

# 국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별기술과 안전성 평가기술 개발

Development of Techniques for Origin Discrimination and Safety  
Evaluation of the Agricultural Products and/or Foods in the Market

연 구 기 관  
한 국 식 품 개 발 연 구 원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별기술과 안전성 평가기술 개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 6 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 남 수

세부연구책임자 : 류 미 라(제1세부)

위탁연구책임자 : 정 태 균

(국립농산물품질관리원 시험연구소)

세부연구책임자 : 신 원 선(제2세부)

위탁연구책임자 : 유 상 렬(서울대)

세부연구책임자 : 김 남 수(제3세부)

위탁연구책임자 : 최 부 돌(신구대학)

협동연구기관명 : 국립농산물품질관리원 시험연구소

협동연구책임자 : 성 기 용(제1협동)

위탁연구책임자 : 조 현 우(경기대)

위탁연구책임자 : 정 덕 화(경상대)

협동연구기관명 : 서울여대

협동연구책임자 : 노 봉 수(제2협동)

위탁연구책임자 : 이 중 용(서울대)

여 백

(과제별 참여연구원)

과 제	주관(협동)연구기관		위탁연구기관	
	기관명	연구원	기관명	연구원
제1세부과제 NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발	한식연	류미라 김현구 김혜영 김은영 김정현	품관원 시험연	정태균 김중환 김수정 이남윤 최동섭
제2세부과제 PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품 으로부터 <i>Listeria</i> , <i>Escherichia</i> 및 <i>Salmonella</i> 의 신속검출법 개발		신원선 김왕준 문기성		서울대
제3세부과제 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발	한식연	김남수 박인선 김동경 박경림	신구대학	최부돌 최창용 김경욱
제1협동과제 농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석 기술 개발	품관원 시험연	성기용 김정한 배혜리 김도완 정몽희 조경규 박은성 김재곤 최규일 이준현 노재억	경기대	조현우 김택제 박제원 강미나 조천호
			경상대	정덕화
제2협동과제 전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가	서울여대	노봉수 한기영 박은영 조연수 유지현 권연진	서울대	이중용 조성인

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별기술과 안전성 평가기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 다양한 원리의 분석기법을 활용하여 농산물(가공식품)에 대한 신속품질 판별법과 안전성 평가기술을 개발하는데 그 연구목적이 있다.

농산물의 산지나 재배조건에 따라 발생하는 품질의 차이를 효율적으로 구분하고 WTO 체제에 의한 농산물의 산지표시 강화 및 제도화에 부응하기 위한 과학적 분석방법 개발이 시급히 요구되며 부정유통되는 수입산 농산물이 날로 증가하고 있으므로 현장 단속과정에서 수거된 이들 농산물의 원산지 검정을 위한 과학적인 식별방법 개발이 필요하다. 이를 통한 농산물의 엄격한 원산지관리로 국내 농산물의 대외경쟁력 강화가 기대된다. 근적외분광법 (near-infrared spectroscopy, NIR)과 전자코 (electronic nose)는 상대적으로 분석이 간편하며 결과산출이 신속하고 경제적으로 수행할 수 있으므로 관련 기술의 개발이 긴요하고, 이 경우 산지판별의 정확도를 높이고 작업자가 손쉽게 판별하기 위하여 확보된 data를 신경회로망을 이용하여 통계적으로 분석하고 학습된 시스템을 구축하여 원산지를 판별하는 기법의 개발이 요망된다. 아울러, 기존의 전기영동법이나 HPLC 분석법 등의 단백질 분석법에 소요되는 시간이나 비용을 많이 감소시켜 양적 digital 분석이 가능한 새로운 기법으로서 모세관전기영동법 (capillary electrophoresis, CE)의 개발이 긴요한 실정이다.

국민소득 증대에 따라 농산물의 안전성 확인에 대한 국민의 관심과 요구가 증폭되고 UR 협상 등에 따라 각종 농산물 및 식품의 수입량이 크게 증가하게 되었다. 따라서, 이들 국내에서 유통되는 농산물의 안전성에 대한 체계적이고 주기적인 모니터링에 대한 사회적 공감대가 형성되었고 그 결과 농산물의 안전성에 대한 검사수요가 앞으로 크게

증대될 것으로 전망되고 있다. 고형상 미세추출법 (solid-phase microextraction, SPME)은 1992년에 개발되어 일부국가에서 환경시료 등의 분석에 제한적으로 사용되고 있는 새로운 방법이며 환경오염을 최소화하면서 자동화 전처리가 가능한 새로운 농약추출법으로서 농산물 중의 농약분석에의 적용이 기대되며, 잔류농약에 대한 효소면역분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)도 신속하게 다량의 시료분석에 적용할 수 있으므로 관련기술의 개발이 시급하다. 국내의 경우 *Salmonella* 및 *Escherichia coli* O157:H7에 의한 식중독이 자주 발생하고 있으며 수입되는 냉동식품 중에서 *Listeria monocytogenes*가 발견되어 국민의 식생활 안전을 위협하는 여러 가지 사건이 있었으므로 이들을 분자생물학적인 방법으로 다양한 식품 매트릭스로부터 신속하게 검출해내는 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR)의 개발필요성도 입증하고 있다. 한편, 농업용수의 오염이 최근 심화됨에 따라 생산된 농작물 및 이를 이용한 가공식품에서 중금속의 발생가능성이 높아지고 있고 축산원료 및 그 가공품에 있어서도 각종 항생제에 의한 오염가능성이 증가하고 있으므로 이를 신속하게 검출할 수 있는 현장성이 제고된 간이검출법으로서의 바이오센서 기술의 개발필요성도 매우 높다. 따라서, 본 연구에서는 위에서 언급된 다양한 원리의 원산지 및 안전성 평가기술을 개발하여 국내에서 유통되는 다양한 농산물 및 가공식품의 품질평가에 적용하고자 하였으므로 그 중요성은 매우 높은 것으로 사료된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발

- NIR 및 CE를 이용한 울무, 당귀, 홍화씨, 백삼(가루)의 원산지 판별법 개발
- NIR 및 CE를 이용한 황기, 고추(가루), 천궁, 고사리의 원산지 판별법 개발
- NIR 및 CE를 이용한 우엉, 당근, 연근의 원산지 판별법 개발

#### 2. PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 *Listeria*, *Escherichia* 및 *Salmonella*의 신속검출법 개발

- PCR을 이용한 축산물 및 가공식품 중 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 및 *S. enterica*의 검출
- PCR 저해물질 및 template DNA 추출방법 탐색

- 다양한 PCR 방법 적용, 최적의 PCR 조건 확립 및 이를 이용한 field test
3. 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발
- 효소센서 시스템 구성 및 특성구명과 컴퓨터 접속시스템 구성
  - 면역센서 시스템 구성 및 특성구명과 컴퓨터 접속시스템 구성
  - PC-controlled 바이오센서 시스템 정립, 실제적용 및 시스템 제어연구
4. 농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발
- SPME 분석조건 확립을 위한 시료조건별 추출효율 조사, GC에 의한 공시농약, 공시농산물별 분석방법 정립 및 immunoassay 방법 기초연구와 hybridoma 개발
  - GC에 의한 공시농약, 공시농산물별 분석방법 정립 및 ELISA법 확립
  - HPLC에 의한 공시농약, 공시농산물별 분석방법 정립 및 간이검사 ELISA kit 개발
5. 전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가
- 전자코의 인공지능막 구축과 시료 (검정현미와 대추 등 6종과 기타)의 전자코 data 획득 및 육류의 신선도와 저장상태 지표 구명
  - 전자코 data에 대한 다변량 통계분석과 신경회로망 구축 및 육류의 신선도와 저장상태 평가모형 개발
  - 전자코 data의 다변량 통계분석과 신경회로망 분석에 의한 공시료의 산지판별 및 NIRS를 이용한 육류의 신선도와 저장상태 평가시스템 개발

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발

CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발결과를 보면 먼저 1차년도에 울무, 당귀, 홍화씨 및 백삼가루에 대하여 실험한 결과 울무 및 당귀는 각각 최적의 분석조건을 확립하였고, 이를 유통시료에 대하여 적용 시 울무는 약 82%, 당귀는 86%의 판별율을 나타내었다. 반면 홍화씨는 분석조건은 확립하였으나 국산 및 수입산을 판별할 수 있는 peak의 도출이 어려웠으며 백삼가루는 분석 시 재현성이 나타나지 않아 현재까지 CE로는 분석이 어려운 것으로 나타났다. 2차년도에는 황기, 고춧가루, 천궁 및 고사리에 대하여 실험하여 황기, 천궁, 고사리에 대하여 최적의 분석조건을 확립할 수 있었다. 유통시료에 대하여 적용 시 황기 약 80%, 천궁 약 62%, 고사리는 약 84%의 판별율을 나타내었다. 반면 고춧가루는 여러 가지 추출 및 분석조건을 적용해 보았으나 백삼과 마찬가지로 현재로서는 CE에 의한 분석이 어려운 것으로 나타났다. 3차년도에는 우엉, 당근, 연근에 대하여 실험한 결과 우엉과 당근은 최적의 분석조건을 확립하였다. 우엉은 약 55%의 원산지 판별율을 나타내었다.

NIR에 의한 농산물의 원산지 판정방법 개발연구는 주요 농산물 유통시장에서 유통되는 각 농산물에 대한 과학적인 원산지 식별방법을 연구 개발하여 농산물의 원산지 검정 업무에 활용함으로써 건전한 유통질서 확립을 도모할 목적으로 다음과 같이 연구를 수행하였다. 첫째, 농산물의 주요 품목에 대한 표준시료를 작성하였는데 이는 연구업무 추진에 있어서 가장 기초적이고도 중요한 사항이다. 따라서 정확한 표준시료 확보를 위해 주요 산지 및 수입항만 등을 대상으로 하여 품목별 소요시료를 확보하여 표준시료를 작성하였다. 둘째로 NIR 분석을 통한 시료별 database를 작성하였다. 즉, 주요 품목별 표준시료 분석을 통해 database를 작성하고 이를 이용하여 품목별 검량식 작성에 활용하였다. 마지막으로 검량식을 검증하였는데 이를 위하여 품목별로 작성된 원산지 식별 검량식에 대해 미지시료를 통한 원산지 식별 정확성을 검증하여 원산지 식별업무에 사용 가능여부를 검토하였다.

### 2. PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 *Listeria*, *Escherichia* 및 *Salmonella*의 신속검출법 개발

본 연구에서는 축육 및 축육가공식품 유래의 병원성미생물인 *Escherichia coli*

O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*에 대한 PCR 신속검출법을 개발하고 이를 현장시료의 조사검출용 (monitoring)으로의 적용성을 검토하였다. 각각의 병원성미생물에 대하여 민감하고 특이적인 검출결과를 도출하기 위해서는 PCR 증폭을 위한 primer의 선택이 중요하다. 본 실험에서는 *E. coli* O157:H7에 대한 특이적 검출을 위하여 *rfb* gene, *uid A* gene, *slt I* gene, *slt II* gene 및 *eae A* gene 유래의 primer를 제작하여 이용하였으며 *L. monocytogenes*는 *hly A* gene과 *iap* gene 유래의 primer를 선택하고, *S. enterica*는 *stn* gene을 선택하여 각각의 primer에 대한 교차검출을 실시하여 의양성반응 (false-positive)을 최소화하였다. PCR 증폭반응의 반응특이성을 향상시키기 위하여는 template의 조제가 무엇보다 중요하다. 따라서, 식품에 소량으로 오염되어 있는 병원성미생물을 회수하여 고순도의 PCR 검출용 template로 조제하기 위해서 시료 균질화 후 원심분리한 다음 열처리한 시료를 그대로 PCR 증폭용 template로 이용할 수 있는 방법을 확립하였다. 그러나, 그람 양성균인 *L. monocytogenes*의 경우 검출민감도가 낮아 이를 개선하기 위하여 미생물유래의 cell disruptor를 이용한 결과, DNA 분리과정 없이 원심분리와 열처리만으로 PCR 증폭 시 검출민감도가  $10^1$  수준까지 현저히 높아졌다. 또한, 여러 종류의 식품에서 *Salmonella* 균주를 손쉽게 빠르게 검출하기 위하여, *Salmonella* 장독소 유전자(*stn*)를 기초로 제작한 primer (STN1, STN2)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 617 bp의 특이적인 DNA 단편을 얻을 수 있었다. PCR 민감도는 순수 배양한 균체에서 추출한 template DNA는 1 pg까지 검출이 가능하였고, 직접 균체를 template로 이용한 경우에는  $10^2$  cells까지 검출이 가능하였다. *S. enterica*를 인위적으로 접종시킨 식품에서는 식품 1g 당  $10^3 \sim 10^4$  cells까지 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 PCR을 이용하여 *Salmonella*에 오염된 식품에서 이들 균주를 간편하고 신속하게 검출할 수 있음을 보여준다. 이상의 확립된 PCR 방법의 현장에서 수거한 시료에 대한 적용성을 살펴본 결과, 증균과정 없이 돈육에서 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 확립한 PCR 증폭방법은 시료전처리, template 조제, PCR 증폭 및 결과판정에 이르기까지 약 8시간을 소요함으로써 식품유래 미생물검출을 위한 신속하고 고감도의 검출방법으로 유용성을 지닌다고 판단하였다.

### 3. 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발

Urease의 중금속에 의한 활성저해를 측정하는 urease 저해센서 시스템을 개발하였다.

이를 위하여 먼저 효소량 및 기질농도 등에 따른 유리효소의 특성을 조사하고 이를 활용한 비색분광원리의 cuvette assay를 개발하고 Hg(II), Cu(II), Pb(II)의 단일 및 복합이온의 농도변화에 따른 저해특성을 구명한 결과, 효소활성의 저해도를 측정하여 중금속이온을 검출할 수 있음을 확인하였다. 그 후, 암모늄이온 선택성 전극을 변환기로 하고 여기에 urease로 흡착된 Immobilon cellulose nitrate 막을 장착하여 감응전극을 제조하고 이를 pH/mV meter에 연결하여 바이오센서 시스템을 구성하고 상기 중금속이온에 의한 저해특성을 구명하였다. 그 결과, 중금속 계측 바이오센서는 cuvette assay에 필적하는 감응성을 나타냄을 알 수 있었다. 아울러, 바이오센서 신호에 대한 컴퓨터 접속시스템의 hardware적 구성을 완료하고 접속시스템의 운영 program 구성과 운영특성을 조사하였다.

주요한 잔류분석 항생제의 하나인 chloramphenicol (CAP) 측정을 위하여 화학발광원리로 작동하는 광학적 면역센서 시스템을 개발하였다. 이를 위하여 먼저 항생제에 대한 항체를 확보하고 직접경합반응을 위한 analyte-HRP conjugate (tracer)를 합성하였다. 항체 고정화는 다양한 반응성의 membrane을 실험한 결과, Pall사의 Biotyne A와 B membrane이 가장 좋은 계측결과를 보여주었다. 바이오센서 시스템의 구성은 optic fiber와 Hamamatsu Photonics사 (Japan)의 R955 photomultiplier와 부속 socket를 결합한 detector를 사용하여 batch 및 flow형으로 하였으며 계측조건의 최적화를 이룬 후 CAP 종류에 따른 반응성을 측정한 결과  $10^{-7}$  M의 최소검출한계 (detection limit)를 나타내었다. Penicillinase ( $\beta$ -lactamase)와 flat-bottomed pH electrode를 각각 생물요소와 변환기로 하여 penicillin 화합물을 간편하게 계측할 수 있는 potentiometric 효소센서 시스템을 구성하고 고정화 효소농도, 이온강도 및 pH, 기질종류에 따른 반응특성을 구명한 결과, 최소검출한계는 1  $\mu$ M까지 이를 수 있음이 관찰되었다. 한편, 면역센서 시스템에서 발생하는 광신호의 PC 접속시스템을 구성하여 전기적 신호로의 변환과정 등을 거쳐 PC에 접속하였다.

본 연구에서 개발된 모든 바이오센서 시스템에 의한 계측을 PC에 의하여 관리할 수 있게 하였으며, 또한 중금속 계측 바이오센서 시스템의 연속화를 urease가 고정화된 Chitopearl 수지로 충전된 미세 column을 효소반응기로 하여 행하고 기질농도, 고정화효소량, 유속 및 효소반응기의 길이에 따른 시스템 특성을 구명하였다. 시료의 최소전처리를 바이오센서 및 기존방법에 따라 공시료에 대하여 행하였다. 전처리된 시료에 대하여 일정농도의 중금속, CAP 및 penicillin 화합물을 각각 spiking하여 모델시료를 제조한 후

표준시료 주입 시의 센서반응에 대한 상대반응으로서 표시한 결과, 본 연구의 바이오센서 반응은 표준곡선에 비교적 잘 수렴하는 특성을 보여주었으며 기존의 분석방법인 HPLC에 견줄만한 계측결과도 얻을 수 있었다. 개발기술의 보급·활용을 위한 홍보차 연구결과를 미국 식품과학자학술대회에서 발표하였다. 한편, 개발된 바이오센서 시스템에 대한 자동화장치와 software를 구성하고 bench scale 바이오센서 시스템에 대한 계측제어를 행하였다.

#### 4. 농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발

GC와 HPLC에서 각각 검출빈도가 높은 농약 50여종을 선별하여 4~5개 군으로 분류하고 GC에서는 ECD와 NPD를, HPLC에서는 UVD와 FLD를 이용하여 정성하였다. 시료 25g을 acetonitrile 50 ml에 넣고 5000 rpm에서 3분간 추출하여 상층액 20 ml에 NaCl 2g과 pH 8 인산완충용액 10 ml를 넣고 혼합 후 원심분리하였다. 상층액 3 ml (GC), 2 ml (HPLC)를 농축 후 20% acetone/증류수 1.5 ml (GC), 20% acetonitrile/증류수 1 ml (HPLC)로 용해하여 poly acrylated fiber로 10분 추출, 30분 탈착하여 기기분석 하였다. GC 39개 품목과 HPLC 54개 품목을 대상으로 정립된 방법에 의하여 표준물질을 추가하여 시험한 결과, GC (NPD)에서는 47~170%, HPLC (FL)에서는 60~138%의 회수율을 나타내었다. 그러나 유향이 많은 농산물이나 인삼 등과 같이 식물자체 성분이 다량으로 함유되어 있는 농산물에서는 회수율의 변화가 심하였다. 따라서 SPME를 이용한 분석은 대량 단일품목 (벼 등)이나 감도 높은 분석이 요구되는 환경농산물에서의 잔류분석에 활용가능할 것으로 판단되었다. 적용실험 결과, SPME-GC 분석에서는 인삼시료에서 기존의 분석법에 의한 분석결과와 같이 tolclofos-methyl을 정성분석할 수 있었다. SPME-HPLC 분석에서는 돌나물에서 carbendazim이 검출되었으며 기존의 분석법의 정량결과와 3%의 차이를 나타내어 정성 및 정량이 가능하였다. SPME와 GC 또는 HPLC를 접목한 분석법은 분석결과를 얻기까지 2시간 미만이 소요되어 생력적이고 신속한 분석법이며 유기용매 사용량도 50 ml 정도로서 환경친화적인 분석법으로 판단되었다. SPME PA fiber는 개당 50회 정도 반복사용이 가능하여 분석비용도 기존 분석의 1건당 38000원 (2003년 현재)에서 1건당 10000원 미만으로 경제성이 있는 분석법이었다.

한편, 첨가시킨 시료 또는 첨가시키지 않은 같은 시료들을 최적 SPME 조건 (즉, 100  $\mu$ m polymethylsiloxane fiber를 사용하여 50분 흡착과 10분 탈착, (270°C for GC), pH=7)에서 분석이 이루어지도록 연구 개발하였다. 그 결과에서 대다수의 농약들은 코팅

된 섬유 SPME에 의해 추출되었다. 그러나 몇몇 pyrethroid와 organophosphorus 농약들은 SPME-GC/ECD-NPD 두 개의 검출기로 검출되지 않았다. 농산물 중 농약들의 검정 한계는 0.01~1.0 ppm 사이에서 회귀수가 0.990 이상으로 좋은 선형을 보였다. 대다수의 농약들의 검출한계는 0.001 ppm 정도였다. 이 방법은 SPME-GC-HPLC에 의한 분석이 가능한 농약들에서 검색연구를 위해 활용되어질 수 있다. 또한 전형적인 예는 농작물을 재배하는 데에 사용되는 농약들의 경시 잔류성에서 그들의 모체 화합물과 대사물들을 모니터링 하는데 있다.

식품 중의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)의 첨단 면역분석기술을 개발하였다. 이를 위하여 먼저 단클론성 항체를 개발하였는데, 2,4-D를 2,4-D-hapten으로 전이시키고 이들을 BSA, OVA, KLH 등과 결합시켜 항원 또는 coating conjugate를 합성하였다. 그 후 형질세포종세포 (p3×63Ag8.V653)와 2,4-D-KLH 및 2,4-D-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 2,4-D에 대한 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하였으며 hybridoma cell (2,4-D-121-57)을 마우스 복강에 주사하여 생산한 단클론성 항체를 이용하여 2,4-D를 측정하기 위한 indirect competitive ELISA법을 개발하였다. 이 분석법은 0.1~100 ppb 수준의 2,4-D를 분석할 수 있었다. 또한 생성된 단클론성 항체는 2,4-D methyl ester에 대하여 15.6%의 교차반응성을, 4-chloro-*o*-toloxyacetic acid (MCPA)에 대하여 18.9%의 교차반응성을 보였으며 나머지 이성체에 대해서는 교차반응성을 거의 나타내지 않았다. Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품시료 중의 2,4-D를 정제하기 위해 우선 항체를 gel-(affi-gel 10)에 결합시켰다. Column은 먼저 10 ml PBS로 씻고 난 뒤 시료용액을 충전했으며 그리고 10 ml의 증류수와 10 ml의 PBS로 충전한 시료용액을 씻은 후 5 ml의 methanol로 column에 결합되어 있는 2,4-D를 용출시켰다. 2,4-D 분석을 위한 실험적 ELISA kit 한 세트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 2,4-D conjugate가 coating된 microtiter well이 35 line (12 well/line), 표준 2,4-D용액 (A 액: 0.1 ppm), ABTS용액 (B액), 2,4-D에 대한 항체 (C액), 2차 항체-HRP (D액: 1000배 희석액 5 ml), citrate buffer 25 ml (E액), 반응 정지액 25 ml (F액)로서, well, A, B액은 -20℃, C, D, E, F액은 4℃에 보관하였다. 식수, 오렌지 주스, 보리 등의 시료에 표준 2,4-D를 1, 10, 100 ppb의 농도가 되게 임의로 오염시켜 indirect competitive ELISA법을 이용하여 회수율을 측정하였다. 그 결과, 식수의 경우는 98~102%로 회수율이 높게 나타났으며, 오렌지 주스는 89~100%, 보리의 경우는 92~108%로 나타났다.

## 5. 전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가

검정현미, 대추, 수수쌀, 영지, 참깨, 검정콩 및 기타 농산물을 대상으로 하여 센서종류가 다른 전자코를 활용하여 분석한 후 이를 학습시키고 인공지능망을 활용하여 각기 분석한 결과, 검정현미는 국내산 92.75%, 수입산 92.31%, 대추는 국내산 89.16%, 수입산 81.40%, 수수쌀은 국내산 90.9%, 수입산 89.2%, 영지는 국내산 93.3%, 수입산 90.0%, 참깨는 국내산 96.30%, 수입산 97.22%의 확률로 원산지를 구분할 수 있었다. 복령의 경우 2001년도산과 2002년도산을 각각 비교분석한 결과 2002년도산은 수입산과 국내산이 뚜렷하게 판별되었으나 2001년도산은 오랜 시간이 지나 휘발성분이 약화되어 판별에 어려움이 있었다. Chromatogram으로 비교한 결과 산지별 시료에 따라 휘발성분의 차이가 있음을 알 수 있었다. 검정콩은 제대로 판별하기가 어려웠다. 황기의 경우 NIR이나 CE에서 구분되지 않은 일부 시료를 분별한 것으로 미루어 보아 한가지 분석기기로 일차적인 선별을 한 후 다른 분석기기로 반복 분석함으로써 보다 높은 확률로 판별할 수 있었다. 국산 및 수입산 농산물의 원산지 판별을 NIR과 전자코를 이용하여 행함으로써 품질평가를 신속하고 과학적으로 체계화할 수 있는 바, 농산물의 원료뿐만 아니라 수입식품과 국내산 제조가공식품의 품질분석에도 활용의 폭을 넓힐 수 있을 것이다. 나아가 가공식품의 품질향상에 크게 기여함에 따라 국내 농산물 및 식품가공분야의 고급화에 선도적 역할을 수행할 수 있을 것이다.

NIRS에 의한 육류의 신선도 및 저장성 평가를 행하였다. 이를 위하여 먼저 세균학적 판정법, 물리적 판정법, 화학적 판정법을 육류의 신선도 지표로 구명하였고 저장상태 지표로는 전기전도도, biogenic amine, D-glucose, L-lactate, VBN, K값으로 구명하였다. 또한, NIRS의 저과장대를 이용하여 육류의 신선도 지표 및 저장상태 지표의 계측가능성에 대한 실험을 행하였다. 이와 같은 기초연구결과를 토대로 통계적 방법과 신경회로망을 이용하여 NIRS를 이용한 육류의 신선도 지표 계측모형과 저장상태 지표 계측모형을 개발하였다. NIRS의 probe holder를 광의 산란, 외란의 영향을 줄이고, 육류 계측에 적합하도록 설계하였으며 육류의 신선도 및 저장상태 평가 프로그램을 Visual C++ 6.0을 이용하여 개발하였고, 데이터의 입출력 및 저장을 위해 노트북 컴퓨터를 사용하였다.

## 6. 활용에 대한 건의

본 연구개발의 결과, 국내외 학술지 게재, 학회발표, 산업재산권 출원, 세미나, 워크샵 등 총 36건의 계량적 활용실적을 얻었으며 향후 2년내에도 개발기술의 보급과 활용을 위한 세미나, 특허등록 및 출원, 논문게재 등의 활용노력을 계속할 예정이다. 아울러, 본 연구개발의 내용 중 NIR, 전자코에 의한 원산지 식별기술은 국립농산물품질관리원에서 원산지 식별을 위한 장치 및 기술로서 이미 활용 중이고, SPME 기술도 직불제 농산물이나 대규모 단일작물 경작지에서의 품목별 안전성 분석에 활용할 계획이다. 기타 개발 기술도 연구결과의 내용 및 질적 수준이 우수한 것으로 여겨지므로 관련 연구기관 등에서 요구가 있을 경우 기술전수하여 활용을 추진할 수 있을 것이다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Techniques for Origin Discrimination and Safety Evaluation of the Agricultural Products and/or Foods in the Market

## II. Objective and Significance

The aim of this study is to develop various techniques for origin discrimination and safety evaluation on the agricultural products and/or foods.

It has been strongly required to develop the techniques which can discriminate the habitat of the marketed agricultural products because of the increased needs for the origin indication of the agricultural products and the optimum management of their marketing. Through the development of these techniques, the intensification of the competitive power of domestic agricultural products are expected. Near-infrared spectroscopy (NIR) and electronic nose method which were developed for easy and rapid discrimination of agricultural products have been required for the development in data collection and statistical analyses including artificial neural network to increase their correctness in the habitat discrimination. Also, the development of capillary electrophoresis (CE) which makes a quantitative digital analysis possible has been required for the decrease in analysis time compared to the conventional methods for protein measurement such as electrophoresis and HPLC.

The nation-wide interest for the safety confirmation on marketed agricultural products and foods have been increasing in recent years, resulting in the increased inspection demands for the presence of hazardous compounds in them. Domestically, the food-poisonings caused by *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria*

*monocytogenes* have been taken place, resulting in the increased necessity for the methods detecting them rapidly from various food matrices such as polymerase chain reaction (PCR). On the other hand, the possibility of occurrence of heavy metals and antibiotics in the agricultural products and foods has been increased recently possibly owing to the pollution of agricultural water and the abuse of antibiotics, followed by the increased necessity for the rapid screening methods of them. Solid-phase micro-extraction (SPME) which was developed in 1992 and has been limitedly used for the analysis of environmental samples in some countries is required to be applied for pesticide analysis in agricultural products owing to its anti-pollution property and easy automation in sample pre-treatment. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is also strongly required for the rapid detection of a specific pesticide residue in many samples in the agricultural sector.

In this study, some methods for habitat discrimination and safety evaluation of agricultural products or foods were developed based on various principles and were tried to be applied for real sample measurements.

### III. Contents and Scope

1. Development of the discrimination methods for geographical origin of agricultural products by NIR and CE
  - Development of the discrimination methods for geographical origin of job's-tears, angelica gigantis radix, safflower seed and ginseng radix powder by NIR and CE
  - Development of the discrimination methods for geographical origin of astragalus root, red pepper powder, cnidii rhizoma and bracken by NIR and CE
  - Development of the discrimination methods for geographical origin of burdock, carrot and lotus root by NIR and CE
2. Development of the rapid detection method for *Listeria*, *Escherichia* and *Salmonella* from livestock products and foods by PCR

- Detection of *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. enterica* from livestock products and foods by PCR
  - Search for the PCR-inhibiting materials and extraction methods of template DNA
  - Application of various PCR methods, establishment of optimum PCR conditions and field test
3. Development of the biosensor systems for the detection of heavy metals and antibiotics in agricultural products
- Construction and characterization of the enzyme sensor system with its computer interfacing
  - Construction and characterization of the immunosensor system with its computer interfacing
  - Establishment of the PC-controlled biosensor systems, and their application and control during measurement
4. Development of the new, rapid, environmentally sound and economical multi-residue pesticide analysis technique of agricultural products
- Examination of extraction efficiency, establishment of GC method according to pesticides and agricultural products, and development of hybridoma and basic immunoassay study
  - Analysis with GC according to pesticides and agricultural products, and establishment of ELISA method
  - Analysis with HPLC according to pesticides and agricultural products, and development of ELISA kit for screening purpose
5. Habitat discrimination of agricultural products using electronic nose and study on the evaluation for freshness and storage stability of meat using NIR
- System set-up and collection of the electronic nose data on the samples such as

black rice and jujube, and elucidation of the indices for freshness and storage status of meat

- Construction of multi-variate statistical analysis and artificial neural network on the electronic nose data, and development of the evaluation models for freshness and storage status of meat
- Habitat discrimination of the samples by the statistical method and artificial neural network, and development of the evaluation system for freshness and storage status of meat

#### IV. Results and Opinion for Future Use

##### 1. Development of the discrimination methods for geographical origin of agricultural products by NIR and CE

The price of agricultural products cultivated in Korea is much higher than that imported from foreign countries. To prevent the forgery of geographical origin for agricultural products, it is urgent to establish the database for discrimination of geographical origin. Capillary electrophoresis (CE) is a recent technique and has developed very fast. Such rapid development is due to several factors, but especially to the speed and versatility of CE. Thus, it is possible that CE is a rapid and accurate discrimination method for agricultural products. This study is to produce faster and simpler protocols for agricultural products by CE and to investigate the possibility of CE as a tool to discriminate the geographical origin. The optimal analytical conditions for job's-tears (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) and angelicae gigantis radix (*Angelica gigas*) were established using CE at the 1st year of the study. The average correct discrimination percentage of domestic or foreign job's-tears and angelicae gigantis radix were 82 and 86%, respectively. But safflower seed (*Carthamus tinctorius*) and ginseng radix (*Panax ginseng*) powder were not analysed using CE. At the 2nd year of the study, optimal analytical conditions for astragalus roots (*Astragalus membranaceus*), cnidii rhizoma (*Ligusticum wallichii*) and bracken (*Pteridium aquilinum*) were settled by CE. The mean values of accuracy for correct

discrimination of geographical origin of astragalus roots, cnidii rhizoma and bracken were 80, 62 and 84%, respectively. Red pepper (*Capsicum annuum*) powder was not analysed using CE. Burdock (*Atractium lappa*), carrot (*Daucus carota*) and lotus root (*Nelumbo nucifera*) were analysed by CE at the 3rd year of the study. The optimal analytic conditions were established and the average correct discrimination percentage of domestic or foreign origin burdock was 55%. In conclusion, our results raise the possibility that CE could be potential methods for discrimination of geographical origin of agricultural products.

For the development of the discrimination methods for geographical origin of agricultural products by NIR, the following works were undertaken. First, the standard material preparation for main items of agricultural products was done because this is the most important and fundamental point to secure standard materials in this study. Hence, we prepared standard materials from samples collected in main places of production and import harbors. Second, the database construction of each item by NIR analysis was done by constructing the database on each item by NIR analysis, followed by the preparation of the model (calibration equation) of each item in the database. Finally, the validation of each calibration equation was done by applying unknown samples to each calibration equation. We checked the possibility of the discrimination of geographical origin. From now on, it will be possible to accurately manage labeling geographical origins of the agricultural products by applying this research on the spot.

## 2. Development of the rapid detection method for *Listeria*, *Escherichia* and *Salmonella* from livestock products and foods by PCR

Recently, microbial food safety issues have been emerged as a major public health concern worldwide. Developments for detection of food-borne pathogens such as *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. are highly required for prevention and control. For decades, various molecular diagnostic techniques have been developed to monitor the food-borne pathogens for public health protection. Despite the potential of false-positive, PCR-based detection method has been used as

a powerful tool because of very high specificity and simplicity. Thus, we have put great efforts to establish the multiplex conditions for both simplifying the sample preparation and increasing the sensitivity and specificity in terms of saving time and labor. In this study, we first tried to optimize a simple step for extraction-free PCR template preparation and reliable PCR condition in model food, and then, tested applicability of this process to the field samples for the purpose of monitoring the microbial hazard in the market and industry.

Briefly, centrifugation at  $16,000 \times g$  for 5 min and partial heat treatment at  $98^{\circ}\text{C}$  for 10 min were mainly used for the simple preparation of PCR templates. To eliminate possibility of false positive, more than two primer sets were used for PCR amplification. Both *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were detected at the level of  $10^0$  initial cell counts after enrichment without genomic DNA extraction in the culture and the food sample, respectively. Compared to *E. coli* O157:H7, detection sensitivity of *L. monocytogenes* was low at the level of  $10^3$  cells. Thus, to improve the sensitivity of *L. monocytogenes*, we applied cell wall destabilizer to the sample preparation step. As the result of PCR amplification treated with destabilizer, the limit of detection was lowered  $10^3$  to  $10^1$  and  $10^2$  cells in the pure culture and the food samples, respectively. Sensitivity of *Salmonella* detection with heat treatment before PCR was  $10^2$  cells per g of food sample or 1 pg of DNA template.

Feasibility test for the field trial was carried out on the basis of empirically optimized PCR method. Five representative samples such as raw chicken meat, raw pork, *zocbal*, *sundae*, and raw beef were aseptically collected from the different local markets, and treated to screen both *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. According to the PCR amplified with species-specific primers, *L. monocytogenes* was detected in two pork samples but *E. coli* O157:H7 was not detected in any sample. Ten imported foods and 9 domestic foods were tested for the contamination of *Salmonella* but none was contaminated with *Salmonella*. These results suggested PCR method can be used for rapid, sensitive and species-specific detection to monitor the food-borne pathogens in the market.

Based on these results, PCR-based method is a powerful tool for sensitive and

specific detection of the food-borne pathogens, if time to results and the potential of positive-false can be reduced. As explained above, DNA extraction-free PCR assay for detection of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in meat and meat products can meet these demands. As the results of these application with model foods, *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were detectable as low as 100 initial CFU per ml (g) after enrichment for 8 and 24 hr, respectively. Thus, the protocol developed in this work seems to have a significant impact for the rapid and easy detection of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in foods. Conclusively, this simple method can help safety management to monitor the pathogen contaminated foods at low cost.

### 3. Development of the biosensor systems for the detection of heavy metals and antibiotics in agricultural products

The development of biosensor system for heavy metal detection was done as follows. Urease-based inhibition sensors which measure the inhibition of urease activity by heavy metals were developed. First, the properties of the free urease comprising the effects of enzyme amount and substrate concentration on enzyme activity were examined, followed by the development of a cuvette assay based on spectrophotometric principle. The inhibition characteristics of the free urease at varying concentrations of the single and dual heavy metal ions including Hg(II), Cu(II) and Pb(II) were determined, which confirmed the possibility of detection on heavy metals through the measurement of inhibition degree of urease. In the next stage, the biosensor system which exploited an ammonium ion-selective electrode as the transducer was developed by installing Immobilon cellulose nitrate membrane immobilized with urease onto the electrode and connecting the resulting sensing electrode to a PH/mV meter, followed by the measurements of its basic properties and inhibition characteristics with heavy metal ions. As a whole, the biosensor system showed the sensitivity as comparable as that of the cuvette assay. Also, the set-up of hardware structure on a computer interfacing system for processing biosensor signals was done and the operating software was devised, followed by the examination of its operating characteristics.

The development of biosensor system for antibiotics detection was done as follows. Chemiluminescent immunosensor systems which measure chloramphenicol (CAP) were prepared in batch and flow basis. First, an anti-CAP antibody and analyte-HRP conjugate (tracer) for a direct competitive immune reaction were secured or chemically synthesized. The antibody immobilization was done by soaking various membranes into the antibody solution and the best performance in biosensor response was found in case of Biotrace A and B membrane. A batch type biosensor system using a fiber-optic probe and Radiance Spectrometer of Avantes Co., and a flow type biosensor system using a home-made flow cell and R955 photomultiplier of Hamamatsu Photonics were constructed. After the optimization of reaction conditions, the responses of the immunosensors according to analytes were determined, resulting in the detection limit around  $10^{-7}$  M. A potentiometric biosensor system measuring penicillin compounds was developed using penicillinase ( $\beta$ -lactamase) and a flat-bottomed pH electrode as the biological component and transducer, followed by the elucidation of biosensor response concerning the amount of enzyme for immobilization, ionic strength, pH and substrate types. The detection limit of the penicillin sensor could be extended to 1  $\mu$ M. Also, a computer interfacing system for processing the optoelectronic signals from the immunosensors was also developed.

The PC-control for the biosensor systems was made possible and a flow type urease inhibition sensor system was developed exploiting a micro-column enzyme reactor packed with Chitopearl beads, followed by the elucidation of biosensor performance concerning the amount of enzyme for immobilization, flow rate and length effect of the micro-column. The sample pre-treatments for the biosensors and the conventional methods were done. To the analytical samples, heavy metals, CAP or penicillin compounds were added at varying amount. The model samples were analyzed for the corresponding contaminants by both methods and the analytical results were compared. On the whole, the analytical results obtained with the biosensor methods were matched well with those of the conventional methods. For the dissemination of the research output, a part of our results was presented at IFT

Annual Meeting. Also, the automation device and software for the developed biosensors were constructed and the bench-scale controls for the measuring procedures were done.

#### 4. Development of the new, rapid, environmentally sound and economical multi-residue pesticide analysis technique of agricultural products

The optimum SPME condition was selected with 85 nm poly acrylated fiber for 10 min of extraction and 30 min of desorption at 35°C by automated vibration mode as agitation. SPME coupled with GC and HPLC procedures have been developed for 50 kinds of pesticides and were determined by ECD or NPD and UVD or FLD. Sample (25g) was homogenized with 50 ml of acetonitrile and 20 ml of the upper layer was blended with 2g of NaCl and distilled water or pH 8 phosphate buffer. Three milliliters of the upper layer acetonitrile for GC or 2 ml of it for HPLC was dried for 20 min at 50°C under air stream. Dried extract was dissolved with 1.5 ml of 20% acetone/DW for GC or with 1 ml of 20% acetonitrile for HPLC. After SPME, the fiber was injected into GC or HPLC. Recoveries of SPME ranged 40~170% in GC/NPD and 60~138% in HPLC/FL. Organophosphorus and carbamate pesticides were ranged 70~130% in GC and HPLC, indicating SPME could typically be applicable in pesticide residue monitoring. At *in-situ* test, tolclofos-methyl was detected in ginseng with GC analysis with enough sensitivity and repeatability which are same level of traditional residue analysis. Carbendazim was detected in sedum at 3% difference compared with traditional analysis by HPLC. Total analysis time of SPME-GC/HPLC was less than 2 hr, which saved a lot of time compared with traditional method of 6~8 hr. Solvent consumption was also reduced to 50.5 ml compare with 500~1000 ml of traditional method.

Two same samples spiked with or without pesticides were simultaneously analyzed by optimized SPME (*i.e.*, 100  $\mu$ m polymethylsiloxane fiber, 50 min adsorption and 10 min desorption (270°C for GC), pH=7). Most of pesticides were extracted by SPME coating fiber, but a few pyrethroid and organophosphorus pesticides were not detected by SPME-GC/ECD-NPD dual detection system. The

behaviour of the analytical responses of pesticides in agricultural products ranged between 0.01 and 1.0 ppm, and showed good linearity with regression coefficient for  $> 0.990$ ). The detection limits for most pesticides were approximately 0.001 ppm. This method can be employed for screening studies in which pesticides known to be capable of analysis by SPME-GC-HPLC are involved. A typical example is the monitoring of the residue level of particular compounds used in a treatment of a given crop versus time, and their parents and decay.

An immunoassay method for a widely used herbicide 2,4-D, as described below, was developed. Monoclonal antibody (MAb) against 2,4-D was produced by hybridoma method. Myeloma cells were fused with spleen cells of BALB/c mice, immunized with hapten conjugated via carboxyl group to keyhole limpet hemocyanin (KLH). To evaluate the obtained MAb (MAb 2,4-D-121-57, 2,4-D-121-46), competitive indirect ELISA procedure was developed. For the purpose of increasing the sensitivity and selectivity of ELISA, several kinds coating antigens conjugated with proteins such as bovine serum albumin, ovalbumin, corn albumin, and thyroglobulin were employed. Among them, 2,4-D-OVA was the most sensitive among other conjugates. MAb 2,4-D-121-57 was specially reacted with 2,4-D ( $IC_{50} = 4.89$  ng/ml) but much less with its analogs instead of methylester 2,4-D (15.6%). When 2,4-D was spiked in tap water, orange juice and barley with different concentration, recovery ratio was 98~102, 89~100 and 92~108%, respectively. Experimental immunoaffinity column was made with coupling of antibody to affi-gel 10 for the purification of 2,4-D in samples. Column was initially washed with 10 ml PBS, loaded with sample solution, and washed with 10 ml distilled water and 10 ml PBS. Then, 2,4-D bound to antibody was eluted with 5 ml methanol. The best dose-response curve presented in this study was almost linear in the concentration range of 0.1~1000 ng/ml. In heterologous ELISA system using 3,4-D or 3,4-DPA for coating Ag, the sensitivity increased more ( $IC_{50}$  2 ng/ml 2,4-D). This immunoassay was potentially a valuable analytical tool for the rapid and sensitive determination of 2,4-D from various samples.

## 5. Habitat discrimination of agricultural product using electronic nose and study on the evaluation for freshness and storage stability of meat using NIR

It would be a reduction in the overload of analysis work due to expansion of imported agricultural products as a usage of electronic nose. The discrimination of origin on especially locally produced or imported agricultural products such as black rice, jujube, sorghum, *Ganoderma lucidum*, sesame, *Angelica gigas* Nakai, *Cnidium officinale*, *Paeonia albiflora*, black bean, and *bokryoung* was investigated by using electronic nose. The electronic nose was composed of metal oxide sensors and the other is GC based on SAW detector. Volatile compounds of raw materials were described by the sensitivities ( $R_{\text{gas}}/R_{\text{air}}$ ) of sensors. Principal component analysis (PCA) was carried out using the data obtained from six metal oxide sensors. The first principal component analysis was shown with well separating two different origins.

The number of 57 from 69 species of black rices recognized as locally produced one (83.3%) and 11 from 13 species one (imported black rice) was correctly discriminated. Also commercial electronic nose (e-nose 5000) that was combined with metal oxide sensor and conducting polymer sensor showed 92.75% (locally produced black rice) and 92.31% (imported one) of discrimination. The origin of jujube recognized as locally produced one (89.16%) and the imported one was correctly discriminated as 81.40%. The origin of sorghum recognized as locally produced one (90.9%) and the imported one was correctly discriminated as 89.2%. That of *Ganoderma lucidum* recognized as locally produced one (93.3%) and the imported one was correctly discriminated as 90.0%. That of sesame recognized as locally produced one (96.30%) and the imported one was correctly discriminated as 97.22%. The origin of black bean produced was not correctly discriminated. For GC based on SAW detector, the obtained chromatogram was expressed using VaporPrint™ image program. The results of pattern analysis of *Angelica gigas* Nakai, *Cnidium officinale* and *Paeonia albiflora* showed a difference between two origin of samples.

As the research output for the development of an objective, non-destructive and

fast measuring sensor of meat freshness, the following results were obtained. Counting microorganisms, chemical methods and physical methods were selected for indices of freshness, and electric conductivity, biogenic amine, D-glucose, L-lactate, VBN and K value were selected for the indices of storage condition. Also, the evaluation of possibility on measuring freshness indices and storage condition indices with NIRS was processed. Statistical methods and neural network were used for developing measuring models for each freshness and storage condition, followed by the design of an NIRS probe holder to be worked properly during meat measurement. Visual C++ 6.0 was used to develop program of the system and a notebook computer was used for data input, output and storage. By the developed system, calibration data and validation data were evaluated as  $r^2=0.989$  with  $SEC=1.78$  and  $r^2=0.963$  with  $SEP=2.285$ , respectively.

## 6. Opinion for future use

Currently, we have 36 quantitative achievement including papers, presentation at scientific meetings, application to patentship, seminars and workshops. In the future, we will pursue this activity further to disseminate our research output. Also, the NIR and electronic nose technique have already been utilized by National Agricultural Products Quality Management Service in habitat discrimination. The SPME technique is also planned for a future safety analysis in large-scale planting area, etc. As the contents and quality of the other research output seem to be good, they might be exploited through the technical transfer when required by relevant institutions, etc.

# CONTENTS

Chapter 1	Synopsis .....	31
Paragraph 1	Objective and scope .....	31
Paragraph 2	Significance .....	32
Chapter 2	State of Art .....	35
Chapter 3	Contents and Results .....	39
Paragraph 1	Development of the discrimination methods for geographical origin of agricultural products by NIR and CE .....	39
1.	Development of the discrimination method for geographical origin of agricultural products by CE .....	39
2.	Development of the discrimination method for geographical origin of agricultural products by NIR .....	85
Paragraph 2	Development of the rapid detection method for <i>Listeria</i> , <i>Escherichia</i> and <i>Salmonella</i> from livestock products and foods by PCR .....	95
1.	Development of the rapid detection method for <i>Listeria</i> and <i>Escherichia</i> from livestock products and foods by PCR .....	95
2.	Development of the rapid detection method for <i>Salmonella enterica</i> by PCR .....	134
Paragraph 3	Development of the biosensor systems for the detection of heavy metals and antibiotics in agricultural products .....	151
1.	Development of the biosensor systems for the detection of heavy metals and antibiotics in agricultural products .....	151
2.	Computer interfacing system and control study on biosensor response .....	223
Paragraph 4	Development of the new, rapid, environmentally sound and economical multi-residue pesticide analysis technique of agricultural products .....	245

	1. Development of the new, rapid, environmentally sound and economical multi-residue pesticide analysis technique of agricultural products .....	245
	2. Development of the rapid detection method using solid phase microextraction .....	284
	3. Development of the immunoassay method for 2,4-D .....	398
Paragraph 5	Habitat discrimination of agricultural products using electronic nose and study on the evaluation for freshness and storage stability of meat using NIR .....	443
	1. Habitat discrimination of agricultural products using electronic nose .....	443
	2. Study on the evaluation for freshness and storage stability of meat using NIR .....	476
Chapter 4	Achievement and Contribution .....	517
Paragraph 1	Achievement .....	517
Paragraph 2	Contribution .....	518
Chapter 5	Plan for Use .....	519
Paragraph 1	Current use .....	519
Paragraph 2	Future plan .....	522
Chapter 6	Foreign Scientific Information Acquired .....	523
Chapter 7	References .....	524

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	5
SUMMARY .....	15
CONTENTS .....	27
목 차 .....	29
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	31
제 1절 연구개발의 목적 및 범위 .....	31
제 2절 연구개발의 필요성 .....	32
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	35
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	39
제 1절 NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 .....	39
1. CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 .....	39
2. NIR을 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 .....	85
제 2절 PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 <i>Listeria</i> , <i>Escherichia</i> 및 <i>Salmonella</i> 의 신속검출법 개발 .....	95
1. PCR을 이용한 <i>Listeria</i> 및 <i>Escherichia</i> 의 신속검출법 개발 .....	95
2. PCR을 이용한 <i>Salmonella enterica</i> 의 신속검출법 개발 .....	134
제 3절 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발 .....	151
1. 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발 .....	151
2. 센서반응에 대한 컴퓨터 접속시스템 및 제어연구 .....	223

제 4절	농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발 .....	245
1.	농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발 .....	245
2.	Solid phase microextraction 방법을 이용한 신속분석법 개발 .....	284
3.	농산물의 잔류농약 신속판별을 위한 면역분석기술 개발 .....	398
제 5절	전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가 .....	443
1.	전자코를 이용한 농산물의 판별기술 .....	443
2.	NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가 .....	476
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	517
제 1절	연구개발목표의 달성도 .....	517
제 2절	관련분야에의 기여도 .....	518
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	519
제 1절	기존 활용실적 .....	519
제 2절	활용계획 .....	522
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	523
제 7 장	참고문헌 .....	524

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

비파괴 분석법 중 근적외분광법 (near-infrared spectroscopy, NIR)은 최신 계측기술로서 국내외적으로 많은 산업분야에 응용되어 원가절감 및 품질향상에 기여하고 있다. 그러나, 특정 농산물의 원산지 판별에 NIR을 활용하기 위하여는 기술도입보다 자료를 많이 축적하고 이를 현장적용하는 자체적인 연구개발이 요구된다. 또한, 전자코 (electronic nose) 및 모세관전기영동 (capillary electrophoresis, CE)을 이용한 농산물의 원산지 판별의 경우는 국내에서 아직 시작단계여서 적용 예가 많지 않은 실정으므로 국내에서 필요한 시료를 대상으로 하는 연구개발이 요구된다.

잔류농약 분석법 중 고형상 미세추출법 (solid-phase microextraction, SPME)은 개발 역사가 일천하고 지금까지 주로 기체나 액체상태의 시료에 적용하는 방법만이 발표되고 있을 뿐 농산물과 같은 고체시료에 적용하기 위한 연구발표는 거의 없는 실정이다. 식중독균 신속검출을 위한 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR)과 관련하여 현재 국내에서도 primer 제작 등 연구개발에 필수적인 요소를 충분히 갖추고 있으므로 다양한 식품군에 따른 PCR 기법의 개발과 실제적용이 요구되었다. 농산물 중에 존재 가능한 화학적 위해요소인 중금속 및 항생제의 간이정성분석에 각종 바이오센서를 적용하는 연구는 선진국에서도 개발 중에 있으므로 그 핵심기술을 자체 정립하는 노력이 필요하다.

본 연구팀은 다양한 학제를 전공하는 연구진으로 구성되어 있으므로 축적된 선행연구기술과 경험을 토대로 하여 국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별과 안전성 평가에 대한 다양한 기반분석기술을 개발하고 관련기술의 외국과의 격차를 크게 줄이는데 본 연구개발의 목적이 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 NIR 및 CE를 이용한 원산지 식별법 개발, *Listeria monocytogenes* 등 식중독균 3종에 대한 PCR 기법 개발, 바이오센서에 의한 중금속 및 항생제 검출시스템 개발, SPME 방법을 활용한 잔류농약의 신속 다성분 분석법 정립과 농산물 오염가능성이 큰 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)에 대한 면역분석법 확립과 현장적용 연구 및 전자코에 의한 농산물 판별기술 개발과 NIR을 이용한 육류의 신선도와 저장성 평가에 대한 연구를 수행하였다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

농산물의 산지나 재배조건에 따라 발생하는 품질의 차이를 효율적으로 구분하고 WTO 체제에 의한 농산물의 산지표시 강화 및 제도화에 부응하기 위한 과학적 분석방법 개발이 시급히 요구되며 부정 유통되는 수입농산물이 날로 증가하고 있으므로 현장 단속과정에서 수거된 이들 농산물의 원산지 검정을 위한 과학적인 식별방법 개발이 필요하다. NIR과 전자코는 상대적으로 분석이 간편하며 결과산출이 신속하고 경제적으로 수행할 수 있다. 이 경우, 산지판별의 정확도를 높이고 작업자가 손쉽게 판별하기 위하여 확보된 data를 신경회로망 등을 이용하여 통계적으로 분석하고 학습된 시스템을 구축하여 원산지를 판별하는 기법의 개발이 요망된다. CE는 시료로 사용되는 농산물의 단백질 패턴을 비교하여 원산지를 판별할 수 있는 방법으로서 관련기술이 새롭게 개발되고 있고 쌀 등에 적용한 기존연구결과를 고찰해 볼 때 다른 농산물의 원산지 판별에도 적용가능성이 높으므로 관련기술을 시급히 개발해야 한다. 육류는 냉장저장 동안에 적절한 환경만 주어지면 미생물에 의한 부패, 또는 지방의 산패가 손쉽게 발생된다. 이러한 냉장저장 환경조건하에서 변성 정도에 따른 품질의 저하를 검출하는 효율적이고 간편한 분석법이 개발되면 육류의 품질판정 및 등급화에 활용할 수 있을 것으로 기대되므로 그 개발필요성이 높다.

농산물의 안전성 확인에 대한 국민적 관심과 요구가 증폭되고 이에 따라 검사수요가 크게 증대됨에 따라 이에 따른 비용과 시간 및 인력문제에 대한 부담이 가중되고 있다. 따라서 이러한 부담을 감소시키기 위하여 국내뿐만 아니라 전세계적으로 농산물 등의 안전성 평가를 위한 보다 간편하고 신속하며 경제적인 분석방법을 개발하기 위한 노력이 경주되고 있다. 국내의 경우, *Salmonella* 등에 의한 식중독 발생이 빈번하고 수입 냉동식품 중의 *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7 오염이 밝혀지는 등 이들 병원성미생물을 신속히 검출하는 기술개발에 대한 필요성이 증대되고 있으나, 기존의 선택배지를 사용하여 특정균을 확인하는 방법은 시간이 많이 걸리므로 이를 보완하는 신속검출법으로서 분자생물학적 원리에 의한 PCR 기법의 개발필요성이 매우 높은 실정이다. 최근, 농업용수의 오염이 심화됨에 따라 인체에 치명적인 장애를 야기할 수 있는 중금속이 포함된 유해농산물이 생산될 가능성이 증대되었고 축산물 및 그 가공품의 경우에도 배합

사료 등 여러 경로를 통한 항생제 오염가능성이 증대되었다. 따라서, 이들을 신속하게 검출할 수 있는 현장성 있는 기반기술로서의 새로운 계측수단의 개발이 요구되며, 생물요소 (biological component)에 의한 선택적 반응결과를 변환기 (transducer) 상에서 측정하는 바이오센서는 이러한 필요성을 충족시켜 줄 수 있는 유력한 수단으로 기대되므로 관련기술을 시급히 정립해야 한다. SPME 방법은 일부국가에서 현재 환경시료 (물, 토양 등)에 제한되어 사용되고 있으므로 환경친화적 농산물 분석에의 적용필요성이 매우 높고 면역분석법도 그 적용범위를 넓히기 위한 연구가 요구되며 이를 통하여 자동화 전처리, 경제적 비용절감 및 용매사용량의 최소화를 통한 분석환경의 개선효과가 높을 것으로 기대된다.

## 2. 경제·산업적 측면

WTO 체제 출범으로 인해 우리나라 농산물 시장도 외국과의 본격적인 개방화, 경쟁적 체제로 변화하게 되었다. 이에 따라 외국 농산물 및 가공식품의 수입량이 현저하게 증대되고 있으며, 그 필연적 결과로서 국내에서 유통되는 농산물 및 가공식품에 대한 판별기술 및 안전성 평가기술의 개발필요성이 점증하고 있으며, 이의 수행 및 활용을 통하여 국내의 농업 생산자, 식품산업 및 소비자가 많은 경제적 이익을 얻을 수 있을 것으로 기대되고 있다.

즉, NIR, CE 및 전자코를 이용한 원산지 식별방법 개발을 통해 수입농산물의 부정유통 방지와 수입농산물의 차별화가 가능하게 되면, 국내의 생산자와 소비자의 보호와 농산물의 엄격한 원산지관리를 통한 국내 농산물의 대외 경쟁력 강화가 기대된다. 이 과정에서 수입농산물의 다양화와 수입량의 확대에 따라 이를 분석함에 있어, 전처리과정을 단축하고 저가의 비용으로 각 지방의 검역소 등에서 수행할 수 있는 분석시스템의 확립이 기대된다. 근래 냉장육의 유통으로 인하여 각종 오염원에 육류를 노출시킬 가능성이 커짐에 따라, 육류의 신선도를 신속하게 평가할 수 있는 현장적응형의 검사기법의 개발 및 적용의 필요성이 높아지고 있으며 이를 통하여 국내 생산자에게는 상품의 가치를 높일 수 있는 기준을 마련하고 소비자에게는 신선육류를 보다 객관적으로 선택할 기회를 제공할 수 있을 것으로 예상된다.

최근의 국민소득 증가와 소비자 보호활동 강화, 수입식품의 급증 등에 따라 농산물 및 가공식품의 안전성에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있다. 또한, 국내에서도 도시락

등 외식산업의 발달, 냉동식품의 물동량 증가에 따라 *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 등에 의한 식중독 발생가능성이 높아지고 있으며 이 경우 국민의 식생활에 심각한 위해를 가할 수 있을 뿐만 아니라 오염된 식품의 폐기에 의한 경제적 비용부담도 매우 높은 실정이므로 각종 급식소, 양판점 등에서의 식중독 발생관리에 활용할 수 있는 감응성과 신뢰성 있는 새로운 식중독균 검출기술의 개발이 필요하다. 농약의 잔류분석 시 사용되는 기기와 시약 및 초자기구 등이 대부분 고가의 수입품이므로 기기나 도구 사용이 적고 용매의 사용량이 적은 새로운 분석방법이 개발되면 이의 구입에 소요되는 막대한 외화를 절약할 수 있고 또한 분석경비가 줄어들면 누구나 손쉽게 저렴한 비용으로 식품 및 농산물의 안전성을 확인할 수 있어 부정산 농산물의 생산이나 유통이 줄어들 것으로 예상되며 이에 따라 농약의 오·남용으로 인한 불필요한 지출을 억제하고 토양이나 수질오염 등 환경오염을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 식품산업에 있어 위해요소중점관리기준 (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP)의 적용이 확대되고 있어 중금속 및 항생제 등 식품에 존재가능한 화학적 위해요소에 대한 검사수요가 점증하고 있으므로 이들에 대한 정밀분석법을 보완하여 간이정성검사에 활용할 수 있는 신속검출법의 개발이 식품산업의 경제성증진을 위하여 요구되고 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

건전한 사회를 유지하기 위하여는 건강한 식품의 생산 및 섭취가 중요하고 이를 위해서는 가공식품의 원료가 제대로 사용되고 있는지를 평가할 수 있는 분석법의 개발이 뒷받침되어야 한다. 본 연구에서는 이를 위한 현장적용성 높은 다양한 분석법을 개발하여 분석의 신속성 제고, 분석비용의 저하, 유독성 유기용매로부터 분석자의 건강을 지키고 폐용매로 인한 환경오염을 최소화하는데 기여하고자 하였다.

국내 농산물과 해외 농산물의 차등화로 국내 농가의 생산의욕을 고취시킬 필요성이 제기되고 있으며 이와 같은 필요성에 부응하기 위하여 농산물의 유통질서 확립에 활용할 수 있는 신속·정확한 원산지 판별법이 개발되어야 한다. 국내의 경우 각종 위해물질의 안전성에 대한 인식이 상대적으로 낮아 사회적으로 이슈화된 경우에만 형식적이고 단기적인 조치를 취하는 경우가 많고 장기적이고 실제적으로 문제가 되는 사안도 그대로 방치하는 경우가 허다하므로 이의 개선을 위한 노력이 필요하고, 본 연구는 이와 같은 사회적 필요성을 충족시키는데 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

농산물의 원산지판별을 위하여 최근에는 비파괴기술인 근적외선 분광법, 전자코, X선 형광분석법 등이 많이 사용되고 있으며 특히 NIR을 이용한 비파괴기술은 과채류의 당도, 곡류의 함수율, 아밀로오스의 함량, 우유와 유제품의 지방, 단백질 및 고형분함량 분석에 많이 응용되고 있다. 국내에서 유통되는 농산물의 원산지 검정기관인 국립농산물품질관리원에서는 40여 품목의 주요농산물을 NIR로 식별할 수 있는 방법을 1차적으로 개발하였으나 일부 품목에 있어 검량선이 다소 불안정하고 판정오차가 비교적 커 원산지 판정업무에 직접 적용하기에 다소 어려움이 있으므로 보완연구가 필요하였다. 따라서 반복분석횟수를 늘리고 분석결과를 다양한 통계처리기법으로 해석하여 좀더 완벽한 식별법을 개발하여야 하며 또한 NIR 분석 시 흡광에너지의 안정적인 측정을 위하여 매우 중요한, 시료의 전처리조건을 최적화하고 CE, 전자코 등 기타의 원산지 판별수단에 의한 분석결과와의 상호검증과 보완이 필요하다.

한편, 농산물의 품종이나 원산지를 판별하기 위하여 전기영동, HPLC 분석법 등과 같은 기존의 단백질분석법을 활용할 수 있지만 현실적으로 시간이나 비용이 많이 소요되는 단점이 있어 현장에서의 적용에 어려움이 있었다. 최근, 기존의 분석법보다 분석시간이 짧고 분리능(resolution)이 높아 분석에 필요한 시간 및 시료량을 최소화 할 수 있으며, 양적 digital 분석이 가능한 새로운 기법으로서 CE가 적용되기 시작하고 있다. CE 분석법은 현재 주로 곡류, 특히 밀의 품종판별에 주로 활용되고 있으며 국내의 경우 최근 한국식품개발연구원 연구팀에 의하여 국내산 벼 23 품종에 대한 품종판별과 품종별 재배지역에 따른 차이판별에 적용된 바 있어 다양한 농산물의 원산지 판별에 이 기술을 활용가능할 것으로 기대되므로 이를 위한 자료의 축적 및 적용시험이 요구되어 진다.

농산물, 특히 육류의 품질측정은 주로 이화학적 방법에 의하여 행하여져 왔으나 최근 여러가지 비파괴 물성측정장치 및 센서를 이용하여 편의성과 경제성을 제고한 기술개발이 확산되고 있는 실정이다. 이들 비파괴 분석법으로는 초음파 측정법이나 NIR 분석법이 보고되고 있는데, 측정원리상 주변환경에 민감한 probe 분자를 이용하는 분광학적 방법은 편의성과 정확성으로 인하여 점차 연구영역이 확대되고 있는 상태이나 실제의 현장에서 사용할 수 있기에는 아직 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 충분한 시료수집과 정보의 통계처리를 통한 신선도 및 저장상태에 영향을 미치는 인자의 체계적 구명과 측정원리의 이론화가 아직 미진한 실정이다.

현재, WTO 체제와 수입 자유화시대를 맞이하여 외국의 농산물이 많이 수입되고 있으나 이들의 가격이 국산보다 저렴한 경우가 많기 때문에 의도적으로 산지를 속이는 경우가 많은 실정이나 이 경우 과학적 분석에 의한 판별이 쉽지 않은 실정이다. 즉, 농산물의 원산지 규명을 위하여 이화학적 방법을 사용하는 경우 시간이나 비용이 많이 소모되고 결과에 대한 정확도도 80% 내외이므로 비파괴기술인 NIR 분광법이나 전자코 시스템에 의하여 이화학적 방법의 문제점을 보완하는 연구가 시도되고 있다. 특히, 1993년에 국립농산물품질관리원이 범국가적인 원산지관리 전담기관으로 지정된 이후 원산지 식별을 위한 다양한 방법 연구가 광범위하게 진행되고 있다.

병원성 미생물에 의한 식중독은 위생환경이 아주 좋은 선진국에서도 빈번하게 발생하고 있으며 국내의 경우에도 이와 유사하게 위생환경은 개선되었으나 새로운 유형의 식중독균에 의한 식중독의 발생가능성이 제기되고 있다. 미국의 경우 식품산업계와 정부의 노력에도 불구하고 *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, enterotoxigenic *E. coli*, *Campylobacter jejuni* 등의 식품오염 병원균이 일으키는 식중독은 줄어들지 않고 있으며 식품에 오염된 미생물의 종류를 파악하는 것은 매우 어려운 일로 간주되고 있다. 국내의 식생활 양상이 점차 서구화되고 수입산 농산물과 가공식품의 유입이 활발해지고 있는 현 시점에서 PCR 기법 등을 이용한 보다 신속하고 정확한 식중독균 검출법의 개발이 필요하다. 하지만 농산물과 가공식품의 구성성분이 복잡하기 때문에, PCR 기법을 실제로 수입산 농산물과 가공식품 중에 오염된 식중독균을 검출하는데 적용하기 위해서는 식품 매트릭스의 영향 규명과 다양한 PCR 기법의 도입 등 해결하여야 할 점이 많으므로 관련 연구개발이 시급히 요구되고 있다.

바이오센서 기술은 앞서의 연구필요성에서 언급한 바와 같이 농산물의 안전성 평가에 있어 필수적인 현장성과 신속성 측면에서 우수하고 또 측정원리가 다양하여 항원·항체반응뿐만 아니라 효소나 미생물 등 다른 생물요소의 반응성도 측정할 수 있다. 예로서, cholinesterase나 urease 활성이 농약이나 중금속에 의하여 선택적으로 저해되는 현상을 전기적 혹은 광학적 센서로 측정하면 이들을 간편하게 검출할 수 있고 시스템의 on-line화에 의하여 연속적인 측정도 가능하다. 중금속 측정을 위한 바이오센서 시스템의 원형은 microtiter plate를 사용한 urease inhibition assay로서, 중금속에 의한 효소의 활성저해가 발생하면 암모니아의 발생량이 줄어들고 이를 발색시약을 사용하여 광학적으로 측정하거나 이온감응전극 (ion-sensitive electrode)을 사용하여 전기화학적으로 측

정하게 된다. 항생제 등 화학적 유해물질의 분석은 지금까지 효소면역분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의하여 주로 이루어져 왔으나, 그 현장적용성을 개선하기 위하여 dipstick 기법과 면역센서 (immunosensor)의 개발이 최근 이루어지고 있다. 이들 방법은 효소면역분석법에 필적하거나 그 이상의 반응감도를 얻을 수 있으면서도 편의성이 높아 현장분석에 적합한 특성을 지니고 있다.

SPME 방법은 1992년에 개발되어 미국, 캐나다 및 일부 유럽국가에서 지하수나 강물 및 오페수 등의 탄소화합물의 분석과 오렌지쥬스, 커피, 콜라, 치즈 중 방향물질의 분석에 일부 이용되고 있으며, 최근에는 혈액이나 요 중의 마취제와 각성제 분석과 같은 의학 목적으로 연구가 진행되고 있다. 국내의 경우 일부 학계에서 방향성 물질의 동정이나 식수나 지하수 중의 유기화합물 분석에 SPME 방법을 적용하는데 관심을 기울이고 있다. 국립농산물품질관리원에서는 그 동안 다양한 성분 및 종류의 농약과 농산물에 대한 탐색을 시도하여 적용가능성을 확인하였으나, 기체나 액체상태의 분석대상물에서 나타나지 않던 문제점이 고체상태인 농산물을 시료로 하였을 때 일부 나타남에 따라 보다 체계적이고 과학적인 해결책을 모색하기 위한 연구를 수행함으로써 효율적이고 신뢰할 수 있는 분석법으로 개발·정립하는 것이 필요하게 되었다. 동시에, 최근 국내의 일부 업체나 연구소에서 관심을 갖기 시작한 면역분석법에 대하여 항체생산, 면역분석법의 개발 및 최적화, 계측 protocol의 작성과 kit 제작 및 그 응용 등의 체계적 연구를 통하여 기존 분석법의 기법상의 문제, 환경적인 문제, 수입되는 면역분석 kit 사용에 따른 경제성 문제 등을 해결함으로써 급증하는 농산물의 안전성확보 요구에 능동적으로 대처하는 연구개발이 요구되고 있다.

고도 경제성장에 따른 소득증가에 따라 무공해 및 청정 농산물에 대한 소비자기호가 증대되었고 UR 협상 등에 따라 각종 농산물의 수입량이 크게 증가하게 되었다. 따라서, 이들 국내산 및 수입 농산물(가공식품)의 산지판별 및 안전성에 대한 체계적이고 주기적인 모니터링에 대한 사회적 공감대가 형성되었고 그 결과 유통 농산물에 대한 검사수요는 매년 크게 증대되고 있다. 이와 같은 상황전개에 따라 수입 농산물 및 식품의 품질을 보장하고 국내 생산자 및 소비자를 보호하기 위하여 유통 중인 농산물 및 가공식품의 원산지과 안전성에 대한 정부차원의 지원에 의한 새로운 신속분석기술의 확립이 시급히 요구되고 이를 통하여 얻을 수 있는 국가적 이익도 상당할 것으로 추정되므로 본 연구는 이와 같은 취지에 기여하는 것을 목적으로 하였다.

여 백

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 (제1세부과제)

#### I. CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 (주관연구기관)

세부연구책임자 : 한국식품개발연구원 류 미 라

##### 1. 서 설

최근 WTO 체제와 수입 자유화시대를 맞이하여 외국 농산물의 수입이 급증하는 추세에 있다. 이 제품들은 가격이 국산보다 저렴하여 의도적으로 산지를 속이는 경우가 많아 정부에서는 관련법을 정하여 국산농산물에 관한 표시를 의무화하고 있으나 이를 의도적으로 숨기는 경우 구분이 쉽지 않은 실정이다.

농산물의 원산지규명을 위하여 최근에는 근적외선분광법 (NIR), 전자코, X선 형광분석법 등이 많이 사용되고 있다. 특히 근적외선분광법을 이용한 과채류의 당도, 곡류의 함유율, 아밀로스의 함량, 우유 및 유제품의 지방, 단백질 및 고형분 함량 등의 비파괴 분석에 관한 연구가 많이 수행되고 있으며 현재 '국립농산물품질관리원'에서 주요 40여 품목 농산물을 식별할 수 있는 방법을 1차적으로 개발하였으나 일부 품목에서 판정오차가 비교적 크게 나타나 원산지 판정업무에 직접 적용하는데는 다소 어려움이 있어 연구의 보완이 필요한 실정이다. 따라서 보다 많은 종류의 시료수집, 분석자료의 다양한 통계처리방법 도출 및 NIR 분석 시 흡광에너지의 안정적 분석을 위해 매우 중요한 시료의 전처리 조건을 최적화하고 NIR분석과 동시에 다른 원산지 분석법을 이용한 상호검증과 보완으로 완벽한 원산지 식별시스템 개발이 필요하다.

또한 농산물의 품종이나 원산지는 외형적 특성만으로는 판별하기 어려워 곡류를 중심으로 전기영동, HPLC 등의 단백질 분석법을 통한 품종판별 연구도 진행되어 왔다 (Huebner 등, 1990). 그러나 일반적으로 전기영동은 분석시간이 길고 band의 정량화나 해석이 어려우며 또한 시료의 추출량이나 단백질의 염색정도에 따른 minor band의 재현

성에 다소 문제가 있는 것으로 지적되어 왔다. HPLC는 분석에 소요되는 시간이 비교적 짧으며 resolution이 뛰어나 단독 또는 전기영동과 연계하여 곡류 및 두류 등의 품종판별 연구에 이용되어 왔으나 이 방법들을 실질적으로 현장에서 적용하는 데에는 많은 어려움이 예상된다. 1980년대 초에 알려지기 시작한 capillary electrophoresis (CE)는 기존의 분석방법들에 비해 높은 분리도와 빠른 speed, 그리고 양적 digital 분석이 가능하며 분석에 필요한 시료의 양을 최소화할 수 있는 등의 장점을 가진 새로운 분석법으로 최근 들어 그 이용도가 증가하고 있다 (Cancalon 등, 1995; Campos와 Simpson, 1992; Schwer와 Kenndler, 1990; Zeece, 1992). CE는 전기영동과 같이 기본적으로 전기장에서 differential migration에 따라 분석이 이루어지나 gel이 없는 free solution 상태에서 분석하는 것으로, 결과적으로 전기력에 따라 analyte가 이동하면서(electrophoresis) concentration-sensitive detector 위치를 지날 때 전기적인 신호가 생겨 이를 검출하는 (HPLC) 방법이다 (Dong, 1999; Wehr, 1997). 이 방법은 SDS-PAGE나 HPLC로 분리 가능한 물질들에 모두 적용할 수 있을 뿐만 아니라 전처리와 까다로운 시료도 쉽게 분석할 수 있는 등의 장점을 가지고 있다 (Chen, 1991). CE를 곡류의 품종판별에 이용한 것은 Bietz와 Schmalzried (1992; 1993)가 gliadin 분석을 통한 밀의 품종판별을 시도한 것을 시작으로 귀리와 쌀 (Lookhart와 Bean, 1995; 1996), 옥수수 (Righetti 등, 1998; 1999), 보리 (Lookhart 등, 1999) 및 수수 (Bean 등, 2000) 등에 적용되어 왔고, 땅콩 (Basha, 1997) 및 royal jelly (Jia 등, 1995) 등의 분석에도 이용되었으며, 우리나라에서는 본 연구팀에 의해 국내산 쌀의 품종판별 (Rhyu 등, 1998) 및 차이식별 (Rhyu 등, 2001) 등에 적용된 바 있다.

따라서 본 연구는 CE를 이용하여 최근 수입이 급증하고 있는 품목을 대상으로 하여 각각의 CE 분석을 위한 최적의 추출조건 및 분석조건을 확립하고 이를 이용하여 유통 시료를 대상으로 원산지 판별에 적용, 과학적이고 신속 정확한 원산지 판별법의 일부로 사용 가능성을 제시하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 시료

시료는 국립농산물품질관리원 시군 출장소 및 국립식물검역소를 통해 전국 산지 생산품 및 검역 통관물품으로 해당연도에 생산 유통된 국산과 수입산을 수집하여 사용하였다. 수집시료는 food mixer (FM-681, Hanil, Seoul)를 이용하여 조 분쇄 후 cyclone sample mill (UDY-Co, USA)로 분말화하여 20 mesh 체를 통과시켜 사용하였다.

### 나. 기기 및 추출

CE는 Beckman P/ACE 5500 system (Beckman, Fullerton, CA, USA)을 이용하였고, capillary는 I.D. (25, 50, 75  $\mu\text{m}$ )와 길이 (37, 27 cm)가 다른 uncoated fused-silica capillary를 이용하여 예비실험한 결과, 50  $\mu\text{m}$  I.D., 27 cm (20 cm, inlet to detector) 길이의 capillary를 선택, 분석조건을 확립하였다. 각 시료에 대한 추출용매는 수용성 alcohol류와 buffer와 용매를 함께 사용하여 지표물질의 추출율, 침전물의 생성여부 및 분석상태를 확인한 후 결정하였다. 각 시료에 대하여 결정된 추출용매로 추출한 후 원심분리하고 0.45 및 0.22  $\mu\text{m}$  micro-filter로 순차적으로 여과하여 사용하였으며, 분석 시까지 실온 보관하였고 추출 후 15시간 이내에 분석하는 것을 원칙으로 하였다.

### 다. 분석조건 확립

최적의 분석조건 확립을 위해 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5, P-buffer)와 0.3 M borate buffer (pH 8.3, B-buffer)를 각각 기본 분석 buffer로 하여 초기 분석 후 각 시료에 대하여 기본 buffer를 결정하였다. 또한 결정된 분석 buffer에 organic modifier 및 detergent를 첨가 후 분석하여 분리도 개선효과를 검토하였다. Organic modifier는 acetonitrile, ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을, zwitterionic detergent로 CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl ammonio]-1-propanesulfate), lauryl sulfobetain(SB-12)(N-dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)과 octyl-sulfobetain(SB3-8)(N-octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)을, nonionic detergent로 Brij35 (propylethylene 23 lauryl ether)를 사용하였으며, hexane sulfonic acid (HSA)와 iminodiacetic acid (IDA)도 사용하였다. 각 buffer는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)로부터, detergent는 Sigma

Chemicals (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, organic modifier는 HPLC grade를 사용하였다.

분석 protocol은 rinse 시간 및 사용용매, injection time, 분석 시 capillary 온도, 분석 전압 및 detection 파장 등의 결정을 통해 최적의 분석조건을 설정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

(1차년도)

가. 울무

1) 분석조건 확립

가) 지표물질의 추출

CE 분석을 위한 지표물질 추출을 위해 60% 1-propanol, 30% ethanol, 30% ethanol/0.05 M phosphate buffer (pH 2.5)를 적용하여 분석한 결과, 30% ethanol 추출 시 추출을 및 분리도가 가장 좋은 것으로 나타났다. 30% ethanol을 시료에 2.5배량 (w/v) 가하여 상온에서 1시간 추출 후 20분간 원심분리 (10,000 ×g)하여 paper filtration, 0.45 μm 및 0.2 μm micro-filter로 순차 filtration하여 전처리 하였다. 또한 retention time의 재현성을 위해 분석 buffer의 사용횟수를 2차례로 한정하였다.

나) 분석조건 확립

(1) 분석 buffer 조성

CE를 이용하여 곡류 단백질 분석 시 가장 문제가 되는 것은 capillary 내막과 분석하는 단백질간의 소수성 상호작용으로, 이의 해결을 위하여 몇 가지 방법이 제안되어 있다. 그중 하나가 상대적으로 친수성이 강한 organic modifier를 분석 buffer에 첨가하여 소수성 상호작용을 변화시켜 주는 것으로 (Campos와 Simpson, 1992), 분석 buffer에 organic modifier인 acetonitrile, ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을 각각 20% 농도로 첨가하여 분석하였다. Acetonitrile, methanol, ethylene glycol, 2-propanol, 2-methoxy ethanol의 순으로 전체 peak의 용출시간이 늦어졌으며 (Fig. 1), 이 중 acetonitrile은 분석시간은 단축되나 peak의 분리도 면에서 분석시간 10분 이내에 나타나는 peak 들이 서로 붙어 정확한 분리가 어려웠고 ethylene glycol은

baseline의 안정과 용출시간 면에서 안정적인 경향을 나타내었으나 5~10분 사이의 peak들의 분리도가 좋지 못했고 2-propanol은 baseline과 용출시간 면에서, 2-methoxy ethanol은 용출시간이 늦어 전체 분석시간이 너무 길어지는 것으로 나타났다. 따라서 baseline의 안정도, peak의 분리도 및 peak의 용출시간 모두를 고려하여 methanol을 울무 분석용 buffer에 첨가하는 organic modifier로 결정하였다.

단백질과 capillary 내막의 상호작용을 변화시켜 주는 다른 방법의 하나로 detergent의 효과를 비교하였다. 20% methanol을 첨가한 buffer에 6종의 detergent를 각각 26 mM 농도로 첨가하여 peak pattern의 변화를 관찰한 결과 (Fig. 2), detergent를 첨가하기 전에 비해 SB-12, SB3-8 및 HSA를 첨가 시 baseline이 안정적이며 peak의 분리도 개선효과를 나타내었고 특히 HSA를 첨가한 경우 peak의 용출시간이 단축되며 동시에 분리도 개선효과가 가장 컸다. IDA, Brij-35 및 CHAPS는 baseline이 안정적이지 않는 등 울무 분석에는 부적합한 것으로 나타났다.

울무추출물과 capillary 내막의 상호작용 감소를 위한 organic modifier로는 methanol, detergent로는 HSA를 첨가하여 일부 시료에 대한 예비실험을 실시한 결과, retention time 5~10분 사이에 peak 들에서 원산지에 따른 차이의 도출 가능성이 나타나 이들 peak의 분리도 개선을 시도하였다. Methanol 농도가 20, 30 및 40%로 증가할수록 전체 peak의 용출시간이 늦어져 40%에서는 peak의 확산현상이 나타났고 methanol의 농도 30%에서 5~10분 경에 용출되는 peak의 분리도가 적절히 개선되었다 (Fig. 3).

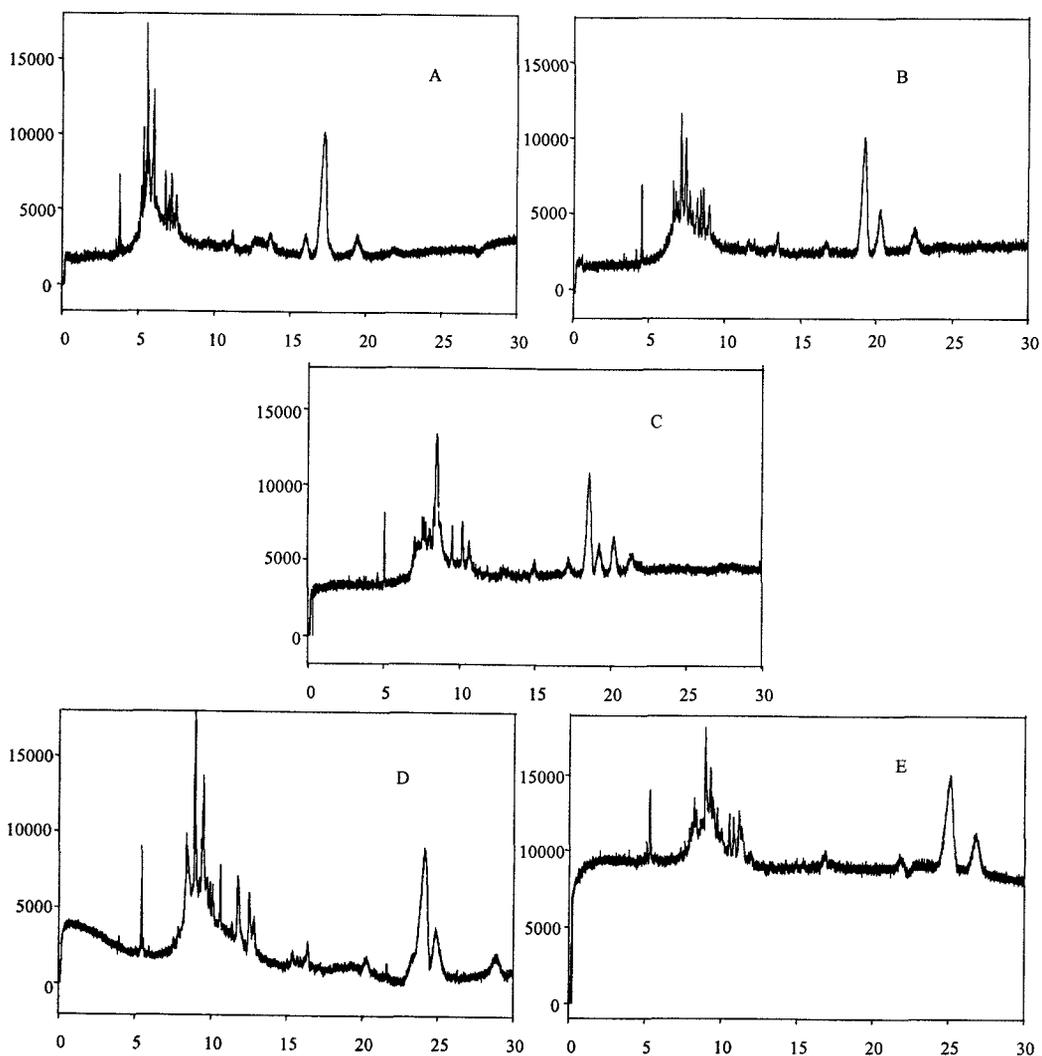


Fig. 1. Capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of Job's-tears separated with 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5 plus an organic modifier; 20% acetonitrile (A), 20% methanol (B), 20% ethylene glycol (C), 20% 2-propanol (D) or 20% 2-methoxy ethanol (E). Separations were carried out in 27 cm (20 cm separation length)  $\times$  50  $\mu$ m I.D. capillaries at 15 kV and 45°C. Samples were pressure-injected (20 sec).

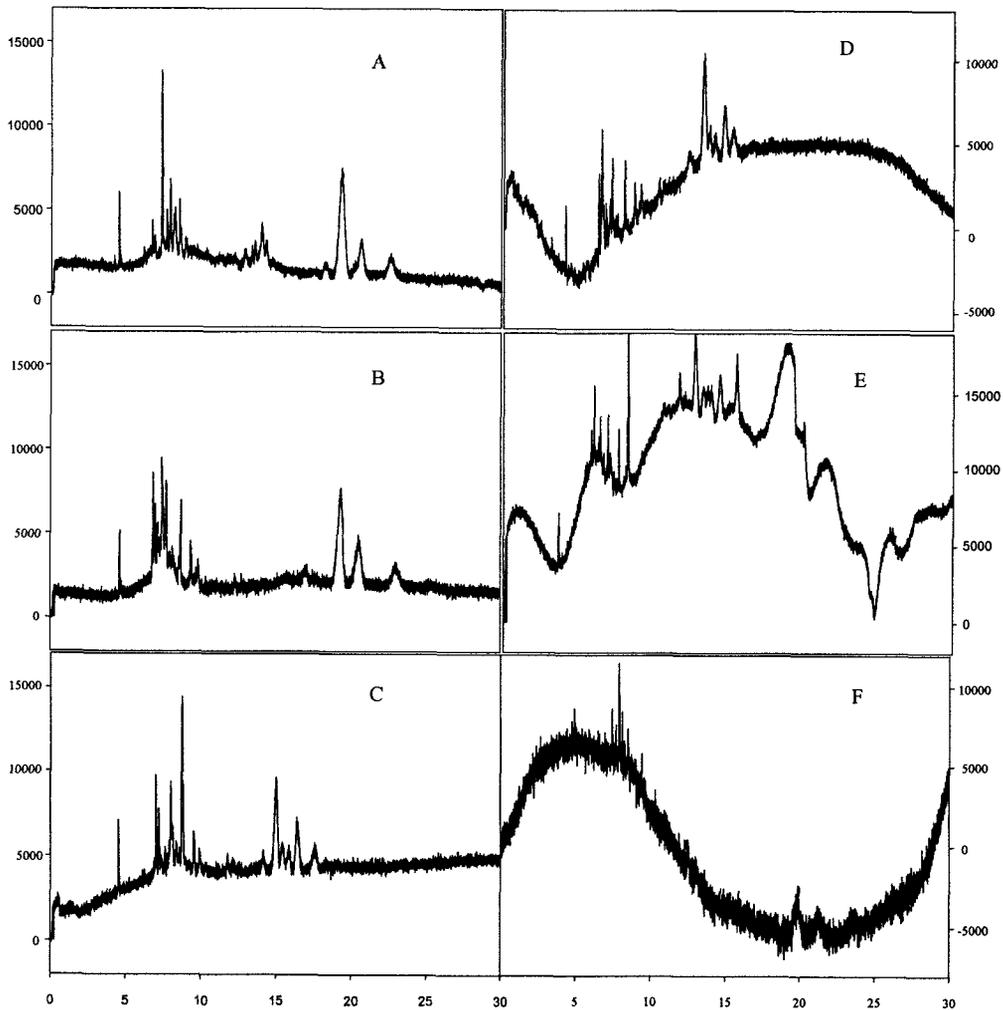


Fig. 2. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of Job's-tears using the following separation buffers: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5 plus 20% methanol + 26 mM laurylsulfobetain (A), 26 mM octyl-sulfobetain (B), 26 mM hexane sulfonic acid (C), 26 mM iminodiacetic acid (D), 26 mM Brij-35 (E) or 26 mM CHAPS (F).

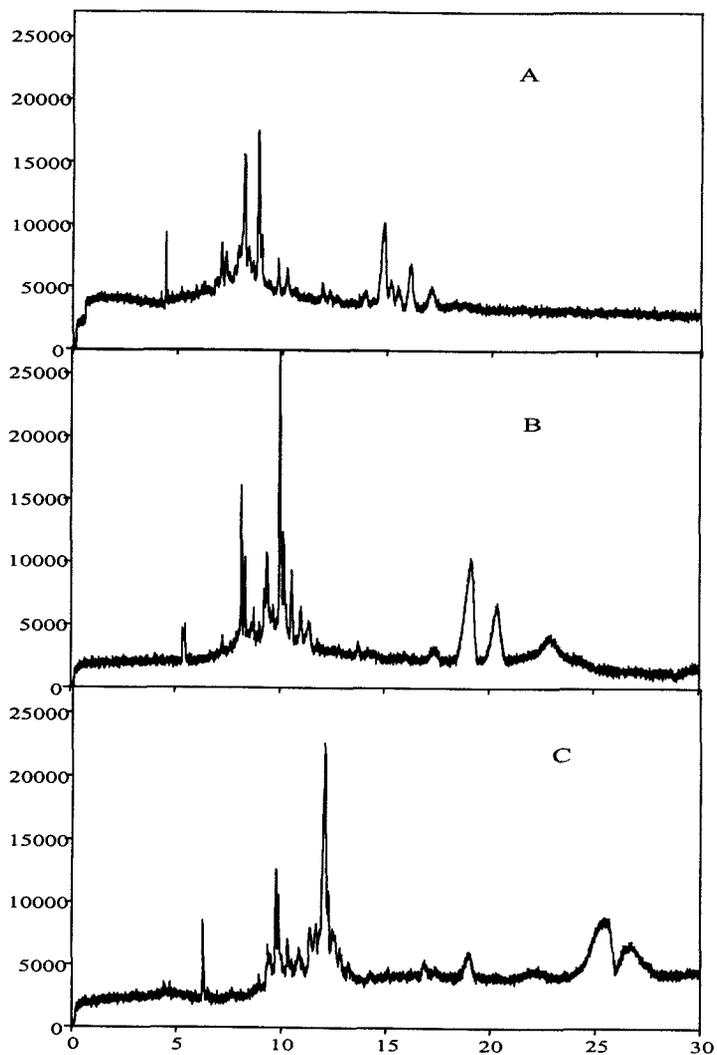


Fig. 3. Capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of Job's-tears using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5 plus 26 mM hexane sulfonic acid (P-HSA) + 20% methanol (A), P-HSA + 30 % MeOH (B) or P-HSA + 40% MeOH (C).

## (2) 기타 분석 조건 및 분석 protocol

분석 buffer외에 기타 분석조건에 따른 울무의 CE 분석 pattern의 변화를 관찰하기 위하여 우선적으로 injection time을 10~30초까지 변화시켜 CE pattern을 비교하였다. Injection time을 10초로 한 경우 baseline이 안정되고 분석시간은 단축되었으나 5~10분 경에 관찰되는 peak들의 크기가 너무 작아 명확히 구분이 어려운 반면 injection time을 30초까지 증가시킨 경우 peak의 확산현상이 나타나 20초를 최적조건으로 결정하였다.

CE peak pattern에서 peak의 확산현상을 일으키는 원인 중 하나는 detector와 recorder에서 data를 읽는 속도가 느린 것을 들 수 있으며 이는 기계의 detector rise time을 변화시켜줌으로써 어느 정도 해소가 가능한 것으로 알려져 있다 (Lucy 등, 1998). Detector rise time은 detector에서 그 data 최종 값이 10~90%까지 증가하는데 걸리는 시간을 의미하며 짧아질수록 peak가 sharp해 지는 경향을 나타내고 기계에 따라 다르나 0.1~1초로 변화가 가능하다. 따라서 detector rise time을 0.1~1초까지 증가시켜 비교하였으며 peak resolution이 가장 뛰어난 0.1초를 분석에 적용하였다. 또한 비교적 안정적인 current 흐름을 나타내기 위하여 온도는 40~45°C, 전압은 10~15 kV가 적절한 것으로 나타나 최종 분석조건으로 45°C, 15 kV를 선택하였다.

CE를 이용한 분석의 재현성을 검토하여 분석 protocol을 결정하였다. 즉, sample injection 전에 증류수 및 0.1 M P-buffer로 각각 5분간 rinse한 후 분석 buffer로 10분간 평형화시키고 20초간 pressure injection하여 200 nm에서 30분간 분석을 수행하였다. 또한 분석 종료 후 분석 반복에 따른 오차를 최소화하고 다음 분석시료에 영향을 미치지 않도록 1 M phosphoric acid로 14분간 rinse하여 총 분석에는 60분이 소요되었다. 또한 새로운 capillary는 1 M sodium hydroxide (NaOH)로 5분간 rinse 후 1 M phosphoric acid와 0.1 M P-buffer로 각각 60분 및 20분간 cleaning하고 분석 buffer로 60분간 평형화시킨 후 분석에 사용하였고, 기계중지 후 다시 사용 시 1 M phosphoric acid와 0.1 M P-buffer로 각각 30분과 10분 rinse 후 사용하였다.

### 2) 유통시료의 원산지 판별에 대한 적용

상기 분석조건을 2000년과 2001년 국산 및 수입산 울무에 적용한 결과, 전체적인 pattern은 유사하였으며 생산연도에 따른 차이도 없는 것으로 나타났다. 그러나 용출된 peak를 6개의 peak 또는 peak group 즉, JT1~JT6으로 분류하였을 때 retention time 약 11~12분에 나타나는 JT5의 용출 pattern이 수입산과 국산에서 뚜렷한 차이를 나타

내었다 (Fig. 4). 즉, 국산 울무에서는 용출되는 peak의 대체로 중심에 JT4가 주된 peak로 나타나고 JT5는 다른 peak group과 큰 차이를 나타내지 않지만 수입산 울무에서는 JT4를 비롯한 JT1, JT2, JT3 및 JT6은 국산울무에서와 동일하게 나타나지만 JT5가 JT4보다 더 큰 주요 peak로 나타나 뚜렷이 구분되었다. 이 peak JT5에 의하여 총 240점의 국산 및 수입산 울무에 적용한 결과, 2000년 시료에서는 국산이 총 47점 중 39점 (판별율 약 83%), 수입산은 총 48점 중 39점 (판별율 약 81%), 2001년 시료는 국산 총 74점 중 60점 (약 81%), 수입산은 총 71점 중 59점 (약 83%)이 정확히 판별되어 전체적으로 약 82%의 판별율을 나타내었다. Peak JT5에 의해 뚜렷이 구분되지 않은 시료들은 대부분 국산은 수입산 시료의 peak pattern에, 수입산은 국산 시료의 peak pattern에 가깝게 나타났다.

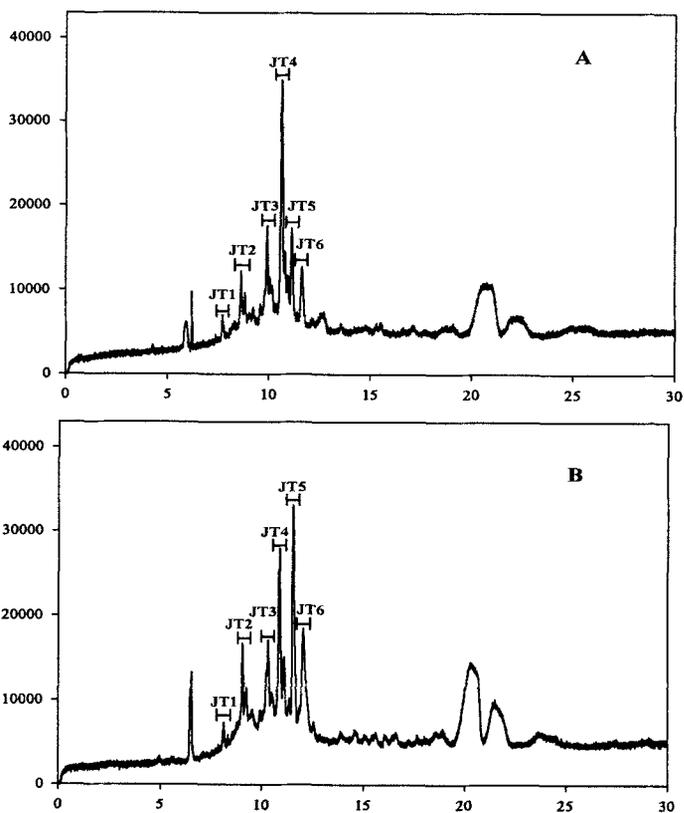


Fig. 4. Capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of Job's-tears with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffers were 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, containing 26 mM hexane sulfonic acid, plus 30% MeOH.

## 나. 당귀

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질 추출

지표물질의 추출조건을 결정하기 위하여 30% ethanol, 30% 2-propanol, 30% ethanol/ 0.1 M P-buffer (pH 2.5) 및 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5)를 사용하여 추출 후 추출물의 상태를 비교 시, ethanol과 B-buffer를 함께 사용한 경우 외에는 모두 추출물에서 침전이 생겼으며, 추출율을 최적화하기 위하여 ethanol과 B-buffer의 농도를 변화시켜 본 결과 10% ethanol/0.3 M B-buffer를 시료의 10배량 (w/v)을 가하여 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

#### 나) 분석조건 확립

##### (1) 분석 buffer의 조성

을무와 마찬가지로 0.1 M P-buffer와 0.3 M B-buffer를 사용하여 지표물질 분석을 위한 실험을 행한 결과, P-buffer가 당귀 분석에 더 적합한 것으로 나타나 P-buffer에 5 종류의 organic modifier와 6종의 detergent를 첨가하여 최적의 분석 buffer를 결정하고자 하였다. Organic modifier로는 2-methoxy ethanol이 적절한 것으로 판명되었고, detergent는 HSA나 IDA가 적합한 것으로 나타나 이들의 최적 조합을 결정하기 위하여 organic modifier와 detergent의 농도를 달리하여 분석하였다. 30% 2-methoxy ethanol에 26 mM HSA를 첨가한 것과 40% 2-methoxy ethanol에 40 mM IDA를 첨가한 것이 당귀의 원산지 판별을 위한 지표물질 분석에 비교적 적절한 것으로 생각되었으며, 특히 40% 2-methoxy ethanol에 40 mM IDA를 혼합하여 분석 시 원산지 판별을 위한 peak의 분리도가 더 높아 (Fig. 5) 이를 최종 분석 buffer로 결정하였다.

##### (2) 기타 분석조건

당귀의 CE 분석 재현성을 높이기 위하여 분석 protocol을 검토한 결과, 시료 injection 전에 증류수 및 0.1 M P-buffer로 각각 5분간 capillary를 rinse하고 최종 분석 buffer로 다시 10분간 평형화시킨 후 5초간 pressure injection하여 30분간 분석, 200 nm에서 detection 하였다. 분석 완료 후 다시 capillary를 1 M phosphoric acid로 14분간 rinse하여 총 분석에 60분이 소요되었다. 분석 동안 capillary의 온도는 45℃로 하였고 current 저하 및 peak 용출시간의 지연을 막기 위해 전압은 15 kV로 하였다.

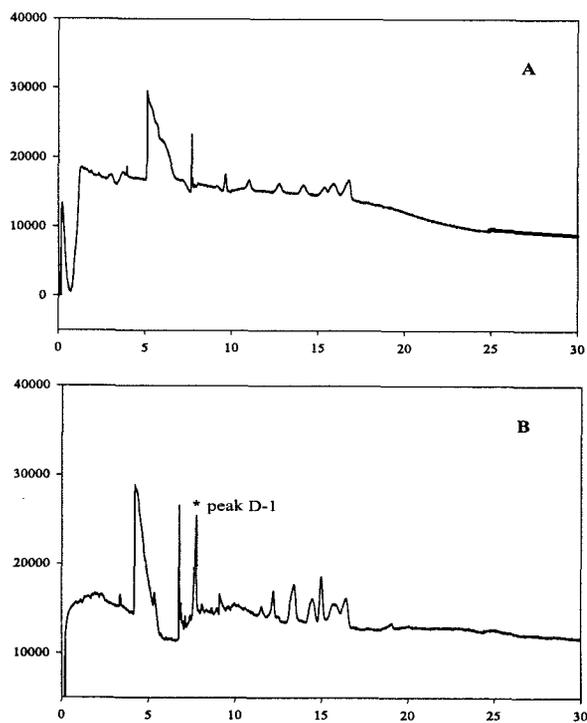


Fig. 5. Capillary electrophoresis pattern of 10% ethanol in 0.3 M borate buffer (pH 8.5) extract of *Angelica gigantis radix* with domestic (A) or foreign (B) origin. Separation buffer was 1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 26 mM HSA with 30% 2-methoxy ethanol (A) or 40 mM IDA with 40% 2-methoxy ethanol (B).

## 2) 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산 및 수입산 당귀에 적용하여 서로를 신속, 명확히 구분할 수 있는 peak D-1 (retention time 약 7~8 min)을 분리하였다 (Fig. 6). 즉, 국산 시료는 peak D-1이 거의 검출되지 않으나, 수입산 시료에서는 peak D-1이 주요 구성 peak로 나타났다. 이를 유통되는 92점의 국산 및 수입산 당귀에 적용한 결과, 국산은 49점 중 41점 (약 84%)이, 수입산은 43점 중 38점 (약 88%)이 정확하게 판별되어 전체적으로 약 86%의 판별율을 나타내었다.

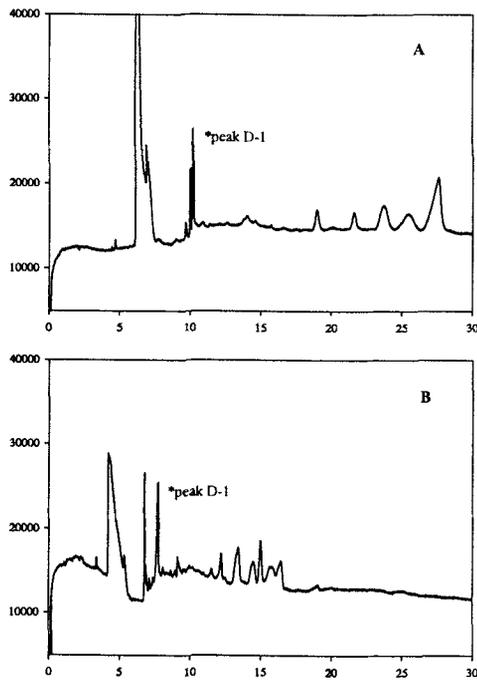


Fig. 6. Capillary electrophoresis pattern of 10% ethanol in 0.3 M borate buffer (pH 8.5) extracts of *Angelica gigantis radix* with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffers were 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 40 mM IDA with 40% 2-methoxy ethanol.

## 다. 홍화씨

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질 추출

홍화씨의 원산지 판별을 위한 지표물질의 추출조건 확립 시 다른 시료들에 비하여 추출용매 (2-propanol : 0.1 M P-buffer = 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5)에 따른 resolution의 차이가 큰 것으로 나타났다 (Fig. 7). 이중 50% 2-propanol/0.1 M P-buffer가 resolution이 가장 좋았으며 propanol의 농도를 더 증가 시 추출율이 떨어지는 것으로 나타났다. 시료 무게의 5배량의 추출용매를 가하여 추출을 수행하였다.

#### 나) 분석조건 확립

##### (1) 분석 buffer 조성

기본 분석 buffer로는 0.1 M P-buffer를 사용하였고, organic modifier로는 2-propanol이, detergent로는 IDA가 적합한 것으로 나타나 이들의 농도를 조정된 결과, 30% 2-propanol과 20 mM IDA를 첨가한 P-buffer가 홍화씨 분석에 적합함을 알 수 있었다 (Fig. 8).

##### (2) 기타 분석 조건 및 분석 protocol

분석 protocol 결정 시 홍화씨의 경우 다른 시료와 차이가 나타나 매 분석시마다 methanol로 capillary를 clean-up하는 과정이 필수적임을 알 수 있었다. 따라서 시료 injection 전에 증류수 및 0.1 M P-buffer로 각각 2분간 capillary를 rinse하고 분석 buffer로 4분간 평형화시킨 후 5초간 pressure injection 하였다. 30분간의 분석 (200 nm detection)이 완료된 후 100% methanol로 12분간 rinse하고 다시 1 M phosphoric acid 로 14분간 rinse하여 총 52분이 소요되었다. 분석 시 capillary 온도는 45°C, 전압은 10 kV로 하여 수행하였다.

### 2) 유통시료에 대한 적용

기 결정된 분석조건으로 국산 및 수입산 홍화씨의 분석을 수행한 결과, 국산과 수입산을 신속, 명확히 구분할 수 있는 peak를 도출할 수 없어 현재까지는 CE를 이용한 홍화씨의 원산지 판별은 어려운 것으로 나타났다.

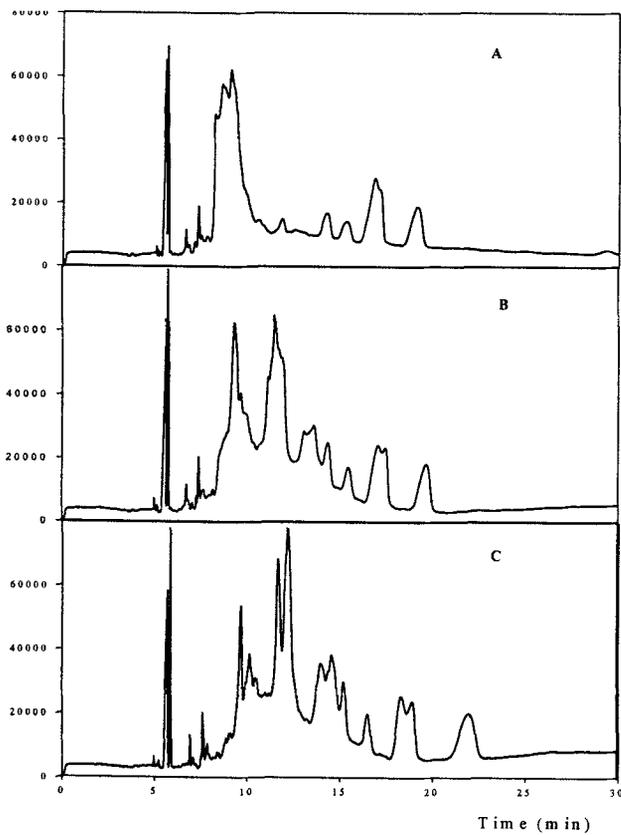


Fig. 7. Capillary electrophoresis patterns of safflower seed separated with 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 20 mM IDA with 30% 2-propanol. Extraction solvents were 0.1 M phosphate buffer plus: 30% 2-propanol (A), 40% 2-propanol (B) and 50% 2-propanol.

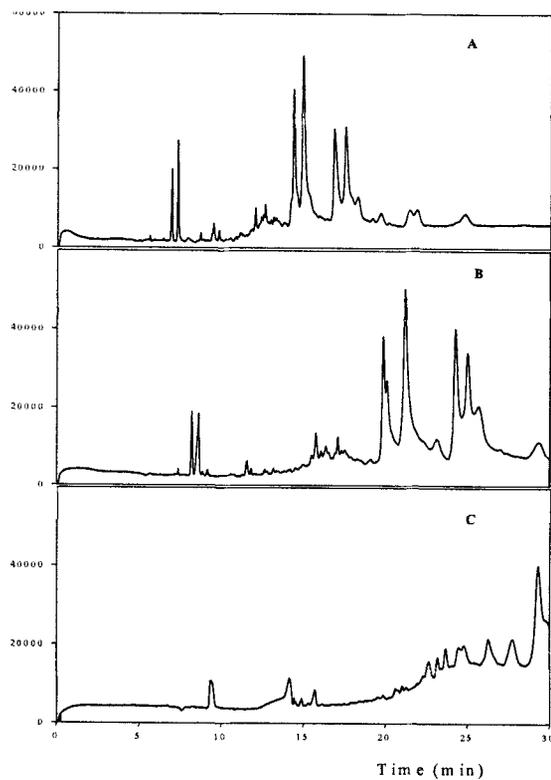


Fig. 8. Capillary electrophoresis patterns of 50% 2-propanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) extracts of safflower seed using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer (P) plus 20 mM IDA + 30% 2-propanol (A), P + 26 mM IDA + 40% 2-propanol (B) and P + 30 mM IDA + 60% 2-propanol.

라. 백삼(가루)

1) 분석조건 확립

가) 지표물질 추출조건 확립

백삼 분석을 위한 지표물질의 추출을 위해 30% ethanol, 30% 2-propanol, 30% ethanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5), 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5) 및 10% ethanol/0.3 M B-buffer를 사용하여 시료의 5배량 (w/v)을 가하고 추출한 결과, 30% ethanol/0.3 M B-buffer가 가장 적합한 것으로 나타났다.

나) 분석조건 확립

(1) 분석 buffer 조성

백삼 분석의 기본 buffer 선택을 위하여 0.1 M P-buffer와 0.3 M B-buffer를 이용 시 두가지 buffer 모두 용출시간 5분경에 큰 peak가 뭉쳐서 나타나고 peak 들의 분리가 잘 되지 않았다. 이 중 0.1 M P-buffer를 이용하여 organic modifier와 detergent 첨가에 따른 분리도의 개선여부를 측정하여 본 결과, organic modifier나 detergent의 첨가여부와 관계없이 모든 경우 5분을 전후하여 큰 peak가 나타나고 그 이후의 peak 들이 뭉쳐서 나타나는 현상이 개선되지 않았다 (Fig. 9).

(2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

기타 분석조건은 당귀와 동일하게 하였고 peak의 분리도 개선 및 안정적인 current를 위하여 분석 시의 전압은 10 kV로 하였다.

2) 유통시료에 대한 적용

국산 21점 및 수입산 28점의 시료에 대하여 분석하였으나 원산지 판별에 적용할 수 있을 것으로 여겨지는 peak를 도출할 수 없었다.

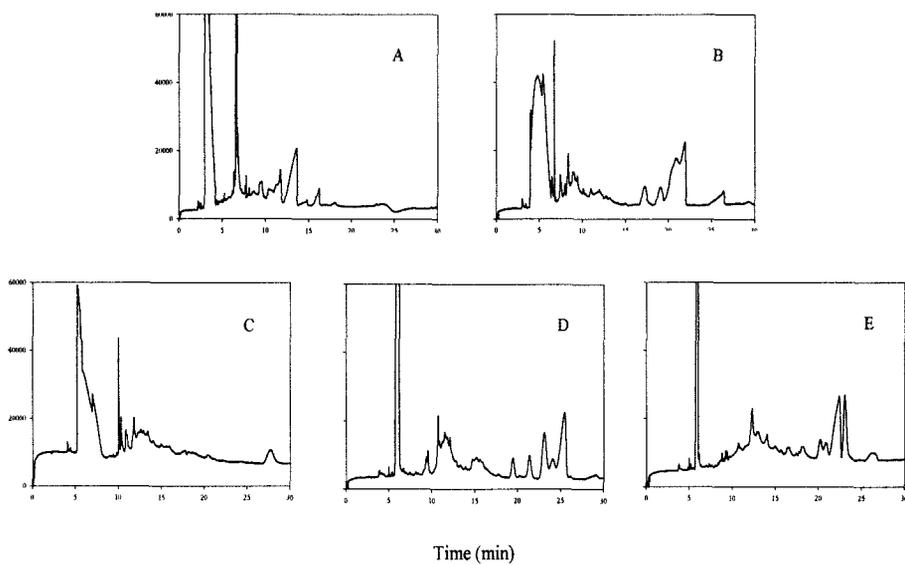


Fig. 9. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol in 0.3 M borate buffer (pH 8.5) extracts of ginseng radix powder with 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 26 mM lauryl sulfobetain plus an organic modifier: 30% acetonitrile (A), 30% methanol (B), 30% 2-methoxy ethanol (C), 30% 2-propanol (D) or 30% ethylene glycol (E).

(2차년도)

가. 황기

1) 분석조건 확립

가) 지표물질의 추출조건 확립

30% 1-propanol, 30% ethanol, 30% methanol 및 30% methanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5), 30% ethanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5)로 추출하여 지표물질 추출 및 추출물에서 침전이 나타나지 않는 조건을 검토하여 최종적으로 30% methanol/0.1 M P-buffer를 추출용매로 선정하였다. 시료에 5배량 (w/v)의 용매를 가하고 실온에서 1시간 추출, 4°C에서 10분간 원심분리 (10,000 ×g)한 후 filter하여 사용하였다.

나) 분석조건 확립

(1) 분석 buffer 조성

분석을 위한 기본 buffer로 0.1 M P-buffer (pH 2.5)와 0.3 M B-buffer (pH 8.5)를 비교한 결과, P-buffer가 peak의 분리도 및 전체적인 peak pattern이 안정적인 것으로 나타났다. 분석 buffer에 organic modifier 5종류를 첨가하여 비교 시 2-methoxy ethanol과 ethanol이 peak 분리도 및 용출시간면에서 적절한 것으로 나타났고 특히 ethanol은 용출시간 단축에서, 2-methoxy ethanol은 분리도 개선면에서 가장 적합함을 알 수 있었다 (Fig. 10). Acetonitrile은 peak의 분리도는 개선시키나 baseline이 가장 불안정하였고, ethylene glycol과 methanol은 peak 분리도가 나빠졌으며 propanol은 용출시간이 늦어지는 경향을 나타내었다. 따라서 baseline의 안정도, peak의 분리도 및 용출시간 모두를 고려하여 ethanol에 비해 용출시간은 다소 늦지만 분리도가 좋고 baseline이 안정적인 2-methoxy ethanol을 organic modifier로 선택하였고 2-methoxy ethanol의 농도를 변화시켜 분석한 결과, 농도가 높을수록 peak 용출시간이 늦어지며, 20% 첨가 시 10~15분 경 용출되는 peak의 분리도가 적합한 것으로 나타나 첨가하는 organic modifier의 농도는 20%로 결정하였다 (Fig. 11). 6종의 detergent를 20% 2-methoxy ethanol을 첨가한 P-buffer에 각각 26 mM 농도로 첨가하여 분석한 결과 HSA가 분리도와 용출시간면에서 가장 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 12). 또한 HSA의 첨가농도를 15, 26 및 40 mM로 다르게 하여 분석한 결과 용출시간은 첨가량이 많을수록 느려졌으나 (Fig. 13) 분리도 및 전체 분석시간에는 큰 영향을 미치지 않았고, detergent의 양이 적을수록 초반에

나타나는 peak의 분리도가 떨어지는 경향을 보여 40 mM 첨가가 황기의 원산지판별을 위한 CE 분석에 가장 적절한 것으로 판단되었다.

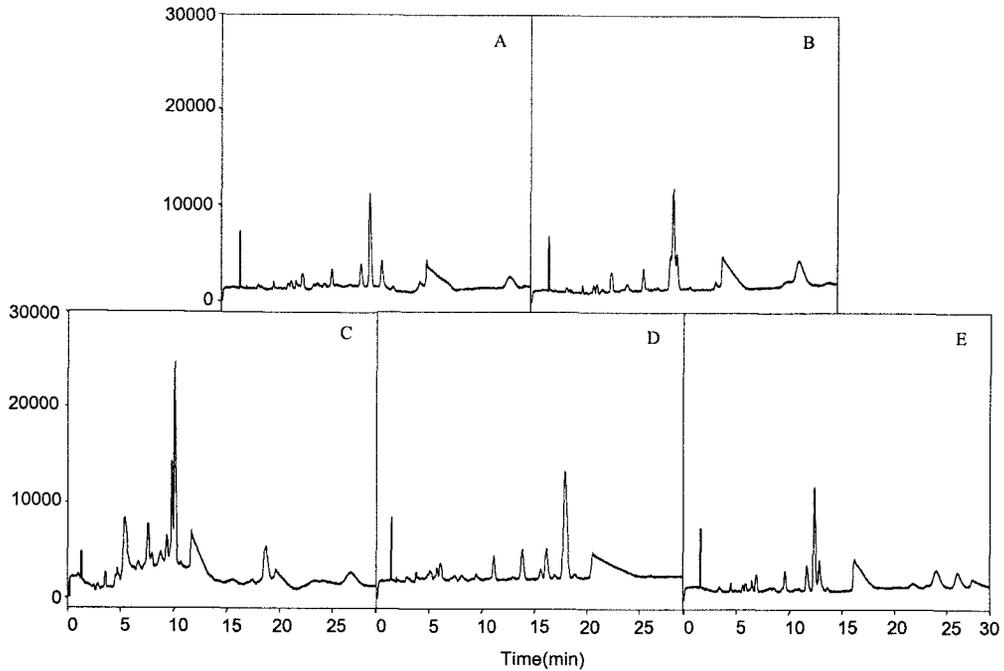


Fig. 10. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) extracts of Astragalus root with 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus an organic modifier: 20% acetonitrile (A), 20% ethanol (B), 20% ethylene glycol (C), 20% methanol (D), 20% 2-methoxy ethanol (E) and 20% 2-propanol(F).

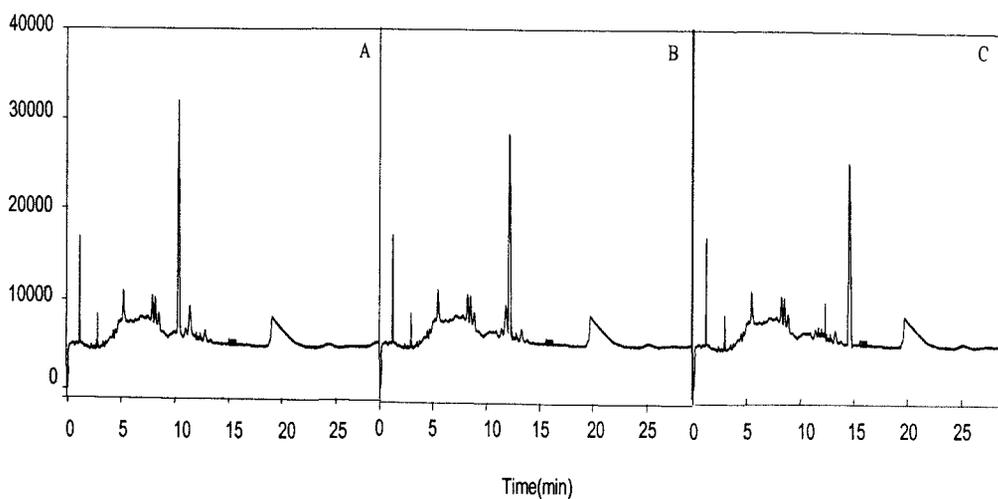


Fig. 11. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) extracts of *Astragalus* root using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer, pH 2.5, plus 26 mM hexane sulfonic acid + 20% 2-methoxy ethanol (A), + 30% 2-methoxy ethanol (B) and + 40% 2-methoxy ethanol (C).

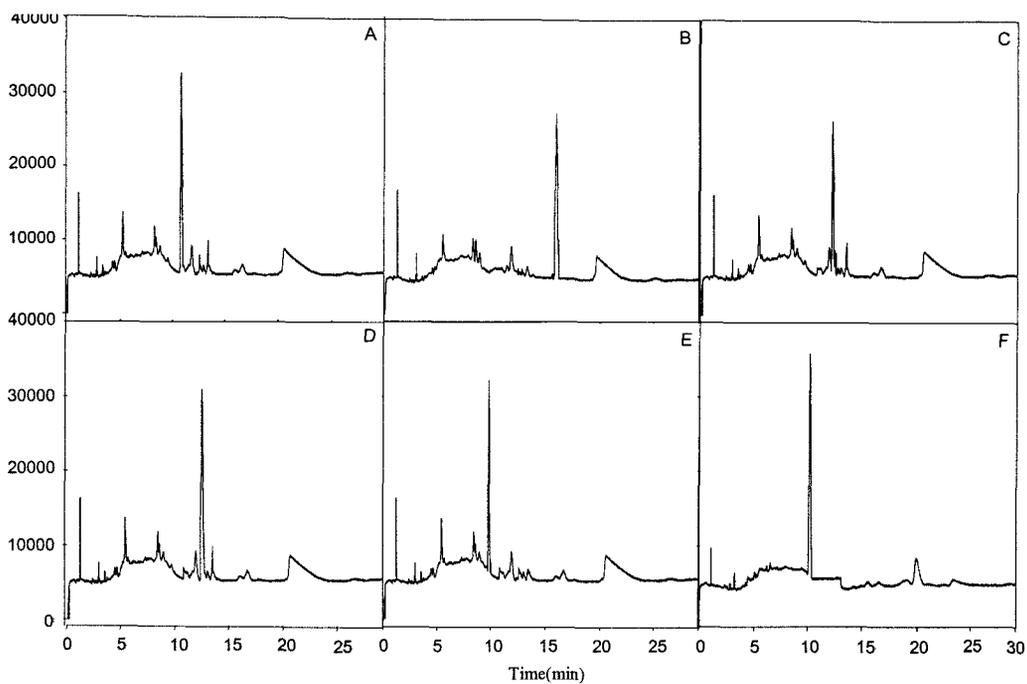


Fig. 12. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.1 M P-buffer (pH 2.5) extracts of Astragalus root using the following separation buffers: 0.1 M P-buffer, pH 2.5, plus 20% 2-methoxy ethanol plus 26 mM CHAPS (A), 26 mM lauryl sulfobetain (B), 26 mM octyl sulfobetain (C), 26 mM Brij35 (D), 26 mM hexane sulfonic acid (E) and 26 mM iminodiacetic acid (F).

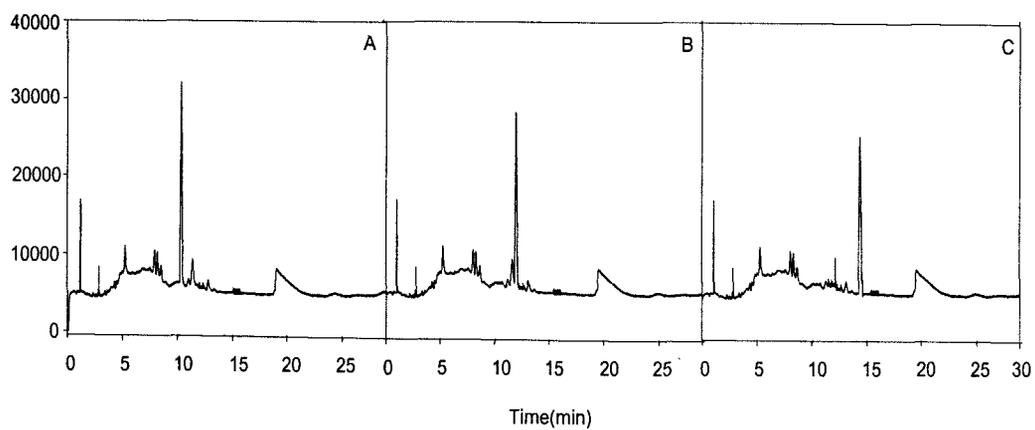


Fig. 13. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.1 M P-buffer (pH 2.5) extracts of *Astragalus* root using the following three buffer systems: 0.1 M P-buffer, pH 2.5, plus 20% 2-methoxy ethanol + 15 mM hexane sulfonic acid (A), + 26 mM hexane sulfonic acid (B) and + 40 mM hexane sulfonic acid (C).

## (2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

황기의 CE 분석 시 재현성 및 resolution의 증대를 위하여 다른 시료와 달리 분석 전 rinse 방향을 조절하여 이를 개선할 수 있었다. 즉, 시료 injection 전 분석 buffer로 1분간 분석 시와 같은 방향 (forward mode, F)으로 rinse하고 0.1 M phosphoric acid와 1 M NaOH는 반대방향 (reverse mode, R)으로 각각 4분, 5분간 rinse하였다. 증류수로 다시 1분간 rinse (R)하고 분석 buffer로 2분간 평형화 (F) 시킨 후 시료를 8초간 pressure injection하여 30분간 분석, 200 nm로 detection하여 1시료당 분석에 총 43분이 소요되었다. 또한 안정적인 current를 유지하기 위하여 분석 시 전압은 14 kV, 온도는 45°C로 하였다.

### 2) 유통시료에 대한 적용

결정된 CE 분석조건을 황기 분석에 적용시킨 결과, 국산 및 수입산의 전체적인 peak pattern은 유사하였으나 용출시간 약 11~13분에 나타나는 peak am-1과 am-2 면적의 비율로 원산지 판별이 가능한 것으로 나타났다. 즉, 국산시료는 이 두 peak의 면적비율이 약 1 : 4로 peak am-2가 peak am-1의 약 4배 정도인 반면, 수입산은 peak am-1과 am-2의 면적 비율이 1 : 10으로 peak am-2와 peak am-1의 크기가 약 10배 차이가 나는 것으로 관찰되어 국산과 수입산의 원산지 구분이 가능하였다 (Fig. 14). 두 peak간 면적 비의 차이를 황기 유통시료의 원산지 판별에 적용한 결과, 국산 93점 중 17점 (2000년 35점 중 4점과 2001년 58점 중 13점, 판별율 약 82%)이 수입산으로 판별되는 오류를 보였고, 수입산은 111점 중 23점 (2000년 59점 중 12점과 2001년 52점 중 11점, 판별율 약 79%)이 국산으로 오판되어 약 80%의 판별율을 나타내었다.

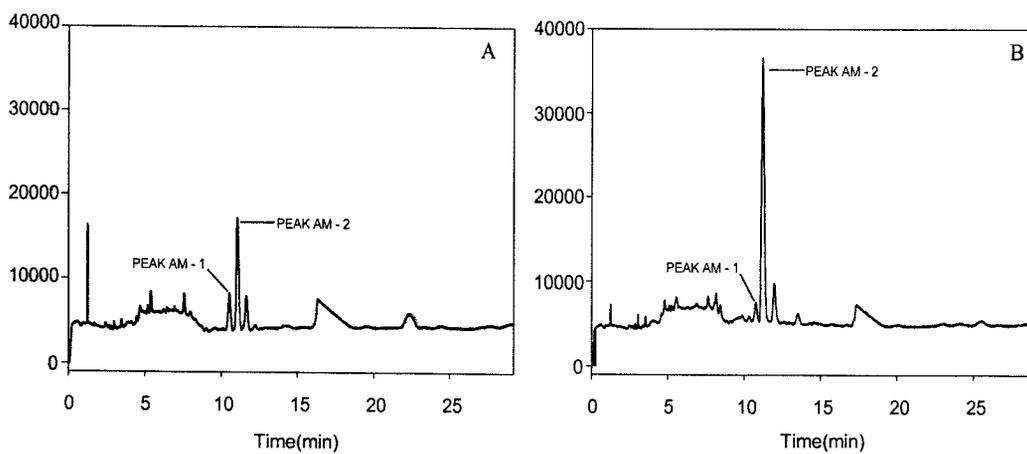


Fig. 14. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.1 M P-buffer (pH 2.5) extracts of Astragalus root with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffer was 0.1 M P-buffer, pH 2.5, containing 40 mM hexane sulfonic acid plus 20% 2-methoxy ethanol.

## 나. 고춧가루

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질의 추출조건 확립

고춧가루의 추출적정성 검토를 위하여 30% ethanol, 30% methanol, acetonitrile, 증류수 및 0.1 M P-buffer를 이용, 추출하여 각각의 성상을 비교한 결과, acetonitrile를 제외한 나머지 용매에서는 추출물의 현탁이 일어나 filtration 등의 전처리가 어려웠다. 따라서 시료에 5배량 (w/v)의 acetonitrile을 가하여 추출하였다. 또한 고추에 존재하는 capsaicin을 지표물질로 활용하기 위하여 acetonitrile로 추출 후 Sep pak C<sub>18</sub> cartridge를 이용하여 흡착 및 비흡착 확분으로 나누었으나 CE 분석에 의해 큰 차이를 나타내지 않았다.

#### 나) 분석조건 확립

##### (1) 분석 buffer 조성

0.1 M P-buffer (pH 2.5), 0.3 M B-buffer (pH 8.5), 0.1 M IDA/4 M urea buffer (pH 2.9)를 이용하여 분석 pattern을 비교 시, P-buffer는 분석시간이 느려져 25분 이후에도 peak가 관찰되었으며 B-buffer는 분석시간은 짧아지나 더 많은 peak가 나타났다 (Fig. 15). 따라서 0.3 M B-buffer에 acetonitrile, methanol, 2-propanol, ethylene glycol 및 2-methoxy ethanol을 첨가하여 분석을 시도하였으나 재현성이 거의 나타나지 않아 이 buffer에 적합한 organic modifier를 결정할 수 없었다. 0.1 M IDA/4 M urea buffer 사용 시 peak가 200 nm가 아닌 224 nm에서 나타났고 첨가하는 organic modifier로는 2-propanol이 적절한 것으로 나타났다.

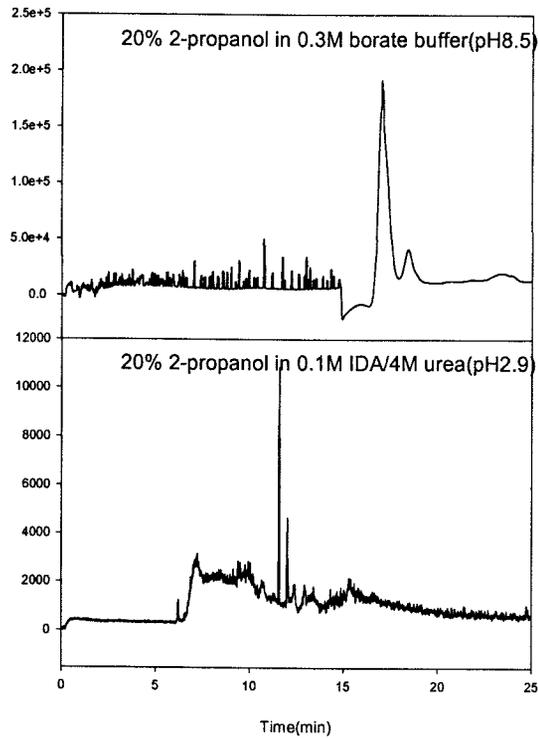


Fig 15. Capillary electrophoresis patterns of 20% 2-propanol extracts of red pepper.

(2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

I.D. 50  $\mu\text{m}$ , 27 cm 길이의 uncoated fused silica capillary를 사용하였으며, 안정적인 current를 나타내기 위하여 분석 중 capillary 온도는 40 $^{\circ}\text{C}$ , 10 kV를 사용하였다. 분석 protocol 결정 시 1 M IDA/4 M urea buffer를 사용한 경우 rinse는 분석 buffer로만 해 주는 것이 가장 좋은 것으로 나타났으며 injection time을 검토한 결과 5~10 초 injection 시는 peak가 너무 작고, 25초 injection 시는 큰 peak가 퍼져서 나타나 해석에 어려움이 있었다.

2) 유통시료에 대한 적용

이상 적용가능한 여러 추출 및 분석조건을 고춧가루 분석에 적용해 보았으나 현재로서는 고춧가루의 CE에 의한 분석은 어려운 것으로 나타났다.

다. 천궁

1) 분석조건 확립

가) 지표물질의 추출조건 확립

추출용매별 지표물질의 추출적정성 검토를 위하여 30% ethanol, 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5), 30% ethanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5) 및 30% 2-propanol을 적용한 결과, 30% ethanol과 30% ethanol/0.1 M P-buffer가 침전이 나타나지 않아 5배량 (w/v)의 30% ethanol로 추출하고 10분간 원심분리 ( $7,800 \times g$ )한 후 filtration하여 분석에 사용하였다.

나) 분석조건 확립

(1) 분석 buffer의 조성

0.1 M P-buffer (pH 2.5)를 기본 buffer로 사용하여 methanol, 2-propanol, 2-methoxy ethanol 및 ethylene glycol을 각각 30% 첨가하여 분석 시 methanol을 첨가한 경우 분리도 개선 및 분석시간에서 가장 좋은 효과를 나타내었으며 (Fig. 16), ethylene glycol과 2-propanol은 peak의 분리도도 좋지 않고 분석시간이 너무 느려졌고, 2-methoxy ethanol은 peak가 거의 나타나지 않았다. 또한 6종류의 detergent를 각각 26 mM 첨가하여 분석 시 SB-12, HSA 및 IDA가 분리도 개선과 동시에 안정적인 분리 pattern을 나타내었다 (Fig. 17). Organic modifier 농도와 detergent 종류 및 농도도 서로 연관성을 나타내었다. 즉, 30% methanol에서는 IDA 농도가 낮아질수록 peak resolution time이 늦어지는 동시에 분리도가 개선되었으며 (Fig. 18), IDA 15 mM에서는 organic modifier의 농도가 높을수록 peak resolution time이 빨라지며 분리능도 개선되는 것으로 나타났다 (Fig. 19). 결과적으로 최종 분석 buffer로는 P-buffer에 40% methanol과 15 mM IDA를 첨가하여 사용하였다.

(2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

분석 전에 증류수로 4분간 rinse하고 분석 buffer로 10분간 equilibration한 후 국산은 5초, 수입은 2초간 pressure injection 하였다. 분석동안 capillary 온도는 40°C, 전압은 10 kV로 하였고 30분간 분리하여 200 nm에서 detection 하였다. 분석이 끝난 후 1 M phosphoric acid와 1 N NaOH로 각각 4분간 rinse하여 한 개의 시료 분석 시 총 57분이 소요되었다.

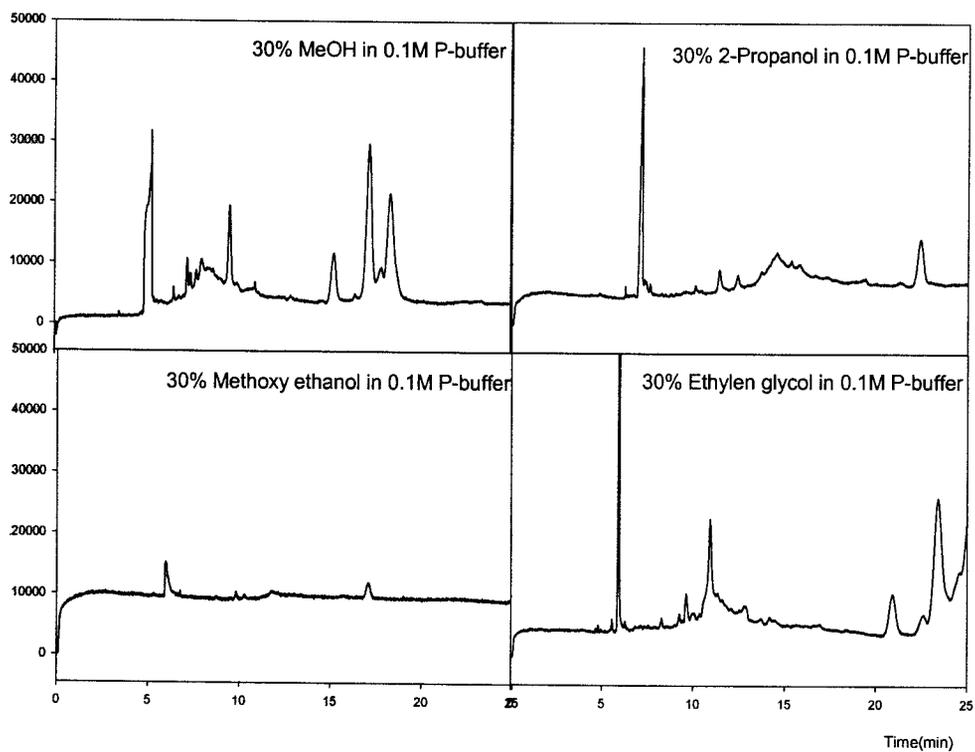


Fig. 16. Capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of Cnidii rhizoma 0.1 M P-buffer (pH 2.5) + organic modifier.

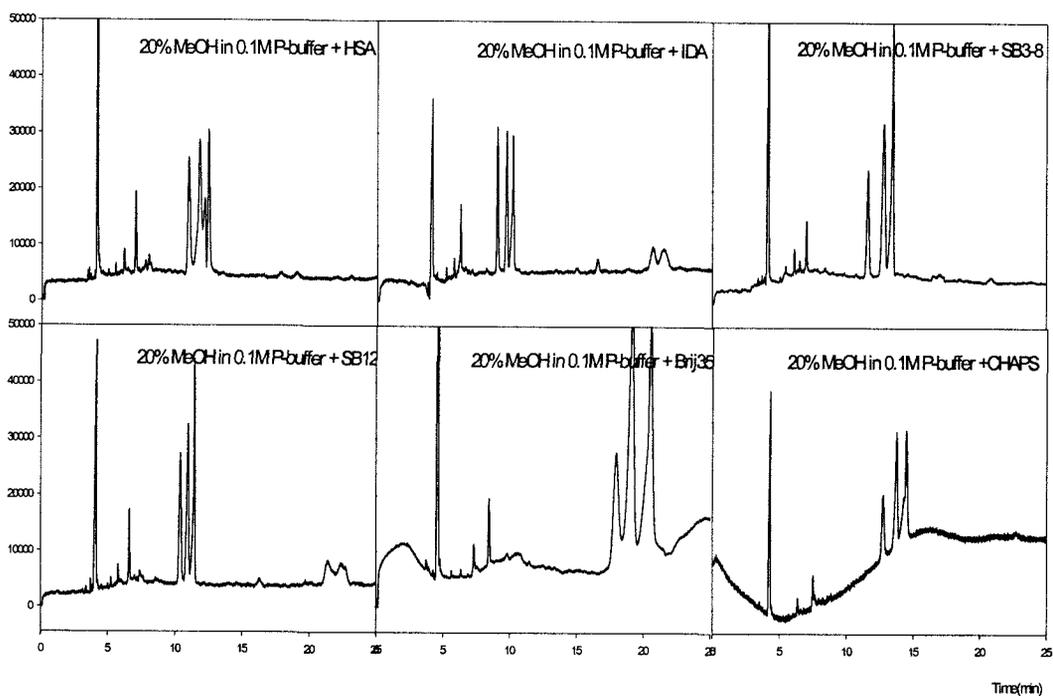


Fig. 17. Capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of Cnidii rhizoma. 0.1 M P-buffer (pH 2.5) + 20% MeOH + detergent.

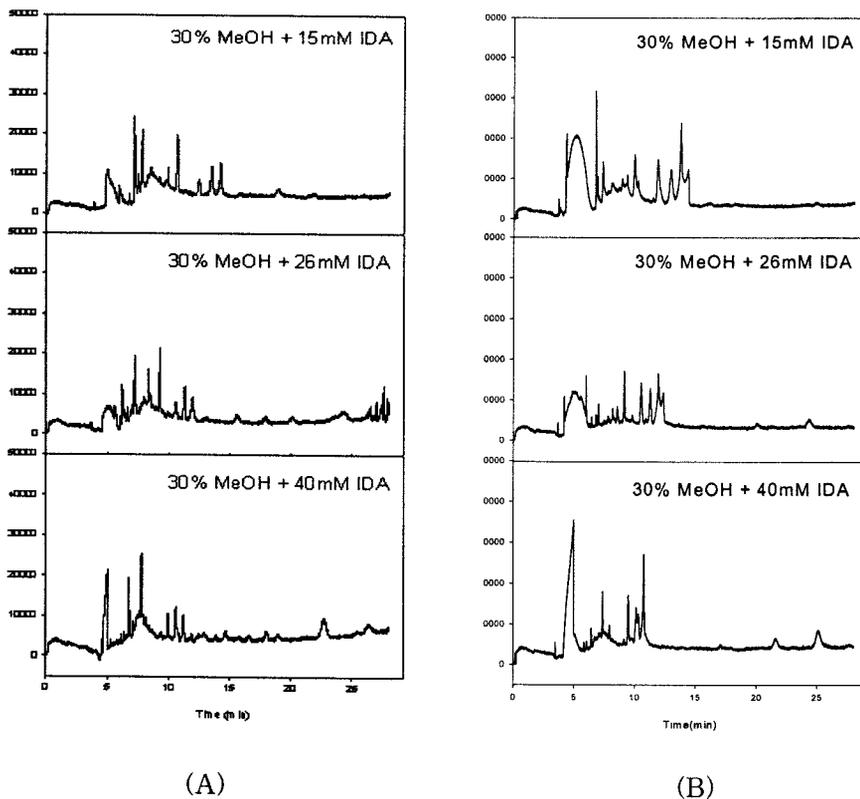


Fig. 18. Effect of IDA concentration on resolution of capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of domestic (A, injection time, 5 sec) or foreign (B, injection time, 2 sec) *Cnidii rhizoma*.

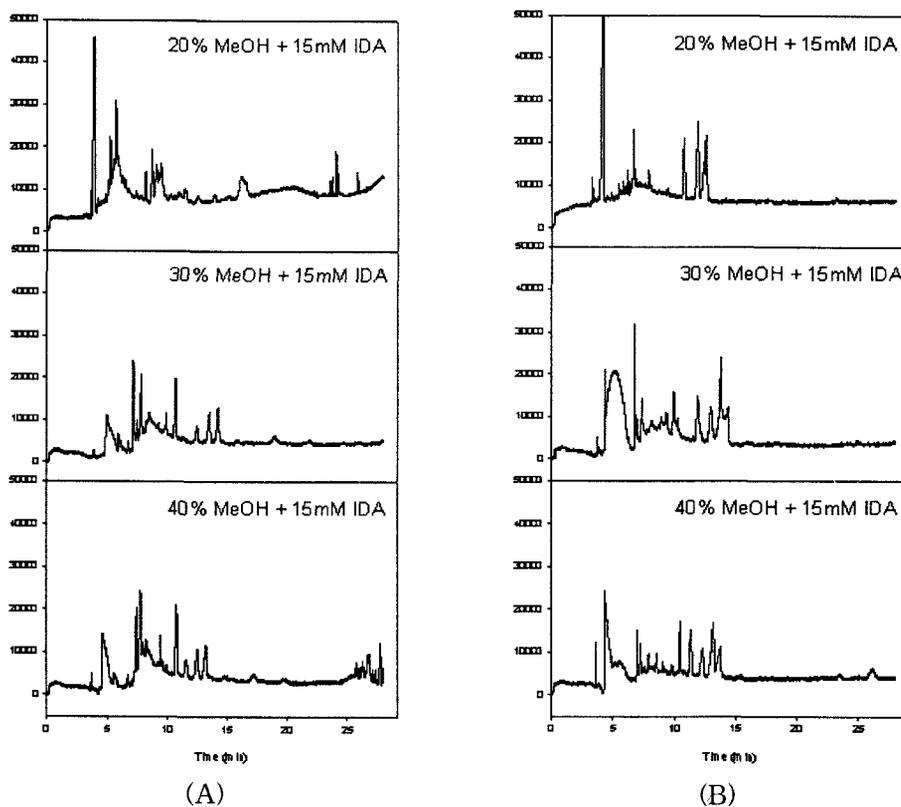


Fig. 19. Effect of organic modifier on resolution of capillary electrophoresis patterns of 30% EtOH extracts of domestic (A, injection time, 5 sec) or foreign (B, injection time, 2 sec) *Cnidii rhizoma*.

## 2) 유통시료에 대한 적용

기 결정된 분석조건을 국산 및 수입산 천궁에 적용 시 전체적인 peak pattern은 유사하였으나 전체 peak에 대한 각 peak의 구성비율이 서로 차이를 나타내어 peak LW-1과 peak LW-5 (retention time 약 10분과 13분)가 국산은 구성비율의 차이가 큰 반면, 수입산은 두 peak의 차이가 작게 나타났다 (Fig. 20). 이러한 결과를 2001년 국내산 62점 및 수입산 51점의 천궁의 원산지 판별에 적용한 결과 국산은 총 62점 중 40점이 바르게 판별되어 약 65%의 판별율을 나타내었고, 수입산은 총 51점 중 30점이 바르게 판별되어 약 59%의 판별율을 나타내었다.

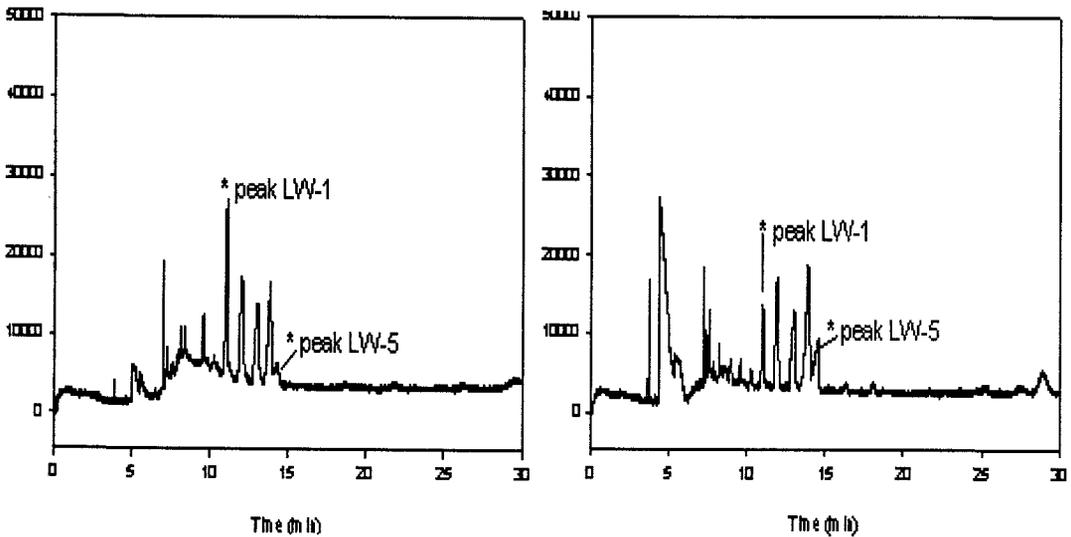


Fig. 20. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of *Cnidii rhizoma* with domestic (A, injection time, 5 sec) and foreign (B, injection time, 2 sec) origin. Separation buffer was 0.1 M P-buffer, pH 2.5, containing 15 mM IDA, plus 40% methanol.

## 라. 고사리

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질 추출조건 확립

고사리는 다른 시료에 비해 추출용매의 양에 따라 추출액의 점성이 큰 차이를 나타내었으며 시료의 10 배량 (w/v)의 30% methanol, 30% ethanol, 30% 2-propanol 및 30% methanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5)로 시료를 추출하여 정치 시 2-propanol에서 침전물이 가장 많았고 다른 용매에서도 약간의 침전물이 발생하였으나, 그중 30% methanol 추출이 가장 적합한 것으로 나타났다.

#### 나) 분석조건 확립

##### (1) 분석 buffer 조성

0.1 M P-buffer (pH 2.5)와 0.3 M B-buffer (pH 8.3) 중 0.3 M B-buffer에서 peak의 분리도가 나은 것으로 나타나 이를 기본 분석 buffer로 사용하였다. Organic modifier로 methanol, 2-propanol, 2-methoxy ethanol 및 ethylene glycol을 각각 20%씩 첨가하여 분석 시 2-propanol의 경우 peak가 거의 나타나지 않았고, methanol과 2-methoxy ethanol은 분리도가 좋지 않았으며 ethylene glycol은 비교적 분리가 가능할 것으로 추정되는 peak 들이 관찰되었으나 (Fig. 21) 전체적인 retention time이 10분 이내로 peak 들이 뭉쳐지는 경향이 있어 첨가하는 ethylene glycol의 양을 증가시켰다. 0.3 M B-buffer에 ethylene glycol을 20%에서 50%까지 증가시켜 분석한 결과, ethylene glycol의 양이 많을수록 retention time이 증가하고 더불어 peak가 퍼지는 경향을 나타내었다 (Fig. 22). 30% ethylene glycol/0.3 M B-buffer에 6종의 detergent를 26 mM 농도로 첨가하여 분석 시 CHAPS를 첨가한 경우 가장 분리도가 개선되는 것으로 나타났으며 (Fig. 23), 다시 CHAPS의 농도를 26, 40, 50 mM로 첨가하여 분석 시 농도가 높을수록 retention time이 길어지고 peak가 퍼지나 40 mM을 첨가하여 분석한 결과가 가장 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 24).

##### (2) 기타 분석 조건 및 분석 protocol

분석결과의 재현성을 높이기 위하여 시료 injection 전에 증류수와 1 N NaOH를 각각 10분과 5분씩 rinse한 후 분석 buffer로 8분간 평형화시키고, 5초간 시료를 pressure injection 하였다. 분석은 40분간 수행하였으며 분석하는 동안 capillary 온도는 40°C, 전

압은 8 kV를 유지하였고 200 nm에서 detection 하였다.

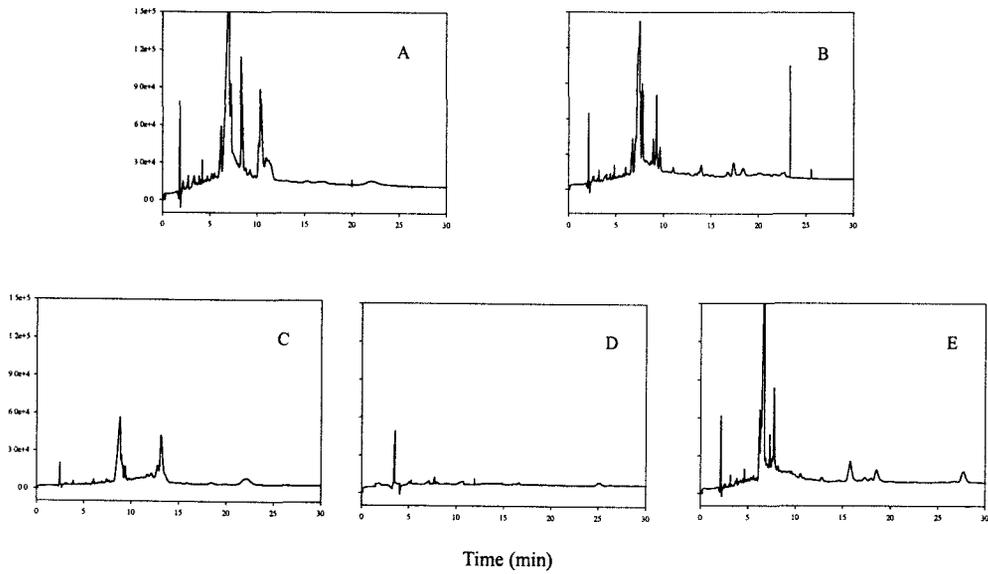


Fig. 21. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken separated with 0.3 M borate buffer (pH 8.5) plus an organic modifier: 30% acetonitrile (A), 30% methanol (B), 30% 2-methoxy ethanol (C), 30% 2-propanol (D) or 30% ethylene glycol (E).

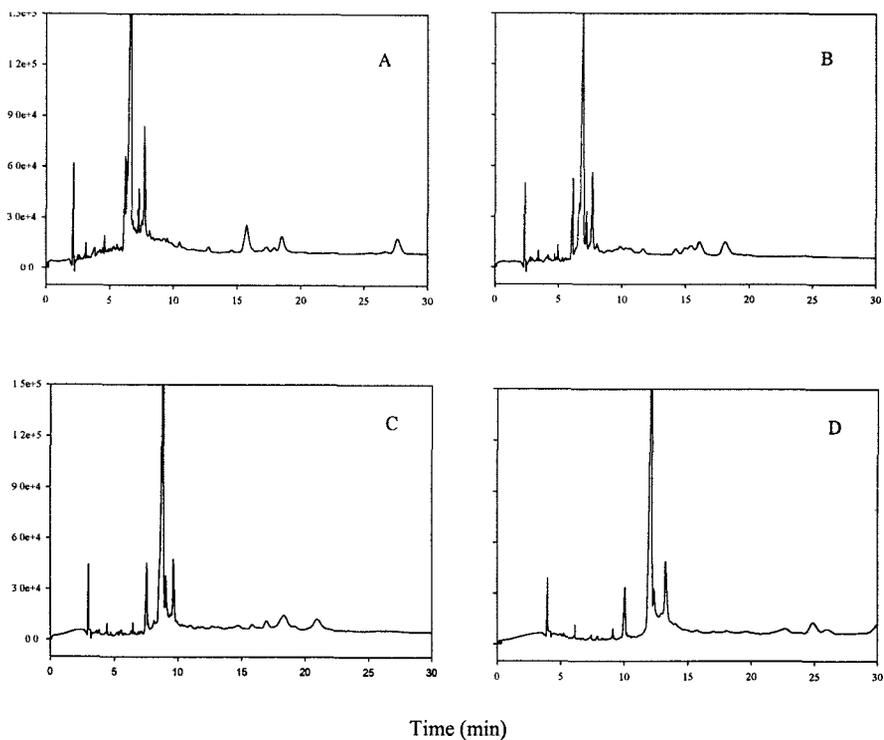


Fig. 22. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken using the following four buffer systems: 0.1 M phosphate buffer (P) + 20% ethylene glycol (A), P + 30% ethylene glycol (B), P + 40 % ethylene glycol (C) or P + 50% ethylene glycol (D).

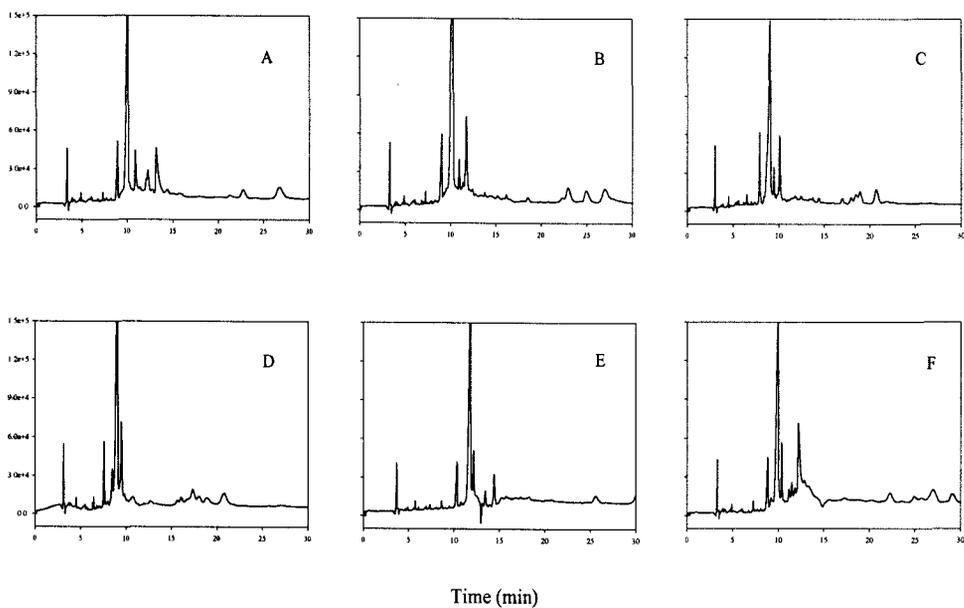


Fig. 23. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken using the following separation buffer: 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) plus 30% ethylene glycol (P-EG) + 26 mM lauryl sulfobetain (A), P-EG + 26 mM octyl-sulfobetain (B), P-EG + 26 mM hexane sulfonic acid (C), P-EG + 26 mM iminodiacetic acid (D), P-EG + 26 mM Brij35 (E) or P-EG + 26 mM CHAPS (F).

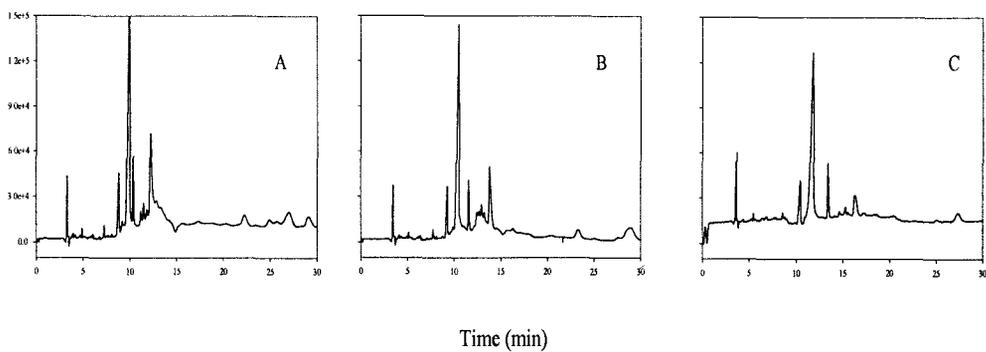


Fig. 24. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken using the following three buffer systems: 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) plus 30% ethylene glycol (P-EG) + 26 mM CHAPS (A), P-EG + 40 mM CHAPS (B) and P-EG + 50 mM CHAPS (C).

2) 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산과 수입산 고사리에 적용 시 전체적인 peak pattern은 유사하였으나 peak PA-1과 peak PA-2의 비율이 국산은 1 : 7로 peak PA-2가 큰 데 반해, 수입산은 4 : 1로 peak PA-1이 더 큰 것으로 나타났다 (Fig. 25). 이 두 peak의 비율을 이용하여 국산 60점과 수입산 80점을 분석한 결과 국산은 12점이 수입산으로 오판되어 약 80%의 판별율을 나타내었고 수입산은 11점이 국산으로 오판되어 약 86%의 판별율을 나타내었다.

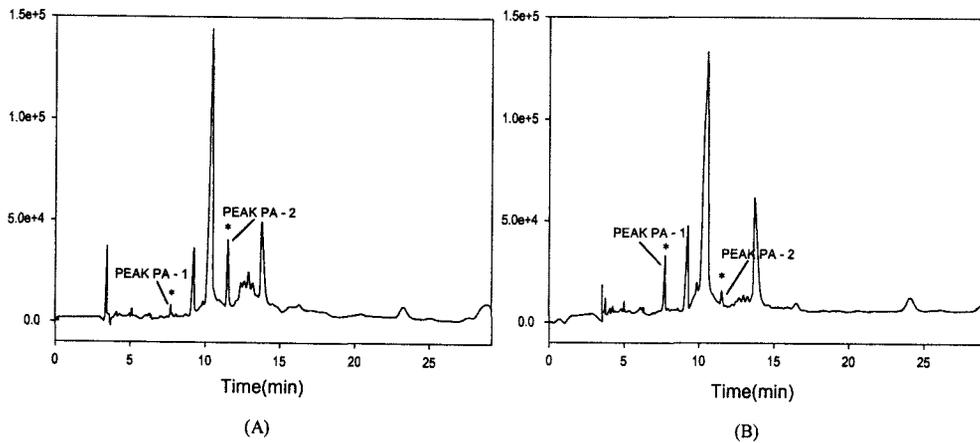


Fig. 25. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol extracts of bracken with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffer was 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 40 mM CHAPS, plus 30% ethylene glycol.

(3차년도)

가. 우영

1) 분석조건 확립

가) 지표물질의 추출조건 확립

추출용매별 지표물질의 추출적정성을 검토하기 위해 30% ethanol, 30% methanol, 30% 2-propanol, 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5), 30% methanol/0.3 M B-buffer, 30% ethanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5) 및 30% methanol/0.1 M P-buffer로 각각 추출하여 성상을 비교한 결과, 30% ethanol/0.3 M B-buffer를 제외한 나머지 용매에서는 추출물이 현탁되어 전처리 (filtration)가 어려움을 알 수 있었다. 이 추출용매에서 다시 0.3 M B-buffer의 pH를 8.5~10.0으로 변화 시 pH를 증가시킬수록 분리도가 개선되기는 하나 추출물의 현탁현상 또한 나타나 최종 추출용매로 30% ethanol/0.1 M borate buffer (pH 9.8)를 선정하였다.

나) 분석조건 확립

(1) 분석 buffer 조성

분석 buffer 결정을 위해 0.1 M P-buffer와 0.3 M B-buffer를 비교 시, 0.3 M B-buffer가 우영분석에 적합한 것으로 나타났다. Organic modifier로 ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을 적용한 결과 ethylene glycol이 분리도 개선에 가장 좋은 효과를 나타내었다. Ethylene glycol의 농도를 증가시킬수록 peak의 resolution time이 늦어지고 농도가 너무 낮으면 분리도가 저하되어 20% ethylene glycol의 첨가를 적정수준으로 하였다. 6 종류의 detergent 또한 첨가하여 분석하였으나 다른 시료들과는 달리 detergent 첨가에 따른 분리도 개선효과는 나타나지 않아 분석 buffer로는 20% ethylene glycol을 함유하는 0.3 M B-buffer로 결정하였다.

(2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

분석 및 peak의 재현성 증가를 위해 시료 injection 전에 증류수로 4분간 rinse한 후 분석 buffer로 6분간 equilibration하고 5초간 pressure injection 하였다. 분석하는 동안 capillary의 온도는 40℃, 전압은 8 kV로 하고 25분간 분리한 후 UV 214 nm에서 detection 하였다. 분석 완료 후 다시 capillary의 clean-up을 위해 0.1 N NaOH로 6분간

rinse하여 한 개의 시료 분석 시 총 분석 소요시간 41분이었다.

## 2) 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산 및 수입산 우영에 적용한 결과, 서로를 특징적으로 구분할 수 있는 peak pattern 즉, 전체 peak에 대한 구성비율이 서로 차이를 나타내는 peak PA-3, PA-4와 peak PA-5를 도출하였다 (Fig. 26). 즉, 국산시료는 peak 1 : peak 4 : peak 5의 비율이 1 : 0.5~2.0 : 0.5~2.5로 수입산 (1 : 1~4 : 1~4)에 비해 peak 4와 peak 5가 상대적으로 작은 것으로 나타났다. 이러한 peak 비율의 차이를 국산 (100점)과 수입산 (55점)에 적용한 결과, 국산의 경우 100점 중 56점을 바르게 판별하여 약 56%의 판별율을 나타내었고 수입산은 55점 중 30점을 제대로 판별하여 약 54%의 판별율을 나타내었다.

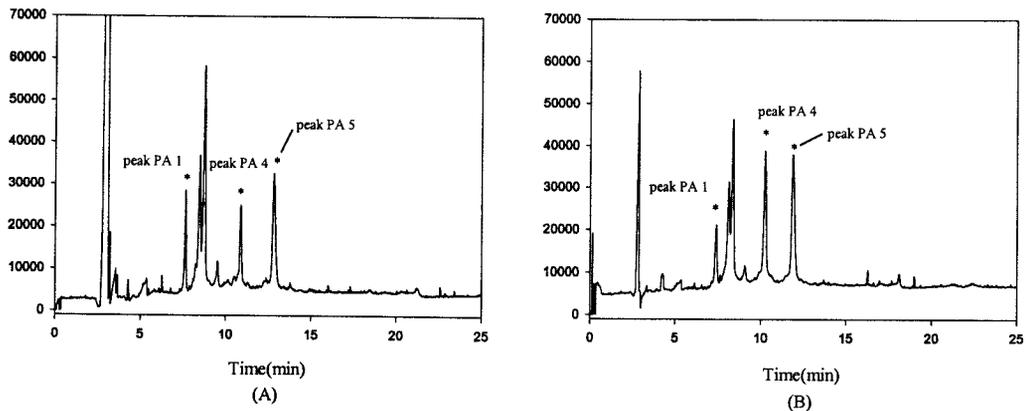


Fig. 26. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol in 0.3 M borate buffer (pH 9.8) extracts of burdock with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffer was 0.3 M borate buffer (pH 8.5) plus 20% ethylene glycol.

## 나. 당근

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질 추출조건

지표물질의 추출 적정성을 검토하기 위하여 30% ethanol, 30% methanol, 30% 2-propanol, 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5), 30% methanol/0.3 M B-buffer, 30% ethanol/0.1 M P-buffer (pH 2.5) 및 30% methanol/0.1 M P-buffer로 각각 추출하여 성상을 비교한 결과, 30% ethanol/0.3 M B-buffer를 제외한 나머지 용매에서는 추출물이 현탁되어 진처리 (filtration)가 어려워 추출용매로 30% ethanol/0.3 M B-buffer (pH 8.5)를 선택하였다.

#### 나) 분석조건확립

##### (1) 분석 buffer 조성

Organic modifier의 영향을 알아보기 위하여 0.3 M B-buffer에 ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을 첨가하여 분석한 결과, ethylene glycol이 분리도 개선에 가장 좋은 효과를 나타내었고, 우엉 분석 시와 마찬가지로 ethylene glycol의 농도가 높아질수록 retention time이 늦어지고 농도가 낮아질수록 분리도가 떨어지는 현상을 나타내었다. 6종의 detergent를 첨가하여 분석 시 SB3-8을 첨가한 경우 분리도 개선 및 안정적인 peak pattern을 나타내어 당근 분석을 위한 최종 분석 buffer로 20% ethylene glycol/0.3 M B-buffer (pH 8.5)에 26 mM SB3-8을 첨가한 것을 선정하였다.

##### (2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

분석 및 peak의 재현성 증가를 위해 시료 injection 전에 증류수 및 1 N NaOH로 각각 5분 및 7분간 rinse한 후 분석 buffer로 7분간 평형화시키고 5초간 pressure injection 하였다. 분석하는 동안 capillary의 온도는 40°C, 전압은 10 kV로 25분간 분리, UV 214 nm에서 detection하여 한 개의 시료 분석 시 총 44분이 소요되었다.

### 2) 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산 및 수입산 당근에 적용한 결과 서로를 특징적으로 구분할 수 있는 peak pattern 즉, 전체 peak에 대한 구성비율이 서로 차이를 나타내는 peak

CA-1과 peak CA-2를 도출하였다 (Fig. 27). 즉, 국산시료는 peak CA-1 : peak CA-2의 비율이 1 : 1.5로 수입산 (1 : 4)에 비해 낮아 상대적으로 peak CA-2의 비율이 낮음을 알 수 있었다.

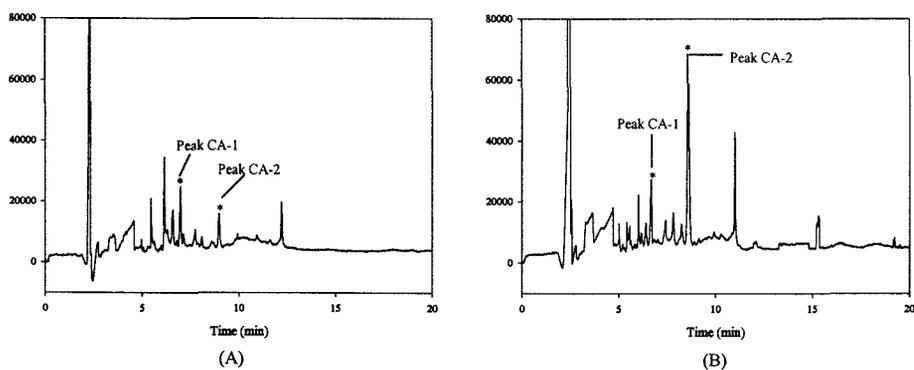


Fig. 27. Capillary electrophoresis patterns of 30% methanol in 0.3 M borate buffer (pH 8.5) extracts of carrot with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffer was 0.3 M borate buffer (pH 8.5) containing 25 mM octylsulfobetain, plus 20% ethylene glycol.

## 다. 연근

### 1) 분석조건 확립

#### 가) 지표물질 추출조건 확립

추출용매별 지표물질의 추출적정성을 검토하기 위하여 10배량의 30% methanol, 30% ethanol, 30% 2-propanol로 시료를 추출하였으며, 정치 시 30% methanol 및 30% 2-propanol을 사용한 경우는 약간의 혼탁성을 띄었다. 반면에 30% ethanol의 경우는 침전물이 생기지 않고 맑은 상태를 유지하여 이를 연근 추출용매로 결정하였다.

#### 나) 분석조건 확립

##### (1) 분석 buffer 조성

기본 분석 buffer 결정을 위하여 0.1 M P-buffer와 0.3 M B-buffer를 이용하여 분석을 수행한 결과, 두 가지 buffer 모두 수입산은 peak가 나타나지 않았으나 국산 시료의 경우 P-buffer 사용 시 분리도가 좋아 이를 기본 분석 buffer로 결정하였다. Organic modifier의 영향을 알아보기 위하여 0.1 M P-buffer에 ethylene glycol, methanol, 2-methoxy ethanol 및 2-propanol을 첨가하여 분석한 결과 ethylene glycol 첨가 시 P-buffer만 사용한 경우에 비해 분석시간 10분 이전에 나타나는 peak 들의 분리도가 개선되어 organic modifier로 ethylene glycol을 선택하였으며, detergent 첨가에 따른 분리도의 개선효과는 나타나지 않아 최종적으로 20% ethylene glycol in 0.1 M P-buffer를 분석 buffer로 결정하였다.

