

ELISA 기법을 이용한 農藥의 殘留分析

이강봉* · 서용택*

Use of ELISA for the Residue Analysis of Pesticides

Kang Bong Lee and Yong Tack Suh

Abstract

Immunochemical assay, ELISA for small molecules such as pesticides are rapid, sensitive, cost effective and can easily analyze with large samples. ELISA is one of several powerful biotechnologies immediately applicable to pesticide analysis. This review lists the advantages and disadvantages of the ELISA and elucidate the steps in assay development using examples from this laboratory. The focus is primarily on hapten synthesis strategies, protein conjugation, Immunization, assay format, and assay validation.

분석수단으로서 항체의 이용이 1960년대⁽¹⁾에 이미 밝혀졌음에도 불구하고 농약이나 다른 환경화합물들의 분석에는 면역학적 기법의 이용이 거의 없었다. 이같이 환경화학분야에서 면역기법의 이용이 뒤떨어진 이유는 gas liquid chromatograph(GLC)나 high performance liquid chromatograph(HPLC)에 의하여 농약이나 환경화합물들을 적절히 분석할 수 있었기 때문이다. 하지만 농약의 장기적인 저농도 노출의 가역적 효과에 대한 관심의 증대로 작물과 환경에 대한 모니터링의 필요성이 확대되고 있지만 기기를 이용한 기존의 분석프로그램에서는 반복되는 대량의 시료에 대한 부담이 많은 어려움을 주게 된다. 이러한

기기를 이용한 분석은 시간과 노동력, 비용 등이 많이 소모되는 단점을 지니고 있어서 농약을 간단하고 신뢰성이 있으며 저렴한 비용으로 분석할 수 있는 방법이 필요하게 되었다. 면역기법(Immunoassay)은 이러한 장점을 지니는 방법으로 1980년대부터 본격적으로 농약의 잔류분석에 응용이 되어왔다. 농약의 면역기법에 의한 분석은 특이성, 민감성, 정확성, 간편성, 경제성, 신속성, 응용성 같은 장점이 있다. 그러나 모든 기법이 그러하듯이 이 기법 역시 생소한 기법이라는 점과 시약을 쉽게 구할수 없다는 점, GLC나 HPLC 기법과 같이 비특이성 간섭물질로 인해 GC-MS 같은 보다 정확한 방법에 의해 확인이

* 전남대학교 농과대학 농화학과

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Table 1. Advantages and disadvantages of Immunochemical technology

Advantages	Disadvantages
Generally applicable	New technology in environmental labs
Highly sensitive	Too sensitive
Highly specific	Hard to apply to multianalyte problems
Highly precise	Cross reactivity and interference
Very rapid	Reagent not available
Cost effective	Confusing terminology
Highly adaptable	Large sample load required

필요하다는 것, 다성분 동시분석에 쉽게 응용할 수 없다는 단점도 있다(Table 1).

면역기법에 의해 지금까지 분석되어진 농약들을 살펴보면, 살균제로는 benomyl과 그 대사체^(2,3), metalaxyl⁽⁴⁾, fenpropimorph⁽⁵⁾ 등이, 살충제로는 benzoylphenylurea계 약제⁽⁶⁾와 parathion⁽⁷⁾, aldrin⁽⁸⁾, dieldrin⁽⁸⁾, endosulfan⁽⁹⁾, fenitrothion^(10,11), permethrin^(12,13), pyrimifos-methyl⁽¹¹⁾ 등이 분석되었으며 제초제로 paraquat^(14,15,16), 2,4-D⁽¹⁷⁾, atrazine^(18,19), chloresulfuron⁽²⁰⁾, metolachlor⁽²¹⁾, picloram⁽²²⁾, bentazon⁽²³⁾ 등이 분석되었다. 이밖에도 IAA⁽²⁴⁾, ABA⁽²⁵⁾, GA⁽²⁶⁾ 같은 식물생장 조절제와 살비제 avermectin⁽²⁷⁾, Bacillus thuringiensis 독소⁽²⁸⁾나 aflatoxin B^(29,30) 등 다양한 분야에 널리 이용되고 있는 실정이다(Table 2).

면역기법은 고전적 분석에 의해 정량하기 어려운 것들을 포함해서 대부분의 화합물에 응용할 수 있다. 단, 매우 작은 분자나 수용액내에서 매우 불안정한 분자들은 적절치 않다. 또한 적절한 hapten합성의 어려움 역시 이 기법의 제한 요인이 되기도 한다. 하지만 이 기법은 최소한의 시료정제와 경제성, 자동화 등이 가능하게 개발되어 현재 이용되고 있는 분석기법들 중에서 대량의 시료분석을 가장 쉽게 적용할 수 있는 방법이다^(6,16). 이것은 저농도의 잔류량을 지닌 대량의 시료를 높은 신뢰도로 분석하기 위해 환경분야에서는 매우 필요한 기법이라고 할 수 있다. 면역기법의 수행과 개발에는 몇가지 단계가 있는데 본 보고에서는 hapten의 선택, 합성, 구조확인, 단백질과의 공유결합, 면역화, 항체의 특성규명,

항체의 최적화, 분석조건의 최적화, 포장시료에의 응용과 유효도 판단 등에 초점을 두고 서술하고자 한다.

