

## Cobalt Phthalocyanine 탄소유기 전극을 이용한 농약 잔류량 측정 센서개발

유영훈 · 조형준 · 박원표<sup>1</sup> · 현해남<sup>1\*</sup>

제주대학교 물리학과, <sup>1</sup>제주대학교 생물산업학부  
(2010년 1월 4일 접수, 2010년 3월 22일 수리)

### Development of Electro-Biosensor for the Residual Pesticides using Organic Carbon and Cobalt Phthalocyanine

Younghun Yu, Hyungjun Cho, Won-Pyo Park<sup>1</sup> and Hae-Nam Hyun<sup>1\*</sup>(Department of Physics, Cheju National University, Ara-dong, Jeju 690-756, Korea, <sup>1</sup>School of Bioscience and Industry, Cheju National University, Ara-dong, Jeju 690-756, Korea)

We have developed the bio-electrode measuring the variance of the amount of acetylcholine affected by residual pesticide. The working electrode of the biosensor was made by combination of cobalt phthalocyanine and carbon organic compounds. The biosensors were constructed by screen-printing method. The principle of working electrode is similar to thiocholine sensor. We have fabricated the biosensor using standard screen printing method. Generally, the biosensor made by printing method formed thick-film biosensor. When the electrodes were made by electrochemical cells, the generation of current by the addition of enzyme substrate was inhibited by standard solutions of organo-phosphate pesticides. The detection limit of biosensor is about 0.5  $\mu\text{g/L}$  for carbofuran. We could improve the responsibility of the sensor by controlling the cobalt phthalocyanine and thiocholine concentration ratio. Also we have tested the EPN and chlorpyrifos and found that the biosensor is applicable to fast determination of residual pesticides.

**Key Words:** Biosensor, Pesticide, Thick-film sensor

### 서 론

현재 유전공학의 발전으로 배양을 통한 효소개발 및 생산이 활기를 띠고 있으며, 그에 따라 많은 장점을 갖는 효소들이 개발되고 있다. 더불어 효소의 항원 항체 반응 등을 이용한 바이오센서들이 개발되고 있으며, 곤충 및 동물들을 통해서만 생산되던 효소들이 배양 및 복제를 통한 대량 생산화가 이루어지고 있어 바이오센서를 통한 검사 및 측정법은 많은 주목을 받고 있다(Bruno et al., 2006, Cho et al., 2005, Ciucu, 2001).

그리고 바이오센서는 선택성을 가져 한 종류의 물질에 대하여 정밀하게 측정하는 센서와, 선택성은 없지만 저해 물질

을 이용하여 여러 물질의 양을 측정할 수 있는 센서가 있다. 특히 유기인계 농약의 경우 그 종류가 매우 많아 선택성이 있는 센서를 사용하는 것은 매우 어렵고, 효소를 이용하여 저해정도를 측정하는 방법이 많이 사용되고 있다. 이러한 바이오센서의 경우 효소의 화학적 반응의 정도를 측정하는 방법과, 효소에 발색을 시켜 발색정도의 차이를 측정하는 방법이 있다. 화학적 반응의 정도를 측정하는 방법의 경우, 특정 원소의 함량 및 산성도를 측정하는 방법이 주로 이용되고 있으며, 발색을 이용한 바이오센서는 측정하고자 하는 현상 및 물질의 특성에 따라 그 발색정도가 달라지도록 만든 것으로, 대부분 분광기를 이용하여 측정한다(Cui et al., 2000, Mitchell, 2004). 그러나 분광 방법은 CCD(Charged Coupled Device)와 회절격자를 이용하므로 고가 일 뿐 아니라, 파장의 공간적 분리를 통한 분광 방법으로 공간적 제약이 따르며, 단파장을 이용한 분광 방법의 경우 색상에 따른 반사 세기의 차이를 측정하는 방법으로 조사 광원의 세기 변화에 따라 측

\*연락처:

