

최 중  
연구보고서

과채류 잔류 Imidacloprid의  
실시간 측정장치 개발

Development of a Real Time  
Measurement System for  
Imidacloprid Residues in  
Fruits and Vegetables

연 구 기 관

충북대학교 농업생명환경대학

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “과채류 잔류 Imidacloprid의 실시간 측정장치 개발” 과제  
의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11 15일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 조 한 근

연 구 원 : 이 재 구

# 요 약 문

## I. 제 목

과채류 잔류 Imidacloprid의 실시간 측정장치 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

효과적인 농약의 개발로 식량문제는 상당히 해결되었으나, 반복 사용에 따른 잔류농약의 축적으로 환경오염을 초래하게 되어 인류의 건강과 생명을 크게 위협하고 있다. 또한 세계 무역자유화의 영향으로 농축산물의 수입이 증가하고 있고, 수입농산물에 대한 잔류농약의 신속하고 정확한 검출의 중요성이 더욱 증대되고 있는 실정이다.

실험실에서의 잔류 농약 측정은 시료의 운반이나 분석을 위해 많은 시간과 노력이 요구하며 숙달된 전문가가 반드시 필요하며, 농약에 의한 오염 정도는 지역간 또는 동일한 지역 내에서도 변이가 커, 많은 양의 시료를 취급해야 하는 문제를 수반하므로 측정 부하가 급속히 증가되는 문제를 갖고 있다. 이를 해결하기 위하여 실시간 측정이 가능하며 비전문가도 사용 가능한 간편한 측정장치의 개발이 필요하다.

국내 농업 및 환경 분야에서의 현장사용에 초점을 맞춘 실시간 측정장치 개발에 관한 연구는 매우 미약한 실정이며, 현장용 실시간 측정장치는 생물학적인 감지요소와 전기전자 변환기의 조합형태로 되어 생화학적인 반응을 이용한 소량의 화학물질을 정확히 측정할 수 있을 뿐 아니라, 전기전자 변환요소를 채택하고 있어 실시간 대의 신속한 분석이 가능하여 부가가치가 높은 첨단산업에 속한다. 선진국에서는 보건, 의료 및 국방 등의 분야에서 연구가 활발하며 최근에는 농업 생명 분야로 적용을 확대하는 추세이다.

농산물이나 식품에 대한 안전성, 토양 및 지하수에 대한 환경오염에 대한 우려가 심각해지고 있어 농산물, 식품안전이나 환경보호와 관련된 산업은 급격히 확대될 전망이다, 21세기는 생명공학의 시대로서 이 분야의 경제규모가 천문학적인 숫자로 증가할 전망이다. 우리나라의 경우 충분히 발달된 전기전자 부품기술로 저가의 고기능 바이오센서 개발을 통한 산업화가 가능하여 수출 유망품목이 될 전망이 유력하며, 타 후진국 또는 개발도상국에 의해 많은 도전을 받고 있는 국내 경제와 산업의 경쟁력을 높이기 위해서는 부가가치가 높은 첨단기술의 개발이 절실히 요구된다.

따라서 본 연구는 국내에서 사용되는 대표적 농약인 Imidacloprid의 과채류 잔류량을 소요시간 60분 이내에 최소량 50ng/mL을 정량적으로 측정할 수 있는 현장용 실시간 측정장치를 개발하는데 목적이 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 단독과제로 구성되어 있으며, 3년간 4개의 실험으로 구분하여 연구를 수행하였고 그 내용은 다음과 같다.

#### 실험 1. 신속한 검출방법

실시간 측정용 생물반응기술 개발을 위해 공동 연구자가 개발한 imidacloprid의 검출을 위한 ELISA의 변형을 통해 측정장치 개발에 활용될 수 있는 신속한 검출방법을 개발한다.

#### 실험 2. 생물반응 및 계측제어 시스템

실시간 검출방법의 자동화를 위한 자동반응 시스템, 신호처리 시스템 및 제어 시스템을 개발한다.

### 실험 3. 단클론항체 제조기술

Imidacloprid용 단클론항체를 제조 기술을 개발한다.

### 실험 4. 시료수집장치

시료를 자동으로 수집하고 처리하는 기술을 개발한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

#### 실험 1. 신속한 검출방법

보고된 바 있는 실험실용 잔류 Imidacloprid 검출을 위한 효소면역분석법은 HPLC나 GC에 비해 노력과 분석시간을 절약할 수 있다. 그러나 시료 및 시약의 준비 후 분석에 최소 2시간 이상이 소요되므로 실시간 측정에 사용하기는 부적합하다. 잔류 Imidacloprid의 실시간 검출을 위한 바이오센서 개발의 기초연구로서 효소면역분석법에 의한 신속한 검출방법을 개발하였다. 우선 실험실용 효소면역분석법을 재현하여 동일한 결과를 얻도록 하였다. 따라서 실험실에서 사용한 기기 및 방법을 그대로 사용하여, 분석시간의 단축을 위해 배양시간, 코팅항원농도 및 항체 희석비를 변화시키며 반복실험을 통해 최적의 검출방법을 구하였으며, 실험실용 효소면역분석법의 감도와 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

코팅항원의 농도를 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 로 하고, 항체의 희석비를 1:4000, 배양시간을 3분으로 수정한 결과, 분석 시간을 2시간에서 15분으로 단축할 수 있었으며, 측정 감도를 나타내는  $\text{IC}_{50}$  값은 34.6 ng/ml로 확인되었다. 이

값은 실험실용 효소면역분석법의 15 ng/ml 보다 높으나, 국내 작물별 imidacloprid 허용 잔류량의 최소 검출한계인 0.05~6.0 µg/mL(ppm)보다 낮아 바이오센서용 검출 방법으로 문제가 없을 것으로 판단된다.

## 실험 2. 생물반응 및 계측제어 시스템

실험 1에서 개발된 신속한 검출방법을 기본으로 하여, 현장에서 사용할 수 있는 생물반응 및 계측제어 시스템을 구성하였다. 반응조로는 흡착성이 좋은 일회용 polystyrene cuvetts을 사용하였고, 시료와 시약의 운반을 위해 마이크로 펌프와 솔레노이드 밸브를 사용하였고, 흡광도 측정을 위해 광다이오드와 포토다이오드를 반응조에 설치하였다. 포토다이오드에서 변환된 신호는 신호처리과정을 거쳐 마이크로컴퓨터에 입력된다. 마이크로컨트롤러는 효소면역분석법의 절차에 따라 펌프, 밸브, 광다이오드 등을 제어한다.

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, 표류에 의한 오차는 160분 이후 0.3%로 확인되어, 잔류 imidacloprid의 농도 측정에 문제가 없을 것으로 판단된다.

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 소요시

간은 11분으로 단축됨으로써 imidacloprid의 신속한 현장용 측정 장치로 이용 가능할 것이다.

효소면역분석법에 사용되는 완충액과 imidacloprid의 농도별 용액으로 출력전압 및 흡광도를 측정한 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.

### 실험 3. 단클론 항체 제조

항체는 일반적으로 다클론 항체(polyclonal antibody)와 단클론 항체(monoclonal antibody)로 구분하는데, 다클론 항체는 생산기간이 3-6개월 정도로 단클론 항체의 약 1년에 비해 짧아 생산하기 쉽지만 단클론 항체는 대량생산이 가능하고 순도가 높아 특이성이 다클론 항체에 비해 높으며 표준화가 쉽다. 이런 이유로 인해 현장용으로 간편하게 사용될 수 있는 측정장치의 효소면역분석법에는 단클론항체의 사용이 다클론항체보다 바람직한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 imidacloprid와 특이적으로 작용하는 단클론 항체를 생산하기 위하여 imidacloprid의 hapten I 과 hapten II에 KLH를 접합시킨 항원을 사용하여 단클론 항체 생산을 시도하여 양성 hybridoma를 선별하였다. 그러나 hapten I 항원을 이용한 항체들 중에서는 양성의 잡종 세포주들이 나타나지 않았고, hapten II 항원을 이용한 항체들 중 17개의 양성 잡종세포주를 찾아 효소면역법(ELISA)으로 조사하였다. Table1에서 보듯이 각각의 면역마다 세포 융합 후 좋은 inhibition %를 나타내는 양성 잡종 세포주를 표로 나타내었다. 이들을 클론화 작업(Limiting dilution)을 거쳐 특이적으로 imidacloprid를 분석할 수 있는 단클론 항체를 찾아 계속적으로 실험을 수행하였으나 클론화 작업을 진행할수록 항체

의 activity가 떨어져 단클론 항체를 이용한 최적 ELISA의 감도가 떨어졌다. 그 중 일부를 이용하여 imidacloprid를 분석해 본 결과 낮은 감도를 보였다. 따라서 농산물 시료나 환경 중에 잔류하는 수 ppb 혹은 수 ppm의 아주 미량을 감지하고 정량하는데 적합하지 않다고 판단되었다.

#### 실험 4. 시료전처리 기술

농산물의 잔류농약 분석을 위해 실험실에서 시행하던 시료의 전처리 및 분석을 현장에서 신속하게 측정하기 위한 시료전처리 기술 개발에 목적을 두고 있으며 최적화된 효소면역분석법을 기본으로 연구를 수행하였다.

농산물의 잔류농약 분석은 시료의 전처리과정과 기기분석과정으로 나뉘며, 전처리과정에서 샘플을 채취, 추출, 여과농축, 정제하여 효소면역분석, GC/HPLC분석 등의 기기분석을 하게 된다.

배 시료에 잔류되어 있는 살충제 Imidacloprid의 추출에 microwave 방법을 이용하고자 sonication 방법과 추출효율을 비교하여 최적의 추출용매, 추출시간 및 power supply의 강도 등을 조사하였다.

배 시료에 잔류되어 있는 Imidacloprid를 microwave로 추출하기 위한 용매는 acetone이 가장 효율적이었으며, 추출효율은 sonication 20분 추출과 microwave 300W에서 온도 60℃에서 120℃, 추출시간 1분에서 3분 동안 추출한 결과를 비교하였는데 microwave 온도 100℃에서 1분 동안 추출한 결과가 우수하게 나타났다. microwave power 700W에서의 추출은 모든 조건에서 80%이상의 효율이 나타났으나, 조건에 따른 추출효율이 일정하게 나타나지 않는 것으로 보아 microwave power의 세기가 클수록 추출효율에 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각된다.

살충제 Imidacloprid가 잔류하고 있는 배 시료의 microwave를 이용한 최적의 추출조건은 power 300W, 추출용매 acetone, 추출온도 100℃에서 추출시간 1분인 것으로 나타났다.

본 연구 결과 배 시료에 잔류되어 있는 농약을 전처리하기 위해 사용

된 microwave는 추출시간, 추출용매량 등을 감소시켜 주는 효과가 있으며, 최근에 많이 사용하는 sonication 방법과 비교하여 볼 때 일정조건에서 우수한 추출효율을 보여 주었다.

## 2. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

본 연구에서 개발된 현장용 잔류 농약의 신속한 측정 기술은 미래 의학, 환경, 보건, 농수축산 등의 여러 산업에서 화학과 생물 검정기술의 현장화 및 간편화의 주축이 될 것으로 기대된다.

농작물에 잔류하는 타 농약 성분에 대한 추가 연구로 농산물에 잔류하는 다양한 종류 농약의 신속한 측정을 위한 바이오센서의 개발이 가능하리라 판단된다. 즉 농작물에 많이 사용하는 주요 농약성분의 개별적 측정을 위한 측정장치가 개발되면, 이들을 조합하여, 농작물 별 주요 농약군의 측정의 가능한 측정장치의 개발이 가능해지며 실용화가 가까워질 것으로 판단된다.

바이오센서의 실용화를 위해서는 각 농약성분에 반응하는 단클론 항체의 제조가 필수적이므로 이를 위한 연구가 병행되어야 할 것이다. 본 연구에서와 같이 imidacloprid와 강력하게 결합하는 단클론 항체를 생산하기 위해서는 imidazolidine 부위를 인지할 수 있는 hybridoma를 생각할 수 있다. 즉 imidacloprid의 pyridine환 부위에 담체단백질을 접합시켜 imidazolidine 부위를 인지할 수 있는 hybridoma를 생산하면 imidacloprid를 검출하는 경합적 효소면역법에 이용할 수 있을 것으로 예상된다.

## SUMMARY

### Experiment 1 : Rapid detection method

Imidacloprid[1-(6-chloro-3-pyridinyl)methyl-4,5-dihydro-N-nitro-1H-imidazole-2-amine] belong to a new class of substances with a great affinity for insect nicotinic acetylcholine receptors. Imidacloprid has been widely used in rice paddies to control sucking insects soil insects, and some chewing insects and in apple orchards to control various insect pests in Korea.

Several methods have been developed for the analysis of imidacloprid, high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). These instrumental methods are accurate but expensive and time-consuming, requiring lengthy sample extraction and cleanup procedures. Therefore a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the chloronicotinyl insecticide imidacloprid was developed using a polyclonal antibody produced against a hapten conjugated through the imidazolidine to keyhole limpet hemocyanin. The ELISA provides advantages of being rapid, sensitive, and cost-effective. But this method is not suitable for the biosensor use because of relatively long process time which takes 2 hours.

For the development of an ELISA for a biosensor which is to detect imidacloprid residues in real time basis, the ELISA developed earlier was modified. Incubation time was changed from 1 hour to 30, 15, 5 minutes. The dilution of

an antiserum was changed from 1:16000 to 1:8000, 1:4000. The coating antigen concentration was changed from 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . With modification of these factors, the following results were obtained:

The  $\text{IC}_{50}$  values were showed 38.4  $\text{ng}/\text{ml}$  and 45.7  $\text{ng}/\text{ml}$  at the incubation time for 30, 15 min. When the coating antigen at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and the dillution of the antiserum at 1:8000, 1:4000,  $\text{IC}_{50}$  values were showed 59.9  $\text{ng}/\text{ml}$  and 34.6  $\text{ng}/\text{ml}$ .

## **Experiment 2 : Biological reaction and measurement control system**

In this experiment, the objectives was to design a biological reaction and measurement control system to automate the rapid detection method for imidacloprid developed in experiment 1. The biological reaction part was designed for using micro-pumps and valves for fluid transport, and the measurement part consisting of a photodiode, a light-emitting diode for light measurement, and a control computer to implement assay. A polystyrene cuvet was used as a reaction chamber taking place of a microplate used in ELISA application. Signal output was read as the rate of change in optical density at 645 nm. The system could execute a measurement cycle in about 19 min.

The real-time assay showed sensitivity of 3.8 $\text{ng}/\text{mL}$ ( $\text{IC}_{50}$ ) in incubation time of 3 min, and similar sensitivity comparing with a standard assay. Sensor

calibration tests for real-time assay showed reduction of optical density as increase of imidacloprid concentration, and gave a similar tendency, indicating that the detection chemistry was successfully automated.

### **Experiment 3 : Production of monoclonal antibody**

The insecticide imidacloprid has been in wide use for the control of various insect pests of many crops and fruits in Korea as well as many other parts of the world. For the analysis of its residues in the agricultural and environmental samples resulting from its frequent use, HPLC and GC/MS have been the major tools. Although these instrumental methods are accurate, they are rather expensive, laborious, and time-consuming. As an alternative method, immunoassays have been introduced because they are generally sensitive, simple, fast, and much less expensive.

In this investigation, an ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) for imidacloprid has been undertaken using polyclonal and monoclonal antibodies. For the ELISA by polyclonal antibodies, the previous antibodies were used. Meanwhile, for the development of an ELISA by monoclonal antibodies, hapten I-KLH and hapten II-KLH were used to obtain some desirable hybridomas. Only the hapten II-KLH conjugate produced 17 positive hybridomas. The hybridomas exhibiting strong inhibition were used for the subsequent ELISA. The selected monoclonal

antibody(D6) exhibiting 95.8% inhibition at 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  imidacloprid was used for the ELISA. It showed an  $\text{IC}_{50}$  value of 7,000 ng/mL, which is very high compared to the value(17.3 ng/mL) by the polyclonal antibody. This high value is not suitable for the monitoring of crop and environmental samples which usually contain trace amounts of imidacloprid.

For the development of a more sensitive ELISA by monoclonal antibodies to detect imidacloprid residues, another hapten which can conjugate the carrier protein to the pyridine ring of imidacloprid might be used to produce the hybridoma which can recognize the imidazolidine moiety.

#### **Experiment 4 : Development of a sample pretreatment technique**

This study was conducted to elucidate extraction efficiency by microwave in comparison with sonication for extraction of insecticide residues in a pear. The acetone extraction by microwave of Imidacloprid in pear was efficient. The extraction efficiency by microwave with power of 300 and 700 watts and extraction temperature of 60 to 120  $^{\circ}\text{C}$ , heating time 1 to 3 minutes and solvent volume 10 mL was compared with that of sonication with extraction time 20 minutes and solvent volume 20 mL. The extraction efficiency by microwave power of 300W with

extraction temperature of 100 °C, heating time of 1 minute was shown to be higher than the extraction efficiency by sonication.

When pear spiked with Imidacloprid was analyzed to know the extraction efficiency of microwave, the extraction efficiency by microwave with extraction temperature of 100°C was shown to be higher than the efficiency of sonication extraction. The optimal condition for extraction of Imidacloprid in pear by microwave were 300 watts of power supply, 100°C of extraction temperature, 1 minute of heating time and 10 ml of acetone.

# CONTENTS

I. Overview of research project .....	18
1. Research object .....	18
2. Necessity of research development .....	18
3. Scope .....	20
II. Research status in domestic and foreign .....	21
1. Domestic .....	21
2. Foreign .....	21
III. Research performance contents and results .....	23
1. ELISA for real time measurement .....	23
1) Introduction .....	23
2) Materials and method .....	24
3) Results and discussion .....	34
4) Conclusion and summary .....	38
2. Biological reaction and control system .....	39
1) Introduction .....	39
2) Materials and method .....	40
3) Results and discussion .....	54
4) Conclusion and summary .....	61
3. Production of monoclonal antibody .....	63
1) Introduction .....	63
2) Materials and method .....	64
3) Results and discussion .....	75
4) Conclusion and summary .....	79
4. Sample pretreatment system .....	80
1) Introduction .....	80

2) Materials and method .....	83
3) Results and discussion .....	89
4) Conclusion and summary .....	96
IV. Achievement and contribution in related area .....	97
V. Application plan of research results .....	98
1. Accomplishment .....	98
2. Plan .....	99
VI. Collected information .....	100
VII. Reference .....	101
Appendix I. Circuit diagram .....	107
Appendix II Control program for AVR .....	108
Appendix III. Picture of a prototype .....	126

## 목 차

제1장 연구개발과제의 개요 .....	18
제1절 연구개발의 목적 .....	18
제2절 연구개발의 필요성 .....	18
1. 기술적 측면 .....	18
2. 경제·산업적 측면 .....	19
3. 사회·문화적 측면 .....	19
제3절 연구개발의 범위 .....	20
제2장 국내외 기술개발 현황 .....	21
제1절 국내의 경우 .....	21
제2절 외국의 경우 .....	21
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	23
제1절 실시간 측정용 효소면역분석법 .....	23
1. 서론 .....	23
2. 재료 및 방법 .....	24
3. 결과 및 고찰 .....	34
4. 결론 및 요약 .....	38
제2절 실시간 측정을 위한 생물반응 및 계측제어 시스템 .....	39
1. 서론 .....	39
2. 재료 및 방법 .....	40
3. 결과 및 고찰 .....	54
4. 요약 및 결론 .....	61
제3절 살충제 Imidacloprid의 단클론항체 생산 .....	63
1. 서론 .....	63
2. 재료 및 방법 .....	64
3. 결과 및 고찰 .....	75
4. 결론 및 요약 .....	79

제4절	마이크로파를 이용한 시료전처리 시스템 .....	80
1.	서론 .....	80
2.	재료 및 방법 .....	83
3.	결과 및 고찰 .....	89
4.	요약 및 결론 .....	96
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	97
제5장	연구개발 결과의 활용계획 .....	98
제1절	실적 .....	98
1.	학술발표 3건 (국내2, 국외1) .....	98
2.	논문게재 2건 (국내2) .....	98
3.	특허 출원 1건 (국내1) .....	98
4.	학생지도 3명 .....	99
제2절	계획 .....	99
1.	학술발표 1건 .....	99
2.	논문투고 2건 (국내1, 국외 1) .....	99
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	100
제7장	참고문헌 .....	101
부록 I.	생물 반응 및 제어 시스템 전기 회로도 .....	106
부록 II	Control program for AVR .....	107
부록 III.	시작품 사진 .....	126

# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적

국내에서 사용되는 대표적 농약인 Imidacloprid의 과채류 잔류량을 소요시간 60분 이내에 최소량 50ng/mL을 정량적으로 측정할 수 있는 현장용 실시간 측정장치를 개발한다.

## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 가. 효과적인 농약의 개발로 식량문제는 상당히 해결되었으나, 반복 사용에 따른 잔류농약의 축적으로 환경오염을 초래하여 인류의 건강과 생명을 크게 위협
- 나. 세계 무역자유화 영향으로 농축산물의 수입이 증가하고 있고, 수입 농산물에 대한 잔류농약의 실시간 검출의 중요성이 더욱 증대
- 다. 실험실에서의 잔류 농약 측정은 시료의 운반이나 분석을 위해 많은 시간과 노력이 요구하며 숙달된 전문가가 반드시 필요
- 라. 농약에 의한 오염정도는 지역간 또는 동일한 지역 내에서도 변화가 크므로, 많은 시료를 취급해야 하는 문제를 수반하므로 측정 부하가 급속히 증가
- 마. 이를 해결하기 위하여 실시간 측정이 가능하며 비전문가도 사용 가

능한 간편한 측정장치의 개발이 필요

- 바. 국내 농업 및 환경 분야에서의 현장사용을 위한 실시간 측정장치 개발에 관한 연구는 매우 미약한 실정
- 사. 현장용 실시간 측정장치는 생물학적인 감지요소와 전기전자 변환기의 조합형태로 되어 생화학적인 반응을 이용한 소량의 화학물질을 정확히 측정할 수 있을 뿐 아니라, 전기전자 변환요소를 채택하고 있어 실시간 대의 신속한 분석이 가능하여 부가가치가 높은 첨단산업에 속함
- 아. 선진국에서는 보건, 의료 및 국방 등의 분야에서 연구가 활발하며 최근에는 농업 생명 분야로 적용을 확대하는 추세

## 2. 경제·산업적 측면

- 가. 농산물이나 식품에 대한 안전성, 토양 및 지하수에 대한 환경오염에 대한 우려가 심각해지고 있어 농산물, 식품안전이나 환경보호와 관련된 산업은 급격히 확대될 전망
- 나. 21세기는 생명공학의 시대로서 이 분야의 경제규모가 천문학적인 숫자로 증가할 전망
- 다. 우리나라의 경우 충분히 발달된 전기전자 부품기술로 저가의 고성능 바이오센서 개발을 통한 산업화가 가능하여 수출 유망품목이 될 전망이 유력
- 라. 타 후진국 또는 개발도상국에 의해 많은 도전을 받고 있는 국내 경제와 산업의 경쟁력을 제고하기 위해서는 부가가치가 높은 첨단 기술의 개발이 절실히 요구

## 3. 사회·문화적 측면

- 가. 농약의 지속적 사용으로 토양과 지하수의 오염은 국민 식생활을

직접 간접으로 크게 위협

- 나. 무역 세계화에 따른 농산물 수입량의 급증으로 잔류농약에 대한 정확하고 신속한 검출이 절실히 요구
- 다. 식품 및 환경오염으로 인류의 건강과 생명이 위협받게 됨에 따라 환경보호의 중요성이 강조되고 환경감시에 대한 욕구도 날로 증대
- 라. 신속하고 간편하게 장소에 구애받지 않고 식품이나 토양, 지하수 등에 오염된 잔류농약을 정확히 검출할 수 있는 장치의 필요성이 증대
- 마. 바이오센서는 별도의 장비와 시설이 불필요하여 일반인들도 쉽게 이용할 수 있어 사회 문화적 욕구를 충족할 전망

### 제3절 연구개발의 범위

1. 1차년도에는 실시간 측정용 생물반응기술 개발을 위해 공동 연구자가 개발한 Imidacloprid의 검출을 위한 ELISA의 변형을 통해 신속한 검출방법을 개발한다.
2. 2차년도에는 1차년도에 개발된 실시간 검출방법의 자동화를 위한 자동반응 시스템, 신호처리 시스템 및 제어 시스템을 개발한다. Imidacloprid용 단클론항체를 제작한다.
3. 3차년도에는 1, 2차년도에 개발된 실시간 측정기술의 시작품을 제작하고, 시료를 자동으로 수집하고 처리하는 장치를 제작한다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내의 경우

실험실에서 사용할 수 있는 검출방법이 개발되었을 뿐 현장용 실시간 측정 장치 개발에 대한 연구는 아직 보고 된 바 없음 (김중수 등 1997, Lee 등 2000).