1. Hapten의 선발

분자량이 작은 농약들이 면역동물의 체내에서 면역반응을 유발시키기 위해서는 필히 큰 분자나 담체단백질에 공유결합되어야 한다⁽³¹⁾. 여기서 담체단백질은 두가지 역할을 하는데 첫째, 면역동물에게 항원으로 인지받을 수 있는 충분한 크기를 제공하고 둘째, 면역반응이 충분히 완결될 기간동안 면역동물의 체내에 잔존하게 하는 역할을 하는 것이다. 완벽한 hapten은 항원으로서의 표지화합물 구조를 가지며 항체에 의해 용이한 인식을 불러 일으켜야 한다. 이것은 보통 3-6원자의 길이와 단백질과 공유결합할 수 있는 작용기(-NH₂, -COOH, -OH, -SH)를 가지는 것을 말한다. 만약 대상농약이 작용기를 전혀 갖지 않았다면 단백질과 결합할 수 있는 작용기 뿐만 아니라 적절한 spacer arm을 가지게 하기 위한 합성과정이 필요하다.

담체단백질에 hapten을 공유결합시키는 방법은 여러가지가 있는데 이러한 반응에는 용해도가 중요한 요인이 된다. 대상농약은 가능한 한 비극성이어야 하며 결합을 위해 필요한 것 이외에는 다른 작용기를 지니지 않아야 한다⁽³¹⁾. Hapten의 합성은 적절한 어떤 용매를 사용하여도 가능하나 hapten의 담체단백질과의 결합은 일반적으로 수용액에서 수행한다. 그러

Table 2. Pesticides for which Immunoassays have been developed

Pesticides	Reported Detection Limit	Method	Reference
<i>Fungicides</i>			
Benomyl and metabolites	0.1 ng	FIA	42
	1.25 ng	RIA	2
	3.50 ng/ml	ELISA	3
Metalaxyl	63.0 pg/ml	ELISA	4
Triadimefon	1.0 ng/ml	ELISA	43
Fenpropimorph	13.0 pg/ml	ELISA	5
Iprodione	0.2 ng/ml	ELISA	44
<i>Insecticides</i>			
Benzoylphenylurea	3.9 ng	ELISA	6
Parathion	4.0 ng	RIA	7
	10.0 ng/ml	ELISA	45
	25.0 ng/ml	ELISA	46
Bioallethrin	0.5 ng	ELISA	37
Aldrin	700.0 pg	RIA	8
Dieldrin	150.0 pg	RIA	8
Aldicarb	300.0 ng/ml	EIA	33
Chlordane	5.0 ng/ml	EIA	33
	3.0 ng/ml	ELISA	9
Endosulfan	0.1 ng/ml	RIA	47
	0.3 ng	ELISA	10
Fenitrothion	0.3 ng	ELISA	10
Chlorpyrifos methyl	0.02 ng	ELISA	11
Pyrimifos methyl	0.02 ng	ELISA	11
Permethrin	1.5 ng/ml	ELISA	12
Phenothrin	2.0 ng/ml	ELISA	12
<i>Herbicides</i>			
Paraquat	0.1 ng, 10 ng	RIA	14
	0.1 ng	ELISA	15,16
2,4-D, 2,4,5-T	13.0 ng	RIA	17
Diclofop methyl	2.0 ng/ml	ELISA	32
Atrazine	1.0 ng/ml	ELISA	18
	0.1 pg/ml	ELISA	19
Chlorsulfuron	3.0 ng/ml	ELISA	20
Molinate	3.0 ng/ml	ELISA	35
Clomazone	0.5 ng/ml	ELISA	48
Metolachlor	0.1 ng/ml	ELISA	21
Norflurazon	1.0 ng/ml	ELISA	49
Picloram	5.0 ng/ml	ELISA	22
	0.1 ng/ml	RIA	17
Bentazon	2.0 ng/ml	ELISA	23
<i>Plant growth regulators and others</i>			
Avermectin	0.5 ng/ml	ELISA	27
IAA	94.0 pg	RIA	24
GA	2.0 pg	RIA	26
PCBs	0.1 ng	RIA	36
ABA	13.0 pg	ELISA	25
Aflatoxin	0.5 ng	ELISA	29,30
Maleic hydrazide	6.0 ng/ml	ELISA	50
Chloramphenicol	10.0 pg	RIA	51
Sulfamethazin	10.0 ng	ELISA	52
Diflubenzuron, BAY SIR 8514	2.0 ng	ELISA	53

