

작물체중 Metalaxyl의 잔류분석을 위한 ELISA의 응용

이강봉* · 임건재** · 정영호** · 서용택*

Evaluation in ELISA for the Residue Analysis of Metalaxyl in Crops

Kang-Bong Lee*, Geon-Jae Im**, Young-Ho Jung**, Yong-Tack Suh*

Abstract

The cross-reactivities of antibody derived from rabbit immunized with metalaxyl-HSA conjugate were identified to 44% and 28% for metalaxyl acid and metolachlor respectively. The detection range of metalaxyl in competitive ELISA was 5 ppb to 5 ppm. The recoveries of metalaxyl in ELISA for 6 crops; potato, sesame, pepper, cabbage, cucumber and onion was ranged 77.5–103.6%. In this test, CV% were calculated below 10% except for sesame sample as shown 21.5%.

서 론

ELISA에 의한 잔류분석법이 점차 확대되어 가고 있는 가운데 최근 들어서도 살균제 thiabendazole¹⁾, 제초제 s-triazines²⁾, chlorodiamino-s-triazine³⁾, cyanazine⁴⁾, metolachlor⁵⁾, bentazon⁶⁾, 살충제 carbaryl⁷⁾ 과 captan⁸⁾, 유기인계⁹⁾ 등의 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)에 의한 분석법이 개발되었다. 기존의 잔류분석법보다 효과적인 시료조제 과정을 가지는 면역학적 분석기법은 항체에 대한 경쟁적 결합원리에 기초를 두고 있기에 RIA(radioimmuno assay)나 FIA(fluorescence immunoassay) 등의 형

태로도 농약의 잔류분석이 실시되고 있다.

이에 본 보고에서는 침투이행성 살균제인 metalaxyl[methyl N-(2-methoxy- acetyl)-N-(2,6-xylyl)-alaninate]을 잔류분석하고자 전보¹⁰⁾에 나타난 바와 같은 최적조건을 이용하여 몇가지 작물에서 잔류분석을 실시하고 GLC(gas liquid chromatography)에 의한 결과와 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Metalaxyl의 ELISA 기법에 의한 잔류분석을 위

* 전남대학교 농과대학 (College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

** 농업과학기술원 작물보호부 (Department of Crop Protection, Agricultural Science and Technology Institute, Suwon 441-707, Korea)

한 시약은 전보¹⁰⁾에 나타난 것과 동일한 시약을 사용하였으며 microwell plate는 Nunc 96F(flat bottom)를 사용하였고 ELISA reader는 Titertek MC multiscan spectrometer를 사용하였다.

2. 방법

본 실험에 사용한 항원 및 항체, 피복항원(coating antigen; CAg)의 조제와 microwell plate의 전처리, indirect ELISA에 의한 항체의 역가검정 등은 전보¹⁰⁾에 나타난 바와 같이 실시하였으며 잔류분석을 위한 competitive indirect ELISA와 교차반응성(cross-reactivity), I_{50} (inhibit concentration of 50%)값의 결정은 다음과 같이 실시하였다.

Competitive indirect ELISA

Carbonate 완충용액을 희석한 coating antigen 희석액(8 μ g/ml) 180 μ l를 microwell plate에 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 배양하여 고정화 시킨 후 PBS-t(Phosphate buffered saline with 0.1% Tween-20)로 3회 세척하였다. 세척 후 분석성분이 함유된 용액(2ml)과 항체용액(0.5ml)을 별도의 시험관에 1시간동안 반응시켜 이 용액(2 μ l)을 별도의 시험관에 1시간 동안 반응시켜 이 용액(200 μ l)을 plate에 첨가하고 대조구는 항체용액만을 첨가하도록 하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후에는 역시 PBS-t로 3회 세척하고 antirabbit IgG-peroxidase conjugate(1 : 1,000 희석) 용액(220 μ l)를 첨가하여 실온에서 30분간 배양하였다. 배양 후에는 PBS-t로 2회, 증류수로 2회 세척하였다. 최종적으로 기질용액(200 μ l)을 첨가하여 암소에서 30분 방치하고 60% H₂SO₄ 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 492nm에서 그 흡광도를 읽었다.

