

DDT 잔류물분석을 위한 효과적인 면역흡착정제방법에 대한 연구

홍지연*** · 홍지은* · 최명자* · 김종현** · 박송자**†

*한국과학기술연구원 생체대사연구센터, **서울여자대학교 화학과

An effective immunoaffinity clean-up method for DDT multi-residue analysis

Ji Youn Hong***, Jee Eun Hong*, Myung Ja Choi*, Jong-Hyun Kim**, and Song-Ja Park*,†

*Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science & Technology
Sungbuk-gu, Hawologok-dong 39-1, Seoul 136-791, Korea

**Dept. of Chemistry, Seoul Women's University Nowon-gu, Kongnung 2dong 126, Seoul, 139-774, Korea

To increase detection sensitivity for DDT multi-residues (*o,p-p,p*-DDT, *o,p-p,p*-DDE, *o,o-o,p*-DDD), immunoaffinity column was introduced for a highly selective clean-up method of sample. The immunoaffinity matrix was prepared by coupling IgG fraction of DDT antiserum to cyanogen bromide activated Sepharose 4B. Three DDT antibody (DDA-1, DDHP-2, DDCP-3) were tested for affinity column ligand that obtained by immunizing respective DDT immunogens to rabbits, and IgG was purified using protein A affinity column. A suitable eluent and DDCP-3 antibody were selected to elute DDT multi-residues from immunoaffinity column. The eluent was best with PBS containing 30% methanol, 15% DMSO and 15% acetone. When a sample that contained ten organic pesticides and DDT multi-residues was applied for the immunoaffinity clean-up step, 95% DDT multi-residues and two pesticides (a-BHC, cis-chlordane) were recovered in eluent leaving off other pesticides in washing step (20% methanol in PBS). Therefore, the immunoaffinity clean-up step using DDCP-3 antibody is highly efficient for selective analysis of DDT multi-residues by GC/MS.

Key words: DDT, polyclonal antibody, immunoaffinity clean-up, GC/MS

1. 서 론

DDT(dichloro diphenyl trichloroethane)는 1874년에 독일 화학자 Othmar Zeidler에 의해 합성된 최초의 유기합성 살충제로써, 1939년 스위스 화학자 Paul Muller에 의해 해충의 신경 계통에 타격을 주는 살충 효과가 발견되어 살충제로써 대량생산 되었다. Paul Muller는 DDT의 해충 박멸에 끼친 큰 공헌에 의한 공로로 1948년 노벨상을 받았다. DDT는 무색, 무취의 물에 녹지 않고 지질에 잘 녹는 가루로 반감기는 동물에서 8년, 자연계에서 15년이나 되며, 자연계에서는 잘 분해되지 않고 땅이나 물, 공기 중에서 오랜 기간 잔존하여, 조류에서 대형 동물에 이르기까지 먹이연쇄를 거쳐 농축된다.¹⁻³⁾ 또한 지질에 용해되는 특성 때문에 인체에 들어오면 부신, 고환, 갑상선에 대량 축적되며, 신

경계에 영향을 끼친다.⁴⁻⁶⁾ 따라서, 1970년대부터 미국을 비롯하여 개발국가에서 DDT의 사용이 금지되었으나, 30년이 지난 지금까지도 토양에서 발견되고 있으며, 그 분해물 DDE와 DDD까지 함께 발견되고 있다. 이러한 DDT의 문제점에도 불구하고 아프리카에서는 말라리아로 연간 2억 7천만 명이 죽어가고 있으므로, 저렴한 비용과 탁월한 효과를 가진 DDT의 대체 살충제가 개발되기 전까지 말라리아 예방을 위한 모기박멸제로서 DDT의 사용금지를 일부 유보한 상태이다.^{7,8)} DDT는 포유류를 비롯하여 인체에 흡수된 후 체내에서 분해되어 dichlorodiphenyl acetic acid (DDA)로 전환되어 뇨 시료에서 검출되며, 자연계에서 산화되어 DDE 및 DDD로 분해된다.⁹⁻¹¹⁾ DDT와 그 유도체를 분석하는 방법으로 GC/MS가 일반적인 방법으로써,^{12,13)} 분석을 위해서는 수회의 추출 등 시료 정제가 선행되어야 하

†To whom correspondence should be addressed.