##### (2) 기타 분석조건 및 분석 protocol

분석 및 peak의 재현성 증가를 위해 시료 injection 전에 증류수 및 1 N NaOH로 각각 5분 및 7분간 rinse한 후 분석 buffer로 7분간 평형화시키고 10초간 pressure injection 하였다. 분석하는 동안 capillary의 온도는 40℃, 전압은 10 kV로 20분간 분리, UV 214 nm에서 detection하여 한 개의 시료 분석 시 총 39분이 소요되었다.

## 2) 유통시료에 대한 적용

결정된 분석조건을 국산 및 수입산 연근에 적용한 결과, 서로를 구분할 수 있는 특징적 peak pattern이 나타났다. 즉, 국산 연근은 분석시간 약 3~13분 사이에 특징적인 5개의 peak (peak LR1~LR5)가 관찰된 반면 수입산은 peak가 전혀 나타나지 않았다 (Fig. 28). 이를 시중 유통되는 국산 100점 및 수입산 연근 82점에 대하여 적용 시 국산은 100점 중 94점을 국산으로 판별하여 96%의 판별율을 나타내었고, 수입산 또한 82점 중 79점을 수입산으로 판별하여 96%의 판별율을 나타내었다.

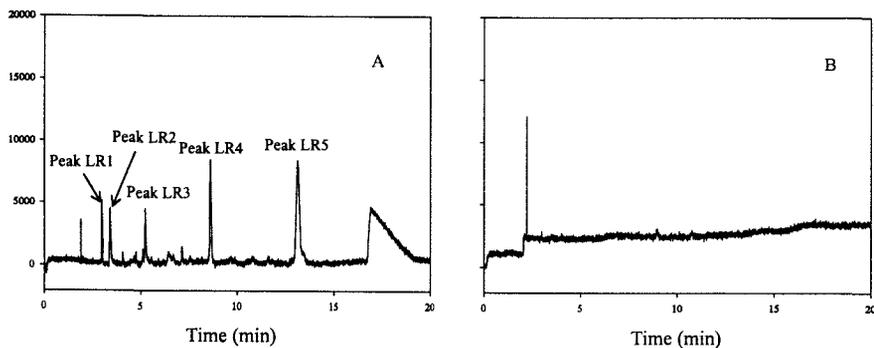


Fig. 28. Capillary electrophoresis patterns of 30% ethanol extracts of lotus root with domestic (A) and foreign (B) origin. Separation buffer was 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) plus 20% ethylene glycol.

## II. NIR을 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발 (위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 국립농산물품질관리원 시험연구소 정 태 균

### 1. 서 설

WHO 협정 체결이후 농산물 유통의 국제화 시대를 맞아 수입농산물의 무차별적인 반입으로 인해 국내 농업이 크게 타격을 받아 그 존립기반이 매우 위태로워지고 있다. 이에 따라 국내 농업보호를 위해 수입농산물의 관세나 수입쿼터 등으로 제한하던 규제도 이젠 한계에 부딪혀 농산물 시장의 완전 개방은 이젠 시대의 조류가 되어가고 있다. 이미 값싼 중국산 마늘, 고추나 수단산 참깨 등으로 인해 그동안 우리 농가의 주 소득작목이 이미 그 생산기반을 상실해 가고 있으며, 또한 값싼 수입농산물이 국산농산물로 위장판매 되는 등 유통질서가 크게 문란해지고 있어 이에 대한 생산자와 소비자의 많은 피해가 예상된다. 이에 따라 생산 유통되는 농산물에 대한 정확한 정보제공으로 농산물의 건전한 유통질서확립을 도모하고 생산자와 소비자에게 신뢰성 있는 정보를 제공코자 농산물의 원산지에 대한 과학적인 식별방법 설정의 필요성이 대두되었다.

현재 농산물의 원산지 식별방법에 관한 연구는 세계적으로도 그 예가 그리 많지는 않다. 일부 선진국에서도 수입농산물의 관세문제 등에 따른 지엽적인 문제로 부분적으로 연구한 결과가 있지만 해당 농산물의 원산지를 추적하는 연구는 우리나라처럼 이해관계가 크지 않아 관련 연구실적이 드문 것 같다. 먼저 국외의 농산물에 대한 원산지 식별방법에 관한 연구자료를 보면, 일본 총합연구소에서 쌀의 지역별 원산지특성에 관한 연구를 ICP/MS를 이용한 극미량 원소분석에 의하여 실시하고 있다는 자료가 있으며, 미국에서는 수입관세 문제로 땅콩과 마늘에 대한 원산지 연구를 실시하고 있으며 프랑스 등 일부국가에서 포도주에 대한 원산지를 연구한다는 자료가 있다. 국내에서는 경북대 조래광 교수가 1998년도 근적외선분광분석법에 의한 참깨의 원산지 판별관련 논문을 발표한 바 있으며 또한 동 방법에 의해 동덕여대 김효진교수의 한약재에 대한 원산지 식별방법 연구가 있었으며 다른 분석법으로 서울여대 노봉수교수 (1997b)가 인삼의 산지판별을 위한 전자코의 conducting polymer 센서와 metal oxide 센서의 이용에 관해 연구결과를 발표한 바 있고 2003년도에는 KT&G에서 손현주박사가 인삼류의 원산지 식별연구에 대하여 발표한 바 있다.

최근 들어 수입농산물에 대한 우리 농산물의 피해가 확대됨에 따라 농산물에 대한

원산지 식별방법 연구에 많은 관심을 보이고 있으며 이에 대한 연구도 활발하게 전개되고 있어 앞으로 많은 연구결과가 도출될 수 있으리라 판단된다.

## 2. 실험방법 및 결과

### 가. 원산지식별 연구용 표준시료 작성

#### 1) 시료수집

##### 가) 시료수집 방법

- 국산시료는 관할 출장소의 협조를 얻어 생산농가를 직접 방문 수집
- 수입산시료는 유통공사, 식물검역소의 수입 및 검역건본과 전국 주요도시의 유통품을 대상으로 수집하였음

##### 나) 시료수집 점당 수량

- 울무, 당귀, 홍화씨, 황기, 천궁, 고사리, 당근, 우엉, 연근: 점당 200g 이상

##### 다) 품목별 시료수집 계획 및 수집실적

품목별	시료수집 점수			비고
	국산	수입산	계	
울 무	100	100	200	
당 귀	100	100	200	
홍 화 씨	100	100	200	
황 기	100	100	200	
천 궁	100	100	200	
고 사 리	100	100	200	
당 근	100	100	200	
우 엉	100	100	200	
연 근	100	100	200	
계	900	900	1,800	

#### 2) 시료관리

수집된 시료는 저온 저장실에 18℃에 보관

### 3) 시료 전처리

#### 가) 전처리 장비

- 보너균분기 (Korea)
- 사각 그물망 체 (10 mesh)
- 조명확대경 (Korea)
- 초저온냉동고 (Ilsin, Korea)
- 동결건조기 (Ilsin, Korea)
- Cyclone sample mill (UDY Co. USA)
- Food mixer (Hanil, Korea)

#### 나) 시료별 전처리방법

##### ○ 울무, 홍화씨

- 사각그물망체를 이용하여 사분을 제거한 후 조명확대경을 통해 이물질, 피해립 이종립, 이종피색립 등을 제거
- 보너균분기를 이용 시료를 축분하여 50g을 채취

##### ○ 당귀, 황기, 천궁, 고사리

- 이물질, 피해립 등을 제거
- Food mixer를 이용하여 1분간 조분쇄
- Cyclone mill (UDY Co. USA)을 이용하여 20 mesh 이하로 2차 미분쇄
- 분쇄된 시료는 흡습방지를 위해 흡습방지용 sample 병에 밀봉하여 분석기기과 같은 조건인  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에 보관

##### ○ 당근, 우엉, 연근

- 시료를 세척
- 세척한 시료를 3~4 mm 두께로 절단
- 절단된 시료를 초저온 냉동고 ( $-50^{\circ}\text{C}$ )에 24시간 동결
- 동결된 시료를 동결건조기에 넣고 48시간 동안 건조
- 건조된 시료를 Food mixer를 이용하여 1분간 분쇄
- 분쇄된 시료는 흡습방지를 위해 흡습방지용 sample 병에 밀봉하여 분석기기과 같은 조건인  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에 보관

나. 시료분석에 의한 spectrum data 수집

1) 사용장비

- NIRS6500 (Foss NIRSystems, USA)

2) 시료 입력용기

- 울무, 홍화씨: rectangular sample cup (57×32×266 mm W×D×H)
- 당귀, 황기, 천궁, 고사리, 당근, 우엉, 연근: small ring sample cup (Φ 50 mm)

3) 시료분석을 위한 NIRS 분석환경 설정

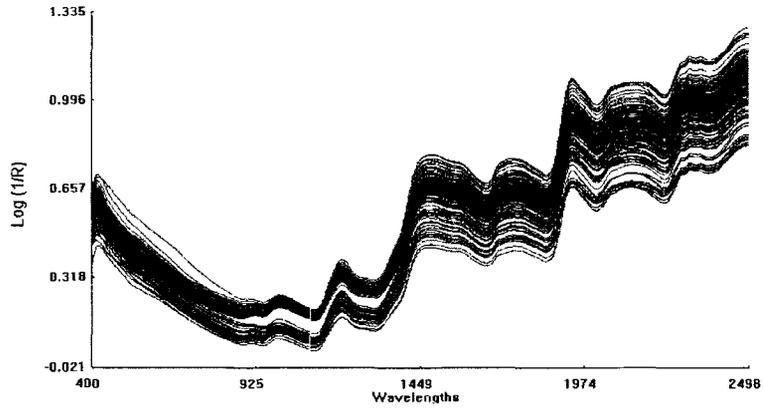
- 사용파장: 800~2500 nm, 측정파장중 비교적 원산지 식별에 유익하다고 판단되는 파장대역을 대상으로 하였음
- Scan: 분당 시료에 조사되는 근적외선의 조사횟수로 분당 32회 조건 설정
- 흡광 mode: reflectance, 고체시료인 관계로 근적외선의 투과에 따른 정확한 흡광도를 얻기가 어려워 reflectance mode를 선택

4) 시료분석에 사용한 software: Foss NIRSystems WinISI (USA)

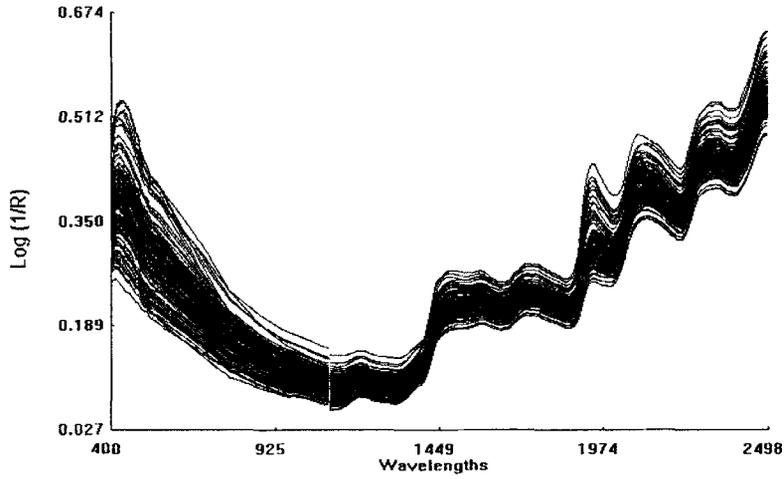
5) 시료분석

- 시료별 분석조건에 따라 spectrum data 수집
- 시료별 스펙트럼 분석결과

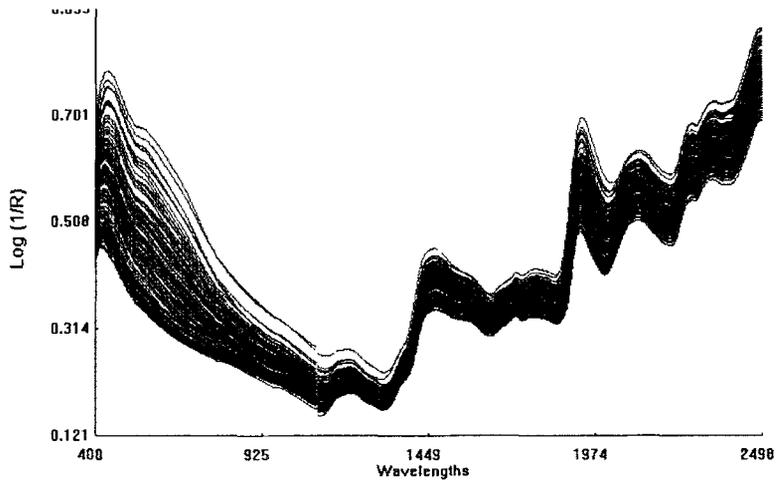
가) 울무분석 spectrum



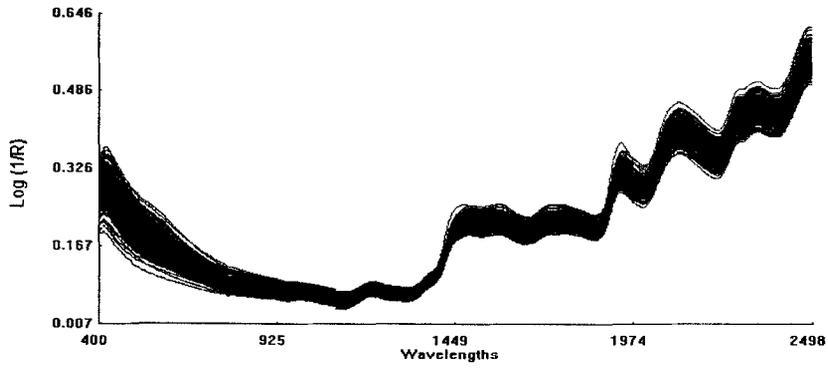
나) 당귀분석 spectrum



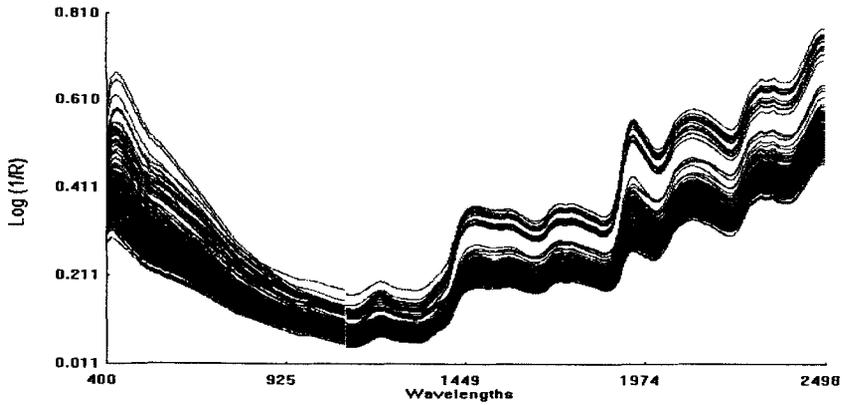
다) 홍화씨 분석 spectrum



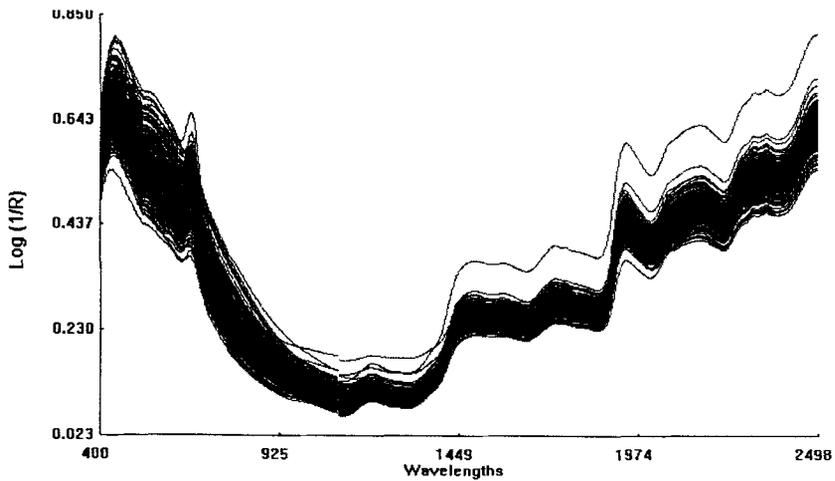
라) 황기 분석 spectrum



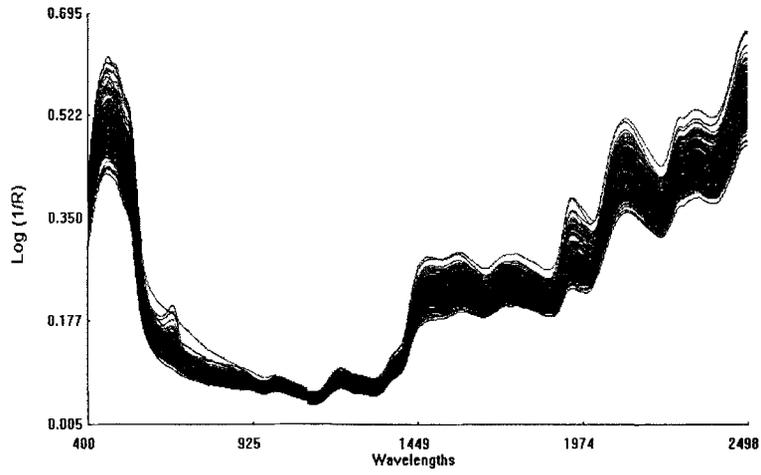
마) 천궁 분석 spectrum



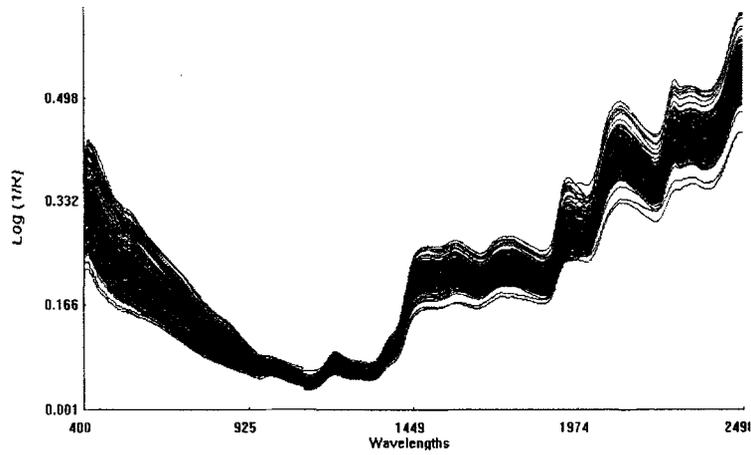
바) 고사리 분석 spectrum



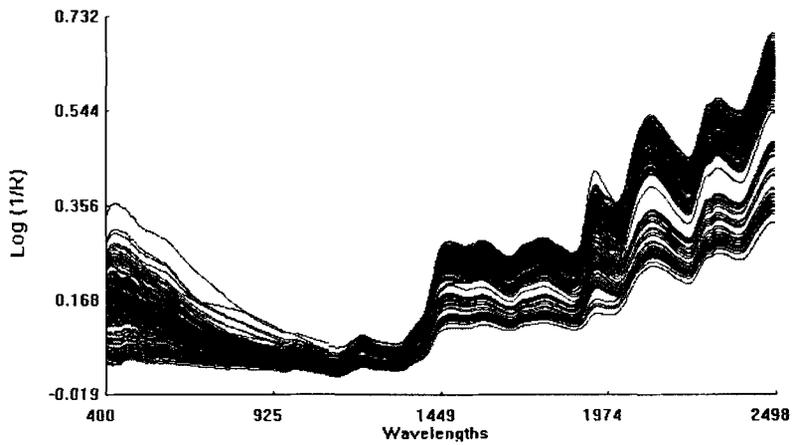
사) 당근 분석 spectrum



아) 우엉 분석 spectrum



자) 연근 분석 spectrum



6) 검량식 작성을 위한 시료 선발

- 판별시스템에 적용할 대표시료를 선발하고 검량식 작성을 위한 기준시료로 활용하기 위함
- 각 품목별 얻어진 시료별 spectrum data를 분석하여 중복된 시료와 모집단에서 크게 벗어난 시료를 제외시켜 모집단 중 각각 이웃하고 있는 시료와 일정한 거리 안에 있는 시료만을 선발하여 검량식 작성용 시료로 활용
- 시료 선발조건: cutoff by H or R value (3.0), neighborhood H (0.6)  
위와 같은 조건에서 시료를 선발하여 아래와 같은 결과를 얻었으며 비선택된 시료는 검량식 검증용으로 사용

구 분	율무		당귀		홍화씨		황기		천궁	
	국산	수입								
분석시료	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
대표시료	58	69	53	51	74	60	65	69	67	78
비선택시료	42	31	47	49	26	40	35	31	33	22

구 분	고사리		당근		우영		연근		비고
	국산	수입	국산	수입	국산	수입	국산	수입	
분석시료	100	100	100	100	100	100	100	100	
대표시료	60	74	81	58	73	66	62	83	
비선택시료	35	31	19	42	27	34	38	17	

7) 검량식 작성

가) 검량식 작성조건

- 사용파장: 800~2500 nm (2 nm)
- Scatter: SNV (standard normal variate) & Detrend, 기기조건 변화에 따른 spectrum의 변화를 제거 또는 보완하여 spectrum의 재현성을 높이기 위해 전처리를 실시하였음
- Segment: 8
- Math treatment: 1.4.4.1 or 2.10.10.1, 검량식 작성 후 검증을 통해 가장 정확성이

높은 조건을 찾아 위 조건을 적용하였음

나) 검량식 작성결과

MPLS (modified partial least square)에 의한 검량식 작성

품목	Type of Eq	R (a)	SEC (%) (b)	SEP (%) (c)
울무	log(1/R)	0.7974	18.3307	20.2189
	1st derivative log(1/R)	0.8576	13.0908	16.5546
	2nd derivative log(1/R)	0.8900	12.6516	14.8292
당귀	log(1/R)	0.9597	8.8688	9.6576
	1st derivative log(1/R)	0.9773	5.6965	7.2336
	2nd derivative log(1/R)	0.9738	5.5726	7.7745
홍화씨	log(1/R)	0.9149	13.1046	14.5068
	1st derivative log(1/R)	0.9416	10.9244	11.9374
	2nd derivative log(1/R)	0.9439	9.7695	11.7758
황기	log(1/R)	0.9048	14.3050	15.3264
	1st derivative log(1/R)	0.9399	11.1769	12.1865
	2nd derivative log(1/R)	0.9169	13.1462	14.3024
천궁	log(1/R)	0.9533	9.3902	10.5582
	1st derivative log(1/R)	0.9559	8.3641	10.2713
	2nd derivative log(1/R)	0.9473	9.6692	11.2332
고사리	log(1/R)	0.8731	16.0889	17.5120
	1st derivative log(1/R)	0.9283	10.5688	13.2452
	2nd derivative log(1/R)	0.8966	13.6174	15.9183
당근	log(1/R)	0.8409	19.4150	23.0555
	1st derivative log(1/R)	0.8778	16.9747	19.8447
	2nd derivative log(1/R)	0.8979	15.5783	22.0348
우영	log(1/R)	0.7555	24.1264	26.5440
	1st derivative log(1/R)	0.8147	21.1455	26.2127
	2nd derivative log(1/R)	0.8325	20.0287	25.0267
연근	log(1/R)	0.9885	5.2949	7.1740
	1st derivative log(1/R)	0.9947	3.6088	5.3356
	2nd derivative log(1/R)	0.9934	4.0008	5.5584

(a): correlation coefficient.

(b): standard error of calibration.

(c): standard error of prediction.

- Modified PLS 분석결과

품목	구분	국산	수입산	계	판별정확도 (%)	
울무	사용시료	42	31	73	90.4	
	판별결과	국산	40	5		66
		수입산	2	26		7
당귀	사용시료	47	49	96	100.0	
	판별결과	국산	47	0		96
		수입산	0	49		0
홍화씨	사용시료	26	40	66	98.5	
	판별결과	국산	25	0		65
		수입산	1	40		1
황기	사용시료	35	31	66	98.5	
	판별결과	국산	34	0		34
		수입산	1	31		32
천궁	사용시료	33	22	55	98.2	
	판별결과	국산	32	0		32
		수입산	1	22		23
고사리	사용시료	40	26	66	95.5	
	판별결과	국산	37	0		37
		수입산	3	26		29
당근	사용시료	19	42	61	98.4	
	판별결과	국산	18	0		18
		수입산	1	42		43
우엉	사용시료	27	34	61	86.9	
	판별결과	국산	24	5		29
		수입산	3	29		32
연근	사용시료	38	17	55	100.0	
	판별결과	국산	38	0		38
		수입산	0	17		17

\* 울무와 우엉에서는 산지별 특성이 크지 않아 원산지 식별의 판별정확도가 다소 낮게 나타났지만 다른 품목에서는 비교적 판별정확도가 높게 나타나 NIR 분석에 의한 원산지 식별 가능성을 보여주었다.

## 제 2 절 PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 *Listeria*, *Escherichia* 및 *Salmonella*의 신속검출법 개발 (제2세부과제)

### I. PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 *Listeria* 및 *Escherichia*의 신속검출법 개발 (주관연구기관)

세부연구책임자 : 한국식품개발연구원 신 원 선

#### 1. 서 설

축산물 및 축산식품으로부터 기인할 수 있는 주요 병원체는 *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter coli/jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* 등으로서 인체의 건강에 심각한 위해를 줄 수 있다고 알려져 있다. 최근 식품안전성의 미생물적 위해요소가 공중보건의 주된 관심사로 전세계적으로 인식되고 있다. 따라서, 식중독 유발 위해미생물에 대한 예방과 조절차원에서 이들을 신속하게 검출하는 방법개발이 시급하게 요구된다. 식품 중에서 위해미생물을 검출하기 위한 전통적인 방법으로 증균 및 선택배지 배양과 유사집락에 대한 생화학적 특성검사를 이용한 방법과 혈청학적 방법으로 항체를 증명하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이들 방법은 저렴한 비용으로 수행할 수 있으나 분석결과를 얻는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있어 최근에는 분자생물학적인 기법을 이용하여 이들 균주를 검출하기 위한 활발한 연구가 이루어지고 있다. 유전자수준에서의 특이적인 검출 (species-specific)을 목적으로 하는 기법에는 real-time PCR, DNA hybridization법, DNA microarray법, polymerase chain reaction (PCR) 등이 있으며 이 중에서 PCR 방법은 저비용으로 신속하고 뛰어난 검출감도를 지니고 있어 병원성 미생물 검출에 광범위하게 이용되고 있다.

*L. monocytogenes*는 인간과 동물에서 발생하는 리스테리아증의 원인균으로 노령인구의 증가와 냉장식품의 소비가 증가하면서 비례적으로 발생빈도가 높아져가고 있다. 이 세균은 Gram양성, 비포자형성 세균으로 *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seligeri*, *L.*

*welshimeri*, *L. grayi* 등과 함께 분류학적으로 *Listeria* 속에 속한다. 이들 세균 중 *L. monocytogenes*만 인간과 동물에 대한 병원성을 지니고 있으며 *L. ivanovii*는 동물에게 병원성을 보이고 나머지는 비병원성균으로 분류된다. 인체는 *L. monocytogenes*의 감염으로 인하여 고열, 기침 그리고 유산 등의 증상이 보이며 일반적으로 30-40%의 치사율을 보인다. 따라서, 이런 높은 치사율 때문에 리스테리아에 의한 오염이 소비자에 이르기 전 식품의 유통과정에서 *L. monocytogenes*를 검색하는 것은 매우 중요하다.

*E. coli* O157:H7은 베로독소 (verotoxin)를 생성하여 장관출혈성 대장균 (enterohemorrhagic *E. coli*)으로 분류하고, enterotoxin을 생성하는 장관독소원 대장균 (enterotoxigenic *E. coli*)과 대장점막의 상피세포를 침입하여 조직내 감염을 일으키는 장관침투성 대장균 (enteroinvasive *E. coli*)과 성인에게 급성위장염을 일으키는 장관병원성 대장균 (enteropathogenic *E. coli*)을 모두 병원성 대장균으로 분류한다. 병원성 대장균은 형태와 생화학적 성상이 비병원성 대장균과 비슷하고 Gram 음성의 간균이고 주모성 편모가 있어 운동성이 있거나 편모가 없고 비운동성인 것도 있다. 일반적으로 호기성이거나 통성 혐기성균이며 장내세균 감별배지인 MacConkey 한천배지에서 lactose를 분해하여 핑크색으로 자라지만 그 중 *E. coli* O157:H7은 sorbitol을 분해하지 못하여 Sorbitol MacConkey agar에서 무색의 집락을 형성하므로 다른 병원성 대장균과 구분한다. 이 균은 10~1000개의 균량으로 발병할 수 있다고 보고되어 있으며 *E. coli* O157:H7은 1982년 미국에서 햄버거에 의한 식중독사건으로 처음 발견되어 보고된 이후 세계 각국에서 발견되고 있다. 주요 오염원은 완전히 조리되지 않은 쇠고기 분쇄육, 칠면조 고기, 샌드위치, 원유, 사과주스 등에서 감염사례가 있다. 또한, 도축장에서 과일된 가축의 장에 의해 오염될 수 있으며 고기를 분쇄하는 과정에서도 오염될 수 있으므로 쇠고기 분쇄육을 섭취할 때에는 충분히 조리하여야 한다.

최근, 식품 안전성을 모니터링하는 새로운 기술로서 개발되고 있는 PCR 방법은 식품 중에 존재하는 병원성 미생물을 특이적 (species-specific)이고 신속하게 고감도로 검출할 수 있는 장점이 있다. PCR을 이용한 병원성 미생물 검출은 특정 미생물이 지니고 있는 염기서열로부터 얻어진 정보를 바탕으로 제작하여 미생물로부터 추출한 DNA를 기질로 하여 반응시키면 해당 절편의 유전자배열을 증폭시키는 반응이다. 병원성 미생물의 동정을 위해 이용하는 primer 들은 미생물의 병원성에 관련된 유전자, 종 특이성유전자 및 항원의 생합성에 관련된 유전자, 16S rRNA 등의 공통유전자의 염기서열에서 얻어진다. 그러나, 이들 병원균을 검출하기 위해서는 식품 중에 존재하는 병원성 세균들을 집

균하여야 하며 식품 속에 존재하는 PCR 저해요소를 제거하는 단계가 필요하다. 식품으로부터 PCR 저해요인을 제거하기 위하여 다양한 방법이 이용되고 있는데 가장 간단한 물리적 방법으로 원심분리, 열처리, 여과 및 immunocapture법 등이 있다. 최근 식품 속에 존재하는 소량의 오염균으로부터 효과적으로 DNA를 분리하기 위하여 paramagnetic bead법을 이용하기도 하는데 이는 적은 양의 미생물을 농축시키는 효과와 아울러 DNA를 분리하는 두 가지 장점을 지니고 있다. 현재까지는 식품유래의 병원성 미생물의 검출 감도를 향상시키기 위한 노력과 다양한 시료에서의 DNA 추출방법의 최적화 등의 연구가 많이 수행되어 왔으나 식품으로부터 간단한 전처리로 PCR 저해요인을 제거하면서 검출감도를 향상시킬 수 있는 다각적인 접근법은 아직 시도된 바가 없다.

## 2. 연구개발 방법 및 결과

### 가. 균주선택 및 배양조건

*E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *L. monocytogenes* ATCC 19111과 *Staphylococcus aureus* ATCC 14458은 ATCC에서 구입하여 사용하였으며 *E. coli* KCTC 1039, *E. coli* KCTC 1041과 *E. coli* KCTC 1114는 KCTC에서 구입하여 이용하였다. 또, *S. enteritidis* P1은 당 연구실에서 분리하여 보존하고 있는 균주를 이용하였다. *E. coli* O157:H7은 mEC broth상에서 37°C에서 18시간 동안 혐기배양한 후, CT-SMAC agar 상에서 *E. coli* O157:H7에 대하여 선택적으로 집락을 형성시켰다. *L. monocytogenes*는 *Listeria* 증균배양액 (LEB)을 이용하여 37°C에서 18시간 배양하여 LSA를 첨가한 옥스포드 리스테리아 선택배지에서 선택적으로 집락을 형성시켰다. *E. coli* KCTC 1039, *E. coli* KCTC 1041, *E. coli* KCTC 1114는 LB broth을 이용하여 37°C에서 18시간 통기성 배양 후 이용하였으며 *S. enteritidis* P1과 *Staphylococcus aureus*는 영양배지상에서 37°C, 18시간 통기배양 후 이용하였다.

### 나. *E. coli* O57:H7과 *L. monocytogenes*의 template 조제

순수배양액으로부터 *E. coli* O57:H7과 *L. monocytogenes*를 추출하기 위하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 채택하였다. 침전물을 1 ml의 2차 증류수로 씻어주고 0.1 ml의 증류수로 현탁시켰다. 이 현탁액을 2 µl 취하여 직접 PCR template (whole cell)로 이용하였다. 또한, 이를 98°C에서 10분간 열처리한 cell lysate, 상용kit로 추출한 genomic DNA (Aquapure genomic isolation kit, BioRad, USA)를 이용하였다.

식품의 특성별로 template 조제에 따른 matrix 효과를 조사하기 위하여 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*를 모델식품에 접종하였다. 본 실험에 사용된 시료는 시판 중인 우유, 햄, 생닭, 돈육, 순대, 족발 등을 식품점, 대형마트, 즉석식품 제조상에서 구입하여 사용하였다.

우유의 경우 각 균주를 접종한 9 ml의 우유를 취하여 멸균 tube에 넣었다. 생닭, 햄, 치즈 등의 고형물은 25 g씩 취하여 멸균된 스토마커 필터백에 넣은 다음 100 ml의 enrichment broth 혹은 0.1%의 peptone 수를 넣었다. 스토마커 (Circulator 400)를 사용하여 200 rpm으로 1분간 스토마킹한 다음 9 ml의 여과액을 멸균튜브에 넣었다. 각각의

튜브에 mEC 배양액과 LEB 배양액에서 37°C에서 18시간 배양한 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*를 접종한 후 배양하고 각 시료 1 ml 당 최종균주의 농도가  $10^0$ 에서  $10^5$  CFU가 되도록 희석하였다. 이들을 37°C의 진탕배양기에서 증균하면서 증균배양 시간별 (0, 4, 8, 24 hr)로 배양시료를 취하였다. 증균배양 중에 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 균수 측정을 위하여 CT-SMAC agar와 LSA를 각각 이용하였다. 각 시료의 PCR template를 제조하기 위하여 시간별로 증균배양액에서 취한 1 ml의 시료액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 수거하였다. 얻어진 침전물을 1 ml의 증류수로 씻고 0.1 ml의 증류수에 현탁시킨 후 이를 98°C에서 10분간 열처리하였다. 현탁액과 열처리한 시료액에서 각각 2  $\mu$ l를 취하여 PCR 증폭반응을 위한 기질로 이용하였다.

다. *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes* 검출용 프라이머 제작

*E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*를 검출하기 위하여 *E. coli* O157:H7은 O-antigen 합성유전자를 encoding하는 *rfb* gene, glucuronidase 합성관련의 *uid A* gene, 장독소를 유발하는 verotoxin 발현유전자 부위의 *st* I, II gene, 장관벽에 부착성이 있는 outer membrane 단백질인 intimin을 전사하는 *eae A* gene을 선택하였으며 *L. monocytogenes*의 특이적 검출을 위하여 *listeriolysin-O* 발현관련 *hly A* gene과 장막 침투관련 p60 단백질을 전사하는 *iap* gene 유래의 primer 들을 선별하였다 (Table 1).

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequences (5'→3')	Target gene	PCR product	Reference
PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG	<i>rfb</i> gene	420 bp	Maurer et al., 1999
PR8	AGATTGGTTGGCATTACTG			
PT2	GCGAAAACGTGGAATTGGG	<i>uid</i> A gene	252 bp	Cebula et al., 1995
PT3	TGATGCTCCATCACTTCCTG			
LP30	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	<i>slt</i> I gene	348 bp	Cebula et al., 1995
LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG			
LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	<i>slt</i> II gene	584 bp	Cebula et al., 1995
LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC			
AE19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	<i>eae</i> A gene	1087 bp	Gannon et al., 1993
AE20	TCAGCGTGGTTGGATCAACCT			
C(+)	TTACGAATTAAAAAGGAGCG	down stream of <i>hly</i> A gene	161 bp	Mengaud et al. 1988, 1989
D(-)	TTAAATCAGCAGGGGTCTTT			
MonoA	CAAACGTGCTAACACAGCTACT	<i>iap</i> gene	660 bp	Bubert et al. 1999
Lis1B	TTATACGCGACCGAAGCCAAC			

라. PCR 운전조건

순수배양액에서의 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes* 검출을 위한 PCR 증폭반응은 PCR premix인 AccuPower™ (Bioneer, Korea)를 이용하였으며 premix의 조성은 다음과 같다: 1U 내열성 DNA polymerase, 250 μM dNTP, 50 mM Tri-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>이었다. 그러나, PCR 증폭의 최적조건 설정 실험 시에는 내열성 *Taq* polymerase (Applied Biosystem, USA)의 농도, MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystem, USA), 첨가하는 template의 양 등을 조절하였다. PCR 증폭반응은 Bio-Rad Gene Cyclor (model No. 10167, USA)를 이용하여 94°C에서 2분간 pre-denaturation한 후 94°C에서 denaturation, 55°C (실험조건에 따라, 48°C, 50°C, 55°C, 60°C에서도 수행)에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 polymerization을 35회 반복한 다음 72°C에서 5분간 extension 후 종결시켰다. PCR 증폭 시 annealing 온도를 50°C, 55°C, 60°C로 조절하여 최적화반응을 수행하였다. 증폭산물은 1.5~2% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 다음 사진촬영을 하였다.

마. 선택 primer를 이용한 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 특이성 검출

Table 1에서 제시한 각각의 primer에 대한 특이성 검정을 위하여 PCR 조건을 다음과 같이 설정하였다. Accupower™ premix (Bioneer, Korea)에 준비한 template로서 whole cell ( $10^3$  cells)과 genomic DNA (50~100 ng)를 첨가하고 antisense primer와 sense primer를 각각 10 pmol 가한 후 각 sample 당 20  $\mu$ l로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 Thermal cycler (Biometra Inc., Germany)를 사용하여 pre-denaturation은 94°C에서 2분간 수행하고 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 48°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분씩 총 35회를 반복 수행한 후 72°C에서 5분간 polymerization 후 반응을 종료하였다.

그 결과, Fig. 1에서와 같이 whole cell (Fig. 1A)과 genomic DNA (Fig. 1B)를 template로 이용한 경우 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 (lane 1~5)과 *L. monocytogenes* ATCC 19111 (lane 6~7)을 선택한 primer로 PCR 증폭산물을 확인한 결과, 사용한 모든 primer에서 특이적인 증폭산물을 검출하였으나 whole cell의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19111 검출용 C(+)-D(-) (161 bp, Fig. 1A, lane 7)에서 증폭하지 않았다. 또한 genomic DNA를 template로 이용하였을 경우, whole cell을 이용한 경우보다 적용한 모든 primer에서 검출감도가 높았다.

또한, 선택 프라이머를 이용하여 다양한 균주에 대한 species-specificity 검증실험을 수행하기 위하여 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *E. coli* KCTC 1039, *E. coli* KCTC 1041, *E. coli* KCTC 1114, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *S. enteritidis* P1, *Staphylococcus aureus*에 대한 PCR 반응 특이성을 조사하였다. 그 결과, Fig. 2와 3에 제시한 바와 같이 선택 primer인 PF8-PR8 (420 bp), PT2-PT3 (252 bp), LP30-LP31 (348 bp), LP43-LP44 (584 bp), AE19-AE20 (1087 bp)에 대하여 *E. coli* O157:H7 ATCC 19111가 특이적으로 검출되었으나 LP30-LP31 (348 bp)과 AE19-AE20 (1087 bp) 증폭결과에서는 비특이적 산물이 함께 검출되었다. 또한, *L. monocytogenes* 특이적 primer인 MonoA-Lis1B (660 bp)와 C(+)-D(-) (161 bp)를 이용하여 증폭시킨 결과 두 종류의 primer에서 *L. monocytogenes* ATCC 19111이 특이적으로 검출되었으며 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *E. coli* KCTC 1039, *E. coli* KCTC 1041, *E. coli* KCTC 1114, *S. enteritidis* P1, *Staphylococcus aureus*에 대한 특이성은 보이지 않았다.

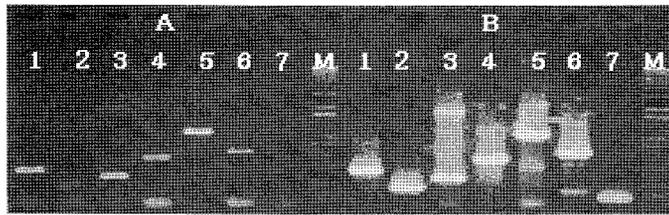


Fig. 1. Specificity test of primer candidates in detecting *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 and *L. monocytogenes* ATCC 19111. A, whole cell ( $10^3$  cells); B, isolated DNA (100 ng). 1, PF8-PR8 (420 bp); 2, PT2-PT3 (252 bp); 3, LP30-LP31 (348 bp); 4, LP43-LP44 (584 bp); 5, AE19-AE20 (1087 bp); 6, MonoA-Lis1B (660 bp); 7, C(+)-D(-) (161 bp); 1~5 primer sets for *E. coli* O157:H7 and 6~7 primer sets for *L. monocytogenes*.

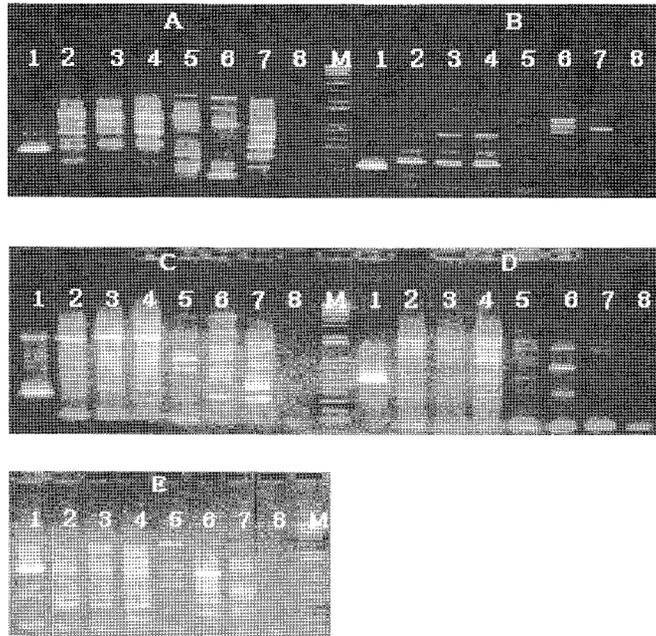


Fig. 2. Specificity test of primer candidates in detecting *E. coli* O157:H7. A, PF8-PR8 (420 bp); B, PT2-PT3 (252 bp); C, LP30-LP31 (348 bp); D, LP43-LP44 (584 bp); E, AE19-AE20 (1087 bp). 1, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 2, *E. coli* KCTC 1039; 3, *E. coli* KCTC 1041; 4, *E. coli* KCTC 1114; 5, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 6, *S. enteritidis* P1; 7, *Staphylococcus aureus*; 8, negative control (no template).

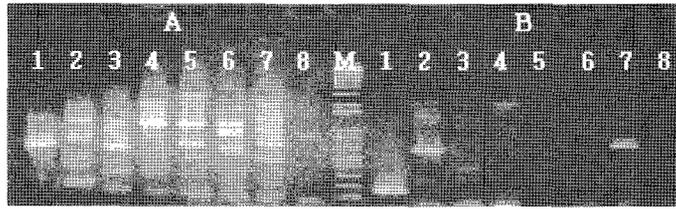


Fig. 3. Specificity test of primer candidates in detecting *L. monocytogenes*. A, MonoA-Lis1B (660 bp); B, C(+)-D(-) (161 bp). 1, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 2, *L. grayi* KCTC 3581; 3, *L. innocua* KCTC 3586; 4, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 5, *E. coli* KCTC 1039; 6, *S. enteritidis* P1; 7, *Staphylococcus aureus*; 8, negative control (no template).

바. Annealing 온도에 따른 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 검출감도 비교

선택 primer를 이용하여 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*를 검출함에 있어서 비 특이적인 증폭을 줄이고 특이성을 향상시키기 위하여 annealing 온도를 조절하여 PCR 증폭산물의 결과를 비교하였다. PCR 증폭반응 중 annealing 온도를 높이면 primer와 주형 DNA간에 mismatch가 감소되어 반응특이성이 높아지기도 하고 mismatch를 가지는 primer를 사용하는 경우 37~45℃로 온도를 낮추어 주기도 한다. 따라서 본 실험에서는 선택 primer에 대해 특이적으로 검출된 균주인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894과 *E. coli* KCTC 1039, *L. monocytogenes* ATCC 19111과 *L. innocua* KCTC 3586을 선별하여 annealing 온도를 45℃ (Fig. 1, 2, 3), 55℃ (Fig. 5), 60℃ (Fig. 4)에서 실시하여 증폭산물의 결과를 비교하였다.

Annealing 온도를 60℃와 55℃에서 PCR 증폭산물을 확인한 결과, 적용한 모든 primer에서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894와 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대한 특이성이 확인되었으며 사용된 primer 중에서 *E. coli* O157:H7의 경우 verotoxin 발현 유전자 *slt I* 유래의 primer인 LP43-LP44 (증폭산물 584bp)가 *L. monocytogenes*인 경우에는 listeriolysin-O 발현 유전자인 *hly A* 유래의 primer인 C(+)-D(-) (증폭산물 161bp)를 적용하여 annealing 온도 55℃에서 PCR을 수행했을 때 높은 검출 특이성을 보였다.

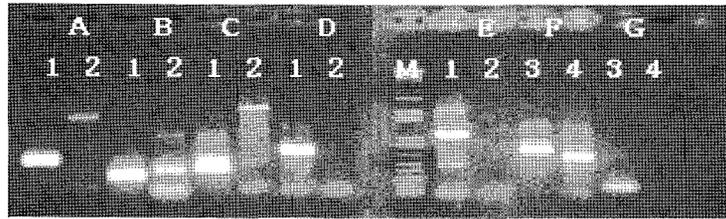


Fig. 4. Specificity of selected primer in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. The primer was annealed at 60°C. A, PF8-PR8 (420 bp); B, PT2-PT3 (252 bp); C, LP30-LP31 (348 bp); D, LP43-LP44 (584 bp); E, AE19-AE20 (1087 bp); F, MonoA-Lis1B (660 bp); G, C(+)-D(-) (161 bp). 1, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 2, *E. coli* KCTC 1039; 3, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 4, *L. innocua* KCTC 3586.

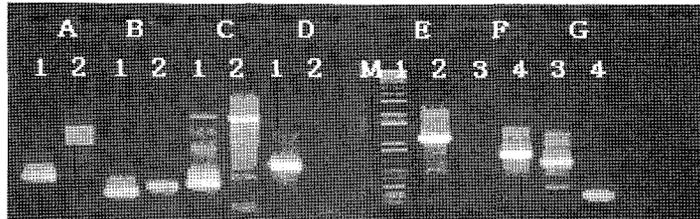


Fig. 5. Specificity of selected primer in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. The primer was annealed at 55°C. A, PF8-PR8 (420 bp); B, PT2-PT3 (252 bp); C, LP30-LP31 (348 bp); D, LP43-LP44 (584 bp); E, AE19-AE20 (1087 bp); F, MonoA-Lis1B (660 bp); G, C(+)-D(-) (161 bp). 1, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 2, *E. coli* KCTC 1039; 3, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 4, *L. innocua* KCTC 3586.

*E. coli* O157:H7 ATCC 43894와 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 가장 특이적인 primer인 verotoxin 발현유전자 *slt* I 유래의 primer인 LP43-LP44 (증폭산물 584bp)와 listeriolysin-O 발현유전자인 *hly* A 유래의 primer인 C(+)-D(-) (증폭산물 161bp)에 대하여 다른 reference 균주의 특이성을 확인하기 위하여 annealing 온도를 55°C로 설정하여 PCR를 수행하였다. PCR 결과 선택된 primer set는 각각 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894와 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대해서만 특이적 band가 증폭되었으며 다른 reference 균주에 대해서는 전혀 증폭되지 않았다 (Fig. 6). 그래서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894에 대해서는 LP43-LP44 primer set를, *L. monocytogenes* ATCC 19111에 대해서는 C(+)-D(-) primer set를 가장 특이적 primer set로 선택하고 다음 실험을 진행하였다.

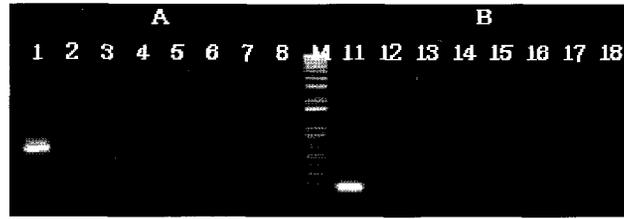


Fig. 6. Specificity test of LP43-LP44 and C(+)-D(-) primer set in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*, respectively. A, LP43-LP44 (584 bp); B, C(+)-D(-) (161 bp). 1, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 2, *E. coli* KCTC 1039; 3, *E. coli* KCTC 1041; 4, *E. coli* KCTC 1114; 5, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 6, *S. enteritidis* P1 7, *Staphylococcus aureus*; 8, negative control (no template); 11, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 12, *L. grayi* KCTC 3581; 13, *L. innocua* KCTC 3586; 14, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 15, *E. coli* KCTC 1039; 16, *S. enteritidis* P1; 17, *Staphylococcus aureus*; 18, negative control (no template).

#### 사. 선택된 primer set의 PCR 최적조건 확립

*E. coli* O157:H7 ATCC 43894와 *L. monocytogenes* ATCC 19111에 가장 특이적인 primer인 verotoxin 발현유전자 *slt I* 유래의 primer인 LP43-LP44와 listeriolysin-O 발현유전자인 *hly A* 유래의 primer C(+)-D(-)에 대하여 primer 농도, annealing 온도, PCR 반복 cycle 수 등의 조건에 따른 검출민감도를 조사하였다.

우선, primer 농도에 따른 검출감도를 비교하기 위하여 AccuPower™ pre-mix (Bioneer, Korea)에 template로서 10 µl의 whole cell ( $10^3$  cells), 각각의 primer의 농도를 5, 10, 20 pmol이 되도록 첨가하여 최종 volume이 20 µl로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭조건은 상기조건과 동일하였으며 annealing 온도는 55°C로 설정하였다.

Fig. 7과 8에 제시한 바와 같이 *E. coli* O157:H7의 경우, primer의 농도로 5 pmol을 첨가하였을 때는  $10^2$  cell 수준에서의 증폭이 되지 않았으나 10 pmol 농도의 primer 첨가 시에는  $10^1$  cell 수준에서의 검출이 가능하였다. primer 농도를 20 pmol로 하면  $10^0$  cell 수준까지 검출이 가능하였으나 낮은 검출강도를 보였다 (Fig. 7). *L. monocytogenes* 인 경우에도 primer를 5 pmol 수준으로 첨가하였을 때에는 증폭이 되지 않았으나 primer 농도를 10 pmol과 20 pmol로 하면  $10^1$  cell 수준에서 검출가능 하였다 (Fig. 8). 그러나, *L. monocytogenes*의 경우 primer 농도를 20 pmol로 증가시켜도 검출강도가 현저히 개선되지는 않았으나  $10^1$  cell 수준에서의 검출감도는 다소 향상되었다.

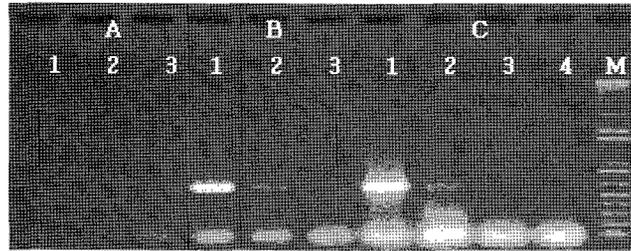


Fig. 7. Sensitivity of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 according to primer concentration. A, 5 pmoles; B, 10 pmoles; C, 20 pmoles. 1~3, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894  $1 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU; 4, negative control (no template).

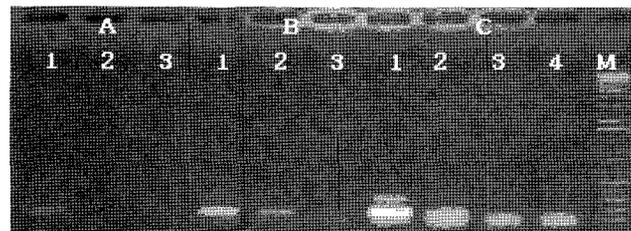


Fig. 8. Sensitivity of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* according to primer concentration. A, 5 pmoles; B, 10 pmoles; C, 20 pmoles. 1~3, *L. monocytogenes* ATCC 19111  $8 \times 10^3 \sim 10^1$  CFU; 4, negative control (no template).

Fig. 9와 10은 PCR 증폭 시 반복 cycle 수에 따른 검출감도를 비교한 것이다. PCR 증폭 cycle을 30 cycle로 하였을 때에는 어느 수준에서도 target 유전자가 증폭되지 않았으나 35와 40 cycle을 증폭한 경우  $10^1$  cell 수준에서 증폭되었다 (Fig. 9, B-lane 2, C-lane 2). 그러나, 40 cycle을 증폭시킨 경우 검출강도가 현저히 향상된 것으로 나타났다 (Fig. 9, C-lane 2). 그러나, *L. monocytogenes*의 경우 (Fig. 10), *E. coli* O157:H7과 마찬가지로 30 cycle에서는 증폭되지 않은 반면 35 cycle과 40 cycle에서는  $10^2$  cell 수준에서 증폭되었으나 증폭산물의 검출감도가 상당히 낮았다.



Fig. 9. Sensitivity of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 according to PCR cycle number. A, 30 cycles; B, 35 cycles; C, 40 cycles. 1~3, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894  $1 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU, 4, negative control (no template).

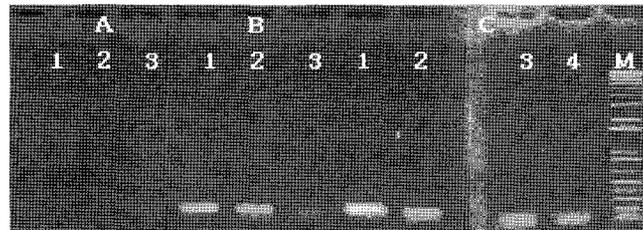


Fig. 10. Sensitivity of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* according to PCR cycle number. A, 30 cycles; B, 35 cycles; C, 40 cycles. 1~3, *L. monocytogenes* ATCC 19111  $8 \times 10^3 \sim 10^1$  CFU; 4, negative control (no template).

본 실험에서는 PCR 증폭단계에서의 annealing 온도를 조절함으로써 검출감도를 비교하고자 하였다. *E. coli* O157:H7의 경우 annealing 온도가 50°C에서 반응시켰을 때  $10^2$  CFU 수준에서 검출이 가능하였으나 55°C에서는  $10^1$  CFU 수준에서 특이적이고 고감도로 검출되었고 (Fig. 11, B-lane 2), 60°C에서는 오히려  $10^2$  CFU 수준에서도 낮은 검출 강도(Fig. 11, C-lane 1)를 보였다. Fig. 12는 *L. monocytogenes*에 대한 실험결과이다.

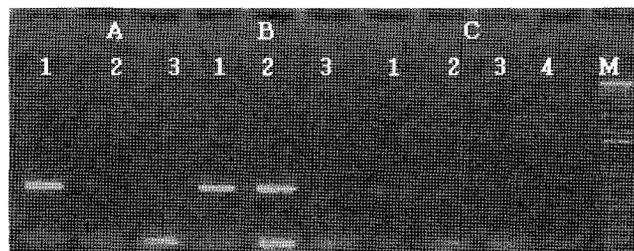


Fig. 11. Sensitivity of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 according to PCR annealing temperature. A, 50°C; B, 55°C; C, 60°C. 1~3, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894  $1 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU; 4, negative control (no template).

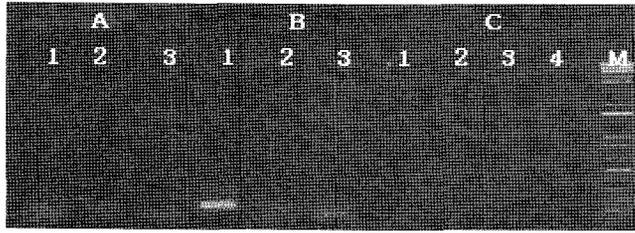


Fig. 12. Sensitivity of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* according to PCR annealing temperature. A, 50°C; B, 55°C; C, 60°C. 1~3, *L. monocytogenes* ATCC 19111  $8 \times 10^3 \sim 10^1$  CFU; 4, negative control (no template).

다음은 *Taq* polymerase (Bioneer, Korea)를 0.5, 1, 2 unit씩 첨가하였으며  $MgCl_2$ 는 1.5, 3, 5 mM씩 첨가한 다음 PCR 증폭산물을 비교하였다. 그 밖의 PCR 증폭조건은 상기조건과 동일하게 수행하였다. 그 결과, *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 경우 모두 *Taq* polymerase를 2 unit 첨가한 경우에만 증폭산물이 검출되었다 (Fig. 13, 14).

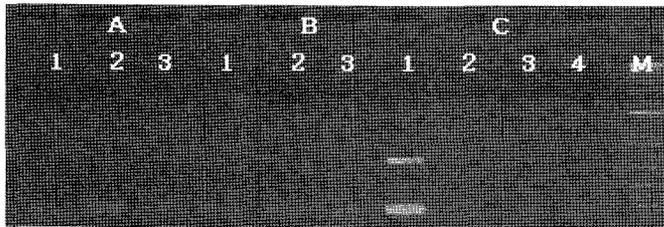


Fig. 13. Sensitivity of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 according to the amount of *Taq* polymerase. A, 0.5 unit; B, 1 unit; C, 2 unit. 1~3, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894  $1 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU; 4, negative control (no template).

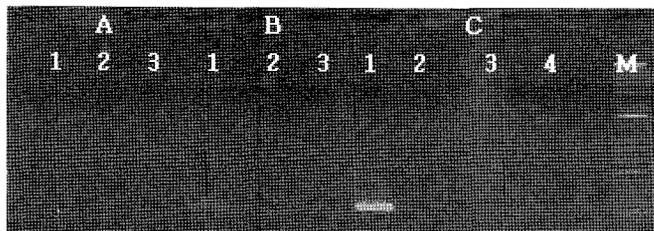


Fig. 14. Sensitivity of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* according to the amount of *Taq* polymerase. A, 0.5 unit; B, 1 unit; C, 2 unit. 1~3, *L. monocytogenes* ATCC 19111  $8 \times 10^3 \sim 10^1$  CFU; 4, negative control (no template).

다음은 MgCl<sub>2</sub>의 농도에 따른 PCR 증폭산물을 비교하였다. 그 결과, MgCl<sub>2</sub>의 농도가 1.5 mM 이상이 첨가된 경우 10<sup>3</sup> cell 수준에서 목적유전자 부위가 증폭되었으나 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에서 모두 검출감도가 상당히 낮았다 (Fig. 15, 16).

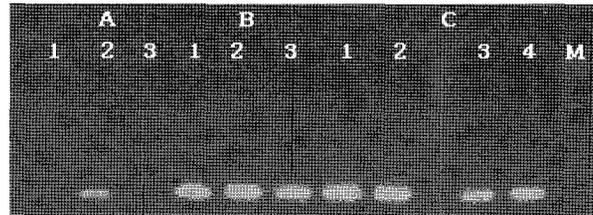


Fig. 15. Sensitivity of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 according to concentration of MgCl<sub>2</sub>. A, 1.5 mM; B, 3 mM; C, 5 mM. 1~3, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 1×10<sup>2</sup>~10<sup>0</sup> CFU; 4, negative control (no template).

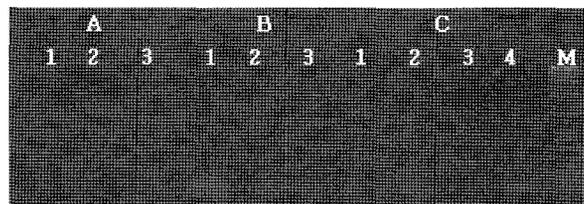


Fig. 16. Sensitivity of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* according to concentration of MgCl<sub>2</sub>. A, 1.5 mM; B, 3 mM; C, 5 mM. 1~3, *L. monocytogenes* ATCC 19111 8×10<sup>3</sup>~10<sup>1</sup> CFU; 4, negative control (no template).

본 실험은 시판되고 있는 3종류의 *Taq* polymerase를 선택하여 이들 효소에 따른 PCR 증폭효과를 비교하였다. PCR 조건은 primer 농도는 10 pmol, *Taq* polymerase 농도는 2 units, MgCl<sub>2</sub> 농도는 3 mM, template ss whole cell을 10<sup>3</sup>~10<sup>1</sup> CFU 수준으로 이용하였다. PCR은 annealing 온도를 55℃에서 수행하였고 35 cycle을 반복하여 증폭하였다. 그 결과, 모든 종류의 *Taq* polymerase에서 10<sup>1</sup> CFU 수준에서 PCR 증폭산물을 관찰할 수 있었으며 동일한 수준의 균주를 검출하는 경우 *E. coli* O157:H7에서 *L. monocytogenes*보다 검출감도가 높았다 (Fig. 17, 18).

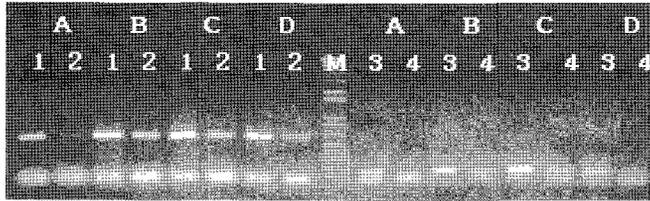


Fig. 17. Sensitivities of LP43-LP44 and C(+)-D(-) set in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*, respectively according to commercial *Taq* polymerase. A, Bioneer; B, Intron; C, Takara; D, Roche. 1~2, *E. coli* O157:H7  $1 \times 10^2 \sim 10^1$  CFU; 3~4, *L. monocytogenes*  $8 \times 10^3 \sim 10^2$  CFU.

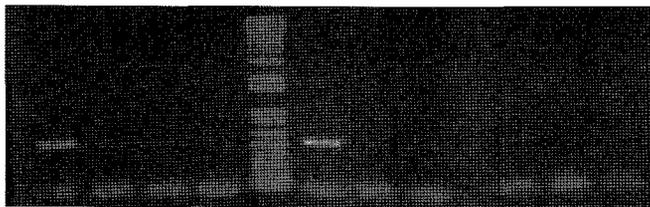


Fig. 18. Sensitivities of LP43-LP44 in detecting *E. coli* O157:H7 according to commercial *Taq* polymerase. A, Bioneer (Premix); B, Takara (Ex-); C, Intron (i-). 1~3, *E. coli* O157:H7  $2 \times 10^2 \sim 10^0$  CFU; 4, negative control (no template).

선택된 primer set 들을 이용한 PCR 최적조건을 확립하기 위하여 여러 가지 PCR factor에 대한 민감도를 조사하였다. 확인한 factor 들은 primer 농도, PCR cycle 수, annealing 온도, *Taq* polymerase의 unit,  $MgCl_2$ 의 농도 등이었다. Primer 농도는 10 pmoles, PCR cycle 수는 35~40 cycles, annealing 온도는  $55^\circ C$ , *Taq* polymerase는 2 unit,  $MgCl_2$ 는 3 mM로 적용했을 때 민감도가 비교적 높게 나왔다. 이러한 조건들을 PCR 기본조건으로 사용하여 상업적으로 판매되는 *Taq* polymerase의 효율을 비교한 결과, 전반적으로 양호하였으나 Bioneer의 경우 조금 떨어지는 경향이 있었다. 그러나, Bioneer premix의 경우 효율에 큰 차이가 없어 실험편의를 위해 이를 다음 실험들에 사용하였다. 그리고, 최적화된 PCR 방법을 이용하여 pure culture에 대한 선택 primer의 민감도를 조사한 결과 *E. coli* O157:H7은  $10^1$  cells인 반면 *L. monocytogenes*는  $10^3$  cells 수준이었다 (Fig. 19).

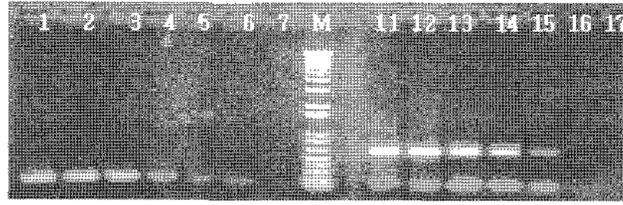


Fig. 19. Sensitivities of LP43-LP44 and C(+)-D(-) primer set in detecting *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*, respectively. Whole cell was used as a PCR template. 1~6, *L. monocytogenes*  $1.4 \times 10^6 \sim 10^1$  CFU; 7, negative control (no template); M, 1 kb plus ladder; 11~16, *E. coli* O157:H7  $2.1 \times 10^5 \sim 10^0$  CFU; 17, negative control (no template).

아. Food matrix 효과를 최소화하는 template 조제 최적방법 탐색

순수배양한 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대하여 설정한 PCR 증폭 최적 조건을 이용하여 시판되고 있는 축육 및 축육가공식품의 모델을 선정하여 검출능 (detection efficacy)를 조사하였다.

식품시료별로 전처리한 기질에 대한 PCR 증폭반응의 감도를 조사하기 위하여 시판되고 있는 PCR premix (AccuPower<sup>TM</sup>, Bioneer, Korea)에 anti-sense와 sense 프라이머를 10 pmol, DNA template인 경우 50 ng, 배양액으로부터 직접 준비한 whole cell과 이를 열처리한 cell lysate를 각각 넣고 (14, 10, 7, 5, 3, 1  $\mu$ l) PCR 증폭반응을 실시하였다. 각 시료의 특성에 따른 matrix 효과 및 검출민감도에 대한 PCR 증폭결과를 Fig. 20에서 Fig. 31까지 제시하였다.

Whole milk의 경우 *E. coli* O157:H7을 LP43-LP44 primer set로 검출하였다. 그 결과, 균주 접종된 milk를 그대로 3  $\mu$ l와 1  $\mu$ l씩 넣은 경우에는 증폭하였으나, 5  $\mu$ l 이상을 첨가할 경우 증폭산물이 검출되지 않았다 (Fig. 4-1 A). 그에 비해 원심분리 후 얻어진 whole cell에서는  $10^4$  CFU 수준에서 증폭하였으나 증폭감도는 낮았다. 이에 비해 whole cell을 98°C에서 10분간 열처리한 cell lysate를 이용한 경우  $10^4$  CFU 수준에서 높은 검출감도로 증폭하였으며, geomic DNA를 template로 이용한 경우에는  $10^3$  CFU 수준에서도 고감도로 증폭되었다 (Fig. 20, B, C, D).

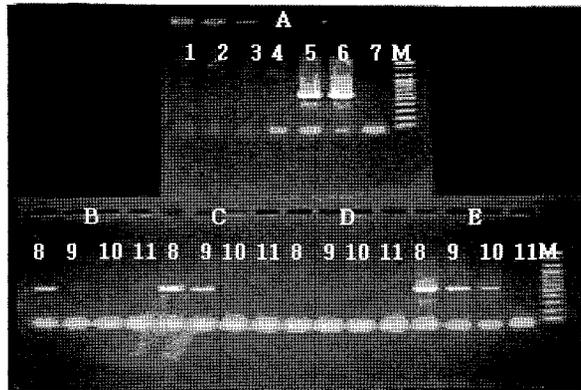


Fig. 20. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from raw milk. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l raw milk); B, whole cell; C, heat-treated cell lysate; D, supernatant of the lysate; E, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 5, 7, 3, 1  $\mu$ l raw milk, respectively; 7, negative control; 8~10, *E. coli* O157:H7  $10^5 \sim 10^3$  CFU/ml; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

Whole milk의 경우 *L. monocytogenes*에 대한 matrix 효과 및 PCR 검출감도를 실험한 결과, whole milk에 집중한 그대로를 PCR template로 이용하였을 때 5  $\mu$ l 수준까지 첨가한 경우 증폭산물이 검출되었다 (Fig. 21, A). 그러나, whole cell을 이용한 경우  $10^5$  CFU 수준에서 검출되었으며 열처리한 시료에서도 검출감도는 향상되지 않았다 (Fig. 21, B, C).

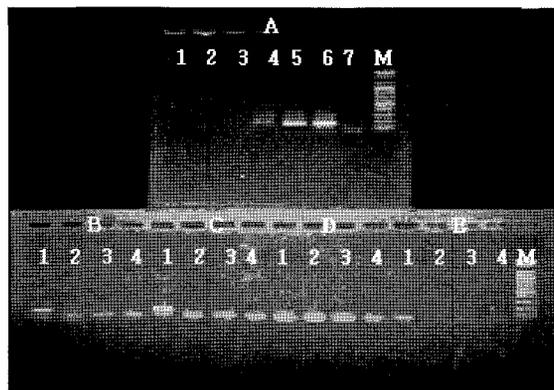


Fig. 21. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* from raw milk. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l raw milk); B, whole cell; C, heat-treated cell lysate; D, supernatant of the lysate; E, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 7, 5, 3, 1  $\mu$ l raw milk, respectively; 7, negative control; 8~10, *L. monocytogenes*  $10^5 \sim 10^3$  CFU/ml; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

모델시료로서 햄을 이용한 경우 *E. coli* O157:H7을 mEC broth 배양액과 ham 시료를 균질화한 homogenate를 각각 5 µl 수준에서 첨가하였을 때, PCR 증폭에 방해받지 않았음을 보여주었다 (Fig. 22, A, B). 그러나 whole cell에서 (Fig. 22, C)  $10^5$  CFU 수준에서 검출되었으며 열처리한 cell lysate는  $10^4$  CFU, genomic DNA를 template를 이용한 경우에는  $10^4$  CFU 수준에서 검출이 가능하였다 (Fig. 22, D, F). 그러나, *L. monocytogenes*는 Listeria enrichment broth에서 증균한 배양액을 그대로 template로 이용한 경우 5 µl 첨가수준에서 증폭하였고 햄 시료의 homogenate를 그대로 첨가한 경우 첨가량 7 µl인 경우에도 *L. monocytogenes*는 증폭하였다 (Fig. 23, A, B). 그러나, whole cell, cell lysate와 genomic DNA를 각각 PCR template로 이용한 경우에는 *L. monocytogenes* 특이적 프라이머인 C(+)-D(-)의 인식부위 증폭산물이 검출되지 않았다 (Fig. 23, C, D, F).

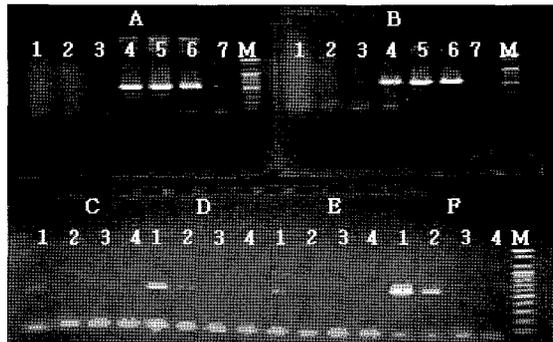


Fig. 22. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from ham. A, matrix effect test (14~0 µl mEC broth); B, matrix effect test (14~0 µl ham sample homogenate) C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 7, 5, 3, 1 µl mEC broth (or ham sample homogenate), respectively; 7, negative control, 8~10, *E. coli* O157:H7  $10^5 \sim 10^3$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

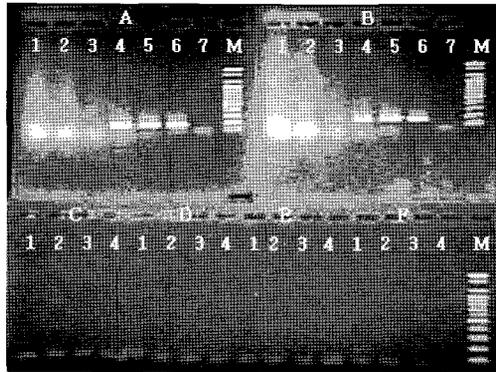


Fig. 23. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) set in detecting *L. monocytogenes* from ham. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l Listeria enrichment broth); B, matrix effect test (14~0  $\mu$ l ham sample homogenate); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 5, 3, 1, 0  $\mu$ l mEC broth (or ham sample homogenate), respectively; 7, negative control, 8~10, *L. monocytogenes*  $10^5$ ~ $10^3$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

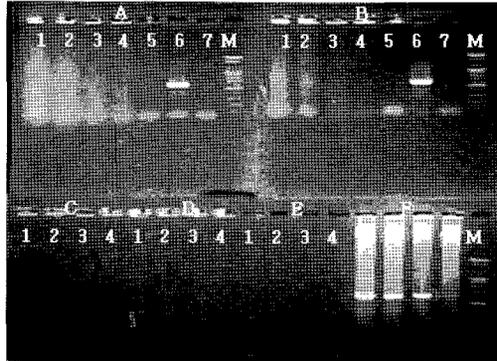


Fig. 24. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from chicken meat. A, matrix effect test (14~1  $\mu$ l chicken meat sample homogenate); B, matrix effect test (14~1  $\mu$ l chicken meat sample homogenate for direct PCR) C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 7, 5, 3, 1  $\mu$ l chicken meat sample homogenate (or chicken meat sample homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control, 8~10, *E. coli* O157:H7  $10^6$ ~ $10^4$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

모델시료로서 생닭고기를 이용하여 실험한 결과를 Fig. 24에 제시하였다. *E. coli* O157:H7을 생닭고기에 접종하여 균질화한 homogenate를 template로 이용한 경우 1  $\mu$ l를 첨가한 경우에만 PCR 증폭산물이 검출되었다 (Fig. 24, A). Homogenate를 원심분리하여 얻어진 whole cell과 이를 열처리한 cell lysate를 template로 이용한 결과 *E. coli* O157:H7은 증폭되지 않았으며 genomic DNA를 이용한 경우에만  $10^3$  CFU 수준에서 검출이 가능하였다 (Fig. 24, C, D, F). 반면에 생닭고기에 *L. monocytogenes*를 접종하여 이를 template로 이용한 결과, 3  $\mu$ l 수준에서 첨가한 경우에만 target bacteria가 증폭하였고 과량 첨가한 경우에는 증폭을 방해한 것으로 나타났다 (Fig. 25, A, B). 또한, whole cell을 첨가한 경우에는 증폭산물을 검출할 수 없었으며 열처리한 cell lysate를 template로 이용한 경우  $10^5$  CFU, genomic DNA를 template로 첨가한 경우에는  $10^4$  CFU 수준에서 증폭이 가능하였다 (Fig. 25, D, F). 모델식품으로서 돼지고기를 이용하여 target 균을 검출한 결과를 Fig. 4-7 과 4-8에 제시하였다. *E. coli* O157:H7을 증식시킨 배양액을 그대로 PCR template로 이용한 경우, 3  $\mu$ l 첨가수준에서 검출이 가능하였으며 돼지고기 시료에 접종한 후 이를 균질화한 시료를 그대로 첨가한 경우에는 1  $\mu$ l 첨가수준에서만 증폭이 가능하였다 (Fig. 26, A, B). 돼지고기의 경우, whole cell, cell lysate를 PCR template로 이용한 경우 *E. coli* O157:H7이 검출되지 않았으나 genomic DNA를 이용한 경우  $10^3$  CFU 수준에서 고감도로 검출되었다 (Fig. 26, C, D, F). 그러나, *L. monocytogenes*를 검출하기 위하여 LEB에서 증균한 배양액을 PCR에 적용한 경우 3  $\mu$ l 첨가수준에서 검출되었으며 돼지고기에 접종시켜 증균한 homogenate를 그대로 PCR template로 이용한 경우에도 3  $\mu$ l 첨가수준에서 PCR 증폭이 가능하였다 (Fig. 27, A, B). 돼지고기에 접종하여 증균한 후 얻어진 whole cell과 이를 열처리한 cell lysate를 template로 이용한 경우 *L. monocytogenes*가 검출되지 않았으며 genomic DNA를 이용한 경우  $10^5$  CFU 수준에서 검출이 가능하였다.

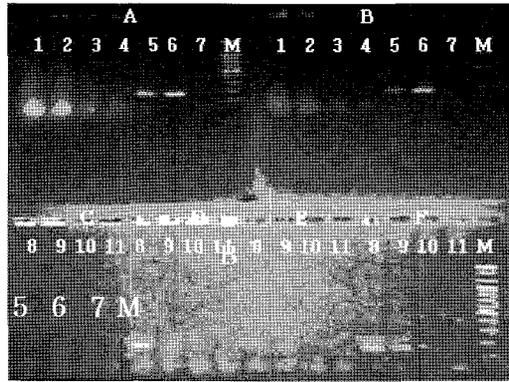


Fig. 25. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) primer set in detecting *L. monocytogenes* from chicken meat. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l chicken meat sample homogenate); B, matrix effect test (14~0  $\mu$ l chicken meat sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 5, 3, 1, 0  $\mu$ l chicken meat sample homogenate (or chicken meat sample homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control, 8~10, *E. coli* O157:H7  $10^6 \sim 10^1$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

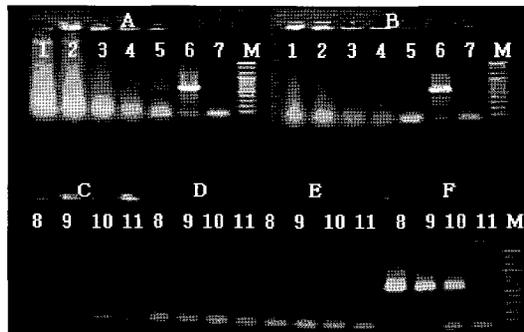


Fig. 26. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from pork. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l pork sample homogenate); B, matrix effect test (14~0  $\mu$ l pork sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 5, 3, 1, 0  $\mu$ l pork sample homogenate (or pork sample homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 8~10, *E. coli* O157:H7  $10^6 \sim 10^4$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

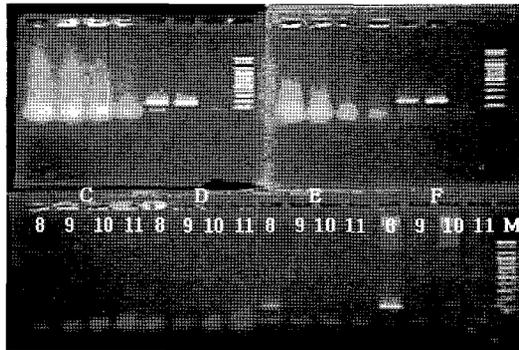


Fig. 27. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) primer set in detecting *L. monocytogenes* from pork. A, matrix effect test (14~0  $\mu$ l pork sample homogenate); B, matrix effect test (14~0  $\mu$ l pork sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~6, addition of 14, 10, 5, 3, 1, 0  $\mu$ l pork sample homogenate (or pork homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 8~10, *L. monocytogenes*  $10^6$ ~ $10^4$  CFU/g; 11, negative control; M, 100 bp ladder.

축육가공품에서 즉석식품 형태로 제조 판매되는 식품인 족발 (steamed pork leg)을 모델식품으로 선택하여 matrix effect 및 PCR 검출감도 실험에 응용하였다. Fig. 28에 제시한 바대로 족발에 *E. coli* O157:H7을 접종하여 균질화한 시료를 그대로 PCR에 적용하였을때 5  $\mu$ l 수준에서 첨가한 경우 고감도로 검출이 가능하였다 (Fig. 28, A, B). *E. coli* O157:H7을 접종하여 이를 원심분리한 다음 얻어진 whole cell을 PCR template로 이용한 경우  $10^4$  CFU 수준에서 고감도로 검출되었으며 cell lysate는  $10^5$  CFU, genomic DNA를 이용한 경우  $10^4$  CFU 수준에서 고감도로 검출되었다. 그러나, whole cell을 그대로 template로 이용한 것 보다 genomic DNA를 이용한 것이 검출감도가 월등히 향상되었다 (Fig. 28, C, F). *L. monocytogenes*를 검출한 결과를 Fig. 29에 제시하였다. LEB 배양액에서 증균한 것을 그대로 template로 이용한 것과 족발에 접종하여 이를 균질화한 다음 직접 template로 이용한 결과는 5  $\mu$ l 수준까지 첨가하여도 PCR 증폭을 방해하지 않고 *L. monocytogenes*가 증폭되었음을 알 수 있었다 (Fig. 29, A, B).

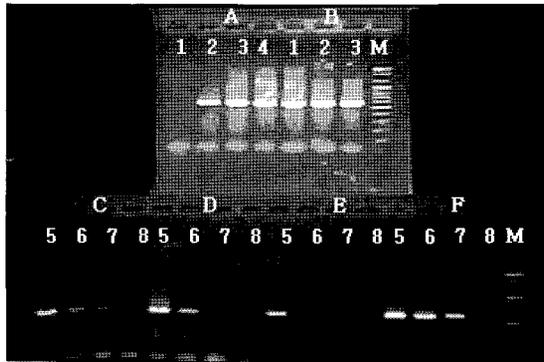


Fig. 28. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from zocbal. A, matrix effect test (5~0 µl zocbal sample homogenate); B, matrix effect test (5~1 µl zocbal sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~4, addition of 5, 3, 1, 0 µl zocbal sample homogenate (or zocbal sample homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 5~7, *E. coli* O157:H7  $10^6\sim10^4$  CFU/g; 8, negative control; M, 100 bp ladder.

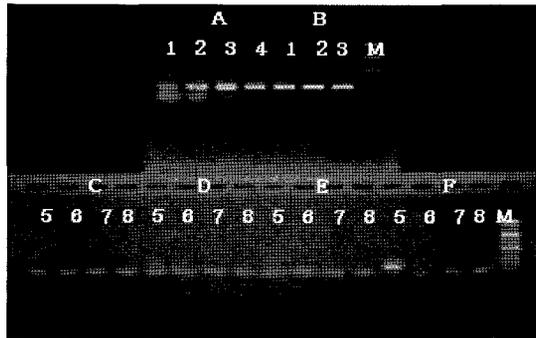


Fig. 29. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) primer set in detecting *L. monocytogenes* from zocbal. A, matrix effect test (5~0 µl zocbal sample homogenate); B, matrix effect test (5~1 µl zocbal sample homogenate for direct PCR) C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~4, addition of 5, 3, 1, 0 µl zocbal sample homogenate (or zocbal homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 5~7, *L. monocytogenes*  $10^6\sim10^4$  CFU/g; 8, negative control; M, 100 bp ladder.

그러나, whole cell과 이를 열처리한 cell lysate를 template로 이용한 경우에는 target bacteria의 증폭산물이 검출되지 않았으며  $10^6$  CFU 수준의 *L. monocytogenes*에서 분리한 genomic DNA만이 증폭산물을 관찰할 수 있었다 (Fig. 29, C, D, F).

축육가공품의 다른 즉석식품형태인 순대를 구입하여 PCR 방해효과 및 검출감도에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과, 순대에 *E. coli* O157:H7을 접종하여 증균한 후 이를 직접 PCR에 적용한 경우 5  $\mu$ l 첨가량 수준에서 PCR 증폭이 가능하였으며 (Fig. 4~11, B), whole cell과 cell lysate를 template로 이용한 경우  $10^6$  CFU 수준에서 검출이 가능하였다. 그러나, genomic DNA를 template로 이용한 경우 검출감도는 크게 향상되어  $10^4$  CFU 수준에서 고감도로 검출되었다 (Fig. 30, C, D, F).

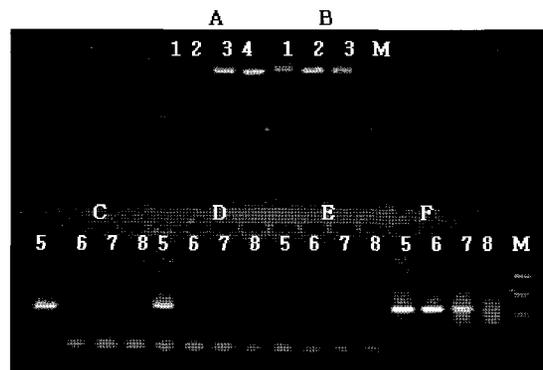


Fig. 30. Matrix effect and sensitivities of LP43-LP44 set in detecting *E. coli* O157:H7 from sundae. A, matrix effect test (5~0  $\mu$ l sundae sample homogenate); B, matrix effect test (5~1  $\mu$ l sundae sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~4, addition of 5, 3, 1, 0  $\mu$ l sundae sample homogenate (or sundae sample homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 5~7, *E. coli* O157:H7  $10^6$ ~ $10^4$  CFU/g; 8, negative control; M, 100 bp ladder.

또한, *L. monocytogenes*에 대한 검출을 시도한 경우, 시료의 homogenate를 직접 PCR template로 이용한 경우 5  $\mu$ l 수준에서 증폭이 되었으며 whole cell, cell lysate 및 genomic DNA를 각각 template로 이용한 경우에는  $10^6$  CFU 수준에서 검출이 가능하였다 (Fig. 31, C, D, F).

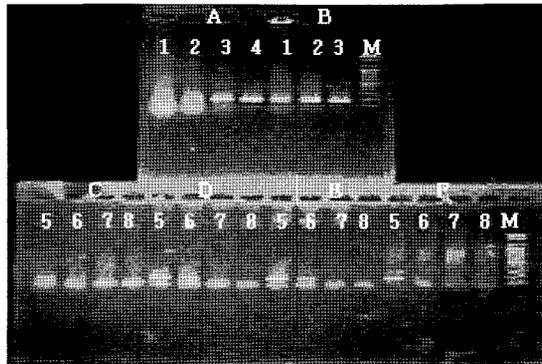


Fig. 31. Matrix effect and sensitivities of C(+)-D(-) primer set in detecting *L. monocytogenes* from sundae. A, matrix effect test (5~0  $\mu$ l sundae sample homogenate); B, matrix effect test (5~1  $\mu$ l sundae sample homogenate for direct PCR); C, whole cell; D, heat-treated cell lysate; E, supernatant of the lysate; F, isolated DNA. 1~4, addition of 5, 3, 1, 0  $\mu$ l sundae sample homogenate (or sundae homogenate for direct PCR), respectively; 7, negative control; 5~7, *L. monocytogenes*  $10^6 \sim 10^4$  CFU/g; 8, negative control; M, 100 bp ladder.

이상과 같이 축육 및 축육가공식품의 대표적인 모델식품을 5군 선정하여 PCR 증폭 반응에 미치는 matrix 효과와 검출감도에 대한 실험을 수행한 결과, 우유, 햄, 족발, 순대의 경우 matrix의 영향을 비교적 덜 받았으나 돈육과 계육의 경우 matrix의 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한, template type에 따른 PCR 민감도는 대부분의 시료에서 정제된 DNA가 가장 높게 나왔으며 *E. coli* O157:H7이 *L. monocytogenes*에 비해 검출감도가 높았다. 그러나, 원심분리 및 열처리 등의 물리적 방법으로 조제한 template의 경우 예상과는 달리 민감도가 낮게 나왔는데 이는 실험오차라 생각되어 다음과 같이 반복 실험을 수행하였다.

#### 자. Template type에 따른 식품별 검출민감도 조사

이상의 실험을 통해 식품의 특성별로 PCR 증폭에 미치는 matrix 효과가 존재하는 것으로 확인되어, 본 실험에서는 template type에 따른 PCR 증폭검출 민감도를 비교하고 matrix 효과를 최소화할 수 있는 방법을 찾아보고자 하였다. 그 결과, *E. coli* O157:H7의 경우, 우유에서는 원심분리로 회수한 whole cell을 template로 이용한 경우  $10^5$  CFU 수준에서 검출 가능하였으나 열처리한 cell lysate는  $10^3$  CFU, 그리고 genomic DNA를 이용한 경우에는  $10^3$  CFU 수준에서 검출 가능하였다 (Fig. 32, A, B, D).

i) Milk

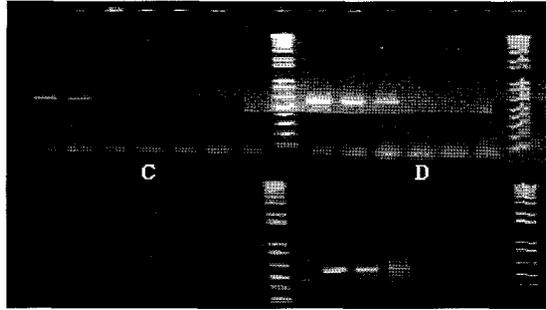


Fig. 32. A, whole cell; B, heat-treated cell lysate; C, supernatant of the lysate; D, isolated DNA. 1~5, *E. coli* O157:H7  $2.1 \times 10^6 \sim 10^2$ ; 6, no spiked milk; 7, negative control (no template); M, 1 kb plus ladder.

그러나, *L. monocytogenes*는 검출감도가 상당히 낮아서 whole cell의 경우  $10^6$  CFU, cell lysate는  $10^5$  CFU 수준에서 검출되었고 genomic DNA를 template로 이용한 경우에도  $10^6$  CFU 수준에서 검출 가능하였다 (Fig. 33, A, B, D).

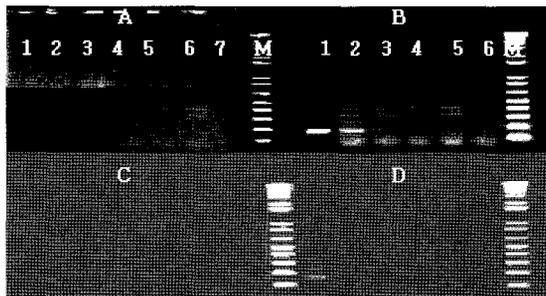


Fig. 33. A, whole cell; B, heat-treated cell lysate; C, supernatant of the lysate; D, isolated DNA. 1~5, *L. monocytogenes*  $7.2 \times 10^6 \sim 10^2$ ; 6, no spiked milk; 7, negative control (no template); M, 1 kb plus ladder.

햄에 인위적으로 접종한 각각의 균주의 template type에 따른 검출력을 확인하기 위하여 실험한 결과, 검출 한계치가 크게 낮아졌음을 알 수 있었다 (Fig. 34). *E. coli* O157:H7인 경우, whole cell을 증폭시켰을 때  $10^3$  CFU 수준에서 검출되었고 cell lysate는  $10^4$  CFU, genomic DNA로 증폭시켰을 때는  $10^2$  CFU 수준에서 검출되었다 (Fig. 32, A, B, D). 반면, *L. monocytogenes*는 whole cell의 경우  $10^4$  CFU, cell lysate는  $10^5$  CFU, genomic DNA는  $10^4$  CFU 수준에서 검출되어 *E. coli* O157:H7 보다는 검출감도가 낮았다 (Fig. 34, E, F, H).

ii) Ham

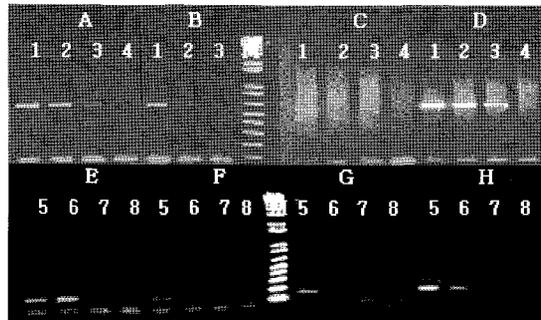


Fig. 34. A, E, heat-treated cell lysate; B, F, supernatant of the lysate; C, G, isolated DNA (phenol:chloroform extraction); D, H, isolated DNA (genomic DNA isolation kit, Bio-Rad). 1~3, *E. coli* O157:H7  $5 \times 10^5 \sim 10^3$ ; 4, no spiked ham; 5~7, *L. monocytogenes*  $6 \times 10^6 \sim 10^4$ ; 8, no spiked ham; M, 1 kb plus ladder.

Cheese에 오염시킨 균주를 회수하여 PCR 증폭을 시키기 위해 25 g의 시료를 취하여 스토마킹을 한 결과, 균질화된 시료의 phase가 분리되지 않았다. 따라서, *E. coli* O157:H7은 물론, *L. monocytogenes*도 DNA template만이 증폭이 가능하였으며 검출감도는 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*는 각각  $10^3$  CFU와  $10^5$  CFU 수준에서 검출 가능하였다 (Fig. 35, D, H).

iii) Cheese

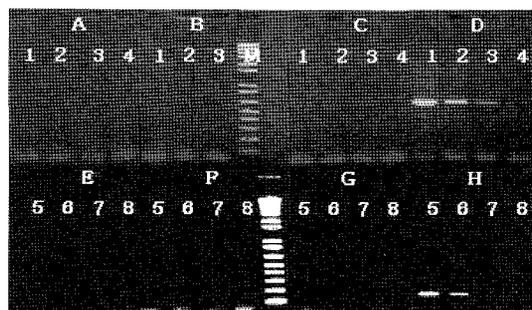


Fig. 35. A, E, heat-treated cell lysate; B, F, supernatant of the lysate; C, G, isolated DNA (phenol:chloroform extraction); D, H, isolated DNA (genomic DNA isolation kit, Bio-Rad). 1~3, *E. coli* O157:H7  $5 \times 10^5 \sim 10^3$ ; 4, no spiked cheese sample; 5~7, *L. monocytogenes*  $6 \times 10^6 \sim 10^4$ ; 8, no spiked cheese sample.

생닭으로부터 분리한 whole cell, cell lysate 및 genomic DNA를 template로 이용하여 PCR 증폭시킨 결과, 98°C에서 10분간 열처리한 cell lysate와 genomic DNA에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*는  $10^4$  CFU 수준에서 검출되었으나 DNA template를 이용한 경우, 검출감도가 다소 높았다 (Fig. 36, C, F).

#### iv) Chicken meat

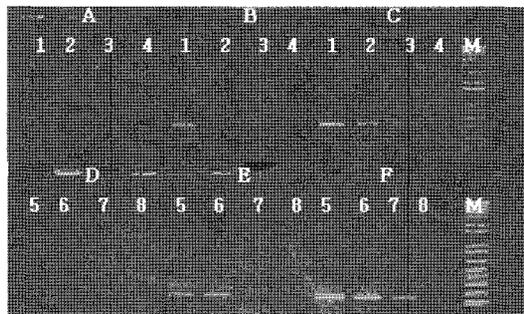


Fig. 36. A, D, whole cell; B, E, heat-treated cell lysate; C, F, isolated DNA. 1~4, *E. coli* O157:H7  $1.2 \times 10^6 \sim 10^3$  CFU/g; 5~8, *L. monocytogenes*  $7.5 \times 10^6 \sim 10^3$  CFU/g.

이상의 실험결과를 비교해보면, whole cell를 PCR template로 이용했을 경우 *E. coli* O157:H7은  $10^4$  CFU 수준까지 검출이 가능했으나 98°C에서 10분간 열처리함으로써 검출감도가  $10^1$ 까지 향상되었다. 반면, *L. monocytogenes*는  $10^5$  수준에서 검출이 가능하여 검출감도가 비교적 낮았다. 이는 *L. monocytogenes*가 그람양성균으로 peptidoglycan으로 형성된 세포벽을 지니고 있어 세포내의 DNA 용출이 용이하지 않기 때문인 것으로 보고되고 있다. 원심분리하여 식품으로부터 오염된 박테리아를 회수하여 열처리를 통해 DNA 용출을 용이하게 하였으나 *L. monocytogenes*의 경우 크게 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한, cheese와 같이 완전히 균질화되어 상분리가 어려운 시료는 반드시 genomic DNA를 추출하여 PCR template로 이용해야 하는 시료도 있다. 그리고, 모든 종류의 식품시료에서 오염된 식중독균들을 증균시킨 다음 회수하여 열처리한 cell lysate를 PCR template로 이용한 경우  $10^0$  수준에서 검출이 가능하였다 (Table 2).

Table 2. Detection limits of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in artificially inoculated food samples before (whole cell, heat-treated cell lysate, genomic DNA isolate) and after (heat-treated cell lysate) enrichment.

Food sample	Detection limit (initial CFU/ml or g) of <i>E. coli</i> O157:H7 ( <i>L. monocytogenes</i> )			
	Before enrichment			After enrichment
	Whole cell	Heat-treated cell lysate	Genomic DNA isolate	Heat-treated cell lysate
Raw milk	$\geq 10^5$ ( $10^6$ )	$\geq 10^4$ ( $10^5$ )	$\geq 10^4$ ( $10^6$ )	$\geq 10^0$ ( $10^0$ )
Raw chicken meat	ND <sup>a</sup> (ND)	$\geq 10^4$ ( $10^5$ )	$\geq 10^4$ ( $10^5$ )	$\geq 10^0$ ( $10^0$ )
Ham	$\geq 10^4$ ( $10^5$ )	$\geq 10^3$ ( $10^5$ )	$\geq 10^3$ ( $10^5$ )	$\geq 10^0$ ( $10^0$ )
Cheese	ND (ND)	ND (ND)	$\geq 10^3$ ( $10^5$ )	$\geq 10^0$ ( $10^0$ )

<sup>a</sup> No detection.

PCR was performed with 10 pmole primers using 2  $\mu$ l of each preparative template in 20  $\mu$ l PCR mixture. *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were enriched for 8 hr at 37°C and 24 hr at 37°C, respectively. Each sample was artificially inoculated with the following range. Raw milk,  $10^6$  to  $10^2$  CFU/ml of milk; raw chicken meat,  $10^6$  to  $10^3$  CFU/g of meat; ham,  $10^5$  to  $10^3$  CFU/g of ham; cheese,  $10^5$  to  $10^3$  CFU/g of cheese sample.

#### 차. Nested PCR 최적 조건설정 및 식품 적용성

Nested PCR은 원하는 목적유전자의 증폭산물 이외의 영역으로부터 유래하는 비특이적인 산물을 제거하거나 검출감도를 향상시키기 위하여 이용된다. 본 연구에서는 상기의 실험에서 사용한 primer set에서 forward primer는 그대로 이용하고 reverse primer 부위를 교체하는 semi-nested PCR법을 실험하였다. *E. coli* O157:H7의 경우 *slt II* 유래의 primer인 LP43-LP44 (584 bp) primer set를 1차 PCR 증폭을 위하여 이용하였고 2차 PCR 증폭에는 reverse primer로 동일한 *slt II* 유래의 primer (증폭산물 320 bp)를 이용하였다.

그 결과, 1차 PCR 산물을 전기영동상에서 확인하였을 때 *E. coli* O157:H7과 *L.*

*monocytogenes*의 pure culture를 PCR 증폭한 경우, 두 병원균 모두  $10^2$  cell 수준에서 검출이 가능하였으나 2차 PCR 증폭결과 (semi-nested PCR 적용), *E. coli* O157:H7은  $10^1$  cell, *L. monocytogenes*는  $10^2$  cell 수준에서 검출되었다. 그러나, semi-nested PCR을 적용한 결과에서 검출민감도는 향상되었으나, 증폭산물의 background가 관찰되었으며 비특이적인 산물도 검출되었다. 이는 2차 PCR 증폭 cycle 수 등의 증폭조건을 조정함으로써 개선될 수 있다고 판단된다 (Fig. 37).

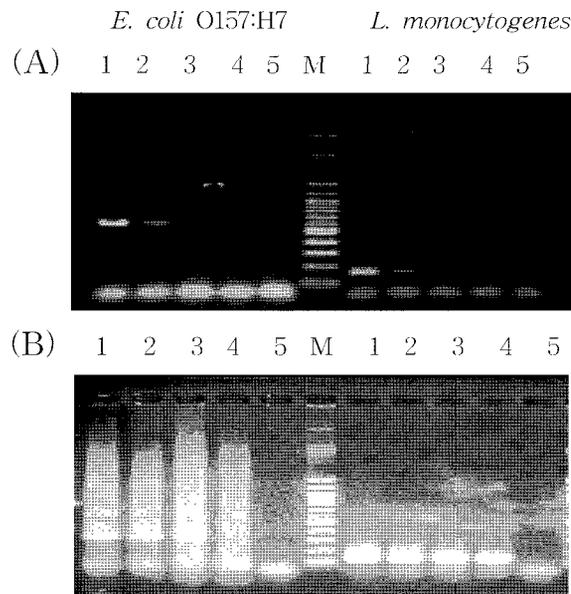


Fig. 37. Semi-nested PCR with pure culture of *E. coli* O157:H7 using LP43-LP44 (584 bp), upper-left panel; LP43-*sltII* R nested (320 bp), lower-left panel and *L. monocytogenes* using C(+)-D(-) (161 bp), upper-right panel; C(+)-*hly* A R nested (123 bp), lower-right panel. Lane 1~4,  $10^3$  to  $10^0$  cells in a 20  $\mu$ l of PCR mixture; lane 5, negative control. Panel A, 1<sup>st</sup> PCR; panel B, 2<sup>nd</sup> PCR (semi-nested PCR).

다음은 *E. coli* O157:H7을 우유와 돼지고기에 오염시킨 다음 PCR 검출한 결과로서,  $10^4$  cell 수준에서 검출되었으며, *L. monocytogenes*인 경우에도 각각의 시료에서  $10^4$  cell 수준에서 검출되었다. 그러나, semi-nested PCR을 적용하여 2차 PCR 증폭 후 산물을 검토한 결과, *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*는 우유에서는  $10^2$  cell, 돼지고기에서는  $10^1$  cell 수준에서 검출 가능하였다 (Fig. 38).

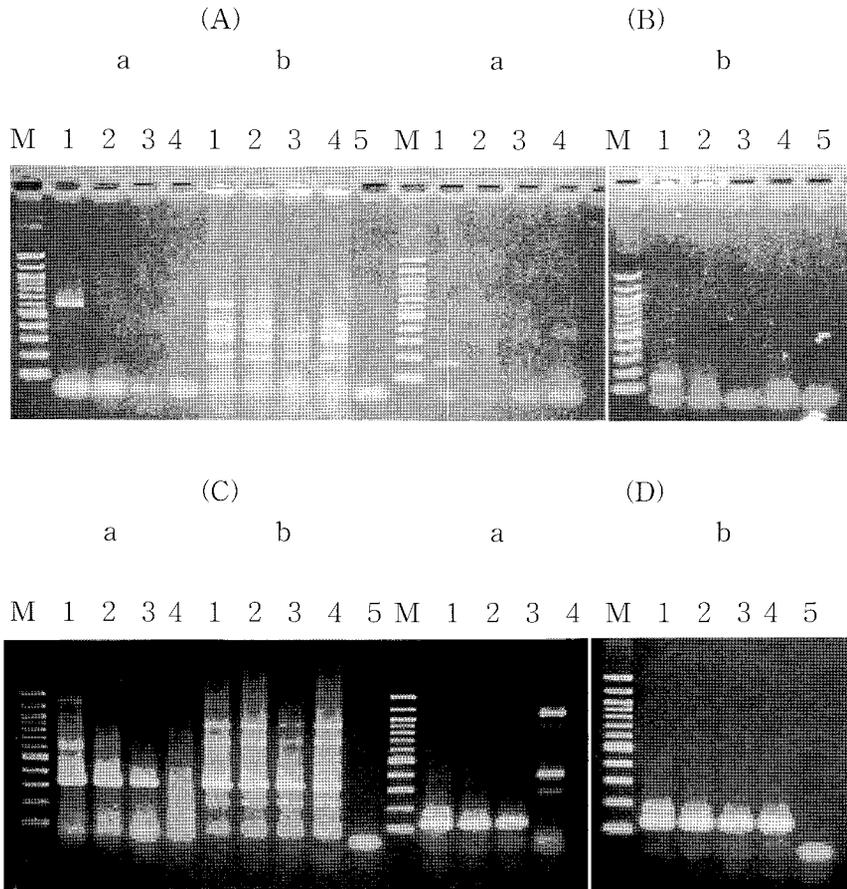


Fig. 38. Semi-nested PCR with pure culture of *E. coli* O157:H7 using LP43-LP44 (584 bp), A panel-a, b; LP43-*sltII* R nested (320 bp), C panel-a, b and *L. monocytogenes* using C(+)-D(-) (161 bp), B panel-a, b; C(+)-*hly* A R nested (123 bp), D panel-a, b. a, whole milk; b, raw pork. Lane 1~4, *E. coli* O157:H7 or *L. monocytogenes*  $10^4 \sim 10^1$  cells/ml (g); 5, negative control; M, 100 bp ladder (BioLabs).

#### 카. PCR 검출방법의 field test에의 적용성 검토

이상의 실험을 통해 최적화시킨 시료 전처리방법, template 조제방법, 그리고 PCR 증폭조건을 이용하여 현장에서 오염된 시료의 신속검출에의 이용가능성에 대한 적용성 (applicability)을 검토하였다. 현장에서의 시료채취는 1월, 5월, 7월의 세 번에 걸쳐 수행 되었으며 시료수거는 재래시장, 슈퍼마켓, 대형 마트 등지에서 실시하였다. 현장검정용 시료는 축육 및 그 가공식품 (돈육, 우육, 수입우육, 순대, 족발, 생닭 등)으로 하였으며, 시료를 수거할 때에는 교차오염이 일어나지 않도록 pre-sterilized 비닐 팩에 포장하여

냉장처리된 박스에 넣어 수거한 다음 저장기간 없이 시료 전처리를 수행하였다.

#### 1) 1차 현장시료 적용성 실험

각각의 시료는 실험실에서 개봉하여 10 g씩 분취하여 여기에 0.1% peptone 수를 가한 다음 스토마킹 하였다. 스토마킹 한 시료를 여과하여 1 ml씩 멸균된 튜브에 넣고 9 ml의 증균배양액을 가하였다. 이를 37°C에서 8시간 증균배양한 다음 1 ml씩 취하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 침전물을 취하여 여기에 1 ml의 증류수로 씻어낸 다음 다시 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 여기에 100 µl의 증류수를 넣고 현탁시킨 후 98°C에서 10분간 열처리 하였다. 열처리한 시료를 cell lysate로 하여 2 µl 취하여 직접 PCR template로 이용하였다. 각 병원균에 대한 의양성 및 의음성 결과물에 대한 가능성을 없애기 위하여 *E. coli* O167:H7에 대한 1차 스크리닝은 PT2-3 프라이머를 이용하였으며 *L. monocytogenes*는 C(+)-D(-) 프라이머를 이용하였다. 1차 스크리닝에서 검출된 시료에 한해서 *E. coli* O157:H7은 PF8-PR8, LP3-31, 그리고 LP43-LP44 등의 특이적 프라이머를 이용하였으며, *L. monocytogenes*는 MonoA-Lis1B를 이용하여 검출확인 실험을 수행하였다.

각각의 병원균에 대한 1차 스크리닝 PCR 증폭실험 결과를 Fig. 39에서 비교해 보면, T 마트의 생닭 (Fig. 39, A1)과 순대 (Fig. 39, A4), 재래시장 (1)의 돈육 (Fig. 39, B2)과 족발 (Fig. 39, B3), 재래시장 (2)에서 구입한 생닭 (Fig. 39, D1)과 순대 (Fig. 39, D4)에서 *E. coli* O157:H7이 양성으로 검출되었다. *L. monocytogenes*의 오염여부를 체크하기 위하여 1차 스크리닝 목적으로 C(+)-D(-)의 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 Fig. 40에서 제시한 바와 같이 T마트에서 구입한 돈육 (Fig. 40, A2), L마트의 돈육 (Fig. 40, A2), 그리고 재래시장 (2)에서 구입한 돈육 (Fig. 40, D2)에서 *L. monocytogenes*가 검출되었다. 따라서, 1차 실험에서 양성검출된 시료 9점을 대상으로 확인실험을 수행하였다. Fig. 41 (panels A, B, C)에서 보여지는 바와 같이 각각의 species-specific primer에 의한 2차 검출반응에서 *E. coli* O157:H7은 모두 음성반응을 보였으나 *L. monocytogenes* 특이적 검출용 프라이머로 증폭한 2 종류의 돈육에서 *L. monocytogenes*가 양성으로 검출되었다 (Fig. 41, D11, D12).

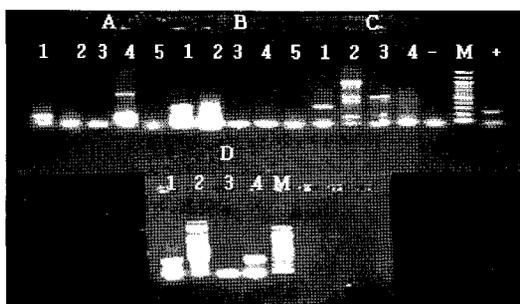


Fig. 39. Detection of *E. coli* O157:H7 (PT2, 3 - 252 bp) from meat products collected in the markets. A, T mart; B, L supermarket; C, J market; D, Z market. 1, chicken meat; 2, pork; 3, zocbal; 4, sundae; 5, beef; +, positive control (pure culture); -, negative control (no template); M, 100 bp ladder (BioLabs).

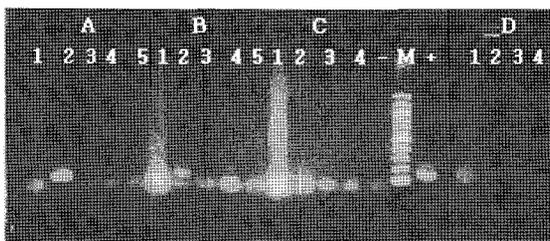


Fig. 40. Detection of *L. monocytogenes* (C(+), D(-) - 161 bp) from meat products collected in the markets. A, T mart; B, L supermarket; C, J market; D, Z market. 1, chicken meat; 2, pork; 3, zocbal; 4, sundae; 5, beef; +, positive control (pure culture); -, negative control (no template); M, 100 bp ladder (BioLabs).

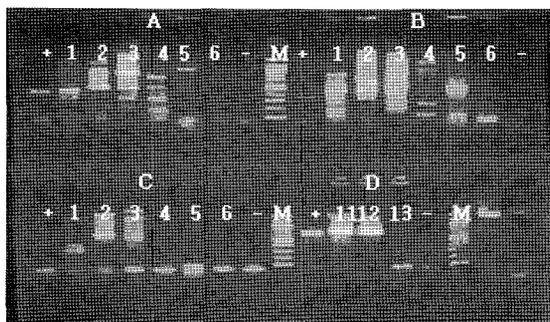


Fig. 41. Confirmation of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* with species-specific primers. A, PF8 PR8-420 bp; B, LP30 31-348 bp; C, LP43 44-584 bp. 1, A1; 2, A4; 3, C2; 4, C3; 5, D1; 6, D4 (upper panel); *L. monocytogenes*; D, MonoA Lis1B 660 bp; 11, A2; 12, B2; 13, D2 (upper panel); +, positive control (pure culture); -, negative control (no template); M, 100 bp ladder (BioLabs).

## 2) 2차 현장시료 적용성 실험

지방에서 수거한 시료를 실험실로 가져와 10 g씩 무균적으로 취하여 0.1% peptone 수 90 ml를 가하고 스토마킹 하였다. 스토마킹 한 후 filter를 통과한 여액을 1 ml씩 취하여 멸균 시험관에 넣고 증균배지를 9 ml 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 증균배양액 1 ml씩을 취하여 16,000 g에서 10분간 원심분리 후 상등액을 버리고 침전물은 3차 증류수로 2회 세척 후 같은 조건으로 원심분리 후 상등액을 버린 후 침전물은 3차 증류수 100 µl에 현탁하였다. 현탁물을 98°C에서 10 분간 열처리한 후 2 µl를 취하여 PCR template로 사용하였다. 의사양성의 가능성을 없애기 위해 1차 스크리닝 실험으로 양성인 시료에 대하여 2차 확인실험을 실시하였다. 스크리닝 실험에 사용한 primer 들은 *E. coli* O157:H7의 경우 PT2-PT3 프라이머 쌍이었고 *L. monocytogenes*의 경우 C(+)-D(-) 프라이머 쌍이었다. 확인실험에 사용한 프라이머들은 *E. coli* O157:H7의 경우 LP30-LP31, LP43-LP44, AE19-AE20 프라이머 쌍이었고 *L. monocytogenes*의 경우 MonoA-Lis1B 프라이머 쌍이었다.

수거한 시료들에 대한 두 병원균의 PCR 스크리닝 결과, A 마트와 D3 마트의 생닭 (Fig. 42- 7, 11 lane)에서 *E. coli* O157:H7에 특이적인 band가 증폭되었고 B 마트, C 마트, D4 마트, D3 마트의 생닭 (Fig. 43- 8, 9, 10, 11 lane)에서 *L. monocytogenes*에 특이적인 band가 증폭되었다. 1차 스크리닝 단계에서 두 균에 대해 양성으로 나타난 시료는 다른 프라이머들을 이용해서 확인실험을 수행하였다. 확인실험 결과, 1차에서 *E. coli* O157:H7 양성으로 나온 두 시료 모두 각각의 프라이머 쌍들에 대한 특이적인 band가 증폭되지 않아 (Fig. 42(B)- A7, A11, B7, B11, C7, C11 lane), 수거한 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7이 검출되지 않은 것으로 결론지었다. 1차에서 *L. monocytogenes* 양성으로 나온 네 시료에 대한 확인실험 결과 B 마트 생닭의 경우 특이적인 크기의 band가 뚜렷하게 나타났고 (Fig. 43(B)- 8 lane) 나머지 세 시료는 band가 약하거나 (10, 11 lane) 크기가 약간 차이가 있어 (lane 9) 선택배지를 사용하여 재확인실험을 수행하였다. 증균했던 네 군데 마트의 생닭시료를 *L. monocytogenes* 선택배지 (Chromagar™, Chromagar microbiology, France)에 도말한 결과 B 마트에서 수거한 시료의 colony만 양성을 나타내었고 나머지는 음성으로 나타났다 (data not shown). 최종적으로 선택배지상에서 양성인 colony를 배양하여 두 프라이머 쌍(C(+)-D(-), MonoA-Lis1B)을 이용한 PCR을 수행하였다. 그 결과 양성을 나타낸 colony의 경우만 *L. monocytogenes*에 특이적 band가 증폭되었고 (Fig. 44- A3, B3 lane) 나머지는 그렇지

않았다. 결론적으로 *L. monocytogenes*의 경우 B 마트의 생닭에서만 검출이 되었다.

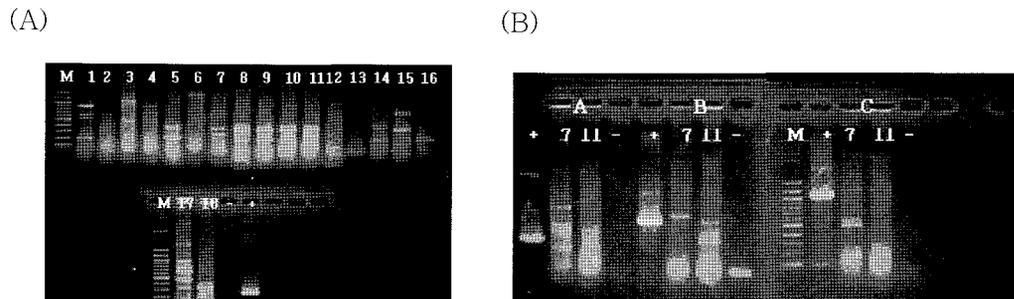


Fig. 42. Detection of *E. coli* O157:H7 with different primer set. Upper panel, primer set, PT2-3 (252 bp); lower panel, LP30-31 (348 bp), LP43-44 (584 bp), AE19-20 (1087 bp); M, 100 bp ladder. 1~6, pork (1, D1 mart; 2, D2 mart; 3, D3 mart; 4, C mart; 5, B mart; 6, A mart); 7~11, chicken meat (7, A mart; 8, B mart; 9, C mart; 10, D4 mart; 11, D3 mart); 12~14, sundae (12, D5 mart; 13, C mart; 14, B mart); 15~16, zocbal (15, C mart 16, B mart); 17~18, beef (17, A mart; 18, B mart); +, positive control; -, negative control; A, LP30, 31-348 bp; B, LP43, 44-584 bp; C, AE19, 20-1087 bp.

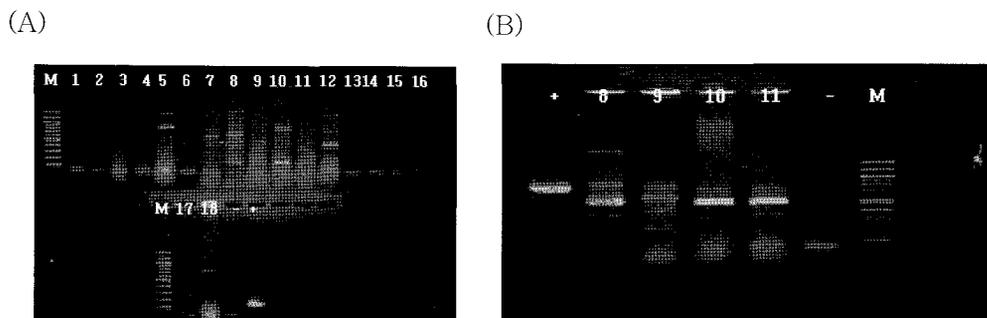


Fig. 43. Detection of *L. monocytogenes* using two-step PCR with species-specific primers, C(+)-D(-) (161 bp) for first screening (panel A) and MonoA-Lis1B (660 bp) for second screening (panel B). M, 100 bp ladder; 1~6, pork (1, D1 mart; 2, D2 mart; 3, D3 mart; 4, C mart; 5, B mart; 6, A mart); 7~11, chicken meat (7, A mart; 8, B mart; 9, C mart; 10, D4 mart; 11, D3 mart); 12~14, sundae (12, D5 mart; 13, C mart; 14, C mart); 15~16, zocbal (15, C mart; 16, C mart); 17~18, beef (17, A mart; 18, B mart); +, positive control; -, negative control.



Fig. 44. Confirmation on selection medium (Chromagar<sup>TM</sup>-Listeria) of *L. monocytogenes* with inoculation of positive colony into 5 ml BHI broth. Panel A, C(+), D(-); panel B, MonoA, Lis1B; M, 100 bp ladder. 1, positive control 2, #8-1; 3, #8-2 4, #8-3; 5, #9; 6, #10; 7, #11; 8, negative control.

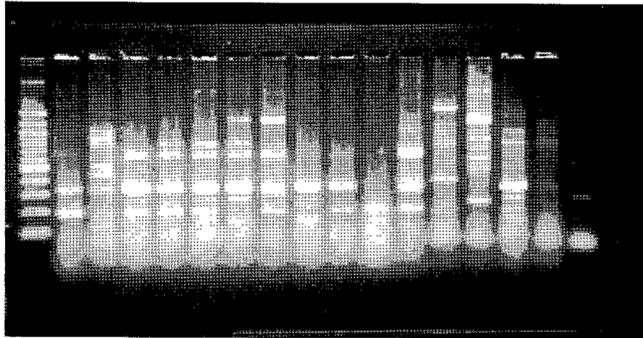
### 3) 3차 현장시료 적용성 실험

대도시 근교의 6개소의 식품마트와 편이식품점에서 돈육, 계육, 우육, ground beef, 및 햄버거패티 등의 5종류의 축육 및 가공식품을 수거하여 시료로 이용하였다. 시료의 전처리, PCR template 준비 및 PCR 조건은 상기의 실험과 동일한 조건으로 실시하였다. 우선, *E. coli* O157:H7을 검출하기 위하여 PT2-PT3 primer set를 이용하여 1차 PCR 증폭을 실시한 결과 (Fig. 45(A)), 돈육 3종, 계육 1종, 우육 1종 및 햄버거패티 1종에서 *E. coli* O157:H7으로 의심되는 증폭산물이 검출되었다. 이를 바탕으로 LP30-LP31 (348 bp), LP43-LP44 (584 bp)와 AE19-AE20 (1087 bp)의 primer set를 이용하여 2차 PCR 증폭을 실시한 결과 (Fig. 45(B)), 돈육 3종, 햄버거패티 1종이 각각 검출되었다. 이상의 결과를 확인하기 위하여 semi-nested PCR을 실시한 결과, 최종적으로 돈육 1종(M mart)에서 *E. coli* O157:H7을 검출할 수 있었다 (Fig. 45(C)). 또한, *L. monocytogenes*를 검출하기 위하여 C(+)-D(-) (161 bp) primer set를 이용하여 1차 PCR을 실시하였다. 그 결과, 돈육 2종과 계육 3종에서 검출되었으며 (Fig. 46(A)) 이를 확인하기 위하여 MonoA-LisB1(660bp) primer set를 이용하여 2차 PCR을 실시하였다. 그 결과, 돈육 1종, 계육 1종에서 *L. monocytogenes*가 검출되었다 (Fig. 46(B)). 이 결과를 토대로 C(+)-*hly* A R primer set를 이용하여 nested PCR을 실시한 결과 K mart에서 구입한 돈육에서 *L. monocytogenes*가 최종적으로 검출되었다 (Fig. 46(C)).

*E. coli* O157:H7

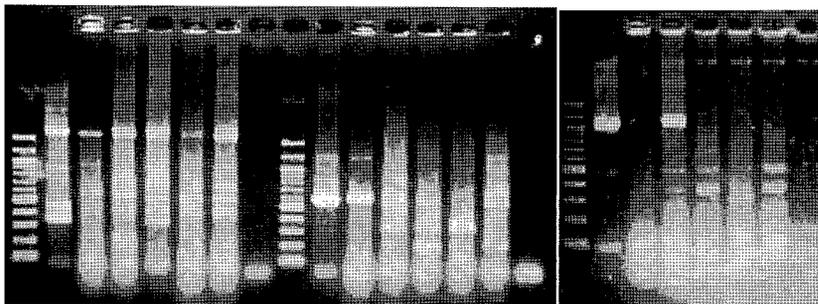
(A) 1st PCR: PT2-3 (252 bp)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



(B) 2<sup>nd</sup> PCR: LP30-31 (348 bp), LP43-44 (584 bp), AE19-20 (1087 bp)

M + 3 5 6 8 14 16 M + 3 5 6 8 14 16 M + 3 5 6 8 14 16



(C) Nested PCR (LP43-*stxII* R nested, 320 bp)

M + 3 5 6 8 14 16

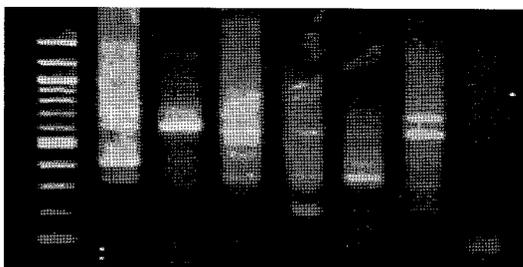


Fig. 45. PCR detection of *E. coli* O157:H7 contaminated in pork (1, K mart; 2, G mart a; 3, L mart; 4, M mart a; 5, M mart b; 6, G mart b), chicken meat (7, K mart; 8, M mart c; 9, M mart d), ground beef (10, K mart), beef (11, K mart; 12, G mart c; 13, L mart; 14, G mart d) and hamburg patties (15, R mart; 16, B mart).

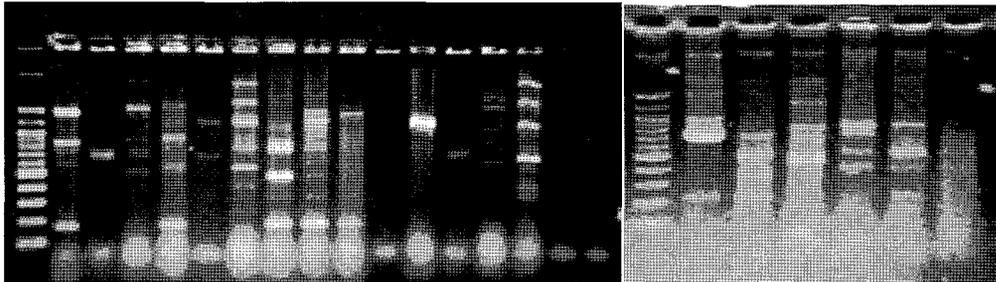
*L. monocytogenes*

(A) 1st: C(+)-D(-) (161 bp)

(B) 2nd: MonoA-Lis1B (660 bp)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

M + 1 4 7 8 9



(C) Nested PCR (C(+)-mp1R nested, 123 bp)

M 1 4 7 8 9

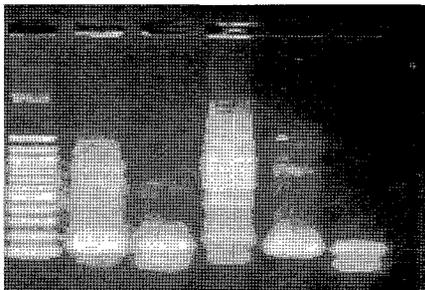


Fig. 46. PCR detection of *L. monocytogenes* contaminated in pork (1, K mart; 2, G mart a; 3, L mart; 4, M mart a; 5, M mart b; 6, G mart b), chicken meat (7, K mart; 8, M mart c; 9, M mart d), ground beef (10, K mart), beef (11, K mart; 12, G mart c; 13, L mart; 14, G mart d) and hamburg patties (15, R mart; 16, B mart).

## II. PCR에 의한 *Salmonella enterica*의 신속검출법 개발 (위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 서울대학교 유 상 렬

### 1. 서 설

*Salmonella* 균은 장내세균과에 속하는 Gram 음성의 운동성이 있는 통성 혐기성균으로서 형태학적, 생화학적 성상은 동일하지만 그 혈청형이 2,000여종 이상인 것으로 알려져 있다. 이 균은 급성패혈증, 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식품유래의 식중독균이며, 일반적으로 장관세포 내에 침입한 후 증식하는 것이 발병 (salmonellosis)의 필수적인 과정으로 알려져 있다. 미국에서는 연간 140만 건의 *Salmonella* 균에 의한 식중독이 발생한다고 보고되어 있고, 우리나라에서는 돼지고기를 이용한 음식에 의해서 높은 발병률을 나타내고 있다. 주요 원인균으로는 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. thompson*, *S. postsdam*, *S. oranienburg*, *S. senftenberg*, *S. infantis*, *S. derby* 등이 있으며 특히 육류나 난류가 다른 식품에 비해 높은 비율로 *Salmonella*의 주요 오염원이 되고 있다. *Salmonella*가 오염된 식품에서 이들 균주를 검출하는 방법에는 선택배지와 당 발효성 등을 이용한 생화학적 실험을 이용한 방법과 혈청학적 방법으로 항체를 증명하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이들 방법은 분석결과를 얻는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있다. 최근에는 분자생물학적인 기법을 이용하여 이들 균주를 검출하는 시도가 이루어지고 있다. 이러한 기법에는 real-time PCR, DNA hybridization 기법, DNA microarray법, PCR 방법 등이 있으며 이 중 PCR 방법이 빠르고 검출한계가 뛰어난 점 등으로 인하여 많이 이용되고 있다. *Salmonella*의 *stn* 유전자는 *Salmonella* 장독소 (enterotoxin) 유전자이며 salmonellosis의 중요한 요인으로 작용한다. 이 유전자는 single polypeptide chain으로 이루어지고 약 29 kDa의 단백질을 전사하는 749 bp 크기의 유전자로 cholera toxin (CT)이나 *E. coli*가 분비하는 heat-labile toxin (LTs)과 비슷한 생화학적 활성을 보인다. 또한 이 유전자는 다른 장내세균과 (Enterobacteriaceae)에서는 검출되지 않은 병원성 *Salmonella*의 특이 유전자로도 알려져 있다.

## 2. 실험방법

### 가. 식품에서 PCR을 통한 *Salmonella*의 검출한계 결정

본 실험은 일정량의 식품에 어느 정도 이상의 *Salmonella*가 존재할 때 PCR method를 이용하여 오염여부의 검출이 가능한지를 알아보는 것이 목적이다. 그를 위해서 일정량의 식품시료에 연속 희석된 *Salmonella*를 인위적으로 주입한다. 이를 위해 overnight 동안 배양된 *Salmonella* cell의 수를 hemocytometer와 현미경을 이용하여 직접적으로 counting하고 그를 토대로 식품 1g 당 *Salmonella*가  $10^6$  cells,  $10^5$  cells,  $10^4$  cells,  $10^3$  cells,  $10^2$  cells이 되도록 희석하여 식품에 첨가한 후 식품에서 *Salmonella*를 detection할 수 있는 최소농도를 PCR을 통하여 측정하였다. 그리고 특정식품 (우유와 달걀)에 대해, 일정량의 *Salmonella* DNA에 대해 식품의 양을 변화시킬 때의 PCR inhibitory effect에 대해서도 살펴보았다.

### 나. 식품의 준비

고체식품의 경우 식품을 DNA extraction 과정을 수행할 수 있는 액체 형태로 만들기 위해 식품 : 증류수 = 1 : 5의 비율로 섞은 후 homogenizer를 이용한 mixing에 의하여 균질화 하였다. 그리고 균을 주입 후  $500 \times g$ 로 5분간 원심분리를 하여 균에 비해 상대적으로 무거운 식품입자들을 가능한 최대로 제거한 후  $15,000 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 균을 회수하였다.

그리고 돼지고기를 증류수와 섞어 균질화한 후 이를 저속원심분리 하면 돼지고기의 점성 때문에 식품입자의 제거가 효율적으로 이루어지지 않는 등의 문제가 있었기 때문에  $500 \times g$ 의 저속원심분리를 이용하여 시료 중 식품입자들을 분리하는 방법 외에 filtration을 통한 식품입자 제거방식도 고려하였다. 곧, 식품 : 증류수 = 1 : 5로 섞은 후 homogenizer를 이용하여 mixing하고 Whatman filter paper (No. 41)로 여과한 후 여과물을  $15,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 균을 회수하였다.

액체식품의 경우에는 증류수를 섞는 과정도, 저속원심분리를 통한 고체식품 입자의 제거도 필요하지 않기 때문에 균을 주입한 후 바로  $15,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 균을 회수하였다.

#### 다. DNA extraction method

##### 1) Gene releaser를 이용한 genomic DNA 추출법

원심분리를 통하여 회수된 cell에 Gene releaser (Bioventures, Inc, USA) 20  $\mu$ l를 넣은 후 65°C에서 30초, 8°C에서 30초, 65°C에서 90초, 97°C에서 180초, 8°C에서 60초, 65°C에서 180초, 97°C에서 60초, 80°C에서 반응을 마친 후 여기서 얻은 DNA template를 PCR에 직접 이용하였다.

##### 2) Phenol extraction method

Commercial plasmid mini prep kit의 resuspension buffer와 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis 시키고 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 통해 단백질을 제거하였다. 그리고 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켜 PCR에 사용할 DNA template를 준비하였다.

##### 3) QIAamp tissue kit

샘플을 180  $\mu$ l의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton, 4 mg lysozyme)와 잘 섞고, 37°C에서 30분간 incubation 하였다. 그런 후 25  $\mu$ l의 proteinase K를 섞고 70°C에서 30분간 incubation하고 다시 95°C에서 30분간 incubation 하였다. 반응이 끝난 후 210  $\mu$ l의 ethanol을 첨가하고 잘 섞은 후 QIAamp spin column에 담고 8,000  $\times g$ 에서 1분간 원심분리 하였다. 여과물을 폐기하고 column에 걸린 물질을 washing buffer를 이용하여 2번 씻어 내리고 마지막으로 20  $\mu$ l의 Tris-EDTA (pH 8.0)로 elution 하였다. 그렇게 얻어진 DNA sample 중 2  $\mu$ l를 PCR에 DNA template로서 사용하였다.

##### 4) NaI treatment

샘플을 500  $\mu$ l의 멸균수와 섞고 상층액 중 200  $\mu$ l를 새로운 튜브에 옮겼다. 400  $\mu$ l의 lysis buffer (0.5% N-laurylsarcosine, 50 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, pH 8.0)를 주입하고 vortexing 하였다. 그런 후 10,000  $\times g$ 에서 5분간 원심분리하고, 얻어진 pellet을 glycogen (최종농도를 0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l로 조정)이 포함된 lysis buffer 200  $\mu$ l에 resuspension 하고 거기에 4  $\mu$ l의 proteinase K (2 mg/ml)를 더하였다. 37°C에서 1시간 incubation한 후 300  $\mu$ l의 NaI solution (6 M NaI in 50 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, pH 8.0)과 500

μl의 isopropanol을 더하고 10,000 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 얻어진 pellet을 35% isopropanol로 씻고 20 μl의 멸균수로 resuspension 하였다.

#### 5) Direct DNA extraction method using CTAB

이 방법은 cell pellet을 얻을 필요가 없는 직접적인 방법이다. 먼저 저속원심분리를 하고 얻은 상층액 0.4 ml와 DNA extraction buffer (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM sodium EDTA pH 8.0, 100 mM sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl (pH 8.0), 1% cetyltrimethylammonium bromide) 1.1 ml 그리고 약간 량의 proteinase K를 새로운 튜브에 옮겨서 잘 섞어주었다. 37°C shaking incubator (225 rpm)에서 30분간 incubation 한 후 0.12 ml의 20% SDS를 첨가하였다. 65°C water bath에서 2시간 동안 incubation을 하고 10분간 실온에서 6,000 ×g로 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브에 옮기고 동일 부피의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)을 더하고 다시 9,000 ×g, 실온에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 0.6 V의 isopropanol을 더하고 실온에서 1 시간 incubation 하였다. 1 시간 후 9,000 ×g, 실온에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 1 ml 70% ethanol로 washing하고 적당량 (20~40)의 distilled water (or TE)로 resuspension 하였다.

#### 6) PCR primer

실험에 사용된 primer는 STN1 (5'-TTG-TCT-CGC-TAT-CAC-TGG-CAA-CC-3')과 STN2 (5'-ATT-CGT-AAC-CCG-CTC-TCG-TCC-3')이었다.

### 3. 결과 및 고찰

식품에 오염된 식중독 원인균의 존재를 신속하게 검출하기 위한 방법으로 PCR detection 방법을 활용하기 위해서 식품 중에 존재하는 다양한 PCR 저해물질을 탐색하여 이를 제거할 수 있는 DNA extraction 방법을 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 *Salmonella*를 대상으로 여러 가지 식품이 PCR을 이용한 신속검출법에 미치는 영향을 연구하였다.

#### 가. 식품에서 PCR을 통한 *Salmonella*의 검출한계 결정

만두의 경우 예상되는 620 bp의 one band를  $10^2$ 까지 확인할 수 있었고 순대는 phenol extraction 방법을 이용하면 식품 1g 당  $10^5$ 의 *Salmonella* 농도에서 *Salmonella* detection limit을 보였고 gene releaser 방법을 이용하면 식품 1g 당  $10^6$ 의 *Salmonella*도 검출할 수 없었다. 김밥은 phenol extraction 방법에서 식품 1g 당  $10^4$  cells의 *Salmonella* detection limit을 보였고 gene releaser 방법에서는 그보다 낮은  $10^6$  cells의 값을 보였다. 생닭의 경우 phenol extraction과 gene releaser 방법에서 모두 식품 1g에  $10^6$ 의 *Salmonella*도 검출할 수 없었다. 달걀 껍질의 경우 phenol extraction 방법에서만 식품 1g 당  $10^6$  cells 농도의 *Salmonella*를 검출할 수 있었다.

그리고 우유의 경우 두 방법 모두 식품 당  $10^6$  cells 농도의 *Salmonella*를 검출할 수 있었다. 카스테라를 식품시료로 사용한 실험의 경우 phenol extraction과 gene releaser 방법에서 모두 식품 1g 당  $10^6$  cell의 *Salmonella* detection limit을 보였다. 동태의 경우 gene releaser 방법을 이용한 실험에서 오차가 생겨 식품 1g 당  $10^8$  cell에서도 *Salmonella*를 검출하지 못했지만 phenol extraction 방법에서는 식품 1g 당  $10^6$  cell의 *Salmonella* detection limit을 보였다. 마지막으로 피자를 이용한 실험에서는 phenol extraction 방법의 경우 식품 1g 당  $10^6$  cell의 *Salmonella* detection limit을 보였고, gene releaser 방법의 경우 식품 1g 당  $10^6$  cell의 *Salmonella* detection limit을 보였다. 실험에 사용된 식품에서 template 준비방법으로 gene releaser를 사용할 때 보다 phenol extraction 방법을 이용할 때 낮은 농도의 *Salmonella*를 detection할 수 있었다. 달걀 (삶지 않은)의 경우 예상되는 620 bp의 one band를 phenol extraction (이하 PE) 방법을 이용하여 얻은 template를 사용한 PCR 실험에서 식품 1g 당  $10^6$  에서 확인할 수 있었다

삶은 달걀의 경우도 역시 삶지 않은 달걀과 같은 결과를 얻었다. 돼지고기를 이용한

경우에는 gene releaser (이하 GR), PE method 양쪽 모두 band를 얻지 못했다. 우유를 시료로 사용한 실험에서는 PE method의 경우 식품 1g 당  $10^6$ 에서 PCR band를 확인할 수 있었다. 마지막으로 버터를 사용한 실험에서는 GR method와 PE method 양쪽 모두 식품 1g 당  $10^6$ 에서 PCR band를 확인할 수 있었다 (Table 1, Fig. 1, Fig. 2).

Table 1. Phenol extraction과 gene releaser를 이용할 때의 detection 한계 비교

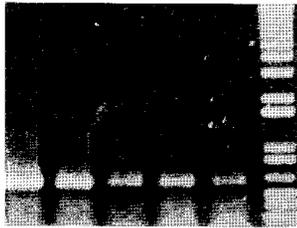
	<i>Salmonella</i> detection limit (number/g)	
	Phenol extraction	Gene releaser
만두	$10^2$	-
김밥	$10^4$	$10^6$
순대	$10^5$	$>10^6$
달걀껍질	$10^6$	$>10^6$
생닭	$>10^6$	$>10^6$
우유	$10^6$	$10^6$
카스테라	$10^6$	$10^6$
동태	$10^6$	$>10^8$
피자	$10^6$	$10^7$

Table 2. Detection 한계 비교

	<i>Salmonella</i> detection limit (number/g)		
	Phenol extraction	Gene releaser	CTAB method
달걀	$10^6$	$>10^6$	$>10^6$
삶은 달걀	$10^6$	$>10^6$	$>10^6$
돼지 고기	$>10^6$	$>10^6$	$10^6$
우유	$10^6$	$>10^6$	-
버터	$10^6$	$10^6$	$>10^6$

### 만두

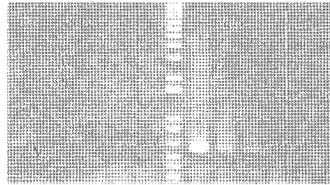
Phenol extraction  
1 2 3 4 5 M



Lane: 1,  $10^6$  (cells/g of food);  
2,  $10^5$ ; 3,  $10^4$ ; 4,  $10^3$ ; 5,  $10^2$

### 김밥

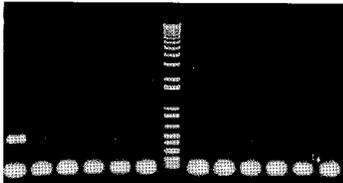
Gene releaser Phenol extraction



Lane: 1 and 7,  $10^6$  (cells/g of food); 2 and 8,  $10^5$ ; 3  
and 9,  $10^4$ ; 4 and 10,  $10^3$ ; 5 and 11,  $10^2$ ; 6 and 12,  
no addition of *Salmonella*

### 순대

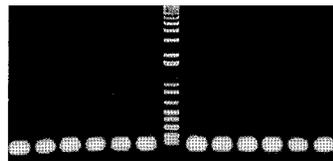
Phenol extraction Gene releaser



Lane: 1 and 7,  $10^6$  (cells/g of food); 2 and 8,  $10^5$ ; 3  
and 9,  $10^4$ ; 4 and 10,  $10^3$ ; 5 and 11,  $10^2$ ; 6 and 12,  
no addition of *Salmonella*

### 생닭

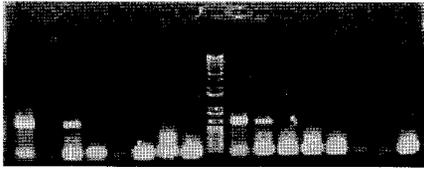
Gene releaser Phenol extraction



Lane: 1 and 7,  $10^6$  (cells/g of food); 2 and 8,  $10^5$ ; 3  
and 9,  $10^4$ ; 4 and 10,  $10^3$ ; 5 and 11,  $10^2$ ; 6 and 12,  
no addition of *Salmonella*

### 피자

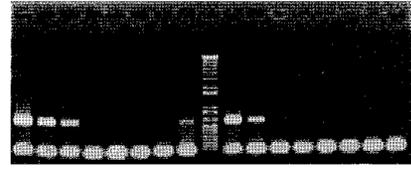
Phenol extraction    Gene releaser



Lane: 1 and 10,  $10^8$ (cells/g food); 2 and 11,  $10^7$ ; 3 and 12,  $10^6$ ; 4 and 13,  $10^5$ ; 5 and 14,  $10^4$ ; 6 and 15,  $10^3$ ; 7 and 16,  $10^2$ ; 8 and 17, 10

### 카스테라

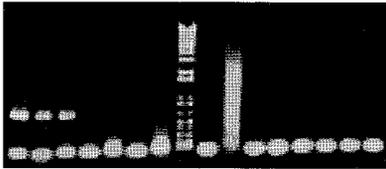
Phenol extraction    Gene releaser



Lane: 1 and 10,  $10^8$ (cells/g food); 2 and 11,  $10^7$ ; 3 and 12,  $10^6$ ; 4 and 13,  $10^5$ ; 5 and 14,  $10^4$ ; 6 and 15,  $10^3$ ; 7 and 16,  $10^2$ ; 8 and 17, 10

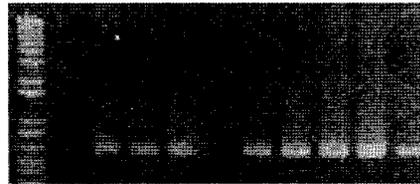
### 동태

Phenol extraction    Gene releaser



Lane: 1 and 9,  $10^8$ (cells/g food); 2 and 10,  $10^7$ ; 3 and 11,  $10^6$ ; 4 and 12,  $10^5$ ; 5 and 13,  $10^4$ ; 6 and 14,  $10^3$ ; 7 and 15,  $10^2$ ; 16, 10

### Milk



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0  
(M:marker, 1:10ul of milk, 2:1ul, 3:0.1ul  
4:0.01ul, 5:0.001ul, 6:0.0001ul, 7:0.00001ul  
8:0.000001ul, 9:0.0000001ul, 0:no milk)

Fig. 1. 각종 식품에서의 *Salmonella* detection 한계 비교.

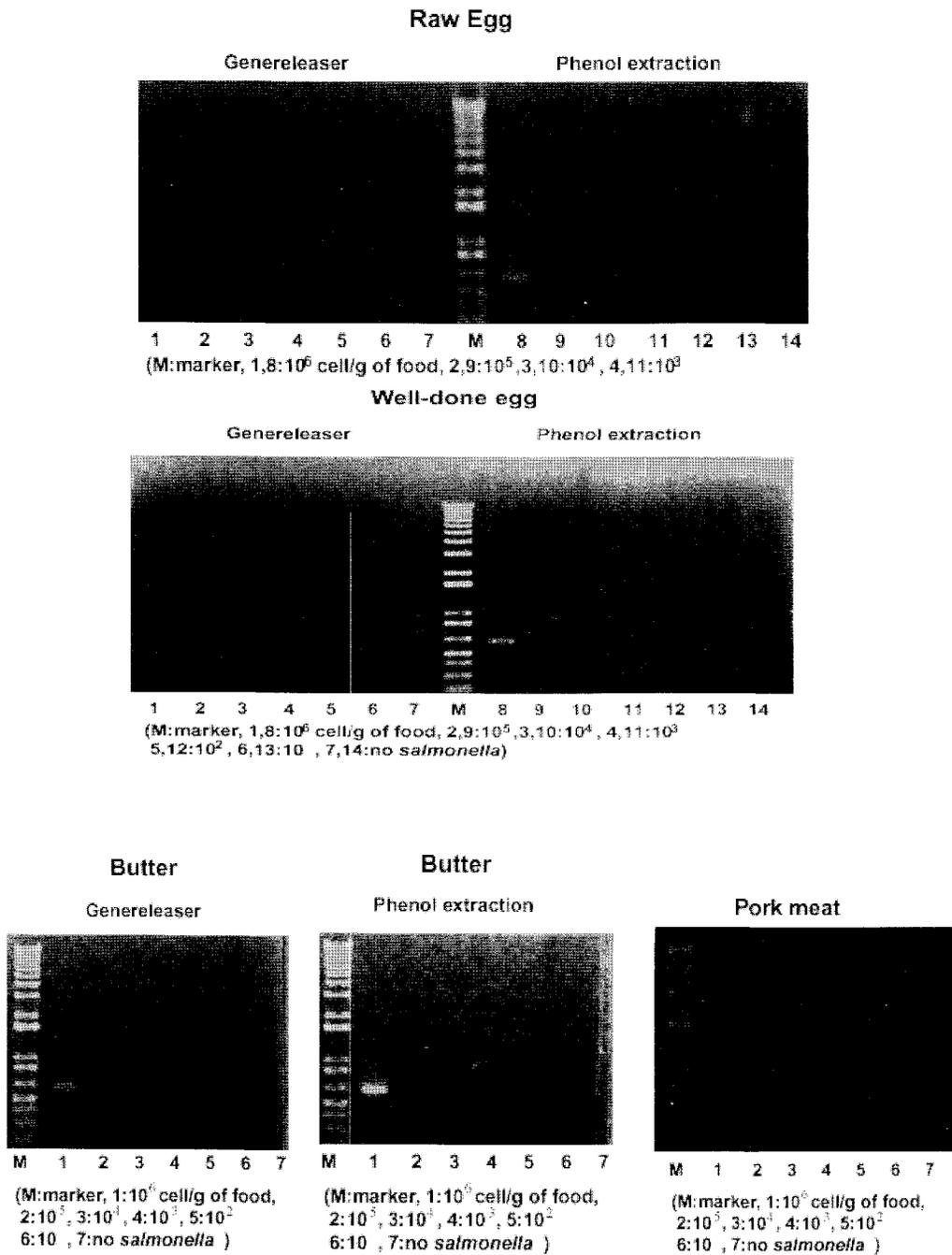


Fig. 2. 각종 식품에서의 *Salmonella* detection 한계 비교 II.

그리고 식품성분이 PCR에 직접적인 영향을 주는지의 여부를 알기 위한 실험의 결과는 아래와 같다.

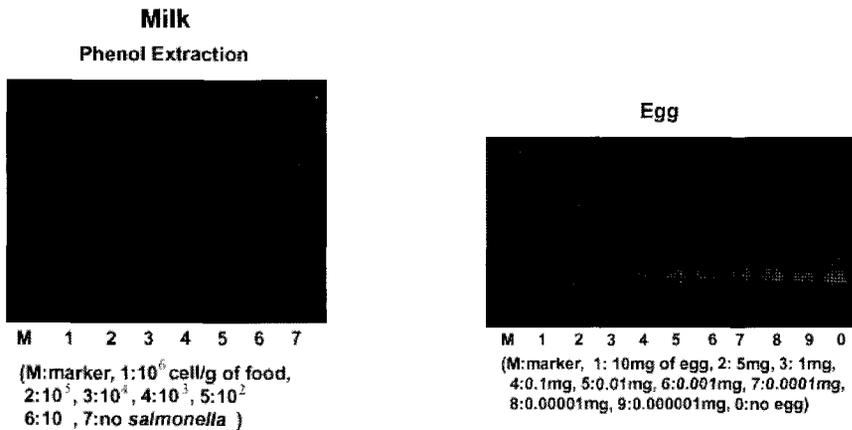


Fig. 3. 달걀과 우유가 PCR에 미치는 영향.

식품으로부터 미생물 pellet을 얻은 후 그것에서 DNA template를 추출하는 방법은 미생물 외에 식품 자체 역시 pellet으로 침전되어 방해물질로 작용할 가능성이 크기 때문에 본 실험에서는 pellet을 얻지 않고 extraction buffer를 이용한 직접적인 DNA 추출법을 사용하여 보았다. CTAB를 기초로 한 direct extraction method를 이용하여 DNA template를 얻은 후 PCR을 행하였을 때 돼지고기를 식품 샘플로 사용한 경우 기존의 방법 (gene releaser, phenol extraction method)으로는 얻을 수 없었던 PCR band를 얻을 수 있었다. 결국 각 식품별로 특성에 맞는 DNA 추출법의 개발이 필요함을 간접적으로 시사해 주는 것이라 할 수 있겠다. 그리고 미리 얻어진 식품의 방해 없이 얻어진 DNA template에 직접 식품을 일정량 첨가하여 PCR을 행해본 결과, PCR reaction의 전체 부피 중 큰 부분 (1/5)을 차지할 때를 제외하고는 원하는 band를 얻을 수 있었다. 이는 식품이 물론 PCR의 inhibitor로서 작용하지만 동시에 DNA extraction에도 큰 방해요인으로 작용함을 의미한다.

위의 실험결과를 토대로 볼 때 식품 종류별 특이 DNA 추출법의 개발이 필요함과 더불어 식품이 존재하더라도 DNA를 효율적으로 얻을 수 있는 DNA 추출법의 개발 역시 필요함을 알 수 있었다.

나. 현장시료 검정 (field test)

1) 실험목적

본 연구에서 확립된 PCR을 이용한 *S. enterica*의 검출방법을 이용하여 실제 시판되는 국내외 가공식품에서 *S. enterica*의 오염정도를 확인함

2) 재료 및 방법

가) Samples

국내식품류 : 시판중인 순대, 만두, 김밥, 카스테라, 달걀껍질, 생닭, 우유, 냉동피자를 구입하여 사용하였다.

수입식품류

식품명	제조사	제조국
Sausage	Nueske's Hillcrest Farm	USA
Cherry berry fruitlings	Sunsweet Co.	USA
Pitted prunes	Sunsweet Co.	USA
Chicken broth	Compbell Soup Co.	USA
Baby meal	Gerber Products Co.	USA
Hunt's tomato paste	Conagra Grocery Products Co.	USA
Cream of mushroom soup	Compbell Soup Co.	USA
Green Giant	Pillsbury Co.	USA
Chilli sauce hit	Cerebos Foods	Australia
Onion in vinegar	Tramier	France

나) 식품시료의 준비

식품과 증류수의 비율을 1 : 5로 섞은 후 mixer를 이용해 blending 후 500 ×g로 5분간 원심분리를 하여 식품을 어느 정도 제거한 후 15,000 ×g로 10분간 원심분리하여 균을 회수하였다 (단, 우유를 실험재료로 사용할 때는 우유 자체가 액체 상태의 시료이기 때문에 500 ×g로 5분간 원심분리하여 식품입자를 제거할 필요가 없기에 생략하고 바로 사용 15,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 균을 회수). 그리고 원심분리를 이용하여 시료 중 식품조각을 분리하는 방법과 병행하여 거즈를 이용하여 식품제거를 행하였다.

다) Phenol extraction method

Commercial plasmid mini prep kit의 resuspension buffer와 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis 시키고 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 통해 단백질을 제거하였다. 그리고 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켜 PCR에 사용할 DNA template를 준비하였다.

라) PCR primer 및 조건

사용한 primer는 STN1: 5'-TTG-TCT-CGC-TAT-CAC-TGG-CAA-CC-3'  
STN2: 5'-ATT-CGT-AAC-CCG-CTC-TCG-TCC-3'이며, thermal cyclor (PTC-100TM, MJ Research Inc., USA)를 사용하여 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

Step	Procedure	Temp.(°C)/Time
1	Pre-denaturation	95°C/10 min
2	Denaturation	95°C/30 s
3	Annealing	58°C/30 s
4	Extension	72°C/30 s
5	-	30 cycle
6	Post-extension	72°C/5 min
7	Cooling	4°C/10 min

마) 식품에서 PCR을 통한 *Salmonella*의 검출한계 결정

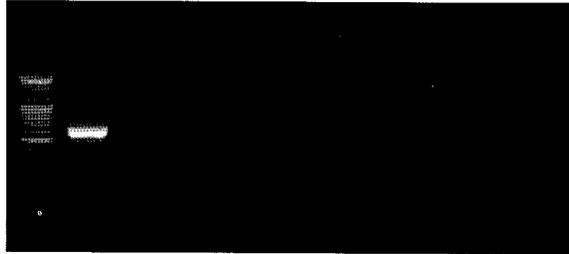
식품에 존재하는 *Salmonella* detection limit을 정하는 실험에서는 hemocytometer를 통하여 cell counting하여 식품 1g 당 *Salmonella*가  $10^6$  cells,  $10^5$  cells,  $10^4$  cells,  $10^3$  cells,  $10^2$  cells이 되도록 희석하여 식품에 첨가한 후 식품에서 *Salmonella*를 detection 할 수 있는 최소 농도를 PCR을 통하여 측정하였다.

3) 시판중인 국산식품과 수입식품과 미생물학적 비교

시판 중인 국내가공식품 9종과 수입식품 10종을 구입하여 *Salmonella* 존재여부를 확립된 PCR 방법을 이용하여 측정하였다. 측정된 모두의 가공식품에서는 *Salmonella*가 검출되지 않았다 (Fig. 4).

### 국 내 식 품

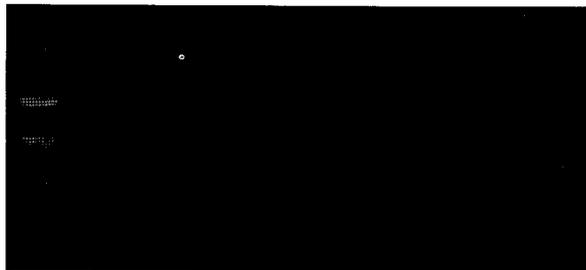
M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9



C, positive control; 1, 순대 (A); 2, 순대 (B); 3, 만두; 4, 김밥;  
5, 카스테라; 6, 달걀껍질; 7, 생닭; 8, 우유; 9, 냉동피자

### 수 입 식 품

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1. Sausage (소세지, 미국)
2. Sunsweet pitted prunes (건자두, 미국)
3. Sunsweet cherry berry fruitlings (버찌, 미국)
4. Chicken broth (식육추출 가공품, 미국)
5. Gerber (유아식, 미국)
6. Hunt's paste (과채 페이스트, 미국)
7. Campbell's cream of mushroom soup (스프, 미국)
8. Green Giant (곡류 가공품, 미국)
9. Chilli sauce hit (소스, 호주)
10. Tramier (양파 절임, 프랑스)

Fig. 4. 국내식품과 수입식품의 *Salmonella* 오염 비교.

#### 4. 결 론

##### 가. Template DNA 양에 따른 *Salmonella* 검출 민감도

*S. enterica*를 배양한 후, genomic DNA을 추출하여 정량한 후, 1 fg부터 1 µg까지 희석한 template DNA을 가지고 PCR을 수행하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 PCR의 산물은 예측한대로 617 bp의 DNA 단편이 측정되었으며, 1 pg까지 template DNA의 양에서 관찰되었다. 이와 같은 민감도는 PCR 방법을 이용하여 식품에 존재하는 소량의 균체에서도 민감하게 검출하는 것을 가능하게 한다고 판단된다.

##### 나. Template DNA 추출방법에 따른 *Salmonella* 검출 민감도

Template DNA 추출방법에 따른 *Salmonella* 검출의 정도를 비교하기 위해 *S. enterica* 순수배양액에서 template DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 균체를 직접 사용하는 방법, 균체의 boiling (95°C, 10분간) 방법, phenol-chloroform 추출법, genomic DNA kit 방법으로 template DNA를 추출하여 검출한계를 비교하였다. Table 3에서와 같이 순수배양액에서 *S. enterica*는 4가지 방법에서 3회 반복하여 모두 양성 결과를 얻은 것을 기준으로 하여  $10^2$  cells까지 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 모든 방법에서 유사한 결과를 얻었으나, 균체를 boiling하여 PCR을 사용한 것이 상대적으로 검출감도가 더 높은 것으로 측정되었다. 이것은 boiling에 의한 균체의 분해로 PCR 수행에 이용될 수 있는 template가 더 많아진 것으로 추정되어, boiling법으로 사용하는 것이 신속하고 경제적인 방법으로 판단된다.

Table 3. Sensitivity<sup>a</sup> of PCR assay for detection of *S. enterica* from pure culture

Template preparation methods	Inoculation level (cells)						
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Whole cell	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Boiling	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Phenol extract	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Genomic DNA kit	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>a</sup> Sensitivity was shown as the number of positive samples/number of triplicates.

#### 다. 식품 종류별 존재하는 *S. enterica* 검출한계 측정

서로 다른 종류의 식품에 *S. enterica*를 인위적으로 농도별로 접종하고 균체를 회수한 다음 lysozyme (10 mg/ml)과 phenol-chloroform 추출법으로 제조한 template DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. Table 4와 같이 냉동피자, 만두, 햄, 순대, 우유, 김밥, 치즈 등 대부분의 식품이 1 g당 10<sup>3</sup> cells에서 검출한계를 보였다. 카스텔라, 생닭, 달걀 껍질의 경우 1 g당 10<sup>4</sup> cells에서 검출할 수 있었다. 이와 같이 식품에 따라 농도별 차이가 있는 것은 식품과 혼합 후, 균을 회수하는 과정에서의 회수율, template DNA를 분리하는 과정에서 추출량 및 식품 내에 PCR 수행에 있어서 inhibitor가 영향을 주는 것으로 추정된다. 이러한 식품별 검출한계는 한국식품의약품안전청 (<http://www.kfda.go.kr>) 보고에 의하면 *Salmonella*의 경우 발병 균량은 정상인의 경우는 식품 1 g당 10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>, 신생아 감염은 식품 1 g당 수십 cell이기 때문에 일반인에 대한 검출은 본 실험에 사용한 PCR 방법으로 충분하나, 신생아에 대한 발병균량 측정은 보다 더 민감한 방법을 개발할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Sensitivity<sup>a</sup> of PCR assay for detection of *S. enterica* from artificially inoculated Food samples.

Food samples	Inoculation level (cells/g or ml)						
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Raw chicken meat	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Egg shell	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Sponge cake	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Milk	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Cheese	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Frozen pizza	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mandu	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Ham	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Sundae	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Kimbap	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>a</sup> Sensitivity was shown as the number of positive samples/number of triplicates.

라. 시판중인 식품들의 *Salmonella* 균주의 검출여부

시판 중인 국내가공식품 10종과 수입식품 10종을 구입하여 식품공전에 수록된 방법대로 시료 25 g을 수거한 뒤, DNA를 추출하여 *S. enterica*의 존재여부를 PCR 방법을 이용하여 산물을 agarose gel에서 확인하였다. 측정된 모두의 가공식품에서 *S. enterica*가 검출되지 않았다.

본 연구에서는 순수배양된 *S. enterica* 균체를 그대로 이용하는 방법, 균체를 100℃에서 5분간 boiling하는 방법, phenol-chloroform 추출법 그리고 상용화된 genomic DNA kit를 이용하여 template DNA를 추출한 후, PCR을 이용하여 추출방법에 대한 민감도를 조사하였다. 순수 배양액에서는 네 가지 모두 다 10<sup>2</sup> cells까지 검출하였으며 가장 신속하고 간편한 방법은 boiling 방법이였다. 또한 인위적으로 오염시킨 식품에서는 PCR을 수행하여 식품 1g 당 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> cells까지 검출할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 식품에서 *Salmonella* 균주를 간편하고 빠르게 검출할 수 있을 것으로 생각되었다.

여 백

### 제 3 절 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발 (제3세부과제)

#### I. 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발 (주관연구기관)

세부연구책임자 : 한국식품개발연구원 김 남 수

##### 1. 서 설

1992년 UN환경개발회의 (UNCED)에 의해 개최된 Rio 선언에 따라 화학물질안전프로그램 (IPCS)에서는 화학물질, 화학물질의 혼합물, 화학물질의 화합물 등에 대하여 인체건강에 미치는 위해성 평가를 강화하고 확대하기로 결의하였다. 또한, 국제사회에서 인체건강과 밀접한 관계가 있는 농산물 중의 유해화학물질에 대한 관심이 높아지면서 이들을 현장에서 신속히 검사할 수 있는 간이검출법 개발이 전 세계적으로 이루어지고 있다. 바이오센서 기술은 농산물의 안전성 평가에 있어 필수적인 현장성과 신속성에 있어서 우수하고 또 측정원리가 다양하여 항원·항체 반응뿐만 아니라 효소나 미생물 등의 생물요소의 반응성을 측정할 수 있으므로 보다 다양한 범위의 유해화학물질을 측정할 수 있다. 예로서, cholinesterase, urease 등의 효소활성이 농약이나 중금속에 의하여 선택적으로 저해되는 현상을 이용하고 이 때의 전기적 혹은 광학적 신호를 측정하는 것을 센서화 하면 이들 물질을 간편하게 검출할 수 있고 시스템의 *on-line*화에 의하여 연속적인 측정도 가능하게 된다.

현재 환경기준에 따르면 인체의 건강보호를 위하여 농업용수 등 각종 수자원 중의 특정유해물질인 수은 (Hg), 연 (Pb) 등 중금속의 허용농도는 미검출 및 극미량 이하로 규제되고 있으나, 공단폐수 등에 이들 물질이 허용농도 이상으로 배출되면 이들은 농업용 수원으로 사용되고 있는 각종 하천 및 소하천, 저수지 등에 전이될 가능성이 있고, 그 결과 농산물의 중금속 오염이 발생할 가능성이 상존한다. 따라서, 이를 미연에 방지하기 위해서는 중금속에 의한 위해 가능성을 신속히 판단할 수 있는 간이분석기법의 개발이 긴요하며 urease 활성이 중금속에 의하여 저해되는 현상을 이용하여 중금속을 검출하는 저해 바이오센서 (inhibition biosensor)는 이러한 목적에 부합될 수 있을 것으로

사료된다 (Wittekindt 등, 1996; Meier 등, 1992).

국산 및 수입 농산물의 안전성 평가를 위한 방안의 하나로서의 항생제 간이검사에는 현재 *Bacillus megaterium* disc assay, 효소면역분석법 등을 사용할 수 있으나 이들 방법은 비교적 복잡하거나 시간이 많이 소요되는 점이 단점으로 지적되기도 한다. 특히 효소면역분석법의 경우, 반응결과 발생하는 빛의 측정장치가 있어야 하고 항원 혹은 항체의 지지체로의 결합, 반응 cell의 세척, 항원·항체 결합 및 세척, 측정기질의 첨가와 발색 등의 과정을 거쳐야 하므로 복잡하고 현장적용에 한계가 있어 왔다 (Keay와 McNeil, 1998). 효소면역분석법의 현장적용성을 개선하기 위하여 dipstick 기법이 개발되었으나 측정대상물질의 종류에 따라 반응감도가 떨어지고 정량적 측정이 어려운 단점이 존재하였다 (Keay와 McNeil, 1998). 따라서, 효소면역분석법과 같거나 그 이상의 반응감도를 얻을 수 있으면서도 편의성이 높은 시스템 개발이 긴급하며 면역센서 (immunosensor)는 이런 목적에 가장 부합되는 장치로 여겨진다 (Osipov 등, 1996; Rubtsova 등, 1998).

현재 국내에서의 농산물 중의 중금속 측정은 기기분석법과 복잡한 과정을 거치는 비색분광법에 의하여 행해지고 있다. 외국의 경우, carbonic anhydrase 등의 효소활성이 중금속에 의하여 저해되는 현상을 이용하여 이를 microplate assay화 하는 연구, 더 나아가서 바이오센서 시스템으로 발전시켜 간편성과 현장성을 증진시키고 있으나 국내에서는 이와 관련된 가시적인 연구성과가 아직 미약한 실정이고 항생제를 면역센서 기술을 적용하여 계측하는 연구도 이제 시작단계이므로 이와 관련된 집중적인 연구개발이 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 국내에서 유통되는 농산물 및 가공식품 중에 존재가능한 중금속 및 항생제의 신속검출에 적용할 수 있는 효소센서 및 광학적 면역센서 시스템을 개발하고자 하였다.

## 2. 중금속 계측 urease 저해센서 시스템 개발

### 가. Urease 저해활성 측정 cuvette assay 개발

#### 1) 실험방법

##### 가) 효소 및 시약

중금속 이온에 의한 활성저해 실험에 사용된 urease (EC 3.5.1.5, from jack bean), 암모니아 표준용액과 효소반응의 기질인 urea는 Sigma사 (MO, USA)에서 구입하였다. Urease의 반응결과 생성되는 암모니아는 분광광도계에 의하여 630 nm에서 측정하였는데, 이 때 발색시약인 시약 A (phenol-nitroprussid solution)와 시약 B (alkaline hypochlorite solution)는 각각 다음과 같이 조제하였다. 즉, 시약 A는 6 g의 phenol을 70 mL의 pH 12 완충용액 (30 g trisodium phosphate · 12수화물, 30 g sodium citrate · 2수화물과 3 g EDTA를 소량의 증류수에 용해시킨 후 증류수를 가하여 1 L로 정용하여 제조)에 용해시킨 후 0.02 g의 sodium nitroprussid (Sigma사)를 가하고 pH 12 완충용액으로 100 mL로 정용하였다. 시약 B는 16 g sodium hydroxide, 150 g/L의 sodium hypochlorite 7 mL를 증류수로 1 L로 정용하였다. Urease 활성저해 실험에 사용된 중금속 이온인 Hg(II), Pb(II), Cu(II), Zn(II) 및 Cd(II) 이온은 각각 특급의 sulfate 염을 사용하였으며 기타 다른 시약도 특급의 것을 사용하였다.

##### 나) Cuvette assay에 의한 암모니아 측정

Urease에 의한 기질분해 시 발생하는 암모니아는 microtiter plate를 사용하는 urease inhibition assay를 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 암모니아 용액을 2 mL씩 또는 urease 용액 0.4 mL와 urea 용액 1.6 mL를 시험관에 넣고 여기에 증류수 100 µL와 위에서 제조한 발색시약 A와 B를 각각 600과 900 µL씩 넣은 후 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer (Jasco V-550, Japan)를 사용하여 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

##### 다) 중금속 이온에 의한 urease 저해활성 측정

중금속 이온에 의한 urease 저해활성은 다음과 같이 측정하였다. 먼저 시험관에 1.1% urea 용액 1.6 mL를 넣은 후 증류수와 중금속 이온 용액을 각각 50 µL씩 가하였다. 여기에 0.4 mg/L의 urease 용액 0.4 mL를 넣은 후 25°C에서 15분간 방치하여

urease의 저해반응을 유도하고 발색시약 A와 B를 가한 후 상기의 cuvette assay를 행하였다. 이 때 urease 저해활성은 중금속 이온 용액을 첨가하는 대신 증류수 100  $\mu$ L를 가한 대조구의 효소활성을 100으로 하였을 때의 상대활성으로 표시하였다. 한편, 두 종류 중금속 이온의 공존효과를 알아보기 위하여 기준이 되는 중금속 이온 용액 50  $\mu$ L와 다른 종류의 중금속 이온 용액 50  $\mu$ L를 가한 후 상기의 방법으로 발색시키고 흡광도를 측정하였다.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) Cuvette assay 조건 실험

암모니아 용액을 0.1~3.0 mg/L 농도로 조제하여 시험관에 넣고 cuvette assay를 행하였다. 표준곡선을 작성한 결과, 공시 암모니아 용액의 농도범위에서 흡광도는 0.070~1.795이었고 흡광도와 암모니아 농도사이에는 0.998 ( $r$ )의 높은 양의 상관관계가 나타났다 (Fig. 1).

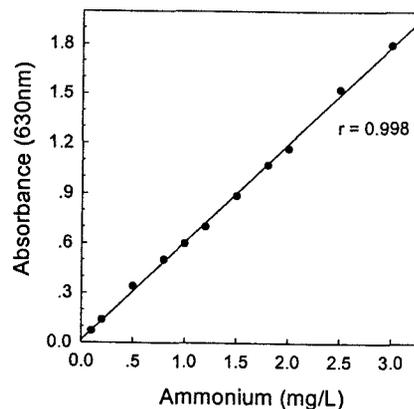


Fig. 1. Effect of ammonia concentrations for urease activity.