### 제2절 외국의 경우

1. Marty 등(1995)과 Jeanty와 Marty(1998)는 유기인계와 카바메이트계 농약을 검출하기 위해 콜린에스테라제 효소의 억제에 기초하여 전위차나 전류를 측정하는 방식의 바이오센서를 개발. 이 센서는 두 개의 전극으로 구성되었는데 한 개는 콜린에스테라제 효소를 고정화한 플라티늄 전극과 상업용 금(염화 금) 전극을 전류 측정장치와 연결되어, 물에 함유된 3.91 - 10.36  $\mu\text{g/l}$ 의 잔류농약을 측정할 수 있다고 보고.
2. Gonzalez-Martinez 등(1997)은 카바메이트계 농약을 검출하기 위해 CPG(controlled-pore glass)를 면역시약의 고정화를 위한 고정지지물을 사용한 바이오센서를 개발. 이들은 단클론 항체를 이용한 면역기법을 기본으로 하였고, 음료수에 적용할 수 있는 정도의 측정한계인 0.029  $\mu\text{g/l}$ 를 측정할 수 있었고, 검출에 필요한 시간은 20분이었고, 성능저하 없이 100회의 반복사용이 가능한 것으로 보고
3. Brummel 등(1997)은 사이클로다이엔 계의 농약을 검출하기 위해 광섬유 형의 바이오센서를 개발, 그들은 면역기법을 이용하여

형광을 발하게 하여 농약의 백만분의 일 정도를 측정할 수 있다고 보고

4. Nunes 등(1998)은 채소류에 잔류하는 카바메이트계 농약을 검출할 수 있는 콜린에스테라제 효소를 이용한 전류계형 바이오 센서를 개발. 감자, 당근 및 고추 주스를 시료로한 검출결과 액체분광법/UV를 이용한 방법과 잘 일치하는 것으로 확인
5. Mulchandani 등(1999)은 유기인계 농약을 검출할 수 있는 전류계형 효소전극 바이오센서를 개발하였고, pH 측정용 전극을 변형하여 유기인계의 하이드로라제를 고형화, 이 센서로 2  $\mu\text{M}$  농도를 측정할 수 있었고, 1개월 안정성을 유지
6. Bachmann과 Schmid(1999)는 잔류농약을 신속히 검출할 수 있는 다 전극형 일회용 바이오센서를 개발, 이 센서는 아세틸 콜린에스테라제 억제와 인공신경망을 이용한 자료분석방법을 이용, 검출에 소요되는 시간은 60분이었고, 검출범위는 0.2-20 $\mu\text{g}/\text{l}$ 로 보고
7. Neufeld 등(2000)은 일회용이며 전류계형인 마이크로 유량주입 바이오센서를 개발하여 유기인계 농약을 검출, 이 센서는 효소반응을 이용하여 극소량의 농약을 검출할 수 있다고 보고

## 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절 실시간 측정용 효소면역분석법

#### 1. 서론

환경 농업에 대한 인식 확대로 단위 면적 당 농약 사용량이 점차 감소하고 있는 추세이지만, 대부분의 국내 농가에서는 농산물의 품질과 생산성 향상을 위해 농약 사용을 피할 수 없는 실정이다. 농지, 지하수 및 수확 농산물의 표면 혹은 내부에 잔류하는 농약은 환경오염은 물론 국민 보건에 큰 위협을 초래하므로 잔류량을 신속히 측정할 수 있는 장비 혹은 분석법이 절실히 요구되고 있다 (박, 2003).

이미다크로플리드(imidacloprid)는 신니코틴(neonicotinoid)계 살충제로서 해충 등에 살포되었을 때 전신마비, 이완, 활동성 저하 등을 일으켜 이를 박멸한다. 국내에서는 굴굴나방, 조팝나무 진딧물, 벼멸구, 굽벙이 류 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 장미, 복숭아 및 벼농사에 광범위하게 사용되고 있다 (Bayer CropScience-Korea, 2002).

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)에 의존하고 있는데, 분석을 위해 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추출하고 정제한다. 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 갖는 반면 많은 경비와 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능을 필요로 한다. 최근 살충제 이미다크로플리드 잔류물의 검출을 위해 관행적인 분석법이 지니는 단점을 보완하기 위해 보다 신속하고 감도가 예민하며, 특이성과 선택성을 가지는 동시에 분석비용이 저렴한 효소면역분석법(ELISA) 개발에 관한 연구가 수행되었다(이 등,

2001 ; Lee 등, 2001 ; Li 등 2000). 면역분석법은 기존의 분석법으로 정량화하기 어려운 화합물들에도 응용할 수 있고, 저 농도의 잔류량을 지닌 다량의 시료를 높은 신뢰도로 분석할 수 있는 기법이다. 그러나 최근 개발된 효소면역분석법은 관행적인 대형기에 의한 분석방법에 비해 경비, 시간 및 노력 등은 단축하였으나, 현장에 사용하기에는 경제적 및 기술적인 문제점을 갖고 있다. 실험실로 시료를 이동해야 하며, 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구되어 신속한 검출을 위해서는 바이오센서와 같은 실시간 측정장비가 필요하다.

바이오센서는 선택성이 탁월하고 전처리가 간편하며 현장에서의 실시간 측정이 가능하기 때문에 보건·의료 및 국방 분야를 중심으로 선진국에서는 개발에 대한 관심이 급증하고 있으며, 최근 들어 농업 생명과학 분야에서도 많은 연구개발이 진행되고 있다(Claycomb 등, 1996 ; Delwiche 등, 2000). 1차년도 연구에서는 살충제 이미다크로플리드의 잔류물을 신속하게 검출할 수 있는 바이오센서를 개발하기 위하여, 기존에 실험실용으로 개발된 효소면역분석법을 기초로 한 바이오센서용 측정방법을 개발하고 측정 감도를 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 효소 면역 분석법(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)

효소면역 분석법은 잔류농약과 같이 분자량이 작고 농도가 낮은 분석물의 측정을 위해 많이 사용된다(Crowther 등, 2001). 분석에 필요한 대부분의 시약이 시판되고 있고, 신니코틴계 살충제인 이미다크로플리드 분석을 위한 프로토콜이 최근 발표되어 (Lee, 2001), 부분적인 수정을 통해 바이오센서용으로의 사용이 시도되었다. 일반적인 간접 효소면역 분석법의 경우, 항원을 실험용 쉘 표면에 고정시킨 후(그림 1a) 항체와 분석 시료인 이미다크로플리드의 농도별 용액을 첨가한다(그림 1b). 이때 코팅항원과 분석시료는 항체와의 결합을 위해 서로 경쟁하게 된다(그림 1b).

결합을 위한 충분한 시간 (binding time)이 지난 후, 반응되지 않은 항체와 분석물을 세척해 낸 후(그림 1c) 효소가 표지된 이차항체를 추가한다(그림 1d). 그 다음 기질 버퍼를 가하면 효소에 의해 산화가 촉진되어 청색으로 발색된다 (development time, 그림 1e). 이러한 반응에 대한 광 변화를 읽기 위해 마이크로플레이트 판독기(microplate Reader)로 흡광도를 측정하며 이때 시료의 농도는 광 변화에 반비례하게 된다.

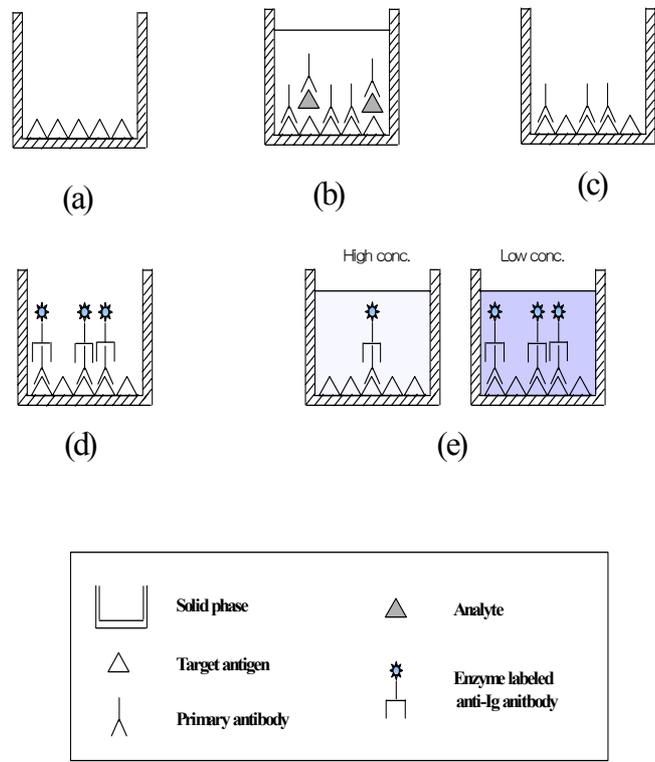


Fig 2. ELISA in which (a) antigen is immobilized on to a test cell, (b) sample solution and 1st antibody are added, then sample and antigen compete for 1st antibody, (c) excess solution is washed away, (d) 2nd antibody with enzyme label is added, and (e) substrate solution is added and the absorbance is measured.

#### 나. 표준 효소면역분석법

살충제 이미다크로플리드 잔류물을 검출하기 위해 충북대학교 농화학  
과 농약학 실험실에서 개발된 표준 효소면역분석법은 다음과 같다 (이 등,  
2001 ; Lee 등, 2001 ; Li 등 2000).

먼저 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface,  
Roskilde,Denmark)의 각 반응조(well)에 pH 9.6의 코팅 버퍼로 희석한 코  
팅항원(단백질 농도: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 100 $\mu\text{l}$ 씩 주입한다. 그후, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤  
방치한 후 세척 완충액(0.1 $\times$ PBST)으로 5회 세척하여 플레이트에 코팅되  
지 않은 항원을 제거하고, 반응조의 코팅되지 않은 부위를 블로킹  
(blocking)하기 위하여 각 반응조에 무지유(3% skim milk in 1 $\times$ PBS)를 200  
 $\mu\text{l}$ 씩 추가한다. 그후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 배양한 다음 다시 상기 방법으로 반응  
조 플레이트를 세척한다. 그 다음 코팅된 플레이트에 1 $\times$ PBS에 1:16000  
로 희석한 다클론 항체와 분석 대상 시료인 이미다크로플리드의 농도별  
용액을 50 $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 반응  
후 다시 세척하고, 이차항체에 효소가 표지된 goat anti-rabbit  
IgG-Horseradish peroxidase 희석액 (1:10000 diluted with 1 $\times$ PBST)을  
100 $\mu\text{l}$ 씩 추가한다. 실온에서 1시간 반응 후 세척하고 기질 완충액 100 $\mu\text{l}$   
씩을 각 반응조에 추가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 반응  
조에서의 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 50 $\mu\text{l}$ 씩 추가한다. 황  
색으로 변한 플레이트를 450-655 nm 범위의 dual wavelength mode에서  
마이크로플레이트 판독기(Model 550 , Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로  
흡광도를 측정한다(Lee등, 2001 박, 2003).

이미다크로플리드 표준용액의 농도는 25000ng/ml에서 0.0128ng/ml로  
희석하여 사용하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 그림 2와 같이 S자형  
으로 맞추고(fitting), 4개의 계수를 갖는 지수 식으로 식 (1)과 같이 표시  
된다 (Rodbard, 1981). 이 곡선의 IC<sub>50</sub>(C)를 중심으로 한 직선범위 IC<sub>20</sub> -  
IC<sub>80</sub>가 실질적인 이미다크로플리드의 측정범위가 된다. 측정감도의 예측

은 분석물을 함유하지 않은 시료의 흡광도를 50% 저해하는 이미다크로플리드의 농도 IC<sub>50</sub>로 표시할 수 있다. 그러므로 IC<sub>50</sub> 값이 작은 시그모이드 표준곡선이 예민한 방법이라고 할 수 있다.

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (1)$$

여기에서

y: 흡광도(absorbance)

x: 이미다크로플리드 농도 (ng/ml)

A: 이미다크로플리드의 최대 흡광도

B: 직선구간의 기울기

C: 공시료의 흡광도를 50% 저해하는 이미다크로플리드의 농도(ng/ml), IC<sub>50</sub>(ng/ml)

D: 이미다크로플리드의 최소 흡광도

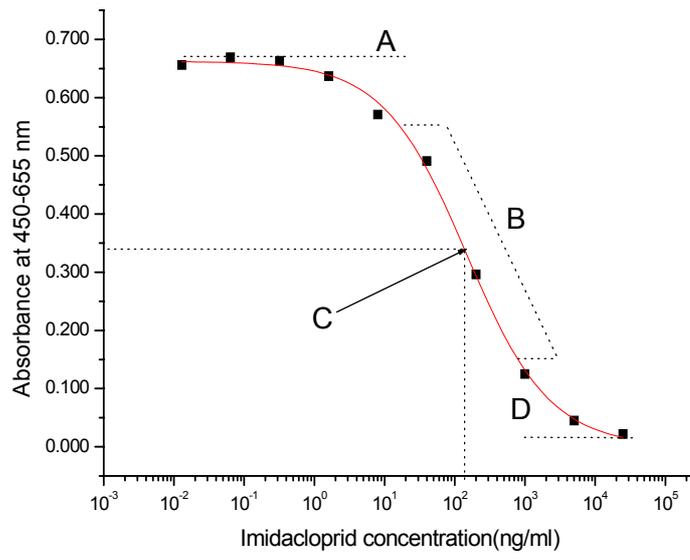


Fig. 2 Four parameter log-logistic curve fitting model

#### 다. 실시간 측정용 효소면역분석법(바이오센서용)

표준 효소면역분석법을 기초로 한 바이오센서 개발의 중요한자는 측정에 소요되는 시간을 단축하는 것이다. 분석에 소요되는 시간은 측정감도와 정확도를 저하시키지 않는 범위에서 짧을수록 좋을 것이다. 소요시간을 단축하기 위해서 배양시간, 반응시간 및 발현시간을 최소화하는 기초실험을 실시하였다. 표준방법에서 1시간 소요되는 배양(표 1, 단계 7과 10) 시간을 30분, 15분, 5분으로 단축하여 실험을 하였다. 배양 시간만의 단축에는 한계가 있으므로, 코팅 항원과 항체의 농도에 따른 시간 감소를 측정하였다. 코팅 항원농도를 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 증가시키고, 항체의 희석비를 1:16000에서 1:8000과 1:4000으로 각각 증가시켰다. 또한 배양 시간을 30분, 15분, 5분 (표 1, 단계 7과 10)으로 변화시키며 감도측정을 수행하였다. 표 1은 변형된 효소면역법의 순서를 나타낸다. 항체와 분석물인 이미다크로플리드의 각 농도별 용액을 각각 50 $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 난 뒤에 반응을 위한 배양 시간과 2차 항체를 첨가한 뒤의 배양 시간을 1시간에서 30분, 15분, 5분으로 변경하여 과정을 반복한 후 흡광도를 측정하였다.

#### 라. 시약 및 재료

표준 효소면역분석법의 수정을 통한 바이오센서용 실시간 효소면역분석법의 개발에 필요한 코팅 항원과 항체로는 각각 충북대학교 농화학과 농약학 실험실에서 제조된 hapten-1-BSA과 hapten-2-KLH를 면역원으로 하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A.)로부터 구입하였다.

마이크로플레이트(microplate)는 Maxisorp 96-well microtiter

plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였고, 마이크로플레이트 판독기는 Bio-Rad Model 550(Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

Table 1. Modified procedure for imidacloprid ELISA

<b>Immobilization of antigen</b>
1. Immobilize antigen on plates(100 $\mu$ l , 5 $\mu$ g/ml , 50 $\mu$ g/ml, 12h, 4 $^{\circ}$ C)
2. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
3. Blocking plate(200 $\mu$ l , 1 $\times$ PBS + 3% skim milk, 2h ,37 $^{\circ}$ C)
4. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
<b>Binding</b>
5. Add 50 $\mu$ l of standard or sample solution.(25000, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 ng/ml)
6. Add 50 $\mu$ l of the dilute polyclonal antibody(1:16000 , 1:8000, 1:4000)
7. Incubate for 30, 15, 5 minute at 25 $^{\circ}$ C
8. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
9. Add 100 $\mu$ l of 2nd-antibody(goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:10000)
10. Incubate for 30, 15, 5 minute at 25 $^{\circ}$ C
11. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
<b>Development</b>
12. Add 100 $\mu$ l of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
13. Incubate for 15, 5 minute at 25 $^{\circ}$ C
14. Add 50 $\mu$ l of stop solution(4N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
15. Read optical density on microplate reader.

마. 효소면역분석법을 위한 완충액의 조제

효소면역분석법을 위한 완충액은 EPA Guideline(Lee 등 2001, 이 등 2001, 박 2003)에 따라 다음과 같이 제조하였고, 표 2에 요약한 내용을 보여준다.

- **Coating buffer:**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.795g과  $\text{NaHCO}_3$  1.465g을 약 500ml의 초순도 증류수에 녹이고 pH를 9.6으로 맞춘 후 최종부피를 500ml로 하여 4℃ 냉장고에 보관 사용하였다.
- **10×PBS (phosphate buffered saline):**  $\text{NaCl}$  640g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  16g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  91.96g,  $\text{KCl}$  16g을 약 7L의 초순도 증류수에 서서히 교반하면서 녹이고 pH를 7.5로 맞춘 후 최종부피를 8L로 하여 실온에서 보관 사용하였다.
- **1×PBS :** 100ml의 상기 10×PBS를 초순도 증류수로 10배 희석하고 필요하다면 pH를 8로 맞춘 후 실온에 보관 사용하였다.
- **1×PBST(0/05% Tween 20):** 100ml의 상기 10×PBS 와 400 $\mu\text{l}$ 의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 1L가 되도록 부피를 맞춘 후 실온에 보관 사용하였다.
- **Washing buffer(0.1×PBS + 0.05% Tween 20):** 80ml의 상기 10×PBS와 4 ml의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 최종부피를 8L가 되도록 하였다.
- **Horseradish peroxidase 실험용 citrate-acetate buffer:** 13.61g의 sodium citrate(100 mM)를 약 1L 초순도 증류수에 녹인 후 acetic acid로 pH를 5.5로 조절하고 1L로 맞추어 사용하였다.
- **1 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액:** 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  1ml을 29ml 초순도 증류수에 넣고 플라스틱용기에 담아 냉장고에 저장하였다.
- **0.6% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB):** 60mg의

Tetramethyl-benzidine을 10ml의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 실온의 암소에 저장하였다.

- **최종 substrate buffer:** DMSO에 녹인 0.6 % TMB 용액 0.4ml과 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 ml을 상기의 citrate-acetate buffer 25ml에 가하여 잘 섞은 후 바로 사용. 이 경우 buffer와 TMB의 온도는 실온이어야 한다.

Table 2. Buffers used and their preparation procedures

Buffers	Preparation procedure
Coating buffer	0.795g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1.465g NaHCO <sub>3</sub> , 500ml high purity water pH 9.6 , store at 4°C
10×PBS (phosphate buffered saline)	640g NaCl , 16g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 91.96g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 16g KCl were mixed with 7ℓ high purity water at pH 7.5, last volume 8ℓ, store at room temperature
1×PBS	100ml 10×PBS, 900 ml high purity water at pH 8, store at room temperature
1×PBST(0.05% Tween 20)	100ml 10×PBS , 400μℓ Tween 20 were mixed with high purity water about 1ℓ, store at room temperature.
Washing buffer(0.1×PBS + 0.05% Tween 20)	80ml 10×PBS, 4ml Tween 20 were mixed with high purity water about 8ℓ.
Horseradish peroxidase citrate-acetate buffer	13.61g sodium citrate(100 mM), 1ℓ high purity water were controlled with acetic acid to pH 5.5
1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 29ml high purity water store at 4°C
0.6 % 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)	60mg tetramethyl-benzidine, 10ml dimethyl sulfoxide(DMSO) store in dark room at room temperature.
Substrate buffer	0.1ml 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and 0.4ml 0.6 % 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB) in dimethyl sulfoxide(DMSO) were added to 25ml of citrate-acetate buffer. store at room temperature.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 배양시간 변화에 따른 측정 감도

그림 3과 그림 4는 배양 시간을 각각 30분, 15분으로 했을 때의 흡광도 측정 결과이다. 배양 시간이 30분일 때와 15분일 때의  $IC_{50}$  값은 각각 38 ng/ml 와 45 ng/ml로 측정되었다. 이 값은 표준 방법의  $IC_{50}$  값 17 ng/ml (Lee 등, 2001)보다는 큰 값이지만, 국내의 작물별 이미다크로플리드 잔류 허용량(국립 농산물 품질관리원 농약잔류허용기준)이 0.05~6.0 ppm 인 것을 고려하면 최소검출한계가 30분과 15분일 때 각각 0.038ppm와 0.45ppm으로 확인되어, 이미다크로플리드의 검출에 사용될 수 있는 충분한 감도를 갖는 것으로 나타났다. 표 3은 incubation 시간이 30분과 15분일 때의 조건 값들을 보여준다.