므로 hapten은 수용성 조건에서 어느정도 안정하여야 담체단백질과의 결합이 용이하다. 예를 들면 비극성인 endosulfan의 대사체인 endosulfan diol은 -OH 기를 가지는 수용성이며 이들은 쉽게 담체단백질에 결합되고 모화합물의 구조를 충분히 지니게 된다⁽⁹⁾. 또한 fenpropimorph나 diclofop-methyl의 대사체들 역시 -COOH 기를 가지고 있어 담체단백질에 쉽게 결합하게 된다^(6,32). Benomyl의 경우에는 2-aminobenzimidazole에서 부터 합성을 시작하여 담체단백질에 결합시킬 수 있고 metalaxyl은 metalaxyl acid 형태를 조제하여 이것의 -COOH 기에 단백질을 결합시키는게 가능하다(Fig.1). 이렇듯 작용기를 지닌 hapten의 선택이 우선적이고 작용기를 갖지 않은 hapten의 경우에는 적절한 작용기를 결합시키는 반응이 필요하다.

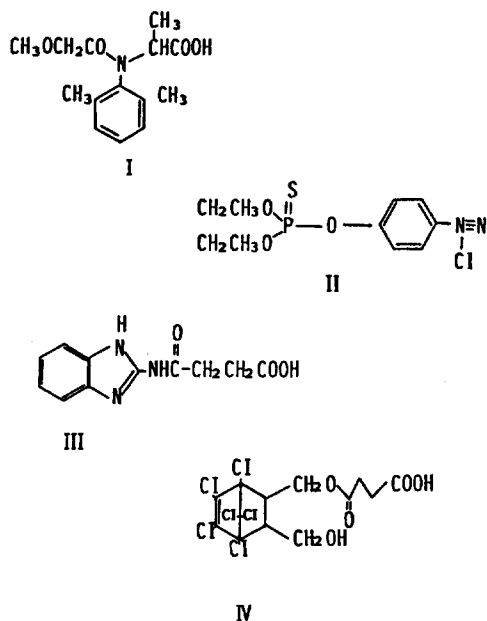


Figure 1. Structures of some pesticides for protein conjugation; I, metalaxyl acid; II, diazotized parathion; III, 2-amidobenzimidazole carbamate; IV, endosulfan hemisuccinate

2. 담체 단백질(Carrier Protein)과의 공유결합

화학적으로 활성을 지닌 hapten은 여러가지 방법에 의해서 무수, 수용성 유기용매에서 제조된다. 이러한 활성화된 hapten의 일정량은 bovine serum albumin(BSA), keyhole limpet hemocyanin(KLH), human serum albumin(HSA), Ovalbumin(OA) 등의 단백질에 첨가반응시키고 이때의 hapten: protein 비는 적어도 2:1 이상이 되어야 한다(보통 5:1-50:1)⁽³³⁾. 결합반응이 완결된 용액은 투석으로 정제하고 장기간의 보존을 위해서는 필요한 농도와 양만큼 분리,보관한다. 경우에 따라서는 동결건조하여 보관하는 것도 좋은 방법이 된다. 동결건조 후 보관은 hapten과 단백질의 결합과정에서 수용성 단백질들이 수용성 유기용매에서 변성이 될 우려가 있을때 필요한 방법이다. 결합반응시 유의해야 할 조건은 pH, 반응속도, hapten의 안정성, 단백질 안정성, 온도 등인데 고온은 결합반응을 촉진시키고 저온은 단백질 변성을 지연시키며 너무 높거나 낮은 pH는 hapten을 파괴시킬 뿐만 아니라 반응속도를 조절하기도 한다.

Hapten의 작용기는 담체단백질에 hapten을 결합시키는데 사용되는 방법의 선택에 중요하다. Carboxyl 기를 함유한 hapten을 단백질에 결합시키려면 일반적으로 두가지 방법이 널리 쓰이는데 원래 peptide 결합반응을 위해 개발되었던 mixed anhydride 법⁽³³⁾과 carbodiimide 법⁽³⁴⁾이다. Mixed anhydride 법은 benzoylphenylurea계⁽⁶⁾나 thiocarbamate계⁽³⁵⁾, PCBs⁽³⁶⁾ 등에 사용되어 왔다. Carbodiimide 법의 예로는 Newsome 등⁽³⁾이 2-succinamidobenzimidazole을 HSA에 pH 7에서 결합시킨 것과 Wie 등⁽⁶⁾이 5개의 benzoylphenylurea계 약제를 몇가지 담체단백질에 결합시킨 것이 있다. 이보다 더 세련된 방법으로는 활성 ester를 합성하기 위해 carbodiimide를 사용하는 방법인데 이 활성 ester는 단백질에 적절한 길이와 작용기를 가지고 결합할 수 있다⁽³⁴⁾. Wing 등⁽³⁷⁾은 S-bioallethrin hemisuccinate의 활성 ester기를 조제하여 사용하였으며 이 기법은 tria-

zine계 제초제⁽¹⁸⁾나 dieldrin⁽⁶⁾, fenpropimorph⁽⁶⁾, maleic hydrazide⁽⁵⁰⁾, endosulfan⁽⁹⁾ 등에 사용되어 왔다. Amine 기를 지닌 hapten은 molinate⁽³⁵⁾나 parathion⁽⁷⁾의 경우와 같이 단순한 diazo 화 반응에 의해 단백질과 결합시킬 수 있다. Hydroxyl 기를 지닌 hapten은 succinic anhydride⁽³¹⁾로 단백질을 유도체화시킨 후 직접 단백질과 결합시킬 수 있다. Sulfhydryl 기를 함유한 hapten은 homo- 또는 heterobifunctional 시약⁽³¹⁾에 의해 결합시킬 수 있다.

