

有機燐系 殺虫劑 Phorate 가 Acetylcholinesterase 活性에 미치는 影響

金 政 鎬* · 洪 鍾 旭**
(1987. 11. 13 접수)

Effect of Phorate, an Organophosphorus Insecticide on the Activity of Acetylcholinesterase

Jung-Ho Kim* and Jong-Uck Hong**

Abstract

Present study was carried out to elucidate the effect of phorate (0,0-diethyl S-ethylthiomethyl phosphorodithioate), an organophosphorus insecticide on the acetylcholinesterase(AChE) and cholinesterase(ChE) activity in the chicken brain and plasma.

The inhibitory effect of phorate and its metabolites on AChE and ChE activity was also increased in the order of phorate (p=S,S) < phorate sulfoxide (p=S,SO) < phorate sulfone (p=S,SO₂) < phoratoxon (p=O,S) < phoratoson sulfoxide (p=O,SO) < phoratoson sulfone (P=O,SO₂).

Acute oral LD₅₀ of phorate was 1.02mg/kg. After oral administration of phorate, the activity of plasma ChE was inhibited more rapidly than that of brain AChE, whereas recovery of plasma ChE activity was more rapid than that of brain AChE activity.

結 論

人類文明의 發達과 더불어 急進的으로 發展된 産業化는 環境汚染이란 豫期치 않은 問題를 招來하게 되었다.

특히 農藥은 農産物을 增産하는데 必所한 農業資材로서 安全多收獲은 물론 省力栽培에 크게 寄與하여 왔

다. 그러나, 農藥의 使用量이 增加함에 따라서 人畜毒性,^{1,2)} 生態系의 變化, 食品汚染 및 土壤과 水質의 汚染³⁾ 등 環境汚染이 環境保全이란 側面에서 반드시 研究되어야 할 課題로 登場하게 되었다.

農藥은 程度의 差異는 있으나 毒性을 가지고 있어 잘못 使用하면 人畜에 害를 주거나 環境을 汚染시킬 可能性을 內包하고 있다. 따라서 生物에 有害反應을 일으키는 農藥의 毒性에 관한 評價는 그 物質에 對한 許

* 大邱韓醫科大學 環境保健學科(Dept. of Environ. Health, Taegu Oriental Medical University, Taegu, Korea)

** 慶北大學校 農科大學 農化學科(Dept. of Agricul. Chemi. College of Agricul. Kyungpook National University, Taegu, Korea)

容基準을 設定하거나 有害程度를 檢討하는데 매우 重要한 役割을 한다.

化學物質의 安全性을 檢査하는 方法으로는 急性毒性, 4-6) 亞急性毒性, 7) 및 慢性毒性試驗⁹⁾ 등이 알려져 있다.

또한 각종 有機磷系 및 Carbamate 系 殺虫劑에 대한 AChE 및 ChE 活性阻害에 미치는 影響에 관해서는 많은 研究⁹⁻¹⁴⁾가 報告되어 왔다. 한편 Menzer 等¹⁵⁾에 의하면 植物體에 吸收된 phorate는 酸化되어 殺虫力이 더 크고 安定한 sulfoxide와 sulfone으로 되며 thiono體보다 thiol體가 더 殺虫力이 强하다고 하였다. 또한 Eto¹⁶⁾은 磷酸 ester 結合의 開裂은 無毒化 反應이며 이들 分解物은 cholinesterase 阻害劑로서의 活性이 크게 감소된다고 하였다.

즉, 母化合物과 代謝物과는 AChE 活性 阻害가 상이하다. 이와 같이 AChE 활성저해에 대한 연구는 농약개발 및 독성학적인 측면에서 의의가 크다고 할 수 있다 따라서 本 研究에서 腦 AChE 및 血漿 ChE의 活性에 미치는 pH, 供試藥劑의 溶劑 및 反應時間의 最適條件을 究明할 phorate 및 그 代謝物이 in vivo, in vitro 상태에서 AChE 및 ChE 活性 阻害에 미치는 影響을 검토하였다.