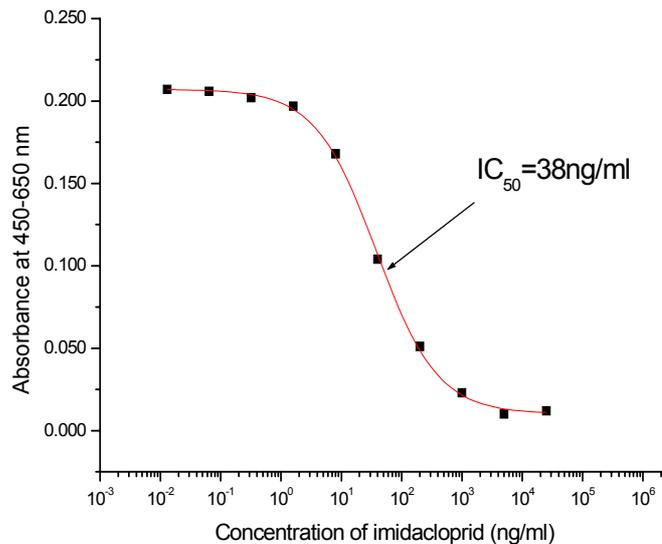


Fig. 3 The standard curve of the incubation for 30 minute.

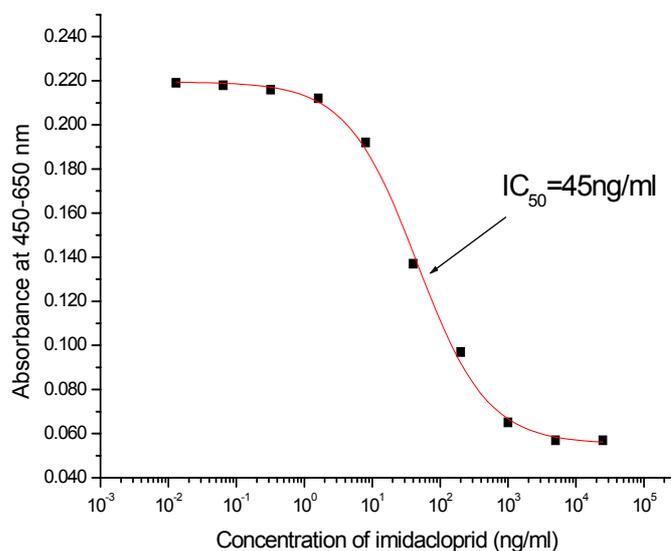


Fig. 4 The standard curve of the incubation for 15 minute.

Table 3. Conditions for the Imidacloprid ELISA at the incubation for 30 and 15min

incubation time (min)	coating antigen ( $\mu\text{g/ml}$ )	rabbit D antiserum(d ilution)	$A_{\text{max}}$ (A)	$IC_{50}$ (ng/ml) (C)	$A_{\text{min}}$ (D)	A/D	detection range(ng/ml)(I C <sub>20</sub> -IC <sub>80</sub> )
30	5	1:16000	0.207	38.4	0.010	20.7	8-193
15	5	1:16000	0.220	45.7	0.055	4	8.9-236.6

나. 코팅항원의 농도변화에 따른 측정 감도

그림 5와 그림 6은 배양 시간이 5분, 코팅 항원농도가  $50\mu\text{g}/\text{m}$ , 그리고 항체의 희석비가 각각 1:8000과 1:4000일 때의 흡광도 측정결과이다. 그림에서 보는 것처럼 흡광도는 급격히 감소하였으나  $\text{IC}_{50}$  값은 표준방법과 비교할 때 큰 차이가 없으며, 항체의 희석비가 1:4000일 때가 더 낮게 측정되었다. 표 4는 항체 희석비가 1:8000과 1:4000 일 때의 값을 나타낸다. 표에서 보는 것처럼 흡광도는 급격히 감소하였으나  $\text{IC}_{50}$  값에는 표준방법과 비교할 때 큰 차이가 없으며, 항체의 희석비가 1:4000일 때가 더 낮게 측정되었다.

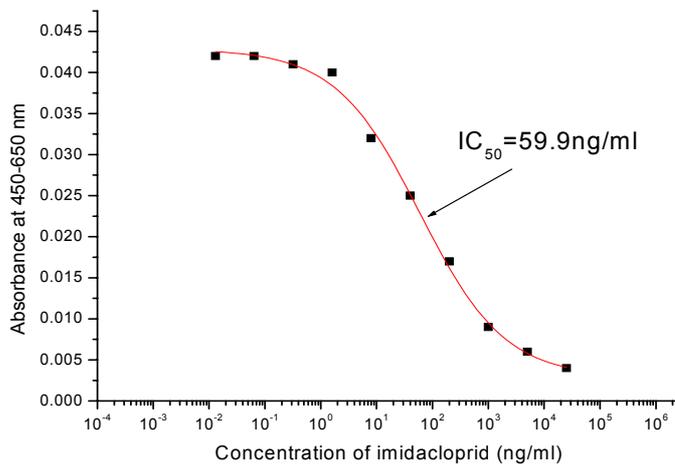


Fig. 5 The standard curve of the coating antigen at  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  and the dilution of the antiserum at 1:8000.

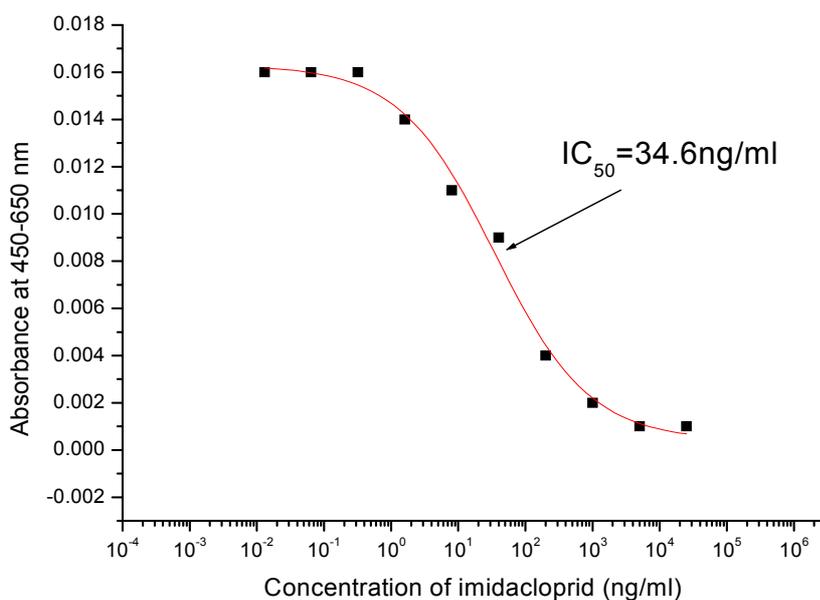


Fig. 6 The standard curve of the coating antigen at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and the dilution of the antiserum at 1:4000.

Table 4. Conditions for the Imidacloprid ELISA of the coating antigen at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and the dilution of the antiserum at 1:8000 and 1:4000.

Incubation time (min)	Coating antigen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Rabbit Dantiserum (dilution)	$A_{\text{max}}$ (A)	$\text{IC}_{50}$ (ng/ml) (C)	$A_{\text{min}}$ (D)	A/D	Detection range (ng/ml) (I C <sub>20</sub> -I C <sub>80</sub> )
5	50	1:8000	0.0428	59.9	0.0029	14.8	5.3-671.3
5	50	1:4000	0.0163	34.6	0.0004	40.75	3.6-331.0

#### 4. 결론 및 요약

본 연구는 살충제 이미다크로플리드 잔류물의 실시간 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서 바이오센서용 효소면역분석법을 개발하기 위해 실행되었다. 이미 개발된 실험실용 효소면역분석법은 HPLC나 GC에 비해 노력과 분석시간을 절약할 수 있다. 그러나 측정에 소요되는 시간이 최소 2시간 이상이므로 실시간 측정에 사용하기에는 적합하지 않다. 분석시간의 단축을 위해 배양시간을 단축하고 이에 따른 감도의 변화를 관측한 결과 IC<sub>50</sub>값이 38 ng/ml과 45 ng/ml로 실험실용 효소면역분석법의 IC<sub>50</sub>값인 17 ng/ml 보다 높게 나타났으나, 국내 작물별 이미다크로플리드의 허용 잔류량의 최소 검출한계인 0.05 ~ 6.0 ppm보다 낮은 값을 가지므로 현장적용에 문제가 없다고 판단된다. 실험실용 효소면역분석법의 코팅항원 농도인 5  $\mu$ l/ml에서의 배양시간의 단축에는 한계가 있어 코팅항원의 농도를 50  $\mu$ l/ml으로 하고 항체의 희석비를 1:8000과 1:4000으로 증가시켜 흡광도를 측정하였다. 분석에 소요되는 시간을 2시간에서 15분으로 단축할 수 있었으며, 이때의 IC<sub>50</sub> 값은 59.9 ng/ml과 34.6 ng/ml로서 비교적 작은 값이므로 측정감도에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 마이크로플레이트는 반응조의 수량이 96개이며, 350  $\mu$ l의 용량으로 제한되어 있어 바이오센서용에는 적합하지 않을 뿐 아니라 코팅항원의 농도를 높이는데 한계가 있다. 향후 마이크로플레이트가 아닌 흡착성이 높고, 교체 사용이 용이한 일회용 폴리스티렌 큐벳(polystyrene cuvetts)을 이용하여 감도를 유지하면서 동시에 반응시간을 더 단축하기 위한 연구와 함께 바이오센서로서의 재 사용성과 교차 반응성 등에 대한 연구가 지속될 예정이다.

## 제2절 실시간 측정을 위한 생물반응 및 계측제어 시스템

### 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 굴굴나방, 조팝나무 진딧물, 벼멸구, 굽벙이 류 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 장미, 복숭아 및 벼농사에 광범위하게 사용되고 있다(정 등, 2000). 국내에서 imidacloprid의 최대 잔류허용 한계는 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 농약 분석의 단점을 보완하기 위하여 효소면역분석법(ELISA)이 개발되고 있다(Lee et al., 2001). 최근에는 효소면역분석법을 이용한 센서들이 식품원료나 가공 식품 및 공정에 잔류하는 농약, 항생제, 식품독소, 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(IC<sub>50</sub>)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 이미다클로플리드 잔류량을 신속하고 정확하게 검출하고, 운반이 간편하며 비전문가도 사용 가능한, 휴대형 바이오센서의 개발을 위한 생물반응시스템 및 계측제어시스템의 개발에 있다.

## 2. 재료 및 방법

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

본 연구에서는 Lee et. al., (2001)이 개발한 경합적 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 1

시간 반응 후 세척하고 기질 완충액 100  $\mu$ L씩을 각 반응조에 추가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 반응조에서의 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 50  $\mu$ L씩 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 hapten-3-BSA을 사용했으며 항체로는 hapten-5-KLH를 면역원으로 하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 이들 항원과 항체는 충북대학교 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. 완충액(Buffer) 조제

효소면역분석법을 위한 완충액은 EPA Guideline(Lee 등, 2001; 박, 2003)에 따라서 제조하였다. 제조방법에 관한 자세한 내용은 제1절에 소개되어 있다.

#### 라. 실험장치

##### 1) 생물반응 시스템

생물반응 시스템의 구성은 그림 1에 보여준다. 반응조는 실험실용 마이크로플레이트(microplate)를 대신하여 흡착성이 좋은 표준 수정 큐벳을 선택하였으며, 큐벳의 외부는 빛의 간섭을 최소화하기 위해 PVC 블록으로 외부 빛을 차단하였다. 블록 외형 치수는 40×40×60mm이며 중앙에 큐벳이 삽입되도록 12×12×45mm의 홈을 만들었다. 시료의 운반 및 혼합을 위해 행정 당 50  $\mu\ell$ 의 이송용량을 가진 4개의 솔레노이드 펌프(LPLA1220050L, The Lee Co.)를 사용하였다. 펌프, 시약주입용 밸브 및 이송관의 오염을 최소로 하기 위해 별도의 결합(Conjugate) 펌프 1개와 이송관을 두었다. 시약(Reagent) 펌프는 각 밸브에서 선택된 시약 및 시료의 운반을 위해, 혼합(Mix) 펌프는 일차 항체와 Imidacloprid 표준용액을 혼합하기 위해, 배수(Drain) 펌프는 큐벳 안의 시료를 밖으로 배출하기 위해 사용하였다. 양방향 밸브(LFAA1201710H, The Lee Co. USA)는 선택한 시약을 주입하기 위해 사용하였고, 세 방향 밸브(LFAA1201410H, The Lee Co.)는 시료의 갑작스런 주입을 방지하고 이송관 내에 남아있는 시료를 제거하기 위해 사용하였다. 이때 남아있는 시료를 운반하기 위해 별도의 공기주입 밸브를 두었다. 밸브로 연결되는 이송관으로 내경이 1.4 mm인 실리콘 튜브가 사용되었고, 나머지 이송관으로는 내경이 1.6 mm인 바이톤 튜브(06434-01, Cole-Parmer Instrument Corp., Vernon Hills, Ill. USA)가 사용되었고, 반응조로 연결되는 배관으로는 내경 1.07mm이고 외경 1.47mm인 스테인레스강 튜브(HTX-17, Small Part Inc., Miami Lakes, Ca. USA)가 사용되었다.

시약펌프에 연결된 스테인레스 강 튜브의 위치는 세척효과를 높이기 위해 큐벳 바닥으로부터 17mm 위에, 혼합 펌프로부터 나온 튜브는 큐벳 바닥으로부터 10mm 위에 위치하며 혼합 효과를 높이기 위해 큐벳의 대각선 방향 모서리에 서로 마주보게 위치하였다. 결합펌프로부터 나온 튜브는 기질 버퍼와의 원치 않는 혼합을 방지하기 위해 바닥에서 20mm 위에 위치하고, 배수(Drain) 펌프로 입력되는 튜브는 시료의 완전한 배출을 위해 튜브 끝을 큐벳 바닥과 가깝게 위치하였다. 표 1은 생물반응시스템에 사용된 주요 부품의 형식과 특징을 나타낸다.

Table 1. Specification of main parts used in biological reaction system

Item	Type	Feature
Cuvet	Standard	Standard cell with polystyrene 2 Windows polished 12.5mm Sq × 45.0mm high
Solenoid pump	LPLA1220050L	Standard volume : 50 µl Operating voltage : 12 Vdc
Solenoid valve	LFAA1201710H(2-way) LFAA1201410H(3-way)	Operating voltage : 12 Vdc Power : 280mW Response times : 1.5ms
Tubing	Stainless steel Viton	1.47 mm OD, 1.07 mm ID 3.17 mm OD, 1.59 mm ID

## 2) 계측 및 제어 시스템

기질의 흡광도를 측정하기 위해 645 nm 발광다이오드(HLMP-4101, Hewlett Packard, San Jose, CA, USA)와 포토다이오드(BPX61, Siemmens Components, Inc., Cupertino, CA, USA)를 사용하여 농도에 대한 발색 정도에 따라 출력전압을 측정하였다(Delwiche 등, 2001). 발광다이오드(LED)는 그림 3에서 보는 바와 같이 반응조를 둘러싼 블럭 외벽

에 구멍을 뚫은 후 맞은 편의 포토다이오드 면과 수직이 되도록 정렬하여 삽입되었다. 발광다이오드에서 나온 광은 블록의 아주 작은 구멍(직경 1mm 정도의 원통형)을 통하여 큐벳에 투과시켜 반대편에 위치한 포토다이오드를 통해 흡광도를 측정하도록 하였다. 이때 포토다이오드는 투과된 빛의 광도에 비례하여 광전류를 발생시키며  $10^6$  V/A의 이득을 갖는 광전압 증폭기에 입력된다. 증폭기에서 출력된 전압 신호의 고주파 성분을 제거하기 위해 차단 주파수가 10 Hz인 4차 버터워스(4th-Butterworth) 저역통과 필터를 사용하였다. 신호측정의 마지막 단계로 이득이 10이며 출력 오프셋(offset) 조절이 가능한 인버터용 연산증폭기로 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 회로도는 그림 2와 같다 (Delwiche et al., 2001).

생물반응 공정 중 시료 운반에 필요한 펌프와 밸브의 작동, 생물반응 공정이 끝난 후 반응조의 발색정도 측정에 필요한 발광 다이오드의 작동, 포토다이오드와 신호처리 회로에서 출력된 전압신호의 아날로그-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 밸브 작동에 필요한 전류 공급과 IC에 역전류를 방지하기 위해 달링턴 드라이버를 사용하였다. 표 2는 계측 제어 시스템에 사용된 부품의 형식과 특징을 나타내며, 제어순서는 표 3에 요약되어 있다. 계측제어시스템을 위한 상세한 전기회로도는 부록 I에 포함되어 있다. 제어용 프로그램은 C 언어로 작성되어 실행 프로그램으로 변환된 후 마이크로컴퓨터 AVR에 다운로드 되었다. 마이크로컴퓨터의 프로그램 소스 코드는 부록 II에 포함되어 있다.

### 3) 바이오센서 시작품

앞에 설명된 생물반응 시스템과 계측제어 시스템을 결합하여 시작품

을 제작하였다. 완성된 시작품의 평면의 사진은 부록 III에 포함되어 있다.

Table. 2. Specification of main parts for the measurement and control system

Item	Type	Features
Photodiode	BPX61	400nm ~1100nm Short switching time
LED	HLMP-4101	AlGaAs red (645nm)
Op-amp	AD549	Low offset drift Low input voltage noise
	AD705	0.6 $\mu\text{V}/^\circ\text{C}$ max drift 100 pA max input bias current
Darlington driver	ULN2803	Darlington array of 8 pin Output current to 500mA
Microcontroller	ATmega8535	8-channel, 10bit ADC 8K Bytes in system Self-programmable flash Operating voltage : 2.7~5.5Vdc

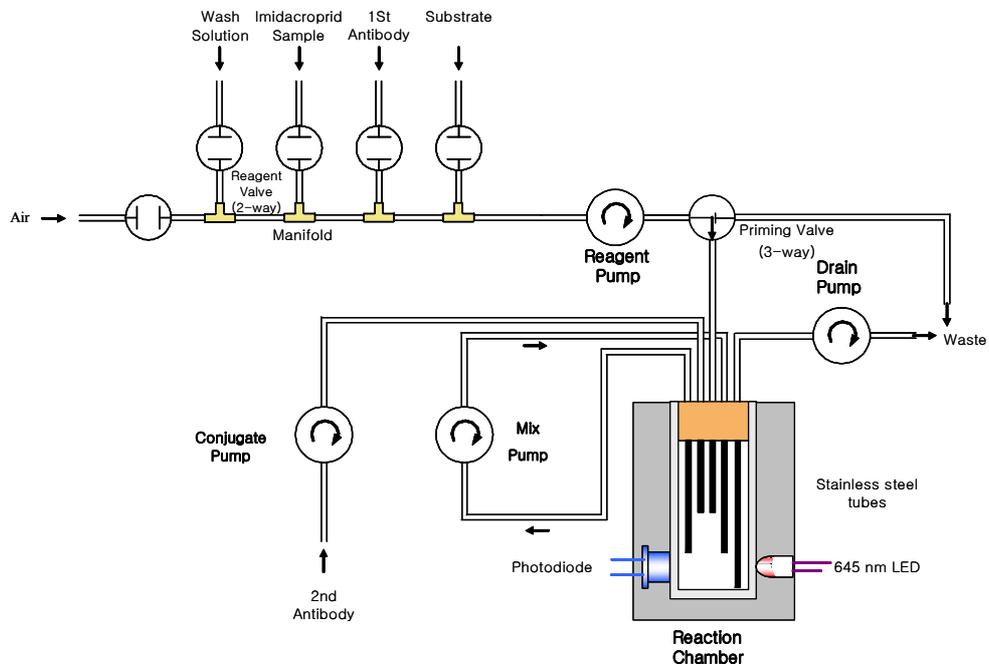


Fig. 3. Scheme of the biological reaction system (Delwiche et al., 2001).

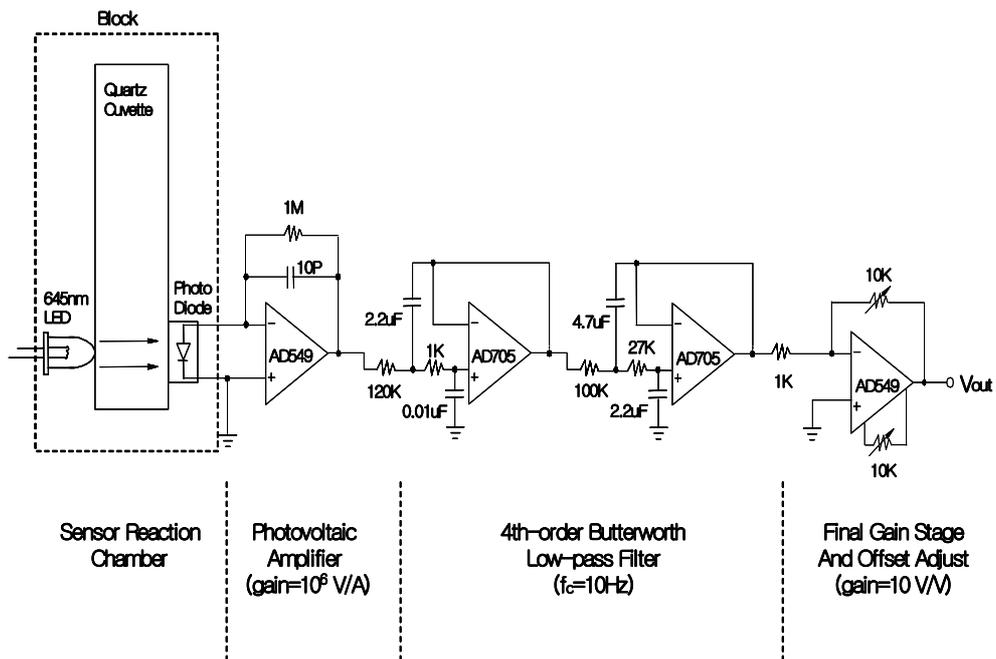


Fig. 2. Circuit diagram for the signal processing (Delwiche et al., 2001).