Cross-reactivity와 I_{50} 의 결정

Metalaxyl과 구조가 유사하거나 동일작물에 사용되는 약제 및 제형상 혼용하게 되어 있는 약제들, 즉 metalaxyl acid, chlorothalonil, captafol, beno-

myl, endosulfan, captan, thiophanate, metolachlor를 상기 언급한 ELISA 과정에서 metalaxyl 표준품 대신에 반응시켜 항체와의 결합능을 조사하였다. 또한 이들 각각의 화합물들은 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100ppm의 농도로 ELISA 반응 후 50% 결합 저해 농도(I_{50})를 찾았다.

표준검량선의 작성

Metalaxyl 표준품(96.5%)을 정용하여 100ppm stock soln.을 methanol로 조제한 후 이를 다시 희석하여 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0ppm의 농도로 조제하였다. 희석된 표준용액은 앞서 언급한 ELISA 과정에서 항원으로 사용하여 반응시키고 8 반복의 실험결과로 표준검량선을 작성하였다.

회수율시험

Metalaxyl이 사용되는 작물인 감자, 참깨, 고추, 배추, 오이, 양파 등의 6가지 시료(10g)를 농약잔류 분석과정¹¹⁾에 의거하여 세절하고 methanol(30ml)을 이용하여 균질화시켰다. 회수율 첨가농도는 0.05 ppm과 1.0ppm으로 하였으며 3 반복시험을 수행하였다. 시료는 균질화 후 감압여과하고 50ml 용량 플라스크로 옮겨 methanol로 부피를 맞추었다. 이들 시료는 더 이상의 정제없이 바로 ELISA에 사용하고 단, 참깨시료는 분액여두상에서 증류수 500ml와 함께 hexane으로 분배하여 농축하고 이를 methanol로 재희석하여 ELISA를 실시하였다.

GLC/NPD를 이용한 분석시료는 Tafuri 등¹²⁾의 방법을 변형시켜 다음과 같이 조제하였다. Metalaxyl이 첨가된 시료(20g)를 세절하여 methanol(100ml)로 추출여과하고 감압농축(50°C)한 후 남아 있는 수분은 ethyl acetate(100ml)와 celite(1g)를 첨가하여 완전농축하는 과정을 2회 반복함으로써 제거하고 농축물을 acetone(20ml)으로 재희석하였다. 희석액은 celite(1g)를 이용해 다시 여과하고 농축하여 Florisil column(5g, 12mm \times 400mm)에서 정

제하였다. 정제는 15%의 acetone이 함유된 dichloromethane액 30ml를 용출시켜 제거한 후 30%의 acetone이 함유된 동일용액(100ml)으로 용출시켜 농축 후 GLC/NPD 분석을 실시하였다. 이때 GLC/NPD의 분석은 5% OV-17(4mm i.d.×1.5m) 컬럼을 사용하였고 주입부와 컬럼, 검출기의 온도는 각각 230, 230, 280°C였다.

결과 및 고찰

Metalaxyl의 항원조제를 위해 사용된 metalaxyl acid와 7개의 다른 약제, chlorothalonil, benomyl, captan, endosulfan, thiophanate, metolachlor의 교차반응성을 조사한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 metalaxyl acid와 metolachlor가 높은 교차반응성을 지닌 것으로 나타났다. Metalaxyl이 0.7µg/ml의 농도로 항체결합을 50% 저해할때 metalaxyl acid와 metolachlor는 각각 1.5, 2.5µg/ml의 농도로 50%의 결합을 저해하였다. 이 밖의 약제들은 거의 항체결합을 저해하지 않고 50µg/ml 이상의 높은 농도에서 항체결합을 저해하는 것으로 나타났다. 하지

만 이들 약제들은 모두 100µg/ml의 농도까지 흡광도 %의 80% 이상을 저해하지 못하는 것으로 나타났다. 이 가운데 metalaxyl acid, metolachlor, thiophanate, benomyl 등은 20µg/ml 이상의 농도에서도 더 이상 흡광도를 크게 저해하지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 metalaxyl이 20ppm 이상 존재할 때는 적정농도로 희석하여 정량분석을 실시하여야 하는데 실제 20ppm 이상의 잔류 예는 흔치 않아 이들의 정량분석을 위한 별도의 조건은 생략하기로 하였으며 이 실험에서는 5ppm 까지의 검출 직선성을 가지고 분석을 실시하였다.