Cuvette assay에 필요한 urease와 그 반응기질인 urea의 농도를 변화시키면서 발생하는 암모니아의 양을 Fig. 1의 표준곡선에서 계산하여 도시한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저 urease의 농도변화에 따른 영향에 대하여 urease 농도를 0.5 mg/L에서 순차적으로 증가시키면서 실험하였으며 이 때 urea의 농도는 1%로 하였다 (Fig. 2, panel A). 이 경우 효소반응 지표인 흡광도는 0.041~14.080까지 증가하여 urease 농도에 따른 의존성이 매우 높음을 알 수 있었다. 분광광도계에 의한 분석 시 시료의 희석을 행하지 않거나 최

소화하는 것이 바람직하고 또한 Lambert-Beer의 법칙에 따라 직선성을 나타내는 흡광도 범위에서 실험하여야 정확한 측정이 가능하므로 본 연구에서는 이와 같은 조건을 만족시켜 줄 수 있는 0.4 mg/L의 urease 농도를 이 후의 실험에 사용하였다. Urease의 농도를 0.4 mg/L로 고정하고 urea를 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 각각 1, 2, 5, 8 및 10% 농도로 용해하여 기질용액을 조제하였다. 기질의 농도변화에 따른 암모니아의 발생정도를 urease 농도증가에 따른 경우와 비교해 보았을 때 본 실험의 조건에서는 urea 농도에 따른 의존성이 그리 크지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 2, panel B). 이와 같은 결과에 따라 이 후의 실험에 사용된 urea의 농도는 1.1%로 하였다.

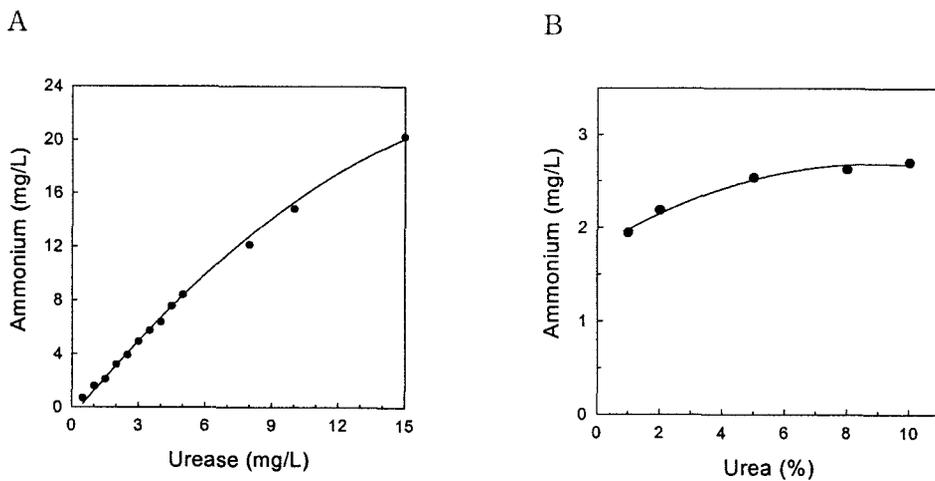


Fig. 2. Effects of the concentrations of urease (A) and urea (B) on ammonia production.

나) 중금속에 의한 urease 활성저해

(1) 단일 중금속 이온에 의한 urease 활성저해

Fig. 2의 실험결과에서 선정된 urease 및 urea의 농도인 0.4 mg/L와 1.1%를 사용하여 Hg(II), Pb(II), Cu(II), Zn(II) 및 Cd(II)의 단일 중금속 이온에 의한 urease의 활성저해도를 측정하였다 (Fig. 3). 먼저 단일 중금속 이온을 cuvette assay의 반응 혼합물에 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 측정한 결과, 전 실험과정에서 1.663보다 낮은 값을 보여주었으며 이와 같은 흡광도 수치는 Fig. 1에서 직선성을 보여주는 구간내에 존재하므로 발색 후 시료의 희석과정을 거치지 않고 측정을 행하여도 무방하였다.

Hg(II) 이온에 의한 urease 활성저해를 살펴보기 위하여 Hg(II) 이온의 농도를  $1.0 \times 10^{-6}$ ,  $5.0 \times 10^{-6}$ ,  $1.0 \times 10^{-5}$ ,  $5.0 \times 10^{-5}$  및  $1.0 \times 10^{-4}$  mM로 달리하여 첨가하여 본 결과, 흡광도는 1.476에서 점차로 감소하여 0.151까지 떨어져 urease가 10.2%의 효소활성을 나타내는 수준까지 저해됨을 알 수 있었다. Pb(II) 이온을  $9.7 \times 10^{-4}$ ,  $1.9 \times 10^{-2}$ ,  $4.8 \times 10^{-2}$ ,  $7.7 \times 10^{-2}$  및  $9.7 \times 10^{-2}$  mM에 해당하는 농도로 첨가하면 흡광도는 0.950에서 0.328로 감소하여 이로부터 효소활성의 저해도가 71.2%에 이르렀다. Cu(II) 이온을  $3.2 \times 10^{-3}$ ,  $6.3 \times 10^{-3}$ ,  $1.6 \times 10^{-2}$ ,  $2.5 \times 10^{-1}$  및  $3.2 \times 10^{-1}$  mM의 농도로 첨가한 후의 흡광도는 1.663에서 점차 감소하여 0.606에 이르러 63.6%의 효소활성이 감소하였다. Zn(II) 이온의 경우  $3.1 \times 10^{-1}$ ,  $6.1 \times 10^{-1}$ , 1.5, 2.5 및 3.1 mM 농도로 첨가하여도 흡광도는 1.514에서 1.469까지 미약하게 감소하여 3.1 mM 농도의 Zn(II) 이온 첨가 시의 상대활성이 97.0%에 이르는 것으로 나타났다. 이와 같은 사실은 Hg(II) 이온 등이 urease의 강력한 저해제로 작용하는 사실을 확인시켜 준 반면 Zn(II) 이온은 urease의 저해에 거의 관여하지 않는 것을 보여준다. Cd(II) 이온의 경우 1.8, 3.6, 8.9, 14.2 및 17.8 mM에 해당하는 농도로 첨가하였을 때 흡광도는 1.156에서 1.018까지 감소하여 효소활성이 최대 11.9% 저해되었다. 이상의 결과로부터 urease에 대한 중금속 이온의 저해도는 Hg(II) > Pb(II) > Cu(II) > Cd(II) > Zn(II) 이온의 순으로 나타났으며 이는 Preininger와 Wolfbeis 등 (1996)이 urease가 고정화된 센서층을 사용하여 행한 실험에서의 중금속 이온에 의한 저해특성과 유사한 결과를 보여주었다.

본 연구의 cuvette assay는 urease가 Hg(II) 이온 등의 중금속 이온에 의하여 저해되는 특성을 이용한 것이므로 효소의 저해에 따른 발색정도를 측정하여 수계 혹은 각종 농산물 및 가공식품의 전처리된 시료에서 중금속 이온의 존재를 탐색하는데 활용될 수 있을 것으로 여겨지나, Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 Hg(II) 이온과 Pb(II) 및 Cu(II) 이온의 측정가능범위가 현저하게 다르므로 시료에 따라 Hg(II) 이온을 선택적으로 측정하는 데에도 사용가능할 것으로 여겨진다. 이 경우 Hg(II) 이온이  $10^{-5}$  mM 내외로 존재하여도 urease 활성저해가 시작되고 이 농도는 외국의 경우 수산가공품에서 허용된다고 보고되는 농도인 0.5~1.0 ppm보다 현저하게 낮아 본 연구의 cuvette assay에 있어서 시료의 전처리를 행할 때 농축과정과 같은 별도의 단계를 거치지 않아도 될 것으로 사료되었다.

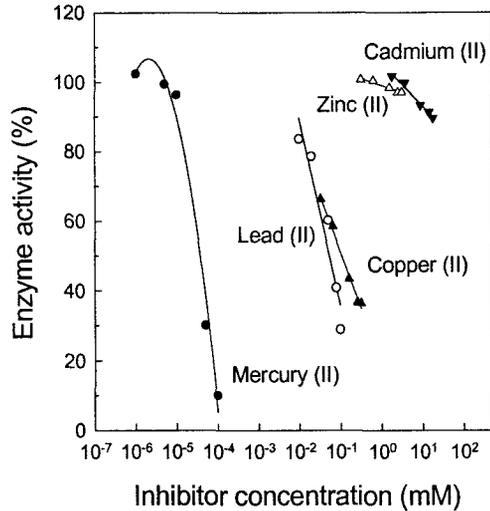


Fig. 3. Inhibitions of free urease with Hg(II), Pb(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) ions.

(2) 복합 중금속 이온에 의한 urease 활성저해

한가지 중금속 이온의 농도를 고정하고 다른 중금속 이온을 각기 다른 농도로 첨가하면서 urease의 활성변화를 측정하였다. 먼저 Hg(II) 이온의 농도를  $1.0 \times 10^{-5}$  mM로 고정한 후 Pb(II), Cu(II), Zn(II) 및 Cd(II) 이온의 농도를 달리하여 첨가한 결과, 본 연구의 첨가수준에서 urease 활성은 Hg(II) 이온에 Pb(II) 및 Cu(II) 이온을 첨가한 경우가 가장 낮은 것으로 나타났다 (Table 1).

Pb(II) 이온의 농도를  $9.7 \times 10^{-3}$  mM로 고정하고 다른 중금속 이온을 각자 농도별로 첨가한 경우 Hg(II) 이온 첨가 시 urease의 활성저해가 가장 현저하여  $1.0 \times 10^{-4}$  mM 농도의 Hg(II) 이온을 첨가하였을 때의 효소의 상대활성은 6.9%로 매우 낮았다. 또한 Cu(II) 이온의 농도별 첨가에 의해서도 효소활성이 상당한 수준으로 저해됨을 알 수 있었다 (Table 2).

Cu(II) 이온의 농도가  $3.2 \times 10^{-2}$  mM이 되도록 하고 여기에 다른 중금속 이온의 농도를 변화시키며 첨가한 후의 효소활성은 Hg(II) 및 Pb(II) 이온 첨가 시 가장 낮게 나타났다 (Table 3).

Zn(II) 이온의 농도를 3.06 mM로 고정하고 여기에 다른 중금속 이온을 농도별로 첨가한 결과 Hg(II), Pb(II) 및 Cu(II) 이온 첨가에 의한 urease의 활성저해가 현저하여

Hg(II) 이온을  $1.0 \times 10^{-4}$  mM 농도로 첨가하였을 경우 상대활성이 14.6%로 나타났다 (Table 4).

Cd(II) 이온을 17.80 mM의 농도로 고정하고 여기에 다른 중금속 이온을 농도별로 첨가하였을 때에도 Hg(II), Pb(II) 및 Cu(II) 이온을 첨가한 처리구에서 urease 활성저해가 현저하였고 이 때 Hg(II) 이온을  $1.0 \times 10^{-4}$  mM 농도로 첨가하였을 때의 상대활성은 8.1%에 불과하여 효소활성의 저해가 가장 높았다 (Table 5).

상기의 결과를 고찰해보면 단일 중금속 이온의 농도를 고정하고 다른 중금속 이온을 농도별로 가하였을 때 urease 활성저해는 대체로 개별 중금속 이온에 의한 저해의 총합으로서 나타났으며 중금속 이온의 공존에 의한 저해억제 현상은 발견되지 않아 본 연구의 cuvette assay가 시료 중의 존재하는 Hg(II) 이온에 대한 선택적 검출법으로서 뿐만 아니라 존재가능한 중금속 이온들에 대한 간이검출법으로도 효율적으로 활용할 수 있음을 보여주었다.

Table 1. Inhibitions of urease activity according to the added other metal ions to Hg(II) ion

Inhibitor (mM)	Added other metal ion (mM)				Enzyme activity (%) <sup>a</sup>			
	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)
	Control	Control	Control	Control	100.0	100.0	100.0	100.0
	0.032	0.306	1.78	0.0097	90.3	100.6	97.2	86.9
Hg(II)	0.063	0.612	3.56	0.0193	78.0	98.4	93.7	74.8
(0.00001)	0.158	1.530	8.90	0.0483	68.1	95.5	92.9	55.1
	0.252	2.448	14.24	0.0773	45.2	94.9	90.1	35.8
	0.315	3.060	17.80	0.0966	35.2	91.4	89.6	31.4

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing Hg(II) only.

Table 2. Inhibitions of urease activity according to the added other metal ions to Pb (II) ion

Inhibitor (mM)	Added other metal ion (mM)				Enzyme activity (%) <sup>a</sup>			
	Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)
	Control	Control	Control	Control	100.0	100.0	100.0	100.0
	0.000001	0.032	0.306	1.78	99.0	83.2	100.2	99.7
Pb(II)	0.000005	0.063	0.612	3.56	97.6	70.5	98.6	98.3
(0.0097)	0.00001	0.158	1.530	8.90	91.1	60.2	97.3	98.0
	0.00005	0.252	2.448	14.24	57.4	55.2	96.9	97.8
	0.0001	0.315	3.060	17.80	6.9	52.7	92.8	97.9

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing Pb(II) only.

Table 3. Inhibitions of urease activity according to the added other metal ions to Cu (II) ion

Inhibitor (mM)	Added other metal ion (mM)				Enzyme activity (%) <sup>a</sup>			
	Hg(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)	Hg(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)
	Control	Control	Control	Control	100.0	100.0	100.0	100.0
	0.000001	0.306	1.78	0.0097	97.9	104.0	95.3	82.9
Cu(II)	0.000005	0.612	3.56	0.0193	96.5	100.6	93.9	79.1
(0.032)	0.00001	1.530	8.90	0.0483	93.9	99.8	93.0	67.5
	0.00005	2.448	14.24	0.0773	75.4	96.9	86.0	52.3
	0.0001	3.060	17.80	0.0966	18.6	95.7	84.8	42.7

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing Cu(II) only.

Table 4. Inhibitions of urease activity according to the added other metal ions to Zn (II) ion

Inhibitor (mM)	Added other metal ion (mM)				Enzyme activity (%) <sup>a</sup>			
	Hg(II)	Cu(II)	Cd(II)	Pb(II)	Hg(II)	Cu(II)	Cd(II)	Pb(II)
	Control	Control	Control	Control	100.0	100.0	100.0	100.0
	0.000001	0.032	1.78	0.0097	95.0	94.2	95.2	86.7
	0.000005	0.063	3.56	0.0193	93.4	82.5	84.3	74.6
Zn(II) (3.06)	0.00001	0.158	8.90	0.0483	84.1	64.7	83.8	58.0
	0.00005	0.252	14.24	0.0773	29.7	48.5	81.4	43.2
	0.0001	0.315	17.80	0.0966	14.6	35.9	79.0	34.4

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing Zn(II) only.

Table 5. Inhibitions of urease activity according to the added other metal ions to Cd (II) ion

Inhibitor (mM)	Added other metal ion (mM)				Enzyme activity (%) <sup>a</sup>			
	Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Pb(II)	Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Pb(II)
	Control	Control	Control	Control	100.0	100.0	100.0	100.0
	0.000001	0.032	0.306	0.0097	98.0	80.7	102.4	98.5
	0.000005	0.063	0.612	0.0193	93.6	66.2	101.7	93.9
Cd(II) (17.80)	0.00001	0.158	1.530	0.0483	89.0	57.0	98.1	72.5
	0.00005	0.252	2.448	0.0773	57.2	44.0	96.7	51.7
	0.0001	0.315	3.060	0.0966	8.1	42.8	97.0	17.9

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing Cd(II) only.

한가지 중금속의 농도를 고정하고 다른 중금속을 첨가 시 urease 활성의 저해정도를 그림으로 나타내면 Fig. 4와 같다.

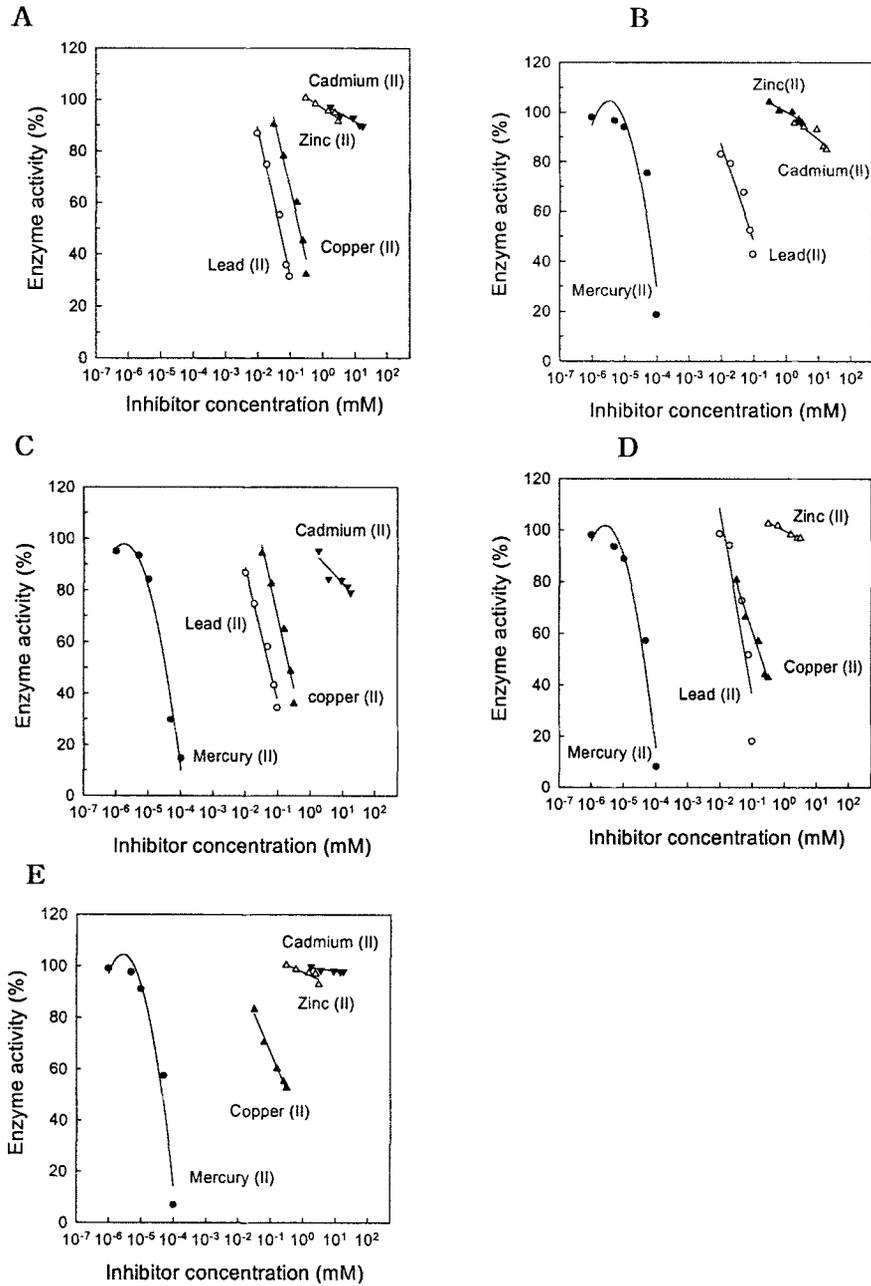


Fig. 4. Inhibitions of free urease with added other metal ions. Other metal ion solutions were added to A; Hg(II), B; Cu(II), C; Zn(II), D; Cd(II), and E; Pb(II).

## 나. Batch형 중금속 계측 urease 저해센서 시스템 개발

### 1) 실험방법

#### 가) Urease 고정화

Urease (EC 3.5.1.5, from jack beans, Sigma사) 0.5 unit를 5 mM의 Tris 완충용액 (pH 7.0) 1 mL에 용해시켜 효소용액을 제조하였다. Immobilon cellulose nitrate membrane (Milipore, pore size 0.4  $\mu\text{m}$ )을 전극의 직경보다 약간 작은 8 mm로 잘라 효소용액에 담가 24시간 동안 4°C 냉장고에서 정치하여 고정화하였다.

#### 나) Batch형 바이오센서 시스템 구성

##### (1) 바이오센서 시스템 구성

Urease 활성이 중금속에 의하여 저해되는 현상을 이용하는 저해센서는 암모늄 이온선택성전극 (ion-selective electrode, ISE)을 사용하여 potentiometric 하게 구성할 수 있다. 본 연구에서는 urease를 생물요소로 사용하는 효소센서 시스템을 구성하여 중금속 이온에 의하여 저해되는 현상을 기질인 urea 분해에 따라 생성되는 암모늄 이온을 mV로 측정하여 평가하였다 (Fig. 5). 이를 위하여 변환기로는 암모늄 전극 (Orion, model 93 series, USA)을 사용하고 반응결과의 potential 변화를 Orion (model 920) pH/mV meter로 측정하였다. 아울러, 바이오센서 시스템에 의한 계측과정을 운영 software에 의하여 PC화 하였다.

##### (2) 시료 분석

용액내의 이온세기를 일정하게 유지하기 위하여 모든 시료와 완충용액에 ionic strength adjuster (ISA)를 넣어 주었다. 즉, 표준 시료용액 100 mL에 ISA (NaCl 292 g/L) 2 mL를 넣어주었다. 전극을 처음 사용하기 전이나 오래 보관한 후 사용하는 경우에는 30분 동안 암모니아 표준용액에 전극을 담가둔 후 사용하였다.

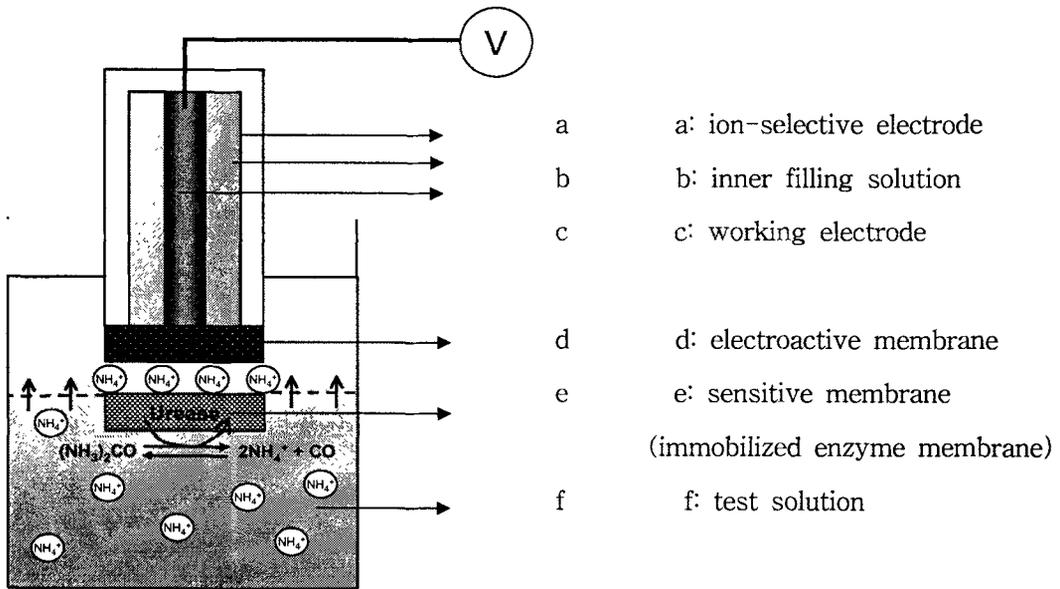


Fig. 5. Chemical reaction occurring on the surface of ion-selective ammonium electrode.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) Batch형 바이오센서 시스템의 기본특성

#### (1) 암모니아 농도에 따른 영향

표준 암모니아 용액을  $5.55 \times 10^{-5} \sim 5.55 \times 10^{-2}$  M로 각각 농도별로 조제한 후 이것을 반응 cell에 넣고 전극의 감응도를 살펴보았다. 암모니움 전극을 Tris 완충용액 (pH 7.0)에 담갔을 때의 초기전위값은 193.8 mV이었으며, 안정된 후에 암모니아의 농도를 증가시키면서 반응 cell에 첨가하면 전위값은 점차 증가하였다. 일반적으로 전위값은 -220 ~ -30 mV를 나타냈으며 고 농도의 암모니아를 주입하였을 때 전위값이 더 커지는 것을 보여주었고, 10배 농도가 증가함에 따라 전위차값 ( $\Delta$ mV)은 0.9에서 61.7 mV까지 증가하였다 (Fig. 6). Fig. 7에서 볼 수 있는 것처럼 암모니아 표준용액의 농도  $1 \times 10^{-2}$  M까지 0.998 (r)의 상관계수를 나타내었다.

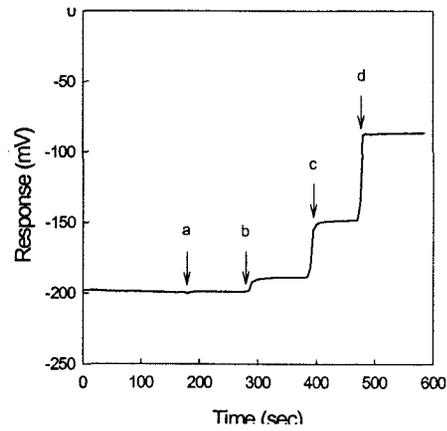


Fig. 6. Typical voltage response profiles of the batch type urease-based sensor. The added ammonia concentrations were  $5.55 \times 10^{-5}$  M (a),  $5.55 \times 10^{-4}$  M (b),  $5.55 \times 10^{-3}$  M (c) and  $5.55 \times 10^{-2}$  M (d), respectively.

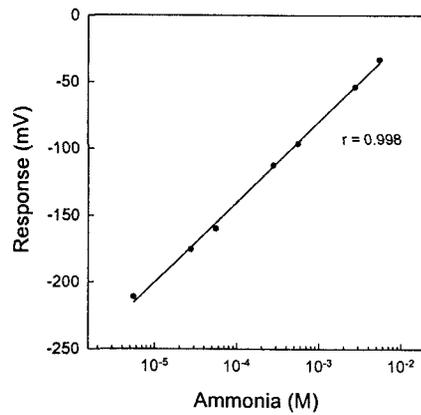


Fig. 7. Effect of ammonia concentrations on biosensor response.

### (2) 이온세기에 의한 영향

암모니움 전극에서 측정되는 것은 측정전위에 해당하는 암모니움 이온의 활동도를 반영한다. 활동도와 농도는 활동도 계수에 의해 영향을 받는데 활동도 계수는 이온세기에 의존하므로 센서 시스템에 미치는 이온세기의 영향을 알아보려고 하였다. 시료분석에 사용하는 Tris 완충용액 (pH 7.0)의 농도를 2, 5, 10, 20, 50 mM로 다양하게 제조한 후 전위값을 측정하여 보았다. 10 mM의 urea를 기질용액으로 주입한 후의 전위값은 이온세기에 의해 다소 차이를 보였으며 5 mM의 완충용액 농도에서 전위차가 가장 크게 나타났다 (Fig. 8). 또한 측정 시 안정될 때까지 걸리는 시간도 가장 짧아 이 조건에서 전극의 안정도가 가장 좋은 것으로 나타났다.

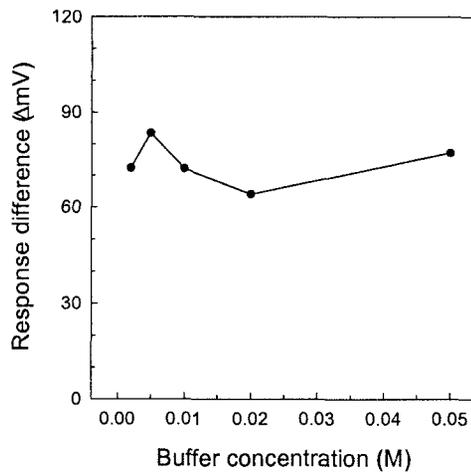


Fig. 8. Effect of buffer concentrations on biosensor response.

### (3) pH에 의한 영향

본 연구의 바이오센서 시스템에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 시료분석에 사용된 Tris 완충용액의 pH를 6.0에서 8.0까지 변화시키면서 센서반응을 살펴보았다. 유리상태의 urease는 pH 7.0에서 가장 활성이 좋은 것으로 알려져 있는데 같은 농도의 기질용액을 주입하였을 때 고정화한 후에도 pH 7.0과 8.0에서 전위차값이 큰 것을 보여주었다 (Fig. 9).

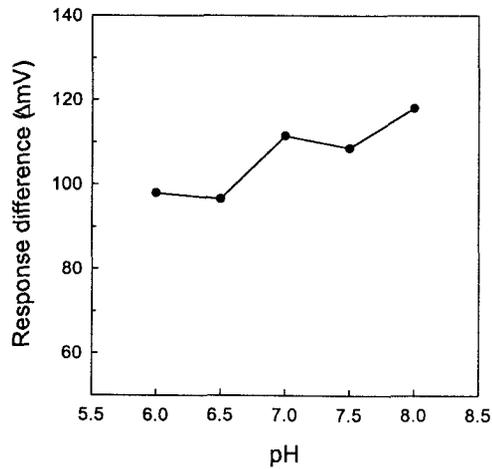


Fig. 9. pH dependence of biosensor response.

#### (4) 기질농도 (urea)의 변화에 따른 영향

바이오센서 반응에 미치는 기질인 urea 농도의 영향을 살펴보았다 (Fig. 10). 효소를 고정화하였을 때 나타나는 초기전위값은  $-176.5$  mV인데 이것은 고정화하지 않았을 때의 전위값 ( $-193.8$  mV) 보다 다소 상승한 값이다. 기질을  $10^{-6} \sim 10^{-2}$  M의 농도범위에서 반응 cell내에 주입하였을 때 기질농도가 증가함에 따라 전위값은 증가하였으며 전위차값도  $0.3 \sim 121.7$  mV로 점차 증가함을 보여주었다. 이는 효소를 고정화하지 않은 암모니움 전극에서 보여주는 전위차값과 다소 차이를 나타낸 것으로 효소를 고정화한 경우에는 전위차값은 상대적으로 더 크게 나타났다. 기질농도에 대한 센서반응을 도시하면  $10^{-6} \sim 10^{-2}$  M의 구간에서 반대수좌표에서 일직선상의 검량곡선을 보여준다. 이 사실은 urease 저해센서 시스템에 사용되는 기질농도를 결정하는데 참고사항이 된다. 또한, 다른 측면으로 고찰하여 중금속에 의한 저해를 고려하지 않으면 본 연구의 바이오센서는 생체내 대사산물의 하나인 urea의 농도를 정량적으로 측정하는 urea 센서로도 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 각각의 urea 농도구간에서의 상관계수 (r)는 다음 Table 6과 같다.

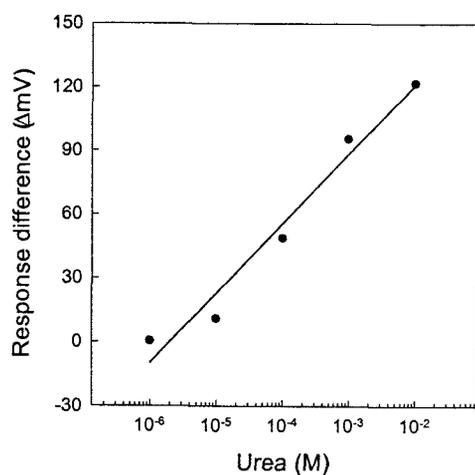


Fig. 10. Effects of substrate concentrations on biosensor response.

Table 6. Detailed description of biosensor response according to urea concentrations

Substrate (M)	Response (mV)	Response difference (ΔmV)	Urea linear range (M)	Correlation coefficient (r)
Tris buffer, pH 7.0	-172.1	-		
10 <sup>-6</sup>	-171.8	0.3	10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>	0.990
10 <sup>-5</sup>	-161.2	10.6	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-3</sup>	0.996
10 <sup>-4</sup>	-123.4	48.7	10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>	0.970
10 <sup>-3</sup>	-76.6	95.5		
10 <sup>-2</sup>	-50.4	121.7		

나) 중금속에 의한 바이오센서 반응의 저해

중금속 이온에 의한 urease 저해센서의 감응성을 알아보기 위하여 먼저 완충용액 상에서의 전위값을 측정 한 후 10 mM의 urea 용액에서의 전위값을 측정하였다. 이 후 각 중금속 이온의 농도를 달리하여 반응 cell에 첨가하면서 효소센서의 저해도를 전위값으로 측정하였다.

Hg(II)에 의한 urease 저해활성을 알아보기 위하여 Hg(II)의 농도를  $1.0 \times 10^{-6}$  mM에서  $1 \times 10^{-4}$  mM로 달리하여 첨가하여 본 결과, 전위차값 ( $\Delta mV$ )은 중금속을 첨가하지 않은 경우와 비교했을 때 0.7~101.9 mV 정도 감소하였으며,  $1 \times 10^{-4}$  mM의 Hg(II)에 대하여 효소활성이 28% 수준까지 저해됨을 보여주었다. 이는 같은 농도의 Hg(II)에 의하여 유리 urease가 10.2% 수준까지 저해됨과 비교해 볼 때 저해정도가 약간 낮음을 보여주는 것으로서 효소의 고정화에 의한 영향으로 사료되었다.

Cu(II)의 경우 Hg(II)에 있어서와 마찬가지로  $3.2 \times 10^{-2}$  mM에서 30 mM까지의 농도 범위에서 첨가하였을 때 전위차값은 1.0~112.3 mV로 나타났으며 30 mM의 Cu(II)에 의하여 센서반응이 64.7% 감소하였다.  $3.2 \times 10^{-1}$  mM의 Cu(II)를 첨가했을 때의 센서반응은 81.3%로서 유리 urease의 효소활성이 36.4%인 것과 비교해 보았을 때 고정화에 의하여 urease의 Cu(II)에 대한 감응성이 약간 낮아짐을 알 수 있었다.

Zn(II)의 경우  $3.1 \times 10^{-1}$  mM에서 20 mM까지 첨가한 결과 전위차값은 1.1~2.5 mV이었으며 20 mM의 Zn(II) 첨가 시 센서반응은 98.5%로 높게 유지됨을 알 수 있었다. 반면, 유리 urease의 경우에는 3.1 mM의 Zn(II) 첨가 시 센서반응이 97%까지 유지되었다. 이 결과는 유리 urease나 고정화된 urease가 Hg(II)나 Cu(II)에 의한 경우와는 다르게 Zn(II)에 의해서는 크게 저해받지 않음을 보여주어 Zn(II)가 효소의 불활성화에 거의 영향을 끼치지 않음을 보여준다.

Cd(II)의 경우 1.8 mM에서 180 mM까지에 해당하는 농도를 첨가한 결과, 전위차값은 1.1~53.0 mV로 나타났고 이는 180 mM Cd(II)의 경우 센서반응이 36.6%까지 저해됨을 보여주었다. 반면, 유리 urease의 경우 17.8 mM의 Cd(II) 첨가 시 효소활성이 10.2% 저해되었다.

Pb(II)는  $5 \times 10^{-4}$  mM에서  $5 \times 10^{-2}$  mM에 해당하는 농도를 첨가한 결과, 전위차값은 0.2~1.0 mV 이었으며  $5 \times 10^{-2}$  mM 농도의 경우 센서반응이 99.4%까지 유지됨을 보여주었다. 유리 urease의 경우  $9.7 \times 10^{-2}$  mM의 Pb(II)를 첨가했을 때 효소활성이 28.8%까지

저해된 것과 비교해 볼 때 저해도에 있어 비교적 큰 차이가 남을 알 수 있었다.

이 결과, urease 저해센서의 중금속에 의한 저해도는 Hg(II) > Cu(II) > Cd(II) > Pb(II) > Zn(II)의 순으로 나타났으며 이것을 흡광도로 측정한 urease의 저해정도와 비교해 볼 때 Pb(II)의 경우 차이가 나타나나 대개의 경우 일치하는 경향임을 알 수 있었다. 결과적으로 유리효소에 의한 중금속의 저해정도보다 효소를 고정화한 후 중금속의 저해정도를 측정한 경우가 효소활성이 비교적 더 많이 유지됨을 알 수 있었다. 위의 결과를 간추린 것을 Table 7에 표시하였고 이들 중금속 이온에 대한 바이오센서의 반응특성을 Fig. 11에 표시하였다.

Table 7. Inhibitions of the urease-based sensor at varying concentrations of individual heavy metal ion

Added metal ion (mM)					Enzyme activity (%) <sup>a</sup>				
Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)	Hg(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Pb(II)
0	0	0	0	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
$1 \times 10^{-6}$	$3.2 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-1}$	1.8	$5 \times 10^{-4}$	99.5	99.4	99.4	99.4	99.9
$5 \times 10^{-6}$	$3.2 \times 10^{-1}$	1.5	10	$1 \times 10^{-3}$	98.2	81.3	99.3	99.1	99.2
$1 \times 10^{-5}$	3.2	3.1	20	$5 \times 10^{-3}$	97.2	57.7	98.9	98.7	99.3
$5 \times 10^{-5}$	30	20	90	$1 \times 10^{-2}$	38.1	35.3	98.5	86.4	99.1
$1 \times 10^{-4}$	-	-	180	$5 \times 10^{-2}$	28.0	-	-	63.4	99.4

<sup>a</sup> Percent ratio against the enzyme activity of the control containing 10 mM urea only.

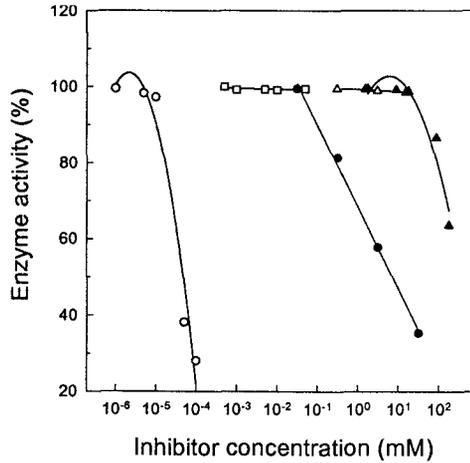


Fig. 11. Inhibitions of the urease-based sensor by heavy metal ions. ○, Hg(II); ●, Cu(II), △, Zn(II); ▲, Cd(II); □, Pb(II).

#### 다) 바이오센서 반응의 재현성

Urease 저해센서의 중금속에 대한 감응성을 전위차값으로 측정할 때, 한 번 중금속 이온에 노출된 효소 고정화막의 urease는 완충용액에서는 재활성화가 이루어지지 않고, 따라서 센서의 재사용을 할 수 없게 된다. 그러나, 중금속에 의한 urease의 불활성화는 대개의 경우 가역반응이므로 적절한 chelating agent 처리에 의하여 센서는 원래의 감응성을 회복할 수 있게 된다. 본 연구에서는 이를 위하여 암모늄 효소전극을 100 mM EDTA 용액에 약 5분간 담가 stirring bar로 돌려주면서 처리하여 효소막을 세척하였다. 이 후, 증류수와 완충용액으로 다시 세척한 후 기질에 대한 감응성을 측정하면 효소활성이 중금속 이온의 종류에 따라 원래수준으로 회복되었다. Cu(II) 이온의 경우를 예로 들면, 100 mM EDTA 처리를 반복하면서 암모늄 효소전극의 중금속에 의한 저해정도를 측정하였다 (Fig. 12). Fig. 12에서 볼 수 있는 것처럼 100 mM EDTA 처리를 4회까지 반복하더라도 10 mM urea 존재하에서의 초기활성은 거의 일정하게 유지되었고 Cu(II) 이온에 의한 저해정도도 거의 비슷한 것으로 나타나 재현성이 양호한 것으로 평가되었다. 기타 이온의 경우는 반복사용에 따른 재현성이 Cu(II) 이온의 경우보다 낮은 것으로 나타났는데 이는 개별 중금속에 의한 urease 저해기구의 차이점을 시사하는 것으로 사료되었다.

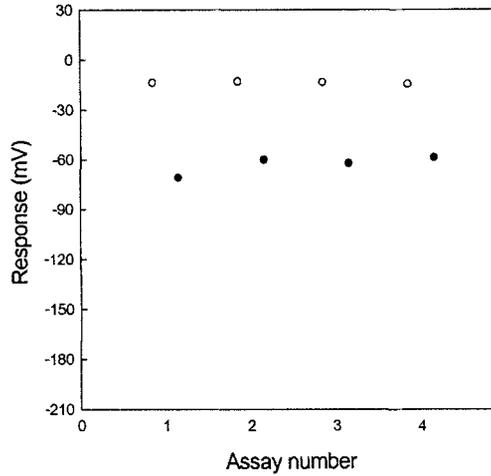


Fig. 12. Reproducibility of the urease inhibition sensor against Cu(II) ions. ○, response of the biosensor in the presence of urea; ●, response of the biosensor in the presence of urea and Cu(II) ions.

본 연구의 urease 저해센서는 inductively coupled plasma (ICP)에 의한 중금속의 정밀분석에 앞선 간이 스크리닝에 의하여 중금속 오염 가능성이 있는 시료를 선별하는데 앞서 개발된 urease 저해활성 측정 cuvette assay와 함께 사용될 수 있을 것으로 생각되며, potentiometric 원리에 의하여 중금속 존재 시의 전위차변화를 측정하므로 pH/mV meter, 암모늄 전극과 운영 software 만으로도 작동할 수 있어 저렴하게 구성할 수 있고 compact한 휴대용 시스템으로도 향후 발전시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이를 위해서는 연속형 시스템으로 전개하는 것도 한 방안이 될 수 있으므로 아래에서 flow형 중금속 계측 urease 저해센서 시스템에 대하여 연구하였다.

#### 다. Flow형 중금속 계측 urease 저해센서 시스템 개발

##### 1) 실험방법

##### 가) Urease 고정화

Chitopearl bead (Fujibo, Japan) 4 mL를 5 mM Tris 완충용액 (pH 7.0) 10 mL에 넣고 세척하였다. 세척한 bead를 희석 glutaraldehyde 용액 (2.5%)에 가하고 30°C에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이 후 증류수와 동일한 완충용액으로 충분히 씻어준 후

urease를 인산 완충용액에 용해시켜 효소용액 (2.5 units/mL)을 제조하고 30℃에서 2시간, 4℃에서 24시간 진탕하며 반응시켰다. 고정화 효소 bead를 충전하기 위하여 직경 3 mm, 길이 7 cm의 glass micro-column을 사용하였다. 한편, 흡착법에 의하여도 urease를 Immobilon cellulose nitrate membrane에 고정화 하였다.

#### 나) Flow형 바이오센서 시스템 구성

Flow형 바이오센서 시스템 중 reactor형 시스템의 구성도는 다음과 같다 (Fig. 13). 일정한 유속으로 완충용액 및 기질용액을 연속적으로 흘려주기 위하여 Gilson사 (France)의 Minipuls 3 pump, Rheodyne injector (Supelco사, USA), 고정화효소 bead가 충전된 micro-column을 차례로 연결하였다. 이를 암모늄 전극에 연결하고 반응결과의 potential 변화를 pH/mV meter로 측정하였다. 이 때 연속형 시스템의 각 부분의 연결은 직경 0.8 mm인 capillary tubing (19-0041-01, Pharmacia, Sweden)에 의하여 행하였으며, batch형 바이오센서 시스템의 경우와 마찬가지로 센서신호의 계측을 PC화 하여 software에 의하여 운영될 수 있도록 하였다 (Fig. 13).

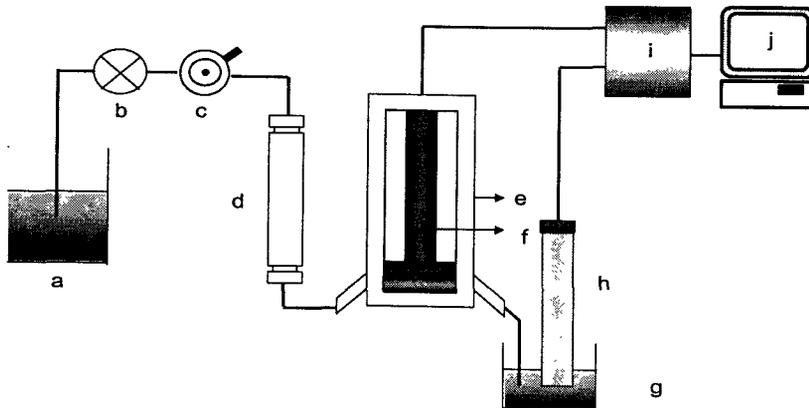


Fig. 13. Schematic diagram of the urease inhibition sensor with flow-through reactor. a, buffer; b, peristaltic pump; c, injector; d, enzyme reactor; e, flow cell body; f, ammonium ISE; g, waste solution; h, reference electrode; i, pH/mV meter; j, PC.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) Flow형 바이오센서 시스템의 기본특성

#### (1) 반응 profile

1차년도에는 Immobilon cellulose nitrate membrane에 효소를 흡착법으로 고정화하여 batch형 시스템을 구성한 반면 3차년도에는 Immobilon cellulose nitrate membrane에 의한 효소 고정화와 이를 전극에 부착한 flow cell형 시스템과 urease가 고정화된 Chitopearl bead로 충전된 효소반응기를 사용하는 reactor형 시스템의 두 가지 flow형 시스템을 구성하였으며, 이 때 이들의 반응 profile은 Fig. 14와 같다. Flow cell형 시스템의 경우 반응시간이 20분 이상 소요되어야 반응이 안정되었고 정상상태 (steady-state)에 이르기까지 많은 시간이 소요되었다. 한편, reactor형 시스템의 경우 반응시간은 20분 이내로 나타났다.

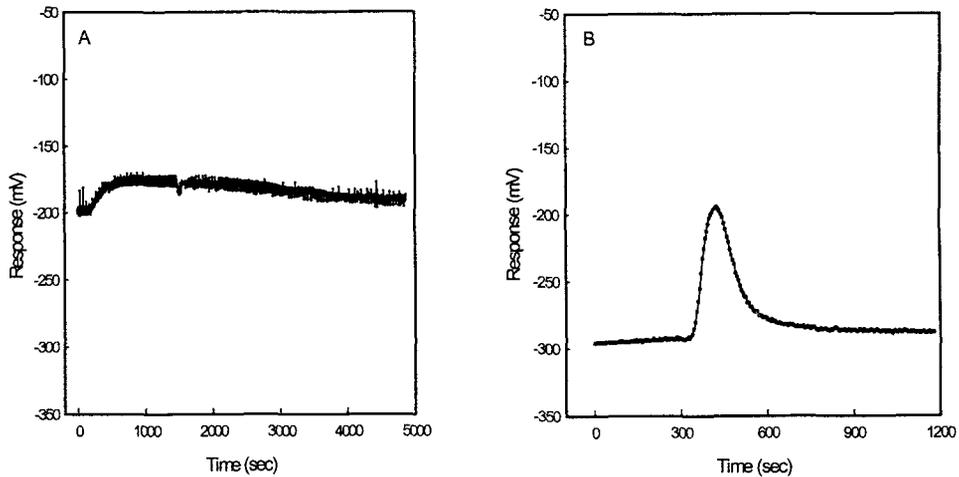


Fig. 14. Responses of the flow type urease inhibition sensor systems. A, flow cell type; B, reactor type.

#### (2) 유속의 영향

Flow형 바이오센서 시스템의 반응에 미치는 완충용액 유속의 영향을 100  $\mu$ L의 기질을 주입하면서 살펴보았다 (Table 8). 이 때, 유속은 0.155~0.255 mL/min으로 변화시켰다. 그 결과, 실험에 사용된 유속 범위에서 바이오센서의 반응도는 큰 차이가 없었으나 0.200 mL/min의 유속에서 센서감응이 가장 큰 것으로 나타났다.

Table 8. Effect of flow rates on the responses of the flow type biosensor system

Flow rate (mL/min)	Response (mV)
0.155	27.2
0.188	28.2
0.200	39.1
0.229	33.4
0.255	27.5

Table 9는 batch형 바이오센서 시스템과 최적 유속조건 하에서 작동되는 flow형 바이오센서 시스템의 반응시간과 감응도를 비교한 결과이다. Table 9에서 볼 수 있는 것처럼 flow형 바이오센서 중에서는 reactor형 시스템이 보다 나은 작동특성을 보여주고 있다.

Table 9. Comparison of reaction time and response among the batch and flow type biosensor system

System	Sensing element	Reaction time (min)	Sensitivity (mV)
Batch type	Urease membrane	20	94.4
Flow type	Flow cell	60	111.4
	Reactor	Urease reactor	20

### (3) Reactor 길이에 의한 영향

Flow형 바이오센서 시스템 중 reactor형 시스템에서 효소반응기의 길이에 따른 센서 감응을 반응기질의 농도를 달리하면서 비교하였다 (Fig. 15). 이 때, reactor의 길이를 7 cm 및 10 cm로 각각 달리하여 효소가 고정화된 Chitopearl bead를 충전하였다. Reactor의 길이가 10 cm인 경우 기질로서 0.1 M urea를 반응시키면 reactor의 길이가 7 cm인 경우보다 감응도가 40% 정도 우수한 것으로 나타났다. 따라서, 이 후의 실험은 reactor의 길이를 10 cm인 것으로 사용하였다.

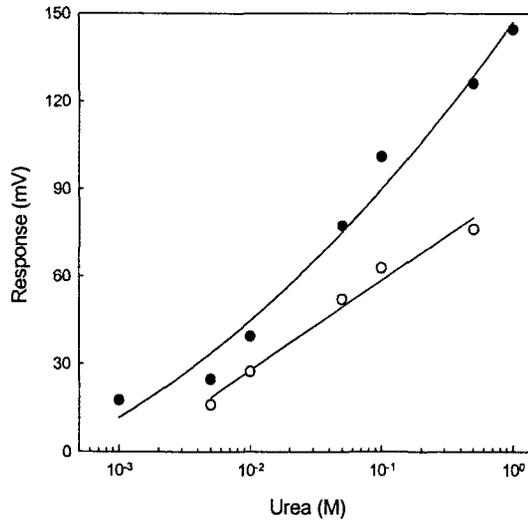


Fig. 15. Effect of the reactor length on biosensor response.

●, 10 cm; ○, 7 cm.

### (4) 암모니아 및 urea 농도의 영향

본 연구의 flow cell형 및 reactor형 바이오센서 시스템이 암모니아와 urea 농도에 따라 나타내는 반응특성을 살펴보았다. Flow cell형 시스템의 경우 암모니아 농도 0~0.06 M까지 반응하였으며 reactor형 시스템의 경우에는 0~0.003 M까지 반응하여 reactor형 시스템의 경우 보다 낮은 농도의 암모니아와 반응할 수 있었다 (Fig. 16). 또한 반응기질인 urea의 농도변화에 따른 영향을 살펴 본 결과, flow cell형 시스템의 경우 urease 2 unit을 고정화하였을 때 0.1 M urea 농도까지 상관관계를 나타내었다. 한편, reactor형 시스템의 경우에는 urea 0.6 M까지도 반응하여 기질에 대한 감응 농도범위가 넓은 것으로 나타났다 (Fig. 17).

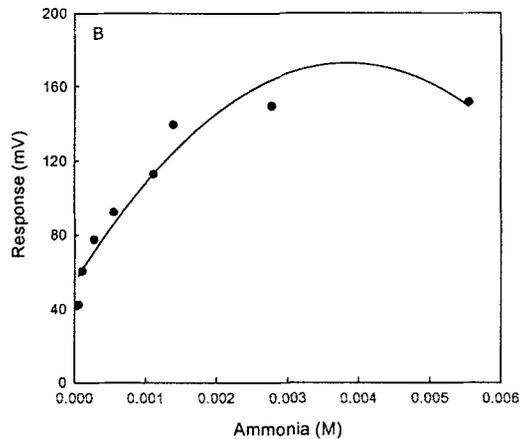
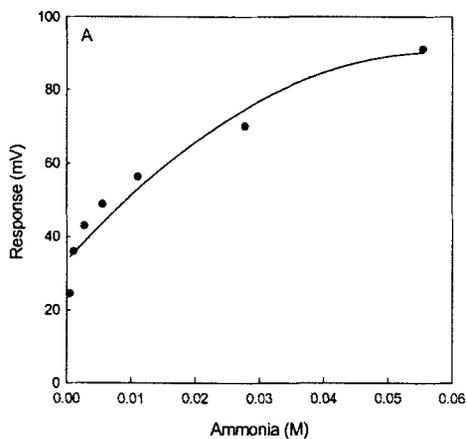


Fig. 16. Effects of ammonia concentrations on biosensor response. A, flow cell type system; B, reactor type system.

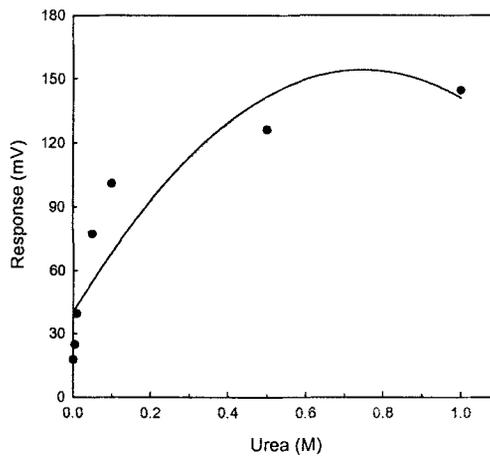
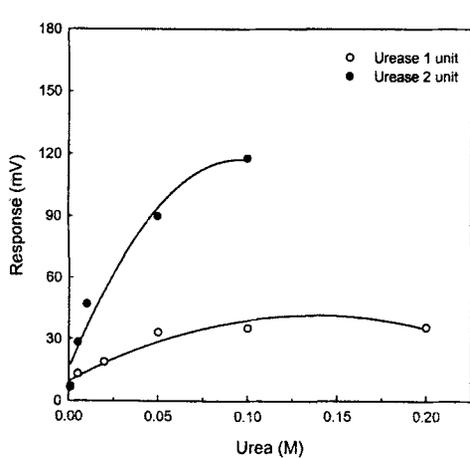


Fig. 17. Effects of urea concentrations on biosensor response. A, flow cell type system; B, reactor type system.

(5) 효소 고정화량에 의한 영향

Flow형 바이오센서 시스템 중 reactor형 시스템에서 효소 고정화량을 각각 2, 2.5, 5 unit로 달리하여 제조한 효소반응기에 따른 센서반응을 살펴보았을 때, 효소농도 2.5 unit의 경우 가장 반응성이 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 18).

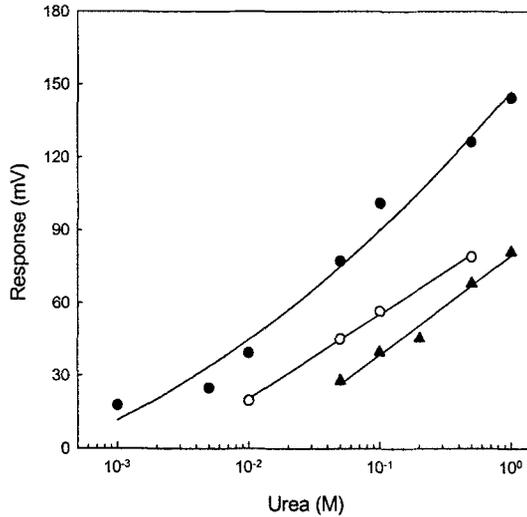


Fig. 18. Effect of immobilized enzyme loadings on biosensor response of the reactor type system. ▲, 2 unit; ●, 2.5 unit; ○, 5 unit.

나) 중금속에 의한 바이오센서 저해반응 profile

Flow형 중금속 계측 urease 저해센서 시스템에서의 계측과정 중 반응 profile의 변화를 reactor형 시스템의 경우를 예로 들어 설명하면 다음과 같다. 즉, 일정한 유속으로 완충용액을 흐르게 하고 반응이 정상상태에 이르게 되면 주입구에 urea를 주입하였다. 기질이 효소가 고정화된 reactor를 통과하면서 센서반응이 일어나게 된다 (Fig. 19, peak 1). 여기에 중금속 이온 용액을 주입하여 반응시키면 중금속 이온의 농도나 종류에 따라 urease의 저해정도가 달라지게 되므로 기질만 주입하였을 때보다 반응 peak가 작게 나타나게 된다 (Fig. 19, peak 2). 이를 계산하면 효소의 저해도에 따른 중금속 이온의 농도를 측정할 수 있다. 반응이 끝나면 Chitopearl bead에 결합되어 있는 중금속 이온을 분리하기 위하여 EDTA 용액을 주입하여 세척하였다. 이 때, 기질을 주입하여 얻어지는 반응 peak는 초기에 기질을 주입한 경우보다 크게 나타났으나 (Fig. 19, peak 3), 완충용액을 계속적으로 흘려 보내 세척하면 반응 peak가 원래의 수준 정도로 낮아져 안정되고

이에 다음 주기의 분석을 행할 수 있었다 (Fig. 19, peak 4).

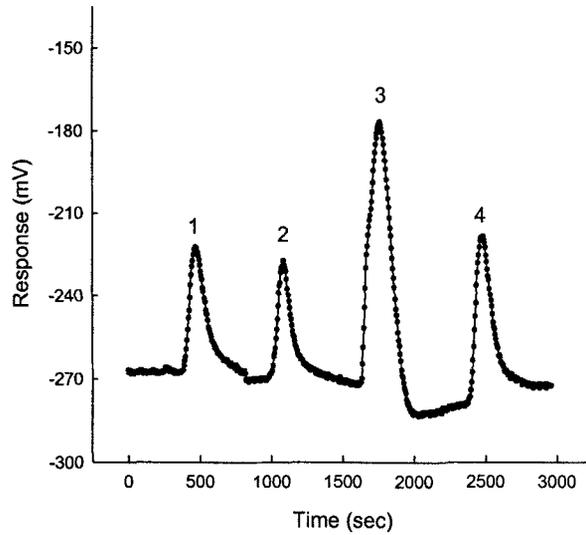


Fig. 19. Response profiles of the reactor type urease inhibition sensor system. 1, urea; 2, urea + heavy metal ion; 3, EDTA flushing; 4, urea.

본 연구에서 구성한 flow형 중금속 계측 urease 저해센서 시스템에 의하여 얻어진 중금속 저해 표준곡선의 감응도는 batch형 바이오센서 시스템의 경우보다 전반적으로 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 효소반응기인 micro-column에 충전된 bead에 고정화된 urease의 활성이 중금속 이온에 의하여 저해되는 현상에 대한 억제효과가 고정화담체 등의 다양한 원인에 의하여 나타난 것으로 사료되었다.

#### 라. 실제시료 계측

##### 1) 실험방법

##### 가) 기존방법에 의한 분석용 시료 전처리

쌀, 고사리, 콩나물, 건고사리, 목이버섯, 백태, 흑태의 농산물 7종을 각각 10 g씩 취하여 건조믹서기로 고루 갈아 30 mesh 표준망체를 통과한 고운 입자를 얻었다. 이를 3 g씩 취하여 열판 위에서 예열처리한 후 500℃에서 2시간 회화하고 실온까지 냉각하였다. 여기에 증류수 10 방울을 떨어뜨린 후 0.1 N HNO<sub>3</sub> 용액 3 mL를 떨어뜨렸다. 이를

열판 위에서 건조하여 질산이 휘발되도록 하고 시료가 완전히 건조하도록 하였다. 500 °C에서 1시간 회화 후 다시 냉각하고 0.1 N HCl 용액 10 mL를 넣어 재를 완전히 용해 하였다. 이를 증류수를 이용하여 50 mL 플라스크에 정용하고 여과한 것을 ICP 분석용 검체로 하였다.

#### 나) 바이오센서 방법에 의한 시료 전처리

상기의 시료 7종을 각각 10 g씩 취하여 건조믹서기로 고루 갈아 300 mesh 표준망체를 통과한 미세입자를 얻었다. 이것을 Tris 완충용액에 용해시켜 충분히 교반한 후 0.45 µm membrane filter를 통과시킨 것을 control 시료로 사용하였다. 한편, 시료에 Hg(II)  $5 \times 10^{-4}$  M, Cu(II)  $5 \times 10^{-3}$  M, Cd(II)  $5 \times 10^{-3}$  M, Pb(II)  $5 \times 10^{-3}$  M, Zn(II)  $5 \times 10^{-3}$  M의 중금속을 취하여 spiking한 후 Tris 완충용액을 가하여 위와 같이 처리하여 모델시료를 제조하였다. 반응용액 중의 이온세기를 일정하게 유지하기 위하여 모든 시료와 완충용액에 ionic strength adjuster (ISA)를 넣어 주었다.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) 실제시료 중의 중금속 분석

시료 중에 존재하는 중금속의 농도를 기존 분석법인 ICP 및 Hg analyzer를 이용하여 분석하였다 (Table 10). 시료 중 Hg, Cu, Pb, Zn, Cd 농도는 각각 30~720, 1000~29000, 0~800, 5000~56000, 0~300 ppb 수준으로 존재하여 Cu와 Zn의 함량이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 농도범위와 본 연구의 urease 저해센서 시스템의 검출구간을 고려해 볼 때 (Fig. 3, Fig. 11) 본 연구의 바이오센서 시스템으로 시료 중의 Hg와 Cu의 존재여부를 스크리닝 할 수 있을 것으로 사료되었다.

Table 10. Analysis of heavy metals in the real samples by the conventional Hg analyzer and ICP

Inhibitor	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ppb)	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
Hg	30~720	0.15~3.59
Cd	0~300	0~2.67
Cu	1000~29000	15.74~456.36
Pb	0~800	0~3.86
Zn	5000~56000	76.46~856.40

나) Urease 저해센서 시스템에 의한 모델시료 분석

본 연구의 urease 저해센서 시스템을 이용하여 각각의 중금속 이온이 spiking 된 모델시료를 분석하고 표준시료를 가하였을 때 얻어지는 urease 저해에 대한 상대저해도로써 표시하였다 (Table 11, 12).

Table. 11. Analysis of Hg(II) ion in the model samples by the urease inhibition sensor

Inhibitor	Spiked concentration (M)	Sample	Relative inhibition (%) <sup>a</sup>
Hg(II)	$5 \times 10^{-4}$	Rice	95.8
		Bracken	99.7
		Bean sprouts	98.9
		Dried bracken	107.1
		Jellyfungus	104.5
		<i>Glycine max</i> (baektae)	105.8
		<i>Glycine max</i> (heugtae)	107.2

<sup>a</sup> Percent biosensor response on the spiked model sample against that of the standard sample.

Table 12. Analysis of other heavy metal ions in the model samples by the urease inhibition sensor

Inhibitor	Spiked concentration (M)	Sample	Relative inhibition (%) <sup>a</sup>
Cu(II)	$5 \times 10^{-3}$	Rice	96.0
		Bracken	110.6
		Bean sprouts	109.6
		Dried bracken	116.1
		Jellyfungus	114.4
		<i>Glycine max</i> (baektae)	116.3
		<i>Glycine max</i> (heugtae)	114.3
Cd(II)	$5 \times 10^{-3}$	Rice	99.9
		Bracken	95.9
		Bean sprouts	101.0
		Dried bracken	103.3
		Jellyfungus	104.1
		<i>Glycine max</i> (baektae)	107.1
		<i>Glycine max</i> (heugtae)	107.0
Pb(II)	$5 \times 10^{-3}$	Rice	101.0
		Bracken	99.6
		Bean sprouts	101.8
		Dried bracken	106.0
		Jellyfungus	103.4
		<i>Glycine max</i> (baektae)	104.2
		<i>Glycine max</i> (heugtae)	102.8
Zn(II)	$5 \times 10^{-3}$	Rice	97.9
		Bean sprouts	97.3
		Dried bracken	97.1
		Dried bracken	104.0
		Jellyfungus	103.4
		<i>Glycine max</i> (baektae)	102.5
		<i>Glycine max</i> (heugtae)	103.8

<sup>a</sup> Percent biosensor response on the spiked model sample against that of the standard sample.

Table 11 및 12에서 알 수 있는 것처럼 농산물 시료에 따른 개별 중금속 이온에 의한 바이오센서 시스템의 상대저해도는 Hg(II), Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II) 이온의 경우 각각 95.8~107.2, 96.0~116.3, 95.9~107.1, 99.6~106.0, 97.1~104.0%로 나타났는데, 이들 모델시료에 대한 측정치가 중금속 이온에 의한 urease 저해 표준곡선에 매우 근접하게 수렴함을 의미하고 아울러 본 연구의 urease 저해센서 시스템의 실제 활용가능성을 보여준다.

또한, 본 연구의 바이오센서 시스템에 의한 분석 시, 전처리 과정을 간편화 하였으므로 기존의 중금속 분석법에 비하여 유리한 점이 있고 이와 같은 방법은 향후 시료 전처리의 필요성이 크지 않은 농업용수 등에 존재가능한 중금속 모니터링에의 적용가능성을 보여준다.

### 3. 항생제 측정을 위한 광학적 면역센서 시스템 개발

#### 가. Electroluminescence Spectrometer를 이용한 실험

##### 1) 실험방법

##### 가) 항생제에 대한 항체 및 효소 확보

표지효소인 horseradish peroxidase (HRP) type VI와 VI-A, anti-chloramphenicol (CAP) antibody, 화학발광 (chemiluminescence) 실험에 필요한 luminol과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등은 Sigma사 (MO, USA)의 제품을 사용하였다. HRP 및 anti-CAP antibody HRP의 고정화에 사용된 nitrocellulose membrane은 Waters사 (MI, USA)의 것이었고 Biotek nylon B membrane 등은 Pall사 (NY, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

##### 나) Anti-CAP antibody-HRP conjugate 제조

화학발광도 측정에 의하여 고정화 지지체 (immobilization support)로의 항체의 시간 의존적인 결합정도를 실험하기 위하여 anti-CAP antibody-HRP conjugate를 modified periodate method에 의하여 다음과 같이 제조하였다. 즉, 4 mg의 HRP를 1 mL 증류수에 용해시키고 바로 제조한 0.1 M sodium periodate 용액 200 µL를 첨가한 후 이를 실온에서 20분간 흔들어 주고 4°C에서 1 mM sodium acetate 완충용액 (pH 4.4)으로 하룻밤 동안 투석하였다. 투석막 내의 용액에 0.1 M sodium carbonate 완충용액 (pH 9.5)을 적당량 첨가하여 pH가 9.0~9.5가 되게 한 후 CAP에 대한 항체 (0.25 mg/mL)를 위의 sodium carbonate 완충용액에 용해한 후 첨가하여 2시간 동안 실온에서 가끔씩 흔들어 주면서 conjugation 하였다. 여기에 sodium borohydride (4 mg/mL)를 증류수에 용해하여 조제한 것을 100 µL 첨가한 후 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. 이를 다시 borate 완충용액 (0.1 M, pH 7.4)에 넣고 투석한 후 60% glycerol 용액을 첨가하여 4°C에서 저장하였다.

##### 다) Free HRP 및 anti-CAP antibody-HRP의 고정화

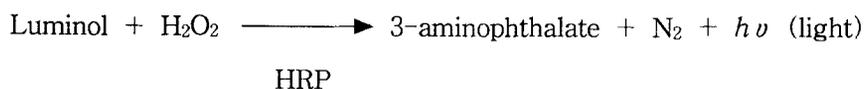
효소 및 항체의 고정화는 다음과 같이 행하였다. 먼저, free HRP의 경우 nitrocellulose membrane을 가로, 세로 8 mm의 크기로 잘라 이를 농도를 달리한 효소용액에 담가 24시간 흡착시킨 후 PBST 완충용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 씻어주었다. Biotek nylon B membrane을 포함하는 Pall

membrane의 경우도 같은 크기로 자른 후 동일한 방법으로 반응시켜 효소를 고정화하였다. 또한 anti-CAP antibody-HRP conjugate의 경우도 위와 동일한 방법으로 각각의 membrane에 고정화하였다.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) 화학발광 원리

항생제 등 위해물질의 고감도 분석을 위한 면역센서 실험 시, 계측신호로서 화학발광의 측정은 유력한 계측수단이 될 수 있으므로 먼저 그 원리를 살펴보면 다음과 같다.



이 때,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 산화제 (oxidant)이며 HRP는 촉매제 (catalyst)로 작용하게 되고 가끔 iodophenol 등을 증진제 (enhancer)로서 사용한다. 본 연구에서는 화학발광 조건을 우선 설정하고자 하였으며, 이를 위하여 Electroluminescence Spectrometer (Aminco-Bowman Series 2, Spectronic사, NY, USA)를 사용하였다. 화학발광 실험을 위한 반응 혼합물의 구성성분으로서 2.5 mM luminol, 2.5 mM *p*-iodophenol, 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 HRP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.6)에 용해시켜 각각의 stock solution을 제조하였다. 개별 성분의 stock solution을 quartz cuvette (Sigma사)에 각각 60  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 최종적으로 HRP 60  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 전체 부피가 3 mL가 되도록 위의 완충용액으로 조정하였다. Spectrometer의 파장을 100~700 nm의 범위에서 scanning 하여 emission 파장을 지정하고 이 후의 화학발광 실험을 행하였다. 예비실험에서 cuvette에 luminol,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *p*-iodophenol, HRP를 전부 넣고 측정한 결과, 413~420 nm에서 최대광도 (maximum light intensity)를 보여주는 emission spectrum을 얻을 수 있었다. 한편, luminol 자체도 동일한 파장대역에서 최대광도를 나타내나 화학발광 실험의 반응 혼합물이 모두 들어있는 경우보다는 현저하게 빛의 방출이 낮았다. 따라서, luminol에 의한 background 값을 뺀 것을 반응에 의한 발광도로서 계산하였다.

나) Free HRP를 이용한 실험

(1) Luminol 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 영향

일정한 농도의 free HRP를 이용하고 여기에 반응 혼합물 중 luminol과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 stock solution을 여러 농도로 희석한 working solution을 가하고 화학발광의 정도를 측정하였다. 먼저 luminol의 농도를 0.003~0.04 mM로 변화시키면서 발광도를 측정한 결과는 Fig. 20과 같으며 최대발광도를 보여주는 0.02 mM을 최적조건으로 설정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.166~2.0 mM 농도로 변화시켰을 때 23.5~38.4 범위의 발광도를 얻을 수 있었으며 (Fig. 21), 중간값인 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 향후의 실험을 수행하는 것이 타당할 것으로 사료되었다.

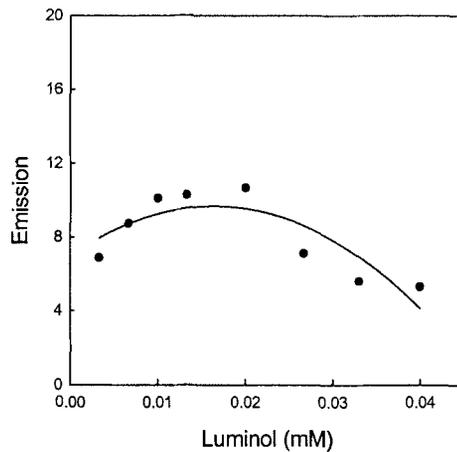


Fig. 20. Effect of luminol concentrations on light emission.

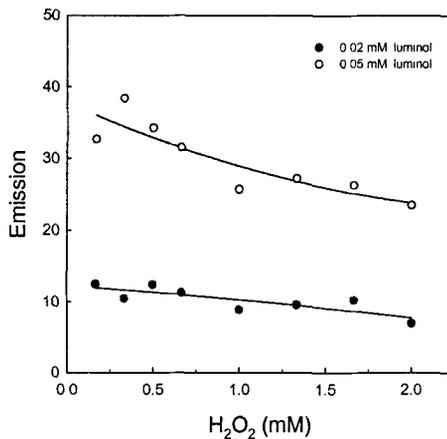


Fig. 21. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on light emission.

## (2) Free HRP 농도에 의한 영향

Luminol 및  $H_2O_2$ 의 농도를 일정하게 유지하고 HRP의 농도를 16.66~200  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 로 변화시키면서 발광도를 측정하였다 (Fig. 22). Luminol 농도가 0.02 mM일 때 HRP의 농도변화에 따른 발광도의 변화가 보다 양의 상관성을 지니는 것으로 나타난 반면, 0.05 mM의 luminol을 주입하였을 때는 HRP 농도변화에 따라 발광도가 증가하다 감소하는 경향을 보여주었다. 본 연구에서는 중간값인 100  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 의 HRP 농도를 최적조건으로 설정하였다.

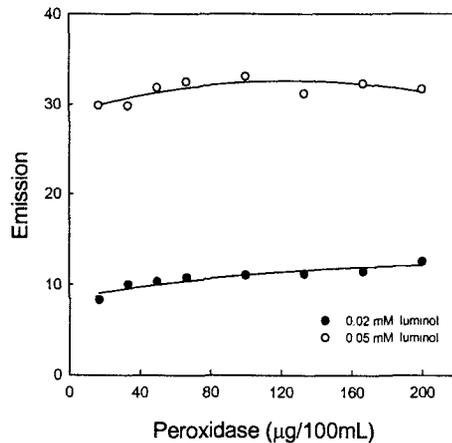


Fig. 22. Effect of free HRP concentrations on light emission.

### 다) 고정화된 anti-CAP antibody-HRP를 이용한 실험

#### (1) 고정화 지지체별 고정화 시간에 따른 반응성

Anti-CAP antibody-HRP conjugate를 nitrocellulose membrane과 Biotinylated nylon B membrane에 각각 경시적으로 고정화한 후 반응 혼합물에 가하고 발광도를 측정하였다. 이 때, luminol의 농도는 0.02 mM로 하였다. Fig. 23에서 볼 수 있는 것처럼 고정화 시간이 경과함에 따라 화학발광의 반응성이 좋아졌으나 5시간 이후부터는 고정화 시간이 경과하여도 반응도는 거의 증가하지 않았다. 최대발광도의 50%에 해당하는 고정화 시간을  $E_{50}$ 으로 정의하면  $E_{50}$ 은 30분 이내로 나타남을 알 수 있었고 이는 anti-CAP antibody-HRP conjugate의 흡착반응이 반응초기에 거의 완료됨을 의미한다. 따라서 추후의 면역센서 실험에서 항체 고정화 시간의 최소화에 의한 반응시간의 단축이 가능할 것으로 사료되었다. 또한, Fig. 23으로부터 고정화 지지체로는 nitrocellulose membrane보다 Biotinylated nylon B membrane이 더 우수한 것을 알 수 있었다.

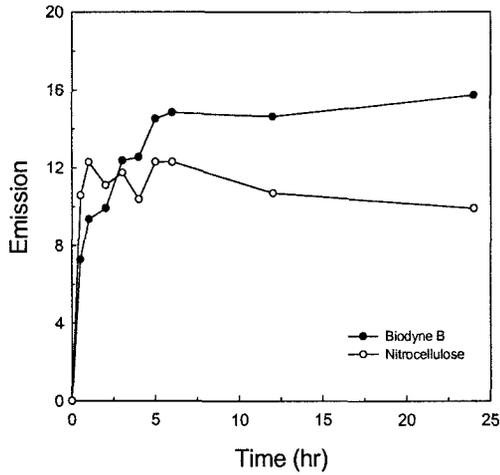


Fig. 23. Time-dependent binding of the anti-CAP antibody-HRP onto immobilization supports.

(2) Luminol 농도에 따른 반응성

Anti-CAP antibody-HRP를 희석하여 농도를 각각 달리한 것에 위의 고정화막을 가하고 luminol의 농도를 달리하면서 반응성을 살펴보았다 (Fig. 24). Luminol 농도가 증가할수록 발광도값은 증가하는 경향을 보여주었으나 0.025 mM 이후의 luminol 농도에서는 크게 증가하지 않았고 이는 free HRP를 사용한 실험결과와 비교적 잘 일치하였다.

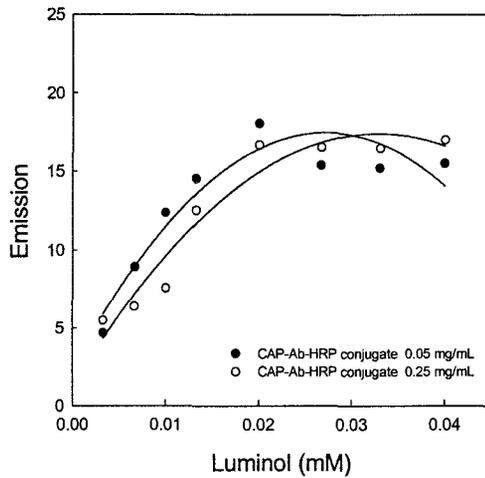


Fig. 24. Emission caused by the anti-CAP antibody-HRP-immobilized support according to luminol concentrations.

나. CAP 검출을 위한 batch형 광학적 면역센서 시스템 개발

1) 실험방법

항생제, 호르몬, 항원, 의약품 등의 고감도 측정기술의 하나로서 면역반응을 이용한 면역센서가 활용되고 있다. 면역반응의 특징은 항원과 항체 사이의 특이적인 복합체의 형성이며 이 때 발생하는 질량변화, 화학발광 등을 측정하게 된다. 면역센서 중 화학발광 측정형 면역센서는 luminol이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 공존할 때 금속착제나 효소 등의 촉매작용에 의해 방출하는 빛을 측정한다. 본 연구에서는 nitrocellulose membrane이나 Biodyne B membrane 등을 고정화 지지체로 하고 여기에 anti-CAP antibody를 고정화 한 후 이에 대한 항원에 해당하는 시료 중의 analyte와 HRP를 결합시킨 labeled analyte (tracer)를 함께 반응시키면 이들에 의한 직접경합반응 (direct competitive reaction)이 일어나게 된다. 이를 도식화하면 Fig. 25와 같다. 이 후, 적절한 washing 과정을 거친 후 고정화 지지체상의 항체와 결합된 tracer에 의하여 기질 혼합액 중 luminol에 의한 화학발광이 일어나고 이 때의 발광량을 측정하면 시료 중의 analyte 농도와 발광량 사이의 상관관계에서 analyte의 농도를 구할 수 있다.

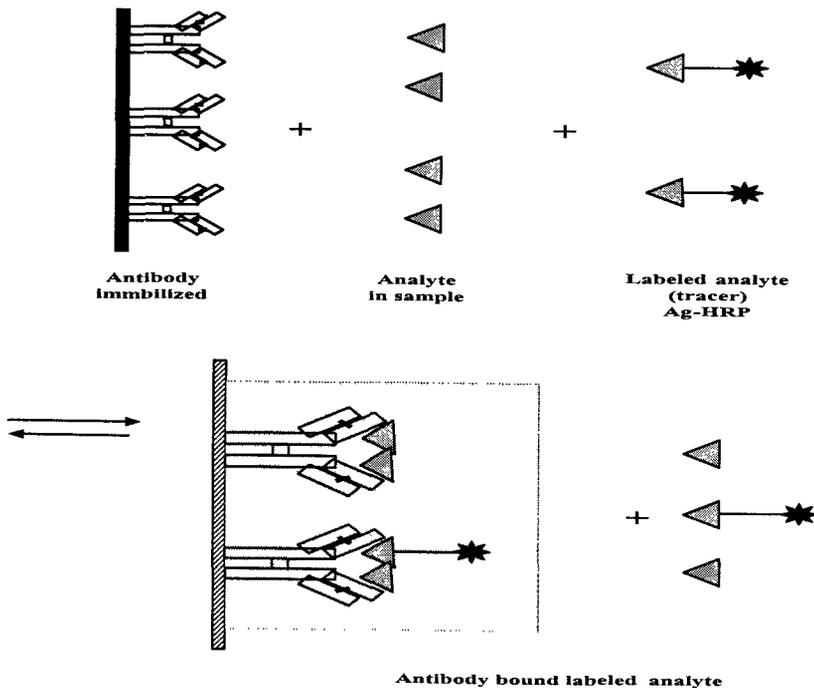


Fig. 25. Schematic diagram of a direct competitive immunoreaction employed in this study.

## 2) 결과 및 고찰

### 가) Fiber-optic 면역센서 시스템 구성

본 연구에서 정립한 경합반응 원리의 batch형 면역센서 시스템은 변환기로서 optic-fiber를 사용하는 시스템이다. 즉, 직접경합법의 원리에 따라 항체를 고정화 지지체에 고정화하고 이 고정화막을 반응용액으로 채워져 있는 자체제작한 최대부피 5 mL의 반응 cell 안에 넣었다. 반응 cell 안에 완충용액 (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6) 1200  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 *p*-iodophenol을 각각 600  $\mu$ L 넣고 free HRP 용액 600  $\mu$ L이나 항체 고정화막을 넣어 반응용액이 3 mL가 넘지 않도록 하였다. 고정화 항체와 반응용액이 들어있는 반응 cell과 fiber-optic probe (200  $\mu$ m fiber with CC-3-UV, Avantes, Netherlands)를 암실에 넣고 이를 밖으로 연결하여 Radiance Spectrometer (AVS-S2000-IRRAD, Avantes)와 computer에 순차적으로 연결한 후 반응 cell 내의 주입구를 통하여 기질인 luminol 600  $\mu$ L를 넣고 화학반응이 원활하게 일어나도록 stirrer를 작동시켰다 (Fig. 26). 기질 주입 후 발광정도는 Avantes software (version 5.1)에 의하여 lux로 환산되어 computer 모니터에 표시되었다.

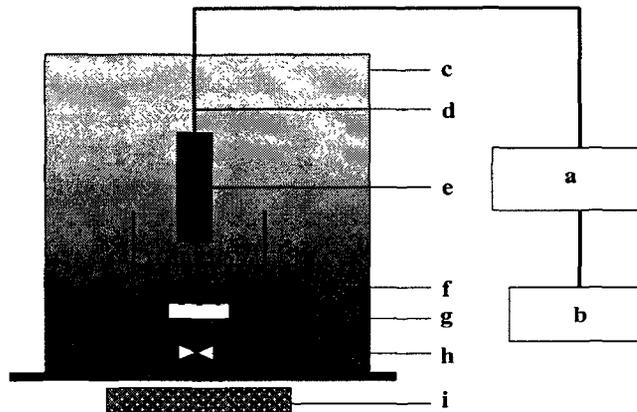


Fig. 26. Schematic diagram of the batch-type fiber-optic immunosensor system. a, spectrometer; b, computer (with Radiance S/W); c, dark room; d, cladding; e, uni-directional optic fiber; f, reaction solution; g, antibody-immobilized membrane; h, magnetic bar; i, stirrer.

## 나) Tracer (analyte-HRP conjugate) 제조

### (1) Tracer 제조

직접결합원리의 면역센서 실험에 필요한 tracer인 CAP-HRP는 activated ester method에 의하여 다음과 같이 합성하였다. 먼저, CAP succinate (1.6 mmol)를 50 mL의 증류수에 용해시키고, 여기에 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethylcarbodiimidemetho-*p*-toluene sulfonate (1.5 mmol)와 N-hydroxysuccinimide (1.5 mmol)를 각각 10 mL의 증류수에 용해시켜 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 1시간 교반하며 incubation 시켰다. Potassium phosphate 완충용액 (0.01 M, pH 7.4) 20 mL에 HRP (11  $\mu$ mol, 0.5 mg/mL)를 용해한 후 activated CAP succinate (630  $\mu$ mol) 20 mL를 첨가하고 반응 혼합물을 교반하면서 2시간동안 실온에서 incubation한 후 4°C에서 overnight, incubation 하였다. 그 후 증류수를 수시로 바꿔주며 반응 혼합물을 5일간 투석하였다. 제조된 tracer의 HRP와의 binding 효율을 알아보기 위하여 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)법에 의하여 측정하였다.

### (2) TNBS법에 의한 고정화효율 측정

단백질 용액 (1.0 mg/mL, 256.4 units/mL)에 4% NaHCO<sub>3</sub> 용액 1 mL를 넣고 0.1% TNBS 용액을 첨가하였다. 이를 40°C에서 2시간동안 반응시킨 후 10% SDS (sodium lauryl sulfate) 용액 1 mL와 1 M HCl 용액 0.5 mL를 넣어 반응시킨 후 335 nm에서 UV Spectrophotometer (Jasco, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 또한, potassium thiocyanate (KSCN)를 이용한 TNBS법은 단백질용액 1 mL에, 4 M KSCN에 4% NaHCO<sub>3</sub>와 0.1% TNBS를 각각 용해한 것을 1 mL씩 가하고 2시간동안 40°C에서 반응 시켰다. 여기에 1.5 mM의 증류수를 넣은 후 335 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제조된 analyte-HRP conjugate의 binding 효율을 알아보려고 free HRP를 기준으로 하여 HRP 농도에 따른 흡광도를 구한 후 검량곡선을 그려본 결과, TNBS법과 KSCN법에 의한 검량곡선은 각각 0.938, 0.998의 높은 상관관계 ( $r^2$ )를 나타내었다 (Fig. 27). 한편, CAP 자체도 TNBS 시약과 반응하여 발색하므로 (data not shown), CAP-HRP의 conjugation이 발생하면 전체적으로 흡광도값이 증가하게 된다. 실제로 KSCN법으로 측정하였을 때, conjugation 후 HRP 농도를 0.1 mg/mL로 희석한 경우의 흡광도에서 control 흡광도 값을 빼면 0.143의 흡광도 값이 나타난 반면 0.1 mg/mL free HRP의 흡광도 값에서 control 흡광도 값을 빼면 0.007의 흡광도 값을 얻을 수 있었다. 따라서, 0.136만큼의 흡

광도 값이 conjugation에 의해 증가하였고 이를 퍼센트로 나타내면 95%에 해당하였다.

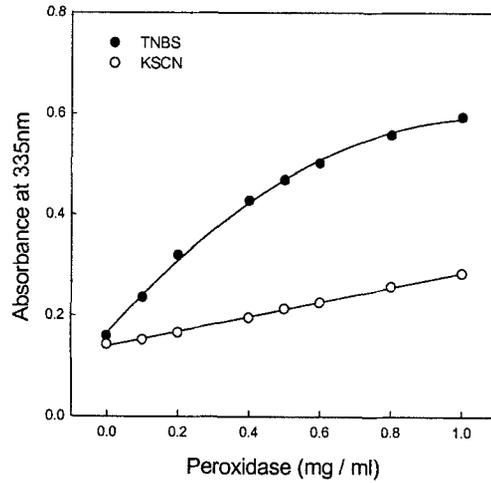


Fig. 27. Absorbance of free HRP by TNBS and TNBS (KSCN) at 335 nm.

다) Free HRP에 의한 fiber-optic 면역센서 시스템의 최적화

Membrane에 항체를 고정화하지 않고 반응 cell에 반응용액과 free HRP를 가한 후 반응정도를 살펴보았다. 일반적으로 기질 주입 후 반응은 5초 이내에서 바로 나타났으며 그 이후에도 방출된 빛은 약 10초간 유지되었다. 먼저 산화제로 이용되는  $H_2O_2$ 의 농도를 각각 달리하여 반응정도를 살펴본 결과, 13.3 mM까지의 범위에서는  $H_2O_2$ 의 농도가 증가할수록 반응성이 증가한 반면 그 이상의 농도에서는 더 이상 반응성이 증가하지 않았다. HRP 농도를 2000  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 까지 달리한 결과, HRP의 농도증가에 따라 반응성도 증가함을 알 수 있었으나 그 증가정도는 점차 감소하였다. 또한, *p*-iodophenol을 0.66 mM까지 첨가하면 반응성이 증가하나 그 이후에는 오히려 감소하는 경향을 보여주었고 기질인 luminol의 농도를 달리하여 반응성을 본 결과 0.66 mM까지 반응성이 증가하는 것을 보여주었다. 이들 개별 물질의 농도변화에 따른 센서시스템의 반응정도는 Fig. 28에서 보는 바와 같다.

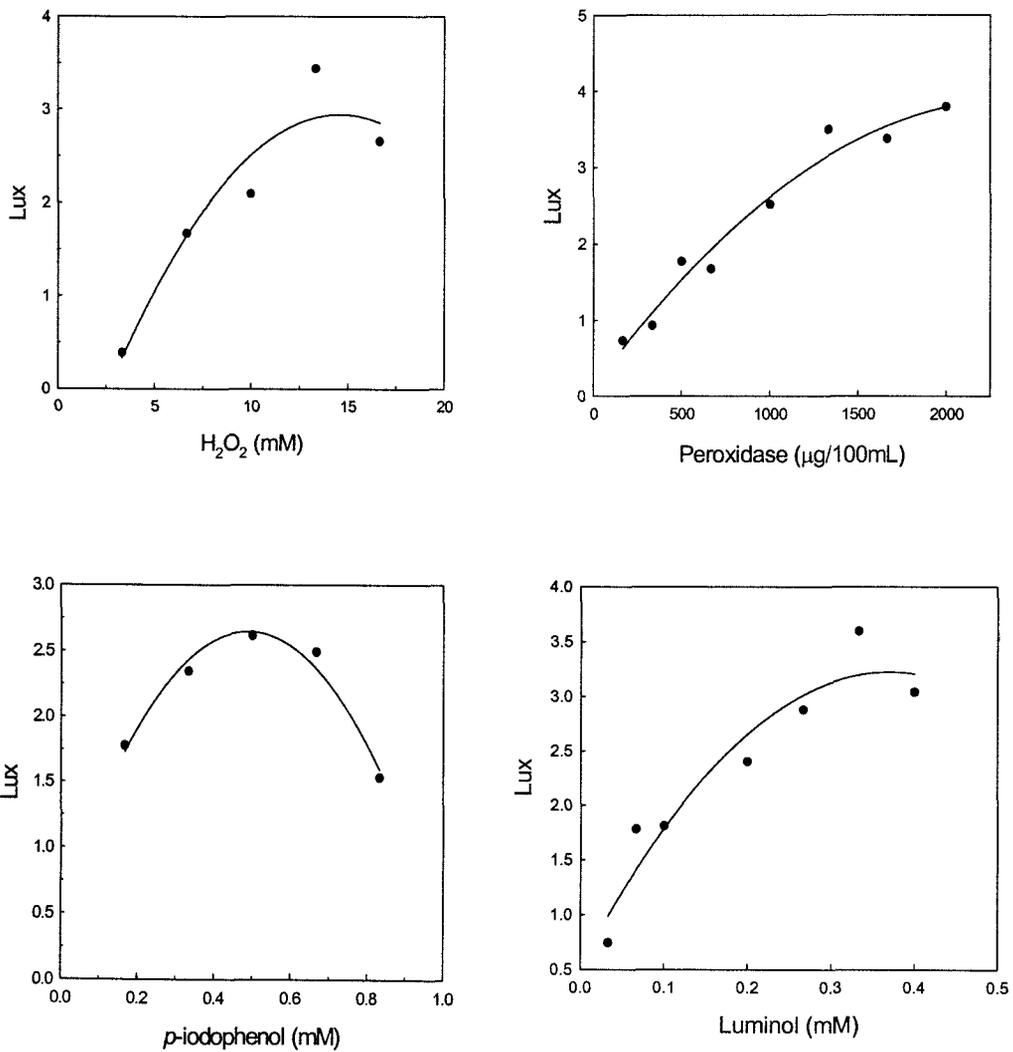


Fig. 28. Effects of  $H_2O_2$ , peroxidase, *p*-iodophenol and luminol concentrations on the responses of the fiber-optic immunosensor system.

라) 항체 고정화 membrane을 이용한 fiber-optic 면역센서 시스템의 최적화

(1) 항원·항체 반응시간 및 항체 고정화시간의 영향

Free HRP의 경우와는 다르게 본 연구의 막 이용 면역센서 (membrane-based immunosensor)에 사용되는 항체 고정화막을 이용하여 화학발광 반응의 최적화를 행하였으며, 이 때 사용된 항체는 anti-HRP antibody와 anti-CAP antibody-HRP이었다.

먼저, anti-HRP antibody를 1000배 및 2000배로 희석한 용액에 미리 적당한 크기 (0.5×0.5 cm)로 잘라 놓은 Biotrace B membrane을 30분간 침지하였다. 그 후 면역센서 시스템의 완충용액인 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)로 씻어주고 HRP를 시간에 따라 처리하여 면역반응을 유도한 후 여기에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luminol 등의 기질용액을 첨가하였다. 즉, 고정화막에 항체가 고정화되고 여기에 다시 HRP가 결합되므로 HRP의 결합정도에 따라 반응성이 나타나게 된다 (Fig. 29). 대개의 경우 화학발광 반응은 기질 주입 후 약 20초 지나 시작되었는데, 이는 free HRP의 경우와 비교할 때 빛의 방출시간이 상당히 지연됨을 보여주며 아울러 발광시간도 free HRP의 경우보다 다소 길게 유지되었다. Fig. 29에서 볼 수 있는 것처럼 항체 고정화막에의 항원 결합은 대략 1시간 후 최대치를 보여 주었으나 30분 경과 후에도 결합도가 높은 것으로 나타났다.

Fig. 30에는 Biotrace A, B, C membrane과 Biotrace, Ultrabind, nitrocellulose membrane에 modified periodate method로 제조한 anti-CAP antibody-HRP conjugate를 30분, 1, 2, 3, 6, 9, 24시간 고정화한 후 완충용액으로 씻어주고 기질용액을 첨가하여 fiber-optic 면역센서 시스템으로 화학발광도를 측정하는 것이다. Biotrace, Ultrabind, Biotrace A membrane의 경우에는 2~3시간까지의 고정화시간에서 반응성이 직선적으로 크게 증가하지만 기타 membrane의 경우에는 1시간 이내에 대부분의 항체 고정화가 이루어짐을 알 수 있었다. 이 때, 항체 고정화막을 사용하지 않은 background 값은 1.0~1.2로 나타났으며 6가지의 고정화막 가운데서 반응성이 가장 좋게 나타난 것은 Biotrace A membrane이었다.

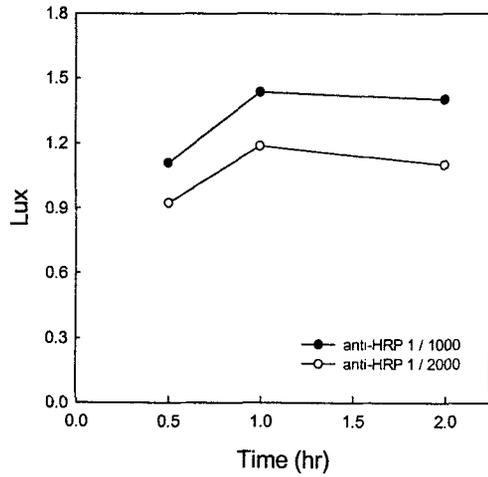


Fig. 29. Effect of the binding time between anti-HRP antibody and HRP on light emission.

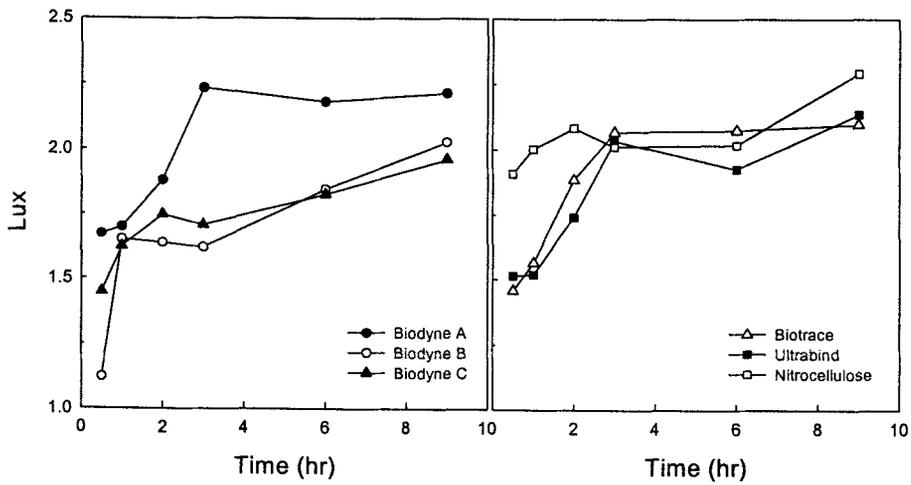


Fig. 30. Time-dependent binding of the anti-CAP antibody-HRP onto various immobilization support.

## (2) BSA 농도에 따른 영향

일반적인 면역분석법에서 비선택적인 흡착에 의한 계측저해를 방지하기 위하여 항체를 고정화한 후 고정화 지지체의 비반응표면을 blocking 처리하며, 이 경우 bovine serum albumin (BSA)이 보통 사용된다. BSA에 의한 blocking에 의하여 면역반응의 선택성은 증대되지만 감응성에 영향을 미칠 수 있으므로 본 연구에서도 BSA 처리조건을 검토하고자 하였다. 즉, anti-CAP antibody-HRP conjugate를 Biodyne A membrane에 고정화한 후 항체 고정화막을 0.5 및 1.0% BSA 용액에 경시적으로 침지하였다. 이 후 항체 고정화막을 완충용액으로 씻어주고 반응 cell에 가한 후 기질용액을 첨가하여 fiber-optic 면역센서에 의하여 화학발광도를 측정하였다 (Fig. 31). Fig. 31에서 볼 수 있는 것처럼 BSA 처리시간은 화학발광도에 거의 영향을 주지 않았으나 0.5% BSA 처리의 경우 처리시간에 따라 발광도가 약간 감소함을 고려해 볼 때 30분 처리로도 충분할 것으로 생각되었다. 반면 1% BSA 처리 시의 반응성은 0.5% BSA 처리의 경우보다 약간 높은 것으로 나타났다.

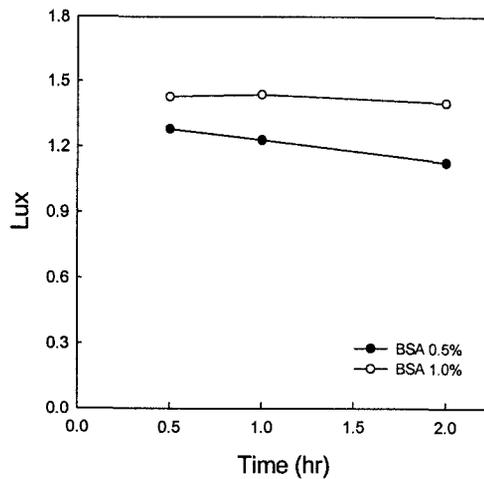


Fig. 31. Effect of the dipping time in BSA solution on light emission.

마) Fiber-optic CAP 면역센서의 경합반응

(1) CAP 농도증가에 따른 경합반응

Pall membrane 중 Biodyne A, B membrane과 nitrocellulose membrane에 anti-CAP antibody를 완충용액을 사용하여 적절히 희석한 후 고정화하였다. 이 때, 항체 1 vial에 1000  $\mu\text{g}$  이하의 CAP에 대한 항체가 존재하였으며, vial의 내용물을 1 mL의 완충용액에 용해한 후 이를 100배 희석하여 실험에 사용하였다. Anti-CAP antibody를 위의 membrane에 고정화한 후 완충용액으로 씻어주고 항체 고정화막을 CAP와 tracer (CAP-HRP conjugate)로 이루어진 경합반응 mixture에 가하여 30분간 경합반응을 행하였다. Tracer의 사용농도는 경합반응의 효율을 극대화하기 위하여 시료인 CAP의 농도 범위보다 현저히 높거나 낮지 않게 조절하였다. 본 실험에서 tracer의 농도는 0.028 mg/mL로 고정하였고 CAP를  $10^{-7} \sim 10^{-3}$  M까지로 다양하게 조제하였으며 경합 mixture 중의 tracer와 기질의 부피비율은 1 : 4 (total 1 mL)로 하였다. 경합반응 후 membrane을 완충용액으로 씻어주고 washing된 membrane을 기존에 정립한 화학발광 mixture에 가하고 CAP의 농도에 따른 화학발광의 정도를 측정하였다 (Fig. 32). 이 때, CAP의 농도가 증가할수록 반응성은 감소하였는데, 이는 CAP와 tracer의 경합반응에 따라 CAP의 농도가 높은 경우에는 항체 고정화막에 결합하는 tracer의 수가 줄고 그 결과로서 luminol 반응이 감소하는데 기인하는 것으로 여겨진다 (Fig. 32). 이 때 3가지의 막에 따른 반응성을 살펴본 결과, Biodyne B membrane의 경우에 상관관계가 가장 좋게 나타났다 ( $r=0.956$ ).

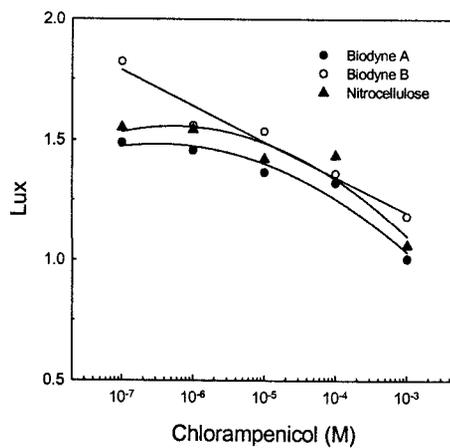


Fig. 32. Standard curves for CAP in the direct competitive chemiluminescent membrane immunoassay.

(2) Tracer의 농도증가에 따른 경합반응

Anti-CAP antibody를 membrane에 고정화한 후 CAP의 농도를  $10^{-6}$  M로 고정하고 tracer의 농도를 변화시키면서 반응 cell에 주입하여 경합반응 시켰다. 이 때 tracer의 농도는 0.00224~0.112 mg/mL로 변화시켰다. 그 결과, tracer의 농도가 증가함에 따라 반응성은 증대되었는데, 이는 항체 고정화막에 tracer가 더 쉽게 결합할 수 있는 여건이 되어 나타난 결과로 생각된다 (Fig. 33). Biodyne B membrane에 고정화한 경우 0.951 (r)로 직선상의 상관관계가 나타났다.

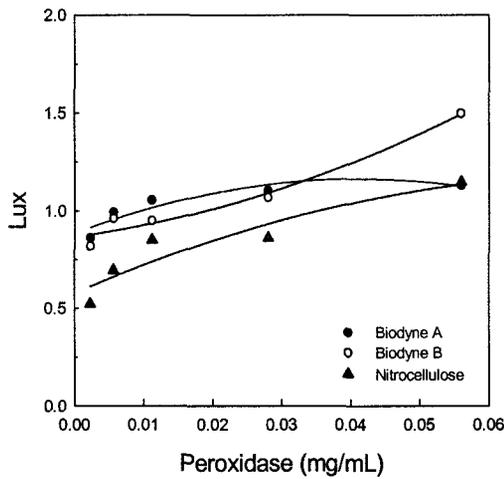


Fig. 33. Effect of tracer concentrations at a fixed CAP concentration on light emission.

(3) CAP 종류에 따른 반응성

Tracer와의 경합반응에서 경합하는 항원인 analyte로서 CAP와 CAP succinate 2종류를 비교하였다 (Fig. 34). 이 때, CAP와 CAP succinate는 각각 Tris-HCl 완충용액 (pH 8.6)에 용해시켰다. Tracer의 농도를 고정하고 CAP와 CAP succinate의 농도를 달리하여 본 결과, CAP succinate의 경우에 반응성이 더 높은 것으로 나타났고 analyte 농도 증가에 따라 반응성이 감소하는 것은 CAP의 경우와 동일하였으며 CAP와 CAP succinate의 경우 표준곡선의 상관계수는 각각 0.956, 0.837로 나타났다.

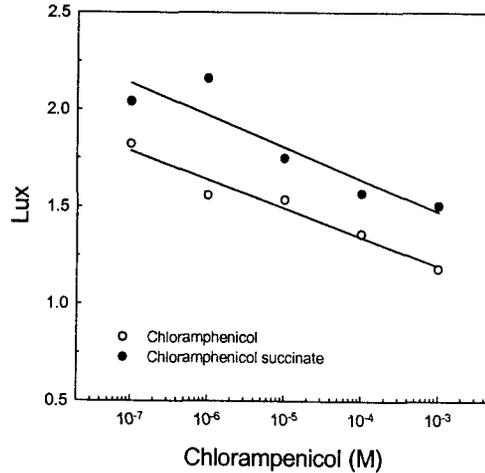


Fig. 34. Comparison of the responses of CAP and CAP succinate in the direct competitive chemiluminescent membrane immunoassay.

#### 다. CAP 검출을 위한 flow형 광학적 면역센서 시스템 개발

##### 1) 실험방법

CAP 계측을 위한 flow형 면역센서 시스템을 구성하였다. 먼저, 외부 광을 차단하기 위한 암상자 (16 cm×16 cm×20 cm)와 항체 고정화막을 끼우는 flow cell을 자체 제작하였다. 이 때, flow cell 내부는 약 20 μL 정도의 반응부피가 되도록 제작하였다. Flow cell은 스티로폼에 구멍을 뚫어 여기에 flow cell을 끼우고 이 고정체를 flow cell에서 발생한 광이 photomultiplier tube (PMT)의 수광면에 도달하도록 암상자의 맞는 위치에 고정시켰다. 암상자의 윗 부분에는 capillary tube (i.d. 0.4 mm)의 flow line이 들어갈 수 있도록 구멍을 뚫어 주었다. 항체 고정화막 (직경 10 mm)을 flow cell 내에 부착하고 Minipuls 3 pump에 의하여 일정유속으로 완충용액 (20 mM Tris buffer, pH 8.6)을 흘러 보내주었다. 이 후 luminol, *p*-iodophenol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혼합한 기질을 injector에 주입하였다. 기질 주입 후 기질이 flow cell에 도달하여 항체 고정화막과 반응하여 발생한 광은 Hamamatsu Photonics사 (Japan)의 R955 PMT의 수광면으로 전해져 전기신호로 전환되었다. R955 PMT는 전류출력형이고 160~900 nm의 파장에서 작동하며 400 nm에서 최대의 출력을 보인다. Model C6271 HV power supply socket을 결합한 detector 시스템을 구성하였다 (Fig. 35).

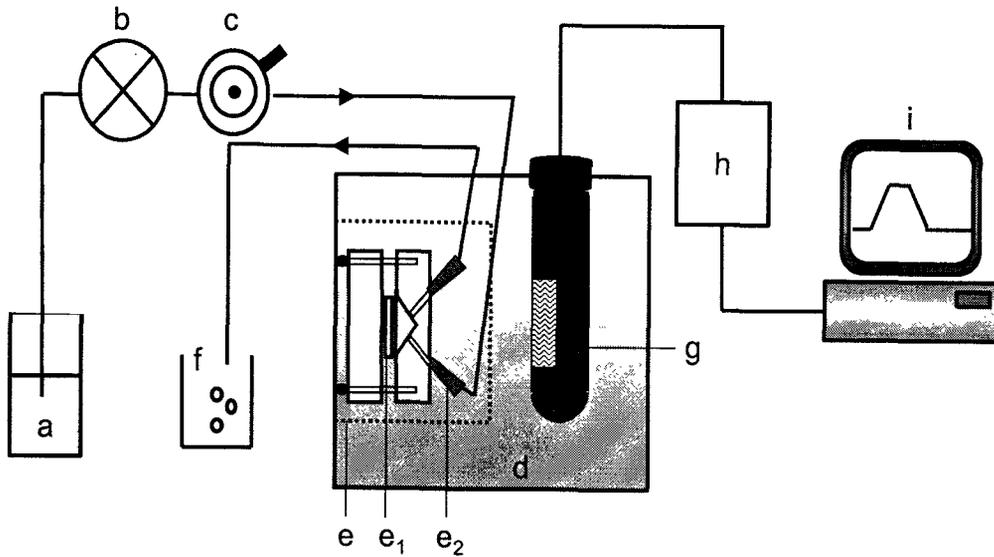


Fig. 35. Schematic diagram of the flow type device for fiber-optic optoelectronic immunosensor system. a, buffer solution; b, peristaltic pump; c, injector; d, black box; e, flow cell; e<sub>1</sub>, O-ring and immobilized antibody membrane; e<sub>2</sub>, flow guide; g, R955 PMT; h, PC lab card; i, computer (with Radiance S/W).

## 2) 결과 및 고찰

### 가) Flow형 CAP 면역센서 시스템의 최적화

#### (1) 기질 주입량에 따른 영향

Flow형 반응시스템에서 기질 주입량을 달리하면서 반응도를 살펴보았다. Injector를 통하여 기질을 주입하면 flow line을 거쳐 기질이 반응 cell에 도달하게 되는데, 이 때 유속은 0.155 mL/min로 유지하였으며 flow line은 암상자 안의 반응 cell과 연결 시 반응시작 후 암상자의 여담음에 불편함이 없도록 최소길이로 하였다. 기질 주입량을 50~200  $\mu$ L로 변화시키면서 가하였을 때 기질용액이 반응 cell에 도달하여 반응이 일어나기 시작하는데 걸리는 시간인 유도시간 (induction time)은 100~105초 정도로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 한편, 기질 주입량이 많을수록 반응시간 (reaction time)은 길게 나타났으며 반응시간이 길면 반응 peak의 넓이는 broad 하게 나타나지만 그 높이 또한

높음을 알 수 있었다 (Table 13). 이상과 같은 결과로부터 이 후의 기질용액 주입량을 200  $\mu\text{L}$ 로 정하였다.

Table 13. Effect of injection volume on the response profiles of the flow-type optoelectronic immunosensor system

Injection volumn ( $\mu\text{L}$ )	Light intensity (V)	Induction time (sec)	Reaction time (sec)
50	0.732	105	60
100	1.045	105	60
150	1.793	100	90
200	2.480	100	110

## (2) Luminol 농도에 따른 영향

일정한 농도의 anti-CAP antibody를 고정화한 막을 flow cell에 끼운 후 여기에 반응 기질인 luminol의 농도를 변화시키면서 화학발광의 정도를 측정하였다. 이를 위하여 먼저 항체농도를 0.1 mg/mL로 한 용액에 Biotin B membrane을 가하여 항체 고정화막을 제조한 후 반응 cell에 끼워 바이오센서 시스템을 조립하였다. 여기에 반응기질인 luminol의 농도를 0.05~0.5 mM로 변화시키면서 화학발광도의 변화를 살펴보았다. 이 경우 흐름 중의 flow cell 내 luminol의 최종농도는 0.003~0.04 mM에 해당하는 것으로 추정되었다. 이 때, 기질용액의 주입 후 반응이 일어나기 시작하는 시간에 해당하는 유도시간은 약 2분 정도 소요되었으며 반응시간은 기질 주입량이나 기질농도에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다. 기질농도를 달리하면서 반응시켜 본 결과, luminol의 농도가 높을수록 반응도는 증가하고 측정에 소요되는 시간도 약간씩 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 36, 37).

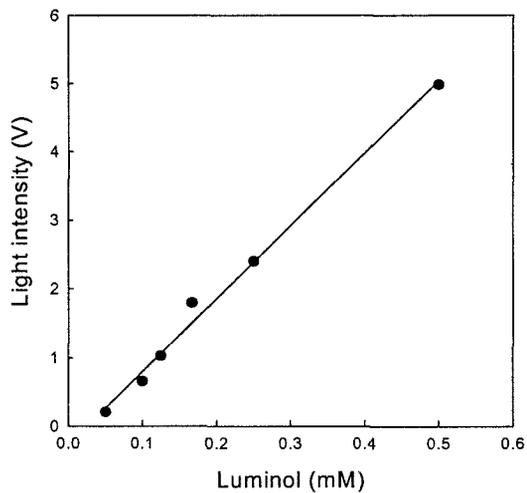


Fig. 36. Effect of luminol concentrations on the responses of the flow type optoelectronic immunosensor system.

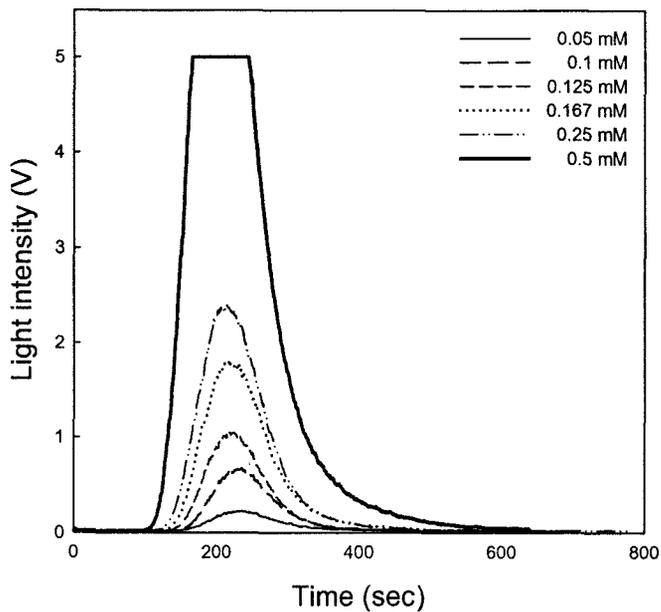


Fig. 37. Time-dependent response profiles of the flow type optoelectronic immunosensor system according to luminol concentrations.

## 나) Flow형 CAP 면역센서 시스템의 반응특성

### (1) 고정화 항체의 농도증가에 따른 반응성

Biodyne B membrane에 고정화하는 anti-CAP antibody의 농도를 각각 0.05 및 0.1 mg/mL로 달리하였을 때의 luminol 농도에 따른 반응성을 살펴본 결과 (Fig. 38), 0.1 mg/mL 농도의 항체용액을 사용한 경우 낮은 기질농도에서도 높은 반응성을 나타내었다. 화학발광도가 1.45 V인 경우를 예로 들어 비교해 보면 0.05 mg/mL의 항체용액으로 고정화한 경우 luminol 농도 0.25 mM에서 얻을 수 있는 반응성을 0.1 mg/mL의 항체용액으로 고정화한 경우에는 luminol 농도 0.1 mM에서 얻을 수 있어 고정화 항체의 양이 반응감도와 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있었다.

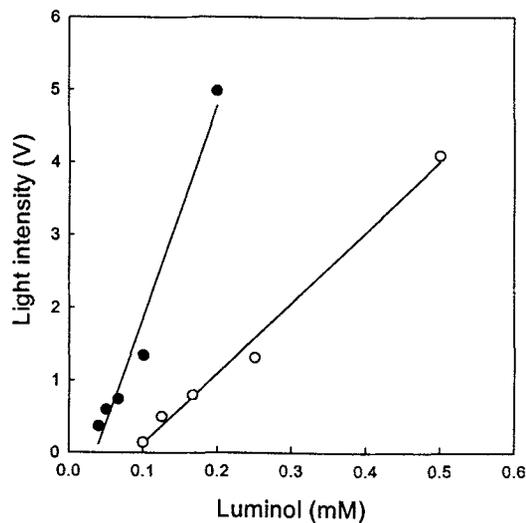


Fig. 38. Effect of anti-CAP antibody concentrations on the responses of the flow type optoelectronic immunosensor system. ○, 0.05 mg/mL anti-CAP antibody; ●, 0.1 mg/mL anti-CAP antibody.

### (2) 반응기질의 농도증가에 따른 경합반응

항체의 결합부위에 대하여 tracer와 경합하는 analyte로 CAP와 CAP succinate를 비교하였다. 이 때, CAP와 CAP succinate를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.6)에 용해시켜 analyte 용액을 농도별로 제조하고 tracer인 CAP-HRP conjugate 농도는 고정시켰다. CAP와 CAP succinate의 농도를 달리하여 주입한 결과, 농도축에 대한 semi-logarithmic scale로 도시하여 직선상의 상관관계를 얻을 수 있었으며 두가지 기질은 농

도에 따라 거의 비슷한 반응성을 보여주었다 (Fig. 39).

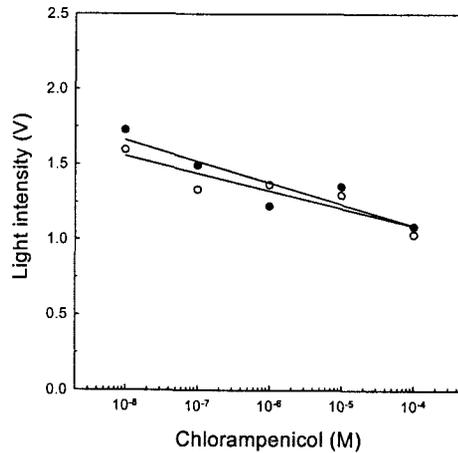


Fig. 39. Comparison of the responses of CAP and CAP succinate in the flow type optoelectronic immunosensor system ○, CAP; ●, CAP succinate.

(3) Tracer 농도증가에 따른 경합반응

Anti-CAP antibody를 membrane에 고정화한 후 CAP와 CAP succinate의 농도를  $10^{-6}$  M로 고정하고 CAP-HRP conjugate의 농도를 변화시키면서 flow cell에 주입하여 경합반응이 일어나게 하였다. 이 때, tracer의 농도는 0.00224~0.112 mg/mL로 변화시켰으며 그 결과 tracer의 농도증가에 따라 반응도는 커짐을 알 수 있었다 (Fig. 40).

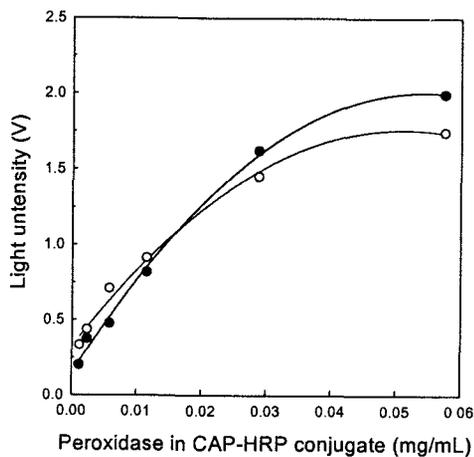


Fig. 40. Effect of tracer concentrations at a fixed analyte concentration on light emission. ○, CAP; ●, CAP succinate.

라. 실제시료 계측

1) 실험방법

HPLC 분석법을 기존방법으로 사용하였다. 사용기기는 Borwin chromatography software (Rev. 1.2150, Jasco사, Japan)로 작동하는 Jasco사의 HPLC 시스템 (model PV-980)이었고 column으로 Supelcosil LC-8-DB (4.6 mm i.d.×50 mm, GL Sciences, Japan)를 사용하였다. 분석 중 column 온도를 35℃로 유지하였고 UV detector (model UV-975, Jasco사)로 254 nm에서의 흡광도를 측정하였다. HPLC 시스템의 이동상 용매는 acetonitrile : methanol : 20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 : 17 : 78)이었고 유속은 1.0 mL/min 였다. 분석용 시료 전처리로 돼지고기, 쇠고기 등의 drip을 아래와 같이 제조하였다. 시료 30 g을 칭량하여 자체 제작한 acryl net가 설치된 원심분리 cell에 넣어 Hanil MF-80 (Hanil사, Korea) 테이블식 원심분리기로 1,000 rpm에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻어진 drip을 0.45 μm syringe filter로 여과하여 여과액을 분석용 검체로 하였다.

2) 결과 및 고찰

가) HPLC에 의한 실제시료 중의 CAP 화합물 확인

Fig. 41에는 각각  $2 \times 10^{-3}$  M 농도인 CAP 및 CAP succinate 표준품의 HPLC chromatogram이 표시되어 있다. 이 때, 머무름 시간은 각각 7.6과 18.4분으로 나타났다. 본 연구에 사용된 쇠고기, 돼지고기 등 실제시료에서는 CAP 화합물이 검출되지 않았다 (Fig. 42). 따라서, 전처리를 행한 분석용 검체에 임의농도의 CAP 화합물을 spiking하여 모델시료를 제조한 후 공시하였다.

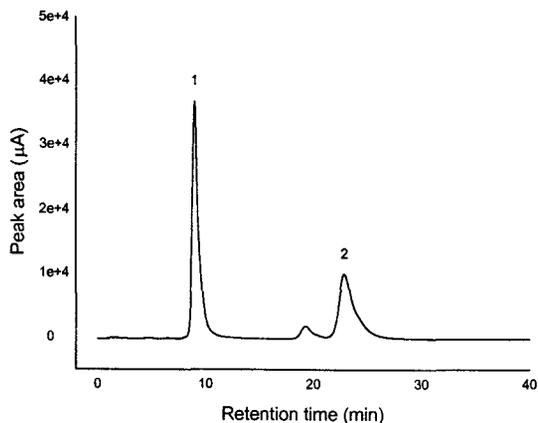


Fig. 41. HPLC chromatogram of CAP (1) and CAP succinate (2).

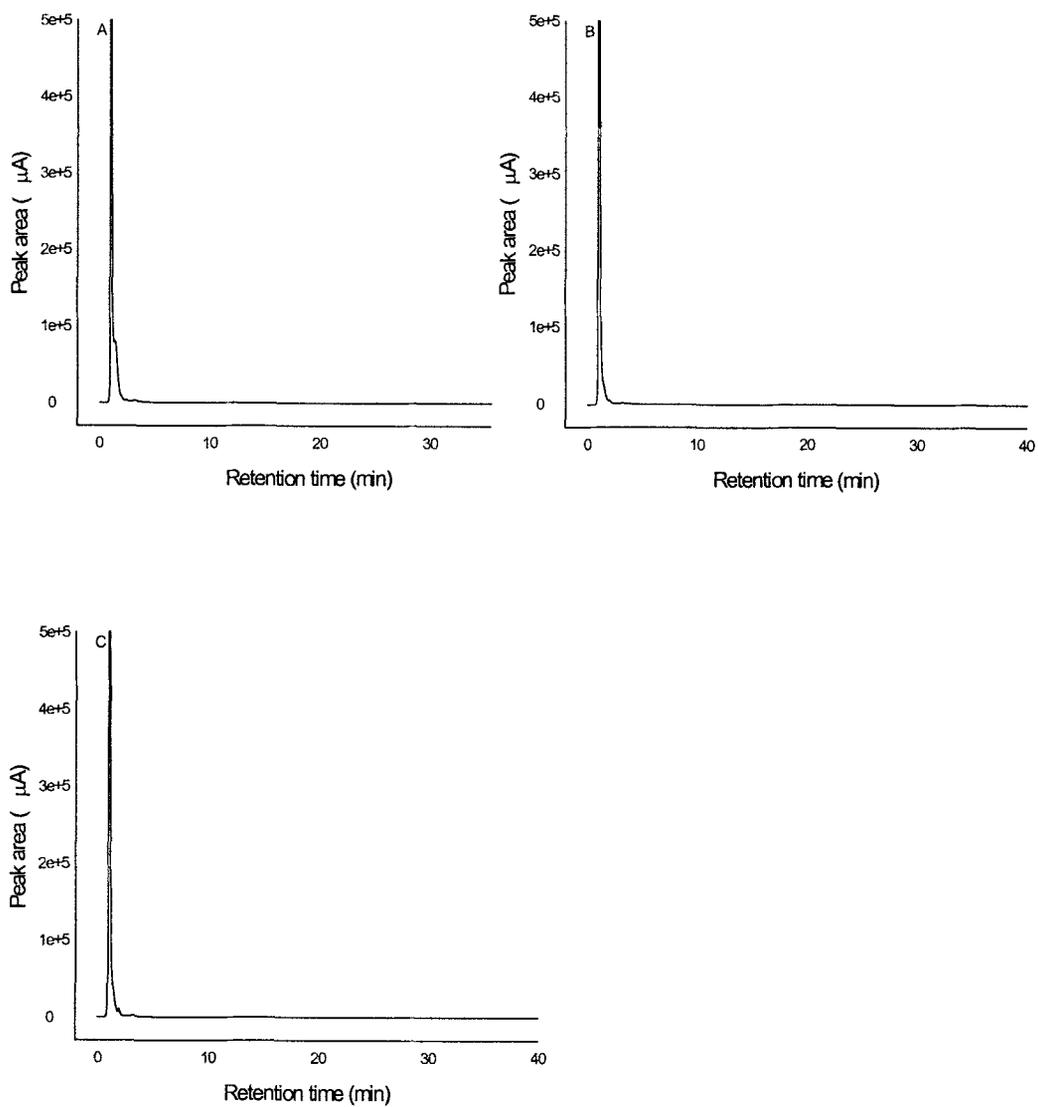


Fig. 42. HPLC chromatograms of samples. A, pork; B, beef; C, chicken.

나) 광학적 면역센서에 의한 모델시료 중의 CAP 측정

먼저, 실제시료 중에 CAP 화합물이 존재하지 않았으므로 분석용 검체에 CAP를 spiking하여 모델시료를 제조하였으며 이 때의 CAP 첨가수준은  $10^{-6}$  M이었다. 표준시료의 경우에 비해 모델시료의 경우에는 화학발광도가 현저하게 낮게 측정되어 시료용액의 혼탁도 등에 의한 matrix 효과가 존재함을 알 수 있었다. 즉, tracer만을 주입하였을 때 (CAP 농도는 zero) 나타나는 발광도가 1.470 V이고 tracer와  $10^{-6}$  M의 CAP 표준용액을 주입하였을 때의 발광도가 1.259 V인 반면 tracer와 분석용 검체를 주입한 경우에는 0.317~1.000 V 범위의 발광도를 나타내었고 tracer와 모델시료를 주입하였을 때의 발광도는 0.237~0.835 V 였다.  $10^{-6}$  M CAP 표준품이 나타내는 발광도에 대한 상대감응비는 37.9~140.3%로 시료에 따른 변이폭이 비교적 크고 시료의 종류에 따라 표준곡선에 잘 수렴하지 않는 것으로 나타나 (Table 14), 시료별로 적합한 표준곡선의 작성이 경우에 따라 필요함을 알 수 있었으며 특히 이와 같은 필요성은 최고기의 경우 가장 큰 것으로 나타났다. 그러나, 본 연구의 광학적 면역센서 시스템의 현저한 감응성을 고려해 볼 때 가축의 뇨 등에 대한 스크리닝 목적으로 사용가능할 것으로 사료되었다.

Table 14. Summary of the optoelectronic CAP immunosensor measurements on the model samples spiked with CAP

Sample	Response (V)		Relative ratio (%) <sup>a</sup>
	Analytical sample	Model sample	
Pork	0.603	0.400	96.2
Beef	0.317	0.237	37.9
Chicken	0.831	0.535	140.3
Shrimp	1.000	0.835	78.2
Milk	0.574	0.427	69.7

<sup>a</sup> Percent ratio of the response of the model sample against that of the standard sample.

다) HPLC 분석에 의한 CAP 화합물 계측

CAP와 CAP succinate의 CAP 화합물을 각각  $2 \times 10^{-3}$  M 농도로 spiking하여 제조한 모델시료를 HPLC 시스템에 주입하였을 때 얻어지는 chromatogram은 표준품의 그것과 쇠고기, 돼지고기, 닭고기의 경우 거의 정확하게 일치하였으므로 기존방법의 재현성을 확인할 수 있었다 (data not shown).

모델시료에 대하여 HPLC 분석을 행한 결과, 표준시료를 주입하였을 때 얻어지는 peak 면적에 대한 상대감응비가 93.7~119.2%로 나타났고 (Table 15) 모델시료 측정결과 얻어진 peak 면적이 표준곡선상에 거의 분포하였다 (data not shown). 이 결과는 실제로 첨가한 양과 거의 같은 농도로 개별 CAP 화합물이 존재하는 것으로 HPLC 분석 결과가 나타남을 의미한다.

Table 15. Summary of the HPLC measurements on the model samples spiked with CAP

Sample	CAP ( $2 \times 10^{-3}$ M)		CAP succinate ( $2 \times 10^{-3}$ M)	
	Peak area	Relative ratio (%)	Peak area	Relative ratio (%)
Control	1578452.3	100.0	994761.0	100.0
Pork	1479528.0	93.7	1185392.0	119.2
Beef	1612854.5	102.2	1072332.0	107.8
Chicken	1624122.5	102.9	1079172.3	108.5
Shrimp	1510695.5	95.7	1107259.8	111.3
Milk	1521587.8	96.4	1126562.5	113.3

<sup>a</sup> Percent ratio of the peak area of the model sample against that of the standard sample.

#### 4. 항생제 계측을 위한 potentiometric 효소센서 시스템 개발

pH/mV meter, penicillinase ( $\beta$ -lactamase) 고정화막이 부착된 flat-bottomed pH electrode 및 computer만으로도 간편하게 구성할 수 있는, 식품 중에 존재가능한 penicillin 화합물 검출용 potentiometric 효소센서 시스템을 개발하고 그 특성을 검토하였다.

##### 가. 실험방법

###### 1) 효소 및 시약

생물효소로서 penicillinase (EC 3.5.2.6, from *Bacillus cereus*), analyte로서  $\beta$ -lactamase 항생제인 penicillin G (potassium salt), ampicillin, amoxicillin은 Sigma사에서 구입하였으며 기타 시약들은 시약 특급 및 일급의 것을 사용하였다.

###### 2) 바이오센서 시스템 구성

Immobilion cellulose nitrate membrane (HAHY N6020, Wako, Japan)을 직경 0.9 cm 크기로 잘라 이를 penicillinase 효소용액 (2~200 unit/mL)에 담가 하룻밤 overnight 시켜 효소의 고정화를 행하였다. 효소 고정화막을 flat-bottomed pH electrode (Istek사, Korea)에 부착하여 얻은 감응전극을 Orion 920A pH/mV meter (Orion사, MA, USA)에 연결한 후 computer에 접속하고 시스템 작동 software를 설치하였다. 바이오센서 반응을 측정하기 위하여 감응전극을 18 mL sodium phosphate buffer로 채워진 beaker에 침지하고 바이오센서 신호가 안정되면 2 mL의 analyte를 반응 cell에 가하였다. 기질첨가에 따라 발생하는 pH 혹은 전위 (mV) 변화는 자동적으로 PC monitor 상에 표시되었고 바이오센서 반응은 정상상태의 신호를 취하여 계산하였다.

###### 3) 모델시료의 제조

본 실험에 사용된 시료는 냉장유통되는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 새우, 우유로서 분당지역에서 구입한 것이었다. 바이오센서 계측을 위하여 각각의 시료를 30 g씩 칭량하여 자체 제작한 acryl net가 설치된 원심분리 cell을 이용하여 테이블식 원심분리기로 1000 rpm에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻어진 drip을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 얻은 여과액을 분석용 검체로 하였다. 액체식품인 우유의 경우는 상기의 micro-

filtration을 행하여 전처리 하였다. HPLC 분석에 사용된 분석용 검체는 식품공전에 있는 방법에 따라 다음과 같이 행하였다. 즉, 시료 10 g에 메탄올 25 mL를 가해 1분간 균질화한 후 3000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 상정액을 250 mL 농축 플라스크에 취하고 잔사는 똑같은 조작을 반복하여 추출한 후 상정액을 플라스크에 합하였다. 전체의 상정액에 *n*-부탄올 2 mL 및 에탄올 20 mL를 가하고 40°C에서 감압건고한 후 잔류물을 sodium potassium phosphate buffer (pH 6.0) 10 mL에 용해하였다. 이 용액에 에틸에테르 10 mL를 가해서 10분간 진탕한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 수층 7 mL를 0.45 µm membrane filter로 여과하여 여과액을 분석용 검체로 하였다. 바이오센서 및 HPLC 분석용 검체에 penicillin G, ampicillin, amoxicillin을 각각 농도별로 spiking하여 모델시료를 제조하였다.

#### 4) 비교실험을 위한 HPLC 분석조건

Potentiometric penicillin 센서에 의한 시료 중의 penicillin 화합물 검출결과와의 비교 목적으로 HPLC 분석법을 다음과 같이 정립하였다. 이 때 사용된 기기는 Borwin chromatography software에 의하여 작동되는 Jasco사의 HPLC 시스템 (model PV-980)이었다. Column은 Kromasil C<sub>18</sub> (5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm)을 사용하였으며 이의 온도는 30°C로 유지하였고 UV detector (model UV-975, Jasco사)에 의하여 254 nm에서의 흡광도를 측정하였다. HPLC 시스템으로의 이동상 용매의 용리는 gradient elution에 의하여 메탄올 : 0.1 M sodium acetate (20 : 80)를 10분 동안 1.0 mL/min의 유속으로 흘려보내고 15분까지 methanol 조성을 40%로 올린 후 다시 원래의 조성으로 되돌아가는 방식으로 행하였다. HPLC 분석을 위하여 penicillin G 20 mM, ampicillin 20 mM, amoxicillin 4 mM 농도로 메탄올에 용해하여 stock solution을 제조하였고 이들을 적당히 희석하여 표준용액으로 하였다.

### 나. 결과 및 고찰

#### 1) 계측원리

Penicillin이나 cephalosporin 등의 β-lactam계 항생제는 작용 spectrum이 넓으며 항미생물 작용이 강하나 인축에 대한 독성이 강한 특성을 가지고 있다. Penicillin 화합물은 유사한 화학구조를 지니는 일단의 화합물로서, β-lactam ring의 치환기에 따라 천연 penicillin (penicillin G 및 penicillin V)과 반합성 aminopenicillin (amoxicillin, ampicillin

등)이 보고되고 있다. 이들은 penicillinase에 의한 선택적 가수분해에 의하여  $\beta$ -lactam ring이 개열되어 비독화 된다. 이 때, penicillin은 penicilloic acid로 변환되는데 구조적으로는 carboxyl기가 형성되므로 주위용매에  $H^+$  이온이 해리되고 이는 pH의 감소나 전위차 ( $\Delta mV$ ) 증가를 야기한다 (Fig. 43).

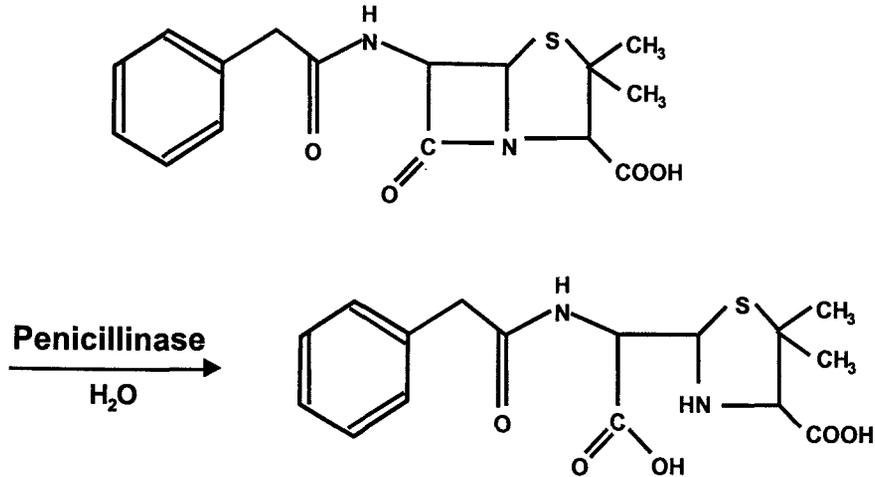


Fig. 43. Penicillinase-induced hydrolysis of the penicillin compounds. Penicillin G was depicted as the example.

## 2) Potentiometric penicillin 센서 시스템의 특성구명

### 가) pH 및 이온세기의 영향

pH 변화 및 전위차를 측정하는 potentiometric 바이오센서 시스템의 경우 반응용액의 pH 및 이온세기는 감응도에 상당한 영향을 미치므로 이들의 영향을 살펴보았다. 바이오센서 반응에 필요한 완충용액으로 pH 6.8~7.5의 sodium phosphate buffer를 사용하여 pH의 영향을 알아보았다. 유리상태 penicillinase의 최적 pH는 7.0이었으나 바이오센서 반응은 pH 7.2에서 가장 큰 것으로 나타났고 이 때  $\Delta pH$ 와  $\Delta mV$ 는 각각 -1.56과 92.0 mV이었다. 이와 같은 최적 pH의 알칼리 전이는 hypoxanthine 및 lactate 센서에서도 보고되고 있다 (Kim 등, 1996; Park 등, 2002). Sodium phosphate buffer의 이온세기도 바이오센서 반응에 현저한 영향을 끼쳐 몰 농도가 50 mM 이상인 경우에는 pH 및 전위 변화가 거의 없는 반면 낮은 이온세기에서는 바이오센서의 감응성이 매우 높은 것으로 나타났다. 감응성과 안정성을 고려하여 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 반응 완충용액으로 선정하였다 (Fig. 44).

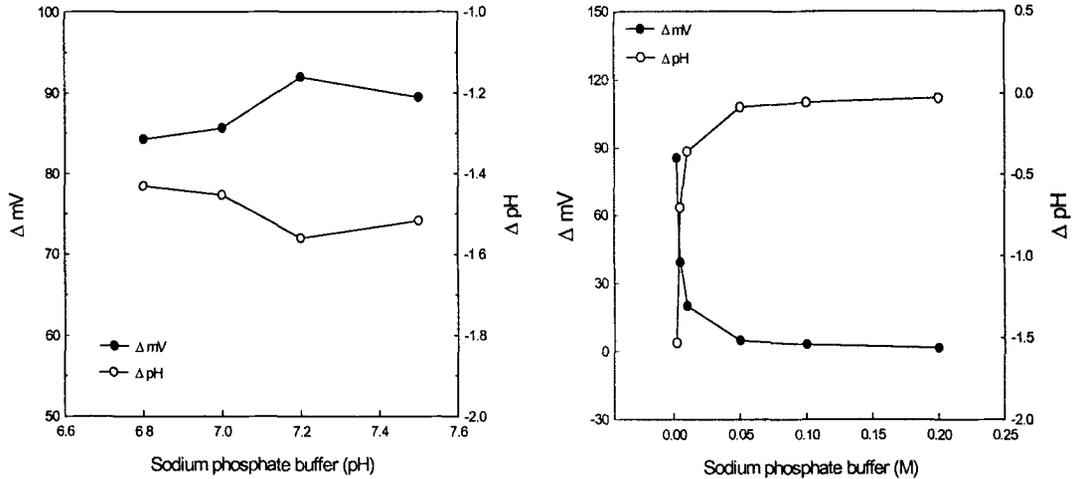


Fig. 44. Effects of pH and ionic strength of the buffer solutions on the biosensor responses.

나) 고정화 효소농도에 의한 영향

효소 고정화막을 제조할 때 penicillinase의 농도가 증가하면 pH 및 전위의 변화량도 증대되었다. 즉, 2, 10, 50 units/mL의 효소농도 중 모든 기질농도에서 50 units/mL의 효소농도가 가장 큰 바이오센서 반응을 보여주었다 (Fig. 45). 이 때, 8 mM의 penicillin G 농도에서  $\Delta mV$ 와  $\Delta pH$ 는 각각 -1.86과 115 mV이었다. 한편, 2 및 10 units/mL의 효소농도 사이에는 바이오센서의 감응도에 있어 큰 차이가 없었고 모든 효소농도에서 penicillin G의 농도가 4.5 mM 이상이면 센서감응의 증가추세는 현저하게 감소하였다.

다) 기질농도에 의한 영향

고정화 효소농도를 50 units/mL로 하고 기질농도를 변화시키면서 penicillin 센서의 반응성을 측정하였다. 이 때, ampicillin과 amoxicillin은 Triton X-100 (0.05% v/v)을 반응 완충용액에 첨가하여 완전히 용해시켰다. Fig. 46에서와 같이 바이오센서 반응은 amoxicillin의 경우 가장 컸으며 그 다음은 penicillin G, ampicillin 순이었고 amoxicillin의 경우 전위 및 pH의 최대변화는 각각 142.9 mV 및 -2.42로 나타났다. Amoxicillin과 penicillin G의 경우 기질농도 2 mM까지 반응성이 농도의존적으로 증가하나 그보다 고농도에서는 단위 기질농도별 감응도가 점차 감소하여 효소의 활성부위가 점차 포화되어

값을 알 수 있었다. 한편, ampicillin의 경우는 8 mM까지 포화되지 않았는데 이는 penicillinase와의 반응성이 상대적으로 낮았던데 기인하는 것으로 사료되었다.

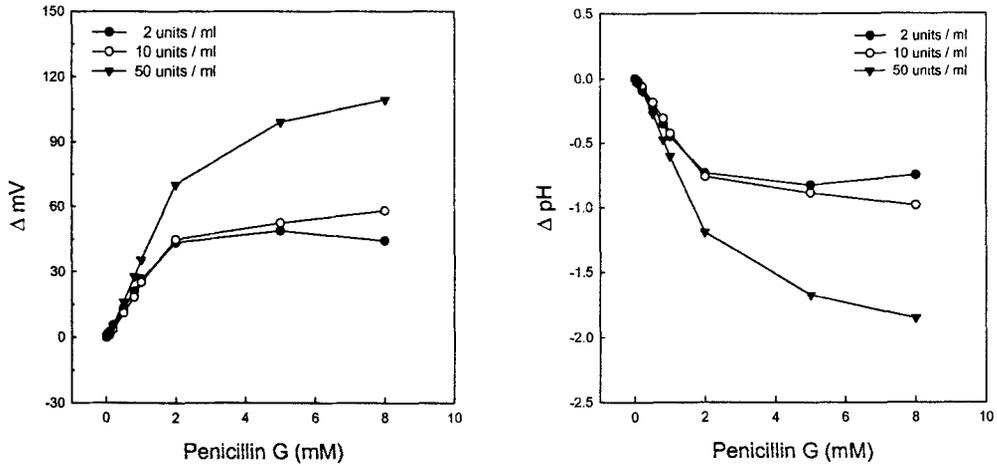


Fig. 45. Biosensor responses at different enzyme loadings for immobilization.

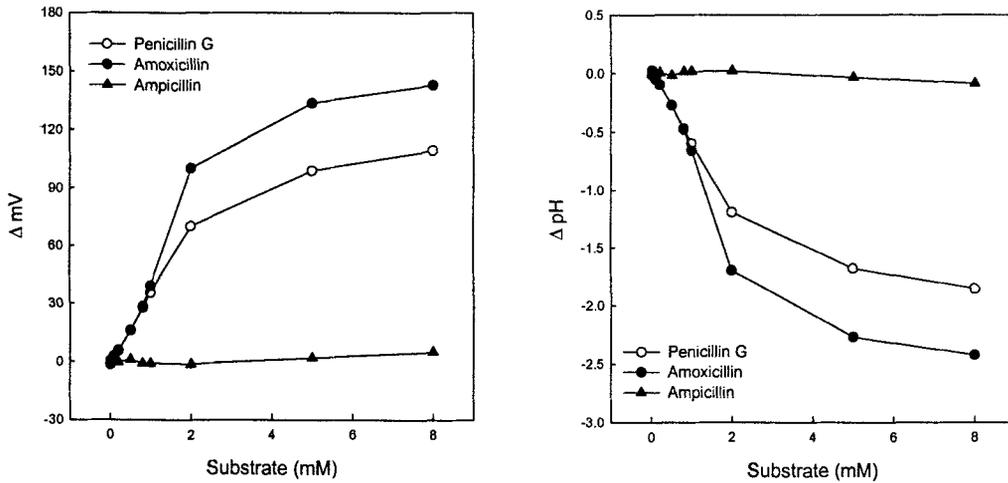


Fig. 46. Biosensor responses at different substrate concentrations. The enzyme loading was 50 units/mL.

라) Penicillin 화합물 표준곡선

효소농도 50 units/mL에서 penicillin 화합물의 표준곡선을 표시하였다 (Fig. 47). 기질의 종류에 무관하게 높은 상관관계 (penicillin G와 amoxicillin의  $r^2$ 는 각각 0.9953과 0.9913이었고 ampicillin의  $r$ 은 0.9746)를 보여 주었지만 최소검출한계 (detection limit)를 100  $\mu\text{M}$  이하로 낮추기는 어려웠다. 이 농도는 가축의 뇨 혹은 혈청에 대한 항생제의 스크리닝 검사에서 양성판별의 기준으로 여겨지는 0.4~1.3 ppm보다는 현저하게 높아 penicillin 센서의 최소검출한계를 낮출 필요성이 대두되었다. 이를 위하여 효소농도를 100 및 200 units/mL로 증가시켰는데, Table 16에서 볼 수 있는 것처럼 바이오센서 반응은 10 및 20  $\mu\text{M}$ 의 낮은 기질농도에서는 효소농도에 따라 증가하였다. 따라서, penicillinase 농도를 100 units/mL로 하여 고정화한 후 기질농도를 변화시키면서 바이오센서 반응을 측정하였다. Fig. 47의 panel B에 나타난 것처럼 1000  $\mu\text{M}$ 의 기질농도까지 직선상의 표준곡선을 얻을 수 있었고 (penicillin G, amoxicillin 및 ampicillin에 대한  $r$ 값이 각각 0.9985, 0.9999, 0.9878) 1  $\mu\text{M}$ 까지의 최소검출한계가 나타났다. 이 수치는 앞서의 기준을 만족시킬 수 있고 기존의 penicillin 센서에서 보고되는 0.01~3 mM보다 우수한 것으로 나타났다 (Rusling 등, 1976).

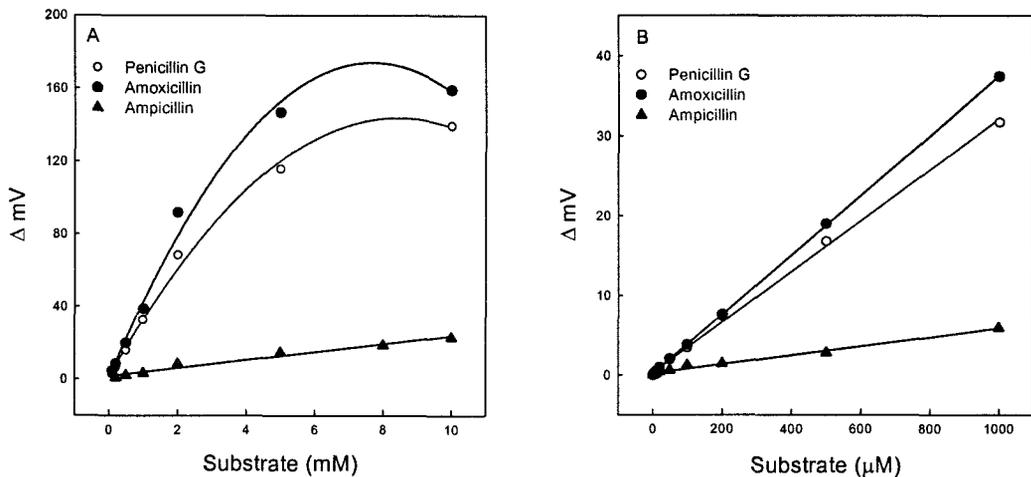


Fig. 47. Standard curves for the penicillin compounds according to the enzyme loadings of 50 (panel A) and 100 units/mL (panel B).

Table 16. Effects of enzyme loadings for immobilization on the responses of the penicillin sensor

Penicillin G ( $\mu\text{M}$ )	Biosensor response (%) <sup>a</sup>		
	Enzyme loading (units/mL)		
	50	100	200
10	100.0	200.0	350.0
20	100.0	166.7	266.7
50	100.0	118.8	118.8
100	100.0	126.5	130.2
200	100.0	125.4	142.4
500	100.0	113.5	127.0
1000	100.0	107.1	133.8

<sup>a</sup> The biosensor responses at the enzyme loading of 50 units/mL were arbitrarily taken as 100%.

### 3) 시료분석

#### 가) 실제시료 중 penicillin 화합물의 HPLC 확인

본 연구의 반응기질인 amoxicillin, ampicillin 및 penicillin G를 비교분석법인 gradient HPLC 방법에 의해 분석한 결과는 Fig. 48과 같고 이들의 머무름 시간은 각각 7.7, 21.0 및 29.3분으로 나타났다. 쇠고기, 돼지고기 등 공시시료로부터 제조한 분석용 검체에 penicillin 화합물이 존재하는지의 여부를 HPLC로 확인한 결과, 해당 화합물의 peak가 관찰되지 않았다 (Fig. 49). 그리하여 각각의 시료에 일정농도의 반응기질을 spiking한 모델시료를 potentiometric penicillin 센서와 HPLC 시스템에 각각 주입하여 분석하였다.

#### 나) 바이오센서 시스템에서의 시료분석

Fig. 50은 모델시료와 분석용 검체를 penicillin 센서 시스템에 주입하였을 때 얻어지는 반응양상을 1 mM penicillin G 첨가의 경우를 예로 들어 나타낸 것이다. 분석용 검체를 주입한 경우에도 반응전위가 증가하는 matrix effect가 나타났으나 모델시료를 주입하면 전위값은 분석용 검체를 주입한 경우보다 더 증가하였으며 따라서 정상상태에서의 모델시료와 분석용 검체의 반응변화량의 차이를 analyte에 의한 것으로 계산하였다.

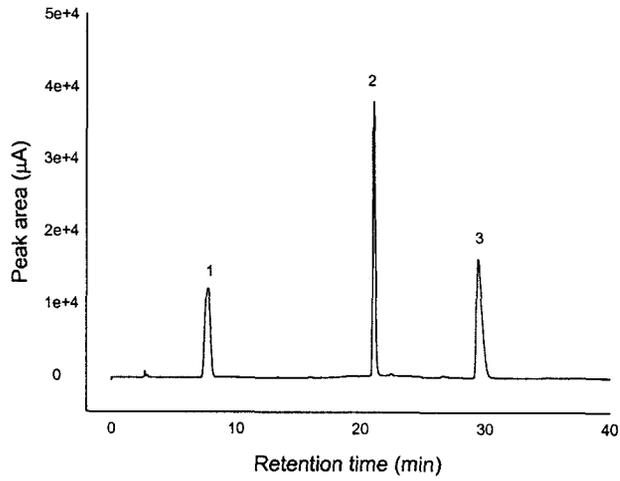


Fig. 48. HPLC chromatograms of amoxicillin (1), ampicillin (2) and penicillin G (3). The injection concentrations and retention time for peaks 1, 2 and 3 were 1 mM (7.7 min), 5 mM (21.0 min) and 5 mM (29.3 min), respectively.

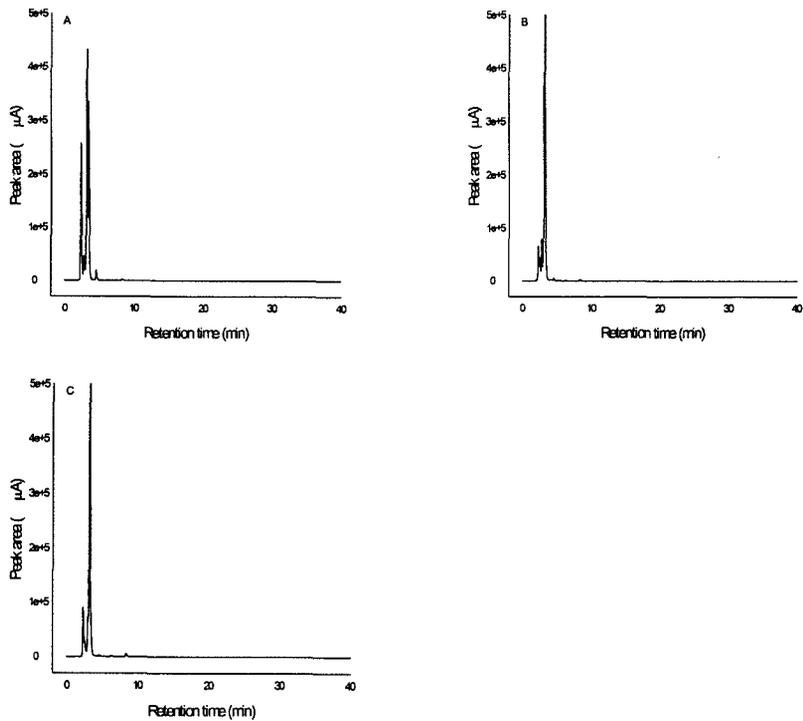


Fig. 49. HPLC chromatograms of the analytical samples. A, pork; B, beef; C, chicken.

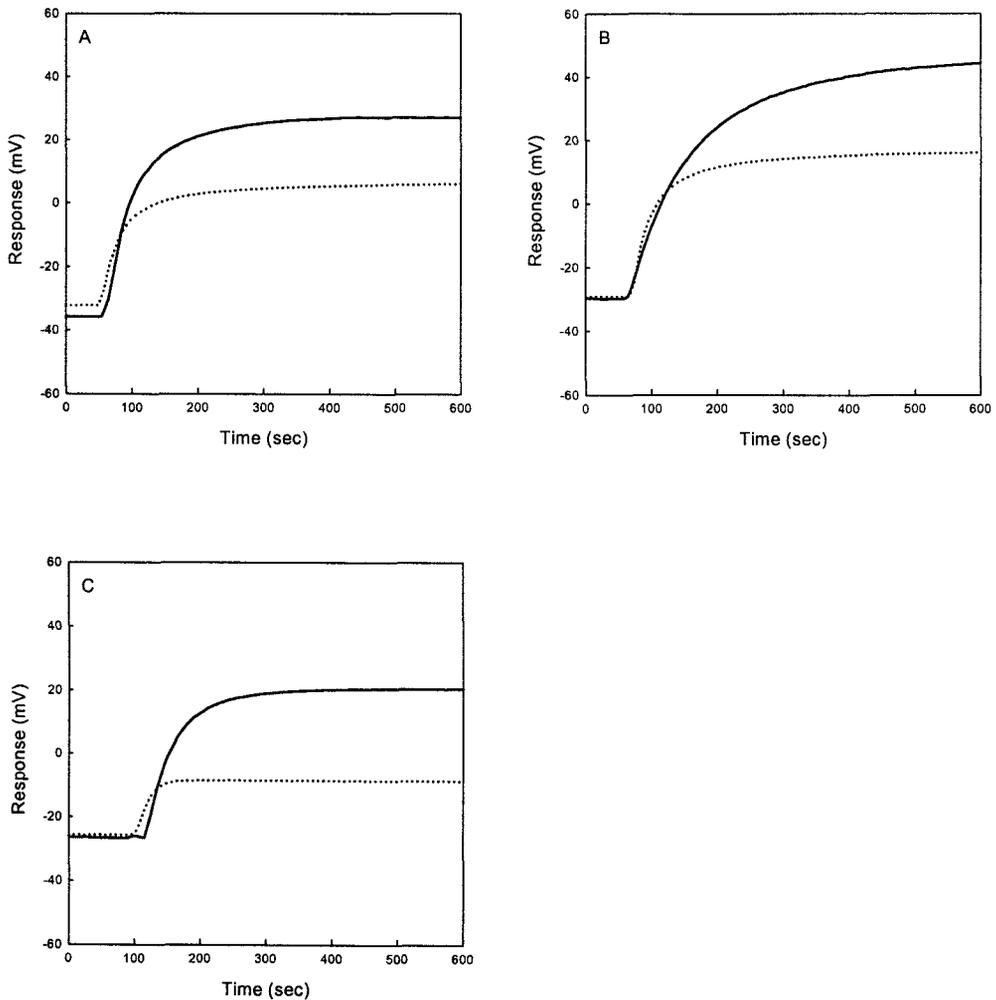


Fig. 50. Response profiles of the analytical samples unspiked and spiked with penicillin G. Panels A, B and C represent pork, beef and chicken, respectively. ....., analytical samples without spiking, —; model samples.

Table 17은 penicillin 화합물을 농도별로 가하여 제조한 모델시료를 주입하였을 때의 바이오센서 반응을 표준용액의 그것에 대한 상대감응비로 표시한 것이다. 각각의 시료에 대하여 penicillin G를 0.5 및 1 mM로 첨가 시 상대감응비는 각각 94.6~106.2%, 100.9~105.5%이었고 ampicillin 4와 5 mM에 대해서는 86.0~101.9%, 84.7~106.1%, amoxicillin 0.5와 1 mM에 대해서는 93.3~101.0%, 90.5~99.2%로 나타났다. Fig. 51의 표준곡선에서와 같이 바이오센서 측정치가 거의 표준곡선에 수렴하여 재현성이 높음을 알 수 있었다.

Table 17. Summary of penicillin sensor measurements with the model samples spiked with penicillin G, ampicillin and amoxicillin

Sample	Penicillin G (0.5 mM)		Penicillin G (1 mM)	
	Response (mV)	Relative ratio (%)	Response (mV)	Relative ratio (%)
Control	12.9	100.0	21.9	100.0
Pork	13.7	106.2	22.9	104.6
Beef	13.0	100.8	22.1	100.9
Chicken	12.8	99.2	23.0	105.0
Shrimp	12.8	99.2	22.2	101.4
Milk	12.2	94.6	22.7	103.7
Squid	12.3	95.4	23.1	105.5
Sample	Ampicillin (4 mM)		Ampicillin (5 mM)	
Control	10.7	100.0	13.1	100.0
Pork	10.1	94.4	11.1	84.7
Beef	9.2	86.0	13.3	101.5
Chicken	10.3	96.3	13.0	99.2
Shrimp	10.1	94.4	13.9	106.1
Milk	10.0	93.5	12.6	96.2
Squid	10.9	101.9	12.4	94.7
	Amoxicillin (0.5 mM)		Amoxicillin (1 mM)	
Control	19.3	100.0	37.0	100.00
Pork	18.0	93.3	36.5	98.7
Beef	18.1	93.8	36.0	97.3
Chicken	18.9	97.9	34.9	94.3
Shrimp	18.4	95.3	33.5	90.5
Milk	19.5	101.0	35.8	96.8
Squid	18.5	95.9	36.7	99.2

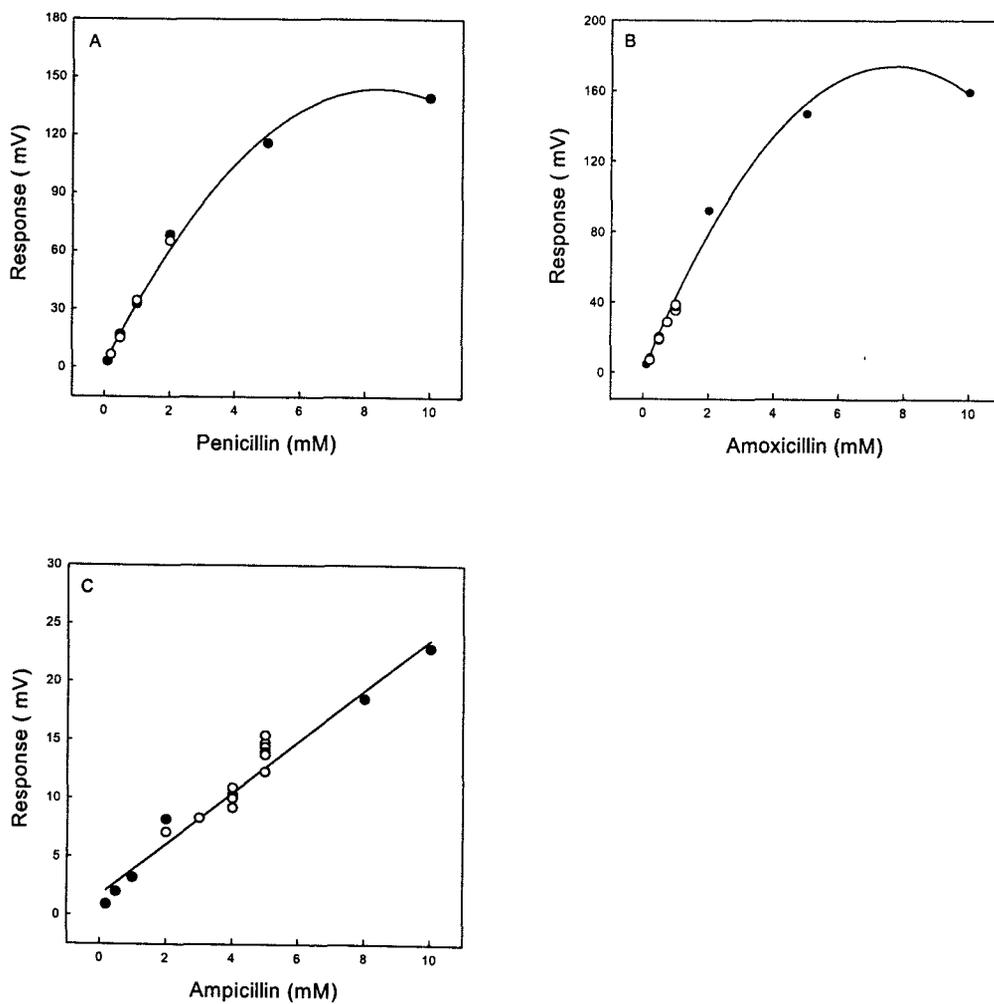


Fig. 51. Comparison of the biosensor responses for the standard samples (●) and model samples (○).

다) HPLC 시스템에서의 시료분석

HPLC 분석을 위한 분석용 검체에 각각의 penicillin 화합물을 농도별로 spiking하여 모델시료를 제조하고 이들을 gradient HPLC 시스템에 주입하여 분석하였다. Fig. 52는 penicillin G, ampicillin, amoxicillin을 첨가한 모델시료를 HPLC 시스템에 주입하였을 때 얻어지는 chromatogram을 표준품의 그것과 비교한 것이다. 모든 경우에 있어 모델시료 중의 penicillin 화합물의 peak와 표준용액의 그것은 정확하게 일치하여 비교분석법으로서의 효용성이 확인되었다.

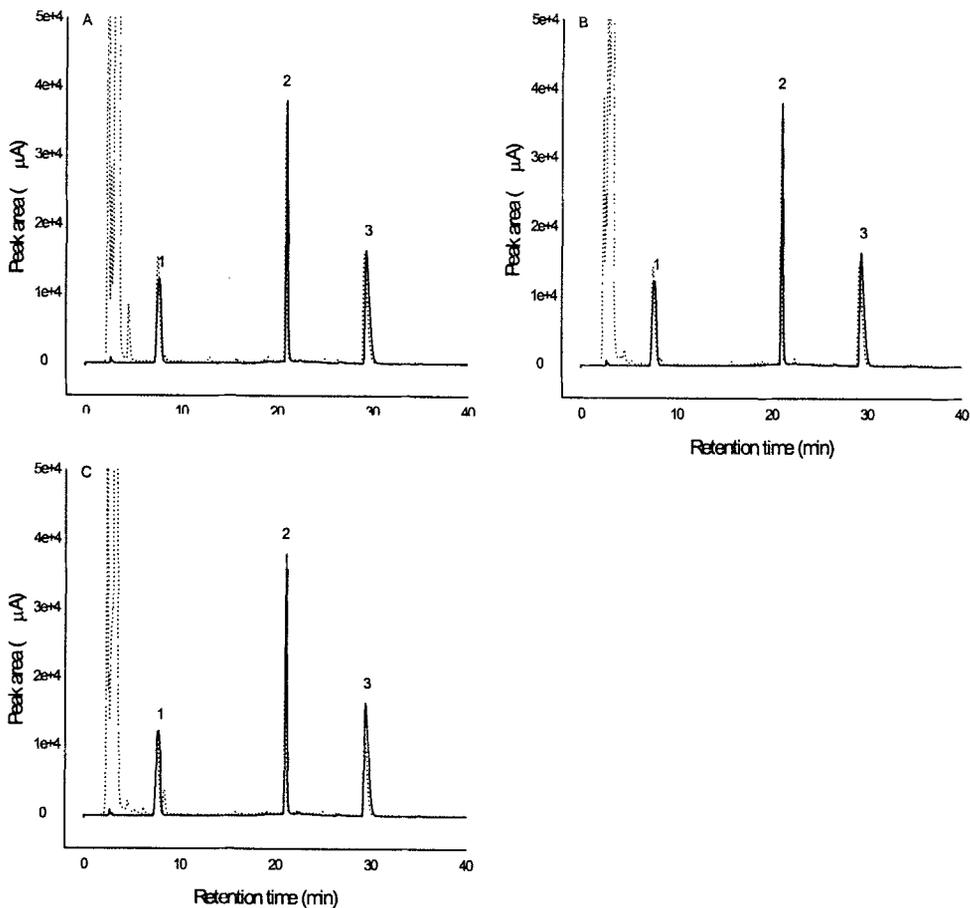


Fig. 52. HPLC chromatograms of the model samples spiked with amoxicillin, ampicillin and penicillin G. Panels A, B and C represent pork, beef and chicken, respectively. —, standard sample; ....., model sample. 1, amoxicillin (1 mM); 2, ampicillin (5 mM); 3, penicillin G (5 mM).

각각의 penicillin 화합물을 일정한 농도로 spiking하여 제조한 모델시료를 HPLC 시스템에 주입하여 얻은 peak 면적을 동일농도의 표준용액이 나타내는 peak 면적과 비교하여 상대감응비로서 표시하였다 (Table 18). 각각 5, 5 및 1 mM의 penicillin G, ampicillin, amoxicillin을 첨가하여 제조한 모델시료가 나타내는 상대감응비는 각각 61.1~93.4, 60.8~89.1, 65.8~97.3%이었다. Fig. 53은 모델시료를 HPLC 시스템에 주입하여 얻은 peak 면적을 표준용액의 peak 면적으로부터 도정한 표준곡선과 비교한 것이다. Penicillin 센서 시스템의 경우와 마찬가지로 HPLC 분석치가 표준곡선에 수렴하여 재현성이 높음을 알 수 있었다

Table. 18. Summary of HPLC measurements with the model samples spiked with penicillin G, ampicillin and amoxicillin

Sample	Penicillin G (5 mM)		Ampicillin (5 mM)		Amoxicillin (1 mM)	
	Peak area	Relative ratio (%)	Peak area	Relative ratio (%)	Peak area	Relative ratio (%)
Control	517763.3	100.0	515883.2	100.0	374244.5	100.0
Pork	473564.0	91.5	453339.5	87.9	354436.0	94.7
Beef	423768.0	81.9	414616.5	80.4	327382.0	87.5
Chicken	316457.0	61.1	313639.5	60.8	246153.0	65.8
Shrimp	483321.5	93.4	459407.5	89.1	363963.5	97.3
Milk	470018.1	90.8	402593.5	78.0	312060.9	83.4
Squid	442440.0	85.5	418093.0	81.0	328410.0	87.8

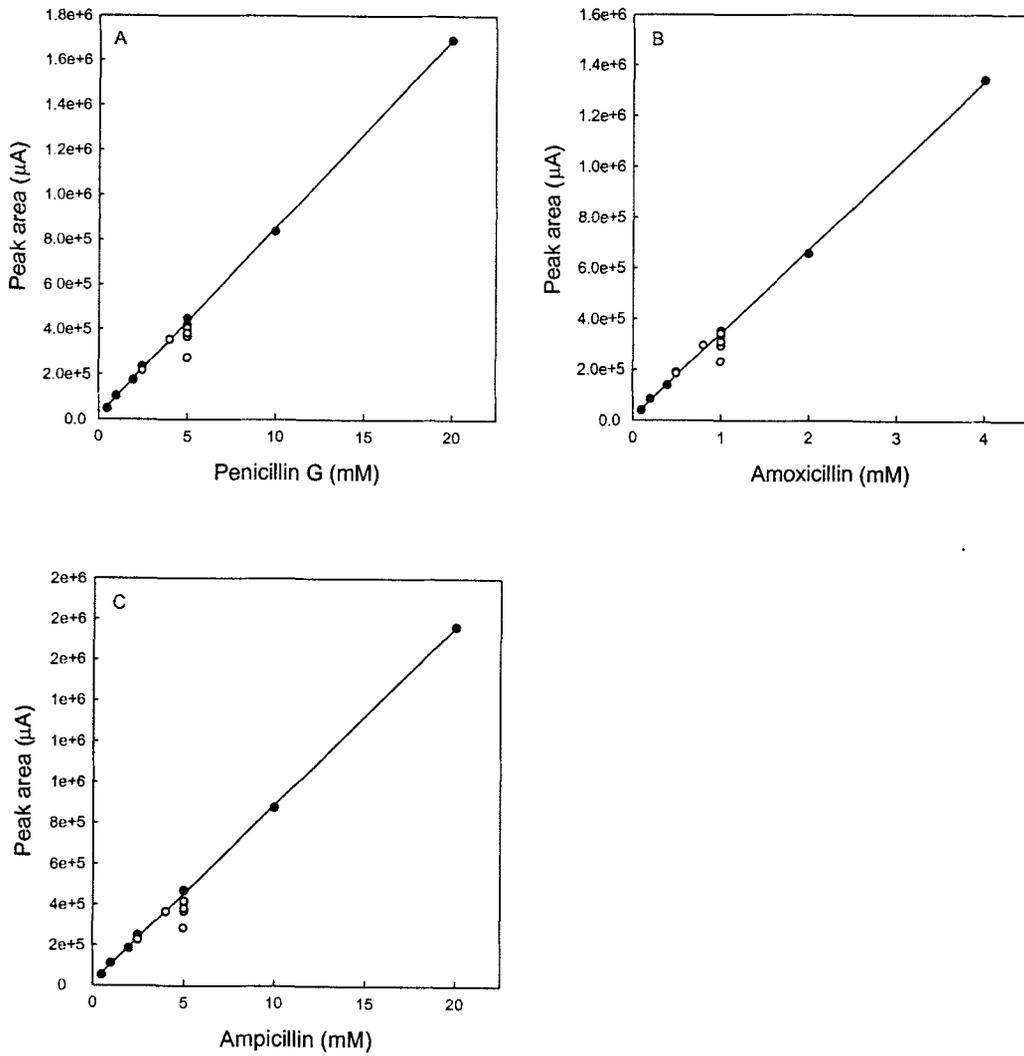


Fig. 53. Comparison of the HPLC peak area for the standard samples (●) and model sample (○).