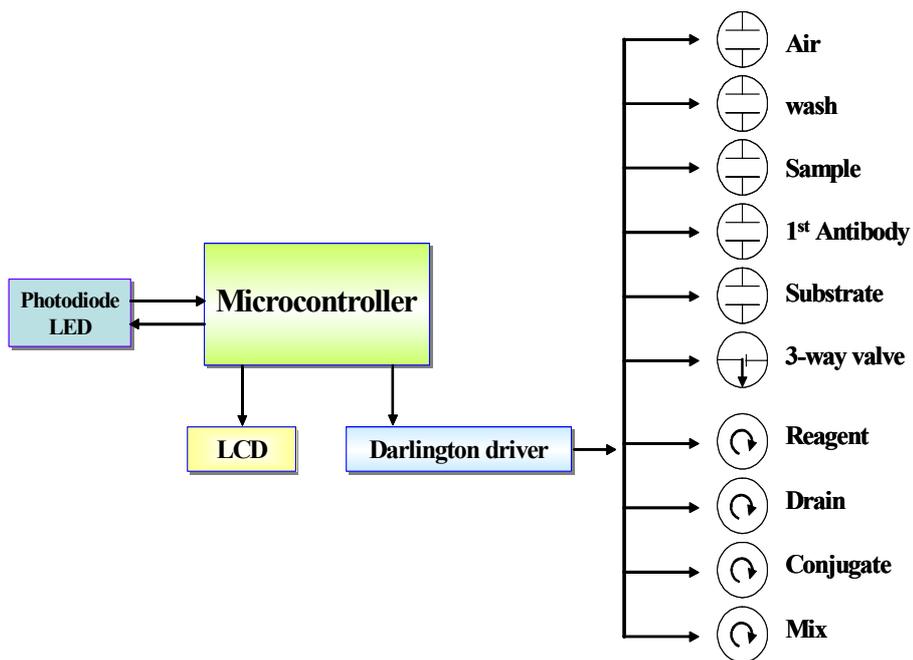


Fig. 3. Block diagram for the system control.

Table 3. Control sequence for the system.

<b>Binding cycle</b>
<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°C)</li> </ul>
<b>Washing cycle <math>\times 5</math></b>
<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>
<b>Antibody Labeling cycle</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2nd antibody(1 mL), pump(20 strokes)</li> <li>▪ Incubate 5, 3 min(24°C)</li> </ul>
<b>Washing cycle <math>\times 5</math></b>
<b>Development cycle</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Substrate valve(1 mL), Reagent pump(32 strokes)</li> <li>▪ Incubate 5 min(24°C)</li> <li>▪ A/D converter</li> <li>▪ Calculate OD rate(10 s)</li> </ul>
<b>Cleaning cycle</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Clear imidacloprid valve</li> <li>▪ Clear substrate valve</li> <li>▪ Add washing solution</li> </ul>

## 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 1:16,000에서 1:8,000, 1:4,000 및 1:2,000으로, 2차 항체의 희석비를 1:20,000에서 1:10,000와 1:5,000으로 변화하면서 실험하였다. 항체 희석비 증가에 따라 배양시간을 1시간에서 30분, 15분 및 5분으로 단축하면서 흡광도를 측정하였다. 표 4는 표준 효소면역 분석법의 변형된 분석법을 나타낸다.

Table. 4. Modified procedures for imidacloprid ELISA

Immobilization of Antigen
1. Immobilize antigen on plates(100 $\mu$ l , 0.1 $\mu$ g/ml , 12h, 4 $^{\circ}$ C)
2. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
3. Blocking plate(200 $\mu$ l , 1 $\times$ PBS + 3% skim milk, 1h ,37 $^{\circ}$ C)
4. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Binding
5. Add 50 $\mu$ l of standard or sample solution. (25000, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 ng/ml)
6. Add 50 $\mu$ l of the dilute polyclonal antibody (1:8000, 1:4000, 1:2000)
7. Incubate for 15, 5, 3 min at 24 $^{\circ}$ C
8. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
9. Add 100 $\mu$ l of 2nd-antibody (goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:10000, 1:5000)
10. Incubate for 15, 5, 3 min at 24 $^{\circ}$ C
11. Washing plate(1 $\times$ PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Development
12. Add 100 $\mu$ l of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
13. Incubate for 15, 5 min at 24 $^{\circ}$ C
14. Add 50 $\mu$ l of stop solution(4N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
15. Read optical density on microplate reader.

## 2) 시스템 성능평가

신속한 측정을 위해 분석시간이 단축되도록 수정된 효소면역분석법을 생물반응 및 계측제어 시스템에 적용하였다. 펌프별 스트로크당 오차를 최소화하고 큐벳에 적용하기 위해 실험실용 효소면역분석법에 사용되었던 시료량을 10배 증가하였다. 시스템에 적용된 프로토콜은 표 3과 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 실시

하였고, 표류를 조사하기 위해 200분이 경과하는 동안 출력 값의 변화를 조사하였다.

### 3) 농도측정

생물반응 및 계측제어 시스템에 적용하기 전의 준비과정으로 imidacloprid의 농도별 용액에 대하여 수작업을 통해 큐벳에 항원을 코팅시켰다. 코팅된 큐벳은 냉동고(-20°C)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°C)에 보관하여 사용하였다. Imidacloprid는 200~0.32 ng/mL 범위로 희석하여 사용하였다.

준비과정이 완료되면 빛이 투과되는 큐벳 표면에 이물질이 묻지 않도록 주의하며 큐벳을 블럭에 삽입하고, 표 3과 같은 순서로 펌프 및 밸브를 작동하여 효소면역법 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.

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

Table 3. Protocol for the ELISA used in the system.

<b>&lt; Manual operation &gt;</b>
<b>Immobilization of Antigen</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Immobilize antigen on cuvet(1 mL, 0.1 µg/ml, 12h, 4°C)</li> <li>2. Washing cuvet(1×PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> <li>3. Blocking cuvet(2 mL, 1×PBS + 3% skim milk, 1h, 37°C)</li> <li>4. Washing cuvet(1×PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> </ol>
<b>&lt; Automatic operation &gt;</b>
<b>Binding</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Add 500 µL of standard or sample solution. (200, 40, 8, 1.6, 0.32 ng/mL)</li> <li>6. Add 500 µL of the dilute polyclonal antibody(1:2000)</li> <li>7. Incubate for 5, 3 min at 24°C</li> <li>8. Washing cuvet(1×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°C</li> <li>11. Washing cuvet(1×PBS + 0.05% Tween20, 5 times)</li> </ol>
<b>Development</b>
<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°C</li> <li>14. Read optical density on sensor</li> </ol>

### 3) 교차반응성

생성된 항체가 imidacloprid에 대해서만 특이적으로 반응하고 다른 유사화합물에 대해서는 친화력이 낮아야 분석물을 선택적으로 정확하게 정성 및 정량분석을 할 수 있다. 교차 반응성은 imidacloprid의 IC<sub>50</sub>값과 시

험 분석물의 IC<sub>50</sub>값의 비를 나타낸다. Imidacloprid 유사화합물 중 acetamiprid와 thiacloprid에 대한 항체의 교차반응성을 본 연구에서 개발된 시스템을 이용하여 측정하였다.

### 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 측정 한 결과와 일차항체의 농도를 1:2000으로 하고 이차항체의 농도를 1:5000으로 하였을 때 흡광도를 비교한 것이다. 일차항체의 농도를 4배, 이차항체의 농도를 2배로 증가시켰을 때 표 4의 최적화 조건에서의 결과와 비교하여 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 15분일 때 흡광도 값도 높아지고, 최소 검출한계도 낮아지는 것으로 확인되었다.

Table 4. 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

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  $IC_{50}$  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  $\mu\text{g/mL}$ (이 등, 2003) 보다 낮은 농도의 검출이 가능해 현장에서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

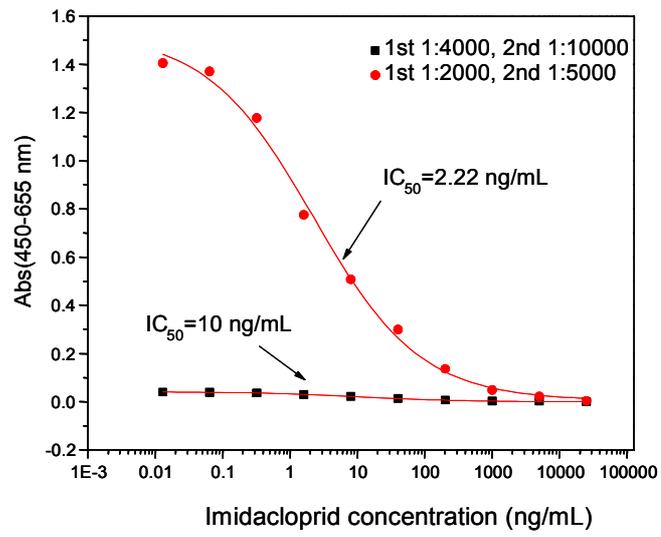


Fig. 4. Effect of dilution of the rabbit D antiserum and the goat anti-rabbit IgG-HRP on the sensitivity of the ELISA.

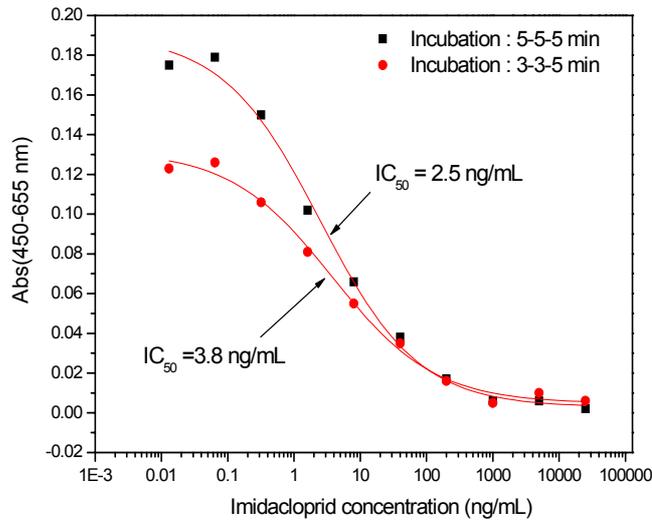


Fig. 5. The standard curve at the incubation for 3 and 5 minutes.

#### 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 1mL의 증류수를 넣은 큐벳을 블록에 삽입과 제거를 반복하며 연속 측정된 흡광도 값 20개의 평균값을 30회 반복 실시한 결과, 출력전압은 3.4V, 표준편차는 0.003V로 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 보

완이 필요할 것이다. 표류(drift)현상을 최대한 줄이기 위해 증폭기에는 정전압 안정전원을 공급하였으며 회로에 사용된 저항은 오차가 1%인 금속 피막 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 하였을 때 3.058 V가 출력되었다. 이때의 흡광도 값은 각각 0.080과 0.046로 측정되었다. 또한 imidacloprid의 농도 200 ng/mL에서는 배양시간을 5분으로 하였을 때 3.295 V가 출력되었고, 배양시간을 3분으로 하였을 때 3.371 V가 출력되었다. 이때의 흡광도 값은 각각 0.014와 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.

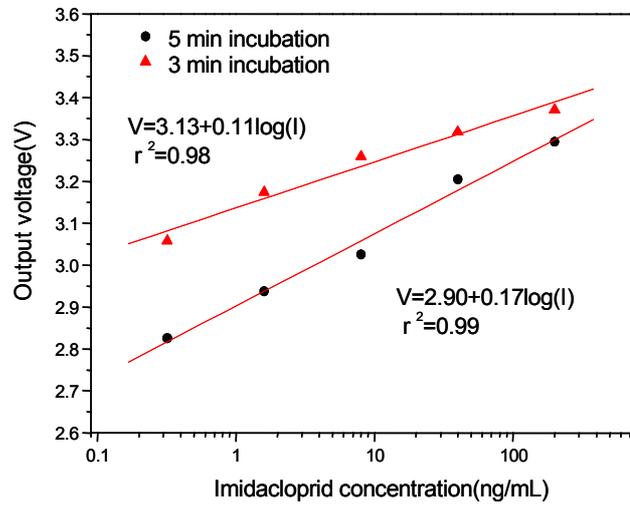


Fig. 6. Calibration of ovoltage utput versus imidacloprid concentration with two incubation periods.

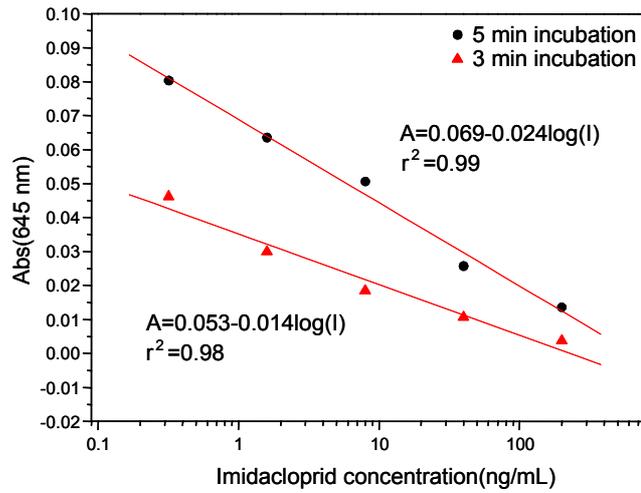


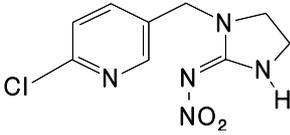
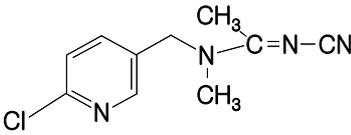
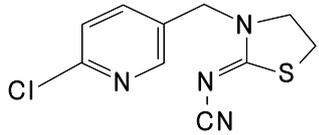
Fig. 7. Calibration of optical density versus imidacloprid concentration with two incubation periods.

#### 라. 교차반응성

다른 약제에 대한 항체의 교차반응성은 각각 장단점을 가지고 있다. 장점으로는 농산물 시료에 포함되어 있는 약제를 존재 유무를 동시에 검출할 수 있다는 것이고, 단점으로는 imidacloprid가 교차반응성을 갖는 다른 약제와 혼합되어 있을 때 정확한 검출 및 측정이 어렵다는 것이다 (박, 2003).

표 5는 imidacloprid와 구조적으로 매우 유사한 살충제 acetamiprid와 thiacloprid의 교차반응성의 결과를 보여주는데, 교차반응성은 각각 28.8%, 14.6%로 나타났다. 비교적 높지 않은 값으로 잔류량의 검출은 쉽지 않지만, 유무정도는 검출이 가능할 것으로 판단된다.

Table 5. Cross-Reactivity of Some Structurally Related Compounds to the Rabbit D Antiserum in the ELISA

Compound	Chemical structure	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Imidacloprid		2.88	100
Acetamiprid		10	28.8
Thiacloprid		19.7	14.6

% Cross-reactivity (CR) = (IC<sub>50</sub> of imidacloprid/IC<sub>50</sub> of test compound)

#### 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 계측시스

템을 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 측정한 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.

### 제3절 살충제 Imidacloprid의 단클론항체 생산

#### 1. 서론

1984년 일본 Bayer 사에 의하여 소개된 imidacloprid는 침투이행성이 높은 nitroguanidine group의 접촉성 살충제이다. Imidacloprid의 살충작용은 신속하며, 작용부위는 신경계 synapse 후막의 acetylcholine receptor에 작용하여 신경전달을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Abbink, 1991; Shiokawa 등, 1994). 우리나라에서는 2003년 13,984 M/T(실물량)이 단제 또는 혼합제 형태로 생산되어 수도용 및 원예용으로 사용되고 있다.

환경시료 중에 잔류하는 imidacloprid의 분석을 위하여 HPLC (HPLC/MS) 및 GC (GC/MS)를 이용한 방법 (Placke와 Weber, 1993; Ishii 등, 1994; Fernandez-Alba 등, 1996; Valverde Garcia 등, 1996; Vilchez 등, 1996; Baskaran 등, 1997; Navalon 등, 1997; Martínez Galera 등, 1998; MacDonald와 Meyer, 1998)이 보고 되었다. 그러나 이들 기기는 상당히 고가품이고 운영상 전문지식이 요구되며, 기기분석 전 시료의 전처리 과정 또한 복잡하고 집약적인 노동력이 요구되어 실제 imidacloprid의 잔류량 확인까지 소요되는 시간은 상당히 길다. 이러한 여러 단점에도 불구하고 여전히 이러한 기기분석 방법이 사용되고 있다는 것은 이와 대체할 수 있는 신기술이 아직까지 없거나 기기에 의한 imidacloprid의 분석감도를 증가할 수 없기 때문일 것이다.

최근의 생명공학기법 중 특이 항체에 기초한 immunoassay는 재조합 화합물이나 고전적 화합물의 새로운 분석법을 제공해 준다. 특히 개방화 시대에 대량으로 유입되는 농산물이나 환경시료의 농약에 의한 오염정도의 monitoring에는 신속하고 간편하며 저비용으로 높은 감도의 분석법에 의한 분석기술이 요구된다. 그러므로 본 연구에서는 현재 전 세계적으로 각광을

받고 있으며 우리 나라에서도 수도용 및 원예용으로 사용되고 있는 침투성 살충제인 imidacloprid를 대상 농약으로 선정하여 면역원으로서 적합한 구조의 수종 hapten을 설계하여 합성한 후 항체 (antibody)를 생산하여 competitive indirect ELISA 방법에 의하여 최적화 (optimization)과정을 거친다. 항체는 일반적으로 다클론 항체 (polyclonal antibody)와 단클론 항체 (monoclonal antibody)로 구분하는데, 다클론 항체는 생산기간이 3-6개월 정도로 단클론 항체의 약 1년에 비해 짧아 생산하기 쉽지만 단클론 항체는 대량생산이 가능하고 순도가 높아 특이성이 다클론 항체에 비해 높으며 표준화가 쉽다.

본 연구에서는 현장용 측정장치에 활용될 효소면역분석법에 보다 적합한 단클론항체의 생산기술을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. Hapten의 합성

분석대상 농약인 imidacloprid는 분자량 (M.W.=255.7)이 너무 작아 그 자체로 면역원으로 사용하기에는 적당하지 않기 때문에 새로운 hapten을 합성해야만 한다. Hapten 역시 분자량이 작아서 면역원으로 직접 사용할 수 없으므로 분자량이 큰 담체단백질 (BSA:Bovine serum albumin이나 KLH:keyhole limpet hemocyanin)과 접합시켜 항체반응을 유도시켜야 한다. 따라서 새로이 합성한 hapten은 담체단백질과의 접합이 용이한 관능기 (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>)를 지니고 있어야 하고 그 구조가 분석하고자 하는 대상 화합물의 구조와 유사하여 생산된 항체가 분석대상 화합물과 특이적으로 반응해야만 한다 (Szurdoki 등, 1995).

ELISA에서 중요한 것은 역가가 높은 항체를 만들 수 있도록 hapten을 과학적이고 합리적으로 잘 설계하고 합성한 후 immunogen으로 사용하여 다클론항체와 단클론항체를 만드는 일이다. 본 연구에서는 항체생산을 위하여 분석대상농약인 imidacloprid와 유사한 화학구조를 가지며 또한

carboxyl 관능기를 지닌 5종의 이미 합성된 hapten 중에서 양호한 면역반응과 저해반응을 보였던 hapten I 과 hapten II 를 사용하였다.

#### 1) Hapten I 의 합성

그림 1에서 보는 바와 같이 질소 기류 하에서 imidacloprid 3.84 g (15 mmol)을 건조된 chloroform 81 mL에 녹인 다음 triethyl amine (3.64 g)을 천천히 가하고 반응용기를 0°C로 냉각시킨 후 81 mL의 chloroform에 녹인 methyl succinyl chloride 용액을 천천히 적가하였다. 적가 후 30분간 같은 온도에서 교반하고 상온에서 다시 24시간 교반하였다. 반응혼합액에 5 mL의 10% 염산을 가한 후 chloroform으로 3회 추출하여 유기층을 포화식염수로 세척한 후 무수황산마그네슘으로 건조, 여과, 농축하여 조생성물을 얻은 다음 column chromatography (ethyl acetate)에 의하여 methyl ester (761 mg; yield, 15.6%)을 얻었다.

Methyl ester (489 mg, 1.32 mmol)을 최소량의 chloroform에 녹여 5°C로 냉각시켰다. 이 용액에 물 2 mL에 lithium hydroxide (166 mg, 3.96 mmol; LiOH · H<sub>2</sub>O)을 녹인 용액을 천천히 적가하였다. 이 반응혼합액을 4 시간동안 (5~10°C) 교반한 후 1 N 염산 (3.96 mL)을 가하고 그 반응혼합물의 용매를 감압제거하여 조생성물을 얻은 후 column chromatography [methanol: ethyl acetate (1:2, v/v)]에 의하여 357 mg의 백색 hapten I (yield, 83.0 %)를 얻었다.

#### 2) Hapten II 의 합성

그림 2에서 보는 바와 같이 10 mL의 dry dimethylformamide (DMF)에 녹아 있는 511.4 mg (2 mmol)의 imidacloprid에 52.8 mg (2.2 mmol)의 NaH를 첨가하여 0°C에서 한 시간 동안 반응시키고 975.3 mg (5 mmol)의 ethyl-4-bromobutyrate를 서서히 적가한 다음 12시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응종료 후 반응물에 80 mL의 물을 넣고 용액의 pH를 묽은 염산으로 6-7로 조정 한 다음 80 mL의 chloroform으로 2회 추출하여

유기 용매층을 감압 농축하였다. 농축잔류물에 다시 10 mL의 2N HCl을 넣고 60°C에서 4시간 동안 가수분해한 다음 1N NaOH로 pH를 6-7로 조정하여 50 mL의 ethyl acetate로 2회 추출하였다. 유기 용매층은 모두 받아서 감압 농축한 다음 silica gel flash column chromatography와 chromatotron을 사용하여 150 mg의 백색고체의 hapten II를 얻었다.

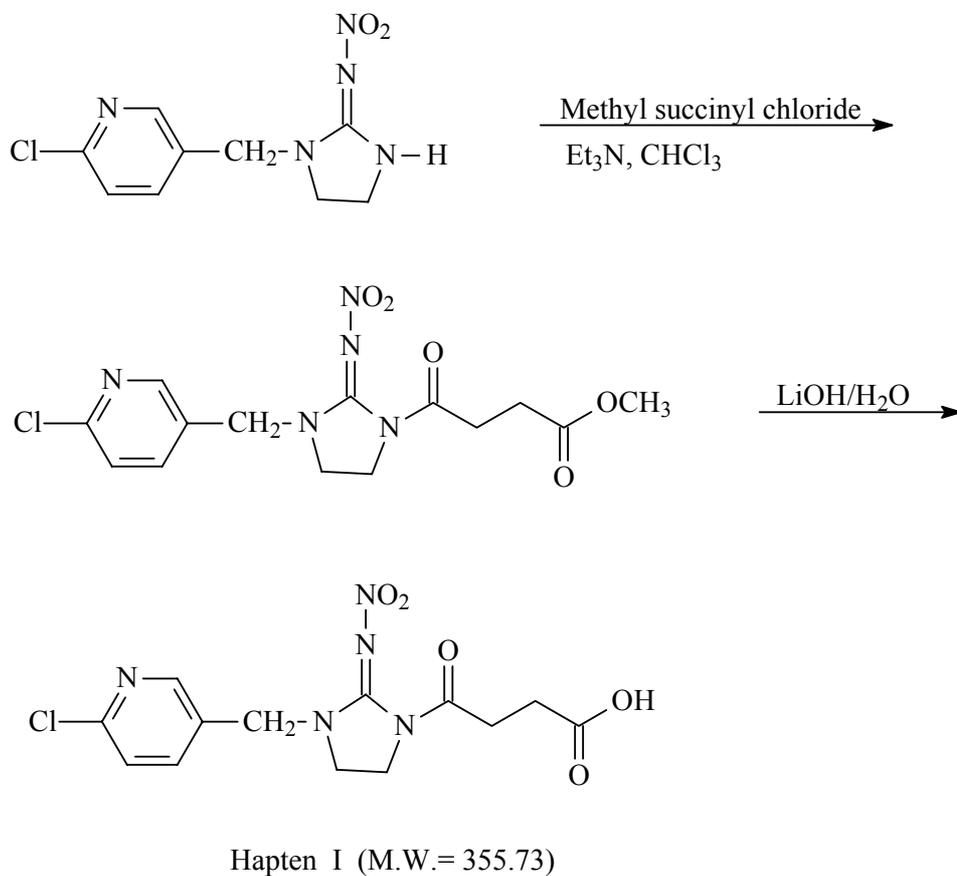


Fig. 1. Synthesis of hapten I for the antigenic imidacloprid.

