

## 살충제 Imidacloprid 잔류물의 신속한 측정을 위한 생물반응 및 계측제어 시스템 개발

임종근 조한근

### Development of a Biological Reaction and Measurement Control System for Rapid Detection of the Insecticide Imidacloprid Residues

J. K. Lim H. K. Cho

#### Abstract

In this study, a biological reaction and measurement control system was developed to rapidly measure the insecticide imidacloprid residues in agricultural products. The biological reaction part of the system was designed to include micro-pumps and valves for fluid transport, and a polystyrene cuvet as a reaction chamber. The measurement control part of the system consisted of a photodiode with a light-emitting diode for optical density measurement, and a control microcomputer to implement assay. Signal output was read as the rate of change in optical density at 645 nm. The sensitivity of the system was 2.2 ng/mL ( $IC_{50}$ ). The system could execute a measurement cycle in about 19 minutes. Research will be continued to develop an automatic sampler for imidacloprid residues from agricultural products.

**Keywords :** Biosensor, ELISA, Antibody, Antigen, Imidacloprid, Insecticide residues

#### 1. 서론

농산물, 식품 또는 환경 분야에서 잔류 농약의 검출에 대한 중요성은 점차 증가하고 있다. 최근에는 소비자 보호기관이나 시민단체를 비롯하여 국민 모두가 농산물 잔류농약에 대하여 높은 관심을 보이고 있다. 또한 농산물 수입량이 날로 증가함에 따라 수입 농산물에 잔류하는 농약성분의 정확하고 신속한 검출이 중요한 문제로 대두되고 있다.

이미다크로플리드(imidacloprid)는 신니코틴(neonicotinoid)계 살충제로서 해충 등에 살포되었을 때 전신마비, 이완, 활동성 저하 등을 일으켜 이를 박멸한다. 국내에서는 꿀굴나방, 조팝나무 진딧물, 벼멸구, 굽벵이 류 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 장미, 복숭아 및 벼농사에 광범위하게 사용되

고 있다(정 등, 2000). 국내에서 imidacloprid의 최대잔류허용한계는 쌀에서 0.05 ppm, 면실에서 6 ppm으로 작물별로 다르지만 0.05~6 ppm 범위이다(이 등, 2003).

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고속액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)에 의존하고 있다. 이 방법들은 잔류농약 측정의 정확도 높다는 장점을 갖고 있지만, 추출과 정제의 전처리 과정이 필요하기 때문에 시간 및 비용이 많이 소요된다는 단점을 갖고 있으며 숙달된 전문 기술이 필요하다(박, 2003). 최근에는 대형기기를 이용한 농약분석의 단점을 보완하기 위하여 효소면역분석법(ELISA)이 개발되고 있다(Lee et al., 2001). 효소면역분석법을 이용한 센서들이 식품원료나 가공 식품 및 공정에 잔류하는 농약, 항생제, 식품독소,

This study was supported by the Agricultural R&D Promotion Center (ARPC), Ministry of Agriculture and Forestry. The article was submitted for publication in January 2005, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in April 2005. The authors are Jong-keun Lim, Former graduate student, Han-keun Cho, KSAM member, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Korea. The corresponding author is Han-keun Cho, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; E-mail : <hkcho@cbu.ac.kr>

중금속 등의 고감도 검출에 많이 활용되고 있다(김, 2002). 이 분석법은 관행적인 방법에 비해 경비, 시간 및 노력 등을 많이 단축하였으나, 시료를 실험실까지 운반해야 하며 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구된다. 따라서 송과 조(2003)는 기존의 효소면역분석법(Lee et al., 2001)을 변형하여 감도(IC50)는 3.46 ng/mL로 실험실용 효소면역분석법에 비해 다소 낮게 나타났으나, 검출에 소요되는 시간은 15분으로 단축하여 신속한 측정이 가능하도록 하였다. 그러나 현장에서 사용 가능한 측정 장치의 개발은 아직 미흡한 실정이다.

본 연구의 목적은 효소면역법을 이용하여 농산물의 이미다클로프리드 잔류량을 신속하고 정확하게 검출하고, 운반이 간편하며 비전문가도 사용 가능한, 휴대형 바이오센서의 개발을 위한 생물반응시스템 및 계측제어시스템의 개발에 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 경쟁적 간접 효소면역분석법(competitive indirect ELISA)