Table 19는 동일시료로부터 제조한 분석용 검체에 각각의 penicillin 화합물의 농도를 달리 첨가하여 제조한 모델시료를 본 연구의 potentiometric penicillin 센서와 gradient HPLC에 의하여 분석하고 그 상대감응비를 비교한 것이다. 바이오센서로 측정하였을 때 penicillin G, amoxicillin 및 ampicillin의 농도변화에 따라 나타난 상대감응비는 각각 95.5~103.5, 82.1~96.2, 84.4~100.7%인 반면 HPLC로 분석한 경우에는 각각 84.0~101.4, 86.1~106.1, 79.5~99.1%로서, 본 연구의 바이오센서 시스템은 HPLC에 비견할 수 있는 감응성과 정밀성을 지녀 penicillin 화합물에 대한 간이검출에 효율적일 것으로 사료되었다.

Table 19. Comparison of the relative ratio for the penicillin compounds obtained with the biosensor method and HPLC

Substrate	Biosensor method		HPLC	
	Spiked concentration (mM)	Relative ratio (%) <sup>a</sup>	Spiked concentration (mM)	Relative ratio (%) <sup>a</sup>
Penicillin G	0.2	98.6	2.5	92.4
	0.5	99.2	4.0	101.4
	1.0	103.5	5.0	84.0
	2.0	95.5		
Amoxicillin	0.2	82.1	0.5	98.5
	0.5	96.2	0.8	106.1
	0.75	87.4	1.0	86.1
	1.0	96.1		
Ampicillin	2.0	84.4	2.5	91.2
	3.0	100.7	4.0	99.1
	4.0	94.4	5.0	79.5
	5.0	97.1		

<sup>a</sup> Percentage of the response (or peak area) of the model sample against that of the standard sample.

## II. 센서반응에 대한 컴퓨터 접속시스템 및 제어연구 (위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 신구대학 최 부 돌

### 1. 서 설

바이오센서의 전극으로 활용되는 ammonium 전극과 reference 전극을 이용한 농축산물의 화학적 위해요소인 수은이나 구리, 납 등의 중금속 등의 검사에 활용가능 하도록 개발된 전극의 측정조건에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력, 저장 분석하기 위한 측정 자동화 시스템을 구축하였다.

한편, 광학적 면역센서는 고감도 측정이 가능하고 계측시스템도 간편하게 구성할 수 있어 현장적응성이 뛰어난 새로운 분석장비이다. 축육 및 우유에 잔류가능한 수의용 항생제인 chloramphenicol 측정을 위한 화학발광 원리의 광학적 면역센서 시스템에 컴퓨터 접속시스템을 구축하여 항생제의 잔류량을 간이적으로 자동측정 할 수 있는 시스템을 구성하였다. 이 때, 시스템 구성은 연속형으로 하였으며 Hamamatsu Photonics사 (Japan)의 R955 photomultiplier와 부속 socket를 결합한 detector를 사용하여 반응결과 의 광량을 측정하였다. 반응조건과 단계별 계측공정의 최적화를 이루어 면역센서 시스템에서 발생하는 광신호의 PC 접속시스템을 구성하였다. 이들 센서에서 얻어지는 측정된 신호는 8개의 측정신호를 입력할 수 있는 ADAM-4018에 연결하여 효소센서의 측정 데이터를 입력하였다. 측정된 analog 신호는 ADAM-4018 내에 내장된 16bit A/D 변환기에 의해 변환된 digital 신호로 가공된 후 1.5 km 내의 원거리의 신호전송의 데이터 버스 기능을 하는 ADAM-4520를 통과하고, 컴퓨터 본체의 RS-232로 연결하여 데이터의 전송이 이루어지게 접속장치를 구성하였다. 입력된 측정값과 제어하려는 설정치에 따라 relay나 motor 등을 구동할 수 있는 접속장치인 ADAM-4050에 연결하여, 컴퓨터 출력 신호가 RS-232를 거쳐 ADAM-4050에 전달되며, ADAM-3864를 연결하여 ON-OFF 신호에 따라 300W의 작동기를 작동할 수 있도록 하여 시료의 주입과 온도제어가 일어나도록 하였다. 또한, ADAM-4018은 냉점 보상회로가 있으므로 thermocouple를 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 반응조의 온도측정을 위하여 T type의 thermocouple을 이용하여 온도의 측정 및 제어를 행하도록 하였다. 이와 같은 방법으로 중금속 및 항생제에 대한 신속 분석기술의 개발을 위한 바이오센서의 컴퓨터 접속 및 제어 시스템을 구축하였다.

## 2. 연구개발 방법 및 결과

### 가. 바이오센서의 컴퓨터 접속시스템 구성

#### 1) 컴퓨터 접속시스템의 hardware적 구성

바이오센서의 전극으로 활용되는 ammonium 전극과 reference 전극을 이용한 농산물의 화학적 위해요소 검사 등에 활용가능 하도록 개발된 전극의 측정조건에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 시스템을 다음 Fig. 1과 같이 구성하였다.

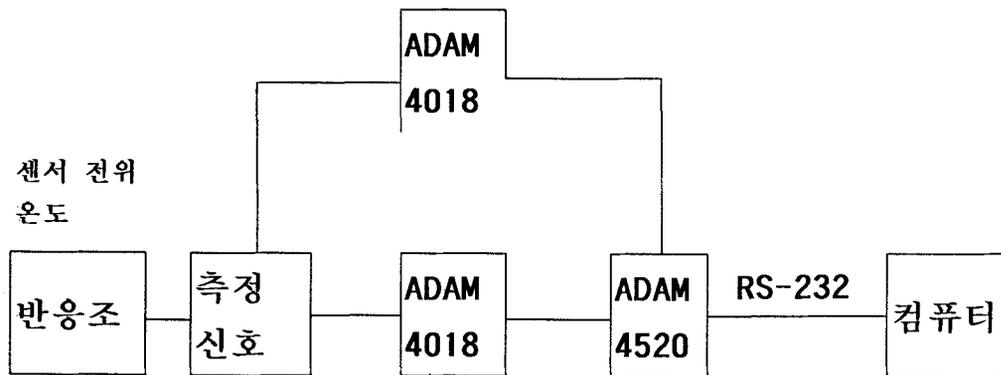


Fig. 1. Block diagram of the computer-aided data acquisition for the biosensor.

바이오센서에서 얻어지는 mV의 측정된 신호를 8개의 측정신호를 입력할 수 있는 ADAM-4018에 연결하여 효소센서의 측정 데이터를 입력하였다. 측정된 analog 신호는 ADAM-4018 내에 내장된 16bit A/D 변환기에 의해 변환된 digital 신호로 가공되어 데이터 버스 기능을 하는 ADAM-4520를 통과한 후 컴퓨터 본체의 RS-232로 연결하여 데이터의 전송이 이루어지게 접속장치를 구성하였다. 시스템 운영은 Advantech사의 Genie 3.0 program을 신호의 측정 및 저장, 자료분석을 위한 source program으로 하여 urease 저해센서에서 얻어진 자료를 컴퓨터에 저장, 분석할 수 있는 program을 작성하였다. 또한, ADAM-4018은 냉점 보상회로가 있어 6종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)을 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 본 연구에서는 반응조의 온도측정을 위하여 T type의 thermocouple을 이용하였다.

## 2) 컴퓨터 접속시스템 운영 program

앞에서 구성한 접속장치를 활용하기 위해서는 이를 운영할 program이 필요하다. Advantech사의 Genie 3.0 program을 구입하여 신호의 측정 및 저장이 가능한 source program으로 사용하였다. Genie 3.0은 Window를 이용한 data 측정 및 제어, data 분석 및 data presentation 등을 할 수 있는 software이다.

Genie는 사용자가 운영 program을 개발하는 것을 돕기 위해 많은 graphic control과 display icon을 제공하고 있다. Screen에 제어와 display icon을 끌어와서 가져다 놓으면 실시간 공정자료를 얻고 공정의 제어가 가능하게 된다. 대부분의 자료수집 및 제어 system은 이 같은 graphic design과 presentation system을 통하여 이용가능하다. Genie 3.0은 4개의 주요부분인 Script Designer, Task Designer, Display Designer, Report Designer로 구성되어 있다. 본 실험에서의 Task Design은 Fig. 2와 같이 구성하였다.

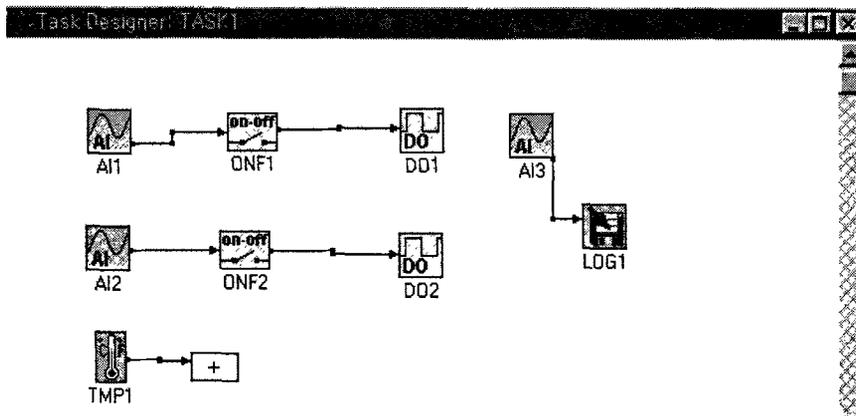


Fig. 2. Task Design of the data acquisition for the urease sensor.

Task Designer는 동시에 다수의 작업을 수행할 수 있게 해 준다. 각각의 작업은 작업 Window에 포함되어 있고, scan rate, 시작/중지 방법 등과 같은 작업은 각각의 고유성을 가진다. 하나의 strategy file은 control strategy에 관련된 모든 scan task을 저장하고 있게 된다. Display Designer는 즉각적인 그래픽 display를 만들 수 있게 해 준다. Tool을 사용자가 직접 필요한 display를 그려 사용할 수도 있다. Display를 만들기 위해서는 나타내고자 하는 item을 screen에 정렬하면 된다. Fig. 3은 Genie 3.0 program에 의하여 ADAM-4018에서 digital 신호로 전환되고, 바이오센서의 반응기간 동안 반응조

의 온도를 측정하고, 바이오센서에서 측정된 수 mV의 신호가 1초마다 컴퓨터에 입력 저장할 수 있도록 하고, 입력된 자료는 Display Design에 의하여 그래프로 실시간 출력하는 과정을 보여준다.

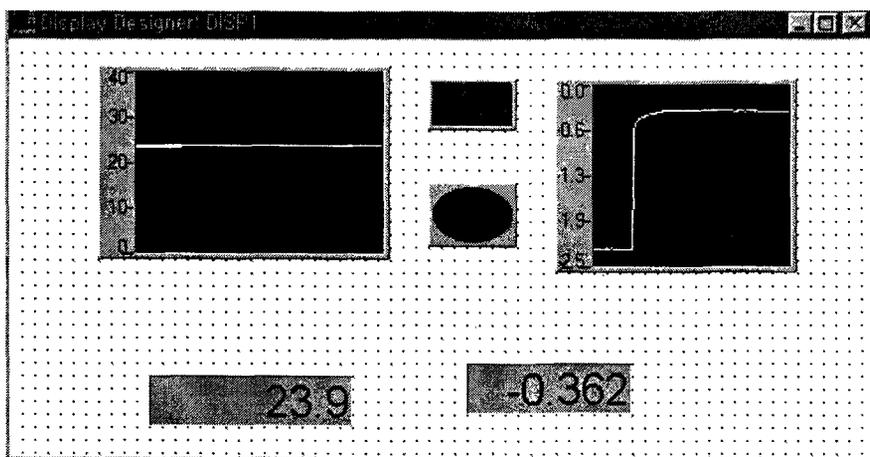


Fig. 3. Display Design of the data acquisition for the urease sensor exploiting R955 photomultiplier of Hamamatsu Photonics Co.

### 3) Ammonium 전극의 안정성 확인

Ammonium electrode와 reference electrode를 이온강도 조정 buffer를 첨가한 0.005 M Tris-buffer에서 표준 암모니아 농도에 대한 응답특성을 batch 시스템에서 얻어 Fig. 4와 같은 직선적인 상관관계의 그래프를 얻었다.

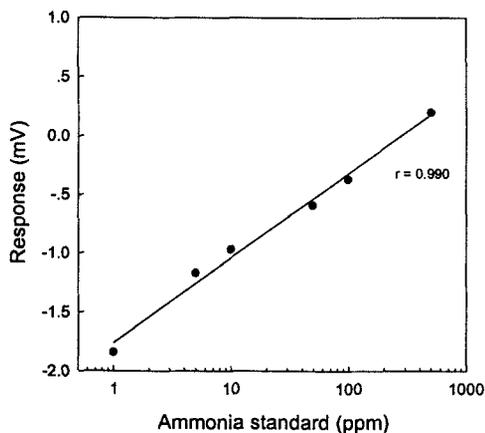


Fig. 4. Standard curve of the ammonium electrode.

Immobilon cellulose nitrate 막을 사용하는 흡착법에 의하여 urease를 고정화하고 이 막을 ammonium 전극에 부착하여 바이오센서를 제작하였다. 제조한 바이오센서를 이온 강도 조정 buffer가 첨가된 0.005 M Tris-buffer의 비이커에 넣은 후 5분간 안정화시키고 urea 0.01 M을 첨가하여 urease 효소센서에 의해 ammonia를 생성하게 하면 Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 급격히 전압이 상승하여 3분 정도가 경과하면 평형에 이른다. 이 용액에 효소저해를 일으키는 중금속 용액을 농도별로 주입하여 효소가 불활성화되면서 전압이 떨어지는 전위차의 변화를 측정하여 그래프로 얻었다. 측정후 0.1 M EDTA로 5분 동안 세척하여 효소를 재활성화 하여 다시 사용하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 중금속의 종류와 농도에 따라 저해 정도가 다르게 나타났다. 수은은 아주 낮은 농도에서도 현저한 저해를 보였고, 구리도 농도에 따라 저해가 아주 큰 차이를 보였다. 아연이나 납은 낮은 농도에서는 저해가 잘 관찰되지 않았고 농도가 어느 정도에 이르면 저해가 나타났다. 수은이나 구리같은 금속이온에 대하여 저해가 크게 나타나 이들 원소들의 식품함유를 확인하는데 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

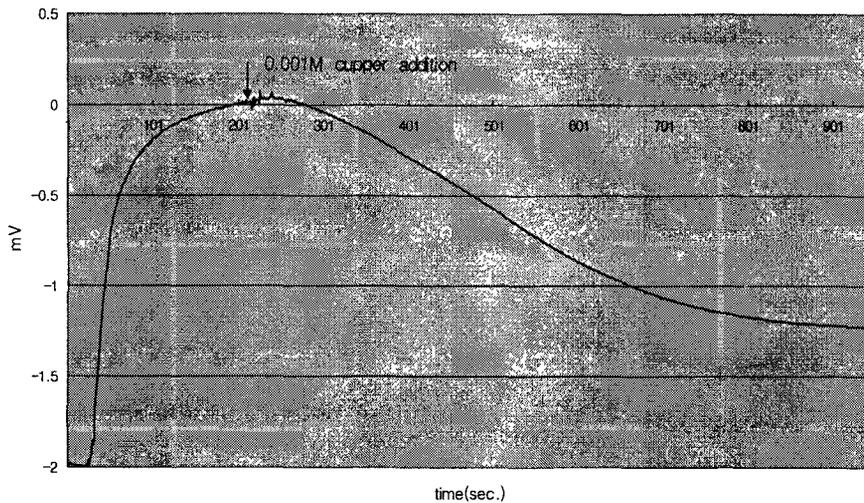


Fig.5. Typical metal inhibition curve of urase sensor at 0.001 M conc. copper

Table 1. Inhibition rate of the urease sensor for the metal concentration

Metal	Conc. (M)	Inhibition rate ( $\Delta$ mV)	
Cu	$10^{-5}$	-0.02	
	$10^{-4}$	-0.35	
	$10^{-3}$	-1.22	
	$10^{-2}$	-1.43	
Hg	$10^{-8}$	-0.51	
	$10^{-7}$	-1.12	
	$10^{-6}$	-1.62	
Zn	$10^{-4}$	-0.01	
	$5 \times 10^{-4}$	-0.02	
	$10^{-3}$	-0.02	
	$5 \times 10^{-3}$	-0.03	
	$10^{-2}$	-0.30	
Pb	$10^{-6}$	-0.02	
	$5 \times 10^{-6}$	-0.04	
	$10^{-5}$	-0.06	
	$5 \times 10^{-5}$	-0.25	

나. 면역센서 시스템에 대한 컴퓨터 접속시스템 개발

1) 접속 시스템의 hardware적 구성

면역센서의 광 발생시스템을 이용한 농산물의 화학적 위해요소의 검사 등에 활용가능 하도록 개발된 센서의 발광량을 전기적 신호로 전환하여 측정신호를 컴퓨터에 입력하기 위한 시스템을 Fig. 6과 같이 구성하였다. 그림에서와 같이 먼저 외부 광을 차단하기 위한 암상자 (16 cm×16 cm×20 cm)를 제작하고 (i), 완충용액을 넣은 시험관 (b)을 고정할 수 있는 스킨로폼으로 된 고정체 (f)에 시험관을 넣을 수 있게 수직으로 구멍을

만들었다. 시험관에서 발생한 광이 PMT (a)의 수광면 (g)에 도달하도록 고정체에 수평으로 구멍 (1 cm×1.5 cm)을 만들어 주었다. 고정화 효소막 (c)으로의 효소 및 항체의 고정화는 흡착법에 의하여 다음과 같이 행하였다. Nitrocellulose membrane (Waters, MI, USA)을 가로, 세로 10 mm의 크기로 잘라, 이를 50 µg/ml 농도의 free HRP 용액에 담가 24시간 흡착시킨 후 PBST 완충용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 씻어주었다. Biodyne nylon B membrane (positively charged, Pall Inc., NY, USA)도 같은 크기로 자른 후 동일한 방법으로 반응시켜 효소를 고정화하였다. 측정 중 시험관의 완충용액을 혼합하기 위하여 magnetic bar (d)를 넣고 stirrer (e)를 작동하였다.

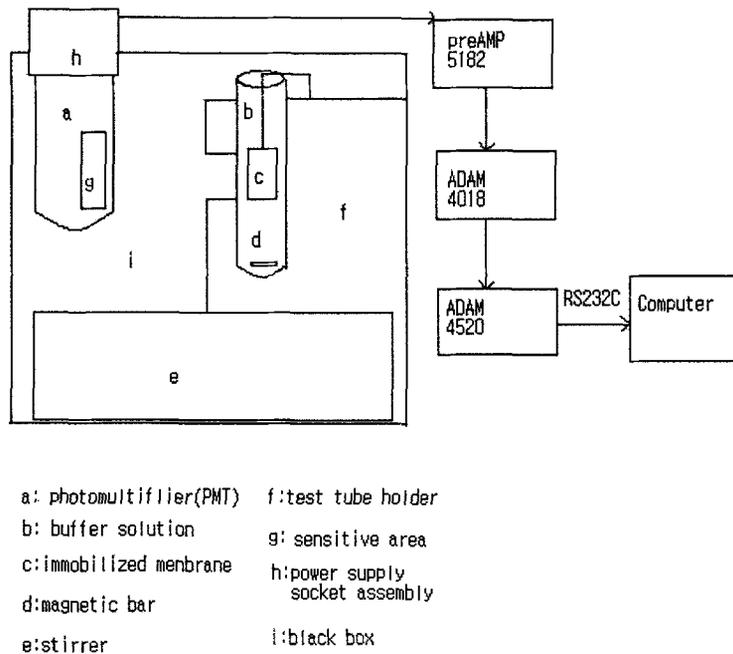


Fig. 6. Schematic diagram of the computer-aided data acquisition for the photomultiplier sensor system.

고정화 효소막 (c)에서 발생한 광은 Hamamatsu Photonics (Japan)의 R955 photomultiplier (a)의 수광면 (g)으로 입력되어 전기신호로 전환된다. R955는 전류출력형이며 160~900 nm의 파장에서 작동하며 400 nm에서 최대의 출력을 보인다. Model C 6271

HV power supply socket (h)은 PMT에 전원을 공급하여 작동시키는 부품이다. Fig. 6과 같은, 효소에 의해 발생하는 광량 측정시스템을 구성하였고 이를 본 연구의 광학적 면역센서 계측에 활용하였다.

면역센서 시스템에서 전압 (V)의 측정신호를 입력할 수 있는 ADAM-4018에 연결하여 면역센서의 측정 데이터를 입력하였다. 측정된 analog 신호는 ADAM-4018 내에 내장된 16bit A/D 변환기에 의해 변환된 digital 신호로 가공되어 데이터 버스 기능을 하는 ADAM-4520를 통과한 후, 컴퓨터 본체의 RS-232로 연결하여 데이터의 전송이 이루어지게 접속장치를 구성하였다. 시스템 운영은 Advantech사의 Genie 3.0 program을 신호의 측정 및 저장, 자료분석을 위한 source program으로 하여 면역센서 시스템에서 얻어진 자료를 컴퓨터에 저장, 분석할 수 있는 program을 작성하였다. 또한, ADAM-4018은 냉점 보상회로가 있어 6종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)을 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 본 연구에서는 반응조의 온도측정을 위하여 T type의 thermocouple을 이용하였다.

## 2) 컴퓨터 접속시스템 운영 program

앞에서 구성한 접속장치를 활용하기 위해서는 이를 운영할 program이 필요하다. Advantech사의 Genie 3.0 program을 구입하여 신호의 측정 및 저장이 가능한 source program으로 사용하였다. Genie 3.0은 Window를 이용한 data 측정 및 제어, data 분석 및 data presentation 등을 할 수 있는 software이다. Screen에 제어와 display icon을 끌어와서 program을 구성하면 실시간 공정자료를 얻고 공정제어가 가능하게 된다. Genie 3.0은 4개의 주요부분인 Script Designer, Task Designer, Display Designer, Report Designer로 구성되어 있다. 본 실험에서의 Task Design은 Fig. 7과 같이 구성하였다.

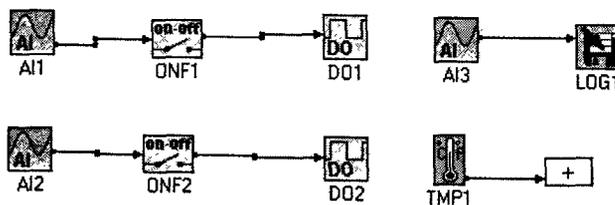


Fig. 7. Task Design of the data acquisition for the PMT sensor.

Task Designer는 동시에 다수의 작업을 수행할 수 있게 해 준다. 각각의 작업은 작업 Window에 포함되어 있고 scan rate, 시작/중지 방법 등과 같은 작업은 각각의 고유성을 가진다. Display Designer는 즉각적인 그래픽 display를 만들 수 있게 해준다. Tool을 사용자가 직접 필요한 display를 그려 사용할 수도 있다. Fig. 8은 Genie 3.0 program을 이용하여 ADAM-4018에서 digital 신호로 전환되고, 바이오센서의 반응기간 동안 반응조의 온도를 측정하고, 면역센서 시스템에서 측정된 전압 (V) 신호가 1초마다 컴퓨터에 입력 저장할 수 있도록 하고, 입력된 자료는 Display Design으로 그래프로 실시간 출력하는 과정을 보여준다.

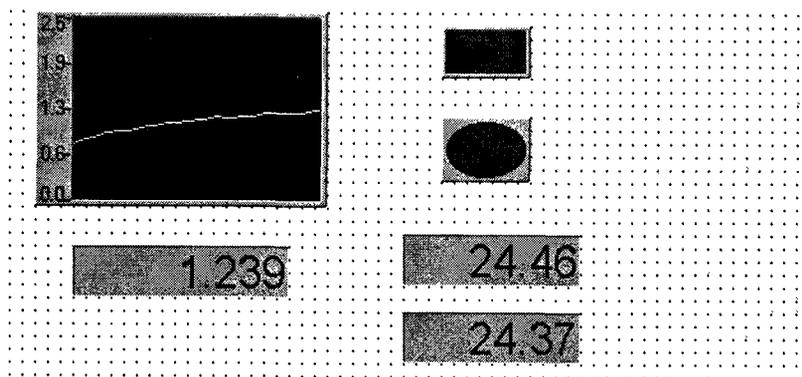


Fig. 8. Display Design of the data acquisition for the PMT sensor.

### 3) Free HRP를 이용한 실험

#### 가) Luminol 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 영향

일정한 농도 ( $1.66 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/ml}$ )의 free HRP를 이용하고 여기에 반응 혼합물 중 luminol과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 stock solution을 여러 농도로 희석한 working solution을 가하여 화학 발광의 정도를 측정하였다. 먼저 luminol의 농도를 0.003~0.12 mM로 변화시키면서 발광도를 측정 한 결과는 Fig. 9와 같다. Luminol의 농도를 높이면 발광도는 증가하는 양상을 보여 주었으나 0.04 mM이상에서는 그 증가가 크지 않았다.

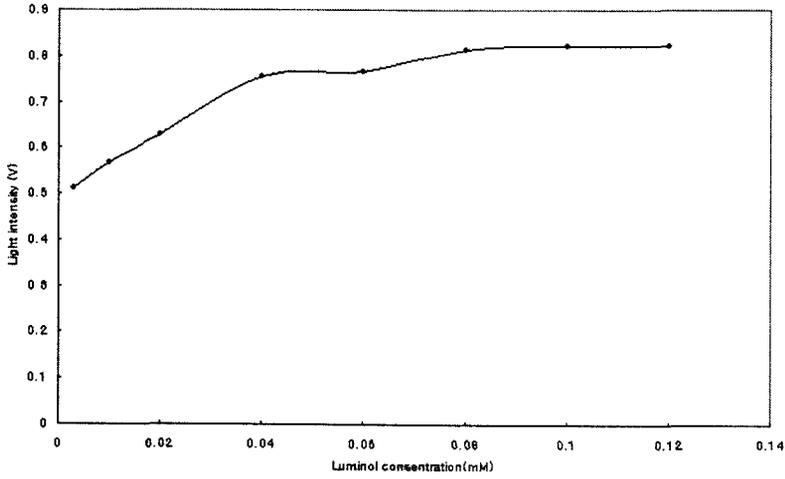


Fig. 9. Effect of luminol concentrations.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.166~4.0 mM 농도로 변화시켰을 때 Fig. 10에서와 같은 발광도를 얻을 수 있었으며 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 이상에서는 그 증가량이 크지 않았다.

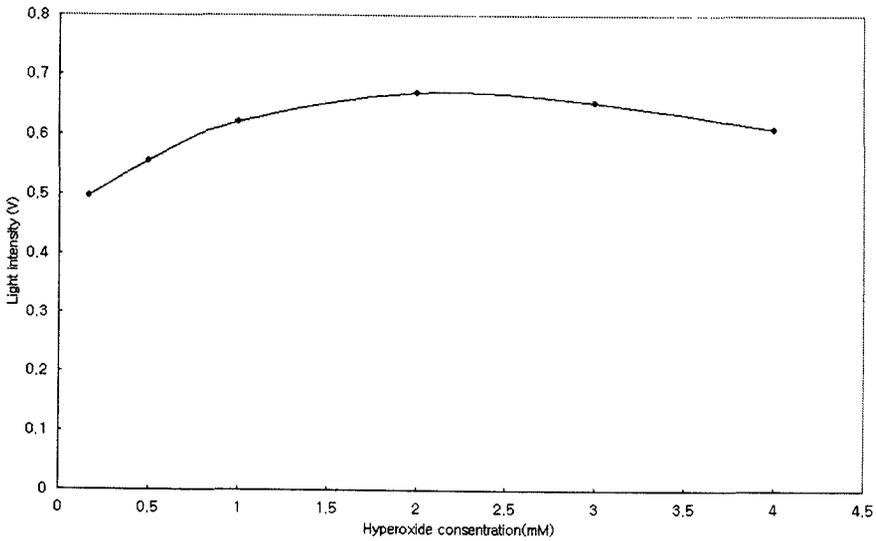


Fig. 10. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

#### 나) Free HRP 농도에 의한 영향

Luminol (0.02 mM) 및  $H_2O_2$  (1.0 mM)의 농도를 일정하게 유지하고 HRP의 농도를  $1.66 \times 10^{-5} \sim 1.2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ 로 변화시키면서 발광도를 측정하였다 (Fig. 11). HRP의 농도에 따라 발광도의 변화가 양의 상관성을 보였다. HRP 농도는 발광량에 크게 영향을 미치는 요소이며 HRP 농도가 너무 높으면 발광량이 많아 측정범위를 벗어나게 되기 때문에 적절한 농도를 설정하는 것이 중요하다.

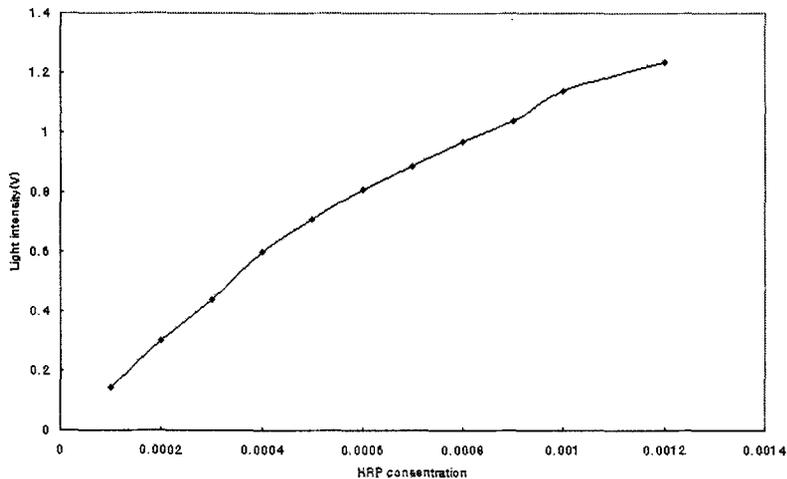


Fig. 11. Effect of free HRP concentrations.

#### 4) 고정화된 HRP를 이용한 실험

Nitrocellulose membrane을 가로, 세로 10 mm의 크기로 잘라 이를 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 HRP 용액에 담가 24시간 흡착시킨 후 PBST 완충용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 씻어주었다. Bodyne nylon B membrane도 같은 크기로 자른 후 동일한 방법으로 반응시켜 효소를 고정화하였다.

시험관에 반응 혼합물을 가하고 효소막을 PMT의 sensitive area에 수평이 되도록 위치시켜 발광도를 측정하였다. 이 때, luminol의 농도는 0.02 mM로 하였다. Fig. 12에서 볼 수 있는 바와 같이 luminol 농도가 증가하면 발광도가 증가하였고, 고정화 지지체로는 nitrocellulose membrane보다 Bodyne nylon B membrane이 더 우수함을 알 수 있었다. Fig. 13은 고정화 효소가  $H_2O_2$ 의 농도에 따라 보여주는 발광량을 측정한 것으로 농도증가에 따라 발광량이 증대됨을 알 수 있었다.

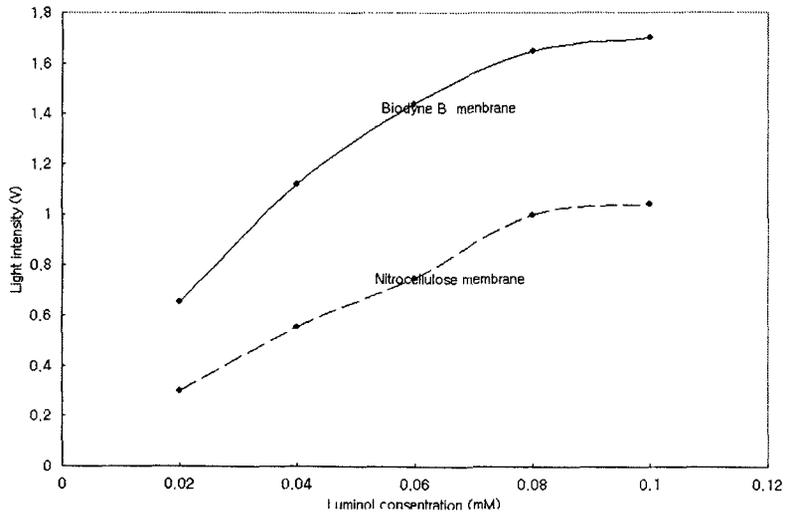


Fig. 12. Light intensity caused by two different immobilized membrane supports according to luminol concentrations.

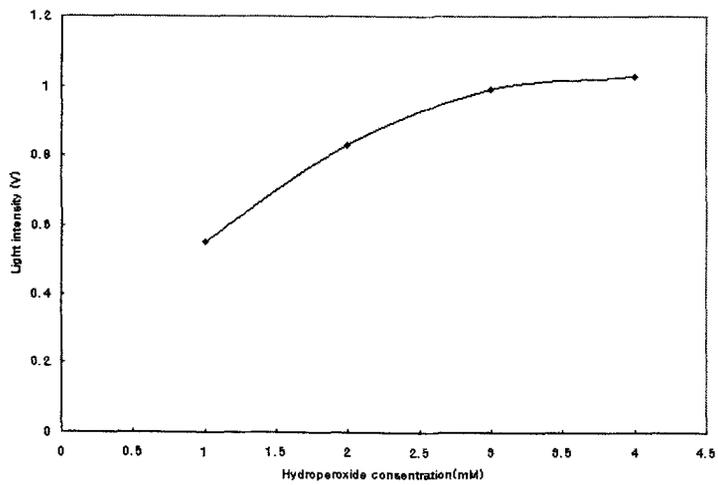


Fig. 13. Light intensity caused by Biodyne nylon B immobilized membrane according to  $H_2O_2$  concentrations.

다. 개발된 바이오센서 시스템을 이용한 계측제어

1) Urease 효소센서의 컴퓨터 계측제어 시스템 구성

가) 컴퓨터 계측제어 시스템의 hardware적 구성

Urease 센서의 전극으로 활용되는 ammonium 전극과 reference 전극을 이용한 농산물의 화학적 위해요소인 중금속 검사 등에 활용가능 하도록 개발된 전극의 측정조건에서 얻어지는 측정신호를 컴퓨터에 입력하고 제어하기 위한 시스템을 다음 Fig. 14와 같이 구성하였다.

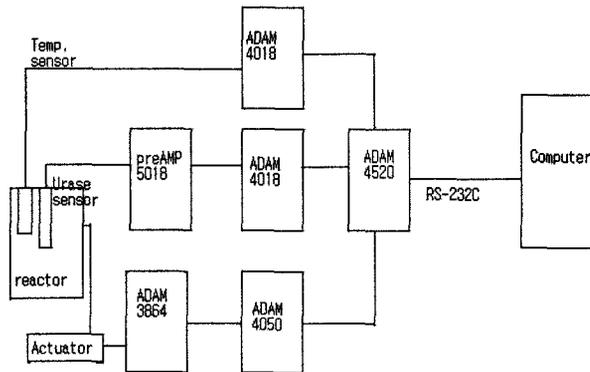


Fig. 14. Schematic diagram of the computer-aided measurement of heavy metals using urease sensor.

바이오센서에서 얻어지는 mV의 측정된 신호는 8개의 측정신호를 입력할 수 있는 ADAM-4018에 연결하여 효소센서의 측정 데이터를 입력하였다. 측정된 analog 신호는 ADAM-4018 내에 내장된 16bit A/D 변환기에 의해 변환된 digital 신호로 가공되어 1.5 km 내의 원거리의 신호전송의 데이터 버스 기능을 하는 ADAM-4520를 통과한 후, 컴퓨터 본체의 RS-232로 연결하여 데이터의 전송이 이루어지게 접속장치를 구성하였다. 입력된 측정값과 제어하려고 하는 설정치에 따라 relay나 motor 등을 구동할 수 있는 접속장치가 필요하다. 본 실험에서는 Advantech사에서 구입한 접속장치인 ADAM-4050

를 사용하였다. 제어는 컴퓨터 출력신호가 RS-232를 거쳐 ADAM-4050에 전달되며, 300W의 작동기를 작동할 수 있는 ADAM-3864를 연결하여 ON-OFF 신호에 따라 작동하도록 하여 시료의 주입과 온도제어가 일어나도록 하였다. 시료의 측정값이 중금속의 설정한계치에 이르면 경고음을 발생하도록 하고 경고발생 시간과 측정값이 자동저장 되게 된다. 또한, ADAM-4018은 냉점보상 회로가 있어 6종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)를 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 반응조의 온도측정을 위하여 T type의 thermocouple로 온도의 측정 및 제어를 행하였다.

나) 컴퓨터 계측제어 시스템 운영 program

Genie 3.0 program을 이용하여 신호의 측정 및 저장이 가능한 source program으로 사용하였다. Urease 센서를 이용한 시료 중의 중금속 량을 측정하고 설정치 이상의 측정값이 입력되면 경고를 발하게 하고 이 때의 시간과 측정값이 자동적으로 기록 보존 되도록 Fig. 15와 같이 Task Design을 구성하였다. AI1은 반응조의 온도를 1초단위로 측정하고 설정된 반응조의 온도에 따라 히타의 전원을 On-Off 되게 필요한 신호가 ADAM-4050으로 보내지고 보내진 신호에 따라 ADAM-3864의 relay 작동으로 300W 전원을 On-Off 하므로 설정된 반응조의 온도를 유지하도록 프로그램을 작성하였다. AI3를 통하여 urease 센서에서 측정된 값은 1초 간격으로 저장되고 15분간 지속되며, 시료의 측정이 종료되면 새로운 완충용액과 시료가 투입되어 자동측정이 반복적으로 수행된다. ET1은 측정 동안의 경과시간을 표시하며, ALOG1은 측정값이 설정 한계치를 벗어난 시료들의 값과 시간을 기록하여 준다. 이 때, 경고신호가 스피커를 통하여 발생된다.

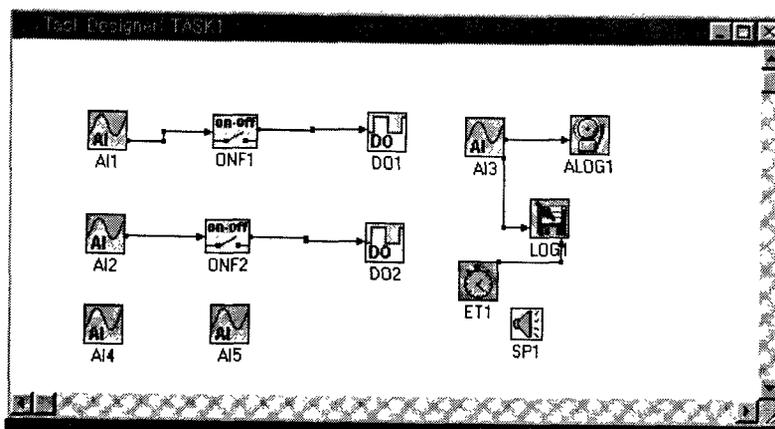


Fig. 15. Task Design of the data acquisition for the urease sensor.

Display Designer는 즉각적인 그래픽 display를 만들 수 있게 해준다. Fig. 16은 Genie 3.0 program을 ADAM-4018에서 digital 신호로 전환되고, 바이오센서의 반응기간 동안 반응조의 온도를 자동측정하고 제어가 일어나도록 program을 작성하였고, 바이오센서에서 측정된 수 mV의 신호가 1초마다 컴퓨터에 입력 저장할 수 있도록 하고, 입력된 온도 및 센서의 측정자료는 Display Design에 의하여 그래프로 실시간 출력하는 과정을 보여주며, 반응경과 시간과 온도 조절기의 상태와 시료의 주입펌프의 작동상태를 알 수 있고 설정된 목표치에 따라 일정량의 중금속 설정치를 초과하면 경고음을 발생시킬 수 있도록 하였다.

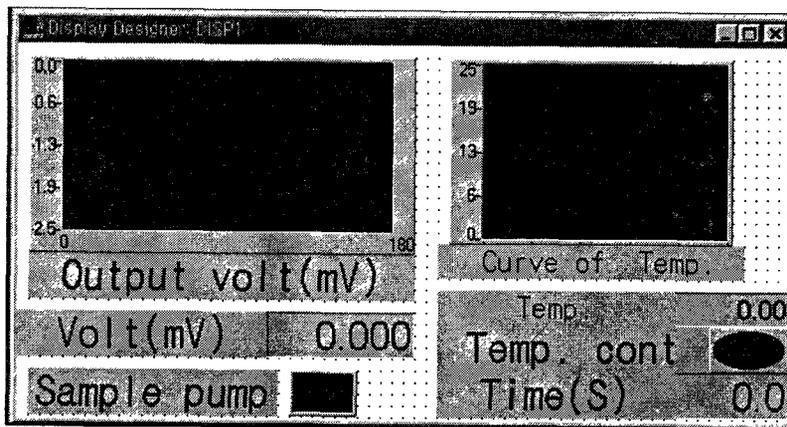


Fig. 16. Display Design of the data acquisition for the urease sensor.

다) Ammonium 전극의 안정성 확인 및 bench scale에서의 측정시험

Ammonium electrode와 reference electrode를, 이온강도 조정 buffer를 첨가한 0.005 M Tris-buffer에서 표준 암모니아 농도에 대한 응답특성을 batch 시스템에서 얻으면 직 선적인 상관관계를 보였다. Immobilon cellulose nitrate 막을 사용하여 흡착법에 의하여 urease를 고정화하고 이 막을 ammonium 전극에 부착하여 바이오센서를 제작하였다. 제조한 바이오센서를 이온강도 조정 buffer를 첨가한 0.005 M Tris-buffer가 담겨진 비이커에 넣은 후 5분간 안정화 한 후 urea 0.01 M을 첨가하여 urease 효소센서에 의해 ammonia를 생성하게 하면 Fig. 17에서 볼 수 있는 바와 같이 급격히 전압이 상승하여 3분 정도 경과하면 평형에 이른다. 이 용액에 효소저해를 일으키는 중금속 용액을 농도 별로 주입하면 효소가 불활성화 되면서 전압이 떨어지는 전위차의 변화를 측정하여 그래프로 얻었다. 측정 후 0.1 M EDTA로 5분 동안 세척하여 효소를 재활성화 시켰다. 중

금속의 종류와 농도에 따라 저해정도가 다르게 나타났다. 수은은  $10^{-8}$  M의 아주 낮은 농도에서도  $-0.51$  mV 정도의 현저한 저해를 보였고  $10^{-7}$  M에서  $-1.25$  mV의 전위차를 보여 urease의 저해가 크게 나타남을 알 수 있었다. 구리도 농도에 따라  $10^{-5}$  M의 농도에서  $-0.02$  mV,  $10^{-2}$  M에서는  $-1.43$  mV의 저해를 보여 농도에 따라 아주 큰 차이를 보였다 (Fig. 18).

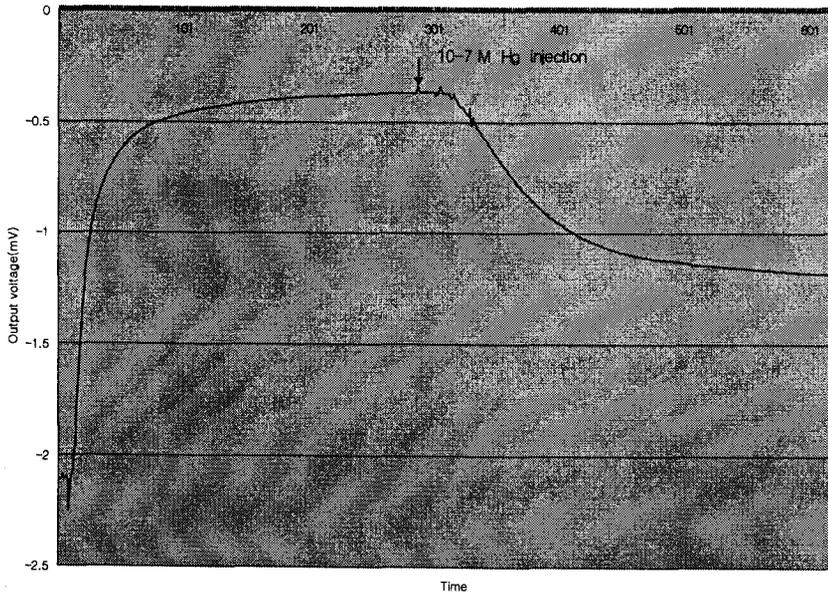


Fig. 17. Metal inhibition curve of the mercury in the bench scale.

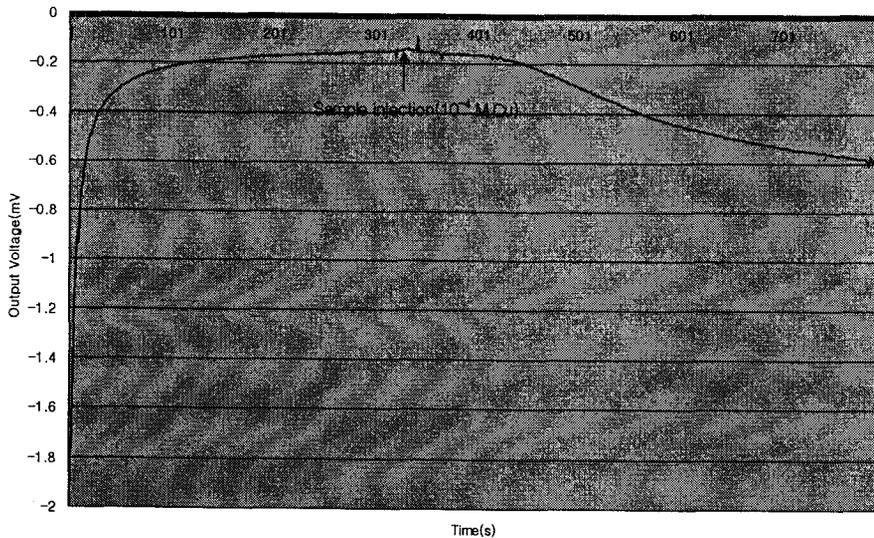


Fig. 18. Metal inhibition curve of the copper in the bench scale.

2) 면역센서의 연속 측정제어 시스템 자동화

가) 컴퓨터 연속 측정제어 자동화 시스템의 hardware적 구성

2차년도의 batch형 실험을 연속화 장치로 개선하기 위하여 Fig. 19에서와 같이 먼저 외부 광을 차단하기 위한 압상자 (16 cm×16 cm×20 cm)를 제작하고 (e), 고정화 효소막 위에 O-ring을 삽입하여 flow cell에 고정하고, 이 flow cell (g)을 PMT의 수광면에 평행되게 고정할 수 있는 스테로폼으로 된 고정체 (d)에 flow cell을 고정시켰다. Flow cell에서 발생한 광이 PMT (a)의 수광면 (b)에 잘 도달하도록 만들어 주었다. 고정화 효소막(f)의 효소 및 항체의 고정화는 다음과 같이 행하였다. 즉, nitrocellulose membrane, Biotinylated nylon B membrane을 직경 10 mm의 크기로 잘라 anti-CAP antibody를 고정화 한 후 이에 대한 항원에 해당하는 시료 중 analyte와 HRP를 고정화한 labeled analyte (tracer)를 함께 반응시키면 이들에 의한 직접경합반응 (direct competitive reaction)이 일어나게 된다. 이를 PBST 완충용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 씻어주었다. 마이크로 펌프로 연속적으로 PBST 완충용액을 흘려 보내다가 luminol과 iodophenol 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 일정농도 혼합액 400 µl를 주입하여 광량을 측정하였다.

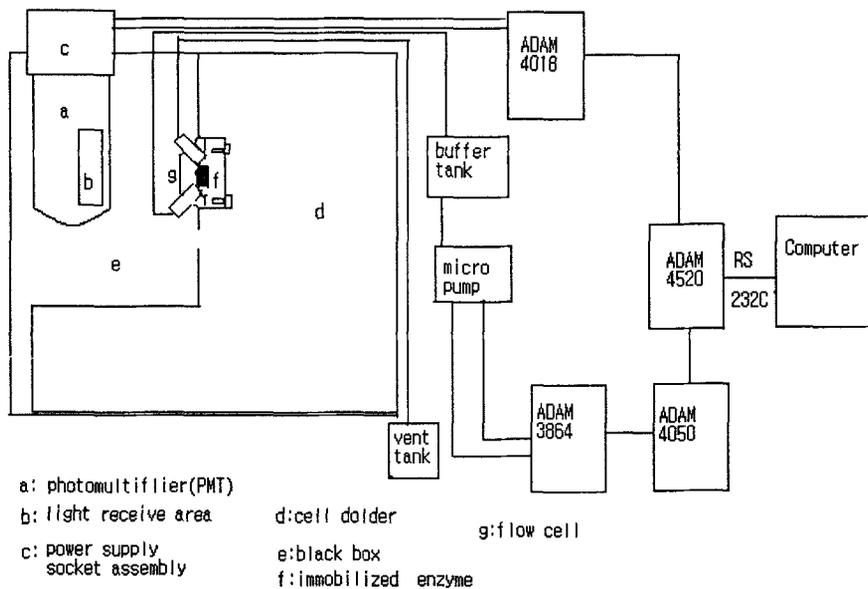


Fig. 19. Schematic diagram of the computer-aided measurement of the antibiotics using continuous flow cell.

고정효소막 (f)에서 발생한 광은 Hamamatsu Photonics의 R955 photomultiplier (a)의 수광면 (b)으로 입력되어 전기신호로 전환된다. R955는 전류출력형이며 160~900 nm의 파장에서 작동하며 400 nm에서 최대의 출력을 보인다. Model C6271 HV power supply socket assembly (c)는 PMT에 전원을 공급하여 작동시키는 부품이다. 이 부품이 작동하는 데는 +15V 전원의 입력이 필요하고 PMT에 공급되는 high voltage는 -1250V이다. Fig. 19에서와 같이 효소에 의해 발생하는 광량의 측정시스템을 구성하였고 이를 본 연구의 광학적 면역센서 계측에 활용하였다.

면역센서 시스템에서 전압 (V)의 측정신호를 입력할 수 있는 ADAM-4018에 연결하여 측정 데이터를 입력하였다. 측정된 analog 신호는 ADAM-4018 내에 내장된 16bit A/D 변환기에 의해 변환된 digital 신호로 가공되어 데이터 버스 기능을 하는 ADAM-4520를 통과한 후 컴퓨터 본체의 RS-232로 연결하여 데이터의 전송 및 저장이 이루어지게 접속장치를 구성하였다. 측정 시 연동펌프의 제어는 시간 설정치에 따라 relay를 구동할 수 있는 접속장치가 필요하다. 본 실험에서는 Advantech사의 접속장치 ADAM-4050를 사용하였다. 제어는 컴퓨터 출력신호가 RS-232를 거쳐 ADAM-4050에 전달되며 relay를 작동할 수 있는 ADAM-3864를 연결하여 ON-OFF 신호에 따라 작동하도록 하였다. 또한 ADAM-4018은 냉점보상 회로가 있어 6종류의 thermocouple (T, J, E, K, R, S)을 직접 연결하여 software적으로 처리하여 온도를 측정할 수 있다. 본 연구에서는 반응조의 온도측정을 위하여 T type의 thermocouple을 이용하였다.

#### 나) 컴퓨터 연속 계측제어 자동화 시스템 운영 program

시스템 운영은 Advantech사의 Genie 3.0 program을 신호의 측정 및 저장, 자료분석을 위한 source program으로 하여 면역센서에서 얻어진 자료를 컴퓨터에 저장, 분석 및 제어할 수 있도록 Fig. 20과 같은 Task Program을 작성하였다. AI1으로 반응조의 온도 측정을 위하여 thermocouple로 제작한 온도 센서를 ADAM-4018에 연결하여 온도를 측정하고 설정온도에 따라 필요한 신호가 자동으로 ADAM-4050으로 가 ONF1의 ON-OFF 신호가 발생되고 ADAM-3864의 DO1으로 relay가 작동되어 온도가 제어되도록 하였다. AI3는 발생된 광량에 따라 ADAM-4018의 16bit A/D 변환기로 digital 신호로 전환되고 ADAM-4520를 거쳐 RS-232C를 통하여 컴퓨터에 입력되고 이 자료는 LOG1에 의해 저장되게 된다. 설정치 이상의 측정치가 입력되면 ALOG1에 측정시간과 측정값이 기록되고 SP1에 경고음을 발생시킨다. ET1은 실험 실시 경과시간을 실시간으로 기록한

다. 시스템이 가동되면 펌프가 완충용액을 흘려 보내다가 0.4 ml의 시료를 흘려 보낸 후 다시 완충용액을 흘려 보내게 된다. Task Designer는 동시에 다수의 작업을 수행할 수 있게 해준다. 각각의 작업은 작업 Window에 포함되어 있고 scan rate, 시작/중지 방법 등과 같은 작업은 각각의 고유성을 가지도록 설정하게 된다.

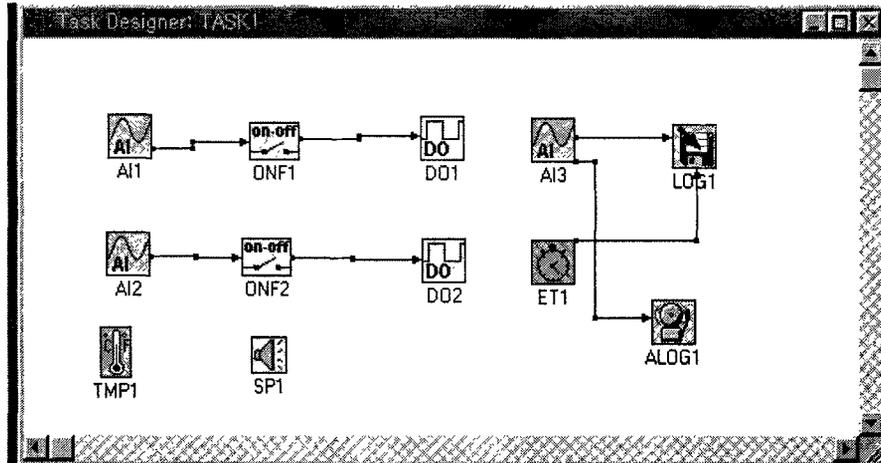


Fig. 20. Task Design of the data acquisition for the continuous flow cell immunosensor.

Display Designer는 실험 중 실시간으로 그래픽 display를 만들 수 있게 해준다. Tool을 사용자가 직접 필요한 display를 그려 사용할 수도 있다. Fig. 21은 Genie 3.0 program에 의하여 ADAM-4018에서 digital 신호로 전환되고, 바이오센서의 반응기간 동안 반응조의 온도를 측정하고, 면역센서 시스템에서 측정된 전압 (V) 신호가 1초마다 컴퓨터에 입력 저장될 수 있도록 하고, 입력된 자료는 Display Design의 그래프로 실시간 출력값을 보여주고 디지털 값을 실시간으로 볼 수 있는 과정을 나타낸다. 제어 구동장치에 의하여 buffer 용액과 필요량의 sample이 flow cell로 유입되도록 시스템을 구성하여 작동상태를 관찰할 수 있도록 하였다.

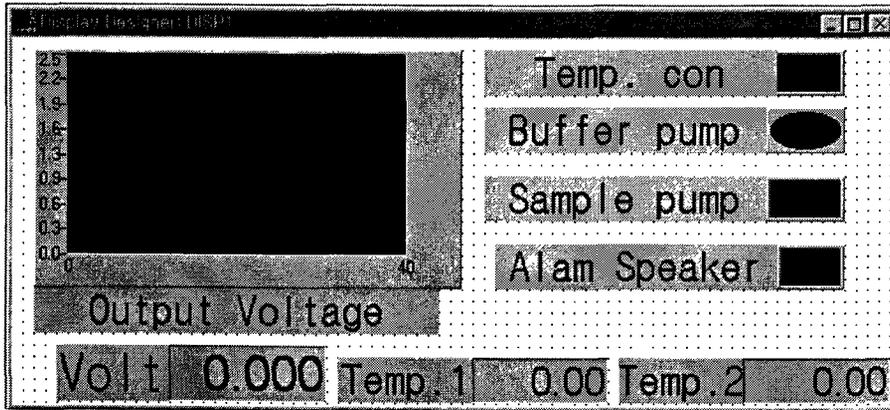


Fig. 21. Display Design of the data acquisition for the automatic continuous immunosensor.

다) 고정화 효소와 기질농도에 따른 광 반응성

Biodyne nylon B membrane을 직경 10 mm의 크기로 잘라, 이를 10~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 free HRP 용액에 담가 24시간 흡착시킨 후 PBST 완충용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 씻어주었다. Flow cell에 효소 고정화막을 고정시키고 PBST 완충용액을 1.25 ml/min 속도로 흘려 보내다가 각각 농도가 다른 반응 혼합물 (luminol +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + iodophenol) 1 ml를 흘려 보내면 화학발광이 일어나는데 주입 후 2분 이내에 최대값에 이르렀다. 발광곡선은 Fig. 22에서 볼 수 있는 바와 같고 효소의 흡착농도가 높을수록 발광도가 크고 Fig. 23에서와 같이 기질인 luminol의 농도가 증가하면 발광도가 증가하였다.

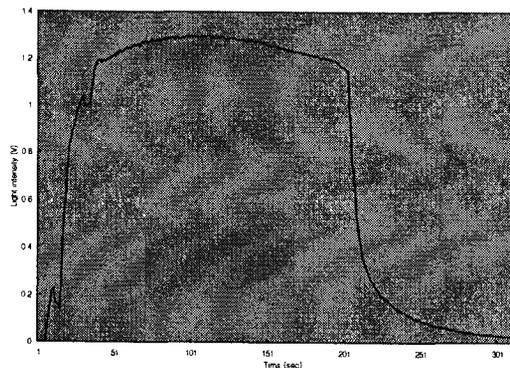


Fig. 22. Typical curve of the light intensity caused by the immobilized membrane support (luminol 0.04 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  5mM and iodophenol 2.5 mM).

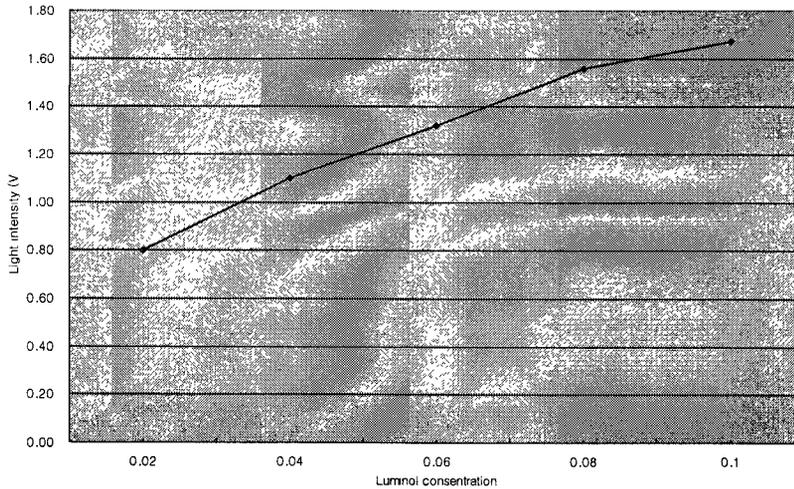


Fig. 23. Light intensity caused by the immobilized membrane support according to luminol concentrations.

라) 연속 계측제어 자동화 장치를 이용한 CAP immunosensor 경합반응

(1) Free CAP 농도증가에 따른 경합반응

Biodyne B membrane에 anti-CAP antibody를 완충용액을 사용하여 적절히 희석한 후 고정화하였다. 이 때, 항체 1 vial에 1000  $\mu\text{g}$  이하의 CAP에 대한 항체가 존재하였으며, vial의 내용물을 1 ml의 완충용액에 용해한 후 이를 100배 희석하여 실험에 사용하였다. Anti-CAP antibody를 상기 membrane에 고정화 한 후 buffer로 씻어주고 항체 고정화막을 free CAP와 tracer (CAP-HRP conjugate)로 이루어진 경합반응 mixture에 가하여 30분간 경합반응을 행하였다. Tracer의 사용농도는 경합반응의 효율을 극대화하기 위하여 sample인 CAP의 농도범위보다 현저히 높거나 낮지 않게 조절하였다. 본 실험에서 tracer의 농도는 0.115 mg/ml로 고정하였고 free CAP의 농도는  $10^{-9} \sim 10^{-5}$  M까지로 다양하게 조제하였으며 경합 mixture 중의 tracer와 기질의 부피비율은 1 : 4 (total 1 ml)로, 경합반응 후 membrane을 완충용액으로 씻어주고 washing된 membrane을 flow cell 내에 고정시키고 PBST 완충용액을 1.25 ml/min 속도로 일정시간 흘려 보낸다. 그 후에 0.4 ml의 일정농도의 luminol, iodophenol,  $\text{H}_2\text{O}_2$  혼합액을 흘려보내면 미세한 광이 발생되고 다시 완충용액을 흘려 보내어 연속측정이 가능하였으며 free CAP의 농도에 따른 화학발광의 정도를 측정하였다 (Fig. 24). 이 때, CAP가 없는 경우는 1.8V의 높은 광량이 발생하고 CAP의 농도가 증가할수록 광량이 감소하였다.

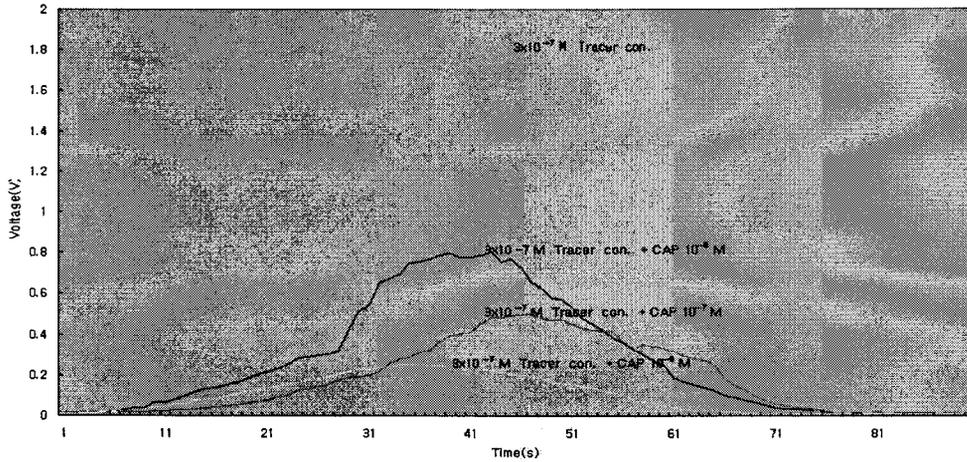


Fig. 24. Light intensity curve for free CAP in the direct competitive chemiluminescent membrane immunoassay.

(2) CAP-HRP conjugate 농도증가에 따른 경합반응

Anti-CAP antibody를 membrane에 고정화 한 후 free CAP의 농도를  $10^{-7}$  M로 고정하고 tracer의 농도를 변화시키면서 반응 cell에 주입하여 경합반응 시켰다. 이 때, tracer의 농도는 0.00115~0.115 mg/ml로 변화시켰다. 그 결과, tracer의 농도가 증가함에 따라 반응성은 증가하였는데 이는 free CAP와의 경합반응에서 tracer의 농도가 증가함에 따라 항체 고정화막에 tracer가 더 쉽게 결합할 수 있는 여건이 되어 나타난 결과라고 생각된다 (Fig. 25).

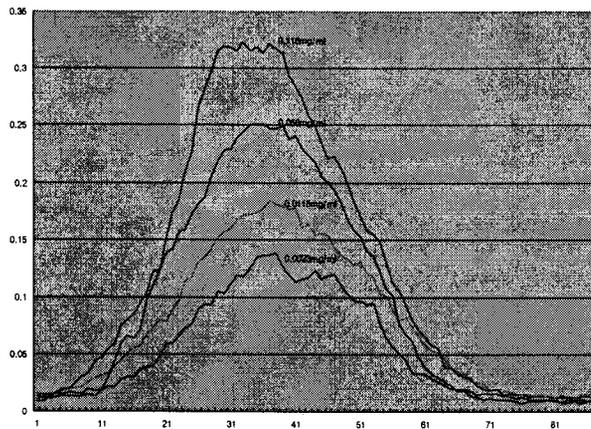


Fig. 25. Light intensity curve at varying tracer concentrations.

## 제 4 절 농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발 (제1협동과제)

### I. 농산물 중의 잔류농약 신속 다성분 분석기술 개발 (협동연구기관)

협동연구책임자 : 국립농산물품질관리원 시험연구소 성 기 용

#### 1. 서 설

고체상미세추출법 (solid-phase microextraction, SPME)은 1992년 이후 미국, 캐나다, 일부 유럽국가에서 지하수나 강물, 오·폐수 중의 탄소화합물 분석, 오렌지 주스, 커피, 콜라, 치즈 중의 방향물질의 분석에 일부 이용되고 있으며, 최근에는 혈액 중의 마취제나 뇨 중의 각성제 분석 등 의학적인 용도로의 사용을 위하여 연구가 진행되고 있다. 국내에서는 일부 학계에서 방향성 물질의 동정이나 식수나 지하수 중의 유기화합물의 분석 등 극히 미미한 분야에서만 관심을 기울이고 있다.

그러나, 본 연구를 수행하고자 하는 국립농산물품질관리원에서는 100여 성분의 농약과 30종의 농산물에 대하여 SPME와 연계한 GC 분석을 시도하여 적용가능성을 확인하였으나, 고체상태인 농산물에 적용하였을 때 기체나 액체 형태의 분석대상에서 나타나지 않던 문제가 일부 나타남에 따라 보다 체계적이고 과학적인 해결책을 모색하고자 많은 잔류농약 분석기법과 경험이 축적된 서울대학교 및 경기대학교와 공동으로 본 연구를 수행하여 효율적이고 신뢰할 수 있는 분석방법을 개발·정립하고자 하며, 동시에 경상대학교는 최근에 국내의 일부 업계나 연구소에서 관심을 갖기 시작한 immunoassay 방법의 연구를 통하여 기존 분석법의 기법상의 문제, 환경적인 문제, 수입 immunoassay kit 사용에 따른 경제성 문제 등을 해결함으로써 급증하는 농산물의 안전성 확보 요구에 대처코자 하였다.

전통적인 시료조제 방법은 과다한 유기용매와 분석도구의 사용에 따라 추출 및 농축 등의 단계에 의해 시간 및 경제적 비용을 증가시키고 분석결과의 오차를 크게 하며, 분석종사자에 대한 유해성 문제를 야기시키고 있다. 뿐만 아니라 과다한 유기용매와 시약의 사용은 폐용매의 발생량을 증가시키고 이의 처리비용 및 이로 인한 환경오염 문제까지도 유발함으로써 분석방법의 개선에 대한 요구를 촉발시킴으로써 분석법의 개선을 위

한 연구와 노력은 끊임없이 진행되고 있고 또한 진행되어야 할 필연성을 가지고 있다. 특히 유기용매의 사용문제는 분석화학 분야에 많은 기법변화를 유도하고 있으며, 최근에 들어서 solvent-free extraction 기법이 관심을 끌기 시작한 것도 분석 종사자의 건강과 환경 및 독성 유기용매의 사용을 줄이려는 법적 규제 때문이었다.

본 연구에서 적용코자 하는 SPME 방법은 이러한 요구사항을 충족시킬 수 있는 미래형 분석기법으로서 분석화학 분야에서 더욱 확대 응용되리라고 전망된다.

## 2. SPME 분석조건 확립을 위한 시료조건별 추출효율 조사

### 가. 실험방법

#### 1) 탈착시간 결정

GC injector에서의 적정 탈착시간을 선정하기 위하여 ECD1 group을 100 ppb로 이용하여 50, 30, 20, 10, 5, 3, 2, 1분으로 시간을 줄여가며 탈착실험을 행하였다. 최종 1분 실험 후 증류수를 대조구로 하여 20분간 추출하고 기기주입하여 유착여부를 점검하였다.

#### 2) 추출시간 결정

시료와 fiber간에 적정 평형시간을 구하고 GC runnig time (60분)과 추출율을 감안하여 가장 효율적인 추출시간을 결정하였다. 5, 10, 20, 30, 45, 60분에 대하여 100 ppb ECD1 group으로 실험하고 선발한 성분별 흡착량을 비교하여 적정시간을 선정하였다.

#### 3) 정밀성

1)과 2) 실험에서 정해진 방법으로 반복간의 변이율을 산출하여 정밀 screening 분석 가능성을 검토하였다.

#### 4) Fiber 종류별 흡착량 실험

Fiber coating 물질 및 두께에 따라 3종의 polydimethylsiloxane (이하, PDMS) fiber (7, 30, 100  $\mu\text{m}$ )와 PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB), polyacrylate (PA), carboxen/PDMS (CAR/PDMS), carbowax/DVB (CW/DVB), DVB/CAR/PDMS를 구입하여 동일한 조건으로 앞서의 탈착과 흡착조건으로 실험하였다.

5) 추출 mode별 흡착량 실험

현재 실험실에서 운용가능한 방법을 사용하였으며, stirring, vibration, shaking 등 3가지 방법으로 추출율을 비교실험 하였다.

6) pH별 흡착량 실험

동일한 종류의 시약으로 조성된 광범위 buffer (0.2 M boric acid, 0.05 M citric acid, 0.1 M trisodium orthophosphate)를 선택하여 pH 2~12의 11종 buffer를 가하여 pH별 흡착량을 측정하였다.

7) Salt의 종류 및 농도별 실험

Sodium chloride와 sodium sulfate를 0, 5, 10, 20% 및 포화 (NaCl로서 37%) 수준으로 조제하여 흡착량을 조사하였다.

8) 시료량이 흡착량에 미치는 영향

2 ml와 10 ml vial에 시료 1, 1.5, 2, 3, 5, 10 ml를 담고 각각의 흡착량을 비교하여 적합한 시료량을 선정하였다.

9) 추출용매별 흡착량 실험

Acetone, acetonitrile, methanol 등 3가지 주요 잔류분석용 용매를 사용하여 각각의 용매조성이 1, 10, 20, 30, 50, 75, 100%가 되도록 조제하여 각각의 경우의 흡착량을 비교하였다.

10) 추출온도와 흡착량과의 상관성 조사

침지실험 (direct SPME)의 경우 온도를 20, 30, 40, 60, 80°C로 변화시켰을 때의 흡착량의 변화를 조사하여 온도의 영향을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 탈착시간 결정

10 ml 증류수에 100 ppb 정도의 ECD1을 사용하여 800 rpm으로 stirring하여 추출시  
 험하였다. 이 때 추출시간은 10분으로 임의로 고정하였다. 20분을 탈착하여도 carry-  
 over되어 다음 탈착에 영향을 미치므로 탈착시간을 줄이고 유기용매 (methanol)로  
 washing한 다음 30분간 탈착하는 방법을 사용하였을 때 carry-over 현상이 현저히 감소  
 하였으며 다음 실험에 거의 영향을 미치지 않았다.

전체적으로는 20분 후부터 흡착량의 증가가 둔화되며 성분에 따라서는 10분에 이미  
 감소하는 것으로 나타났다 (그림 1). GC running time을 고려하여 10분을 선정하였고,  
 앞에서 언급한 30분간 conditioning을 적용하였다.

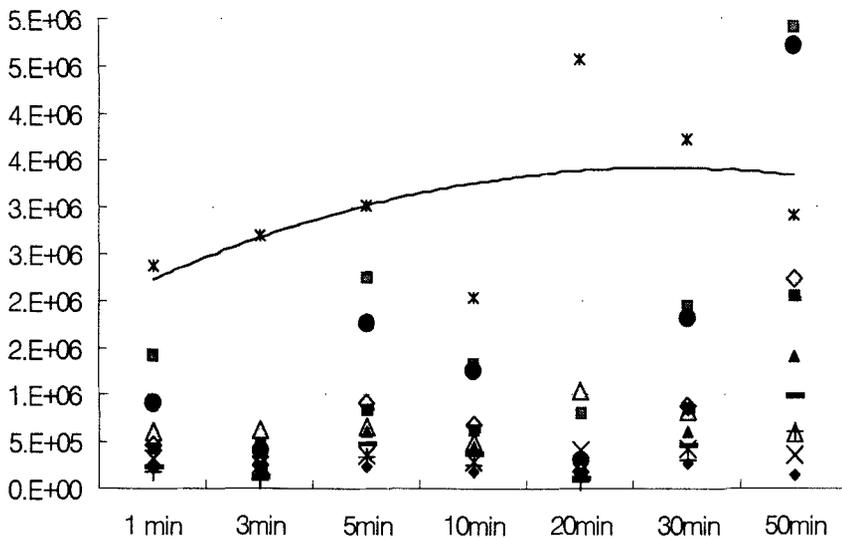


그림 1. 탈착시간 결정.

2) 추출시간 결정

실험 1)에서 결정된 10분을 탈착시간으로 고정하여 추출시간 결정실험을 하였다 (그  
 립 2). 5, 10, 20, 30, 45, 60분으로 추출하였을 때 20분 정도에서 서서히 흡착량의 증가율  
 이 둔화되는 성분이 나타나고 있으며 30분 부터는 거의 모든 성분들이 증가속도가 감소  
 하고 있다. 따라서, 추출시간은 10분에서부터 30분 이내에 결정하여야 할 것이며 정량분  
 석을 위해서는 20분 정도가 적합하나 GC running time (60분)과 검출한계를 증가시키기

위하여 가장 효율적인 30분을 추출시간으로 결정하였다. 정성분석을 위해서는 추출시간을 늘릴수록 많이 흡착되므로 실험목적에 따라 달리 적용할 수 있다.

GC 분석시간이 60분이고 안정화에 5분이 소요되면 30분 추출, 35분 탈착 프로그램하여 분석하면 효율적인 분석이 가능하였다.

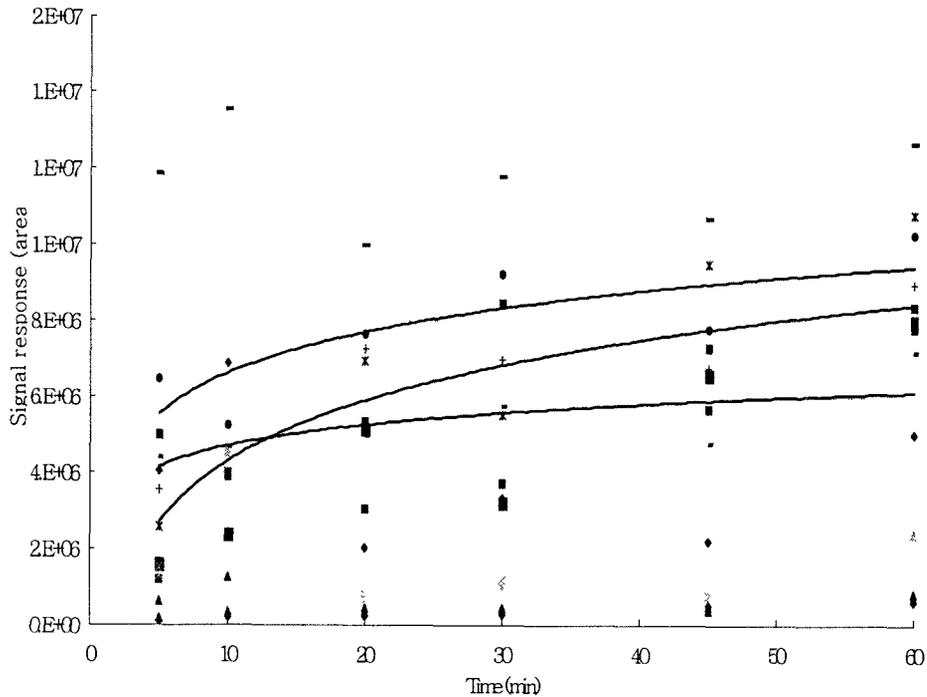


그림 2. 추출시간의 결정.

### 3) 정밀성

추출시간 30분과 탈착시간 10분을 적용하여 12성분에 대하여 3반복 실험하여 실험구간의 변이율을 검토하였다. 실험실간 정도관리에서 적용되는 Horwitz curve 공식을 활용하면,

$$CV(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

적용결과, 인정범위는 22.6%가 되므로 7개 성분은 범위내에 속하였고 5개 성분이 범위밖에 속함에 따라 정량분석보다는 정성분석으로 적용하는 것이 타당할 것으로 판단되었다 (표 1).

표 1. SPME에서의 변이율 (%)

Retention time (min)	Compound name	Signal response (Area)	CV (%)
7	Metobromuron	178313	14.67
20	Metribuzin	1683900	29.26
36	Iprodion	1026679	11.65
38	Bifenthrin	1012271	42.12
41	Fenarimol	6418547	16.28
42	Acrinathin	1634821	2.05
43	Permethrin	280532	3.02
47	Cyfluthrin2	1204024	23.92
48	Cyfluthrin3	701779	26.70
48	Cyfluthrin4	1316887	18.52
48	Fenvalerate	1191769	16.47
49	Fenvalerate	997189	25.97

#### 4) Fiber 종류별 흡착량 실험

ECD group 2를 이용하여 100 ppb/증류수 수준으로 조제하여 8종의 fiber로 흡착량 실험을 하였으며, 앞서의 추출조건을 사용하였다. 성분의 특성- 극성, 비점 등에 따라 각 fiber에 흡착되는 양이 서로 달랐으나, 전체적으로 PA, CAR/DVB의 추출량이 많았다. Fiber coating 물질의 안정성 (반복사용 횟수)은 PA가 더 우수하였으므로 PA를 선정하여 사용하였다 (그림 3).

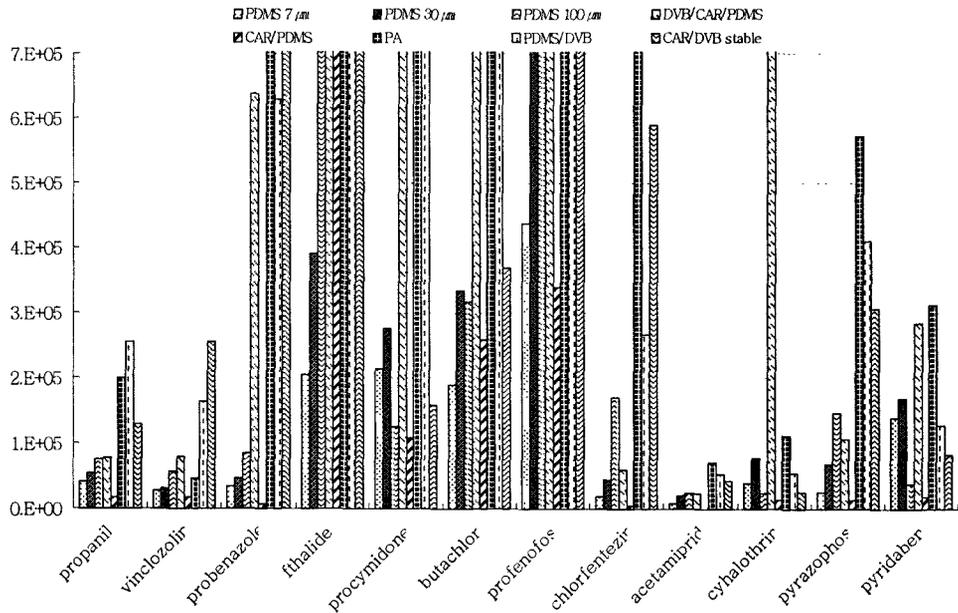


그림 3. Fiber 종류에 따른 흡착량 비교.

#### 5) 추출방법별 흡착량 실험

Shaking, stirring, vibration 등 3종류의 추출방법을 사용하여 추출량을 비교실험 하였다. Shaking은 stirring bar를 넣고 300 rpm에서 10분간, stirring은 800 rpm에서 10분간, vibration은 Varian 8200 autosampler를 사용하여 10분간 각각 추출량을 비교하였다 (그림 4).

시료량 10 ml로 stirring 하였는데 약간의 기포가 발생하여 fiber에 부착됨으로써 fiber와의 분배계수가 큰 성분의 경우는 흡착량이 감소하는 것으로 나타났다. Manual 일 경우 shaking 방법을 사용하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단되었다. 그러나, autosampler를 사용하여야 했으므로 현재 구비된 Varian사에서 보급한 vibration 방법으로 실험하였다. Shaking과 vibration을 비교하였을 때 shaking에서 dichlobenil을 제외한 ethalfluralin, flufenoxuron, propanil, vinclozolin, probenazole, linuron, fthalide, fipronil, procymidone, endosulfan, butachlor, profenofos 등의 흡착량이 증가하는 것으로 나타났다(그림 5). Oxadiazon, chlofentezin, acetamiprid, bromopropylate, fenpropathrin, tetradifon, cyhalothrin, pyrifidaben, cypermethrin, esfenvalerate, deltamethrin 등 profenofos 이후에 검출되는 비극성 농약들은 profenofos와 같이 vibration에 의해 흡착량이 증가하는 것으로 나타났다.

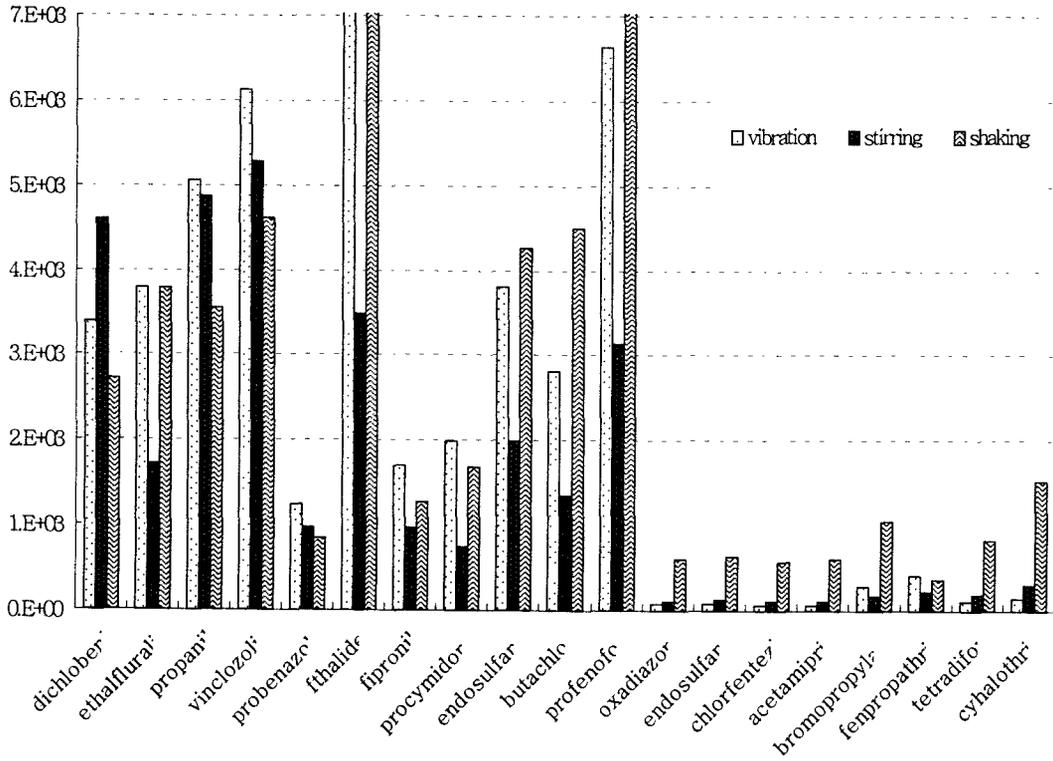


그림 4. 추출방법에 따른 추출량 비교.

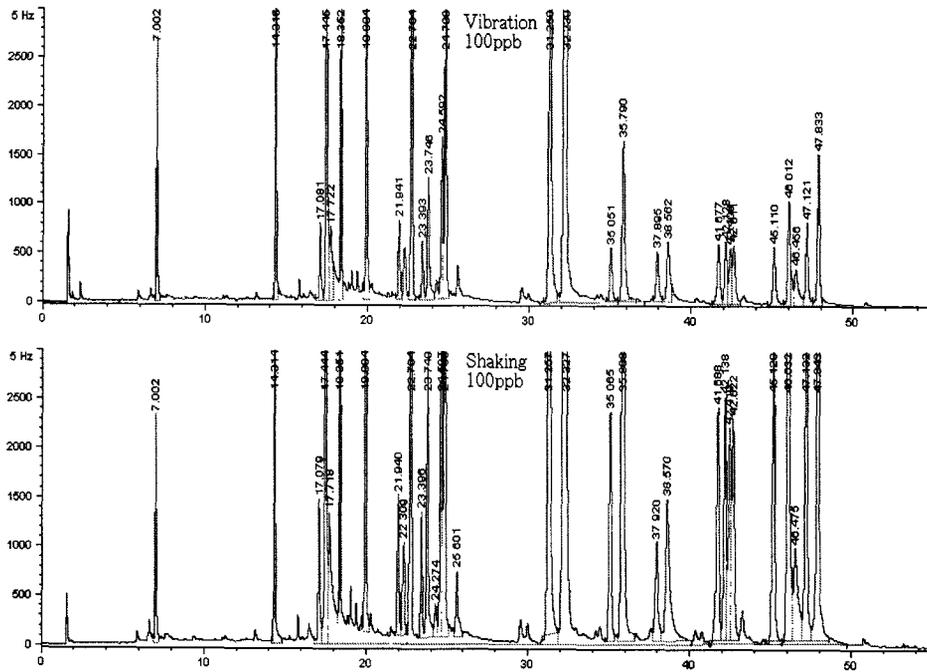


그림 5. ECD2 group에서의 추출방법에 의한 chromatogram (vibration (상)과 shaking (하)).

### 6) pH별 흡착량 실험

pH 2에서부터 pH 12까지 E2 표준물질을 사용하여 100 ppb 수준으로 조제하여 흡착량을 비교실험 하였다. 그림 6과 같이 증류수 처리구를 대조구로 하여 실험하였을 때 buffer의 첨가에 의하여 대조구와 흡착량 차이는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나 propanil, vinclozolin은 pH 8에서 가장 흡착량이 크게 나타났으며 fthalide와 endosulfan은 pH 7 이상에서는 급격히 흡착량이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 실험을 보다 간단하게 하기 위하여 증류수를 사용하기로 하였다. 이러한 pH에 의한 흡착량의 변화는 시료의 종류에 따른 회수율의 차이를 나타내는 한 요소로 판단되었다. 유기산이 많은 과일 등에서 정량실험할 경우 반드시 검토해야 할 항목이다.

따라서 SPME는 전 품목에 정량분석법을 정립하는 것은 어려운 것으로 판단되며, 일반적인 10  $\mu$ m 직접주입 방법보다 5~10배 정도 검출한계가 낮아 screening 분석방법으로는 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

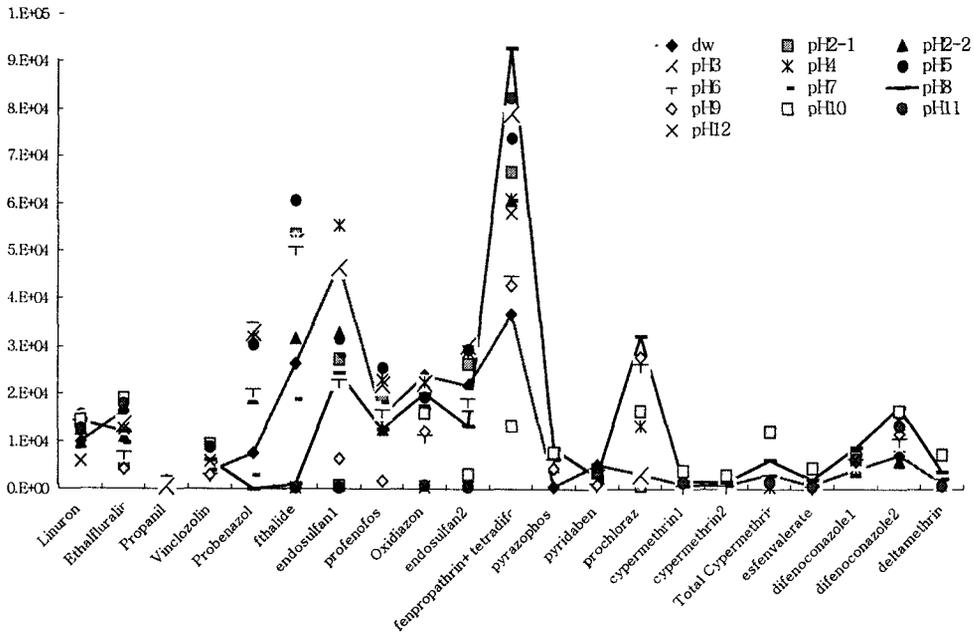


그림 6. pH별 추출량 비교.

### 7) Salt의 종류 및 농도별 실험

증류수에다 sodium chloride 0, 5, 10, 20% 및 포화농도 (37%)와 sodium sulfate를 0, 5, 10, 20% 수준으로 용해시킨 다음 농도별 흡착량을 비교실험 하였다. 20% 이상 염이 들어있을 경우 흡착량은 오히려 감소하였으며, 전체적으로 5% NaCl 처리구가 가장 흡착량이 많았으나 NaCl 무처리구에서 흡착량이 많은 성분도 있으므로 시약의 소모량을 줄이고 처리시간을 단축하기 위하여 NaCl를 처리하지 않는 무처리 방법을 선택하였다 (그림 7).

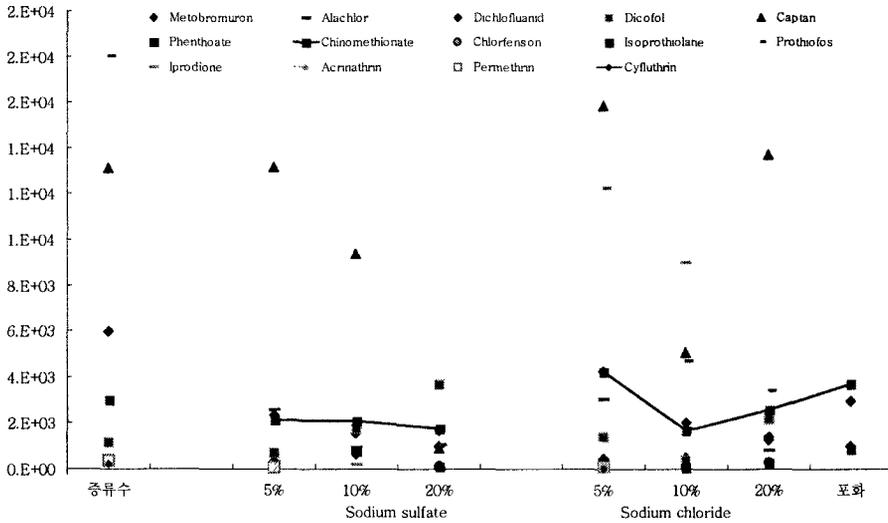


그림 7. 염처리에 의한 흡착량의 변화.

#### 8) 시료 용기의 크기와 시료량

1 ml와 3 ml 시료량의 경우는 fiber가 충분히 담기지 않아 추출량이 적으며 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나, 1.5 ml · 2 ml와 5 ml · 10 ml 시료구에서는 부피에 의한 흡착량이 차이가 나타났다.

1.5 ml와 5 ml가 각각 2 ml와 10 ml 보다 흡착량이 많은 것은 stirring 단계에서 적용한 800 rpm으로 2 ml와 10 ml에 일률적으로 사용할 경우 충분한 agitation이 되지 않아서 fiber와 시료액상과의 경계가 제거되지 않고 공기막이 존재하여 fiber에 농약성분이 흡착되는 접촉면적이 감소되고 따라서 흡착량이 줄어드는 것으로 판단되었다 (그림 8). 그러므로, stirring이 충분하지 않으면 vibration보다 오히려 흡착량이 감소될 우려가 있다. Pawliszyn 등의 실험에 의하면 시료액량이 많을수록 흡착되는 양이 많아지므로 10 ml vial을 사용하는 것이 2 ml 크기를 사용하는 것보다 감도면에서는 유리할 것으로 예상되나, 전처리과정에서 농축을 해야 하는 경우와 분석시료수가 많은 경우에는 시간이 많이 소요되고 자동주입기에 장착할 수 있는 시료수가 적으므로 2 ml vial에 1.5 ml 시료량을 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다.

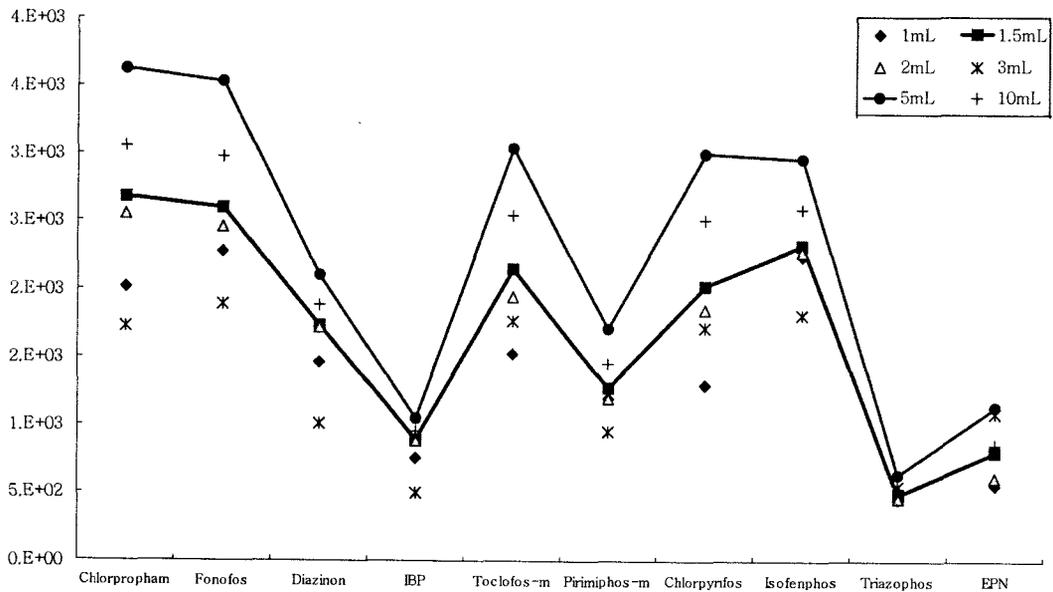


그림 8. 시료량에 의한 흡착량의 변화.

#### 9) 추출용매별 흡착량 실험

Acetone, acetonitrile, methanol이 0, 20, 30, 50, 75, 100%로 구성된 액에 NPD1 및 NPD2 group을 처리하여 100 ppb 수준으로 조제하고 Varian autosampler를 이용하여 30분간 흡착, 35분간 탈착하여 흡착량을 비교하였으며 이 때 1.5 ml의 시료량을 적용하였다 (그림 9).

10% 처리구에서는 acetone과 acetonitrile에서의 성분의 추출양상이 비슷하였으며 methanol의 흡착량이 가장 높은 것으로 나타났다. 실제시료에서의 검출한계를 적용하기 위해서는 희석배수를 줄이고 계산하기 편리해야 하므로 20% 처리구를 선정하였고 이 때 acetone 처리구의 경우 10% acetone 처리구에 비해 크게 흡착량이 감소하지 않았으므로 20% 처리구를 선택하였다.

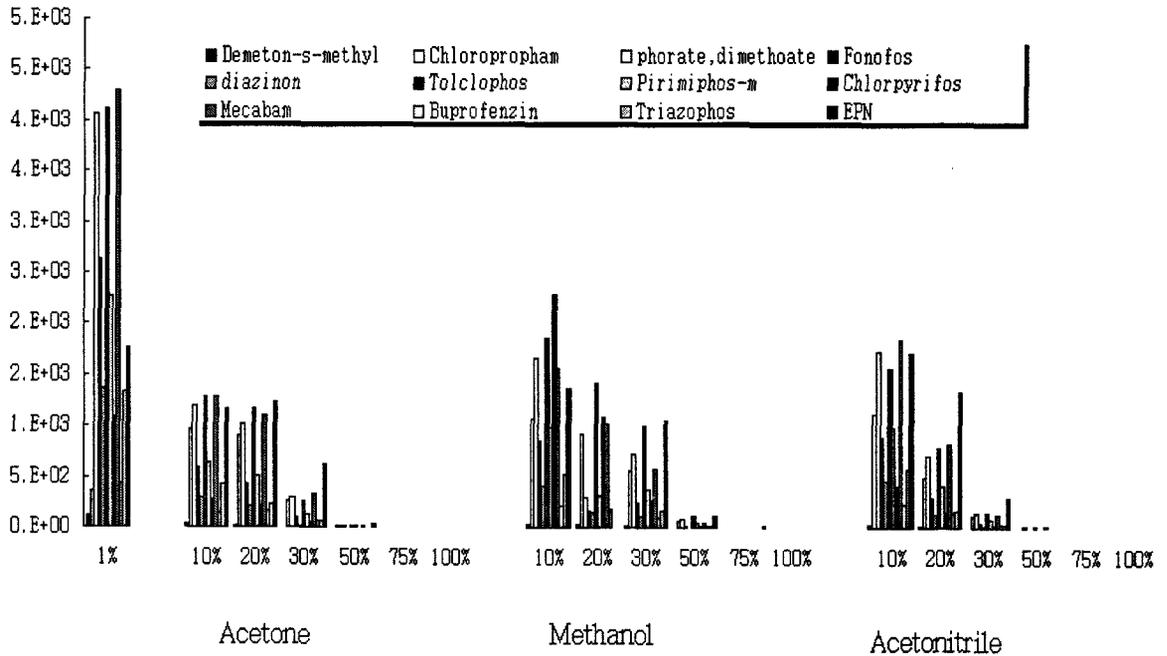


그림 9. 용매의 종류 및 비율별 추출량의 변화.

10) 추출온도별 흡착량 비교

20, 30, 40, 60, 80℃로 시료 vial의 온도를 변화시키면서 흡착율을 비교실험 하였을 때, 추출량은 40℃에서 가장 많은 것으로 나타났고, 60℃와 80℃의 경우는 오히려 추출량이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 semi-volatile 성분이 휘발되어 headspace로 이동하였다기 보다는 8항에서 언급된 기포의 형성량이 증가하여 fiber의 접촉면을 감소시켜 흡착량이 감소하는 것으로 판단되었다 (그림 10).

GC의 SPME autosampler (Varian 8200)에서는 가온이 되지 않기 때문에 injector 온도를 250℃로 두었을 때 vial 온도는 35℃ 정도가 되어서 추출량은 적합할 것으로 판단되었다. Direct injection 10 μl와 비교하였을 때 최소 10배에서 최고 100배 정도까지 흡착이 되어 검출한계를 낮출 수 있었다.

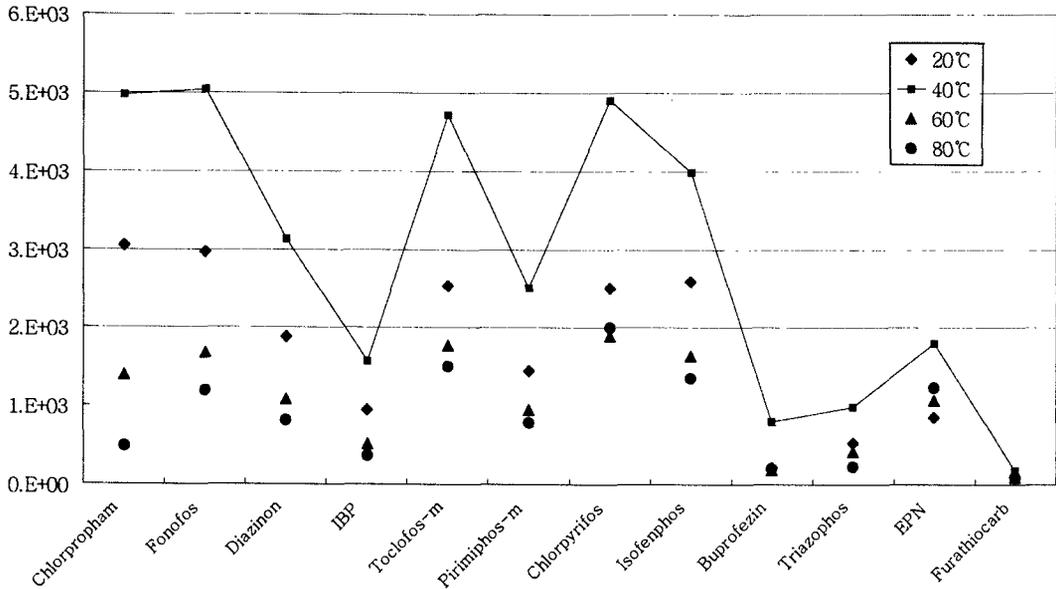


그림 10. 추출에 미치는 온도의 영향.

### 3. GC에 의한 공시농약, 공시농산물별 분석방법의 정립

#### 가. 실험방법

##### 1) 품목별 회수율 실험

##### 가) 표준물질 선별 및 조제

1차년도에서 흡착효율이 높았던 20% acetone 처리구를 만들기 위하여 acetone으로 stock solution을 조제하였다. 전체 78성분의 standard를 검출기 효율과 출현시간에 따라 4개군으로 분류하였으며, ECD용 표준물질은 5 ppm 수준으로, NPD용 표준물질은 10 ppm 수준으로 조제하였다.

##### 나) 품목 선정 (36종)

고수분, 저수분, 고당류, 가공식품 36품목을 선정하여 실험하고자 하였다. 수분과

당분 함량을 기준으로 국내에서 생산되는 농산물에서 주요 부적합 빈도가 높은 품목을 위주로 선정하였다.

#### 다) SPME 실험방법

시료 25g을 칭량하여 대조구, ECD1 처리, ECD2 처리, NPD1 처리, NPD2 처리로 나누어 각각의 처리구에 100 µl 표준물질을 처리하였다. 실온에서 30분이 경과한 다음 acetonitrile 50 ml를 추가하여 5,000 rpm에서 3분간 blending 하였다. Sodium chloride 20g을 넣어 3분간 shaking하고 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 주스류는 각각의 표준물질을 처리하여 shaker에서 3분간 진탕하여 원심분리 하였다. 인삼, 콩과 같이 sodium chloride를 넣어 blending 하면 층분리가 일어나지 않는 품목은 blending 후 원심분리 하여 상층부 30 ml를 50 ml 원심분리용 시험관에 담고 sodium chloride 5g을 가하여 1분간 혼합하고 앞서의 조건에서 원심분리 하였다. 상층부로 이동된 acetonitrile 층 3 ml를 유리시험관에 옮겨 담고 시험관 건조기 (turbo vap)에서 휘발시켰다. 수욕조의 온도는 40°C, 휘발시간은 35분으로 고정하였다. 완전히 건조된 잔류물에 acetone 300 µl를 추가하여 시험관에 혼합하고 다시 증류수 1,200 µl를 추가하여 재혼합하고 2 ml vial에 담아 기기분석 하였다.

#### 2) 기존 신속 전처리방법과의 비교

가) 기존의 전처리방법은 다음과 같다. 즉 시료 40g을 acetonitrile 100 ml로 추출하여 NaCl 15g을 가하여 혼합하고 3,000 rpm에서 원심분리한 후 40 ml를 취하여 회전농축기에서 감압농축하고 NH<sub>2</sub> (Ig, Varian) cartridge로 20% acetone/hexane 5 ml로 용출한 액 10 ml를 turbovap에서 휘발하여 acetone으로 녹여 기기주입 하였다.

나) 인삼시료를 이용하여, 1)항의 SPME 전처리방법과의 비교를 행하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 품목별 회수율 실험

가) 표준물질 선정 (농약 65종): 4종 group (표 2)

- (1) ECD1: Ethoprophos, trifluralin, terbufos, alachlor, dichlofluanid, dicofol  
chinomethionate, triflumizole, isoprothiolane, prothiofos, oxifluorfen,  
chlorfenapyr, nuarimol, iprodione, bifenox, bifenthrin, fenarimol, acrinathrin,  
permethrin, cyfluthrin, flucythrinate, fenvalerate, fluvalinate, tralomethrin  
(24)
- (2) ECD2: Dichlobenil, ethalfluralin, flufenoxuron, propanil, vinclozolin,  
probenazole, linuron, fthalide, fipronil, procymidone, endosulfan, butachlor,  
profenofos, oxadiazon, chlofentezin, acetamiprid, bromopropylate,  
fenpropathrin, tetradifon, cyhalothrin, pyridaben, cypermethrin, esfenvalerate,  
deltamethrin (24)
- (3) NPD1: Phorate, fonofos, diazinon, tolclofos-m, pirimiphos-m, chlorpyrifos,  
pendimethalin, triazophos, EPN (9)
- (4) NPD2: Chlorpyrifos-m, fenitrothion, thiobencarb, fenthion, penconazole,  
edifenphos, phosalone, amitraz (8)

나) 품목 선정 (36종)

- (1) 고수분: 들깨잎, 무청, 배추, 양배추, 상추, 삼엽채, 셀러리, 시금치, 신립초,  
청경채
- (2) 저수분: 감, 고사리, 밀, 밤, 버섯, 쌀, 애호박, 인삼, 콩, 팥
- (3) 고당분: 딸기, 배, 복숭아, 사과, 오렌지, 자두, 참외, 키위, 파인애플, 포도
- (4) 가공식품: 매실주스, 사과주스, 오렌지주스, 토마토주스, 포도주스, 야채주스

다) 4개 표준물질 group별 회수율 결과

최소검출한계를 조사하기 위하여 0.01 ppm (10 ppb) 수준으로 조제하여 S/N > 10 이상 나타나는 성분에 대하여 조사하였다. Dichlobenil, ethalfluralin, flufenoxuron, propanil, vinclozolin, probenazole, fthalide, fipronil, procymidone, endosulfan, chlofentezin, acetamiprid, fenpropathrin, tetradifon, cyhalothrin, pyridaben, cypermethrin

(4), esfenvalerate(2), deltamethrin(2), ethoprophos, trifluralin, terbufos, alachlor, dichlofluanid, dicofol, triflumizole, chlorofenson, prothiofos, oxifluorfen, iprodione, bifenthrin, fenarimol, acrinathrin, permethrin(2), cyfluthrin(4), flucythrinate(2), fenvalerate(2), fluvalinate(2), tralomethrin 등 51성분을 ECD에서 검출할 수 있었고, NPD에서는 phorate, fonofos, diazinon, tolclofos-m, chlorpyrifos, pendimethalin, triazophos, EPN, chlorpyrifos-m, fenitrothion, thiobencarb, fenthion, penconazole, edifenphos, phosalone 등 15성분이 검출되었다. NPD에서는 비교적 흡착되는 양이 비슷하여 회수율이 일정하게 나타났으나 ECD에서는 신호값이 증대되어 시료 품목간 회수율의 차이가 심하였다 (그림 11, 12, 13, 14).

ECD1에서는 dichlofluanid, dicofol, chlorofenson, isoprothiolane, oxyfluorfen 등은 회수율이 70~130%에서 분포하였다. Bifenthrin, fenarimol, acrinathrin, permethrin, cyfluthrin, flucythrinate, fenvalerate, fluvalinate, tralomethrin 등은 회수율이 50% 미만으로 나타났으나 품목간 편차는 크지 않았다. 회수율이 높게 나타난 품목은 샐러리, 배추 등이었으며 회수율이 낮게 나타난 품목은 시금치, 무잎이었고 중간정도에 들깻잎, 양배추 등이 분포하였다. ECD2에서는 dichlobenil, flufenoxuron, fthalide, procymidone, endosulfan, acetamaprid, pyridaben 등이 회수율이 70~130% 정도로 분포하였다. Butachlor, profenofos, oxadiazon은 회수율이 150% 정도로 나타났으나 품목간 편차는 적었다. NPD1과 NPD2에서는 샐러리, 양배추, 깻잎 등이 회수율이 높게 분포하였고 배추, 삼엽채가 낮게 나타났다. Phorate, dimethoate, fonofos, diazinon, tolclofos-methyl, primiphos-methyl, pendimethalin, triazophos, thiobencarb, fenthion 등은 회수율이 70~130% 정도에 분포하였고, chlorpyrifos, EPN 등은 50~100% 정도로 분포하였으나 품목간 편차는 일정하게 나타났다. Chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, penconazole, phosalone, edifenphos 등은 회수율이 100% 이상으로 나타났다.

표 2. 4종 표준물질군

ECD 1			ECD 2			NPD 1		
NO	성분명	RT	No	성분명	RT	No	성분명	RT
1	Ethoprophos	14.7	1	Dichlobenil	7	1	Phorate	14.4
2	Trifluralin	16.2	2	Ethalfuralin	14.3	2	Fonofos	16.1
3	Terbufos	17.3	3	Flufenoxuron	15.8	3	Diazinon	16.8
4	Alachlor	19.3	4	Propanil	16.5	4	Toclofos-m	18.3
5	Dichlofluanid	19.9	5	Vinclozolin	17	5	Pirimiphos-m	19.5
6	Dicofol	20.2	6	Probenazole	17.4	6	Chlorpyrifos	20.1
7	Chinomethionate	21.7	7	Linuron	17.9	7	Pendimethalin	21.8
8	Triflumizole	22.4	8	Fthalide	19.9	8	Triazophos	26.4
9	Isoprothiolane	22.8	9	Fipronil	21.3	9	EPN	30.7
10	Prothiofos	23.7	10	procymidone	21.9			
11	Oxifluorfen	24.6	11	Endosulfan	22.7			
12	Chlorfenapyr	25.2	12	Butachlor				
13	Nuarimol	27.8	13	Profenofos	23.7			
14	Iprodione	30.4	14	Oxidiazinon	24.5			
15	Bifenox	31.7	15	Endosulfan	24.8			
16	Bifenthrin	32.2	16	Clofentezin	25.6			
17	Fenarimol	34.4	17	Acetamiprid	32.1			
18	Acrinathin	37.4	18	Bromopropyl	34.4			
19	Permethrin	38	19	Fenpropathrin	35			
20	Permethrin	38.5	20	Tetradifon	35.7			
21	Cyfluthrin 1	40.5	21	Cyhalothrin	37.8			
22	Cyfluthrin 2	40.9	22	Pyridaben	38.5			
23	Cyfluthrin3	41.2	23	Cypermethrin 1	41.6			
24	Cyfluthrin 4	41.4	24	Cypermithrin 2	42.1			
25	Flucynithrinat 1	42.6	25	Cypermithrin 3	42.3			
26	Flucynithrinat 2	43.5	26	Cypermethrin 4	42.5			
27	Fenvalerate 1	45	27	Esfenvalerate 1	45			
28	Fenvalerate 2	45.9	28	Esfenvalerate 1	45.9			
29	Fluvalinate 1	46.5	29	Deltamethrin 1	47			
30	Fluvalinate 2	46.9	30	Deltamethrin 2	47.8			
31	Tralomethrin	47.8						

NPD 2		
No	성분명	RT
1	Chlorpyrifos-m	18.2
2	Fenitrothion	19.1
3	Thiobencarb	19.9
4	Fenthion	20
5	Penconazole	24.4
6	Edifenphos	27
7	Phosalone	32.7
8	Amitraz	35.1

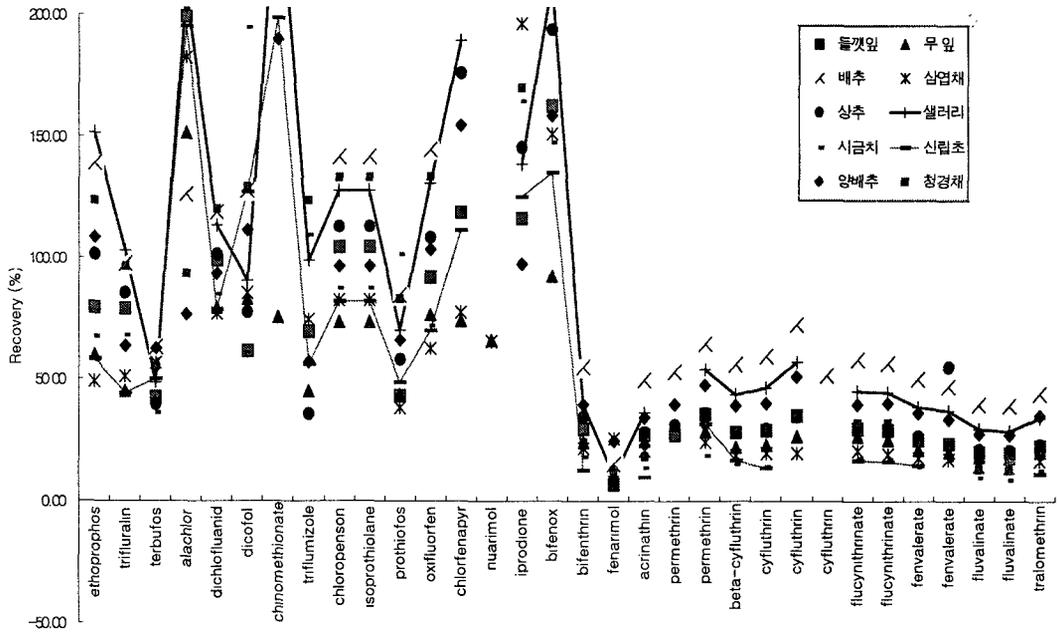


그림 11. ECD1의 회수율.

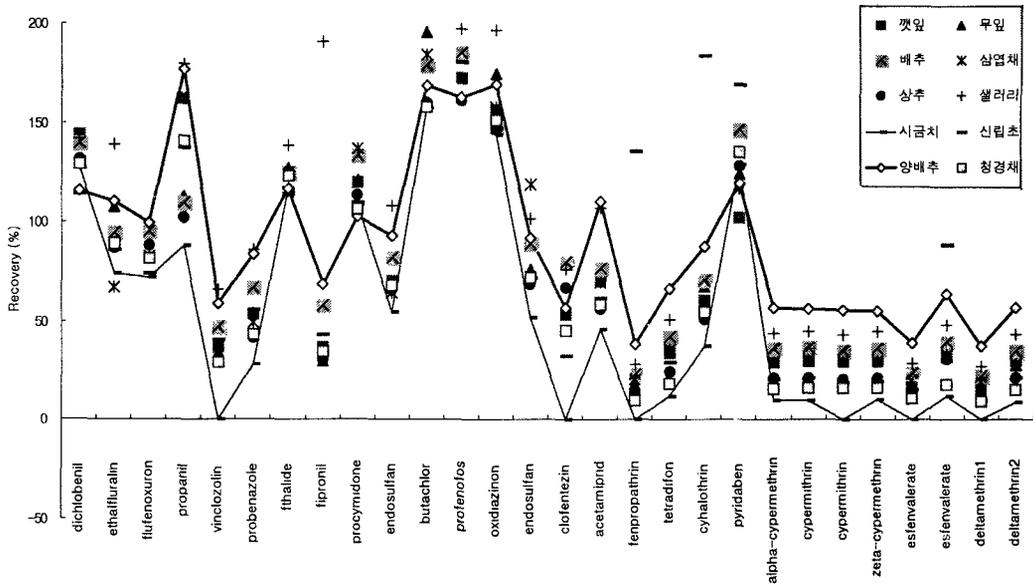


그림 12. ECD2의 회수율.

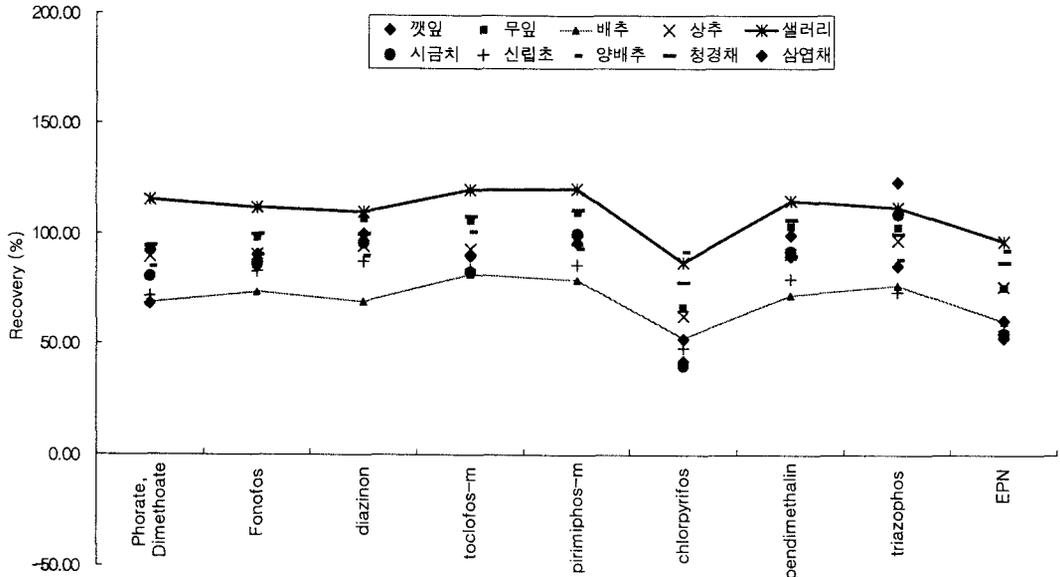


그림 13. NPD1 회수율 (%).

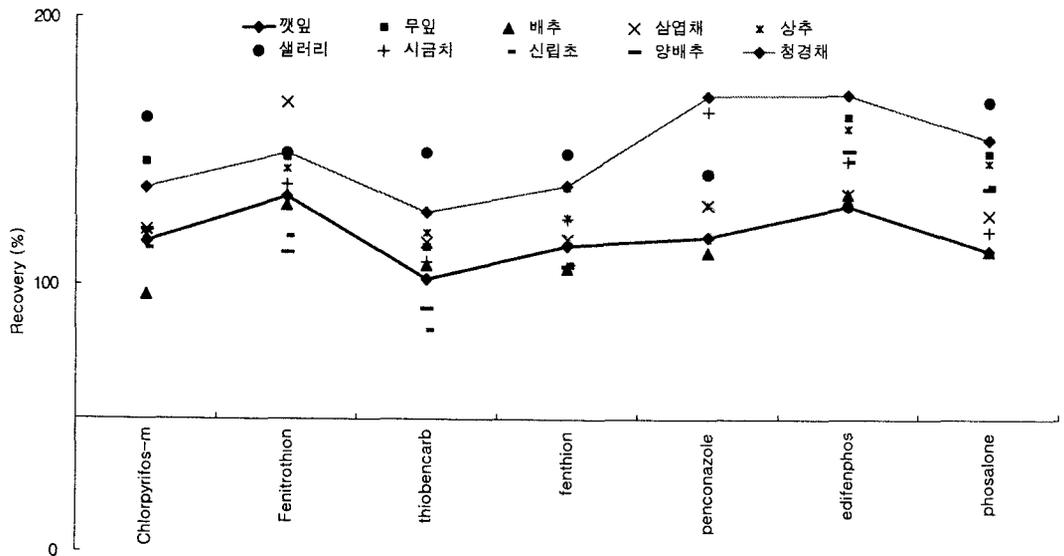


그림 14. NPD2의 회수율 (%).

## 2) 기존의 전처리방법과의 비교

2001년 인삼류에 허용기준이 설정된 농약 중 GC 분석대상성분 (BHC, quintozene, endosulfan, tolclofos-methyl, procymidone, diazinon, DDT)을 이용하여 기존의 분석결과와 비교하였다. 인삼시료는 saponin (ginsenosides) 등과 향 성분 등 SPME 흡착에 영향을 미치는 성분들이 많아 정량분석은 불가능하였다. 그러나 정성분석은 가능하여 tolclofos-methyl, procymidone 등의 정성이 가능하였다 (그림 23 참조).

## 3) SPME 기법에 의한 방해물질의 제거실험

인삼과 한약재를 이용하여 1년차 분석법으로 잔류농약의 추출효율을 조사한 결과, 실험방법의 개선없이 크로마토그램이 분리되지 않았고 fiber 흡착량이 포화되어 회수율의 검정이 어려웠다. Autosampler의 상부온도 (35℃)에서 headspace 추출방법을 사용하였을 때 V.P점이 낮은 성분들, quintozne, BHC, tolclofos-m 등이 검출가능 하였으며, 농산물용 표준물질로 calibration 가능성을 검토한 결과는 아래와 같이 우수한 것으로 나타났다 (표 3). 그러나 시료에 표준물질을 처리하여 실험한 결과, 기체상과 시료상과의 분배계수가 달라 검량선식의 적용이 어려울 뿐만 아니라 회수율이 0~74%로 분포하여 실질적인 활용이 떨어질 것으로 판단되었다.

표 3. Headspace 추출방법에서의 검량선식

성분명	검량선식	상관계수 ( $r^2=$ )	비 고
Dimethoate	$Y=70.482X+147.28$	0.9836	
Terbufos	$Y=248.86X+243.57$	0.9781	
Chlorpyrifos	$Y=70.732X+16.025$	0.9989	
Fenitrothion	$Y=15.755X+1.5875$	0.9963	
Fenthion	$Y=184.37X+126.74$	0.9836	

#### 4) 추출방법 재실험

시료상의 영향을 줄이기 위하여 pH 8, 0.1 M potassium phosphate buffer (potassium phosphate monobasic 0.64 g + potassium phosphate dibasic 13.44g)를 이용하여 pH를 교정한 다음, 1년차 시료 들깨잎, 배추, 상추, 총각무, 청경채를 대상으로 표준물질은 추가하여 증류수와 buffer 액을 가하여 추출실험한 결과 회수율 및 감도가 개선된 것으로 나타났다 (그림 15).

Buffer를 이용한 분석 전처리과정은 표 4와 같다. 소요시간은 1점당 평균 45분이었으며, 25점을 동시에 전처리할 경우 5시간이 소요되어 기존의 분석법보다 생략화되고 신속한 분석이 가능하였다. 또한 유기용매 사용량 측면에서는 acetonitrile 50 ml만을 사용함으로써 보다 경제적이고 환경친화적인 분석법인 것으로 평가되었다.

#### 5) 현행 신속 전처리방법과의 비교

현행 신속 전처리방법과 SPME를 이용한 전처리방법과 비교하였을 때 SPME의 경우 시료에 의한 영향이 커 성분의 회수율이 높게 나타났다. Buffer를 사용하여 품목간의 편차를 줄일 수는 있었지만 분석대상범위가 다양한 농산물에서의 정량분석은 어려운 것으로 판단되었다 (표 4) (그림 15, 16).

표 4. 시료 전처리과정

Step	Treatment	Content
1	Sample 25g	±1%
2	Fortify 0.1 ppm level	ECD: 5 ppm, 500 µl
3	Buffer 50 ml	
4	Acetonitrile 50 ml	
5	Blending	5,000 rpm, 3 min
6	NaCl 20g	Shaking, 1 min
7	Centrifuge	3,000 rpm, 3 min
8	Evaporation	Air, 40°C, 30 min
9	Acetone 300 µl + DW 1,200 µl	Test tube, vortex and Transfer to 2 ml vial

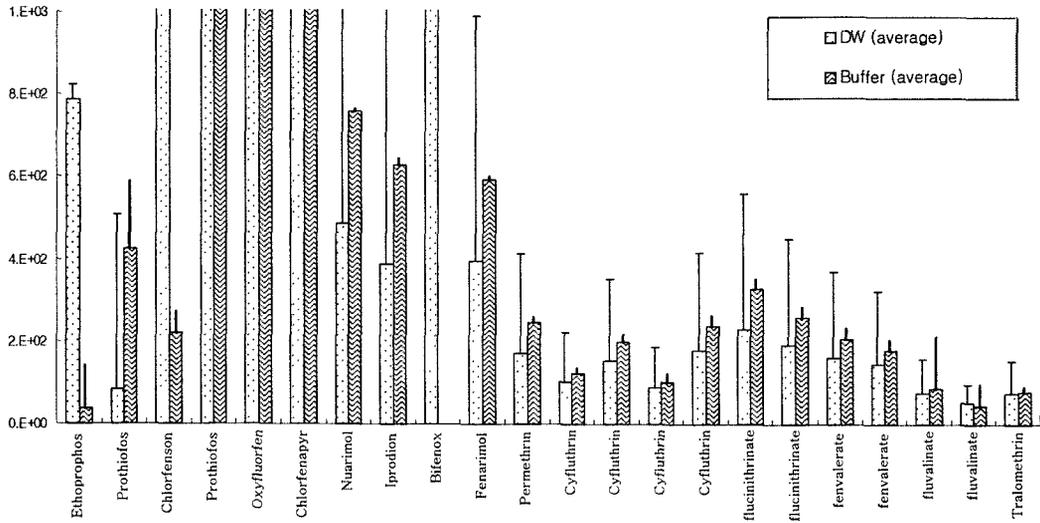


그림 15. 증류수와 완충용액을 이용한 성분별 감도 및 변이율.

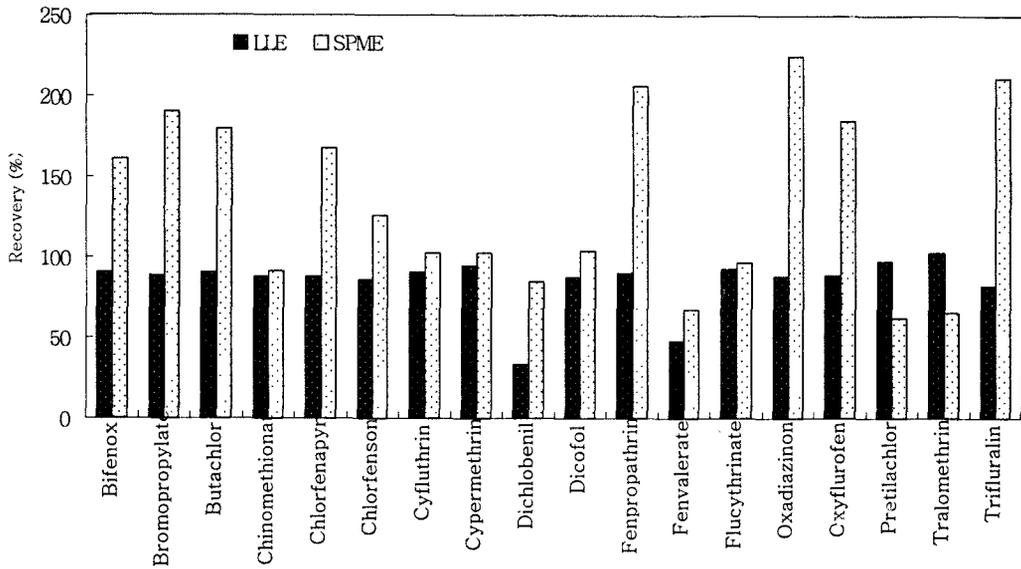


그림 16. 전처리방법의 비교.

6) 품목별 회수율 실험 (chromatogram 생략)

1년차에서 예상되었던 대로 품목간의 편차는 buffer만으로는 제거할 수 없었으며, filter를 이용한 실험에서도 적절한 결과를 얻을 수 없었다. 그러므로 품목간 정량을 위하여 많은 단계나 고가의 시약, 재료를 구입하는 방법을 강구하기에는 시간이 너무 소요되고 비합리적이라고 판단되었다. 본 실험에서는 internal standard 방법을 변형하여 활용하였다. 표준물질 중에서 중간의 RT 값을 갖는 표준물질 diazinon의 signal (height)을 분모로 하여 각 성분의 signal을 나누어 50을 곱하여 signal을 processing하여 그 합계를 품목간 비교하였다 (그림 17, 18). 아래의 그림과 같이 단순히 signal 값으로 정량을 하면 Y-union이 장착된 기기의 경우는 기기안정성 (flow, split ratio 등)이 떨어지고 NPD의 경우는 bead의 활성이 일정하지 않으며 autosampler를 사용한 분석에서는 매번 fiber의 상태를 점검할 수 없기 때문에 정량을 하기 어려웠다. 그러나 fiber에 부착되는 성분들의 분배계수는 어느 정도 비슷하기 때문에 앞서와 같은 방법으로 적합한 internal standard를 추가하여 분석하면 어느 정도 잔류추세와 기기의 안정성을 점검할 수 있기 때문에 정밀도 높은 분석이 가능하였다.

Raw data의 성분별 signal response의 품목간 변이율은 51.74~76.50%이었으나 processing한 경우 21.00~78.81%로 다소 개선되었다. 이는 SPME가 단일 반복품목이나 유기, 무농약 환경농산물에서의 정성분석에 활용하는 것이 효율적인 것을 나타낸다.

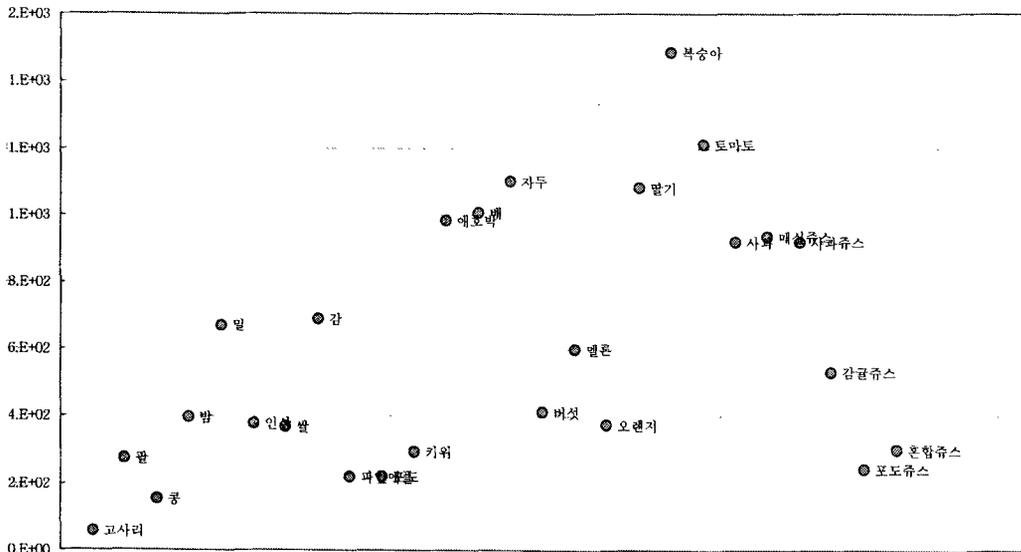


그림 17. 품목별 신호값의 분포 (보정 전).

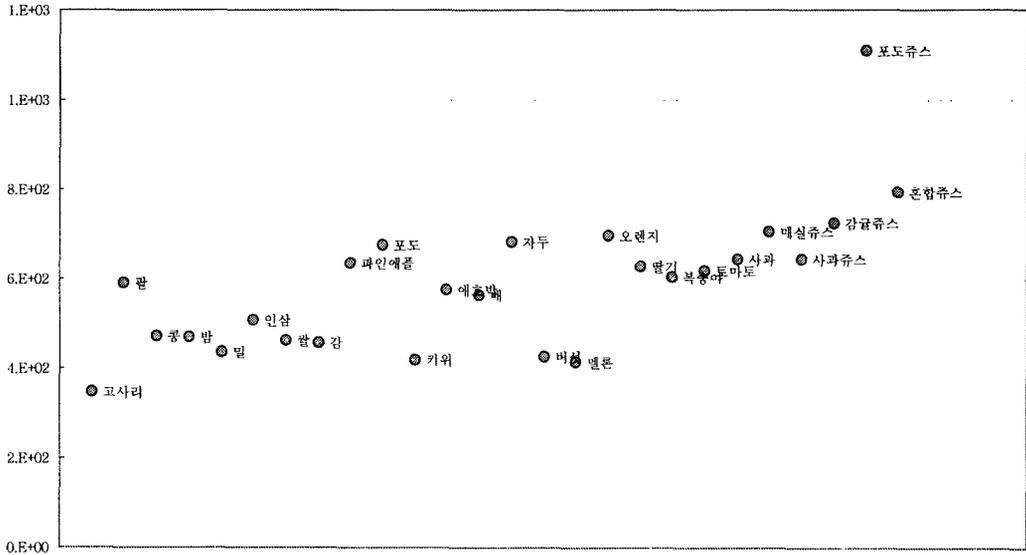


그림 18. 품목별 신호값의 분포 (diazinon 신호값 보정 후).

건조품의 경우는 추출단계에서 시료에 강하게 흡착되어 추출량이 적은 것으로 판단되므로, acetonitrile로 추출한 다음 buffer와 NaCl을 가하여 충분히 하여야 할 것이다. 또한 단계를 줄이기 위하여 NaCl을 가하여 균질화 하였는데, 과실류의 경우는 큰 차이가 없었으나 콩이나 인삼의 경우는 NaCl을 시료 균질화 단계에서 넣게 되면 유밀화되어 원심분리 하여도 충분히 되지 않는데, 이 경우는 앞에서 언급한 바와 같이 용매로 먼저 추출한 후 용매층을 분획하여 NaCl을 가하여 충분히 분리하면 쉽게 진행할 수 있다. 쌀이나 콩, 고사리와 같은 건조식품은 수분을 가하여 불린 후 분석하게 되어 있는데 NaCl로 포화시키기 위해서는 일반 신선채소류 (15g)보다는 충분한 양 (20g)을 넣어야 한다. 그렇지 않으면 휘발시키고 나서 물이 남는 경우가 생기므로 흡착량에 많은 영향을 준다. 포도주스의 경우는 당이 많이 존재하여 각 성분의 분배에 영향을 준 것으로 판단된다. 그림 19는 식품성분표 (농촌생활연구소, 1996)를 근거로 수분과 당 함량과의 회수율을 검토한 것이다. 과실류의 당 함량은 9~15% 사이로서 흡착량에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타나 다른 요인을 찾아야 할 것으로 판단되었다.

농약계열별 실험에서는 유기인계, 유기염소계의 회수율이 품목간 편차가 적은 것으로 나타났으며 다음으로 피레스로이트계와 우레아계 순이었다 (그림 20).

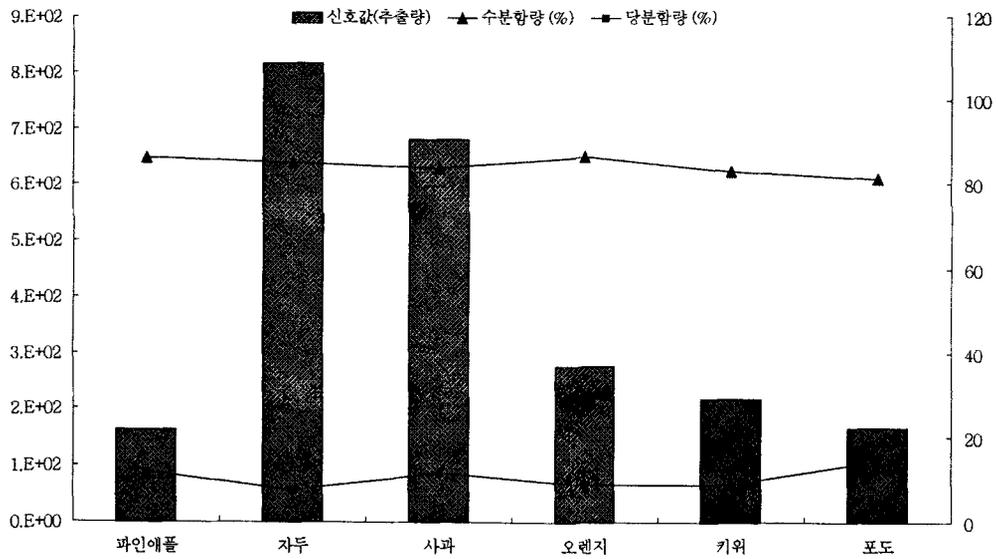


그림 19. 과일류에서 당 및 수분함량과의 검출량과의 상관성.

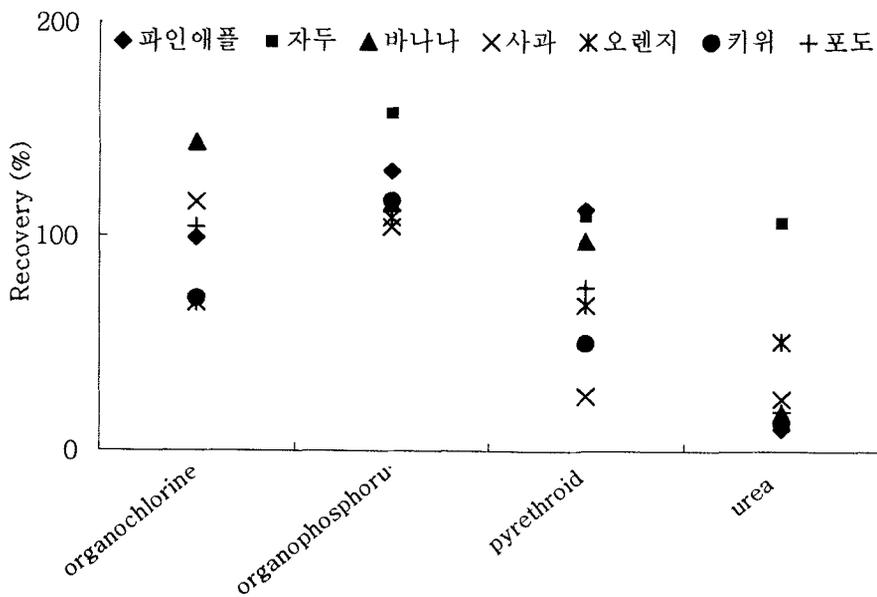


그림 20. 농약계열별 회수율의 변화.

#### 4. HPLC에 의한 공시농약, 공시농산물별 분석방법의 정립

##### 가. 실험방법

###### 1) HPLC에 의한 공시농약 분석방법 정립

주요 검출성분을 위주로 하여 공시농약 50종에 대하여 100 ppm/acetonitrile 저장용 표준용액을 만든 후 2 ppm 수준에서 출현시간과 2종 검출기 (UV, FL)을 이용하여 grouping하고 확인하였다.

###### 2) 공시 농산물별 분석방법 정립

###### 가) 정량 가능성 및 정밀성 검토

SPME를 이용한 정량을 위하여 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 ppm의 표준물질을 조제하여 SPME 추출하고 기기분석하여 3반복에 대한 직선성과 정밀성을 조사하였다.

###### 나) 회수율 및 적용실험

실제 정립된 분석법으로 농산물 54종 (고수분, 저수분, 고유지, 고당, 저수분, 가공식품 등) 에 대한 분석을 행하였다. 실제시료를 분석하여 기존의 분석결과와 비교하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

###### 1) HPLC에 의한 공시농약 분석방법 정립

HPLC thermo separation products 및 Agilent 1100 series를 이용한 분석방법을 정립하였다. Column은 Phenomenex C18 (150 mm × 2 mm, 3 μm)을 사용하였다. 2 ppm 수준으로 methanol로 용해시켜 기기분석하였다. 이동상의 조건과 각 성분별 출현시간은 표 5와 같으며 5개군으로 나누어 검출감도를 조사하였다 (표 6). S/N > 3 이상에서 검출된 파장을 표기하였고 형광검출기에서의 \*값은 형광의 세기를 나타낸다. 유기인계의 chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, phosmet, pyrazophos 등은 230 nm에서 감도가 큰 것으로 나타났다. Carbaryl, carbofuran, benfuracarb 등의 카바메이트계 농약은 post column reaction 장치 없이도 형광검출이 가능하였고 bitertanol, phosalone 등도 검출이 용이하여 HPLC 다성분 분석성분을 대폭 늘릴 수 있었다.

표 5. 기기분석 조건

구 분	내 용		
HPLC	Thermo separation products		
Column	Phenomenex Luna C18 (150 mm × 2 mm, 3 μm)		
Injector	Injection volume 10 μl (direct injection) SPME interface (Supelco), 85 μm polyacrylated fiber		
Detector	UV: 230, 254, 260, 275, 280 nm FL: excitation 286 nm, emission: 316 nm		
	시간 (min)	용매비율	유속 (ml/min)
Mobile phase	0 ~ 5	H <sub>2</sub> O : acetonitrile = 45 : 55	1.0
	5 ~ 10	H <sub>2</sub> O : acetonitrile = 30 : 70	1.3
	10 ~ 25	H <sub>2</sub> O : acetonitrile = 30 : 70	1.3

표 6-1. HPLC 표준물질 group 1

출현시간	성 분 명	검출파장 (nm)	
		UV	FL
8.83	Methomyl	230	*
11.50	Thiophanate-methyl	230 254	
13.06	Nuarimol	230 260 275 254 280	
14.35	Diethofencarb	254	***
15.94	Captan	254	
16.32	Iprodion	254 230 260	
17.71	Alachlor	230	
17.92	Phosalone	230	***
18.35	Isoprocarb	230 254 260 275	
18.75	Furathiocarb	230 275 280	*

표 6-2. HPLC 표준물질 group 2

출현시간	성분명	검출과장	
		UV	FL
9.89	Carbendazim	230	**
10.00	Imidacloprid	275 280 260 254 230	
11.86	Propoxur	230	**
12.00	E-dimethomorph	230 254 260	
12.86	Z-dimethomorph	230 254 260 275 280	
14.29	Azinphos-methyl	230	
14.57	Pyrimethalin	275 280 260 254	
16.88	Vinclozolin	230	
17.89	Teflubenzuron	230 254 260 275 280	
18.26	Dicofol	260 254 275 280 230	

표 6-3. HPLC 표준물질 group 3

출현시간	성분명	검출과장	
		UV	FL
11.47	Thiodicarb	230	*
12.44	Metalaxyl	230	
13.46	Triadimenol	230	*
14.41	Dichlorbenil	230	-
15.72	Diflubenzuron	260 254 230 275 280	*
16.94	Difenoconazole	230	
17.76	Thiobencarb	230 254	
18.47	Lufenuron	230 254 260 275 280	-
19.07	Chlorpyrifos	230	*
19.95	Acrinathrin	230 254 280 260 275	

표 6-4. HPLC 표준물질 group 4

출현시간	성분명	검출파장	
		UV	FL
9.05	Fluoromide	230	
9.96	Folpet	230	
12.29	Carbaryl	254 260 230 275 280	****
12.58	Carboxin	230 260	
14.12	Methiocarb	230	
16.26	Diniconazole	254 260 230 275 280	
17.54	Pyrazophos	254 230 260 280 275	
17.91	Tolclofos-m	230	
18.69	Benfuracarb	230 280 275	**
19.15	Ethion	230	

표 6-5. HPLC 표준물질 group 5

출현시간	성분명	검출파장	
		UV	FL
11.43	DDVP	230	
11.96	Carbofuran	230 280 275	**
12.63	Thiram	230 254 260 275 280	
13.63	Fenarimol	230	
14.30	Phosmet	230	
15.62	Bitertanol	230 254 260	*****
16.64	Tebuconazole	254 260 275 280 230	
17.67	Isofenfos	230 254 260 275	
18.23	Chlorpyrifos-methyl	230 280	
18.87	Flufenoxuron	230 275 280	

2) 공시 농산물별 분석방법 정립

가) 정량 가능성 및 정밀성 검토

SPME를 이용한 정량을 위하여 50종 표준물질 중 검출빈도가 높고 주요 다성분분석법에 포함된 성분 10종 (carbendazim, imidacloprid, thiophanate-methyl, carbofuran, carbaryl, E, Z-dimethomorph, methiocarb, diflubenzuron, teflubenzuron)을 선별하였다. 0.1, 0.5, 1, 2, 10 ppm의 표준물질을 조제하여 SPME 추출하고 기기분석 하여 3반복에 대한 직선성과 정밀성을 조사하였다.

(1) 검출한계 및 정밀성

UV 230 nm에서 측정된 결과, 대부분의 성분들의 검출한계 (LOD, S/N > 3)는 0.05 ppm 수준에서 나타났으나 methomyl은 감도가 낮아 0.3 ppm 정도의 높은 검출한계를 갖는 것으로 나타났다. 따라서 post-column reaction 장치를 사용하여 감도를 높이거나 시료의 농축배수를 늘리는 방법이 검토되었다. 정량한계 (LOQ, S/N > 5)는 methomyl을 제외하고는 대부분 0.1 ppm 정도로 분포하여 일상분석에는 사용될 수 있을 것으로 판단되었다. Imidacloprid는 carbendazim과 거의 분리가 되지 않아 carbendazim으로만 나타내었다 (표 7, 그림 21).

표 7. SPME를 이용한 분석법 감도

성분명	LOD (ppm)		LOQ (ppm)		CV (%)	
	Area	Height	Area	Height	Area	Height
Methomyl	0.09	0.29	0.17	0.42	14.13	18.10
Carbendazim	0.10	0.04	0.18	0.06	12.93	15.91
Thiophanate-m	0.05	0.02	0.10	0.02	9.12	26.31
Carbofuran	0.22	0.07	0.40	0.10	9.84	25.66
Carbaryl	0.07	0.02	0.12	0.04	3.19	20.83
E-dimethomorph	0.20	0.06	0.35	0.09	11.98	23.79
Z-dimethomorph	0.10	0.04	0.19	0.06	6.06	23.30
Methiocarb	0.08	0.04	0.15	0.06	1.68	18.76
Diflubenzuron	0.08	0.04	0.14	0.06	9.20	12.51
Teflubenzuron	0.12	0.04	0.21	0.05	51.53	34.72

(2) SPME를 이용한 직선성은 경기대학교의 실험결과를 참고하였다. 대부분의 성분들이 0.99 이상의 높은 직선성을 나타내었다.

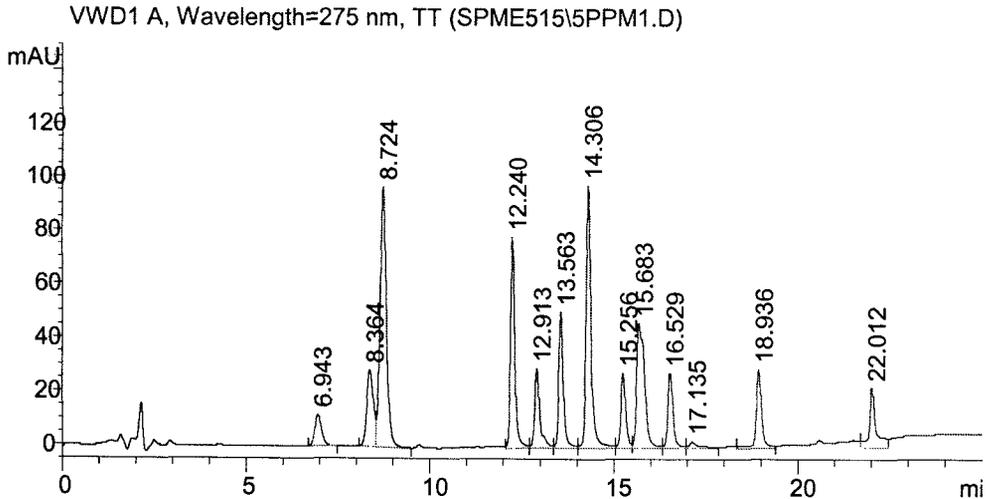


그림 21. 10개 성분의 chromatogram; methomyl (3.943), carbendazim (8.364), imidacloprid (8.724), thiophanate-methyl (12.24), carbofuran (13.563), carbaryl (14.306), E-dimethomorph (15.256), Z-dimethomorph (15.683), methiocarb (16.529), diflubenzuron (18.936), teflubenzuron (22.012).

#### 나) 회수율 실험

Agilent HPLC injection program을 이용하여 고수분 농산물에서는 carbendazim, imidacloprid, thiophanate-methyl, carbofuran, carbaryl, E, Z-dimethomorph, methiocarb, diflubenzuron, teflubenzuron에 대하여 회수율 실험을 하였다.

Carbendazim의 출현시간까지는 시료 중의 극성물질이 많이 유출되어 분석이 어려웠다. 운용가능한 UV 단파장 HPLC를 형광검출기와 병행하여 측정하였다. UV 파장변화는 275 nm에서 10분간 유지시킨 후 230 nm에서 25분 측정하여 methomyl은 분석이 어려웠으나 carbendazim은 형광검출기를 이용하여 분석가능 하였다. 품목별 처리구를 동일한 전처리과정을 거친 표준물질로 정량하였다. 시료성분에 의한 영향이 적은 형광검출기를 이용한 carbaryl, carbendazim, carbofuran의 결과는 SPME에 흡착량을 알 수 있는데 carbaryl과 carbofuran의 회수율은 각각 87~96%와 90~127% 정도로 분포하여 품목간 성분의 흡착량에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 딸기, 배추, 쪽가에

서는 carbendazim이 잔류할 가능성이 있다. 자외선 검출기에 의한 앞서의 3성분 외에 성분들 중 275 nm에서 측정된 imidacloprid에서는 회수율이 어느정도 안정되게 나타났으나 버섯과 쪽감 등에서는 230 nm에서 275 nm로 파장이 변하는 지점에서 성분에 의하여 신호의 바탕선이 달라져 단파장 변화로는 측정이 어려웠다. 버섯에서는 thiophanate-methyl, 배추에서는 dimethomorph가 잔류하는 것으로 추정되었다 (그림 22).

그러므로, 무처리구 시료에서 잔류가능성이 있는 성분들이 있으므로 회수율 실험마다 모든 품목에 대하여 표준물질구, 무처리구 및 처리구를 각각 측정하여 시료구의 회수율은 무처리의 측정값을 처리구에서 빼고 이를 표준물질의 측정값으로 나누어서 얻을 수 있었다.

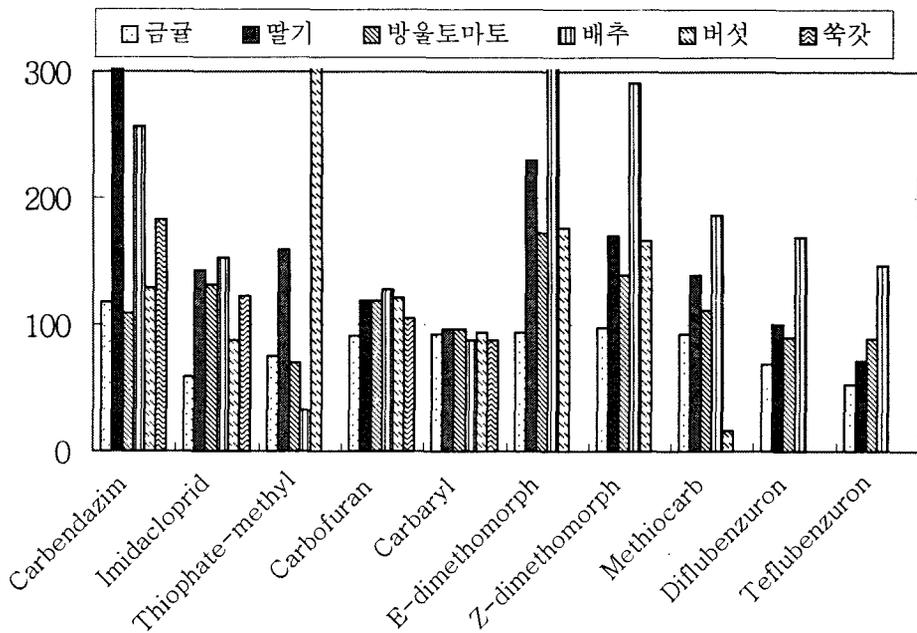


그림 22. 고수분, 저수분, 고당류 6개 품목 농산물에서의 회수율 실험결과.

표 8. 17개 품목의 자외선 검출기를 이용한 회수율

품목명	갓	근대	들깻잎	딸기	미나리	방울 토마토	평균
Carbendazim	132.93	140.33	110.50	128.38	127.82	123.34	127.22±10.01
Imidacloprid	107.10	95.58	69.81	154.83	105.74	131.18	110.71±29.34
Thiophanate-m	31.82	0	29.90	-4.24	0	0	10.29±15.95
Carbofuran	119.78	154.51	132.13	143.58	136.99	143.86	138.48±11.87
Carbaryl	127.76	149.59	117.78	102.79	103.38	101.58	117.15±18.99
E-dimethomorph	83.20	-1.54	77.61	95.89	0	104.03	59.86±47.88
Z-dimethomorph	98.29	92.49	78.13	105.03	0	113.53	81.25±41.56
Methiocarb	112.73	0	91.95	76.60	0	100.60	63.65±50.69
Diflubenzuron	65.02	0	57.02	87.67	0	102.04	51.96±43.31
Teflubenzuron	117.39	172.47	68.24	87.90	0	106.79	92.13±57.25
Carbendazim	133.85	133.85	137.81	125.17	135.71	140.27	134.44±5.17
Imidacloprid	14.52	97.20	142.75	110.27	120.19	136.72	103.61±46.74
Thiophanate-m	0	43.82	22.93	47.89	0	0	19.11±22.58
Carbofuran	140.42	145.42	146.93	135.12	117.10	140.87	137.65±10.90
Carbaryl	124.13	127.14	120.64	106.02	125.38	110.91	119.04±8.60
E-dimethomorph	0	81.53	82.01	85.62	101.43	120.72	78.55±41.33
Z-dimethomorph	0	94.10	75.75	89.49	107.99	119.09	81.07±42.45
Methiocarb	0	112.84	97.60	89.06	87.79	106.16	82.24±41.44
Diflubenzuron	0	87.91	48.07	72.84	66.11	118.29	65.54±39.84
Teflubenzuron	0	141.36	63.72	109.59	0	0	113.69±136.7
Carbendazim	115.94	139.41	20.40	121.01	43.91		88.13±52.50
Imidacloprid	107.40	134.49	0	134.80	77.93		90.92±55.97
Thiophanate-m	80.11	0	29.28	38.77	8.21		31.27±31.44
Carbofuran	144.55	144.24	54.19	132.13	142.09		123.44±39.04
Carbaryl	117.90	121.29	46.06	128.32	151.74		113.06±39.72
E-dimethomorph	67.03	114.52	158.85	36.42	105.85		96.53±46.85
Z-dimethomorph	67.72	120.79	0	103.91	117.56		81.99±50.44
Methiocarb	90.80	114.56	29.67	118.15	140.20		98.68±42.37
Diflubenzuron	54.53	112.44	18.90	90.82	93.55		74.05±37.28
Teflubenzuron	94.21	0	105.50	168.62	60.15		85.70±61.92

품목간 회수율의 변화와 SPME의 흡착량을 조사하기 위해서 carbendazim, carbaryl, carbofuran으로 비교하였다 (표 8). 형광검출기에서는 땅콩, 감귤에서는 정량에서 문제가 있는 것으로 나타나 적용이 어려웠으나 이를 제외한 대부분의 농산물에서는 흡착량에서의 차이가 크게 나타나지 않았다. 따라서 GC 분석결과와 같이 내부표준물질을 추가하여 대략적인 정량은 가능하며 SPME의 검출한계가 낮기 때문에 LC/MSD에 연결하였을 때 효율이 증대될 것으로 기대된다.

### 5. 농산물에서의 SPME-GC/HPLC 전처리방법 정립

여러단계의 실험을 통하여 농산물에 적용할 수 있는 SPME-GC, SPME-HPLC 분석법을 정립하였다 (표 9, 10).

표 9. SPME-GC/SPME-HPLC 분석 전처리법

구 분	소요시간	처리내용	
추 출	5분	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           시료 25g 칭량            아세토니트릴 50 ml 추출         </div>	
정 제	5분	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           상층액 20 ml            pH 8.0 인산버퍼 10 ml            2g NaCl            시험관 (50 ml) 원심분리         </div>	
농 축	20분	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           GC            상층액 3 ml 분획            50°C 20분간 농축         </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           HPLC            상층액 2 ml 분획            50°C 15분간 농축         </div>
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           Acetone 300 µl            증류수 1200 µl            시험관 혼합하여            vial 담기         </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           Acetonitrile 200 µl            버퍼 800 µl            시험관 혼합하여            vial 담기         </div>
회 석	5분	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           Acetone 300 µl            증류수 1200 µl            시험관 혼합하여            vial 담기         </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           Acetonitrile 200 µl            버퍼 800 µl            시험관 혼합하여            vial 담기         </div>
기기주입	60분	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">           PA fiber SPME 후 기기주입         </div>	

표 10. 형광검출기를 이용한 35개 품목별 회수율

품목명	Carbendazim	Carbaryl	Carbofuran
감 자	148.32±16.52	102.34±18.10	104.11±11.49
검은콩	116.07±15.53	98.00± 8.90	109.07± 5.82
겨자잎	86.49±12.88	95.24± 5.82	84.34±12.48
밀 감	184.84±17.10	203.49±25.52	75.238± 3.84
파리고추	86.49±12.88	95.25± 5.82	84.34±12.48
당 근	93.92± 9.51	91.91±10.63	101.24± 3.22
돌나물	130.36± 1.15	95.30± 7.39	97.08± 3.23
땅 콩	439.49±64.33	1112.9±90.97	161.07±11.47
머 위	112.45± 7.50	86.52± 5.06	97.05± 0.90
멜 론	122.76± 7.77	94.10± 8.83	106.47± 1.06
무	124.78±11.03	106.92± 7.28	108.21± 1.91
배 추	95.84±10.03	116.91± 2.96	11.31± 0.54
복숭아	259.10± 0.57	99.72±12.65	89.58±29.82
사 과	119.42±12.88	110.55± 9.28	107.60± 1.96
상 추	114.55±14.17	98.70± 5.34	107.21± 2.17
수 박	110.21± 4.68	105.43± 6.11	91.00±17.10
순 무	86.48±12.88	95.24± 5.81	84.33±12.48
신선초	133.03±15.02	84.80±16.71	103.66±12.66
현 미	118.40±20.89	99.59± 4.15	95.24± 5.19
애호박	95.84±10.47	116.91± 2.53	111.31± 0.49
양 파	75.35±12.37	129.68± 7.57	98.36±15.54
열 무	95.83±10.47	116.91± 2.53	111.31± 0.49
오렌지쥬스	126.76±17.00	96.06±12.85	120.38± 3.92
참나물	110.56± 4.71	66.14± 7.71	78.07± 0.60
취나물	114.17± 3.02	81.35± 8.63	87.49± 0.28
치커리	95.84±10.47	116.91± 2.53	111.31± 0.49
콩나물	117.88± 6.61	105.42± 7.04	112.60± 1.98
키위1	117.88± 6.61	105.42± 7.04	112.60± 1.97
키위2	77.77±12.09	105.33± 8.01	112.61±17.68
토마토	120.90±12.88	92.86± 5.82	91.08±12.48
토마토쥬스	91.62± 8.13	88.02±11.19	106.95± 3.16
파인애플	82.86± 7.87	132.14± 5.36	100.45± 9.88
팔	112.56± 5.50	163.47± 9.74	118.55± 3.29
포 도	89.02±11.47	113.34± 6.59	94.20±11.76
포도쥬스	125.18± 8.27	89.85± 8.89	125.62± 4.52

## 6. 농산물 중 잔류농약 분석에의 SPME 적용

### 가. 적용실험

#### 1) 학술논문발표

3년간 국내외 학술발표를 통하여 농산물에서의 적용가능성에 대한 많은 관심을 얻었다 (제26회 한국분석과학회 춘계학술대회, 2001년; 4th European Pesticide Residues Workshop, 2002 등 6편)

#### 2) SPME-GC 적용실험

농산물 품목 중에서도 성분이 복잡한 인삼에서 실험하였을 때, NPD에서 tolcolfos-methyl이 검출되어 기존의 분석결과와 유사하였다 (그림 23). 정량은 시료 (건삼·수삼, 채취부위 등)에 따라 편차가 있어 적용할 수 없었으나 검출여부 확인은 가능하였다.

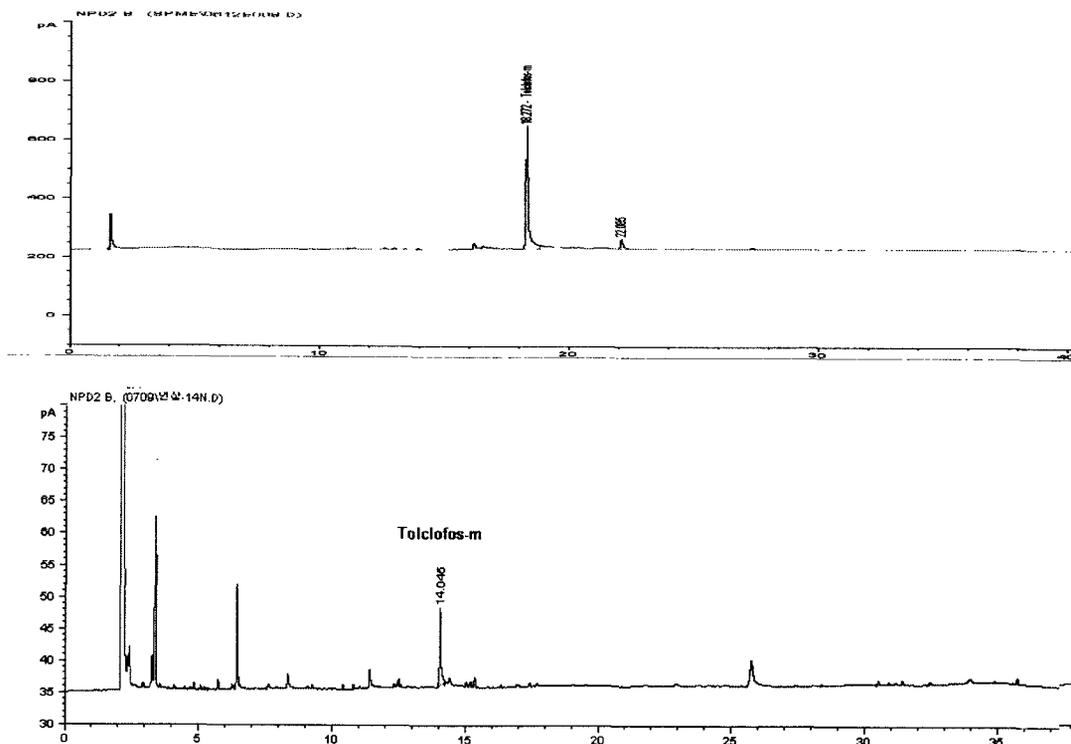


그림 23. 인삼시료에서 tolcolfos-methyl 검출 (위: SPME, 아래: 기존분석법).

### 3) SPME-HPLC 적용실험

시료로 사용된 돌나물에서 carbendazim이 검출되었다. 표준물질도 시료와 같은 전처리과정을 거친 것을 사용하였으며 무처리구의 신호값을 표준물질 처리구의 신호값에서 뺀 후 표준물질의 신호값을 나누어 퍼센트 계산하여 검출치를 구하였다. 2 ppm 수준의 표준물질을 사용하여 정량하였을 때 1.78 ppm으로 계산되어 기존분석법에 의한 1.72 ppm과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (그림 24).

#### 나. 연구결과 요약

##### 1) 생력적이고 환경친화적인 신속 잔류농약 분석법

유기용매의 사용량이 GC와 HPLC 포함하여 40.5 ml로 기존의 200~600 ml보다 대폭 감소되어 인체에 보다 안전하고 환경친화적 방법이 될 수 있었다. 1회 사용하고 폐기되던 고체상추출 (SPE) cartridge의 사용을 하지 않고 50회 이상 반복사용이 가능한 SPME fiber를 이용함으로써 전처리 분석비용 또한 대폭 감소시킬 수 있었다. 분석에 소요되는 시간은 기존 6~8시간에서 2시간으로 단축할 수 있어 생력적이고 경제적인 분석법으로 판단되었다.

##### 2) 검출한계가 낮은 감도 좋은 분석법

SPME를 농산물에서의 전처리방법으로 활용하였을 때 시료별 구성성분의 차이가 있어 정량이 어려운 단점이 있었다. 그러나 이는 환경농산물 등에서 정성분석에 활용하거나 내부표준물질을 추가하여 정량하는 방법과 직불제 농산물이나 대규모 단일작물 경작지에서 품목별 안전성 분석에 활용하면 효율적으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

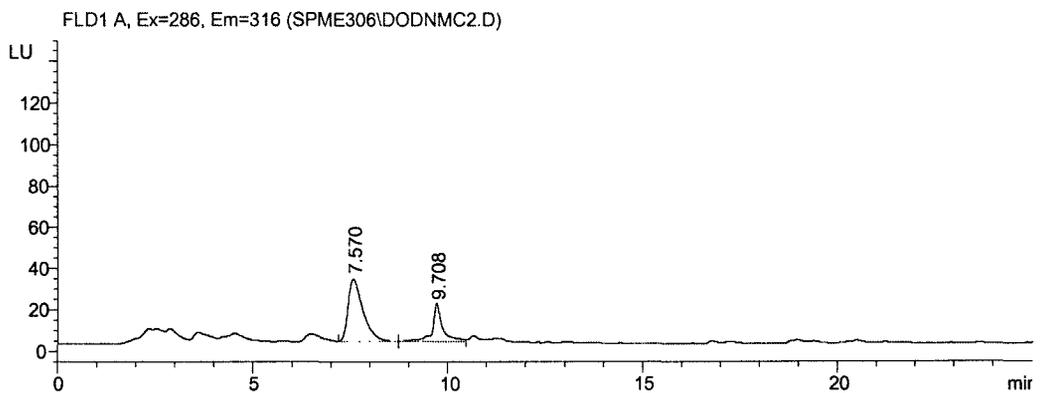
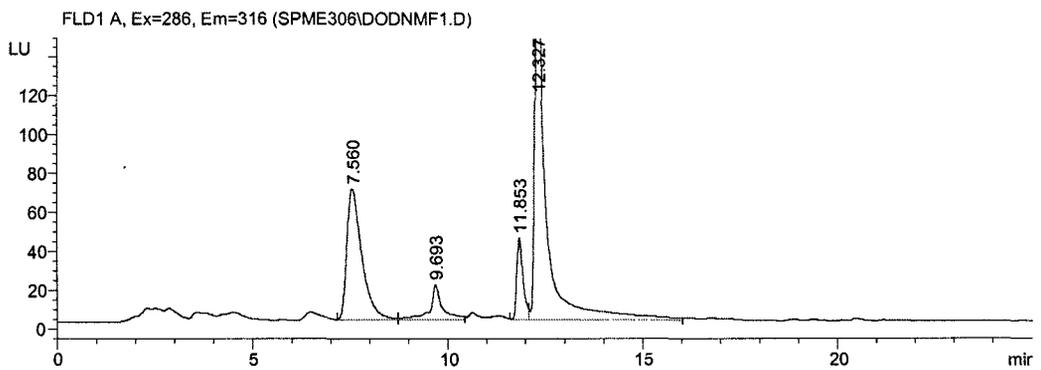
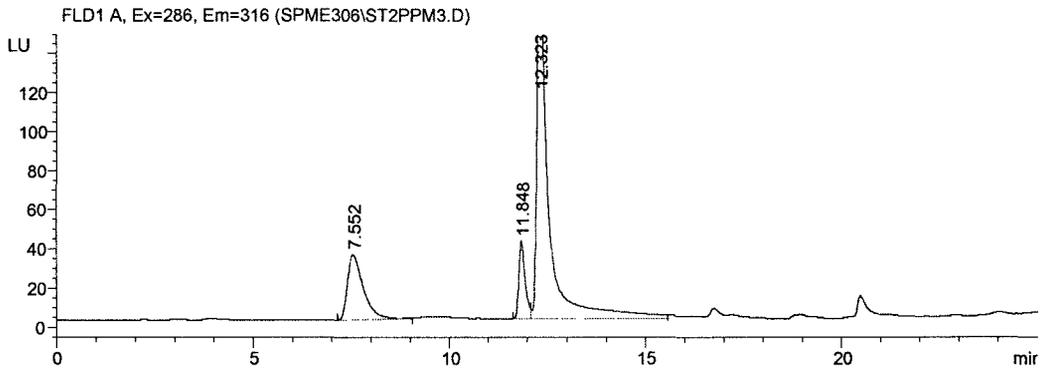


그림 24. 돌나물에서의 적용실험; 표준물질 (2 ppm)의 형광검출기 크로마토그램 (상), 표준물질을 첨가한 돌나물에서의 크로마토그램 (중), 무처리구 돌나물의 크로마토그램 (하).