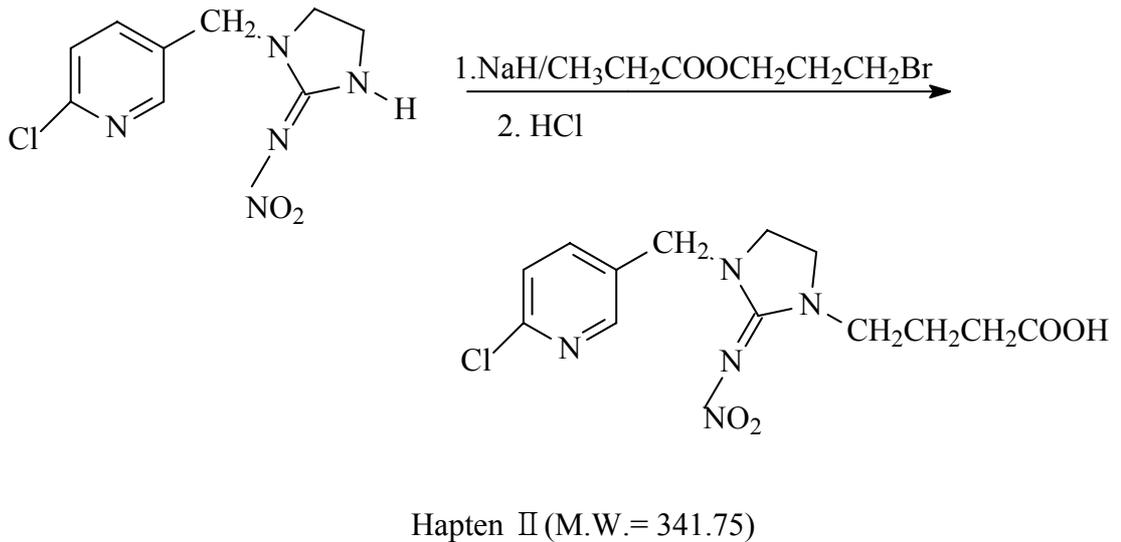


Fig. 2. Synthesis of hapten II for the antigenic imidacloprid.

나. Hapten의 활성 ester 합성

합성한 hapten 자체만으로는 분자량이 너무 작아 코팅항원과 면역원으로 사용할 수 없기 때문에 분자량이 큰 BSA(bovine serum albumin)와 KLH(keyhole limpet hemocyanin)를 접합시켜야 한다. 단백질과의 접합이

용이 하도록 Fig. 3과 같이 활성 ester로 만들어 주었다. (Langone and Van Vunakis, 1975). 즉, 0.04 mmol hapten, 0.04 mmol NHS (N-hydroxysuccinimide), 그리고 0.044 mmol DCC(1,3-dicyclohexyl carbodiimide)를 0.2 mL의 dry DMF (dimethylformamide)에 넣고 실온에서 5시간 동안 교반한 후 여과하여 생성된 침전물(DCU)을 제거하여 활성 ester hapten을 얻었다.

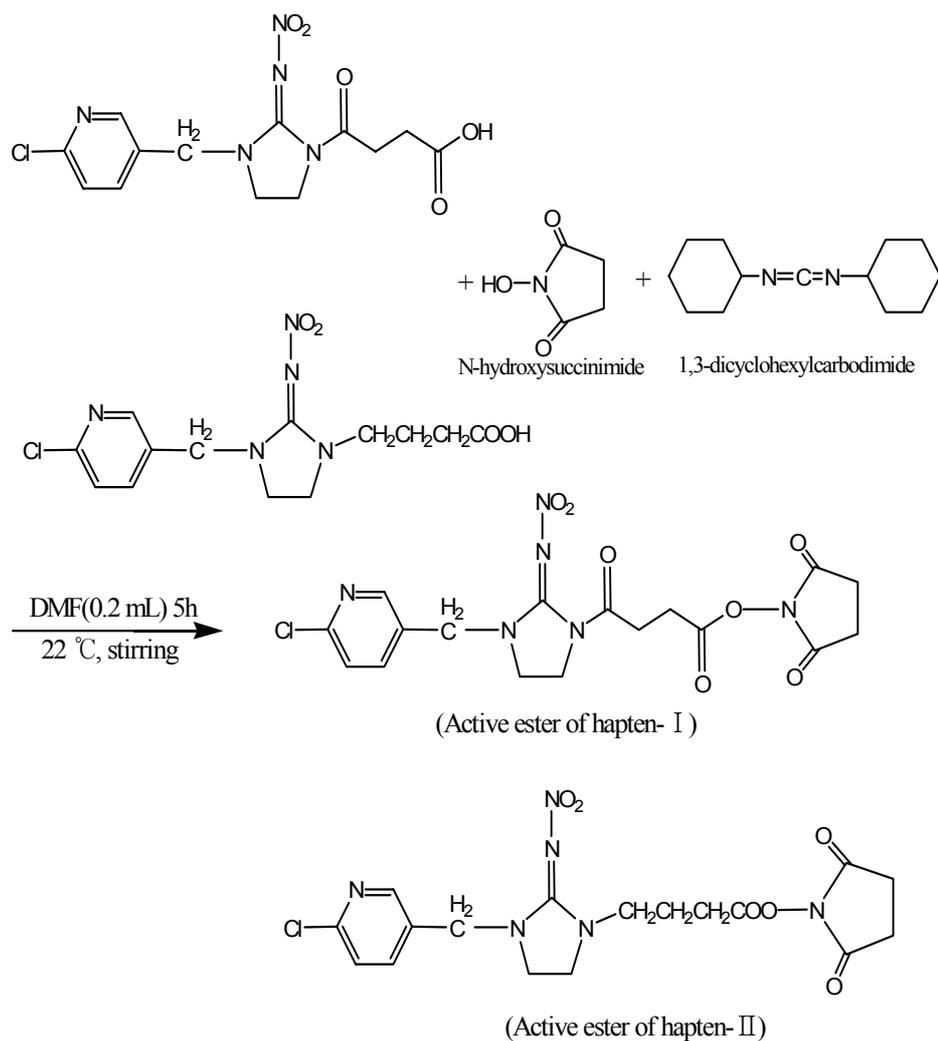


Fig. 3. Synthesis of activated esters of the carboxylic haptens.

#### 다. 담체 단백질과의 접합

활성화된 ester 형태의 hapten을 일정량은 BSA(bovine serum albumin)와 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 단백질용액에 각각 첨가하여 hapten-단백질 conjugate를 조제하였다(Fig. 4). 단백질 용액을 1 mL의 0.05 M borate buffer(sodium borate · 10H<sub>2</sub>O, pH 8.0)에 10 mg의 BSA 또는 KLH를 각각 녹이고 격렬히 교반하면서 위에서 얻은 활성화 hapten 여과액 약 200 µL를 약 20분 동안 서서히 첨가하였다. 이 hapten-protein conjugate는 4°C에서 24h 동안 반응시킨 후 투석막(6000-8000 MW cutoff)을 이용하여 약 10배 용량의 완충용액(1 × PBS, pH 7.5)속에서 교반하면서 4°C에서 5일간 투석하여 미반응의 저분자 물질들을 제거하였다. 투석이 종료되면 투석막내의 용액을 polypropylene vial에 넣은 후 -70°C이하에서 사용 전까지 보관하였다.

#### 라. 단클론 항체 생산

##### 1) 항원 (Antigen)

Hapten I, II-KLH conjugate는 항원으로 사용하였다. 즉 hapten I, II-KLH conjugate를 단클론항체 생산을 위하여 mouse 면역에, hapten I, II-BSA conjugate는 세포융합 후 imidacloprid에 특이적으로 반응하는 양성 hybridoma를 선별하기 위한 효소면역법의 capture antigen(coating antigen)으로 사용하였다.

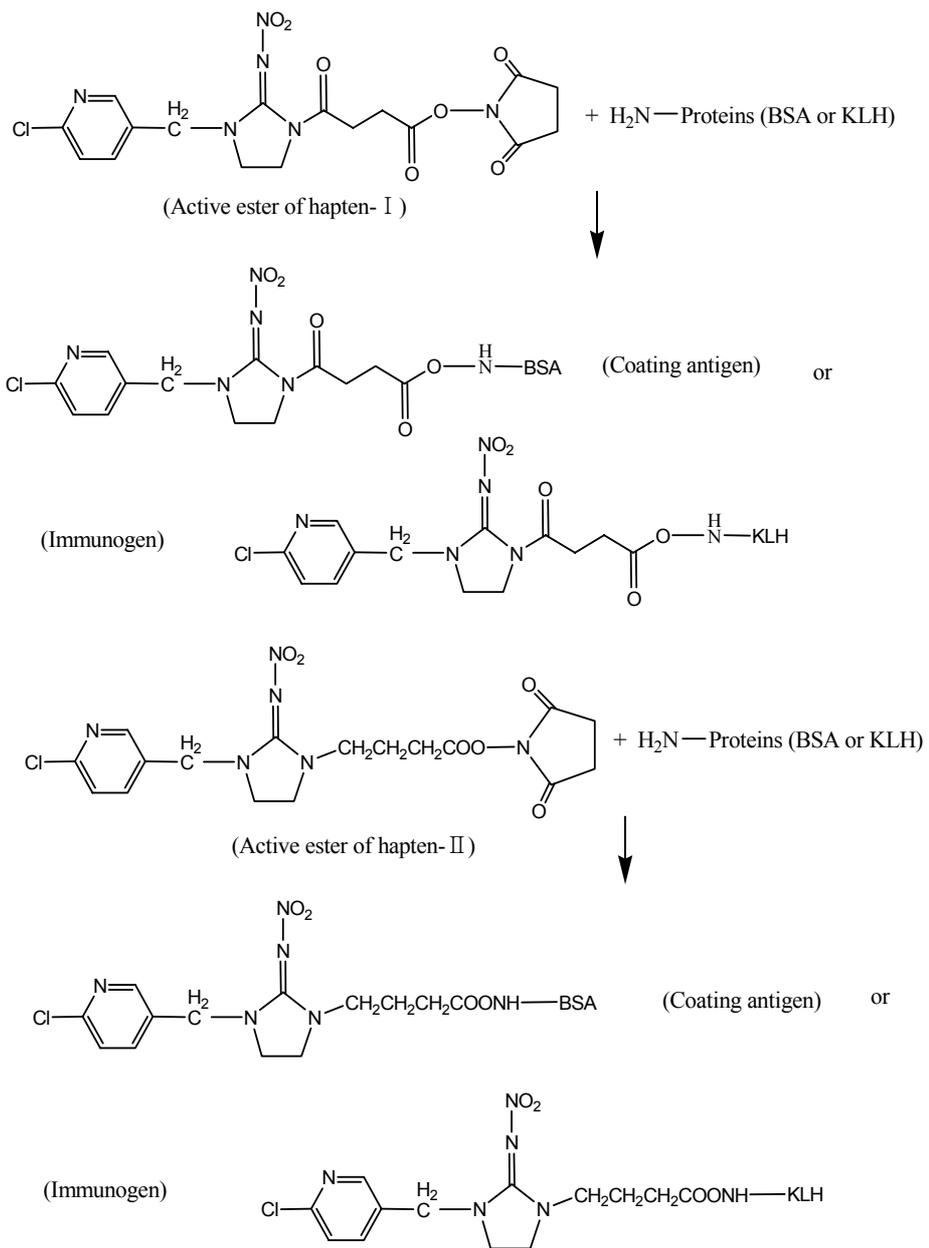


Fig. 4. Conjugation of the carboxylic acid haptens to carrier proteins via NHS esters.

## 2) Mouse 면역

세포융합에 사용할 mouse는 4-6 주령의 BALB/c strain으로 (주)샘타코에서 구입하여 사용하였다. Mouse 면역은 footpad 접종법을 실시하였다. Footpad 접종법은 4일 간격으로 mouse의 foot에 hapten-II-KLH conjugate 10 µg protein을 각각 0.85% 멸균식염수 1 mL에 용해시킨 후 1 mL의 Freund's complete adjuvant와 완전히 유화하여 각각의 임파절에 200 µL씩 3회 접종하였으며, 1차 접종에만 complete Freund's adjuvant를 사용하고 1차접종 이후에는 incomplete Freund's adjuvant를 사용하였다. 마지막 접종 3일 후 inguinal 및 axillary lymph node가 커진 것을 확인한 후 세포융합을 실시하였다.

## 3) 세포융합

세포융합은 hapten I,II-KLH conjugate로 면역된 mouse의 비장세포 혹은 inguinal과 axillary lymph node로부터 분리한 면역세포(B세포)와 Sp2/0 myeloma 세포(T세포, 골수종양 세포)막을 인위적으로 부착시키게 하는 역할을 하는 polyethylene glycol (PEG; M.W. 1500)을 사용하여 일반적인 세포융합방법에 따라 시행하였다. 이때 B세포와 골수 종양 세포의 혼합 비율은 4:1이었다. 세포융합이 끝난 혼합세포액은 소태아혈청 및 HAT(50 µM Hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, 16 µM thymidine)가 함유된 세포배양액에 부유시킨 다음 96-well plate에 well 당 100 µL씩 분주하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

## 4) 효소면역법

hapten에 특이적으로 반응하는 항체의 양성검사를 위한 효소면역법(ELISA)는 96-well microplate에 coating buffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6)로 1 µg/mL의 농도로 희석한 각각의 hapten II-BSA conjugate를 well 당 100 µL씩 첨가하여 4°C에서 12시간 반응시켜 부착시켰다. 항원 부

작 후 3% non-fat dry milk를 well 당 100  $\mu$ L씩 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 항원이 부착되지 않은 부위를 차단시켰다. Tween 20이 0.05% 첨가된 PBS(PBS-T)로 5회 세척한 후 검색할 hybridoma 상층액을 100  $\mu$ L(1:10 = hybridoma 상층액 : PBS, v/v) 첨가하고 24°C에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 5회 세척 후 1:2000으로 희석된 goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase를 well 당 100  $\mu$ L 첨가하여 24°C에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 5회 세척 후 citrate-acetate buffer에 TMB(0.6% 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mixture를 well 당 100  $\mu$ L씩 넣어 24°C에서 15분간 효소반응을 유도한 후 4N 황산용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이후 ELISA reader (Microplate Reader 550, BIO-RAD Instruments)로 450~655 nm에서 흡광도를 측정하여 양성 hybridoma를 선별하였다.(Fig .5)

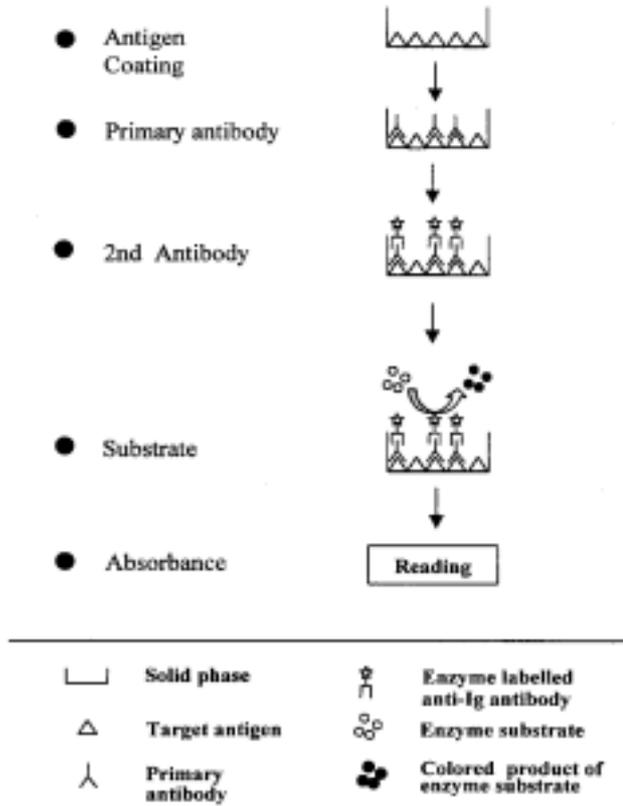


Fig. 5. Scheme of noncompetitive indirect ELISA.

##### 5) 스크리닝(Screening)

세포 융합 시킨 세포를 HAT 배양액에서 배양하면 B세포와 골수종양 세포가 융합된 것만이 최종적으로 생존하여 포도송이처럼 분열증식한다. 이것을 클론이라 하는데 well의 30%정도 증식 하였을때 합성된 hapten에 대하여 특이적으로 반응하는 양성 잡종세포주 클론을 일반적인 효소면역법(Enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA)를 이용하여 선별하였다. Hapten II-KLH conjugate에 의해서 얻어낸 잡종세포주(culture supernatant)들이 imidacloprid 잔류분석을 위한 항체로 적합한지를 시험하여 비교하였다. Coating antigen인 hapten II-BSA conjugate의 농도는 각각 1,

0.1, 0.01 $\mu$ g/mL로 하였으며, 10배로 1 $\times$ PBST에 희석한 단클론항체와 2000배로 희석한 2차 항체 (Goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase)를 사용하였다. Imidacloprid의 분석감도를 알아보기 위하여 앞의 4)와 같은 방법으로 시험하였다. 이때 분석법의 최적 조건은 이미 앞서 실험된 다클론 항체를 이용한 imidacloprid의 효소면역적 분석법 개발과 같이 하였다.(Lee 등, 2001)

#### 6) 클론화 작업(Cloning)

융합된 세포 중 양성 잡종세포주(B세포-T세포 융합)로 분석에 필요한 단클론 항체를 생산하는 것이라 확인된 well에는 원하는 단클론 항체를 생산하는 세포외에도 많은 세포가 혼합되어 있다. 그러므로 한 종류의 항체만을 생산하는 단클론 항체를 얻기 위해서 하나의 잡종세포를 채취하여 다른 배양용기에서 증식시켜 단일 클론을 만든다. 이런 클론화 작업은 96-well plate를 이용하여 한계 희석법(Limiting dilution)을 사용 하였다. 배양한 잡종세포의 수를 측정하여 배양용기 well 당 0.5개에서 1개 정도가 들어가게끔 희석하여 배양시키면 하나의 세포가 증식하여 자라는 well의 세포를 증식 배양한다.

### 3. 결과 및 고찰

우리가 원하는 imidacloprid와 특이적으로 작용하는 단클론 항체를 생산하기 위하여 imidacloprid의 hapten I 과 hapten II에 KLH를 접합시킨 항원을 사용하여 단클론 항체 생산을 시도하여 양성 hybridoma를 선별하였다. 그러나 hapten I 항원을 이용한 항체들 중에서는 양성의 잡종 세포주들이 나타나지 않았고, hapten II 항원을 이용한 항체들 중 17개의 양성 잡종세포주를 찾아 효소면역법(ELISA)으로 조사하였다. Table1에서 보듯이 각각의 면역마다 세포 융합 후 좋은 inhibition %를 나타내는 양성 잡종 세포주를 표로 나타내었다. 이들을 클론화 작업(Limiting dilution)을

거쳐 특이적으로 imidacloprid를 분석할 수 있는 단클론 항체를 찾아 계속적으로 실험을 해보았지만 클론화 작업을 진행할수록 항체의 activity가 떨어져 단클론 항체를 이용한 최적 ELISA의 감도가 떨어졌다. 그 중 D6를 이용하여 imidacloprid를 분석해 본 결과 약 7000 ng/mL의 IC<sub>50</sub>를 보였다. 이는 다클론 항체를 이용한 분석결과인 17.3 ng/mL 보다도 감도가 상당히 낮았다. 따라서 농산물 시료나 환경 중에는 imidacloprid의 잔류량이 수 ppb 혹은 수 ppm의 아주 미량이므로 mouse에서 생산된 단클론 항체를 이용한 ELISA는 imidacloprid를 monitoring하고 정량하는데 적합하지 않다고 판단되었다.

본 연구에서 얻어진 양성 잡종 세포주를 클론화하여 얻은 단클론 항체들은 살충제 imidacloprid와 특이적으로 작용하지 않았다. 즉 경합적 효소면역법을 이용하여 imidacloprid를 검출하기 위해서는 imidacloprid와 강력하게 결합하는 단클론 항체가 필요한데 연구 결과에서 볼 수 있듯이 검출이 이루어지지 않았다. 이것은 imidacloprid의 pyridine환 부위보다는 hapten과 BSA 혹은 KLH를 연결하는 linker 부위가 immunodominant하여 많은 hybridoma가 이 부위에 대한 것이 아닌가 생각된다. 이것은 imidacloprid의 pyridine환을 인지할 수 있는 강력한 단클론 항체가 본 연구에서는 생산되지 않은 것으로 생각된다. 또한 단클론 항체는 장기간의 시간과 전문 기술이 요구되고 있으며, 원하는 모든 단클론 항체를 만들기가 쉽지 않은 단점을 가지고 있다.

본 연구에서와 같이 imidacloprid와 강력하게 결합하는 단클론항체를 생산하기 위해서는 imidazolidine 부위를 인지할 수 있는 잡종 세포주를 생각할 수 있는데, 이것은 imidacloprid의 pyridine환 부위에 담체단백질을 접합시켜 imidazolidine 부위를 인지할 수 있는 hybridoma를 생산하여 imidacloprid를 검출하는 경합적 효소면역법에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Screening of the monoclonal antibodies(MAb) obtained from test mice by homologous ciELISAs for the inhibition by the analyte imidacloprid.

Immunization	MAb	Immunization route	Immunogen	Coating antigen	
				Conc. of imidacloprid (OD at 450~655 nm)	
				1000	10
				% Inhibition <sup>***</sup>	
I	E5 <sup>*</sup>	FP <sup>**</sup>	H- II -KLH	15.5	8.4
	E7	"	H- II -KLH	55.7	11.1
	F4	"	H- II -KLH	20.3	14.2
II	E1	FP	H- II -KLH	14.0	3.9
	F6	"	H- II -KLH	25.9	19.6
	G3	"	H- II -KLH	14.1	0.0
III	B2	FP	H- II -KLH	12.9	3.0
	D4	"	H- II -KLH	43.7	13.5
	F7	"	H- II -KLH	54.1	26.1
IV	B7	FP	H- II -KLH	13.3	7.5
	D2	"	H- II -KLH	33.4	28.2
	F5	"	H- II -KLH	3.1	32.6
V	B4	FP	H- II -KLH	5.0	29.2
	B5	"	H- II -KLH	80.0	26.7
	C8	"	H- II -KLH	6.3	25.9
VI	D6	FP	H- II -KLH	95.8	39.8
	F2	"	H- II -KLH	4.0	10.0

\* Letters and numbers represent the positions in the 96-well plates.

