

ELISA를 이용한 농약속성 검사에 관한 조사연구(IV)

영등포지소

최채만 · 이찬수 · 김명희

A Study on the Rapid Bioassay of Pesticide Residues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(IV)

Youngdeungpo-branch

Chae-man Choi, Chan-soo Lee, and Myung-hee Kim

Abstract

We carried out rapid bioassay of pesticide residues on agricultural products collected in the southwest region of seoul, and investigated the realities of pesticide residues and the plan in order to improve of rapid bioassay the accuracy.

The results were as followed :

1. The positive items of pesticide residues were nine, items of unsuitability on the criterion were six of them. This results appeared many decrease compared to those of 2001.
2. The rapid bioassay must use the exact amount of enzyme, because the inhibition rate is affected largely by the amount of enzyme.
3. These items as garlic, stalk of garlic, red pepper, leek, pine mushroom and bean sprouts appeared as if they were contained inhibition component in themselves.
4. As the extractive absorbed dependent on the chlorophyll to some extent, absorption values of these should be subtracted from the final result value.
5. This method will be rapid and accurate measurement method for pesticide residues if the positive items detected with ELISA Leader should be measured spectrophotometer repeatedly in order to raise of the accuracy.

Key words : rapid bioassay, pesticide residues, ELISA, agricultural products

서 론

20세기에서 지금 21세기에 들어서기까지 과학 문명의 눈부신 발전은 인류에게 많은 혜택을 누리게 하는 이면에 환경오염, 지구의 온난화, 식량과 물 부족 등으로 결국 인류에게 많은 위험을 초래하고 있다. 특히 환경오염 문제는 산모의 모유에서 유기염소계 농약이 검출되고 남성의 정자수가 점점 줄어들어 든다는 사실부터 알 수 있듯이 매우 심각한 실정에 이르렀다¹⁾.

농업생산성의 양적 증대와 안정적 생산 및 공급은 생산자인 농민이나 소비자에게 다같이 매우 중요한 문제이다. 특히 최근 인구의 급격한 증가에 따라 식량이 국가 안보에 직결되고 있는 현실에서 식량자원의 안정적 확보 문제와 경제성장으로 인한 소비자의 소비 개념이 질적으로 우수한 농산물을 요구하고 있어서 농약의 중요성은 더욱 높아지고 있다²⁾.

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 잔류농약에 대해 식품의약품안전청에서 잔류허용기준을 추가로 설정하고 있으나, 지속적으로 감소 추세를 보이고 있는 농경지, 농촌인구와 환경농업의 대두, 잔류농약 감시활동 강화 등 계속되는 잔류농약 검출에 대한 보도는 국민들의 관심을 고조시키고 있다³⁾.

한편 농약은 우리들의 생활환경을 오염시키고 생태계에 영향을 미칠 뿐만 아니라 식품에 오염, 잔류된다는 점에서 식품위생, 즉 국민 보건상 커다란 문제가 되기도 한다. 농약의 이러한 양면성 때문에 근래에 들어서는 그 개발 과정에서부터 병해충이나 잡초에 대한 효능뿐 아니라 인간에 대한 위해성 및 안전성 문제까지도 강조되고 있다⁴⁾.

이러한 차원에서 우리나라 및 선진 외국에서는 식품 중 잔류농약의 허용기준을 설정하여 식품 중 농약의 잔류량을 규제하고 있는데, 우리나라의 경우 현재 240종 농약에 대하여 104종 농산물의 잔류허용기준치가 설정되어 있다. 특히 잔류농약 검사는 식품중에 미량 함유 되어있는 성분 검사로 전처리가 복잡하여 검사에 많은 시간이 소요되기 때문에 그 동안 잔류농약검사의 신속성에 대해 많은 문제가 제기 되어 왔다⁵⁾.