Tel: +82-64-754-3345 Fax: +82-64-754-6665

E-mail: hnhyun@jejunu.ac.kr

정값이 달라지거나, 바이오센서의 화학적 처리과정에서 발생하는 수막 등의 현상에 따라 그 값이 달라져 분광 정보를 얻기가 어렵다. 또한 분광을 이용한 방법은 시료의 색소 등에 의해 영향을 받아 신뢰성에 문제가 발생한다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 분광학적인 방법이 아닌 다른 방법이 요구되고 있다. 이러한 방법 중 한 가지가 현재 많이 연구되고 있는 전극을 이용한 방법이다(Parikh et al., 2004, Reshetilov, 2005, Rich and Myszk, 2005, Savran et al., 2003, Spence et al., 2003). 전극을 이용한 방법은 시료의 색소 영향이 없을 뿐만 아니라 시료의 전처리 과정에서 오는 오차를 줄일 수 있고 측정 시 편리하다는 장점이 있다.

본 연구에서는 효소를 이용한 바이오 전극을 제작하였으며, 농약에 의한 효소의 저해율을 측정하여 시료 내에 있는 농약의 잔류량을 측정할 수 있는 센서를 개발하였다.

### 재료 및 방법

바이오센서의 전극 제작을 위하여 Ag 페이스트, Ag/AgCl 페이스트, CoPh(cobalt phthalocyanine) 페이스트를 사용하였다. Ag 페이스트는 Ag 함유량이 80%이며, 기준전극은 Ag/AgCl=60/40 인 것을 사용하였다. Ag와 Ag/AgCl는 Gwent사(미국)에서 구매하였다. 그리고 CoPh는 Aldrich사(미국) 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 ATChE(Acetylthiocholine Esterase)는 소일테크사(제주, 한국)에서 초파리 유전자를 이용하여 배양 한 것을 사용 하였으며, ATCh(Acetylthiocholine) 는 Sigma사(미국) 제품을 사용하였다. 본 연구에서는 thiocholine 센서를 이용하여 전하량을 측정하여 잔류농약의 정도를 간이법으로 측정하는 연구를 하였다. 즉 thiocholine 양에 따라 작동전극과 기준전극, 혹은 작동전극과 보상전극 사이의 전기 전도도가 달라지고, 이에 따라 기준전극과 작동전극 사이의 전압도 달라진다. 이러한 변화를 측정함으로써 thiocholine 양의 변화를 측정 할 수 있고, 잔류 농약의 정도를 알 수 있다.

제작된 바이오 전극의 선형성 검사를 위하여 바이오전극에 ATChE 농도를 변화시키면서 바이오센서의 출력을 측정하였다. 측정은 1 mM ATCh(10 mM KCl) 200  $\mu$ l 에 ATChE 를 10 mM KCl에 희석하여 20 unit/mg의 농도로 만든 후 20  $\mu$ l씩 첨가하면서 측정하였다, 이와 같이 선형성과 반응성을 확인 한후, 카보후란, EPN 및 클로로피리포스 의 농도를 변화 시키면서 제작된 바이오 센서의 출력을 측정하였다.

### 전극제작

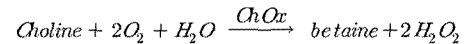
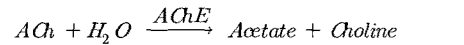
일반적으로 저해율을 이용하는 바이오전극은 AChE를 많이 사용한다. 이를 이용한 잔류 농약 측정원리는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1(a)는 choline 센서의 원리이고, (b)는 thiocholine 센서 원리이다. Fig. 1(a)에서 보는 것과 같이 바이오 전극에 있는 ACh(acetylcholine)과 물(H<sub>2</sub>O)이 AChE와