## II. Solid Phase Microextraction 방법을 이용한 신속분석법 개발 (위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 경기대학교 조 현 우

### 1. 서 설

농산물의 안정성에 대한 국민의 관심과 욕구 증대에 따른 농약분석 업무와 검사물량이 대폭 확대되고 있으나, 이러한 추세에 부응하기 위해 수반되는 새로운 분석법은 유기용매를 사용치 않는 환경친화적인 기법과 다단계과정이 아닌 시험과정의 간편성을 가져야 하고 그 결과로서 분석비용이 저렴한 특성을 지녀야 할 것으로 사료된다. 현재 국내에서도 농산물을 수확할 시기에 농산물에 대한 농약 잔류량을 조사하여 농산물별 농약의 허용기준 (식품공전, 2002년)이 초과된 농산물은 수확시기를 조절하거나 폐기 또는 용도전환 등의 법적 조치를 취하여 소비자를 위한 안전한 농산물을 유통시키는 제도를 운영하고 있다.

농산물 중 과일류와 채소류 등은 수확 후 그 신선도가 보전되어야 하는 특수성이 있고 그 안전성 문제에 있어서 신속한 검사와 평가가 이루어져야 한다. 그러나, 수질과 토양 등과 같은 환경 중의 잔류농약 분석과는 달리 농산물에 대한 잔류농약 분석은 matrix가 복잡하여 농약의 추출, clean-up 및 농축의 여러 단계의 시료 전처리과정이 필요하다.

현재 대부분의 검사기관에서 수행하고 있는 검사단계는 1차 screening 방법으로서 다성분 잔류농약 분석법으로 여러 성분의 농약을 동시에 확인한다. 만약 농약으로 의심될 경우에는 시료를 재처리하여 검출성분에 대한 개별 정성 및 정량분석을 수행한다. 우리나라의 안전성 검사기관에서 수행하고 있는 농산물 중 잔류농약에 대한 1차 screening 방법은 대만의 TARI (Taiwan Agricultural Research Institute)에서 개발된 rapid bioassay of pesticide residues 방법이다. 이 분석법은 많은 농산물을 대상으로 한 잔류농약의 신속한 생물검정법으로 acetylcholinase의 작용을 저해하는 유기인계 및 카바메이트계 농약들이 발색시약에 의해 분석과장 540 nm에서 흡광광도법으로 측정되어 저해율 (%)로부터 농약의 양을 알아낸다. 이 방법은 각각의 농약을 정성, 정량하기 위한 검정법이 아니고 유기인계와 카바메이트계 살균제 농약만이 분석 가능하기 때문에 공전분석을 하기 전 단계의 보조적인 역할만을 하고 있다.

우리나라의 국립농산물품질관리원에서는 California FDA multi-residue simultaneous screening test method에 따라 농산물의 특성과 농약의 종류별로 농산물 중 잔류농약을 규제하고 있다. 다성분 잔류농약 분석법을 살펴보면, 공정시험법으로서 미국에는 AOAC법과 FDA법등이 있고 우리나라에는 식품공전 (한국식품공업협회, 2002년)이 있는데, 식품공전에는 각종 농산물을 비롯한 식품에 대해 263종의 농약 잔류허용기준을 제시하여 규제하고 있으며 농약들의 물리·화학적 성질에 따라 99가지의 단일 및 다성분 분석법으로 구성되어 있다. 따라서 기존의 잔류농약 분석법은 유기인계 (organophosphorus pesticide), 유기염소계 (organochloride pesticide), 카바메이트계 (carbamates)로 각각 구분하여 추출, 농축, 정제 등의 과정을 반복적으로 수행해야 하기 때문에 최소한의 시료 전처리를 하는데 많은 시간이 소요되고, 시료 전처리과정에서 분석물 손실에 의한 오차가 발생하며, 다량의 유기용매 사용으로 인한 환경 오염 등의 많은 문제점을 가지고 있다.

잔류농약 분석과정은 전처리와 기기분석의 두 단계로 나누어 볼 수 있는데, 방해물질을 분리하고 제거하는 전처리방법으로는 purge and trap (P&T), closed-loop stripping analysis (CLSA), head space analysis (HSA), super-critical fluid extraction (SFE), liquid-liquid extraction (LLE) 등의 방법이 알려져 있으며, 기기분석법은 GC법, HPLC법, GC/MS법, LC/MS법 등이 알려져 있다. 농산물에 대한 잔류농약 분석의 전처리방법은 일반적으로 적용하고 있는 용매추출법 (liquid-liquid extraction, LLE), FDA(US Food and Drug Administration)나 KFDA (Korea Food and Drug Administration)에서 공정법으로 채택하고 있는 solid-phase extraction cartridge법, SPME (solid-phase micro-extraction)법, SFE (supercritical fluid extraction)법, ASE (accelerated solvent extraction)법 등 다양한 분석 전처리방법이 널리 활용되고 있다.

다성분 잔류농약 분석법의 문제점을 극복하기 위한 방안이 여러 방면으로 시도되고 있다. 캐나다 Waterloo 대학의 Janusz Pawlisyzn에 의해 개발된 고체상 미량추출법 (solid-phase microextraction, SPME)을 도입한 다성분 농약 동시분석법 연구가 최근 많이 진행되고 있다. 고체상 미량추출법은 기존의 다성분 잔류농약 분석법의 추출, 분배, 정제 단계를 모두 통합할 수 있는 새로운 기법이다 (그림 1). 이미 추출과 분배과정을 통합한 농산물 중 다성분 잔류농약 분석법에 관한 연구가 보고되어 있고, 최근 동시 추출/분배/농축법인 고체상 미량추출법에 의한 다성분 잔류농약 분석과 관련하여 발표된 연구들이 많이 보고되고 있다.

고체상 미량추출법을 다성분 잔류농약 분석에 활용한 사례를 보면, 2000년 Volante 등은 GC/ECD-NPD와 SPME를 사용하여 채소시료에서 100여종의 농약을 동시에 분석하는 방법을 연구하였다. 이는 식품 중 잔류농약을 고체상 미량 추출법을 통해 분석하는데 있어서 가장 효과적으로 추출하기 위한 방법을 연구하였으며 공인된 다성분 잔류농약 추출방법과 비교하고 기준 표준물질 (reference standard material, RSM)을 구입하여 고체상 미량추출법에 의한 잔류농약 분석법의 타당성을 입증하였다. 1998년 Volante 등은 감자 중에서 chlorpropham과 꿀 중에서 amitraz를 GC/MSD와 SPME를 사용하여 분석한 방법을 보고한 바 있다. 1999년 Simplicio는 과일과 과일쥬스에서 유기인계 농약 8성분을 GC/FPD와 SPME를 이용하여 분석하였다.

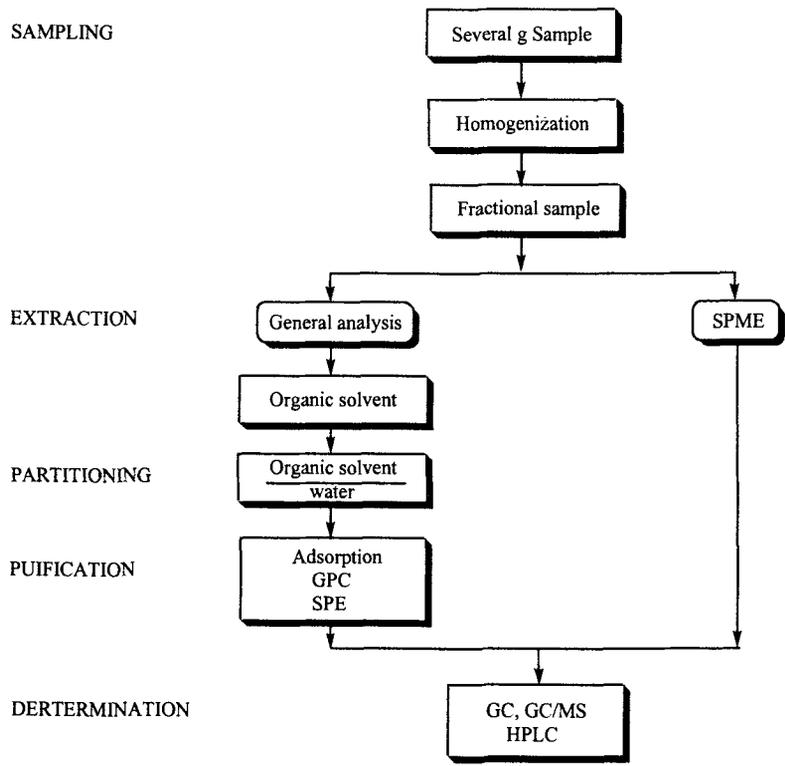


그림 1. 잔류농약 분석법의 계통.

그 밖에도 1998년 Bao-Huey Hwang 등은 chaese herbal formulations에서 유기염소계 농약들을 고체상 미량추출법을 사용하여 분석하였다. 수용액으로 되어 있는 식품들은 더러 물로 묽혀 SPME fiber를 직접 시료용액에 담그어 분석물들을 수확했다. 과일과 채소류 등은 소량의 유기용매 (아세톤이나 아세토니트릴)를 사용해서 농약들을 추출하고 SPME 수확제로 추출하였다. 대부분 식품 중 잔류농약의 분석기기는 GC를 사용하였으며, 검출기로는 질소-인 검출기 (NPD)와 전자포착 검출기 (ECD), 질량분석계 (MSD), 불꽃광도 검출기 (FPD) 등을 사용하였고, 때로는 두 가지 이상의 검출기를 동시에 사용하기도 하였다.

## 2. 이론적 배경

이상적인 시료 전처리방법은 유기용매를 사용하지 않고, 실험조작이 간단하며, 시간과 비용 면에서 경제적이고, 분석물에 대해 효율적인 추출과 높은 선택성의 분리가 이루어지며, 다양한 정성 및 정량법에 바로 활용되어야 한다. 또한 동시에 분석성분만을 분리, 농축할 수 있고 시료 채취장소에서 시료 전처리가 수행될 수 있어야 한다. 따라서 본 논문에서 시료 전처리에 대해 추출 유기용매를 사용하지 않는 최신 분석기법들과 시료 중 분석물의 채취, 농축, 정성, 정량분석을 단일단계로의 통합기법인 고체상 미량추출법에 관해 고찰하고자 한다.

유기용매를 사용하지 않거나, 거의 사용하지 않는 추출기법이 이전에도 사용되어 왔으나 최근에 들어 독성유기용매의 사용을 줄이려는 법적 규제 때문에 solvent-free extraction 기법이 관심을 끌기 시작했다. 이 기법은 기체 상에 의한 추출법, 막에 의한 추출법 (membrane extraction), 흡착제에 의한 추출법 (sorbent extraction)으로 요약되어질 수 있다.

기체 상에 의한 추출법으로서 static headspace 추출법, purge and trap 추출법 및 초임계 유체 추출법 (supercritical fluid extraction, SFE)이 있다. Headspace법은 휘발성 물질의 분석에 넓게 사용되었는데, 추출상으로서 공기나 질소가 사용되며 분석기기 (특히 크로마토그래피와 모세관 전기영동 등)와 현장시료의 전처리에 알맞으며 시료와 평형을 이루고 있는 headspace 부피의 일부를 취하여 직접 GC에 주입, 분석한다. 이 기법은 기체상에 있는 분석물을 농축하지 않고 바로 분석하기 때문에 검출한계가 더러 문제

가 된다. 또한 화학평형 (두 상간의 분배계수)에 의해 정량 과정에서 분석물에 대해 보정이 필요하고 많은 기체시료 양을 채취할 수 없다는 단점이 있다. Purge and trap 기법은 dynamic headspace 시료 채취법으로 연쇄 분배법을 근거로 VOCs를 정량적으로 추출해서 분석할 수 있다. Purge and trap 장치의 원리는 액체시료로부터 VOCs를 추출하기 위해 시료 수용액에 불활성 기체를 불어넣는다. 불활성 기체와 휘발성 분석물은 냉각 포착기 (cold trap) 또는 흡착 포착기 (sorbent trap)를 사용하여 휘발성분을 모은다. 이 기법은 거품이 생기는 시료분석에 문제가 있고 시료처리 후에 다음 시료처리 과정에서 상호 오염문제가 있으며 시료의 채취현장에서는 적당하지 않다. 초임계 유체 추출법에서 초임계 유체는 기체와 같은 빠른 물질전달 특성과 액체와 같은 용매화 특성 때문에 자주 사용된다. 그러나 이 방법의 단점으로는 높은 압력의 고가장비가 필요하고 고순도 CO<sub>2</sub>가 많이 필요하며 장비의 무게 때문에 현장적용이 어렵다는 점을 들 수 있다.

막에 의한 추출법은 두 가지의 동시적인 과정으로 되어 있다. 시료로부터 고분자물에 의한 추출과 고분자상으로부터 기체에 의한 분석물의 추출단계가 있다. 대표적으로 hollow fiber는 자체로 지탱할 수 있고 또한 높은 표면적 대 부피의 비를 가지고 있기 때문에 분석물 전달속도를 크게 하여 더 효율적인 추출이 가능하다. 막 추출법은 MS나 GC에 직접 연결할 수 있다. 막에 의한 추출법에서 낮은 압력의 stripping gas는 전형적으로 VOC 분석에 사용되고 높은 압력의 stripping gas의 사용은 반 휘발성 물질 분석에 사용한다. 그러나 분석물의 농도변화에 민감하지 못하고 상업적으로 유용한 극성 hollow fiber 막이 적어 극성물질의 사용에 제한을 받는 단점이 있다.

수용성 시료로부터 미량의 유기물질을 추출하기 위한 흡착제가 오래 전부터 유기물질을 추출하는 데 사용되어 왔다. 미량 유기물질을 수용액이나 기체시료로부터 흡착제에 의해 분리, 농축할 수 있다. 많은 종류의 흡착제가 다양한 선택성을 가지고 있어 여러 유기물질을 추출하는데 유용하다. 흡착제에 의한 추출법으로 가장 많이 사용되는 기법 중의 하나는 고체상 추출법 (solid-phase extraction, SPE)이다. 분석물은 흡착제가 들어 있는 cartridge를 통해 수용액 시료를 통과시킴으로서 분석물과 일부 방해물질과 함께 추출된다. 선택적인 용리 유기용매의 사용은 보통 방해물질과 분석물을 분리시켜 준다. 고체상 추출법은 전통적인 용매 추출법과 비교하여 많은 장점이 있다. 이 방법은 매우 간단하고 경제적이며, 시료채취 현장에서의 사용이 가능하고, 자동화처리를 할 수 있으며, 상대적으로 적은 양의 유기용매가 사용된다. 그러나 고체상 추출법은 분석물의 낮은 회수율과 cartridge 내의 유로 막힘 현상 또는 시료 구성성분에 의한 흡착제 내의 기공

의 막힘과 같은 문제점이 있다.

고체상 추출법의 이러한 문제점에 대한 해결은 용융 실리카섬유 (fused-silica fiber) 나 적절한 재질로 된 철사처럼 가는 봉 (rod)에 흡착제를 도포시킨 모양으로 개선되었다. 이러한 원통형으로 된 고체상 미량 추출장치는 분석물의 추출과 탈착 시 질량전달이 빠르고 용매 유로의 막힘 현상이 일어나지 않고 취급조작과 분석기기로의 시료주입이 쉽다. 고체상 미량 추출법은 코팅물 (흡수 정지상)과 시료 사이에 분석물이 분배되는 과정과 흡수된 분석물이 분석기기 내에서 탈착이 일어나는 과정으로 되어 있고, 시료 채취 (추출)와 시료 전처리 (정제와 농축), 그리고 분석의 단계가 단일단계로 통합되어진 기법이다. 용융 실리카 fiber에 코팅된 정지상이 시료용액에 노출되어 분석물이 시료로부터 정지상 (흡착제) 속으로 추출된다. 그런 다음 분석물을 흡수한 흡착제는 GC나 LC의 주입구로 옮겨져 열적인 탈착이나 유기용매에 의해 탈착을 시킨다. 정제 단계는 고체상 추출법처럼 각종 용매를 선택하여 사용함으로써 수행할 수 있고 추가적인 정제 단계는 사용되는 fiber 정지상의 분석물에 대한 선택성 때문에 필요가 없다.

고체상 미량 추출법은 장치가 간단하고 비용이 저렴하며 fiber의 GC 주입 자동화가 쉽다. 또한 시료 채취현장에서 직접 fiber에 의해 분석물의 추출이 가능하고 유로의 구멍 막힘과 유기용매 사용 등의 고체상 추출법의 단점이 없다. 특별한 열적 탈착을 위한 부수장치가 필요하지 않고 분석기기를 개조할 필요도 없다. 고체상 미량 추출법은 유기용매를 사용하지 않는 추출과정부터 GC 주입구에서 분석물들의 열적 탈착과정의 모든 과정이 단일단계로 통합되어 있다. 고체상 미량 추출법은 정적 추출과정이기 때문에 고체상 추출법처럼 코팅의 표면적이 문제가 되지 않고 fiber에 균일하고 얇은 정지상의 코팅은 유로막힘의 문제도 없다. 또한 고체상 미량 추출법은 headspace에서 추출이 가능해서 폐기물과 같은 매우 복잡한 구성성분 시료로부터 분석물만을 추출할 수 있다.

고체상 미량 추출법의 장치를 살펴보면 (그림 2), 용융 실리카 fiber는 계속 사용하도록 작은 스테인레스강 관에 내장되어 있고 그 관은 GC용 microsyringe의 바늘 속에 장착되었다. 시료를 추출하기 위해 microsyringe 바늘 속에 있는 fiber는 그의 plunger를 움직여 vial 내의 시료에 노출시킨다. 코팅된 흡착제와 시료로부터 분석물을 추출하는 시간은 평형분배가 이루어지도록 방치한다. Vial에서 microsyringe를 뽑아서 직접 GC 주입구로 넣는다. 주입구에서 분석물은 fiber 흡착제로부터 분석물이 열적으로 탈착되고 GC에 의해 분석하게 된다. 고체상 미량 추출법은 microsyringe의 수작업 또는 auto-sampler에 의해 수행되어 진다.

고체상 미량 추출법의 fiber 수착 메커니즘은 시료 matrix 중에 있는 분석성분이 용융실리카 fiber의 코팅상으로 이동하고, 일정한 시간이 경과되면 matrix와 fiber 간에 분석성분이 평형에 도달하게 된다. 평형시간은 분석물의 분배상수에 의존하고, 추출온도, 추출방법, pH 및 염의 존재여부에 따라 달라진다.

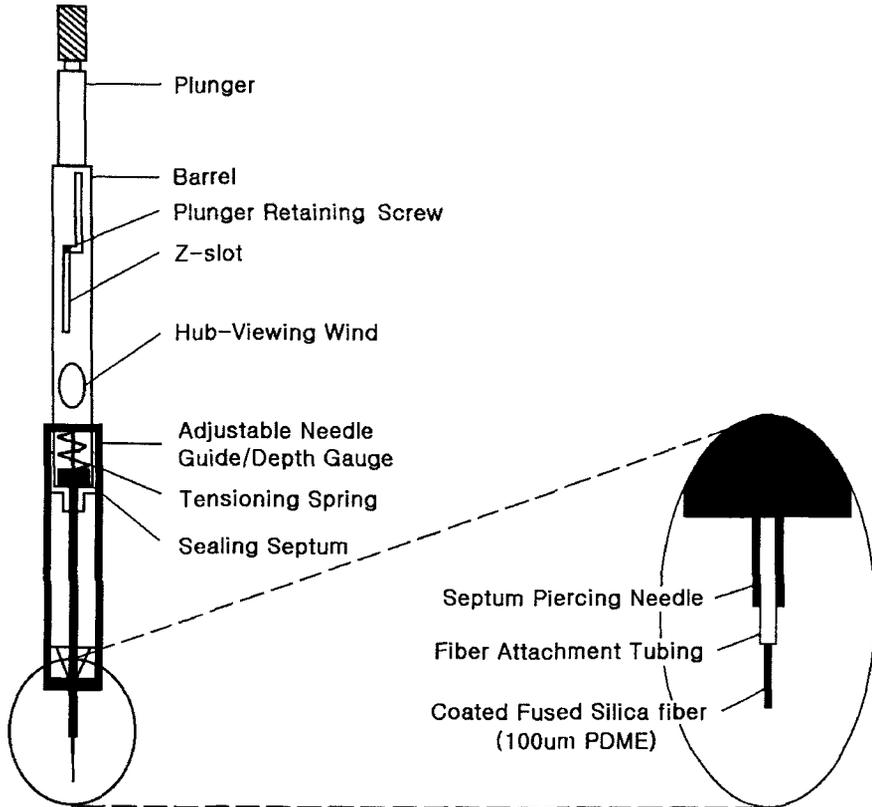


그림 2. SPME 장치.

고체상 미량 추출법의 원리는 시료와 흡착제 (정지상) 사이에서 분석물의 분배원리이다. 흡착제로서 극성이 다른 고분자 물질이 일반적으로 사용되고 시료와의 평형에서 코팅 (정지상)에 의해 흡착되어 지는 분석물의 양은 아래 식에서 보여주는 바와 같이 시료 중 분석물의 농도와 비례관계가 된다.

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

여기에서  $n$ 은 코팅에 의해 흡착된 분석물의 질량이고,  $V_f$ 와  $V_s$ 는 각각 코팅 fiber와 시료의 부피이며,  $K_{fs}$ 는 시료에 대한 코팅 fiber 중 분석물의 분배계수이고,  $C_0$ 는 시료 중 분석물의 초기농도이다.

위의 식은 부피가 일정한 fiber ( $V_f$ )와 시료 양 ( $V_s$ ) 및 두 상간 특정 분석물의 일정한 분배계수 ( $K_{fs}$ )에서 시료에 있는 분석물의 초기농도 ( $C_0$ )와 흡착제에 의해 흡착되어지는 분석물의 양 ( $n$ )과의 관계가 비례한다는 것을 보여준다. 고체상 미량 추출법에서 사용되는 흡착제와 유기물질간 분자인력의 크기가 커지면 분배계수의 값도 커진다. 따라서 고체상 미량 추출법이 분석물의 고농축 효과를 가져오기 때문에 매우 좋은 검출한계(감도)를 가진다. 그러나 대부분 분배계수 값은 시료에서 분석물의 정량적인 추출이 이루어지지 않기 때문에 그의 값은 그렇게 크지는 않다. Static headspace 분석법과 같이 고체상 미량 추출법은 평형시료 채취법이기 때문에 적당한 검량을 통해 시료에 있는 분석물의 농도가 정확히 정량될 수 있다. 위의 식에서 보여주는 것처럼  $V_s$ 가 매우 크면 ( $V_s \gg K_{fs} V_f$ ) fiber에 의해 흡착되어진 분석물의 양은 시료의 부피와 무관해진다 ( $n = K_{fs} V_f C_0$ ). 이러한 특징은 많은 시료를 현장에서 채취하여 분석하는 것을 가능하게 하며 고체상 미량 추출장치를 시료에 직접 담귀 채취하고 기기에 직접 주입하여 분석함으로써 분석시간을 단축시켜 준다.

고체상 미량 추출법은 앞서 기술한 바와 같이 시료와 수차 정지상간 분석물의 화학평형을 바탕으로 분석물들을 추출하는 기법이기 때문에 분석물들을 분석시료로부터 전량 추출하는 과정이 아니다. SPME로 추출하는 방식에 따라 다르지만 시료 (고체시료를 포함), 용매 (추출용)와 수차 정지상의 3성분계 간에 평형분배들이 일어난다. 직접 액체 시료 채취법에서는 수용액 시료와 수차 정지상간, 그리고 공간부위 시료 채취법에서는 수용액 시료와 공간부위간과 공간부위와 수차 정지상간에 평형분배들이 일어난다.

공간부위 시료 채취법의 경우, 고체상 미량 추출법에서 분석물들이 수차되는 양은 일반적으로 3성분계의 전체 평형에 관련된다. 평형이 이루어진 3성분계에서 분석물들의 분포식은 다음과 같다.

$$C_0 V_s = C_s V_s + C_h V_h + C_f V_f \quad (2)$$

여기에서  $C_0$ 는 수용액 시료 중 최초 분석물의 농도이고,  $V_s$ 는 시료용기에 담겨진 수용액 시료의 부피이며,  $C_s$ ,  $C_h$ ,  $C_f$ 는 각각 수용액 시료, 공간부위와 수착제 (정지상)에서 분석물의 평형농도이고,  $V_h$ ,  $V_f$ 는 각각 공간부위와 수착제의 부피이다.

수용성 시료상과 수착 정지상간 분석물의 분배비 (partition ratio),  $\kappa'$ 는 다음과 같다.

$$\kappa' = \frac{C_f V_f}{C_s V_s} = K_{fs} \cdot \frac{V_f}{V_s} = \frac{n_f}{n_s} \quad (3)$$

여기에서  $K_{fs}$ 는 수착제 상과 수용액 상간의 분석물의 분배계수이고,  $n_f$ ,  $n_s$ 는 각각 수착제 상과 수용액 상에서 분석물의 평형 몰수이다.  $K_{fs}$ 는 주어진 계와 일정 온도에서 상수가 되고 이는 분석물에 대해 수착제의 종류와 그에 따른 선택성이 다르면 다른 값을 갖게 된다. Fiber 정지상의 종류를 표 1에 나타내었다. SPME 수착 정지상과 분석물 간에 친화력이 보다 크면 분석물의 분배계수는 매우 큰 값을 가지게 되고 따라서 높은 농축 효과를 가지게 되고 감도가 좋아진다.

표 1. 유통 중인 SPME fiber

Fiber coating type	$T_{max}$ , °C	Application	Coating stability	Polarity
PDMS				
100 $\mu$ m	280	휘발성 화합물 (MW 60-275)	NB	NP
30 $\mu$ m	280	무극성 중간 휘발성 화합물 (MW 80-500)	NB	NP
7 $\mu$ m	340	무극성 고분자량 화합물	B	NP
PA				
85 $\mu$ m	320	극성 중간 휘발성 화합물	CL	P
PDMS/DVB				
65 $\mu$ m	270	volatile, amine, nitroaromatic 화합물 (MW 80~300)	C	BP
CAR/PDMS				
75 $\mu$ m	320	gas, 저분자량 (MW 30~225) 화합물	C	BP
CW/DVB				
65 $\mu$ m	265	알콜류, 극성 화합물	C	P
DVB/CAR/				
PDMS	270	flavors ( $C_3 \sim C_{20}$ ), odors (MW 40~275)		

PDMS: polydimethylsiloxane, PA: polyacrylate, DVB: divinylbenzene,

CW: carbowax, CAR: carboxen, NB: nonbonded, B: bonded, CL: cross-linked

NP: nonpolar, P: polar, BP: bipolar

1998년 Volante 등은 감자와 꿀 중 각각 chlorpropham과 amitraz를 분석하는 연구에서 시료와 수착제 간에 농약을 전달할 수 있는 매체인 'transfer medium'으로서 추출용매와 시료, 그리고 수착제와 함께 3-상 (phase)에서 분배계수를 연구하였다. 뿐만 아니라 1998년 Weiqi Chen 등은 2-상과 3-상 성분계에서 뭉힘비 (f)와 분배계수 (K)로부터 농약의 추출량을 계산할 수 있는 다음과 같은 관계식을 유도하였다.

$$\frac{n_s'}{n_s} \approx \frac{f}{1+f} + \frac{1}{K_{wv}(1+f)} \approx \frac{K_{wv}f+1}{K_{wv}(1+f)} \quad (4)$$

여기에서  $n_s'/n_s$ 는 SPME에 의한 농약의 회수율의 역수이고,  $K_{wv}$ 는 물상과 식물시료간의 분배계수이며, f는 물/식물시료 간의 뭉힘비이다.

또한  $\log K_{ow}$  (octanol/물간의 분배계수) 대  $\log K_{wv}$  관계식을 유도하여 분자구조상으로 같은 계열 농약들의 시료와 물간의 분배계수 ( $K_{wv}$ )를 octanol/물의 분배계수 ( $K_{ow}$ )로부터 쉽게 계산할 수 있도록 하였다.

SPME가 일차적으로 평형에 근거한 기법이기 때문에 표준물에 의한 검정이 정량을 위해 필요하다. 상대적으로 깨끗한 수용성 시료 (<1% 유기물)를 예를 들면 음용수나 다른 성분이 몇 종 있는 경우에 외부 표준물법이 잘 이루어질 수 있고, 함유시료에 일정 농도의 분석물을 첨가해서 SPME 분석을 할 수 있다. 미지시료의 농도는 검정곡선으로부터 검출기의 감응을 비교하여 정량할 수 있다.

다양한 성분으로 된 시료에 대해 외부 표준물법은 matrix 효과 때문에 잘 맞지 않으며 표준물 첨가 또는 내부 표준물법이 사용되어야 한다. 내부 표준물법에서는 내부 표준물의 분배계수가 분석물의 값과 거의 같아야 하기 때문에 분석물의 동위원소 표지 유사체가 제일 좋은 내부 표준물이 되고 따라서 화학적 성질과 물리적 성질이 분석물과 비슷하다. 첨가한 분석물은 시료 중 원래 함유된 분석물보다 강하게 상호작용을 하지 않을지도 모르기 때문에 실험조건은 본래 분석물의 효율적인 추출이 되기 위해 상당한 주의를 기울여야 한다.

만약 분석물의 분배계수 값이 매우 크다면, 코팅물에 강한 친화력 또는 코팅물의 냉각과 동시에 시료의 가열로서 분석물의 정량적인 추출도 가능하다. 이 경우에 검정이 더 이상 필요하지 않으나, 추출효율은 확인해야 한다. SPME의 정밀도는 단일 단계 기법이기 때문에 분석물의 전이과정과 관련된 우연오차를 최소화할 수 있어서 정밀도는 보통

RSD 5% 정도이고 autosampler를 사용할 경우에 그 값이 1% 이하가 될 수 있다.

고체상 미량 추출법에 의한 새로운 방법을 확립하는 데에 필요한 실험인자들을 살펴 보면 다음과 같다. 첫째로 수착 정지상의 종류를 선택해야 한다. 그의 원리는 분석물들을 GC로 분리할 경우에 정지상의 선택과 같다. 수많은 분석물이 종류가 다른 흡착제에 의해 추출되기 때문에 몇 가지 흡착제가 SPME에서 사용되고 있다. 이러한 다양한 흡착제가 사용되는 기준은 유기물질에 따라 “like-dissolves-like”의 기본 개념이 적용된다. polyacrylate와 carbowax와 같은 극성 코팅물은 페놀류, 카르복실산류와 같은 극성물질을 매우 잘 추출하는 반면에 polydimethylsiloxane과 같은 무극성 코팅물은 탄화수소류 등의 물질을 잘 흡착한다. 표 1에서 보여주는 바와 같이 분석물의 극성에 따라 수착 정지상의 극성을 선택하면 분석물의 분배계수가 커져서 감도가 좋아진다. 또한 수착 정지상이 입혀진 정지상의 두께와 길이가 커지면 수착 정지상의 부피가 커져서 분석물의 감도가 좋아진다. 한편 그의 두께가 커지면 보다 많은 분석물이 더 큰 정지상 부피내 침투(확산현상)하는데 소요되는 평형시간이 길어진다. 다시 말하면 주어진 수착조건에서 같은 화합물이나 다른 화합물들의 분배계수가 커지면 그에 따라 평형시간은 길어진다. 따라서 분석물의 감도가 만족스럽다면 추출시간이 짧은 정지상의 두께를 가진 수착 정지상을 사용해야 한다.

둘째로 분배계수를 변화시키는 실험인자로 수착온도가 있다. 그 중에서 시료온도만을 살펴보면 온도변화는 분석물의 분배계수를 변화시켜 SPME 기법의 감도문제에서 중요한 기여를 한다. 일반적으로 시료의 온도증가는 끓는 온도가 높은 분석물들에서 감도를 증가시키지만 끓는 온도가 낮은 분석물들에서는 감도를 감소시킨다. 온도증가로 분석물들의 확산계수는 증가되고 그들의 분배계수 ( $K_{fs}$ )는 감소되어 결과적으로 평형시간은 짧아진다. 이러한 효과로 주어진 수착 정지상에서 분석물들의 추출시간은 최적화할 필요성이 있다. 공간 추출법에서 시료온도의 증가는 공간부위에 분석물들의 농도를 증가시켜 보다 빠른 추출을 이룰 수 있다. 그러나 보다 휘발성 분석물에서 시료온도의 증가는 그의 분배계수 ( $K_{fs}$ )를 감소시켜 불리한 결과를 가져온다.

셋째로 시료 matrix로부터 수착 정지상으로 분석물들의 이동시간에 의해 추출속도가 결정된다. 각 단계별 과정은 첫째는 고형체 시료에서는 고형체로부터 분석물들의 탈착되는 속도가 있고 둘째는 대기나 액체시료를 통해 분석물들의 이동속도가 있으며 셋째는 수착 정지상 내에 분석물들의 확산속도로 이루어진다. 이러한 과정중 하나 또는 여러 과정들이 시료채취 조건들에 따라 다르지만 속도의 결정단계가 된다. 용액 중 분석물들을

빠르게 추출하기 위해 Prandtl 계면층 (Prandtl boundary layer; 수착 정지상과 시료 사이의 공간층)이 얇게 되도록 휘젓기 (agitation)의 형태로 실험이 이루어진다. 휘젓기 방법은 자석 젓기, 용액에 수착 정지상의 휘젓기, 초음파 처리나 흐름 액체시료에 수착 정지상의 담그기가 있다. 실제로 시료용액을 자석젓기 하거나 수착 정지상의 휘젓기를 행하면 분석물의 평형이 이루지기 위해 소요되는 시간은 정적 시료 채취법의 시간에 비해서 10배정도 빠르다. 공간 시료 채취법에서는 분석물들이 수용성 시료에서 공간부위로, 그리고 마지막으로 수착 정지상으로 질량 이동속도에 따라 평형시간이 정해진다. 휘발성 분석물들은 3성분상계에서 평형농도가 빠르게 이루어지지만 반휘발성 분석물들은 시료에서 공간부분으로 그의 질량이동이 느려서 평형시간이 길어진다. 따라서 시료용액의 휘젓기가 요구된다.

넷째로 GC나 HPLC 주입구 내에서 분석물들의 탈착문제는 크로마토그래피의 분리효능과 정량의 정밀도에 영향을 준다. GC에서는 열적 탈착과정으로 주입구의 온도를 증가시키면 수착 정지상과 기체상 (운반기체)간의 수착물들의 분배계수가 감소하고 또한 운반기체의 일정 흐름은 수착된 분석물들을 쉽게 탈착시키고 온도가 낮은 분석컬럼의 머리부분에 재농축되게 하여 띠 넓어짐 현상을 최소화시킨다.

그 밖에도 염 효과 (salt effect)나 시료의 pH 조절 (산이나 염기 화합물들에 해당) 등은 고체상 미량 추출법에서 분배계수에 영향을 주며 실험에서 결정되어야 할 조건들이다. 분배계수가 분석물과 시료사이의 상호작용에 의해 부분적으로 결정되기 때문에 시료 matrix의 성질이 그 분배계수에 영향을 줄 수 있도록 변화될 수 있다. 수용성 시료에 NaCl이나 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 같은 염을 첨가함으로써 물의 이온세기가 증가되어 코팅물 속으로 극성 유기화합물 (이온이 아닌 것)의 분배계수가 증가된다. 중성인 분석물이 더 효과적으로 비이온성 고분자 코팅물에 잘 추출되기 때문에 수용액 시료의 pH는 분석물의 이온화를 방지하기 위해 조절되어야 한다.

### 3. 실험방법

#### 가. 분석기기 및 장치

본 실험에 사용된 기기는 Hewlett-Packard (HP) 5890 series II plus gas chromatograph (GC)이었고 비분할 주입구를 사용하였다. 검출기는 전자포획 검출기 (electron capture detector, ECD)와 질소-인 검출기 (nitrogen phosphorus detector, NPD)를 사용하였다. 분석자료를 얻기 위한 data system으로는 HP 5890, 6890 Chemstation System Software (Hewlett-Packard, U.S.A.)를 이용하였다. 79종의 농약의 분리 및 검출을 하기 위해 사용한 모세관 컬럼은 J&W사 (U.S.A.)의 것으로서 길이 30 m, 내경 0.25 mm, 정지상 두께 0.25  $\mu\text{m}$ 인 DB-5 (cross-linked 5% phenyl methyl siloxane) 컬럼을 사용하였다. Inlet 부분에는 같은 두 개의 모세관 컬럼을 동시에 연결하고, 검출기 부분에는 각각의 모세관 컬럼을 ECD와 NPD에 연결하는 one-port/dual capillary system을 이용하였다. 운반기체와 make-up 기체는 99.999%의 고순도 질소 기체 (Union Gas Co. Korea)를 사용하였고, 또한 NPD에서는 99.99%의 수소와 공기 기체 (Donga Co. Korea)를 사용하였다. GC 분석조건으로써 운반기체로는 질소를 유속 2.0 ml/min로 조절하여 사용하였고 ECD와 NPD의 운반기체의 각 유속은 0.5 ml/min로 하였다. 보충기체 (make-up)는 ECD에서 60 ml/min, NPD에서 10 ml/min로 조절하였고, NPD의 연료기체는 공기가 30 ml/min, 수소가 3 ml/min로 조절하여 사용하였다. Splitless mode에서 purge delay 시간은 1.5분으로 분석하였다. 컬럼의 온도는 처음 80 $^{\circ}\text{C}$ 로 2분간 유지시킨 후 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 180 $^{\circ}\text{C}$ 까지 승온하였으며, 180 $^{\circ}\text{C}$ 부터 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 235 $^{\circ}\text{C}$ 까지 승온한 다음에 280 $^{\circ}\text{C}$ 까지 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 승온하고 280 $^{\circ}\text{C}$ 에 도달하면 15분간 온도를 유지하여 총 분석시간은 60분으로 하였다. 이때 시료 주입구의 온도는 270 $^{\circ}\text{C}$ , ECD의 온도는 300 $^{\circ}\text{C}$ , NPD의 온도는 280 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 이상의 분석조건을 표 2에 요약하였다.

표 2. 최적 기체 크로마토그래피 조건들

---

Column: DB-5 (cross-linked 5% Ph Me siloxane)
30 m × 0.25 mm × 0.25 μm
Carrier gas flow: 1.0 ml/min
Make-up gas flow: ml/min
Injection port system: splitless mode
Injection port temp.: 270°C (one port with dual analytical columns)
Electron capture detector temp.: 300°C
Nitrogen phosphorus detector temp.: 280°C
Air & hydrogen flow rate:
Oven temp. program:
2 min at 80°C, up to 180°C at 8°C/min, up to 235°C at 2°C/min,
up to 280°C at 15°C/min, and finally 15 min at 280°C
Run time: 60 min
Solvent delay: 1.5 min

---

High performance liquid chromatography (HPLC)는 Agilent 1100 series (U.S.A.)로 automatic SPME가 장착되었다. 검출기는 variable UV detector와 fluorescence detector를 사용하였다. 분석 조작조건으로서 분석용 컬럼은 Phenomenex C<sub>18</sub> (250×4.6 mm, 5 μm)과 Hypersil ODS (250×4.6 mm, 5 μm)를 사용하여 농약들의 분리성능을 비교하였다. 이동상 용매는 최적 분리조건으로써 acetonitrile-물 (55 : 45, v/v)로 5분간 등용매로 pH=8과 유속 1.0 ml/min에서 분석한 다음에 기울기 용매기법으로 10분간 그 용매의 조성이 acetonitrile-물 (85 : 15)가 되게 하였다. 표준농약 혼합용액 (각각 5ppm)과 시료주입량은 20 μl이었다. UV 검출기의 분석파장은 254 nm에서 분석하였으며 형광 검출기의 분석파장으로서는 들뜸파장은 286 nm이었고 방출파장은 316 nm이었다.

시료를 파쇄하기 위해 사용한 blender는 Waring Products사 (U.S.A.)의 5011G형이었고 시료로부터 농약을 추출하기 위해 사용한 초음파기기는 명성과학사 (Korea)의 Branson 3200형이었다. 시료의 부유물을 분리하기 위해 사용한 원심분리기는 Hanil Science Industrial사 (Korea)의 Union 55R형 원심분리기 또는 Advantec MFS Inc.사 (Japan)의 0.2 μm pore size PTFE로 된 반투막 거르개를 사용하였다.

시료를 수착하기 위해 사용한 SPME 장치로서 Supelco사 (U.S.A.)의 SPME manual holder와 100 μm film 두께의 polydimethylsiloxane (PDMS)과 polyacrylate (PA) fiber

를 사용하였다. SPME fiber에 수착시키기 위하여 시료를 담은 vial은 Supelco사의 4 ml screw top vial로서 cap에 PTFE/silicon septa가 장착된 vial을 사용하였다. 휘젓기를 위해 사용된 교반기는 Corning사 (Korea)의 PL-351형이었고 수착 중 온도를 일정하게 하기 위하여 제일과학사 (Korea)의 J-431형을 사용하였다. 탈염수는 Millipore사 (France)의 ZMQ 5600Y형 water purification system을 사용하여 제조하였다.

#### 나. 표준농약과 시약

표준물로 사용된 농약은 79종으로써 유기인계 농약이 acephate 외 27종, 카바메이트계 농약이 chlorpropham 외 3종, pyrethroid계 농약이 bifenox 외 7종, azole계 농약이 triadimenol 외 9종, 그 밖의 농약이 alachlor 외 29종으로 Dr. Ehrenstorfer제로서 순도 99% 이상의 농약 표준물질을 사용하였다. 2001년 국립농산물품질관리원에서 한 해 동안 조사한 55000여건의 국내 농산물에 대한 잔류농약 안전성 조사결과를 토대로 검출빈도가 높은 농약들을 선택하여 실험하였다. 농약목록은 표 3에 나타내었다. 표준 저장용액의 조제는 각 농약을 에틸아세테이트 (HPLC grade)에 각각 녹여 1000 ppm이 되도록 제조하여 냉장보관 하였다. 이 표준용액들을 아세톤으로 희석하여 필요한 농도로 제조하여 사용하였다.

농약의 추출용매로 사용된 아세톤은 J.T.Baker사 (U.S.A.)의 잔류농약 분석용을 사용하였으며 H<sub>2</sub>O는 탈염수를 사용하였다. 염 효과를 조사하기 위하여 Samchun Pure Chemical사 (Korea)의 NaCl (99.5%)을 사용하였다.

분석시료로서 풋고추, 당근, 무, 감자, 두부는 안양 L백화점에서 구입하였고, 콩과 옥수수는 재래시장에서 구입하였다. 공정시험법과 비교하기 위해 사용한 부추와 신선초, 그리고 시금치는 국립농산물품질관리원 (경기지소)에서 얻어 분석하였다. 각 시료에 대하여 300g를 blender로 파쇄하고 이를 냉동보관 하였으며, 실험을 하기 전에 실온에서 해동한 다음, 시료 10g씩 분취하여 실험에 사용하였다.

표 3. GC 분석용 농약의 유형별 분류

A. Organophosphorus Pesticides		
acephate	azinphos-methyl	chlorpyrifos
demeton-S-methyl	diazinon	dichlorvos
dimethoate	edifenphos	EPN
ethoprophos	fenitrothion	fenthion
fonofos	isofenphos	malathion
methidathion	omethoate	parathion
phenthoate	phorate	phosalone
profenofos	prothiofos	pyrazophos
pirimiphos-methyl	tolclofos-methyl	triazophos
quinalphos		
B. Pyrethroids		
bifenthrin	cyfluthrin( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -)	cyhalothrin( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -)
cypermethrin( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -)	deltamethrin( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -)	fenvalerate( $\alpha$ -, $\beta$ -)
fenpropathrin	tralomethrin( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -)	
C. Carbamates		
chlorpropham	fenobucarb	furathiocarb
thiobencarb		
D. Azoles		
bitertanol( $\alpha$ -, $\beta$ -)	difenoconazole( $\alpha$ -, $\beta$ -)	flusilazole
hexaconazole	myclobutanil	oxadiazon
prochloraz	terbuconazole	triadimefon
triadimenol( $\alpha$ -, $\beta$ -)		
E. Others		
alachlor	amitraz	bifenox
bromacil	buprofezin	butachlor
captan	chinomethionat	clofentezine
dicofol	endosulfan( $\alpha$ -, $\beta$ -)	fenarimol
folpet	flucythrinate( $\alpha$ -, $\beta$ -)	fluvalinate
hexazinone	iprodione	mefenacet
napropamide	nuarimol	oxyfluorfen
pendimethalin	procymidone	simazine
tetradifon	tricyclpyr	tricyclazole
trifluralin	vinclozolin	

HPLC 분석을 위해 사용된 농약목록과 실험용 분류 (A, B, C, D와 E)는 다음 표 4와 같고, GC로 분석하는 데에 문제가 되어 왔던 N-methyl carbamate류를 포함해서 54종 농약들로 되어 있다.

표 4. HPLC 분석용 농약명과 실험용 분류

A	B	C	C	D
Compound	Compound	Compound	Compound	Compound
carbendazim	imidacloprid	spinosad	thiopante-methyl	thiodicarb
DDVP	metolcarb	propoxur	carbofuran	carbaryl
metaraxyl	carboxin	thiram	E-dimethonmorph	nuarimol
isoprocarb	methiocarb	fenarimol	Z-dimethonmorph	azimphos-methyl
BPMC	methidathion	posmet	diethofencarb	diflubenzuron
dithianone	diniconazole	tebufenozide	captan	alachlor
vinclozolin	difenoconazole	pyrazophos	pyrimetalin	tefluybenzuron
posalone	thiobencarb	chlorpytifos-methyl	iprodione	isophenphos
lufenuron	dicofol	benfuracarb	furathiocarb	flufenoxuron
ethion	chlorpyrifos	dieldrin	biteranol	

#### 다. 표준농약들의 분리와 정성분석

79종 농약들의 각 머무름 시간을 확인하기 위하여 단일 성분의 표준 저장용액들을 각각 아세톤에 묽혀 10 ppm이 되도록 제조하였다. 그리고 79개의 표준용액들을 GC 주입구에 각각 microsyringe로 2 µl 주입하여 각 농약과 이성질체들의 머무름 시간을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 79종의 농약을 A (40종 농약)와 B (39종 농약)의 2 group으로 나누어 실험하였다 (표 5). 이 저장용액은 실험할 때마다 필요한 농도의 표준용액을 제조하는데 사용되었고 1회 수척할 때마다 새로운 표준용액을 만들어 사용하였다.

#### 라. SPME의 최적화

SPME에 의한 잔류농약 분석을 실제시료에 적용하기 전에 SPME 최적 수척조건이 결정되어야 한다. 사전에 예비실험으로 농약들을 일정량 첨가시킨 탈염수로부터 SPME 수척제에 대한 최적 추출조건들로서 fiber 정지상의 종류, 수척과 탈착시간, 탈착온도, 염효과, pH, 온도효과, 시료부피 등이 결정되어야 한다. 이러한 SPME 최적 수척조건들은 물, 토양, 농산물 중 잔류농약을 분석하는 데에 적용된다. 잔류농약 분석에 앞서 SPME 최적 수척조건을 확립하기 위하여 순수한 탈염수 중 0.1 ppm 표준용액을 제조하여 실험

하였다. 본 연구의 분석대상인 농약들은 분자량이 200~450 범위이며 반 휘발성 내지는 비휘발성이기 때문에 fiber를 추출액에 직접 담귀 수착하는 방법을 이용하여 분석하였다.

표 5. GC 분석용 농약들의 실험 분류

A group		B group	
번호	농 약	번호	농 약
1	dichlorvos	21	tricyclazole
2	acephate	22	prothiofos
3	omethoate	23	profenofos
4	chlorpropham	24	myclobutanil
5	phorate	25	buprofezin
6	dimethoate	26	oxyfluorfen
7	diazinon	27	triazophos
8	tolclofos-methyl	28	terbuconazole
9	alachlor	29	bifenox
10	fenitrothion	30	tetradifon
11	bromacil	31	azinphos -methyl
12	malathion	32	mefenacet
13	chlorpyrifos	33	amitarz
14	dicofol	34	cyhalothrin
15	pendimethalin	35	clofentezine
16	captan	36	bitertanol
17	isofenphos	37	prochloraz
18	triadimenol	38	cypermethrin
19	chinomethionat	39	fenvalerate
20	napropamide	40	difenoconazole
		1	triclopyr
		2	fenobucarb
		3	demeton S -methyl
		4	ethoprophos
		5	trifluralin
		6	simazine
		7	fonofos
		8	vinclozolin
		9	pirimiphos -methyl
		10	thiobencarb
		11	fenthion
		12	parathion
		13	triadimefon
		14	furathiocarb
		15	quinalphos
		16	folpet
		17	phenthoate
		18	procymidone
		19	methidathion
		20	$\alpha$ -endosulfan
		21	butachlor
		22	hexaconazole
		23	oxadiazon
		24	flusilazole
		25	$\beta$ -endosulfan
		26	iprodione
		27	edifenphos
		28	hexazinone
		29	nuarimol
		30	EPN
		31	bifenthrin
		32	fenpropathrin
		33	phosalone
		34	cyfluthrin
		35	fenarimol
		36	pyrazophos
		37	fluvalinate
		38	flucynithrinat
		39	deltamethrin
		40	tralomethrin

79종의 농약들을 모두 최대로 추출할 수 있는 SPME fiber 정지상을 선택하기 위해 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane (PDMS) fiber, 85  $\mu\text{m}$  polyacrylate (PA) fiber, 65  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber, 그리고 65  $\mu\text{m}$  carbowax/divinylbenzene (CW/DVB) fiber를 선정하여 상대적인 수착능력과 감도를 비교하였다. 4 종류의 fiber는 수착시간을 50분으로 동일하게 하였으며 열에 의한 탈착은 270°C의 GC 주입구에서 10분간 탈착시켰다.

고체상 미량 추출법은 수착시간에 따라 fiber 정지상과 시료간의 수착량이 달라진다. 따라서 fiber의 수착 평형시간을 결정하기 위해 선택된 최적의 fiber를 사용하여 실온에서 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120분 동안 수착시킨 다음 시간에 따른 농약들의 추출량을 평가하였다.

고체상 미량 추출법에 의해 수착평형이 이루어진 분석화합물은 GC 주입구의 열에 의해 열적인 탈착이 이루어지게 된다. 이때 충분한 탈착이 이루어지지 못하면 fiber에 수착된 화합물이 완전히 탈착이 이루어지지 않아 정량적인 결과를 얻지 못하게 된다. 또한 충분한 열을 가해주지 못할 경우 분리된 화합물들의 peak 들의 꼬리 끌림 현상이나 락스 현상이 생겨서 분리능이 나빠질 수 있다. 따라서 이를 방지하고자 최적의 탈착시간을 실험하였다. 탈착시간은 50분을 수착시킨 다음, GC 주입구에서 10분 탈착시킨 후 다시 10분을 탈착시켜 carry-over되는 분석물을 확인하였다.

농산물에 흡수나 흡착된 잔류농약들을 추출해내기 위해서는 불가피하게 유기용매를 사용해야 한다. 또한 추출액의 유기용매 함량에 따라 추출액의 수상과 fiber 정지상간의 분배계수는 달라진다. 따라서 아세톤 함량에 따른 농약의 수착효과를 조사하기 위해 1, 5, 10% 아세톤 수용액을 제조하여 농약들의 수착량을 비교하였다. 또한 아세톤을 포함하지 않는 순수한 물에서 실험하여 추출용매의 사용량에 따른 추출효율을 비교하였다.

순수한 물에 salt가 용해되어 있으면 화합물들이 추출액으로부터 SPME 정지상으로 추출되는 효과가 좋아지거나 저해된다. 이것을 각각 염석효과 (salting-out effect)와 염용효과 (salting-in effect)라고 한다. 농약들마다 이온세기가 변화함에 따라 염에 대한 추출효과가 각기 다르다. 따라서 순수한 탈염수에 녹아있는 NaCl의 양에 따른 농약들의 fiber로의 수착량을 알아보기 위하여 NaCl을 0, 5, 10, 20, 30%로 변화시켜 분석하여 수착량을 비교하였다.

SPME fiber를 이용하여 분석물을 흡착시킬 때 matrix의 온도가 변화하면 분석물들의 수착 평형시간과 수착량도 변화하게 된다. 일반적으로 낮은 온도에서는 분석물이

SPME fiber에 더 많이 수착된다. 그러나 높은 온도에서는 분석물이 SPME fiber에 수착되어 있는 것보다 matrix에 존재하는 것이 더 안정하기 때문에 SPME fiber에 수착되는 양이 일반적으로 감소하게 된다. 따라서 SPME에 의한 분석물의 분배계수는 온도에 의존한다. 그러므로, 수착온도에 따라 SPME fiber로 추출된 분석물들의 수착량을 알아보기 위해 추출액의 온도를 25, 40, 55, 65°C로 변화시켜 분석하였다. 일정한 온도를 유지시키기 위하여 용액을 항온조에 약 30분 동안 방치시켜 온도의 평형이 이루어지게 하였고 위에서 결정된 수착시간과 탈착시간에 의해 분석하였다.

시료부피가 fiber에 수착되는 농약들의 양에 어떻게 영향을 주는지 알아보기 위하여 vial에 시료의 부피를 4, 6 ml로 변화시키며 수착량을 비교 검토하였다.

각 농약들의 ECD/NPD 감응비를 조사하기 위하여 그룹별로 1 ppm 표준용액을 제조하였고 이를 100  $\mu$ m PDMS fiber로 50분 수착하고 GC 주입구에 10분 탈착하여 분석하였다.

HPLC 분석에서는 농약들의 수착된 fiber를 HPLC 내에 삽입해서 5분간 씻어주어 용매탈착을 시킨 다음에 분석하였다.

#### 마. 농산물 분석과정

SPME 최적화 실험을 바탕으로 실제 농산물에 적용하여 실험하였다. 시료채취 시 농산물의 부위에 따라 잔류농약의 분포에 차이가 있으므로 시험할 부위를 정해서 대표적인 시료가 되기 위한 양을 채취해야 한다. 농산물은 원칙적으로 식품공전 (한국식품공업협회, 2002)에 따라 가식부를 시험부위로 시료채취를 하였다. 풋고추는 꼭지를 제거하였고, 무와 감자, 그리고 당근은 물로 가볍게 씻어 흙을 제거하였으며 기타 채소로서 부추, 신선초는 가식부위를 채취하여 실험에 사용하였다. 농산물의 수분 함량은 110°C에서 5시간 동안 오븐에서 가열한 다음 무게법에 의해 2회 반복 측정하였다.

농산물의 잔류농약을 분석하기 위해서는 추출, 분배, 정제의 3가지 과정을 거치는 것이 일반적이나 이러한 과정을 1단계로 단축시키기 위하여 SPME를 사용하였다. 그러나 잔류농약을 농산물로부터 물층으로 추출해내기 위하여 소량의 아세톤을 첨가하였고 초음파 처리하였는데 이러한 시료 전처리방법은 2000년 Volante 등의 개선된 SPME 방법을 변형시킨 것이다.

본 연구에서 시료 전처리는 다음과 같이 행하였다. 표준농약을 추출하기 위해 시료 300g을 blender로 갈아서 균질화시켰고 그 중 10g을 깨끗이 씻어 말린 100 ml 비커에

담아 정확히 칭량하였다. 여기에 아세톤을 4 ml 넣고 10분 동안 초음파 처리하여 농약을 용매층으로 추출한 다음, 탈염수 90 ml를 넣은 후 잘 섞어주었다. 그리고 맑은 용액을 얻기 위해서 상층액 중 일부를 3500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 4 ml vial에 옮겨 담았다. 이 용액을 교반하면서 실온에서 100  $\mu$ m PDMS fiber를 시료용액에 직접 담그어 50분 동안 수착하였다. 수착이 끝나면 SPME fiber를 GC에 주입하기 전에 SPME fiber에 붙어 있는 클로로필 (chlorophyll)과 지방과 같은 불순물을 제거하기 위해서 탈염수에 SPME fiber를 노출시키고 10초 이내로 가볍게 흔들어서 씻어주었다. 그리고 SPME fiber를 needle 내부로 넣고 needle 주변에 묻어 있는 물기를 닦아 낸 후 GC 주입구에서 10분 탈착하여 분석하였다.

분석이 끝난 SPME fiber는 270 $^{\circ}$ C의 injector에서 10분 동안 reconditioning 시키는 과정을 수행하여 연속된 실험과 SPME fiber에 잔류하는 불순물을 제거하였다. 처음 사용하는 SPME fiber는 270 $^{\circ}$ C에서 2시간 conditioning 하여 사용하였으며, conditioning된 SPME fiber를 GC/ECD로 바탕실험하여 필요하다면 270 $^{\circ}$ C에서 30분간 reconditioning 시키는 과정을 수행하였다. 이상의 추출 및 SPME의 실험과정을 간략하게 요약하면 그림 3과 같다.

농산물 중 잔류농약을 추출하는 과정에서 불순물이 공용리되므로 농약 피크들의 방해를 방지하고 fiber를 보호하여 수명을 연장시키기 위해 풋고추를 대상으로 원심분리하여 분석물과 클로로필을 비롯한 다른 불순물들은 분리하였다. 풋고추에 0.1 ppm이 되도록 A group의 표준농약을 첨가하여 아세톤과 물로 추출한 다음, 3500 rpm으로 10분간 원심분리 하였다.

정제하기 위한 또 다른 방법으로 0.2  $\mu$ m pore size의 PTFE membrane filter를 사용하여 추출한 시료액체를 여과하여 처리하지 않은 시료와 비교해보았다.

추출액으로부터 분석농약을 정량적으로 추출한 다음, SPME fiber에 붙어 있는 클로로필과 지방과 같은 불순물을 제거하기 위해서 GC 주입구에서 탈착시키기 전에 fiber를 탈염수에 세척하였다. 따라서 fiber 세척시간에 따라 농약의 수착량의 변화를 조사하였는데, 탈염수에서 SPME fiber를 노출시키고 10, 20, 30초 동안 가볍게 흔들어서 씻어준 다음, SPME fiber를 needle 내부로 넣고 needle 주변에 묻어 있는 물기를 닦아 낸 후 GC 주입구에서 10분 탈착하여 분석하였다.

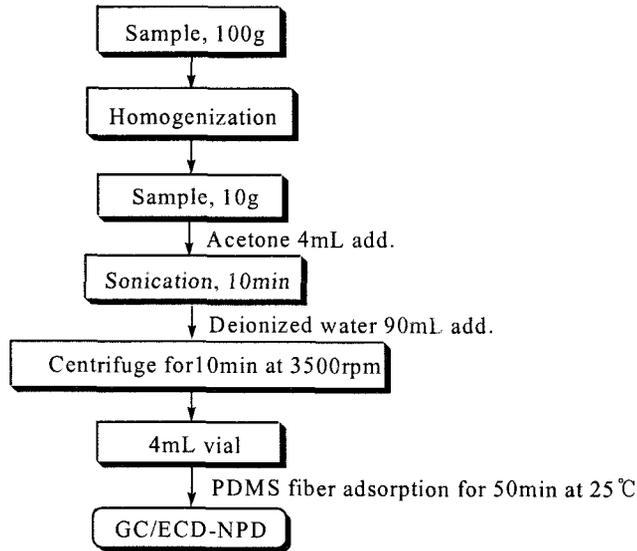


그림 3. 79종 농약들의 실험과정.

#### 바. 농산물 중 농약들의 감응 선형성

정확한 분석결과를 얻으려면 바탕성분이 같은 바탕 농산물을 허용하는 표준물 첨가법이 수반되어야 한다. 따라서 수분이 많은 농산물 (풋고추, 당근, 무, 감자)과 고지방 및 고단백질 농산물 (두부, 콩, 옥수수)의 바탕시료에 각 농약의 농도가 시료에 대하여 0.01, 0.05, 0.10 및 1.0 ppm이 되도록 조제한 다음에 100  $\mu$ m PDMS fiber로 50분 수착하여 GC 주입구에 10분 동안 탈착하였다.

#### 사. 표준농약 첨가법에 의한 평가

위에서 확립된 실험조건을 적용하여 0.1 ppm의 one-point calibration method로 4가지 농산물 (풋고추, 당근, 무, 감자)을 분석하였다.

곱게 간 시료를 10g씩 2개를 취하고 그 중 하나의 시료에는 표준농약을 첨가하지 않고 전처리하였으며 다른 하나의 시료에는 25 ppm 표준 저장용액 40  $\mu$ l를 첨가하여 위의 방법대로 전처리 하였다. 시료 전처리과정은 그림 3의 과정에 따랐다. 이 2개의 추출액을 각각 4 ml glass vial에 넣고 여기에 fiber를 직접 주입하여 교반하면서 50분 수착하고 GC 주입구에 10분간 탈착하였다. 검색법에 의해 분석된 시료들은 머무름 시간과 ECD/NPD 감응비를 이용하여 잔류농약을 정성 확인하였고 검출된 농약의 농도를 구하

였다.

아. 공정시험법에 의한 분석결과와의 비교

본 연구에서 개발된 잔류농약 분석법을 국립농산물품질관리원에서 수행하는 공정시험법과 비교하였다. 공정시험법은 California FDA multi-residue simultaneous screening test method로 고수분 저지방 시료인 신선초와 부추를 대상으로 하였다.

## 4. 결과 및 고찰

### 가. 농약들의 분리와 감응

#### 1) 기체 크로마토그래피 (GC)

79종의 농약을 동시 분리하기 위해 DB-5 모세관 컬럼을 사용하여 GC/ECD-NPD로 분석하였고 one-port/dual capillary system에 의해 표준농약의 감응비를 구하였다. 각 농약별로 10 ppm 표준용액을 제조하여 syringe법으로 분석한 결과에서 79종의 농약과 이 중 triadimenol, cyhalothrin, bitertanol, cypermethrin, fenvalerate, difenoconazole, endosulfan, cyfluthrin, flucynithrin, deltamethrin, tralomethrin의 각 이성질체의 머무름 시간을 조사하였다. 더 확실한 정성확인을 위하여 각 검출기별로 A group의 경우, malathion과 terbuconazole를 기준으로 각 농약들의 상대 머무름 시간 (relative retention time)을 계산하였고, B group의 경우, triadimefon과 EPN를 기준으로 각 농약들의 상대 머무름 시간을 계산하였다. 각 농약의 머무름 시간은 8.429분 (clofentezine)~49.796분 (delta-deltamethrin, delta-tralomethrin)에 걸쳐서 나타났다. 또한, 재현성을 검토하기 위해 3회 측정된 각 농약의 머무름 시간의 상대표준편차는 0.27% (mefenacet) 이하였고 ECD와 NPD에서 각 농약의 상대 머무름 시간은 소수점 셋째 자리에서 변화하였다.

순수한 탈염수에 0.1 ppm 표준용액을 제조하여 100 µm PDMS fiber로 50분 수착하여 GC/ECD-NPD로 분석한 크로마토그램을 그림 4에 나타내었다. 그림 4(1)은 A group의 ECD와 NPD의 크로마토그램이고 그림 4(2)은 B group의 ECD와 NPD의 크로마토그램이다. 그림 4에 나타낸 숫자는 표 6에 나타난 각 농약의 No.이고 a~d까지의 alphabet은 그 농약의 이성질체를 나타낸다. 또한 크로마토그램 상에서 한 피크에 나타난 No.가 2개나 3개인 것은 농약이 겹치는 것을 말한다.

그림 4(1)에서 dichlorvos와 profenofos의 분해물이 겹쳤고 chlorpyrifos와 dicofol, isofenphos와 alpha-triadimenol, beta-triadimenol과 chinomethionat가 서로 겹쳤으며 azinphos-methyl은 상대적으로 SPME 수착량이 작아 tetradifon과 거의 겹쳤다. 그림 4(2)에서 fenthion, parathion, triadimefon이 ECD에서는 겹쳤으나 NPD에서는 분리가 되었고 quinalphos, folpet, phenthoate가 ECD와 NPD에서 모두 분리되지 않았다. 또 deltamethrin과 tralomethrin은 각각의 4가지 이성질체가 모두 동일한 머무름 시간에 용출되었다.

Cyfluthrin과 cyhalothrin의 alpha-와 beta- 이성질체는 각각 그 감응세기가 상대적으로 매우 작고 다른 농약의 피크와 겹쳐서 정량할 수 없었고 bitertanol은 ECD에서 alpha-와 beta- 이성질체가 서로 겹쳤으나 NPD에서는 분리되어 beta-이성질체가 감응이 작음을 알 수 있었다. 또한 beta-flucythrinate는 감응이 작아 검출되지 않았으며 NPD에서 endosulfan은 검출되지 않았다. 또한 SPME fiber에 수착이 잘 되지 않는 농약들은 dichlorvos(A1), acephate(A2), omethoate(A3), dimethoate(A6), bromacil(A11), malathion(A12), captan(A16), cyhalothrin(A34), cypermethrin(A38), fenvalerate(A39), triclopyr(B1), simazine(B6), fenthion(B11), iprodione(B26), edifenphos(B27), nuarimol (B29), fenarimol(B35)이며 이들 농약 중에는 감응이 작아 정량이 어려운 것들도 있었다. 100  $\mu$ m PDMS fiber에 수착이 잘 안되는 이러한 농약들의 대부분은 유기인계나 pyrethroids계 농약들이었으며 이것은 2000년 Volante 등의 연구결과와 비슷하였다.

물 중 0.1 ppm 표준농약 용액을 사용하여 peak 면적의 재현성을 검토하기 위해 3회 측정된 각 농약의 평균 peak 면적과 상대 표준편차를 표 6에 나타내었다. 그 결과에서 각 농약의 상대 표준편차는 A group의 경우, ECD에서 28.0 (prothiofos)~1.4% (bromacil)의 범위이고 NPD에서는 alpha-cypermethrin을 제외하고 38.2 (prochloraz)~0.8% (clofentezine)의 범위이며 B group의 경우, ECD에서 24.9 (edifenphos)~2.4% (alpha-endosulfan)의 범위이고 NPD에서는 simazine을 제외하고 26.6 (gamma-deltamethrin)~3.5% (procymidone)의 범위이었다. Alpha-cypermethrin을 비롯하여 peak 면적의 상대 표준편차가 20% 이상인 농약들은 각 검출모드에서 그 감응이 작아서 생기는 오차 때문이라고 생각된다.

농산물 중 농약성분의 정성분석은 주어진 분석기기의 조건에서 머무름 시간으로 확인되지만 복잡한 불순물과 79종 농약들을 정성분석을 하는 데에 보다 신뢰성을 부여하려고 농약별 ECD/NPD의 감응비로 확인하는 방법을 도입하였다. ECD와 NPD의 감응비의 재현성을 검토하기 위해 3회 측정된 각 농약의 감응비를 표 6에 나타내었다. 감응비는 순수한 물에서 ECD/NPD로 농약의 검출 감응비에 대한 분석결과를 SPME injection 하여 ECD의 peak 면적을 NPD의 peak 면적으로 나눈 값이다. 그 결과에서 ECD/NPD의 감응비는 A group의 경우, 0.3 (triazophos)~228 (bifenox) 범위이었고, B group의 경우, 146.4 (fluvalinate)~0.4 (ethoprophos) 범위이었다. 감응비의 상대 표준편차는 alpha-cypermethrin과 simazine을 비롯한 5가지 농약을 제외하고는 모두 20% 이하였다. ECD/NPD 감응비가 alpha-cypermethrin을 비롯하여 peak 면적의 상대 표준편차가 20%

이상인 농약들은 각 검출모드에서 그 감응이 작아서 오는 것이라고 생각된다. ECD/NPD 감응비는 endosulfan의 경우, 다른 화합물보다도 훨씬 컸는데 그것은 분자구조에 다수의 chlorine이 존재하기 때문에 NPD에 대한 ECD의 감도가 매우 컸기 때문이라고 생각된다.

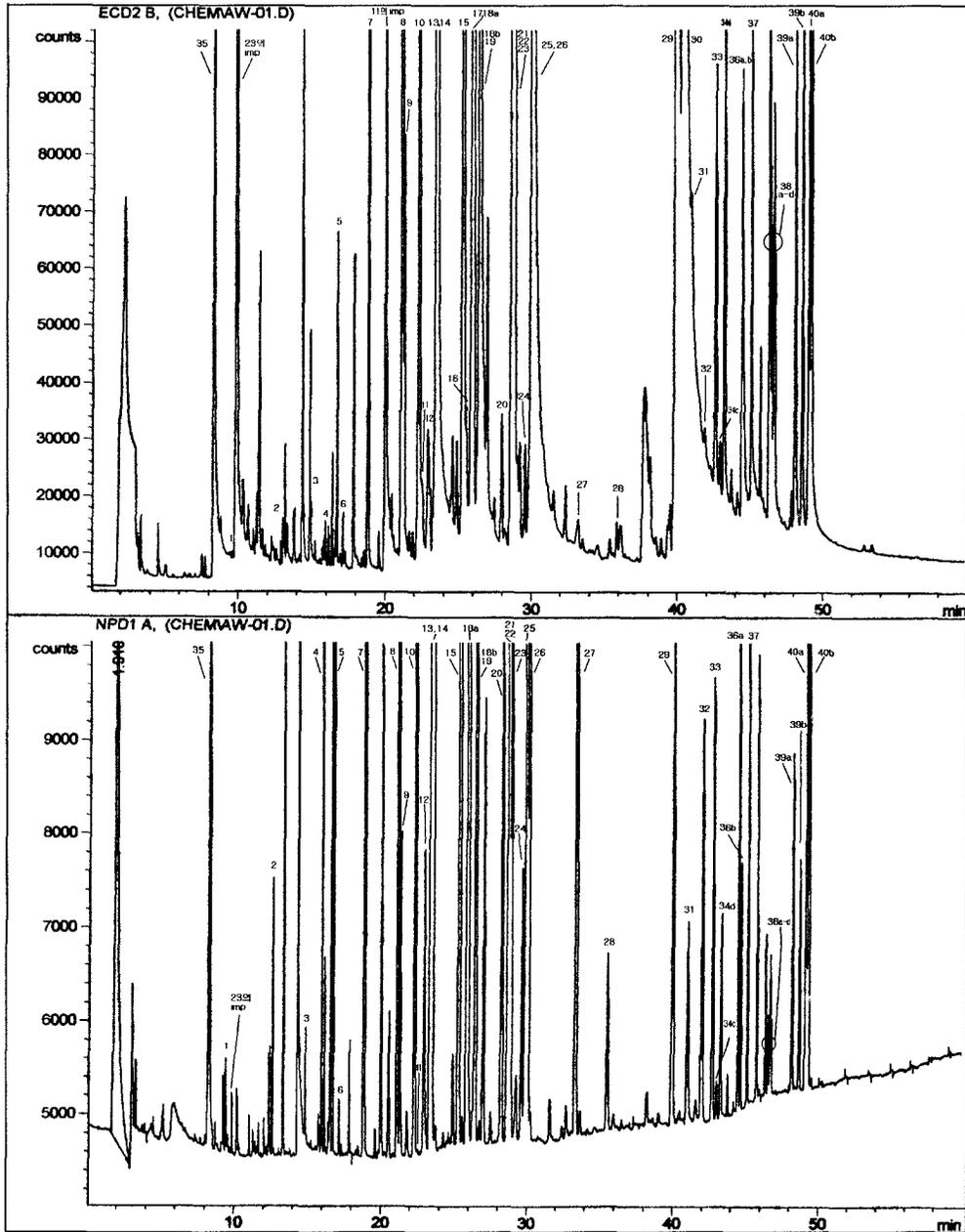


그림 4. 100  $\mu$ m PDMS fiber에 의한 물 중 79가지 농약들의 크로마토그램.

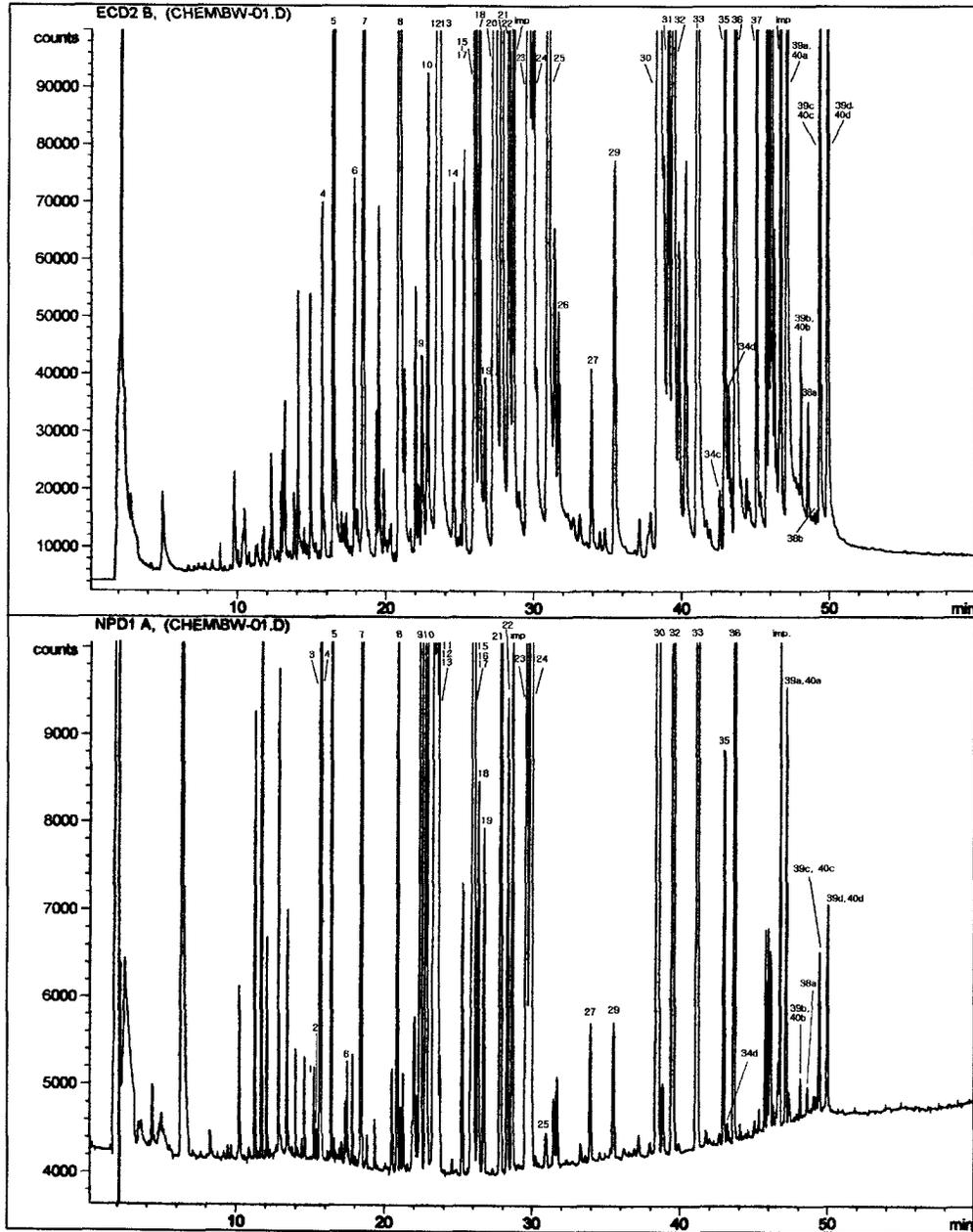


그림 4. 계속; B group.

표 6. 농약들의 ECD와 NPD의 반응비와 피크면적의 재현성 비교

번호	농 약	ECD		NPD		Response ratio	RSD %
		Peak	RSD	Peak	RSD		
		area	%	area	%		
1	dichlorvos	0.380	10.4	0.022	23.7	18.0	18.3
2	acephate	0.216	5.0	0.202	11.7	1.1	7.6
3	omethoate	2.138	3.5	0.056	6.4	38.2	3.2
4	chlorpropham	0.891	2.3	1.602	8.2	0.6	6.1
5	phorate	4.980	7.0	7.563	9.8	0.7	3.7
6	dimethoate	-	-	-	-	-	-
7	diazinon	6.834	5.8	7.902	7.9	0.9	2.3
8	tolclofos-methyl	32.520	8.7	4.707	9.9	6.9	3.1
9	alachlor	4.922	7.1	0.265	11.5	18.6	5.1
10	fenitrothion	26.822	7.9	4.874	9.2	5.5	2.7
11	bromacil	0.698	1.4	0.037	8.6	18.8	9.0
12	malathion	3.072	15.1	1.057	26.3	3.0	11.1
13	chlorpyrifos	38.110	11.6	3.591	14.0	10.6	2.9
14	dicofol	a	-	-	-	-	-
15	pendimethalin	16.836	10.4	1.504	14.9	11.2	4.8
16	captan	1.087	9.5	-	-	-	-
17	isofenphos	4.507	4.1	7.750	6.5	0.6	3.3
18	alpha-triadimenol	a	-	a	-	-	-
	beta-triadimenol	55.102	11.1	2.446	16.7	22.7	5.3
19	chinomethionat	a	-	a	-	-	-
20	napropamide	0.556	4.7	0.526	12.5	1.1	7.3
21	tricyclazole	10.474	9.8	1.429	10.7	7.3	2.8
22	prothiofos	14.184	28.0	1.638	35.2	8.8	6.5
23	profenofos	0.881	5.9	0.050	7.0	17.5	1.1
24	myclobutanil	1.903	7.1	0.245	15.0	7.8	7.8

a: not determined.

표 6. 계속; A group

번호	농 약	ECD		NPD		Response	
		Peak	RSD	Peak	RSD	Ratio	RSD
		area	%	area	%	ratio	%
25	buprofezin	1.300	6.7	-	-	-	-
26	oxyfluorfen	26.915	7.4	2.625	11.7	10.3	5.7
27	triazophos	0.674	9.3	2.219	21.0	0.3	11.5
28	terbuconazole	0.245	3.7	0.183	19.3	1.4	15.2
29	bifenox	41.394	7.2	0.183	16.4	228.0	9.0
30	tetradifon	35.542	6.8	-	-	-	-
31	azinphos-methyl	1.821	20.6	-	-	-	-
32	mefenacet	0.976	11.7	0.327	27.2	3.1	16.3
33	amitarz	-	-	0.423	20.8	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	0.284	18.8	-	-	-	-
	delta-cyhalothrin	0.692	24.0	0.015	20.0	45.8	5.8
35	clofentezine	6.044	3.8	1.551	0.8	3.9	3.2
36	alpha-bitertanol	0.705	8.2	0.401	20.2	1.8	11.5
	beta-bitertanol	a	-	-	-	-	-
37	prochloraz	7.406	25.5	0.502	38.2	15.3	14.0
38	alpha-cypermethrin	0.594	14.5	0.005	103.5	199.3	71.9
	beta-cypermethrin	0.289	15.8	0.004	20.2	89.7	9.4
	gamma-cypermethrin	0.279	11.7	0.004	0.0	73.8	8.6
	delta-cypermethrin	0.549	11.9	0.004	0.0	144.8	9.8
39	alpha-fenvalerate	0.345	18.0	0.003	28.3	149.3	10.1
	beta-fenvalerate	0.388	7.6	0.004	20.2	113.3	10.0
40	alpha-difenoconazole	2.365	20.3	0.204	33.5	12.0	15.6
	beta-difenoconazole	4.588	17.4	0.212	34.3	22.7	20.2

a: not determined.

표 6. 계속; B group

번호	농 약	ECD		NPD		Response ratio	RSD %
		Peak	RSD	Peak	RSD		
		area	%	area	%		
1	triclopyr	0.153	19.3	-	-	-	-
2	fenobucarb	0.489	7.9	0.045	11.8	11.0	15.7
3	demeton S-methyl	0.144	7.0	0.054	5.4	2.7	11.5
4	ethoprophos	3.627	10.6	5.566	8.3	0.7	14.7
5	trifluralin	44.046	17.9	1.695	18.2	26.0	0.3
6	simazine	0.232	8.7	0.004	56.8	78.1	55.7
7	fonofos	82.043	3.9	21.639	5.7	3.8	4.6
8	vinclozolin	58.472	3.9	0.647	4.0	90.4	3.0
9	pirimiphos-methyl	2.178	4.7	10.487	9.1	0.2	4.5
10	thiobencarb	1.731	8.0	1.299	11.5	1.3	3.8
11	fenthion	-	-	-	-	-	-
12	parathion	43.813	4.0	7.573	12.9	5.8	9.6
13	triadimefon	25.785	3.1	12.091	8.8	2.1	6.8
14	furathiocarb	a	-	1.287	4.8	-	-
15	quinalphos	34.449	7.5	17.239	10.9	2.0	3.6
16	folpet	a	-	a	-	-	-
17	phenthoate	a	-	a	-	-	-
18	procymidone	10.975	3.6	0.484	3.5	22.7	0.6
19	methidathion	4.166	4.2	0.998	5.0	4.2	1.4
20	alpha-endosulfan	140.195	2.4	-	-	-	-
21	butachlor	21.986	6.6	0.962	8.8	22.9	2.4
22	hexaconazole	19.183	4.7	0.523	4.9	36.7	1.1
23	oxadiazon	48.522	7.7	1.450	10.6	33.5	3.1
24	flusilazole	11.605	7.4	2.332	6.1	5.0	12.6
25	beta-endosulfan	52.683	8.5	-	-	-	-

a: not determined.

표 6. 계속; B group

번호	농 약	ECD		NPD		Response ratio	RSD %
		Peak	RSD	Peak	RSD		
		area	%	area	%		
26	iprodione	6.057	4.0	0.098	8.3	62.2	5.4
27	edifenphos	2.593	24.9	0.276	32.1	9.6	9.8
28	hexazinone	-	-	-	-	-	-
29	nuarimol	8.645	4.9	0.215	5.0	40.2	6.0
30	EPN	73.923	7.9	8.546	12.3	8.7	4.9
31	bifenthrin	1.104	4.9	0.062	15.0	18.1	11.8
32	fenpropathrin	3.073	18.1	0.132	21.5	23.5	4.4
33	phosalone	25.598	14.7	2.485	6.8	8.4	74.8
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	0.169	13.8	0.017	19.3	10.2	7.4
	delta-cyfluthrin	a	-	-	-	-	-
35	fenarimol	21.398	4.1	0.493	7.4	43.5	3.5
36	pyrazophos	15.997	7.2	4.781	12.5	3.4	5.6
37	fluvalinate	1.200	5.7	0.008	13.9	146.4	18.5
38	alpha-flucynithrin	0.166	7.9	-	-	-	-
	beta-flucynithrin	-	-	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	0.787	3.3	0.072	11.4	11.0	11.2
	beta-deltamethrin	0.125	15.6	-	-	-	-
	gamma-deltamethrin	0.362	12.1	0.004	26.6	90.3	42.6
	delta-deltamethrin	0.215	19.6	0.008	13.9	25.8	11.7
40	alpha-tralomethrin	a	-	a	-	-	-
	beta-tralomethrin	a	-	a	-	-	-
	gamma-tralomethrin	a	-	a	-	-	-
	delta-tralomethrin	a	-	a	-	-	-

a: not determined.

2) 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)

GC로 분석하기 어려운 농약 53종을 역상 HPLC로 분석한 결과에서 각 농약 (각 농도가 5.0 ppm)의 머무름 시간들과 UV와 형광검출기에 의한 감응크기 (봉우리 넓이)는 다음 표 7에서 보여주는 바와 같다.

표 7. HPLC에 의한 머무름 시간과 감응

번호	농 약	UV 검출기		형광 검출기	
		머무름 시간 (min)	봉우리 넓이	머무름 시간 (min)	봉우리 넓이
1	methomyl	5.92	$6.8 \times 10^4$	-	-
2	carbendazin	8.44	#	9.46	*
3	imidaclopnid	8.44	#	-	-
4	spinosod	10.11	$3.5 \times 10^4$	-	-
5	thiopanate-methyl	10.12	$3.5 \times 10^3$	-	-
6	thiobencarb	10.17	$5.2 \times 10^4$	-	-
7	metolcarb	10.20	$3.0 \times 10^4$	-	-
8	propoxur	10.53	*	10.53	*
9	carbofuran	10.58	$2.5 \times 10^4$	10.31	*
10	carbaryl	10.90	$8.3 \times 10^4$	10.59	*
11	metaraxyl	11.09	$2.9 \times 10^4$	-	-
12	carboxin	11.25	$1.3 \times 10^3$	-	-
13	thiram	11.38	$1.2 \times 10^3$	-	-
14	E-dimethomorph	11.41	$9.9 \times 10^4$	-	-
15	nuarimol	11.48	$4.6 \times 10^4$	-	-
16	isoprocarb	11.51	$3.3 \times 10^4$	-	-
17	Z-dimethomorph	11.63	$2.0 \times 10^3$	-	-
18	methiocarb	12.18	$5.8 \times 10^4$	-	-
19	fenarimol	12.31	$7.0 \times 10^4$	-	-
20	azimphos-methyl	12.38	$1.0 \times 10^3$	-	-
21	methidathion	12.48	$7.8 \times 10^4$	-	-
22	posmet	12.58	$6.6 \times 10^4$	-	-
23	captan	12.62	$6.1 \times 10^4$	-	-
24	diflubenzuron	12.93	$2.2 \times 10^3$	-	-
25	tebufenozide	13.64	$1.0 \times 10^3$	-	-
26	pyrimetalin	13.65	$3.0 \times 10^3$	-	-
27	alachlor	13.81	$7.7 \times 10^4$	-	-
28	vinclozolin	13.86	$1.4 \times 10^4$	-	-
29	pyrazophos	14.70	$2.8 \times 10^3$	-	-
30	iprodione	15.00	$5.8 \times 10^4$	-	-

# 봉우리가 겹쳐짐.

\* 미량 검출.

표 7. 계속

번호	농 약	UV 검출기		형광 검출기	
		머무름 시간 (min)	봉우리 넓이	머무름 시간 (min)	봉우리 넓이
31	tefluybenzuron	15.05	$9.9 \times 10^4$	-	-
32	posalone	15.16	$2.1 \times 10^4$	15.21	*
33	thiobencarb	15.37	$2.0 \times 10^4$	-	-
34	chlorpyrifos-methyl	15.47	*	15.51	*
35	isophenphos	15.84	$2.1 \times 10^4$	-	-
38	lufenuron	16.11	$1.1 \times 10^5$	-	-
39	dicofol	16.23	$1.4 \times 10^5$	-	-
40	benfuracarb	17.03	*	17.09	*
41	furathiocarb	17.18	*	-	-
42	flufenoxuron	17.22	$9.5 \times 10^4$	-	-
43	ethion	18.36	*	-	-
44	chlorpyrifos	18.47	*	18.48	*
45	dieldrin	18.59	*	-	-
46	acephate	-	-	-	-
47	aldrin	-	-	-	-
48	DDT	-	-	-	-
49	deltamethrin	-	-	-	-
50	dithianon	-	-	-	-
51	endosulfan	-	-	-	-
52	fenpyoximate	-	-	-	-
53	oxamyl	-	-	-	-
54	thibendazole	-	-	-	-
55	tolclofos-methyl	-	-	-	-
56	triadimenol	-	-	-	-

# 봉우리가 겹쳐짐.

\* 미량 검출.

위의 결과에서 54종 농약물의 분리에서 GC보다 HPLC의 분리되는 정도가 좋은 결과를 보여주지 못하고 (이론적 분리능의 저하문제와 고비용 문제점을 예측하였음) 또한 농약들의 검출한계 및 선택성 검출문제가 있었다. 즉, 54종 농약들 중 UV 검출기 (분석파장 254 nm)에서 31종, 형광 검출기 (들뜸 파장 286 nm와 방출 파장 316 nm)에서 4종 농약이 검출되었다.

따라서, 농산물의 잔류농약의 동시 HPLC 분석법을 개발하기 위해 농약 54종 GC 분석법에서 문제가 되는 N-methyoarbambamate계와 phenylurea계 농약 10종 (화합물로

11종)에 대해 HPLC 분석을 시도하였다.

10종 농약의 HPLC 최적 분리 컬럼을 선정하기 위해 역상 C<sub>18</sub> 컬럼으로서 Hypersid ODS 컬럼과 Phenomenex C<sub>18</sub> 컬럼을 사용해서 얻은 chromatogram 들은 <부록3-2>와 같다. 그 결과에서 Hypersil ODS 컬럼 (carbendazim과 imidacloprid가 겹침)에 비해 Phenaminex C<sub>18</sub> 컬럼의 분리능이 우수하여 이 컬럼을 선정하여 실험하였다.

이동상 용매의 pH 영향을 평가하기 위해 pH 변화를 시켜 얻은 결과에서 pH 7보다 완충용액으로 조정된 pH 8의 결과에서 봉우리 넓힘 현상 (methomyl과 carbendazim 등)이 없어 11종 화합물들은 기준선 분리능을 얻었고 용출시간을 14분 정도였다. 따라서 이 이동상 용매는 pH 8 (완충 용액)로 조정하여 사용하기로 하였다 <부록3-3>.

10종 농약물의 HPLC 감응 (UV 검출기 254 nm)과 농도변화 (0.01 0.20 0.50 1.0 4.0 5.0 ppm) 농약들의 검출한계 (잡음에 대해 3배)를 알기 위해 분석한 결과물을 요약하면 다음 표 8와 같다.

표 8. HPLC에 의한 10종 농약들의 검정식과 검출한계

번호	농 약	Calibration	Regression	LOD, µg/ml
		equation	coefficient (R <sup>2</sup> )	
1	methomyl	y=17.464x - 0.251	0.99998	0.033
2	carbendazim	y=30.194x - 0.618	0.99996	0.028
3	imidacloprid	y=39.241x - 3.538	0.99965	0.035
4	thiophanate-m	y=48.285x - 0.785	0.99989	0.011
5	carbofura	y=13.224x + 0.235	0.99988	0.038
6	carbaryl	y=62.193x + 0.046	0.99997	0.008
7	E-dimethomorph	y=10.692x + 0.450	0.99954	0.026
	Z-dimethomorph	y=21.741x + 0.301	0.99981	0.024
8	methiocarb	y=21.868x + 0.625	0.99973	0.024
9	diflubenzuron	y=29.341x - 0.521	0.99968	0.020
10	teflubenzuron	y=20.810x - 0.724	0.99979	0.041

위의 검정 관계식의 10종 농약들의 같은 농도에서 흡광도 차이가 6배 정도 범위로 다르게 검출되었고 (관계식에서 기울기) 농도변화가 0.10 ppm에서 5.0 ppm의 50배 범위에서 검정 관계식의 regression coefficient 감응이 0.999 이상의 좋은 직선관계가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 10종 농약들의 검출 한계가 0.008~0.041 (µg/ml) 범위였다.

## 나. SPME의 최적화

### 1) 수착 fiber의 선택

다양한 종류의 잔류농약을 최대로 추출할 수 있는 fiber 수착제를 선택하기 위해서 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB fiber, 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber, 85  $\mu\text{m}$  PA fiber, 65  $\mu\text{m}$  CW/DVB fiber를 사용하여 일정한 SPME 조작조건에서 실험하였다. 그 결과를 각 농약별 fiber 수착제의 종류에 따른 감응세기로 그림 5에 나타내었다.

그 결과에서 fiber 수착제의 종류에 따라 각 농약들의 봉우리 넓이들 (수착량)은 달랐다. 분석된 농약들 중 50% 이상의 농약들은 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB fiber에서 수착량이 가장 컸고 [그림 5(A)], EPN의 14가지 농약들은 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber에서 수착량이 가장 컸다 [그림 5(B)]. 또한, triazophos의 4가지 농약들은 65  $\mu\text{m}$  CW/DVB fiber에서 수착량이 가장 컸다 [그림 5(C)]. Acephate, profenofos 등과 같이 octanol/water에서의 분배계수 [ $\log(K_{ow})$ ] 값이 작은 농약들과 cyhalothrin, fenvalerate, cypermethrin 등과 같이 pyrethroid 계통의 농약들은 PA fiber에 수착이 더 잘되는 것으로 나타났다 [그림 5(C)].

Valor와 Magdic에 의하면 diazinon과 EPN은 PDMS fiber가 PA fiber보다 수착량이 더 높고, triazophos와 dichlofos는 PA fiber가 PDMS fiber보다 수착량이 더 높다고 보고하였는데 본 실험결과와 동일한 결과를 보였다.

SPME의 감도는 fiber 수착제의 종류와 두께의 선택에 따라 결정된다. 일반적으로 잔류농약 분석에는 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber와 85  $\mu\text{m}$  PA fiber를 주로 사용한다. PDMS fiber는 무극성 유기인계 살충제와 같이 물에 대한 용해도가 작은 무극성 농약들을 수착하는데 사용된다. 반면에 PA fiber는 polar ester side chain에 hydrochain의 구성을 갖기 때문에 극성을 가지므로 질소를 함유한 제초제를 수착하는데 주로 사용되지만 무극성 화합물에 대한 수착량은 적다. 때로는 보다 더 극성이거나 여러 가지 잔류성분들로부터 더욱 선택성을 가진 fiber 수착제가 요구될 경우 다른 fiber 수착제를 사용한다. 1998년 Beltran 등에 의하면 약한 극성의 CW/DVB fiber는 유기염소계 농약에 사용되고 CW/DVB fiber와 PDMS/DVB fiber는 유기인계 농약을 분석하는데 주로 사용한다고 하였다.

대부분의 식품 중 잔류농약을 분석한 논문에는 유기염소계 농약이나 유기인계 농약, 그리고 카바메이트계 농약을 분석할 때 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber를 사용하였다. 또한 1999년 Simplicio에 의하면 위의 4가지 fiber 수착제들 중에서 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber가 재현성과 열적 안정성 면에서 가장 나은 것으로 나타났다. 따라서 현재 농산물 중 잔류농약 규제치인 0.1 ppm을 검출하기 위한 분석법 개발을 위한 본 연구의 목적과 부합되는 fiber로

서 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber를 선택하였다.

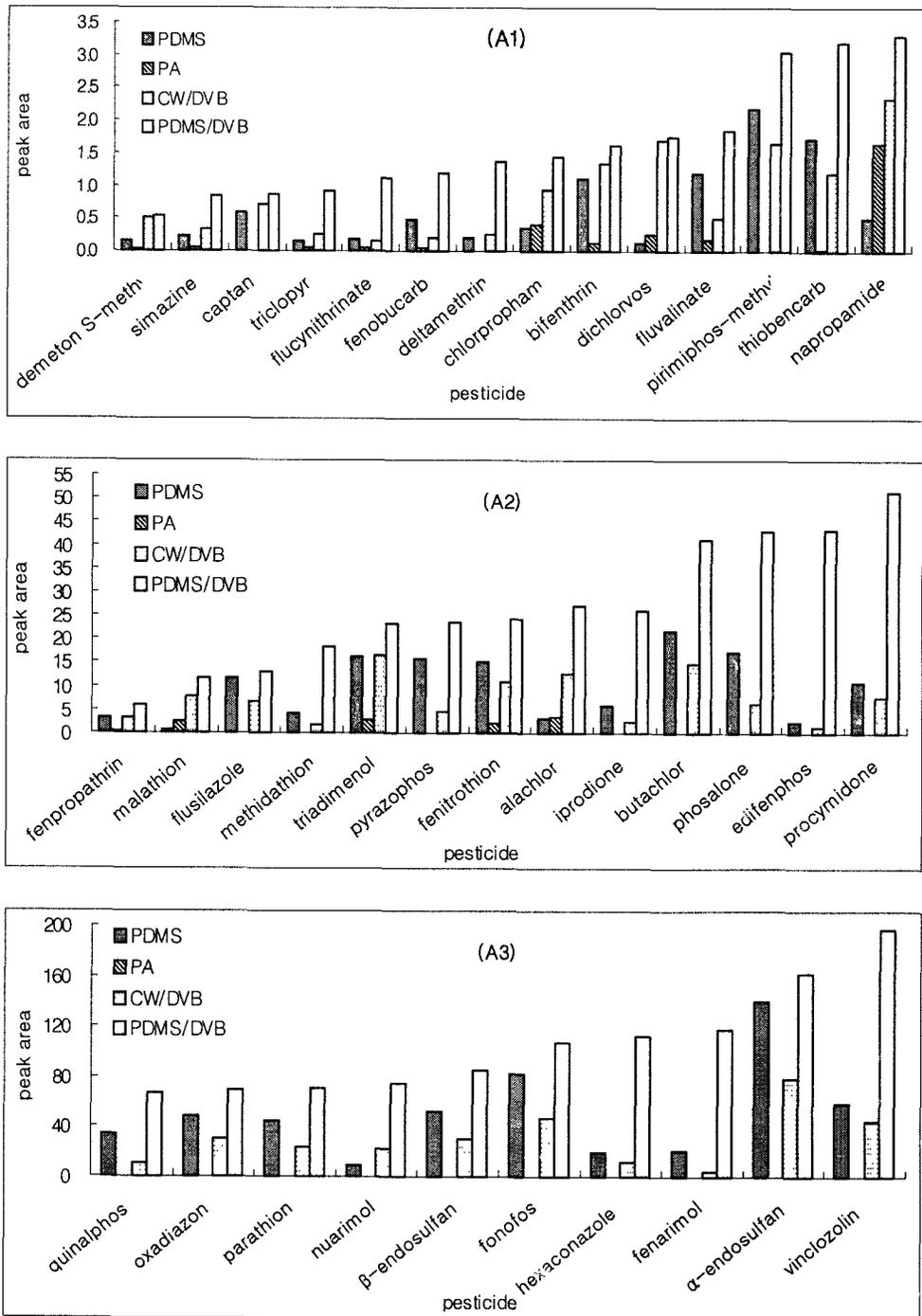


그림 5. Fiber 수착제에 따른 농약들의 수착량.

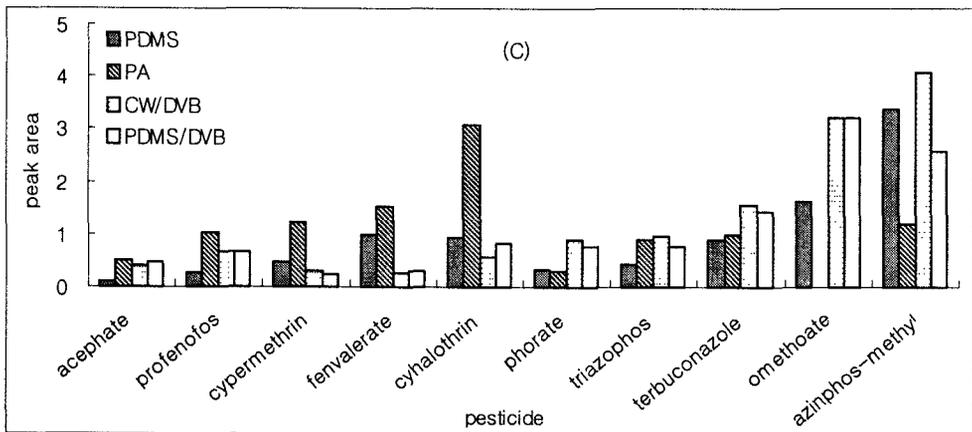
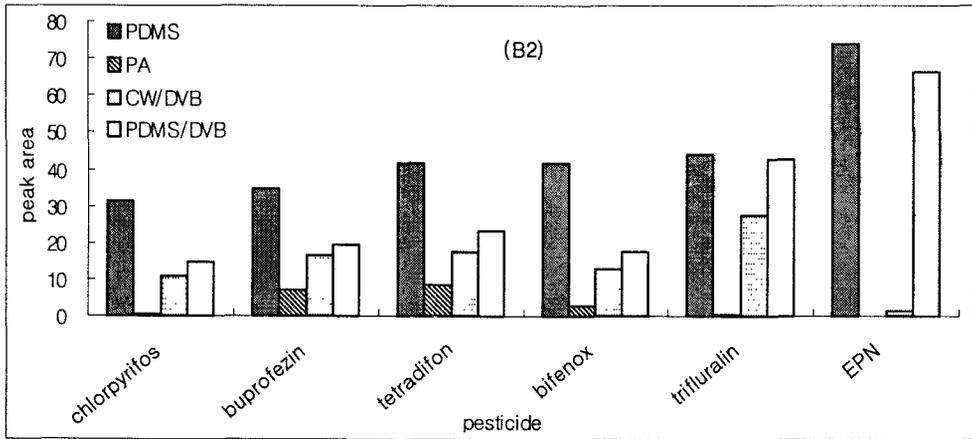
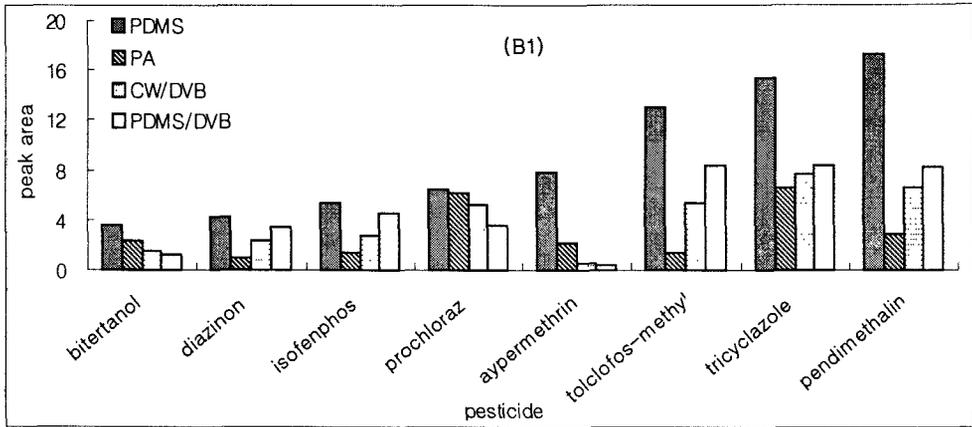


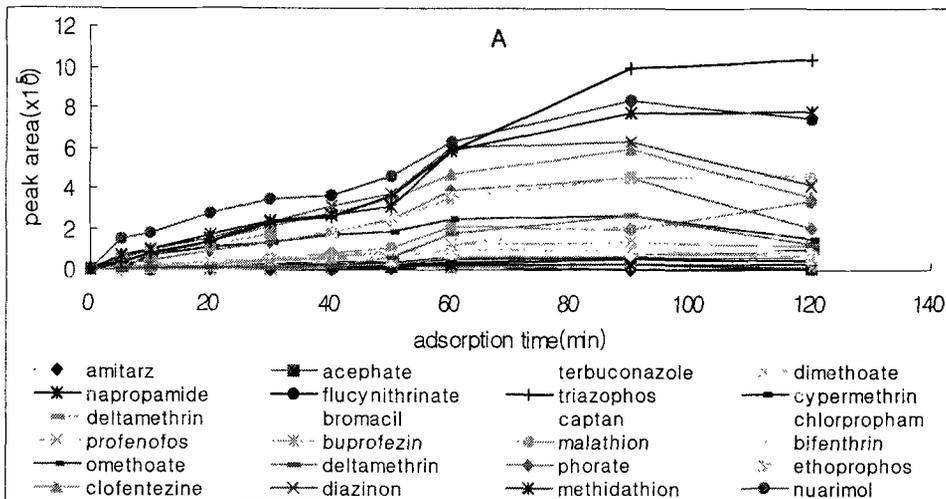
그림 5. 계속.

## 2) 최적 수착과 탈착시간

각 농약들에 대하여 수착시간에 따른 수착량을 그림 6에 나타내었다. 그림 6(A), (B)는 추출시간이 증가함에 따라 계속 수착된 양이 증가하는 농약들을 나타내었고 그림 6(C)는 추출시간이 증가함에 따라 수착된 양도 증가하는 농약들을 나타내었다.

그 결과에서 대부분의 농약들은 추출시간이 경과함에 따라 수착량이 증가하였고 60분까지는 수착량이 증가하다가 그 이후에는 수착량의 변화가 완만하였다. 좀 더 자세히 살펴보면 vinclozolin, endosulfan 등과 같은 분자량이 큰 농약들은 수착시간이 증가함에 따라 수착되는 양이 증가하였다. 반면에 acephate, chlorpropham 등의 분자량이 상대적으로 작은 농약들은 대부분 수착시간이 90분 이후부터 수착량이 일정하거나 약간 감소되는 경향을 보였다. 1997년 Ai에 의하면 서로 다른 화학적 성질을 갖는 농약들은 SPME에서 다른 양상을 보인다고 하였고 그 결과 PDMS fiber에서 log  $P_{ow}$ 가 3.8 이상인 화합물의 경우에 평형시간이 더 오래 걸린다고 하였다.

최적 수착시간을 결정하기 위한 실험결과에서 농약들마다 수착시간의 변화에 따른 수착량의 경향이 각기 다르기 때문에 분석시간과 농약의 감도를 고려해서 수착시간은 50분이면 충분하였으므로 최적 수착시간을 50분으로 결정하였다. 탈착시간은 10분으로 하였을 때 더 이상 잔류하는 peak 들은 존재하지 않았다. 따라서 최적 수착시간은 50분, 탈착시간은 10분으로 하였다.



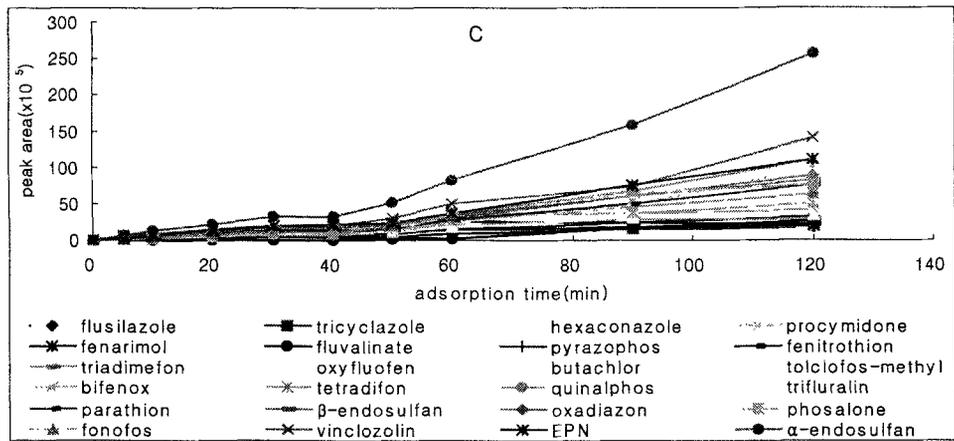
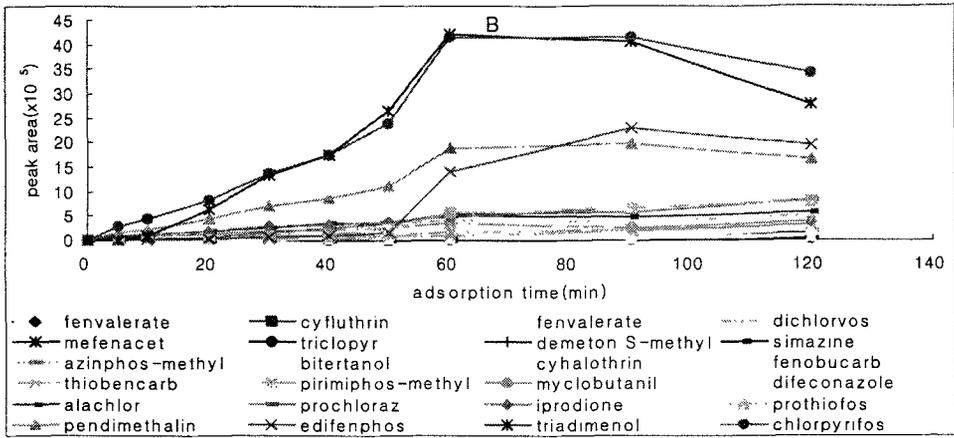


그림 6. 농약들의 SPME 흡착시간.

### 3) 추출용매와 염 효과

농산물에 흡착되어 있는 잔류농약을 추출해 내기 위해서는 불가피하게 유기용매를 사용해야 한다. 유기용매를 많이 사용할 경우, 농축효과가 생기고 fiber 수착제에 늘어붙게 되므로 소량의 유기용매를 사용해야 한다. 그러나 유기용매를 너무 소량 사용하게 되면 일정량의 농산물을 충분히 적시지 못하고 정량적으로 농약들을 추출해낼 수 없다. 따라서 유기용매의 최적 사용량을 결정해야 한다. 또한 용액에서 분석물의 용해도가 감소하면 수착제로의 추출율이 증가하기 때문에 유기용매의 영향을 조사하였다.

2001년 Fernandez 등에 의하면 아세톤은 높은 추출효율과 휘발성 및 적은 유해성 때문에 추출용매로서 가장 많이 사용된다고 하였다. 따라서 본 연구에서 유기용매로는 아세톤을 사용하였다.

아세톤 함량에 따른 농약들의 추출효율을 비교한 결과를 그림 7에 나타내었다. 그 결과에서 일반적으로 분석대상 농약들은 아세톤의 함량이 증가할수록 대부분의 농약들은 수확량이 감소되거나 일정한 경향을 나타내었다. 좀 더 자세히 살펴보면, acephate를 비롯한 20종 농약들은 아세톤의 함량이 증가함에 따라 추출되는 양도 증가하였으나 23종의 농약들이 유기용매의 함량이 1%일 때 추출율이 가장 높았고 [그림 7(B)], 20여종의 농약들은 유기용매의 함량이 5%일 때 추출율이 가장 높은 것으로 나타났다 [그림 7(C)]. 또한 분석대상 농약의 28%는 유기용매의 함량이 증가할수록 대부분의 농약들은 추출율도 증가하는 경향을 나타내었다 [그림 7(D)]. 그러나 ethoprophos 등 8종의 농약들은 유기용매를 첨가하지 않은 순수한 탈염수에서 추출율이 가장 높았다 [그림 7(A)]. 물에 대한 용해도가 작은 농약들은 대부분 순수한 탈염수에서 추출율이 가장 높았다.

SPME는 유기용매를 사용하지 않는 장점을 가지고 있으나 불가피하게 사용해야 할 경우 그 사용량을 최소화하는데 목표를 두어야 한다. 따라서 본 실험결과를 바탕으로 아세톤의 사용량은 1%로 결정하였다.

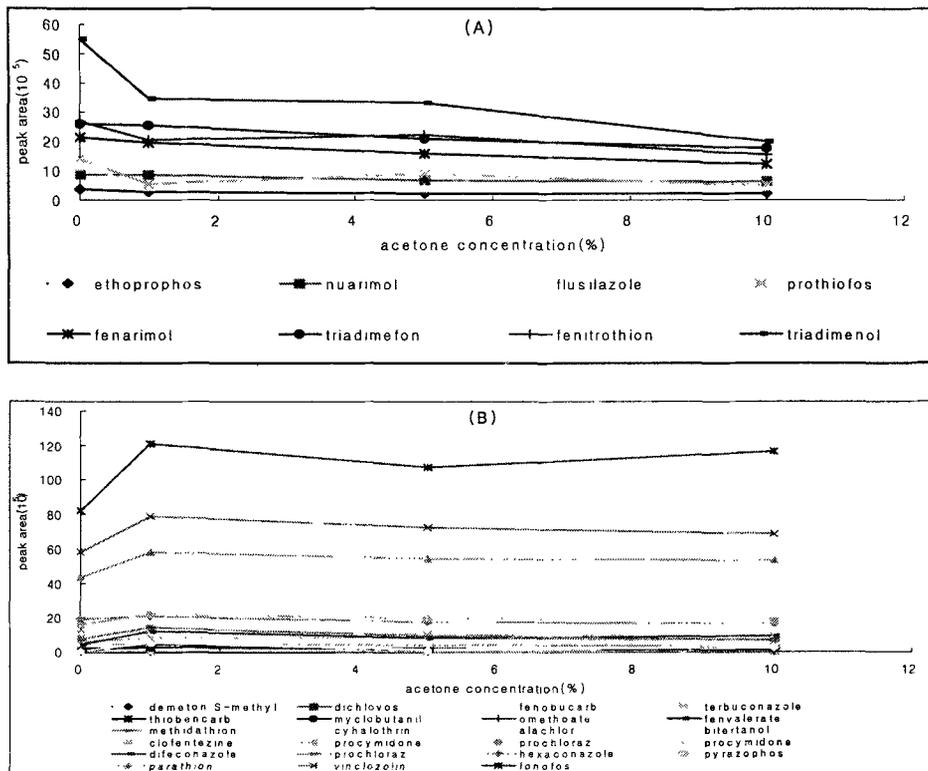


그림 7. 아세톤 농도에 따른 SPME로부터 탈착된 농약들의 피크 면적.

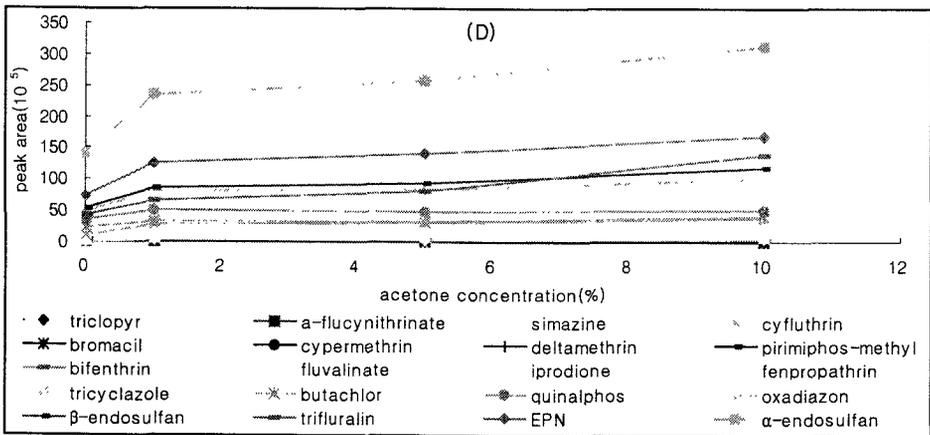
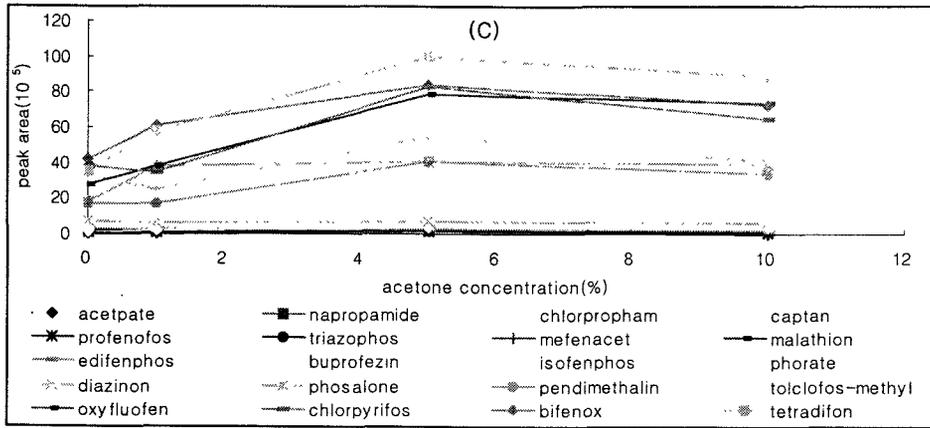


그림 7. 계속.

농약들은 fiber 정지상에서 친화성보다 물에 대한 용해도가 크기 때문에 이온세기를 조절하게 된다. 염을 첨가함으로써 농약들의 물에 대한 용해도가 감소한다면 (salting-out) fiber 정지상에 수착되는 양이 증가할 것이다. 그러나 물에 대한 용해도가 낮은 농약들은 농산물 시료로부터 수용성 매체로 추출되는 것이 염에 의해서 감소되기 때문에 fiber에 수착되는 양이 작아지는데 (salting-in) 본 실험에서는 이 두 가지 효과가 동시에 나타난다. 일반적으로 염을 첨가하여 이온세기가 변하면 농약의 물에 대한 용해도가 작아져 수착제로 추출율이 증가된다.

순수한 탈염수에 NaCl를 일정량을 첨가하여 실험한 결과를 그림 8에 나타내었다. 그 결과에서 33종의 농약에 대하여 5% 염이 포함된 용액에서의 추출효율이 가장 좋은 것으로 나타났다 [그림 8(A)]. 이것은 대부분의 농약들에 대해서 NaCl 첨가 시 물에 대한 분석물의 용해도가 작아지므로 fiber로 추출되는 양은 증가한다. 또한 이온세기가 증가할

수록 추출량은 감소되었다. Terbuconazole의 9종의 농약들은 염의 양이 증가할수록 fiber로 수확되는 양이 증가하였고, triclopyr는 염을 첨가하지 않았을 때 가장 수확되는 양이 많았다 [그림 8(C)].

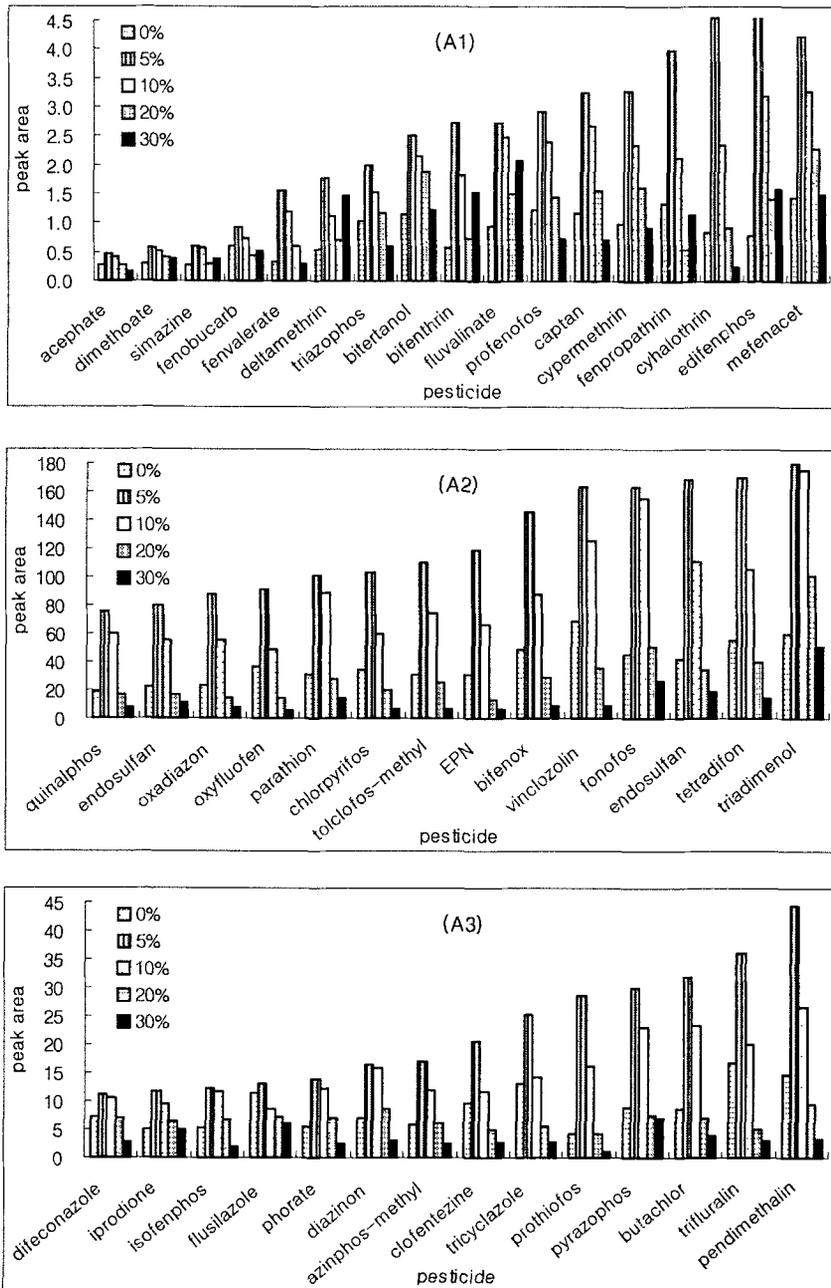


그림 8. NaCl 농도에 따른 추출효율.

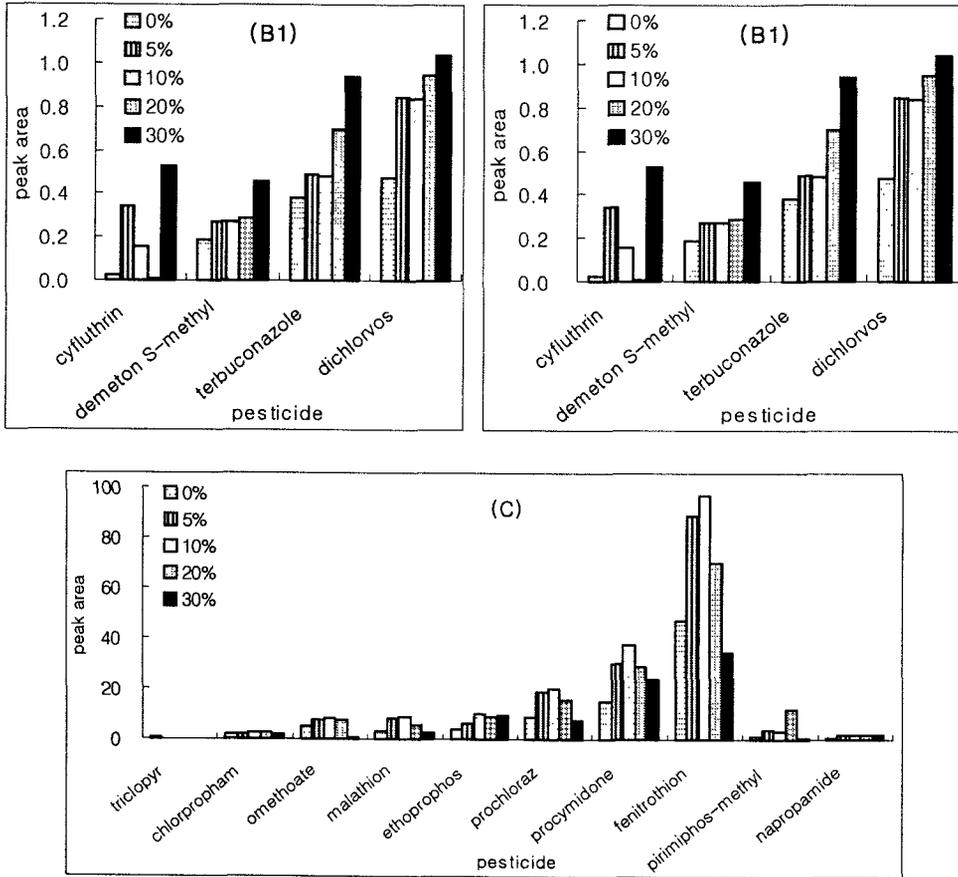


그림 8. 계속.

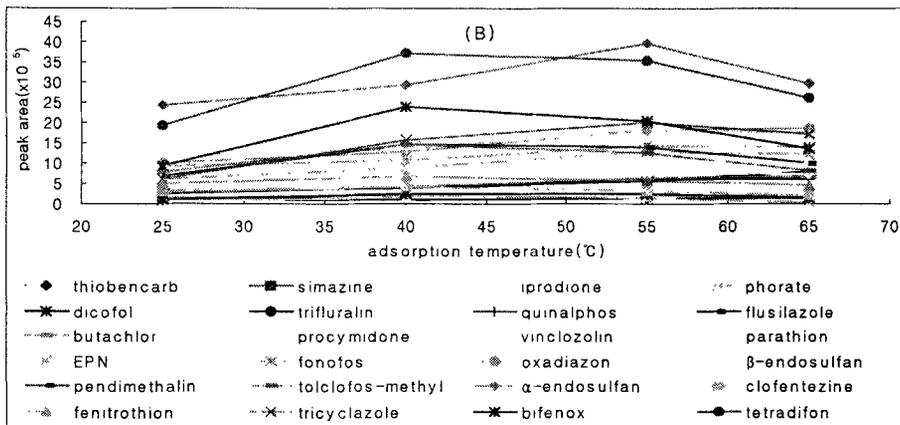
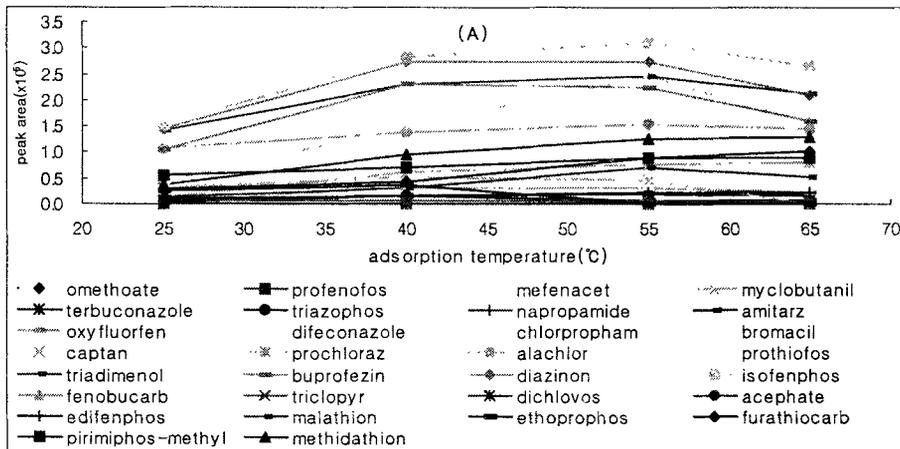
#### 4) 수확온도의 효과

수확온도는 SPME 방법에서 상반되는 효과를 가져다준다. 그것은 fiber 평형이 발열 반응이기 때문에 수확온도가 증가하면 분석물의 회수율과 수확 평형시간은 감소하고 분석물의 시료 상층부/시료의 분배계수는 증가하며 동시에 fiber 정지상/시료 상층부의 분배계수는 감소한다. 따라서, SPME에 의한 분석물의 분배계수는 온도에 의존함으로 순수한 물에서 fiber로 추출된 분석물의 수확량과 수확온도의 변화를 알아보기 위해 25, 40, 55, 65°C의 4가지 온도조건에서 물과 fiber 간의 추출율을 비교하였다. 그 실험결과를 그림 9에 나타내었다.

그 결과에서 대부분의 농약들은 일반적으로 추출온도가 증가할수록 추출량이 감소하거나 거의 평형에 도달하는 경향을 보였고, cypermethrin를 비롯한 17종의 농약들은 추출온도가 높을수록 더 많이 추출되었다. 좀 더 자세히 살펴보면, chlorpropham 등의 농

약들은 40℃ 또는 55℃에서 최대 수착량을 보였고, 그 이상의 온도에서는 수착량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, azinpos-methyl과 같은 농약들은 55℃에서 최대 수착량을 보인 다음 그 이후의 온도에서는 거의 평형에 도달하였다 [그림 9(A), (B)]. Cyhalothrin, deltamethrin 등의 농약들은 수착온도가 증가함에 따라 그 수착량이 증가하여 65℃에서 가장 수착량이 컸고 [그림 9(C)], 이들 농약들은 수착 온도를 65℃ 이상으로 증가하면 그 수착량이 훨씬 클 것으로 예상되었다. Pyrethroid계 농약들은 분자량이 크기 때문에 평형에 도달하는데 시간이 오래 걸리는 것으로 보인다 [그림 9(A), (B)].

일정한 시간에 대하여 온도가 증가하면 용액으로부터 fiber로 수착되는 양은 증가하지만 fiber 수착된 화합물들의 양은 감소한다. 따라서 본 실험결과에서는 안전성과 감도를 고려하여 최적 수착온도를 55℃로 결정하였다.



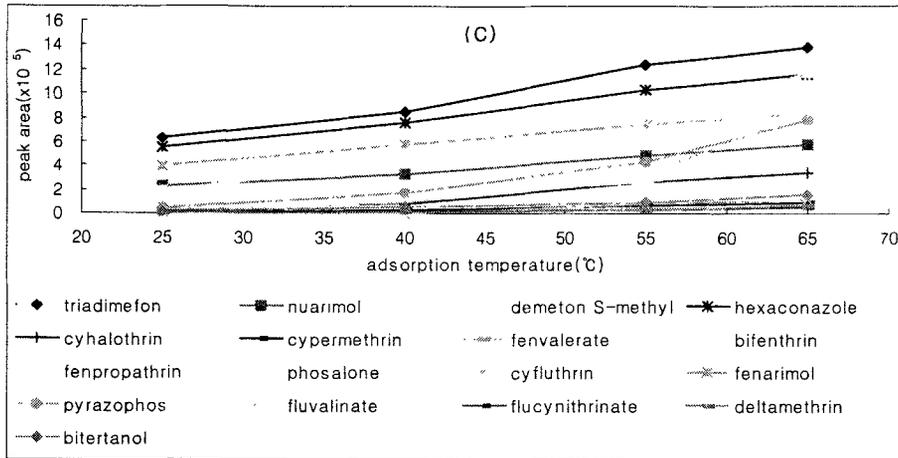


그림 9. 온도에 따른 추출효율.

### 5) 수확용기의 크기

Fiber에 수확되는 양은 fiber 정지상의 부피, 분배계수, 시료의 농도와 부피에 의존한다. 따라서, 본 실험에서 시료부피에 따른 수확량을 조사한 결과를 그림 10에 나타내었다. 그 결과에서 prothiofos, triflurarín, fonofos, pirimifos-methyl, quinalpos의 13종을 제외하고는 시료용량에 따라 수확되는 농약의 양은 거의 비슷하거나 증가하였다 [그림 10(A)~(C)].

### 다. 농산물의 분석

물 중 농약들의 예비실험을 통해 확립한 SPME 수확제에 의한 수확조건들의 최적화를 바탕으로 실제 농산물 중 잔류농약 분석에 적용하기 위해 시료 matrix 효과와 방해물의 영향을 최소화하기 위하여 시료를 물로 희석하여 실험하였다. 물의 묽힘 비율이 너무 작으면 fiber에 농축되는 아세톤의 양이 증가하여 농약의 추출효율이 낮아진다. 그러나 물의 묽힘 비율이 너무 크면 농약들의 검출한계를 구하기 어렵다. 따라서 본 실험에서는 물의 묽힘 비율을 1 : 10으로 하였다. 물의 묽힘 비율에 따라 시료로부터 수확제로 농약들을 최대로 추출하기 위한 보문들이 많다. 1999년 Simplicio 등에 의하면 negative matrix effect를 감소시키기 위해 유기인계 8종에 대하여 70% 이상의 회수율 (순수한 물에서의 회수율과 비교해서)을 얻기 위해서는 시료를 50배 이상 물로 묽혀야 하고, 100배까지 묽힐수록 회수율이 증가한다고 하였다. 1998년 Jimenez 등은 꿀 중 유기인계와 유기염소계 농약을 정량하기 위해 물로 5~50배로 묽혀 묽힘비에 대한 영향을 조사하였다.

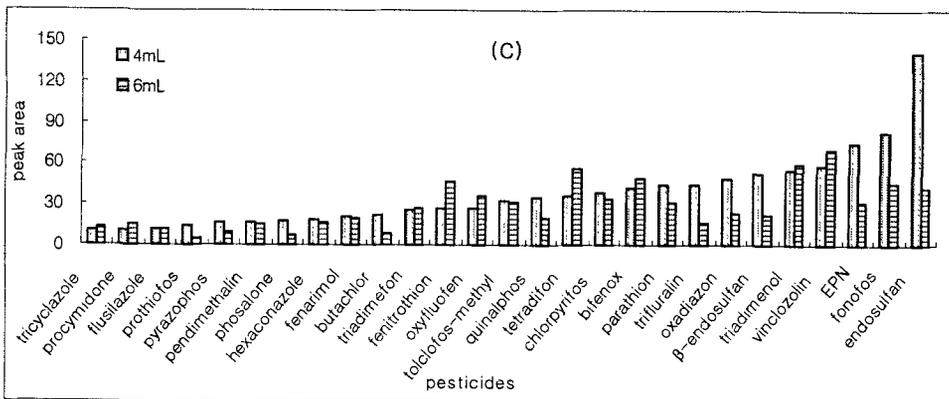
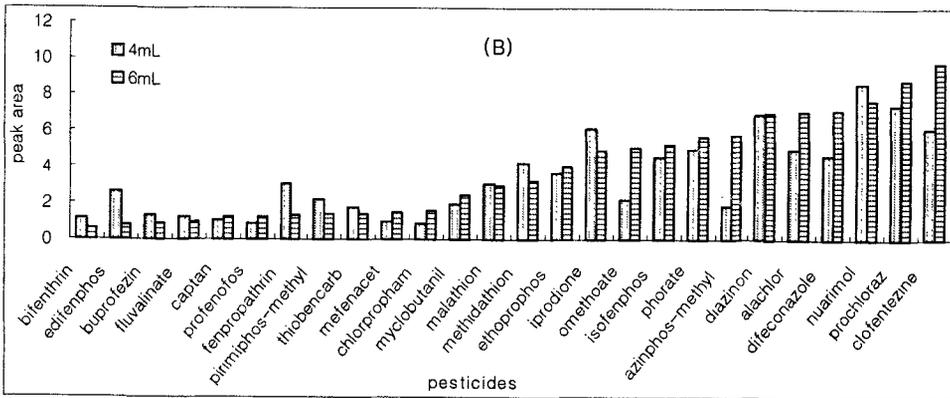
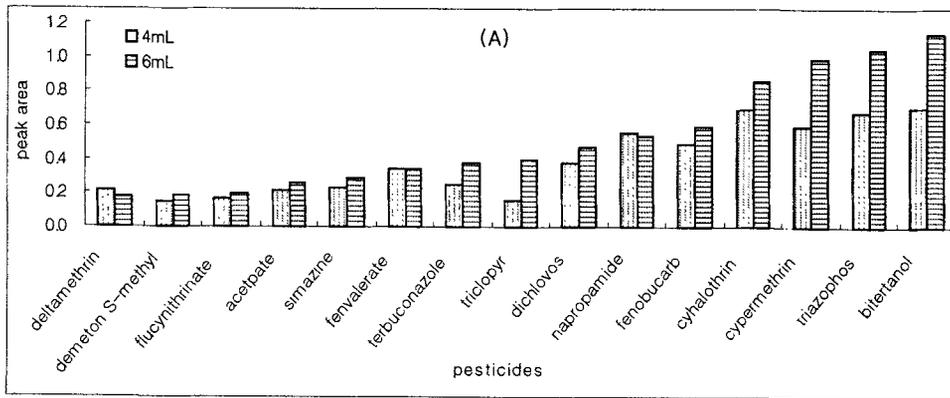


그림 10. 시료용량이 미치는 효과.

농산물 중 농약을 추출하기 위해서는 불가피하게 유기용매를 사용해야 한다. 유기용매의 양을 가능한 한 적게 하되 10g의 농산물이 충분히 적셔지도록 하기 위해 4 ml를 사용하기로 결정하였다.

대부분 잔류농약 분석에서 사용된 SPME 방법은 농약들이 반휘발성 성질을 가지고 있어 공간 추출법 (headspace extraction)보다 오히려 시료용액에 수착제를 직접 담그어 추출하는 직접 담금질 방법이 주로 사용되므로 본 연구에서도 직접 담금질 방법을 사용하였다.

풋고추를 비롯한 4가지 농산물의 수분 함량을 측정하기 위해 무처리 시료 10g을 무계법에 의해 측정하여 오븐 안에서 110℃에서 완전히 건조시킨 후 수분 함량을 측정하였다. 그 결과를 2반복하여 측정한 평균값은 풋고추가 91.2%, 당근이 88.3%, 감자가 85.0%, 그리고 무는 96.3%이었다.

#### 1) 원심분리기에 의한 분리

시료 중 불순물 (침전물 포함)을 제거하여 fiber와 GC 검출기를 보호하기 위하여 여과와 원심분리 하는 방법을 각각 처리하지 않은 것과 비교하였다. 그 중 원심분리에 대한 결과를 표 9에 나타내었다.

그 결과에서 여과나 원심분리한 시료의 경우에 매우 맑은 용액을 얻었으며 이것은 fiber를 오래 사용할 수 있게 하였다. 또한 원심분리한 시료를 각각 처리하지 않은 시료와 비교해 볼 때 대부분의 농약들에 대하여 추출된 양이 거의 비슷하였다. 여과는 원심분리와 비교하여 비용면에서 비경제적이므로 본 실험에서는 시료 중 불순물을 제거하고 맑은 상층액을 얻기 위해 원심분리를 선택하였다.

#### 2) 수착 fiber의 세척

추출액으로부터 분석물을 수착시킨 fiber를 세척시간에 따라 분석한 결과, fiber의 세척시간은 10초 이내면 충분하였고 씻어주는 시간이 30초까지는 정량하는 데 이상이 없었다. 따라서 본 실험에서 추출액으로부터 농약들을 수착시킨 fiber를 탈염수에 10초 동안 씻어주었다.

표 9. 농약을 원심분리한 것과 하지 않은 것의 비교

번호	농 약	Ratio*	번호	농 약	Ratio*
1	dichlorvos	0.75	25	buprofezin	1.07
2	acephate	0.63	26	oxyfluorfen	0.78
3	omethoate	0.78	27	triazophos	1.21
4	chlorpropham	0.76	28	terbuconazole	0.80
5	phorate	0.96	29	bifenox	0.95
6	dimethoate	-	30	tetradifon	0.77
7	diazinon	0.93	31	azinphos-methyl	0.71
8	tolclofos-methyl	0.91	32	mefenacet	1.04
9	alachlor	1.01	33	amitarz	-
10	fenitrothion	1.06	34	alpha-cyhalothrin	-
11	bromacil	1.35		beta-cyhalothrin	-
12	malathion	1.77		gamma-cyhalothrin	0.64
13	chlorpyrifos	0.47		delta-cyhalothrin	1.18
14	dicofol	-	35	clofentezine	0.84
15	pendimethalin	0.87	36	alpha-bitertanol	1.03
16	captan	1.09		beta-bitertanol	-
17	isofenphos	0.99	37	prochloraz	1.50
18	alpha-triadimenol	-	38	alpha-cypermethrin	0.74
	beta-triadimenol	1.28		beta-cypermethrin	1.12
19	chinomethionat	-		gamma-cypermethr in	0.96
20	napropamide	1.18		delta-cypermethrin	1.25
21	tricyclazole	0.96	39	alpha-fenvalerate	0.68
22	prothiofos	1.70		beta-fenvalerate	0.39
23	profenofos	-	40	alpha-difenoconazol e	1.23
24	myclobutanil	0.93		beta-difenoconazole	1.38

\*: Centrifuge peak area/not centrifuge peak area.

### 3) 농약들의 감응 선형성

농산물별 구성 matrix 성분들이 다양하고 달라서 농약 추출액의 물리·화학적 성질이 다르기 때문에 SPME fiber에 의한 농약 수차량 (다른 수차 실험조건은 일정할 경우)이 달라지는가에 따라서 표준물 검정법의 올바른 선정이 필요하다. 정확한 분석결과를 얻으려면 바탕성분이 같은 바탕농산물을 허용하는 표준물 첨가법이 수반되어야 한다. 따라서 농산물별 바탕시료에 각 농약의 농도가 0.01, 0.05, 0.10 및 1.00 ppm이 되도록 조제한 다음에 GC/ECD-NPD와 SPME로 분석하였다.

79종 농약의 표준 검정곡선을 작성하기 위해 풋고추를 비롯한 7가지 농산물에 대하여 0.01 또는 0.05~1.00 ppm의 농도범위에서 분석하였다. 각 농산물에 대한 직선식과 회귀계수, 그리고 검출한계를 <부록 1>에 나타내었고, 그 중 대표적으로 풋고추에 대한 0.01~1.00 ppm의 농도별 크로마토그램을 <부록 3>에 나타내었다. 각 농약에 대한 검출모드는 거의 비슷하지만 농산물에 따라 동일하지 않으며 검출모드는 단지 농도에 따른 데이터를 얻기 위해 사용되었다.

그 결과에서 각 matrix에 따라 검출된 농약의 종류는 다른 불순물에 의한 방해 때문에 약간씩 달랐으나 각 농약들은 matrix에 상관없이 감응세기가 거의 비슷하였다. 풋고추와 당근 시료는 머무름 시간이 약 10분까지 방해물질이 많이 검출되기 때문에 dichlorvos와 acephate가 방해물 피크와 겹쳐서 정량하지 못하였다. 지방이 많이 포함된 농산물인 옥수수과 콩의 경우, 지방이 fiber에 달라붙어 대다수 농약들의 직선식을 얻지 못하였고 좋은 선형성을 얻지 못하였다. 또한 이들 시료는 농약의 감응세기가 다른 수분이 많이 포함된 농산물의 것과 비교할 때 대략 10배 정도 작았다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 농약을 추출한 다음, 지방산을 zinc acetate나 zinc chloride와 반응시켜 물에 녹지 않는 zinc carboxylate를 생성시키도록 하여 맑은 상층액을 얻어 실험해 보았으나 zinc carboxylate가 침전하는데 시간이 많이 소요되었고 효과도 거의 없었다.

위 결과를 좀 더 자세히 살펴보면, 검정식을 작성한 결과, 상관계수 ( $R^2$ )는 풋고추에서 5종 농약을 제외하고 0.9913~1.0000 범위이었고, 당근에서 5종 농약을 제외하고 0.9909~1.0000 범위이었고, 무에서 9종 농약을 제외하고 0.9907~1.0000 범위이었고, 감자에서 8종을 제외하고 0.9908~1.0000이었다. 가공식품인 두부는 8종 농약을 제외하고 0.9909~1.0000 범위이었으며 콩과 옥수수는 지방에 의한 fiber로의 농약추출이 감소되어 대부분 상관계수가 좋지 못하였다. 각 농산물에 대하여 대부분의 농약의 상관계수가 0.9900 이상으로 좋은 직선성을 얻었으며 상관계수가 0.9900 이하인 농약들은 감응이 작

거나 비슷한 머무름 시간을 가지는 농약성분과 부분적으로 겹쳐서 정확한 peak 면적을 얻지 못했기 때문이라고 생각된다.

식품공전을 살펴보면 본 실험대상의 농약 허용단계는 농작물마다 다르고 그 범위는 0.01~50 ppm이다. 본 실험에 사용된 농약은 0.01~1.00 ppm으로 거의 모든 농작물에 적용할 수 있다고 생각된다.

시료에 첨가된 농약을 사용하여 noise에 대해 3배의 signal 값 ( $S/N = 3$ )에서 측정된 검출한계는 풋고추에서 6.94 ng (beta-flucynithrin) 이하, 당근은 5.32 ng (acephate) 이하, 감자에서 50 ng (amitraz) 이하, 무에서 32.28 ng (terbuconazole) 이하, 두부에서 15.28 ng (delta-cyfluthrin) 이하, 콩에서 28.67 ng (gamma-cyhalothrin) 이하, 옥수수에서 9.09 ng (gamma-cyhalothrin) 이하이었다.

#### 4) 표준농약 첨가법에 의한 평가

##### 가) 기체 크로마토그래피 (GC)

표준물 첨가법에 의한 표준농약의 검정법 결과에서 풋고추를 비롯하여 수분이 많이 포함된 4가지 농산물 대부분의 잔류농약 분석결과에서 재현성 및 직선성을 확인하였다. 이 결과들을 바탕으로 본 연구에서 개발된 검색법을 적용시키기 위해 위에서 검정법으로 농도별 직선성이 확인된 4가지 농산물에 무처리 시료와 무처리 시료에 표준농약을 0.1 ppm 첨가하여 두 분석결과를 비교, 평가하였다.

검색법에 의한 분석결과에서 4가지 시료중 대표적으로 풋고추의 감응비와 잔류농약의 농도를 <부록 1>에 나타내었고, 그 크로마토그램을 <부록 3-1>에 나타내었다. <부록 3-1>은 각 검출기별로 무처리 시료의 크로마토그램과 0.1 ppm의 표준농약을 첨가하여 얻은 두 개의 크로마토그램을 software 상에서 한 개의 크로마토그램이 되도록 겹쳐서 나타내었다. 농약의 정성은 머무름 시간과 ECD/NPD 감응비를 바탕으로 이루어졌고 농약의 규제치인 0.1 ppm 이하 또는 이상을 검색한 결과, 풋고추에서 prochloraz, iprodione가 검출되었다.

##### 나) 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)

3차년도 연구내용의 농산물은 4종이었으나 본 연구결과에서는 7종 농산물 (밭, 콩, 파인애플, 포도, 오렌지, 키위와 토마토)을 대상으로 10종 농약들을 첨가해서 SPME HPLC (UV 검출기와 형광 검출기)로 분석하였다.

대표적으로 콩 시료를 SPME-HPLC/UV 검출기/형광 검출기로 분석한 크로마토그램은 <부록 3-4>, A와 B에서 보여주는 바와 같다. 쌀 시료를 포함한 7종 농산물에 농약들은 첨가시킨 시료를 (각 시료별 0.20 ppm) SPME로 추출하고 HPLC의 UV 검출기로 분석한 각 농약들의 회수율은 표 10에 나타내었다.

표 10. 농산물 별로 각 농약들의 회수율 (%)

번호	농 약	1	2	3	4	5
		포도	오렌지	키위	토마토	상추
1	imidaclopril	117	-	83	116	60
2	carbofuran	92	112	126	-	162
3	carbaryl	206	237	114	103	102
4	E-dimethomorph	91	-	74	106	137
	Z-dimethomoyth	61	61	74	88	74
5	methiocarb	189	152	75	83	91
6	diflubenzuron	126	129	139	125	138
7	teflubenzuron	102	560	243	690	377

위의 결과에서 5종의 농산물 중 7가지 농약의 회수율은 대부분 농약에서 80% 이상이였다. 이러한 결과는 농산물의 구성성분에 의한 방해 영향이 정도 차이가 있지만 기여하는 것으로 판단된다.

#### 5) 공정시험법에 의한 분석결과와 비교

본 연구에서 개발된 검색법으로 분석한 결과를 국립농산물품질관리원 (경기지소)에서 분석된 결과와 비교하였다. 분석대상의 농산물은 신선초, 부추, 시금치이였다. 그 중 대표적으로 신선초의 크로마토그램을 <부록 3>에 나타내었다.

그 결과, 대표적으로 procymidone은 공정시험법 결과에 대하여 신선초에서 70%, 부추에서 80%, 시금치에서 70%가 회수되였다. 부추에서 methidathion은 82%가 회수되였다.

## 5. 결 론

고체상 미량 추출법에 의한 79종 잔류농약을 분석하기 위해 수행된 본 연구의 중요한 결론을 요약하면 다음과 같다.

가. 본 연구에서 GC의 분석 컬럼으로서 DB-5 컬럼 (cross-linked 5% phenylmethyl siloxane)을 사용한 결과, 79종 농약의 대부분이 분리되었고 GC/ECD-NPD와 one-port/dual capillary system에 의해 ECD와 NPD의 데이터를 동시에 수집하여 얻은 결과들은 농약들의 ECD/NPD 감응과 감응비를 이용하여 농산물 중 잔류농약을 정성하는데 매우 유용하였다.

나. 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber에 최적 수착조건으로서 농약들의 수착시간은 5분간이었고 GC에서의 탈착시간은 270°C에서 10분간이었다. HPLC에서는 용출시간은 5분간이었다. 또한 수착용액의 pH는 7 정도였고 수착온도는 실온이었다. 수착이 잘 되지 않는 농약들은 유기인계 농약이나 pyrethroid계 농약들이었으며, 그 이외에도 captan외 6종이었다.

다. 농산물로부터 농약을 추출하기 위해서 사용된 아세톤의 양은 10g의 농산물이 모두 적셔지도록 4~5 ml를 사용하였고, 물로 희석시킨 추출과정에서 79종의 농약들은 염 용 효과와 염석 효과를 모두 나타내어 농산물 분석에서는 염을 첨가하지 않도록 하였다. 또한 불순물들을 제거하고 깨끗한 용액을 얻기 위해 원심분리를 하였다. 또한 추출액으로부터 농약들을 수착 시킨 fiber를 탈염수로 10초 동안 세척하여 분석을 하였다.

라. 풋고추를 비롯한 농산물 19종에 대하여 GC로 분석한 결과에서 0.01 또는 0.05~1.00 ppm의 농도범위에서 대부분 농약의 상관계수가 0.9900 이상으로 좋은 직선성을 얻었다. 그러나 콩이나 옥수수과 같은 유지방 농산물의 경우에는 SPME 수착제로의 농약들의 추출율이 매우 낮았다. 검출한계는 각 농산물 별로 6.94~50 ng범위 이하이었다.

마. 본 연구에서 개발된 농산물 중 잔류농약 동시분석법은 79종의 표준농약들을 농산물에 0.10 ppm 되게 첨가시킨 시료와 같은 matrix 시료를 각각 분석한 결과들 (크로마토그램들)을 비교해서 농약의 규제치 (0.10 ppm) 이하 또는 이상을 바로 판정할 수 있

었다.

바. 본 연구에서 개발된 검색법은 분석과정이 간단하고 신속하며 용매와 시약들을 소량 사용하여 환경친화적이고 규제농약의 쉬운 판정을 할 수 있다. 따라서 현행 사용되고 있는 공전법의 다성분 잔류분석법에 비해 훨씬 신속하며 비용효율성이라고 생각된다.