材料 및 方法

1. 供試藥劑 및 試藥

本 實驗에 供試된 phorate와 그 代謝產物은 American Cyanamid 社로부터 分讓받은 99.9% 以上の 純度를 갖은 化合物로서 그 構造는 Table 1과 같다. 酵素活性測定用으로 使用되는 dithiobisnitrobenzoic acid(DT-NB) 및 bovine serum albumin은 Sigma 製를 使用하였다.

2. 供試動物

1日齡된 병아리(Hy-Line W-77, ♂) 중에서 43~

47g 되는 健全한 個體를 選別하여 使用하였다.

3. Acetylcholinesterase 活性度 測定

Acetylcholinesterase(AChE)活性 測定은 Ellman 方法²⁰⁾에 準하여 병아리의 頸部를 切斷하고 腦 全部를 取하여 磷酸緩衝溶液(0.1M pH 8.4)을 2倍(w/w)添加하여 均質化한 다음, 4°C에서 15000rpm으로 20分間 遠心分離한 後 上澄液을 酵素液으로 使用하였다. 腦 AChE 活性 測定은 25°C에서 磷酸緩衝溶液(0.1M pH 8.4) 3ml에 acetylthiocholine iodide(0.075M) 50μl, DTNB(0.01M) 50μl 및 酵素液 50μl을 加한 後, 1分間 choline과 DTNB와 反應하여 生成된 5-thio-2-nitrobenzoate을 spectrophotometer(Shimadzu U.V-200)로 412nm에서 測定하였다. 酵素의 活性은 μmol acetylthiocholine/min/g protein으로 나타내었다. 蛋白質 定量은 Lowry 等¹⁸⁾의 方法에 準하여 bovine serum albumin을 標準品으로 使用하였다.

4. Cholinesterase 活性測定

Cholinesterase(ChE)活性測定도 역시 Ellman 方法에 準하여 병아리의 頸部를 切斷하고 heparin으로 處理된 遠心分離管에 全血을 採取한 後, 3000 rpm으로 20分間 遠心分離하여 上澄液인 血漿을 酵素液으로 使用하였다. 血漿 ChE 活性 測定은 Sörenson's 磷酸緩衝溶液(0.1M pH 7.4)에 3ml acetylthiocholine iodide (0.09M) 50μl, DTNB (0.01M) 50μl 및 酵素液 50μl을 加하여 spectrophotometer로 412 nm에서 測定하였다.

5. In vitro 實驗

前述한 緩衝溶液 3ml에 酵素液 50μl과 適當한 濃度로 稀釋한 供試農藥을 50μl 加하여 37°C에서 30分間 恒溫시킨 後, 前述한 方法에 따라 酵素活性을 測定하였다. 對照區는 acetone를 同一量 添加하였으므로 酵素 活性의 阻害率은 다음과 같이 計算하였다.

Table 1. Common name and chemical structure of Phorate and its metabolites

$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{O} \end{array}$
Phorate	Phorate sulfoxide	Phorate sulfone
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \backslash \\ \text{P} - \text{SCH}_2\text{SC}_2\text{H}_5 \\ / \quad \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{O} \end{array}$
Phoratoxon	Phoratoxon sulfoxide	Phoratoxon sulfone

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

여기서 A : 對照區의 酵素活性

B : 農藥 處理區의 酵素活性

酵素活性 阻害率의 比較는 酵素活性의 50%가 阻害되는데 必要한 反應液中的 濃度인 I_{50} 으로 하였으며, $pI = -\log I$ 이다. k_i 는 $k_i = 0.695/I_{50}t$ 式(t : 反應時間)¹⁹⁾를 利用하여 求하였다.

6. 急性經口毒性 半数致死量測定

Phorate 에 對한 急性經口毒性 LD_{50} 의 測定은 豫備 實驗에서 求한 致死率 0~100% 範圍에서 投與量을 擇 하였으며, 經口用 注射器로 經口投與하고 24時間 後에 致死率을 調査하였다. 急性經口毒性 LD_{50} 의 計算은 Probit 分析方法²⁰⁾에 準하였으며, 供試動物數는 投與量 別로 各各 10 마리씩 供試하였다.

