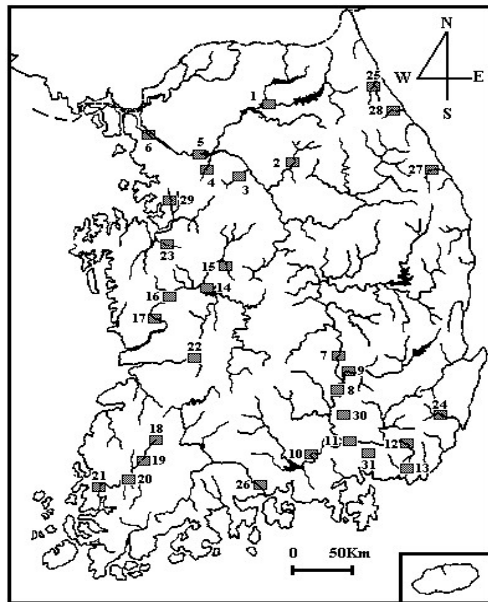


Fig. 1. The 31 sampling sites along the major rivers.

생물시료는 한강, 낙동강, 금강, 영산강 등의 전국 주요 하천 및 호소지역 29개 지점과 습지 2개 지점을 포함한 총 31개 지점에서 어류 및 양서류 각 2종씩

채취하였으며, 시료 채취 지점은 Fig. 1에 나타내었다. 어류는 국내 하천에서 가장 많이 서식하는 붕어와 피라미를 선택하였으며, 극히 적은 개체가 채취되거나 대상 종이 서식하지 않는 지역에서는 우점종을 대상 어종으로 하였다. 양서류는 황소개구리와 참개구리를 선택하였으며 대체종으로는 산개구리를 채취하였다. 분석용 시료는 근육부분을 분리하여 균질화한 후 사용하였으며 -4 °C 이하에서 냉동보관하였다.

2.2 실험 기구 및 시약

본 연구에 사용한 trifluralin, atrazine, metribuzin, alachlor, malathion, nitrofen, permethrin, cypermethrin, fenvalerate, parathion의 표준 용액은 Dr. Ehrenstorfer에서 시판되는 제품을 사용하였으며, 실린지첨가용 내부 표준물질 penanthrene-d₁₀, fluoanthene-d₁₀, crysene-d₁₂, perylene-d₁₂은 Aldrich Chemical의 제품을 사용하였다. 추출용매로는 잔류농약 분석용의 acetonitrile (Merck, Aldrich Chemical)을 사용하였다. 농약의 휘발을 방지하기 위해 상전이 용매로서 dichloromethane (Merck)을 사용하였으며, 정제과정에 사용한 잔류농약 분석용의 플로리실 (Wako)은 실험 전에 130 °C 오븐에서 8시간 활성화시킨 다음 데시케이터에서 2시간 동안 방냉시켜 실험에 사용하였다. 유리섬유는 톨루엔으로 세척하여 실온에서 48시간 동안 건조시킨 후 실험전에 n-헥산과 아세톤으로 세척하여 사용하였다. 추출 용매로 사용한 n-헥산과 아세톤은 Merck의 잔류농약 분석용을, 수분을 제거하기 위해 무수황산나트륨 (Na₂SO₄, anhydrous)을 130 °C 오븐에서 4시간 동안 건조시킨 후 사용하였다. 회전 감압 농축기는 Buchi Rotavapor R-114, 균질화기는 Ultra Turrax T25, 원심분리기는 VS-21 SMTN를 사용하였다. 추출효율 증대를 위해 사용한 교반기는 JEIO TECH SK-760A, 정제용 크로마토그래피 컬럼은 소결 원반(disc) 테플론 잠금 꼭지가 부착된 1.2 cm i.d. × 45 cm length Pyrex 컬럼 (Arthur H. Thomas Co.)을 사용하였다.

2.3 표준용액 조제

유기질소계 농약의 표준물질은 아세톤에 녹여 100 µg/ml의 표준원액을 조제한 후 각 농약성분의 표준원액을 같은 양씩 취하여 아세톤으로 희석하여 1 µg/ml의 혼합표준액을 조제하였다.