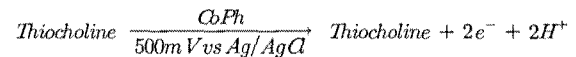
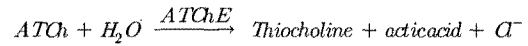
반응하여 acetate와 choline을 생성한다. 여기서 AChE는 농약에 의하여 저해되고 남은 양이므로, 생성되는 choline의 양은 농약의 양에 반비례한다. 이러한 choline을 측정하기 위하여 choline oxidase를 이용하는데, choline은 choline oxidase에 의해 betaine과 2개의 과산화수소를 만든다. 생성된 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 양은 잔류 농약에 반비례하므로 과산화수소 측정 센서를 제작하면 잔류 농약의 양을 측정 할 수 있다. 그러나 choline 센서 방법은 choline oxidase가 저온에서만 동작하는 단점이 있으므로 일반적으로 사용하기 어렵다. Fig. 1(b)는 상온에서 ATChE 효소를 이용하여 잔류 농약을 측정 할 수 있는 thiocholine 센서 원리이다. Choline 센서와 마찬가지로 농약량과 thiocholine 양은 관계가 있고, thiocholine은 CoPh과 외부 전압에 의해서 전자와 수소 이온을 발생하며, 발생된 전자의 양과 수소이온의 양은 thiocholine 양에 비례한다. 그러므로 수소 이온의 양을 측정하거나 전하량을 측정하면 농약 잔류량을 측정할 수 있다.

Thiocholine 센서를 일반적인 스크린 프린팅방법을 이용하여 Fig. 2와 같이 제작하였다. 기준전극(RE)은 Ag/AgCl 페이스트를 이용하여 제작하였고, 보상전극(CE)은 Ag, 작동전극 (WE)은 탄소유기물과 CoPh를 섞어 제작하였다.

그리고 작동전극의 크기는 지름이 2.5 mm 이고 전극의



(a)



(b)

Fig. 1. Principles of measurement of AChE activity. (a) choline sensor, (b) thiocholine sensor.

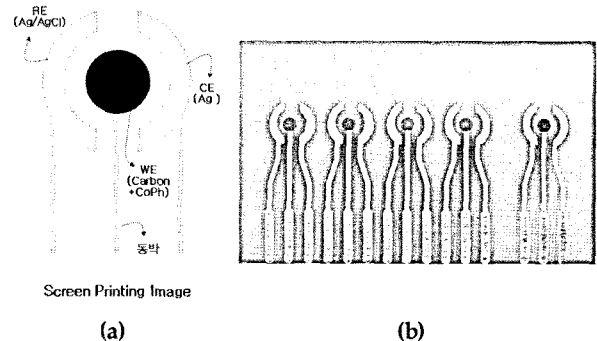


Fig. 2. Schematic diagram of the sensor and screen printed sensor array. RE: reference electrode, CE: counter electrode, WE: working electrode. (a) design of sensor, (b) screen printed sensor array.

전체 크기는 지름이 6 mm 되게 제작하였다.

작동전극 제작 시 적정한 탄소 유기용매와 CoPh의 비율을 알아보기 위하여 CoPh의 양을 조절하며 센서의 반응성을 살펴보았다. 그 결과는 Fig. 3과 같다. CoPh의 비율이 3 ~