본 연구에서는 Lee et al.(2001)이 개발한 경쟁적 간접 효소면역분석법을 수정하여 사용하였고, 다음은 이 방법의 개략적인 설명이다. 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)의 각 반응조(well)에 pH 9.6의 코팅 버퍼(buffer)로 희석한 코팅항원(단백질 농도: 0.1 µg/mL)을 100 µL씩 주입한다. 4°C에서 24시간 경과 후 세척 완충액(1×PBS + 0.05% Tween20)으로 5회 세척하여 플레이트에 코팅이 되지 않은 항원을 제거한다. 반응조의 코팅되지 않은 부위를 블로킹(blocking)하기 위해 각 반응조에 탈지유(3% skim milk in 1×PBS)를 200 µL씩 추가한다. 37°C에서 1시간 배양한 다음 다시 상기 방법으로 반응조 플레이트를 세척한다. 코팅된 플레이트에 1×PBS에 1:16,000로 희석한 다클론 항체와 분석 대상 시료인 imidacloprid의 농도별 표준용액을 50 µL씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온(24°C)에서 1시간 반응시킨다. 다시 세척하고, 이차항체에 효소가 표지된 goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase 희석액(1:20,000 diluted with 1×PBST)을 100 µL씩 추가한다. 실온에서 1시간 반응 후 세척하고 기질 완충액 100 µL씩을 각 반응조에 추가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 반응조에서의 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 50 µL씩 추가한다. 황색으로 변한 플레이트를 450-655 nm 범위의 dual wavelength mode에서 마이크로플레이트 판독기(Model 550, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정한다(Lee et al., 2001).

Imidacloprid 표준용액의 농도는 25,000 ng/mL에서 0.0128 ng/mL로 희석하여 사용하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 S자형으로 맞추고, 4개의 계수를 갖는 지수 식으로  $Y=D+(A-D)/(1+(X/C)^B)$ 과 같이 표시된다. 이 곡선의 상하점근선은 imidacloprid의 최대(A) 및 최소(D) 농도에 따른 흡광도이며, 이 곡선의 IC<sub>50</sub>(C)를 중심으로 한 직선범위 IC<sub>20</sub> - IC<sub>80</sub>가 실질적인 imidacloprid의 측정범위가 된다. 측정감도의 예측은 분석물을 함유하지 않은 시료의 흡광도를 50% 저해하는 imidacloprid의 농도 IC<sub>50</sub>로 표시할 수 있다. 그러므로 IC<sub>50</sub> 값이 작은 S자 표준곡선이 imidacloprid의 분석에 예민한 효소면역분석법이라고 할 수 있다(Lee et al., 2001). 살충제 imidacloprid 잔류물의 검출을 신속히 하기 위해 배양시간을 단축시키고 항체농도를 높여 수정된 표준 효소면역 분석법은 송과 조(2003)에 요약되어 있다.

### 나. 시약 및 실험재료

Imidacloprid의 잔류량 검출을 위한 코팅 항원으로 haptin-3-BSA를 사용했으며 항체로는 haptin-5-KLH를 면역원으로 하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 이들 항원과 항체는 충북 대학교 농화학과 농약학 실험실에서 제조하였다. 이차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

Microplate는 Maxisorp 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno Plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였고, microplate reader는 Bio-Rad Laboratories 사의 Model 550(Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

### 다. 실험장치

#### 1) 생물반응 시스템

생물반응 시스템의 구성은 그림 1과 같다. 반응조는 흡착성이 좋은 표준 수정 큐벳을 사용하였으며, 시료의 운반과 혼합을 위해 행정당 50 µL의 이송용량을 가진 4개의 솔레노이드 펌프(LPLA1220050L, The Lee Co., Westbrook, CT, USA)가 사용되었다. 펌프, 이송관 및 밸브의 오염을 최소화하기 위해 별도의 펌프와 이송관을 두었다. 양방향 밸브(LFAA1201710H, The Lee Co.)는 선택된 시약을 주입하기 위해 사용하였고, 세 방향 밸브(LFAA1201410H, The Lee Co.)는 시료의 급격한 주입을 예방하기 위해 사용하였다. 반응조 안에 공급되는 배관은 스테인레스 강 튜브(1.47 mm OD, 1.07 mm ID)를 사용했고, 다른 이송관은 내경이 1.6 mm인 바이톤 튜브를 사용하였다.

펌프 속도가 지나치게 큰 경우 운반이 정량적으로 되지 않

을 수 있으며, 반대로 지나치게 작은 경우 전체적인 검출시간을 단축시키는데 어려움이 따른다. 펌프의 13 스트로크로 500  $\mu\text{L}$ 의 증류수가 큐벳으로 이동되었고, 20 스트로크로 증류수 1,000  $\mu\text{L}$ 이 운반되었다. 이송관의 길이가 길수록 시료 운반을 위한 펌프의 스트로크 횟수가 많아져 시료이송 시간이 길어지므로 이송관의 길이를 최소가 되도록 펌프, 밸브 및 반응조의 위치를 결정하였다.