3. 항체생산

이 단계는 면역화과정과 항체의 형성, 항체의 특성규명을 포함한다. 항체 생성원으로는 반드시 척추동물이 사용되어야 하는데 이중 널리 사용되는 토끼는 취급이 용이하고 혈청량도 적당하며 항체역가가 높다는 장점이 있다. 면역기법에 사용하기 위하여 일반적으로 생성되는 항체는 모두 다클론 항체(polyclonal antibody)이어서 그 특이성이 단클론항체(monoclonal antibody)에 못미치는 결점이 있다. 1975년에 Köher⁽³⁸⁾ 등에 의하여 개발된 단클론항체 기법은 *in vitro*에서 원하는 단일항체를 무제한으로 생산해 낼 수 있는 세포체계를 구축하게 하였다. 이 기법의 hybridoma는 시간과 노동력, 비용의 소모가 크지만 독특한 친화력과 특이성을 지닌 훌륭한 시약과 같으며 생산량이 있어도 무제한적이라고 할 수 있다.

면역기법에서는 단클론 항체나 다클론 항체에 상관없이 항체는 항원의 결합양상이나 동물체내의 면역반응체계, 면역방법과 면역주사시기에 따라 생성이 달라진다. Williams 등⁽³⁹⁾이나 Vaitukaitis 등⁽⁴⁰⁾은 면역과정과 시간일정의 다양한 방법들을 서술했고 현재 이들의 많은 변법이 널리 사용되고 있다. 본 실험실에서는 토끼로부터 농약에 대한 다클론항체 생산을 위해 다부위 피하주사(multi intradermal injection, MIDI)를 토끼의 등과 목 부분에 실시하고 있다. 보통 초기주사 3-4주 후에는 면역촉진주사(booster injection)를 실시하고 각각의 촉진주사 후에는 소량의 혈청을 채취하여 항혈청의 생성을 조사한다. 이때

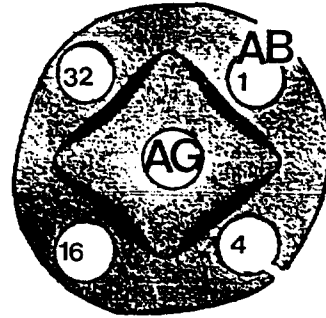


Figure 2. Double immunodiffusion pattern of the antiserum against immunogen

항혈청의 역가를 조사하는 방법으로는 indirect ELISA, double immunodiffusion test(Fig.2), western blotting 등이 사용된다. 일단 항체의 역가가 높게 나타나면 토끼로부터 최종채혈하여 항체를 분리시키는 데 이러한 면역화 과정에는 표준방법은 없으며 대부분 경험이나 경험자의 자문에 도움을 얻는 것이 바람직하다.

4. Immunoassay format

농약에 대한 특이항체가 생성되면 대량시료의 분석과 포장에서 신속한 정성분석을 위해 다양한 형태로 사용할 수 있다. 이 다양한 형태의 면역기법은 각각 속도, 비용, 민감도 등의 요인에 대한 장점을 지닌 방법이 되어야 할 것이다. 농약분석에 사용되는 모든 면역기법의 형태는 특이항체, protein conjugated hapten, 분석대상 농약의 3가지 구성요인을 가진다. 농약을 측정하기 위해 가장 널리 사용되는 면역기법은 피복항원(hapten-protein)에 구조적으로 유사한 특이항체가 결합하기 위해 대상농약(hapten)과 경쟁하는 표준형 competitive ELISA^(16,35)와 특이항체에 대해 효소표지 농약과 순수한 농약이 결합을 위해 경쟁하는 항원 competitive ELISA(또는 indirect competitive ELISA)⁽⁶⁾가 있다(Fig. 3). Endosulfan의 ELISA 분석시 항원 competitive ELISA를 이용하면 표준형 competitive ELISA를 이용한 분석보

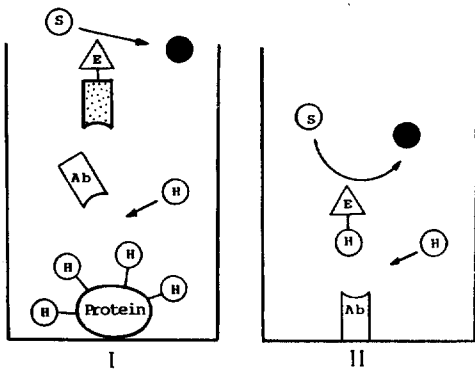


Figure 3. Standard competitive ELISA format and antigen competitive ELISA format.; I, A coating Ag is bound to the solid phase. Hapten, in sample or standard, competes for a fixed amount of antibody. This bound Ab is quantitated by binding an enzyme-conjugated second Ab. Substrate is added and color formation monitored.; II. Antibody is bound to the solid phase. The competitive immunoreaction between hapten and hapten-conjugated enzyme for the specific Ab occur simultaneously. The color conversion is indicative of the amount of enzyme-labeled hapten that is bound to specific antibody captured by the solid phase