\*\* FP, footpad inoculation.

\*\*\* % Inhibition =  $[1-(A_{\text{imidacloprid}}/A_{\text{control}})] \times 100$

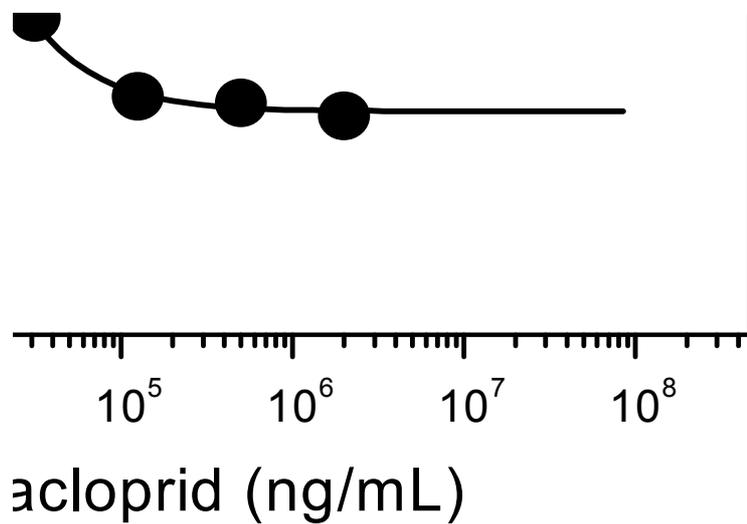


Fig. 6. Inhibition curve for imidacloprid ELISA, using a D6/VI monoclonal antibody (diluted 1:10 with 1×PBS), and a coating antigen (hapten II-BSA conjugate, 1.0  $\mu$ g/mL). The curve was obtained by a four-parameter curve fit.

#### 4. 결론 및 요약

항체는 일반적으로 다클론 항체(polyclonal antibody)와 단클론 항체(monoclonal antibody)로 구분하는데, 다클론 항체는 생산기간이 3-6개월 정도로 단클론 항체의 약 1년에 비해 짧아 생산하기 쉽지만 단클론 항체는 대량생산이 가능하고 순도가 높아 특이성이 다클론 항체에 비해 높으며 표준화가 쉽다. 이런 이유로 인해 현장용으로 간편하게 사용될 수 있는 측정장치의 효소면역분석법에는 단클론항체의 사용이 다클론항체보다 바람직한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 imidacloprid와 특이적으로 작용하는 단클론 항체를 생산하기 위하여 imidacloprid의 hapten I 과 hapten II에 KLH를 접합시킨 항원을 사용하여 단클론 항체 생산을 시도하여 양성 hybridoma를 선별하였다. 그러나 hapten I 항원을 이용한 항체들 중에서는 양성의 잡종 세포주들이 나타나지 않았고, hapten II 항원을 이용한 항체들 중 17개의 양성 잡종세포주를 찾아 효소면역법(ELISA)으로 조사하였다. Table1에서 보듯이 각각의 면역마다 세포 융합 후 좋은 inhibition %를 나타내는 양성 잡종 세포주를 표로 나타내었다. 이들을 클론화 작업(Limiting dilution)을 거쳐 특이적으로 imidacloprid를 분석할 수 있는 단클론 항체를 찾아 계속적으로 실험을 해보았지만 클론화 작업을 진행할수록 항체의 activity가 떨어져 단클론 항체를 이용한 최적 ELISA의 감도가 떨어졌다. 그 중 일부를 이용하여 imidacloprid를 분석해 본 결과 낮은 감도를 보였다. 따라서 농산물 시료나 환경 중에 잔류하는 수 ppb 혹은 수 ppm의 아주 미량을 감지하고 정량하는데 적합하지 않다고 판단되었다.

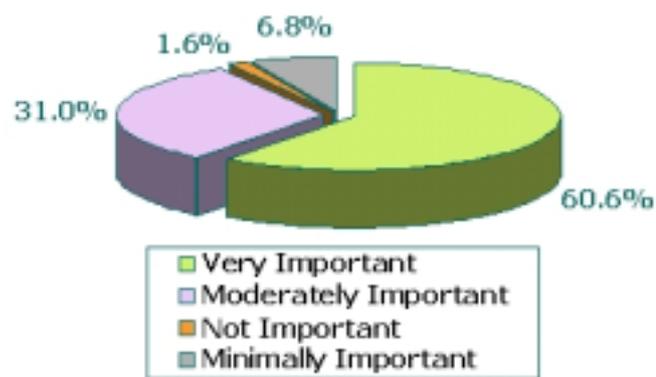
## 제4절 마이크로파를 이용한 시료전처리 시스템

### 1. 서론

최근에는 고가의 장비를 이용하지 않고 저렴한 비용으로 잔류농약을 분석할 수 있는 방법으로 효소면역분석법(ELISA)이 개발되었는데(Lee 등, 2001), 이 분석법은 관행적인 방법보다 경비, 시간, 노력 등은 단축하였으나, 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구된다. 이에 본 연구에서는 기존의 효소면역분석법에서 2시간 정도 소요되는 시간을 15분으로 단축하는 방법을 개발하였고, 이를 이용하여 현장에서 실시간 측정이 가능한 계측제어 시스템을 개발하였다. 그러나 분석하는 방법에 대한 연구가 이루어졌으며, 정확한 분석을 하기 위해 시료를 적합한 형태로 미리 처리하는 시료전처리에 대한 연구가 미흡하다.

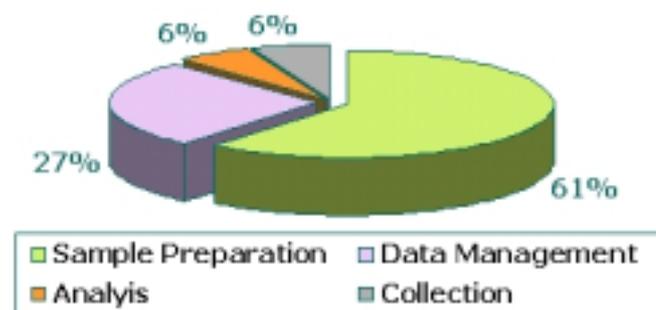
잔류농약 분석에 있어서 시료의 전처리 과정은 분석대상 시료에 대한 농약성분의 손실이나 오염 없도록 하여야 하며, 이 과정은 매우 다양하고 반복적으로 이루어진다. 또한, 분석하고자 하는 시료에 따라 유도체화, 용매 또는 고체상 추출, 농축 등의 적절한 처리가 이루어져야 한다. 아무리 성능이 우수한 분석기기를 이용한다 하더라도 시료의 전처리가 잘못되면 정확한 분석결과를 얻을 수 없으며 정밀성도 기대할 수 없다.

미국에서 설문조사한 "An Overview of Sample Preparation LC-GC"에서 그림 1과 같이 응답자의 60%이상이 시료전처리를 매우 중요하게 생각하는 반면, 중요하지 않다고 생각하는 사람은 1.6%정도에 불과하다. 또한, 실험분석에 걸리는 시간을 살펴보면 그림 2와 같이 전처리와 데이터 처리에만 88%이상의 시간을 소요하고 있으며 많은 시간이 전처리에 할애되고 있음을 알 수 있다. 그러므로 농약 잔류량을 정확하고 신속하게 검출할 수 있고, 최단 시간 내에 현장에서 비전문가도 시료의 전처리를 완료할 수 있는 시료전처리 장치의 개발이 절실히 요구된다.



"An Overview of Sample Preparation" LC-GC, Vol.9, No.1, 1991

Fig. 1. Importance of Sample Preparation.



"An Overview of Sample Preparation" LC-GC, Vol.9, No.1, 1991

Fig. 2. Distribution of time Analytical Chemists Spend on Sample Analysis.

본 연구와 관련하여 농산물의 잔류농약을 실시간으로 검출하기 위해 사용되는 효소면역분석법(ELISA)은 최근에 기기 분석법의 단점을 보완하여 감도가 좋고 신속성과 특수성을 가지며 가격이 저렴한 분석법으로 개발 연구가 수행되고 있다.(Wie & Hammock, 1984; Van 등, 1986). 이러한 분석법은 1950년대 이후 생의학 분야에서 주로 스테로이드, 펩티드, 알칼로이드, 핵산 유도체, 비타민, 항생제 등의 연구에 사용되었으나, 1980년대부터 본격적으로 농약의 잔류분석에 응용되었다(Hammock & Mumma, 1980; Hammock 등, 1990).

잔류농약 분석을 위한 시료전처리와 관련하여 Kim 등(2000)은 건조된 한약재 시료인 백삼, 홍삼, 지황, 당귀 및 시호 중에 잔류되어 있는 Tolclofos-methyl 및 Quintozene의 추출에 Microwave 추출법을 이용하고자 Soxhlet 추출법과 추출효율을 비교 분석하였다. 최적의 추출용매, 추출시간 및 Power supply의 강도 등을 조사한 결과 Microwave 추출하기 위한 용매는 Acetone이 가장 효율적 이었으며, 추출효율은 Soxhlet 7시간 추출과 Microwave power 45W에서 3~5분 추출하였을 경우와 거의 같은 추출효율이 나타났다고 보고되었다. 또한 잔류농약 분석시 불순물의 방해를 고려한 최적의 추출효율을 나타내는 Microwave power는 45~90W로 보고되었다.

본 연구는 농산물의 잔류농약을 신속하게 실시간으로 측정하기 위한 시료전처리 장치를 개발할 목적으로 수행되었으며, 이를 위해 1, 2년차에서 개발된 실시간 잔류농약 측정용 생물반응 및 계측제어 시스템에 적합하도록 마이크로웨이브를 이용한 시료전처리 방법을 개발하고, 실시간 측정용 효소면역분석법을 기본으로 하여 잔류농약 분석을 위한 시료의 전처리과정을 간편하고 비전문가도 쉽게 할 수 있는 시스템을 구성하고, 회수를 검증을 통해 그 성능을 평가하려 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 재료

#### 가) 시료 전처리

실험에 사용된 배(pear) 시료는 시중의 슈퍼마켓에서 구입하였으며, 껍질부분을 2mm정도 두께로 깎아 분쇄기로 분쇄 시킨 후 냉동고에 보관하여 시료로 사용하였다. 분쇄기는 시중에 판매되는 후드믹서(BW-3300, 부원인터내쇼날, 한국)를 사용하였다.

사용된 시약 중 acetone과 Celite 545는 동양제철화학(주)에서 시약 1급용을 구입 사용하였고, hexane은 Wako사(Wako pure chemical Industries, Ltd, Japan)의 잔류농약분석용을 사용하였다.

분석된 농약은 현재 국내에서 굴나방, 조팝나무, 진딧물, 벼멸구 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 복숭아 및 벼농사에 광범위하게 사용하는 Imidacloprid로 neonicotinoid계 살충제이며, 표준품은 Wako사(Wako pure chemical Industries, Ltd, Japan)에서 구입하였다.

#### 나) 잔류농약 측정

Imidacloprid의 최적화 효소면역법을 위한 코팅 항원으로 hapten-3-BSA을 사용했으며 항체로는 hapten-5-KLH를 면역원으로 하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 이들 항원과 항체는 충북대학교 농화학 과 실험실에서 제조하였다. 그리고 이차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3, 3', 5', 5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A)로부터 구입하였다.

Microplate는 Maxisorp 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno Plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였다. 실험 결과 측정은 분광광도계(Spectrophotometer)를 사용하여 측정하는 Bio-Rad Laboratories, Inc.의 microplate reader(model 550)를 이용하였다.

## 2) 실험장치

마이크로웨이브를 이용한 농산물 시료의 전처리를 위한 실험장치의 구조는 그림 3과 같다. 마이크로웨이브 전달과정은 마그네트론(magnetron)에서 발생된 마이크로웨이브가 도파관(導波管, waveguide)를 따라 microwave cavity에 도달하면 우산모양의 분산기(splitter)가 마이크로파를 각기 다른 방향으로 분산시켜 vessel 내부에 있는 시료를 가열시킨다.

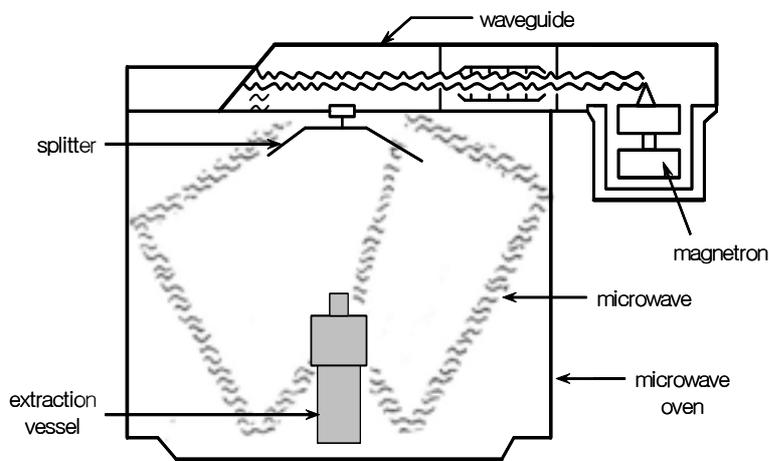


Fig. 3. Scheme of microwave system

마이크로웨이브 발생장치로 불꽃방전을 이용하면 거의 모든 파장의 마이크로파를 발생시킬 수 있으나 출력이 약하고 불안정하며 보통의 전자관은 전자운동 속도가 비교적 느려 1주기의 시간이 극히 짧은 마이크로파 발생에 적당하지 않다. 따라서, 마이크로파를 발생시키려면 특별한 전자관, 클라이스트론, 마그네트론, 레이저 등을 쓰며 전송에는 주로 입체회

로를 쓴다. 이중 마그네트론이 가장 널리 이용되는데 마그네트론(magnetron)은 양극과 음극으로 구성된 원추형의 이극진공관(diode)으로 되어있다. Microwave oven 내부는 프루오로 카본 등으로 코팅되어 내산성이며 실험자의 보호를 위해 oven 내부의 공기를 2.8 m<sup>3</sup>/min 이상으로 환기시킬 수 있다. 또한 마이크로파의 노출을 방지하기 위해 오븐이 열려져 있을 때에는 마그네트론이 작동되지 않도록 되어있다.

Extraction vessel은 시료의 오염을 방지하고 끓는 점 이상까지 시료를 신속하게 가열할 수 있는 밀폐형(closed type)으로 되어있으며, 용기는 300ml 크기로서 마이크로파를 흡수하지 않고 통과하고 내화학성 성질을 갖고 있는 비극성 재질의 테프론(PFA, perfluoroalkoxy)이 사용되었다. 테프론의 녹는점은 300℃로 대부분의 유기용매와 반응하지 않는다. 그림 4는 본 실험에서 사용된 extraction vessel의 구조도를 나타낸다. 회전판은 마이크로웨이브에 의한 시료추출용 용기(extraction vessel)의 균일한 가열을 위해 사용되었으며, 회전판의 속도는 3rpm이다.

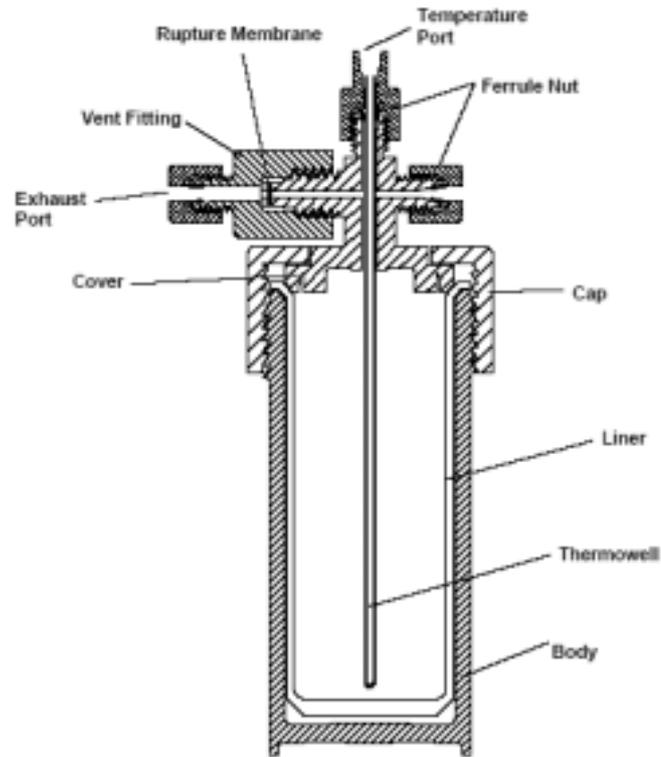


Fig. 4. Scheme of extraction vessel in microwave system.

### 3) 실험방법

#### 가) 시료 전처리

살충제 Imidacloprid의 잔류량 분석을 위해 분쇄된 배 시료 2.0g을 추출용 vessel에 넣고 Imidacloprid를 0.5ppm과 1.0ppm를 첨가하여 교반기로 혼합 후 30분 동안 반응시켜 추출하였다. 시료전처리 과정 중 적합한 추출방법을 찾기 위해 microwave와 sonication을 이용한 추출법을 비교 분석하기 위해 실험을 수행하였으며, 추출용매는 예비실험 결과를

참조하여 acetone을 사용하였다.

Microwave 추출의 경우 용매의 양을 10ml, power를 300, 700W의 조건으로 하여 추출 온도를 60, 80, 90, 120℃ 간격으로 하였고, 추출 시간을 1, 2, 3분 간격으로 변화시켜 추출하였다. sonication 추출은 용매 20ml로 20분간 추출하였다.

살충제 Imidacloprid의 잔류분석을 위한 전처리 과정은 그림 5와 같이 진행하였으며, 추출은 microwave 방법과 sonication 방법으로 나누어 하였다. 추출액은 감압 여과기로 여과하여 고형물과 액체로 분리한 후 evaporator를 사용하여 감압 농축하였다. 감압 농축된 액을 syringe filter를 이용하여 정제하였고, 정제된 액을 1×PBS용액으로 희석하여 20 ml이 되도록 적정한 후 최적화된 효소면역분석으로 분석하였다.

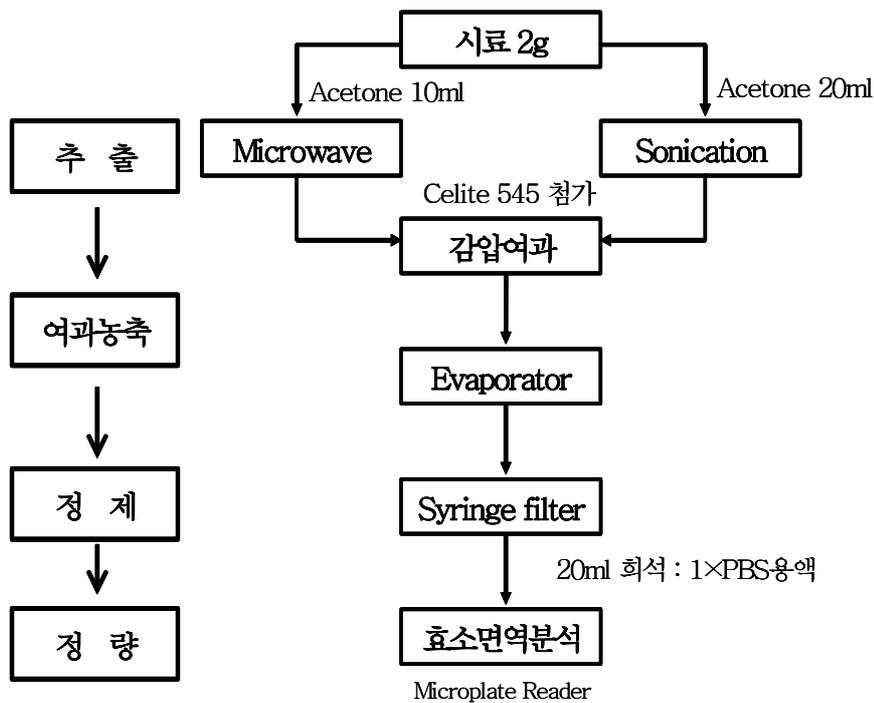


Fig. 5. Process of residual imidacloprid pretreatment.

나) 마이크로웨이브 출력점검

시료를 전처리하기 전에, 다음과 같은 방법으로 마이크로웨이브의 출력을 점검하였다. 마이크로웨이브 시스템을 5분 동안 예열한 후 마이크로파의 출력은 최고 출력의 50%에 설정하고, 가열시간은 2분으로 한다. 이때 19~25℃의 증류수 1,000ml를 Teflon 또는 Polypropylene 비이커에 넣고 0.1℃까지 측정이 가능한 온도계로 가열 전 증류수의 온도( $T_i$ )를 측정한다. 내부 순환공기의 영향으로 냉각되는 것을 방지하기 위해 2L 용기의 Teflon 또는 polypropylene 비이커를 준비하여 증류수가 들어 있는 비이커를 덮은 다음 실험자가 잘 볼 수 있는 위치인 microwave oven의 오른쪽 앞에 놓는다. microwave oven의 문을 닫고 각각의 작동조건에서 가열이 끝난 후 비이커를 꺼내어 온도분포를 균일하게 하기 위해 잘 저은 다음 온도( $T_f$ )를 측정한다. 측정이 끝난 후 식(1)을 이용하여 마이크로파의 출력을 계산한다.

$$\text{마이크로파 Power, } W = 35 \Delta T \text{ (W/}^\circ\text{C)} \quad (1)$$

여기서,

$$\Delta T = T_f - T_i$$

$T_f$  = 가열후 증류수의 온도(℃)

$T_i$  = 가열전 증류수의 온도(℃)

$$35 = \frac{K \times C_p \times M}{t}$$

$K$  = 4.1 (열량을 와트로 바꾸는 상수)

$C_p$  = 1.0 (물의열량, cal/g/℃)

$M$  = 물의 질량 (g)

$t$  = 시간 (sec)

다) 회수율 시험

배 시료를 2 g씩 달아 3개를 준비하여 공시료(blank)와 살충제 Imidacloprid를 0.5 mg/kg과 1.0 mg/kg를 첨가한 시료에 Acetone을 20 mL을 넣고 20분간 sonication 한 후 slurry에 celite 545를 넣고 Büchner funnel을 이용하여 여과한 후 20 mL 로 씻어 주었다. 이 여액을 40℃의 rotary evaporator에서 농축하였으며, 이 농축액을 1 × PBS를 사용하여 10배 희석액 상태로 만들어 주었다. 이 희석액을 숨을 채운 column을 이용하여 간이 여과한 후 다시 syringe filter를 이용하여 최종 여과하였다. 각 단계별로 희석액(×10, ×20, ×50, ×100)을 만들어 가장 낮은 matrix effect를 보이는 희석배수를 결정하였으며, 이후 회수율 시험에서는 결정된 희석배수(×100)를 이용하여 진행하였다. 분석방법은 최적화된 경합적 간접 ELISA법을 이용하였다. 분석물질의 회수율은 식(2)와 같이 계산한다.

$$\%recovery = \frac{amount\ recovered}{amount\ spiked} \times 100 \quad (2)$$

여기서, *amount recovered* = 회수한 잔류량

*amount spiked* = 첨가한 물질의 농도

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) Microwave의 가열 특성 및 용매설정

microwave를 이용한 배 시료의 잔류된 농약 추출의 최적의 용매를 찾기 위해 hexane, acetone, dichloromethane 등 세가지 용매를 이용하여 microwave 가열 시간에 따른 용매의 온도변화 상태를 조사한 결과

그림 6과 같으며, 이들 용매의 물리적 특성을 표 4에 나타내었다. 헥산의 경우 쌍극자모멘트(dipole moment)가 “0”이고 유전상수(dielectric constant)가 낮아 2분간 가열하였을 때 온도의 증가가 거의 없는 반면 acetone과 dichloromethane의 경우에는 끓는점까지 증가하여 평형에 도달하였다. 온도상승 속도와 평형도달 온도는 dichloromethane 보다 acetone이 훨씬 높은 결과를 보였고 시료 중으로의 침투성을 고려해 볼 때 추출용매로서는 acetone이 가장 적당한 것으로 사료되어 추출용매로 아세톤을 사용하였다.