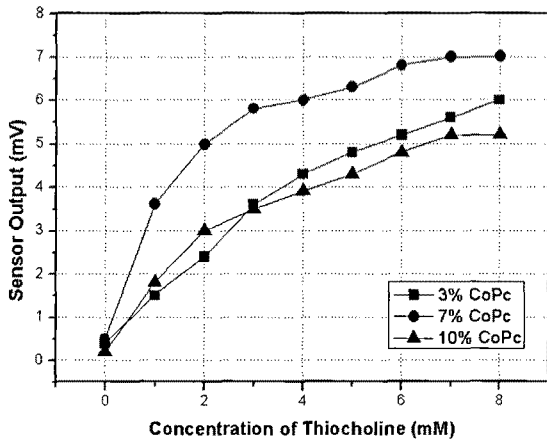
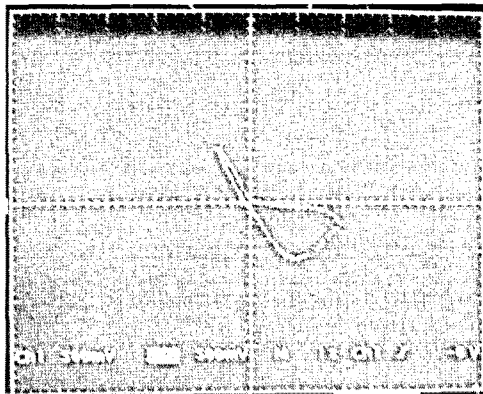
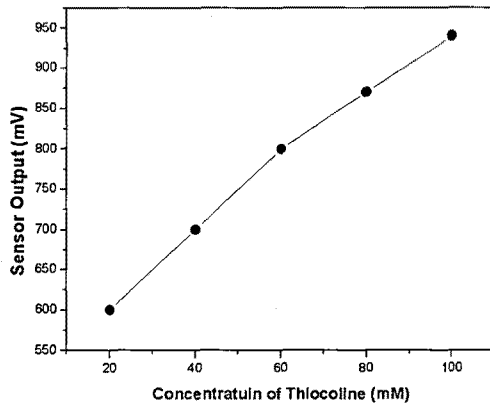


Fig. 3. Response of three electrodes containing three different CoPh to organic carbon.



(a)



(b)

Fig. 4. (a) cyclic voltammogram of biosensor containing 7% CoPh, (b) sensor output as a function thiocoline concentration.

10% 인 경우 thiocholine 의 농도 변화에 따라 센서의 반응이 모두 잘 일어났다. thiocholine 농도가 0 ~ 8 mM 범위에서 CoPh의 비율이 3% 인 경우가 선형성이 가장 좋았고, 7% 인 경우는 thiocholine의 농도가 작은 범위에서 출력 변화가 컸다. 실제 본 연구에서 측정할 범위는 thiocholine 의 농도가 2 mM 이하이기 때문에 센서의 출력 변화율이 가장 좋은 7%를 취하였다. 기준전극과 보상전극은 실크 프린트 후 약 120°C 에서 15분간 건조하였고, working 전극은 전극 제작 후 80°C 에서 약 3시간 동안 건조하였다.

제작된 전극의 thiocholine 량에 따른 전극의 전도성 변화를 보기 위하여 thiocholine 농도에 따른 실험을 하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같다. 이때 전해질 용액으로는 10 mM 염화칼륨(KCl) 용액을 사용하였고, 측정은 CV(cyclic voltmetry) 방법을 이용하였다.

Fig. 4(a)는 CV 방법에 의한 전형적인 오실로그래프이고 (b)는 thiocholine 농도에 따른 센서의 출력 값이다. Fig. 4(a)에서 오실로그래프이 비대칭인 것은 산화 환원 반응이 대칭적이지 않기 때문이다. 그리고 Fig. 4(b)로부터 thiocholine 농도에 따라 전극의 출력값을 보여 주고 있는데, 이를 1차원 회귀 분석한 결과 상관계수(R: correlation coefficient) 값이 0.97 이었다. 이 결과로부터 Thiocoline 농도에 따라 전극의 출력 값이 선형적으로 변화됨을 볼 수 있는데, 이로부터 전극이 성공적으로 제작되었음을 알 수 있었다.

