

# 살균제 Iprovalicarb 잔류물의 신속한 검출을 위한 효소면역분석법

조한근   경기성   이은영

## Enzyme Immunoassay for Rapid Detection of the Fungicide Iprovalicarb Residues

H. K. Cho   K. S. Kyung   E. Y. Lee

### Abstract

For a biosensor development, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of the fungicide iprovalicarb was developed by minimizing the processing time. The time for whole incubation process was reduced from 135 minutes to 15 minutes. The concentration of antibody was varied to improve sensitivity. The total processing time was reduced from 2.5 hours to 20 minutes, the final sensitivity ( $IC_{50}$  value) of 7.93 ng/mL and the lowest detection limit of 0.045 ng/mL were obtained. This ELISA was applied to potatoes and onions, and the recoveries were in the range of 98.85~101.20% and 87.97~102.70%, respectively. Accordingly, this method can be used as basis for a biosensor for rapid monitoring of iprovalicarb residues in crops.

**Keywords :** Biosensor, ELISA, Iprovalicarb, Fungicide

### 1. 서론

국민건강과 환경보호에 대한 관심 증대로 친환경 농업이 점차 확대되고 있어, 국내의 단위 면적 당 농약 사용량은 감소하고 있지만, 아직도 많은 농가에서는 농산물의 품질과 생산성 향상을 위해 농약 사용을 중단하지 못하는 실정이다. 또한 외국으로부터 수입되는 농산물은 수확 후 보존성을 높이기 위해 농약을 사용하는 경우가 있으므로 국내 농산물에 비해 잔류정도가 더욱 심각한 실정이다. 따라서 농산물에 잔류하는 농약성분을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 장비와 기술은 여전히 중요한 위치를 차지하고 있다.

이프로발리카브(iprovalicarb)는 카바메이트(carbamate)계 침투성 살균제로서 보호, 치료 및 박멸 효과를 갖고 있으며, 양파·오이·포도·참외의 노균병과 토마토·감자의 역병 및 수박·고추의 탄저병 방제에 사용된다(Tomlin, 2003; 한국작물보호협회, 2006). 농약잔류허용기준은 참외의 경우 0.3 ppm, 감자,

양파 및 수박의 경우 0.5 ppm, 고추와 오이의 경우 1.0 ppm, 그리고 토마토와 포도의 경우에는 2.0 ppm 이다(식품의약품안전청, 2005).

잔류농약의 분석은 관행적으로 GC(gas chromatography)나 HPLC(high performance liquid chromatography)로 수행되고 있는데, 일정량의 시료를 마쇄한 후 적당한 유기용매로 추출하고 정제하는 전처리 작업이 필요하다. 이 방법들은 감도와 정확도가 높은 장점을 갖고 있지만 많은 비용, 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능이 요구된다. 최근에 관행적 분석법의 단점을 보완하기 위해, 살균제 이프로발리카브 잔류물의 검출을 위하여 보다 신속하고 감도가 예민하며, 특이성과 선택성을 갖는 동시에 분석비용이 저렴한 효소면역분석법(ELISA)의 개발이 보고되었다(Lee 등, 2004; 이, 2005). 이 효소면역분석법은 저 농도의 잔류량을 지닌 다량의 시료를 높은 신뢰도로 분석할 수 있는 기법으로, 측정범위는 0.0128~5,000 ng/mL, 최소 검출량은 0.065 ng/mL로 국내의 농약잔류허용기준을 만족할

This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2005. The article was submitted in November 2006, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in December 2006. The authors are Han-Keun Cho, Professor, KSAM member, Dept. of Biosystems Engineering, Kee Sung Kyung, Associate professor, Dept of Agricultural Chemistry, and Eun Young Lee, Graduate assistant, Dept of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University. Corresponding author: H. K. Cho, Professor, Dept of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; Fax: +82-43-271-4413; E-mail: <hkcho@cnu.ac.kr>.

수 있고, 측정감도(IC<sub>50</sub>)는 3.51 ng/mL로서 기존 분석법으로 정량화하기 어려운 화합물에 응용할 수 있다. 그러나 이 효소면역분석법은 관행적인 분석법에 비해 시간, 비용 및 노력 등은 단축하였으나, 시료를 실험실로 이동해야 하며, 2시간 이상의 분석시간이 요구되어 현장에서는 사용할 수 없는 문제점을 갖고 있다. 따라서 현장에서 신속한 검출을 위해서는 바이오센서와 같은 측정장치가 필요하다.