따라서, 여러 가지 유해 물질 중에서 농약은 농산물에 사용이 허가된 화학물질로써 농산물의 출하시기까지는 독성실험을 거쳐 설정된 허용기준량 이내로 잔류해야 하며 사용목적에 따라 살충제, 살균제, 제초제, 생장조절제, 살서제, 살비제 등으로 분류된다. 살충제는 전체 농약 중 27%이며, 살충제 중 곤충의 신경전달계에 작용하는 유기인계(organophosphorus)와 카바메이트(cabamate) 농약이 55%를 차지한다. 그러나 이 두 계열의 농약의 농산물에서의 잔류허용기준 초과비율은 40%로서(국립농산물품질관리원, 1999) 타계열 농약에 비하여 검출빈도가 높아 주요 분석대상 물질로 간주되고 있다.

그동안 화학적인 정량 및 정성분석방법으로 고성능 액체 크로마토그래프(high performance liquid chromatograph, HPLC)나 가스 크로마토그래프(gas chromatograph, GC)등의 정밀분석이 이루어지고 있다. 그러나 분석 결과를 얻기까지 시간이 많이 소요되고 훈련된 많은 인력이 요구될 뿐만 아니라 운용 비용이 등이 고가이면서 분석 폐기물이 다량 발생하므로 점차 환경친화성, 경제성 등을 고려하여 간편하고 신속한 분석법이 요구되고 있다⁶⁾.

이에 대하여 잔류농약 검사를 신속하게 실시하여 농약에 오염된 농산물을 소비 전 단계에서 신속하게 차단하기 위해 비교적 광범위하게 실용화된 간이속성검사법으로 효소면역학적 분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) (Rittenberg, 1990)은 농약 성분중 유기인계와 카바메이트계 살충제 중 일부를 검사하는 방법이다.

이에 본 연구는 2002년도의 서남권의 대형유통매장과 영일시장 및 조광시장을 대상으로 잔류농약 검사를 시행한 결과에 대한 자료분석과 ELISA Reader를 이용한 잔류농약 속성검사의 정확성을 향상시키고, 간이속성검사법의 단점을 보완하기 위한 정밀검사를 실시함으로써 농산물에 대한 농약잔류 실태를 정확히 파악하고 소비자에게도 농산물 선택에 대한 정보를 제공하여 시민의 건강에 이바지하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

서울시 서남권에 위치한 대형유통매장 및 재래 시장인 영일시장, 조광시장에서 과일과 채소 12,735건을 수거하여 실험재료로 하였다.

2. 기기 및 시약

ELISA Reader(Labsystems iEMS Reader, Finland)
Spectrophotometer(Kontron, Italy)
Vortex(Thermolyne, USA)
농약속성검사 kit(TARI, Taiwan)
농약 Standard(Ridel-de Haen, Germany)
Bromine(Aldrich, USA)
Methyl alcohol 300(WAKO, Japan)

3. 대상농약

사용되는 농약 중 유기염소계를 제외한 유기인계, 카바메이트계 살충제가 대상이 되며, 이들 중에서도 AChE와 반응하여 발색되는 30종을 대상으로 하였다.

1) Organophosphorus pesticide(21종)

Azinphos-methyl, Carbophenothion, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diazinon, Dichlorvos, Dimethoate, EPN, Ethion, Ethoprophos, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Methidathion, Omethoate, Parathion, Phenthat, Phosalone, Phosmet, irimicarb, Pirimiphose-thyl

2) Carbamate pesticide(9종)

Aldicarb, Bendiocarb, Carbaryl, Carbofuran, Isoprocarb, Methiocarb, Methomy, Oxamyl, Propoxur

4. 실험방법

채소류에 대한 농약속성검사는 Rapid Bioassay of Pesticide Residues(RBPR)법에 준하

여 실험하였으며 신속한 검사를 위해 Spectrophotometer로 측정하는 대신 46건까지를 동시에 시행할 수 있는 ELISA Reader를 이용하여 측정하였다. RBPR법에서는 100 μ l를 주입하게 되어 있는 kit시약(효소, 기질, 반응정지, 발색시약)을 20 μ l로 줄여서 실험하였으며 반응양성 시 경동농수산물검사소에 의뢰하여 유기인계 농약은 GC/MSD를 이용하고 카바메이트계 농약은 HPLC를 이용하여 정밀검사를 실시하였다.