# 부 록

여 백

부록 1. 농산물별 농약농도와 검정관계식.(계속)

꽃고추-group A					
No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	-	-	-	-
2	acephate	-	-	-	-
3	omethoate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.651x + 0.081$	0.9640
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 5.491x + 0.275$	0.9987
5	phorate	ECD	0.01-1.0	$y = 3.486x + 0.564$	0.9984
6	dimethoate	ECD	<0.1	-	-
7	diazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 9.184x + 0.532$	0.9978
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 15.685x + 0.562$	0.9986
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 8.774x + 0.579$	0.9999
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 20.698x + 1.369$	0.9976
11	bromacil	ECD	0.01-1.0	$y = 24.708x + 0.775$	0.9968
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 6.869x + 0.635$	0.9992
13	chlorpyrifos	NPD	0.01-1.0	$y = 2.256x - 0.072$	0.9997
14	dicofol	NPD	0.01-1.0	$y = 3.261x - 0.029$	0.9963
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.547x + 0.129$	0.9966
16	captan	ECD	0.01-1.0	$y = 0.639x + 0.151$	0.8362
17	isofenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 4.813x + 0.790$	0.9962
18	alpha-triadimenol	ECD	a	-	-
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 1.573x + 0.082$	0.9990
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 1.483x + 0.077$	0.9990
20	napropamide	ECD	0.01-1.0	$y = 25.908x + 1.359$	0.9990
21	tricyclazole	ECD	<0.1	-	-
22	prothiofos	ECD	a	-	-
23	profenofos	ECD	0.01-1.0	$y = 14.280x + 0.721$	0.9970
24	myclobutanil	ECD	0.01-1.0	$y = 2.345x - 0.065$	0.9997
25	buprofezin	ECD	0.01-1.0	$y = 8.122x - 0.202$	0.9992
26	oxyfluorfen	ECD	0.01-1.0	$y = 7.445x - 0.185$	0.9992
27	triazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 0.683x + 0.146$	0.9995
28	terbuconazole	ECD	0.05-1.0	$y = 0.585x - 0.005$	0.9996
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 25.562x + 0.435$	0.9987
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 20.146x + 0.720$	0.9966
31	azinphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 3.398x + 0.032$	0.9998
32	mefenacet	NPD	0.01-1.0	$y = 0.432x + 0.005$	0.9998
33	amitarz	NPD	<0.1	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.492x + 0.022$	0.9992
	delta-cyhalothrin	ECD	<0.1	-	-
35	clofentezine	ECD	0.01-1.0	$y = 3.508x + 0.790$	0.9841
36	alpha-bitertanol	NPD	0.01-1.0	$y = 2.350x + 0.165$	0.9987
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 8.251x + 0.481$	0.9989
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.446x + 0.150$	0.9872
	beta-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.245x + 0.191$	0.9400
	gamma-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 1.100x + 0.101$	0.9913
	delta-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.326x + 0.557$	0.9235
39	alpha-fenvalerate	ECD	<0.1	-	-
	beta-fenvalerate	ECD	<0.1	-	-
40	alpha-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 1.885x + 0.160$	0.9999
	beta-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 5.354x + 0.177$	0.9994

꽃고추-group B

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	NPD	0.01-1.0	$y = 2.034x + 0.248$	0.9878
2	fenobucarb	NPD	0.05-1.0	$y = 0.828x + 0.226$	0.9986
3	demeton S-methyl	ECD	<0.1	-	-
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 6.536x + 0.735$	0.9991
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.761x + 0.121$	0.9852
6	simazine	NPD	0.05-1.0	$y = 0.625x + 0.056$	0.9985
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 28.674x + 1.917$	0.9997
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 32.388x + 1.675$	0.9993
9	pirimiphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 31.070x + 0.217$	0.9993
10	thiobencarb	ECD	0.05-1.0	$y = 0.670x + 0.843$	0.9999
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 12.574x + 0.174$	0.9997
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 15.947x + 0.694$	0.9994
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 15.209x + 0.254$	0.9993
14	furathiocarb	ECD	a	-	-
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 5.839x + 0.200$	0.9996
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 1.058x + 0.036$	0.9996
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 3.537x + 0.121$	0.9996
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 7.472x + 0.920$	0.9914
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 4.343x + 0.559$	0.9996
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 14.605x + 0.187$	0.9999
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 9.879x + 0.671$	0.9996
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 10.163x + 0.342$	0.9999
23	oxadiazon	NPD	0.01-1.0	$y = 3.452x + 0.056$	0.9998
24	flusilazole	NPD	0.01-1.0	$y = 3.478x + 0.099$	0.9987
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 5.481x + 0.414$	0.9985
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 2.331x + 0.057$	0.9962
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 8.346x + 0.188$	1.0000
28	hexazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 0.454x + 0.027$	0.9994
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 6.765x + 0.411$	0.9994
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 19.125x + 0.477$	0.9996
31	bifenthrin	ECD	<1.0	-	-
32	fenpropathrin	ECD	<0.1	-	-
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 18.441x + 0.521$	0.9994
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	ECD	<0.1	-	-
	delta-cyfluthrin	ECD	<0.1	-	-
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 8.916x + 0.303$	0.9994
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 13.104x + 0.834$	0.9988
37	fluvalinate	ECD	<1.0	-	-
38	alpha-flucynithrin	ECD	<1.0	-	-
	beta-flucynithrin	ECD	<1.0	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
	beta-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
	gamma-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
	delta-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
40	alpha-tralomethrin	ECD	a	-	-
	beta-tralomethrin	ECD	a	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	a	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	a	-	-

당근-group A

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	ECD	b	-	-
2	acephate	ECD	<1.0	-	-
3	omethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 3.045x + 2.106$	0.9862
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 19.785x - 0.210$	0.9993
5	phorate	ECD	0.01-1.0	$y = 5.934x + 0.760$	0.9952
6	dimethoate	-	-	-	-
7	diazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 19.822x + 1.398$	0.9999
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 41.193x + 0.271$	1.0000
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 10.646x + 0.938$	1.0000
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 64.699x + 0.618$	0.9999
11	bromacil	ECD	0.01-1.0	$y = 0.375x + 0.003$	1.0000
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 9.052x + 1.419$	0.9986
13	chlorpyrifos	NPD	0.01-1.0	$y = 3.014x - 0.074$	0.9990
14	dicofol	NPD	0.01-1.0	$y = 6.441x - 0.234$	0.9998
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 8.985x - 0.043$	0.9996
16	captan	ECD	0.01-1.0	$y = 1.329x + 0.942$	0.9895
17	isofenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 9.039x + 0.563$	0.9986
18	alpha-triadimenol	ECD	a	-	-
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 88.777x + 0.150$	0.9999
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 83.697x + 0.141$	0.9999
20	napropamide	NPD	0.01-1.0	$y = 9.050x - 0.107$	0.9995
21	tricyclazole	NPD	0.01-1.0	$y = 4.819x - 0.237$	0.9992
22	prothiofos	ECD	0.05-1.0	$y = 0.822x - 0.035$	0.9993
23	profenofos	ECD	0.01-1.0	$y = 36.093x + 0.239$	0.9997
24	myclobutanil	NPD	0.05-1.0	$y = 2.301x - 0.081$	0.9998
25	buprofezin	ECD	0.01-1.0	$y = 16.402x + 1.162$	0.9996
26	oxyfluorfen	ECD	0.01-1.0	$y = 5.843x + 0.429$	0.9995
27	triazophos	ECD	0.05-1.0	$y = 0.963x + 0.263$	0.9969
28	terbuconazole	NPD	0.01-1.0	$y = 2.147x - 0.016$	1.0000
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 66.237x - 1.955$	0.9969
30	tetradifon	ECD	<0.1	-	-
31	azinphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 4.428x - 0.046$	0.9994
32	mefenacet	NPD	0.01-1.0	$y = 5.819x - 0.033$	0.9998
33	amitarz	NPD	<1.0	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.007x + 0.004$	0.9921
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.120x - 0.052$	0.9972
35	clofentezine	ECD	0.05-1.0	$y = 5.704x + 1.379$	1.0000
36	alpha-bitertanol	NPD	0.01-1.0	$y = 3.555x + 0.001$	0.9999
	beta-bitertanol	NPD	0.01-1.0	$y = 0.821x + 0.117$	0.9969
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 7.780x + 0.136$	0.9975
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.594x + 0.050$	0.9971
	beta-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.420x + 0.055$	0.9195
	gamma-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.629x + 0.375$	0.9470
	delta-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.947x + 0.611$	0.9402
39	alpha-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 1.581x + 0.010$	0.9945
	beta-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.978x + 0.277$	0.9785
40	alpha-difeconazole	NPD	0.01-1.0	$y = 2.151x - 0.015$	1.0000
	beta-difeconazole	NPD	0.01-1.0	$y = 2.524x - 0.011$	0.9999

당근 검량-Group B

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	NPD	0.01-1.0	$y = 2.981x + 0.080$	0.9954
2	fenobucarb	NPD	0.05-1.0	$y = 1.158x + 0.162$	0.9950
3	demeton S-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 62.845x - 0.109$	1.0000
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 10.507x + 0.979$	0.9888
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 8.442x + 1.273$	0.9809
6	simazine	ECD	0.01-1.0	$y = 32.331x + 2.592$	0.9954
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 107.420x + 0.350$	0.9998
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 116.110x + 1.421$	0.9999
9	pirimiphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 101.550x - 0.562$	0.9999
10	thiobencarb	NPD	0.01-1.0	$y = 16.019x - 0.264$	0.9992
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 50.734x - 0.670$	0.9996
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 64.375x - 0.825$	0.1000
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 41.010x - 0.162$	0.9994
14	furathiocarb	ECD	0.01-1.0	$y = 2.619x + 1.828$	0.9650
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 11.085x + 0.269$	0.9995
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 9.437x + 0.229$	0.9995
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 31.536x + 0.766$	0.9995
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 21.102x + 1.889$	0.9998
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 8.712x + 1.460$	0.9977
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 44.297x - 0.005$	0.9999
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 23.199x + 0.869$	0.9992
22	hexaconazole	NPD	0.01-1.0	$y = 4.321x - 0.039$	0.9999
23	oxadiazon	NPD	0.01-1.0	$y = 11.008x - 0.081$	0.9998
24	flusilazole	NPD	0.01-1.0	$y = 12.794x - 0.195$	0.9998
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 21.163x + 0.054$	0.9996
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 8.665x + 2.645$	0.9986
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 24.314x + 0.376$	0.9995
28	hexazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 18.304x - 0.076$	0.9909
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 12.624x + 0.217$	0.9993
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 72.526x + 0.212$	0.9999
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.316x + 0.032$	0.9966
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 5.135x - 0.171$	0.9964
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 70.786x - 0.382$	0.9998
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.927x + 0.000$	0.9949
	delta-cyfluthrin	ECD	0.05-1.0	$y = 1.044x + 0.205$	0.9412
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 22.488x + 0.114$	0.9997
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 41.461x + 0.825$	0.9998
37	fluvalinate	ECD	0.01-1.0	$y = 2.843x + 0.032$	0.9941
38	alpha-flucythrinate	ECD	0.05-1.0	$y = 2.078x + 0.123$	0.9989
	beta-flucythrinate	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 7.105x - 0.019$	0.9995
	beta-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.954x + 0.281$	0.9347
	gamma-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 3.529x - 0.119$	0.9996
	delta-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 4.967x - 0.041$	0.9998
40	alpha-tralomethrin	ECD	a	-	-
	beta-tralomethrin	ECD	a	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	a	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	a	-	-

감자-group A

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.713x + 0.389$	0.8651
2	acephate	NPD	0.05-1.0	$y = 3.983x + 0.450$	0.9972
3	omethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 4.513x + 0.333$	0.9996
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 39.622x + 0.310$	0.9997
5	phorate	ECD	0.01-1.0	$y = 10.806x + 0.232$	0.9964
6	dimethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.717x + 0.350$	0.9881
7	diazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 18.117x + 0.867$	0.9988
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 83.803x + 0.551$	0.9979
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 9.810x + 0.496$	0.9993
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 44.867x + 1.906$	0.9991
11	bromacil	ECD	0.01-1.0	$y = 9.601x + 3.004$	0.9515
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 6.695x + 0.857$	0.9923
13	chlorpyrifos	ECD	0.01-1.0	$y = 27.929x + 0.026$	0.9965
14	dicofol	ECD	0.01-1.0	$y = 16.640x + 0.015$	0.9965
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 25.000x + 1.883$	0.9974
16	captan	ECD	0.01-1.0	$y = 1.801x + 0.118$	0.9976
17	isofenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 10.472x + 0.392$	0.9885
18	alpha-triadimenol	ECD	a	-	-
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 5.365x - 0.051$	0.9970
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 5.058x - 0.048$	0.9970
20	napropamide	NPD	0.01-1.0	$y = 14.088x + 0.034$	0.9999
21	tricyclazole	ECD	0.01-1.0	$y = 25.971x + 1.1599$	0.9959
22	prothiofos	ECD	0.01-1.0	$y = 2.220x + 0.080$	0.9960
23	profenofos	ECD	0.01-1.0	$y = 33.552x - 0.015$	0.9938
24	myclobutanil	ECD	0.01-1.0	$y = 2.350x + 0.236$	0.9988
25	buprofezin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.219x + 0.210$	0.9954
26	oxyfluorfen	ECD	0.01-1.0	$y = 36.656x + 2.170$	0.9972
27	triazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 1.687x + 0.084$	0.9983
28	terbuconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 0.624x + 0.084$	0.9985
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 112.310x + 0.506$	0.9979
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 87.667x + 1.484$	0.9985
31	azinphos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 7.390x - 0.107$	0.9972
32	mefenacet	ECD	0.01-1.0	$y = 1.575x - 0.054$	0.9953
33	amitarz	ECD	<0.1	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.216x - 0.024$	0.9957
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.405x - 0.057$	0.9954
35	clofentazine	ECD	0.01-1.0	$y = 17.093x + 1.143$	0.9992
36	alpha-bitertanol	NPD	0.01-1.0	$y = 1.719x + 0.004$	0.9997
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 12.393x - 0.172$	0.9974
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.327x + 0.617$	0.8291
	beta-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.711x + 0.080$	0.9121
	gamma-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.947x + 0.501$	0.9191
	delta-cypermethrin	-	-	-	-
39	alpha-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.936x + 0.193$	0.9908
	beta-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.858x + 0.179$	0.9913
40	alpha-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 2.902x + 0.075$	0.9979
	beta-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 7.218x - 0.066$	0.9974

감자-groupB

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	NPD	0.01-1.0	$y = 3.793x + 0.306$	0.9982
2	fenobucarb	NPD	0.01-1.0	$y = 1.373x + 0.215$	0.9952
3	demeton S-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 51.664x + 1.875$	0.9983
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 5.564x + 0.391$	0.9997
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 34.175x + 3.100$	0.9886
6	simazine	ECD	<0.1	-	-
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 85.865x + 2.651$	0.9997
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 85.063x + 2.391$	0.9997
9	pirimiphos-methyl	ECD	0.05-1.0	$y = 1.781x + 0.675$	1.0000
10	thiobencarb	ECD	0.05-1.0	$y = 1.635x + 0.923$	0.9972
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 65.946x + 0.902$	0.9997
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 44.934x + 0.353$	0.9996
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 26.967x + 1.200$	0.9999
14	furathiocarb	ECD	<0.1	-	-
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 6.913x + 0.234$	0.9999
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 1.253x + 0.042$	0.9999
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 4.187x + 0.142$	0.9999
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 14.752x + 1.267$	0.9985
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 5.658x + 0.655$	0.9974
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 81.010x + 4.325$	0.9984
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 21.560x + 1.523$	0.9993
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 16.964x + 0.602$	0.9987
23	oxadiazon	ECD	0.01-1.0	$y = 58.429x + 3.611$	0.9995
24	flusilazole	NPD	0.01-1.0	$y = 19.090x + 0.178$	1.0000
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 26.314x + 1.258$	0.9991
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 8.285x + 0.763$	0.9982
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 6.834x + 0.428$	0.9992
28	hexazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 0.599x + 0.009$	0.9999
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 9.520x + 0.155$	0.9999
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 74.569x + 3.4089$	0.9997
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.1908x + 0.1617$	0.9893
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 5.9841x + 0.4673$	0.9958
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 52.74x + 0.5718$	0.9998
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	ECD	<0.1	-	-
	delta-cyfluthrin	ECD	<0.1	-	-
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 17.413x + 0.385$	0.9998
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 24.336x + 0.743$	0.9999
37	fluvalinate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.761x + 0.232$	0.9672
38	alpha-flucynithrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.249x - 0.137$	0.9980
	beta-flucynithrin	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.431x + 0.1861$	0.9286
	beta-deltamethrin	-	-	-	-
	gamma-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
	delta-deltamethrin	ECD	<0.1	-	-
40	alpha-tralomethrin	ECD	a	-	-
	beta-tralomethrin	ECD	a	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	a	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	a	-	-

부-group A

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	ECD	0.01-1.0	$y = 58.476x + 2.594$	0.9992
2	acephate	NPD	0.01-1.0	$y = 7.822x + 20.135$	0.9967
3	omethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 5.087x + 0.632$	0.9990
4	chlorpropham	ECD	0.01-1.0	$y = 2.314x + 0.904$	0.9619
5	phorate	ECD	0.01-1.0	$y = 13.941x + 0.800$	0.9998
6	dimethoate	ECD	<0.1	-	-
7	diazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 28.780x + 0.379$	0.9993
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 118.424x + 0.551$	1.0000
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 12.242x + 0.503$	0.9997
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 83.661x + 0.667$	1.0000
11	bromacil	ECD	0.01-1.0	$y = 2.244x + 2.612$	0.9227
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 10.212x + 0.803$	0.9994
13	chlorpyrifos	ECD	0.01-1.0	$y = 57.835x + 0.693$	0.9999
14	dicofol	ECD	0.01-1.0	$y = 21.593x + 0.259$	0.9999
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 31.557x - 0.604$	0.9996
16	captan	ECD	0.05-1.0	$y = 2.500x + 0.232$	0.9994
17	isofenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 16.718x + 1.050$	0.9975
18	alpha-triadimenol	ECD	a	-	-
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 37.056x + 0.010$	1.0000
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 17.982x + 0.005$	1.0000
20	napropamide	NPD	0.01-1.0	$y = 16.483x - 0.064$	1.0000
21	tricyclazole	ECD	0.01-1.0	$y = 4.524x + 0.359$	0.9991
22	prothiofos	ECD	0.01-1.0	$y = 0.409x + 0.028$	0.9995
23	profenofos	ECD	0.01-1.0	$y = 76.238x - 1.399$	0.9993
24	myclobutanil	ECD	0.01-1.0	$y = 3.403x - 0.143$	0.9995
25	buprofezin	ECD	0.01-1.0	$y = 7.742x + 0.059$	0.9997
26	oxyfluorfen	ECD	0.01-1.1	$y = 90.337x + 1.150$	0.9997
27	triazophos	NPD	0.01-1.0	$y = 4.449x - 0.071$	0.9996
28	terbuconazole	ECD	0.05-1.0	$y = 1.349x + 0.501$	0.0000
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 199.831x - 0.882$	0.9480
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 167.904x + 3.304$	0.9993
31	azinphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 2.964x - 0.059$	0.9973
32	mefenacet	NPD	0.01-1.0	$y = 1.038x - 0.017$	0.9996
33	amitarz	NPD	<0.1	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.334x - 0.068$	0.9993
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.001x + 0.021$	0.9907
35	clofentezine	ECD	0.01-1.0	$y = 23.562x + 1.386$	0.9957
36	alpha-bitertanol	NPD	0.01-1.0	$y = 9.769x - 0.109$	0.9999
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	-	0.01-1.0	$y = 21.687x - 0.497$	0.9976
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 2.206x + 0.136$	0.9936
	beta-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 1.114x + 0.202$	0.9991
	gamma-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.875x + 0.167$	0.9994
	delta-cypermethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 4.506x - 0.162$	0.9986
39	alpha-fenvalerate	ECD	<0.1	-	-
	beta-fenvalerate	ECD	<0.1	-	-
40	alpha-difeconazole	ECD	0.05-1.0	$y = 6.287x - 0.131$	0.9997
	beta-difeconazole	ECD	0.05-1.0	$y = 17.13x - 0.796$	0.9992

7-groupB

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	NPD	0.01-1.0	$y = 3.433x + 0.360$	0.9545
2	fenobucarb	NPD	0.01-1.0	$y = 1.208x + 0.343$	0.8984
3	demeton S-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 59.136x + 1.056$	0.9989
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 7.669x + 0.451$	0.9967
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 5.921x + 0.308$	0.9956
6	simazine	NPD	0.05-1.0	$y = 0.577x + 0.571$	0.9986
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 151.550x + 1.448$	0.9999
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 119.490x + 2.780$	0.9996
9	pirimiphos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 3.461x + 0.713$	0.9979
10	thiobencarb	ECD	0.01-1.0	$y = 4.024x + 0.946$	0.9990
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 102.810x + 0.754$	0.9998
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 85.238x + 0.573$	0.9990
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 85.238x + 0.573$	0.9994
14	furathiocarb	ECD	0.01-1.0	$y = 2.296x + 0.382$	0.9868
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 14.148x + 2.551$	0.9226
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 2.564x + 0.462$	0.9226
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 10.072x - 0.110$	0.9989
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 20.584x + 1.354$	0.9975
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 6.935x + 0.735$	0.9988
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 78.116x + 2.024$	0.9987
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 41.027x + 1.540$	0.9990
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 20.842x + 1.072$	0.9916
23	oxadiazon	ECD	0.01-1.0	$y = 127.160x + 3.509$	0.9995
24	flusilazole	ECD	0.01-1.0	$y = 3.122x + 0.516$	0.9930
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 32.420x + 0.909$	0.9985
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 8.931x + 0.545$	0.9969
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 12.736x + 0.079$	0.9993
28	hexazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 0.614x + 0.030$	0.9915
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 9.762x + 0.484$	0.9915
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 122.320x + 2.411$	0.9997
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.074x + 0.078$	0.9994
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.880x + 0.130$	0.9954
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 98.291x - 0.582$	1.0000
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.262x + 0.057$	0.9246
	delta-cyfluthrin	-	-	-	-
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 21.838x + 0.819$	0.9943
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 53.534x + 0.440$	0.9999
37	fluvalinate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.427x + 0.239$	0.9714
38	alpha-flucyknithrin	ECD	0.01-1.0	$y = 3.969x - 0.002$	0.9968
	beta-flucyknithrin	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.857x + 0.083$	0.9985
	beta-deltamethrin	-	-	-	-
	gamma-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.594x + 0.065$	0.9987
	delta-deltamethrin	ECD	0.05-1.0	$y = 0.296x + 0.067$	0.9073
40	alpha-tralomethrin	ECD	a	-	-
	beta-tralomethrin	ECD	a	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	a	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	a	-	-

두무 - A group

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlofos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.018x + 0.004$	0.8324
2	acephate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.145x + 0.002$	0.9924
3	omethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 1.135x + 0.110$	0.9980
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 0.640x - 0.008$	0.9982
5	phorate	NPD	0.01-1.0	$y = 4.704x - 0.122$	0.9979
6	dimethoate	-	-	-	-
7	diazinon	NPD	0.01-1.0	$y = 6.108x - 0.145$	0.9982
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 20.143x + 0.047$	0.9990
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 3.461x + 0.047$	0.9990
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 13.687x + 0.175$	0.9992
11	bromacil	ECD	0.01-1.0	$y = 0.169x + 0.751$	0.6201
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 2.105x + 0.143$	0.9988
13	chlorpyrifos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.725x + 0.003$	0.9933
14	dicofol	NPD	0.01-1.0	$y = 1.073x - 0.035$	0.9984
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 10.373x + 0.175$	0.9990
16	captan	ECD	0.01-1.0	$y = 0.582x + 0.042$	0.9982
17	isofenphos	NPD	0.01-1.0	$y = 4.685x - 0.107$	0.9984
18	alpha-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 3.110x + 0.131$	0.9991
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 7.268x - 0.049$	0.9992
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 17.696x - 0.119$	0.9992
20	napropamide	NPD	0.01-1.0	$y = 0.411x - 0.008$	0.9979
21	tricyclazole	ECD	0.01-1.0	$y = 6.984x + 0.105$	0.9980
22	prothiofos	ECD	0.01-1.0	$y = 6.901x - 0.134$	0.9988
23	profenofos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.008x + 0.005$	0.9959
24	myciobutanil	NPD	0.01-1.0	$y = 0.109x + 0.001$	0.9886
25	buprofezin	NPD	0.01-1.0	$y = 1.785x - 0.040$	0.9984
26	oxyfluorfen	NPD	0.01-1.0	$y = 0.154x - 0.002$	0.9983
27	triazophos	NPD	0.01-1.0	$y = 1.051x - 0.010$	0.9922
28	terbuconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 0.106x + 0.007$	0.9935
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 23.967x - 0.204$	0.9989
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 26.450x + 0.279$	0.9991
31	azinphos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 2.422x - 0.096$	0.9955
32	mefenacet	ECD	0.01-1.0	$y = 0.719x - 0.025$	0.9974
33	amitarz	NPD	0.05-1.0	$y = 0.195x - 0.009$	0.9986
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.511x - 0.006$	0.9973
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.805x - 0.012$	0.9975
35	clofentezine	ECD	0.01-1.0	$y = 3.853x + 0.356$	0.9995
36	alpha-bitertanol	ECD	0.01-1.0	$y = 0.646x + 0.004$	0.9975
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 5.306x - 0.012$	0.9987
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.668x + 0.134$	0.8889
	beta-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.283x + 0.034$	0.9978
	gamma-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.308x + 0.019$	0.9996
	delta-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.513x + 0.023$	0.9990
39	alpha-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.555x - 0.030$	0.9973
	beta-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.373x - 0.013$	0.9957
40	alpha-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 1.421x - 0.030$	0.9977
	beta-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 2.976x - 0.080$	0.9972

두부 - B group

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	ECD	0.01-1.0	$y = 0.094x + 0.112$	0.9672
2	fenobucarb	NPD	0.01-1.0	$y = 0.103x + 0.005$	0.9951
3	demeton S-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 0.101x + 0.001$	0.9988
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 3.207x + 0.908$	0.9561
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 7.866x + 0.567$	0.9964
6	simazine	-	-	-	-
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 26.847x + 0.603$	0.9999
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 23.325x + 0.735$	0.9991
9	pirimiphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 4.426x + 0.001$	1.0000
10	thiobencarb	NPD	0.01-1.0	$y = 0.644x - 0.003$	1.0000
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 3.184x + 0.011$	0.9999
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 14.615x + 0.708$	0.9993
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 9.594x + 0.436$	0.9990
14	furathiocarb	-	-	-	-
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 9.461x + 0.220$	0.9985
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 2.371x + 0.074$	0.9996
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 1.356x + 0.118$	0.9848
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 4.725x + 0.541$	0.9977
19	methidathion	-	-	-	-
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 23.293x + 0.390$	0.9992
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 6.727x + 0.287$	0.9993
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 6.639x + 0.284$	0.9978
23	oxadiazon	NPD	0.01-1.0	$y = 0.520x - 0.001$	1.0000
24	flusilazole	NPD	0.01-1.0	$y = 0.513x + 0.011$	0.9999
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 9.563x + 0.218$	0.9990
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 2.458x + 0.217$	0.9969
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 2.135x + 0.018$	1.0000
28	hexazinon	ECD	0.01-1.0	$y = 0.082x + 0.021$	0.9345
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 4.107x + 0.099$	0.9992
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 23.677x + 0.479$	0.9993
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.617x + 0.022$	0.9981
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 1.823x + 0.068$	0.9979
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 12.895x + 0.120$	0.9997
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	-	-	-	-
	delta-cyfluthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.317x + 0.010$	0.9986
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 6.027x + 0.186$	0.9985
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 8.455x + 0.331$	0.9982
37	fluvalinate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.608x + 0.176$	0.9971
38	alpha-flucythrinate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.104x + 0.061$	0.5155
	beta-flucythrinate	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.712x + 0.420$	0.8376
	beta-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.194x + 0.094$	0.6382
	gamma-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.308x + 0.050$	0.9571
	delta-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.348x + 0.037$	0.9909
40	alpha-tralomethrin	ECD	a	-	-
	beta-tralomethrin	ECD	a	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	a	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	a	-	-

공 - A group

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.026x + 0.003$	0.9625
2	acephate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.044x + 0.009$	0.9261
3	omethoate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.003x + 0.002$	0.8032
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 0.134x + 0.01$	0.9885
5	phorate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.408x + 0.005$	0.9997
6	dimethoate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.120x + 0.196$	0.3969
7	diazinon	NPD	0.01-1.0	$y = 2.202x + 0.027$	0.9999
8	tolclofos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 0.528x + 0.029$	0.9992
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 2.697x + 0.339$	0.9966
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 4.189x + 0.490$	0.9988
11	bromacil	-	-	-	-
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 1.394x + 0.393$	0.9467
13	chlorpyrifos	-	-	-	-
14	dicofol	NPD	0.01-1.0	$y = 0.395x + 0.004$	0.9993
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.843x + 0.381$	0.9998
16	captan	ECD	0.01-1.0	$y = 0.082x + 0.082$	0.8966
17	isofenphos	NPD	0.01-1.0	$y = 1.605x + 0.024$	0.9996
18	alpha-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 1.425x + 0.346$	0.9681
	beta-triadimenol	ECD	0.01-1.0	$y = 1.168x + 0.098$	0.9995
19	chinomethionat	ECD	0.01-1.0	$y = 2.844x + 0.240$	0.9995
20	napropamide	NPD	0.01-1.0	$y = 0.293x + 0.006$	1.0000
21	tricyclazole	ECD	0.01-1.0	$y = 2.060x + 0.194$	0.9994
22	prothiofos	ECD	0.01-1.0	$y = 4.815x + 0.278$	0.9994
23	profenofos	ECD	0.01-1.0	$y = 2.046x + 0.020$	0.9981
24	myclobutanil	ECD	0.01-1.0	$y = 1.041x + 0.149$	0.9974
25	buprofezin	NPD	0.01-1.0	$y = 0.419x + 0.004$	0.9985
26	oxyfluorfen	ECD	0.01-1.0	$y = 5.974x + 0.397$	0.9901
27	triazophos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.561x + 0.022$	0.9996
28	terbuconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 0.113x + 0.169$	0.8908
29	bifenox	ECD	0.01-1.0	$y = 4.512x + 0.247$	0.9982
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 5.272x + 0.321$	0.9992
31	azinphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 0.061x + 0.003$	0.9918
32	mefenacet	ECD	0.01-1.0	$y = 0.284x + 0.021$	0.9999
33	amitarz	NPD	0.05-1.0	$y = 0.050x - 0.001$	0.9978
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.232x + 0.047$	0.8422
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.369x + 0.040$	0.9898
35	clofenteszine	ECD	0.01-1.0	$y = 0.133x + 0.371$	0.5847
36	alpha-bitertanol	ECD	0.01-1.0	$y = 0.277x + 0.162$	0.9105
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 4.750x + 0.596$	0.9989
38	alpha-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.388x + 0.135$	0.9752
	beta-cypermethrin	ECD	<0.1	-	-
	gamma-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.143x + 0.122$	0.9328
	delta-cypermethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.328x + 0.309$	0.6618
39	alpha-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.489x + 0.275$	0.8968
	beta-fenvalerate	ECD	<0.1	-	-
40	alpha-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 1.107x + 0.148$	0.9927
	beta-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 2.720x + 0.193$	0.9973

공 - B group

No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	-	-	-	-
2	fenobucarb	NPD	0.01-1.0	$y = 0.103x + 0.018$	0.9530
3	demeton S-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 0.064x + 0.014$	0.9065
4	ethoprophos	NPD	0.01-1.0	$y = 2.802x + 0.085$	0.9788
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.763x + 0.636$	0.9901
6	simazine	ECD	0.01-1.0	$y = 0.026x + 0.184$	0.8507
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 5.696x + 0.949$	0.9842
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 4.891x + 0.808$	0.9768
9	pirimiphos-methyl	NPD	0.01-1.0	$y = 1.247x + 0.054$	0.9917
10	thiobencarb	NPD	0.01-1.0	$y = 0.096x + 0.005$	0.9900
11	fenthion	NPD	0.01-1.0	$y = 0.176x + 0.015$	0.9736
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 2.987x + 0.679$	0.9598
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 6.459x + 0.867$	0.9841
14	furathiocarb	ECD	0.01-1.0	$y = 0.126x + 0.451$	0.9202
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 0.976x + 0.157$	0.9696
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 0.822x + 0.132$	0.9696
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 2.774x + 0.447$	0.9696
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 1.514x + 0.462$	0.9587
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 0.976x + 0.354$	0.9070
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 9.759x - 0.101$	0.9890
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 3.034x + 0.460$	0.9855
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 6.063x + 0.648$	0.9961
23	oxadiazon	NPD	0.01-1.0	$y = 0.129x + 0.004$	0.9928
24	flusilazole	NPD	0.01-1.0	$y = 0.404x + 0.015$	0.9963
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 3.431x + 0.204$	0.9986
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 0.682x + 0.278$	0.9838
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 2.437x + 0.186$	0.9915
28	hexazinon	-	-	-	-
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 3.574x + 0.357$	0.9948
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 5.605x + 0.472$	0.9836
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.213x + 0.009$	0.9960
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.731x + 0.052$	0.9939
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 3.475x + 0.290$	0.9812
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	-	-	-	-
	delta-cyfluthrin	-	-	-	-
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 5.342x + 0.307$	0.9942
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 3.073x + 0.452$	0.9711
37	fluvalinate	-	-	-	-
38	alpha-flucynithrin	-	-	-	-
	beta-flucynithrin	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.281x + 0.214$	0.9699
	beta-deltamethrin	ECD	0.01-1.0		
	gamma-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.317x + 0.137$	0.9841
	delta-deltamethrin	ECD	0.01-1.0		
40	alpha-tralomethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.186x + 0.126$	0.9699
	beta-tralomethrin	-	-	-	-
	gamma-tralomethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.117x + 0.050$	0.9841
	delta-tralomethrin	-	-	-	-

옥수수 - A group

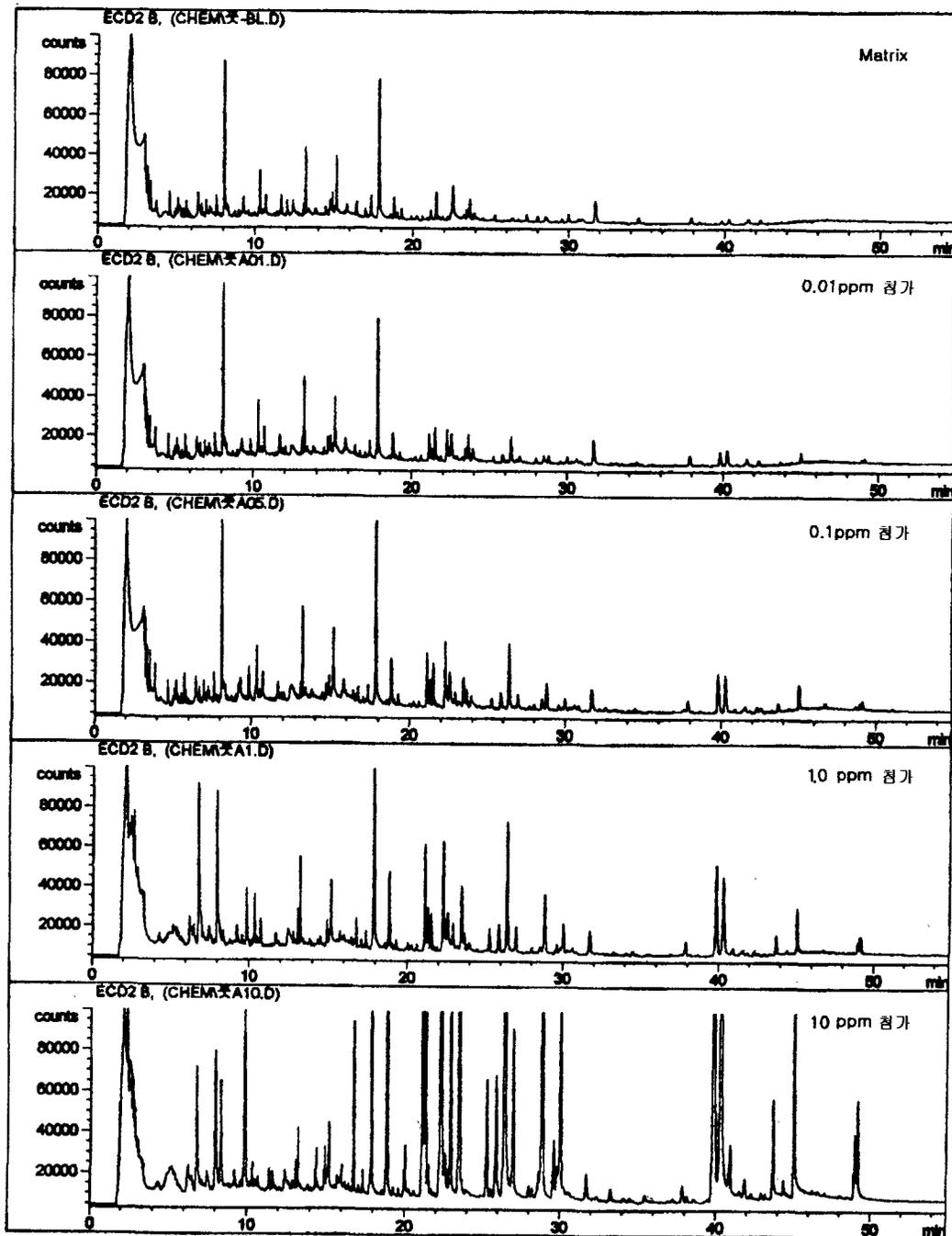
No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	dichlovos	-	-	-	-
2	acephate	NPD	0.01-1.0	$y = 0.046x + 0.044$	0.9982
3	omethoate	-	-	-	-
4	chlorpropham	NPD	0.01-1.0	$y = 0.427x + 0.040$	0.9979
5	phorate	-	-	-	-
6	dimethoate	-	-	-	-
7	diazinon	NPD	0.01-1.0	$y = 1.961x + 0.008$	1.0000
8	tolclofos-methyl	ECD	0.01-1.0	$y = 4.880x + 0.289$	0.9997
9	alachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 2.169x + 0.153$	0.9996
10	fenitrothion	ECD	0.01-1.0	$y = 5.038x + 0.471$	0.9946
11	bromacil	ECD	-	-	-
12	malathion	ECD	0.01-1.0	$y = 1.797x + 0.276$	1.0000
13	chlorpyrifos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.184x - 0.002$	0.9995
14	dicofol	NPD	0.01-1.0	$y = 0.262x - 0.002$	0.9993
15	pendimethalin	ECD	0.01-1.0	$y = 2.526x + 0.249$	0.9950
16	captan	-	-	-	-
17	isofenphos	NPD	0.01-1.0	$y = 1.181x - 0.004$	0.9999
18	alpha-triadimenol	-	-	-	-
	beta-triadimenol	-	-	-	-
19	chinomethionat	-	-	-	-
20	napropamide	NPD	<0.1	-	-
21	tricyclazole	ECD	0.01-1.0	$y = 2.615x + 0.628$	0.9994
22	prothiofos	ECD	0.01-1.0	$y = 4.222x + 0.223$	0.9996
23	profenofos	ECD	<0.1	-	-
24	myclobutanil	ECD	<0.1	-	-
25	buprofezin	NPD	0.01-1.0	$y = 0.452x - 0.005$	0.9991
26	oxyfluorfen	-	-	-	-
27	triazophos	NPD	0.01-1.0	$y = 0.900x + 0.002$	0.9998
28	terbuconazole	NPD	<0.1	-	-
29	bifenox	-	-	-	-
30	tetradifon	ECD	0.01-1.0	$y = 6.419x + 0.120$	0.9999
31	azinphos-methyl	NPD	<0.1	-	-
32	mefenacet	NPD	0.01-1.0	$y = 0.335x + 0.003$	0.9998
33	amitarz	-	-	-	-
34	alpha-cyhalothrin	-	-	-	-
	beta-cyhalothrin	-	-	-	-
	gamma-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.281x + 0.001$	0.9991
	delta-cyhalothrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.803x + 0.028$	0.9992
35	clofentazine	ECD	0.01-1.0	$y = 1.153x + 0.254$	0.9960
36	alpha-bitertanol	ECD	0.01-1.0	$y = 0.549x + 0.426$	0.9995
	beta-bitertanol	-	-	-	-
37	prochloraz	ECD	0.01-1.0	$y = 2.719x + 0.230$	0.9984
38	alpha-cypermethrin	ECD	<0.1	-	-
	beta-cypermethrin	ECD	<0.1	-	-
	gamma-cypermethrin	ECD	<0.1	-	-
	delta-cypermethrin	ECD	<0.1	-	-
39	alpha-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.888x + 0.147$	0.9977
	beta-fenvalerate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.567x + 0.171$	0.9952
40	alpha-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 0.662x + 0.071$	0.9982
	beta-difeconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 1.503x + 0.085$	0.9997

옥수수 - B group

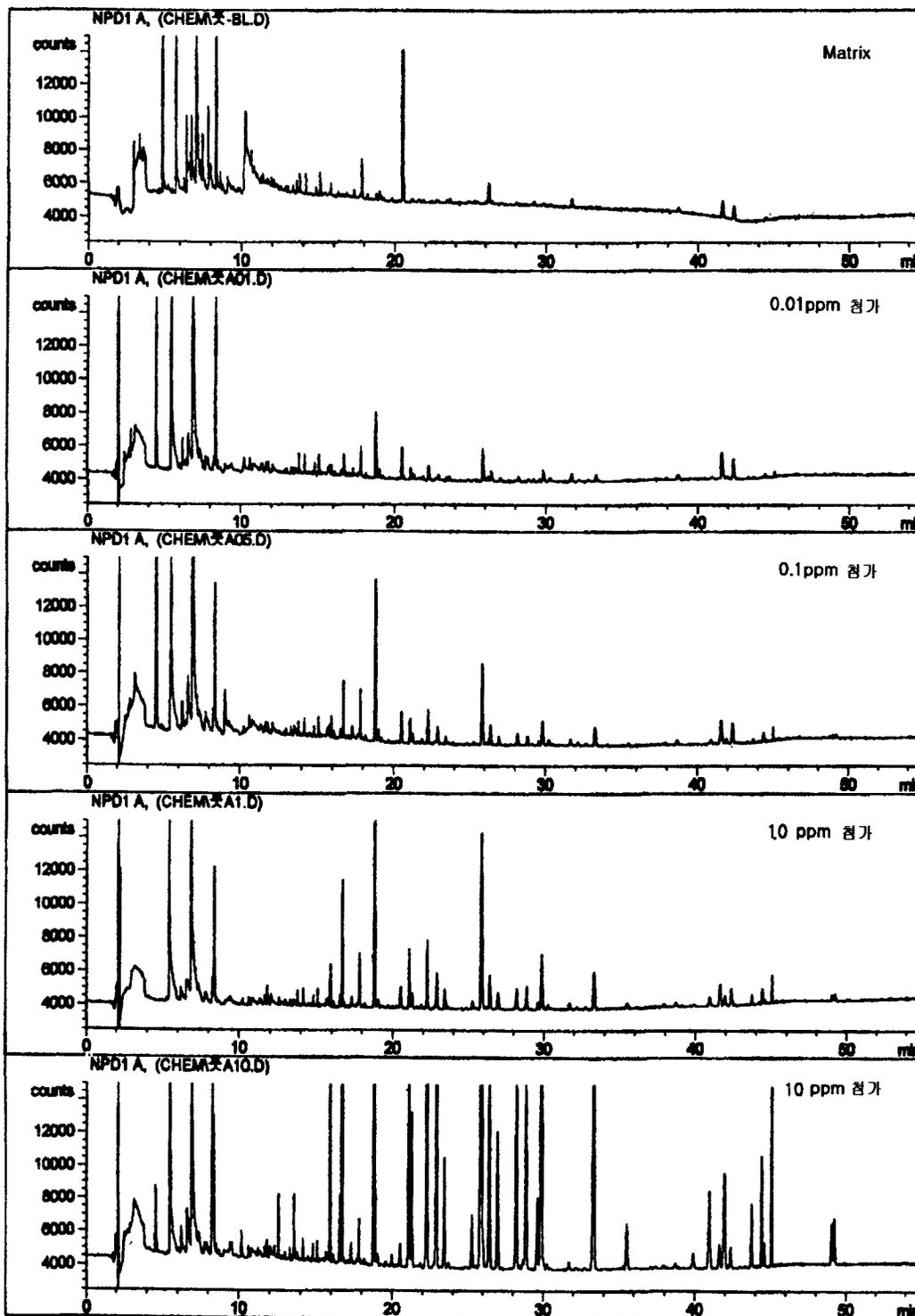
No	Pesticide	Detection Mode	Range	Calibration Equation	Regression Coefficient
1	triclopyr	-	-	-	-
2	fenobucarb	ECD	0.01-1.0	$y = 0.250x + 0.100$	0.9907
3	demeton S-methyl	-	-	-	-
4	ethoprophos	ECD	0.01-1.0	$y = 1.335x + 0.292$	0.9987
5	trifluralin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.955x + 0.382$	0.9999
6	simazine	-	-	-	-
7	fonofos	ECD	0.01-1.0	$y = 3.250x + 0.639$	0.9961
8	vinclozolin	ECD	0.01-1.0	$y = 5.951x + 0.473$	0.9977
9	pirimiphos-methyl	-	-	-	-
10	thiobencarb	-	-	-	-
11	fenthion	-	-	-	-
12	parathion	ECD	0.01-1.0	$y = 2.744x + 0.388$	0.9964
13	triadimefon	ECD	0.01-1.0	$y = 4.187x + 0.317$	0.9992
14	furathiocarb	ECD	0.01-1.0	$y = 0.092x + 0.320$	0.7074
15	quinalphos	ECD	0.01-1.0	$y = 0.494x + 0.082$	1.0000
16	folpet	ECD	0.01-1.0	$y = 0.416x + 0.069$	1.0000
17	phenthoate	ECD	0.01-1.0	$y = 1.406x + 0.233$	1.0000
18	procymidone	ECD	0.01-1.0	$y = 1.733x + 0.188$	0.9965
19	methidathion	ECD	0.01-1.0	$y = 1.314x + 0.224$	0.9971
20	alpha-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 2.858x + 0.134$	1.0000
21	butachlor	ECD	0.01-1.0	$y = 2.061x + 0.208$	0.9995
22	hexaconazole	ECD	0.01-1.0	$y = 0.806x + 0.358$	0.9497
23	oxadiazon	NPD	0.01-1.0	$y = 1.959x + 0.236$	0.9962
24	flusilazole	-	-	-	-
25	beta-endosulfan	ECD	0.01-1.0	$y = 1.374x + 2.745$	0.5923
26	iprodione	ECD	0.01-1.0	$y = 0.919x + 0.192$	0.9941
27	edifenphos	ECD	0.01-1.0	$y = 1.245x + 0.063$	1.0000
28	hexazinon	-	-	-	-
29	nuarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 2.253x + 0.105$	0.9999
30	EPN	ECD	0.01-1.0	$y = 2.783x + 0.114$	0.9998
31	bifenthrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.377x + 0.012$	1.0000
32	fenpropathrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.417x + 0.026$	1.0000
33	phosalone	ECD	0.01-1.0	$y = 2.512x + 0.022$	1.0000
34	alpha-cyfluthrin	-	-	-	-
	beta-cyfluthrin	-	-	-	-
	gamma-cyfluthrin	-	-	-	-
	delta-cyfluthrin	-	-	-	-
35	fenarimol	ECD	0.01-1.0	$y = 2.694x + 0.053$	1.0000
36	pyrazophos	ECD	0.01-1.0	$y = 1.637x + 0.163$	0.9973
37	fluvalinate	ECD	0.01-1.0	$y = 0.143x + 0.214$	0.9618
38	alpha-flucynithrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.085x + 0.117$	0.8089
	beta-flucynithrin	-	-	-	-
39	alpha-deltamethrin	-	-	-	-
	beta-deltamethrin	-	-	-	-
	gamma-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.171x + 0.155$	0.9055
	delta-deltamethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.168x + 0.073$	0.9647
40	alpha-tralomethrin	-	-	-	-
	beta-tralomethrin	-	-	-	-
	gamma-tralomethrin	-	-	-	-
	delta-tralomethrin	ECD	0.01-1.0	$y = 0.099x + 0.043$	0.9647

부록 2. 풋고추중 농도별 농약을 첨가시켜 분석한 크로마토그램.(계속)

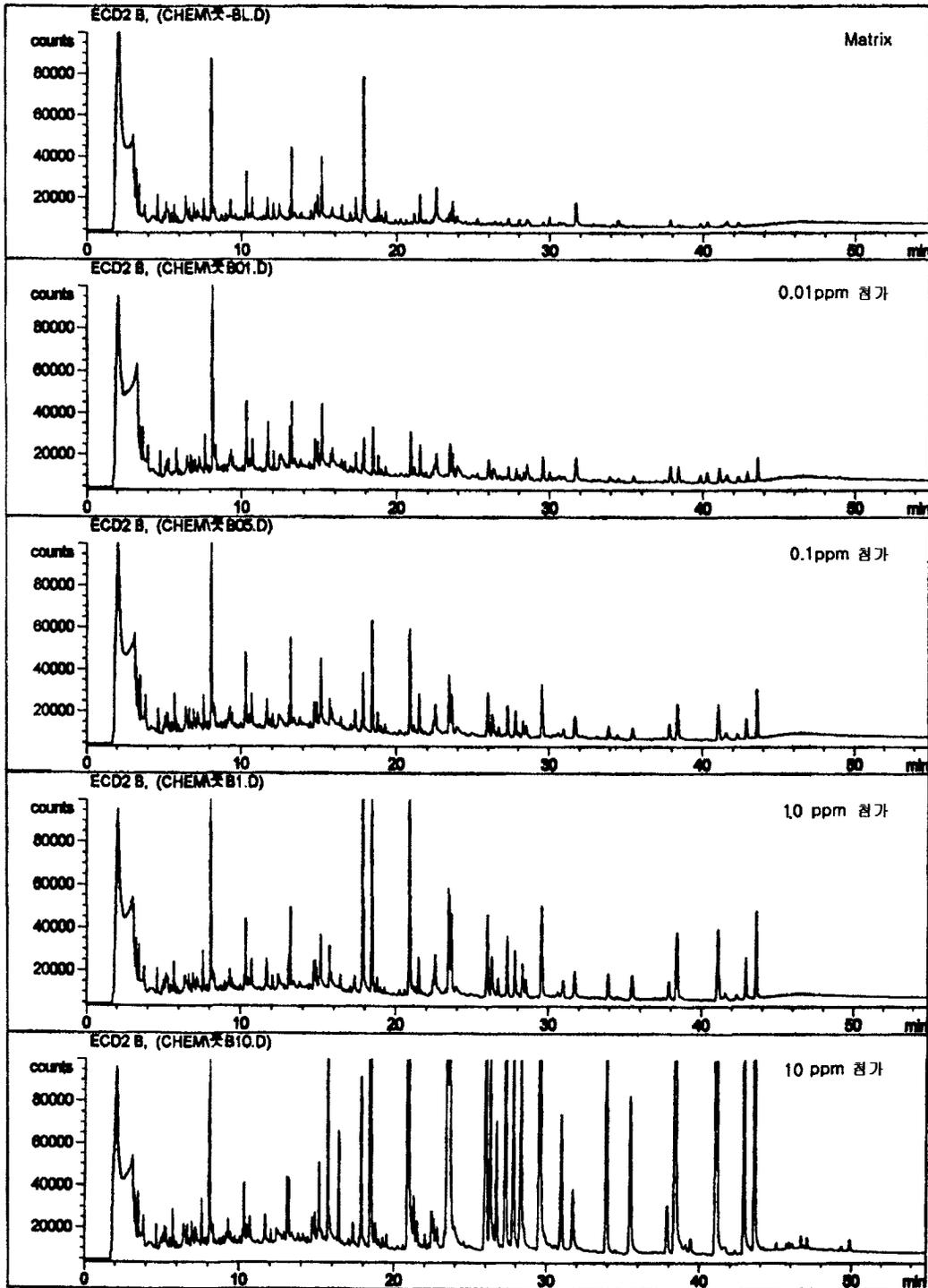
A group; ECD



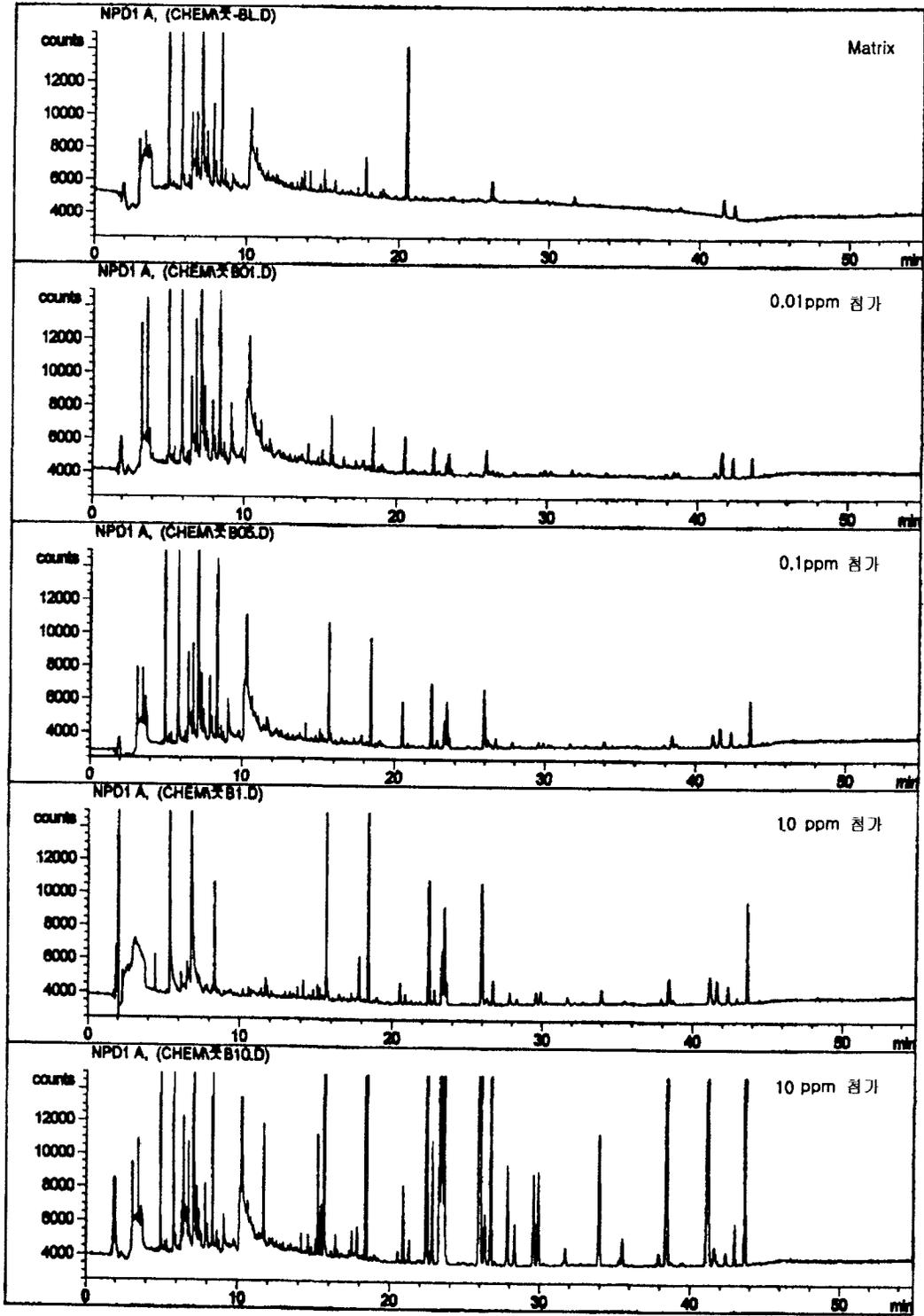
A group; NPD



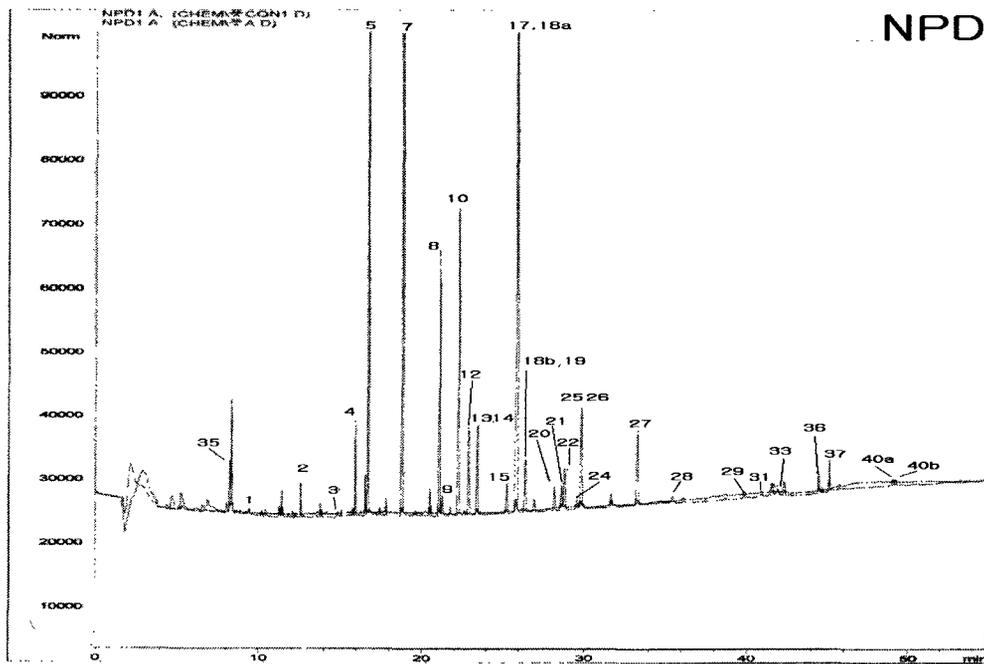
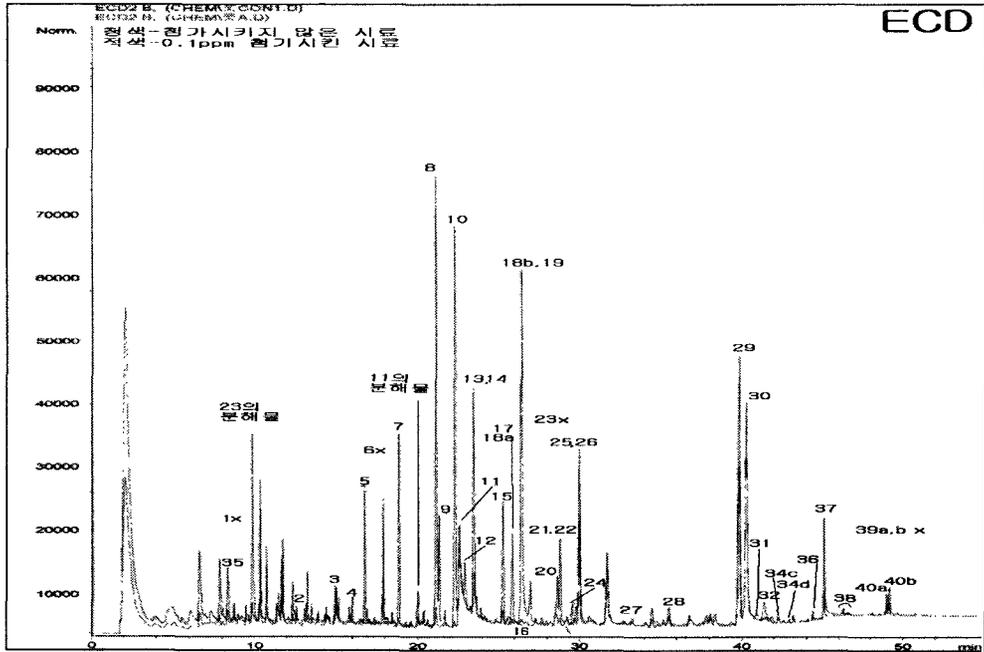
B group; ECD



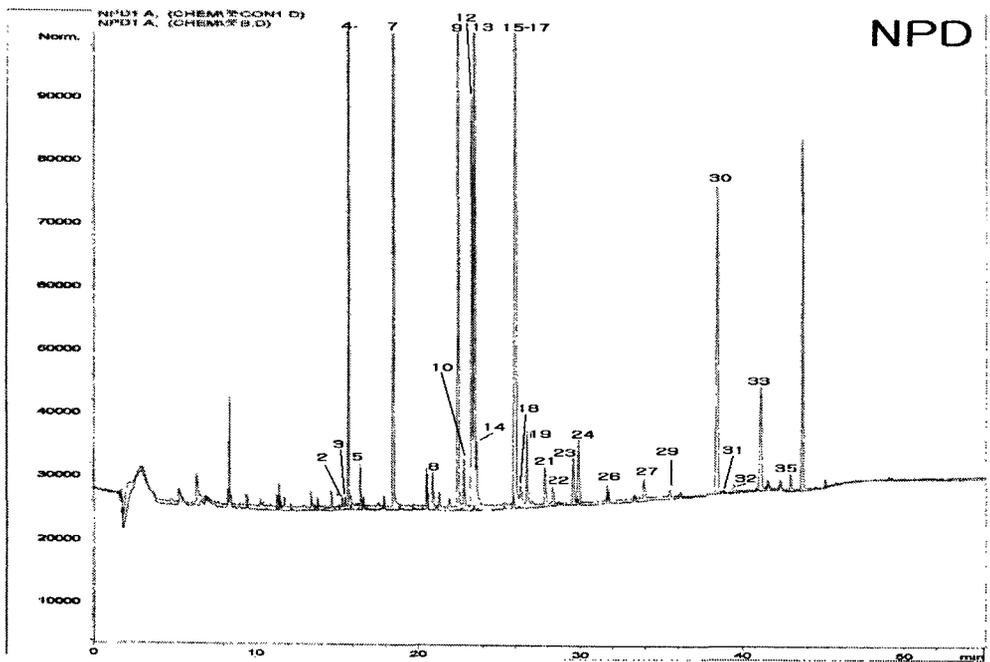
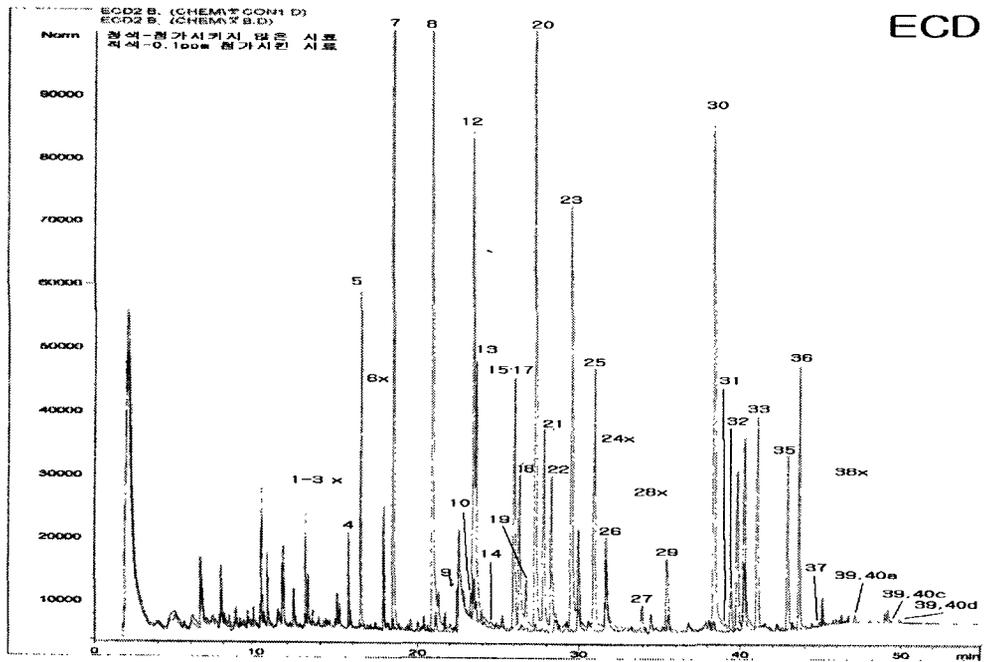
B group; NPD



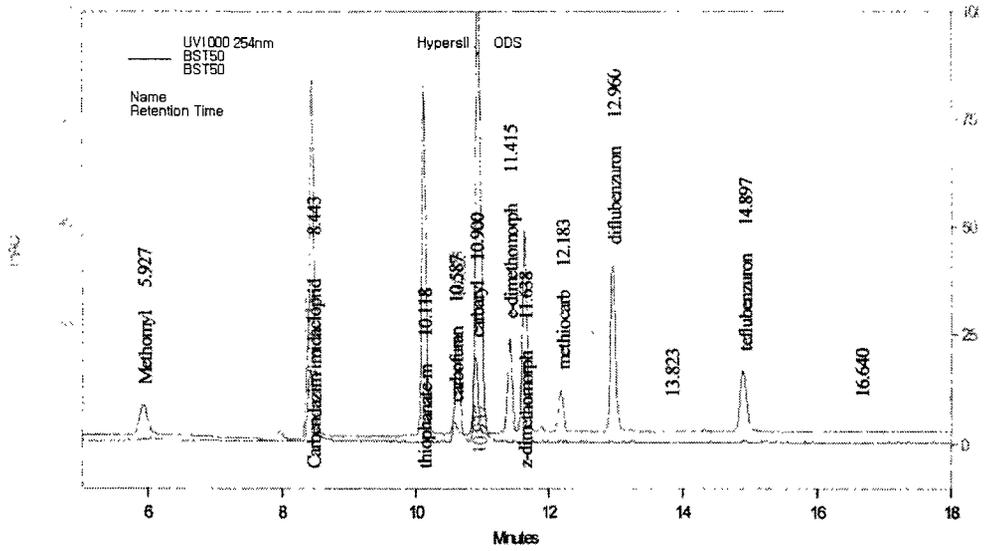
부록3-1. 풋고추 중 79가지 농약들의 크로마토그램, A group.



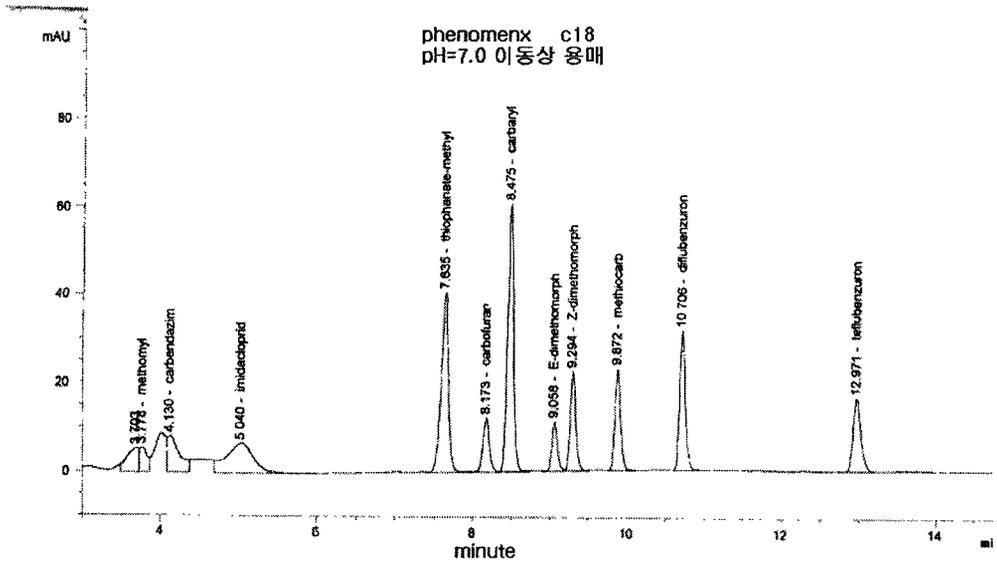
부록3-1. 계속, B group.



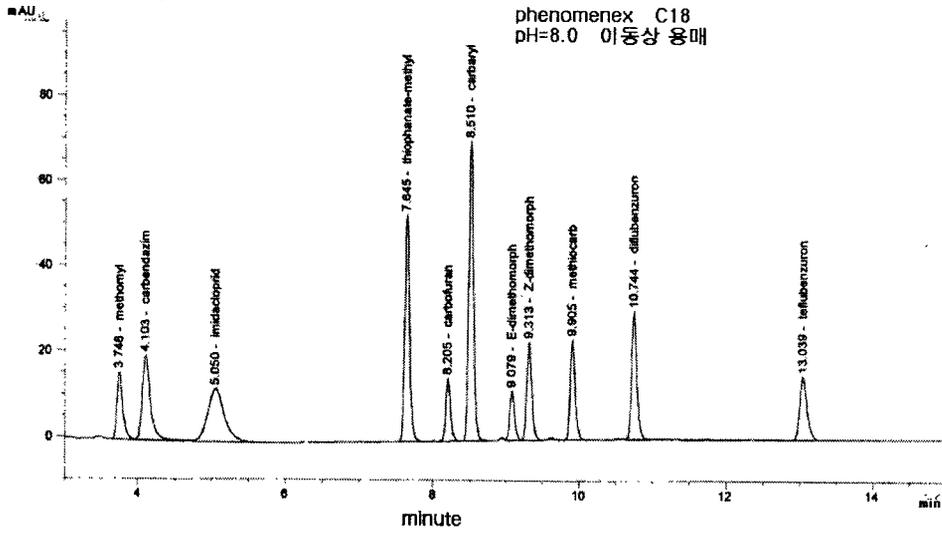
부록3-2. 두 C<sub>18</sub> 컬럼에서의 HPLC 크로마토그램들.



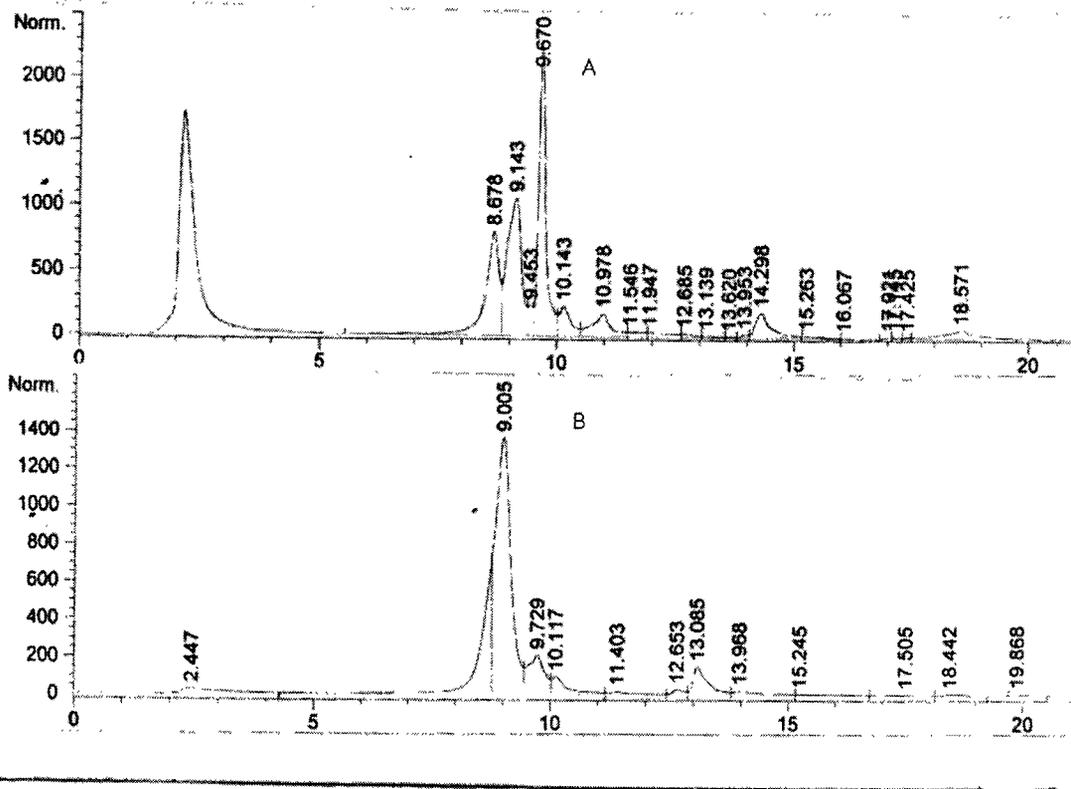
부록3-3. pH=7과 phenomenex C<sub>18</sub>에서 HPLC 크로마토그램



부록 3-3 . 계속, pH=8과 phenomenex C<sub>18</sub>에서 HPLC 크로마토그램



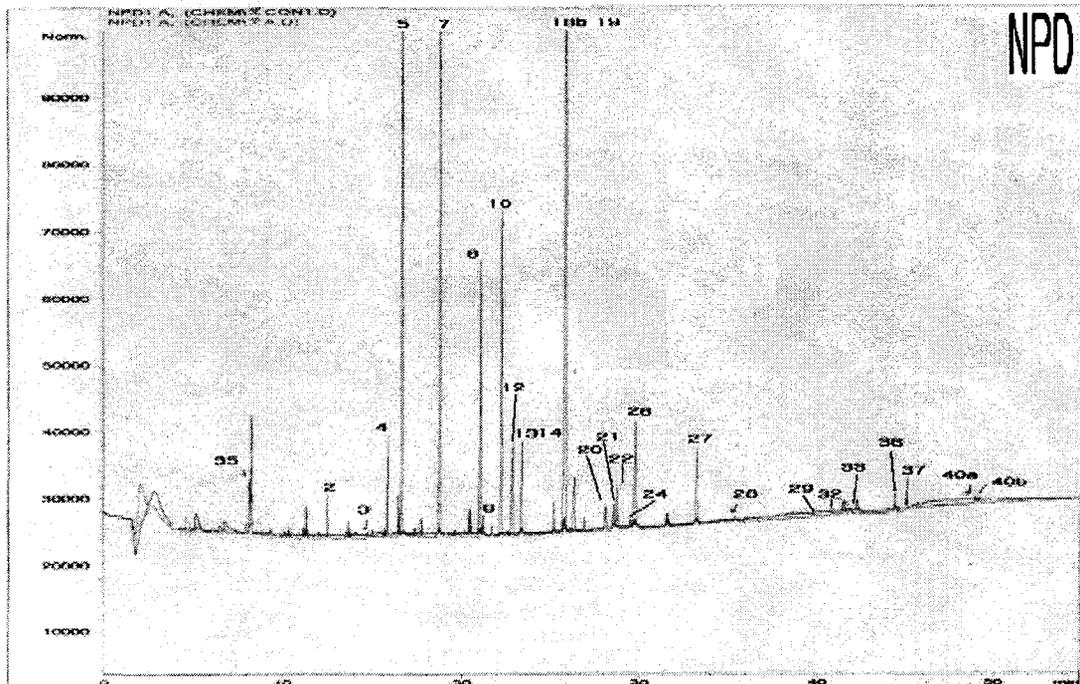
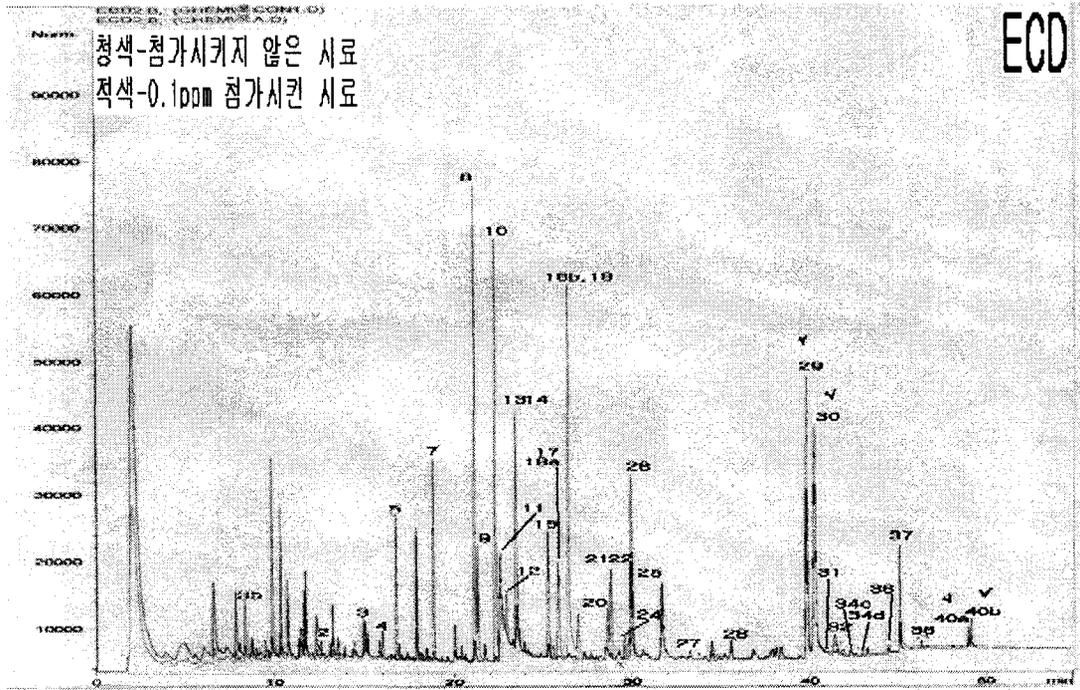
부록3-4. 콩 시료중 10종 농약들의 HPLC 크로마토그램들.



부록 3-5. 각 농산물별 농약 첨가시료(0.1ppm)와 첨가시키지 않은 시료의 GC 크로마토그램.(계속)

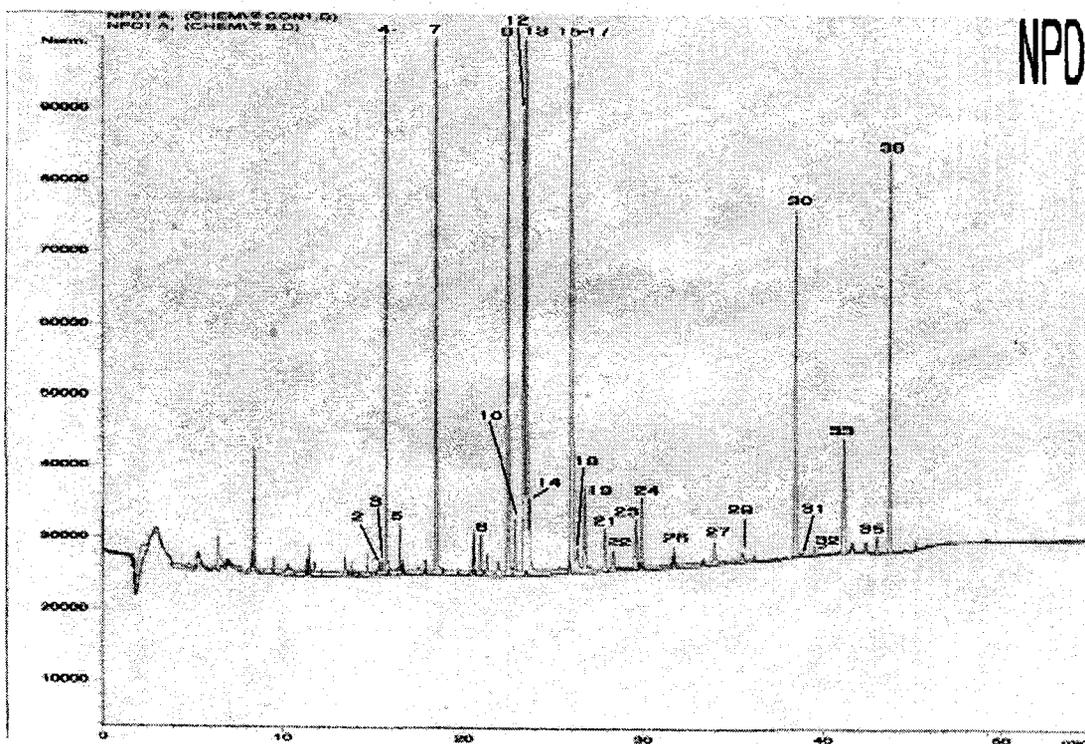
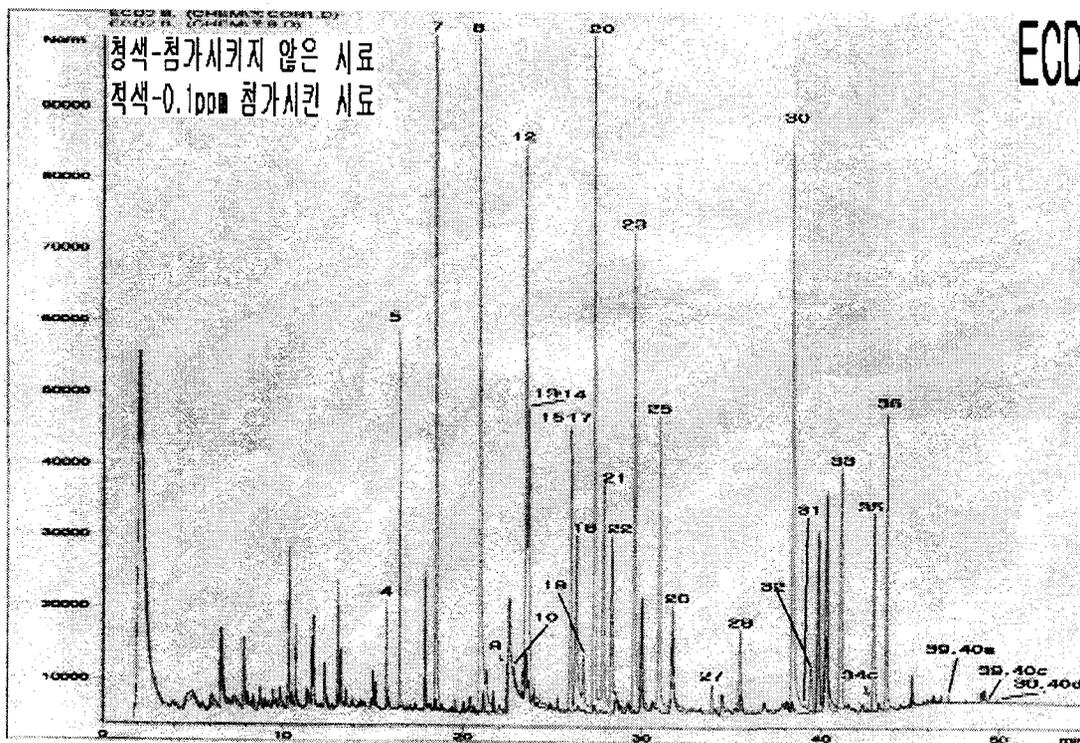
## 풋고추

(A group)



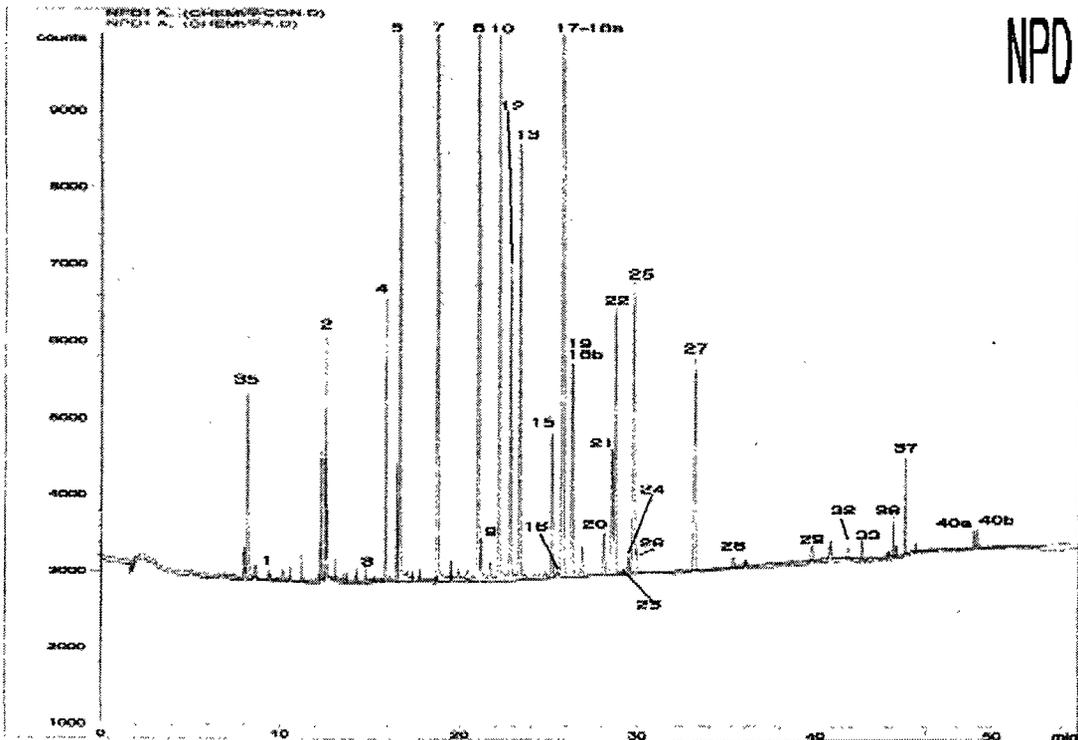
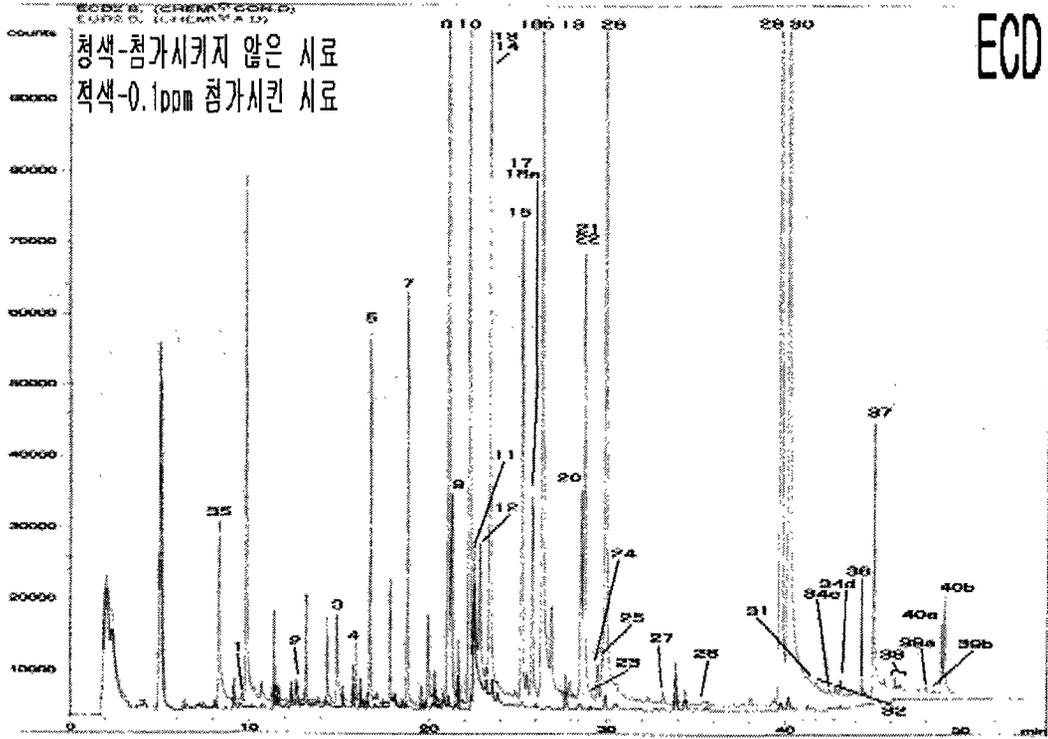
# 풋고추

(B group)



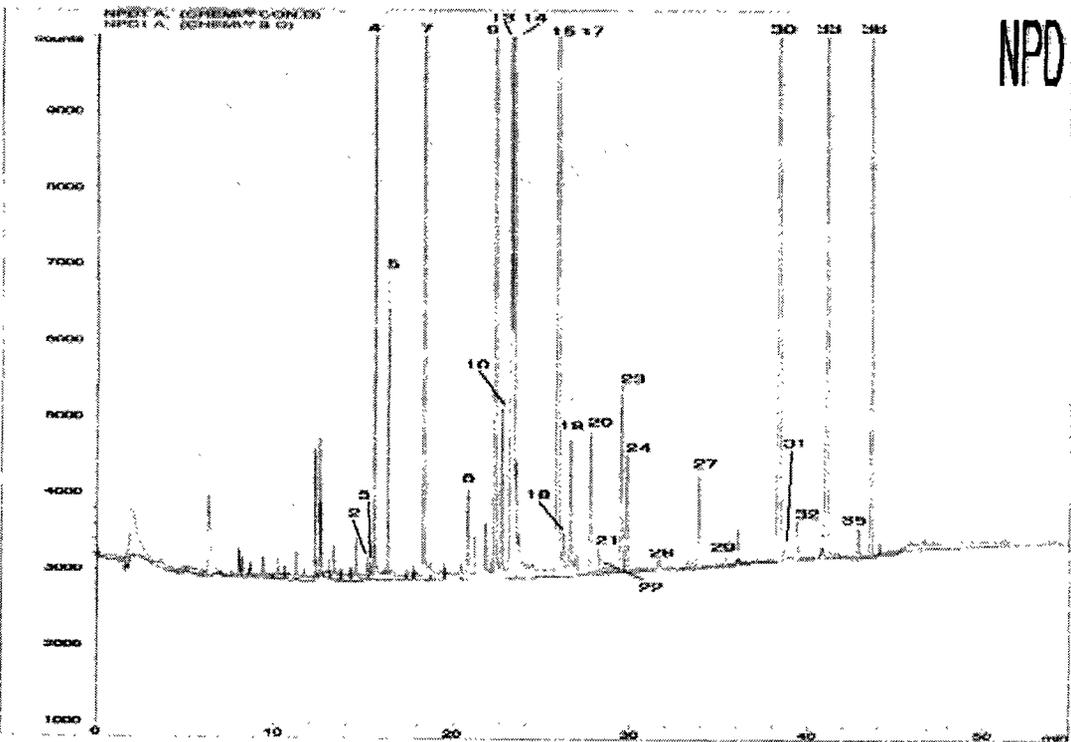
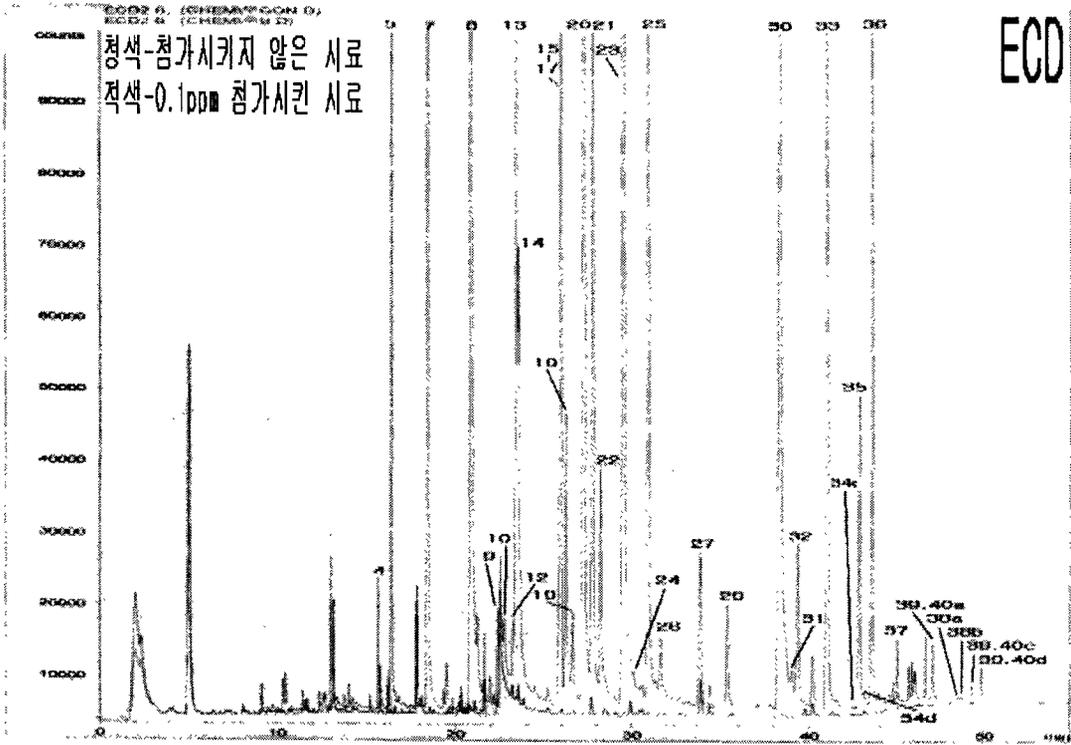
# 무

## (A group)



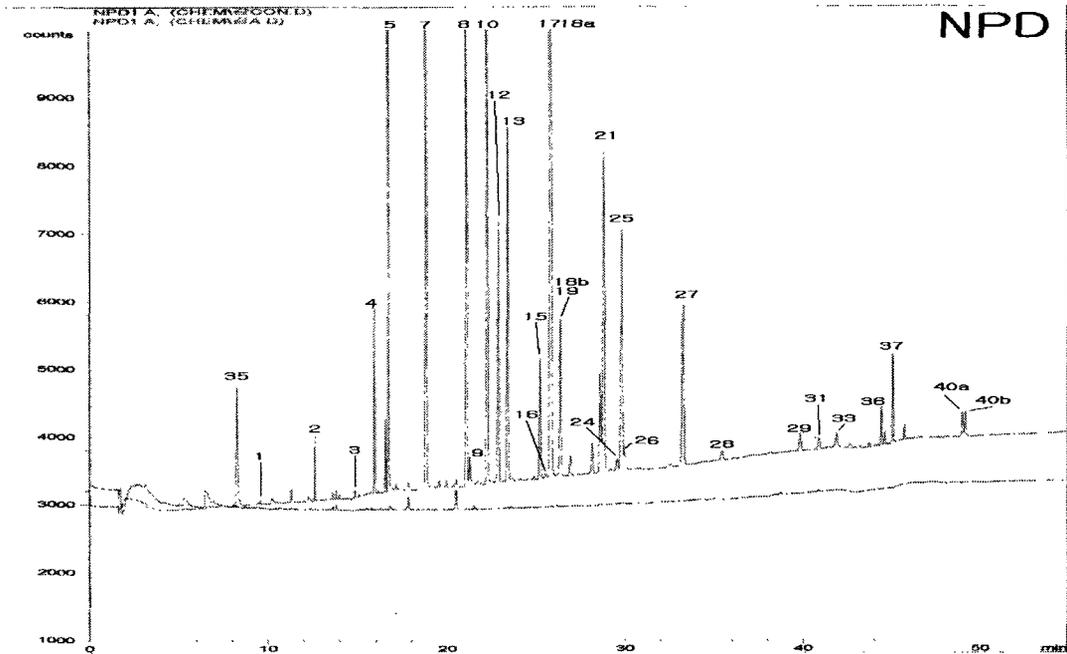
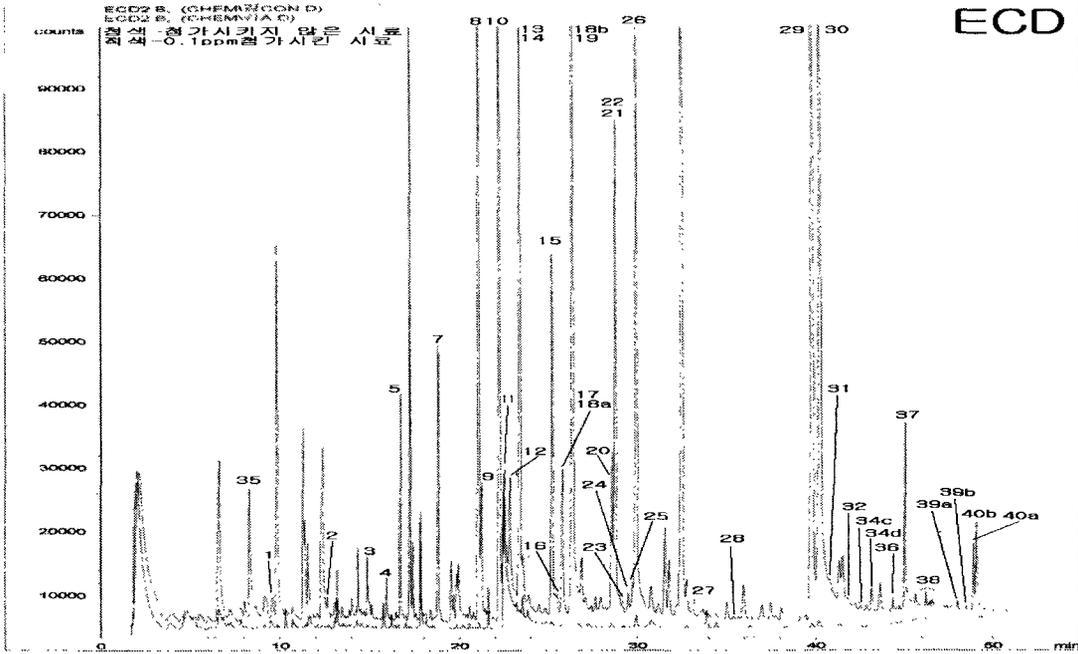
# 무

## (B group)



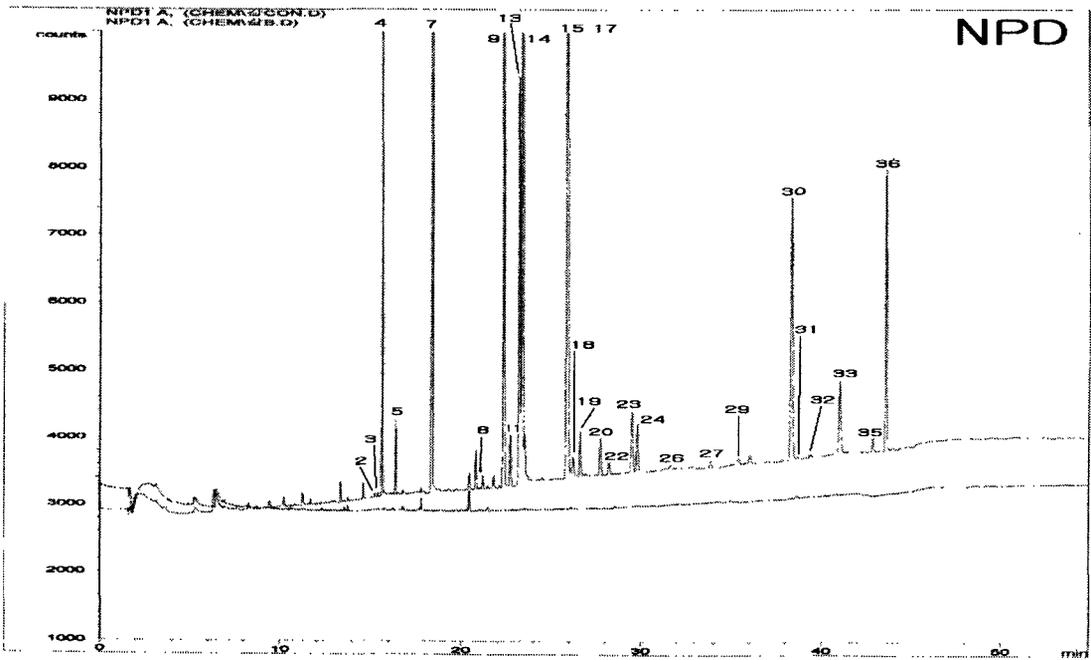
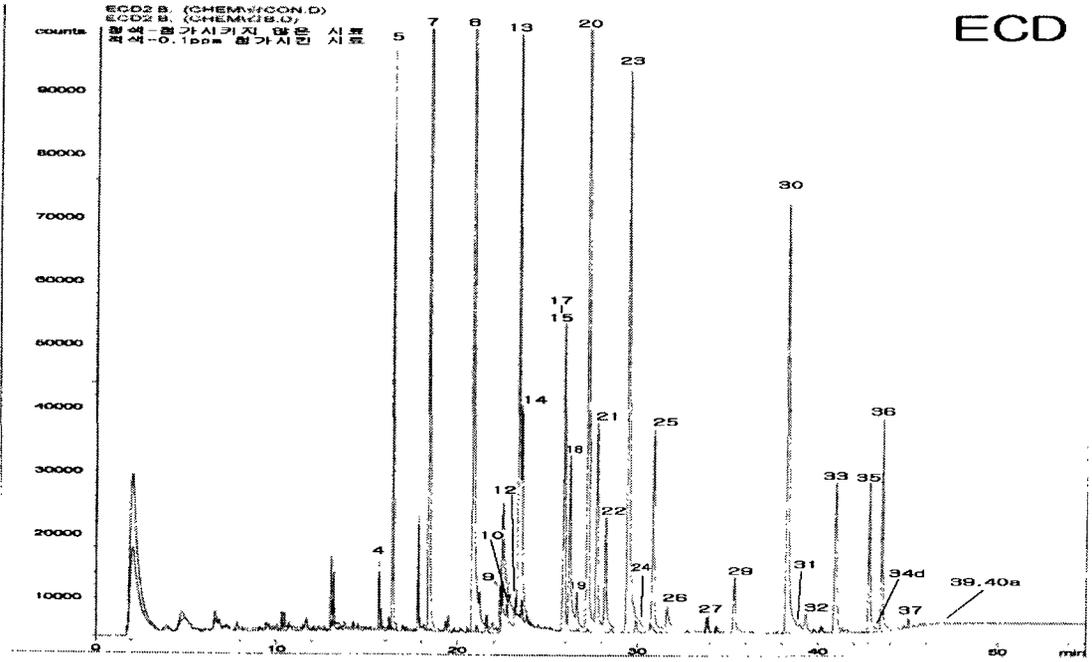
# 감자

(A group)



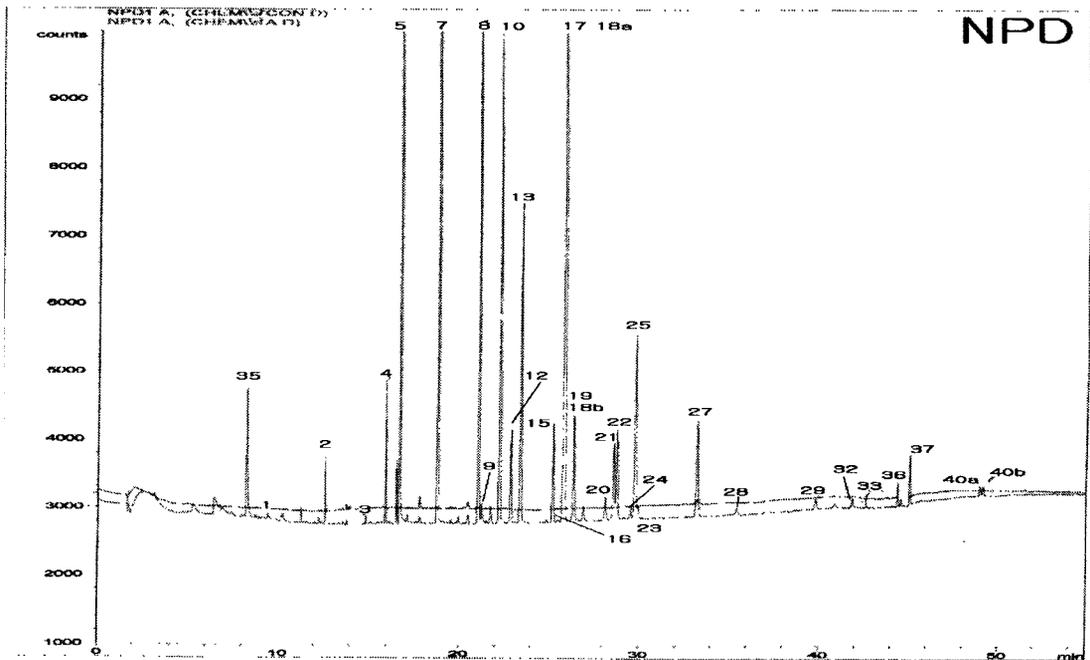
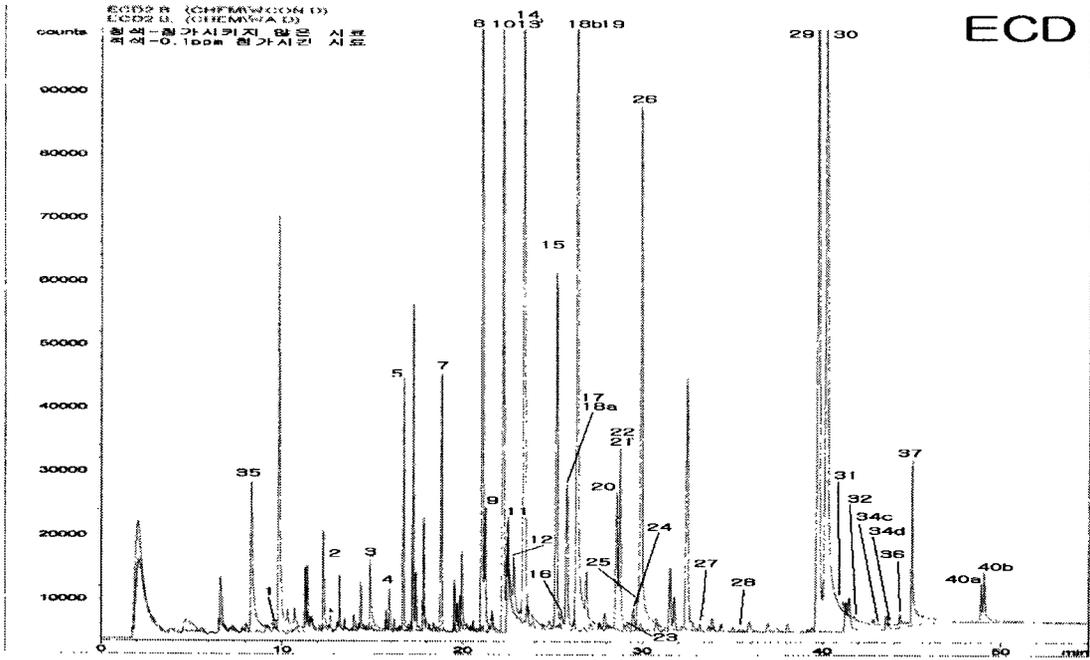
# 감자

(B group)



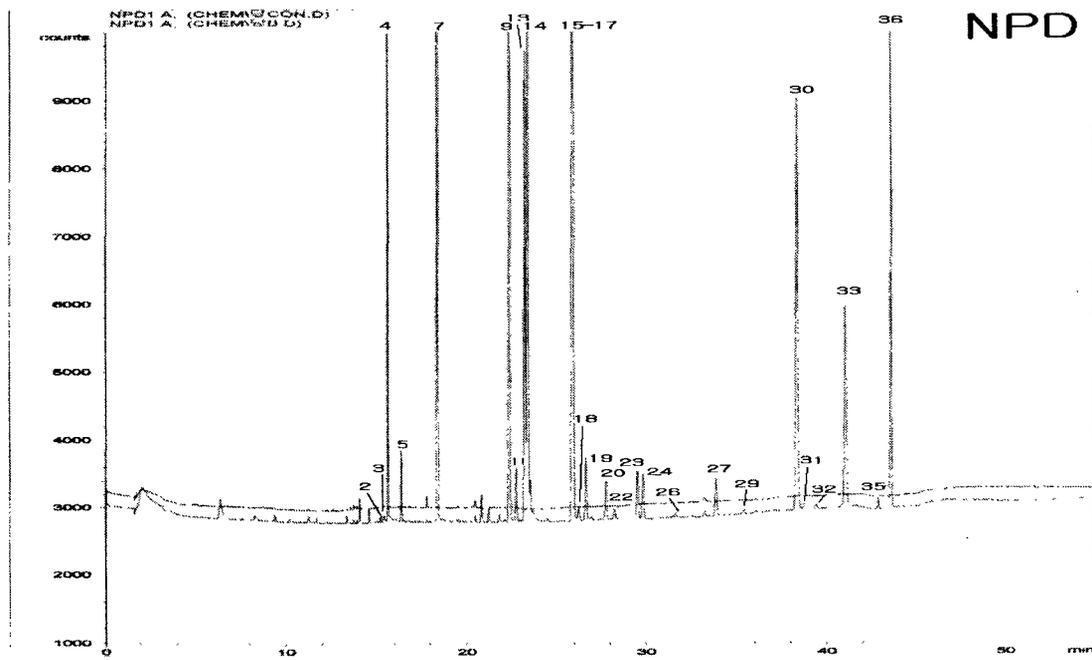
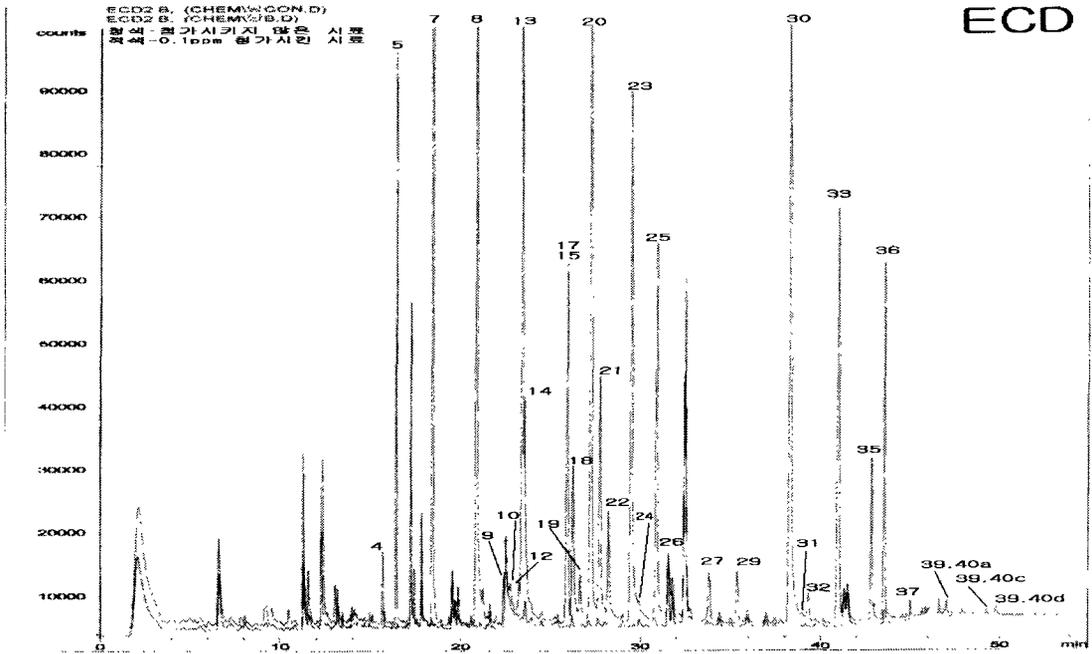
# 당 근

(A group)



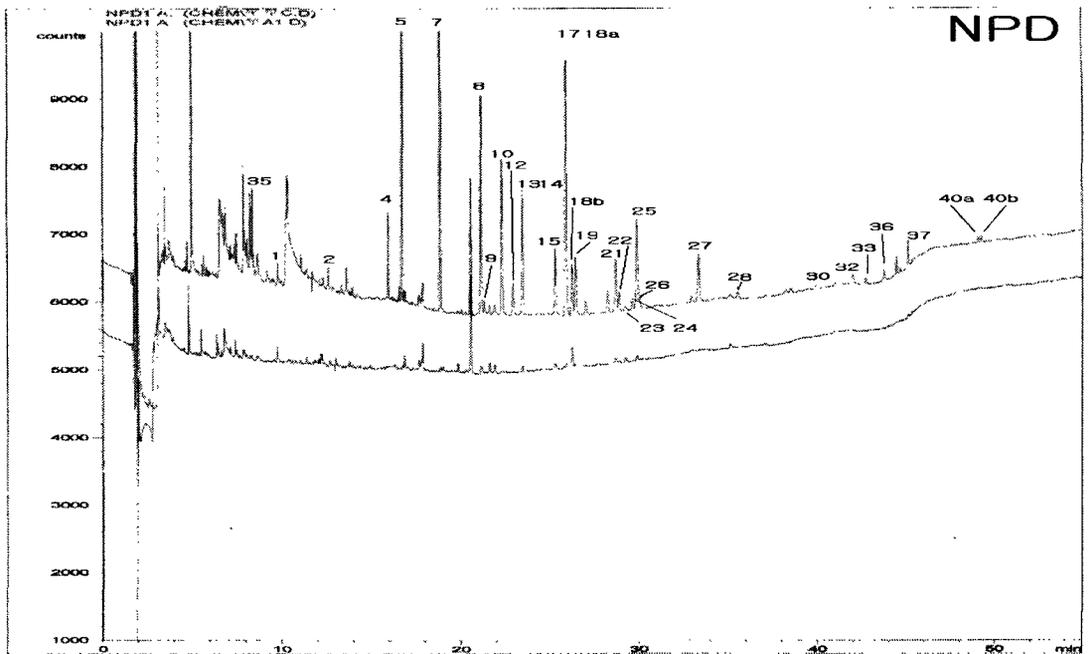
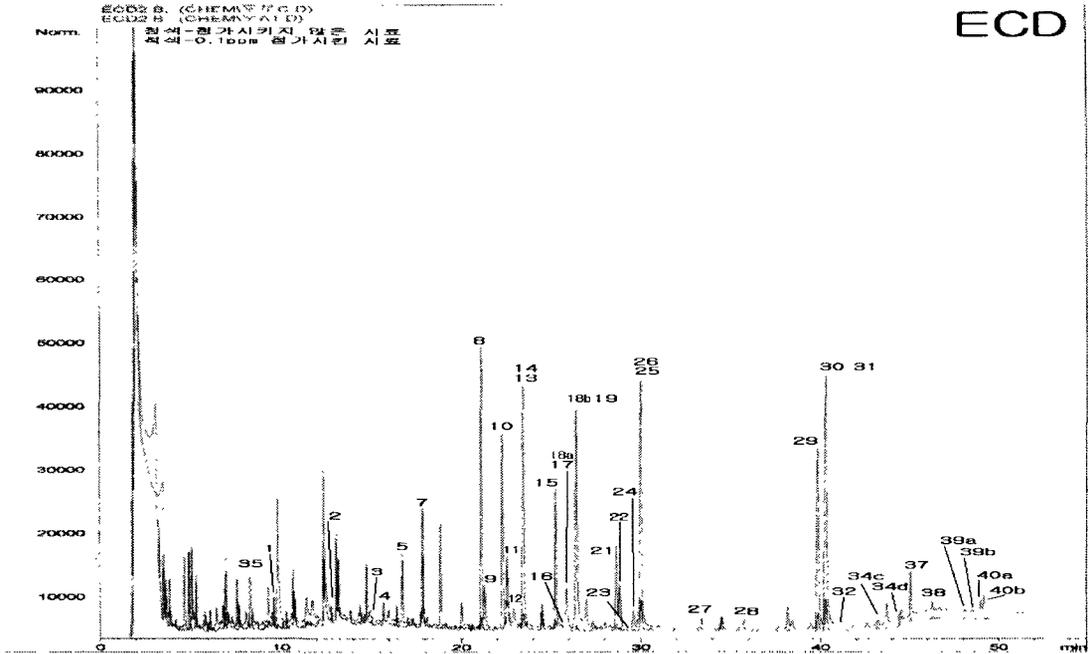
# 단군

(B group)



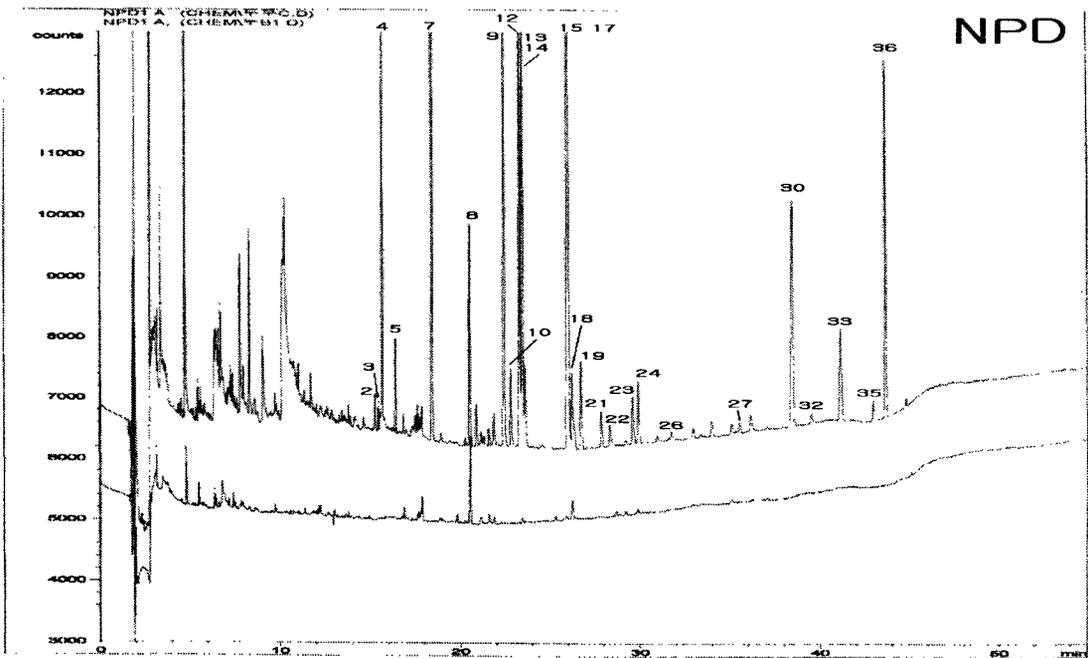
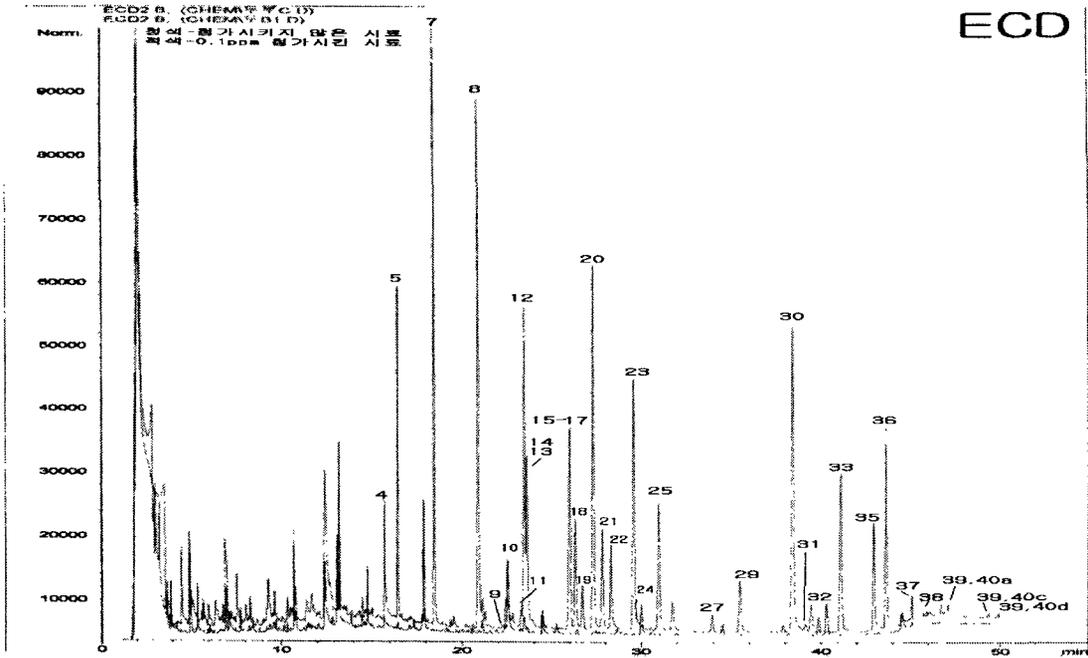
# 두 부

(A group)



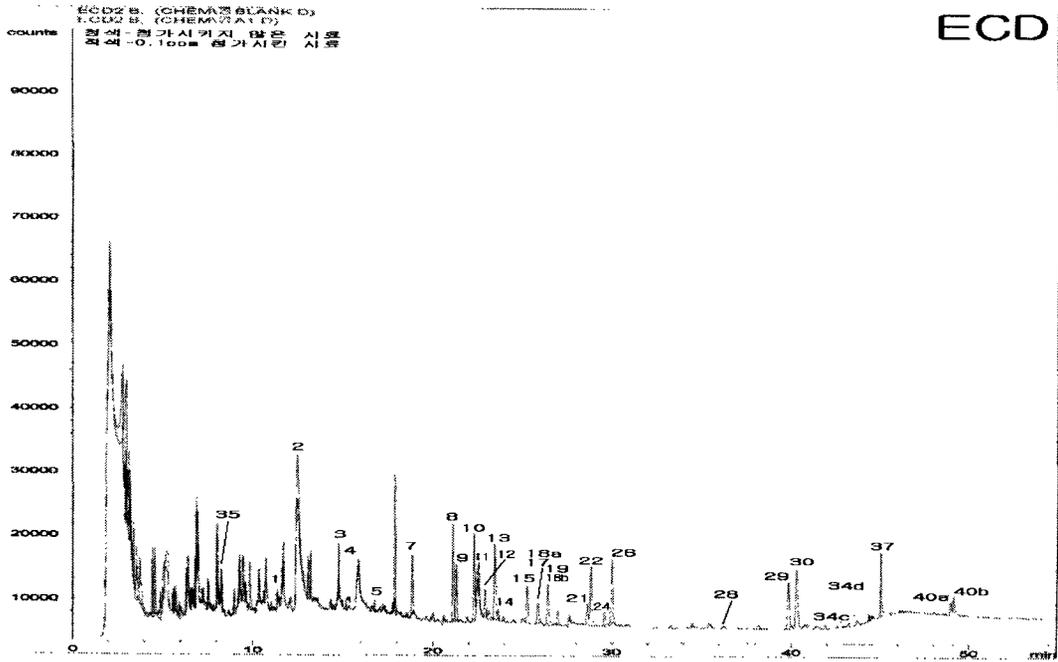
# 두 부

(B group)

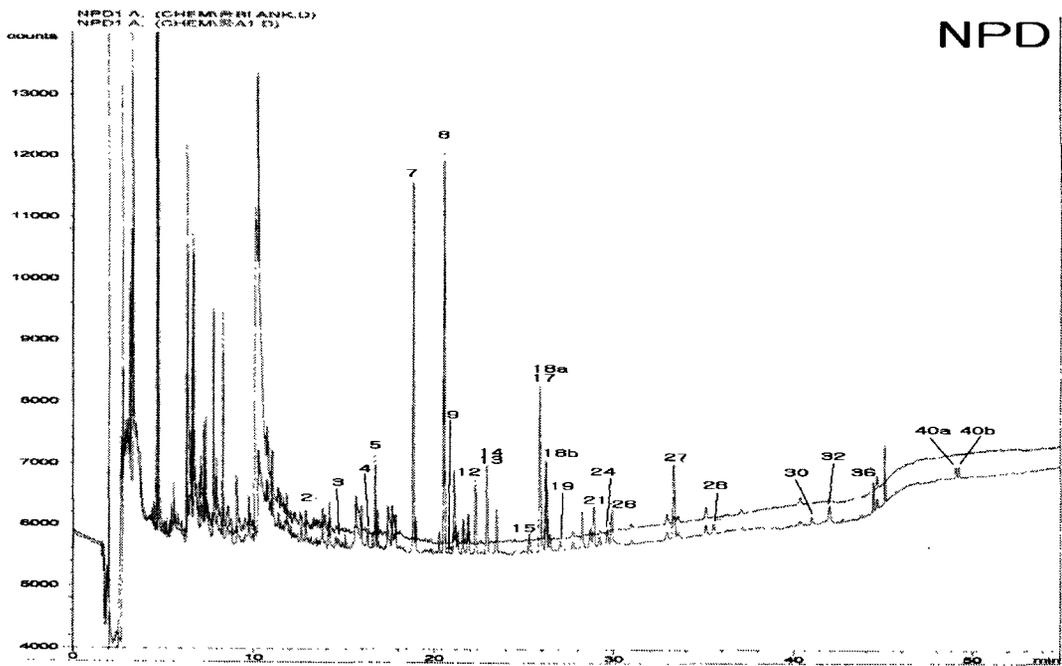


FD

(A group)



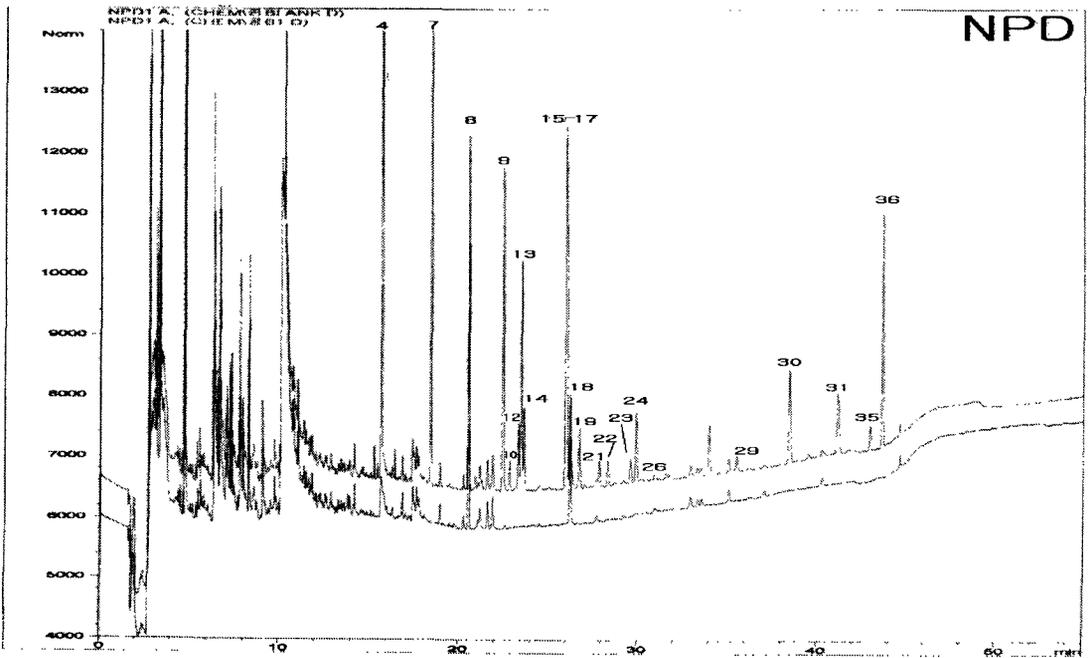
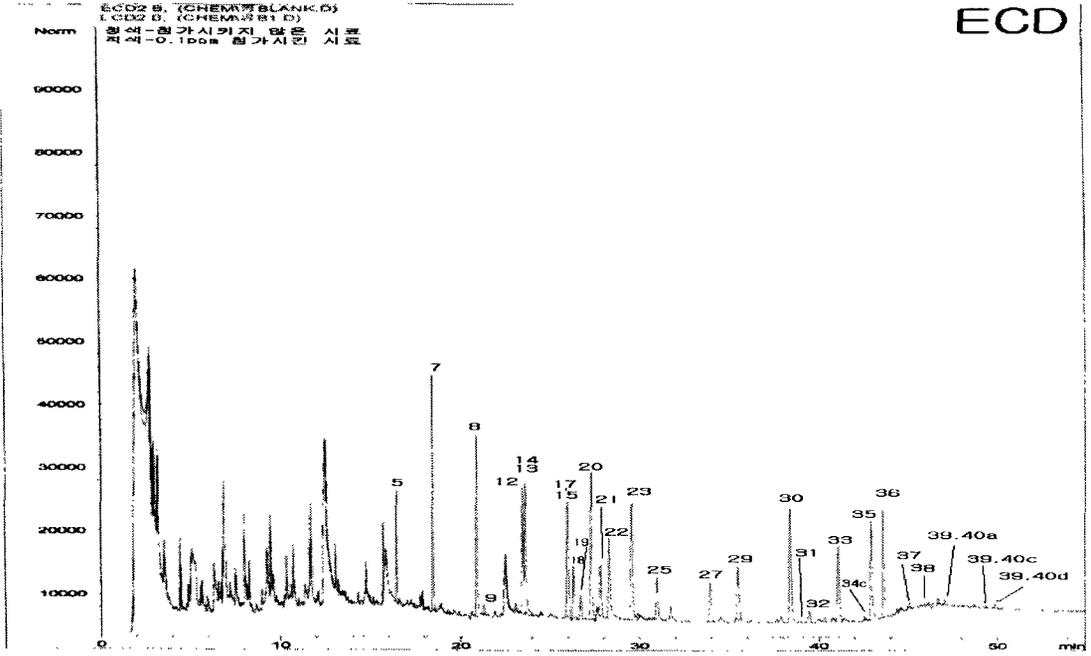
ECD



NPD

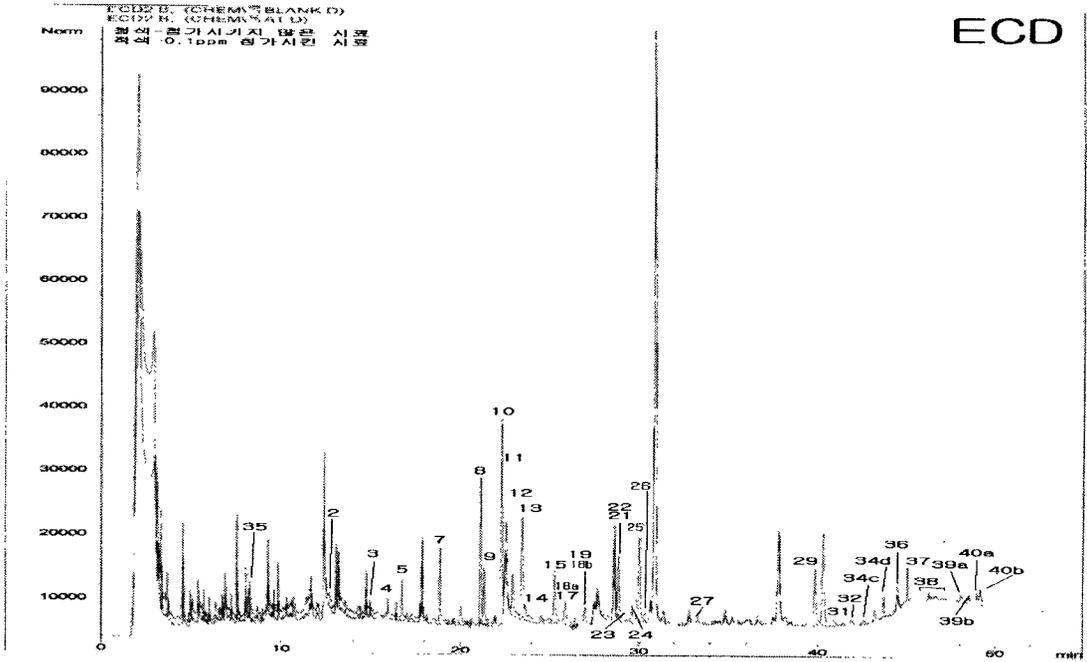
HO

(B group)

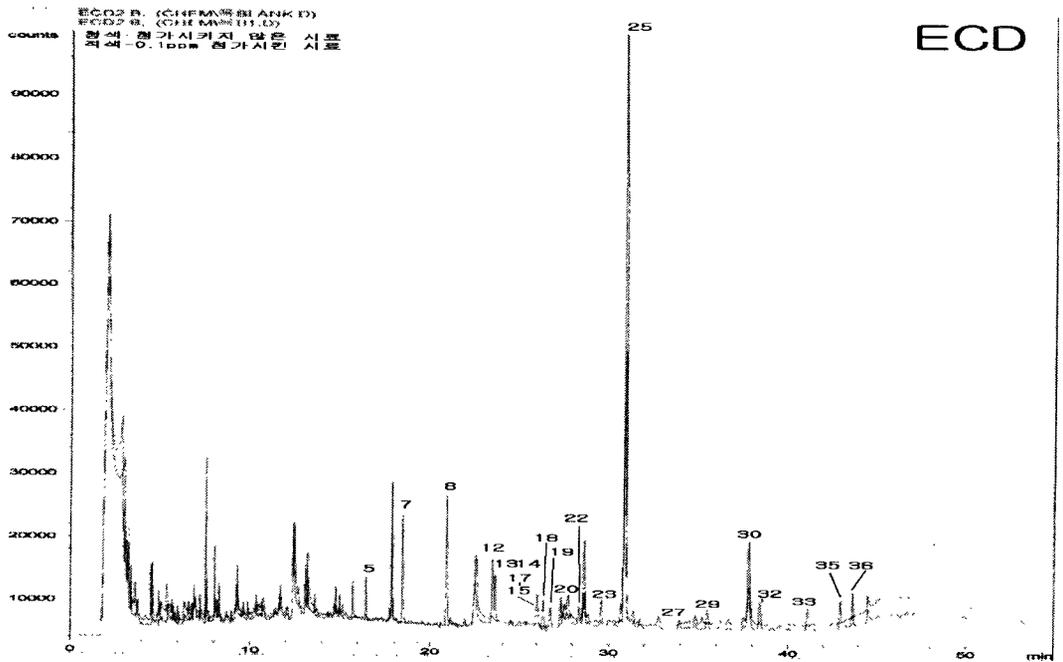


# 옥수수

(A group)

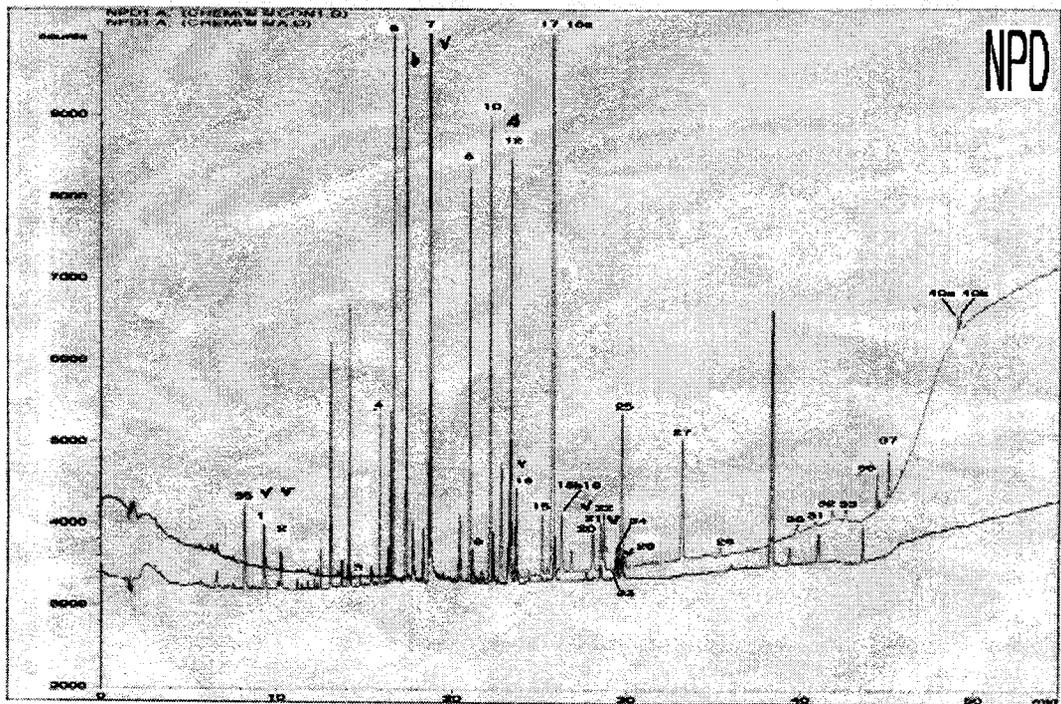
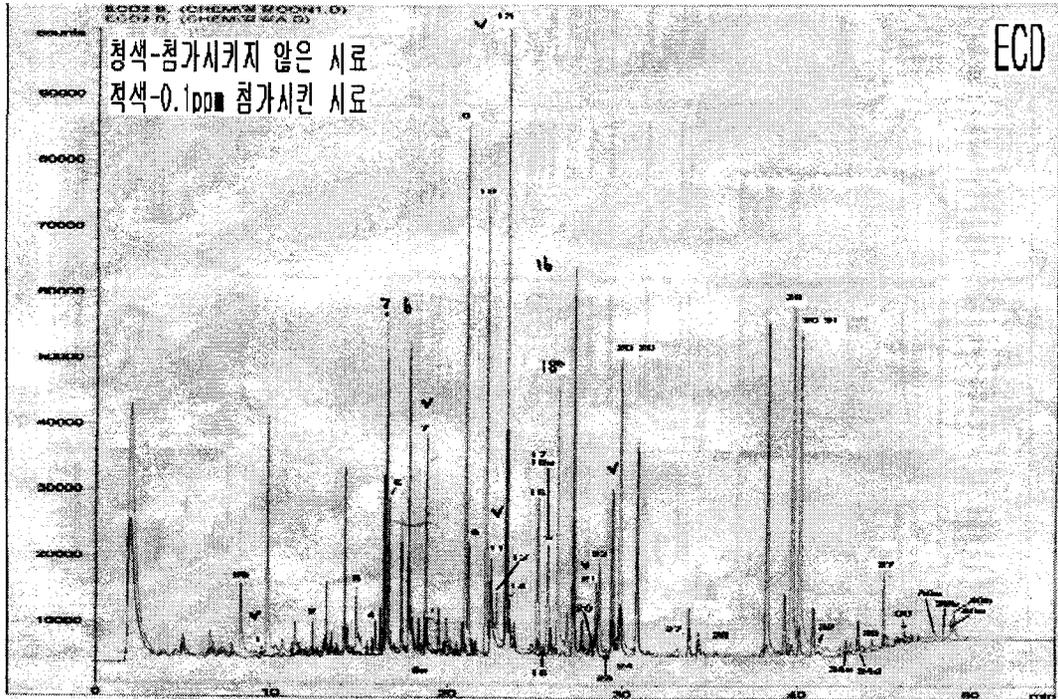


(B group)



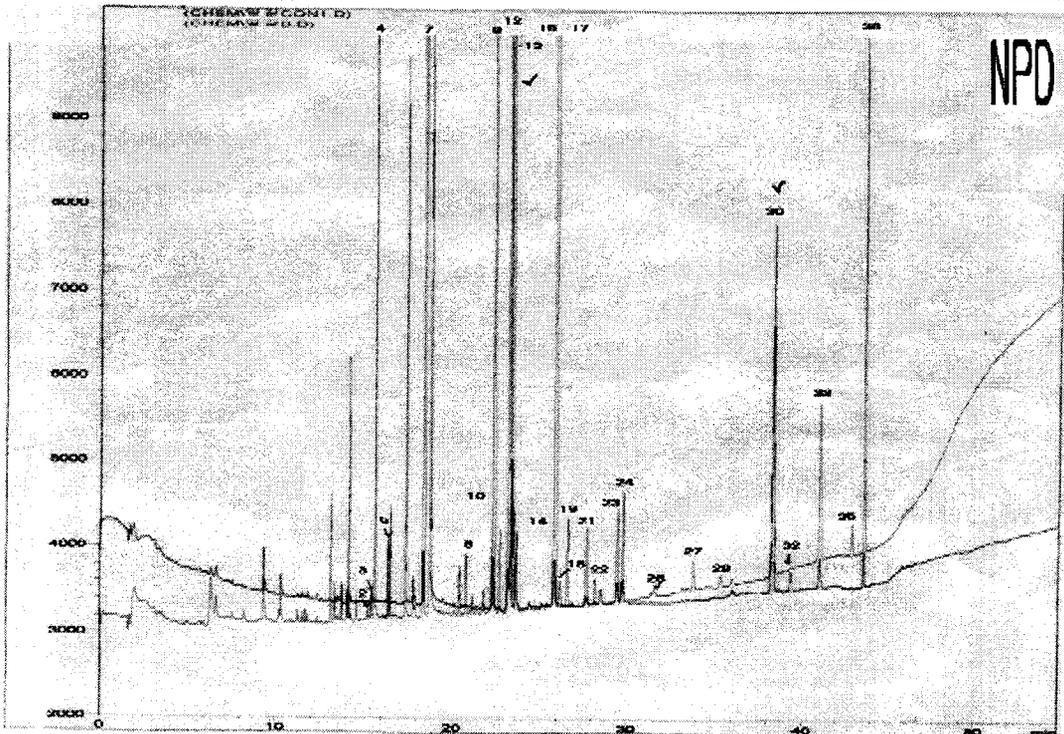
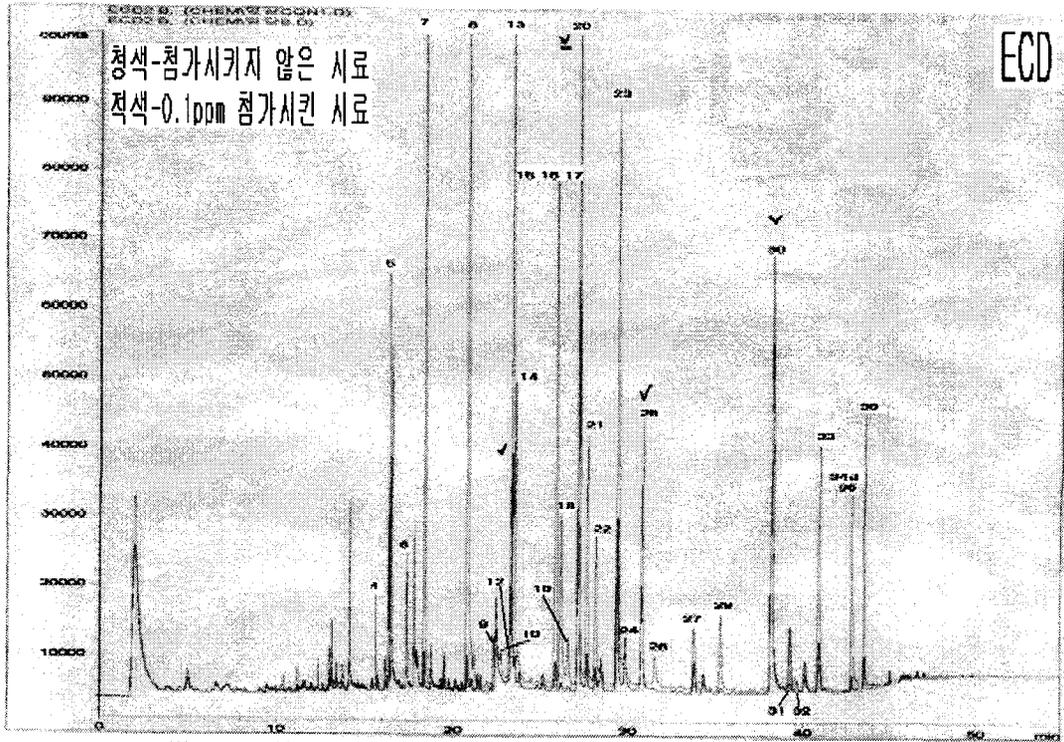
# 얼갈이 배추

(A group)



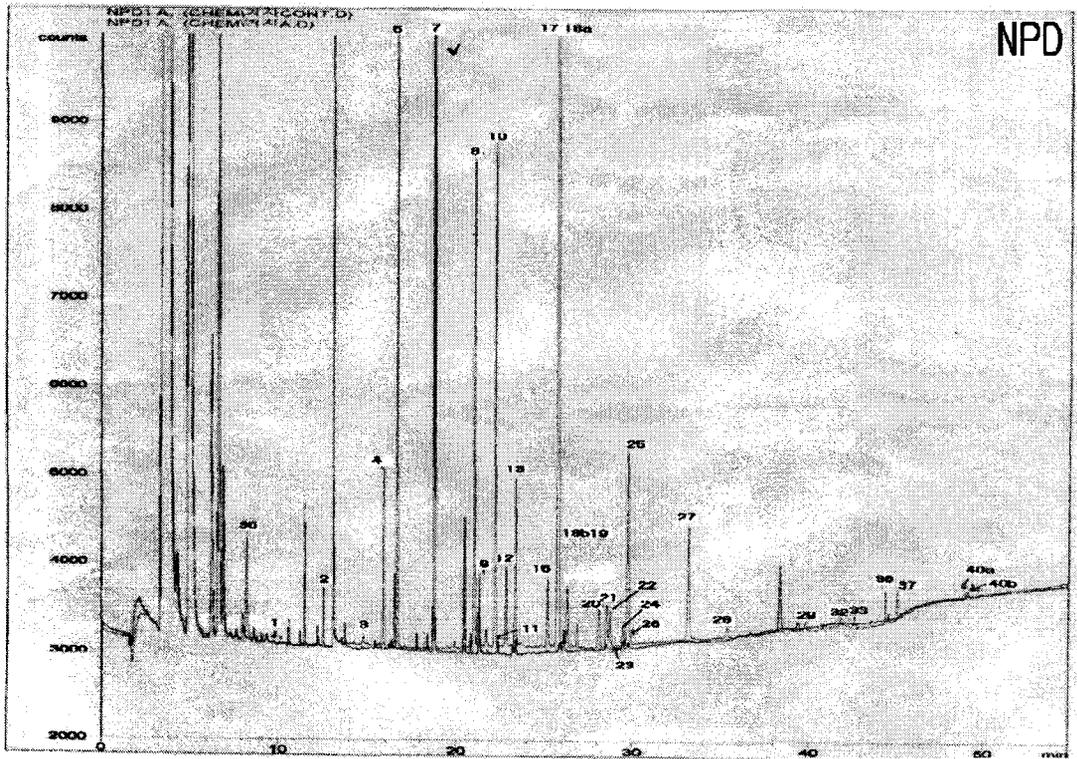
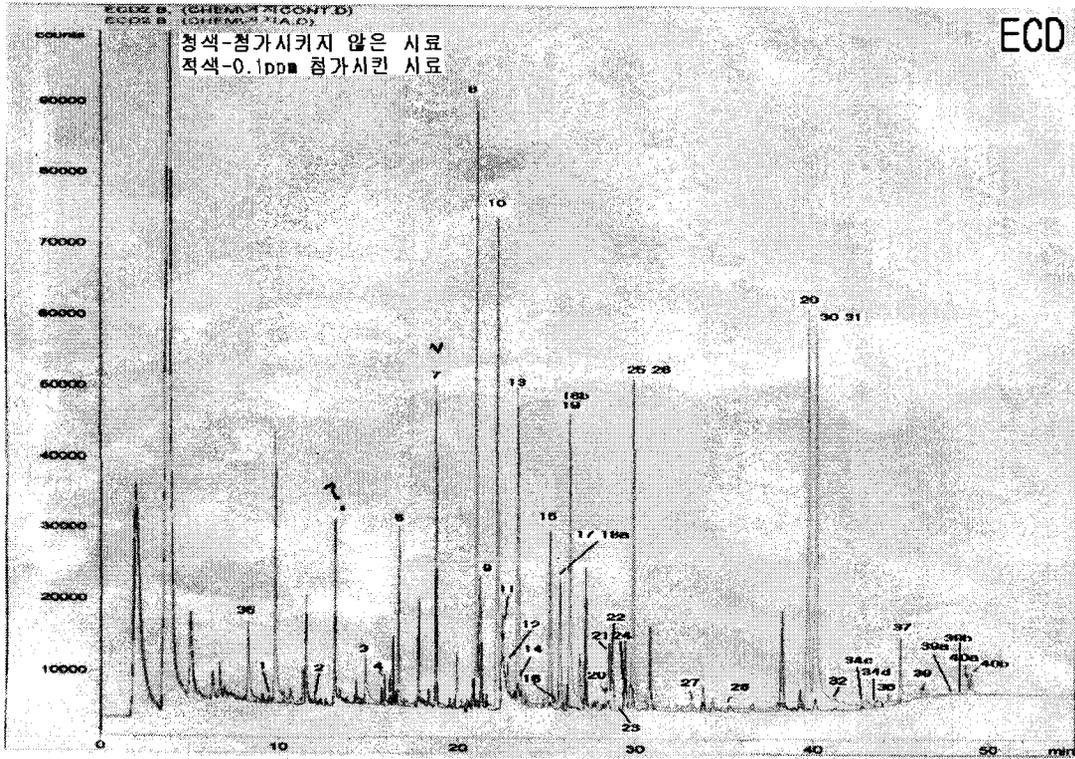
# 얼갈이 배추

(B group)

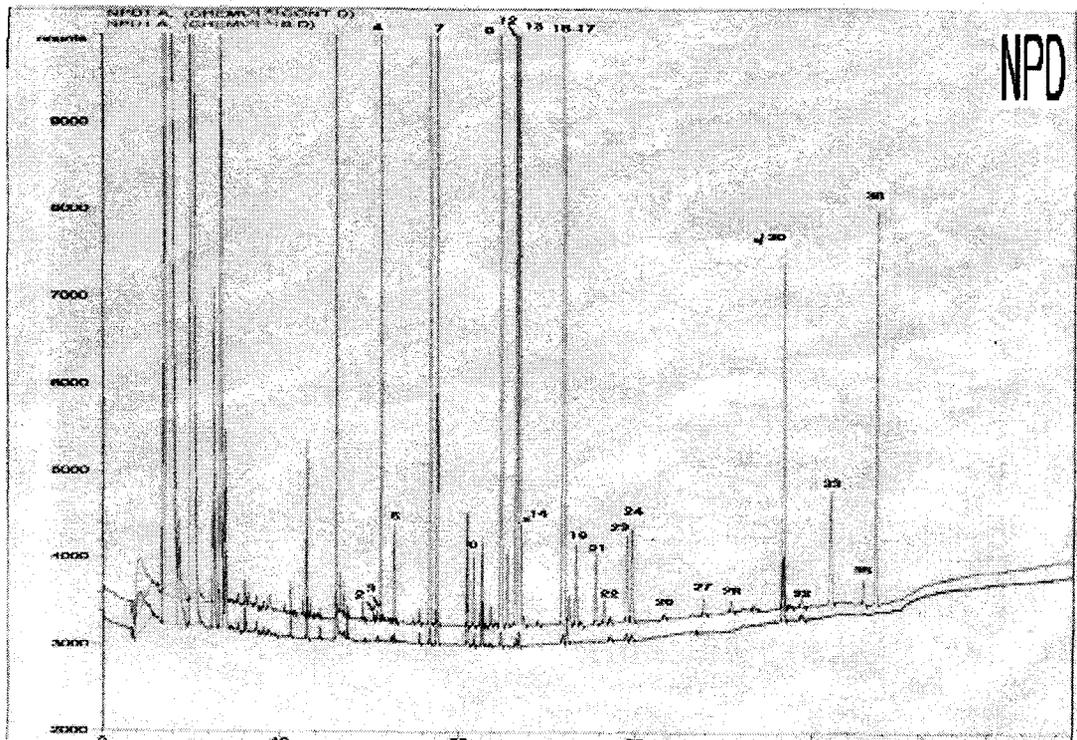
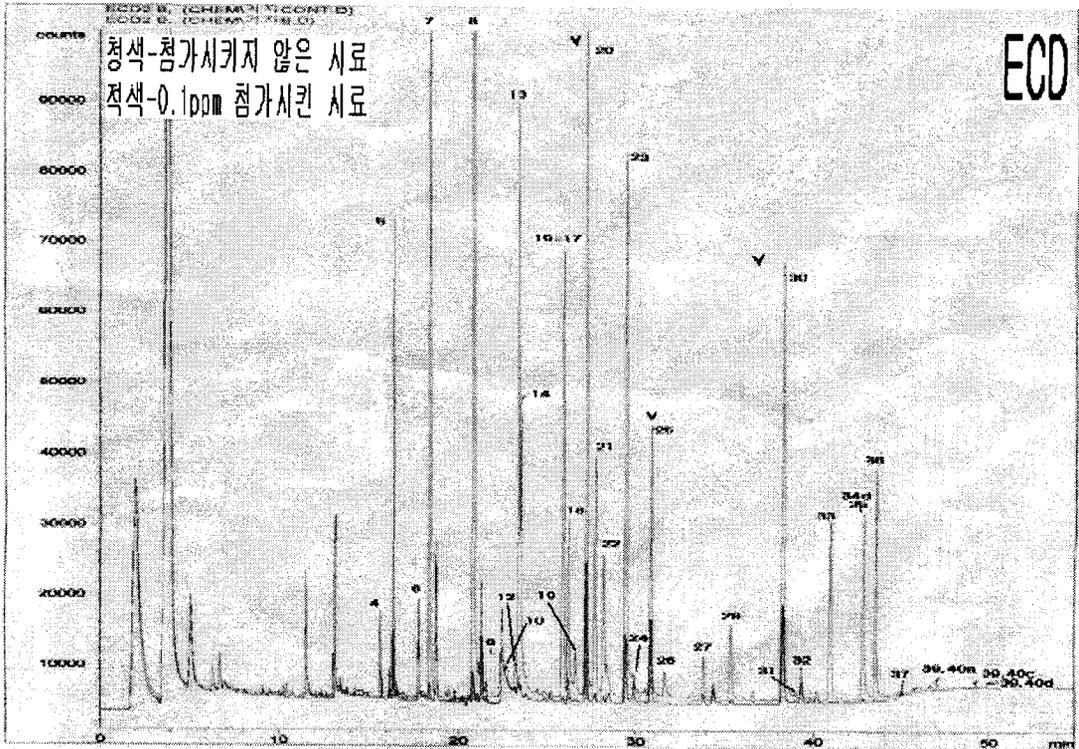


# 겨자채

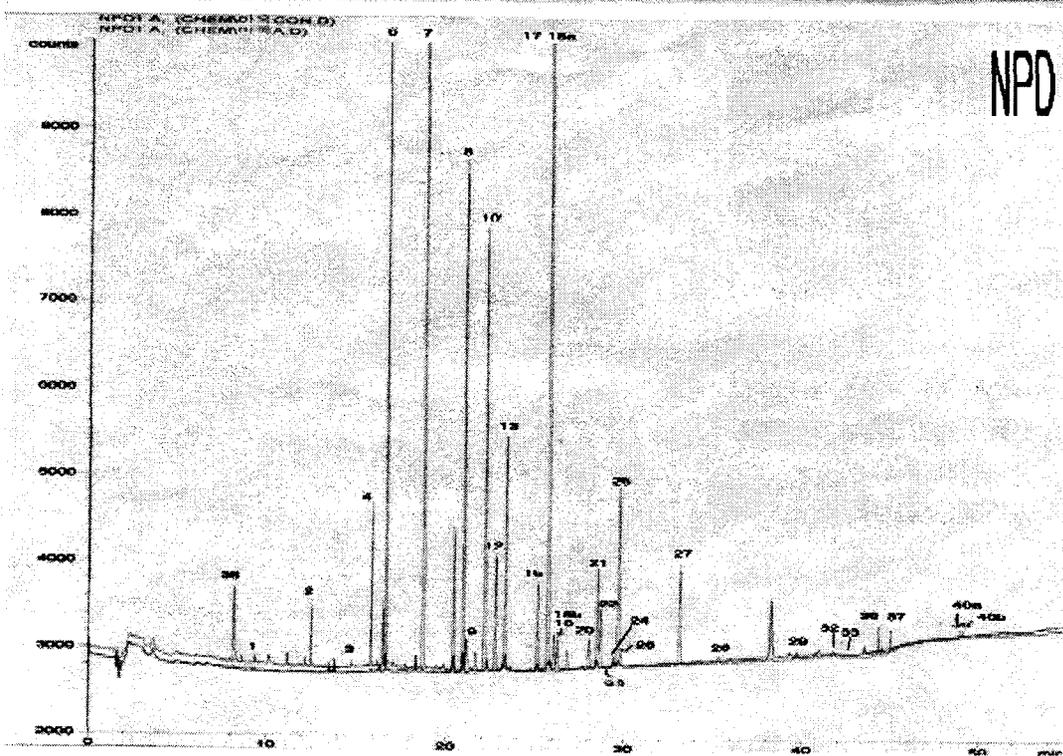
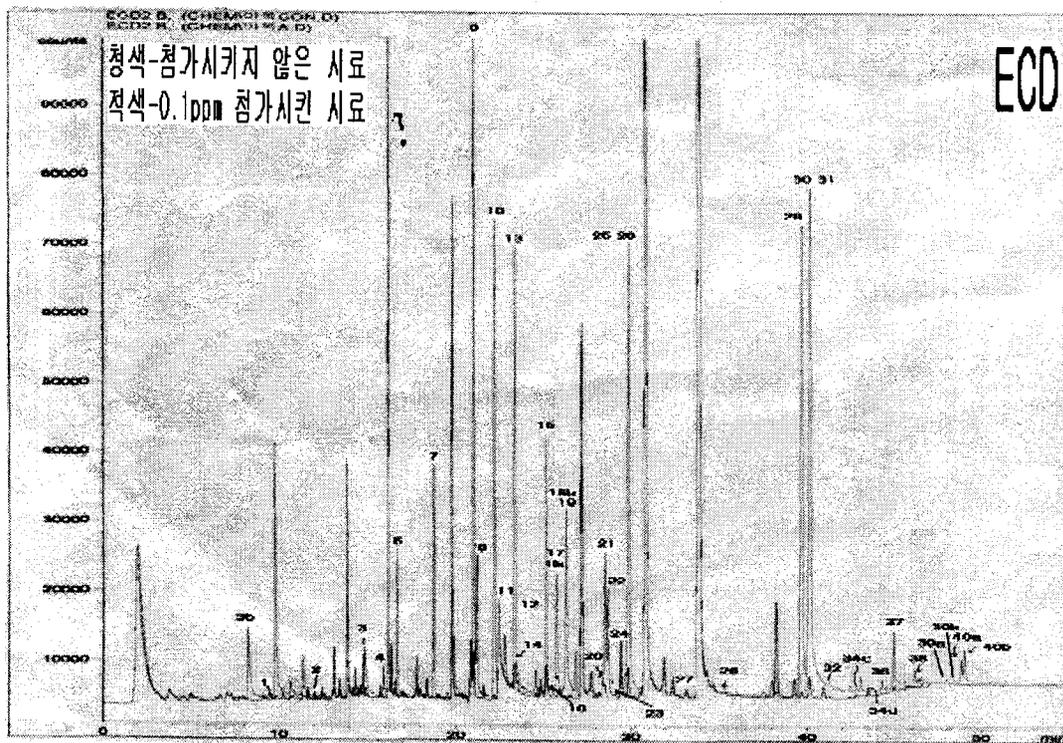
## (A group)



# 겨자채 (B group)

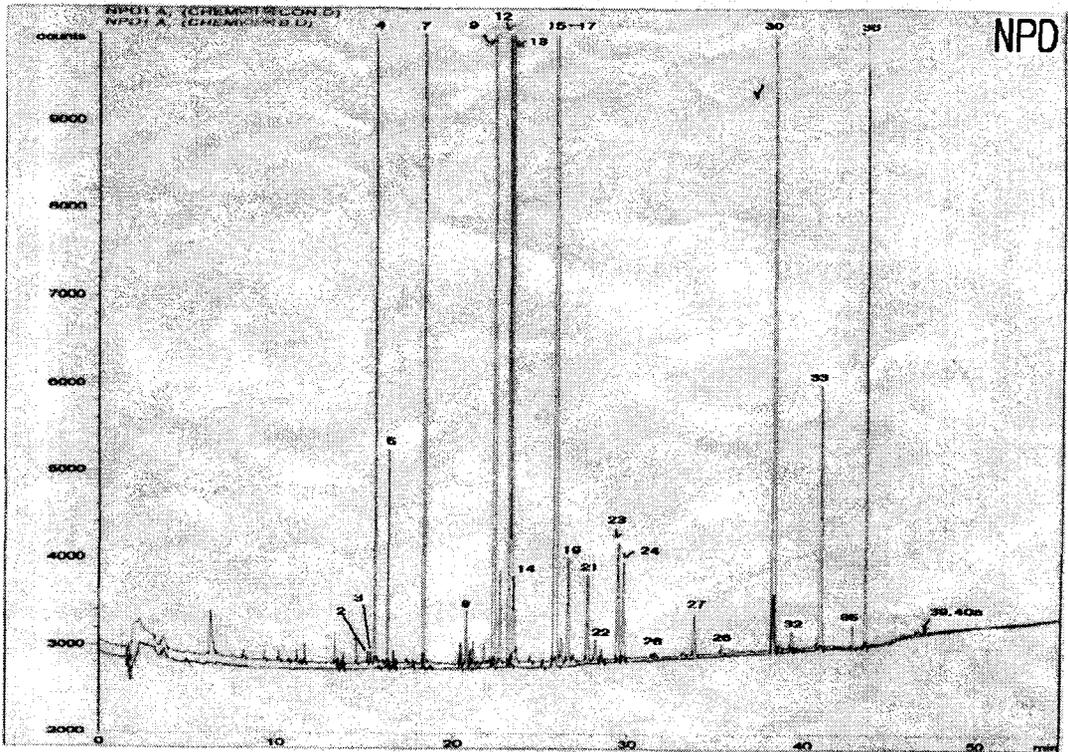
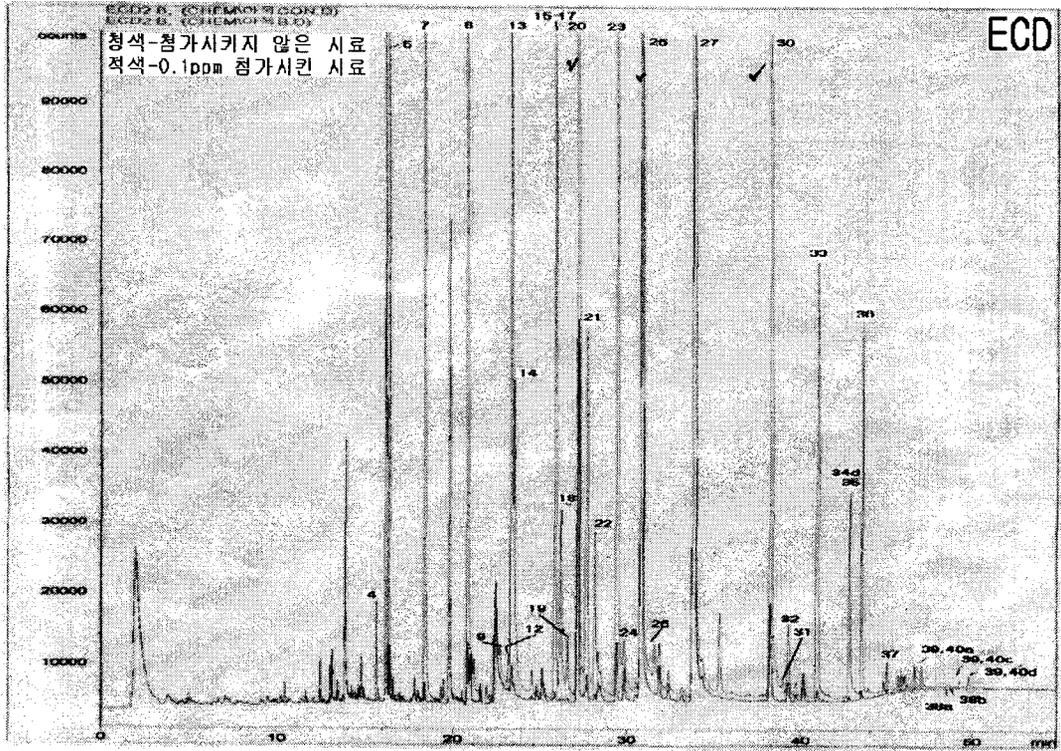


# 아 옥 (A group)



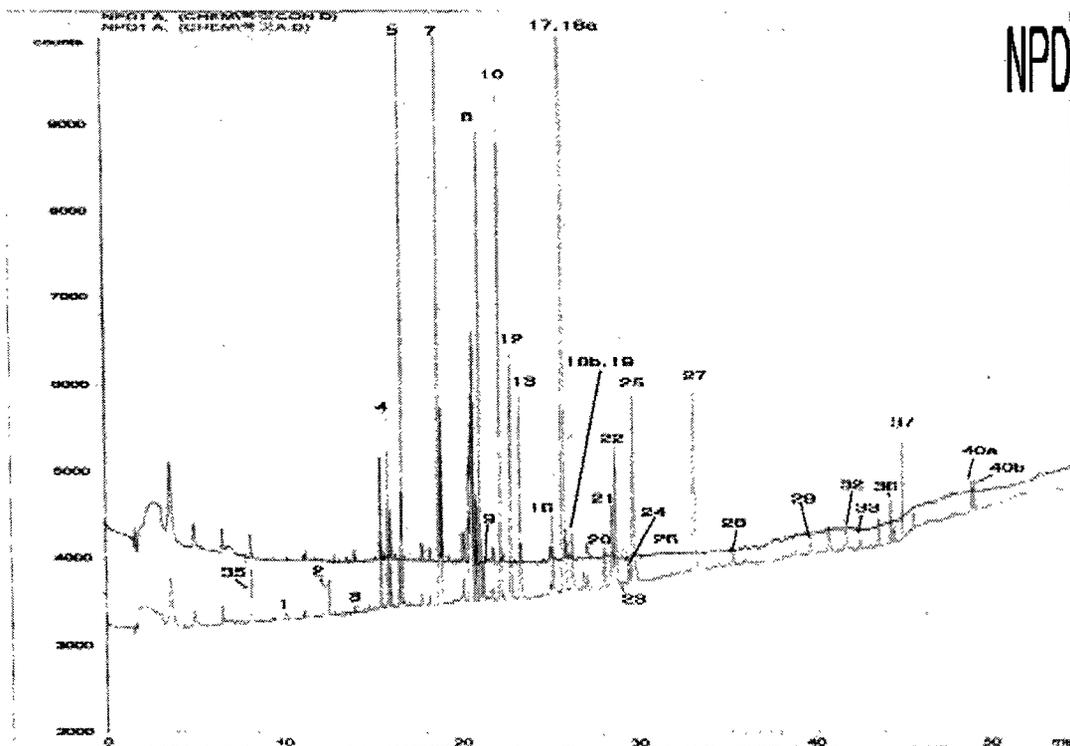
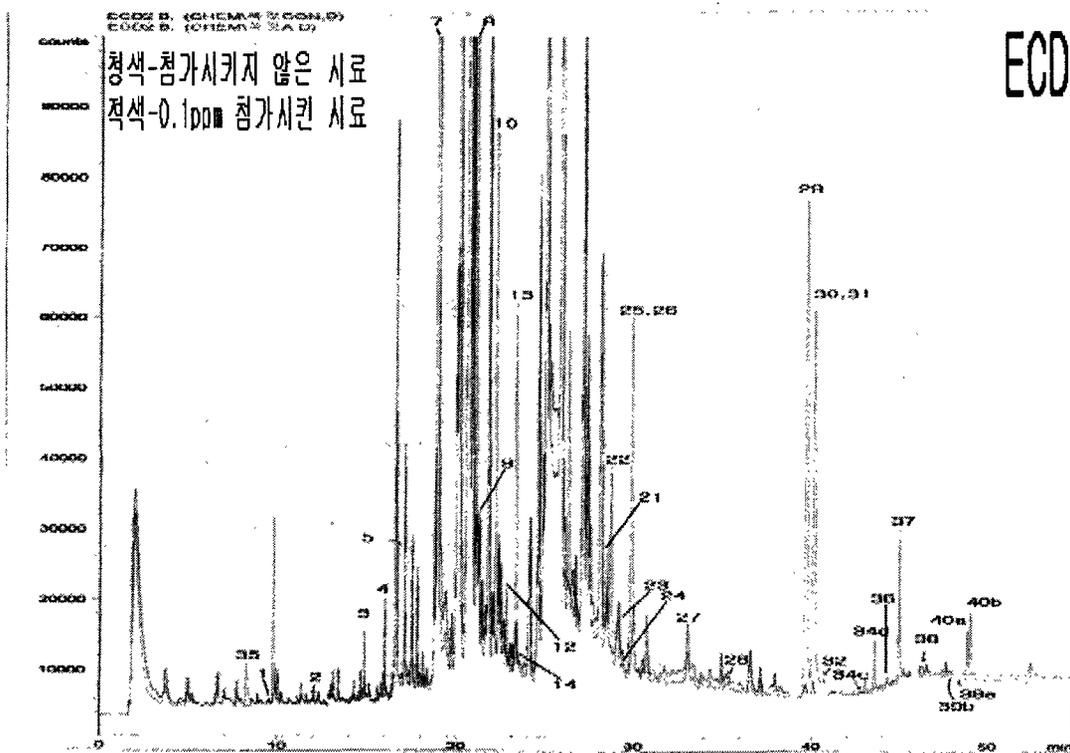
# 아 옥

## (B group)



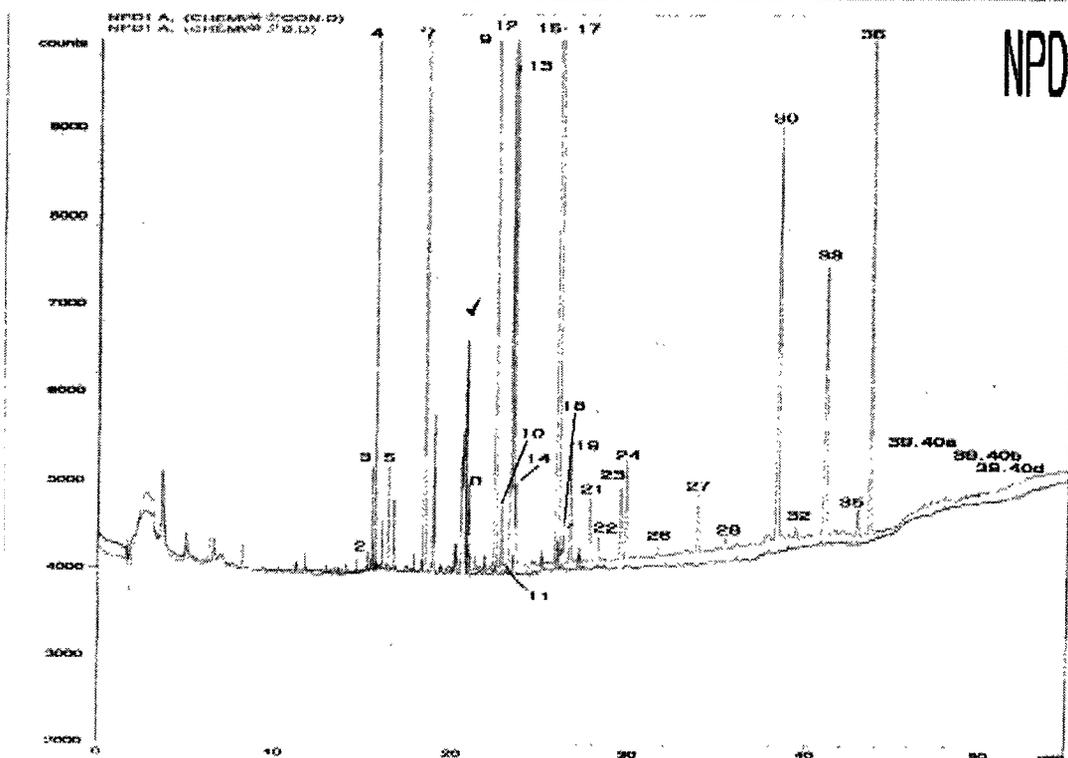
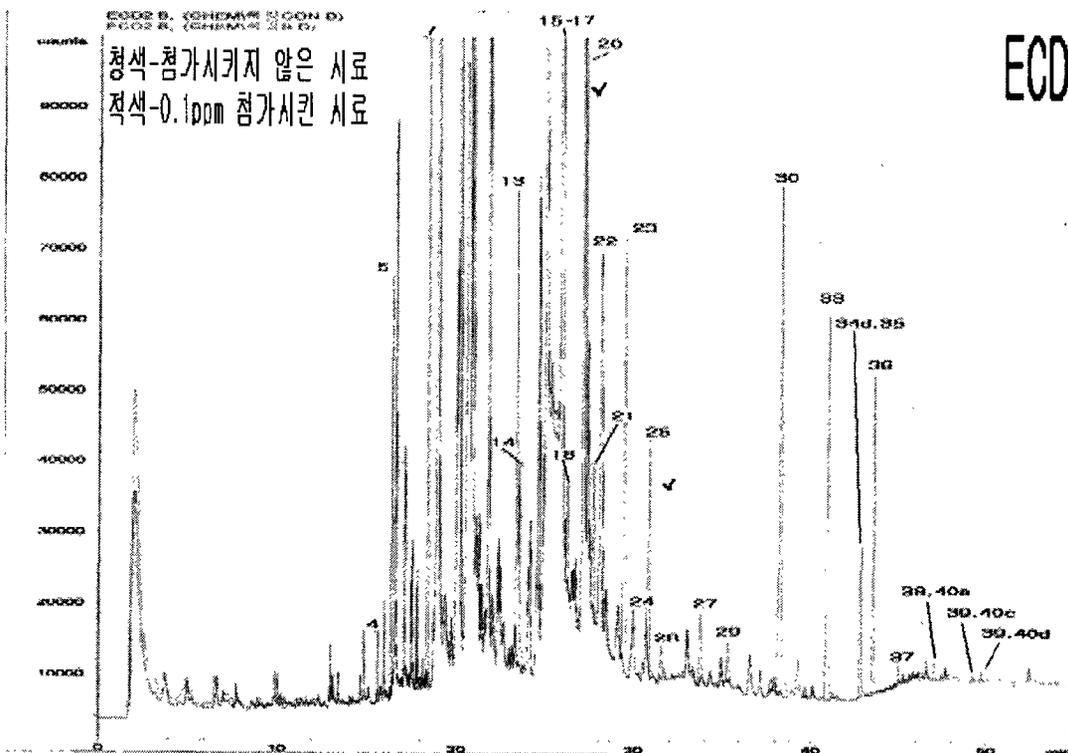
# 속 갖

(A group)



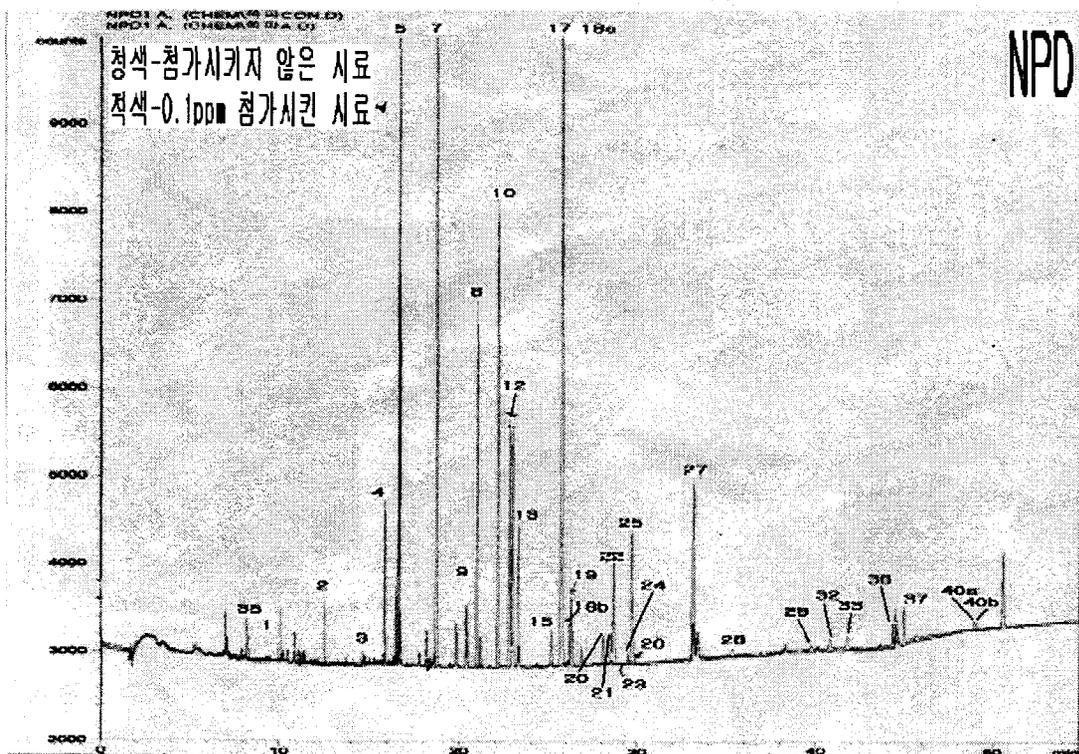
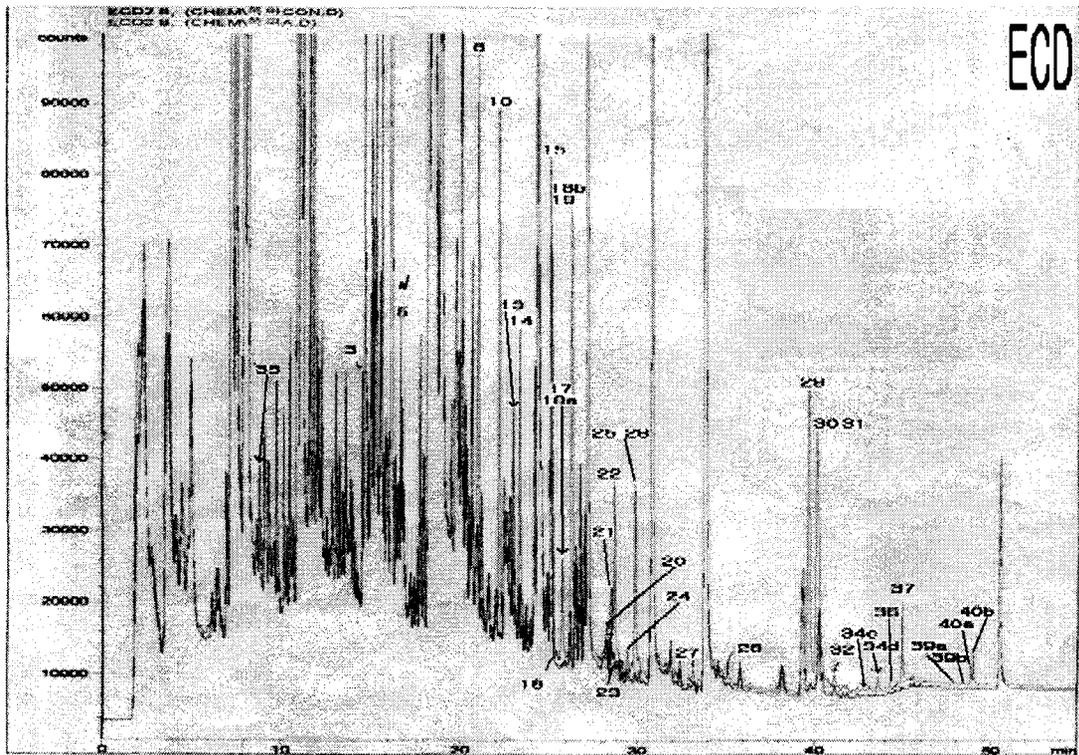
# 썩 갖

(B group)



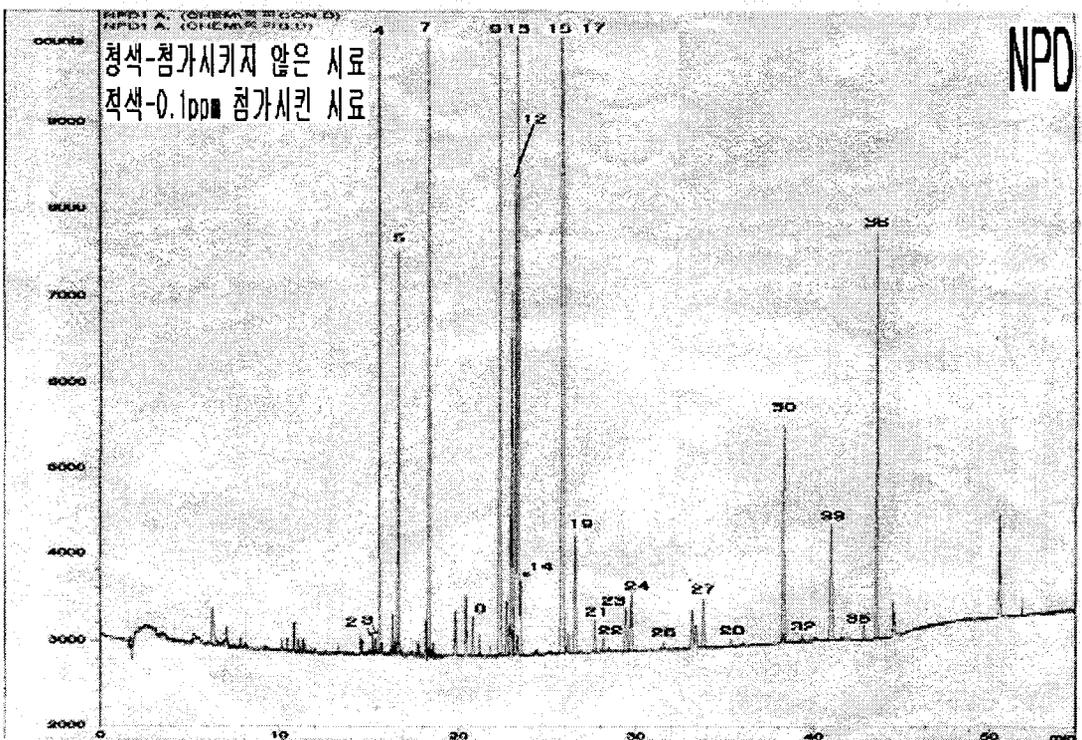
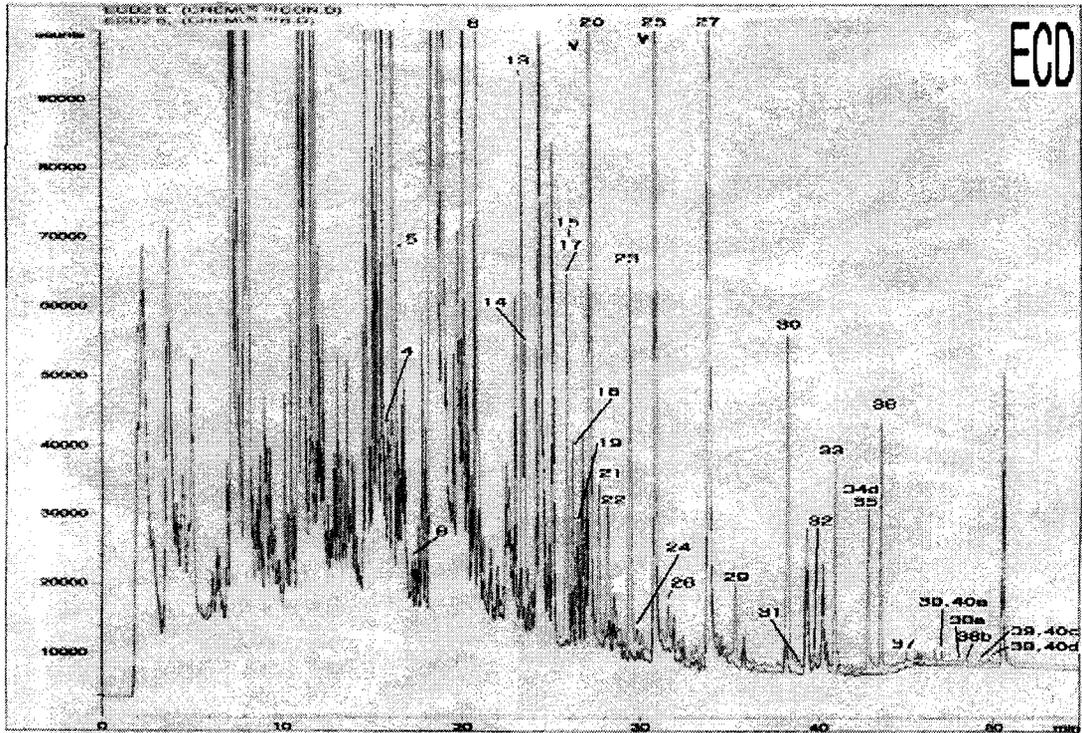
# 쪽 파

(A group)



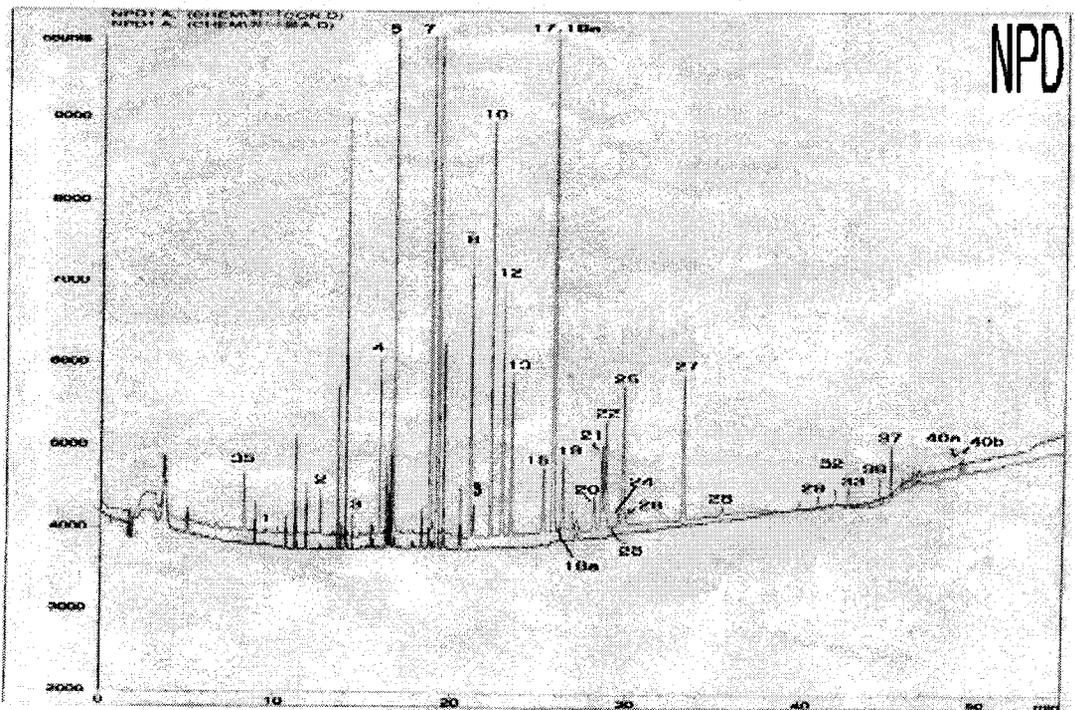
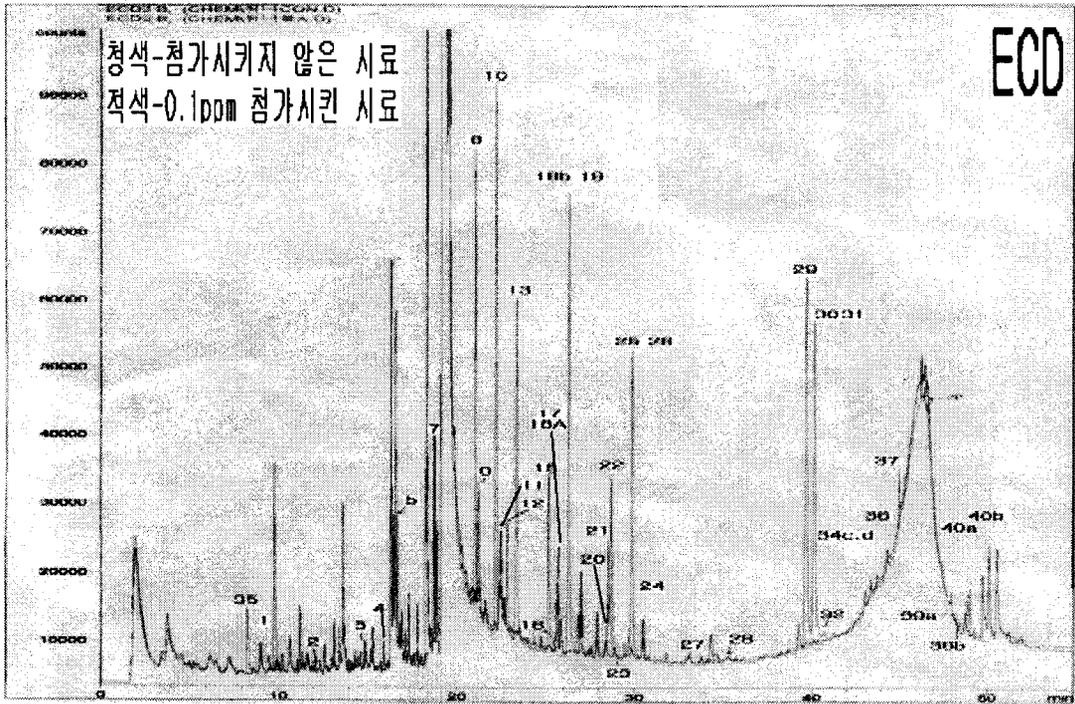
# 쪽 파