본 연구는 농산물에 잔류하는 살균제 이프로발리카브의 신속하고 정확한 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서, 기존에 실험실용으로 개발된 효소면역분석법(Lee 등, 2004)을 변형하여 바이오센서 개발에 사용될 효소용 면역분석법을 개발하고 측정 성능을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 바이오센서용 효소면역분석법

표준 효소면역분석법을 기초로 한 바이오센서 개발의 중요한지는 측정에 소요되는 시간을 단축하는 것이다. 분석에 소요되는 시간은 측정감도와 정확도를 저하시키지 않는 범위에서 짧을수록 좋을 것이다. 개발될 바이오센서에 사용될 효소면역법은 Lee 등(2004)이 발표한 살균제 이프로발리카브 잔류물 검출을 위한 효소면역분석법을 기초로 하여 항체의 농도 변화, 배양시간과 색 발현시간의 단축 등의 방법을 통해 분석에 소요되는 시간을 최소화하도록 하였다. 본 연구의 기초가 된 효소면역분석법(Lee 등, 2004)을 요약하여 정리하면 다음과 같다.

먼저 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)의 각 반응조(well)에 pH 9.6의 코팅 버퍼로 희석한 코팅항원(단백질 농도: 5 µg/mL)을 100 µL 씩 주입한다. 그 후, 4°C에서 하룻밤 방치한 후 세척 완충액(0.1×PBST)으로 5회 세척하여 플레이트에 코팅이 되지 않은 항원을 제거하고, 반응조의 코팅되지 않은 부위를 블로킹(blocking)하기 위하여 각 반응조에 무지유(3% skim milk in 1×PBS)를 200 µL 씩 추가한다. 그후 37°C에서 1시간 배양한 다음 다시 상기 방법으로 반응조 플레이트를 세척한다. 그 다음 코팅된 플레이트에 1×PBS에 1:16,000로 희석한 다클론 항체와 분석 대상 시료인 이프로발리카브의 농도별 용액을 50 µL 씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 반응 후 다시 세척하고, 이차항체에 효소가 표지된 goat anti-abbit IgG-Horseradish peroxidase 희석액(1:10000 diluted with 1×PBST)을 100 µL 씩 추가한다. 실온에서 1시간 반응 후 세척하고 기질 완충액 100 µL 씩을 각 반응조에 추가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 반응조에서의 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 50 µL 씩 추가한다. 황색으로 변한 플레이트를 450-655 nm 범위의 dual wavelength mode에서 마이크로플레이트 판독기(Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정한다(박, 2003). 표 1은 단계별 절차를 나타낸다.

이프로발리카브 표준용액의 농도는 25,000 ng/mL에서 0.0128 ng/mL로 희석하여 사용하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 S자형으로 맞추고, 4개의 계수를 갖는 지수 식으로 표시된다(송과 조, 2003; Rodbard, 1981). 이 곡선의 IC<sub>50</sub>(C)를 중심으로 한 직선범위 IC<sub>20</sub> - IC<sub>80</sub>가 실질적인 측정범위가 된다. 측

**Table 1** Modified procedure for the 이프로발리카브 ELISA

Immobilization of antigen
1. Immobilize antigen on plates (100 µL, 1.0 µg/mL, 12h, 4°C)
2. Washing (1×PBS+0.05% Tween20, 5 times)
3. Blocking (200 µL, 1×PBS+3% skim milk, 1h, 37 °C)
4. Washing (1×PBS+0.05% Tween20, 5 times)
Binding
5. Add 50 µL of standard or sample solution. (25,000, 5,000, 1,000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 ng/mL)
6. Add 50 µL of the diluted polyclonal antibody (1:16,000, 1:8,000, 1:4,000)
7. Incubate at 24 °C
8. Washing plate (1×PBS+0.05% Tween20, 5 times)
9. Add 100 µL of 2nd antibody (goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:10,000)
10. Incubate at 24 °C
11. Washing plate (1×PBS+0.05% Tween20, 5 times)
Development
12. Add 100 µL of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
13. Incubate at 25°C
14. Add 50 µL of stop solution (4N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
15. Read optical density on microplate reader.

정감도의 예측은 분석물을 함유하지 않은 시료의 흡광도를 50% 저해하는 이프로발리카브의 농도 IC<sub>50</sub>로 표시할 수 있다. 그러므로 IC<sub>50</sub> 값이 작은 시그모이드 표준곡선이 예민한 방법이라고 할 수 있다.

