

## 노중 파라쿼트(paraquat)측정용 진단 시험지의 개발

박상범<sup>1</sup> · 장원철<sup>1</sup> · 김종완<sup>\*</sup>  
<sup>1</sup>단국대학교 자연과학대학 화학과  
단국대학교 의과대학 진단검사의학과  
(2003. 5. 30 접수)

### Development of Diagnostic Strip for Determining Paraquat in Urine

Sang-Bum Park<sup>1</sup>, Won-Cheoul Jang<sup>1</sup>, and Jong-Wan Kim<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea  
Department of Laboratory Medicine, Dankook University Medical College, Cheonan 330-714, Korea

(Received May 30, 2003)

**요 약.** Paraquat은 가장 효과적이고 널리 사용되는 제초제이지만 인간에게 매우 유독한 물질이다. 중독환자에 있어 뇨중 농도는 가장 중요한 인자중의 하나로 알려져 있으나 일반 검사실에서 이를 위한 시정검사는 거의 시행되지 않고 있다. 본 연구에서는 sodium dithionite를 이용하여 뇨중의 paraquat의 농도를 측정하는 새로운 방법의 진단 시험지를 개발하였다. 이 이차유도체성 방식을 사용하여 paraquat의 농도를 측정할 결과 0.5% borate 완충용액(pH 8.0), 유도체 0.25 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 0.1-0.8% PolyVinyl Pyrrolidone(PVP) 안정제, 1% decanol의 구성비로 만들어진 진단시험지의 반응 색상이 안정하며 표준 비색표에 의한 육안적인 감별은 물론 화학 자동분석기에서의 응용성이 좋았다.

**주제어:** Paraquat, 진단시험지, 뇨

**ABSTRACT.** Paraquat is an effective and widely used herbicide, but it is also very toxic to humans. It is well-known that urine paraquat concentration is one of the most important prognostic indicator for paraquat-poisoning. Quantitative analysis of paraquat, however, are not generally used in clinical laboratories. In this work, a new test strip to detect paraquat concentration using sodium dithionite in urine was developed. Using these second-derivative method, the test strip prepared in 0.5% borate buffer (pH 8.0), 0.25 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 0.1-0.8% PVP, and 1% decanol showed not only better color reaction but also an excellent application possibility to be used in automatic analyzer.

**Keywords:** Paraquat, Diagnostic strip, Urine

### 서 론

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 세계에서 가장 흔히 사용되는 제초제로 식물의 광합성(photosynthesis)동안에 superoxide가 생성되어 세포벽과 원형질을 파괴한다. 또한 호기성 생물체내에서 용해되어 환원 paraquat를 형성하여 전자 수용체로 작용하여 NADP의 환원을 감소시켜 superoxide 및 peroxide

radical을 형성하여 세포막 파괴를 일으키고 조직에 변화를 초래하는 유독한 약물이다. 그리고 생체내에서 paraquat-monopyridone의 형태로 대사되어 진다(Fig. 1). 독성이 강하여 적은 양이라도 인체에 흡수되면 치명적이며 우리 나라에서 가장 많은 희생자를 내는 농약이다. Paraquat 중독에 의한 사망률은 국가에 따라 20-74%까지 보고되어 있는데, 우리 나라의 경우 이에 대한 전국적인 통계자료는 없으나 특히 약물을 쉽게 접할 수 있

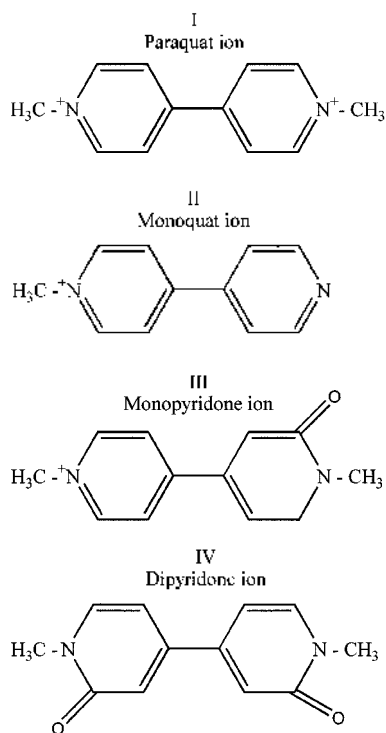


Fig. 1. Paraquat and its metabolites.