므로 많은 시간과 노력을 필요로 한다.

이전에 발표한 논문에서 DDT와 유사구조를 면역원을 사용하여 폴리클론항혈청을 얻었고, competitive ELISA로 DDT류에 대한 면역항체의 특성을 연구하였다.^{14,15)} 이번 논문은 GC/MS법으로 DDT와 그 유도체를 검출하기 위한 시료 전처리 방법으로 간편한 면역흡착 크로마토그래피 과정을 통한 시료정제법에 관한 것이다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

Bovine serum albumin(BSA), ovalbumin(OVA), keyhole limpet hemocyanide(KLH)는 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL., U.S.A.)에서 구입하였고, CNBr-activated Sepharose 4B는 Pharmacia Biotech (Wikstroms, Sweden)에서 구입하였고, column chromatography 용매는 HPLC급을 사용하였으며, 모든 chemical은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO., U.S.A.) 및 Chem Service Inc. (West Chester, PA, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. 모든 완충용액은 Milli-Q water system(Millipore Inc., MA, U.S.A.)으로 정제된 탈이온수를 사용하였다.

2.2. 햅튼 제조 및 면역원 합성

DDT 항체를 얻기 위하여 DDT와 유사구조를 갖는 세 종류의 햅튼을 합성한 후 KLH에 결합하여 토끼에 면역주사하였으며 세 종류의 DDT 항혈청을 얻었다. 합성방법은 이전 논문^{14,15)}에 발표했으며, 세 종류의 햅튼은 2,2-Bis(4-chlorophenyl)acetic acid (DDA), 5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-hydroxypentanoic acid (DDHP), 5, 5-Bis(4-chlorophenyl)-5-chloropentanoic acid (DDCP)이다.

2.3. 항체의 정제

DDA, DDHP와 DDCP를 KLH에 결합하여 면역주사하여 얻은 항혈청은 protein A를 사용한 흡착정제과정을 통하여 IgG를 분리하였다. Protein A 흡착컬럼의 제

조과정은 다음과 같다. protein A Sepharose 4B gel을 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)을 사용하여 활성화하였다. 컬럼에 packing한 후 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)과 0.1M citric acid로 세척한 후 다시 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)으로 세척하였다. 항혈청 2 mL을 취하여 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0)을 2 mL 첨가하여 0.45 µm membrane filter를 사용하여 여과 후 protein A 컬럼에 가하고 4°C에서 2시간동안 섞어주며 반응시켰다. 0.1M sodium phosphate buffer를 사용하여 UV 280 nm에서 측정하여 항체의 IgG 농도를 측정하였다.

2.4. 면역흡착 크로마토그래피컬럼의 제조

CNBr-activated Sepharose 4B 0.5 g을 1 mM HCl 7 mL를 가하여 15분간 rotator에서 활성화시킨 후 sintered glass funnel에서 1 mM HCl 100 mL를 사용하여 여과한 후 coupling 완충액 (0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M NaHCO₃, pH 8.3) 50 mL를 사용하여 세척하였다. 활성화시킨 CNBr-activated Sepharose 4B gel 컬럼을 세개 준비하여 protein A로 정제한 각각의 IgG (PAb #1; 4.72 mg, PAb #2; 3.59 mg, PAb #3; 4.37mg)를 가한 후 coupling 완충액에서 실온에서 2시간 반응한 후 4°C에서 12시간 동안 반응하였다. 각각의 경우에 Gel과 IgG의 비율을 같게하여 같은 조건에서 반응하였다. 반응 후 남아 있는 IgG는 5 mL의 coupling 완충액으로 세척한 후 A280에서 측정하였으며, gel에 결합된 IgG의 농도를 계산한 결과 대부분의 IgG가 전부 반응 하였음을 알 수 있었다. 반응 후 남아있는 gel의 활성그룹은 1 M ethanoamine으로 2시간 반응하여 불활성화하였다. 0.5 M NaCl을 함유하는 0.1 M acetate 완충액 (pH 4.0)과 0.1 M tris-HCl 완충액 (pH 8)으로 3회 세척하였다.