**나. 시약 및 재료**

바이오센서용 효소면역분석법의 개발에 필요한 이프로발리카브와 p-methylphenylethylamine는 Bayer AG(Leverkusen, Germany)에서 분석등급으로 공급받았다. 코팅 항원과 항체로는 각각 충북대학교 농화학과 농약학 실험실에서 제조된 hapten-I-BSA와 hapten-II-KLH conjugate를 각각 코팅항원과 면역원으로 하여 토끼 E에서 생산된 항혈청을 사용하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다.

Maxisorp 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였고, 마이크로플레이트 판독기는 Bio-Rad Model 550(Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

효소면역분석법을 위한 완충액은 EPA Guideline(Lee 등, 2004; 송과 조 2003)에 따라 제조하였다.

**다. 분석시간 감축**

표준방법에서 소요되는 총 배양시간(표 1, 단계 7, 10, 13)을 135분 (60+60+15)에서 45분(15+15+15)과 15분(5+5+5)으로 단축하여 효소면역법의 측정감도 변화를 관찰하였다. 배양시간의 단축에는 한계가 있으므로, 항체의 농도 변화에 따른 시간 단축을 병행하여 실험하였다. 1차 항체의 희석비는 1:16,000에서 1:4,000과 1:2,000으로 증가하여 효소면역법의 측정감도 변화를 관찰하였다.

**라. 농산물 시료분석**

분석시간을 단축하도록 수정된 효소면역분석법을 이용하여 이프로발리카브의 회수율 시험을 하기 위해 농산물 시료를 분석하였다. 농산물 시료로는 감자와 양파를 선택하였고, 시료 전처리에는 Lee 등(2004)의 방법에 따라 추출, 여과, 농축 및 정제의 순으로 진행하였다. 감자는 1.0, 1.5, 2.0 와 3.0 ppm, 양파는 0.3, 0.6, 0.9 와 1.2 ppm 처리를 하여 비교하였다. 분석방법은 표 1에 서술된 효소면역법 절차를 따라 수행하였고 회수율 결과는 HPLC에 의한 회수율과의 상관계수를 구하여 비교하였다.

**마. 교차반응성**

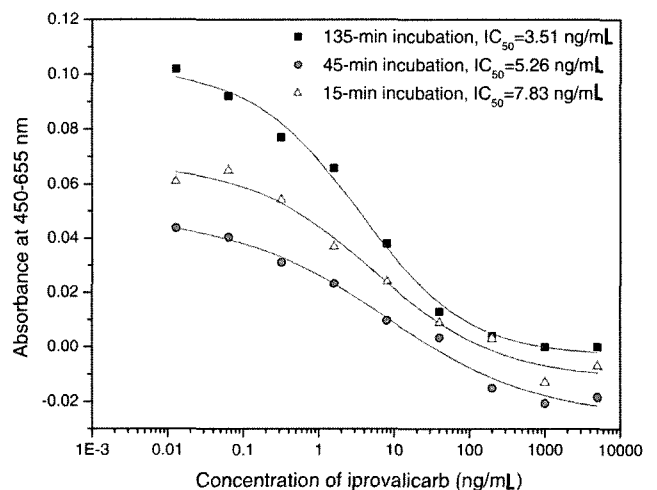
수정된 효소면역분석법에 사용된 항체는 이프로발리카브에 만 특이적으로 반응하고 다른 유사 화합물에 대해서는 친화력이 낮아야 분석물을 선택적으로 정확하게 분석할 수 있다. 따라서 이프로발리카브와 구조가 유사한 hapten-I, hapten-II, p-methhlphenylethyl-amine 및 이프로발리카브의 가수분해 산물을 선택하여 교차반응성을 비교하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**가. 분석시간 감축**

**1) 배양시간 변화에 따른 측정 감도**

그림 1은 배양 시간을 각각 45분과 15분으로 했을 때의 흡광도 측정 결과이다. 배양 시간이 45분일 때와 15분일 때의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 5.26 ng/mL 와 7.83 ng/mL로 측정되었다. 이 값은 표준 방법의 IC<sub>50</sub> 값 3.51 ng/mL(Lee 등, 2004) 보다는 크지만, 국내의 작물별 이프로발리카브 잔류 허용량(국립 농산물 품질관리원 농약잔류허용기준)이 0.05~6.0 ppm인 것을 고려하면 배양시간이 45분과 15분일 때 최소검출한계가 각각 0.038 ppm와 0.045 ppm으로 확인되어, 농산물에 잔류하는 이프로발리카브의 검출에 사용될 수 있는 충분한 감도를 갖는 것으로 나타났다. 배양시간을 135분에서 15분으로 단축할 경우, 감도와 최소검출한계에 큰 손실 없이 전체 분석시간을 120분 단축할 수 있어 바이오센서의 기본 분석법으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 1** Effect of the incubation time on the sensitivity of iprovalicarb ELISA.

