

# 토양과 물에서의 제초제인 atrazine 검색을 위한 형광 편광 면역 분석법의 개발

김지훈, 박정현, 김윤정, 심원보, 정덕화

경상대학교 대학원 응용생명과학부

## 1. 서론

Atrazine은 s-triazine 계에 속하는 제초제로서 농촌지역에서 잡초방제에 사용되고, 환경 시료에서 검출하기 때문에 농약오염의 지표로서 사용되기도 한다. atrazine은 동물에 있어서 독성이 매우 강하고 사람에게 발암성을 일으킬 수 있는 물질로 분류되었다<sup>(1)</sup>. 마시는 물이나 지하수에서 의 제초제인 atrazine의 오염이 발생되기도 하므로, 지속적인 모니터링을 통해서 물이나 흙에서 잠재적인 환경독소에 대한 물이나 토양에 대한 안전성을 확보하고 오염에 의한 피해를 예방하여야 한다<sup>(2)</sup>. 이런 이유로 간단하고 신속하고 저렴한 atrazine의 검출 방법이 필요하다. 기존의 검출방법인 chromatographic의 방법들은 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있고 많은 시료의 분석에 대한 어려움이 있으므로, 최근 효소면역분석방법에 관한 연구가 많이 시행되고 있다. 이런 면역분석방법 중의 하나인 형광 편광 면역 분석법은 분리, 씻어내는 복잡한 단계를 줄인 homogenous한 방법으로 효소면역분석법 보다 편리하고 간편하며 신속하고 실험 후 방사능물질과 같은 위험폐기물이 생성되지 않는 장점을 가지고 있으므로, 본 연구는 atrazine에 대한 특이항체를 이용하여 형광 면역 분석법 조건의 확립하고 분석에 응용하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

표준 독소 및 이성체 : Atrazine, terbutryne, alachlor, captan, and simazine, (Sigma Co. St. Louis, Mo. USA); Tracer와 항체 : AT-EDF, Atrazine-monoclonal antibody (At-88), atrazine polyclonal antibody (At-PAb); Buffer와 유기용매 : Borate buffer (50 mM, 0.1% sodiumazide, pH 9.0), methanol, ethyl acetate, chloroform, acetonitrile (Aldrich Inc. USA); 기구 및 장치: TDx : Abbott, Co.(USA)

\* EDF의 합성 : ethylenediamin 35  $\mu$ L (0.5 mmol)과 35 mL methanol을 혼합액에 39 mg (0.1 mmol) FITC와 5 mL methanol, 50  $\mu$ L triethylamine 용액을 30분간 한 방울씩 첨가한다. 2시간 동안 반응 후 filter하여 고체형의 EDF를 회수하고 건조하여 갈색병에 넣어 4 보관하여 사용하였다.

\* Tracer의 정제 : EDF와 atrazine을 결합시킨 후 TLC plate(Art. 1.05553, 25 TLC aluminium sheets, 20x20 cm, silica gel 60 (Merck))에 line spotting하여  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(4:1) 전개용매로 전개시켜 분획한 후 methanol에 재용출시켜 하여 atrazine 형광 tracer로 사용하였다.

\* 항체 농도 결정 : At-88 MAb와 At-PAb를 borate buffer(BB, 50 mM, pH 9.0)에 단계 희석하여 intensity 2000으로 조정된 atrazine tracer, 0.5 mL과 동량 혼합한 후 TDx/FLx를 이용해 mili-polarization(mP)을 측정하여 Max. mP 70%가 되는 농도를 희석배수로 결정하였다.

\* 표준곡선의 작성 : 물에서의 atrazine 농도를 측정하기 위한 표준곡선을 얻기 위하여 PAb(1:200) 0.5 mL와 tracer(= intensity 2000) 0.5 mL 및 3차 증류수에 첨가된 각 농도의 atrazine 500  $\mu$ L를 cuvette에 차례로 첨가하고 혼합시킨 후 즉시 TDx/FLx photo check mode 편광도를 측정하였다. 한편, 토양에서의 atrazine 농도를 측정하기 위해서는 유기용매로 추출 후 희석하는 방법을 채택하기 위하여 methanol, ethyl acetate, chloroform, acetonitrile 유기용매별 영향을 측정하였고, 영향이 가장 적은 methanol을 선택하여 10%MeOH/BB로 희석한 표준 독소 500  $\mu$ L를 물에서 측정할 조건의 항체 및 tracer 조건으로 혼합한 후 편광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

\* 교차반응성 측정 :Terbutryne, alachlor, captan, simazine를 atrazin 표준곡선 작성과 같은 방법으로 교차반응성을 살펴보았다.