2) 계측 및 제어 시스템

기질의 흡광도를 측정하기 위해 645 nm 발광다이오드(HLMP

-4101, Hewlett Packard, San Jose, CA, USA)와 포토다이오드(BPX61, Siemens Components, Inc., Cupertino, CA, USA)를 사용하여 농도에 대한 발색 정도에 따라 출력전압을 측정하였다(Delwiche 등, 2001). 발광다이오드(LED)는 반응조를 담은 블랙 외벽의 아주 작은 구멍을 통하여 큐벳에 광을 투과시켜 반대편에 위치한 포토다이오드 면과 수직으로 정렬하였다(그림 1). 이때 포토다이오드는 투과된 빛의 광도에 비례하여 광전류를 발생시키며  $10^6$  V/A의 이득을 갖는 광전압 증폭기에 입력된다. 증폭기에서 출력된 전압 신호는 차단 주파수가 10 Hz인 4차 버티워스(4th-Butterworth) 저역통과 필터로

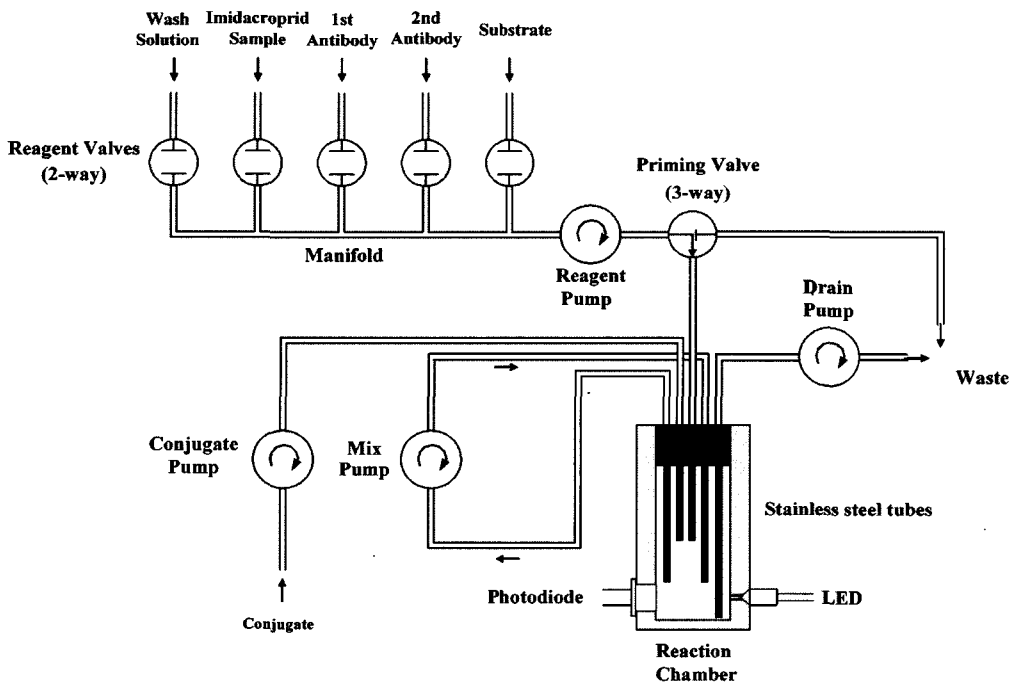


Fig. 1 Scheme of the biological reaction system used in the study (Delwiche et al., 2001).

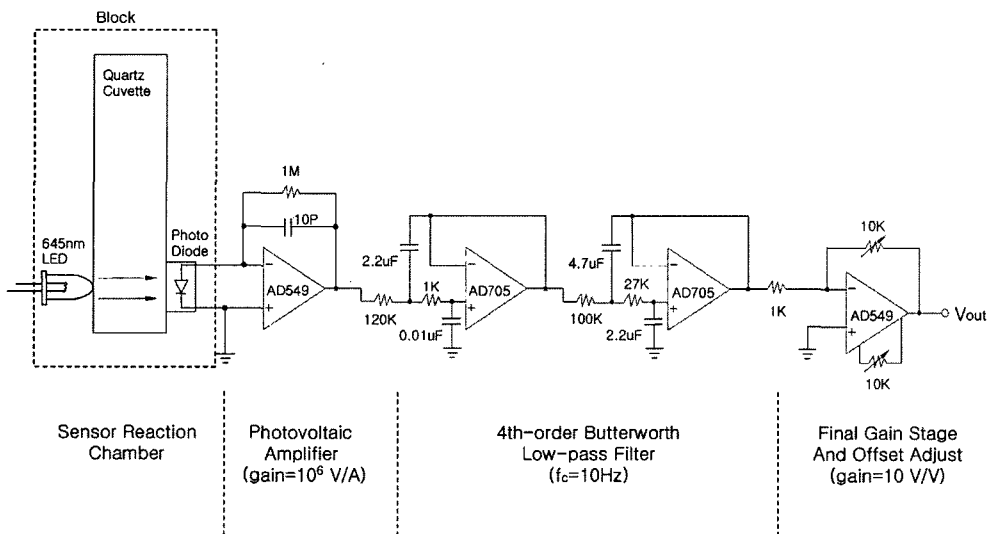


Fig. 2 Circuit diagram for the signal processing (Delwiche et al., 2001).