1) 검체를 잘게 잘라 0.5g정도를 시험관에 넣어 메탄올 1ml과 브롬수 20 μ l를 넣고 vortex로 혼합하여 잔류농약을 추출하였으며 추출액에 농약속성 검사 kit시약을 첨가하여 발색시킨 후 ELISA Reader로 그 흡광치를 측정하여 저해율을 계산하였다. 실험과정을 간략하면 Fig. 1과 같다.



Fig. 1. The schedule of the experiment.

2) 효소와 기질의 양을 20 μ l와 100 μ l로 처리하였을 때 효소활성실험(Ellman assay)을 실시하였다.

3) 검체에 따라 용출되는 염록체에 의한 흡광치를 측정하여 저해율 관여도를 조사하였다.

4) ELISA Reader로 측정시 양성 판정의 정확성을 높이기 위해 Spectrophotometer와의 병행 측정을 시도하여 그 결과를 알아보았다.

결과 및 고찰

농산물의 잔류농약 검사는 주로 GC, HPLC 등을 이용한 정밀 검사법이 주로 사용되고 있는데, 전처리가 까다롭고 검사에 시간이 많이 소요되는 단점을 보완하기 위해 대만의 TARI(Taiwan Agricultural Research Institute)에서는 이와 같은 문제점을 보완하기 위해 약 46 건의 야채류 시료에 대한 잔류농약 함유 여부를 3시간 내에 검사할 수 있는 "Rapid Bioassay of Pesticide Residues (RBPR)"를 개발하였다.

RBPR은 유기인계 및 카바메이트계 살충제가 해충의 신경조직에서 acetylcholinesterase (AChE)의 작용을 저해함으로써 해충을 마비, 사망토록 하는 기전을 이용한 것으로, AChE와 야채류 추출액을 반응시킨 후 AChE의 저해정도를 측정함으로써 농약의 잔류 여부를 추정하는 방법이다. 이에 2002년도 검사실적을 토대로 간이속성검사와 정밀검사와의 관련도를 조사해보고 효율적인 방법을 찾기로 하였다.

1. 정밀 검사와의 관련성

서울시 서남권 대형유통매장과 재래시장인 영일

시장, 조광시장 등에서 유통되는 2002년 1월부터 12월까지 농산물 12,735건을 수거하여 간이속성검사를 실시한 결과를 보면 양성품목이 9건으로 전체의 0.07%를 나타냈으며 이를 정밀 검사하여 6건이 기준에 부적합한 것으로 나타났다. 양성품목과 잔류농약 검출량의 관계를 Table 1에 나타냈다.

여기서 보면 양성품목 9건중 부적합 판정을 받은 농산물은 6건으로 열무, 취나물, 깻잎, 머위, 치커리 모두 채소류이었으며 이중 검출된 농약은 클로르피리포스, 클로르헥나피르, 프로시미돈 3종이 검출되었다. 주로 유기인계농약인 클로르피리포스가 3건이나 검출되었다. 또한, 저해율은 높았지만 정밀검사 결과 잔류농약이 검출되지 않은 점은 농약 이외의 성분이 반응에 관여하여 저해율을 높이고 있는 것으로 추정된다. 특히 농산물 중에는 알려지지 않은 성분들이 많이 들어 있어 이들 중 어느 성분이든지 효소와 먼저 결합할 수 있는 구조로 되어 있다면 기질과의 반응을 방해할 것이다. 이런 방해 반응에 의해 저해율이 높게 측정됨으로써 농약의 잔류로 오인할 수 있어 신중한 판정이 요구된다.

2. 효소활성 실험

농약속성검사로 잔류농약을 측정할 때 저해율에 가장 민감한 시약은 효소이며 이 효소의 양이 많고 적음에 따라 발색의 차이가 크게 발생하여 그 결과치는 상당히 변화한다. 효소 활성실험(Ellman

Table 1. The situation on the detection of pesticide residues for positive items.