2.5. 분석대상시료의 선정 및 검출표준용액의 제조

흔히 사용되는 농약류 중 각각의 구조별로 10종류와 DDT 유도체 6종류를 Table 1과 같이 선정하였다. 6종

Table 1. Chemical structures of DDT immunogens

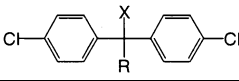
	X	R	Immunogen	Antibody
	H	COOH	DDA-KLH	PAb #1
	OH	(CH ₂) ₃ COOH	DDHP-KLH	PAb #2
	Cl	(CH ₂) ₃ COOH	DDCP-KLH	PAb #3

Table 2. Recovery of various condition of elution

Column	DDT residue	Recovery of various condition of elution(%)			
		#1	#2	#3	#4
	<i>o,p'</i> -DDT	31	30	106	75
	<i>p,p'</i> -DDT	92	31	82	73
	<i>o,p'</i> -DDE	13	23	86	95
	<i>p,p'</i> -DDE	12	24	80	99
	<i>o,p'</i> -DDD	20	54	76	92
	<i>p,p'</i> -DDD	17	57	60	101

#1; 100% Acetone, #2; 50% MeOH, 10% DMSO, 10% Acetone in PBS, #3; 40% MeOH, 10% DMSO, 10% Acetone in PBS, #4; 30% MeOH, 15% DMSO, 15% Acetone in PBS

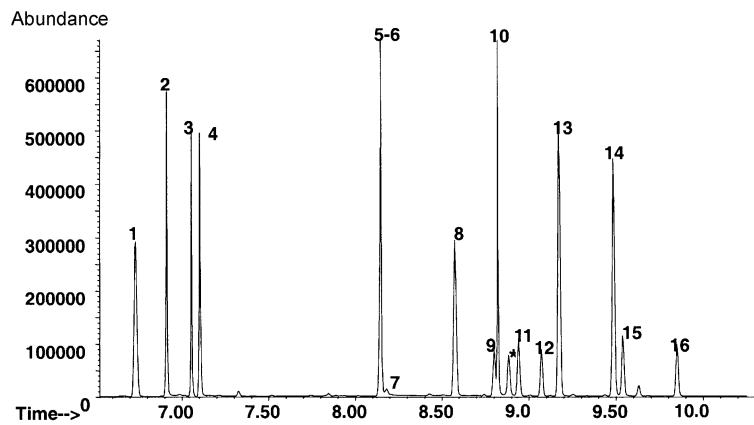


Fig. 1. Chromatogram of analytes in clean-up sample

의 DDT 유도체의 농도가 각각 10 µg/mL이 되도록 혼합한 표준용액과 10종의 농약류의 농도가 각각 10 µg/mL이 되도록 혼합한 표준용액을 메탄올에 녹여 제조하여 4°C에서 보관하여 사용하였다.

2.6. 면역친화컬럼에 결합된 DDT 유도체의 용출액 선정

10 µg/mL의 6종의 DDT 혼합표준용액을 메탄올/PBS 용액에 희석하여 1 µg/mL 농도의 20% 메탄올 용액을 제조하였다. 이 분석용액을 3 mL 취하여 미리 제조한 면역흡착컬럼에 넣고, 실온에서 2시간 반응 후 6 mL의 20% 메탄올/PBS 용액으로 세척하였다. 이 컬럼에 DDT 유도체의 용해도를 참조하여 아세톤, 메탄올, DMSO의 유기용매와 PBS의 비율을 달리한 다양한 용출액을 사용한 후 그 회수율을 측정하였다(Table 2).