혼합표준액을 0~1.0 ml씩 단계적으로 취하여 내부

표준액 25 ng/ml를 첨가하고 질소 가스를 불어넣어 0.5 ml까지 농축하고 검량선 작성용 표준액으로 하였다. 내부표준액은 phenanthrene-d₁₀, fluoranthene-d₁₀, crysene-d₁₂, perylene-d₁₂의 각 25 ng/ml 아세톤 혼합액이다. 실험과정에서 사용한 모든 표준원액 및 표준액과 검량선 표준액은 밀폐하여 냉암소에 보관하여 사용하였다.

2.4 실험방법

2.4.1 추출과정

균질화한 생물시료 20 g에 아세토니트릴 50 ml를 넣고 10분간 고속 교반한 후 10분간 초음파로 추출하였다. 이 혼합물을 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리시킨 후 상등액을 분리하여 1 l 분액깔대기에 옮기고 잔여물에 아세토니트릴 50 ml를 넣어 추출조작을 반복하였다. 분액깔대기에 들어있는 아세토니트릴층에 아세토니트릴을 포화시킨 n-헥산 30 ml를 넣고 5분간 진탕하였으며, 정치 후 하부의 아세토니트릴층을 분액 깔대기에 옮기고 n-헥산층은 버렸다. 아세토니트릴층에 아세토니트릴로 포화된 n-헥산 30 ml를 다시 넣고 5분 동안 진탕하였으며 정치 후 아세토니트릴을 다른 분액깔대기에 옮기고 정제수 5 ml를 넣어 조용히 교반하고 잠시 정지한 후 하부의 아세토니트릴층을 분액 깔대기에 옮겼다.

여기에 5% 염화나트륨수용액 500 ml를 넣고 10분간 교반 혼합한 후 디클로로메탄 50 ml를 넣고 10분 동안 진탕하여 방치하였다. 디클로로메탄층을 삼각플라스크에 옮기고, 혼합액층에 다시 디클로로메탄 50 ml를 넣고 진탕하여 추출하였다. 디클로로메탄 추출액을 무수황산나트륨으로 탈수하고 40 °C 이하의 수욕에서 회전식 감압농축기를 이용하여 약 10 ml까지 농축하였다. 혼재하는 아세토니트릴을 완전히 없애기 위해 농축액에 n-노난 10 ml를 넣고 다시 약 2 ml까지 농축하여 시료의 전처리액으로 하였다.

2.4.2 플로리실 정제

플로리실 10 g을 정제용 크로마토그래피 컬럼에 n-헥산으로 습식 충전하고 상·하부에 무수황산나트륨 약 2 g을 적층하였다. 컬럼을 n-헥산 10 ml로 씻고 액면을 컬럼 베드까지 내린다. 무수황산나트륨 층이 교란되지 않게 시료의 전처리액을 컬럼에 부하하여 유하시키고 계속하여 2 ml 정도의 n-헥산으로 용기를 여러

번 씻고 컬럼에 흘려보내 컬럼 벽면을 씻으면서 유하시켜 액면을 컬럼 베드까지 내린다. 처음에 n-헥산 100 ml로 전개하여 그 용출액은 버리고 다음에 20% 아세톤 · n-헥산 100 ml로 전개하여 이 용출액을 받아 회전식 감압농축기를 사용하여 2 ml까지 농축하였다.

2.4.3 GC-MS의 조건

분석에 사용된 기기는 MSD (mass selective detector) 가 연결된 Hewlett Packard 6890 시스템을 사용하였다. 컬럼은 HP5-MS (30 m length ×0.25 mm i.d, 0.25 μm film thickness, crosslinked 5% phenylmethylsiloxane film)

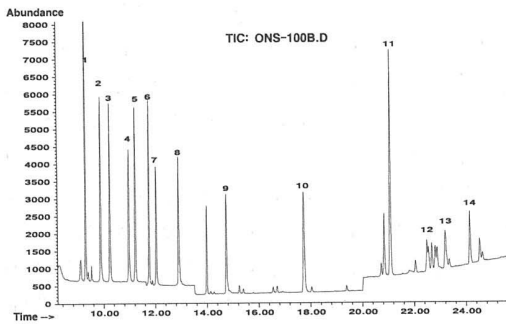


Fig. 2. Total ion chromatogram of organonitrogen pesticides obtained from standard solutions.