## (B group)



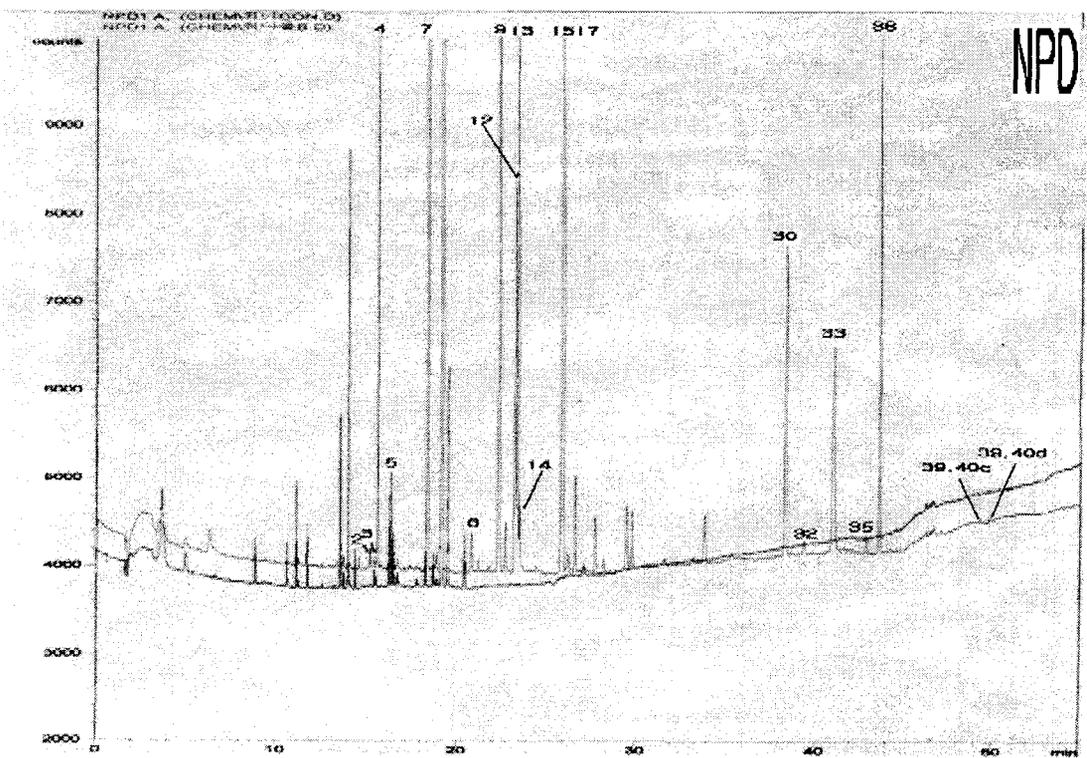
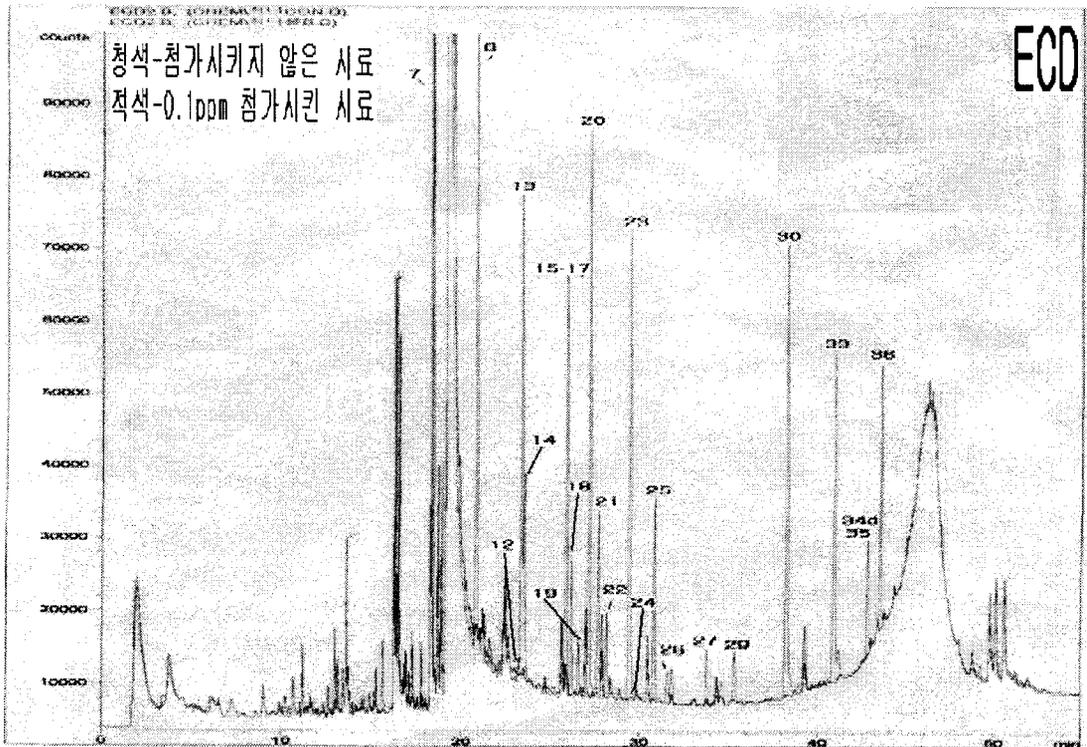
# 취나물

(A group)



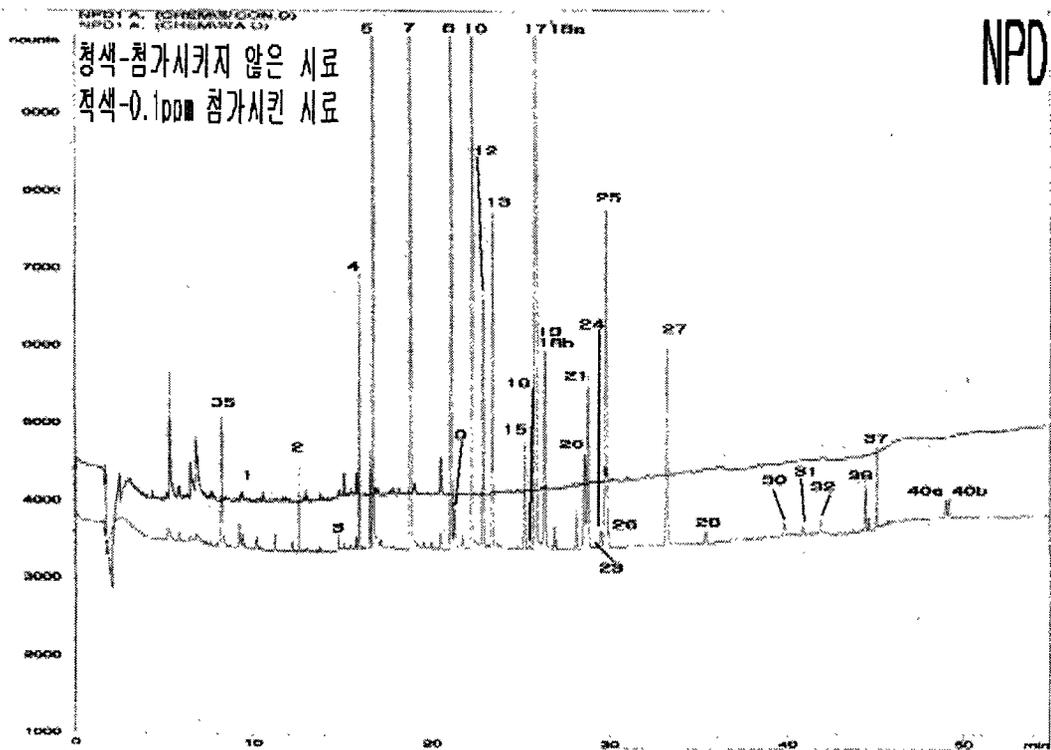
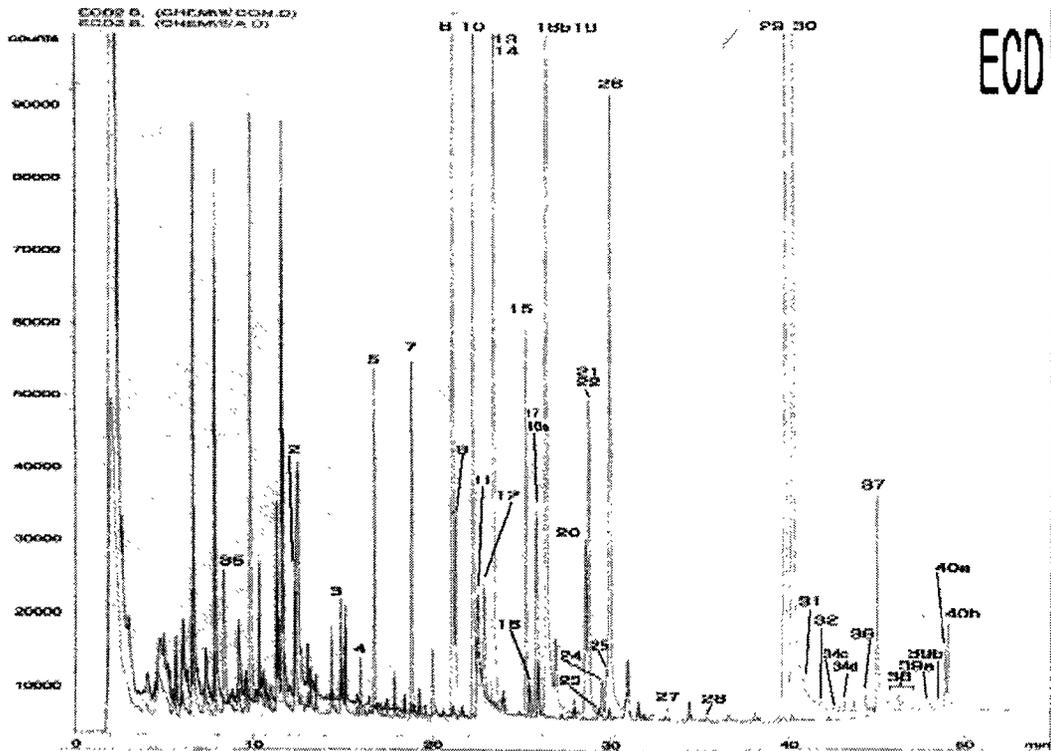
# 취나물

(B group)



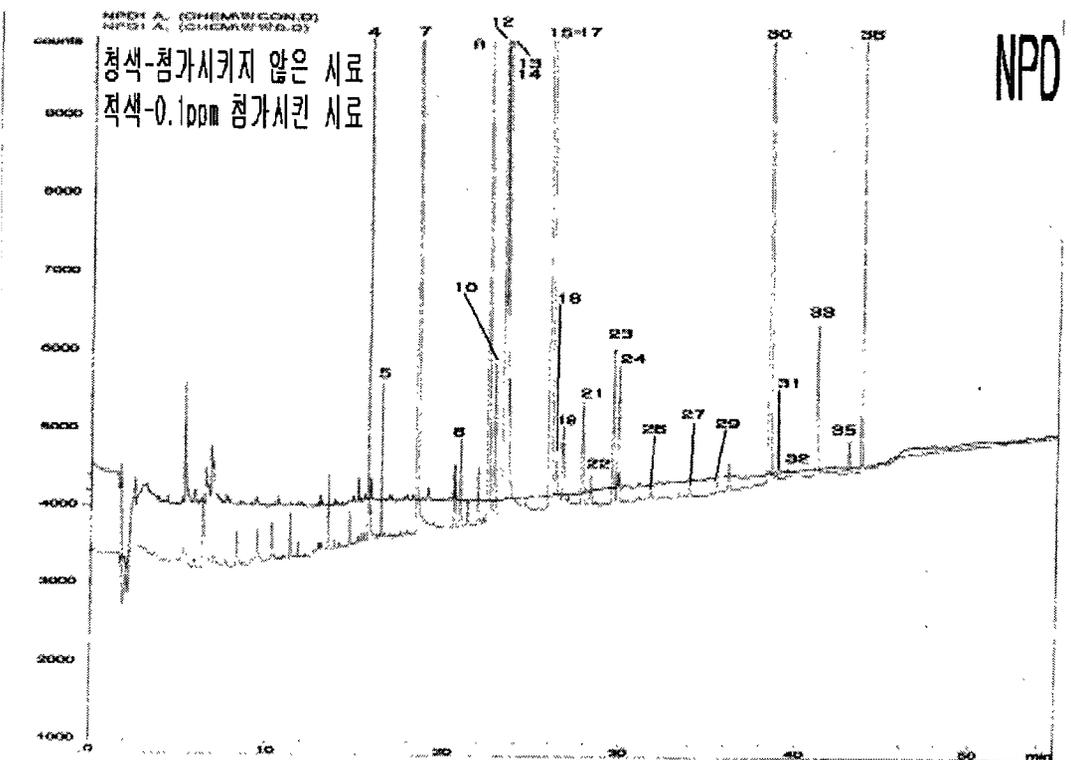
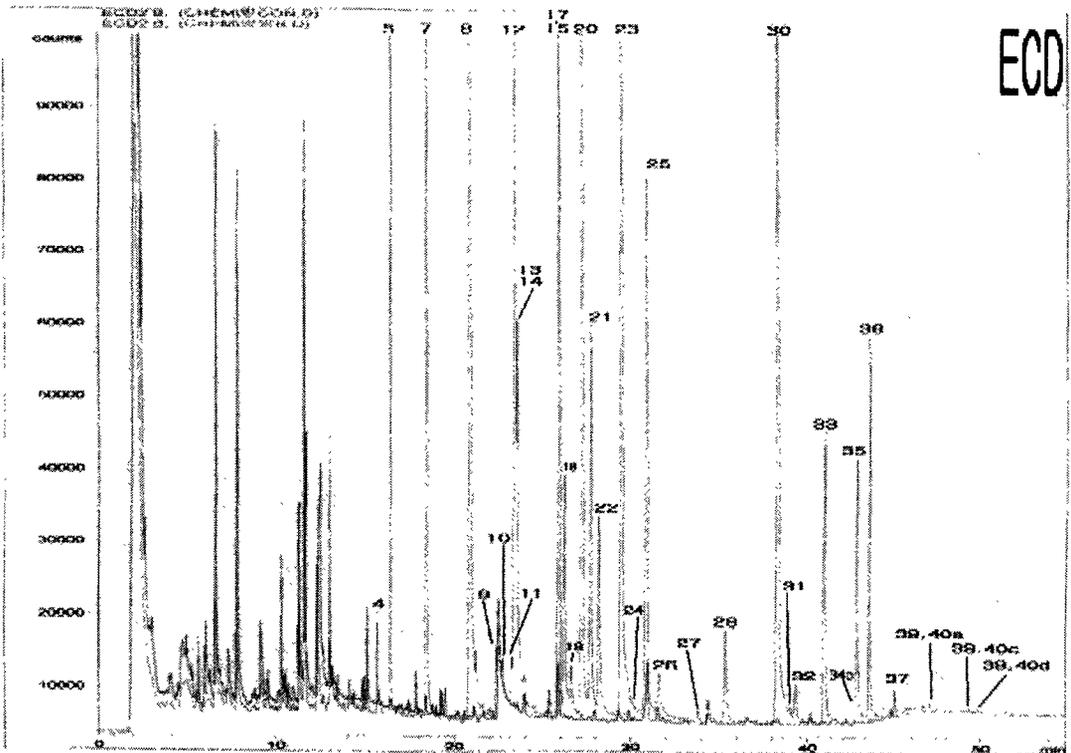
# 방울 토마토

(A group)



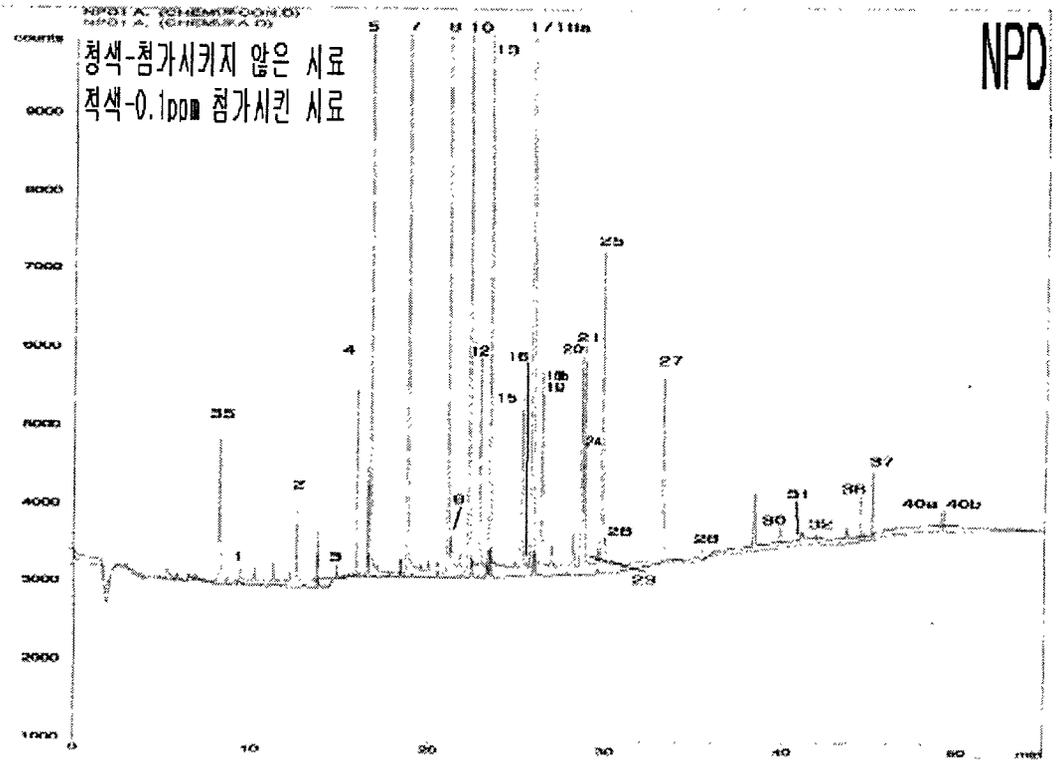
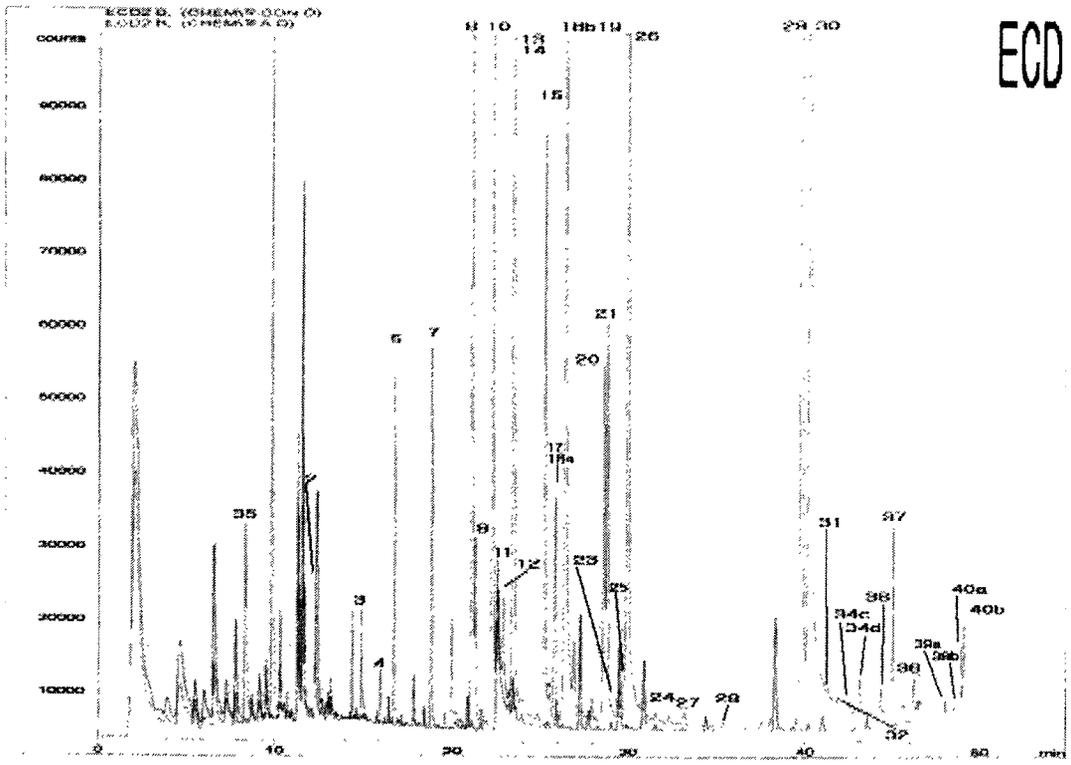
# 방울 토마토

(B group)



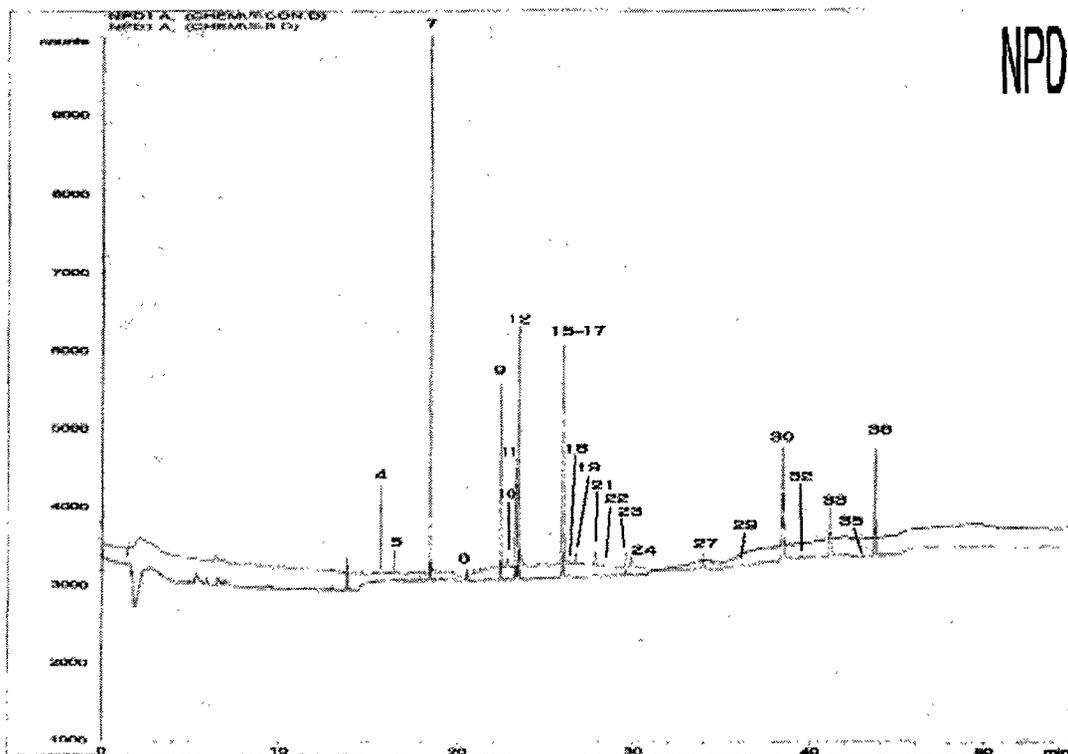
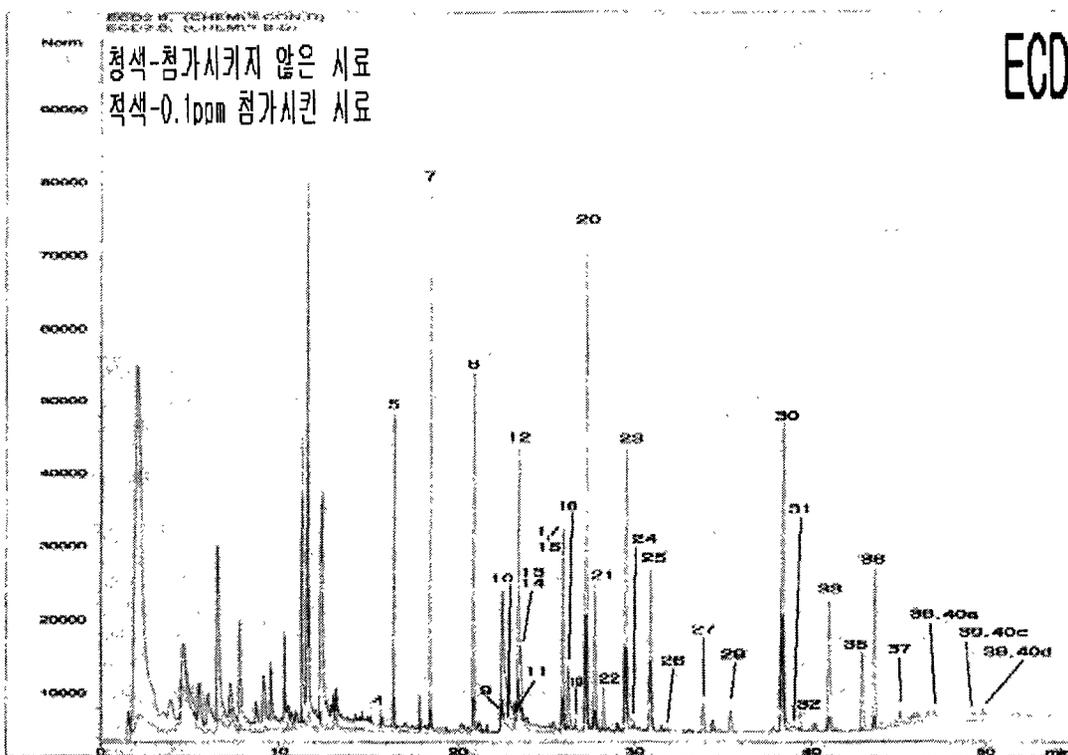
# 토 마 토

(A group)



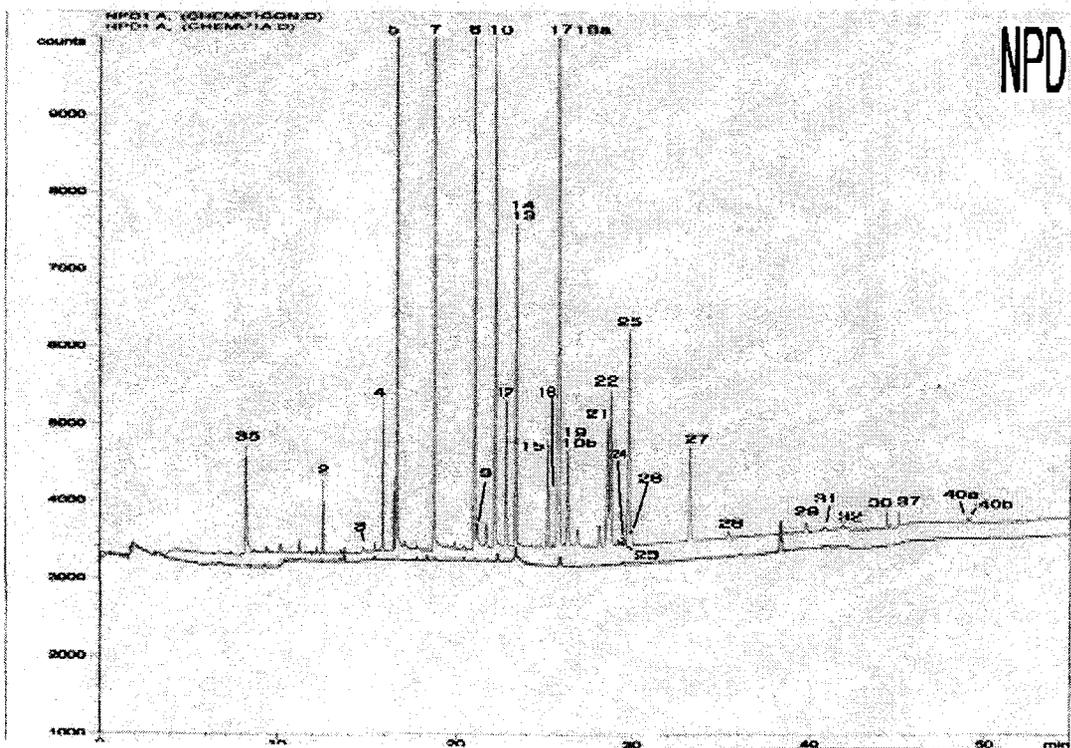
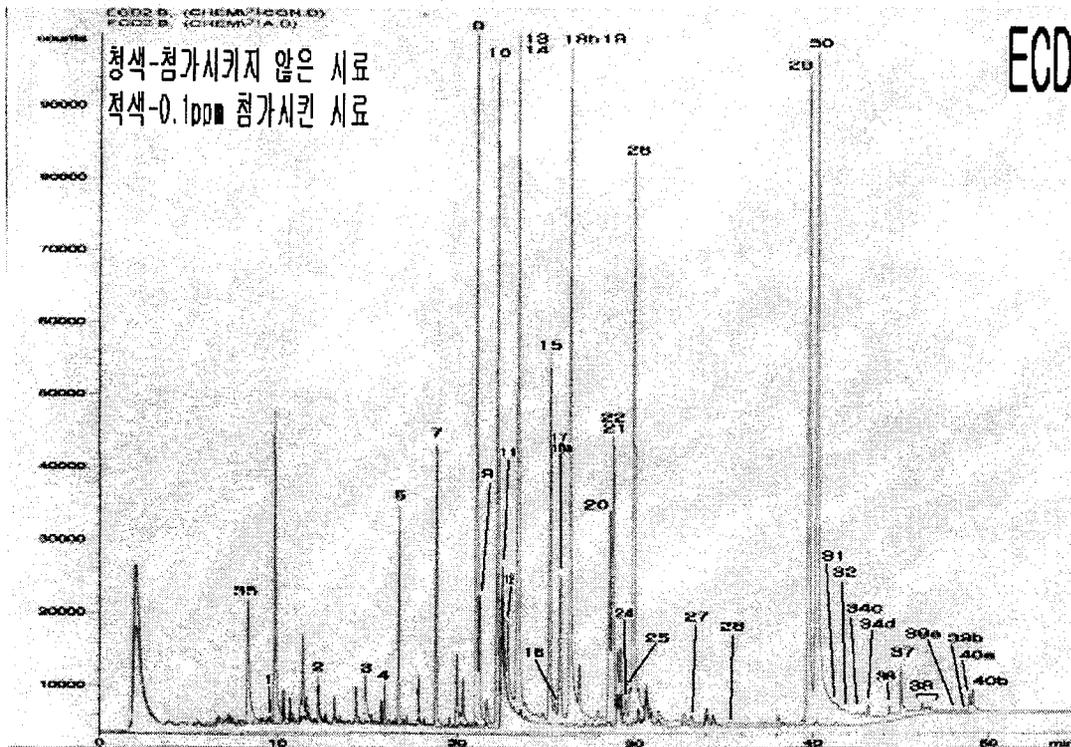
# 토 마 토

(B group)



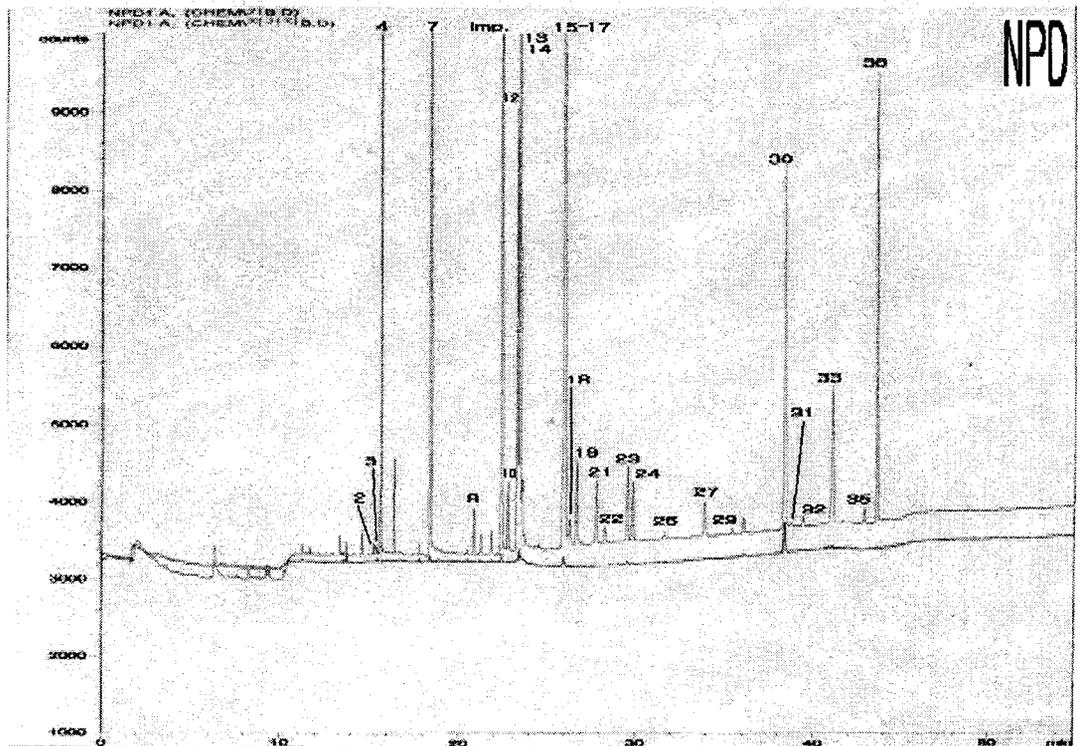
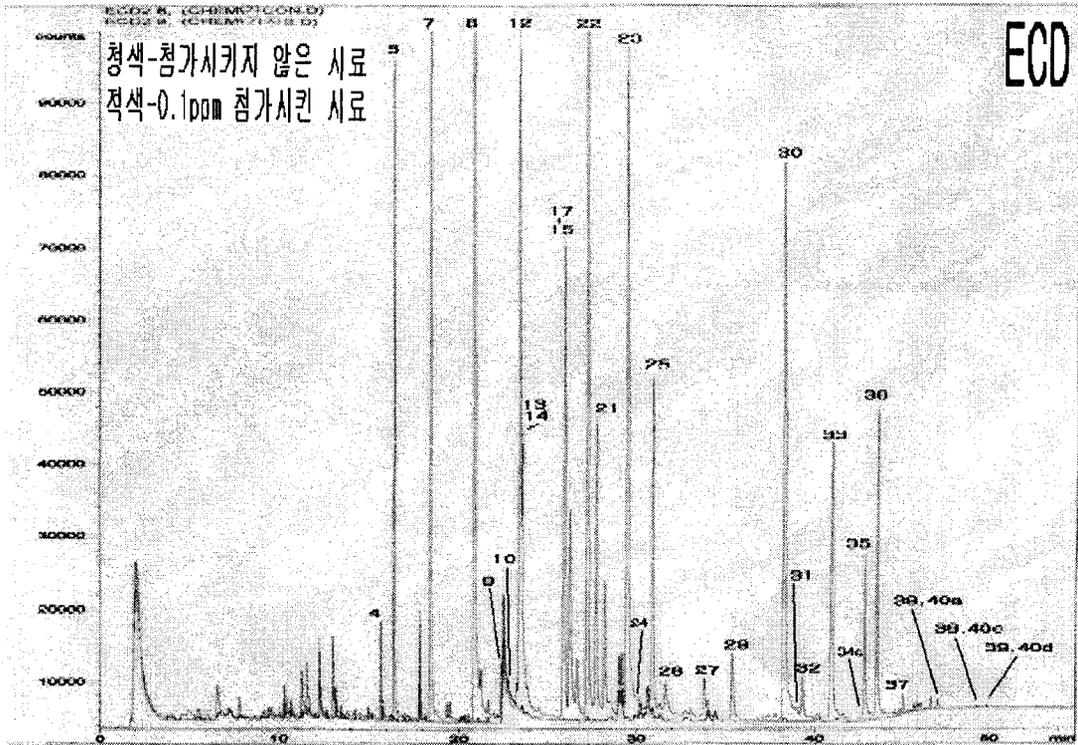
# 가 지

## (A group)



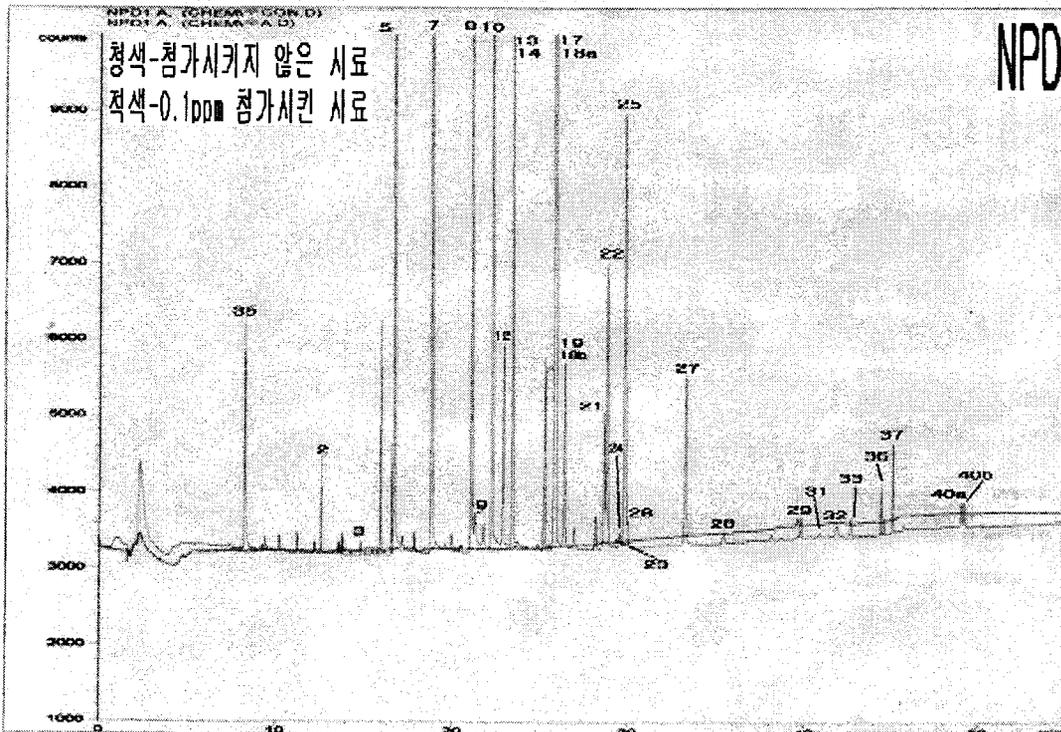
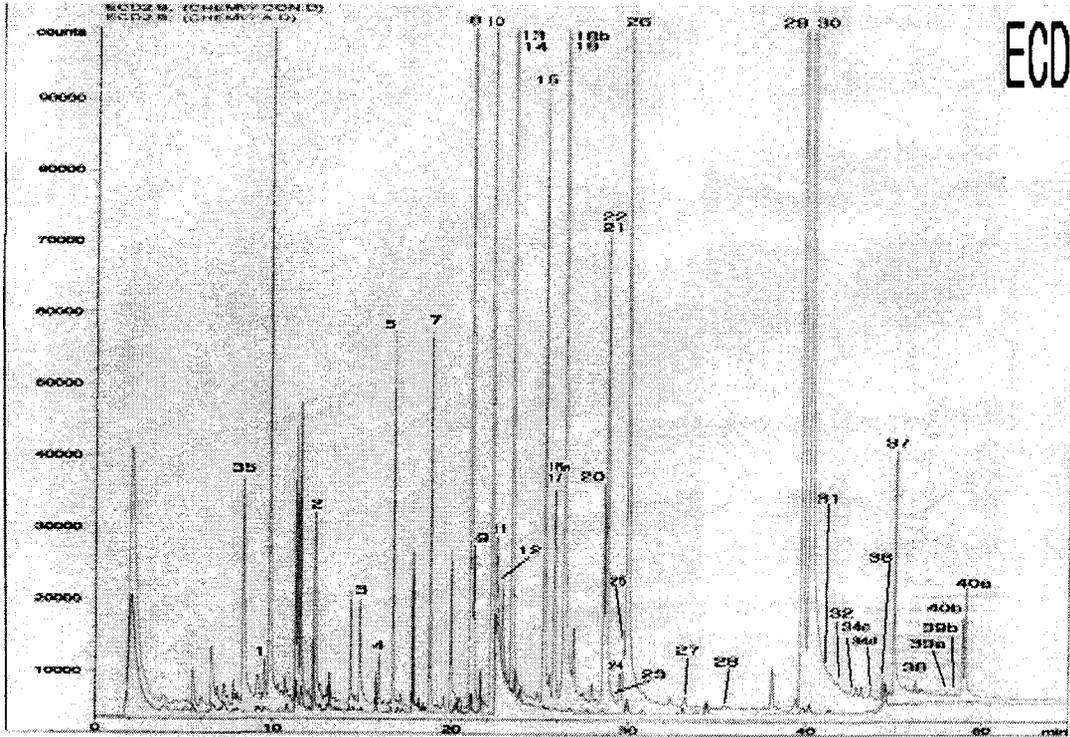
# 가 지

## (B group)



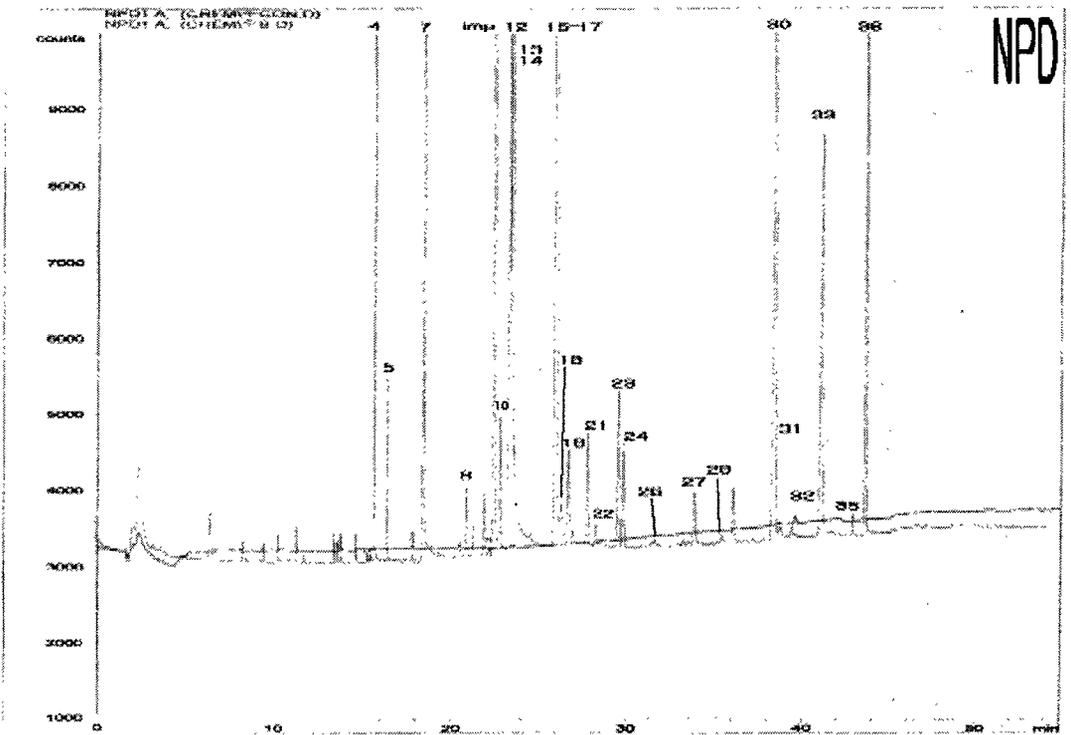
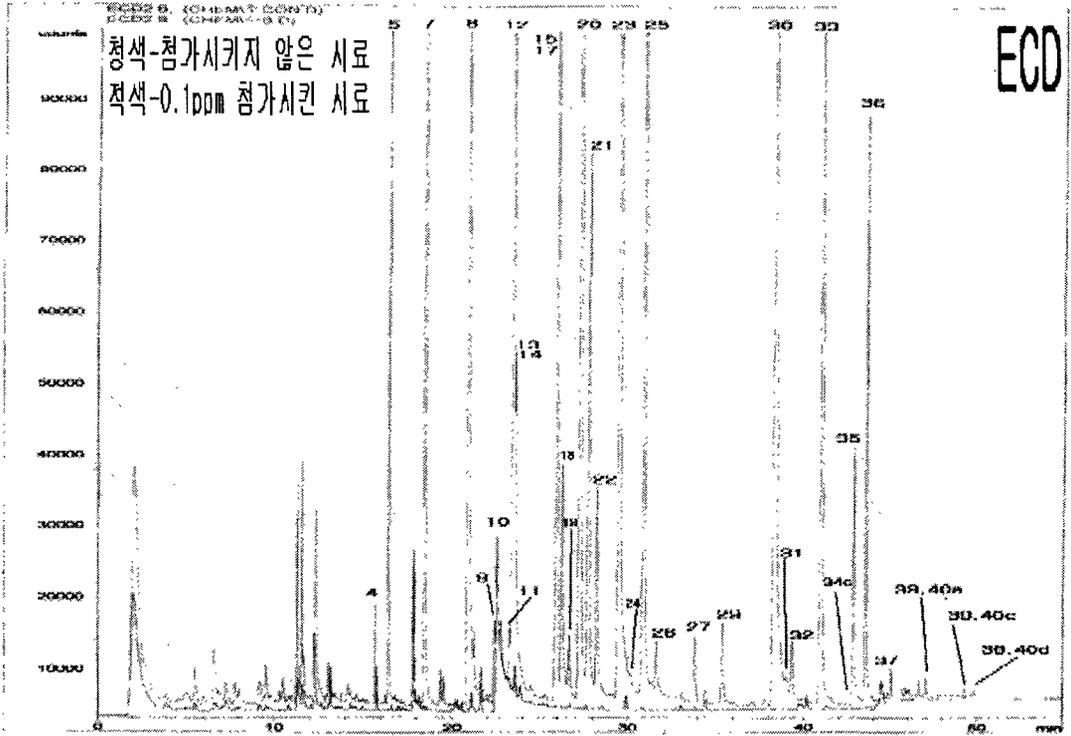
# 수 박

(A group)



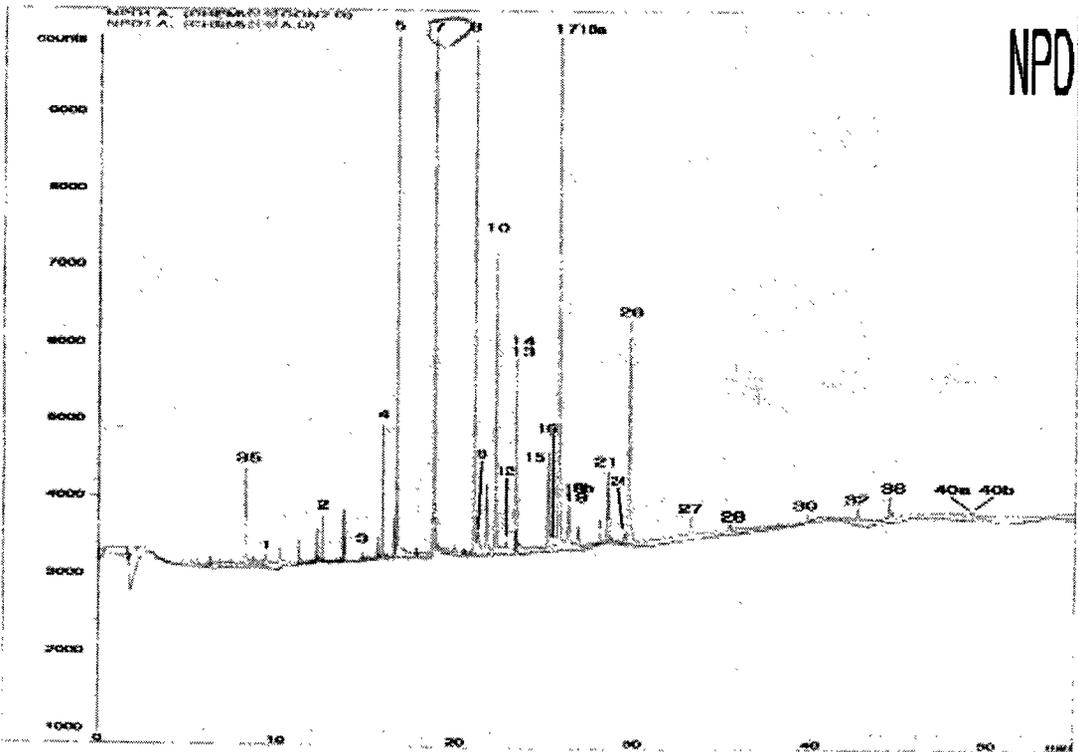
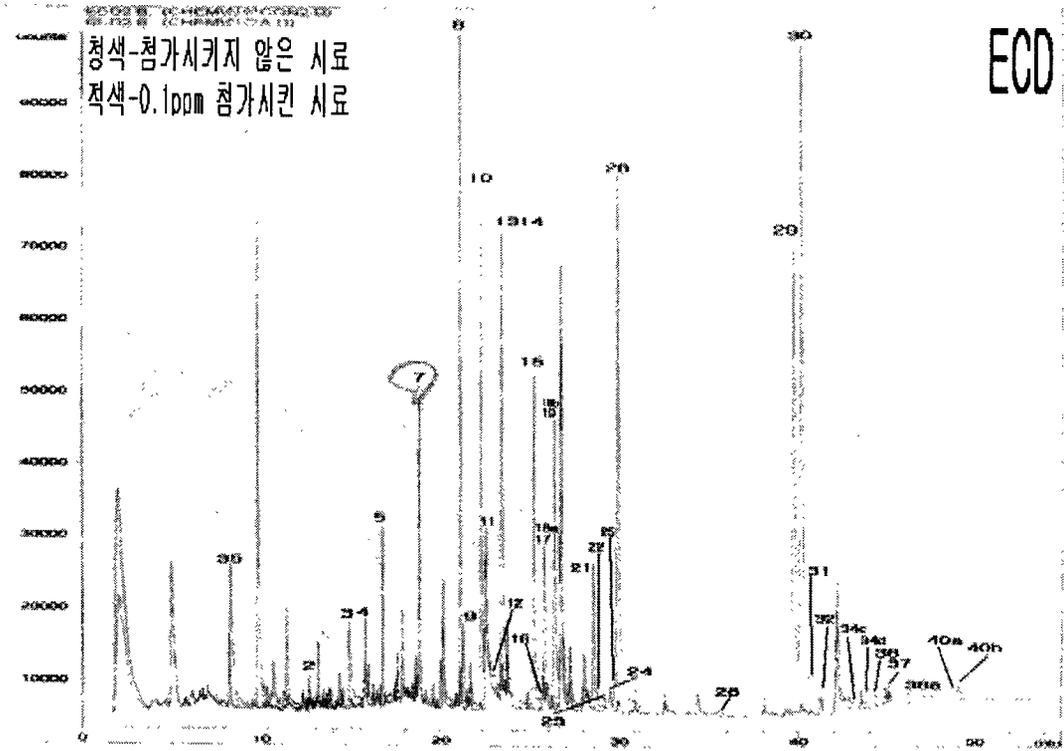
# 수 박

(B group)



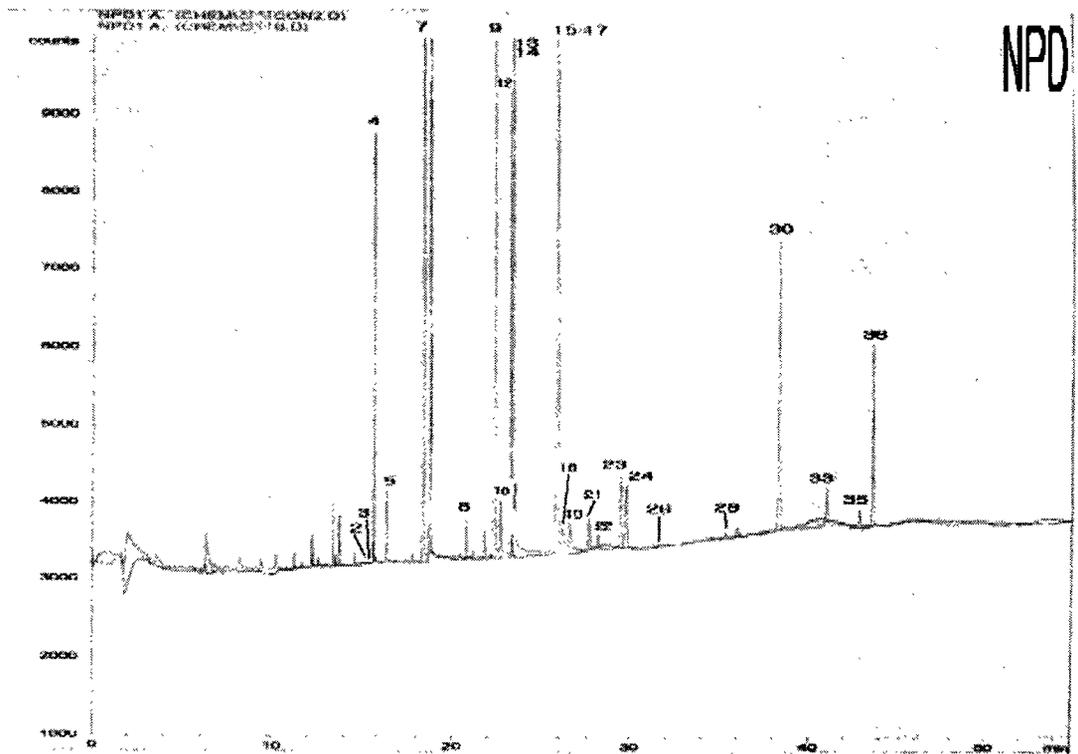
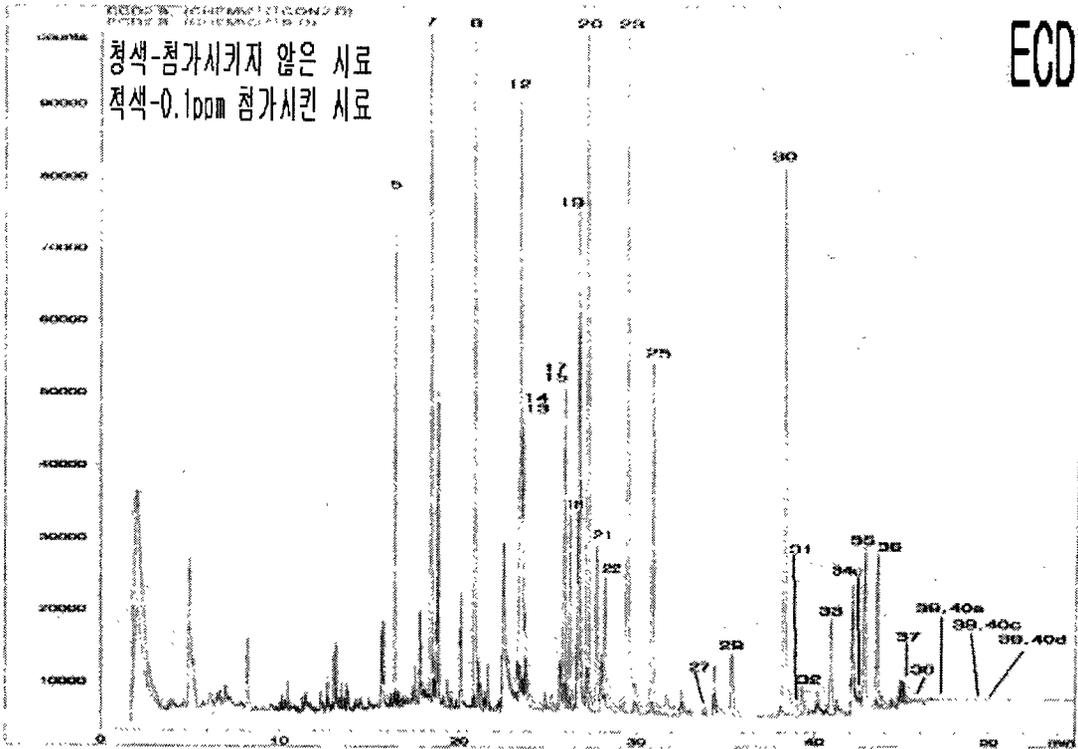
# 신선초

(A group)



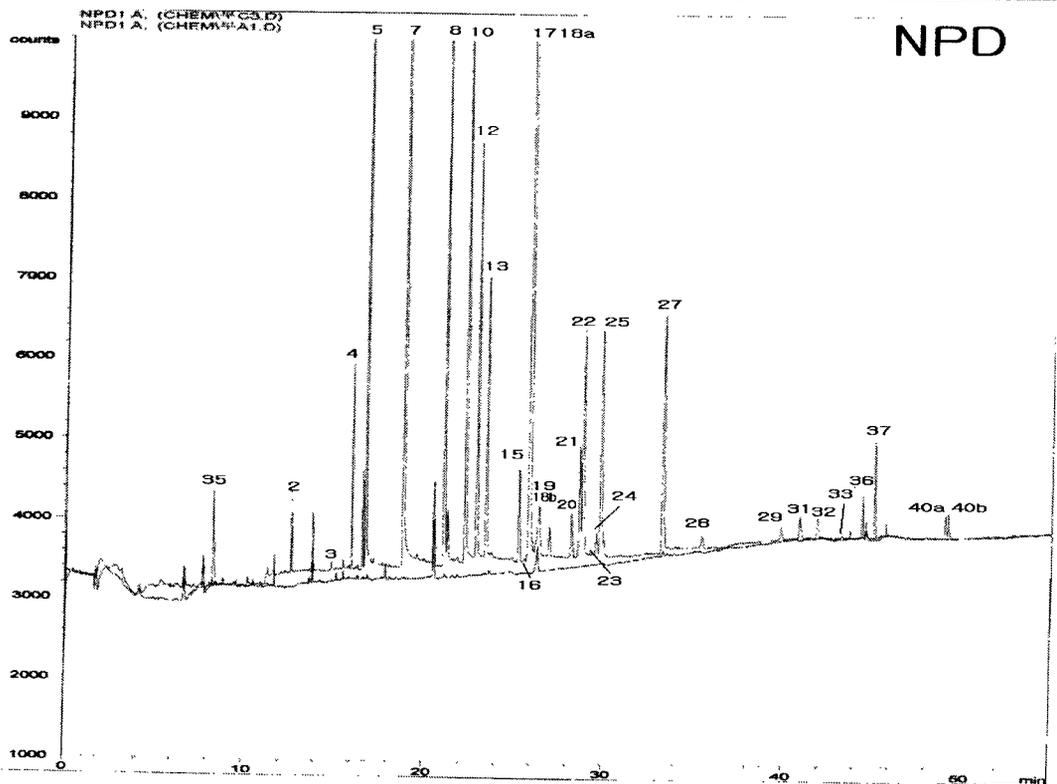
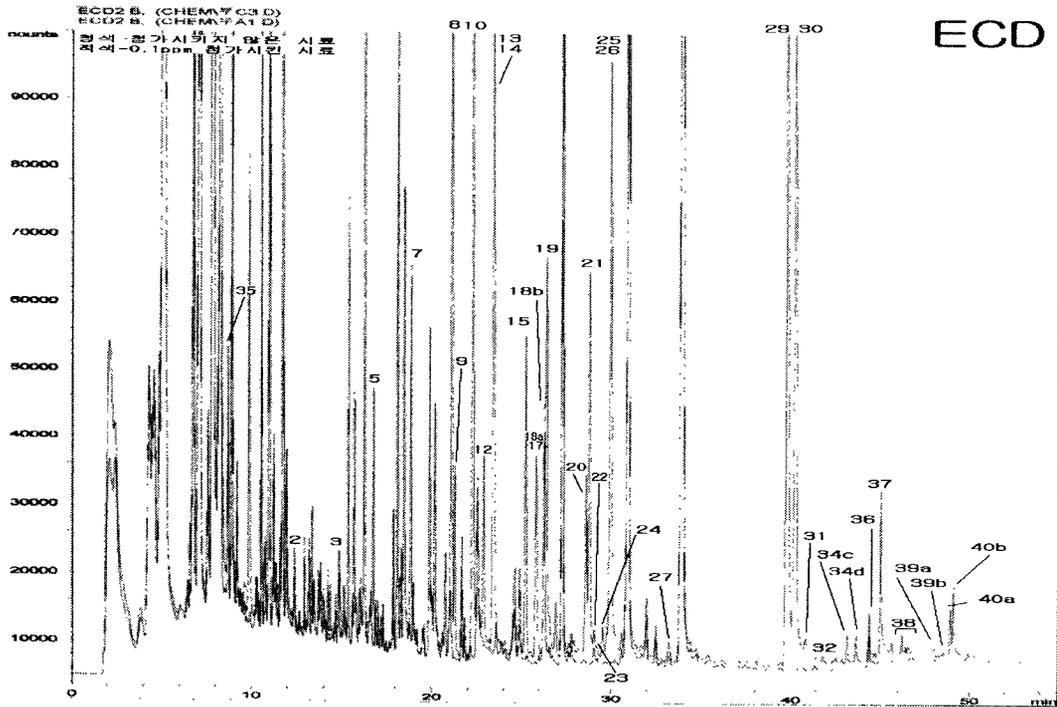
# 신선초

## (B group)



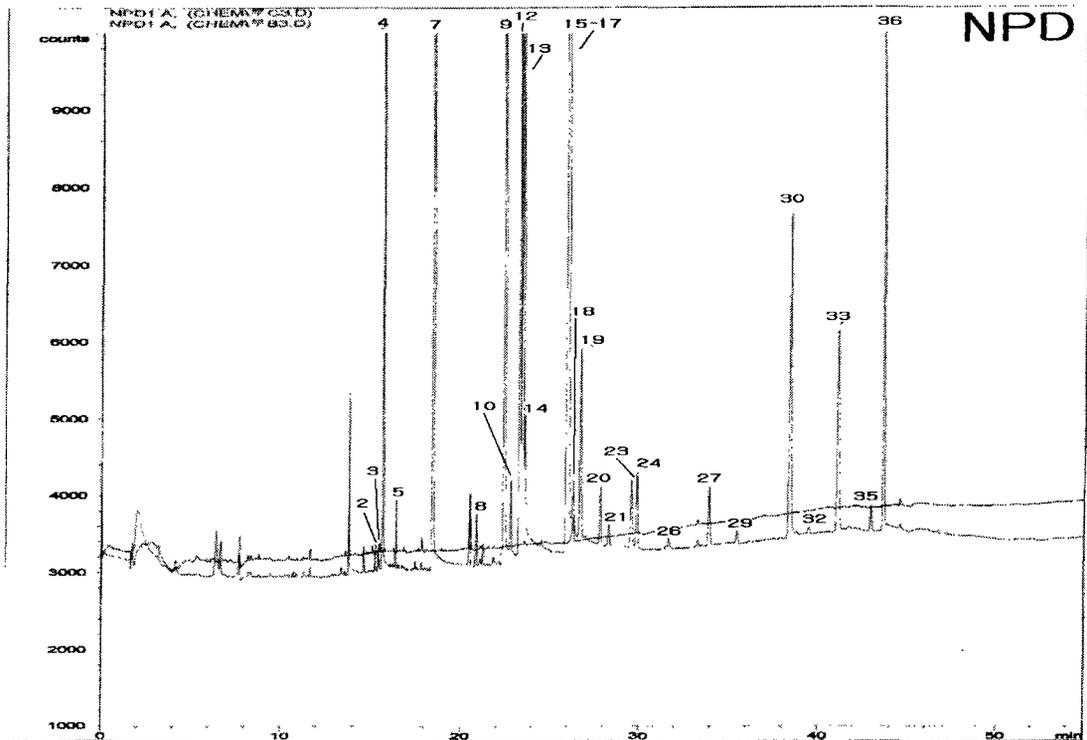
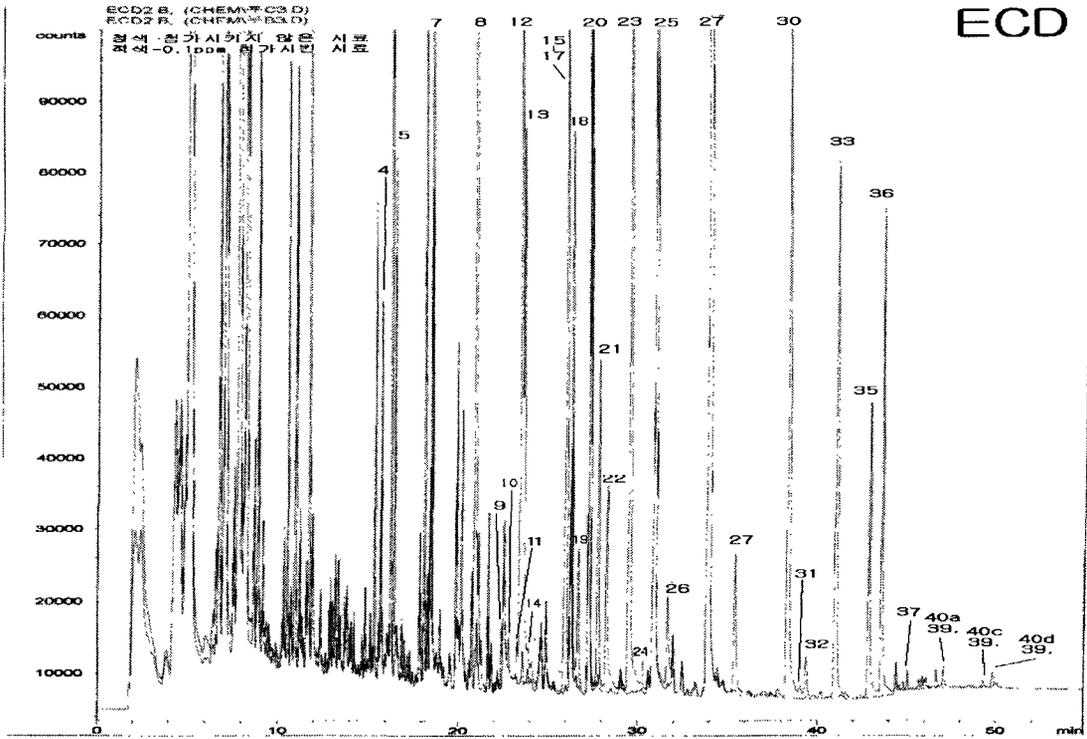
# 부 추

(A group)



# 부 추

## (B group)



### III. 농산물의 잔류농약 신속판별을 위한 면역분석기술 개발

(위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 경상대학교 정 덕 화

#### 1. 서 설

국제화 시대를 맞아 무한 경쟁시대에 들어갔으며 특히 OECD 가입으로 대부분의 농산물의 수입과 수출이 개방화되고 있다. 이러한 시대의 흐름에 적응하기 위해 식품의약품안전청을 발족시켜 식품의 수입개방에 능동적으로 대처하기 위한 노력을 하고 있다. 식품의 안전과 관련하여 오염의 심각성이 지적되어 온 잔류농약의 경우 외국에서의 오랫동안 활발한 연구와는 달리 국내에서의 연구결과는 대단히 미흡하며 최근 농산물 수입개방과 관련하여 관련업계나 연구소 등에서 관심을 갖기 시작하고 있다.

농업에서 잡초는 농작물의 양분과 수분을 탈취하고 일광의 투사를 방해하며 해충 및 병균의 숙주가 되어 농작물의 생육에 많은 해를 끼칠 뿐만 아니라 수확량을 감소시키는 원인도 된다. 따라서 인류는 농경시대가 개막된 이래로 논·밭에 있어서 잡초제거를 위하여 힘겨운 고생을 감수해 왔으며, 이를 해결하기 위해 선진 각국마다 경쟁적으로 보다 새롭고 특징있는 제초제의 개발에 노력한 결과, 신규 유망한 제초제가 계속 속출하여 오늘날과 같이 제초제의 이용에 큰 발전을 보게 되었다. 그 중 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)는 호르몬형·이행형 제초제로 phenoxy계에 속한다. phenoxy계 제초제의 일반적인 특성인 옥신작용을 지니고 있으며, 광엽잡초에 선택활성을 지니고 발아억제활성 및 경엽처리활성이 있다. 그리고 흡수이행형 제초제로서 살초활성은 호르몬작용에 의한 생체 내의 옥신의 균형을 잃게 하고, 분열조직의 활성화·분열이상·형태이상·호흡증진·엽록소형성저해·세포막의 삼투압증대 등 식물의 기본적 생리활성의 교란현상에 의하여 제초활성을 나타낸다. 또한 인축 및 어패류에 대한 독성이 낮고 값이 싸다는 장점으로 인하여 국내에서는 이양벼, 보리, 잔디 재배에 많이 사용되고 호르몬성의 작용특성으로 인해 성장조절 및 살균 효과가 인정되어 수확한 과일에 살포하는 수확 후 농약(post-harvest pesticide)이나 어린 감귤류의 낙과 방지를 위해서도 사용되고 있다.

현재 우리나라에서 잔류농약 검사를 받는 농산물은 극히 제한되어 있고, 특히 수입농산물에 대한 규제는 보다 미흡하므로 잔류농약검사를 대폭 확대할 필요성이 절실하다. 아울러 수입농산물의 경우 안전한 보관을 위해 수확 후 농약처리를 하므로 농약잔류검

사가 더욱 절실히 요구되며, 수출농산물에 대해서는 국제적 신뢰성 차원에서 수출농산물(사과, 배, 감귤, 채소 등) 재배단지에서 생산되는 농산물의 농약 잔류실태를 사전에 철저히 확인하여야 한다. 이를 위해서는 신속하고 저경비의 잔류농약 분석법이 확보되어 있어야 하며 또한 식품안전에 대한 국민관심 증가, 규제대상 농약 수의 증가, 최대잔류허용량의 지속적인 저하 등으로 인한 잔류농약 검출에 있어서 신속성, 정확성, 경제성 등이 뛰어난 분석법의 필요성이 더욱 증대되고 있다.

우리나라에서 농산물 및 식품 중의 농약 검출은 주로 기체 크로마토그래피 (gas chromatography, GC) 혹은 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC) 방법에 의존하고 있다. 그리고 전 세계적으로도 기기분석법이 보편화되어 있고, 아울러 근래에는 잔류농약의 동시분석법 등이 개발되어 적용되고 있다. 이들 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 가지는 반면에 장시간의 전처리 과정과 고가의 기기가 요구된다는 단점을 가진다. 또한 GC의 경우 열에 불안정한 물질, 극성물질, 저 휘발성물질의 검출에는 적합하지 않은 경우가 많다. 그리고 최근에는 검출방법과 칼럼 충전물에 대한 기술의 발전으로 HPLC가 많이 대체되고 있지만, HPLC의 경우 발색단이 없는 물질은 검출이 어렵다는 단점을 가진다.

농약검사에 있어서 대부분의 농산물은 농약함량이 허용치에 미달한다는 점을 고려한다면 이러한 예비적인 스크리닝은 식품이나 환경의 잔류농약 검사에 있어서 막대한 시간적 경제적 이득을 가져올 수 있을 것이다. 또한 농산물 도매시장이나 일반 농가에서도 농약의 잔류허용치 초과 여부를 쉽게 판단할 수 있는 분석도구의 개발 및 적용이 필요하므로, 기기분석의 단점을 보완하면서 많은 시료의 정기적인 모니터링을 할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하게 되었다.

이를 위하여 또 다른 하나의 생체물질인 항체의 이용 가능성에 대한 관심이 고조되고 있으며 그 중에서도 면역분석법 (immunoassay)과의 접목에 의한 효소면역분석법 (enzyme-linked immunoassay)의 개발에 관한 연구가 최근 들어 활발하게 시도되고 있다. 그러나, 기술축적의 미비, 안전성의 문제점, 그리고 수입 kit의 경제성 문제 등으로 실질적인 분석에 어려움이 많아 관련기술의 국내 자체정립이 시급히 요구되어지고 있으며, 그 개발의 결과로 국민의 식생활 향상과 더불어 국내농산물을 비롯한 식품의 안전성 확보와 국내 가공식품의 보호에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다. 이에 본 연구에서는 국내에서 중요한 제초제 중의 하나인 2,4-D에 대한 효소면역분석 기술을 개발하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 가. 시약 및 실험재료

Hapten-단백질 conjugate의 합성에 필요한 시약인 *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), dichloromethane, dimethylene formamide (DMF, D-8654), bovine serum albumin (BSA: fatty acid free, fraction V, A-3059), KLH, ovalbumin (OVA: crude, fraction VII)는 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였고 dialysis membrane (MW cutoff 6,000~8,000)은 Spectrum Laboratories사 (Rancho Dominguez, USA)의 Spectra/Por 제품을 사용하였다.

면역에 사용한 complete Freund's adjuvant와 incomplete Freund's adjuvant는 Aldrich사 (Milwaukee, USA)의 제품이었으며 fusion에 사용한 polyethyleneglycol (PEG 1500)은 Sigma사의 것이었다. 그 외 효소면역분석법에 사용된 시약인 polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline) sulfonic acid (ABTS), hydrogen peroxide 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. 그리고 2차 항체로 사용된 antimouse-IgG-horseradish peroxidase conjugate는 Jackson Immunol. Chem. (West Grove, USA) 사에서 구입하여 사용하였다. 면역에 사용한 syringe는 Sigma사 제품을, 유화 시 사용한 3-way valve는 한화 메디칼 제품을 사용하였다. 그리고 cell culture에 사용한 T-25, T-75 flask, cryogenic vial은 Corning사 (USA) 제품을 사용하였고, microculture plate (96 well, 24 well) 및 15 ml, 50 ml conical tube는 Nunc사 (Roskilde, Denmark) 제품을 사용하였다. 그리고 ELISA에 사용한 polyethylene microtiter strip은 Dynatech사 (Chantilly, USA)의 제품을 사용하였다.

개발된 항체의 특이성을 조사하기 위하여 사용한 유기인계 농약 표준물질 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2,4-dichlorophenol, 2,4-methylester, 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid, 4-chloro-*o*-toloxyacetic acid, 3,4-dichlorophenylacetic acid (3,4-DPA), 2,4-dichloropyrimidine, 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid는 Sigma사 제품을 사용하였다.

### 나. 사용기기

Cell culture에 사용된 CO<sub>2</sub> incubator는 Integra사 (USA), centrifuge는 Hanil사 (Korea), water bath는 ELIM사 (USA)의 것을 사용하였다. Plate shaker (Tritramax

100)는 Heidolph사 (Germany) 제품을 사용하였고 plate 세척기는 Nunc사 (Roskilde, Denmark) 제품인 Nunc-immuno TMWash (470175)를 사용하였으며, ELISA reader는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)의 model 550 plate reader를, software는 MPM software (Bio-Rad, version 4.0)를 사용하였다.

다. 기존 분석방법의 확립

국내는 물론 수입농산물에 잔류하는 농약을 체계적으로 신속 정확히 검색해야 하는 필요성이 강하게 대두되고 있다. 현재까지의 잔류농약 검색방법은 GC 및 LC에 의존해 왔다. 그러나 여러 가지 분석법이 혼용되고 있으므로 HPLC에 대한 분석법을 확립할 필요성이 있다. 그러므로 국내농산물은 물론 수입농산물의 안전성확보를 위해 유해잔류물질인 농약들의 신속분석법을 개발하기 이전에 기존분석법을 확립하여 새로이 개발하는 분석법의 정확성을 비교하고자 실험을 실시하였다.

이를 위해 시약으로는 2,4-D 표준품, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (시약 1급), acetonitrile (HPLC용), 증류수 (HPLC용), 내부표준용액 : DMP 1.25% (혼합용매 = 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 400 + MeCN 400) (pH 2.60±0.02)를 준비하였고, 기구는 HPLC (UV), 25 ml syringe, 50 ml 공전삼각 flask, 10 ml volumetric pipette을 준비하여 다음과 같은 조작을 거쳐 실험을 실시하고 농도를 계산하였다.

즉, 표준용액의 조제는 표준품 0.1g을 정확히 달아 공전삼각 flask에 넣고 내부표준용액 10 ml를 정확히 가한 후 완전히 용해시켜 만들었다. 아울러 시료용액의 조제는 주성분으로서 0.1g에 해당하는 시료를 정확히 달아 공전삼각 flask에 넣고 내부표준용액 10ml를 정확히 가하고 완전히 추출 여과하였다. 그리고 아래의 계산식으로 2,4-D 잔류량을 환산하였다.

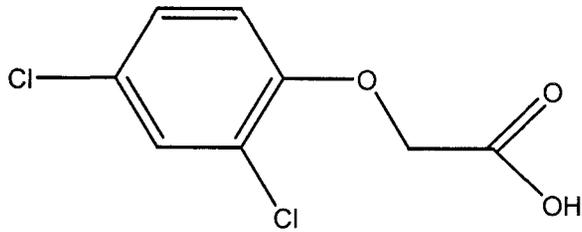
$$AI(\%) = \frac{\text{표준품무게} \times \text{시료면적비} \times \text{표준품순도}(\%)}{\text{시료무게} \times \text{표준품면적비}}$$

라. 항원합성 및 확인

한편, 취급하기 쉽고 비싼 도구가 필요 없으며 언제 어디서나 누구라도 사용이 가능하고 많은 시료를 동시에 측정할 수 있는 효소면역분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 국내기술에 의하여 kit로 개발하기 위해서는 무엇보다도 민감도와 특이성이 뛰어난 항체를 확보하는 기술이 가장 중요하였다.

분석하고자 하는 대상 농약 2,4-dichlorophenoxyacetic acid의 구조와 이화학적 성질

은 다음과 같다.



Chemical class: herbicide

Common name: 2,4-D

Chemical name: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

Molecular formula:  $C_8H_6Cl_2O_3$

Molecular weight: 221.0396

Water solubility: 0.0890g/100 ml, slightly soluble, decomposes

Melting point: 138°C

Boiling point: 160°C at 0.4 mmHg

Density: 1.563

LD50: 375 mg/kg in rats

2,4-D는 저분자 물질로 면역능이 없기 때문에 단백질을 결합시켜 분자량을 증가시킴으로써 항원성을 부여하였다. 2,4-D에 대한 항체를 얻기 위해 면역원으로 다음과 같은 방법으로 단백질을 결합시켰다. 즉, 시약으로서 pyridine, carboxymethylamine, 증류수, benzene-ethyl, acetate, anhydrous sodium sulfate, DMF, NHS, DCC를 준비하였다. 아울러 25 ml V형 reactive vial, 10 ml 1회용 주사기, speed vacuum 등의 기기를 준비하였다. 그리고 A: 30  $\mu$ mole 2,4-D-oxime conjugate in 100  $\mu$ l DMF, B: 30  $\mu$ mole DCC + 60  $\mu$ mole NHS in 50  $\mu$ l DMF (stir at least 5 min at room temp. before separation) 와 C: 25 mg protein (BSA, ovalbumin, HRP) in 1 ml 0.1 N  $NaHCO_3$  용액을 준비한 후 다음과 같은 방법으로 실시하여 면역항원 및 효소면역분석법을 위한 코팅항원으로 사용하였다.

2,4-D에 대한 특이항체 생성을 위해 고안한 immunogen은 2,4-D의 carboxyl group

과 carrier protein의 amino group을 결합하는 Dean 등의 방법 (1971)을 사용하였고 그 과정은 다음과 같다. 2,4-D 100 mg을 200  $\mu$ l의 tri-*n*-butylamine과 6.8 ml의 dioxane에 녹이고 혼합액을 10°C ice bath에서 온도를 낮춘 후 50  $\mu$ l의 isobutyl chloroformate를 교반하면서 점적하였다. 혼합액은 10°C에서 30분간 교반하여 활성화시키고 10°C로 온도를 낮춘 vial에 0.18, 0.7, 3.5 ml씩 넣고 각각의 vial에 protein solution (0.78g/20.55 ml) 1.7 ml와 0.78 ml 1 M NaOH, 13.8 ml dioxane을 넣고 4°C에서 교반하여 반응시키고 반응 후 탈 이온화된 증류수로 2일간 투석하였다. 투석 후 Bradford법 (1989)으로 합성된 2,4-D-protein conjugate의 단백질량을 정량하여 동결건조 하였다. Conjugate용 단백질은 면역원의 경우 KLH를 사용하였으며, 항체 역가측정 및 특이항체 분리를 위한 코팅항원의 경우 BSA, OVA를 사용하였다.

마. 단클론성 항체 생산을 위한 hybridoma 개발

#### 1) 면역 및 항혈청 titration

세포융합을 위하여 사용한 BALB/C 마우스는 대한 동물사육센터에서 구입하여 사용하였다. 생후 6주된 BALB/C 마우스(암컷)에 2,4-D-KLH, 2,4-D-BSA 결합체와 Freund's complete adjuvant를 1 : 1로 희석한 혼합액을 마리 당 200  $\mu$ g씩 복강으로 면역하였다. 최초 면역 3주 후 항혈청 titration을 실시하였고 6주 후 다시 항혈청 titration을 실시하고 최종 면역을 시킨 후 세포융합을 하였다.

항체의 역가검정은 indirect ELISA법으로 실시하였고 그 과정은 다음과 같다. Carbonate-bicarbonate 완충용액 (pH 9.6)에 1 : 500 농도로 희석한 2,4-D-BSA를 96 well polystyrene microplate에 well당 500  $\mu$ g/100  $\mu$ l씩 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. Coating 후 인산 완충용액 (0.05 M PBS, pH 7.3, 0.05% Tween 20)으로 세척하고 1% BSA 용액을 200  $\mu$ l/well씩 첨가하고 37°C에서 1시간 처리하여 blocking 하였다. 그 다음 인산 완충용액으로 세척하여 희석한 혈청을 50  $\mu$ l/well씩 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 인산 완충용액으로 세 번 세척하고 1 : 1000으로 희석한 anti-mouse IgG를 100  $\mu$ l/well씩 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 인산 완충용액으로 세척하고 기질용액 (ABTS)을 50  $\mu$ l씩 넣어 효소반응을 유도하였다. 실온에서 30분간 효소반응을 유지시킨 후 반응정지액 50  $\mu$ l씩을 첨가하여 효소반응을 중단시킨 다음 나타난 발색반응의 정도를 405 nm에서 측정하였다

## 2) Cell fusion 및 hybridoma 개발

세포융합에 사용한 형질세포종 세포는 P3×63Ag8.V653 세포주로서 경상대학교 의과대학 미생물학 교실에서 분양받아 계대한 것이었다. 이를 8-azaguanine (20 µg/ml), 10% 우태아혈청, 10% NCTC-135 (Gibco), 그리고 gentamicin (50 µg/ml)이 함유된 RPMI 1640 (Gibco)로 배양하며 2~4일에 한번씩 원심세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37°C, 6% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양, 계대하여 사용하였다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지로 18시간 배양한 후 RPMI1640으로 3회 세척하고 세포수를 1×10<sup>7</sup>/ml로 조정하여 세포융합에 사용하였다.

최종면역 후 3일이 경과된 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) 내에서 핀셋으로 비장세포를 분리하였다. 비장세포액을 실온에서 적당하게 정치시켜 비장 결합조직을 가라앉혀 제거하고 DMEM으로 원심세척 하였다. 비장세포액을 우태아 혈청에 중층하여 280 ×g에서 5분간 원심분리함으로써 비장세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 원심세척한 다음, 비장세포액을 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 용액 (Tris 20.6 g/ml, NH<sub>4</sub>Cl 8.3 g/ml)으로 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 그런 다음 RPMI1640으로 3회 세척하여 세포수를 1×10<sup>8</sup>/ml로 조정하여 사용하였다. 세포융합은 Kohler와 Milstein (1975), 그리고 차 등 (1984)의 방법으로 실시하였다. 즉, 위에서 준비한 형질세포종 세포와 비장세포를 1 : 10의 비율로 혼합하여 2회에 걸쳐 원심세척하였다. 37°C로 보온시킨 혼합 세포침전물에 50% (w/v) polyethylene glycol 1,500 (PEG, Sigma사) 1 ml를 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적 후 즉시 37°C의 DEME 1 ml를 흔들면서 1분 동안에 첨가하였고 계속해서 DMEM 15 ml를 5분간에 걸쳐 첨가하여 세포융합을 실시하였다. 융합이 끝난 혼합 세포액을 400 ×g에서 5분간 원심하고 20% 우태아혈청, 10% NCTC, 그리고 gentamicin (50 µg/ml)이 첨가된 DMEM에 부유시킨 다음 96-well 배양판에 well당 50 µg씩 분주하여 37°C, 6% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield가 고안한 HAT (50 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, 16 µM thymidine) 배지를 융합 후 1, 3, 5 및 7일에 well당 50 µl씩 첨가하고 10일에는 150 µl씩 배지를 교환하여 15일까지 융합세포의 증식유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

융합 후 10일 내지 15일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양 상등액을 채취하여 항체의 생산여부를 위에서 서술한 비경쟁적 ELISA를 실시하여

검색하였다. 항체를 생산하는 well의 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체 역가가 계속 유지되고 carrier protein과 비특이적 결합이 없으며 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning을 실시하였다.

Cloning은 Mckearn의 무한대 희석법으로 실시하였다. 24 well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10~30 cell/ml의 농도로 조정하여 well당 100  $\mu$ l씩 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하였다. 7~10일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 ELISA로 검색하였다. PM에 대한 특이성과 민감성이 뛰어난 monoclonal hybridoma cell을 최종 선택하여 증식시키고,  $10^6$  cell/ml로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1 ml씩 분주하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 바. 단클론성 항체 생산과 특성

##### 1) 항체의 생산 및 정제

확보한 hybridoma cell 들이 분비하는 단클론 항체의 특성을 조사하기 위해 복수 항체를 만들기 전에 Integra Bioscience사에서 개발한 INTEGRA CELLLine CL 6-well을 이용해서 배양 상등액을 얻은 후 실험을 실시하였다. 즉, 일반적으로 T-75 flask 상에서 배양한 배양 상등액은 항체의 함유농도가 낮았고 배지교환 시 세포수를 정확하게 유지하기가 힘들므로 여러 종의 monoclonal cell line 별로 동일한 농도의 항체 확보에 어려움이 따른다. 그러므로 총 세포수가 유지되어 항체분비가 일정함이 검증된 CELLLine CL 6-well을 이용해서 농축된 배양 상등액을 얻은 후 IgG 량을 anti-mouse IgG (Jacsone Immunochemical Co., 2.4 mg/ml)를 이용하여 Bradford법을 이용한 Bio-Rad사의 protein 및 IgG 농도 측정시약으로 사용지침에 따라 반응시킨 후 ELISA reader (595 nm filter)로 흡광치를 읽어 농도를 확인하였다.

위의 방법으로 얻은 항체 중 ELISA에 가장 적합한 항체를 선택한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 즉, 1주일 전 복강에 pristane (2,4,10,14-tetramethylpentadecane)을 0.5 ml 주입한 mouse에 T-75 flask에서 대량 증식시킨 hybridoma cell을 수거하여 세포수가  $1.0 \times 10^7 / 0.2$  ml 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 8~10일 후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상등액을 ammonium sulfate법으로 정제하여 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 즉, 복수액을

2배량의 PBS 용액으로 희석한 후 동량의 포화 ammonium sulfate 용액을 4℃에서 교반하면서 한 방울씩 가하여 30분간 반응시킨 다음 10,000 ×g, 4℃에서 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 시작 시 복수액과 동일 부피의 PBS 용액에 재용해한 다음 다시 45% ammonium sulfate 용액을 동량 가하여 4℃에서 30분간 반응시키고 10,000 ×g, 4℃에서 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 한번 더 45% ammonium sulfate 용액으로 침전시킨 다음 PBS 용액으로 3일 (2회 교환/일)동안 투석을 행하였다. 투석이 끝난 용액의 단백질량을 정량한 다음 실험에 사용하였다.

## 2) 항체의 특성 조사

각 hybridoma cell이 분비하는 단클론성 항체의 isotype을 조사하였으며, 이 때 항체 isotype의 결정은 Boehriner Mannheim사의 mouse monoclonal antibody isotyping kit를 사용하여 제시한 방법에 따라 시행하였다.

## 3) 항체의 교차반응성 검토

2,4-D에 대한 단클론성 항체의 특이성을 알아보기 위하여 2,4-D와 유사한 구조의 이성체들에 대한 standard curve를 작성하여 IC<sub>50</sub> 값으로 교차반응성을 계산하였다.

## 사. ELISA법의 확립

### 1) Coating buffer의 선정

일반적으로 코팅에 사용되는 carbonate buffer를 Ueno 등은 pH 9.6인 carbonyl buffer를 사용하였으나 본 실험에서는 보통의 PBS를 코팅 buffer로 사용하여 기존의 buffer와 비교하여 Indirect ELISA법으로 측정하였으며 이를 요약하면 Fig. 1과 같다.

### 2) Coating 조건의 선정

Microtiter plate에 항원을 코팅시키기 위해 항원을 carbonyl buffer로 희석하여 50 ng/well로 코팅하였다. 코팅된 plate를 40℃ dry oven과 4℃ 냉장고에서 하룻밤 코팅한 후 코팅온도가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다.

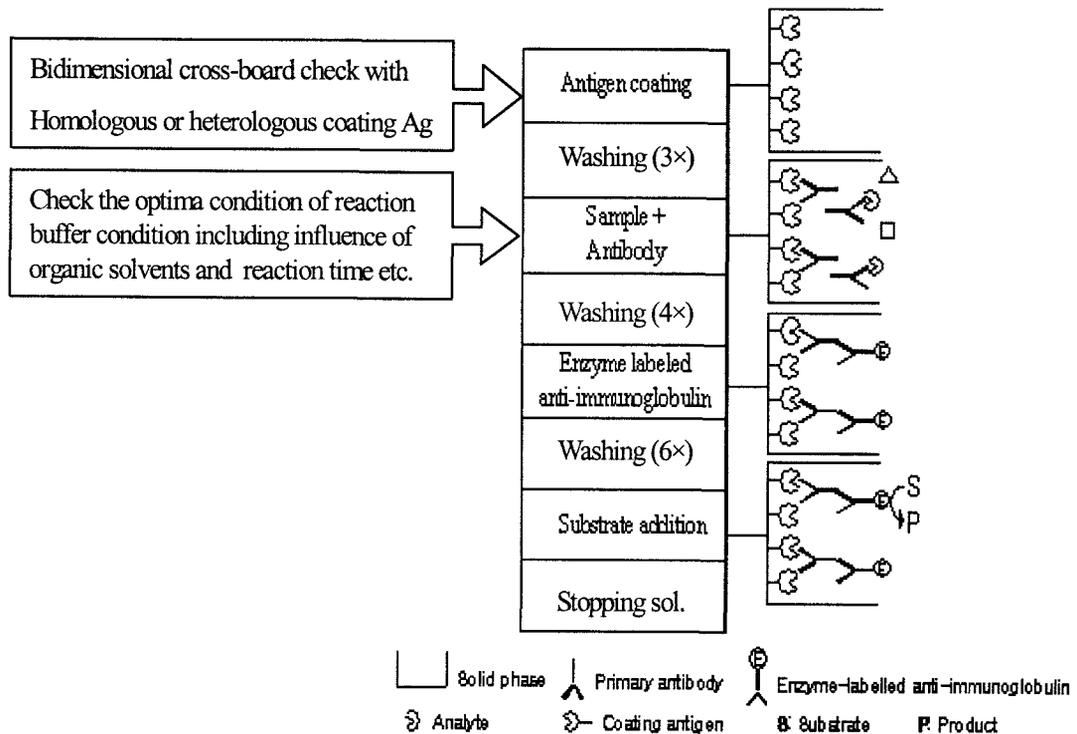


Fig. 1. The main steps involved in indirect competitive ELISA.

### 3) 단클론성 항체의 코팅항원에 대한 2차원적 스크린

2,4-D에 대한 단클론성 항체들의 각 코팅항원에 대한 친화력 및 경쟁력 조사를 통해 가장 민감도가 뛰어난 조합을 선택하고자 각 코팅항원을 25, 50, 100 ng/well (100  $\mu$ l)의 농도로 코팅하고, 0 및 1 ppm의 2,4-D 50  $\mu$ l 및 CL-6에서 얻은 단계별 희석 항체를 50  $\mu$ l 넣어 37°C에서 반응시킨 후 앞서 서술한 IC-ELISA를 실시하여 흡광도 (span)를 측정하여 코팅항체 및 항원의 종류와 농도조합을 선정한 후 보다 세부적인 실험을 실시하였다.

### 4) Blocking buffer가 indirect competitive ELISA (IC-ELISA)에 미치는 영향

Blocking buffer의 농도가 ELISA에 미치는 영향을 살펴보고 최적의 blocking 조건을 찾기 위해 BSA, skim milk, gelatin 및 casein을 blocking 시 사용하였으며 각각을 두개씩 혼합하여 비교하였다. 일반적으로는 BSA와 skim milk가 사용되지만 gelatin 혹은 casein을 blocking에 사용하는 예가 있어 이들 물질을 이용하였고 또한 이들 물질을 각

각 2개씩 혼합하여 비교하고자 하였다.

#### 5) HRP-conjugated anti-mouse IgG 반응농도 결정

코팅항원과 결합한 항체를 검출하기 위한 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 2차 항체로 사용하였고, 희석농도와 반응시간, 반응온도의 영향을 살펴보았다. 조건으로 항체를 5,000배 희석하여 37°C에서 30분, 실온에서 1시간 반응시켰고 10,000배 희석하여 37°C에서 1시간, 실온에서 1시간 반응시켰다.

#### 6) 완충액의 농도가 IC-ELISA에 미치는 영향

식수, 강물, 농업용수와 같은 환경시료에 대해서도 2,4-D에 대한 검사를 실시하고 있으므로 이를 검출대상으로 할 경우 정제과정 없이 바로 ELISA system에 적용하거나, solid phase column (Sepack, C<sup>18</sup> column 등)을 이용하여 농축한 후 검출할 경우는 추출 과정을 거친 후 실험을 실시하는 것이므로 유기용매를 선정하여 추출하는 과정에 응용할 수 있을 것이나, 시료를 추출, 농축과정 없이 바로 ELISA system에 적용할 경우 완충액이 희석되는 효과를 주게 된다. 그러므로 물 시료에 대한 적용가능성을 살펴보고자 항체를 희석하는 완충액의 농도가 분석의 민감도에 미치는 영향을 살펴보았다. 이를 위하여 경쟁단계에서 항체를 희석하는 PBS 농도를 25, 50, 100, 200, 300 및 500 mM 농도로 하였으며 다른 조건은 앞서 기술한 IC-ELISA 조건과 동일하였다.

#### 7) 기질 반응시간 결정

기질로는 ABTS를 사용하였고 기질 첨가 후 10분에서 1시간까지 각 5분 단위로 측정하여 반응시간을 결정하였다.

#### 8) 유기용매의 영향조사

시료 중 오염된 2,4-D를 추출하는데 사용되는 유기용매를 선택하기 위해 acetone, methanol, ethanol, acetonitrile 등의 각종 용매를 농도별로 희석하여 표준 2,4-D 용액을 조제하여 첨가한 다음 ELISA를 행하고 유기용매와 유기용매 농도가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다.

### 9) IC-ELISA 검량곡선 수립

이상의 실험에서 정해지는 조건으로 ELISA를 최적화시켜 2,4-D에 대한 검량곡선을 작성하였다. 이를 기준으로 시료에 적용 시 시료추출물이 미치는 영향에 대하여 비교하는 기준으로 사용하였고 분석의 정확성 및 민감성을 확인하는 자료로 이용하였다. 가장 양호한 결과를 보이는 hybridoma cell line에서 복수액으로 대량생산, 정제한 후 앞서 기술한 INC-ELISA 및 IC-ELISA법으로 항원 코팅농도 및 항체 희석배수를 설정한 후 검량곡선을 수립하였다. 검량곡선으로부터 구한 분석의 민감도는  $IC_{50}$  값으로 비교하였다.  $IC_{50}$  값은 최대 흡광도를 50% 저해시키는 분석물질의 농도를 의미하며, 본 실험에 사용된 값은 MPN software (Ver. 4.0, Bio-Rad Co., USA)로 산출되는 4 parameter를 이용한 logistic equation에 의하여 얻어진 것이며 그 식은 다음과 같았다.

$$Y=(A-D)/[1+(X/C)^B] +D$$

여기서 A는 최대 흡광도, B는 직선의 기울기, C는  $IC_{50}$  그리고 D는 최소 흡광도를 나타낸다.

### 10) Heterologous ELISA와 homologous ELISA의 비교

2,4-D의 이성체인 3,4-dichlorophenoxyacetic acid와 3,4-dichlorophenylacetic acid를 2,4-D와 같은 방법으로 OVA를 결합시켜 코팅항원을 합성하였고 이들 코팅항원을 이용하여 IC-ELISA에 적용시켰다. Hapten과 단백질을 연결시키는 bridge의 구조, 길이 그리고 위치 등은 분석물질에 대한 항체의 결합반응에 관여하는 이온결합, 수소결합, 소수성 상호작용 등에 영향을 주어 특이성과 친화력에 영향을 미친다는 여러 연구결과가 있고 또 면역항원과 구조가 다른 hapten을 경쟁자로 채택하였을 경우 분석의 민감도가 높아진다는 보고에 의하여 본 논문에서는 코팅항원을 면역원에 대한 heterogeneous한 경쟁자로 사용하여 ELISA를 행한 후 그 결과를 homologous ELISA와 비교하고자 하였다.

#### 아. Immunoaffinity column 제조

시료에 극히 미량으로 오염되어 있는 2,4-D를 정제, 농축하기 위한 목적으로 affinity column을 제작하였다. Immunoaffinity column에 의한 2,4-D의 정제원리는 Fig. 2와 같다.

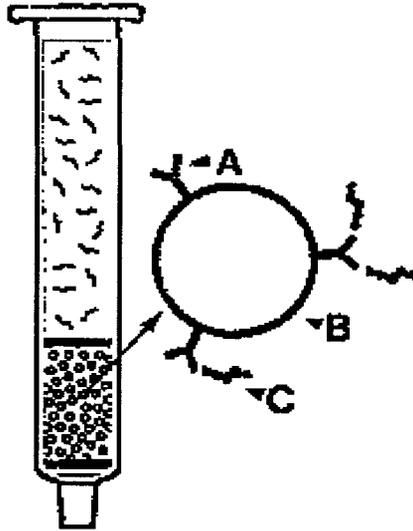


Fig. 2. Principle of developed immunoaffinity column chromatography.

A, monoclonal antibody; B, support bead; C, 2,4-D molecule.

먼저 유리병에 들어있는 gel 25 mg을 감압장치가 부착되어있는 유리 funnel에 옮기고 gel 10배량의 ice-cold water로서 gel을 세척하였다. 세척 전 gel을 25 ml의 차가운 단클론성 항체가 들어있는 (1 mg 항체 및 5 mg 항체/ml PBS) 50 ml 원심분리관에 넣고 천천히 흔들어 덩어리가 없는 혼합액이 되게 한 다음 4°C에서 하룻밤동안 천천히 교반시켰다. 이 때 항체와 gel의 결합을 조사하였다. 즉, 소량의 결합액을 취하여 증류수로 40배 희석한 후 280 nm에서 O.D.를 측정하여 비교하였다. 특히 결합물에 유리되는 N-hydroxysuccinimide의 방해를 감소시키기 위해 전체량의 1/100에 해당하는 1 M HCl을 첨가하여 pH를 낮춘 다음 O.D.를 측정하였다.

항체와 gel의 결합이 확인되면 항체의 잔여 active side를 없애기 위해 2.5 ml의 1 M ethanolamine-HCl을 첨가한 다음 배양을 1시간 더 계속하였다. 단클론성 항체와 결합된 gel을 glass filter가 부착된 funnel에 옮기고 250 ml의 물과 500 ml의 PBS로 gel을 감압 세척하였다. 세척이 끝난 gel cake는 적당한 유리병이나 시험관에 넣고 25~50 ml의 PBS를 첨가한 다음 덩어리가 생기지 않도록 충분히 교반시켰다. 이것에 0.1% sodium azide를 첨가하고 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

또한, 시료의 조제 및 정제는 다음과 같이 수행하였다. 즉, 시료 6g을 50 ml 원심분리관에 넣고 70% methanol 18 ml를 가한 다음 10분간 진탕기에서 100 rpm의 속도로

추출하였다. 진탕이 끝난 시료는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상정액 6 ml를 취하여 PBS 36 ml로 희석시켜 column 정제용 시료로 사용하였다. 정제에 앞서 우선 항체가 결합된 gel 1 mg을 minicolumn에 넣고 10 ml의 증류수와 PBS로 각각 세척하고 항체와 결합한 2,4-D를 methanol로 용출시켰다.

#### 자. Immunoaffinity column-ELISA (IAC-ELISA) 확립

시료에 극히 미량인 2,4-D의 오염정도를 추적해야 할 필요가 있을 경우, 일단 시료를 전처리하고 immunoaffinity column (IAC)으로 시료 중의 2,4-D를 gel에 흡착된 항체에 고정시킨 후 메탄올로 용출시켜 ELISA용 시료로 사용하는 IAC-ELISA 분석조건을 검토하였다.

즉, IAC로 정제된 시료는 ELISA와 결합시켜 IAC-ELISA 분석시스템을 확립하였다. 이 때 항원을 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하고 4°C에서 하룻밤 coating 하였다. Coating plate는 PBS와 3번 이상 PBS-tween 용액으로 washing하고 앞서 정제한 시료 100  $\mu$ l와 2,4-D 항체 희석액을 100  $\mu$ l 혼합한 액을 100  $\mu$ l씩 well에 주입하였다. 반응액이 든 plate는 다시 실온에서 1시간 반응시킨 다음 PBS-Tween으로 3회 washing하고 2차 항체를 넣어 1시간 더 반응시킨 후 PBS-Tween으로 3회 washing한 후 기질 (ABTS) 희석액을 100  $\mu$ l씩 well에 주입하여 10분간 발색시켜 ELISA reader로 읽어 미리 준비한 표준곡선과 비교하여 시료 속의 2,4-D 함량을 구하는 IAC-ELISA system을 확립하였다.

#### 차. 간이검사 kit 개발

2,4-D의 면역분석을 위하여 지금까지 얻은 실험결과를 바탕으로 indirect competitive ELISA법을 이용한 ELISA kit의 실험적 제작을 시도하였다. 간략히 설명하면, indirect ELISA kit에 포함되어야 하는 주요품목으로는 2,4-D-OVA conjugate가 코팅되어 있는 well과 각 농도의 표준용액, 2,4-D-121-46, 2,4-D-121-57 hybridoma cell line에서부터 분리 정제된 1차 항체, 1차 항체에만 특이하게 반응하며 효소가 표지되어 있는 2차 항체, 기질과 반응 정지용액 등이 필수적이며, 부수적으로 syringe와 filter paper와 0.05 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 등이 포함되어야 할 것으로 사료된다. 이들의 각종 구성품의 처리와 각종 시약들의 안정적인 유통과 보관방법을 측정하여 indirect ELISA kit 시제품을 제작하였다.

## 카. 농산물 및 식수 중 잔류 2,4-D의 검색

### 1) 식수

ELISA법의 항원-항체 반응은 시료 속의 단백질이나 지방 등 기타 다른 물질에 의해 방해될 수 있다. 따라서 식수에 표준 2,4-D를 1, 10, 100 ppb 오염시켜 표준곡선을 확립한 후 buffer를 이용한 표준곡선과 비교하여 전처리 없이 적용이 가능한지를 측정하였다. 또한 식수에 표준 2,4-D를 1, 10, 100 ppb로 오염시켜 회수율을 측정하였다.

### 2) 오렌지 주스 및 곡류의 시료전처리 방법 조사

오렌지 주스는 약산성을 나타내는 용액이며, 주스 속에 포함된 성분들에 의해서 ELISA의 항원-항체 반응에 영향을 줄 수 있다. 따라서 일정량의 오렌지 주스를 취하여 8,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 회수하고 이 용액에 dichloromethane을 사용하여 1 : 5로 희석하고 3분간 vortex시켜 추출하였다. 추출된 유기용매 층을 취하여 질소농축기로 농축하고 10% 메탄올/PBS 용액으로 재 용해하여 ELISA에 적용하였다. 위의 방법을 따라 2,4-D가 오염되어 있지 않은 오렌지 주스를 추출한 후 이 용액에 표준 2,4-D를 오염시켜 표준곡선을 확립하고 buffer로서 확립한 표준곡선과 비교하였다.

### 3) 보리

보리 2g을 취해 메탄올 10 ml를 넣어 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 1 ml를 취하였다. 이 추출물을 질소농축기에서 농축한 후 다시 10% 메탄올/PBS 용액 1 ml를 넣어 재 용해하여 ELISA용 시료로 하였다. 위의 방법을 따라 2,4-D가 오염되어 있지 않은 보리를 추출한 후 이 용액에 표준 2,4-D를 오염시켜 표준곡선을 확립하고 buffer로서 확립한 표준곡선과 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 기존의 분석방법의 확립

일반적으로 면역분석법의 확립 후 시료 적용에 있어서 기존의 기기분석과의 비교는 필수적이다. 본 연구에서는 2,4-D 대한 HPLC 분석조건을 Table 1과 같이 확립하였다. 확보된 기기분석법을 이용하여 3차년도에 개발한 간이 검사법과 비교 실험하였다.

Table 1. HPLC condition used for 2,4-D analysis

Item	Condition
Column	ODS type column
Mobile phase	MeCN 30/0.1 M-K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 70, pH 2.6
Wavelength	280 nm
AUFS	1.0
Flow rate	2.0 ml/min
Injection volume	4 $\mu$ l
Chart speed	0.25 cm/min

위의 조건을 이용하여 HPLC를 실행한 결과 아래의 Fig. 3과 같이 retention time이 약 6~7분에서 2,4-D 표준물질에 대한 peak가 나타났다.

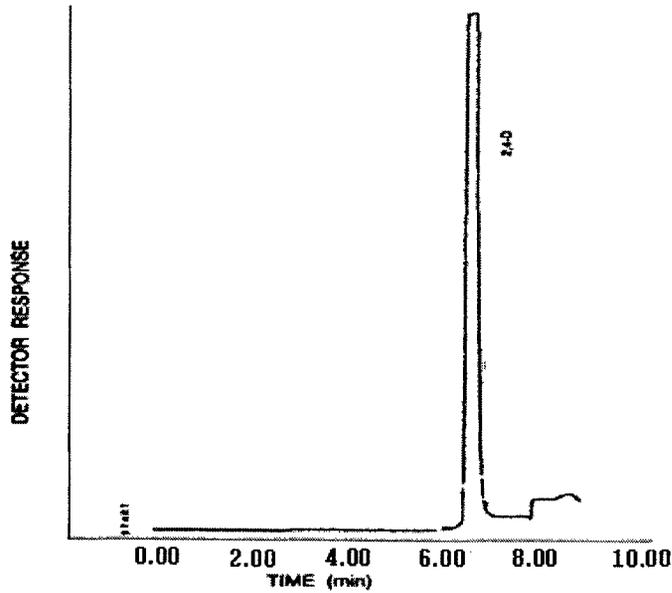


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard 2,4-D.

나. 단클론성 항체 생산을 위한 hybridoma 개발

1) 면역 및 항혈청 titration

면역을 실시한 마우스를 최초 면역 3주 후 마우스 꼬리로부터 항혈청을 채취 후 indirect ELISA법을 이용하여 titration을 실시하였고 6주 후 다시 항혈청을 채취하여 titration을 실시하였다. 간략히 설명하면 carbonate-bicarbonate 완충용액 (pH 9.6)에 1 : 500의 농도로 희석한 2,4-D-OVA 결합체를 96-well polystyrene microplate에 well당 500 ng/100  $\mu$ l씩 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. coating 후 인산 완충용액 (0.05 M PBS, pH 7.3, 0.05% Tween 20)으로 세척하고 1% BSA 용액을 200  $\mu$ l/well씩 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하여 blocking 하였다. 그 다음 인산 완충용액으로 세척하여 희석한 혈청을 50  $\mu$ l/well씩 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 인산 완충용액으로 세 번 세척하고 1 : 1,000으로 희석한 anti-mouse IgG를 100  $\mu$ l/well씩 첨가해서 1시간 반응시켰다. 그런 다음 인산 완충용액으로 세척하고 기질용액 (ABTS)을 50  $\mu$ l씩 넣어 효소반응을 유도하였다. 실온에서 30분간 효소반응을 유지시킨 후 반응 정지액 50  $\mu$ l씩을 첨가하여 효소반응을 중단시킨 다음 나타난 발색반응의 정도를 405 nm에서 측정하였다. Indirect ELISA법에 의해 측정된 항혈청 titer 결과는 Table 2와 같았으

며, 500,000배 희석에서도 역가를 가지는 것으로 나타났다.

Table 2. Titration of anti-2,4-D antiserum as determined by indirect ELISA

(Unit: O.D.)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000	500,000	1,000,000
Nomal	0.02	0.015	0.010	0.006	0.001	0.007	0.005	0.001	0.001
Mouse1	over	over	over	over	over	<b>1.854</b>	<b>1.372</b>	<b>0.453</b>	0.015
Mouse2	over	over	over	over	over	<b>1.156</b>	<b>0.937</b>	<b>0.321</b>	0.013

2) Cell fusion 및 hybridoma 개발

2,4-D-KLH conjugate로 면역시킨 BALB/c mouse 4마리를 사용하여 세포융합을 실시하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 융합 후 분주한 1,536 well중 1,229 well에서 융합된 세포가 성장하였고 80%의 융합율을 보였다.

Table 3. Fusion and frequency of hybrids selected by HAT medium

(Unit: number)

Mice titer	Mice used in fusion	Mice wells seeded	Growth in HAT medium	Fusion rate (%)
5,000	4	1,536	1,229	80

이때, cell fusion에 사용된 spleen cell (a)과 myeloma cell(V653) (b)의 세포군의 모양은 광학현미경을 이용하여 Fig. 4와 같이 관찰되었다.

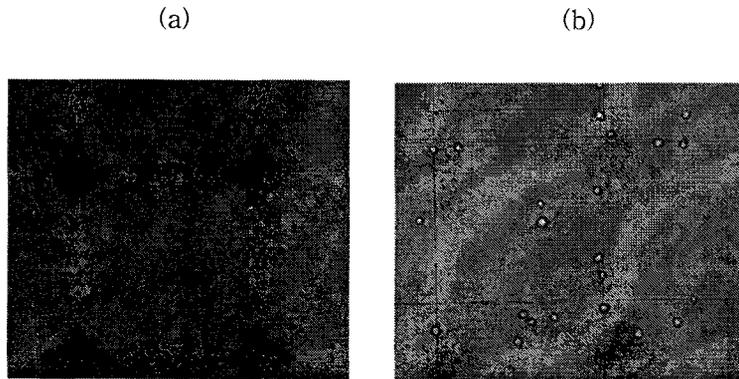


Fig. 4. Spleen cell (a) and P3×63Ag.V653 (b).

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield가 고안한 HAT (50  $\mu$ M hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine) 배지를 융합 후 1, 3, 5 및 7일에 well당 50  $\mu$ l 씩 첨가하고 10일에는 150  $\mu$ l 씩 배지를 교환하여 15일까지 융합세포의 증식유무를 역위상차 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같았다.

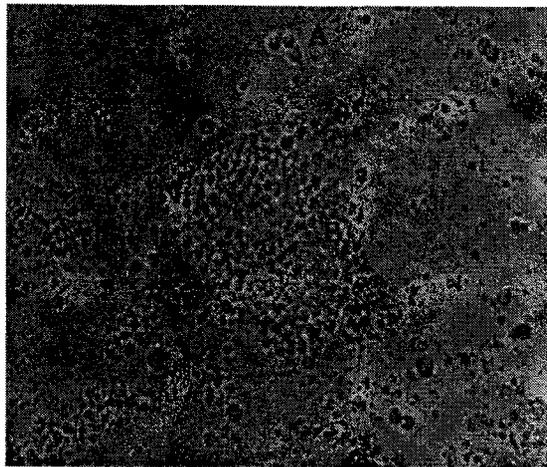


Fig. 5. Photograms of fused cell with spleen cell and V653 myeloma cell (A) and cloned cell (B).

그리고 항체 생산이 뛰어난이 확인된 융합세포주를 24-well에 증식시켜 titer를 측정  
한 결과, Table 4에서 나타난 바와 같이 2,4-D-13, 14, 17, 18, 19, 20, 38, 121, 127, 128,  
및 129 총 11종의 융합세포 배양 상등액에서 항체의 역가를 확인할 수 있었으며, 121번  
과 127번 융합세포주의 항체 생산력이 뛰어난 것으로 나타났다.

Table 4. Screen and selection of hybridoma cell which produces antibody against  
2,4-D-KLH antigen

Fused cell	Titration (O.D. at 405 nm)		
	Supernatant	10×	100×
Control	0.048	0.028	0.041
2,4-D-13	2.180	1.921	1.500
2,4-D-14	0.520	0.538	0.739
2,4-D-17	2.330	2.334	2.320
2,4-D-18	1.167	0.829	0.837
2,4-D-19	1.172	0.277	0.143
2,4-D-20	0.800	0.652	0.451
2,4-D-38	1.600	1.145	0.941
<b>2,4-D-121</b>	<b>2.632</b>	<b>2.580</b>	<b>2.310</b>
<b>2,4-D-127</b>	<b>2.518</b>	<b>2.552</b>	<b>2.450</b>
2,4-D-128	1.581	0.980	0.856
2,4-D-129	2.180	1.920	1.497

한편, 2,4-D에 대해 특이적 항체를 지속적으로 생산하는 hybridoma cell line을 얻기 위해 역가가 뛰어난 2,4-D-121 및 2,4-D-127를 24 well에서 증식시켜 cloning을 실시한 결과 2,4-D-KLH를 면역한 결과 얻어진 융합세포 중 Fig. 6에서 보는바와 같은 형상으로 나타나는 monoclonal hybridoma cell line 중 2,4-D와 선택적 반응을 하는 121-46, 121-57 및 121-69의, 역가가 우수한 3종의 세포주를 Table 5와 같이 확보할 수 있었고 그 중 121-57이 가장 좋은 것으로 나타났다.



Fig. 6. Photograph of cloned cell of 2,4-D-121-57.

Table 5. Titration of monoclonal hybrid cell culture medium supernatant of 121-46, 121-57 and 121-69

No. of hybridoma cell	Dilution times of cell culture medium supernatant									
	1	10	20	40	80	120	320	640	1,280	2,560
121-46	2.384	2.131	1.925	1.840	1.335	1.057	0.678	0.386	0.276	0.169
121-57	2.386	2.275	2.305	2.230	1.984	1.824	1.519	1.080	0.555	0.334
121-69	2.184	1.831	1.675	1.503	1.250	0.957	0.609	0.308	0.189	0.096

그러므로 높은 반응성을 보인 121-46과 121-57의 hybridoma cell line을 이용하여 효소 면역분석법의 조건을 확립함과 아울러 효소면역분석법을 응용한 농산물 중 잔류농약인 2,4-D의 신속판별을 위한 면역분석법에 응용하였다.

다. 단클론성 항체 생산과 특성

1) 항체의 생산 및 정제

확보된 2종의 hybridoma cell이 생성하는 항체의 특성을 조사하기에 앞서, 각 종의 cell line을 T-25에 배양한 후 Integra CL-6 well의 장치를 이용하여 보다 농축된 항체를 포함하는 배양 상등액을 얻어 실험에 활용하였다. 보통 T-75와 같은 배양플라스크를 사용하면, 배지교환 시 세포수의 조절이 용이하지 않고, 분석에 사용하기에 항체의 농도가 낮은 단점이 있다. 또한 여러 종류의 항체를 이용하여 assay를 개발하고자 할 때, 모든 종류의 세포주에 대하여 복수액을 만드는 것도 쉽지만은 않다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 본 실험에서는 최근 보급되고 있는 Technomouse 장치 중 하나인 CL-6 well 장치를 사용하여 세포주 검색 및 분석조건 확립을 위한 항체를 생성하였다. CL-6 well 장치로 막의 반투성을 이용하여 초기에 세포수를 조절하여 접종하면 일정수준의 항체를 일정량 얻을 수 있었다. 항체의 역가를 일반 배양 상등액과 비교하였을 때, Table 6과 같이 일반 배양액은 100배 희석배수에서 CL-6 배양 상등액 1,000배 희석배수와 유사한 흡광치를 보이는 것으로 보아 CL-6에서는 10배 정도 역가가 높은 항체를 얻을 수 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 6. Dilution titer of anti-zearalenone ascites fluid as determined by indirect ELISA (Unit: O.D.)

	Dilution times of cell culture medium supernatant									
	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000	500,000	1,000,000	
Normal culture medium	2.386	2.275	2.305	2.230	1.984	1.824	1.519	1.080	0.555	
CL-6 culture medium	over	2.377	2.309	2.209	2.176	1.976	1.789	1.548	1.124	

## 2) 항체의 특성조사

위의 방법으로 얻은 항체 중 ELISA에 가장 적합한 항체를 선택한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였고, 생산된 복수액을 ammonium sulfate 침전법을 이용하여 간이 정제하고 PBS로 투석 후 동결건조하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 정제된 항체의 isotype을 측정하기 위하여 Boehriner Mannheim사의 mouse monoclonal antibody isotyping kit를 사용하였으며, 그 결과 Table 7과 같이 121-46, 57번 모두  $\kappa$  type의 light chain을 가진 IgG<sub>1</sub>을 생산하였다.

Table 7. Immunoglobulin classes of production of hybridoma cell

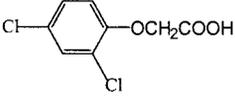
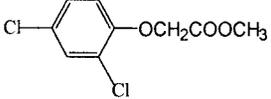
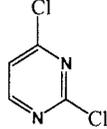
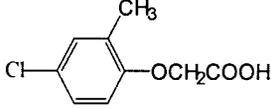
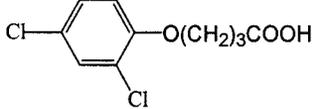
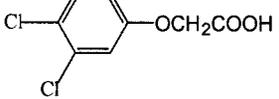
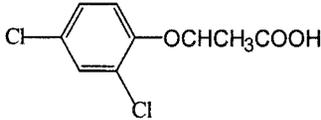
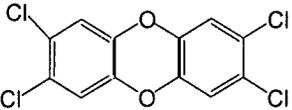
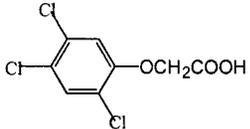
Cell No.	Class	Light chain
121-46	IgG <sub>1</sub>	$\kappa$
121-57	IgG <sub>1</sub>	$\kappa$

## 3) 항체의 교차반응성 검토

2,4-D에 대한 단클론성 항체의 특이성을 알아보기 위하여 2,4-D와 유사한 구조를 가지는 이성체들에 대한 교차반응성을 조사하였으며 그 결과는 Table 8과 같았다. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid methyl ester에 대하여 67.5, 15.6%의 교차반응성을, 4-chloro-*o*-toloxyacetic acid (MCPA)에 대하여 16.5, 18.9%의 교차반응성을 보였으며 나머지 이성체에 대해서는 교차반응성을 거의 나타내지 않았다. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid methyl ester의 경우는 그 구조가 2,4-D의 구조에 methyl기가 첨가된 것을 제외하고는 동일하므로 가장 높은 교차반응성을 나타내는 것으로 생각된다. 본 실험의 결과, 2,4-D에 대한 단클론성 항체는 분석물질에 대한 특이성이 매우 높다고 할 수 있으며 따라서 ELISA에 의한 2,4-D의 정량분석은 그 선택성이 탁월하다고 말할 수 있다.

Table 8. Cross-reactivity of 2,4-D analogues in indirect competitive ELISA

(A: 121-46, B: 121-57)

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> (ppb)	CR(%)
2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)		A : 13.71 B : 4.895	A : 100 B : 100
2,4-dichlorophenoxyacetic acid methyl ester		A : 20.32 B : 31.36	A : 67.5 B : 15.6
2,4-dichloropyrimidine		A : 510.2 B : 2303	A : 2.60 B : 0.21
4-Chloro-o-toloxoacetic acid(MCPA)		A : 82.89 B : 25.87	A : 16.54 B : 18.92
4-(2,4-dichlorophenoyl) butyric acid		A : 425.8 B : 176.1	A : 3.22 B : 2.78
3,4-dichlorophenylacetic acid : 3,4-DPA		A : 2896 B : 2448	A : 0.48 B : 0.20
2-(2,4-dichlorophenoxy) propionic acid		A : ∞ B : ∞	A : 0 B : 0
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)		A : ∞ B : ∞	A : 0 B : 0
2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid : 2,4,5-T		A : 378.7 B : 132.1	A : 3.62 B : 0.68

라. ELISA법의 확립

1) Coating buffer의 선정

개발된 항체 (2,4-D-121-57)를 이용한 ELISA 조건을 확립하기 위하여 coating buffer와 coating 조건을 비롯한 몇 가지 실험을 수행하였다. 먼저 코팅에 사용하는 buffer를 Ueno 등은 대체로 pH 9.6인 carbonyl buffer를 사용하였으나 본 실험에서는 보통의 PBS를 코팅 시 사용하여 기존의 코팅 buffer와 비교하였다. 그 결과, Table 9에서 보는 바와 같이 본 실험에서는 뚜렷한 차이점은 보이지 않았지만 높은 농도에서의 경쟁 반응성이 carbonyl buffer가 PBS로 코팅할 경우보다 양호한 결과를 보였다.

Table 9. Comparison of coating condition in indirect competitive ELISA for 2,4-D  
(Unit: O.D.)

Coating buffer	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (ppb)				
	0	1	10	100	1,000
Carbonyl buffer (pH 9.6)	1.848	1.747	1.262	0.367	0.106
PBS (pH 7.4)	1.815	1.670	1.253	0.449	0.142

2) Coating 조건 선정

Microtiter plate에 항원을 코팅시키기 위해 항원을 carbonyl buffer (pH 9.6)로 희석하여 50 ng/well로 코팅하였다. 코팅된 plate를 40℃ dry oven과 4℃ 냉장고에서 하룻밤 코팅한 후 코팅온도가 ELISA 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, Table 10에서 보는 바와 같이 4℃에서 하룻밤 코팅한 경우 대체로 40℃에서 코팅한 것보다 반응 O.D. 값이 높게 나타났다.

Table 10. Comparison of coating temperature in indirect competitive ELISA for 2,4-D  
(Unit: O.D.)

Temperature	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (ppb)				
	0	1	10	100	1000
40℃	1.582	1.501	0.985	0.376	0.106
4℃	1.852	1.701	1.152	0.385	0.142

### 3) 단클론성 항체의 코팅항원에 대한 이차원적 스크린

재현성과 안정성이 확인된 2,4-D-46 및 2,4-D-57 hybridoma cell을 복수항체로 대량 생산하여 ELISA 개발을 위한 2차원적 검색법으로 코팅항원 농도 및 항체 희석농도를 설정한 후 실험을 수행한 결과는 다음과 같다. 즉, 0 ppm과 1 ppm 사이의 흡광치 차이로 비교하였을 때 2,4-D-46의 경우 2,4-D-OVA 100 ng/well과 2,4-D-BSA 100 ng/well의 농도로 코팅한 후 항체는 1 : 8,000배 희석하여 사용하였을 경우 좋은 반응성을 보이는 것으로 나타났고 2,4-D-57의 경우는 2,4-D-OVA 50 ng/well과 2,4-D-BSA 50 ng/well의 농도로 코팅한 후 항체는 1 : 4,000배 희석하는 것이 최적조건인 것으로 나타났다. 그러므로, IC-ELISA 분석을 위하여 코팅항원과 항체를 최적의 조건으로 하여 민감한 2,4-D 검출을 위한 조건을 설정하는 실험을 수행하였다. Fig. 7은 복수항체의 코팅항원 농도별 최적의 항체 희석배수를 설정한 그래프이다.

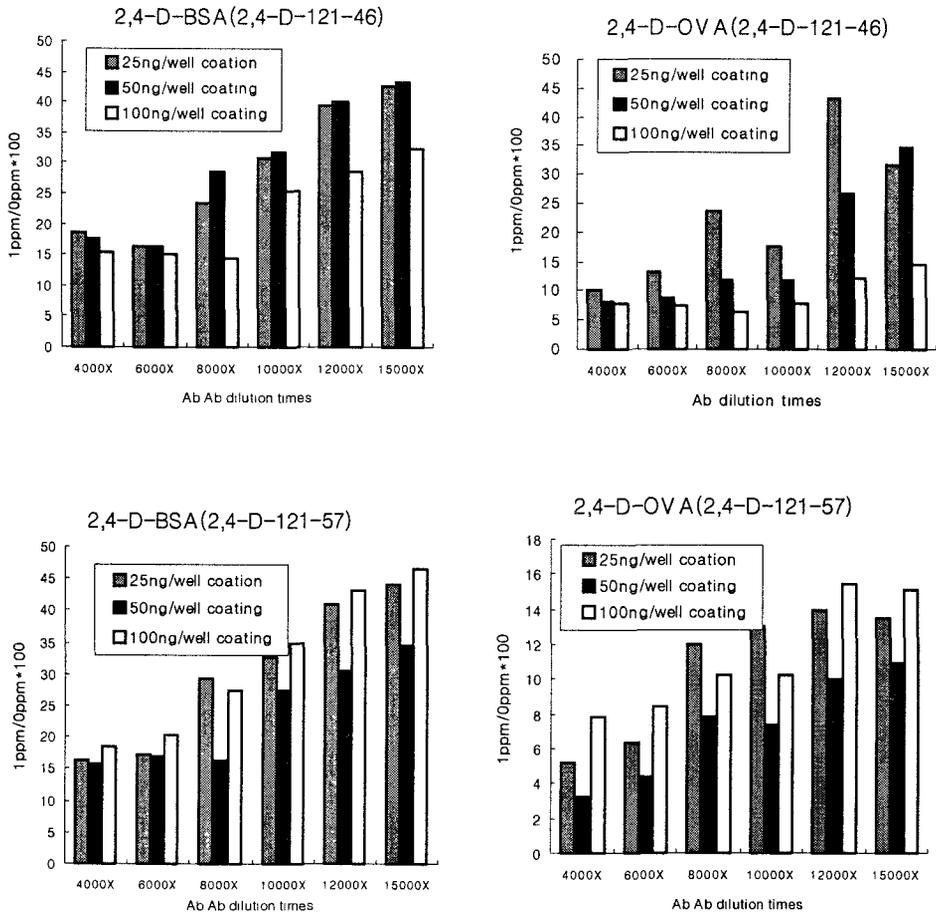


Fig. 7. Chess titration of coating Ag concentration in homologous system.

2,4-D에 대한 단클론성 항체 (2,4-D-121-57)의 코팅항원에 대한 친화력 및 경쟁력이 좋은 조합을 선택하기 위하여 항원-항체 결합을 및 경쟁성 여부를 코팅항원의 농도 및 각 항체의 희석배수에 따른 경쟁력의 차이를 2차원적 검색 (chess screen) 방법으로 살펴보았다. 그리고 코팅항원에 결합되어 있는 단백질의 종류에 따른 경쟁반응성의 차이를 살펴보고, 그 결과 2,4-D-OVA이 2,4-D-BSA보다 더 좋은 결과를 보이는 것으로 나타났다으며, 따라서 2,4-D-OVA을 코팅항원으로 사용하여 실험을 수행하였다. Fig. 8은 코팅항원의 농도와 항체의 농도를 최적화한 조건에서 작성한 검량곡선이다.

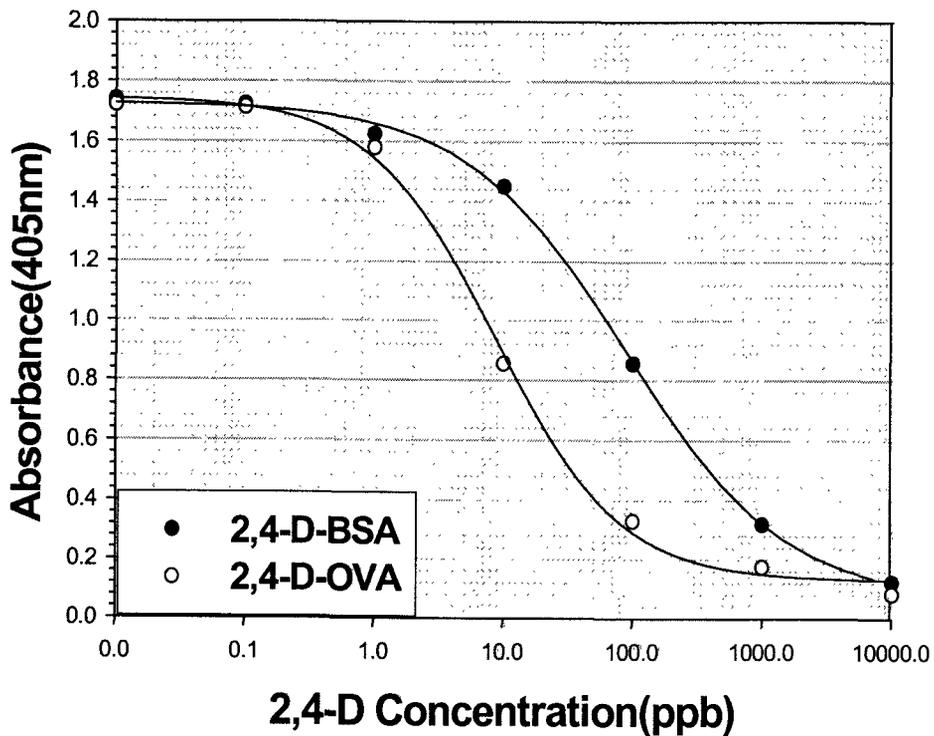


Fig. 8. 2,4-D standard curve with two kinds of coating antigen.

4) Blocking buffer가 indirect competitive ELISA (IC-ELISA)에 미치는 영향

Blocking solution의 종류와 농도를 결정하기 위해 blocking 시 많이 이용되는 후보 물질인 BSA, skim milk, gelatin, casein의 4가지를 0.5와 1%농도가 되게 하여 단일 혹은 혼합하여 사용하였다. 그 결과, Table 11에서와 같이 skim milk, BSA+skim milk, skim milk+gelatin, gelatin+casein 혼합을 한 것이 blocking solution으로 적당한 것으로 나타나 비교실험을 수행하였다. 하지만 이 4가지에 대한 뚜렷한 차이점은 없었고, 실온, 4°C, 37°C에 보관하여 보존성을 살펴본 결과도 Fig. 9와 같이 모두 비슷하였다.

Table 11. Comparison of different blocking buffer (Binding %)

	B	S	G	C	B+S	B+G	B+C	S+G	S+C	G+C	NON
1 ppm/0 ppm*100	32.3	8.4	49.1	66.9	11.9	31.8	39.6	7.7	7.8	40.8	82.0

B, BSA; S, skim milk; G, gelatin; C, casein.

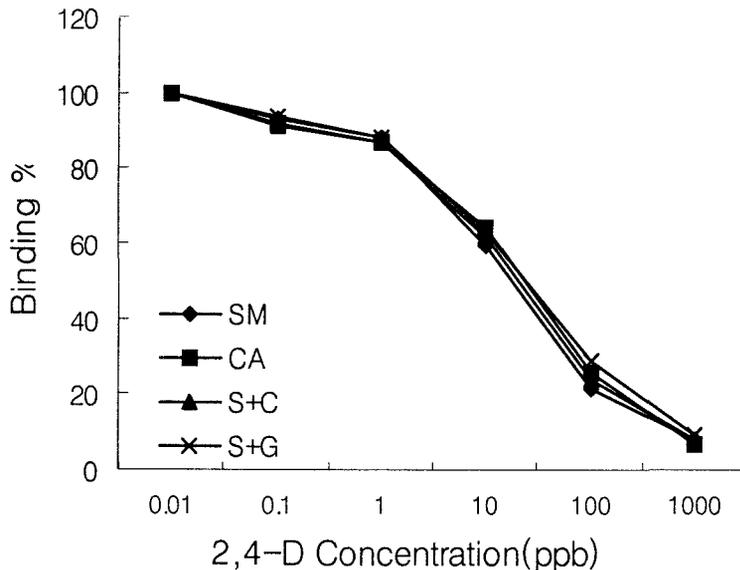


Fig. 9. Effect of blocking solution on ELISA for 2,4-D.

B, BSA; S, skim milk; G, gelatin; C, casein.

5) HRP-conjugated anti-mouse IgG 반응농도 결정

코팅항원과 결합한 항체를 검출하기 위한 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 2차 항체로 사용하였고 희석농도와 반응시간 및 반응온도의 영향을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 10에서와 같이 일정농도 이상에서는 반응시간에 영향을 받지 않았다. 따라서 이 후의 실험은 분석의 신속성을 위해 37°C에서 30분을 반응시키는 조건으로 사용하였다.

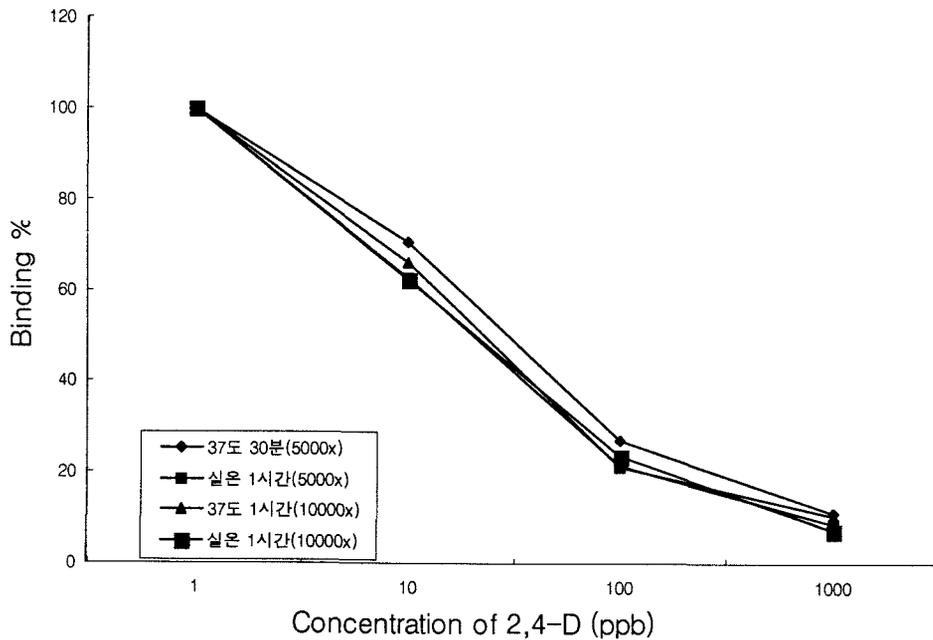


Fig. 10. Effect of HRP-conjugated anti-mouse IgG concentrations (v/v%) and temperatures of 2,4-D standard solution on 2,4-D ELISA.

### 6) 완충액의 농도가 IC-ELISA에 미치는 영향

항체와 항원의 희석 시 사용하는 PBS buffer의 농도를 0.05~0.2 M의 범위로 하고 standard curve를 작성하였다. Fig. 11에서와 같이 buffer의 농도가 높아짐에 따라 최대 흡광도는 낮아지는 경향을 보였고 또한 IC<sub>50</sub> 값도 낮아졌다. 항원의 희석은 증류수를 이용하고, 항체의 희석은 0.2 M PBS를 이용하였을 때 가장 낮은 검출한계와 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 것으로 나타났다. 37°C에 30분 반응시키는 것과 4°C overnight시킨 경우를 비교해 보았을 때 4°C overnight 경우가 IC<sub>50</sub> 값도 낮고 최대흡광도도 높은 것으로 나타났다. 그림에는 없지만 실온에서 1시간 반응시킨 경우는 4°C overnight와 동일한 결과를 나타내었다. 따라서, 분석의 신속성을 고려하여 실온 1시간 반응이 적당하리라 사료된다.

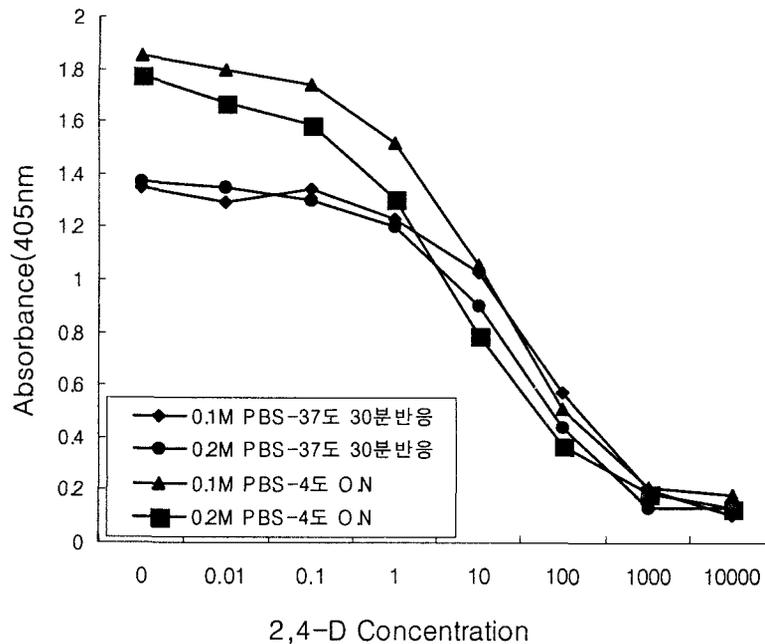


Fig. 11. Effect of temperature, buffer concentration and incubation time on ELISA.

### 7) 기질 반응시간의 결정

기질로는 ABTS를 사용하였고 반응시간별 영향을 살펴본 결과, 15분이 경과된 후에는 최대흡광도는 시간이 경과할수록 증가된 반면 binding %에는 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 20분을 reading time으로 결정하고 이후의 실험은 실온에서 20분 반응 후 결과를 읽었다.

8) 유기용매의 영향 조사

농약의 추출에 많이 사용되는 추출용매인 ethanol, methanol, acetonitrile, acetone를 각각 10%로 제조하여 표준물질을 위의 농도로 각 유기용매에 녹여 실험한 결과 Fig. 12에서 보는바와 같이 methanol을 사용하여 IC-ELISA 실시한 경우가 가장 민감한 그래프를 나타내었다.

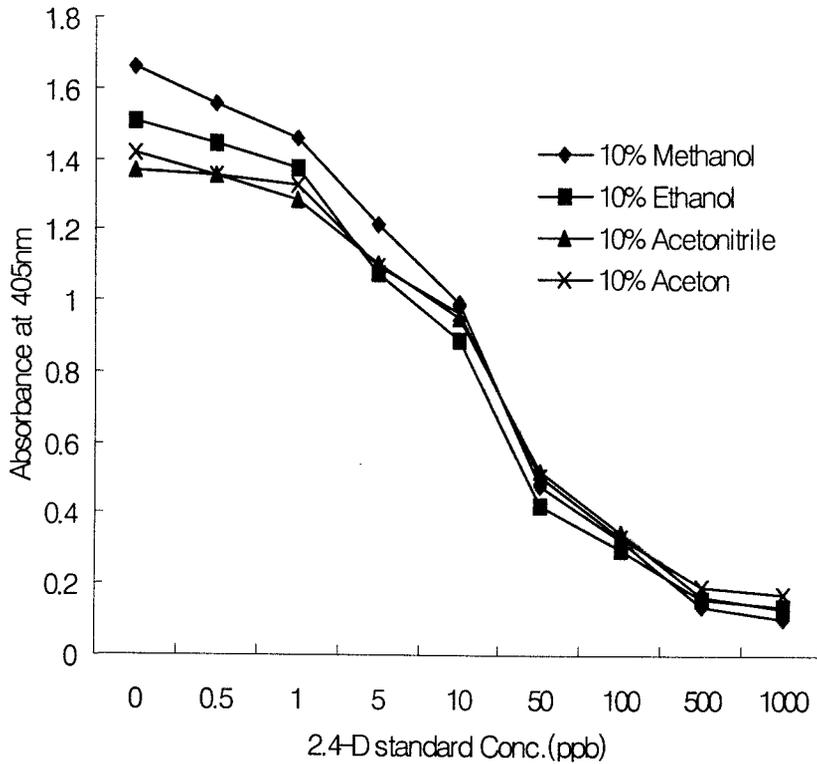


Fig. 12. Influence of 10% organic solvents in PBS.

본 실험에서는 가장 안정한 methanol의 농도변화에 따른 2,4-D standard curve의 변화를 살펴본 결과, Fig. 13에서 보는 바와 같이 methanol의 농도가 높아짐에 따라 경쟁 반응성에 영향이 있고 30% 이하의 농도에서는 사용가능한 것으로 나타났다. Methanol은 다른 농약에 대해서도 추출 용매로서 가장 긍정적인 효과를 가지는 것으로 보고된 바 있다. 분석물질이 소수성일 경우 유기용매의 양이 증가할수록 흡광도 값이 커졌는데 이것은 분석물질의 용해도가 그 유기용매에 의해 증가되었기 때문인 것으로 보고된 바 있다.

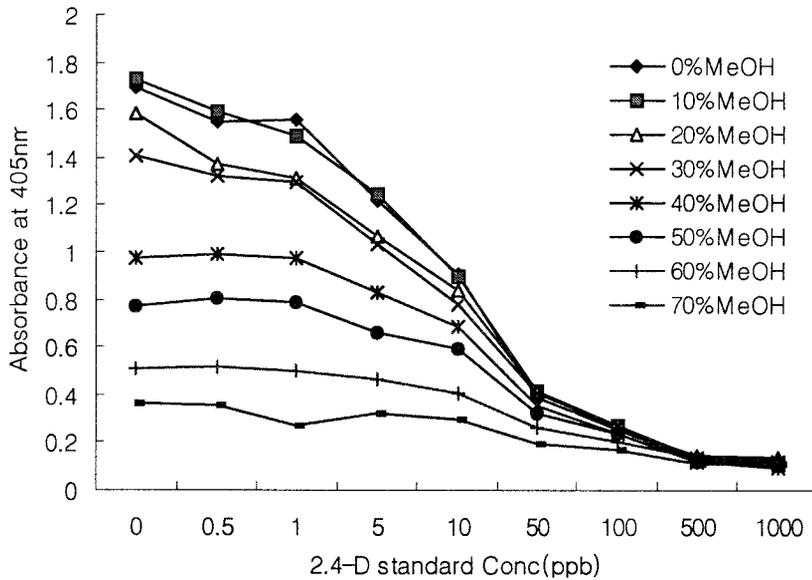


Fig. 13. Influence of methanol concentration in PBS (v/v%).

9) IC-ELISA 검량곡선의 수립

위에서 확립된 최적조건을 이용하여 2,4-D ELISA의 검량곡선을 수립한 결과, Fig. 14에서 보는바와 같이 IC<sub>50</sub> 값이 각각 13.71, 4.895로 나타났고 ELISA의 검출한계를 최대흡광치의 10% 저해시키는 분석물질의 농도로 볼 때 본 실험에서 개발한 ELISA의 검출한계는 0.1 ppb로 나타나 농산물이나 음용수에 미량 존재하는 2,4-D를 검출하는데 충분히 사용가능할 것으로 사료된다.

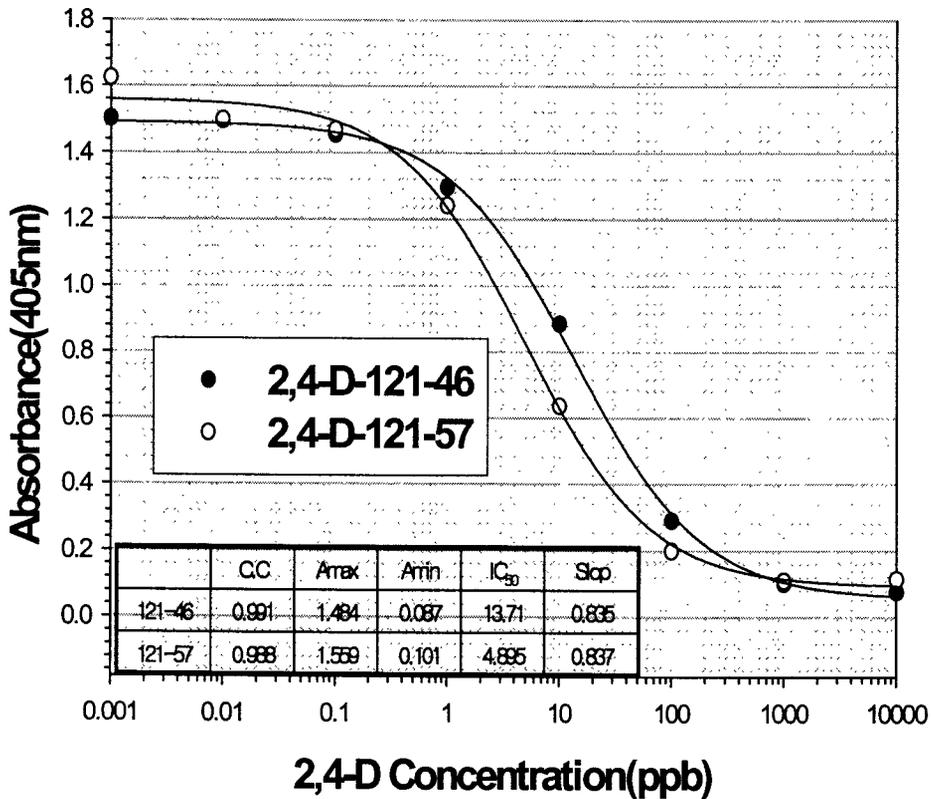


Fig. 14. Standard curve for 2,4-D by indirect competitive ELISA.

10) Heterologous ELISA and homologous ELISA condition

2,4-D의 이성체인 3,4-dichlorophenoxyacetic acid와 3,4-dichlorophenylacetic acid에 OVA을 결합시켜 코팅항원으로 이용한 heterologous ELISA와 2,4-D에 OVA을 결합시켜 코팅항원으로 이용한 homologous ELISA를 비교한 결과, Fig. 15에서와 같이 heterologous ELISA의 경우 IC<sub>50</sub>의 값이 각각 1.732, 1.063 현저히 낮아졌다. 따라서 heterologous ELISA가 더욱 민감한 ELISA임이 증명되었다.

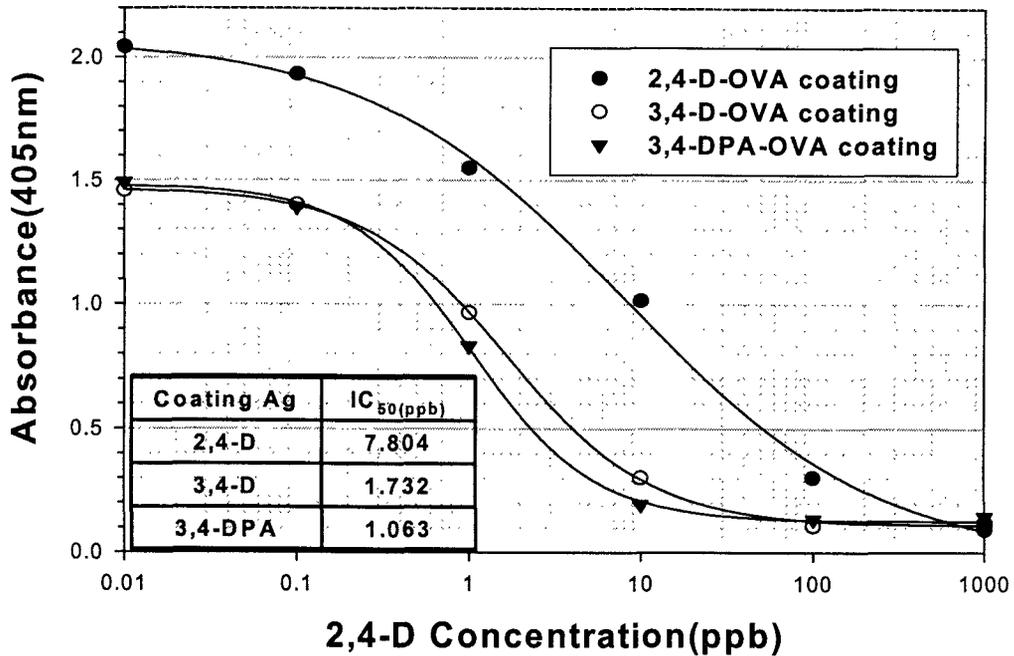


Fig. 15. Comparison of the standard curve of heterologous ELISA and homologous ELISA condition.

마. Immunoaffinity column 제조

시료에 소량 오염되어 있는 2,4-D를 특이적으로 정제하기 위해 앞서 설명한 바와 같이 immunoaffinity column을 Fig. 16과 같은 모양으로 실험제작 하였다. 앞서의 방법으로 gel에 2,4-D에 대한 항체 (2,4-D-121-57)를 1 mg 항체/mg gel 및 5 mg 항체/mg gel의 농도로 부착시키고 column에 packing하여 gel에 항체가 효과적으로 흡착되었는지의 여부를 실험하였다. 먼저 gel 용액과 항체용액을 각각 100  $\mu$ l씩 취한 후 1,900  $\mu$ l의 PBS로 10배 희석한 후 1 N HCl 20  $\mu$ l을 가하고 pH를 낮추었다.

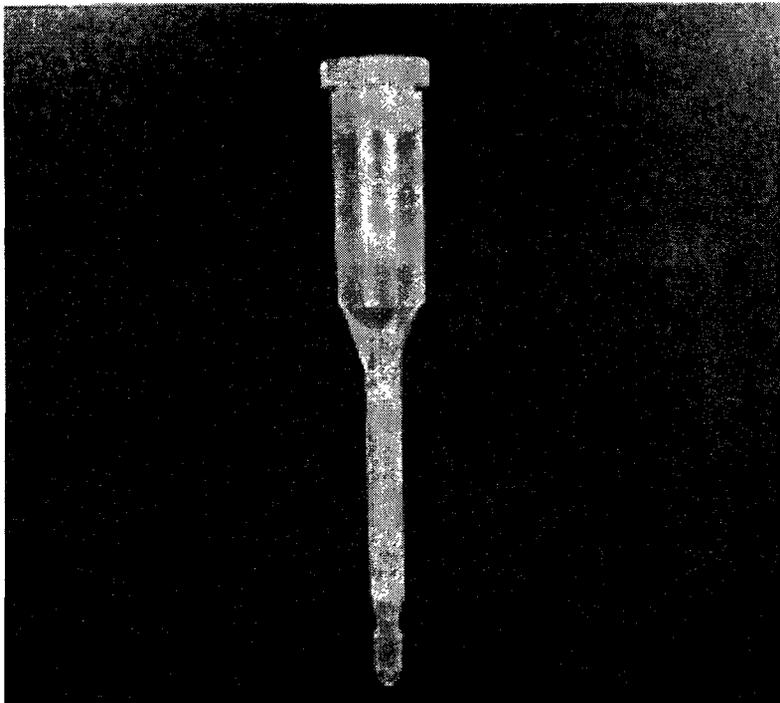


Fig. 16. Photogram of immunoaffinity column.

또한 이 용액을 200~400 nm에서 spectrophotometer로 scanning한 결과, 항체용 희석용액에서만 280 nm에서 흡광치를 보여 용액 중에 항체 단백질이 존재함을 알 수 있었고, 항체 희석용액을 gel에 흡착시킨 후 남은 상등액 200  $\mu$ l를 취하여 1,800  $\mu$ l의 PBS와 20  $\mu$ l의 1 N HCl을 혼합하여 아래와 같은 방법으로 scanning을 실시하여 대부분의 항체 단백질이 gel에 효과적으로 결합되었음도 확인하였다.

한편 시료 정제 시 column의 gel에 부착되어 있는 유리 2,4-D를 methanol로 용출한 경우 그 때 사용되는 methanol의 적당량을 결정하기 위한 실험을 실시하였다. 즉, 10  $\mu\text{g}$ 의 2,4-D를 5 mg 항체/1 mg gel로 제작한 immunoaffinity column에 흡착시킨 후 상법에 따라 10 ml의 PBS와 증류수로 세척하고 매 tube에 1 ml씩 10개의 tube에 methanol 용출액을 모아 ELISA로 측정하여 최적 용출액의 양을 결정하였다. 그 결과, Fig. 17에서 나타난 바와 같이 대부분이 4번째 tube까지 용출되어 나왔으나 5번째 tube에서도 소량 함유되어 있음을 알 수 있었다.

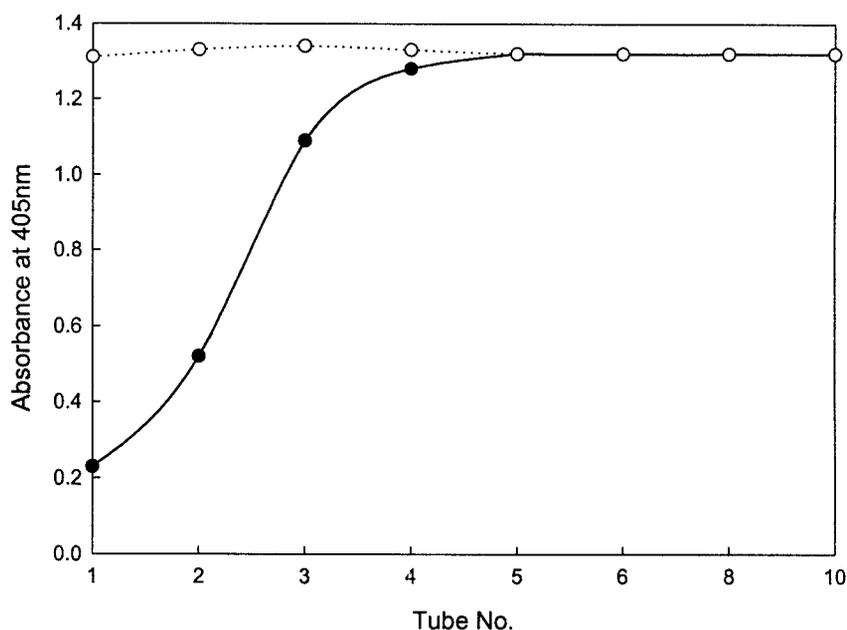


Fig. 17. Effective volumn for elution of 10  $\mu\text{g}$  2,4-D in different immunoaffinity column. ■, control (non 2,4-D loaded); ●, column packing of 1 mg gel bound 5 mg antibody.

## 바. IC-ELISA

각종 농산물의 전처리를 위해 지금까지 화학분석법에서 행하여 오던 복잡한 정제과정을 생략하고 면역분석법으로 분석할 경우 대체로 다음과 같은 간단한 처리과정과 분석과정으로 요약할 수 있다. 본 실험실에서 제작한 immunoaffinity column과 ELISA법으로 연결시켜 실험방법을 확립한 immunoaffinity column-ELISA법은 다음과 같다 (Fig. 18).

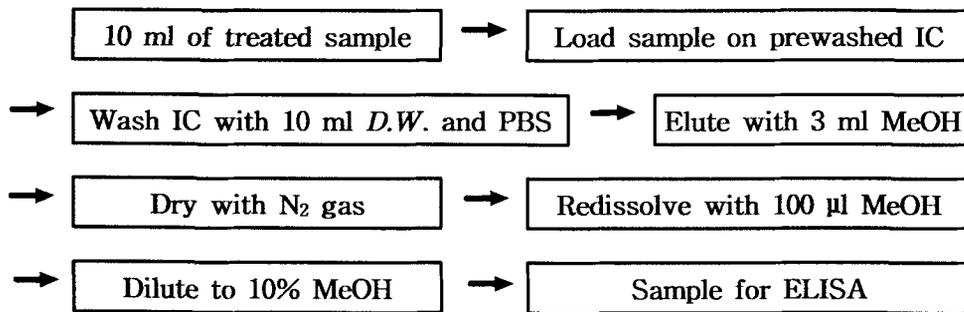


Fig. 18. Step for immunoaffinity column (IC)-ELISA for 2,4-D.

즉, 각 실험방법에 따라 처리한 시료 10 ml를 미리 활성화 시킨 immunoaffinity column에 loading하고 10 ml 증류수와 10 ml PBS로 column을 씻었다. 다시 gel에 흡착된 항체와 binding된 2,4-D를 3 ml methanol로 용출시킨 다음 질소 gas 하에서 농축시키고 100 µl methanol로 다시 녹인 다음 10% methanol 농도로 희석하여 ELISA의 시료로 사용하였다.

ELISA는 앞서 설명한 바와 같이 coating plate를 먼저 PBS 용액으로 3번 washing하고 시료용액과 표준곡선용 표준 2,4-D 용액 100 µl씩을 Eppendorf tube에 넣고 곧 PBS 용액으로 희석시킨 항체용액 100 µl씩을 넣어 시험관 교반기에서 혼합하고 그 중 100 µl씩을 coating된 well에 주입시켜 well에 coating된 항체와 1시간 반응시켰다. 반응 후 다시 washing buffer로 4회 well을 세척하여 반응하지 않은 물질을 제거하였다. 2차 항체를 넣어 1시간 더 반응시키고 washing buffer로 6회 세척한 후 peroxidase와 반응 기질인 ABTS 용액 (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) 100 µl씩을 첨가하여 15분간 발색시켜 반응정지액 100 µl씩을 가한 후 발색정도를 ELISA reader로 흡광도 (405 nm)를 측정하여 먼저 표준곡선을 작성하고 시료의 2,4-D 함량여부를 비교 조사

하였다. 이러한 과정은 필요한 자료와 kit가 준비되어 있는 경우 많은 시료를 단시간에 추출하여 2,4-D 오염정도를 판별하는데 효율적으로 적용할 수 있으리라고 생각된다.

사. 간이검사 kit 개발

2,4-D의 면역분석을 위하여 지금까지 얻은 실험결과를 바탕으로 indirect competitive ELISA법을 이용한 ELISA kit의 실험적 제작을 시도하였다. 즉 microtiter plate에 2,4-D-OVA conjugate를 100 ng/well씩 4℃에서 하룻밤 coating시키고 0.5% skim milk 용액으로 blocking시킨 다음 용액을 완전히 제거하고 ELISA용 kit로 포장하였다. 실험에 사용된 항체 (2,4-D-121-57)는 500배로 희석한 다음 100 µl씩 첨가해야 하기 때문에 100배로 희석하여 포장할 예정이지만 실제로 실험을 많이 수행할 경우 항체를 0.1 mg 단위로 포장하여 공급하는 것이 오히려 안정하다고 생각되었다. 2차 항체-HRP conjugate는 1,000배로 희석시켜 포장하여 공급하며, 4℃에서 보관하면서 사용하도록 안내할 예정이지만 저온 포장수송에 필요하므로 주의해야 할 것이다.

그 외 실험에 사용되는 기질 (ABTS)용액은 30 mg ABTS를 90 ml H<sub>2</sub>O에 녹인 다음 적당히 분배하여 포장한 다음 -20℃에 보관토록 하고 기질용액을 희석할 citrate buffer 및 반응정지시약 역시 각각 포장하여 실온에 보관토록 하며 특히 본 실험에 사용되는 표준 2,4-D의 경우 methanol에 녹인 표준물질을 일정량씩 포장해서 -20℃에 보관케 하며 실제실험 시 PBS 용액에 희석해서 0, 0.1, 1, 10 ppb로 농도별로 나누어 표준용액을 만들 수 있게 준비하였다.

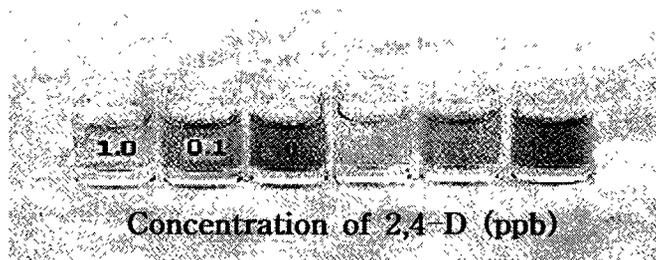


Fig. 19. Comparison of the color differences of analytical indirect competitive ELISA kit.

그 결과 Fig. 19에서 보는 바와 같이 색깔의 차이로 간단하게 2,4-D의 오염정도를 판별할 수가 있었으며, 실제 육안으로 1 ppb 수준에서도 control 구와 판별가능 하였지만 더욱 반응조건을 개선하고 안정성을 향상시키기 위한 연구를 계속하고 있다. 즉 시료 30개를 처리할 재료를 1 kit로 해서 포장할 경우 1 kit당 다음과 같은 것이 필요하다.

\* Coating, blocking된 microtiter well 35 line (8 well/line)

\* 표준 2,4-D (0.1 ppm/bottle: A)

\* ABTS 용액 (B액), 2,4-D에 대한 항체 (C액)

\* 2차 항체-HRP (D액: 1,000 배 희석액 5 ml)

\* Citrate buffer 25 ml (E액)

\* 반응 정지액 25 ml (F액)

(Coating 된 well, A, B, 액은 -20℃에 보관, C, D, E액과 F액은 4℃에 보관)

실험용 kit 사용의 전체 과정을 간단히 요약하면,

- ① 실험 준비: 전처리된 시료용액과 표준 2,4-D 용액 준비 (A를 100  $\mu$ l MeOH에 녹인 후 0.1 N PBS에 희석: A액)
- ② Coating, blocking된 well을 증류수로 washing  $\times$ 3
- ③ 표준 2,4-D용액 (A액) 또는 시료용액 50  $\mu$ l씩을 well에 각각 넣은 다음 2,4-D에 대한 항체 희석액 (C액) 50  $\mu$ l씩 well에 첨가- 37℃ 2시간 반응- 2차 항체-HRP conjugate 희석용액 (D액) 50  $\mu$ l씩을 well에 첨가→ 37℃에 3분간 incubation
- ④ 기질용액 조제: B액 1 ml + E액 10 ml + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4  $\mu$ l를 혼합
- ⑤ Well washing  $\times$ 6
- ⑥ 기질용액 100  $\mu$ l씩 well에 주입→ 15분 incubation
- ⑦ F액 100  $\mu$ l씩 well에 주입→ 반응정지
- ⑧ 결과를 육안으로 비교 (단, ELISA reader가 있을 경우 410 nm에서 측정 비교, 실험에 사용하는 재료는 모두 1회용으로 할 것이며 모든 사용한 기구나 물건은 detoxification 요망)

아. 농산물 중 잔류 2,4-D의 검색

1) 식수

식수에 표준 2,4-D를 0~1,000 ppb로 각각 오염시켜 표준곡선을 확립하고, buffer를 이용한 표준곡선과 비교하여 전처리 없이 시료적용이 가능한 지를 측정하였다. 그 결과, Fig. 20에서 보는 바와 같이 식수의 표준곡선과 buffer의 표준곡선이 거의 유사한 것으로 나타났으며, 전처리 없이 최소 검출한계는 0.1 ppb 였고 검출범위는 0.1~1,000 ppb로 식수 중 미량 잔류하는 2,4-D를 검출할 수 있는 것으로 사료되었다. 또한 회수율은 Table 12에서 보는바와 같이 98% 이상의 회수율을 보였다.

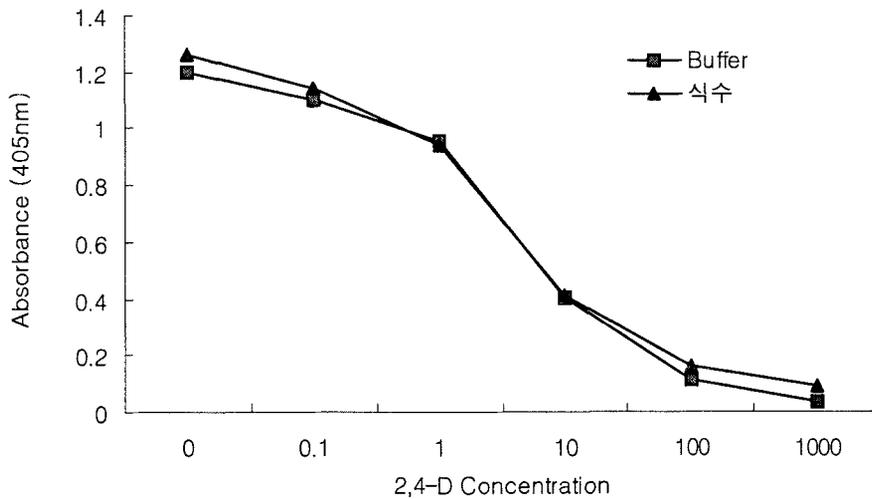


Fig. 20. Determination of matrix effect from drinking water.

Table 12. Recovery ratio of the 2,4-D spiked on tap water

Spiked level (ppb)	Detected level (ppb)	Recovery (%)
1	0.99	99.0
10	10.21	102.1
100	98.50	98.5

2) 오렌지 주스 및 곡류의 시료 전처리 방법

2,4-D가 오염되어 있지 않은 오렌지 주스를 Mcmorris의 방법을 이용하여 추출한 후 이에 2,4-D 표준물질을 0~1,000 ppb로 각각 오염시켜 표준곡선을 확립하고, buffer를 이용한 표준곡선과 비교하여 오렌지 주스 추출물의 matrix effect를 측정하였다. 그 결과 Fig. 21에서 보는 바와 같이 buffer의 표준곡선과는 상당한 차이가 있었다.

