

## 면역크로마토그래피를 이용한 토양 및 쌀의 Cd 간이진단법 평가

이상필 · 김록영 · Kaoru Abe<sup>1</sup> · 김성철<sup>2</sup> · 김원일<sup>3</sup> · 양재의\*

강원대학교 바이오자원환경학과, <sup>1</sup>일본 농업환경과학연구소 <sup>2</sup>충남대학교 생물환경화학과,

<sup>3</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 유해화학과

### Evaluation of a Rapid Immunochromatography Technique for Determination of Cd in Soils and Rice Grains

Sang-Phil Lee, Rog-Young Kim, Kaoru Abe<sup>1</sup>, Sung-Chul Kim<sup>2</sup>, Won-Il Kim<sup>3</sup>, and Jae E. Yang\*

Department of Biological Environment, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

<sup>1</sup>National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3 Kannondai, 305-8604 Tsukuba, Japan

<sup>2</sup>Department of Bio Environmental Chemistry, Chungnam Natinal University, Daejeon, 305-764, Republic of Korea

<sup>3</sup>Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-857, Republic of Korea

Cadmium is known to be very toxic to human health and can be relative easily translocated from soils in plants. Therefore, a rapid method for screening Cd in soils and crops has become more and more important. For this reason, we examined a rapid immunochromatography (ICG) test kit which uses antigen-antibody reaction based on immunoassay and chromatography. Soils and rice grains collected from mine waste-contaminated sites were determined for their Cd contents using this kit. For comparison purposes, 0.1 M HCl and ICP-OES were employed as a conventional extraction and determination method. Cadmium contents in rice grains determined using ICG technique were 0.46~2.39 mg kg<sup>-1</sup> and Cd contents determined using 0.1 M HCl and ICP-OES were 0.52~1.97 mg kg<sup>-1</sup>. The correlation between these two Cd contents were statistically significant ( $r^2 = 0.930$ ). The results of Cd contents in soils also showed a statistically significant relationship between these two methods ( $r^2 = 0.975$ ). On the basis of these results, ICG technique can be applied to rapidly quantify Cd in crops and soils. However, further research is necessary to apply ICG technique for the field screening.

**Key words:** Antigen-antibody, Cadmium, Immunochromatography, Rapid test, Rice

## 서 언

토양 유해물질 중에서 중금속은 토양, 수계, 작물 등 자연계의 먹이사슬을 통해 인간 및 생물체 내에 꾸준히 축적되어 만성적인 독성피해를 준다. 특히 휴·폐광산 주변 농경지 및 작물의 경우 산성광산배수(AMD), 광미, 침출수에 의한 중금속 오염은 심각한 실정이다. 농작물의 안전성은 우리의 건강과 밀접한 관련을 가지고 있어 토양과 작물에 대한 오염도 평가는 매우 중요하다 (Lee et al., 2010). 특히 Cd의 경우 농작물로의 이행이 쉬우며, Cd에 오염된 쌀을 섭취할 경우 칼슘과 인대사 장애, 고혈압 등 비교적 강한 독성을 나타낼 수 있다 (Kim et al., 2008). 국내에서는 오염토양 복원기술로 폐광산에 서식하는 식물종을 이용하는 식물정화기술 (Ok et al., 2003)과, 안정화제를 처리하여 중금속의 식물유효도 및 작물의 중금속 흡수를 저감시키는 안정화

공법 (Kim et al., 2010; Oh et al., 2011)이 오염 농경지 토양 복원에 사용되어 왔다.