다 상당한 장점을 지니는 것으로 비교된다. 민감도가 뛰어나고 분석단계가 절약되기 때문에 시간이 절약된다는 것이다. 이러한 결과는 살균제 fenpropimorph⁶⁾에 대해 두가지 ELISA 형태를 비교한 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

이러한 항원-항체의 상호작용은 질량작용의 법칙에 따르는 것으로 이밖에도 다양한 분석기법들이 사용되는데 그것은 방사성 동위원소(radioimmunoassay, RIA), 혼탁도, 편광성, 가시광선 또는 자외선 흡광도, 형광성(fluorescence immunoassay, FIA), 인광성, 화학발광, 생물발광, 전자계도 공명현상 등을 이용한 분석기법들이다. Table 2의 면역기법에 의해

분석되어진 농약들중 일부는 RIA 기법을 이용한 것인데 요즘은 방사성 동위원소 대신에 효소-표지 기법을 이용함으로써 RIA 기법의 사용이 감소되고 있는 실정이다. 하지만 방사성 동위원소의 사용은 높은 민감도와 선택성을 보장하기 때문에 무시할 수 없는 방법이기도 하다. ELISA의 형태를 선택함에 있어서는 여러가지 기법이 비교, 선택될 수 있고 몇몇 농약과 환경화합물들에 대해서는 상업적으로 kit가 제작되어 있기도 하다.

5. 시료조제

시료조제는 다른 방법을 위해 조제되어 있는 시료로부터 일정량을 취하여 가능한 한 간단한 조작 과정에 의하여 실시된다. 그러나 안정제나 염류를 첨가하는 고전적인 분석법을 위해 조제된 시료에서는 때로 항체의 반응을 간섭하거나 변성을 유발시킬수도 있다. ELISA를 위한 전형적인 시료조제 방법은 추출과정에서 완료되는 것이다. 추출은 다량의 시료를 소량의 용매를 사용하여 실시하고 매우 휘발성이나 수용성 용매를 이용하는 것이 바람직하며 최종적으로 수용액 조건에서 ELISA 반응을 진행시키도록 한다. Endosulfan의 경우에는 dimethylformamide(DMF)를 사용하고 metalaxyl이나 benomyl, parathion의 경우에는 MeOH을 이용하여 추출하는 것이 그 대표적인 예이다. 반면에 molinate³⁵⁾의 경우에는 약제 자체의 휘발성 때문에 비 휘발성 propylene glycol을 사용하기도 한다.

추출된 시료는 직접 ELISA에 사용되기도 하나 용매분배과정을 거쳐 정제한 후 ELISA 분석에 사용하는 것이 신뢰도를 높이는 방법이기도 하다. 용매분배과정은 간단하고 비용도 저렴한 과정이지만 ELISA 분석을 위해서는 solid phase extraction(SPE) 체계를 사용하는 것이 훌륭한 방법이라고 알려져 있다³³⁾. 항체는 때로 EtOH, DMSO, acetonitrile, THF, dioxane, MeOH 같은 용매의 고농도 상황에서도 내성을 나타낸다. 이러한 용매들은 분석대상 농약의 용해도를 증가시키고 시료중 간섭물질이나

지방교질 입자를 제거시켜 시료조작을 용이하게 할 것이다. 본 실험실의 경험에 의하면 일반적으로 킨 유성화합물에 대한 ELISA에서 적어도 10 % 정도의 수용성 유기용매를 지니게 되면 간섭물질에 훨씬 효과적임을 알 수 있었다.

6. 분석 유효도

분석기법의 유효도문제에 대한 일반적인 접근법은 Horwitz⁽⁴¹⁾에 의해 요약되었는데 이는 ELISA 기법에

Table 3. Cross-reactivity and I₅₀ values on the other pesticides with antiserum of parathion

Compounds	I ₅₀ (µg/ml)	CR (%)*
Parathion	1.8	100
Malathion	24	7.5
Pirimiphos-methyl	140	1.3
Azinphos-methyl	190	1.0
EPN	> 200	> 0.9
DDVP	> 200	> 0.9
Deltamethrin	> 200	> 0.9
Esfenvalerate	> 200	> 0.9
Chlorpyrifos	> 200	> 0.9
Carbaryl	> 200	> 0.9

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

많이 이용될 수 있다. 지나치게 쉬운 결정적인 문제는 ELISA 유효도의 실험시간 최적화 과정인데 이 과정은 분석체계의 각각의 단계를 주의깊게 평가하는 것이다. 우리의 경험으로는 자칫 소홀하기 쉬운 96-well microplate와 ELISA 판독기를 포함하여 항체의 최적 희석배수, 항원-항체 혼합비율, 항체의 교차반응성 등이 분석법의 유효도를 결정짓는 주요한 요인이 되는 것으로 나타났다.