고주파 성분을 제거하였다. 마지막 단계로 이득이 10이며 출력 오프셋(offset) 조절이 가능한 인버터를 사용하여 출력전압을 읽는다. 센서 출력은 마이크로컴퓨터에 내장된 10 비트의 분해능을 갖는 A/D 변환 기능을 통해 디지털 신호로 바뀌어 액정 표시장치(LCD)로 출력하였다. 계측 시스템의 신호처리 회로도에는 그림 2와 같다(Delwiche et al., 2001).

생물반응을 위한 시료 운반에 필요한 펌프와 밸브의 작동, 생물반응이 끝난 후 반응조의 발색정도 측정에 필요한 발광 다이오드의 작동, 포토 다이오드와 신호처리 회로에서 출력된

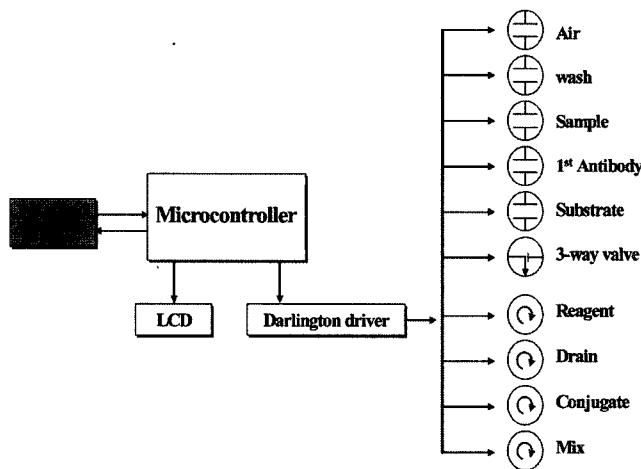


Fig. 3 Block diagram for the system control.

Table 1 Control sequence for the sensor system.

Binding cycle
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Imidacloprid valve (600 <math>\mu</math>L), Reagent pump (20 strokes)</li> <li>▪ 1st antibody valve (600 <math>\mu</math>L), Reagent pump (15 strokes)</li> <li>▪ Mix pump (33 strokes)</li> <li>▪ Incubate 5, 3 min (24<math>^{\circ}</math>C)</li> </ul>
Washing cycle $\times$ 5
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Drain cuvet</li> <li>▪ Washing valve (1.2 mL), Reagent pump (30 strokes)</li> <li>▪ Mix pump (36 strokes)</li> </ul>
Antibody Labeling cycle
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2nd antibody (1 mL), pump (20 strokes)</li> <li>▪ Incubate 5, 3 min (24<math>^{\circ}</math>C)</li> </ul>
Washing cycle $\times$ 5
Development cycle
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Substrate valve (1 mL), Reagent pump (32 strokes)</li> <li>▪ Incubate 5 min (24<math>^{\circ}</math>C)</li> <li>▪ A/D converter</li> <li>▪ Calculate OD rate (10 s)</li> </ul>
Cleaning cycle
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Clear imidacloprid valve</li> <li>▪ Clear substrate valve</li> <li>▪ Add washing solution</li> </ul>

전압신호의 아나로그-디지털 변환과정을 거친 후 최종적인 농도 값을 액정표시장치에 표시하는 제반 공정은 그림 3과 같이 마이크로컴퓨터(AVR, ATmega 8535, ATMEL corp., CA, USA)로 제어되었다. 펌프와 밸브가 작동할 때 큰 전류가 흐르고 IC에 역전류를 방지하기 위해 달링턴 드라이버를 사용하였다. 제어용 프로그램은 C 언어로 작성되어 실행 프로그램으로 변환된 후 AVR에 다운로드 되었다. 제어 알고리즘은 표 1에 요약되어 있다.

### 라. 실험 방법

#### 1) 효소면역 분석법의 분석시간 단축

효소면역분석법(Lee et al., 2001)을 기초로 하여 imidacloprid의 실시간 측정이 가능하도록 측정감도와 정확도를 저하시키지 않는 범위에서 측정에 소요되는 시간을 최소화하였다. 소요시간을 단축하기 위해서 배양시간과 발현시간을 최소화하는 기초실험을 실시하였다. 표준방법에서 1시간 소요되는 배양 시간을 단축하기 위하여 1차 항체의 희석비를 1:16000에서 1:8000, 1:4000, 1:2000으로, 2차 항체의 희석비를 1:20000에서 1:10000, 1:5000으로 변화하면서 실험하였다. 항체 희석비 증가에 따라 배양시간을 1시간에서 30분, 15분, 5분으로 축소하면서 흡광도를 측정하였다.

Table 2 Protocol for the ELISA used in the system.