는 농촌지역을 중심으로 한 사망률은 매우 높을 것으로 추정되며 실제로 몇몇 임상보고에 따르면 75-91%의 사망률을 보이고 있다.<sup>1,2</sup>

Paraquat 중독환자에 있어 뇨중 농도는 가장 중요한 예후 인자중 하나로 알려져 있는데,<sup>4,7</sup> 그중 Proudfoot 등이 보고한 유독 후 시간내별 뇨의 농도나 Hart 등이 보고한 생존가능성 곡선은 뇨중 농도를 기준으로 한 참고치들로서 중독환자의 예후 판정에 널리 인용되고 있다. 그러나 국내의 경우 실제 paraquat 중독환자에서 음독양의 추정이나 치료방법의 결정은 대부분 환자나 보호자의 진술 내지는 임상상에 근거하고 있으며, 현재까

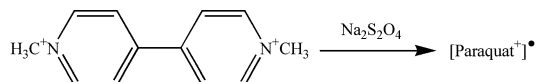


Fig. 2. The one-step derivation of paraquat is performed by reduction with alkaline sodium dithionite solution resulting in strongly UV-absorbing, coloured radicals.

지 paraquat 측정에 이용되고 있는 고성능액체크로마토그래피(HPLC)법은 정확한 농도를 측정할 수는 있지만 시간이 많이 걸리고 검사과정이 복잡하여 임상적용이 힘들고, paraquat와 sodium dithionite가 반응하여 radical의 형태를 띄게 되어 발색을 하게 되는 sodium dithionite법에 의한 발색반응 검사는(Fig. 2) paraquat 중독 여부를 신속히 확인할 수 있는 장점이 있으나, 습식 분석법이기에 때문에 숙련된 인력과 장비를 필요로 하므로 일부 대형병원을 제외하고는 검사를 실시하기가 쉽지 않다. 따라서 보다 간편하고 대학병원단위의 큰 병원 뿐만 아니라 보건지소등의 말단 의료기관에서도 간단히 paraquat 중독 여부를 선별 할 수 있는 신속하고 간편하며 간단도와 정확성을 갖는 검사방법이 필요하다.

본 연구에서는 dip and read 검사 방식의<sup>8</sup> 진단용 시험지를 개발하여 paraquat 진단 및 치료에 필수적인 뇨중 농도의 측정과정을 간편화시키고 건식 화학 기법을 이용한 진단 시약의 국산화에 기여할 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

## 실험 및 방법

### 시료

시료는 2000년 5월부터 2001년 3월까지 단국대학교 병원에 paraquat 중독 증세로 내원한 환자 20명을 대상으로 하였다. 대상군중 생존자는 11명, 사망자는 9명이었고 본원에 입원 후 체외배설요법을 받은 경우는 생존자군과 사망자군에서 각각 6명 및 3명이었다(Table 1).

Table 1. Characteristics of 20 paraquat-poisoned patients

	Survivors	Non-survivors
No. of case	11	9
Sex, male/female	7/4	7/2
Age (years), mean±SD	43.2±7.1	47.1±16.4
Lag time (hours)*, mean±SD	9.1±7.1	17.2±17.7
No. of paraquat urine spot test positivity	4	3
No. of received extracorporeal therapy	6	9

\* Time between paraquat ingestion and arriving at emergency room.

Abbreviation: SD, standard deviation.

내린 후 최초 요검체를 채취하여 즉시 검사하였고 이후 1-4시간 간격으로 3-8회 검체를 채취하여 검사에 이용하였다. 측정 후 남은 검체는 -20 °C에 보관하였다.

**시약 및 기기**

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 구입하였고, 정도관리용 시험지 chek-stix은 Miles Inc. 제품을 사용하였다. 시험지를 제조하기 위한 시약으로 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, NaOH 등은 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 구입하였고 원심분리기는 Beckman CPR centrifuge(U.S.A.)를 사용하였다.

UV-160A recording spectrophotometer는 Shimadzu Co.(Japan)를 사용하여 이차유도성 스펙트럼 방식으로 측정하였다.