Item	Inhibition rate(%)	Criterion of hygiene	Detection amount
Weish onion	86.2	passed	-
Young radish	83.5	failed to pass	chlorpyrifos : 2.6mg/kg
Aster scaber	92.0	failed to pass	chlorpyrifos : 1.5mg/kg
Dropwort	91.6	passed	-
Aster scaber	96.7	passed	-
sesame leak	95.6	failed to pass	procymidone : 23.0mg/kg
Aster scaber	95.0	failed to pass	chlorpyrifos : 0.61mg/kg
Butter bur	93.2	failed to pass	chlorfenapyr: 1.7mg/kg
Chicory	92.8	failed to pass	procymidone : 6.5mg/kg

assay)에 의하면 인산완충액 320 μ l를 기준으로 20 μ l 효소 및 기질량을 처리하였을 때 5분 이후에는 서서히 효소반응이 둔화되지만 효소와 기질의 양이 100 μ l일 때에는 10분간 반응시켰을 때 효소 반응속도가 둔화되지 않으므로 처리구간 효소반응 시간에 의한 개인간이나 실험실간의 처리오차가 커질 것으로 예상된다(Fig. 2).

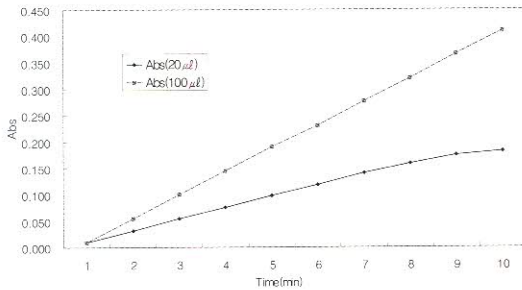


Fig. 2. The change of enzyme activity according to the concentrations of enzyme and substrate.

따라서 실험의 결과, 20 μ l로 효소 및 기질을 처리하여 실험하였을 때 실험시간 및 소요비용이 절감될 것으로 예상되었다. 또한 효소 반응시간을 10분으로 규정하는 것보다는 실험 시작 전에 먼저 효소의 활성을 측정하여 일정 흡광도 수준에 이르는 시간을 적용하여 실험하는 것이 실험오차를 줄이고 각 농약 성분들의 저해율을 판정하기에 타당할 것이다.

3. 간이 속성 검사법의 개선방안

이 방법은 농약 개개에 대한 정량 정성 평가를 위한 시험법은 아니므로 개개 잔류농약에 대한 정성 및 정량이 필요한 경우에는 부가의 정밀시험이 수행되어야 한다. 그러나, 야채류등에 대한 농약잔류여부를 신속하게 screening 할 수 있는 것으로 의의를 찾는다.

그러나, 정확도 문제의 해결이 과제로 대두되고 있다. 특히 농산물 중에는 알려지지 않은 성분들이 많이 들어 있어 이들 중 어느 성분이든지 효소와 먼저 결합할 수 있는 구조로 되어 있다면 기질

과의 반응을 방해할 것이다. 이런 방해반응에 의해 저해율이 높게 측정됨으로서 농약의 잔류로 오인할 수 있어 신중한 판정이 요구된다.

지난 4년 동안 꾸준히 잔류농약 속성검사를 해 온 결과를 토대로 볼 때 이런 반응을 빈번히 나타내는 품목들이 있었다. 이들은 마늘, 홍고추, 마늘쭉, 부추, 양송이, 콩나물 등이었으며 그 중 마늘의 경우는 그 정도가 상당히 높은 것으로 나타났는데 이는 발색제와 황화합물과의 반응에 의해 발색되는 것으로서 잔류농약과는 무관한 것으로 보고되었으며 그 외에도 아미노산 중의 cystein함량이 높은 상관성을 보이는 것으로 발표되었다⁷⁾. 부추의 경우는 항 미생물 활성물질들을 함유하고 있어⁸⁾ 이들 물질 중에 일부가 저해반응을 일으키므로서 저해율 숫치가 높게 나오는 것으로 추정된다. 물론 이들 품목들이 반드시 매번 반응을 저해하지는 않았지만 많은 경우에 이런 반응이 나타나고 있어 실험을 하는데 참고해야 할 것이다.