Yoo et al. (1996)에 의하면 토양 중 Cd 함량이 >5 mg kg<sup>-1</sup> (0.1 M HCl)이면, 쌀 Cd 함량이 국제 Codex 쌀 함량 기준인 0.2 mg kg<sup>-1</sup>을 초과하여 0.4 mg kg<sup>-1</sup> 이상으로 높아질 수 있다고 보고했다. 토양 및 식품의 Cd 오염 조사는 시료 샘플링, 실험실 시료 조제, 산분해 (황수, 0.1 M HCl) 및 검출 (AAS, ICP-OES, ICP-MS)의 비교적 시간적 소모가 많다. 이러한 전통적인 분석절차는 정밀한 정량분석이 가능하다는 장점이 있으나, 폐산 발생과 같은 2차 오염의 우려와 고비용, 노동집약적이라는 단점과 중금속 오염에 빠르고 광범위하게 대처하기 힘들다는 한계가 있다. 더욱이 쌀과 같은 농산물의 경우 토양과 수질보다 matrix가 매우 복잡하여 중금속 농도를 측정하는 것은 더더욱 어려운 실정이다.

최근 이러한 문제점을 해결하고자 간편하고 신속한 현장 분석법들이 선진국을 중심으로 개발되고 있다. 국내의 경우 Lee et al. (1981)은 diphenylcarbazine (DPC)-gel을 이용한

micro-column 시험을 거쳐 수용액 중의 Cr(VI)이온을 ppm 수준으로 정량할 수 있는 간이 분석법을 연구하였으며, 휴대용 미량중금속 분석기로서 potentiometric stripping analyzer 가 시판되고 있다. 또한 휴대용 XRF 등도 수입되어 폐광산 주변 토양오염도 평가에 활용되고 있다 (Jang et al., 2008). 그러나 이러한 기기들은 고가이고 전문적 지식을 요구하기 때문에 실제 현장에서 오염도 평가에 적극적으로 활용되지는 못한 실정이다.

선진국에서는 1990년대 후반부터 면역크로마토그래피 (immunochromatography)을 이용한 중금속 분석법이 활발하게 연구되어 왔는데, 항원·항체 반응을 이용하여 혼합물에 함유되어 있는 물질을 정량하는 기법으로써 immuno-assay와 크로마토그래피법을 결합한 것이다. Blake et al. (1998)은 금속이온-킬레이트 형태를 인식할 수 있는 항체를 개발하여 수질 중 Cd를 ppb 수준으로 정량할 수 있는 방법을 개발하였으며, 최근 일본에서는 더 발전하여 면역크로마토그래피법을 이용하여 간편하게 쌀의 Cd를 신속하게 분석할 수 있는 휴대용 간이분석 kit를 개발하였다. 이것은 임신진단 kit와 유사하며 비색기 등의 장치를 이용하여 항원, 항체가 반응할 때 나타나는 색의 강도로 중금속 오염농도를 정량적으로 평가한다 (Sasaki et al., 2009). 하지만 국내의 경우 아직까지 토양 중금속의 현장 신속진단 분석법이 개발되어 있지 않고, 더욱이 면역분석법을 이용하여 토양, 수질, 농산물 등에 존재하는 중금속을 분석하는 연구개발 사례가 미비하다. 따라서 본 연구에서는 현재 개발된 일본의 중금속 면역분석 kit를 도입하여 국내 오염토양 및 중금속 쌀에 대하여 Cd 농도를 측정해보고 정확성과 현장 적용가능성을 탐색해보고자 하였다.

## 재료 및 방법

**토양 및 쌀 시료 채취** 비봉광산 주변 중금속오염 농경지에서 토양오염공정시험법 시료채취방법 (MOE, 2007)에 따라 표토 (0~30 cm) 층 10점을 채취하였다. 채취한 토양은 풍건한 후, 2 mm 체로 체거름 하여 분석시료로 조제하였다. 쌀 시료는 토양시료 채취지점에서 재배한 벼 시료를 추수하여 물로 잘 씻은 후 오븐에 건조 (60°C)한 다음 도정기에 백미로 도정하였으며 분쇄기로 갈아 분말상태로 제조하였다.