By hand
Immobilization of Antigen
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Immobilize antigen on cuvet (1 mL, 0.1 <math>\mu</math>g/mL, 12h, 4<math>^{\circ}</math>C)</li> <li>2. Washing cuvet (1<math>\times</math>PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> <li>3. Blocking cuvet (2 mL, 1<math>\times</math>PBS + 3% skim milk, 1h, 37<math>^{\circ}</math>C)</li> <li>4. Washing cuvet (1<math>\times</math>PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> </ol>
By the system
Binding
<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Add 500 <math>\mu</math>L of standard or sample solution. (200, 40, 8, 1.6, 0.32 ng/mL)</li> <li>6. Add 500 <math>\mu</math>L of the dilute polyclonal antibody (1:2000)</li> <li>7. Incubate for 5, 3 min at 24<math>^{\circ}</math>C</li> <li>8. Washing cuvet(1<math>\times</math>PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> <li>9. Add 1 mL of 2nd-antibody (goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:5000)</li> <li>10. Incubate for 5, 3 min at 24<math>^{\circ}</math>C</li> <li>11. Washing cuvet (1<math>\times</math>PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> </ol>
Development
<ol style="list-style-type: none"> <li>12. Add 1 mL of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</li> <li>13. Incubate for 5 min at 24<math>^{\circ}</math>C</li> <li>14. Read optical density on sensor</li> </ol>

2) 시스템 성능평가 방법

신속한 측정을 위해 분석시간이 단축된 수정된 효소면역분석법을 생물반응 및 계측제어 시스템에 적용하기 위해 펌프별 스트로크당 오차를 최소화하고 큐벳에 적용하기 위해 실험실용 효소면역분석법에 비해 시료량을 10배 증가하여 시험하였다. 시스템에 적용된 프로토콜은 표 2와 같다. 생물반응 시스템의 펌프 성능을 평가하기 위하여 증류수를 이용하여 각 펌프별로 운반된 양을 정밀저울(XT220A, Precisa instrument, Dietikon, Switzerland)로 측정하였다. 계측시스템의 정확도를 조사하기 위해 20회의 반복측정을 실시하였고, 표류를 조사하기 위해 200분이 경과하는 동안 출력 값의 변화를 조사하였다.

3) 농도측정 방법

생물반응 및 계측제어 시스템에 적용하기 전의 준비과정으로 imidacloprid의 농도별 용액에 대하여 수작업을 통해 큐벳에 항원을 코팅시켰다. 코팅된 큐벳은 냉동고(-20℃)에 보관하여 사용하였다. 일차 항체의 농도는 1:2000으로 하고 이차 항체의 농도는 1:5000으로 하였으며, 배양시간은 5분과 3분으로 하여 실험하였다. 희석된 항체는 변질을 최소화하기 위해 냉장고(4℃)에 보관하여 사용하였다. Imidacloprid는 200 ng/mL ~ 0.32 ng/mL 범위로 희석하여 사용하였다.

준비과정이 완료되면 큐벳의 빛이 투과되는 면에 이물질이

묻지 않도록 주의하며 큐벳을 블록에 삽입하고, 표 2와 같은 순서로 펌프 및 밸브를 작동하여 효소면역분석 순서에 따라 시약을 운반 하고 반응시켰다. 최종 단계로 각 농도에 대한 상대 흡광도는 액정표시장치(LCD)에 출력된 전압과 식 (1)로 계산되었다. 여기서 A는 흡광도이며  $V_{out}(0)$ 는 흡광도 측정을 위한 대조액으로 증류수를 사용하여 측정한 입사광의 세기를 나타내며,  $V_{out}(t)$ 는 imidacloprid 농도별 큐벳을 투과한 투과광의 세기를 나타낸다.

$$A = \log\left(\frac{V_{out}(0)}{V_{out}(t)}\right) \tag{1}$$

3. 결과 및 고찰

가. 효소면역분석법의 분석시간 단축

1) 항체농도 변화

그림 4는 일차항체의 농도를 1:4000(diluted with 1×PBS), 이차항체 농도를 1:10000(diluted with 1×PBST)으로 하였을 때 농도별 흡광도를 측정한 결과와 일차항체의 농도를 1:2000으로 하고 이차항체의 농도를 1:5000으로 하였을 때 흡광도를 비교한 것이다. 일차항체의 농도를 4배, 이차항체의 농도를 2배로 증가시켰을 때 표 3의 최적화 조건에서의 결과와 비

Table 3 Optimized conditions for the imidacloprid ELISA.

Coating antigen ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rabbit D antiserum (dilution)	Goat anti-rabbit IgG-HRP (dilution)	$A_{\text{Max}}$ (A)	Slope (B)	$IC_{50}$ (ng/mL) (C)	$A_{\text{Min}}$ (D)	A/D	Detection range (ng/mL) ( $IC_{20}$ - $IC_{80}$ )
0.1	1:16000	1:20000	0.386	0.460	0.78	-0.007	55.1	0.038-15.926