상업용 microwell plate의 질은 매우 다양한데 이의 사용시에는 항시 plate끼리의 오차정도를 평가하고 부착성 역시 비교하여야 한다. 또한 항체의 최적감도를 위한 희석배수 역시 소홀해서는 안될 문제이다. Metalaxyl의 경우⁽⁴⁵⁾를 보면 1:2,000의 항체 희석배수는 1:16,000이나 32,000의 희석배수에 비해 기울기가 크기 때문에 약제농도간의 흡광도 차이가 크게 나타나 적은 오차로 분석을 실시할 수 있다. 일단 항체의 최적 민감도가 결정되면 항원(또는 시료)-항체 반응액의 부피감소와 측정의 신뢰도를 개선시킴으로서 민감도를 증진시킬 수 있다. 측정의 신뢰도를 개선시키기 위한 작업의 하나로 항체의 교차 반응성을 조사하는 것이 있다. Table 3의 예를 보면 parathion에 대해 생성된 항체는 유사한 구조의 유기인제나 같은 작물에 사용되는 다른 약제 9개에 대해 아주 낮은 반응성을 지니고 50 %의 흡광도 저해농도(I₅₀) 역시 비교가 되게 현저한 차이를 보였다. 이렇듯 parathion에 대해 생성된 항체는 높은 특이성을 지녀 최소한 이들 9개 약제의 존재시에도 7.5 %(malathion) 이상의 반응성은 보이지 않는다는

Table 4. Recoveries and percent coefficients of variation of parathion in 4 crops by modified indirect ELIA

Spiking Level (ppm)	Recoveries (%)*				Mean CV (%)	
	Brown rice	Onion	Apple	Garlic	Intraassay	Interassay
0.1	94.0	96.4	91.1	80.4		
CV %	8.8	4.5	1.8	12.8	6.97	10.36
0.5	101.1	107.6	100.2	96.1		
CV %	8.7	5.2	8.4	4.0	6.56	9.52

*Recoveries and mean CV % based on 8 determinations.

Table 5. Recovery of metalaxyl in method of ELISA and GLC

Sample	Spiking level	Means of Recovery(%)	
		ELISA	GLC
Potato	0.05	85.78	8.6
	1.0	80.8	87.2
Sesame	0.05	77.5	81.0
	1.0	91.2	83.5
Pepper	0.05	87.4	91.4
	1.0	97.6	93.6
Cabbage	0.05	88.7	90.8
	1.0	98.2	91.2
Cucumber	0.05	84.3	89.6
	1.0	103.6	90.1
Onion	0.05	80.8	83.2
	1.0	94.0	80.3

것을 알 수 있다.

분석법의 유효도 판정은 ELISA와 기존의 분석법을 비교하는 것도 포함하는데 이러한 비교가 수행될 때에는 다음의 몇가지 사항을 검토해야 할 것으로 생각된다. ELISA는 적은 시료조제시간을 필요로 하는데 분석자는 반드시 시간이 요구되는 변화나 화학적 변화, 휘발성, 생화학적 전환 같은 요인들을 포함하고 있는 기존의 방법에 의해서도 시료분석을 수행해 보아야 할 것이다. 또한 Table 4에 나타났듯이 intraassay와 interassay의 차이, 변이계수의 차이, 두가지 방법의 검출한계와 회수율, 표준검량 범위 등의 차이를 고려하여야 한다. 이것은 저렴한 비용과 대량시료 분석을 위해 ELISA의 신뢰도를 나타낼 수 있는 중요한 요인이 될 것이다. 예를 들면 metalaxyl의 분석 결과, ELISA와 GLC를 비교하면(Table 5) ELISA의 결과는 시료당 회색액을 4 반복 또는 8반복으로 실시한 것에 반해 GLC는 반복이 없다는 것이다. 이는 GLC 법은 반복을 위해서는 시료마다 동일한 추출과정 부터 GLC 분석을 해야하는 반면 ELISA는 1회 추출로 많은 반복시험을 동시에 수행할 수 있다는 것이다. 물론 두 방법의 비교시에 적절한 통계적 시험도 응용되어야 할 것이다.

7. 결 론

농약의 ELISA에 의한 분석법 개발을 위한 여러 과정과 유효도를 여기에 소개하였다. 이들중 많은 부분이 다른 연구자들에 의해 자세히 조사되었던 것이다. 농약의 ELISA 기법의 완성을 위해서는 단 클론 항체의 일반적 사용, 표준화된 kit의 제작, ELISA기법의 균일한 전수와 같은 의문점이 일어나는데 이러한 의문은 분석방법으로서의 ELISA 확립을 위한 진행과정에서 대답 될 것으로 생각한다. 현재까지의 ELISA개발 현황으로 보아 머지 않아 대부분의 농약이 ELISA에 의해 분석될 수 있으리라고 생각해 본다.