7. In vivo 實驗

Phorate 의 投與量은 Phorate 의 經口毒性 LD_{50} 값의 0.25 倍에 該當하는 量을 投與하고 1 마리당 投與되는 供試藥劑의 容量이 50 μ l 以下되게 하여 經口投與한 後 時間別로 前述한 方法에 따라 腦 AChE 및 血漿 ChE 活性을 測定하였다.

結果 및 考察

1. In vitro 에서의 酵素活性

1) pH 의 影響

磷酸緩衝溶液을 使用하여 腦 AChE 및 血漿 ChE 活性에 미치는 pH 의 影響을 調査한 結果는 Fig. 1 과 같았다.

腦 AChE 에서는 pH 5.0 에서 相對活性이 約 10% 이었으며 pH 가 增加함에 活性도 增加하였으나, pH 7.2

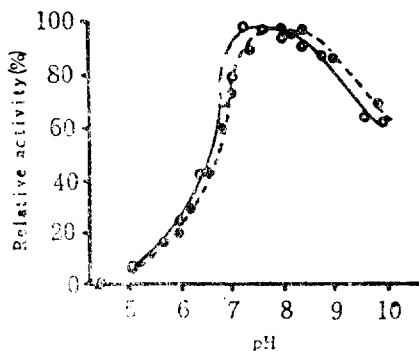


Fig. 1. Effect of pH on the AChE and ChE activity. (AChE : ○—○, ChE : ●—●)

以上에서는 活性이 減少되었다. 血漿 ChE 의 境遇도 비슷한 傾向을 보였는데, pH 5.0 에서 相對活性이 約 8%이었으나 pH 가 增加함에 따라 活性도 增加하여 pH 8.0 에서 가장 높은 活性을 보였다. 따라서 腦 AChE 및 血漿 ChE 의 最適 pH 는 各各 7.2 및 8.0 이었다.

2) Acetone 의 影響

供試農藥의 溶媒로 使用된 acetone 이 AChE 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Fig. 2 와 같았다.

Acetone 添加量에 比例하여 AChE 活性이 阻害되는 것으로 나타났다. In vitro 實驗에서 對照區의 acetone 濃度는 2%以下였고, 이때 AChE 活性 阻害度는 約 5% 였다.

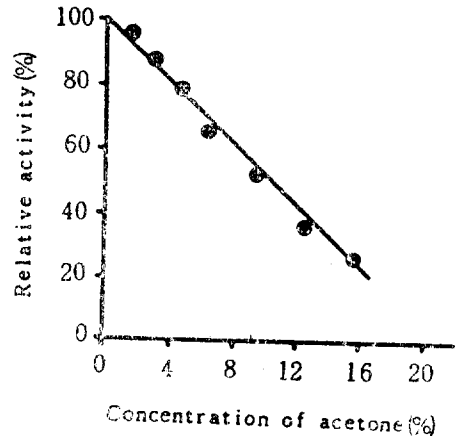


Fig. 2. Effect of acetone on the AChE activity.

3) 反應時間

阻害劑가 AChE 및 ChE 와 反應하여 enzyme-inhi-

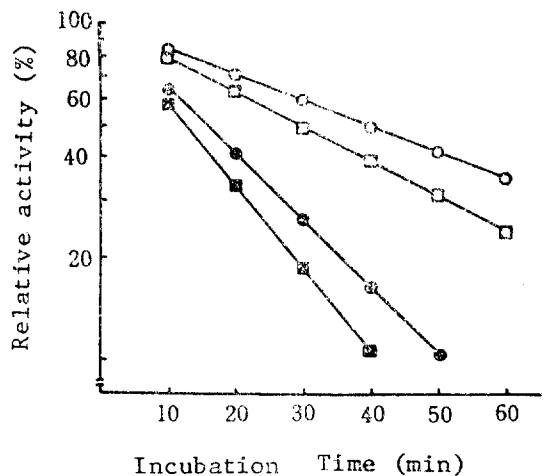


Fig. 3. AChE and ChE activity plotted against incubation time with terbufosoxon sulfoxide.