- 1: trifluralin, 2: atrazine, 3: phenanthrene-d₁₀, 4: metribuzin, 5: alachlor, 6: malathion, 7: parathion, 8: fluoranthene-d₁₀, 9: nitrofen, 10: chysene-d₁₂, 11: permethrin, 12: cypermethrin, 13: perylene-d₁₂, 14: fenvalerate.

Table 1. Molecular weight, quantification ion, and confirmation ion of organonitrogen pesticides

Pesticides	Use	Mol. Wt.	Target Ion	Conf. Ion
Trifluralin	H	335.28	306	335
Atrazine	H	215.68	220	215
Methribuzin	H	214.28	198	144
Alachlor	H	269.77	160	188
Malathion	I	330.35	173	127
Nitrofen	H	284.10	283	202
Permethrin	I	391.29	183	163
Cypermethrin	I	416.30	163	181
Fenvalerate	I	419.91	125	167
Parathion	I	291.26	109	291

H: herbicide, I: insecticide

를 사용하였고, 컬럼의 온도는 50 °C부터 200 °C까지는 20 °C/min로 증가시키고, 200 °C부터 280 °C까지는 5 °C/min으로 높여 5분간 유지하였다. 주입구 온도는 250 °C로 유지하였으며 이온화에 사용한 전자에너지는 70 eV였다. 전처리한 시료를 분석하기 위하여 질량 스펙트럼상의 특성이온만을 선택하여 분석하는 SIM 방법을 이용하였다. 표준크로마토그램 (Fig. 2)과 정량을 위해 선택된 이온들 및 이들의 사용 용도는 Table 1에 나타내었다.

2.4.4 내부정도관리

GC/MSD 감도시험: 시료 10개에 대하여 1회씩 검량선의 중간 정도의 농도에 해당하는 표준액을 측정하여 감도의 변동이 검량선 작성시의 감도에 비해 ±20% 이내인 것을 확인하였다.

이중 측정: 채취한 시료 10개당 1회씩 정량한 값 이상의 농도로 측정된 분석대상물질에 대하여 이중 측정을 실시하였으며 측정값의 차이가 30% 이하인 것을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 분석 회수율

본 연구에서 각 분석물질에 대한 검출한계 및 검량 범위를 Table 2에 나타내었다. 검량선을 작성할 때의 최저농도 표준액을 GC/MSD에 주입하여 측정값을 구하였고 시료 중의 농도를 계산하였다. 시료 5개 이상을 측정하여 구한 표준편차로부터 검출한계값과 정량한계값을 구하였다. 목표 검출한계값은 0.5~50 μg/kg이었다. 또한 사용한 분석 방법의 회수율을 측정하기 위해서 혼합표준액 (유기인계 표준용액)을 어류 2종 및 양서류 2종에 각각 첨가하여 회수율을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하였으며 실린지 첨가용 내부표준물질로서 phenanthrene-d₁₀, fluoanthene-d₁₀, crysene-d₁₂, perylene-d₁₂를 첨가하였다. 회수율은 Table 3에 나타낸 것처럼 어류의 경우 최소 68%에서 최대 133%의 결과를 얻을 수 있었고 양서류의 경우 최소 67%에서 최대 139%의 첨가 회수율을 얻을 수 있었다. 전체적으로 어류의 첨가 회수율이 양서류의 첨가 회수율보다 조금 낮게 나타났는데 이는 어류가 양서류보다 더 많은 지질 성분을 포함하고 있어 이 지질 성분이 회수율 저하의 원인으로 추정된다.