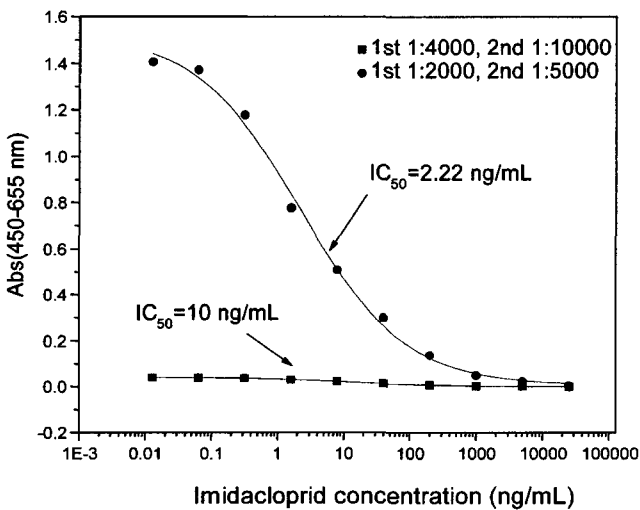


Fig. 4 Effect of dilution of the rabbit D antiserum and the goat anti-rabbit IgG-HRP on the sensitivity of the ELISA.

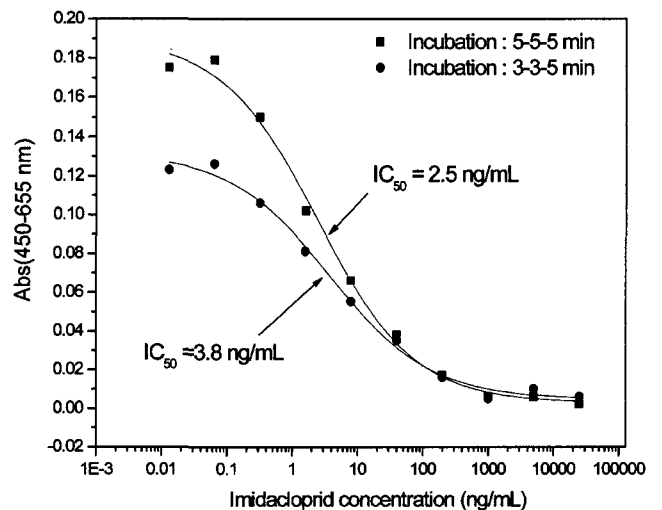


Fig. 5 The standard curve at the incubation for 3 and 5 minutes.

교하여 IC<sub>50</sub> 값이 0.78 ng/mL에서 10 ng/mL로 높아졌고 최대흡광도 값은 0.386에서 0.04로 매우 낮아졌다. 그래서 일차항체를 8배, 이차항체를 4배의 농도로 높인 결과 IC<sub>50</sub> 값은 2.2 ng/mL로 낮아졌고 최대흡광도 값도 1.5272로 급격히 증가하였다. 최소 검출한계도 0.831 ng/mL에서 0.176 ng/mL로 낮게 측정되었다. 따라서 일차항체의 농도가 1:2000, 이차항체의 농도가 1:5000이고 배양시간이 15분 일때 흡광도 값도 높아지고, 최소 검출한계도 낮아지는 것으로 확인되었다.

2) 배양시간 변화

일차항체의 농도가 1:2000, 이차 항체의 농도가 1:5000일 때 좋은 감도를 유지하며 최대흡광도 값이 높게 측정되었으므로, 배양시간을 5분과 3분으로 감소시켜 측정감도를 조사하였다. 배양시간을 5분으로 하였을 때 최대흡광도 값이 0.1901로 측정되었으며 3분으로 하였을 때 최대흡광도 값이 0.1318로 낮게 측정되었다. 측정감도 IC<sub>50</sub> 값은 2.5 ng/mL에서 3.8 ng/mL로 다소 높아졌지만 잔류 imidacloprid의 검출에는 무리가 없을 것이라고 판단된다. 최소 검출한계는 0.237 ng/mL과 0.326 ng/mL로 확인되었고, 잔류 imidacloprid의 국내허용기준인 0.05~6 µg/mL(이 등, 2003) 보다 낮은 검출한계를 가지므로 현장에서의 사용이 가능할 것으로 판단된다.

나. 시스템 성능평가

각 펌프별로 운반되는 양을 정밀저울로 10회 측정된 결과 0.3%의 정확도를 나타냈다. 신속한 측정을 위해 수정된 효소면역분석법의 공정에 따라 증류수를 운반한 결과 시료 운반에 3분, 큐벳 세척에 5분, 배양과정에 5분이 소요되어 전체

검출 시간은 23분 소요되었으며, 배양시간을 3분으로 할 경우 19분정도가 소요되었다. 시료 운반 및 세척 과정의 추가 단축이 가능할 것으로 예상되어, 전체 검출시간은 단축될 것으로 판단된다.