**Cd 면역크로마토그래피 분석법** 카드뮴 면역분석 kit는 일본 농업환경기술연구소 Abe 교수팀의 지원을 받았다. 카드뮴 면역분석 kit는 column, antibody, Cd 표준용액, immunochromatography 로 구성되어 있다 (Fig. 1). Kit를 이용한 시료 분석방법은 (1) 추출/정제 단계와 (2) 면역분석 단계의 2단계로 수행되었다 (Fig. 2). 먼저 쌀 분말 2 g을

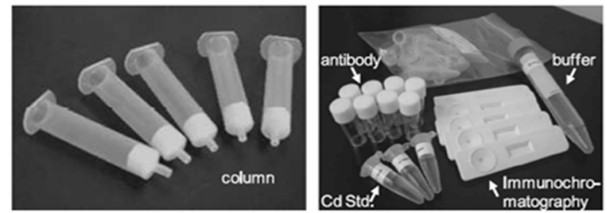


Fig. 1. Rapid test kit for Cd measurement using immunochromatography (from Sasaki et al., 2008).

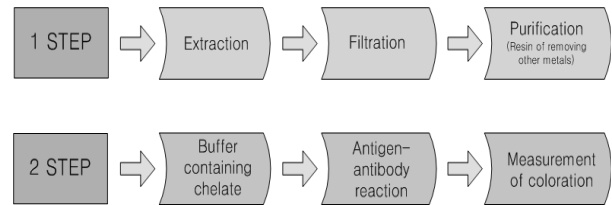


Fig. 2. General process to measure Cd in soil and rice samples using immunochromatography (from Abe et al., 2008).

0.1 M HCl 20 mL로 1 h 추출한 후 여과하였다. 여과액 1 mL를 이온교환수지가 들어있는 컬럼에 통과시킨 후, Cd를 제외한 다른 이온을 완벽하게 제거하기 위하여, 0.1 M HCl 2 mL로 컬럼을 세척하였다. 컬럼에 흡착되어있던 Cd는 증류수 1 mL를 첨가하여 용출하고, EDTA와 복합체를 형성시킨 후, anti-Cd-EDTA 항체와 반응시켜 면역크로마토그래피 검정법으로 Cd 농도를 산출하였다. 토양시료도 동일한 방법으로 토양 Cd를 0.1 M HCl (토양: 추출액 = 1: 10)로 추출 후, 여과, 정제, EDTA-복합체 형성, 항원-항체반응을 거친 후 면역크로마토그래피 검정법으로 Cd 농도를 산출하였다 (Abe et al., 2011). Cd 값에 대한 면역분석 kit의 신뢰성을 평가하기 위하여 각각의 추출액은 ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, Thermo, iCAP6300, USA)로 측정하여 Cd 농도를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

**쌀 중 Cd 함량** 면역크로마토그래피를 이용한 쌀의 Cd 함량은 0.46~2.39 mg kg<sup>-1</sup> 이었고, ICP-OES로 검출한 쌀 중 Cd 함량은 0.52~1.97 mg kg<sup>-1</sup> 였다 (Fig. 3a). 이는 국내 농산물 Cd 잔류허용기준 농도인 0.2 mg kg<sup>-1</sup> 를 초과하는 것으로 모든 농작물이 Cd에 오염되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 3a에서 볼 수 있듯이, 면역크로마토그래피 Cd 함량과 ICP-OES Cd 함량 사이에는 고도의 유의적 상관관계가 성립되었다 (r<sup>2</sup> = 0.930).