($1.90 \times 10^{-6} M$: AChE ●—●, ChE ■—■)
($4.40 \times 10^{-7} M$: AChE ○—○, ChE □—□)

bitor 複合體를 形成하는데 所要되는 時間을 檢討하고 자, 有機磷系 殺虫劑에 屬하는 terbufosoxon sulfoxide 를 택하여 酵素液에 各各 $1.90 \times 10^{-6}M$ 및 $4.40 \times 10^{-7}M$ 되게 添加한 後 이를 $37^{\circ}C$ 에서 反應시키면서 時間別로 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 3 과 같이 反應時間이 經過함에 따라 酵素活性이 顯著하게 減少하여 $1.90 \times 10^{-6}M$ 處理區에서는 AChE 및 ChE 活性阻害가 各各 50 分 및 40분까지 $4.40 \times 10^{-7}M$ 處理區에서는 60 分까지 一次反應으로 나타났다.

따라서 *In vitro* 實驗에서 恒溫時間은 供試農藥의 濃度區間에서 一次反應에 屬하는 30 分이 바람직한 것으로 思料되었다.

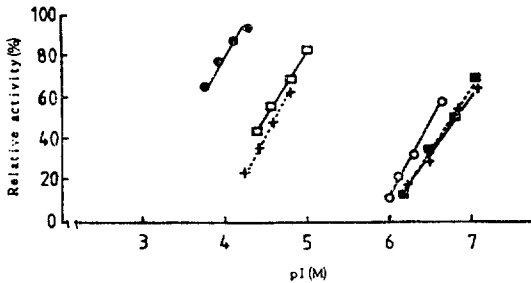


Fig. 4. Inhibition of AChE activity *in vitro* by phorate and its metabolites.

1. Phorate (●-●)
2. Phorate sulfoxide (□-□)
3. Phorate sulfone (+...+)
4. Phoratoxone (○-○)
5. Phoratoxon sulfoxide (■-■)
6. Phoratoxon sulfone (+--+)

4) Phorate 와 그 代謝物의 影響

Phorate, phorate sulfoxide, phorate sulfone, phoratoxon, phoratoxon sulfoxide 및 phoratoxon sulfone 에 對한 AChE 活性阻害는 Fig. 4, 그리고 ChE 活性阻害는 Fig. 5 과 같았다.

여기서 求한 I_{50} 과 k_i 는 Table 2 와 같다.

Phosphorodithioate 型인 phorate, phorate sulfoxide 및 phorate sulfone 의 I_{50} 이 各各 AChE 에서는 3.54×10^{-4} , 3.01×10^{-5} 및 $2.18 \times 10^{-5}M$ 이었으며, ChE 에서는 3.80×10^{-4} , 3.31×10^{-5} 및 $2.39 \times 10^{-5}M$ 이었다.

Phosphorothiolate 型인 phoratoxon, phoratoxon sulfoxide 및 phoratoxon sulfone 의 I_{50} 이 各各 AChE 에

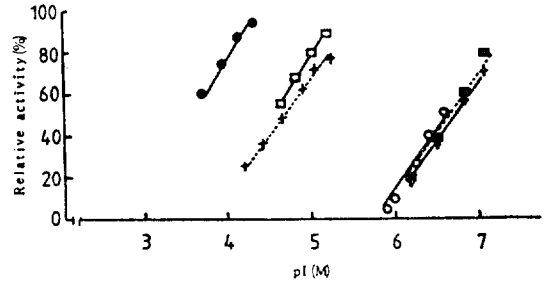


Fig. 5. Inhibition of ChE activity *in vitro* by phorate and its metabolites.