**Paraquat 정량분석**

노중 paraquat 농도의 측정을 위하여 노 1 ml에 반응 유도제(0.25 M Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-0.5 N NaOH) 0.25 ml를 첨가한 후 3,000 rpm에서 1분간 원심 분리 후 상층액을 즉시 395 nm에서 흡광도를 측정하고 변색범위를 관찰하였다. 점부분색이면 강 양성(+++)으로 하고 부분색은(++), 연한 부분색이면 약 양성(-), 색깔의 변화가 없을 때 음성(-)으로 하였다.

**Paraquat 측정용 시험지의 제조**

Paraquat를 검출하기 위한 시험지는 borate-NaOH완충용액(0.4 mole, pH 8.0)과 PVP(0.8 g)와 NaCl을 함유하는 100 ml의 1차침지 수용액에 Advantec No.2를 충분히 침지시킨다. 이 시험지를 열풍건조기에서 30분간 건조시킨다. 그런 다음 0.25 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-0.5 N NaOH를 유기용매에 녹인 용액에 2차 침지를 시킨 후, 50 °C에서 5분 정도 건조시킨다. 건조된 시험지를 한 번의 길이가 5 mm인 점사각형으로 자르고 polystyrene 필름인 받침대위에 부착하고 paraquat 검출용 시험지를 제조하였다. paraquat가 함유되어 있는 노중에 백색을 띄고 있는 음성 시험지를 잠시 담갔다 꺼내면, 노중의 paraquat의 농도에 따라 열은 청색에서 짙은 청색으로 발색된다. 제조된 시험지는 습기에 민감하므로 실리카겔 등의 제습제에 넣어 보관한다.

**결과 및 고찰**

최적의 paraquat 농도 측정용 진단 시험지를 제조하

Table 2. Paraquat reaction time of pH and types of buffer solution

Buffer solution	pH	Reaction time (sec) (paraquat, 1 µg/ml)
Borate	8	100
	9	80
	10	40
	11	40
Carbonate	9	130
	10	100
	11	70
CAPS	9	160
	10	160
	11	160
CES	9	over 160
	10	160
	11	160

기 위해서는 지해제에 영향을 적게 받고 특이성(specificity), 감도(sensitivity), 안정성(stability)등이 높은 측정제와 안정제의 선택과 적절한 완충용액이 중요하다.

**최적의 완충용액 조건**

노 중 paraquat와 진단용 시약이 시험지에서 반응을 잘 일으킬 수 있는 최적의 조건을 조사하기 위해서 우선 조사하였으며, 1차 침지에 있어서 가장 기본이 되는 완충용액으로 많이 사용되는 borate buffer, carbonate buffer, CAPS(3-(N-cyclohexyl-amino)-1-propane-sulfonic acid), CES(2-(N-cyclohexylamino)ethane-sulfonic acid)를 이용하였고 pH는 8-11까지 하였다(Table 2)<sup>9,10</sup>. 위의 결과로 borate 완충용액에서 가장 빨리 반응을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었고 또한 염기도가 강해질수록 기질의 가수분해가 빨리 일어나 반응이 빨리 일어남을 관찰할 수 있었다. Borate의 농도(0.1-1%)와 완충용액의 pH를 8-11까지 변화를 주면서 시험지의 발색의 정도를 관찰하였다(Table 3). 노중에 존재하는 paraquat와 sodium ditionite의 최적 활성 pH는 8.5이고 합성된 반응성이 염기에 가까울수록 자동 가수분해되므로 완충용액의 pH는 8.0으로 정하였다.

**안정제의 농도에 따른 영향**

Paraquat 검출용 유도제가 공기 중에서 매우 불안정하고 시험지 또한 불안정하므로 안정제의 처리가 필요하다. 안정제의 농도는 일반적으로 0.1-1%가 적당한 것으로 보고되어 있어서 본 실험에서는 borate 완충용액의

Table 3. Comparison of reaction times between the variation of borate buffer solution and pH

Con. of borate (%)	pH	Stability of reagent strip		Reaction time (sec)
		Immediate	1 day later	
0.1	8	-	-	over 220
	9	+	-	
	10	=	=	
	11	=	=	
0.5	8	+	+	100
	9	+	+	100
	10	+	+	70
	11	+	+	70
1.0	8	+	+	70
	9	+	+	70
	10	+-	+-	40
	11	+-	+-	40

농도를 0.5-2.0%, pH 8-11, 유도체의 농도를 0.25-0.75 M 로 하여 조사하였고 그 결과는 Table 4와 같다.<sup>11,12</sup> 칩 지 용액을 borate(pH 8.0) 0.5%, 유도체 농도가 0.25 M 이 되도록 하고, 안정제인 PVP(0.1-1.6%)를 농도별로 나누어서 시험지를 만들고 안정제가 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 그 결과는 Table 5와 같았다.