**2) 항체의 농도변화에 따른 측정 감도**

그림 2는 배양 시간이 15분, 코팅 항원농도가 1.0 µg/mL, 그리고 1차 항체의 희석비를 1:4,000과 1:2,000으로 변화시켰

을 때의 흡광도 측정결과이다. 그림에서 보는 것처럼 1차 항체의 희석비가 1:4,000인 경우에는 IC<sub>50</sub> 값이 1:16,000의 경우인 6.13 ng/mL 보다 약간 낮은 값인 4.87 ng/mL로 나타났고, 1:2000인 경우에는 조금 더 낮은 3.22 ng/mL로 나타났다. 항체의 희석비를 줄였을 때 감도의 개선효과는 그리 높지 않은 것으로 나타나서 표준방법에 사용된 희석비를 그대로 사용해도 좋을 것으로 판단된다.

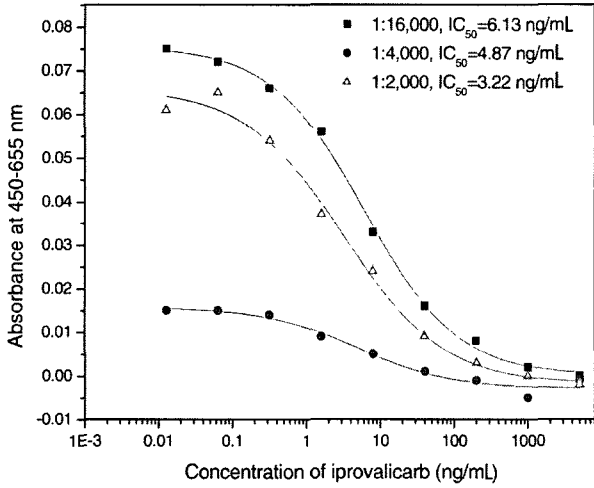


Fig. 2 Effect of the antibody dilution ratio on the sensitivity of iprovalicarb ELISA.

나. 농산물 시료분석

수정된 효소면역분석법을 이용하여 감자와 양파의 시료를 분석하였다. 그림 3과 4에 보이는 바와 같이 가장 낮은 matrix effect를 보이는 희석배수 결정 실험결과, 감자는 100배, 양파는 20배 희석액에서 가장 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다.

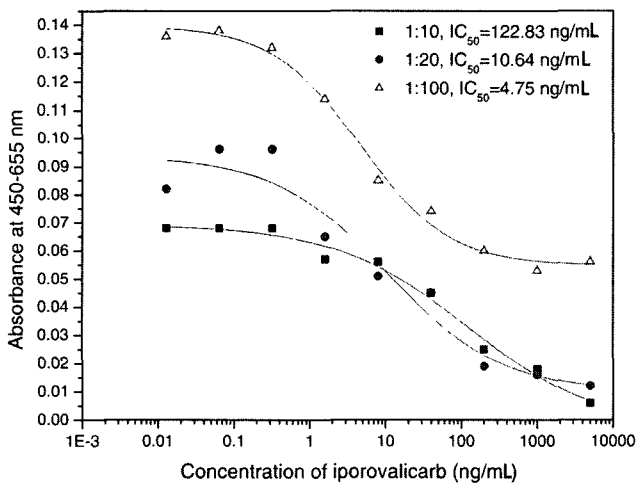


Fig. 3 Matrix effect of the potato extract on the sensitivity of the ELISA.

회수를 실험결과는 표 2에 보이는 바와 같이 감자의 경우 98.85 ~ 101.20%, 양파의 경우 87.97 ~ 102.70%의 높은 값을 나타

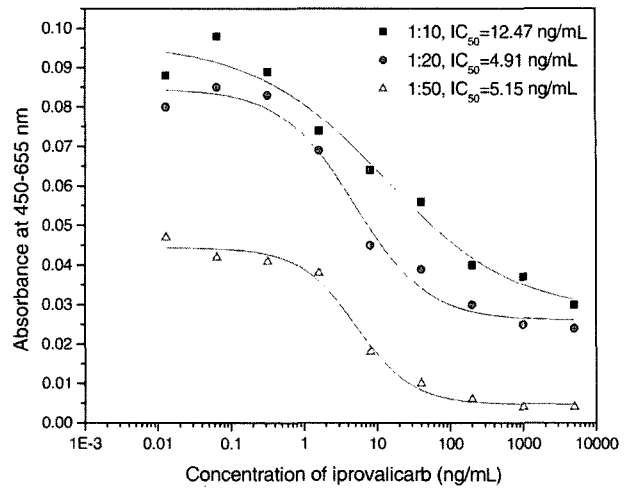


Fig. 4 Matrix effect of the onion extract on the sensitivity of the ELISA.