1. Phorate (●-●)
2. Phorate sulfoxide (□-□)
3. Phorate sulfone (+...+)
4. Phoratoxone (○-○)
5. Phoratoxon sulfoxide (■-■)
6. Phoratoxon sulfone (+--+)

Table 2. Determination of I_{50} and bimolecular rate constant(k_i) of brain acetylcholinesterase (AChE) and plasma cholinesterase (ChE) by phorate and its metabolites

Compounds	Enzyme	I_{50} (M)	k_i (moles ⁻¹ min ⁻¹)	$Y=b+a(-\log x)$		
				b(%)	1	r^2
Phorate	AChE	3.54×10^{-4}	6.54×10^1	183	67.6	0.99
	ChE	3.80×10^{-4}	6.09×10^1	187	67.6	0.99
Phorate sulfoxide	AChE	3.01×10^{-5}	7.69×10^2	226	61.0	0.99
	ChE	3.31×10^{-5}	6.99×10^2	225	61.4	0.99
Phorate sulfone	AChE	2.18×10^{-5}	1.06×10^3	204	54.4	0.98
	ChE	2.39×10^{-5}	9.69×10^2	294	74.6	0.99
Phoratoxon	AChE	2.95×10^{-7}	7.85×10^4	415	71.1	0.97
	ChE	1.86×10^{-7}	1.24×10^5	325	55.7	0.98
Phoratoxon sulfoxide	AChE	2.39×10^{-7}	9.69×10^4	327	56.9	0.95
	ChE	1.69×10^{-7}	1.37×10^5	344	58.2	0.98
Phoratoxon sulfone	AChE	2.23×10^{-7}	1.03×10^5	327	56.8	0.96
	ChE	1.54×10^{-7}	1.50×10^5	334	56.3	0.93

서는 2.95×10^{-7} , 2.39×10^{-7} 및 $2.23 \times 10^{-7} M$ 이었으며 ChE 에서는 1.86×10^{-7} , 1.69×10^{-7} 및 $1.54 \times 10^{-7} M$ 이었다. 따라서 phosphorodithioate 型인 phorate 의 I_{50} 을 基準으로 하여 볼 때 phosphorothiolate 型은 I_{50} 이 AChE 및 ChE 에서 各各 1200~1600 倍 및 1600~1900 倍 減少하였다.

$\begin{matrix} S \\ || \\ >P- \end{matrix}$ 가 $\begin{matrix} O \\ || \\ >P- \end{matrix}$ 로 酸化된 構造에서는 AChE 및 ChE 活性 沮害率이 크게 增加하였으며, 또한 側鎖의 sulfide 가 sulfoxide 와 sulfone 으로 酸化된 構造에서도 AChE 및 ChE 活性 沮害度가 增加되는 것으로 나타났으며, 이는 terbufos 와 그 代謝物의 AChE 및 ChE 活性 沮害度와도 一致하는 傾向이었다.

한편 k_i 값도 phorate < phorate sulfoxide < phorate sulfone < phoratoxon < phoratoxon sulfone 順으로 높았다.

anionic site 와 esteratic site 를 갖는 AChE 에 對¹⁹⁾ 한 沮害劑의 作用은 酵素活性基와 沮害劑와의 親和力에 따라 다르게 나타나며, anionic site 와 esteratic site 의 結合距離와 立體形態 等에 따라서도 沮害率이 달라진다.¹⁹⁾

Terbufos 와 phorate 및 그 代謝物들에 對한 沮害率이 各各 다르게 나타난 것은 이들의 立體形態 等 여러 가지 要因이 相異하기 때문이며, 또한 phosphorodithioate 型이 phosphorothiolate 型보다 더 강한 AChE 活性 沮害率을 나타낸 것은 phosphorodithioate 型이 phosphorothiolate 型보다 酵素活性基에 더욱 強하게 結合하기 때문으로 思料된다.

2. In vivo 에서 酵素活性

Phorate 에 對한 急性經口毒性 LD_{50} 은 Fig. 6 라 같이 1.02mg/kg 이었다.