### 결과 및 고찰

Fig. 1(b)에서와 같이 농약이 ATChE를 저해하므로, ATChE 농도가 농약 양과 반비례한다. 즉 ATChE의 농도를 측정하면 농약 잔류량을 측정할 수 있다. 바이오전극에 ATChE 농도를 변화시키면서 바이오센서의 출력을 측정하였다. 측정은 1 mM ATCh(10 mM KCl) 200 μl 에 ATChE를 10 mM KCl에 희석하여 20 unit/mg의 농도로 만든 후 20 uL씩 첨가하면서 측정하였고, 그 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서

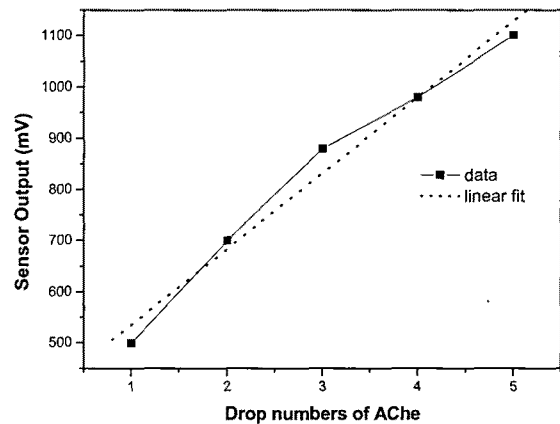


Fig. 5. Sensor outputs as a function of AChE drop numbers.

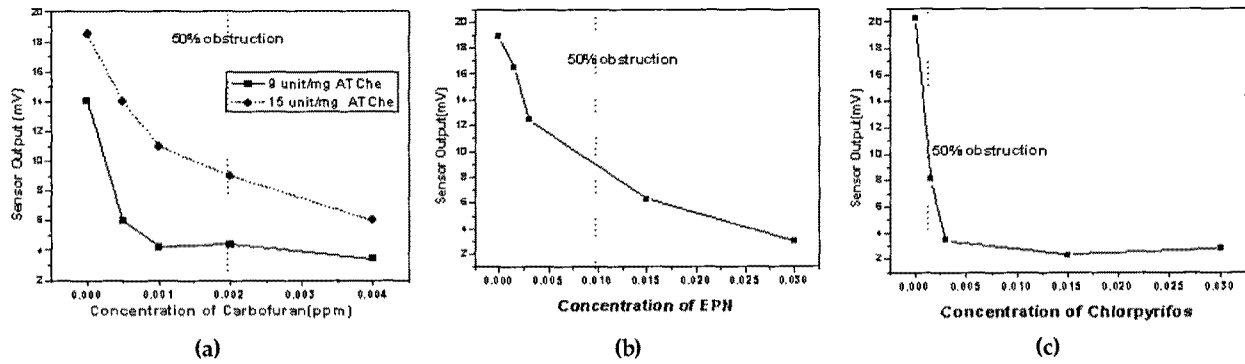


Fig. 6. Sensor response with different pesticides. (a) sensor output as a function carbofuran concentration with different working electrode. ●: 15 unit/ mg ATChE working electrode, ■: 9 unit/ mg ATChE working electrode, (b) sensor output with different EPN concentration, (c) sensor output with different chlorpyrifos concentration.

보는 것과 같이 ATChE를 첨가하면, 즉 ATChE 농도를 증가시키면 바이오센서 출력 값이 선형적으로 증가함을 볼 수 있는데, 이를 선형 회귀분석을 통해 분석한 결과 Fig. 5의 점선과 같다. 회귀 분석을 통해 얻은 일차 함수의 기울기는 148.2였으며, 선형 회귀 분석과 측정된 데이터간의 상관계수는 0.96 이었고 표준 편차는 39.63 이다. 이를 통해 본 연구에서 제작된 바이오센서가 선형적으로 Fig. 1(b)와 같이 잘 반응함을 알 수 있었다.