Table 2. The range and limit of detection of the organonitrogen pesticides

Compounds	Range (ng/ml)	R ²	LOD (μg/kg)
Trifluralin	1~100	0.9924	0.20
Atrazine	1~100	0.9904	0.14
Metribuzin	1~100	0.9795	0.56
Alachlor	1~100	0.9951	0.22
Malathion	10~100	0.9901	0.63
Parathion	10~100	0.9914	0.75
Nitrofen	10~100	0.9916	0.48
Permethrin	1~100	0.9960	0.06
Cypermethrin	10~100	0.9933	0.63
Fenvalerate	10~100	0.9968	1.1

Table 3. Recovery of organonitrogen pesticides in samples (%)

Compounds	Fish		Frog	
	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation
Trifluralin	133.3	3.6	139.2	11
Atrazine	111.4	4.8	114.2	9.1
Metribuzin	85.16	3.5	87.81	3.4
Alachlor	96.38	4.4	106.6	8.1
Malathion	94.95	5.1	90.14	3.4
Parathion	91.15	4.2	67.14	1.0
Nitrofen	73.13	2.7	73.69	2.0
Permethrin	68.84	6.8	71.13	1.9
Cypermethrin	77.16	16	113.1	3.3
Fenvalerate	80.18	4.3	66.78	2.7

3.2 유기질소계 농약의 분포 특성

유기질소계 농약류의 검출빈도 (Fig. 3)를 살펴보면 parathion을 제외한 모든 성분들이 최소한 1개 이상의 지점에서 검출되었다. 주요 성분들을 살펴보면 trifluralin과 nitrofen은 양서류 62개 시료에서는 전혀 검출되지 않았고 어류에서만 검출되었고, atrazine과 malathion은 어류 62개 시료에서 모두 검출되지 않았고 양서류에서만 검출되었다. Metribuzin, permethrin alachlor은 양서류에서 검출빈도가 높았으며, cypermethrin과 permethrin은 어류에서의 검출빈도가 높았다. 금호강, 무안, 남지 등에서는 metribuzin이, 물금, 공주, 나주, 명촌 등에서는 permethrin이 어류와 양서류 두 종 모두에서 검출되었다. Parathion은 가장

랜 기간 동안 사용해 온 농약이지만 작물에 살포되면 가수분해 등에 의해 빨리 분해되기 때문에 환경 중에 잔류성이 낮으며 유기용매에도 섞이는 성질이 있어 본 연구에서 검출이 되지 않은 것으로 추정되어진다.

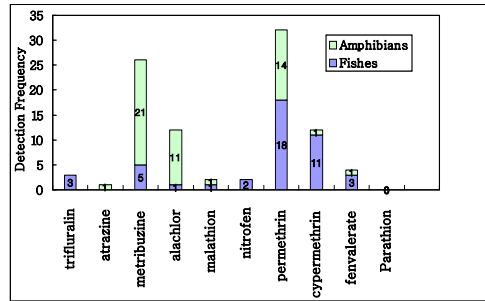


Fig. 3. Distribution pattern of organonitrogen pesticides observed from the 31 sampling sites.

양서류에서는 준도시 지역인 나주에서 metribuzin이 최대 6.8 μg/kg을 비롯해서 7개 항목에서 최대 0.17~6.8 μg/kg의 농도로 검출되었고, 어류에서는 농경지역인 담양읍에서 cypermethrin이 최대 16 μg/kg을 비롯해서 모두 7개 시료에서 최대 0.26~16 μg/kg의 농도로 검출되었다 (Fig. 4). 대부분의 성분들이 농경지, 준도시, 대도시의 구분 없이 전국적으로 분포하고 있었으며 몇몇 지역을 제외하고는 어류에서의 농도가 양서류의 농도보다 높게 분포하고 있었다. 이는 개구리의 경우 채집 지역이 하천이나 호수지역 뿐 아니라 농약 노출이 상대적으로 적은 산 근처지역에서 포획된 경우가 많았기 때문에 검출빈도나 검출농도가 낮게 나타난 것으로 추정되어진다.

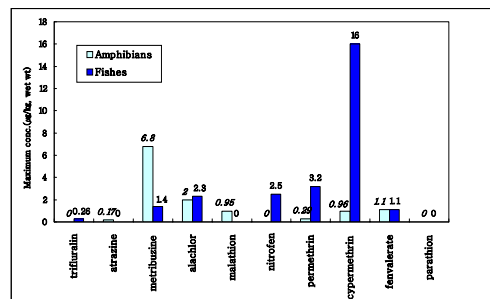


Fig. 4. Comparison of maximum concentrations in the 31 sampling sites.