**토양 중 Cd 함량** 면역크로마토그래피를 이용한 토양 중 Cd 함량은 0.36~10.6 mg kg<sup>-1</sup> 이었고, ICP-OES로 검출

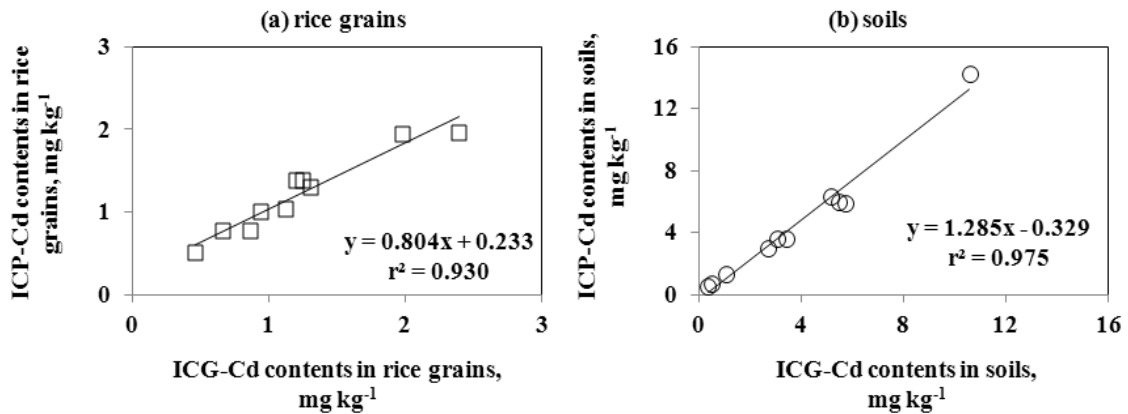


Fig. 3. Correlation between Cd contents measured using immunochromatography (ICG) and ICP-OES: (a) for rice grains and (b) for soils.

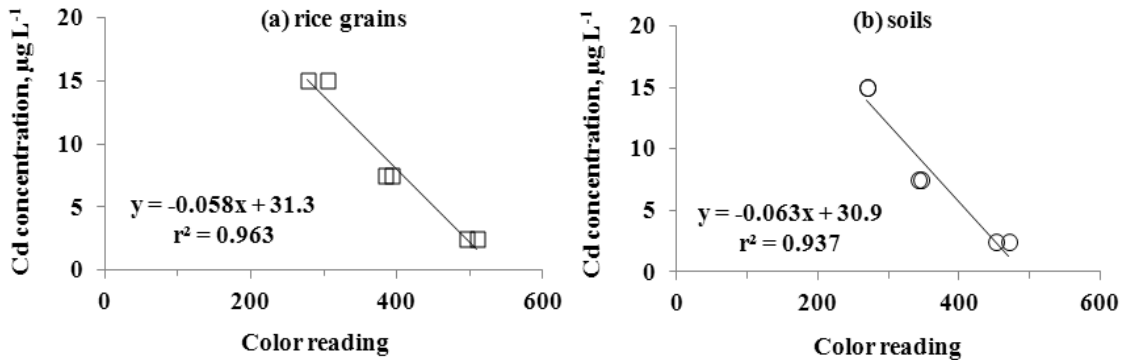


Fig. 4. Calibration curve for Cd measured using immunochromatography test kit : (a) for rice grains and (b) for soils.

한 토양 중 Cd 함량은 거의 유사한 수준인 0.57~14.3 mg kg<sup>-1</sup> 였다 (Fig. 3b). 두 Cd 함량사이에는 역시 고도의 유의한 상관관계를 확인할 수 있었다 (r<sup>2</sup>=0.975).

**면역크로마토그래피법 Cd 검출 장단점** 비교적 낮은 농도인 2.5~10 µg Cd L<sup>-1</sup> 에서도 토양과 쌀 중의 Cd을 면역크로마토그래피를 이용하여 비교적 빠르고 정확하게 검출할 수 있었다 (검정곡선 참조; Fig. 4). 쌀 및 토양에 존재하는 Cd의 간이신속 분석방법으로 충분히 가능성이 있는 것으로 판단되나, 다른 이온과의 간섭을 막기 위한 정제과정이 어렵고, pH, 킬레이트, 항체량, 이온강도 등 여러 인자들이 결과값에 영향을 주기 때문에 이에 대한 해결방안이 필요하다 (Blake et al., 1998). 또한 추출제 종류, 중금속 오염형태 및 다양한 작물에서의 검증자료가 부족하기 때문에 추후 현장 실험을 통한 검증단계가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번