Table 1에서 이들 약제들의 교차반응성을 살펴보면, metalaxyl을 100%의 교차반응성을 가지는 약제로 하여 metalaxyl acid와 metolachlor는 각각 44%, 28%의 반응성을 보이고 이 밖에 captan, endosulfan, captafol, chlorothalonil 등은 1% 내외의 낮은 교차반응성을 보였다. 이들의 낮은 교차반응성은 실제 분석시 무시할 수 있는 수준이었다. Metalaxyl의 ELISA를 위한 표준 검량선은 Fig. 1에 나타났다. 검량선 작성의 범위는 5ppb에서 5ppm까지였으며 이 분석법의 시료에서 검출한계는 25ppb 였다.

Metalaxyl이 사용되는 6가지 작물, 감자, 참깨, 고

Table 1. I₅₀ and cross-reactivity percent for the some pesticides in modified indirect ELISA with regard to metalaxyl

Compounds	I ₅₀ (µg/ml)	CR(%)*
Metalaxyl	0.7	100
Metalaxyl acid	1.5	44
Metolachlor	2.5	28
Captan	50	1.5
Endosulfan	66	1.4
Captafol	72	1.2
Chlorothalonil	75	0.8
Thiophanate-methyl	>100	<0.5
Benomyl	>100	<0.5

* Cross-reactivity is expressed as that concentration of metalaxyl causing a 50% inhibition of binding × 100, divided by the concentration of the other compounds(50% inhibition concentration).

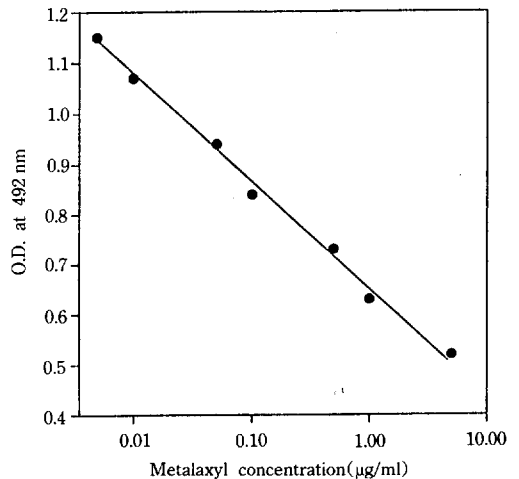


Fig. 1. Standard curve for the determination of metalaxyl by ELISA.

추, 배추, 오이, 양파에서 0.05ppm과 1.0ppm의 농도로 회수를 시험을 실시한 결과 ELISA에서나 GLC 분석 모두에서 양호한 결과를 얻을 수 있었다. Table 2에 나타난 결과를 보면 감자시료의 경우 두 방법 모두에서 80.8-88.6% 범위의 회수율로 변이계수(coefficient of variation %, CV %)는 ELISA에서 7.8%, GLC 법에서 8.3%를 보였고 참깨에서는 ELISA법이 각각 77.5, 91.2%의 회수율을, GLC법이 각각 81.0, 83.5%의 회수율을 보였으며 CV %는 ELISA에 의한 분석이 21.5%로 GLC에 의한 12.2%보다 높게 나타나 참깨에서와 같이 지방성분을 다량 함유하고 있는 시료에서는 ELISA법이 GLC법에 비해서 불리함을 보여주고 있다. 이 밖에도 고추나 배추, 오이, 양파시료에서도 ELISA법은 80.8-103.6%의 회수율을 얻을 수 있었고 GLC법에서는 80.3-93.6%의 회수율을 얻었다. 이들의 CV % 또한 10% 이내로 모두 양호한 결과를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 보아 ELISA에 의한 metalaxyl의 분석은 높은 감도와 신속하며 간편하게 많은 시료를 분석할 수 있다는 점에서 매우 유용한

방법이므로 많은 시료를 분석해야 하는 screening assay에 편리하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

침투 이행성 살균제인 metalaxyl을 ELISA에 의해 잔류분석하기 위해 생성된 항체는 metalaxyl acid와 metolachlor에 대해 44%와 28%의 교차 반응성을 나타냈고 시료 검출범위는 5ppb에서 5ppm 까지였다. ELISA에 의한 metalaxyl의 검출한계는 5ppb였으며 6가지 작물(감자, 참깨, 고추, 배추, 오이, 양파)에서 회수를 시험한 결과는 77.5-103.6% 범위였다. 이 분석법의 변이계수 백분율 값은 참깨에서의 21.5%를 제외하고는 모두 10% 이하였다.