잔류농약 속성검사시 Methyl alcohol로 시료를 추출하여 그 추출액을 시험용액으로 하는데 이 과정에서 시료의 엽록체들이 함께 추출되어 추출액이 녹색을 띠게 된다. 이 착색된 추출액이 420nm의 파장에서 흡광을 나타내어 저해율 측정에 영향을 끼치고 있었다. 그 영향이 품목별로 각각 다르고 매번 차이가 있지만 대략적으로 추출액이 저해율에 대해 끼치는 영향이 어느 정도 인지를 알아보고자 하여 각 품목별로 추출액을 만들어 ELISA Reader로서 흡광도를 측정하여 저해율을 조사하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2. The inhibition rates of the extractive itself.

Group	Absorption	Inhibition rate(%)
Leafy vegetables	0.4~0.8	15~20
Spices	0.3~0.5	8~15
Fruits	0.1~0.3	3~7
Mushrooms	0.05~0.2	0~4

여기서 보면 엽경채류 추출액의 흡광치가 0.4~0.8이었으며 이는 최고 20%까지의 저해율에 해당하는 것으로 양성판정시 오차를 나타낼 수 있는 충분한 수치로서 주의를 기해야 할 것이다. 즉 60%의 저해율을 나타낸 품목의 경우 추출액의 흡광치에 해당하는 20%를 감안한다면 40%의 저해율이 될 것이다. 따라서 시험과정에 있어서 시료를 주입하고서 곧바로 추출액의 흡광치를 측정한다면 다음에 실험을 진행시키고 최종 흡광치가 나오면 이 흡광치에서 최초 추출액의 흡광치를 빼주고 나서 저해율 계산을 하여야만 엽록체에 의한 흡광의 오차발생을 줄일 수 있을 것이다.

보통 RBPR법에서는 Spectrophotometer를 사용하여 실험을 하는 것으로 되어 있는데 좀더 빠른 시간에 많은 건수의 실험을 처리하려는 방안으로 최근에 ELISA Leader를 많이 이용하고 있다. 46건까지를 동시에 측정하므로써 Spectrophotometer에 의한 실험진행보다 시간을 그만큼 줄일 수가 있었다. 그러나 이 ELISA Leader의 이용시 정확도가 다소 떨어지는 경향이 있어 속성검사에 의해 검출된 양성품목을 대상으로 정밀검사를 하였을 때 잔류농약이 검출되는 빈도가 적다는 단점이 지적되고 있다. 이에 ELISA Leader와 Spectrophotometer의 저해율 재현성을 비교 조사해 보기 위하여 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며 대상물질로는 검출빈도가 높은 유기인계의 chlorpyrifos와 카바메이트계의 cabofuran⁹⁾을 대상으로 5ml/l의 용액을 만들어 저해율을 10회 반복하여 측정하였다.

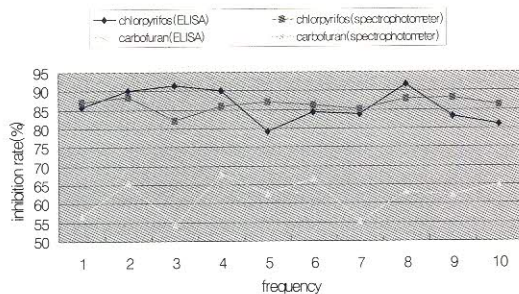


Fig. 3. The difference of the reappearance between ELISA Reader and Spectrophotometer.

여기서 보면 ELISA Leader의 경우는 그 표준편차가 4~5 정도로 재현성이 다소 떨어지는 것으로 나타났으며 Spectrophotometer의 경우는 표준편차가 1.5~3으로 다소 안정되게 나타났다. 따라서 신속한 측정과 더불어 실험의 정확성을 높이기 위해서 ELISA Leader와 Spectrophotometer를 같이 사용하여 측정하는 방안을 생각해 보았다. 1차 실험과정으로 ELISA Leader를 46건을 동시에 실험을 하여 저해율 50%이상으로 나타난 품목들을 대상으로 Spectrophotometer로 2차 속성검사를 실시한다면 정확도가 상당히 높아질 것이다. 물론 측정시간은 더 소요될 것이다. 그러나 ELISA Leader에 의해 검출된 양성품목이 1~2건에 그치고 있기 때문에 Spectrophotometer로서 추가되는 검사시간은 그리 많이 소요되지는 않을 것이다. 따라서 RBPR법에 의한 Spectrophotometer만의 측정시보다도 훨씬 빠른 시간으로, 또한 ELISA Leader만 이용시의 단점을 보완한 정확성을 높일 수 있는 잔류농약 속성검사가 이루어 질 것으로 사료된다.