#### 촉진제의 종류에 따른 영향

시험지 제조에 사용된 유도체는 NaOH가 작용하여 진행되는 환원 반응을 이용한 것이다. 일반적으로 alcohol 을 촉진제로 많이 사용하기 때문에 분자량이 적은 methanol, ethanol과 분자량이 중간정도인 heptanol 그리고 분자량이 큰 decanol과 비교하여 관찰하였다(Table 6). 분자량이 큰 alcohol이 휘발성이 적을뿐더러 활성화 하는 데도 더 효과가 있는 것으로 관찰되었고 시험지 제조에 바람직한 것으로 사료된다. 또한 pyridin도 사용하여 보았는데 decanol보다는 activator로서의 역할이 떨어지는 것으로 관찰되었다.

#### Paraquat 의 농도에 따른 변색범위

Paraquat를 검출하기 위한 진단 시험지는 borate-NaOH 완충용액(0.4 mole, pH 8.0)과 PVP(0.8 g)와 NaCl을 함유하는 100 ml의 최적의 1차 칩지 수용액에 Advantec No.2를 충분히 칩지시킨다. 이 시험지를 열풍건조기에서 30분간 건조시킨다. 그런 다음 0.25 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-0.5 N NaOH를 유기용매에 녹인 용액에 2차 칩지를 시킨 후, 50 °C에서 5분 정도 건조시킨다. Paraquat를 농도별로

Table 4. Paraquat reaction with the variation of derivative concentration, borate buffer solution, and pH (positive control: paraquat 1%)

Con. of derivative	Con. of borate(%)	pH	Reagent strip	Negative control	Positive control
0.25	0.5	8	=	-	++
		9	=	-	++
		10	=	-	++
		11	-	-	-
	1.0	8	+	-	+
		9	+	-	+
		10	+	-	+
		11	+	+	+
	1.5	8	+	±	-
		9	+	±	-
		10	+	-	+
		11	=	-	±
2.0	8	=	±	±	
	9	=	±	±	
	10	=	±	±	
	11	+	±	±	
0.50	0.5	8	+	-	-
		9	+	-	-
		10	+	-	-
		11	-	-	-
	1.0	8	+	±	++
		9	+	±	++
		10	+	±	++
		11	=	-	++
	1.5	8	+	+	+
		9	+	+	+
		10	+	+	+
		11	-	+	+
2.0	8	-	±	+	
	9	-	±	+	
	10	-	-	-	
	11	-	-	-	
0.75	0.5	8	-	-	±
		9	-	-	-
		10	-	-	+
		11	-	±	+
	1.0	8	-	±	+
		9	-	±	+
		10	-	±	+
		11	±	+	+
	1.5	8	±	+	-
		9	±	+	-
		10	±	+	-
		11	±	+	-
2.0	8	±	±	±	
	9	±	±	±	
	10	±	±	±	
	11	-	±	±	

-: Colorless, ±: Pale blue, +: Blue, ++: Deep blue, +++: Dark blue

Table 5. Determination paraquat with PVP concentration

Con. of stabilizer (%)	The day			1 week later		
	Reagent strip	Negative control	Positive control	Reagent strip	Negative control	Positive control
PVP (0.1)	-	-	+	-	-	-
PVP (0.2)	-	-	+	-	-	-
PVP (0.4)	-	-	+	-	-	-
PVP (0.8)	-	-	+	-	-	-
PVP (1.6)	-	-	+	-	-	+

\*paraquat 1 µg/ml

Table 6. Variation of reaction times with the addition of activator of each 1% upon dipping into a paraquat 1 µg/ml

Activators	Reaction time (sec)
Comparative formulation without activator	140
Pyridine	110
Methanol	120
Heptan-1-ol	80
Decan-1-ol	60