흡광도 측정 시스템의 반복성을 조사하기 위해 1 mL의 증류수를 넣은 큐벳을 블록에 삽입과 제거를 반복하며 연속 측정된 흡광도 값 20개의 평균값을 30회 반복 실시한 결과, 출력전압은 3.4 V, 표준편차는 0.003 V로 정밀도가 99.9%로 나타났다. 계측 시스템으로부터 시간변화에 따라 일정한 전압이 출력되었으며 160분 이후에 0.3%의 감소현상이 나타났다. 따라서 장시간 사용에 따른 출력 값의 오차가 있을 것으로 예상되며 이의 보완이 필요할 것이다. 표류(drift)현상을 최대한 줄이기 위해 증폭기에는 정전압 안정전원을 공급하였으며 회로에 사용된 저항은 오차가 1%인 금속피막 저항을 사용하였다.

다. 종합 시스템 성능

효소면역 분석법을 위한 완충액과 농도별 imidacloprid 용액을 이용해 종합 시스템의 성능을 조사하였다. 그림 8은 배양시간을 5분과 3분으로 했을 때의 용액의 농도와 출력전압의 교정곡선을 나타낸다. 출력전압은 4회 측정된 값의 평균값을 나타낸다. 그림 9는 그림 8의 출력전압을 식 (1)로 계산하여 농도별 상대 흡광도 값을 나타낸 교정 곡선이다. 그림 8에서 보듯이 imidacloprid의 농도 0.32 ng/mL에서 배양시간을 5분으로 하였을 때 2.826 V가 출력되었으며, 배양시간을 3분으로 하였을때 3.058 V가 출력되었다. 이때의 흡광도 값은 각각 0.080과 0.046로 측정되었다. 또한 imidacloprid의

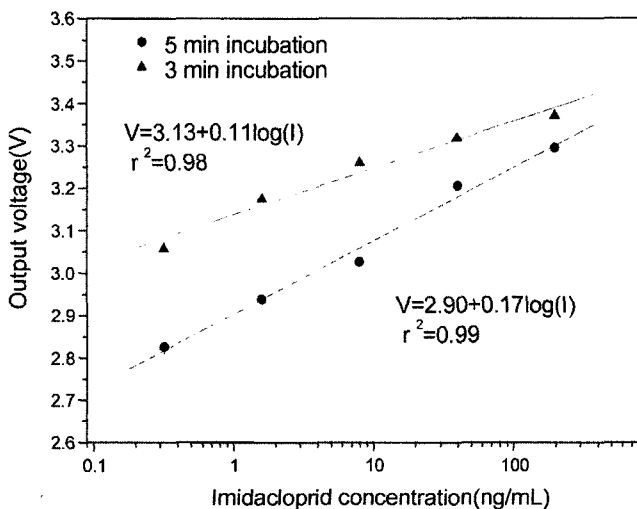


Fig. 6 Calibration of output voltage versus imidacloprid concentration with two incubation periods.

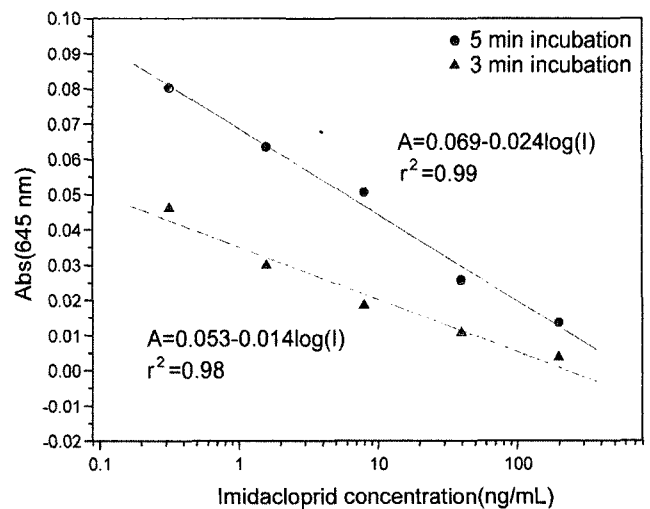


Fig. 7 Calibration of optical density versus imidacloprid concentration with two incubation periods.

농도 200 ng/mL에서는 배양시간을 5분으로 하였을 때 3.295 V가 출력되었고, 배양시간을 3분으로 하였을 때 3.371 V가 출력되었다. 이때의 흡광도 값은 각각 0.014과 0.004로 나타났다. 배양시간을 5분에서 3분으로 했을 때 출력전압의 값은 증가하고 흡광도 값은 감소했지만 전체적인 유형은 선형으로 유사한 경향을 보였다. imidacloprid의 농도 값에 상용대수를 취하여 선형회귀 방정식을 구했을 때 결정계수( $r^2$ )는 0.99과 0.98로 나타났으며 식 (2)와 (3)과 같은 교정 방정식을 얻었다.

$$V = a_0 + b_0 \log(I) \quad (2)$$

$$A = a_1 + b_1 \log(I) \quad (3)$$

여기서 V는 농도별 출력전압을 나타내며 A는 농도별 흡광도 값을 나타낸다. I는 imidacloprid의 농도를 나타내며, a와 b는 상수이다. 배양시간을 3분으로 하여 imidacloprid의 농도를 측정하는데 걸리는 전체 시간은 펌프 및 밸브의 작동시간을 포함하여 19분 정도가 소요된다. 실험실에서 효소면역분석법으로 imidacloprid를 검출하는데 2시간 이상이 소요되는 것과 비교하여 상당히 단축된 시간이다.