2.7. DDT 유도체와 10종의 농약류에 대한 면역흡착 크로마토그래피컬럼 정제

6종의 DDT 유도체와 10종의 농약류를 각각의 농도가 1 µg/mL가 되도록 용매를 메탄올 20% PBS 완충

용액 3 mL을 PAb #3가 결합된 컬럼에 넣고, 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 6 mL의 20% 메탄올/PBS 용액으로 세척한 후 선정된 용출액 (30% 메탄올, 15% DMSO, 15% 아세톤을 함유하는 PBS 완충용액)을 4 mL 씩 8회 용출시켰다. 각각의 화합물의 GC/MS 크로마토그램은 Fig. 1과 같고, 그 회수율은 Table 4에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

세 종류의 면역원 (DDA-KLH, DDHP-KLH, DDCP-KLH)으로부터 얻은 세 종류의 항혈청을 protein A 컬럼을 사용하여 IgG를 분리하였으며 그 결과는 Table 1과 같다. 토양 등 환경시료에서 DDT와 그 분해물들을 GC/MS를 사용하여 검출하기 위한 시료 전처리 과정을 간소화 시킬 수 있는 면역흡착 크로마토그래피컬럼은 DDT와 그 분해물과 가장 좋은 반응성을 보인 PAb #3를 사용하여 면역흡착컬럼을 제조하였다. DDT와 그 분해물들을 컬럼에 흡착 시킨 후 회수율 실험을 한 결과 가장 효과적인 용출액은 30% 메탄올, 15% DMSO,

Table 3. Condition of GC/MS analysis

Parameters	Condition & column
Injection volume	2 μ L
Column	Ultra-2 (cross-linked 5% phenylmethylsilicon, 25 m \times 0.2 mm I.D. \times 0.33 μ m film thickness)
Detector	MSD
Injection temp.	250°C
Transfer line temp.	280°C
Oven temperature	150°C (0.0min) 10°C/min
Programming	300°C (15.0 min)
Carrier gas (He)	0.8 mL/min

Table 4. Comparison of recovery by immunoaffinity clean-up column for DDT

No.	Compound	FW	t _R (min)	Selected ion(m/z)	Recovery(%)
1	α -BHC	288	6.73	181 219 183	95.8
2	Propazine	230	6.93	214 229 58	4.6
3	Propylamide	256	7.09	173 175 145	4.4
4	Fonofos	246	7.14	109 246 137	34.5
5	Parathion	291	8.21	291 109 97	26.5
6	Chlorpyrifos	350	8.21	197 97 314	46.0
7	Aldrin	362	8.26	263 293 91	23.4
8	Heptachlor epoxide	386	8.65	353 355 81	74.0
9	<i>o,p'</i> -DDE	316	8.88	246 318 176	98.9
10	Butachlor	311	8.91	176 160 77	27.1
11	cis-Chlordane	406	9.04	373 375 237	96.9
12	<i>p,p'</i> -DDE	316	9.18	246 318 176	98.9
13	<i>o,p'</i> -DDD	318	9.28	235 165 237	95.1
14	<i>p,p'</i> -DDD	328	9.56	235 165 237	94.6
15	<i>o,p'</i> -DDT	352	9.64	235 237 165	98.1
16	<i>p,p'</i> -DDT	325	9.95	235 237 165	97.3
*	Pyrene-d10	212	9.00	212	-

15% 아세톤을 함유하는 PBS 완충용액이었으며, 각각의 용출액에 대한 회수율은 Table 2와 같다. 6종의 DDT 유도체와 10종의 농약류를 면역흡착컬럼에 통과시킨 후 용출액에서 각각의 화합물의 회수율을 GC/MS로 측정하여 계산하였다. GC/MS의 분석조건 및 각 화합물의 분석방법은 Table 3 및 Table 4에 나타내었다. 이들 DDT 유도체와 농약류의 혼합 표준용액을 면역흡착컬럼을 사용하여 회수율을 조사한 결과, 6종의 DDT 유도체와 cis-chlordane과 α -BHC의 경우 95% 이상의 회수율을 보였으며, heptachlor epoxide는 74%, 나머지 다른 7종의 농약류는 낮은 회수율을 보였다(Table 4).