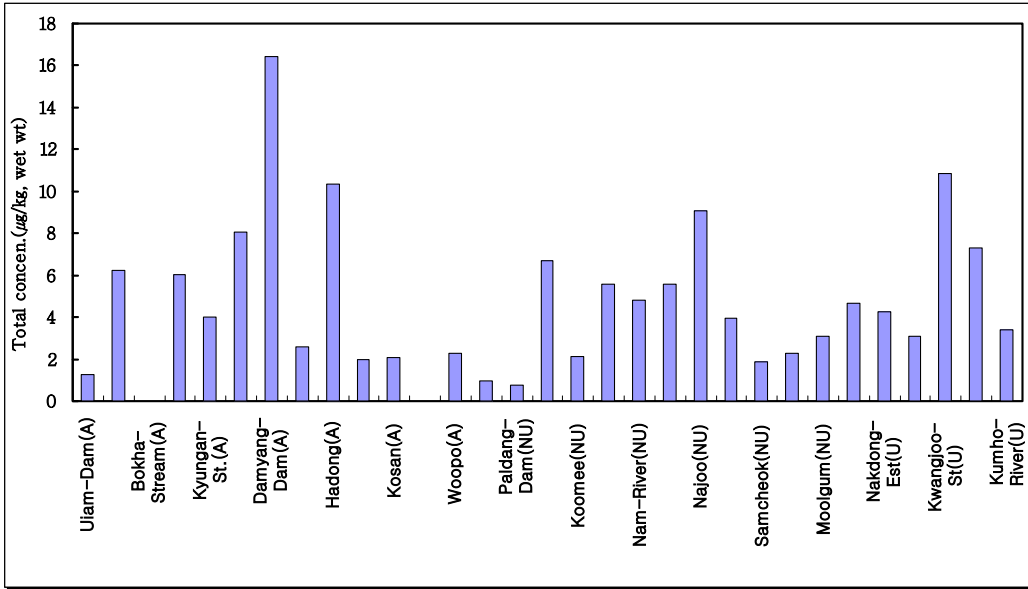


Fig. 5. Total concentration of organonitrogen pesticides in the 31 sampling sites.