참고문헌

1. Brandon, D. L., Binder, R. G., Bates, A. H. and Montague, W. C. (1992). Monoclonal antibody-based ELISA for thiabendazole in liver, *J. Agric. Food Chem.*, **40** : 1722-1726.
2. Muldoon, M. T., Fries, G. F. and Nelson, J. O. (1993). Evaluation of ELISA for the multianalyte analysis of s-triazines in pesticide waste and rinsate, *J. Agric. Food Chem.*, **41** : 322-328.
3. Muldoon, M. T., Huang, R. N., Hapeman, C. J., Fries, G. F., Ma, M. C. and Nelson, O. J. (1994). Hapten synthesis and immunoassay development for the analysis of chloroamino-s-triazine in treated pesticide waste and rinsate, *J. Agric. Food Chem.*, **42** : 747-755.
4. Lawruk, T. S., Lachman, C. E., Jourdan, S. W., Fleeker, J. R., Herzog, D. P. and Rubio, F. M. (1993). Quantification of cyanazine in water and soil by a magnetic particle-based ELISA, *J. Agric. Food Chem.*, **41** : 747-752.
5. Schlaeppli, J. M., Moser, H. and Ramsteiner,

Table 2. Recovery of metalaxyl in methods of ELISA and GLC.

Sample	Spiking level (ppm)	Recovery %			
		ELISA*	CV %	GLC**	CV %
Potato	0.05	85.7	7.8	88.6	8.3
	1.0	80.8		87.2	
Sesame	0.05	77.5	21.5	81.0	12.2
	1.0	91.2		83.5	
Pepper	0.05	87.4	5.6	91.4	3.2
	1.0	97.6		93.6	
Cabbage	0.05	88.7	6.2	90.8	3.4
	1.0	98.2		91.2	
Cucumber	0.05	84.3	1.4	89.6	1.2
	1.0	103.6		90.1	
Onion	0.05	80.8	8.8	83.2	7.5
	1.0	94.0		80.3	

* means of 8 replicates.
 ** means of 3 replicates.

- K. (1991). Determination of metolachlor by competitive enzyme immunoassay using a specific monoclonal antibody, *J. Agric. Food Chem.*, **39** : 1533–1536.
6. Li, Q. X., Hammock, B. D. and Seiber, J. N. (1991). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the herbicide bentazone. *J. Agric. Food Chem.*, **39** : 1537–1544.
7. Marco, M. P., Gee, S. J., Cheng, H. M., Liang, Z. Y. and Hammock, B. D. (1993). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for carbaryl, *J. Agric. Food Chem.*, **41** : 423–430.
8. Newsome, W. H., Yeung, J. M. and Collins, P. G. (1993). Development of enzyme immunoassay for captan and its degradation product tetrahydrophthalimide in foods, *J. A.O.A.C.*, **76** (2) : 381–386.
9. Skerritt, J. H., Hill, A. S., Beasley, H. L., Edward, S. L. and McAdam, D. P. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of organophosphate pesticides: fenitrothion, chlorpyrifos-methyl, and pirimiphos-methyl in water grain and flour-milling fractions, *J. A.O.A.C.*, **75**(3) : 519–528.
10. Lee, K. B., Im, G. J., Jung, Y. H. and Suh, Y. T. (1994). Production of Polyclonal Antibody and Optimum Conditions in ELISA for Metalaxyl, *Korean J. Environ. Agric.*, **13**(1) : 76–82.
11. Agricultural Chemicals Research Institute (1992). In “Assay Methods of Pesticide Residues”, Jung, Y. H., Park, Y. S., Eds., ACRI, Suwon, Pesticide Research Ser. No. 3 : 88.
12. Tafuri, F., Marucchini, C., Patumi, M. and Businelli, M. (1981). Gas Chromatographic Determination of Metalaxyl in Soil and Sunflower, *J. Agric. Food Chem.*, **29** : 1298–1301.