Table 2 Recovery of the iprovalicarb fortified to vegetable samples by the modified ELISA

Sample	Fortified	Actual conc. (ng/mL)	Detected conc. (ng/mL)	Mean recovery (%; n=4)	CV (%)
Potato	0	0	0.00	0.00	1.0
	1,000	10	10.12	101.20	4.0
	1,500	15	14.87	99.13	5.3
	2,000	20	19.77	98.85	4.9
	3,000	30	30.27	100.90	3.4
Onion	0	0	0	0	1.0
	300	15	13.82	92.13	2.2
	600	30	28.25	94.17	5.7
	900	45	46.22	102.70	5.3
	1,200	60	52.78	87.97	3.2

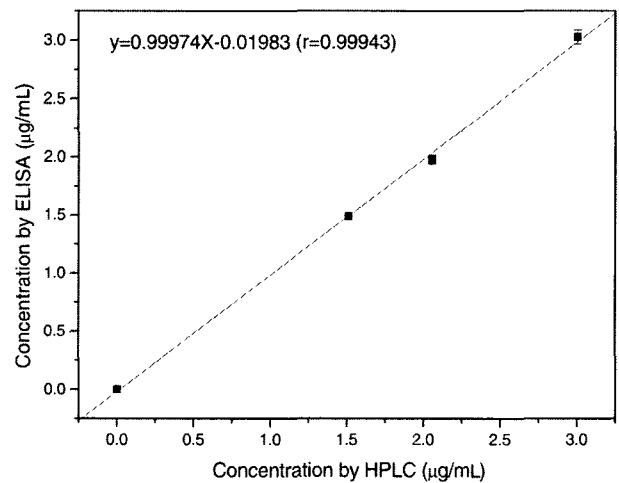
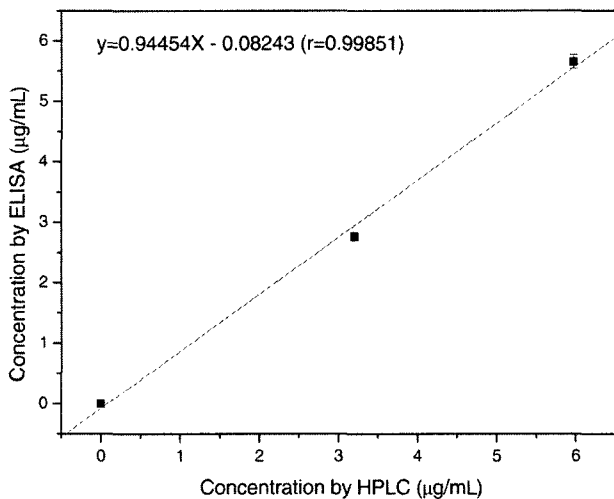


Fig. 5 Correlation between the concentration measured by the modified ELISA and that by HPLC for potatoes.

**Table 3** Cross-reactivity of some structurally related compounds to the rabbit E antiserum in the ELISA

Compound	Chemical structure	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	CR (%) <sup>*</sup>
iprovalicarb		8.01	100.00
hapten-I		3,214.00	0.28
hapten-II		10.49	76.36
p-methylphenyl-ethylamine		415.00	1.93
hydrolysis product of iprovalicarb		227.00	3.53

\* CR(%) (%Cross-reactivity) = (IC<sub>50</sub> of iprovalicarb)/(IC<sub>50</sub> of test compound)×100



**Fig. 6** Correlation between the concentration measured by the modified ELISA and that by HPLC for onions.

났다. 수정된 ELISA를 이용한 분석값과 기존실험실 방식의 HPLC 분석값과의 상관관계를 비교한 결과(그림 5와 6), 감자의 경우에는 0.99943, 양파의 경우에는 0.99851의 높은 상관계수를 얻었다. 이 실험에서 얻은 결과를 최적화된 효소면역분석법으로 얻은 결과(Lee 등, 2004)와 비교하였을 때, 유사한 결과를 보였으므로, 바이오센서의 분석법으로 사용하는데 적합할 것으로 판단된다.