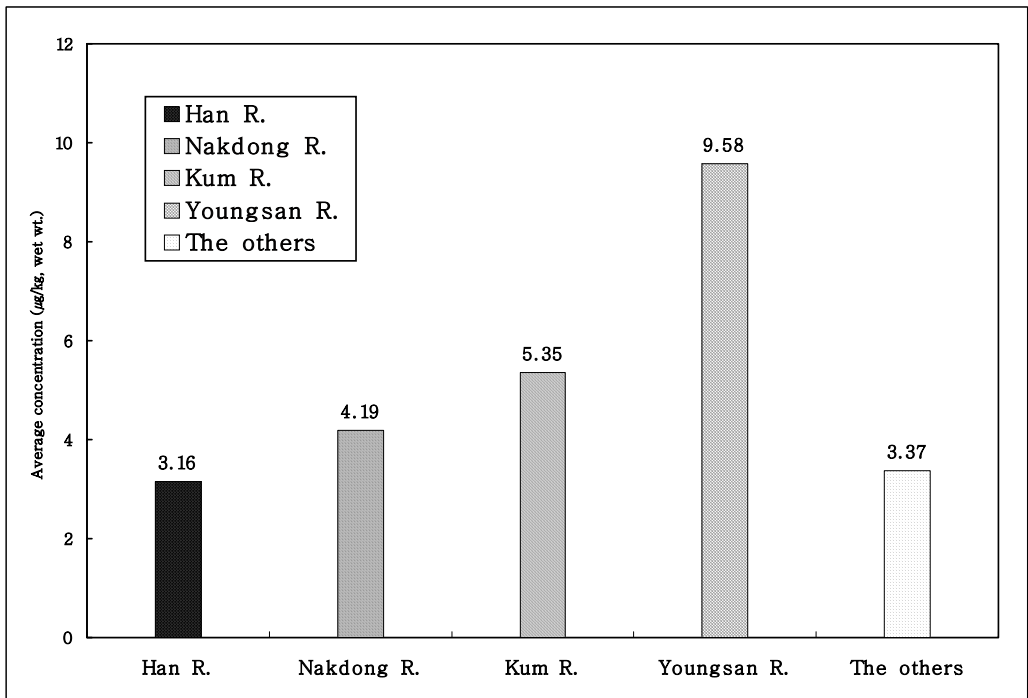


Fig. 6. Average concentrations of organonitrogen in the 31 sampling sites along the major river systems.

시료가 채취된 31개 지점은 농경지(A), 준도시(NU), 대도시(U) 지역으로 구분하였다. 대부분 강어귀나 하천에서 포집이 이루어졌으며 농경지의 경우 호소 부분에서 채집이 이루어지기도 했다. Fig. 5에서는 각 지점에서 검출된 유기질소계 농약의 총 잔류농도를 나타내었다. 북한천과 황구지천에서는 분석대상 농약이 모두 검출되지 않았으며, 나머지 29개 지점에서는 잔류 농약이 최소 1개 성분 이상 검출되었다. 농경지에서 검출된 농도는 시료 채집 지역이 하천보다는 호소 지역으로 분류된 대청댐과 담양댐 등의 검출농도가 상대적으로 높게 나타났다. 이것은 물의 흐름이 원활하지 못한 호소지역에서의 농약 잔류성이 하천수보다는 높다는 추측을 할 수 있게 한다. 검출된 잔류농약의 평균 농도는 $4.57 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며, 수계별로 살펴보면 영산강수계에서 $9.58 \mu\text{g}/\text{kg}$ 로 가장 높은 농도로 검출되었으며 한강수계에서 $3.16 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 낮은 농도로 검출되었다(Fig. 6).

본 연구에서 분석한 농약은 대부분 유기질소계 농약이었다. 유기염소계 농약류가 독성이 높고 환경오염 문제가 심각하게 제기되어 금지된 이래 사용이 증가하고 있는 유기질소계 농약은 주로 지질성분이 많이 함유된 시료에서 잘 축적되어지는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 검출된 농약의 양이 사람의 건강과 생활에 직접적으로 피해를 줄만큼의 우려할 만한 양은 아닌 것으로 추정되지만 지속적인 모니터링은 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부와 국립환경연구원의 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. A. N. Diaz, A. G. Pareja, and F. G. Sanchez, *Pestic. Sci.*, **49**, 56-64 (1997).
2. W. S. Kim, B. H. Lee, K. N. Bahn, S. U. Jung, and H. J. Pak, *J. Korean Env. Sci. Soc.*, **6**, 385-389 (1997).
3. 국립환경연구원, 환경자료집, 2nd. 1999. 10.
4. T. J. Kim, *Analysis of Multi-Residue Pesticides, Anal. Sci. & Tech.*, **9**, 33A-60A (1996).
5. T. Ibaraki, C. Oguma, 1999., *Niigata Prefectural Research Laboratory for Health and Environment*, 314-1 Niigata 950.
6. K. Abou-Arab, A. M. Ayes, H. A. Amra and K. Naguib, *Food Chemistry*, **57**, 487-492 (1995).
7. 내분비계 장애물질 중·장기 연구계획사업(1999~2008), 환경부(행정간행물 등록번호 38000-67610-57-9961), 1999. 7.
8. 내분비계 장애물질에 대한 연구계획과 대처방안, 식품의약품안전청(행정간행물 등록번호 40200-65050-57-04), 1998. 7.
9. P. T. C. Harrison, P. Holmes, and C. D. N. Humfrey, *The Sci. of the Total Env.* **205**, 97-106 (1997).
10. H-O. Adami, R. Bergstrom, M. Mohnner. et al., *Int J. Cancer*, **59**, 33-38 (1994).
11. M. Quinn and E. Allen, *British Med. J.*, **311**, 1391-1395 (1997).