이와 같은 결과는 환경시료로부터 DDT를 검출하고자 할 때, 다른 농약류를 면역흡착컬럼을 사용하여 제거함으로써 분석시료의 GC/MS 크로마토그램에서 noise를 최소화하여 효과적으로 미량의 DDT를 검출할 수 있음을 보여주었다.

4. 결 론

본 연구에서는 잔류 DDT의 분석감도를 증진시키기 위해 DDT 항체의 면역흡착컬럼을 이용한 전처리를 연구하였다. DDT 유도체와 흔히 상용되는 독성이 강한 농약류 10종을 선정하여 면역흡착컬럼 전처리를 수행하였으며, 면역흡착컬럼은 DDT 항체에 대한 농약류의 반응성 차이에 따라 회수율이 다르므로 분석시료에서 농약류를 제거하고 DDT 유도체를 효과적으로 수집할 수 있었다. 이 연구에서는 DDT와 좋은 반응성을 지닌 항체는 PAb #3였으며, 컬럼에 흡착된 DDT를 용출시키면서도 항체의 활성을 떨어뜨리지 않는 용출액은 30% 메탄올, 15% DMSO과 15% 아세톤을 함유하는 PBS 완충용액이었다. 이때 DDT 유도체는 95%이상의 회수율로 얻으면서 다른 화합물을 효과적으로 제거할 수 있었다. 따라서 DDT 항체의 면역흡착컬럼을 사용

하여 시료를 전처리 한 후, GC/MS 분석법을 사용할 때 DDT 유도체의 검출 감도를 향상시킬 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실 과제 (No 2000-N-NL-01-C-045)의 지원에 의해 수행되었음을 밝힙니다. 연구자들은 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. T. Colborn, M. J. Smolen, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **1996**, 146, 91-172.
2. A. Hussein, U. Maqbool, M. Asi, *J. Environ. Sci. and Health*, **1994**, 29, 1-15.
3. T. Samuel, M. K. K. Pillai, *Environ. Pollut.*, **1989**, 57, 63-77.
4. E. C. Voldner, Y. F. Sci. Li, *Total Environ.* **1995**, 160/161, 201-210
5. J. Mitra and K. Raghu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, 60, 585-591
6. P. K. Phoung, C. P. N. Son, J. -J. Sauvain, J. Taradellas, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, 60, 347-354
7. L. Lopez-carrillo, L. Torres-Arreola, L. Torres-Sanchez, F. Espinosa-torres, C. Jimenez, M. Cebrian, S. Waliszewski, O. Saldade, *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 44, 3703-3709.
8. S. M. Waliszewski, V. T. Pardio, K. N. Waliszewski, J. N. Chantiri and R. M. Infanzon, *J. AOAC Int.*, **1996**, 79, 784-786.
9. Watts, R. R. *Manual of Analytical Quality Control of Pesticides and Related Compounds in Humans and Environmental Samples*; Environmental Protection Agency: Research Triangle Park NC, U.S., **1981**; 319
10. WHO. DDT and its Derivatives; Environmental Health Criteria 9. World Health Organization: Geneva, **1979**
11. Ramachandran, M. Banerjee, B. D. Gulati, M. grover, A. Zaidi, SSA. Hussain and Q. Z. Indian, *J. Med. Res.* **1984a**, 80, 590
12. H. R. Buser and M. D. Muller, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2691-2698.
13. J. C. Chuang, K. Hart, J. S. Chang and L. E. Boman, J. M. Van Emon, A. W. Reed, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 444, 87-95.
14. J. Y. Hong, J. -H. Kim and M. J. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, 23, 1413
15. 홍지연, 김종현, 박송자, 최명자, *한국환경분석학회지*, **2002**, 5(2), 103-111