\*The test strips change from colorless to pale and deep blue

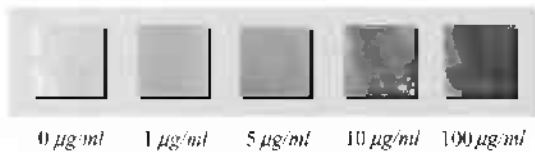


Fig. 3. Change of diagnostic strip with variations of paraquat concentration.

standard solution을 만들어 100 µl씩 떨어뜨린 후 진단 시험지의 변색범위를 관찰하였다(Fig. 3). 1 ppm(µg/ml)에서부터 색의 변화를 관찰할 수 있었다.

**결 론**

Paraquat는 인체에 대한 독성이 강하여 중독된 경우 매우 높은 사망률을 보이는 맹독성 약품이다. 그러나 소량 음취한 경우나 우연한 사고의 경우 적극적인 조기 치료로 생존 가능성이 높고, 노중 paraquat의 농도가 중요한 예후 인자로 인정되고 있어 간편하고 신속한 검사법이 요구되고 있다. 따라서 paraquat 검출용 진단 시험지의 개발은 응급환자의 예후 결정 및 치료선택에 있어서 유용한 검사법이다.<sup>13-14</sup>

본 연구에서는 환자의 소변을 각각 징해진 시간별로 채취하여, 제단백 없이 sodium dithionite로 환원 시켜 색깔의 변화를 관찰하여 paraquat의 농도를 측정하였다.

실험 데이터를 근거로 하여 완충용액의 선택 및 최적의 pH, 안정제와 촉진제 등 여러 가지 사항들을 고려하여 paraquat검출용 진단 시험지를 제조하였다. 침지 용액을 borate(pH 8) 0.5% 유도체 농도가 0.25 M이 되도록 하고, 안정제로 PVP를 사용하고 촉진제로 분자량이 큰 decanol을 사용하여 최적의 조건을 잡았다. 진단 시험지의 개발은 손쉽게 paraquat를 취할 수 있는 우리나라의 경우 원인 불명의 급성신부전증, 구강내 궤양과 호흡 부전을 동반한 환자에게 원인 규명과 예후 결정에 도움을 줄 수 있다. 따라서 sodium dithionite를 이용한 진단시험지는 paraquat 진단 및 치료에 필수적인 노중 농도의 측정과정을 간편화시킴으로써 경제적인 효율성을 가져올 수 있고, 응급의료센터에서 불필요한 치료를 피하고 적절한 치료를 시간을 놓치지 않고 수행할 수 있는 즉시 검사가 가능할 것으로 사료된다.

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-002-F00047).

**인 용 문 헌**

- 이재식, 정미경, 김태준, 김종봉, 백진기, 최태명 *대한내과학회지* 1994, 47, 93-100.
- 김혜영, 최재홍, 이지현, 엄재호 *대한신장학회지* 1996, 15, 582-92.
- 홍세용, 양봉호, Sabapathy NN. *대한내과학회지* 1995, 48, 480-5.
- Lee SK; Ameno K; In SW; Yang JY; Kim KU; Koo KS, et al. *Int J Legal Med* 1999, 112, 198-200.
- Schermann JM; Houze P; Bismuth C; Bourdon R. *Human Toxicol* 1989, 6, 91-3.
- Proudfoot AT; Stewart MS; Levitt T; Widdop B. *Lancet* 1979, 2, 330-2.
- Hart TB; Nevitt A; Whitehead A. *Lancet* 1984, 2, 1222-3.
- Braunsteiner, H.; Rindler, R. *Blut*, 1972, 27, 26.
- Folds, J. D.; Welsh, I. R. H.; Spitznagel, J. K. *Proc.*

- Soc. Exp. Biol. Med.* **1972**, *13*, 461.
10. Little, P.: *Brit. F. J. Urol.* **1964**, *36*, 360-363.
11. Janoff, A.; Blondin, J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1971**, *136*, 1050.
12. Sweetman, F.; Omstein, L. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 327.
13. Little, P.: *Brit. F. J. Urol.* **1964**, *36*, 360-363.
14. Janoff, A.; Blondin, J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1971**, *136*, 1050.
-