결론

서울의 서남권에서 유통되는 농산물 12,735건에 대한 잔류농약 속성검사를 실시하여 검출된 잔류농약의 실태와 속성검사의 정확도를 높이기 위한 방안을 살펴본 살펴 본 결과는 다음과 같다.

1. 잔류농약속성 검사 양성품목은 9건이었으며, 그 중 부적합품목은 6건으로 2001년도에 비해 늘어났지만 이는 꾸준한 검사실행이 실효를 거두고 있는 것으로 추정된다.
2. 간이 속성검사는 효소의 양에 따라 저해율이 크게 영향을 받고 있어 정확한 양의 효소를 사용하여야 한다.
3. 마늘, 마늘즙, 홍고추, 부추, 양송이, 콩나물 등은 농산물 자체에 반응을 저해하는 성분을 함유하고 있는 것으로 추정되는 반응이 자주 보여지고 있었다.
4. 추출액에 포함된 엽록체에 의해 약간의 흡광이 일어나므로 이 흡광치를 최종 결과치에 감

안해 주어야 할 것이다.

5. 측정의 정확도를 높이기 위해서는 ELISA Leader로 1차 측정하고 이때 검출된 양성품목을 다시 Spectrophotometer로 측정하여 최종 양성으로 판정을 내린다면 신속성을 유지하면서 좀더 정확한 잔류농약 측정방법이 될 것이다.

참고문헌

1. 장미순 : 유기인계 농약의 부류별 총체적 분석방법(ELISA)개발. 영남대학원 석사논문. (1997)
2. 정영호 : 최신농약학. 시그마플리스 p5.(2000)
3. 송낙수 : 채소류에 살포된 유기인계농약 잔류성분의 경시적 변화. 충남대보건의대학원.(1996)
4. Hirohiko, Y. : Safety assesment for agricultural chemicals : recent prospect. J of Nippon Food Hygin., 34
5. 서계원 : 광주광역시에서 유통되고 있는 엽채류에 대한 농약의 잔류량 조사. 광주시보건환경연구원(1998)
6. 배혜지 : Acetylcholinesterase(AChE) 작용을 저해하는 농약에 대한 농산물에서의 잔류 분석. 서울시립대학교 석사학위논문(2000)
7. Edward, Y.C., and Kao, C.H. : Rapid bioassay of pesticide residues(RBPR) on fruits and vegetables, Taiwan agricultural research institute(1998)
8. 宮田昌弘, 平原嘉親 : 食品中残留農薬の多成分分析法におけるGC及びGC/MSの比較検討, 食衛誌, 37:3(1996)
9. 국립농산품질관리원 : 농산물품질관리연보, (2001)
10. 김선재, 박근형 : 부추의 향미생물 활성물질. 한국식품과학회지, 28:604(1996)
11. 농업과학기술원 : 농약의 안전성과 작물보호 (1999)
13. 이경무, 정문호 : 일부 경주지역 농민의 농약 사용실태 및 농약의 위험성에 대한 인식조사. 한국환경위생학회, 26:65(2000)
14. 강태선, 백남원 : 과수 농민의 chlorpyrifos 노출에 관한 연구. 한국 환경위생학회, 25: 59(1999)
15. 안소영 : 단세포성 항체를 이용한 Acetylcholinesterase의 구조 연구. 이화여자대학교 박사학위논문(1994)
16. Pawliszyn, J. : Theory and Parctice (Solid Phase Microextraction), Wiley-VCH Inc., New York, p126(1997)
17. Rampa, L., Bisi, A., Valenti, P., Recanatini, M., Cavalli, A., Vincenza, A., Carvrini, V., Fin, L., Buriani, A., and Giusti, P. : Acetylcholinesterase Inhibitor. J. Med. Chemical., 41:3976 (1998)
18. Edward, Y.C., and Kao, C.H. : Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables, Taiwan agricultural research institute(1998)