#### 4. 요약 및 결론

본 연구는 농산물에 잔류하는 살충제 imidacloprid의 검출을 위해 실험실에서 시행되어 오던 효소면역분석법을 기본으로 하여, 신속한 검출이 가능한 바이오센서의 개발을 위해, 생물 반응시스템 및 계측제어 시스템의 개발에 목적을 두었으며 연구내용과 결과를 요약하면 다음과 같다.

효소면역분석법을 기본으로 현장에서 사용 가능하며 20분 이내의 신속한 측정이 가능 하도록 시료의 운반을 위해 마이크로 펌프와 밸브를 사용하여 생물 반응 시스템을 구성하고, 흡광도 측정을 위해 광다이오드, 포토다이오드, 신호처리회로 및 제어용 마이크로컴퓨터를 사용하여 계측시스템을 구성하였다. 마이크로컴퓨터는 효소면역분석법의 순서에 따라 제반 공정을 제어하였다. 마이크로펌프의 시료 운반 성능을 평가한 결과 99.7%의 정확도를 보였으며, imidacloprid의 농도 측정을 위한 계측시스템의 성능을 평가한 결과 99.7%의 높은 정밀도를 확인하였고, 표류(drift)에 의한 오차는 160분 이후 0.3%로 확인되어, 잔류 imidacloprid의 농도 측정에 문제가 없을 것으로 판단된다.

기존의 효소면역분석법(Lee et al., 2001)은 imidacloprid의 검출을 위해 2시간 이상이 소요되었다. 시간을 단축시키기 위해 일차 및 이차 항체의 농도를 높이고 배양시간을 15분으로

했을 때 감도 변화를 관찰한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 10 ng/mL, 2.2 ng/mL로 나타났다. 이는 효소면역 분석법의 IC<sub>50</sub> 값인 0.78 ng/mL 보다 높게 나타나 감도는 낮아졌으나, 국내 작물별 imidacloprid의 허용 잔류량의 최소한계인 0.05~6.0 µg/mL 이하로 센서에 적용이 가능한 것을 판단된다. 항체의 농도를 높이는데 한계가 있고 측정 비용의 상승을 고려하여, 배양시간을 15분에서 5분과 3분으로 단축시킨 결과 IC<sub>50</sub> 값이 각각 2.5와 3.8 ng/mL로 나타나 감도 변화엔 별로 영향을 미치지 않았다. 따라서 변형된 효소면역분석법을 기초로 한 센서 시스템으로 검출하는 경우 소요시간은 11분으로 단축됨으로써 imidacloprid의 신속한 현장용 측정 장치로 이용 가능할 것이다.

효소면역분석법에 사용되는 완충액과 imidacloprid의 농도별 용액으로 출력전압 및 흡광도를 측정된 결과 선형회귀 방정식을 얻을 수 있었으며, 실험실용 효소면역분석법의 감도에는 미치지 못하였지만 전체적인 경향은 비슷하게 나타났다. 또한 배양시간을 5분, 3분으로 했을 때 농도에 따른 출력전압 및 흡광도 차이는 있지만 비슷한 유형의 선형 방정식을 얻을 수 있었다. 시료운반 및 배양시간을 포함하여 imidacloprid의 검출을 위한 최단 시간은 19분 정도가 소요되었다. 향후 농작물에 잔류하는 imidacloprid의 시료채취 장치의 추가 연구로 농산물 잔류 imidacloprid의 신속한 측정을 위한 바이오센서의 개발이 가능하리라 판단된다.

#### 참고 문헌

1. Delwiche, M. J, X. Tang, R. BonDurant and C. Munro. 2001. Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Trans. of the ASAE* 44(6):1997-2002.
2. Lee, J. K., K. C. Ahn, O. S. Park, S. Y. Kang and B. D. Hammock. 2001. Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. *J. Agric. Food Chem.* 49:2159-2167.
3. 김남수. 2002. 식품중에 유해세균 신속검출을 위한 면역센서 개발동향. *보건산업기술동향*: 34-42. 한국보건산업진흥원 편집부.
4. 박선화. 2003. 살균제 Fenarimol 잔류물 검출을 위한 효소면역 분석법 개발. *충북대학교 석사학위논문*.
5. 송석진, 조한근. 2003. 살충제 imidacloprid 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법. *한국농업기계학회지* 28(6):505-510.
6. 이영순, 이형주, 송인상, 김창민, 홍무기, 최동미, 황인균, 이강봉, 오금순, 임무혁, 서정혁, 허수정. 2003. 식품의 농약 잔류허용기준. *식품의약품안전청*.
7. 정영호, 김장영, 김정환, 이영득, 임치환, 허장현. 2000. *농약학*. 시그마프레스.