**다. 교차반응성**

항체의 교차 반응적 특성은 교차반응성이 큰 농약의 존재 유무를 동시에 검출할 수 있지만, 교차반응성이 큰 약제들과 혼합되어 있을 때는 HPLC나 GC에 비해 정확한 정량이 어려

운 문제가 있다.

표 3에서와 같이 이프로발리카브의 isopropoxy 기가 결여된 hapten-I과 이프로발리카브의 isopropyl 기 대신에 수소 원자를 포함하는 가수분해 산물 및 p-methylphenyl-ethylamine은 교차반응성이 낮게 나타났다. 반면에 Hapten-II는 교차반응성이 높게 나타났고 그 이유는 isopropyl 기가 항원의 epitope로 중요한 역할을 했기 때문인 것으로 판단된다. 이 결과는 표준 효소면역법에 비해 높은 IC<sub>50</sub> 값들을 보였으나 백분율로 나타낸 교차반응성 값은 표준 효소면역법의 결과와 유사한 것으로 확인되었다(Lee 등, 2004).

**4. 결론 및 요약**

본 연구는 살균제 이프로발리카브 잔류물의 신속한 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서 바이오센서용 효소면역분석법을 개발하기 위해 실행되었다. Lee 등(2004)에 의해 개발된 실험실용 효소면역분석법은 HPLC나 GC에 비해 노력과 분석시간을 절약할 수 있으나 측정에 소요되는 시간이 2시간 이상이므로 바이오센서에 사용될 생물반응으로는 적합하지 않다. 분석시간의 단축을 위해 배양시간을 단축하고 이에 따른 감도의 변화를 관측한 결과 IC<sub>50</sub>값은 7.83 ng/mL로 나타났고, 분석에 소요되는 시간을 150분에서 20분으로 단축할 수 있었다. 이 값은 실험실용 효소면역분석법의 IC<sub>50</sub> 값인 3.51 ng/mL 보다 높게 나타났으나, 최소측정한계는 0.045 ng/mL 이하로 유효검출한계가 국내 작물별 이프로발리카브의 허용 잔류량의 측정에 적합한 것으로 확인되었다.

실험실용 효소면역분석법의 배양시간 단축에는 한계가 있

어 항체의 희석비를 1차 항체의 경우 1:4,000과 1:2,000으로 2차 항체의 경우 1:2,000과 1:1,000으로 변화시켜 흡광도를 측정하였다. 항체의 희석비 감소에 따른 감도개선 효과는 크지 않은 것으로 나타났다.

농산물 시료에 대한 회수율 시험에서는 감자의 경우 98.85~101.20%, 양파의 경우 87.97~102.70%의 높은 값을 나타내어 바이오센서용 측정방법으로 적합한 것으로 확인되었다. 교차반응성 검증 결과 이프로발리카브와 유사한 화합물에 대해서는 낮은 교차반응성을 보였고, 유사하지 않은 화합물에 대해서는 높은 교차반응성으로 보여 특이성(specificity)이 낮은 것으로 확인되었다.

### 참 고 문 헌

1. Lee, J. K., S. H. Park, E. Y. Lee, Y. J. Kim and K. S. Kyung. 2004. Development of an ELISA for the detection of the residues of the fungicide Iprovalicarb. *J. Agric. Food Chem.* 52:6680-6686.
2. Rodbard, D. 1981. Mathematics and statics of ligand assay: an illustrated guide. In *Ligand Assay: Analysis of International Developments on Isotopic and Nonisotopic Immunoassay*; Langan, J., Clapp, J. J., Eds., Masson Publishing Co., New York, 45-99.
3. Tomlin, C. D. S. 2003. A world compendium : The pesticide manual. 13th ed. British crop protection council publications. UK. pp.580.
4. 박선화. 2003. 살균제 Fenarimol 잔류물의 효소면역분석법 개발. 충북대학교 석사학위논문.
5. 송석진, 조한근. 2003. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법 개발. *한국농업기계학회지* 28(6):505-510.
6. 식품의약품안전청. 2005. 식품의 농약 잔류허용기준(MRLs for pesticides in foods). pp.112.
7. 이은영. 2005. 다클론 항체를 이용한 살균제 Iprovalicarb의 효소면역분석법 개발. 충북대학교 석사학위논문.
8. 한국작물보호협회. 2006. 농약사용지침서. pp.203.