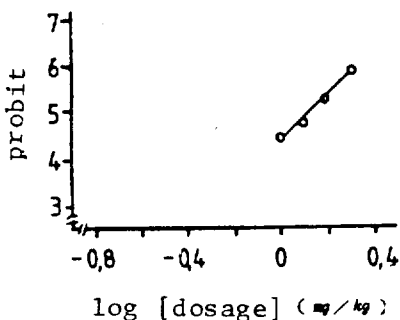


Fig. 6. Atcue oral LD_{50} of phorate.

Phorate 의 急性經口毒性 LD_{50} 의 0.25 倍인 0.26mg/kg 을 經口投與하였을 때, 腦 AChE 및 血漿 ChE 活性 沮害 및 回復에 미치는 影響을 調査한 結果는 Fig. 7

과 같았다.

腦 AChE 活性은 投與 15 分 後에 28%, 30 分 後에 66%가 沮害되었으나 그 以後에는 서서히 回復되는 傾向을 보였으며, 最低 沮害率의 50%와 100%가 回復되는데 必要한 時間은 各各 4.0 時間과 32.5 時間이었다.

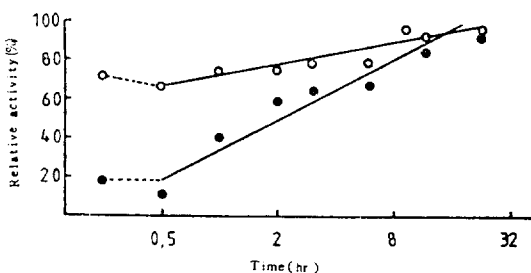


Fig. 7. Response of brain acetylcholinesterase and plasma cholinesterase in chicken by oral administration of phorate. (0.26mg/kg) (Brain AChE : ○—○, Plasma ChE : ●—●)

이는 methamidophos 를 rat 에 經口投與하였을 때 投與後初期에는 腦 AChE보다 血漿 ChE 活性이 더 크게 沮害되었다는 Robinson 等²¹⁾의 報告와, dicrotophos 을 鳥類에 投與한 後 腦 AChE 活性 回復에 對한 Fleming 等²²⁾의 報告와 methamidophos 을 rat 에 投與한 後 血漿 ChE 및 腦 AChE 活性 回復을 調査한 Gray 等²³⁾의 報告와 類似하였다.

이와 같은 腦 AChE 및 血漿 ChE 活性의 回復은 주로 새로운 酵素의 合成에 依해 이루어지며 또한 沮害된 酵素의 脫磷酸化에 依해 일어난다.¹⁹⁾ In vitro 에서는 酵素活性 回復이 거의 非可逆의이나 In vivo 에서는 磷酸화된 酵素가 서서히 加水分解되어 活性 回復에 寄與하는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾

要 約

有機磷系 殺虫劑인 phorate 가 병아리의 Acetylcholinesterase 活性 沮害에 미치는 影響을 조사한 結果는 다음과 같았다.

Phorate 와 그 代謝物에 對한 AChE 및 ChE 活性의 I_{50} 값은 phosphorothiolate 型($\begin{matrix} O \\ || \\ >P-S \end{matrix}$)이 phosphorodithiolate 型($\begin{matrix} S \\ || \\ >P-S \end{matrix}$)보다 約 700~2500 倍 낮았으며, 側鎖의 酸化 狀態別로 보면 sulfide > sulfoxide > sulfone 의 順으로 I_{50} 값이 낮은 傾向이었다.

병아리에 對한 phorate 의 急性經口毒性은 1.02 mg/

kg 이었다.

Phorate 를 急性經口毒性 LD₅₀ 값 以下로 經口 投與 하였을 때 投與 後 初期에는 血漿 ChE 活性이 腦 AChE 活性보다 더 크게 沮害되었으나, 酵素活性의 回復은 腦 AChE 보다 血漿 ChE 가 더 빠른 傾向을 보였다.