이 실험 결과를 토대로 실제 농약과의 반응을 알아보기 위하여 센서에 카보후란을 첨가하면서 전극의 출력 값을 측정하였다. 즉 외부에서 ATChE와 농약을 반응시킨 후 센서에 떨어뜨려 측정하였다. 그 결과는 Fig. 6(a)와 같다. 그림에서 50% 저해율로 표시된 부분은 기존의 잔류농약 정밀법으로 측정하였을 때 50% 저해율의 결과가 나오는 카보후란 농도이다. Fig. 6에서 실선은 9 unit/mg ATChE와 1mM KCl을 전해질로 사용한 경우의 실험 결과이다. 이 결과는 극소량의 농약에도 매우 민감한 반응을 보임을 확인 하였다. 그러나 현재 50% 저해율을 기준으로 볼 때 농약의 농도가 일정 수준 이상에서는 효과적인 반응을 할 수가 없으므로, 즉 0.001 ppm 이하에서는 선형적으로 반응하나 그 이상에서는 반응 정도의 차이가 미미하여 센서로서는 적합 하지 못하다. 이를 극복하기 위하여 ATChE의 농도를 15 unit/mg 로 변경하여 실험을 하였고, 그 결과가 Fig. 6(a)의 점선이다. Fig. 6(a)의 결과 카보후란 농도가 0 ~ 0.04 ppm 범위에서 센서의 반응이 거의 선형적임을 알 수 있다. 또한 측정값의 재현성을 위하여 1개 시료 당 100번씩 측정한 결과 측정값의 오차가 2% 미만이었다. Fig. 6(b)는 유기인계 농약 중 하나인 EPN에 대한 결과이고 Fig. 6(c)는 클로로피리포스 농약에 대해 실험한 결과이다. Fig. 6 (b), (c)에서 점선은 Fig. 6(a)에서와 같이 정밀법으로 측정하였을 때 저해율이 50%인 농도이다. Fig. 6의 결과 3가지 농약에 대해서 탄소 유기체와 CoPh를 혼합하여 제작한 전극이 농약 잔류량 측정센서로서 매우 적합함을 알 수 있었다. 그리고 센서 출력값이 선형적인 농도

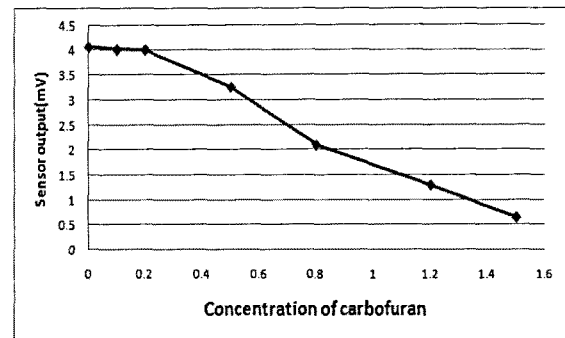


Fig. 7. Sensor sensitivity of carbofuran concentration.

범위가 넓지 못하나 저해율을 측정하는 간이 잔류농약 측정법에서는 충분히 이용 가능하다고 생각된다. 이러한 센서를 좀 더 넓은 범위에서 사용하기 위해서는 선형적 변화구간을 확장 시킬 필요가 있는데, 이는 센서 디자인을 바꿈으로서 가능하리라 생각되며 이는 추후 연구 할 계획이며, 다양한 농약에 대하여 실험을 진행 할 계획이다.

그리고 일반적으로 잔류농약을 검사 할 때 한 가지 농약만이 검출 되는 것이 아니고, 여러 농약이 복합된 형태의 것을 검출해야 할 필요성이 있고, 이에 대한 연구를 진행 할 계획이다. 그런데 Fig. 6의 결과 50% 저해율을 나타내는 센서의 출력값이 3가지 농약에 대하여 8 ~ 10 mV 사이의 값이다. 즉 농약 종류가 달라도 50% 저해율을 나타내는 출력값이 비슷하기 때문에 복합된 농약의 저해율을 조사하는데도 사용 할 수 있으리라 사료된다.