참고문헌

1. Yalow, R.S. & Berson, S.A., Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *J. Clin. Invest.*, 1960, 39, 1157-1175.
2. Newsome, W.H. & Shields, J.B., A radioimmunoassay for benomyl and methyl 2-benzimidazole carbamate on food crops, *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 220 -222.
3. Newsomw, W.H. & Collins, P.G., Enzyme-linked immunosorbent assay of benomyl and thiazobendazole in some foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1987, 70, 1025-1027.
4. Newsome, W.H., An enzyme linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods, *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33, 528-530.
5. Jung, F., Meyer, H.H.D. & Hamm, R.T., Development of a sensitive enzyme linked immunosorbent assay for the fungicide fenpropimorph, 1989, 37, 1183-1187.
6. Wie, S.I. & Hammock, B.D., Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays for benzoylphenylurea insecticides, *J. Agric.*

- Food Chem., 1984, 32, 1294-1301.
7. Ercegovich, C.D., Vallejo, R.P., Gettig, R.R., Woods, L., Bogus, E.R. & Mumma, R. O., Development of a radioimmunoassay for parathion, J. Agric. Food Chem., 1981, 29, 559-563.
 8. Langone, J. & Van Vunakis, H., Development of enzyme immunoassay for organochlorine insecticides aldrin and dieldrin, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 1975, 10, 163-171.
 9. Lee, K.B., Shim, J.H. & Suh, Y.T., Development and application of enzyme immunoassay for endosulfan residue analysis, Korean J. Environ. Agric., 1992, 11(1), 59-66.
 10. McAdam, D.P., Hill, A.S., Beasley, H.L. & Skeritt, J.H., Mono and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion. 1. Approaches to haptenprotein conjugation, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 1466-1470.
 11. McAdam, D.P., Hill, A.S., Beasley, H.L. & Skeritt, J.H., Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of organophosphate pesticides; fenitrothion, chlorpyrifos-methyl, and pirimiphos-methyl in wheat grain and flour milling fractions, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 519-528.
 12. Skeritt, J.H., Hill, A.S., McAdam, D.P. & Stanker, L.H., Analysis of the synthetic pyrethroids, permethrin and 1(R)-phenothrin in grain using a monoclonal antibody-based test, J. Agric. Food Chem., 1992, 40, 1287-1292.
 13. Stanker, L.H., Bigbee, C., Van Emon, J., Watkins, B. & Jensen, R.H., An immunoassay for pyrethroids; detection of permethrin in meat, J. Agric. Food Chem., 1989, 37, 834-839.
 14. Niewola, Z., Walsh, S.T. & Davis, G.E., Enzyme-linked immunosorbent assay for paraquat, Int. J. Immunopharmac., 1983, 5(3), 211-218.
 15. Niewola, Z., Benner, J.P. & Swaine, H., Determination of paraquat residues in soil by an enzyme-linked immunosorbent assay, Analyst, 1986, 111, 399-403.
 16. Van Emon, J., Hammock, B.D. & Seiber, J.N., ELISA for paraquat and its application to exposure analysis, Anal. Chem., 1986, 58, 1866-1873.
 17. Hall, J.C., Raymond, J.A. & Krieg, K.K., Immunoassays for the detection of 2, 4-D and picloram in river water and urine, J. Agric. Food Chem., 1989, 37, 981-984.
 18. Dunbar, B., Riggle, B. & Niswender, G., Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine herbicides, J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 433-437.
 19. Muldoon, M.T., Fries, G.F. & Nelson, J.O. Evaluation of ELISA for the multi-analyte Analysis of S-triazine in pesticide waste and rinsate, J. Agric. Food Chem., 1993, 41, 322-328.
 20. Kelley, M.M., Zahnow, E.W., Petersen, W.C. & Toy, S.T. Chlorsulfuron determination in soil extracts by enzyme immunoassay, J. Agric. Food Chem., 1985, 33, 962-965.
 21. Schlaeppli, J.M., Moser, H. & Ramsteiner, K., Determination of metolachlor by competitive enzyme immunoassay using a specific monoclonal antibody, J. Agric. Food Chem., 1991, 39, 1533-1536.
 22. Deschamps, R.J., Hall, J.C. & McDermott, M.R., Polyclonal and monoclonal enzyme immunoassays for picloram detection in water, soil, plants, and urine, J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 1881-1886.
 23. Li, Q.X., Hammock, B.D. & Seiber, J.N., Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the herbicide bentazon, J. Agric. Food Chem., 1991, 39, 1537-1544.
 24. Völokens, P. & Wild, A., A specific radioimmunoassay for the determination of low quantities