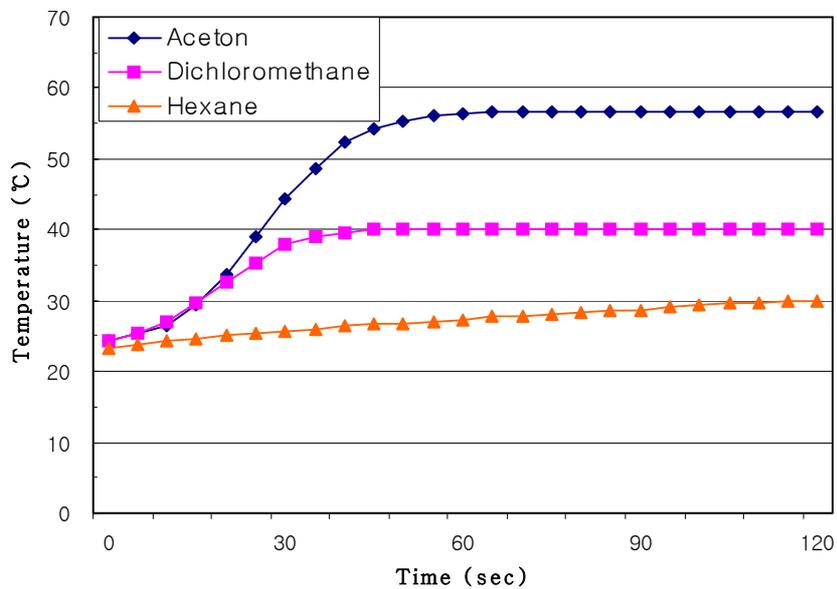


Fig. 6. Heating curve of various solvents by microwave.

Table 4. Physical properties of the solvents

Solvent	Boiling Point (°C)	Dipole Moment	Dielectric Constant	Density g/ml (25°C)
Hexane	68.7	0	1.88	0.65
Acetone	56.2	2.77	20.7	0.78
Dichloromethane	39.8	1.14	8.93	1.32

2) Microwave 출력 변화에 따른 시료전처리 결과

Microwave의 추출효율을 알아보기 위해 농약을 인위적으로 spike하였다. 배 시료 2 g을 달아 살충제 Imidacloprid를 0.5 mg/kg과 1.0 mg/kg 처리한 다음 30분 동안 방치 후 microwave와 sonication 추출법을 이용하여 위에서와 같은 조건으로 추출 효율을 비교한 결과는 표 5 및 6과 같다.

표 5 및 6과 그림 8에서 11까지 나타난 것과 같이 배 시료의 살충제 Imidacloprid 잔류농도를 분석한 결과 microwave 와 sonication 추출 모두 70%이상의 회수율을 보여주었다. sonication 추출은 농산물의 잔류농약 분석에서 최근에 많이 사용하는 방법 중의 하나이며, 본 실험에서도 90%이상의 추출효율을 보였다. sonication 추출법에 의한 추출량을 100으로 볼때 microwave 추출의 경우 power 300W에서 80°C로 3분 동안 가열하여 추출할 때와 같으며, power 700W에서 100°C로 1분 동안 가열하여 추출할 때와 비슷한 회수율을 보여주었다. sonication 추출 보다 microwave 추출이 시간적으로 3/20, 사용된 추출용매의 양으로는 1/2 정도 절약할 수 있는 것으로 나타났다.

Microwave 추출시 조건변화에 따른 추출효율의 변화는 표 5 및 6에서와 같이 살충제 Imidacloprid의 농도 변화에 따른 추출효율을 보면

spike 농도 0.5 mg/kg와 1.0 mg/kg 모두에서 일정한 경향의 추출효율을 나타낸 것으로 보아 농약의 농도가 추출에 영향을 미치지 않는 것 같다. 온도변화에 따른 추출효율은 표 5 및 6에 나타낸 것과 같이 microwave power 300W의 경우 온도가 증가함에 따라 추출효율도 지속적으로 증가하였으나, microwave power 700W의 경우 100℃까지 추출효율이 증가되다가 120℃에서는 감소되었다. 가열 시간변화에 따른 추출효율은 농약의 농도조건에 관계없이 가열시간이 증가할수록 추출효율도 증가하는 경향을 보였다.

Microwave power조건에서는 300W의 경우 그림 8과 9에서 나타난 바와 같이 온도 및 가열시간이 증가함에 따라 추출효율이 증가하였으며, 1분, 2분, 3분 등 모든 시간조건에서 온도가 100℃일 때 100%의 회수율을 보였다. 700W의 경우 표 6의 결과를 보면 온도조건 및 가열 시간에서 80%이상의 추출효율을 나타내고 있으나, 그림 10과 11의 온도변화에 따른 추출효율은 100℃까지 증가하다가 그 이후로 감소되었다. microwave power가 낮은 300W에서는 추출효율의 변화가 안정적으로 나타났으나, 700W는 대부분 80%의 추출효율을 보이고 있지만 조건에 따라 추출효율의 변화가 심하게 나타나는 것으로 보아 microwave power의 세기가 추출효율에 영향을 미치는 것 같다.

살충제 Imidacloprid의 배 시료에서 microwave 추출의 최적조건은 그림 7의 microwave를 이용한 acetone의 가열특성과 microwave의 추출효율 및 경제성 등과 비교분석하면, microwave power 300W, 추출온도 100℃에서 추출시간 1분인 것으로 나타났다.

Table 5. Comparison of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified in pear by sonication and microwave power 300W extraction

Sample crops	fortification (mg/kg)	Extracted efficiencies (%)				
		시간 온도	microwave (300W)			sonication (20min)
			1min	2min	3min	
Pear	0.5	60°C	84.2± 1.40	87.0±14.57	90.6± 6.51	96.8± 2.43
	1.0		86.6±12.38	89.9± 9.47	90.0± 8.34	98.2± 4.31
	0.5	80°C	90.4± 1.35	92.1± 3.21	96.4± 1.02	
	1.0		90.8± 1.44	93.0±12.22	98.4±16.23	
	0.5	100°C	102.6±14.2 <sub>1</sub>	102.8± 7.61	102.5± 7.78	
	1.0		99.1±14.91	103.6± 6.12	103.9± 4.67	
	0.5	120°C	100.7±10.0 <sub>7</sub>	103.9± 5.47	101.2±11.58	
	1.0		103.7± <sub>3.10</sub>	105.4± 8.16	103.4± 4.27	

Table 6. Comparison of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified in pear by sonication and microwave power 700W extraction

Sample crops	fortification (mg/kg)	Extracted efficiencies (%)				
		시간 온도	microwave (700W)			sonication (20min)
			1min	2min	3min	
Pear	0.5	60°C	83.2± 1.18	90.1± 0.55	92.6± 5.40	96.8± 2.43
	1.0		87.1± 2.32	90.0± 1.76	93.3± 3.11	98.2± 4.31
	0.5	80°C	91.8±13.40	90.6±17.93	93.3± 4.20	
	1.0		90.1±10.52	94.1± 4.24	98.0± 7.70	
	0.5	100°C	95.2± 2.19	102.7± 2.33	104.8± 7.55	
	1.0		95.6± 3.99	105.4± 4.92	105.1± 5.19	
	0.5	120°C	80.4± 2.65	84.8± 4.98	91.3± 5.31	
	1.0		80.3± 5.61	87.0±18.72	87.7± 2.05	

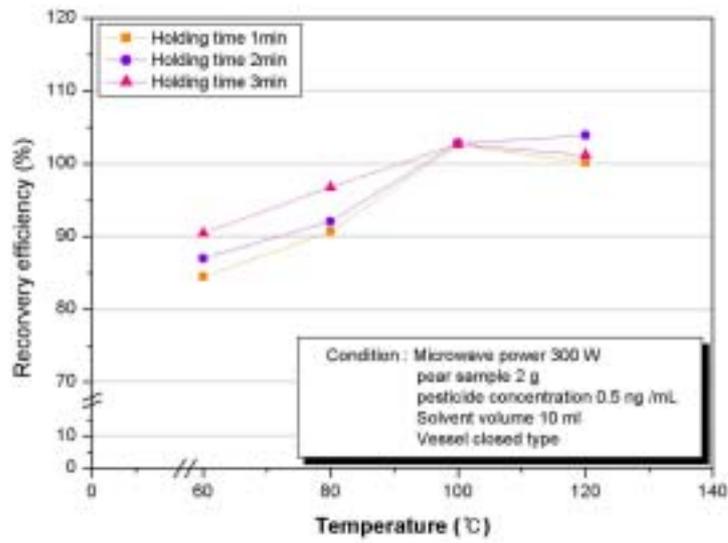


Fig. 7. Temperature & Time - dependent variations of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified with 0.5 ng/mL in pear by microwave power 300W

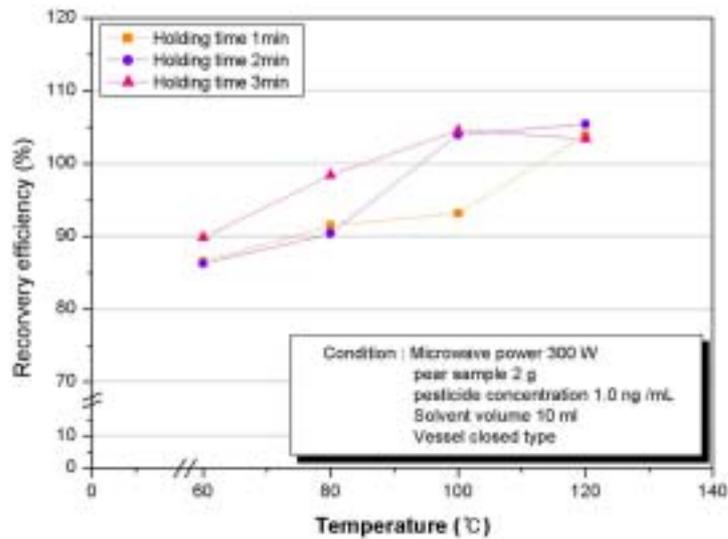


Fig. 8. Temperature & Time - dependent variations of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified with 1.0 ng/mL in pear by microwave power 300W

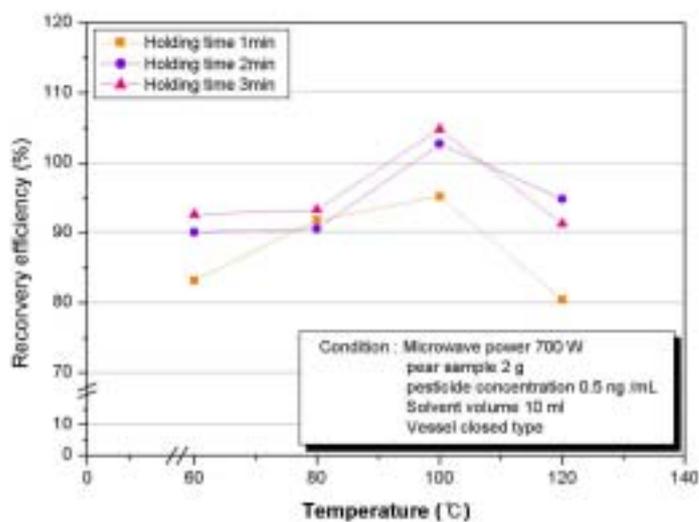


Fig. 9. Temperature & Time - dependent variations of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified with 0.5 ng/mL in pear by microwave power 700W

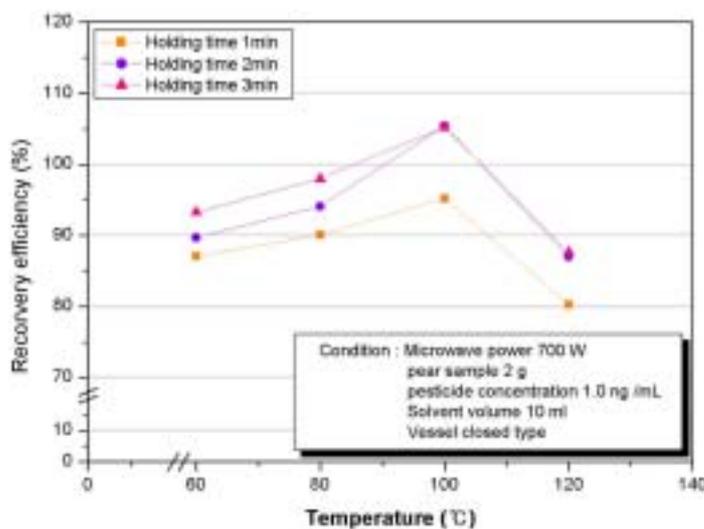


Fig. 10. Temperature & Time - dependent variations of extraction efficiencies of Imidacloprid fortified with 1.0 ng/mL in pear by microwave power 700W

#### 4. 요약 및 결론

본 연구는 농산물의 잔류농약 분석을 위해 실험실에서 시행하던 시료의 전처리 및 분석을 현장에서도 신속하게 측정하기 위한 시료전처리 기술 개발에 목적을 두고 있으며 최적화된 효소면역분석법을 기본으로 연구를 수행하였다.

농산물의 잔류농약 분석은 시료의 전처리과정과 기기분석과정으로 나뉘며, 전처리과정에서 샘플을 채취, 추출, 여과농축, 정제하여 효소면역분석, GC/HPLC분석 등의 기기분석을 하게 된다.

배 시료에 잔류되어 있는 살충제 Imidacloprid의 추출에 microwave 방법을 이용하고자 sonication 방법과 추출효율을 비교하여 최적의 추출용매, 추출시간 및 power supply의 강도 등을 조사하였다.

배 시료에 잔류되어 있는 Imidacloprid를 microwave로 추출하기 위한 용매는 acetone이 가장 효율적이었으며, 추출효율은 sonication 20분 추출과 microwave 300W에서 온도 60℃에서 120℃, 추출시간 1분에서 3분 동안 추출한 결과를 비교하였는데 microwave 온도 100℃에서 1분 동안 추출한 결과가 우수하게 나타났다. microwave power 700W에서의 추출은 모든 조건에서 80%이상의 효율이 나타났으나, 조건에 따른 추출효율이 일정하게 나타나지 않는 것으로 보아 microwave power의 세기가 클수록 추출효율에 나쁜 영향을 미치는 것으로 생각된다.

살충제 Imidacloprid가 잔류하고 있는 배 시료의 microwave를 이용한 최적의 추출조건은 power 300W, 추출용매 acetone, 추출온도 100℃에서 추출시간 1분인 것으로 나타났다.

본 연구 결과 배 시료에 잔류되어 있는 농약을 전처리하기 위해 사용된 microwave는 추출시간, 추출용매량 등을 감소시켜 주는 효과가 있으며, 최근에 많이 사용하는 sonication 방법과 비교하여 볼 때 일정조건에서 우수한 추출효율을 보여 주었다. 따라서 microwave를 이용한 농산물에 포함된 잔류농약 전처리에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구는 2002년 10월 15일부터 2005년 10월 14일 까지 총 3년 동안 수행되었으며, 연구의 최종목표는 국내에서 사용되는 대표적 살충제인 Imidacloprid의 과채류에 잔류하는 양을 소요시간 60분 이내에 최소량 50ng/mL을 정량적으로 측정할 수 있는 현장용 실시간 측정 장치를 개발하고자 한 바, 연구종료 시점에서 소기의 목표를 달성하였다.
  
- 본 연구는 잔류농약을 간편하고, 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 바이오센서의 개발에 관한 연구로서, 향후 다른 잔류농약의 검출과 관련된 연구에 큰 기여를 할 것으로 전망되고, 바이오산업의 활성화에 크게 기여할 것으로 예측된다.
  
- 본 연구를 확대하여 타 농약에 대한 실시간 측정장치를 개발하고, 이들 측정장치를 결합하면, 농작물 별 주요 잔류농약을 간편하고, 신속하고 정확하게 측정할 수 있어 실용화가 가능할 것으로 판단된다.

## 제5장 연구개발 결과의 활용계획

### 제1절 실적

#### 1. 학술발표 3건 (국내2, 국외1)

가. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법.  
한국농업기계학회 하계학술 발표논문집. 송석진, 조한근.  
8(2):440-446. 2003.07

나. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 실시간 측정을 위한 생물반응 및  
계측제어 시스템 개발. 임종근, 조한근, 한국농업기계학회 하계학술  
발표논문집. 9(2):440-443. 2004.07

다. Biosensor for On-line Measurement of the Insecticide  
Imidacloprid Residues. Han-keun Cho, Jae-koo Lee, Suk-jin  
Song, Jong-keun Lim. The second International Symposium  
on Machinery and Mechatronics for Agriculture and  
Bio-systems Engineering. S3:31-34

#### 2. 논문게재 2건 (국내2)

가. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법. 한국  
농업기계학회지. 2003. 28,6:505-510

나. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 실시간 측정을 위한 생물반응 및 계  
측제어 시스템 개발. 임종근, 조한근, 한국농업기계학회지. 2004.  
9(2):440-443

#### 3. 특허 출원 1건 (국내1)

가. 이미다클로프리드 분석방법 및 이의 분석 시스템. 2005. 10. 6.

출원번호 10-2005-93773호

4. 학생지도 3명

가. 석사 2명 졸업 (2004년, 2005년) (송석진, 임종근)

나. 석사 1명 졸업예정 (2006년) (안순용)

제2절 계획

1. 학술발표 1건

2. 논문투고 2건 (국내1, 국외 1)

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제7장 참고문헌

- Abad, A. and Montoya, A. 1994. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. J. Agric. Food Chem. 42: 1818-1823
- Abad, A. and Montoya, A. 1997. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 2. Assay Optimization and Application to the Analysis of Water Sample. J. Agric. Food Chem. 45: 1495-1501
- Abbink, J.(1991) The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 44:183-195.
- Bachmann T.T. and R.D.Schmid. 1999. A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paroxon and carbofuran at high resolution. Analytica Chimica Acta 401 : 95-103.
- Baskaran, S., R. S. Kookana and R. Naidu (1997) Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 787: 271-275.
- Bayer CropScience-Korea. 2002. 수도작용 살충제 코니도.
- Brummel, K.E., J. Wright, and M.E. Eldfrawi. 1997. Fiber optic biosensor for cyclodiene insecticides. J. of agricultural and food chemistry 45(8) :3292-3298.
- Claycomb R.W., M. J. Delwiche, C. J. Munro, R. H. BonDurant. 1996. Enzyme Immunoassay for On-line sensing of milk progesterone. Trans. of the ASAE 39(2):729-734.
- Claycomb R.W., M. J. Delwiche. 1998. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. Biosensors & Bioelectronics 13 :1173-1180.
- Crowther J. R.. 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey : 1-405.
- Crowther, J. R. 1996. ELISA theory and practice. IST publishers Pte Ltd.

singapore, 1-217

- Daniel M. J., M. J. Delwiche. 2002. Manometric biosensor for on-line measurement of milk urea. *Biosensors and Bioelectronics* 17: 557-563.
- Delwiche M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe. De Baerdemaeker, J., Decuypere, E. and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect Penicillin residues in food. *Trans. of the ASAE* 43(1):153-159.
- Delwiche M., X. Tang, R. BonDurant, C. Munro. 2001. Estrus detection with a Progesterone Biosensor. *Trans. of the ASAE* 44(6):2003-2008.
- Delwiche M., X. Tang, R. BonDurant, C. Munro. 2001. Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Trans. of the ASAE* 44(6):1997-2002.
- Delwiche, M. J., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere and W. Sansen. 2000. Biosensor to detect Penicillin residues in food. *Trans. of the ASAE* 43(1):153-159
- Fernandez-Alba, A. R., A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras and S. Chiron (1996) Determination of imidacloprid in vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A.* 721:97-105.
- Forlani, F. Aronldi, A. and Pagani, S. 1992. Development of an Enzymed-Linked Immunosorbent Assay for Triazole Fungicides. *J. Agric. Food Chem.* 40: 328-331
- Gee, S. J., Hammock, B. D., and Van Emon, J. M. 1994. A user's guide to environmental immunochemical analysis. EPA/540/R-94/509, U.S. EPA, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV.
- Gonzalez-Martinez M.A., S.Morais, R.Puchades, A.Maquirira, A. Abad, A.Montoya. 1997. Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl. *Analytica Chimica Acta* 347 :199-205.