Fig. 7은 센서의 한계감도를 측정하기 위하여 ATChE의 농도는 15 unit/mg이며 카보후란 농도에 대한 센서의 출력 전압을 측정한 결과이다. 0.5 µg/L 미만의 농도에서는 센서 출력전압의 표준편차가 카보후란이 첨가되지 않은 상태(0 µg/L)의 센서출력전압과 거의 차이를 보이지 않으므로 카보후란 농도에 따른 센서의 반응을 기대할 수 없는 반면, 0.5 µg/L 이상의 농도에서 그 반응을 충분히 분별할 수 있음을 알 수 있다. 카보후란의 농도가 0.5 µg/L에서는 센서출력전압

이  $3.26 \pm 0.26$  mV 로 카보후란이 첨가되지 않은 상태의 출력전압  $4.06 \pm 0.27$  mV 에 대하여 확연히 구분되므로, 카보후란에 대한 센서의 감도 한계는 약  $0.5 \mu\text{g/L}$  수준임을 알 수 있다.

## 요 약

본 연구에서는 탄소 유기물과 CoPh를 혼합하여 농약 잔류량을 측정 할 수 있는 바이오센서를 구현 하였다. 작동 전극은 탄소유기물과 CoPh를 섞어 사용하였고 비율은 CoPh를 7%로 제작하였다. CoPh가 7%인 경우 저 농도 thiocholine 농도에서도 민감하게 반응하였다. 대표적인 농약인 카보후란에 대하여 센서의 감도 한계는 약  $0.5 \mu\text{g/L}$  수준이며, 농약 농도에 따른 전극의 출력이 선형적인 결과를 얻었다. 또한 EPN 및 클로로피리포스 농약 에 대하여 실험 한 결과 카보후란과 같이 농도에 따라 효과적으로 반응하는 것을 확인하였다. 이러한 센서는 현재 농약 잔류량 측정에 사용되는 비색법과 비교하여도 감도 및 선형성 면에서 뒤떨어지지 않으며, 간이 농약 잔류량 측정기 센서로 사용가능성이 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 농림기술관리센터(ARPC) “농림기술개발사업” 지원에 의해 연구되었습니다.

## 참고문헌

- Bruno, J.P., Sarter, M., Gash, C., and Parikh, V. (2006) Choline and acetylcholine-sensitive microelectrode, *Encyclopedia of Sensor*. 10, 1-15.
- Cho, H., Yu, Y., and Hyun, H. (2005) Development of Biosensor reader system for the Residual Pesticides using White light Source and Color-sensor, *Hankook Kwanghak Hoeji*. 8(16), 433-438.
- Ciucu, A. (2001) Organic phase amperometric biosensor for detection of pesticides, *Roum. Biotechnol. Lett.* 7(2), 667-676.
- Cui, G., Yoo, J., Lee, S., Nam, H., and Cha, G. (2000) Differential thick-film amperometric glucose sensor with an enzyme-immobilized nitrocellulose membrane, *Electroanalysis*. 13(3), 224-228.
- Mitchell, K.M. (2004) Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensor characterized in vitro and in vivo, *Anal. Chemistry*. 76(4), 1098-1106.
- Parikh, V., Pomerleau, F., Huetti, P., Gerhardt, G.A., Sarter M., and Burno, J.P. (2004) Rapid assessment of in vivo cholinergic transmission by amperometric detection of change in extracellular choline levels, *European J. Neuroscience*. 20, 1545-1554.
- Reshetilov, A.N. (2005) Biosensors 2004: The eighth world congress on biosensors, *Appl. Biochem. Microbiology*. 41(2), 219-223.
- Rich, Rebecca L., and Myszka, David G. (2005), Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature, *J. Mol. Recognit.* 18, 1-39.
- Savran, C.A., Burg, T.P., Fritz, J., and Manalis, S.R. (2003) Microfabricated mechanical biosensor with inherently differential readout, *Appl. Phys. Lett.* 83(8), 1659-1661.
- Spence, M.M., Rubin, S.M., Dimitrov, I.E., Janette Ruiz, E., Wemmer, D.E., Pines, A., Yaoi, S.Q., Tiani, F., and Schultz, P.G. (2003) Functionalized xenon as a biosensor, *PNAS*. 98(19), 10654-10657.