參 考 文 獻

1. 金政鎬(1987) : 有機磷系 殺虫劑가 병아리의 Acetylcholinesterase 活性에 미치는 影響, 慶北大學校, 博士學位論文.
2. 洪鍾旭, 金政鎬, 金章億(1986) : Terbufos 가 병아리 中 Acetylcholinesterase 에 미치는 影響, 韓國農化學會誌, 29 : 324~330.
3. 洪鍾旭, 金政鎬(1984) : Dinobuton 의 土壤 및 溶液 中에서 分解, 韓國環境農學會誌, 3 : 16~22.
4. EPA(1978) : Proposed guidelines for registering pesticides in U.S. hazard evaluation: Human and domestic animals. Federal Register August 22.
5. OECD Test Guidelines (1981) : Report from the OECD expert groups on short term and long term toxicity, March 31.
6. Chan, P.K., O'Hara, G.P. and A.W. Hayes (1982) : *Principles and methods for acute and subchronic toxicity*. In principles and methods of toxicology. ed. by A.W. Hayes. Raven Press, New York, pp.1~52.
7. Nabb, D.P., and F. Whitfield (1967) : Determination of cholinesterase by automated pH stat method, *Arch. Environ. Health*, 15, 147~154.
8. Stevens, K.R. and M.A. Gallo (1982) : *Practical Considerations in the conduct of chronic toxicity studies*. In Principles and methods of toxicology ed. by A.W. Hayes. Raven Press, New York, pp.53~77.
9. Schnitzerling, H.J., Nolan, J. and P.A. Davey (1982) : A comparative study of the reactivity of acetylcholinesterases of the cattle tick *Boophilus microplus* and cattle erythrocytes with organophosphorus and carbamate inhibitors, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18, 216~225.
10. Bracha, P. and R.D. O'Brien (1968) : Trialkyl phosphate and phosphorothiolate anticholinesterases. II. Effects of chain length on potency, *Biochem.*, 7 : 1555~1559.
11. Davies, D.B. and B.J. Holub (1983) : Comparative effects of organophosphorus insecticides on the activities of acetylcholinesterase diacylglycerol kinase and phosphatidylinositol phosphodiesterase in rat brain microsomes, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20 : 92~99.
12. Reinders, J.H., Hansen, L.G., Metcalf, R.L. and R.A. Metcalf (1983) : *In vitro* and *in vivo* inhibition of chicken brain neurotoxic esterase by leptophos analogs, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 20 : 67~75.
13. Hart, G.J. and R.D. O'Brien (1973) : Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constants for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate, *Biochem.*, 12 : 2940~2945.
14. Lieske, C.N., Clark, J.H., Meyer, H.G. and J.R. Lowe (1980) : Spontaneous and induced reactivation of eel acetylcholinesterase inhibited by three organophosphates, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13 : 205~212.
15. Menzer, R.E., and L.P. Ditman (1968) : Residues in spinach grown in disulfoton and phorate treated Soil, *J. Econ. Entomol.*, 61 : 225~229.
16. Eto, M. (1974) : *Reactions resulting in detoxication in Organophosphorus Pesticides*: Organic and Biological Chemistry. CRC Press, p.173.
17. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr. V. and R.M. Featherstone (1961) : A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7 : 88~95.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Favr, A.L. and R.J. Randall (1951) : Protein Measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265~275.
19. Eto, M. (1974) : *Organophosphorus Pesticides*, Organic and Biological Chemistry, CRC press, pp.1~368.
20. Finney, D.J. (1971) : *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge Univ. Press, pp.19~80.
21. Robinson, C.P. and D. Beiergrohlein (1980), Cholinesterase inhibition by methamidophos and its subsequent reactivation, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13 : 267~273.
22. Fleming, W.J. and C.E. Grue (1981) : Recovery of cholinesterase activity in five avian species

- exposed to dicrotophos, an organophorus pesticide, *Pestic, Biochem. Physiol.*, **16** : 129~135.
23. Gray, A.J., Thompson, C.M. and T.R. Fukuto (1982) : Distribution and excretion of [^{14}C CH $_3$ S] methamidophos after intravenous administration of a toxic dose and the relationship with anticholinesterase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18** : 28~37.
24. Davison, A.N. (1953) : Return of cholinesterase activity in the rat after inhibition by organophosphorus compounds, *Biochem. J.*, **60** : 339~346.