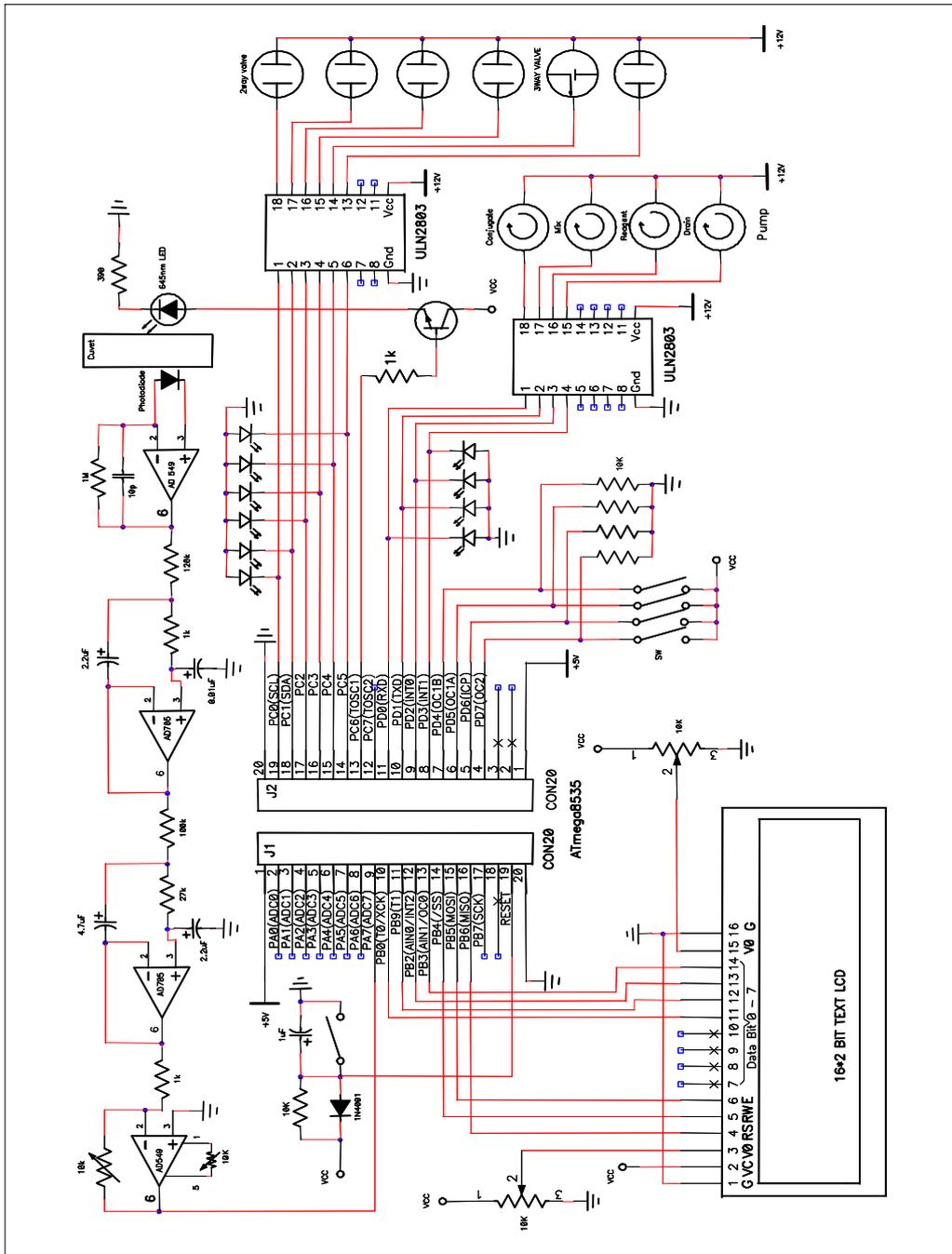
- Hammock B. D. S. J. Gee, R. O. Harrison. F. Jung, M. H. Goodrow, X. Q. Li, A. D. Lucas, A. Székács and K. M. S. Sundaram. 1990. Immunochemical technology in environmental analysis: Addressing critical problems. In *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*; Van Emon, J. M., Mumma, R. O., Eds., ACS Symposium Series 442; American Chemical Society: Washington, DC, 112-139.
- Hammock B. D., R. O. Mumma. 1980. Potential of immunochemical technology for pesticide analysis. In *Pesticide Identification at the Residue Level*; Gould, R. F., Ed; ACS Symposium Series 136; American Chemical Society: Washington, DC : 321-352.
- Harrisons, R. O., Goodrow, M. H., and Hammock. B. D. 1991. Competitive Inhibition ELISA for the s-Triazine Herbicides : Assay optimization and Antibody characterization. *J. Agric. Food Chem.* 39: 122-128
- Hedin, P. A., Menn, J. J., Holligworth, R. M. 1988. *Biotechnology for Crop protection*. American Chemical Society, Washington. D.C 316-330
- Ishii, Y., I. Kobori, Y. Araki, S. Kurogochi, K. Iwaya and S. Kagabu (1994) HPLC Determination of the new insecticide imidacloprid (chloronicotinyl insecticides), and its behavior in rice and cucumber. *J. Agric. Food Chem.* 42:2917-2921.
- Ishii, Y., Kobori, I. Araki, Y., Kurogochi, S., Iwaya, K., and Kagabu, S. 1994. HPLC determination of the new insecticide Imidacloprid and its behavior in rice and cucumber. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2917-2921
- Jae Koo Lee, Ki Chang Ahn, Oee Suk Park, Shin Young Kang, and Bruce 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.
- Jenkins D. M., M. J. Delwiche, R. W. Claycomb. Electrically controlled sampler

- for milk component sensors. 2001. *Applied engineering in agriculture* 18(3) : 373-378.
- Jung, F., Székács, A., Li, Q., and Hammock, B. D. 1991. Immunchemical approach to the detection of aminotriazoles using selective amino group protection by chromophores. *J. Agric. Food Chem.* 39: 129-136
- 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.
- Li, Kai and Qing X. Li. 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3378-3382
- MacDonald, L. M. and T. R. Meyer (1998) Determination of imidacloprid and triadimefon in white pine by gas chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3133-3138.
- Manclús, J. J., and Montoya, A. 1996. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol. 2. Assay optimization and application to environmental water samples. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3710-3716
- Martínez Galera, M., A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal and P. Parrilla Vázquez (1998) Resolution of imidacloprid pesticide and its metabolite 6-chloronicotinic acid using cross-sections of spectrochromatograms obtained by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A.* 799:149-154.
- Navalon, A., A. Gonzalez Casado, R. El Khattabi, J. L. Vilchez and A. R. Fernandez Alba (1997) Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst.* 122:579-581.
- Placke, F. J. and E. Weber (1993) Method of determining imidacloprid residues in plant materials. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.* 44:109-182.

- Rodbard, D. 1981. Mathematics and statistics of ligand assay: an illustrated guide. In *Ligand Assay: Analysis of international developments on isotopic and nonisotopic Immunoassay*; Langen, J., and Clapp, J. J., Eds. Masson Publishing Co. New York, 45-99.
- Schneider, P., Goodrow, M. H., Gee, S. J., and Hammock, B. D. 1994. A highly sensitive and rapid ELISA for the Arylurea Herbicides Diuron, Monuron, and Linuron. *J. Agric. Food Chem.* 42: 413-422
- Shan, G., Stoutamire, D. W., Wengatz, I., Gee, S. J., and Hammock, B. D. 1999. Development of an Immunoassay for the Pyrethroid insecticide Esfenvalerate. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2145-2155
- Shiokawa, K., S. Taboi, K. Iwaya and K. Moriya (1994) Development of a chloronicotinyl insecticide, Imidacloprid, *J. Pestic. Sci.* 19:209-217.
- Székács, A. and Hammock, B. D. 1995. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Triazole Fungicide Myclobutanil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2083-2091
- Valverde Garcia, A., A. R. Fernandez Alba, M. Contreras and A. Aguera (1996) Supercritical fluid extraction of pesticides from vegetables using anhydrous magnesium sulfate for sample preparation. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1780-1784.
- Vilchez, J. L., R. El Khattabi, J. Fernandez, A. Gonzalez Casado and A. Navalon (1996) Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 746: 289-294.
- 곽보연. 1999. 효소면역측정법에 의한 농산물오염 곰팡이의 다중 동시 검출법 개발. 서울대학교.
- 김남수. 2002. 식품중에 유해세균 신속검출을 위한 면역센서 개발동향. 보건산업기술동향 : 34-42.
- 바이엘 크롭사이언스. 2004. 농약사용지침서. 농약공업협회.

- 박선화. 2003. 살균제 Fenarimol 잔류물 검출을 위한 효소면역분석법 개발. 충북대학교 석사학위논문.
- 박주성 외 15명. 1999. 시중 유통 농산물 중의 농약 잔류 실태연구(VII). 서울특별시 보건환경연구논문집 35: 127- 135
- 부경생. 2002. 곤충의 효소를 이용한 과채류 중 잔류농약 검출 키트 개발 및 현장검증. 농림부
- 송석진, 조한근. 2003. 살충제 imidacloprid 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법. 한국농업기계학회지 28(6):505-510.
- 심태흠 외 6명. 1996. 농산물중 농약잔류량에 관한 조사. 강원도보건환경연구연보 7: 67-74
- 이영순, 이형주, 송인상, 김창민, 홍무기, 최동미, 황인균, 이강봉, 오금순, 임무혁, 서정혁, 허수정. 2003. 식품의 농약 잔류허용기준. 식품의약품안전청.
- 이재구, 안기창, D.W. Stoutamire, S.J.Gee and B.D.Hammock. 2001. ELISA에 의한 유기 인계 살충제 Acephate 잔류분석법 개발. 농약과학학회지 5(2):1-12
- 이혜성. 1999. 농산물 품질계측을 위한 센서 개발. 농림부
- 정영호, 김장익, 김정한, 이영득, 임치환, 허장현. 2000. 농약학. 시그마프레스.
- 하대유 외 23인. 1992. 로이트. 그림으로 보는 면역학 2판, 서울, 고문사

# 부록1. 생물 반응 및 제어 시스템 전기 회로도



## 부록II. Control program for AVR

```
#include <progmem.h>
#include <interrupt.h>
#include <sig-avr.h>
#include <io.h>

#include "lcd.c"
#include "lcd.h"
#include "Adc.h"
#include "Adc.c"

volatile unsigned int flag,sec;

SIGNAL(SIG_OVERFLOW0) // signal handler for tcnt0 overflow
interrupt
{
    if(flag==524) // 8mhz -> 20ms
    {
        flag=0;
        if(sec>25000)
            sec=0;
        else
            sec++;
    }
    else
        flag++;

    outp(0x00,TCNT0); // reset TCNT0
}

int main(void)
{
    volatile unsigned int a,b,c,d,adc_result,text, adc_sum=0 ;
    int i,j;
    unsigned char input=0x00,result[6];

    outp(0x80,SREG);
    outp(0xff,DDRB);
```

```

outp(0xff,DDRC);
outp(0xff,DDR0);
outp((1<<TOIE0), TIMSK);           // enable TCNT0 overflow
outp(0x00,TCNT0);                 // reset TCNT0
outp(0x01,TCCR0);                 //count with cpu clock/1024

InitADC();                         //ADC initialization
lcd_init(LCD_DISP_ON);            // LCD 초기화
sei();

lcd_clrscr();                      // 디스플레이 초기화 및 커서를 홈에 위치시킴
lcd_puts("!Start!\n");             // PD5에 연결된 스위치를 누르면 시작
input=0x00;                        // 스위치 입력 변수를 초기화 한다.
input=inp(PIND);                   // D PORT로 부터 스위치 입력을 받는다.

for(;;)
{
if(inp(PIND)== 0x40)                // PD6 에 연결된 스위치 눌림
{
lcd_clrscr();
lcd_puts("Optical Density!!\n");// 문자열출력후 다음행으로 커서이동
lcd_puts("Output:");
outp(0x40,PORTC);                  // Led on

for(;;)
{
for (i=0;i<=20;i++)                //20번 측정하여 평균값 구하기
{
adc_result=adc[0];
adc_sum = adc_sum + adc_result;
if (i == 19)    text = adc_sum ;
if (i == 20 )   adc_sum=0;
}

text=text/20;                       // 연속 데이터 20개의 평균
text = 5*text;                       // 1000*5*결과값/1024

d=text%10;                           // 소수 셋째 자리
text=text/10;

c=text%10;                             // 소수 둘째 자리
text=text/10;
}
}
}

```

```

        b=text%10;           // 소수 첫째 자리
        text=text/10;
        a=text%10;         // 정수 부분

        result[0]=a+'0';
        result[1]='.';
        result[2]=b+'0';
        result[3]=c+'0';
        result[4]=d+'0';
        result[5]=0;

        lcd_gotoxy(8,1);
        lcd_puts(result);   // LCD에 결과 출력
        lcd_puts(" V");
        sec=0;
        while(sec<50){}
    }

    if(inp(PIND)==0x20)     // PD5에 스위치가 눌리면 작동
    {
        while(sec<50){}
        sec=0;

// -----
// step1--Imidacroprid Sample
// -----
        lcd_clrscr();
        lcd_puts("!Imidacroprid !\n");
        sec=0;
        for(i=0;i<=19;i++) // 600 ul
        {
            outp(0x12,PORTC); // Imidacroprid Sample Valve,
Priming Valve
            outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump

            while(sec<13){}
            sec=0;

            outp(0x00,PORTD);
            while(sec<13){}
            sec=0;
        }
    }

```

```

outp(0x00f0,PORTC); //Air Valve, Priming Valve

for(i=0;i<=22;i++)
{
    outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump
    while(sec<12){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<12){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC);
while(sec<20){}
sec=0;

// -----
// step2--1st antibody
// -----
lcd_clrscr();
lcd_puts("!2:1st antibody !\n");
sec=0;

for(i=0;i<=14;i++) // 1st antibody 600ul
{
    outp(0x14,PORTC);//Imidacropriid Sample Valve, Priming Valve
    outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump

    while(sec<13){}
    sec=0;

    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<13){}
    sec=0;
}
outp(0x00f0,PORTC); // Air Valve, Priming Valve

for(i=0;i<=21;i++)
{
    outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump
    while(sec<12){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<12){}
}

```

```

        sec=0;
    }

    outp(0x00,PORTC);                // Valve off

// -----
// Step3--Mixing
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!3:Mixing!\n");
    sec=0;

    for(i=0;i<=45;i++)
    {
        outp(0x08,PORTD);            // Mixing Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

//-----
// Step4--Incubation
//-----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!4:Incubation!\n");

    while(sec<9000){}                // 3 min incubation
    sec=0;

// -----
// Step5--Washing
// -----
    sec=0;
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!Washing!\n");
    outp(0x00,PORTC);

    for(i=0;i<=28;i++)
    {

```

```

        outp(0x02,PORTD);                // Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

    for(i=0;i<=38;i++)                    // Washing solution 1.2ml
    {
        outp(0x11,PORTC);                // Wash Soution,Priming Valve
        outp(0x01,PORTD);                // Reagent Pump

        while(sec<11){}
        sec=0;

        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);
    while(sec<14){}

    for(j=0;j<=2;j++)
    {
        for(i=0;i<=40;i++)
        {
            outp(0x02,PORTD);            //Drain Pump
            while(sec<10){}
            sec=0;
            outp(0x00,PORTD);
            while(sec<10){}
            sec=0;
        }

        for(i=0;i<=28;i++)
        {
            outp(0x11,PORTC);            // Wash Soution,Priming Valve
            outp(0x01,PORTD);            // Reagent Pump
            while(sec<11){}
            sec=0;
            outp(0x00,PORTD);
            while(sec<11){}
        }
    }

```

```

        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);

    for(i=0;i<=35;i++)
    {
        outp(0x08,PORTD);           // Mixing Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }
}

for(i=0;i<=43;i++)
{
    outp(0x02,PORTD);           // Drain Pump
    while(sec<10){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<10){}
    sec=0;
}

for(i=0;i<=25;i++)
{
    outp(0x08,PORTD);           // Mixing Pump
    while(sec<10){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<10){}
    sec=0;
}

outp(0x20,PORTC);           // Air valve on
for(i=0;i<=20;i++)
{
    outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
    while(sec<11){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
}

```

```

        sec=0;
        }

    outp(0x00f0,PORTC);           // Air Valve, Priming Valve
    for(i=0;i<=10;i++)
    {
        outp(0x01,PORTD);       // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);

    for(i=0;i<=43;i++)
    {
        outp(0x02,PORTD);       // Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }
    while(sec<25){}
    sec=0;

// -----
// Step6--2nd Antibody
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!6:2nd Antibody!\n");
    sec=0;

    for(i=0;i<=21;i++)
    {
        outp(0x04,PORTD);       // 2nd antibody Pump,1000ul
        while(sec<14){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<14){}
        sec=0;
    }

```

```

// -----
// Step7--Incubation
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!7:Incubation!\n");
    while(sec<9000){}           // 3 min Incubation
    sec=0;

// -----
// Step8--Washing
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!8:Washing!\n");
    outp(0x00,PORTC);
    for(i=0;i<=28;i++)
    {
        outp(0x02,PORTD);       //Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

    for(i=0;i<=38;i++)         // 1.2ml
    {
        outp(0x11,PORTC);       // Wash Soution,Priming Valve
        outp(0x01,PORTD);       // Reagent Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);
    while(sec<14){}

    for(j=0;j<=3;j++)
    {
        for(i=0;i<=40;i++)

```

```

    {
        outp(0x02,PORTD);           //Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

for(i=0;i<=28;i++)
    {
        outp(0x11,PORTC);           // Wash Soution,Priming Valve
        outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
outp(0x00,PORTC);

for(i=0;i<=35;i++)
    {
        outp(0x08,PORTD);           // Mixing Pump
        while(sec<10){} //
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }
}

for(i=0;i<=43;i++)
    {
        outp(0x02,PORTD);           // Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

for(i=0;i<=25;i++)

```

```

    {
        outp(0x08,PORTD);           // Mixing Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

    outp(0x20,PORTC);           // Air valve on
    for(i=0;i<=20;i++)
    {
        outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }

    outp(0x00f0,PORTC);           // Air Valve, Priming Valve
    for(i=0;i<=15;i++)
    {
        outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);

    for(i=0;i<=43;i++)
    {
        outp(0x02,PORTD);           // Drain Pump
        while(sec<10){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<10){}
        sec=0;
    }

// -----

```

```

// Step9-- Substrate
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!Substrate!\n");
    sec=0;

    for(i=0;i<=10;i++)
    {
        outp(0x10,PORTC);           //Substrate Valve
        outp(0x01,PORTD);         // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;

        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }

    for(i=0;i<=30;i++)
    {
        outp(0x18,PORTC);         // Substrate Valve, Priming Valve
        outp(0x01,PORTD);         // Reagent Pump
        while(sec<13){}
        sec=0;

        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<13){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);

    outp(0x40,PORTC);           // Led on

// -----
// Step10--Incubation
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!10:Incubation!\n");
    while(sec<14000){}         // 5 min Incubation
    sec=0;

// -----
// Step11--Read optical density

```

```

// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("!11:Led On!\n");
    while(sec<50){}

// -----
// Output
// -----
    lcd_clrscr();
    lcd_puts("Optical Density!!\n"); // 문자열출력후 다음행으로 커서이동
    lcd_puts("Output:");

    for(j=1;j<=10;j++)
    {
        for (i=0;i<=20;i++)          // 20번 측정하여 평균값 구하기
        {
            adc_result=adc[0];
            adc_sum = adc_sum + adc_result;
            if (i == 19)    text = adc_sum ;
            if (i == 20 )   adc_sum=0;

        }

        text=text/20;                // 평균
        text = 5*text;                // 1000*5*결과값/1024

        d=text%10;                    // 소수 셋째 자리
        text=text/10;

        c=text%10;                    // 소수 둘째 자리
        text=text/10;

        b=text%10;                    // 소수 첫째 자리
        text=text/10;

        a=text%10;                    // 정수 부분

        result[0]=a+'0';
        result[1]='.';
        result[2]=b+'0';
        result[3]=c+'0';
        result[4]=d+'0';
        result[5]=0;
    }

```

```

        lcd_gotoxy(8,1);
        lcd_puts(result);
        lcd_puts(" V");
        sec=0;
        while(sec<50){
        }
    while(sec<20){}
    outp(0x00,PORTC); //Led off
}

// -----
// 반응후 Pump, tube 세척과정
// -----
    if(inp(PIND)==0x80) // PD7에 스위치가 눌리면 작동
    {
        lcd_clrscr();
        lcd_puts("!Cleaning tube!\n");
        sec=0;

        for(i=0;i<=19;i++) // imidacroprid valve
        {
            outp(0x02,PORTC); // Imidacroprid Sample Valve
            outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump

            while(sec<11){}
            sec=0;
            outp(0x00,PORTD);
            while(sec<11){}
            sec=0;
        }
        outp(0x20,PORTC); // Air valve on

        for(i=0;i<=12;i++) // Reagent Pump
        {
            outp(0x01,PORTD);
            while(sec<11){}
            sec=0;
            outp(0x00,PORTD);
            while(sec<11){}
            sec=0;
        }
}

// 세척과정

```

```

for(i=0;i<=33;i++)
{
    outp(0x11,PORTC);           // Wash Soution,Priming Valve
    outp(0x01,PORTD);         // Reagent Pump

    while(sec<11){}
    sec=0;

    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
    sec=0;
}

outp(0x00,PORTC);

outp(0x00f0,PORTC);          //Air Valve, Priming Valve
for(i=0;i<=40;i++)
{
    outp(0x01,PORTD);         // Reagent Pump
    while(sec<11){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC);

for(i=0;i<=29;i++)
{
    outp(0x02,PORTD);         //Drain Pump
    while(sec<11){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
    sec=0;
}
}

// input manifold
if(inp(PIND)==0x10)          // PD5에 스위치가 눌리면 작동
{
    while(sec<50){}
    sec=0;
}

```

```

// Imidacropriid Sample

lcd_clrscr();
lcd_puts("!Input manifold !\n");

sec=0;
for(i=0;i<=5;i++)
{
    outp(0x12,PORTC); // Imidacropriid Sample Valve, Priming Valve
    outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump

    while(sec<13){}
    sec=0;

    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<13){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC);
outp(0x00,PORTD); // Reagent Pump

while(sec<20){}
sec=0;

// 1St antibody

for(i=0;i<=5;i++)
{
    outp(0x14,PORTC); // Imidacropriid Sample Valve, Priming Valve
    outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump

    while(sec<13){}
    sec=0;

    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<13){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC); // Valve off

// 2nd Antibody
for(i=0;i<=7;i++)

```

```

        {
        outp(0x04,PORTD);           // 2St_antibody Pump,1000ul
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
        }

// Substrate
for(i=0;i<=6;i++)
{
    outp(0x18,PORTC);           //Substrate Valve, Priming Valve
    outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
    while(sec<11){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC);

// Washing tube
for(i=0;i<=20;i++)           // Washing solution 1.2ml
{
    outp(0x11,PORTC);           // Wash Soution,Priming Valve
    outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump

    while(sec<11){}
    sec=0;
    outp(0x00,PORTD);
    while(sec<11){}
    sec=0;
}
outp(0x00,PORTC);
while(sec<14){}

outp(0x20,PORTC);           // Air valve on
for(i=0;i<=20;i++)
{
    outp(0x01,PORTD);           // Reagent Pump
    while(sec<11){}
    sec=0;
}

```

```

        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);
    outp(0x00f0,PORTC); // Air Valve, Priming Valve
    for(i=0;i<=7;i++)
    {
        outp(0x01,PORTD); // Reagent Pump
        while(sec<11){}
        sec=0;
        outp(0x00,PORTD);
        while(sec<11){}
        sec=0;
    }
    outp(0x00,PORTC);
}
}
}

```

### 부록III. 시작품 사진



- ① Control board    ② LCD    ③ Solenoid valve  
④ Micro pump    ⑤ Reagent vesse    ⑥ Reaction chamber block

Fig 1. An overview of the prototype biosensor