- of indole 3-acetic acid in spruce needles of healthy and damaged trees, *J. Plant Physiol.*, 1988, 133, 320-324.
25. Normann, S.M., Poling, S.M. & Maier, V.P., An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for (+)-abscisic acid in citrus, Ricinus, and Xanthium leaves, *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 225-231.
 26. Moritz, T., Philipson, J.J. & Oden, P.C., Detection and identification of gibberellins in sitka spruce of different ages and coning ability by bioassay, radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry, *Physiologia Plantarum*, 1989, 75, 325-332.
 27. Schmidt, D.J., Clarkson, C.E., Swanson, T.A., Egger, M.L., Carlson, R.E., Van Emon, J.M. & Karu, A.E., Monoclonal antibodies for immunoassay of avermectins, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1763-1770
 28. Wie, S.I., Hammock, B.D., Gill, S.S., Grate, E., Andrews, R.E., Faust, R.M., Bulla, L.A. & Schaefer, C.H., Detection and identification of *Bacillus thuringiensis* toxin by enzyme linked immunosorbent assay, *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, 57, 447-454.
 29. Hastings, K.L., Tulis, J.J. & Dean, J.H., Production and characterization of a monoclonal antibody to aflatoxin B, *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 404-408.
 30. Beaver, R.W., James, M.A. & Lin, T.Y., Comparison of an ELISA based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1991, 74(5), 827-829.
 31. Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassay, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp 9-77.
 32. Schwalbe, M., Dorn, E. & Beyermann, K., Enzyme immunoassay and Fluoroimmunoassay for the herbicide diclofop-methyl, *J. Agric. Food Chem.*, 1984, 32, 734-741.
 33. Jung, F., Gee, S.J., Harrison, R.O., Li, Q.X. & Hammock, B.D., Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides, *Pestic. Sci.*, 1989, 26, 303-317.
 34. Anderson, G.W., Zimmermann, J.E. & Callahan, F.M., The use of esters of N-hydroxy succinimide in peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 1839-1842.
 35. Gee, S.J., Miyamoto, T., Goodrow, M.H., Buster, D. & Hammock, B.D., Evaluation of an ELISA for the direct analysis of molinate in rice field water, *Food and Agricultural Immunology*, 1989, 1, 37-51.
 36. Franek, M., Hruska, K., Sisak, M. & Diblíková, I., Development of a microcolumn radioimmunoassay for screening of polychlorinated biphenyls in milk, and in animal fats, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1559-1565.
 37. Wing, K.D., Hammock, B.D. & Wustner, D.A., Development of an S-bioallethrin specific antibody, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, 1328-1333.
 38. Köher, G. & Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature(London)*, 1975, 256, 495-497.
 39. Williams, C.A. & Chase, M.W., *Methods in immunology and immunochemistry*, Academic press, New York, 1967, pp. 209-236.
 40. Vaitukaitis, J.L., In *methods in enzymology: Immunochemical techniques*, Part B, ed. J.J. Langone & H. Van Vunakis, Academic press, New York, 1981, pp. 46-52.
 41. Horwitz, W., Report of the committee on collaborative interlaboratory studies, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984, 67, 432-440.

42. Lukens, H.R., Williams, C.V., Levison, S.A., Dandliker, W.B. & Murayama, D., Development of fluoroimmuno assay for benomyl and MBC, *Environ. Sci. Technol.*, 1977, 11, 292-297.
43. Newsome, W.H., Detection of triadimefon by enzyme linked immunosorbent assay in water and soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1986, 36, 9-14.
44. Newsome, W.H., Determination of iprodione in foods by ELISA, In "pesticide science and biotechnology" ed, R. Greenhalgh & T.R. Roberts, Blackwell scientific publications, Oxford, 1987, pp. 309-316.
45. Lee, K.B., Lim, K.J., Chung, Y.H. & Suh, Y.T., Development of ELISA for parathion, *Korean J. Environ. Agric.*, 1993, (unpublished).
46. Hunter, K.W. & Lenz, D.E., Detection and quantification of the organophosphate insecticide paraoxon by competitive inhibition enzyme immunoassay, *Life Sci.*, 1982, 30, 355-361.
47. Lee, K.B., Shim, J.H. & Suh, Y.T., Development of radioimmunoassay for endosulfan in fish tissues, *Korean J. Environ. Agric.*, 1993, (unpublished).
48. Koppatschek, F.K., Liebl, R.A., Kriz, A.L. & Melhodo, L., Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of the herbicide clomazone, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1519-1522.
49. Riggle, B. & Dunbar, B., Development of enzyme immunoassay for the detection of the herbicide norflurazon, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1922-1925.
50. Harrison, R.O., Brinfield, A.A. & Nelson, J.O., Development of a monoclonal antibody based enzyme immunoassay method for analysis of maleic hydrazide, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 958-964.
51. Arnold, D. & Somogy, A., Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk, and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68, 984-990.
52. Dixon-Holland, D. & Katz, S.E., Competitive direct enzyme linked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1991, 74, 784-789.
53. Wie, S.I. & Hammock, B.D., Development of enzyme linked immunosorbent assay for residue analysis of diflufenzuron and BAY SIR 8514, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, 949-957.