\* 회수율 측정 : 물은 수돗물, 정수기, 증류수의 3종류의 물 5 mL에 10, 50, 100 ppb가 되도록 spike 시켜서 추출과정 없이 바로 측정하였다. 또한 토양에서의 회수율을 측정하기 위하여 진주인근의 토양을 채취하여 1시간 건조하고, 시료 5 g에 10, 50, 100 ppb가 되도록 spike 하여 5 mL의 MeOH로 1시간 동안 강하게 교반시켜 추출하고, 1200 rpm, 5분 원심분리 후 filter(Nylon membrane filter, Deerfield, IL, USA)하여 BB로 10배 희석하여 10% MeOH/BB의 농도로 회수율을 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

형광물질인 EDF와 합성한 tracer와 본 실험실에서 제작한 At-88MAb, At-PAb의 반응성을 살펴본 결과 MAb보다 PAb가 tracer와 높은 결합력과 민감성을 나타내었다. 아울러 PAb의 농도결정에 있어서 Max. mP 70%가 되는 희석배수는 200배로 나타났다.

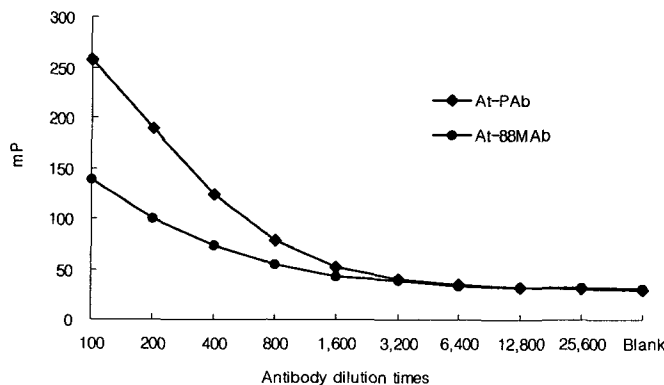


Fig. 1. Titration of atrazine monoclonal antibody(At-88) and polyclonal antibody titration with atrazine-EDF fluorescent tracer

한편, 물 및 토양에서의 atrazine 검색을 위한 최적조건상의 표준곡선의 작성한 결과 Fig. 2와 같았다. 즉, 토양에서 atrazine 추출하기 위해서 100% MeOH로 추출하고 10배 희석하여 10%로 희석하여 표준곡선을 작성한 결과 matrix effect가 적었으며, 검출 범위는 1~1000 ppb로 나타났다.

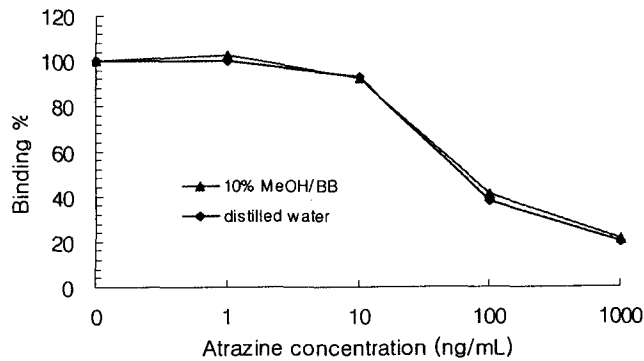


Fig. 2. Standard curve for detection of atrazine in water and soil by homogeneous FPIA using At-PAb

그리고, 물과 토양에서 10, 50, 100 ppb가 되도록 spike 시켜 회수율을 측정한 값을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Recovery ratio of atrazine spike for water and soil

Spiked Samples	Recovery ratio (%)		
	10 ppb	50 ppb	100 ppb
Purified water	119	107	96
Distilled water	117	105	101
Tap water	115	103	99
Soil 1	99	85	67
Soil 2	96	85	72

즉, 물에서의 atrazine의 검출은 별도의 정제과정 없이 수돗물, 정수기물, 증류수 3가지를 10, 50, 100 ppb spike 시켜 측정 결과 96~119%, 토양에서는 67~99%의 결과를 나타내었다. 그러므로, 기존의 기기분석보다 간단한 추출방법을 사용하여 분석할 수 있는 형광 편광 면역분석법은 시료 10개의 분석에 있어서 7분정도의 시간이 소요되는 아주 간단한 방법으로 생각된다.

#### 4. 참고 문헌

- 1) Eldrige, J. C., et al.,(1994), Short-term effects of chlorotriazines or estrys in female sprague-dawley and Fischer 344 rats, *J Toxical, Environ, Health.*, 43(2), 155-167
- 2) Gascon, J., Oubina, et al., (1996), Performance of two immunoassays for the determination of atrazine in sea water samples as compared with on-line soild phase extraction-liquid chromatography-diode array detection, *Analytica Chimica, Acta*, 330, 4-51
- 3) Pourfarzaneh, M., White, G.W., Landon, J. and Smith, D.S.: Cortisol directly determined in serum by fluoroimmunoassay with magnetizable solid phase, *Clin. Chem.*, 26(6), 730-733 (1980)
- 4) Myung Ja Choi, Jung ran lee and Sergei A. Eremin, development of single reagent for fluorecence polarization immunoassay of atrazine, *Food and Agricultural immunology*, 2001
- 5) Do young yoon, Immunological and Biological Applications of Anti-progesterone Antibodies, Department of Life Science Korea Advanced Institute of Science and Technology.10 (1994)