호: PJ0074482011) 및 강원대학교 농업생명과학연구원 지원으로 이루어진 것이며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

Abe, K., Y. Sakurai, A. Okuyama, K. Sasaki, and K. Tawarada. 2008. Simplified method for determining cadmium concentrations in rice foliage and soil by using a biosensor kit with immunochromatography. *J. Sci. Food. Agric.* 89:1097-1100.

Abe, K., K. Nakamura, T. Arai, Y. Sakurai, A. Nakano, C. Suginuma, K. Tawarada, and K. Sasaki. 2011. Immunochromatography for the rapid determination of cadmium concentrations in wheat grain and eggplant. *J. Sci. Food. Agric.* 91(8): 1392-1397.

Blake, D.A., R.C. Blake II, M. Khosraviani, and A.R. Pavlov. 1998. Immunoassay for metal ions. *Analytica Chimica Acta.* 376:13-19.

Jang, M., S.J. Choi, and Y.C. Im. 2008. Assessment of applicability of portable X-ray fluorescence for the rapid analysis of soil contamination in the vicinity of abandoned metallic mines. *J. Mine Reclam. Technol.* 2:102-111.

- Kim, W.I., B.J. Park, S.W. Park, J.K. Kim, O.K. Kwon, G.B. Jung, J.K. Lee, and J.G. Kim. 2008. Relationship between fraction of Cd in paddy soils near closed mine and Cd in polished rice cultivated on the same fields. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 41:184-189.
- Kim, K.R., J.S. Park, M.S. Kim, N.I. Koo, S.H. Lee, J.S. Lee, S.C. Kim, J.E. Yang, and J.G. Kim. 2010. Changes in heavy metal phytoavailability by application of immobilizing agents and soil cover in the upland soiln nearby abandoned mining area and subsequent metal uptake by red pepper. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 43:864-871.
- Lee, Y.H., S.T. Lee, J.Y. Heo, M.G. Kim, K.P. Hong, E.S. Kim, W.D. Song, C.W. Rho, J.H. Lee, W.T. Jeon, B.G. Ko, K.A. Roh, and S.K. Ha. 2010. Monitoring of heavy metal contents from paddy soil in Gyeongnam province. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 43:289-295.
- Lee, Y.K., K.J. Whang, and I.H. Woo. 1981. Simple semiquantitative determination and selective preconcentration of trace heavy metals in environmental pollutants: determination of chromium(VI) with DPC gel. *Korean Chemical Society.* 25:275-282.
- MOE (Ministry of Environment). 2007. Korean Standard for the examination of soil pollution. Korean Ministry of Environment, P225, Gwacheon, Korea.
- Oh, S.J., S.C. Kim, H.S. Yoon, H.N. Kim, T.H. Kim, K.H. Yeon, J.S. Lee, S.J. Hong, and J.E. Oh. 2011. Evaluating heavy metal stabilization efficiency of chemical amendment in agricultural field: field experiment. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 44: 1052-1062.
- Ok, Y.S, S.H. Kim, D.Y. Kim, H.N. Lee, S.K. Lim, and J.G. Kim. 2003. Feasibility of phytoremediation for metal-contaminated abandoned mining area. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* 36:323-332.
- Sasaki, K., N. Ohmura, and K. Tawarada. 2009. Cadmium rapid test kit using cadimium purification column and cadmium immunochromatography. *Soil Science and Plant Analysis.* 40:345-351.
- Yoo, S.H., K.J. Ro, S.M. Lee, M.E. Park, and K.H. Kim. 1996. Distribution of cadmium, copper, lead and zinc in paddy soils around on old zinc mine. *Korean. J. Soc. Soil. Sci. Fert.* 29:424-431.