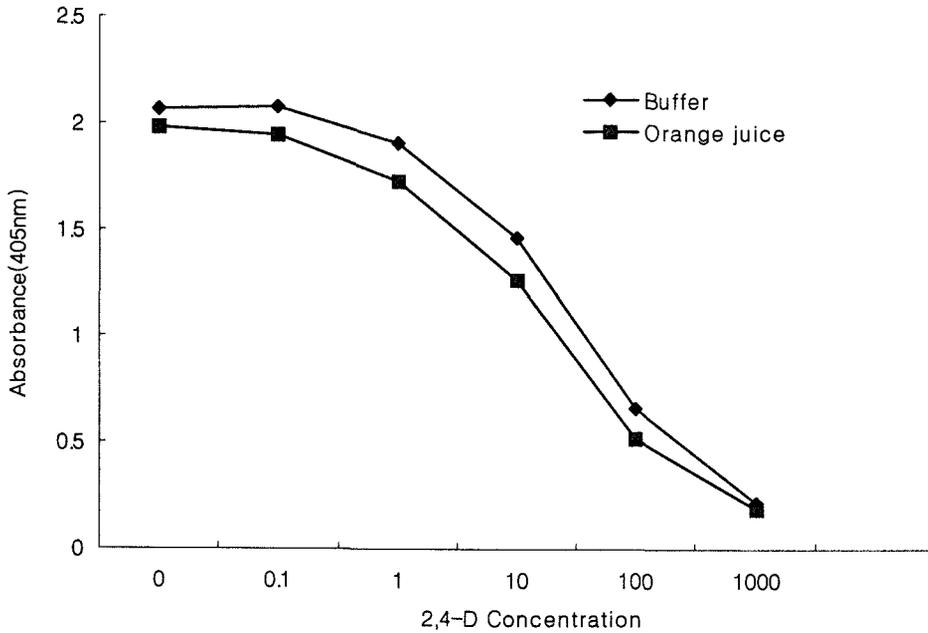


Fig. 21. Determination of matrix effect from extracted orange juice.

각종 주스에 대해 잔류 2,4-D를 측정할 경우 오염되지 않은 각각의 주스를 Mcmorris의 방법을 통하여 추출하였고 이에 각각의 농도인 표준물질을 이용하여 표준곡선의 확립이 필요한 것으로 사료되었다. 오렌지 주스 추출물에 대한 표준곡선을 확립한 결과 Fig. 22와 같이 최소 검출한계는 1 ppb 였으며 검출범위는 1~1000 ppb로 나타났다. 또한 회수율은 Table 13에서와 같이 89%에서 105% 정도로 나타났다.

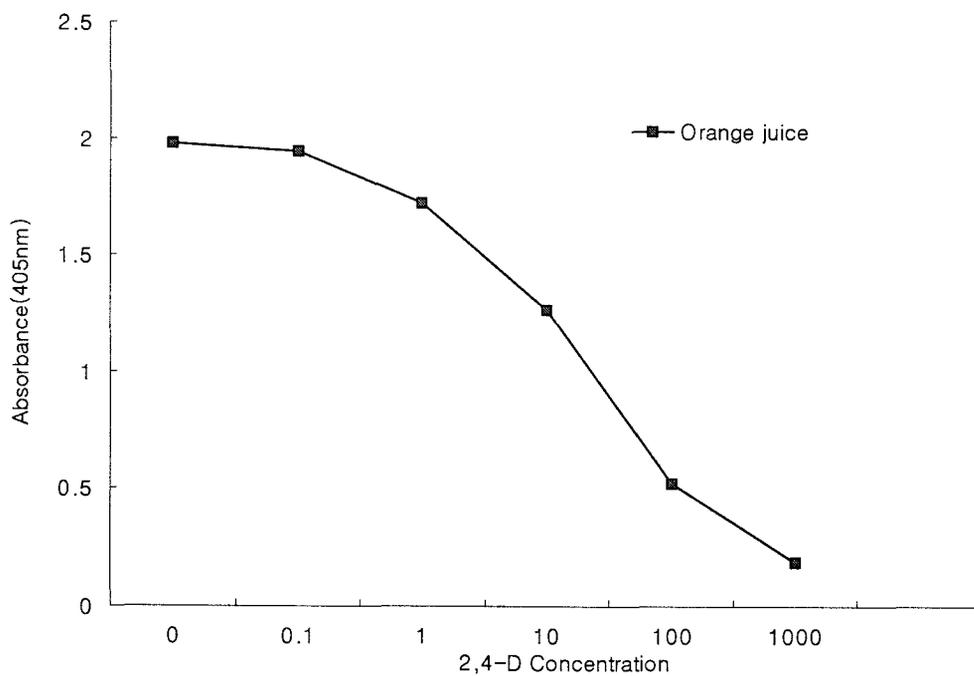


Fig. 22. Standard curve of 2,4-D for extracted orange juice by indirect ELISA.

Table 13. Recovery ratio of the 2,4-D spiked orange juice

Spiked level (ppb)	Detected level (ppb)	Recovery (%)
1	0.89	89.0
10	9.87	98.7
100	100.50	100.5

### 3) 보리

2,4-D가 오염되어 있지 않은 보리를 Newsome의 방법을 이용하여 추출한 후 이에 2,4-D 표준물질을 0~1,000 ppb로 각각 오염시켜 표준곡선을 확립하였고, buffer를 이용한 표준곡선과 비교하여 보리 추출물의 matrix effect를 측정하였다. 그 결과, Fig. 23에서 보는 바와 같이 buffer의 표준곡선과는 상당한 차이가 있었다.

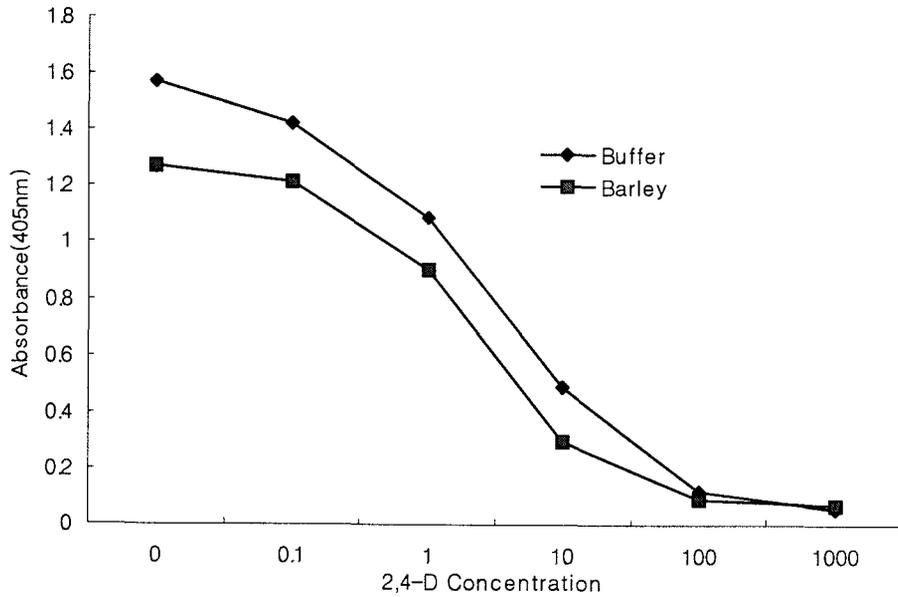


Fig. 23. Determination of matrix effect from extracted barley.

따라서, 각종 곡류에 대해 잔류 2,4-D를 측정할 경우 오염되지 않은 각각의 곡류를 Newsome의 방법을 통하여 추출하였고 이에 각각의 농도인 표준물질을 이용하여 표준 곡선의 확립이 필요한 것으로 사료되었다. 보리 추출물에 대한 표준곡선을 확립한 결과, Fig. 24에서와 같이 최소 검출한계는 0.1 ppb, 검출범위는 0.1~1,000 ppb로 나타났다. 또한 회수율은 Table 14에서 보는바와 같이 92%에서 108% 정도인 것으로 나타났다.

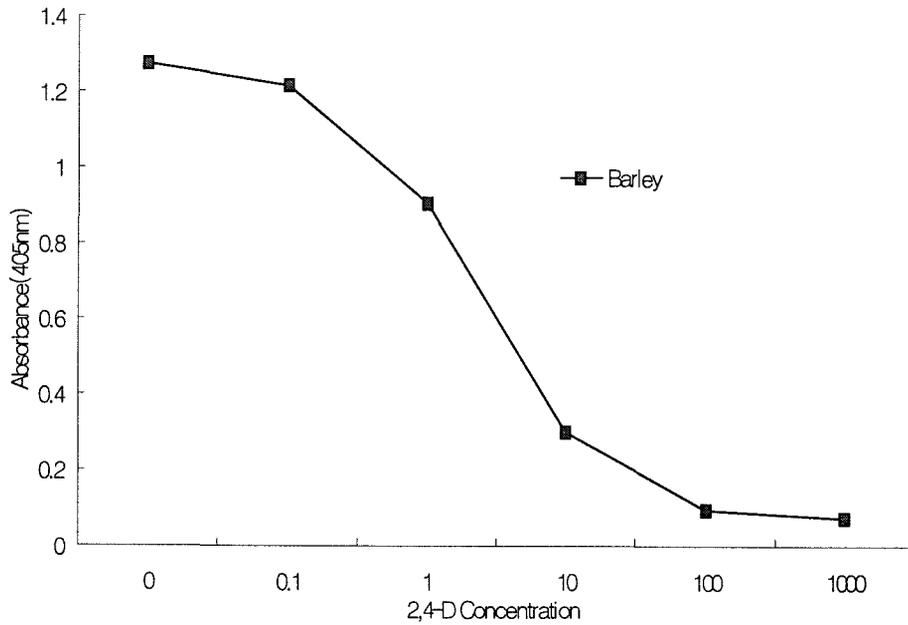


Fig. 24. Standard curve of 2,4-D for extracted barley by indirect ELISA.

Table 14. Recovery ratio of the 2,4-D spiked on barley

Spiked level (ppb)	Detected level (ppb)	Recovery (%)
1	0.92	92.0
10	10.80	108.0
100	97.00	97.0

#### 4. 결 론

가. 단클론성 항체를 개발하기 위해 우선 2,4-D를 2,4-D-hapten으로 전이시키고 이들을 BSA, OVA, KLH 등과 결합시켜 항원 또는 coating conjugate를 합성하였다.

나. 형질세포종세포 (p3×63Ag8.V653)와 2,4-D-KLH 및 2,4-D-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 2,4-D에 대한 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하였다.

다. Hybridoma cell (2,4-D-121-57)을 마우스 복강에 주사하여 생산한 단클론성 항체를 이용하여 2,4-D를 측정하기 위해 indirect competitive ELISA법을 개발하였다. 이 분석법은 0.1~100 ppb 수준의 2,4-D를 분석할 수 있었다. 또한 생성된 단클론성 항체는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid methyl ester에 대하여 15.6%의 교차반응성을, 4-chloro-*o*-toloxyacetic acid (MCPA)에 대하여 18.9%의 교차반응성을 보였으며 나머지 이성체에 대해서는 교차반응성을 거의 나타내지 않았다.

라. Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품 시료 중의 2,4-D를 정제하기 위해 우선 항체를 gel-(affi-gel 10)에 결합시켰다. Column은 먼저 10 ml PBS로 씻고 난 뒤 시료용액을 충전했으며 그리고 10 ml의 증류수와 10 ml의 PBS로 충전한 시료용액을 씻은 후 5 ml의 methanol로 column에 결합되어 있는 2,4-D를 용출시켰다.

마. 2,4-D 분석을 위한 실험적 ELISA kit 한 세트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 2,4-D conjugate가 coating된 microtiter well이 35 line (12 well/line), 표준 2,4-D 용액 (0.1 ppm: A액), ABTS용액 (B액), 2,4-D에 대한 항체 (C액), 2차 항체-HRP (D액: 1,000배 희석액 5 ml), citrate buffer 25 ml (E액), 반응 정지액 25 ml (F액)로서, well, A, B액은 -20℃, C, D, E, F액은 4℃에 보관하였다.

바. 식수, 오렌지 주스, 보리에 표준 2,4-D를 1, 10, 100 ppb 농도로 임의로 오염시켜 indirect competitive ELISA법을 이용하여 회수율을 측정한 결과, 식수의 경우 98~102%로 회수율이 높았으며 오렌지 주스는 89~100%, 보리의 경우는 92~108%로 나타났다.

## 제 5 절 전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가 (제2협동과제)

### I. 전자코를 이용한 농산물의 판별기술 (협동연구기관)

협동연구책임자 : 서울여자대학교 노 봉 수

#### 1. 서 설

농산물의 원산지규명을 위하여 이화학적인 방법을 쓰는 경우 시간이나 비용이 많이 소모되고 그 결과도 80% 내외의 정확도를 갖고 있기 때문에 정확도를 보다 높이기 위하여 비파괴기술인 근적외선 분광법 (김영수, 1997), 전자코에 의한 판별법 (노봉수, 1998) 등이 일부 원료에 대하여 시도되고 있고 X선 형광분석법 등도 검토되고 있으나 이에 관련된 보고는 없는 실정이다. NIR에 의한 원산지 식별방법을 개발하기 위해서는 산지별 시료를 대변할 수 있는 충분한 시료수집에 의한 분석과 분석결과의 스펙트럼 정보에 다양한 통계처리 기법을 동원하여 검량식을 작성하고 이에 대한 검증과 이론적 정립이 요구된다. 현재 NIR을 이용한 비파괴기술은 과채류의 당도, 곡류의 함수율, 아밀로오스 함량, 우유 및 유제품의 지방, 단백질 및 고형분 함량 등에 관한 연구에 많이 활용되고 있다. 이런 경험을 토대로 오렌지 주스 (Scotter와 Day, 1992)와 참기름 (김영수, 1996)의 진위성 여부를 판별하였고, 참깨 (권영길 등, 1998), 생약 (우영아 등, 1998), 쌀 (김상숙 등, 1997), 담배 (김용욱 등, 1994), 고춧가루 (권혜순 등, 1999), 녹차 (김영수, 1997)의 원산지를 판별한 결과가 보고되고 있다. 그러나, 비파괴 분석인 NIR은 수분, 단백질, 지방 등 일반적인 성분을 측정할 수 있으나, 특이성이나 감응도가 떨어져 수분을 제외하고는 각 성분마다 특별한 보정이 필요하며 보다 정확한 분석을 위해서는 분말형태로 만들어야 하나 잣과 같이 지방이 많이 함유된 식품은 분말화가 쉽지 않아 NIR로 분석하는 데에는 한계를 안고 있다.

이러한 문제점은 전자코를 이용하여 보완할 수 있다. 전자코는 음료, 주류 등 각종 식품의 향미성분 분석, 과실 등의 선도등급 결정은 물론 생산공정 감시, 공정제어 및 자동화 분야, 제품의 품질평가 및 관리 등 식품산업의 여러 분야에서 이용이 가능하다 (김성란, 1997, Schaller 등, 1998). 전자코를 이용하여 산지판별을 한 국내의 연구로는 서울

여대 노봉수 그룹이 당근과 마늘, 인삼을 국내산과 외국산으로 구별하는 연구 (노봉수, 1997a), 중국산과 국산 인삼을 conducting polymer 센서와 metal oxide 센서를 이용하여 판별하는 연구 (노봉수, 1997b), 영지, 참깨, 칩과 같은 특용작물을 수입산 및 국내산으로 판별하는 연구를 하였으며 이때 90% 이상의 정확도를 보여주었다 (노봉수, 1998). 인삼 연구원의 이문수 박사 등은 인삼의 물리화학적 특성과 인삼에 묻어 있는 토양을 분석하여 이를 함께 다변량분석을 행하여 보다 높은 판별력을 보여주기도 하였다.

외국의 경우 4개국에서 생산된 과자용 향미료인 saffron을 인공지능망에 인식을 시켜 구별할 수 있었고 (Alpha MOS, 1997a;b), 같은 나라 안에서도 북부와 남부지역에서 생산된 edible oil을 전자코에 의해 각기 다른 산지임을 판별할 수 있었다 (Alpha MOS, 1997a;b). 또, 브라질 커피와 콜롬비아산 커피를 conducting polymer 센서로 사용하여 판별한 보고가 있다 (Schaller 등, 1998). 미국 플로리다 주립대학팀은 sea food의 신선도를 판별하는 방안으로 전자코를 사용하였는데, 미국으로 수입되는 수산물이 70%를 상회하여 매년 증가추세이나 숙련된 검사요원은 한정되어 있어 전자코의 응용이 필요한 실정으로 전자코를 사용할 때 거의 100%에 도달하는 정확도를 나타내는 것을 토대로 이 방법을 미국 FDA의 승인을 받도록 추진 중에 있다 (<http://www.science-daily.com>).

LG 종합기술원의 홍형기팀은 휴대용 전자코를 개발하여 된장의 숙성정도를 예측할 수 있는 시스템을 특허출원 (대한민국, 99-004163) 한 바 있으며 냉장고에 보관중인 각종 채소류의 신선도를 예측하여 선도별로 품질을 제시하는 시스템을 개발하고 있고 Alpha MOS, Aromascan, Figaro 등 세계적인 분석기기 회사와 가스센서를 생산하는 회사별로 다양한 형태의 향기센서로 구성된 전자코를 상품으로 출하하고 있다. 그러나, 이와 같은 전자코 시스템은 식품원료 및 제품에 따라 각기 다른 센서를 선택하여야 하므로 시료에 따른 센서의 선택은 물론 센서감지 시스템에 따른 전자코 시스템의 선별이 요구되고 있다. 현재 metal oxide sensor와 conducting polymer sensor가 가장 많이 이용되고 있으나 선택성과 특이성이 분석물질에 따라 차이가 있는 surface acoustic wave (SAW) sensor를 이용하는 방안도 검토되고 있다. 미국의 EPA는 다이옥신을 분석하는 시스템으로 ppb 레벨까지 선택성을 보여주는 SAW 센서와 GC-MS가 함께 내장된 전자코 시스템의 사용을 인정하기도 하였다 (Staples, 1999). 국립농산물품질관리원은 93년도에 원산지 관리 전담기관이 되었고 동 시험연구소가 농산물의 원산지 검정기관으로 지정된 후 NIRS, X선형광분석기, 전자코, 화상처리기 등을 이용하여 원산지 식별방법에 대하여 연구를 진행하고 있는 실정이다.

## 2. 연구 접근방법 및 내용

### 가. 연구 접근방법

제품의 품질을 결정하는 중요요소로는 향기, 맛, 색깔 등이 있으며 이들의 변화는 동시에 일어나기 때문에 이중 어느 한가지를 분석하더라도 제품의 품질을 예상할 수 있다. 색깔의 경우 아주 미세한 변화로 품질변화 여부를 판별하기는 어려우나 향기성분의 경우는 이것이 용이한 편이다. 향기나 맛의 경우 어느 특정성분이 우리 몸의 후각세포나 미각세포에 의해 감지되고 여기서 얻어진 정보가 신경을 통해 뇌에 전달되는데, 관능검사의 경우 이러한 작업을 반복된 훈련을 통하여 인식하고 판별하게 된다. 따라서 끊임없이 훈련을 받아야 하며 이들 관능요원들은 항상 먹고 싶은 욕망을 억제해야 하고 심리적인 갈등이 있더라도 이를 극복해야 하며 또 신체적으로 항상 좋은 컨디션을 유지해야만 좋은 분석결과를 얻을 수 있는 것이다. 이런 과정 때문에 관능검사 요원에 대하여 높은 비용을 지불해야 한다.

표 1. 관능검사와 GC의 장단점

GC의 장점	GC의 단점
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 정성분석이 가능하다</li> <li>● 정량 분석이 가능하다</li> <li>● 분석 기술이 잘 확립되어 있다</li> <li>● 방법이 체계화되어 있다</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 전처리 과정을 포함한 분석시간이 오래 걸린다</li> <li>● 컬럼의 수명에 따라 교환해야 한다</li> <li>● 전문 기술요원이 필요하다</li> <li>● 복잡한 성분 peak 중 바람직한 향기나 이취와 관련된 성분간의 상관관계를 설정하는 것이 용이하지 못하다</li> </ul>
관능검사의 장점	관능검사의 단점
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 감각기능인 오감과 관련하여 분석한다</li> <li>● 최대한 반복훈련을 통하여 좋은 결과를 얻을 수 있다</li> <li>● 상당히 예민한 편이다</li> <li>● 산업체의 문제점이나 방향을 인식하고 있다</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 훈련실시에 따른 비용이 과다하다</li> <li>● 검사시간이 한정되어 있다 (10시, 3시)</li> <li>● 온도에 민감하여 영향을 받을 수 있다.</li> <li>● 향신료가 첨가되면 이에 따른 영향을 받을 수 있다</li> <li>● 치아가 손상되거나 하여 건강에 해로울 수 있다</li> </ul>

표 1에서 보는 바와 같이 관능검사는 여러 가지 장점과 더불어 단점을 내포하고 있다. 이런 단점들을 극복하고자 가스 크로마토그래피와 같은 기기분석 방법을 도입하기도 하며 전자코를 활용하기도 한다. 예를 들어 커피액의 경우 수십 개의 향기 peak가 GC 분석에서 나타나며 이들 중 소비자들이 좋아하는 peak 성분을 찾아내기까지는 상당히 많은 시간이 요구된다. GC 분석이 가지고 있는 단점 중 전처리 과정이 요망되고 분석시간이 오래 걸리는 문제를 해결하는 방안으로 액체 상태의 경우 바이오센서로, 기체상태의 경우 전자코로 분석을 하면 별도의 전처리 과정이 필요 없이 매우 신속하게 분석을 할 수가 있다.

전자코란 관능검사 요원이 오감을 통하여 얻은 정보를 신경세포를 통하여 뇌에 인식시키는 것과 마찬가지로 여러 개의 비특정 센서들이 얻은 정보를 인공신경망으로 보내 이미 반복훈련을 통하여 숙지된 정보를 토대로 전자코로서의 기능을 하게 되는 것이다. 아무런 전처리 과정이 없이 즉시 여러 개의 센서가 제공한 값을 토대로 냄새성분의 전자지문 (electronic finger print)을 제공함으로써 관능검사나 기존의 분석방법의 기능을 대체할 수 있는 것이다. 이 때, 전자코를 구성하는 중요한 요소인 센서는 특정성분에 대하여 특이성을 보여주는 바이오센서와는 달리 센서마다 비특정 성분에 대하여 함께 반응을 보여 줄 수 있다.

표 2는 사용한 휴대용 전자코 내부에 장치한 센서들과 이들이 측정할 수 있는 성분의 그룹을 나타낸 것이며 여기에는 알코올, 황화수소, 탄화수소, 휘발성분 등 비특정 성분에 대하여 응답을 보이는 특성이 있다.

표 2. 휴대용 전자코에 장치된 metal oxide sensor와 특성

센서 형태 (모델)	응답하게 되는 물질성분
TGS880	Hydrocarbon volatile vapors
TGS825	Hydrogen sulfide
TGS824	Ammonia
TGS2620	Solvent vapor (alcohol)
TGS842	Methane
TGS2610	Combustible gas
TGS2600	Air contaminant

전자코에 많이 사용되는 센서로는 conducting polymer 센서, metal oxide 센서, quartz

crystal microbalance 센서 등이 있으며 센서에 따라 선택성 (selectivity)과 감도 (sensitivity)가 각기 다르므로 사용목적에 맞는 센서가 장착된 시스템을 활용할 수 있다.

예를 들어 품질관리용으로 장기간 사용하고자 하는 중소기업의 경우 metal oxide 센서만을 사용할 수 있으며, 보다 정확하고 정밀한 분석과 신속하게 분석이 되어야 하는 경우 quartz crystal microbalance 센서가 장착된 시스템을 사용하는 것이 보다 바람직할 것으로 여겨진다. 비특정 센서의 사용 시 보다 정확도를 높이기 위하여 보다 많은 센서를 장치하게 되며 이 경우 얻어진 데이터를 다변량통계, 정준판별분석, 주성분분석 등과 같은 통계적인 프로그램을 활용하여 센서들의 응답을 패턴으로 인식하게 된다. 마치 사람의 지문 (fingerprint)과 같은 형태로 인식하여 판별하게 되며 비전문가라 할지라도 손쉽게 어떤 품질인지를 확인할 수 있는 패턴양상의 예라 할 수 있다.

전자코에서 얻어진 데이터는 단순한 기계에 의한 응답이므로 이를 인간의 오감과 관련하여 확보된 관능검사의 결과와의 상관관계를 확립하거나 식품의 특정성분과의 연관성을 확보하여야 전자 관능검사로서 활용될 수 있을 것이다. Fig. 1은 전자코 (e-nose 4000)와 관능검사간의 상관관계를 보여주고 있는 것으로 매우 높은 상관관계를 보여주고 있다. 초기 전자코의 응용이 실시되었을 때에는 이처럼 전자코에 의한 분석과 관능검사 결과간의 상관관계 여부에 대하여 매우 관심이 높았으며 이제는 보편화되어 전자코 결과에 대한 신뢰는 매우 높아진 상태이다.

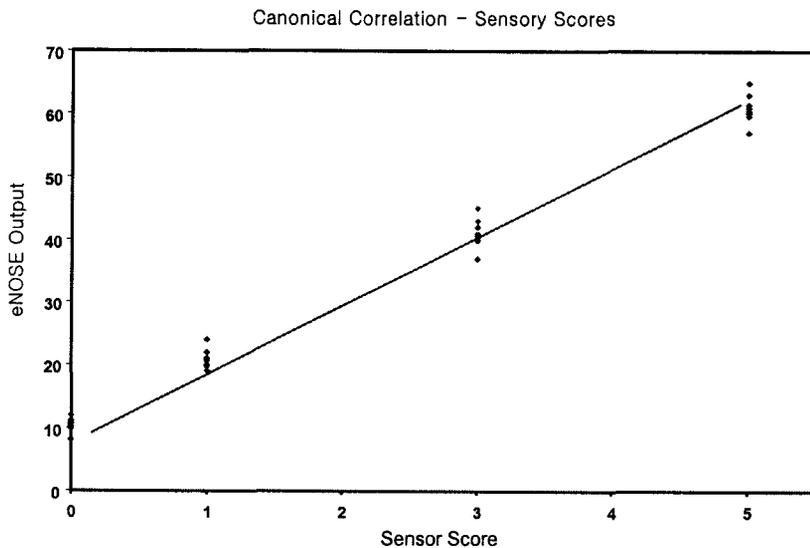


Fig. 1. Relationship between the electronic nose and sensory evaluation.

## 나. 연구 내용

본 연구에서 시도된 전자코를 이용한 국산 및 수입농산물의 원산지 판별실험은 다음과 같은 절차를 통하여 수행되었다.

- 전자코를 이용한 국산 및 수입농산물의 원산지 판별/data 확보
- 연차별 연구품목
  - 1차년도: 검정현미, 대추
  - 2차년도: 수수쌀, 영지버섯
  - 3차년도: 검정콩, 복령기타 (참깨, 당귀, 천궁, 작약 등)
- 센서종류가 다른 전자코 시스템 구축  
다양한 형태의 센서가 부착된 전자코 시스템을 구축- metal oxide sensor (MOS), conducting polymers, surface acoustic wave (SAW)을 각기 또는 혼용하여 분석하는 방법 개발
- 전자코를 이용한 측정조건을 확립  
시료 측정조건을 확립한다: 시료의 향 추출과 관련된 최적조건을 확립한다.  
성분을 추출할 수 있는 온도의 선택, 향기포집시간, 시료의 양, 향기성분을 운반해주는 질소/공기의 유속 등  
전자코 측정: 최적조건 하에서 일정량의 시료를 온도별, 저장기간별로 취하여 수욕조에 담겨진 용기 안에서 낮은 온도로 가열하여 휘발하도록 유도한다. 일정 시간 후 질소가스나 공기를 주입하여 향기성분을 가스센서 막까지 운반하여 감지하도록 한다.
- GC에 의한 일반적인 분석결과를 서로 비교하고 보완하여 더욱 정확하고 세밀하게 국내산과 외국산 농산물을 구분할 수 있도록 한다.
- 얻어진 자료를 함께 통계분석을 실시하며 데이터를 neural network에 적용시켜 시료간의 정확한 구별과 미지시료를 동정할 수 있도록 신경회로망을 구축하고 학습을 통해 산지 판별하는 시스템을 개발한다.
- 실제 적용 (산지 판별)

### 3. 연구개발 방법 및 결과

본 연구를 위한 기본적인 조건은 다음과 같다.

표준시료의 확보: 원산지 판별에 대한 연구에는 정확한 표준시료 확보가 매우 중요하다. 국산시료는 전국 각지에 있는 출장소와 현지 농민의 협조아래 산지로부터 신뢰성 있는 시료를 확보하며 수입산시료는 전국 착항지출장소와 국립농산물품질관리원의 협조를 받아 수집하였다.

전자코 시스템 구축: 국내산과 외국산 농산물의 향기성분을 동시에 감지할 수 있는 다양한 센서 (MOS, conducting polymers, SAW)가 부착된 전자코 시스템을 구축하는 경우 센서의 정확성, 선택성, 재현성, 감도, 안정성 등이 다르기 때문에 각 응용 분야에 맞는 센서를 사용하거나 혼합 사용하는 시스템을 구축하여 사용하였다.

#### 가. 전자코 시스템 구축

##### 1) 전자코 센서

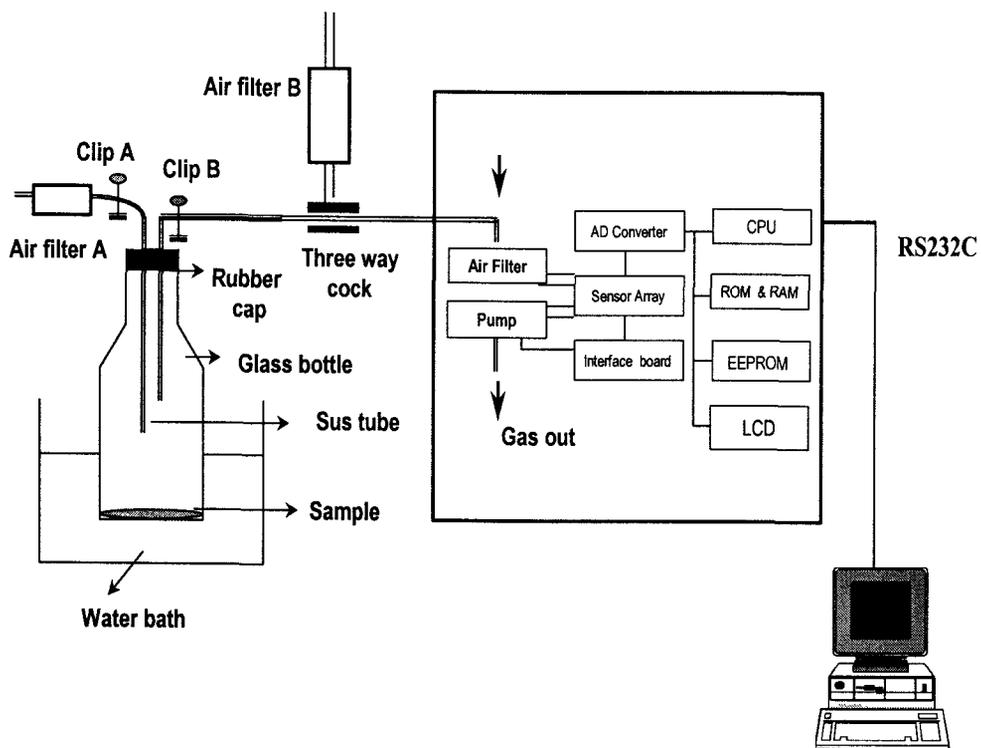
본 실험에 사용된 전자코는 (주)한빛 인스트루먼트 (Seoul, Korea)에서 제조한 것으로 각각 6개의 metal oxide sensor가 사용되었다. 센서는 Figaro사 (Tokyo, Japan)로부터 구입하였고 metal oxide 센서의 특징은 표 2와 같다.

시료의 향 분석을 위한 실험 장치는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 습도가 센서에 미치는 영향을 최소화하기 위해 실리카겔을 넣은 유리관 (air filter)을 사용하여 외부로부터 유입되는 공기의 습도를 차단하였다. 시료병 (25 ml)의 테프론 마개는 마개의 냄새가 센서에 영향을 주는 것을 막기 위해 향 성분을 흡착하지 않는 향기 분석용 비닐 (PE, Yongjin, Korea)을 사용하여 테프론 마개를 포장하여 사용하였다.

##### 2) 전자코 측정

먼저 전자코의 제어장치 구성이 향을 분석할 수 있는 최적조건이 되도록 하였다. 제어장치의 구성에는 데이터 측정간격을 나타내는 데이터 수집시간 (sampling time), 센서의 표면에 흡착된 이물질을 제거하기 위해서 정상상태의 동작전압보다 높은 전압을 가하는 시간 (heater cleaning time), 향 측정 시 남아있는 가스를 방출하고 신선한 공기를 충전하는 시간 (purging time), 센서의 안정화를 위한 시간 (tuning time), 센서를 신선한 공기에 노출시켰을 때의 분석시간 ( $R_{\text{air}}$  measuring time), 센서가 시료향과 반응 시의

분석시간 ( $R_{gas}$  measuring time), 센서 이물질 제거 시의 동작전압 (cleaning voltage)과 정상상태에서의 동작전압 (normal voltage) 등이 있다.



**Apparatus for dynamic head space analysis by the portable electronic nose**

Fig. 2. Dynamic head space set-up with the electronic nose.

전자코로 측정 시 데이터 수집시간은 0.1초, 가열에 의해 이루어지는 센서에 흡착한 이물질 제거시간은 10초, 신선한 공기에 의한 충전시간은 10초, 센서의 안정화를 위한 시간은 600초 이내로 하고 센서 이물질 제거 시의 동작전압은 6V, 정상상태에서의 동작 전압은 5V, 신선한 공기에 센서를 노출시켰을 때의 분석시간은 50초로 하였다. 검정현미의 향을 분석하기 위한 추출조건으로 검정현미의 양은 5g, 분석시간은 5분, 추출시간은 5분으로 하였다. 대추의 향을 분석하기 위해서는 대추의 양은 1g, 추출온도는 40℃, 추출시간은 5분, 분석시간은 50초로 하였다.

센서가 시료 향과 반응 시의 분석시간은 전자코로 시료를 측정할 때 전자코의 저항비율값이 가장 낮았을 때의 시간으로 정하였다 (Fig. 3). 전자코의 저항비율값은 공기저항값 ( $R_{air}$ )에 대한 시료 휘발성성분의 저항값 ( $R_{gas}$ )의 비율, 즉  $R_{gas}/R_{air}$ 로 표현하였다.

$$\text{Ratio of resistance} = R_{gas}/R_{air}$$

시료 측정 후 튜브에 잔류하는 향의 제거를 위해 air pump를 사용하였으며 잔류하는 향의 확인은 전자코로 측정하여 저항비율값 ( $R_{gas}/R_{air}$ )이 0.99이상 될 때까지 세척하였다.

#### 나. 패턴인식 방법

##### 1) 주성분 분석

국내산 검정현미와 수입산 검정현미를 전자코로 측정하여 얻어진 데이터를 이용하여 Multivariate Statistical Analysis Program (MVSAP, version 3.1)으로 주성분 분석을 하였다. 전자코에 내장된 센서 6개에 감지된 휘발성 성분의 저항비율값 ( $R_{gas}/R_{air}$ )을 입력한 후 MVSAP를 이용하여 기여율 (proportion), 제1주성분 값, 제2주성분 값을 구하였다 (Fig. 4). 제1주성분 값의 기여율은 0.958이었고 제2주성분의 기여율은 0.035이었다. 일부 시료의 판별은 어려운 상태이나 전반적으로 수입산과 국내산의 판별이 가능하였다.

국내산 28종과 수입산 16종의 대추를 전자코로 측정하여 얻어진 데이터를 이용하여 주성분 분석을 하였다. Fig. 5A는 제1주성분 값과 제2주성분 값으로, Fig. 5B는 제1주성분 값과 제3주성분 값으로 비교하였다. 제1주성분 값의 기여율은 0.624이었고, 제2주성분과 제3주성분의 기여율은 0.161, 0.132이었다. 제1주성분 값과 제3주성분 값을 이용한 그래프가 제1주성분 값과 제2주성분 값의 그래프보다 국산과 수입산 대추를 더 잘 구별할 수 있었다.

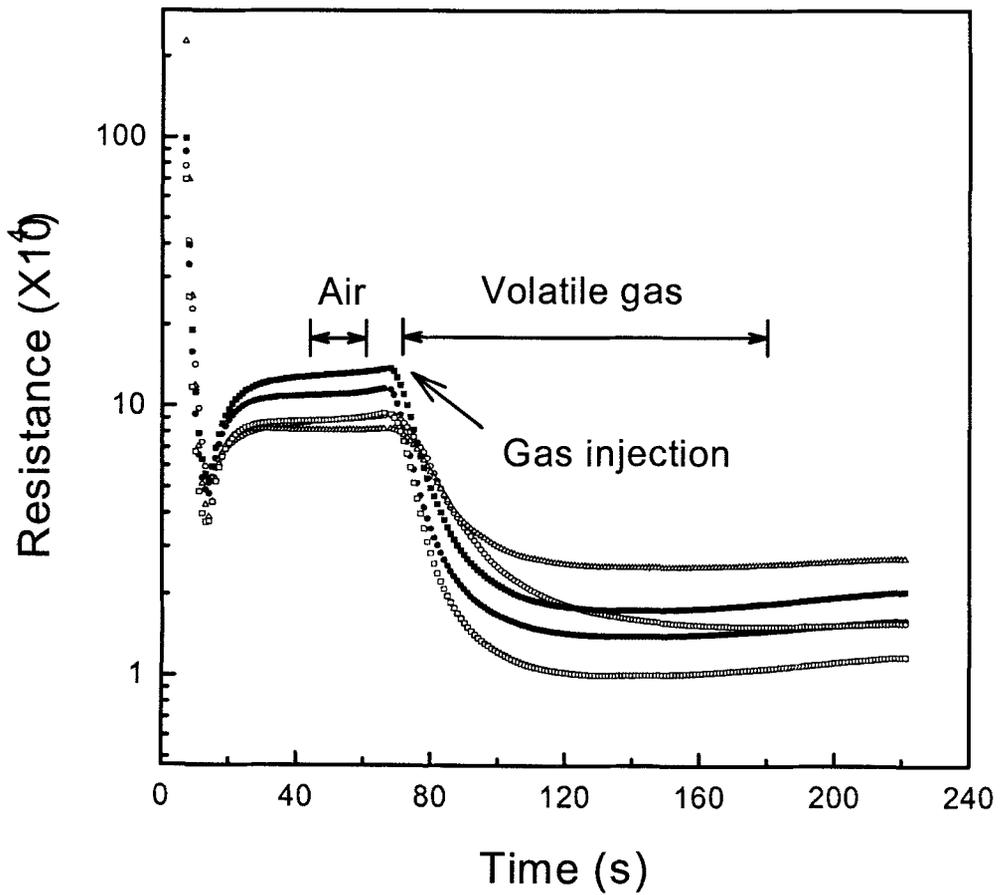


Fig. 3. Response patterns of metal oxide sensors for volatile compounds in the electronic nose. ●: sensor #1, ○: sensor #2, ▲: sensor #3, △: sensor #4, ■: sensor #5, □: sensor #6.

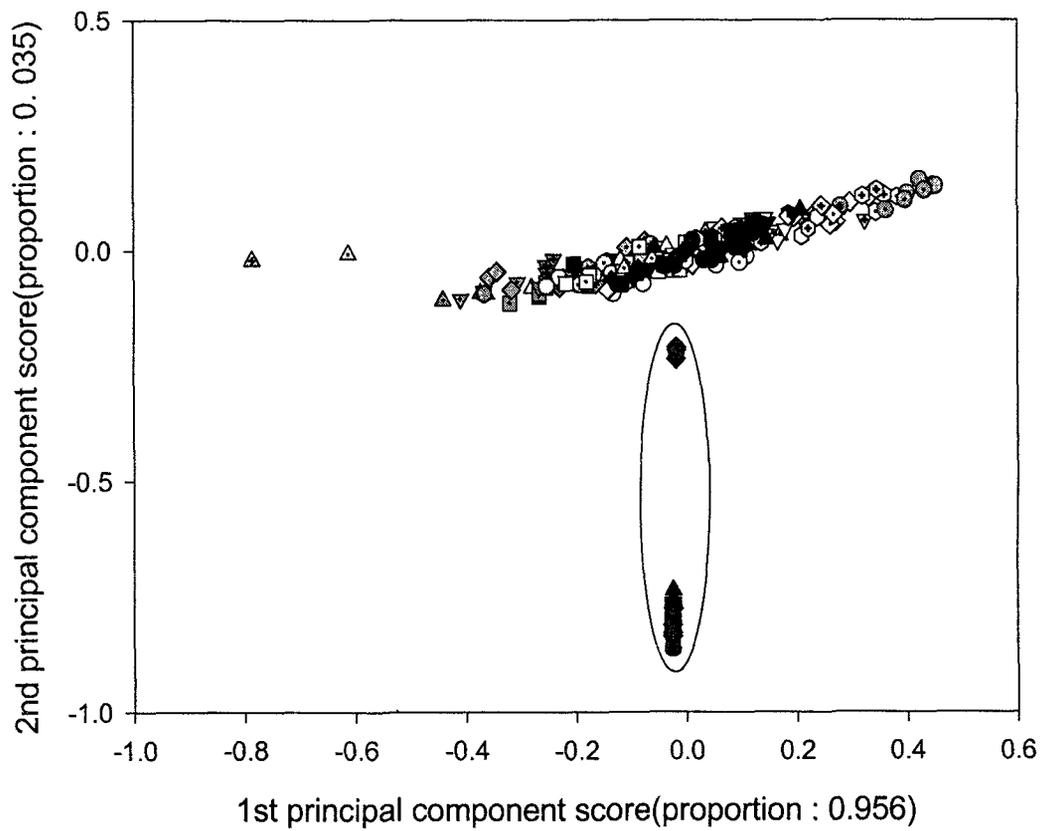


Fig. 4. Principal component analysis from the data obtained with the electronic nose (metal oxide sensor type) for Korean black rices and foreign ones.

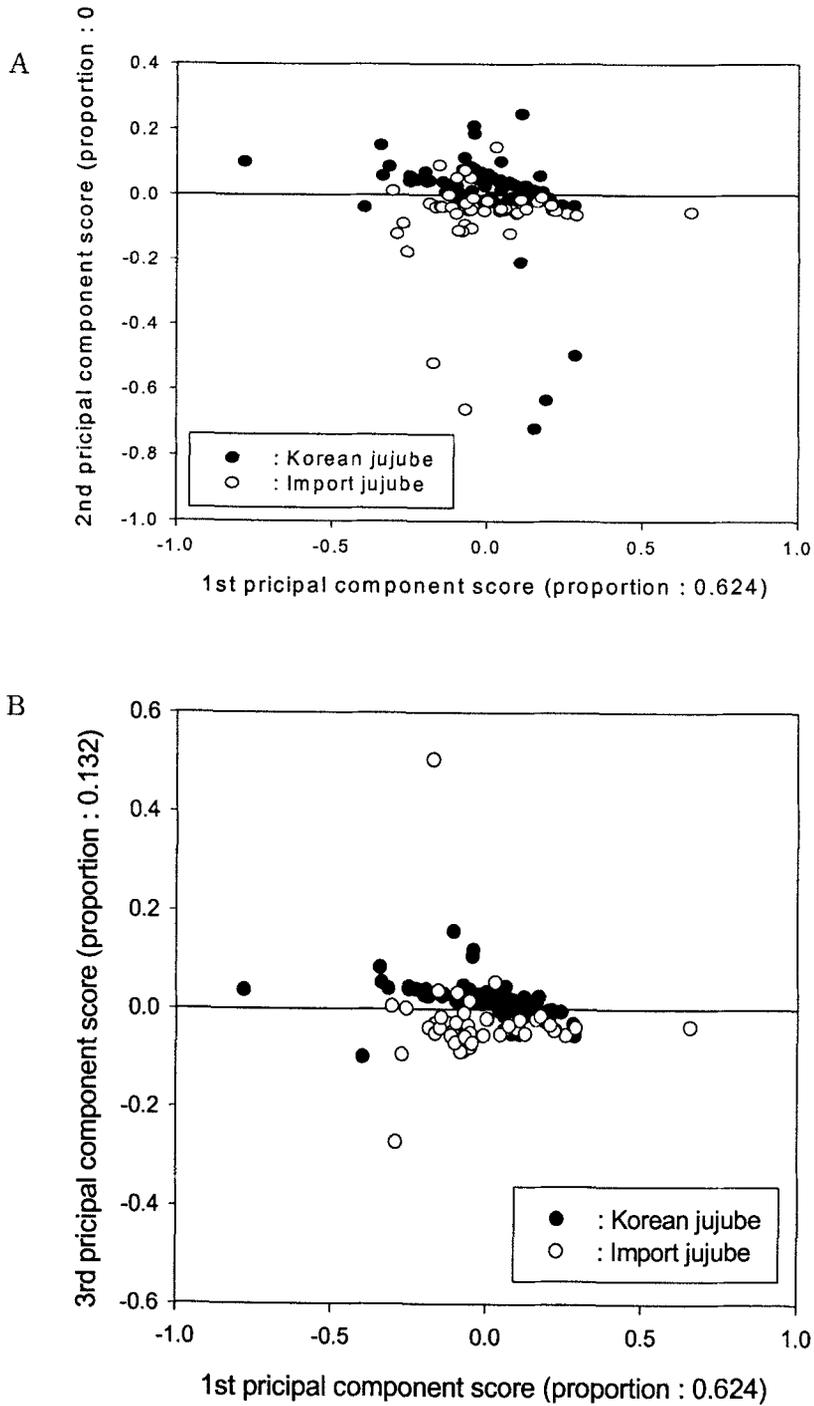


Fig. 5. Principal component analysis from the data obtained with the electronic nose for Korean jujube and foreign jujube (PC1 vs PC2, PC1 vs PC3).

## 2) 인공신경망 분석

Simulated neural chip program (SNC-680311)을 변형하여 농산물의 상태를 예측하기 위한 인공신경망 분석 프로그램을 Fig. 6과 같은 알고리즘을 갖도록 개발하였다. 이미 원산지를 알고 있는 농산물 원료의 향기성분을 전자코로 측정하는 다음, 그 데이터를 인공신경망 분석 프로그램에 학습시킨 후 원산지를 판별하고자 하는 미지시료의 데이터를 인공신경망 분석 프로그램에 입력하여 농산물의 원산지를 예측하였다. 인공신경망은 이미 알고 있는 데이터를 학습하기 위하여 학습규칙에 따라 오차를 줄여가며 내적 지식을 구축하였다. 입력 데이터는 패턴의 형태로 인공신경망에 주어졌고, 인공신경망은 연속적으로 입력패턴을 경험함으로써 학습을 수행하였다. 입력패턴은 체계적으로 인공신경 세포에서 처리되어 출력패턴을 출력하였다. 출력패턴 형식은 사용자에게 의해 목적된 패턴 형식으로 표현되었다. 프로그램의 입력 데이터는 최대 30개까지 사용할 수 있었으며 최대 30가지의 다른 종류를 분석하여 출력해낼 수 있었다. 인공신경망은 학습과정 동안 패턴을 경험해 가며 내적 지식을 구축하면서 반복학습을 통하여 오차를 줄여나갔다.

미지의 입력 데이터는 내적 지식을 통한 경쟁 메커니즘에 의하여 분석되었고, 입력 데이터에 의해 회상된 내적 정보들 중 경쟁 메커니즘에 의해 가장 지지를 받는 정보가 선택되었다. Lab Windows/CVI (National Instrument Co., USA)를 이용하여 전자코에 내장된 센서 6개에 감지된 시료의 휘발성 성분 저항비율값을 입력한 후 결과를 얻었다. Fig. 6과 같이 인공신경망 프로그램의 표시상자에서 입력 숫자상자 (input numeric box)는 원하는 갯수의 입력 데이터를 입력하여 인공신경망으로 분석할 수 있도록 사용자의 편의를 위하여 텍스트 파일상태로 최대 30개까지 입력할 수 있도록 하였다. 또한 출력 숫자상자 (output numeric box)도 입력 데이터와 마찬가지로 최대 30개까지 출력할 수 있도록 하였고 출력값은 0~1 사이의 값으로 출력되었다. 인공신경망이 학습되는 동안 오차의 변화는 error numeric box에 나타나는데 인공신경망의 학습률에 따라 학습하는 과정동안 오차가 감소한다.

## 검정 현미

국립농산물품질관리원 시험연구소에 있는 e-nose 5000 (Neotronics Scientific Ltd.)을 이용하여 국내산 검정현미 및 수입산 검정현미의 휘발성 향 성분을 측정하였다. 휘발성분의 감지용으로 사용된 센서는 conducting polymer sensor 12개와 metal oxide sensor 8개로서, type 401, 478, 459, 463, 460, 298, 462, 458, 461, 483, 297, 464, 20400, 20440,

21360, 22400, 22350, 20420, 20460, 21380가 사용되었다. 시료용기 내에 노출된 20개 센서 head의 감지결과는 시간에 따라 각각 다음과 같이 센서 감응도를 나타내었다.

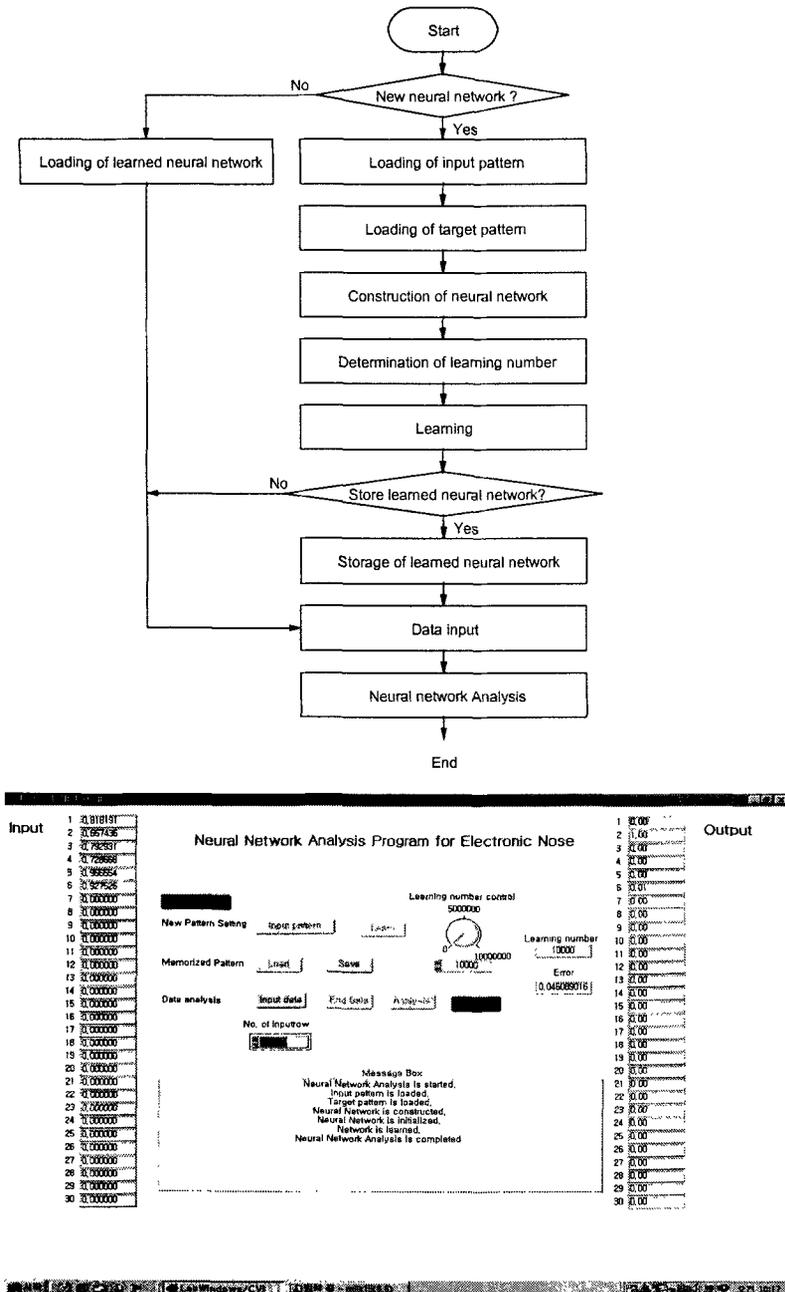


Fig. 6. Algorithms of artificial neural network program and graphic user interface of artificial neural network program for analysis of data.

$$\text{Response} = \Delta R/R \times 100 (\%)$$

R: 센서의 고유저항     $\Delta R$ : 센서의 저항변화값

전자코의 측정조건은 sampling volume은 5 ml, incubator 온도는 40°C, incubation 시간은 10분, syringe 온도는 40°C, GC-run time은 22분이었다. 국내산 69종과 수입산 13종을 각각 2회씩 측정하였다. 각 센서로부터 감지된 데이터는 다변량 통계분석의 하나인 판별분석 (discriminant analysis)을 행하였다.

국내산과 외국산 검정현미를 전자코로 측정하여 판별분석한 결과는 Fig. 7과 같다. 총 69종의 국내산 검정현미를 국내산 검정현미로 판별한 경우가 60종이었고, 61종의 수입산 검정현미중 수입산으로 판별한 경우는 52종이었다 (Table 3). Metal oxide sensor로만 구성된 전자코의 판별정도보다 conducting polymer sensor와 metal oxide sensor를 혼합한 전자코의 판별정도가 더 높았다 (Table 4). 따라서 검정 현미의 경우 여러 가지 센서가 혼합된 전자코 시스템을 사용한다면 원산지 판명을 보다 정확하게 행할 수 있으리라 본다.

Table. 3. Classification of Korean black rices and the imported ones by using artificial neural network program with ratio of resistance in the electronic nose

Actual ones	Predicted black rice		
	Korean	Foreign	Probability (%)
Korean	60	9	86.9
Foreign	9	52	85.2

Table. 4. Classification of discriminant analysis with the electronic nose for Korean black rices and the imported ones using e-nose 5000

Actual ones	Predicted black rice		
	Korean	Foreign	Total
Korean	128 (92.75%)	10 (7.25%)	138
Foreign	2 (7.69%)	24 (92.31%)	26

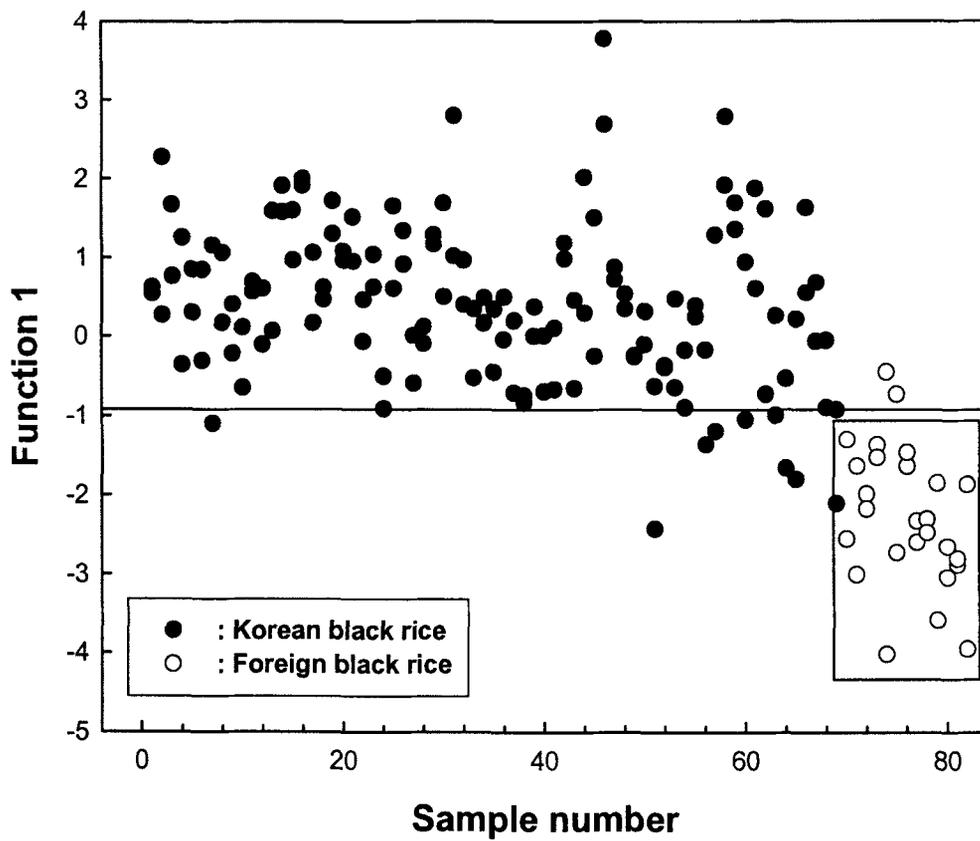


Fig. 7. Discriminant analysis on the electronic nose data for Korean black rices and import ones using commercial e-nose 5000.

## 대추

시료마다 분석조건이 약간씩 차이가 있다. 대추의 시료 분석조건은 다음과 같다.

분석에 사용한 센서: conducting polymer 센서 12 개, metal oxide 센서 8개

분석에 사용한 전자코: e-nose 4000 (Neotronics사)

전달 delay 시간	10초	시료의 노출시간	10분
cleaning 시간	5분	Incubation 온도	40°C
시린지 온도	40°C	Incubation 시간	10분
가스 유속	10 ml/min	시료	4 g

대추시료를 전자코로 분석한 결과를 정준 판별분석에 의하여 판별한 결과는 다음과 같다 (표 5, 6). 2000년도산과 2001년도산으로 분석하였으며 2000년도산의 경우 국내산 82개중 74개가 국내산으로 판별되었으며 이는 89.16%에 해당한다. 한편 수입산 44개중 35개가 수입산으로 판별되어 81.40%의 판별능력을 보여주었다.

표 5. 수입 및 국내 대추 (2000년도산)의 정준 판별분석 결과

시료 \ 판별	국내산	수입산
국내산	74	9
	89.16%	10.84%
수입산	8	35
	18.60%	81.40%

표 6. 수입 및 국내 대추 (2001년도산)의 정준 판별분석 결과

시료 \ 판별	국내산	수입산
국내산	84	7
	83.17%	16.83%
수입산	7	34
	17.07%	82.93%

대추 2001년도산의 경우 91개의 국내산 중 84개가 국내산임을 판별하여 83.17%의 판별을 보여주었으며 수입산의 경우는 41개 품목중 34개가 수입산임을 판별하여 82.93%의 판별능력을 보여주었다. 아직 판별능력의 정확도가 80% 대로 그 정확도를 높여야 할 것이며 이는 반복측정을 통하여 얻어진 데이터 중 불필요한 자료를 삭제하는 작업이 필요하다.

검정현미나 그 밖에 다음에 소개하는 시료에서도 보면 알 수 있듯이 시료에 따라 판별이 용이한 것이 있고 그렇지 못한 것들이 있다. 수입산 시료의 경우 시료의 수가 적어서 통계적 유의성을 확보하는데에 제한이 되었다.

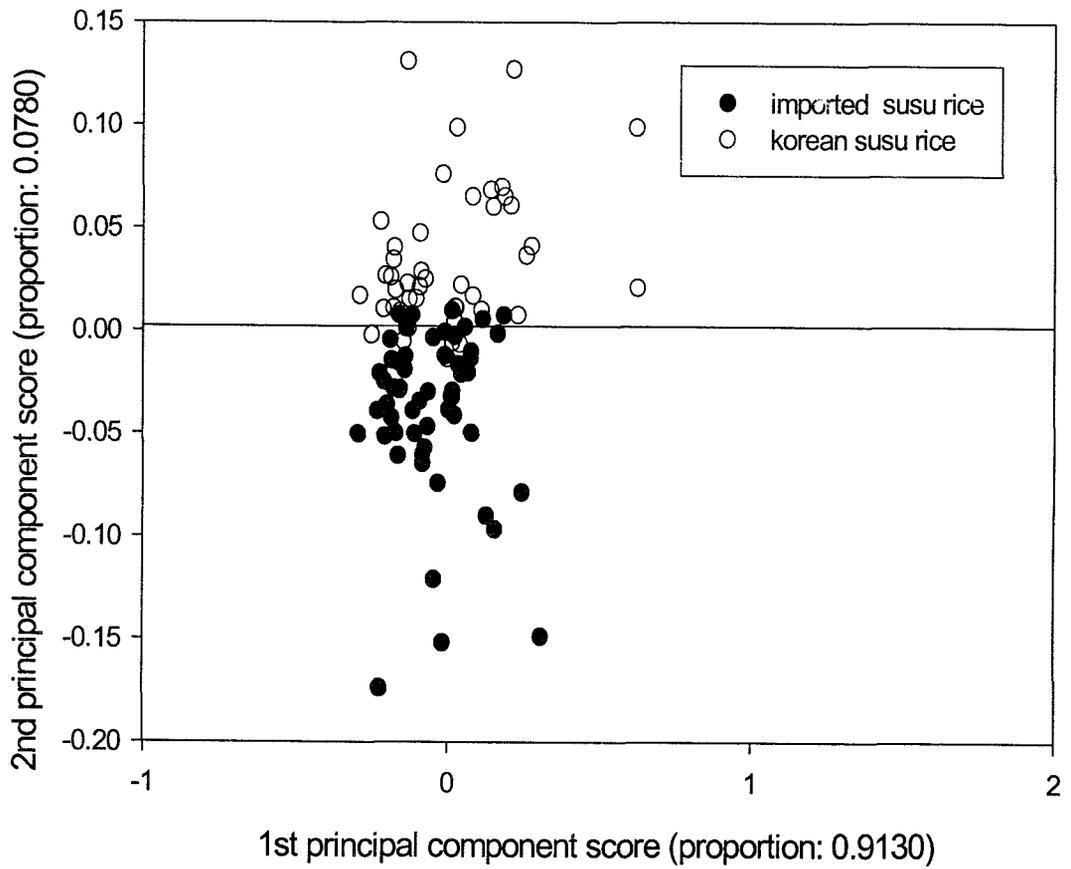
생산출하연도가 다른 경우 국내산의 경우 큰 문제가 되지 않으나 수입산의 경우 생산시기에 대한 신뢰성에 문제가 있으며 그럼에도 불구하고 생산연도에 따른 차이가 적었다. 이 또한 시료에 따라 각기 다르게 나타나는 경우도 있다. 뒤에 언급할 복녕의 경우, 연도에 따라 휘발성분이 휘발되어 당해연도에는 뚜렷한 차이가 1년 이상 저장 후 유통되는 경우 그 차이를 판단하기 어려움 점도 발생하였다.

#### 수수쌀

수수의 경우 전자코를 이용하여 원산지 판별을 주성분 분석에 의해 행한 결과는 그림 8과 같았다. 일부 시료에서 혼동양상이 있었으나 전체적으로 각기 다른 원산지를 나타내었다. 이를 discriminant analysis 행한 결과 89.2% 이상의 정확도가 나타났다 (Table 7).

Table. 7. Classification of discriminant analysis by electronic nose for Korean sorghum and import ones using electronic nose

Actual ones	Predicted sorghum (수수)		Total
	Korean	Foreign	
Korean	40 (90.9%)	4 (9.1%)	44
Foreign	6 (10.8%)	50 (89.2%)	56



Principal component score analysis of ratio of resistance  
by the electronic nose of susu rice

그림 8. 전자코로 분석한 국내산 및 수입산 수수의 원산지 판별에 관한 주성분 분석

영지

영지버섯의 경우 (각각 30개의 시료로) 30개 국내산 영지버섯 시료 중 28개가 국내산으로 판정된 반면 수입산의 경우 30개 중 27개가 수입산으로 판정된 것으로 나타났다 (그림 9, Table 8).

Table 8. Classification of discriminant analysis by electronic nose for Korean *Ganoderma lucidum* (영지) and import ones using electronic nose (e-4000)

Actual ones	영지의 산지판별예측		Total
	Korean	Foreign	
Korean	28 (93.3%)	2 (6.7%)	30
Foreign	3 (10%)	27 (90%)	30

이상을 주성분 분석결과를 토대로 인공지능망으로 5000회 학습시켰으며 이 때 error는 0.0216이었고 학습된 것을 토대로 posterior probability를 행한 결과 표 9를 얻었다.

Table 9. Posterior probability of artificial neural network analysis by electronic nose for *Ganoderma lucidum*

From species	Classified into species	Posterior probability	
		Korea	Foreign
Korea	Korea	1.0000 (30)	0.0000 (2)
		0.9917 (1)	
		0.0299 (1)	
Foreign	Foreign		0.0000 (29)
			0.0001 (1)
			0.0009 (1)
			0.0011 (1)
			0.0018 (1)
		0.0094 (1)	

국내산 시료 34개중 31개는 99% 이상의 확률로 판별하였고 1개는 2.99%의 정확도를 나타냈으며 2개는 수입산으로 잘못 판별하였다. 수입산의 경우 34개 전부를 99% 이상의 확률로 구분할 수 있었다.

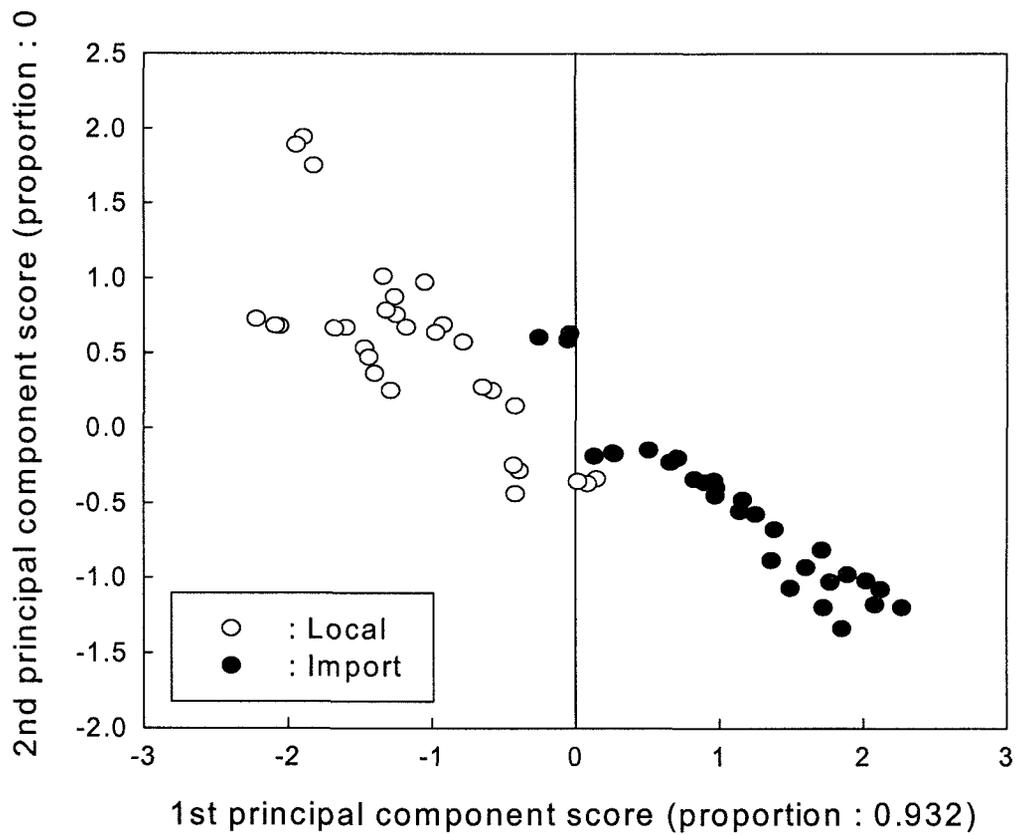


Fig. 9. Principal component analysis of the imported and the locally produced *Ganoderma lucidum* by electronic nose.

## 참깨

참깨의 경우, e-4000으로 분석한 결과 국내산은 96.3%, 수입산은 97.2%의 판별능을 보여주어 매우 높은 원산지 판별력을 보여주었다 (Table 10). 이는 시료의 보존상태가 매우 양호한 것으로 일정한 저장조건하에서 보관된 시료의 경우 품질변화의 정도가 미약하여 비교적 높은 정확도를 보여줄 수 있었다.

Table 10. Classification of discriminant analysis by electronic nose for Korean sesame and import ones using electronic nose (e-4000)

Actual ones	참깨의 산지판별예측		Total
	Korean	Foreign	
Korean	26 (96.3%)	1 (3.7%)	27
Foreign	1 (2.78%)	35 (97.22%)	36

## GC-SAW 전자코 시스템을 이용한 측정

z-nose의 경우 컬럼으로는 DB-5 capillary를 사용하였고 센서는 quartz crystal microbalance (SAW)가 부착되었다. 40 ml의 vial에 2~2.5g의 시료를 넣고 Teflon coated septa로 sealing하여 분석하였다. 분석조건은 injection port 온도 130°C, 센서 온도 30°C, valve 온도 110°C, 컬럼은 30°C에서 120°C까지 초당 3°C씩 상승시키면서 20~25초간 휘발성분을 채취하여 분석하였으며, 별도의 전처리 과정 없이 분석하였다.

## 패턴인식 방법

Electronic Sensor Technology사에서 개발한 Vapot Print™을 사용하여 30초 이내에 얻어진 hertz 값을 바탕으로 한 GC 크로마토그램을 미분하여 표현한 양식과 frequency 패턴을 Vapor Print 방법을 이용해 도형화하여 비교 분석하였다.

## 당귀

당귀의 경우 z-nose로 분석한 결과, 그림 10과 같은 크로마토그램을 얻었으며 이를 derivative 형태와 frequency 형태로 변환하여 비교하기 쉽게 도형화한 결과는 그림 11과 같다. 당귀 시료를 frequency pattern으로 비교한 결과 국내산과 수입산이 뚜렷하게 판별되어졌음을 알 수 있었다 (그림 12).

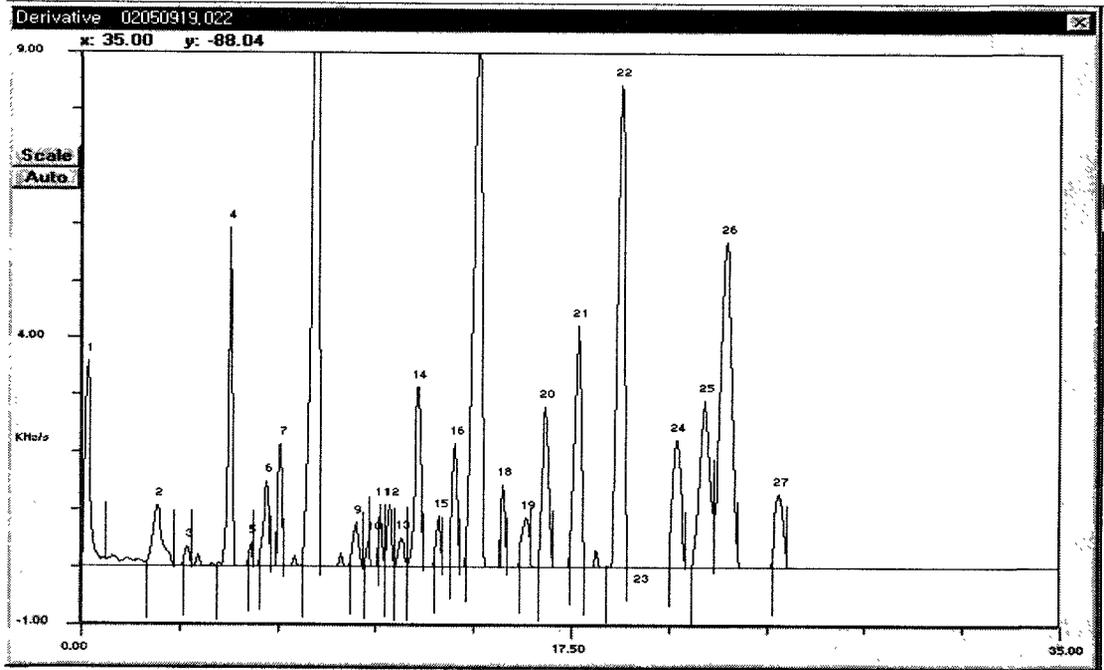


그림 10. 당귀를 GC-SAW (z-nose)로 분석한 크로마토그램.

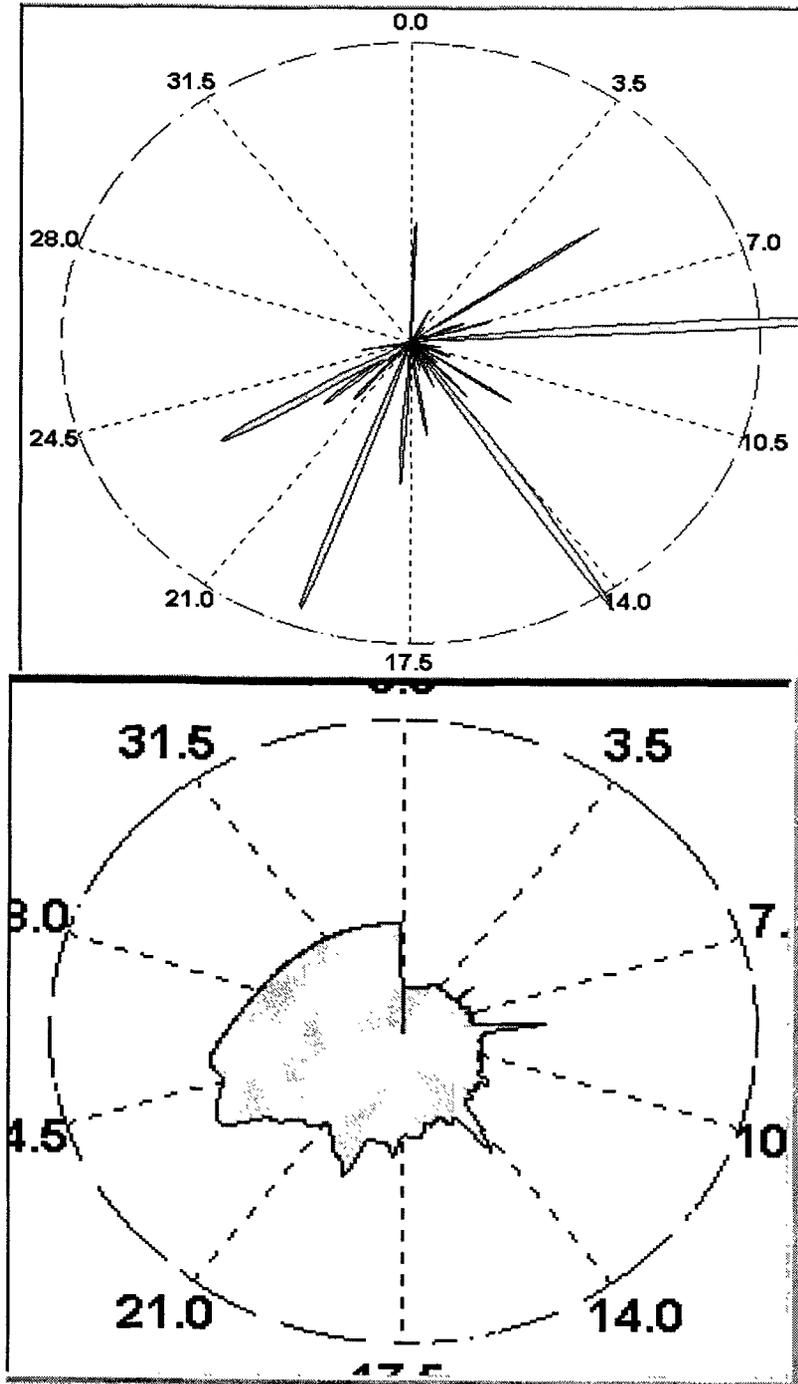


그림 11. 당귀의 크로마토그램 (그림 10)을 Vapor Print™을 이용하여 derivative pattern (상) 및 frequency pattern (하)으로 도형화.

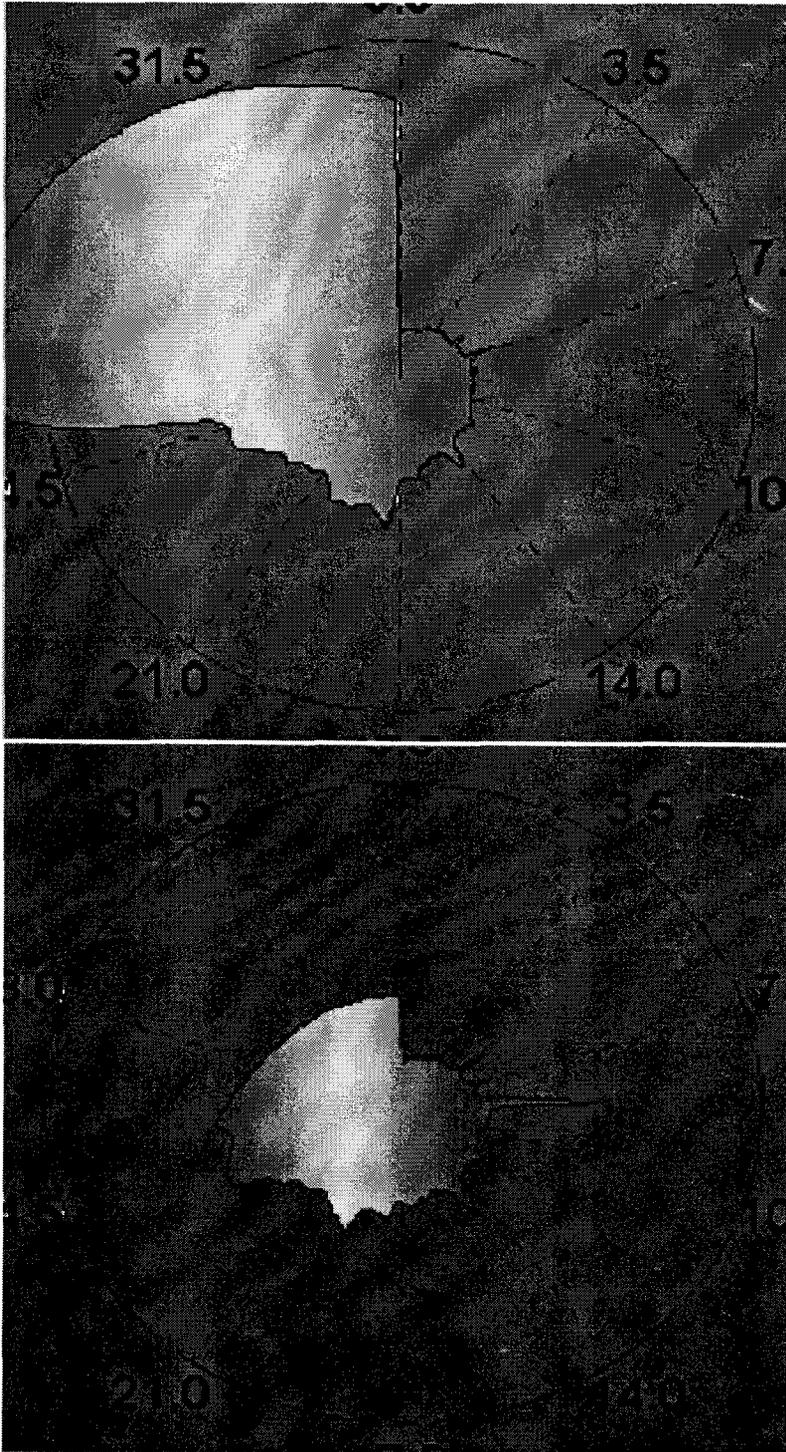


그림 12. 전자코 (z-nose)로 분석한 수입산 당귀 (상) 및 국내산 당귀 (하)의 frequency pattern 비교.

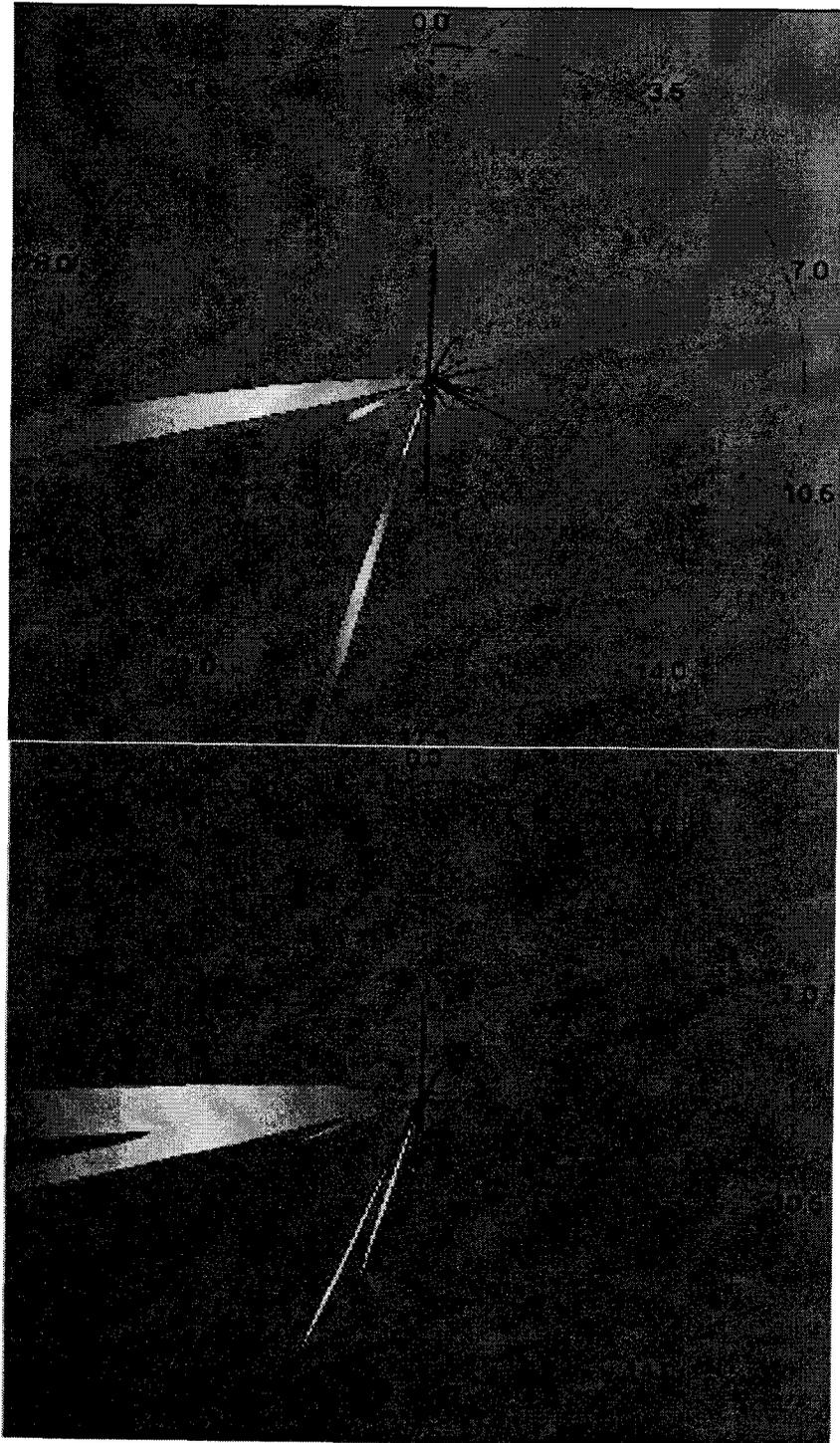


그림 13. 전자코 (z-nose)로 분석한 수입산 천궁 (상) 및 국내산 천궁 (하)의 frequency pattern 비교.

천공 시료 각각 20개를 frequency pattern으로 비교한 결과, 국내산과 수입산이 뚜렷하게 판별되어짐을 알 수 있었다 (그림 13).

작약의 경우 z-nose 크로마토그램의 패턴양상에서 약간의 차이를 보이고 있으나 천공이나 당귀처럼 뚜렷하지 못해 두 개의 retention time을 선택하여 이들 두 retention time의 peak area 비율이 상호 차이가 있음을 알 수 있었으며 이를 토대로 수입산 작약의 경우  $\frac{Rt_{6.55}}{Rt_{10.55}}$  비율값이  $3.141 \pm 1.275$ 이었고 국내산 작약의 경우는  $0.818 \pm 0.392$ 로 나타나 이를 토대로 국내산, 수입산 작약의 원산지를 판별할 수 있었다 (표 11).

표 11. 수입산 및 국내산 작약의 원산지 판별을 위한 z-nose 크로마토그램에서 두 개의 retention time에서의 peak area 비율

수입산 작약			국내산 작약		
$Rt_{6.55}$	$Rt_{10.55}$	$\frac{Rt_{6.55}}{Rt_{10.55}}$	$Rt_{6.55}$	$Rt_{10.55}$	$\frac{Rt_{6.55}}{Rt_{10.55}}$
1034	569	1.817	706	423	1.669
751	353	2.127	578	517	1.117
694	306	2.267	387	669	0.578
705	316	2.231	662	558	1.186
1013	271	3.738	460	558	0.824
1200	326	3.680	257	383	0.671
719	312	2.304	350	732	0.478
1106	220	5.027	588	552	1.065
700	366	1.912	386	639	0.604
793	344	2.305	340	425	0.800
1057	350	3.020	361	670	0.538
1365	207	6.594	61	407	0.149
710	304	2.335	475	580	0.818
1883	495	3.804	356	370	0.962
1035	313	3.306	451	520	0.867
1197	276	4.336	254	870	0.291
527	326	1.616	647	421	1.536
816	262	3.114	247	409	0.603
1162	281	4.135	584	500	1.168
			232	550	0.421
Average			Average		
$3.141 \pm 1.275$			$0.818 \pm 0.392$		

## 검정콩

최적조건을 잡기 위해 온도,  $R_{gas}$  time, 그리고 추출시간 등을 조절하여 가장 감도가 좋고 효율성이 좋은 환경을 설정하였다. 그것은 50℃의 온도에서 5분 동안 추출한 후 60초의  $R_{gas}$  time을 갖는 것이었다. 전자코 측정방의 온도는 22℃로 조정하였고 상대습도는 50~60%에서 측정하였다.

국산 검정콩 시료와 외국산 검정콩 시료는 각각 30개씩이고, 하나의 시료당 3번씩 측정된 결과는 다음과 같았다 (그림 14). 즉, 주성분 분석 결과 수입산 검정콩은 널리 분포되어 존재하는 반면 국산 검정콩은 그래프 상에서 한곳에 몰려 있음을 알 수 있다. 그러나 국산 검정콩과 수입산 검정콩이 PCA 그래프 상에서 함께 나타나 국산 검정콩과 수입산 검정콩의 원산지 판별은 전자코에 의해서는 가능하지 않다고 생각된다. 이처럼 시료에 따라서 전자코를 이용하는 것이 바람직하지 않은 경우도 있었다.

## 복령

추출온도, 추출시간, gas time 조절 결과, 온도는 40℃, gas time은 50초, 추출시간은 3분에서 가장 효율적으로 복령을 분석할 수 있었으므로 모든 복령 시료를 상기 조건하에서 분석하였다. 복령 시료를 연도별 (2001년도 국산 복령, 2002년도 국산 복령, 2001년도 수입산 복령, 2002년도 수입산 복령)로 차이를 관찰하였으며 일부 시료는 너무 딱딱하여 측정이 불가능하였다.

2001년도산 국산 복령과 수입산 복령을 전자코로 분석하여 주성분 분석을 행한 결과 그림 15에서 보는 바와 같이 일부 시료는 중복되어 판별이 어려웠다. 이에 비하여 2002년도산 복령의 경우 국산시료와 수입산 시료가 뚜렷하게 구분되는 것으로 나타나 (그림 16) 2001년도산 시료가 저장기간 동안 휘발성분이 휘발되었거나 아니면 저장방법상의 문제로 말미암아 품질의 변화를 초래하여 이취 생성량의 증가가 본래의 제품 시료에 대한 특성을 가리는 효과가 나타나지 않았나 생각된다. 앞에서 검토한 참깨의 경우 생산연도에의 차이에도 불구하고 뚜렷하게 구분할 수 있었는데 비하여 복령의 경우 2002년도산은 쉽게 원산지 판별이 가능하나 1년이 경과한 시료의 경우에는 그러하지 못하였다.

한편, metal oxide 센서를 바탕으로 한 전자코 시스템과는 별도로 GC-SAW시스템으로 구축된 전자코의 경우 그림 17에서 보는 바와 같이 크로마토그램 상에서 차이를 보여주고 있다. 각 retention time에서의 peak 성분의 양을 대변하는 hertz 값은 표 12과 같으며 국산과 수입산 복령의 휘발성분의 차이를 뚜렷하게 보여줌을 알 수 있었다.

### 외산콩과 국산콩의 비교

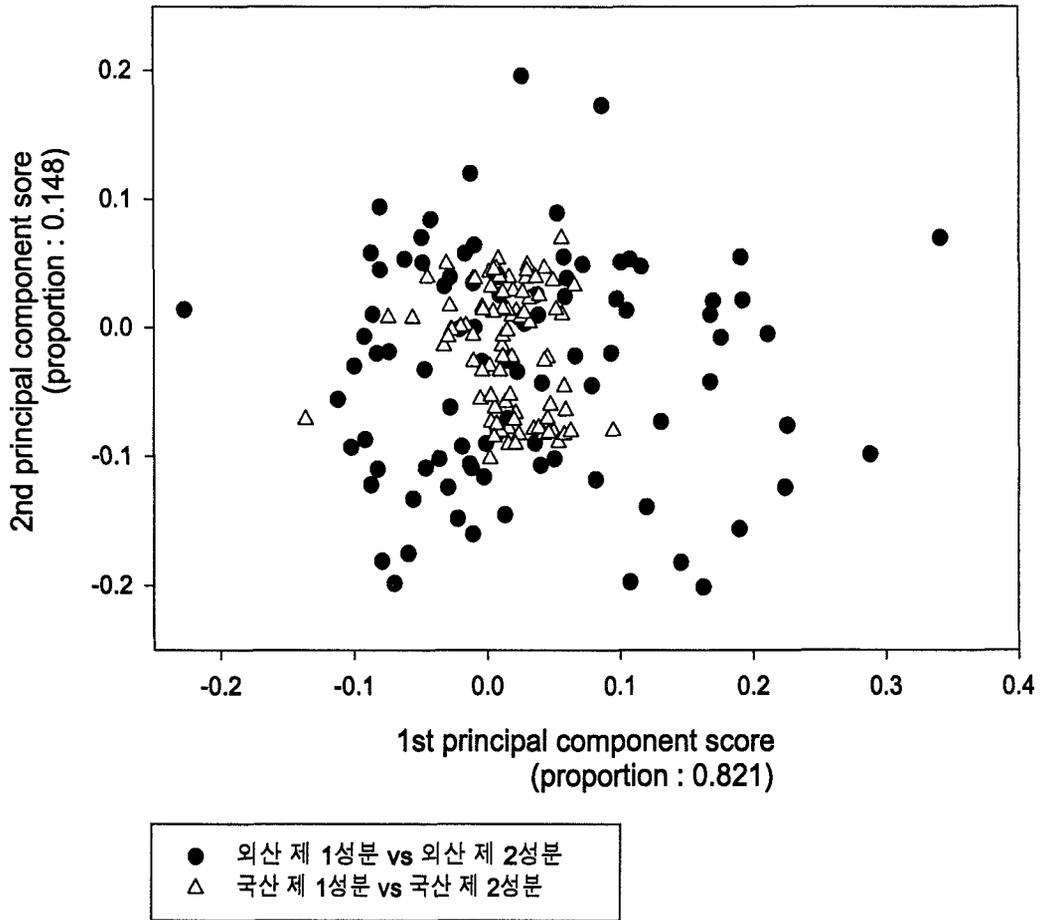


그림 14. 전자코를 이용한 국산 검정콩과 수입산 검정콩의 원산지 판별을 위한 주성분 분석.

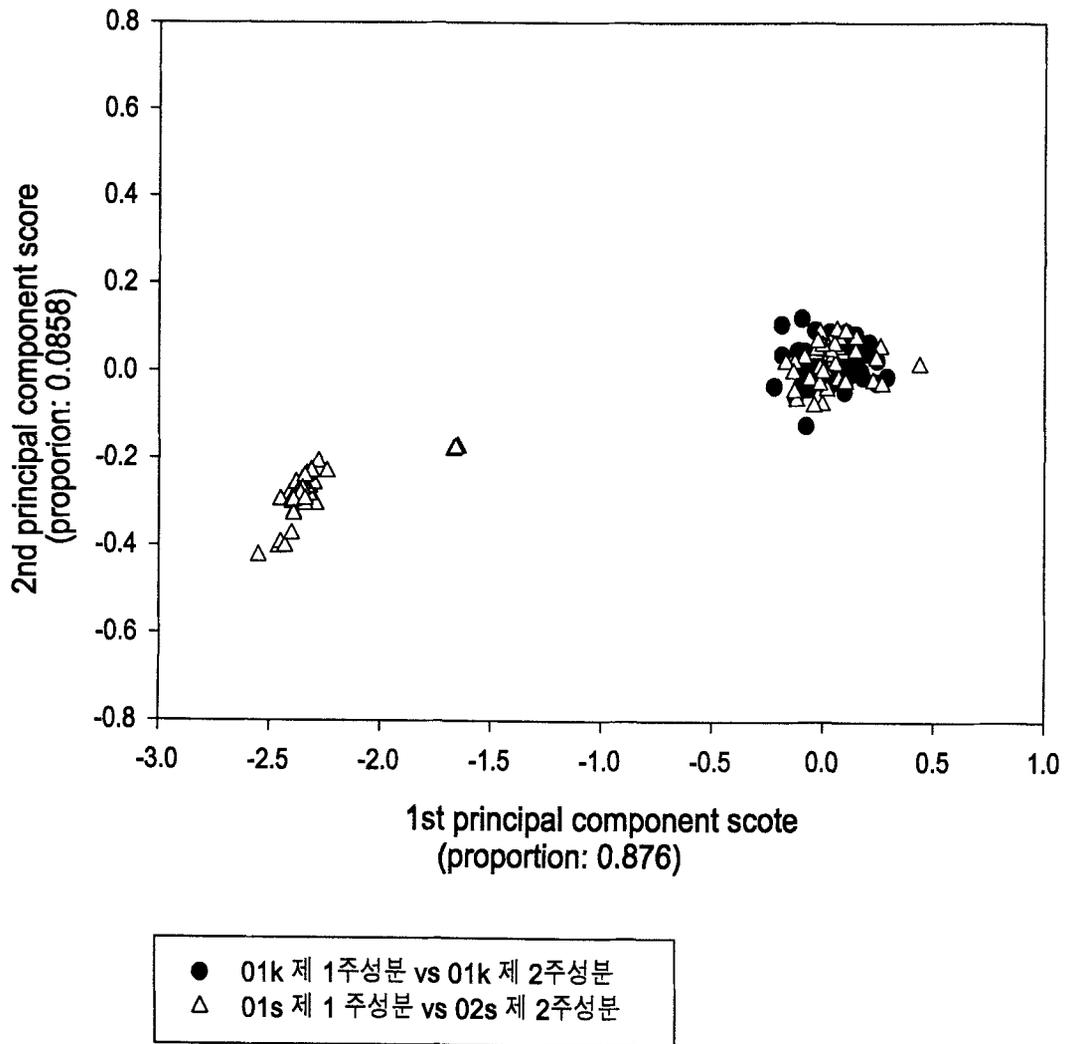


그림 15. 2001년도산 복령 시료를 metal oxide 센서를 바탕으로 한 전자코로 분석한 후 주성분 분석 (01k: 국내산, 01s, 02s: 수입산).

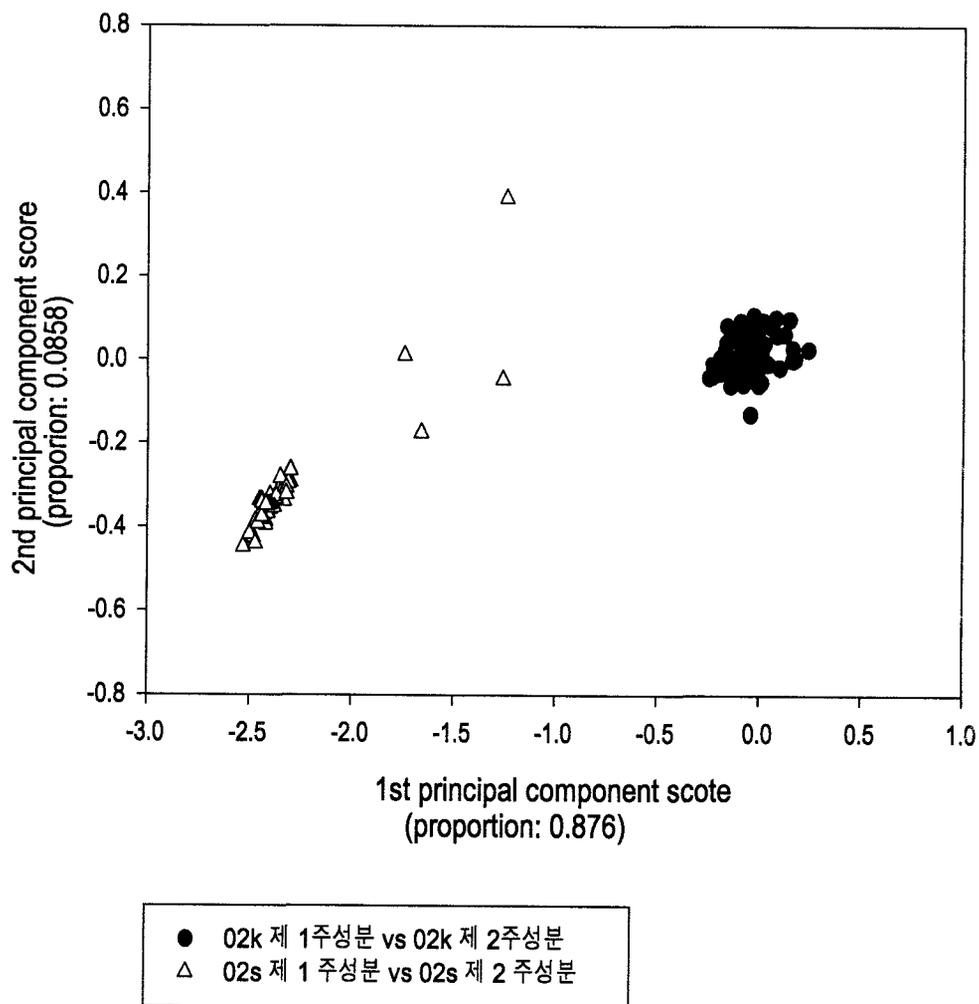


그림 16. 2002년도산 복령 시료를 metal oxide 센서를 바탕으로 한 전자코로 분석한 후 주성분 분석 (02k: 국내산, 02s: 수입산).

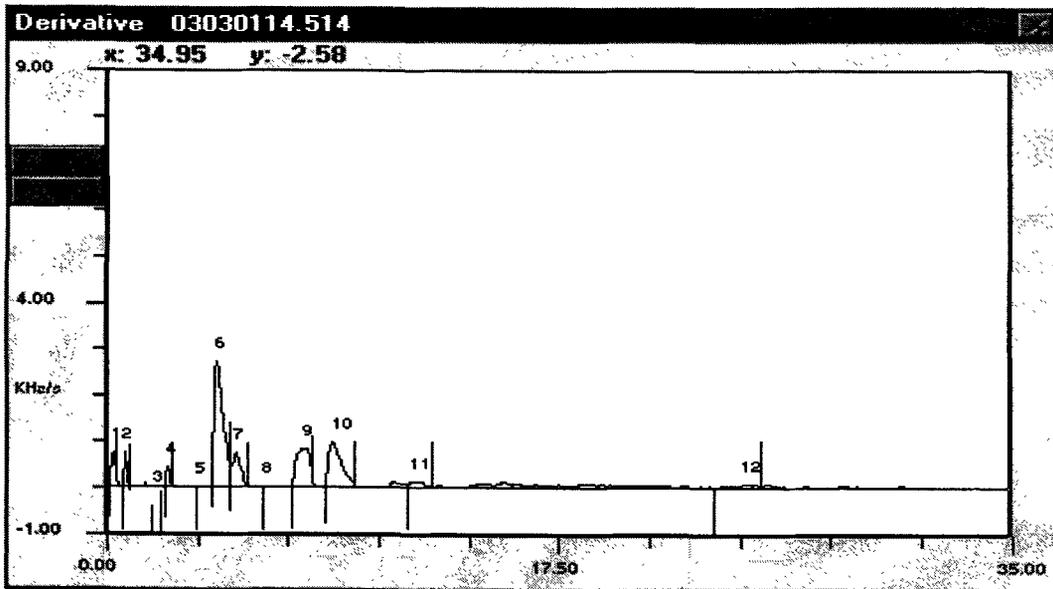
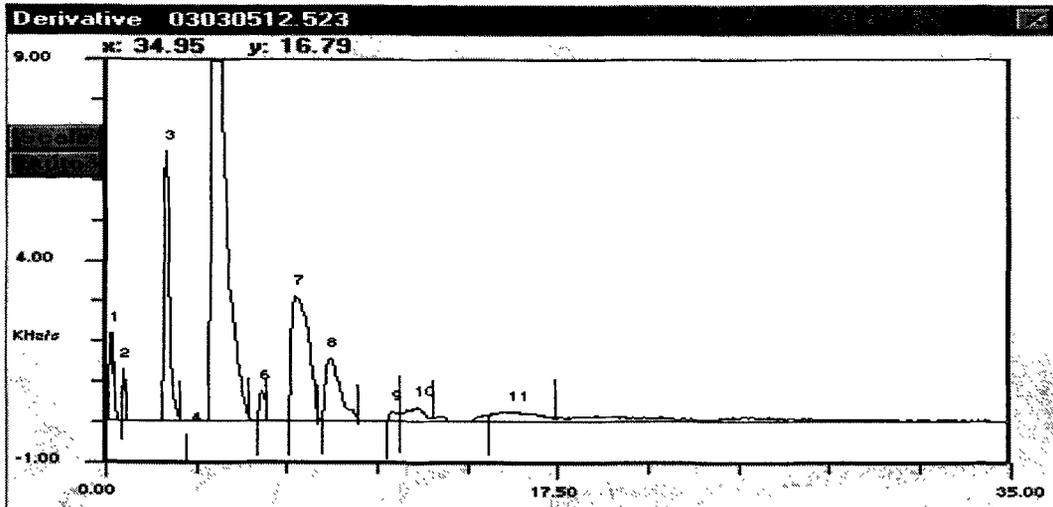


그림 17. GC-SAW를 바탕으로 한 전자코 시스템으로 분석한 원산지 판별을 위한 크로마토그램. 상: 국내산 복령, 하: 수입산 복령.

표 12. GC-SAW를 바탕으로 한 전자코 시스템으로 분석한 원산지 판별을 위한 크로마토그램에서 각 retention time별 peak의 hertz 값 비교

Retention time ( sec)	Hertz값	
	국내산 복녕	수입산 복녕
0.1	325	
0.15		124
0.6	105	61
1.8		132
2.25	1,536	61
3.30	9,667	269
4.1	10,515	972
4.9		131
6.0	194	228
7.3	2,418	
7.55		527
8.60	1,050	593
12.0	132	51
15.8	170	
24.8		52

## II. NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가 (위탁연구기관)

위탁연구책임자 : 서울대학교 이 중 용

### 1. 서 설

우리나라의 대외적 경제체제는 세계무역기구 (WTO)의 출범으로 수출과 수입의 자유화, 개방화의 경쟁적 체제로 변화하고 있다. 이로 인한 농·수·축산 상품의 무역은 불가피하게 되었으며 상품의 특성상 장시간 유통으로 인해 안전성, 품질, 신선도에 나쁜 영향을 줄 수 밖에 없고 따라서 상품의 안전성, 신선도 판정이 중요시되고 있다. 축산물 유통과정의 저장온도, 습도 등의 요소들은 육류의 안전성과 신선도에 큰 영향을 미치며 이는 육류부패의 원인이 되는 미생물의 서식환경에 영향을 준다. 육류에서 서식하는 미생물의 일부는 직접적 또는 간접적으로 독소를 생산하여 인체에 해를 끼치고 미생물 성장으로 인한 단백질의 분해와 미생물의 대사작용도 육류의 부패원인이 되고 있다.

냉장육의 경우는 냉동육과 비교 시 저장 온도 (0~4℃)가 높기 때문에 부패가 빨리 일어나고 그 소비가 늘고 있는 실정에서 안전성, 신선도 판정은 매우 중요하다 할 수 있다. 냉장육의 품질평가에 있어서 신선도는 중요한 항목이 되고 있지만, 소비자들은 단지 관능적인 방법에 의해 식육을 구입하고 있다. 그러나 이러한 방법은 심히 부패된 식육을 구별할 수 있겠지만 그 외의 경우에는 객관적인 신선도 판단을 하기는 쉽지 않다.

육류의 신선도는 일반적으로 미생물의 오염도 평가 (총세균), 지방의 산패도 평가 (thiobarbituric acid, TBA), 단백질 부패도 평가 (volatile basic nitrogen, VBN)를 통해 측정하고 있다. 근육식품은 초기 미생물수가 저장기간과 신선도에 미치는 영향이 크기 때문에 미생물을 빠르고, 정확하게 검색해야 하나 세균학적 방법은 측정에 2~3일이 소요되며 조작이 복잡하고 검사자의 숙련도에 따른 상당한 오차가 생기기 쉬워 문제점이 있다. 잣 도축된 신선육에는 없거나 적게 함유되어 있던 성분이 신선도 저하에 따라 생성되어 증가하는 물질이나 단백질의 변성을 지표로 하는 화학적 방법은 조작이 불편하고 많은 시간을 요하며 파괴적인 단점이 있다. 물리적 방법은 신속한 판정을 얻을 수 있으나 개체에 따른 정상차이가 많아 아직 일반화 된 방법은 없다. 이러한 이유로 고기의 품질을 빠르고, 정확하게 비파괴적으로 측정할 수 있는 새로운 방법이 요구되고 있다.

이에 본 연구는 근적외선 분광분석법을 이용하여 비파괴적이며 객관적으로 쇠고기의 신선도를 측정할 수 있는 센서를 개발하기 위해 수행되었다.

## 2. 연구개발 방법 및 결과

### 가. 신선도 및 저장상태의 지표 구명

#### 1) 도체의 신선도 지표 구명

가) 세균학적 판정법: 식육에 부착된 미생물 수를 측정함으로써 선도를 판정하는 방법으로서 측정에 2~3일이 소요되고, 조작이 복잡하며, 결과에 상당한 오차가 생기기 쉬운 현장에서 사용하기 어려운 방법이다.

이 판정법의 종류에는 ATP (adenosine triphosphate)의 측정을 이용하는 방법, impedance와 conductance를 이용하는 방법, 방사성과 열량의 측정을 이용하는 방법, LAC (limulus amoebocyte lysate)와 catalase 측정을 이용하는 방법, 항원에 따른 항체의 형성에 근간을 둔 방법, DNA/RNA probes를 이용하는 방법 등이 있다.

그림 1, 2, 3, 4는 0°C와 4°C로 저장되는 쇠고기와 돼지고기에 대한 미생물 수와 전기전도도 사이의 관계를 보여준다.

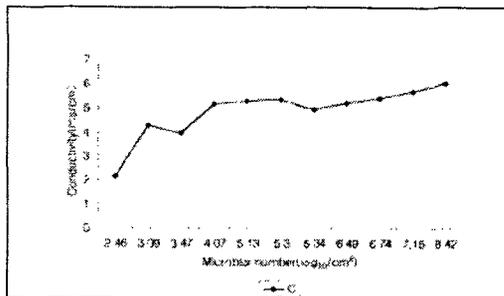


Fig 1. Relation between microbial number and electric conductivity in beef at 0°C

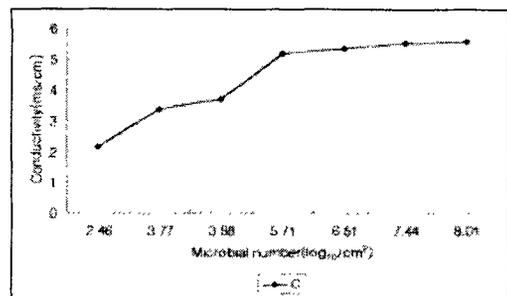


Fig 2. Relation between microbial number and electric conductivity in beef at 4°C

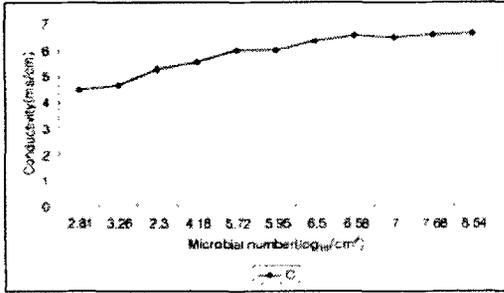


Fig 3. Relation between microbial number and electric conductivity in pork at 0°C

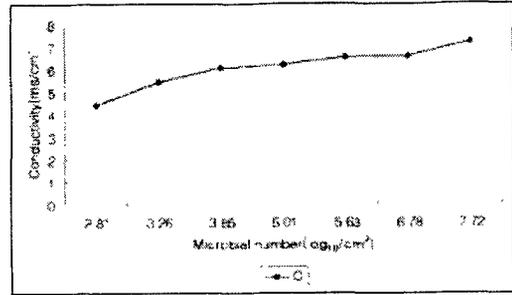


Fig 4. Relation between microbial number and electric conductivity in pork at 4°C

나) 물리적 판정법: 신속한 판정결과를 얻을 수 있는 장점을 지니면서도 품종 또는 개체에 따른 성상차이가 많아 아직 일반화 된 방법은 없다.

다) 화학적 판정법: 기존에는 수산물 위주로 연구되었으며, 종류로는 신선육에는 없거나 적게 함유되어 있던 것이 선도저하에 따라 생성되어 증가하는 물질을 지표로 하는 방법, 단백질의 변성을 지표로 하는 방법, pH 값에 의하는 방법 등이 있다.

그림 5, 6, 7, 8은 쇠고기와 돼지고기에서 biogenic amine 증가에 따른 미생물 수준의 변화를 나타낸다.

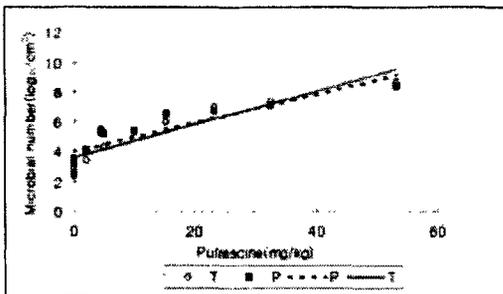


Fig 5. Linear regression curves of putrescine content and number of total plate count, psychrotrophs in beef at 0°C.

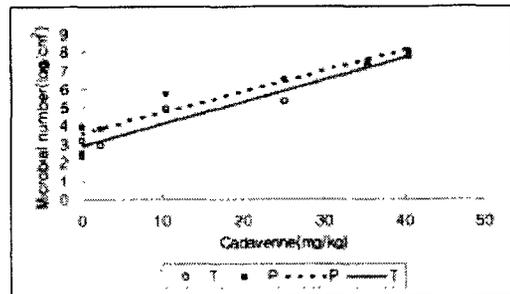


Fig 6. Linear regression curves of cadaverine content and number of total plate count, psychrotrophs in beef at 4°C.

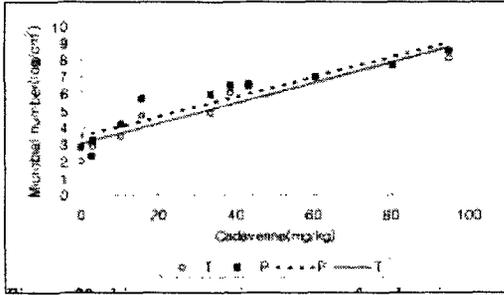


Fig 7. Linear regression curves of cadaverine content and number of total plate count, psychrotrophs in pork at 0°C.

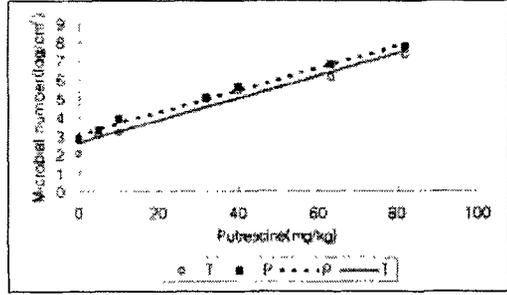


Fig 8. Linear regression curves of putrescine content and number of total plate count, psychrotrophs in pork at 4°C.

## 2) 도체의 저장상태 지표 구명

신선육과 육가공품의 품질과 기호성, 보존성, 위생적 측면에서 육류의 신선도 판정은 매우 중요하고 육과 육제품은 각 가축의 종류, 성, 개체, 연령 등 여러 가지에 따라서 영향을 받는 복잡한 구조와 조성을 갖는 것으로, 한가지의 선도 측정방법이 절대적으로 옳다고 말하기 어렵다. 저장상태 구명을 위한 여러 지표 조사는 다음과 같다 (그림 9, 10).

### 가) 전기 전도도의 변화

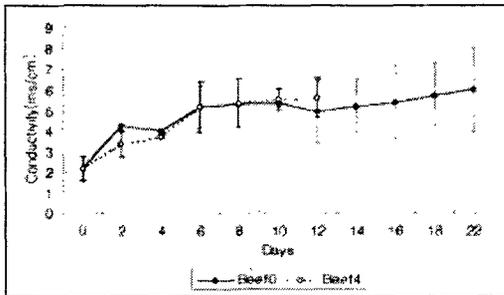


Fig 9. Change of electric conductivity of beef during storage at 0°C and 4°C

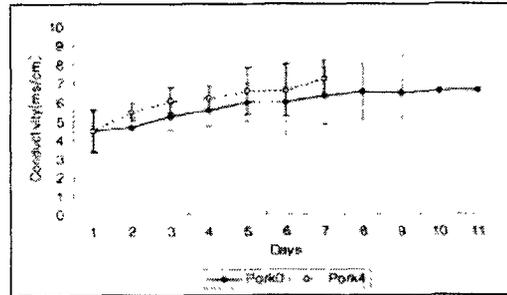


Fig 10. Change of electric conductivity of pork during storage at 0°C and 4°C

나) Biogenic amines (polyamines)

그림 11, 12, 13, 14는 0℃, 4℃의 호기성 대기 저장조건에서 biogenic amine으로서 putrescine, histamine, cadaverine, tyramine과 저장기간과의 관계를 나타낸다.

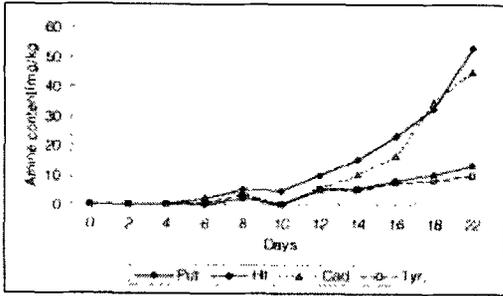


Fig 11. Change of polyamine content in beef during storage at 0℃ under aerobic atmosphere

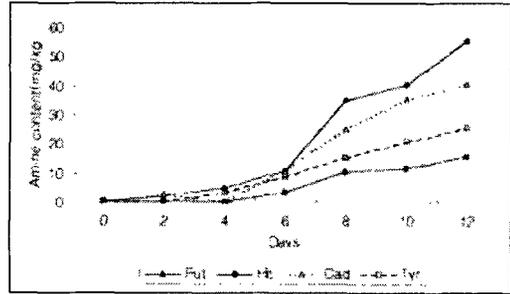


Fig 12. Change of polyamine content in beef during storage at 4℃ under aerobic atmosphere

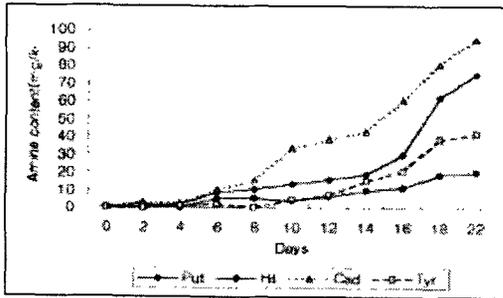


Fig 13. Change of polyamine content in pork during storage at 0℃ under aerobic atmosphere

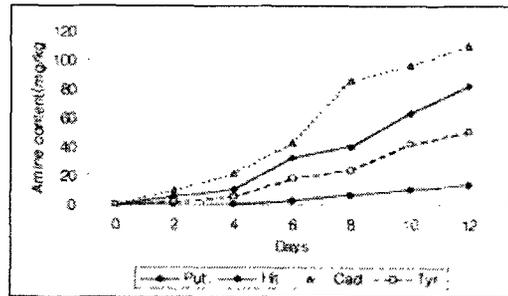


Fig 14. Change of polyamine content in pork during storage at 4℃ under aerobic atmosphere

다) D-Glucose와 L-lactate의 변화

그림 15, 16, 17, 18은 0℃, 4℃의 호기성 대기 저장조건에서 D-glucose와 L-lactate의 저장기간과의 관계를 나타낸다.

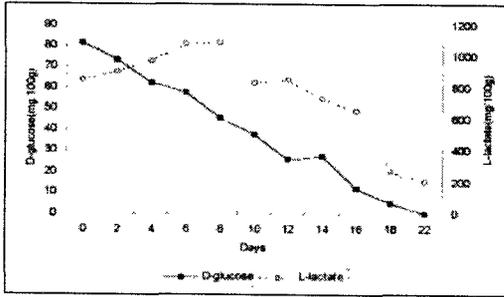


Fig 15. Changes of D-glucose and L-lactate content in beef during storage at 0℃ under aerobic atmosphere

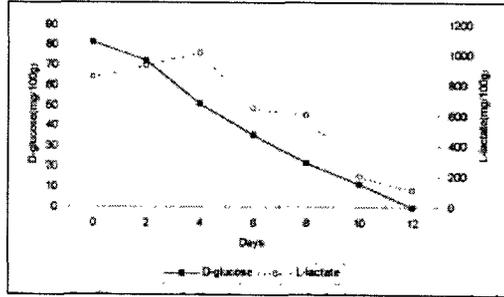


Fig 16. Changes of D-glucose and L-lactate content in beef during storage at 4℃ under aerobic atmosphere

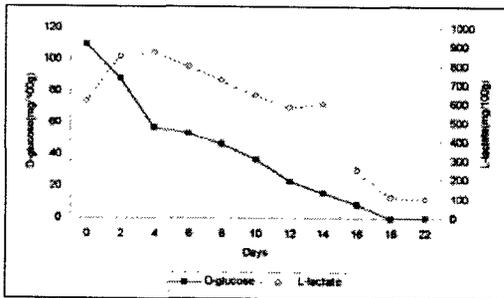


Fig 17. Changes of D-glucose and L-lactate content in pork during storage at 0℃ under aerobic atmosphere

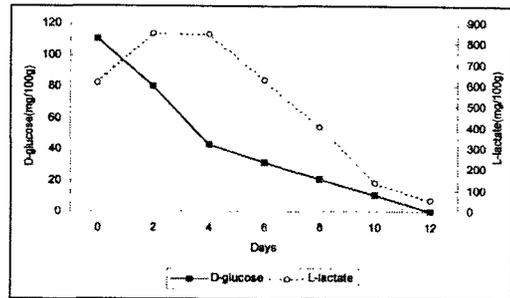


Fig 18. Change of D-glucose and L-lactate content in pork during storage at 4℃ under aerobic atmosphere

그림 19, 20, 21, 22는 0℃, 4℃의 저장조건에서 D-glucose, L-lactate, pH, putrescine 과 cadaverine의 저장기간과의 관계를 나타낸다.

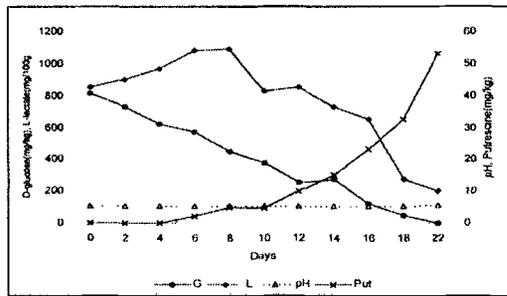


Fig 19. Relations between D-glucose, L-lactate and pH, putrescine in beef at 0℃

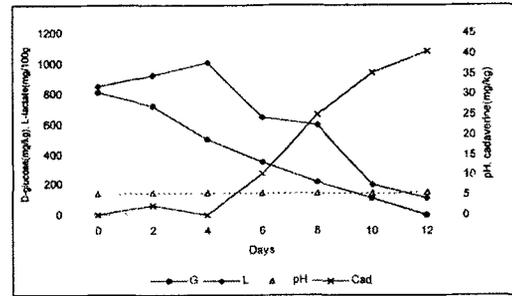


Fig 20. Relations between D-glucose, L-lactate and pH, cadaverine in beef at 4℃

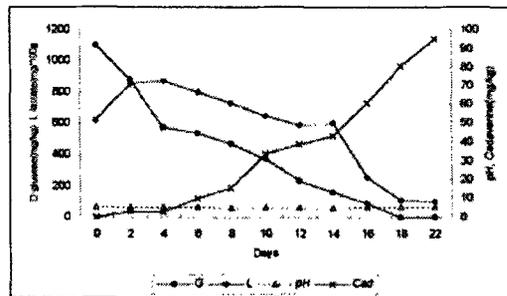


Fig 21. Relations between D-glucose, L-lactate and pH, cadaverine in pork at 0℃

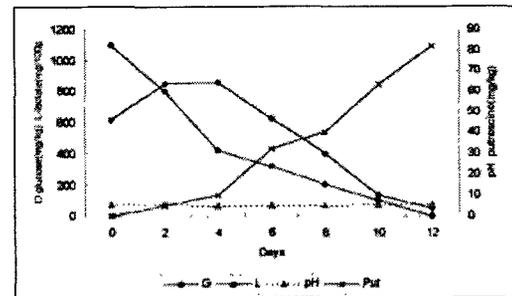


Fig 22. Relations between D-glucose, L-lactate and pH, putrescine in pork at 4℃

라) VBN (volatile basic nitrogen, 휘발성 염기태 질소)

육고기는 변패가 진행됨에 따라 단백질이 아미노산과 그 외 무기태 질소로 분해되는데, VBN 측정방법은 단백질 중의 질소량을 측정하는 방법이다. 가축이 도살된 후 육 중에서는 여러 가지 변성이 시작되는데, 단백질의 가수분해가 중요한 반응이고, 단백질의 변화에는  $\alpha$ -line의 약화, troponin T의 분해산물인 30,000 dalton의 출현, 유리아미노산과 oligopeptide의 증가, 수용성의 비단백태 질소화합물의 증가 등이 있다. VBN은 저장기간에 따라 선형에 가까운 증가를 보이며 VBN이 30 mg (%) 이하이면 생육은 부패하지 않았다고 할 수 있는데, 축산물의 가공기준 및 성분규격 (2001.1.4)에 따르면 식육가공품은 원료육 및 포장육에 한해 VBN이 20 mg (%) 이하여야 한다고 규정하고 있다. VBN

은 현재 선도측정을 위해 일반적으로 사용되고 있는 방법이며, 측정방법은 다음과 같다.

- ① 세절육 5g을 vortex beaker에 넣고 증류수 90 ml를 가하여 14000 rpm에서 5분간 homonizing 한다.
- ② 균질액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한다.
- ③ 여과액 1 ml를 취하여 Conway unit의 외실에 넣고, 내실에 0.01 N 붕산 1 ml와 지시약 3방울을 넣은 후 빨리 뚜껑을 닫는다.
- ④ 뚜껑을 미끄러지게 열고, 외실에 50%  $K_2CO_3$  1 ml를 재빨리 주입 후 바로 밀폐한다.
- ⑤ 용기를 수평으로 회전하여 외실의 sample과  $K_2CO_3$ 가 섞이게 한다. 이때 내실의 붕산과 지시약이 외실의 sample과  $K_2CO_3$ 가 섞이게 한다. 이때 내실의 붕산과 지시약이 외실의 sample과  $K_2CO_3$ 와 섞이지 않게 한다.
- ⑥ 37°C의 incubator에서 120분간 활성화시킨다.
- ⑦ 뚜껑을 조심스럽게 열고 붕산용액을 0.02N-  $H_2SO_4$ 로 신속히 적정한다.
- ⑧ 공시험구는 외실에  $K_2CO_3$ 를 가하지 않은 것의 적정치이다.
- ⑨ 공시험구와 본시험구의 적정결과는 옅은 pink색을 나타낼 때이다. 실험을 통하여 얻은 적정치를 계산식에 대입하여 최종치를 얻었다. 계산식은 다음과 같다.

$$mg\% (mg/100g \text{ 시료}) = \frac{(a-b) \times F \times 28}{\text{sample의량}} \times 100 \quad - (1)$$

where, a: 본 실험 적정치 (ml) b: 공실험 적정치 (ml) F: 0.02N-  $H_2SO_4$  표준화지수  
28: 0.02N-  $H_2SO_4$  1 ml 소모하는데 필요한 N의 양 ( $0.02 \times 1.4 \times 1000$ )

마) K식

생선의 선도를 결정하는 요인은 자기분해 (자기소화)와 부패의 2가지가 있다고 할 수 있다. 여기서 부패 이전에 생선의 선도정도를 아는 수단으로서 어육의 자기소화의 과정을 보기 위한 지표로서 K식이 제안되어 있다. 생선의 근육에는 ATP (아데노신 3인산)라고 하는 에너지 축적물이 있고, 생선이 죽은 후 ATP가 분해돼 근육을 수축시켜 사후경직이 시작된다. 경직에서 연화가 시작되면 ATP는 거의 없어져 맛의 중요한 요소인 IMP (이노신산)는 최대로 되고, 여분의 IMP 양이 감소돼 인노신 (HxR)이란 쓴맛을 나타내는 포키산친 (Hx)이 증가된다. K식은 이상의 경로로 분해되는 근육중의 ATP 관련 화합물을 측정하고 다음의 계산식으로 산출한다.

$$K(\%) = \frac{(HxR + Hx)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)} \times 100 \quad - (2)$$

이 K식의 유용성에 대해서는 현재까지 큰 연구업적이 나타나고 있다. 그런데 사후경직 후의 생선 근육에는 ATP, ADP, AMP가 아주 적은 양밖에 존재하지 않는다. 이 때문에 IMP, HxR과 Hx를 측정해 근사적인 K식을 구할 수 있다. 이 식은 K식과 좋은 상관관계를 얻을 수 있다는 보고가 있다 (Mulchandani 등, 1989). 또 어류 이외는 AMP에서 IMP로 효소계가 깨어질 가능성은 적기 때문에 AMP가 측정된다. ATP 분해량을 측정하여 선도를 측정하는 방법은 어육 이외에도 현재 일반적인 선도측정 방법이며, 다음과 같은 fish & meat 신선도 측정용 kit를 이용하여 측정하였다.

(1) 측정에 사용된 fish & meat 신선도 측정용 kit

그림 23은 신선도 측정 kit의 모습이며, F-Ⅲ 시약, 선도시험지-Ⅲ로 구성되어 있다. 선도시험지-Ⅲ는 HxR과 Hx를 측정할 시험지와 AMP와 IMP를 측정하는 시험지의 2종류를 사용해 K값을 측정한다. K식의 분자측에 있는 HxR과 Hx의 함량을 측정할 시험지에 2개의 효소 (nucleoside phosphorylase, XOD)와 산화 환원색소를 흡착 고정시킨다. 그림 24는 선도시험지-Ⅲ의 모습이다.

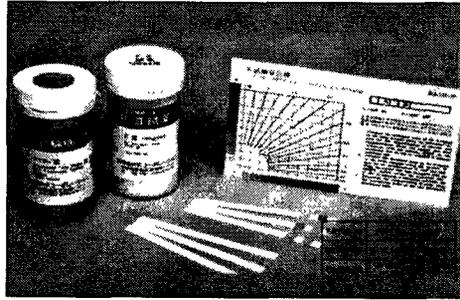


Fig 23. Fish & meat freshness kit

	A		B	
--	---	--	---	--

Fig 24. Freshness test paper (A = HxR, Hx B=AMP, IMP)

(2) 신선도 측정용 kit를 이용한 측정방법 (그림 25)

① 검체 채취 (0.2~0.5g)	② F-III 시약을 첨가한다 (채취량의 10배정도)	③ 검체를 분쇄한다 (Homogenizer 아니면 손으로 비벼서 으갠다)
④ 분쇄한 용액을 선도시험지-III에 적신다	⑤ 선도시험지-III를 투명한 랩에 덮어 가볍게 눌러 실온에 10분정도 둔다.	⑥ 발색한 선도 시험지-III를 K-value 환산색표로 색을 비교해 신선도를 측정한다.

Fig 25. Freshness measurement method using K value

### (3) 시험지의 분석 및 K값의 산출방법

Nucleoside phosphorylase는 Hx를 XOD에 의해 요산으로 분해하며, 산화환원 색소는 Hx가 요산으로 분해될 때 환원되어 발색한다. 이 발색의 농도로 HxR과 Hx를 정량적으로 측정할 수 있고, 이 반응에서 발색된 색소의 농도는 시료 중의 HxR과 관련하여, Hx의 농도가 높으면 색은 진하고 농도가 낮으면 색은 옅게 된다. K식에서 분모의 한성분인 AMP와 IMP를 측정할 시험지는 AMP-deaminase, IMP 탈수소효소, 보조효소, 산화환원 색소와 색소의 환원을 촉매한 효소를 여과지에 흡착, 건조시킨다. 보조효소 (NAD) 존재아래 IMP를 키산치루산에 분해하고 동시에 NAD를 환원해 NADH를 생성시킨다. 이 생성 NADH는 지아휘라아제의 작용으로 산화환원 색소를 환원해 색소를 발색한다. 이 발색의 농도로 AMP와 IMP를 정량으로 나누게 된다. 이 반응에서 발색한 색 농도는 시료중의 AMP와 IMP 농도가 높으면 색은 진하고 농도가 낮으면 옅게 된다.

K값의 측정은 2종류의 시험지를 사용해서 K식의 분자인 HxR과 Hx의 함량에 이를 분모성분인 AMP와 IMP의 함량을 별도로 측정해 분모를 HxR, Hx, IMP와 AMP의 함량으로 나누어서 K값을 산출한다.

3) NIR의 저과장대를 이용한 신선도 지표 계측 가능성 평가

앞의 결과를 토대로 증류수에 Sigma사에서 제조된 putrescine (순도 98%), cadaverine (순도 97%), histamine (순도 99%), tyramine (순도 99%), D-glucose (순도 95%), L-lactate (순도 95%)를 농도별 5단계로 희석하여 농도에 따른 NIR spectrum과의 상관관계를 분석하였다. 서울대학교 농업과학공동기기센터의 400~2500 nm 영역의 파장을 생성하는 NIR 분광분석기 (model 6500, NIRSystems, Inc., USA)를 이용하여 투과도를 측정하였으며, 측정에 사용된 시료별 농도는 표 1 과 같다.

Table 1. Concentration of biogenic amines

Biogenic amine	Concentration
L-Lactate	250, 500, 750, 1000, 1250 (mg/100g)
D-Glucose	20, 40, 60, 80, 100 (mg/100g)
Putrescine	15, 30, 45, 60, 75 (mg/kg)
Tyramine	
Cadaverine	
Histamine	

Cadaverine을 제외한 모든 NIR spectrum은 그림 26과 같았고, cadaverine의 spectrum은 그림 27와 같았다. 각각에 대한 상관분석을 수행하여 그림 28, 29, 30, 31, 32, 33에 나타내었다. 저 과장대의 NIR 분광분석기의 사용을 위한 시료의 상관분석 결과를 표 2에 나타내었다.

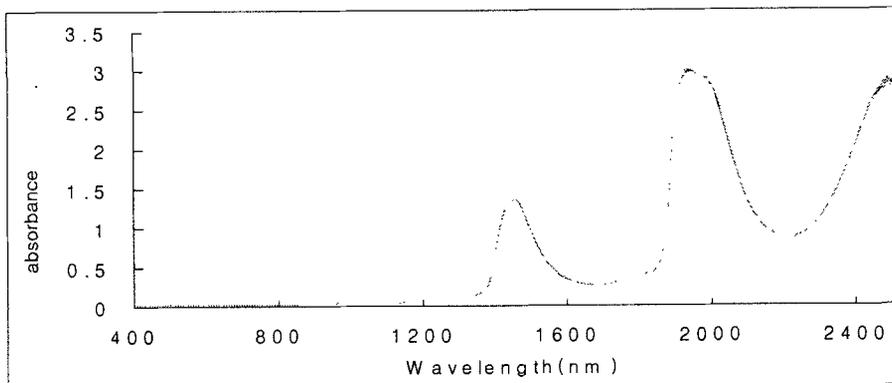


Fig 26. NIR spectra of samples except cadaverine

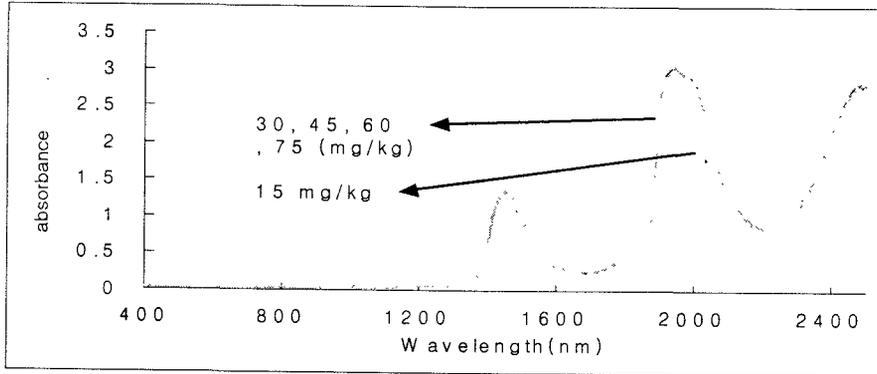


Fig 27. NIR spectra of cadaverine

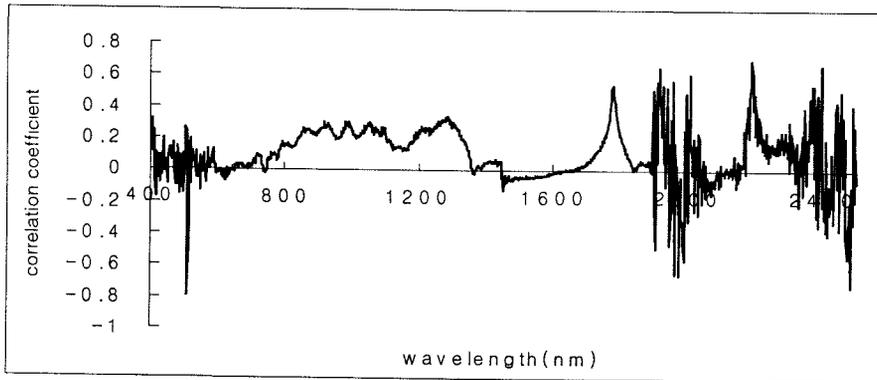


Fig 28. Correlation coefficient graph of putrescine

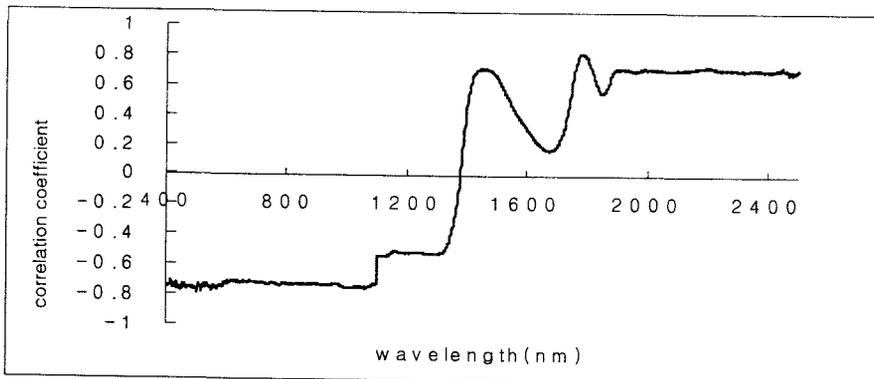


Fig 29. Correlation coefficient graph of cadaverine

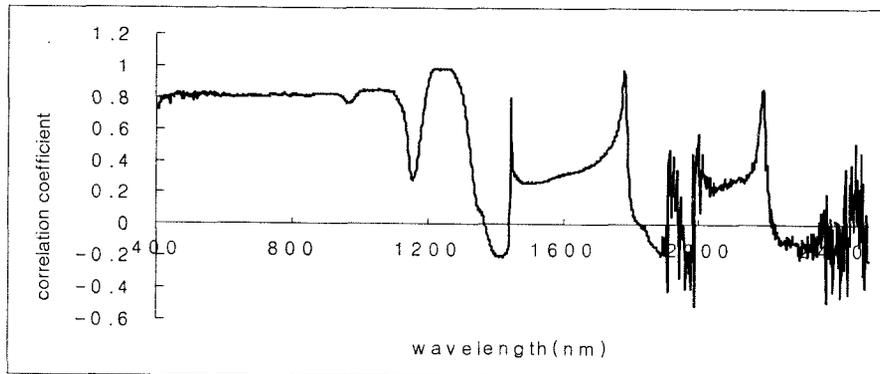


Fig 30. Correlation coefficient graph of tyramine

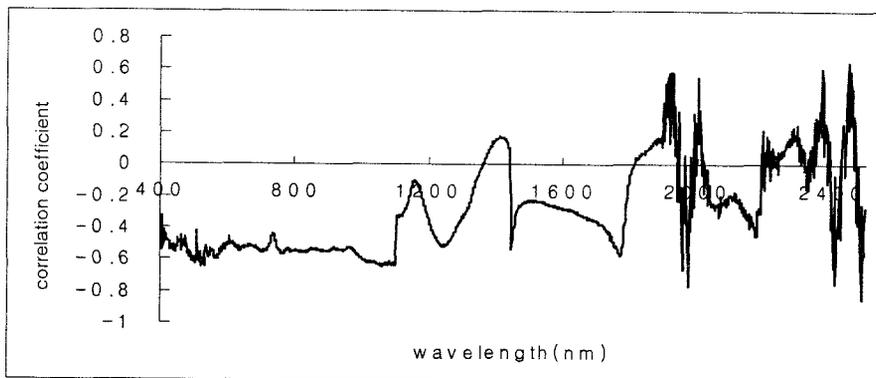


Fig 31. Correlation coefficient graph of histamine

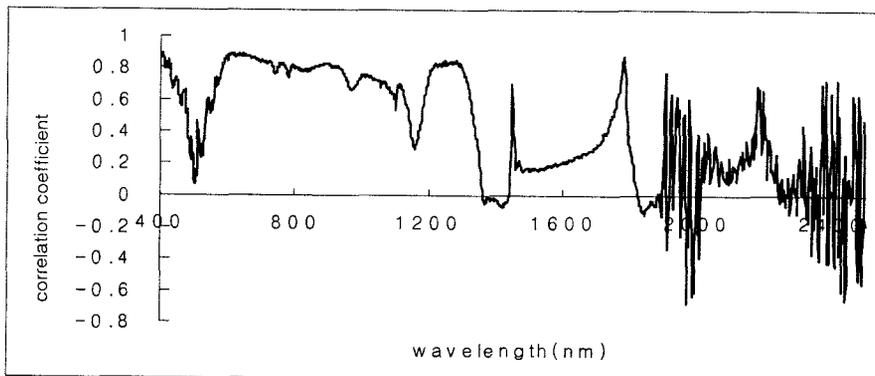


Fig 32. Correlation coefficient graph of D-glucose

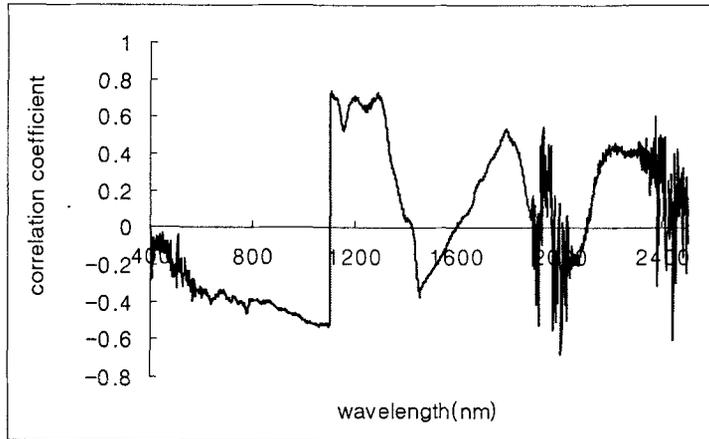


Fig 33. Correlation coefficient graph of L-lactate

표 2에서와 같이 600, 1100 및 1250 nm의 NIR 파장을 이용하여 신선도를 계측 가능함을 보여 주었다.

Table 2. Peak wavelength and correlation coefficients of samples

시료명	Peak wavelength (nm)	Correlation coefficient
Cadaverine	1800	0.8
D-Glucose	600	0.9
Histamine	2400	0.6
L-Lactate	1100	0.7
Putrescine	2200	0.7
Tyramine	1250	1

4) NIR의 저파장대를 이용한 저장상태 지표 계측 가능성 평가

위의 기초 실험결과에 근거하여 저파장대의 NIR을 이용하여 저장상태 지표 계측 가능성을 평가하기 위해 VBN 및 K값 측정의 결과와 상관분석 하였다. 사용된 시료는 도축 후 2일 경과된 쇠고기 등심 1등급이며, 냉장육이 일반적으로 저장되는 4℃로 2주간의 저장 중 VBN은 농촌진흥청 축산기술연구소에 의뢰하여 분석하였으며, 신선도 kit를 사용하는 신선도 실험은 농공학과 내 물성실험실에서 분석하였다. VBN 및 K값의 측정결과는 표 3과 4에 나타내었다.

Table 3. VBN by storage days

측정항목	저장일자	시료 1	시료 2
VBN (mg%)	2일	6.19	6.62
	4일	6.26	6.90
	7일	6.79	7.07
	9일	6.98	7.08
	11일	7.82	7.86
	13일	8.69	8.66

Table 4. K value by storage days

측정항목	저장일자	시료 1	시료 2
K값	2일	11%	15%
	4일	11%	17%
	7일	25%	27%
	9일	27%	27%
	11일	29%	25%
	13일	45%	45%

가) NIR spectrum 측정

측정에 사용된 NIR spectrophotometer는 그림 34, 35, 36, 37과 같으며, 사양은 표 5와 같다.

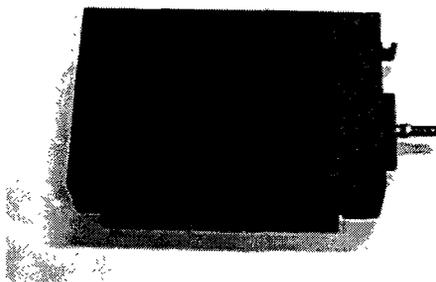


Fig 34. Picture of Spectrograph

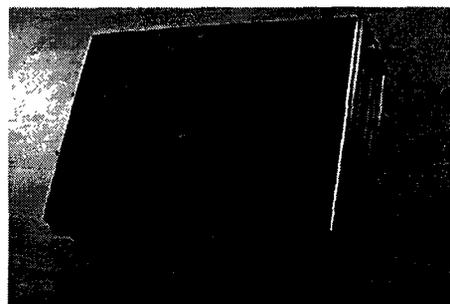


Fig 35. Picture of light source

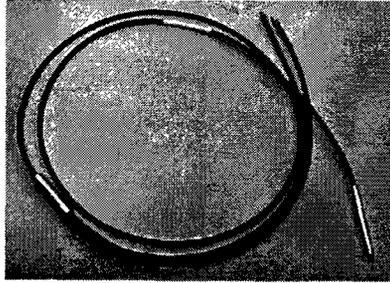


Fig 36. Probe

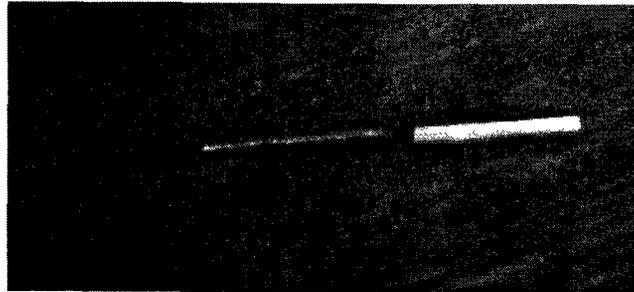


Fig 37. Probe holder

Table 5. Specification of NIR spectrograph

Item	Specification
Wavelength range	900~1700 nm (standard InGaAs)
Wavelength stability	less than 0.05 nm over 48 hr
Spectral dispersion	3.125 nm/pixel (standard InGaAs)
	5.0 nm/pixel (extended InGaAs) custom dispersions available
Spectral bandwidth	6.0 nm, custom bandwidth available
Signal to noise	typ. 32000 : 1
Outputs	modular connector: trigger, two strobes, light source shutter control and two fiber optic switch controls

나) NIR spectrum과 VBN, K값과의 상관관계 분석

육류의 저장기간에 따른 NIR spectrum은 그림 38과 39에 나타내었다. 획득된 NIR spectrum과 신선도의 지표로서 사용되는 VBN 및 K값에 대한 상관분석을 수행하여 그림 40과 41에 나타내었다. 분석결과는 그림 40과 41에서 보는 바와 같이 신뢰할 만한 결과를 얻지 못하였다.

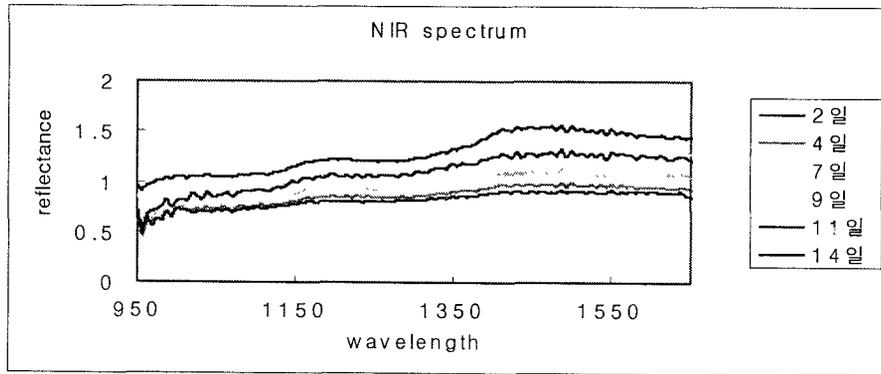


Fig 38. NIR spectrum (sample 1)

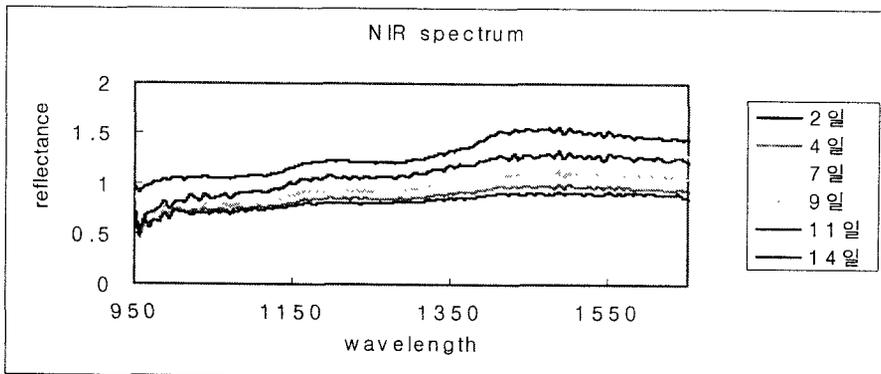


Fig 39. NIR spectrum (sample 2)

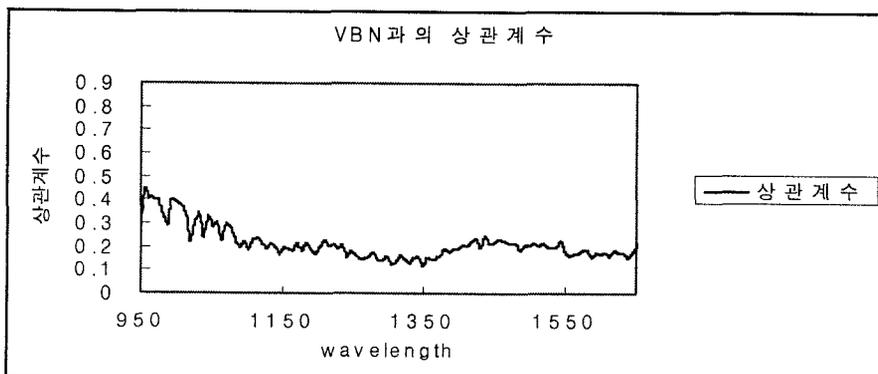


Fig 40. Correlation with VBN

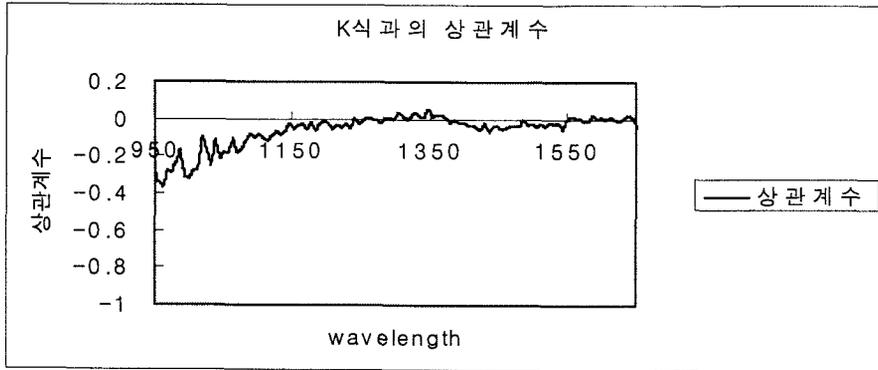


Fig 41. Correlation with K value

Data의 전처리 과정으로 spectrum을 평균 (averaging)한 후 1차 미분을 수행하였다  
1차 미분된 결과는 그림 42와 43에 나타내었다.

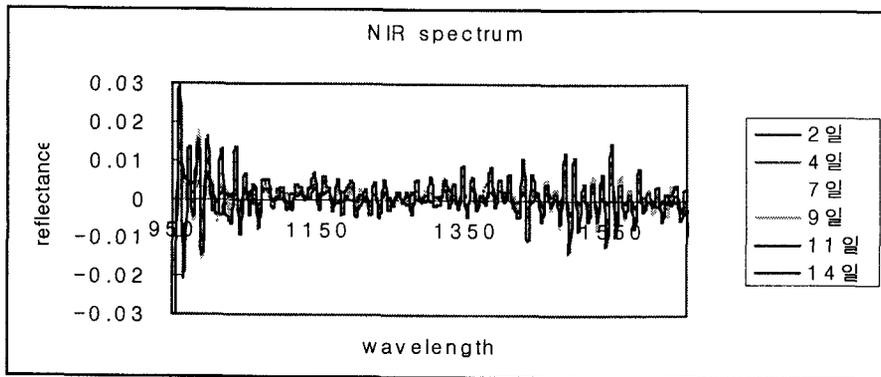


Fig 42. 1st degree differential NIR spectrum(Sample 1)

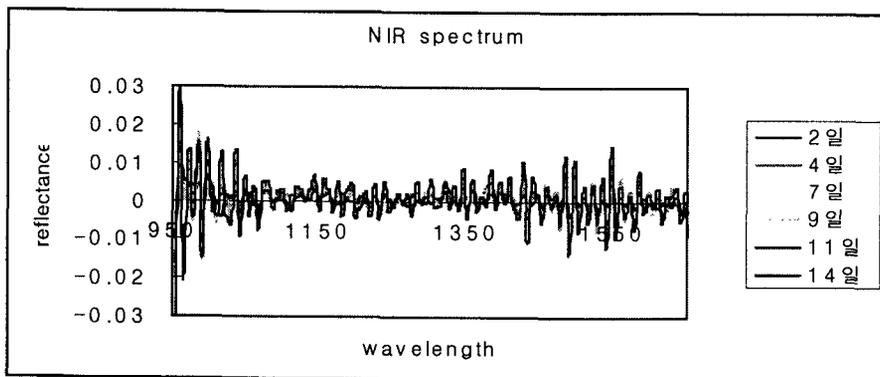


Fig 43. 1st differential NIR spectrum (Sample 2)

VBN 및 K값과의 상관분석 결과는 그림 44와 45에 나타내었고, VBN의 경우 1059~1063 nm에서 0.92~0.95, 1066~1070 nm에서 0.90~0.92, 1551 nm에서 0.94의 높은 상관관계를 보였으며 K값의 경우 1059~1063 nm에서 0.85~0.93, 1066~1070 nm에서 0.91~0.94, 1551 nm에서 0.93의 높은 상관관계를 보였다.

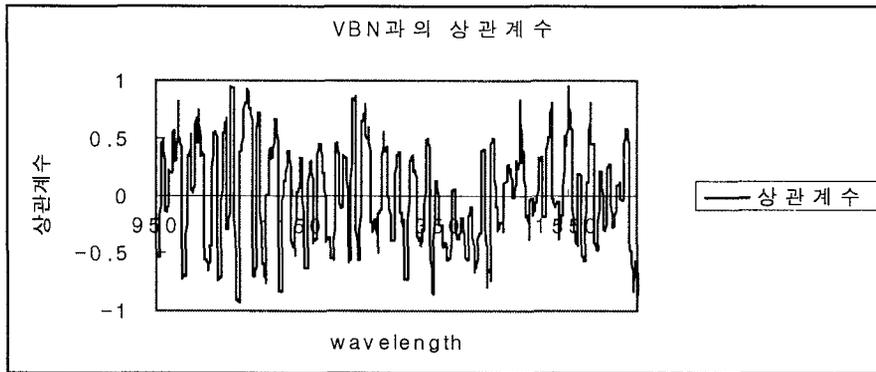


Fig 44. Correlation between 1st differential NIR spectrum and VBN

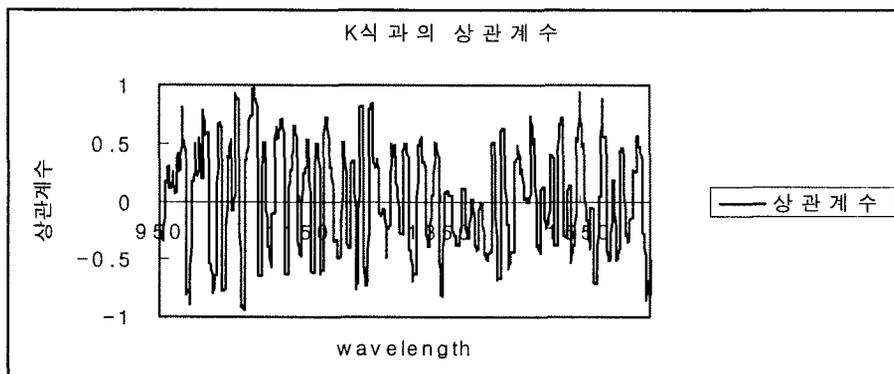


Fig 45. Correlation between 1st differential NIR spectrum and K value

시료 1과 2의 2차 미분된 spectrum은 그림 46와 47에 나타내었으며, VBN 및 K값과 상관분석을 수행하였다. 그 결과는 그림 48과 49에 나타내었고, VBN의 경우 1061~1066 nm에서 0.94~0.97, 1327~1328 nm에서 0.9의 상관계수를 보였으며 K값의 경우 1063~1066 nm에서 0.94, 1327~1328 nm에서 0.97의 높은 상관관계를 보였다.

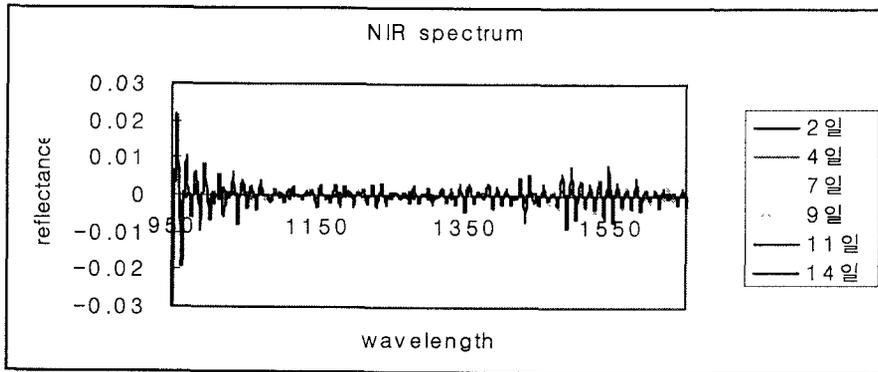


Fig 46. 2nd differential NIR spectrum (sample 1)

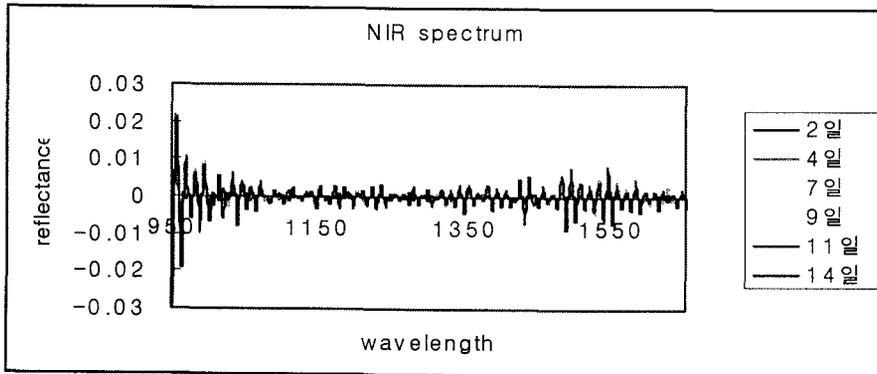


Fig 47. 2nd differential NIR spectrum (sample 2)

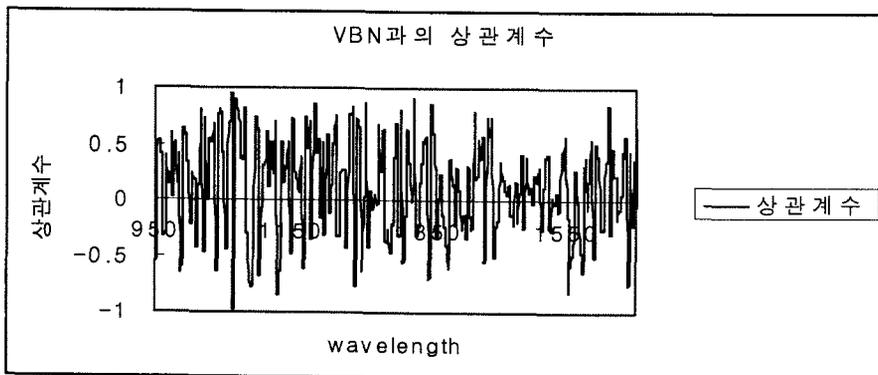


Fig 48. Correlation between 2nd differential NIR spectrum and VBN

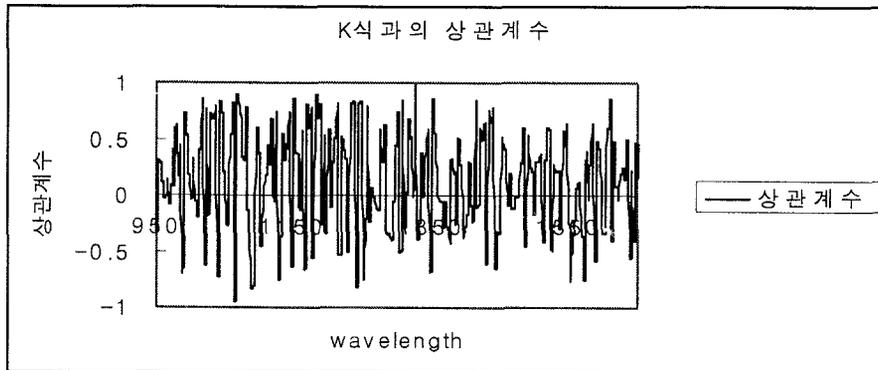


Fig 49. Correlation between 2nd differential NIR spectrum and K value

결과적으로 평균 -> 1차 미분 -> 2차 미분된 spectrum의 상관분석 결과를 토대로 그림 50은 1066 nm에서 NIR에 대한 VBN의 예측결과를 보여준다. 그림 50의 결과에서 보는 바와 같이 높은 선형적인 관계 ( $r^2 = 0.944$ )를 나타내었다. 또한 1327 nm에서 높은 상관관계를 보였던 K식과의 그래프는 그림 51에 나타내었다. NIR의 예측치에 대한 K값의 관계 또한 높은 선형적인 관계 ( $r^2 = 0.944$ )를 나타내었다. 따라서, 저파장대의 NIR을 이용하여 VBN 및 K값을 예측가능함을 보여주었다.

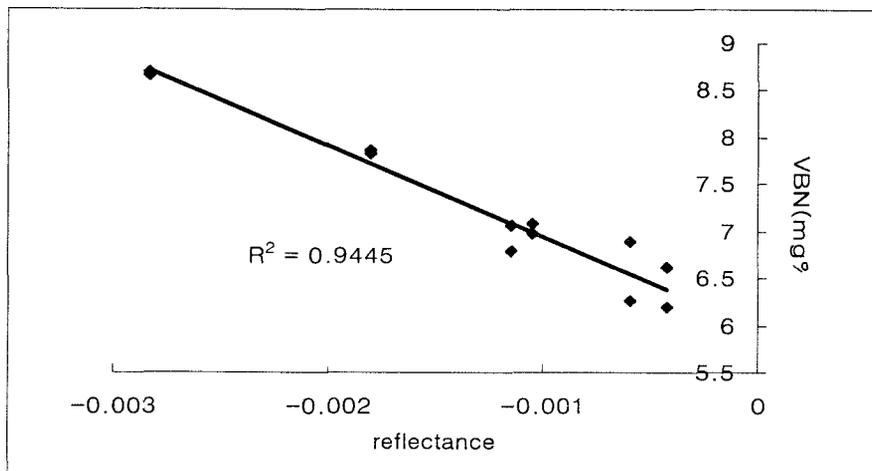


Fig 50 . Correlation between VBN and reflectance

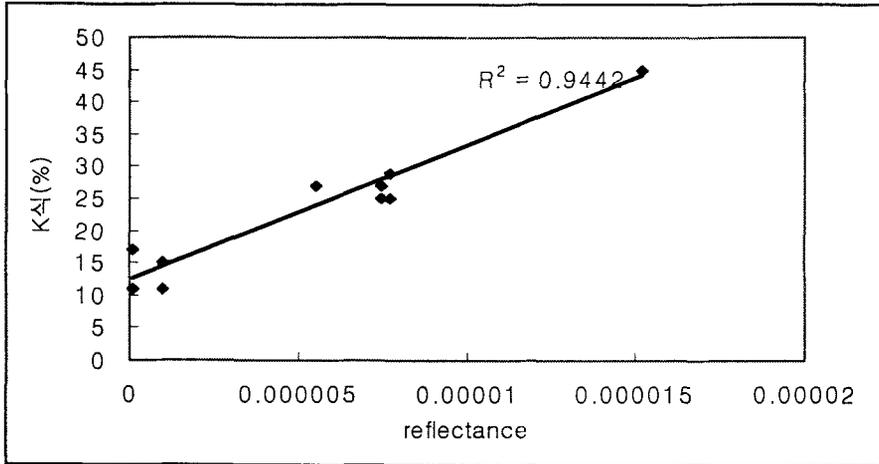


Fig 51. Correlation between K value and reflectance

다) VBN과 K값의 상관관계 분석

VBN은 식육의 부패정도를 측정할 수 있는 표준방법으로 널리 사용되고 있다. 이와 같은 이유로 VBN을 신선도 및 저장상태의 지표로 사용하였으나 VBN의 측정은 시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 장비의 살균 및 측정에 많은 어려움을 내포하고 있다. 따라서 본 연구 수행 시 간편하게 측정할 수 있는 K값을 이용하여 신선도 및 저장상태를 측정하고자 하였다. 이를 위해 52개의 시료를 대상으로 K값과 VBN의 상관관계를 분석한 결과  $r^2=0.901$ 의 값을 나타내었다 (그림 52). 따라서 본 연구에서 VBN과 K값의 관계가 유의성이 있다고 판단하였다.

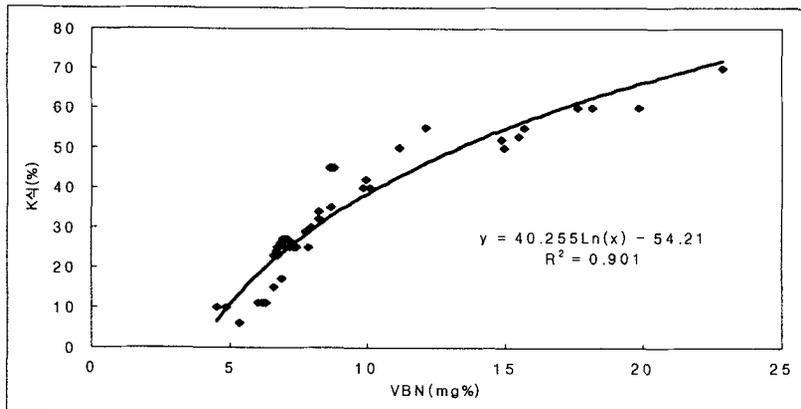


Fig 52. Relation between VBN and K value

## 나. NIR을 이용한 신선도·저장상태 평가모형 개발

### 1) 통계적 방법을 이용한 신선도 및 저장상태 지표 계측모형 개발

일반적으로 스펙트럼에는 성분의 농도와 관련된 정보이외에 노이즈 (noise)가 포함되어 있으며, 측정하고자 하는 인자와 다른 인자들간의 영향은 서로 복합적이므로, 단순히 각 성분과 상관성이 높은 파장들을 선정하여 예측하는 것은 쉬운 일이 아니다. 이러한 문제를 해결하기 위해 분광분석에서 널리 사용되는 여러 가지 통계적 분석방법을 이용하여 신선도 지표의 계측모형을 개발하였다.

#### 가) 통계적 기법

##### (1) 다중선형회귀분석 (multi-linear regression analysis, MLR)

오차분산 (error variance)을 줄이고 종속변수에 대한 보다 충실한 설명이나 예견이 가능하며, 다른 독립변수의 값을 통제된 상태에서 특정 독립변수가 종속변수에 독립적으로 행사하는 영향력을 측정할 수 있으며, 따라서 각 독립변수가 종속변수에 미치는 효과의 상대적인 비교와 보다 정밀한 인과관계의 분석이 가능한 다중회귀분석을 선정하였다. 그러나 다중회귀 모형은 여러개의 독립변수와 하나의 종속변수로 구성되어 주어진 독립변수들간에 일차종속 혹은 일차종속에 가까운 관계가 있을 경우 다중공선성 문제로 인하여 선형적인 관계모델의 개발 시 문제가 된다.

##### (2) 주성분회귀모델 (principal component regression, PCR)

PCR은 높은 상관계수를 갖는 많은 스펙트럼 데이터를 고유벡터 (주성분)와 스코어로 분해하고 주성분이라는 소수의 새로운 변수 set로 변환함으로써 다중선형회귀모델 (MLR)의 다중 공선성 문제 및 변수선택 문제를 해결하기 위해 개발된 모델기법이다. 주성분 모델은 어떤 파장도 사용될 수 있고, 전체 스펙트럼이나 넓은 영역의 파장을 사용하므로 파장선택이 필요하지 않으며, 많은 파장수를 사용하므로 평균효과를 가져 노이즈에 의한 영향을 줄일 수 있으며, 또한 매우 복잡한 혼합물에도 관심있는 요소의 지식만으로 사용될 수 있는 장점을 가지고 있다. 주성분회귀모델 개발 알고리즘은 다음과 같다. 모델개발을 위한 검량시료 데이터를 주성분회귀분석 (principle component analysis)에 의해 충분히 가공한 후, 데이터를 두 개의 주요한 행렬 (주성분 및 스코어 행렬)로 나타낸다.

$$X = TP + E \quad - (3)$$

where X: spectrum matrix ( $m \times n$ )  
 T: score matrix ( $m \times k$ )  
 P: Eigen value matrix ( $k \times n$ )  
 E: residual spectrum matrix ( $m \times n$ )

(3) 최소자승회귀모델 (partial least square regression, PLSR)

PLS 회귀모델은 PCR 모델에서와 같이 스펙트럼 데이터 형태를 고유벡터 및 스코어 벡터로 분해하나, PCR 모델과는 달리 농도정보를 이용하여 고농도의 스펙트럼은 저농도의 스펙트럼보다 큰 가중치를 갖게 하는 기법이며, 또한 차원축소 과정에 농도데이터가 포함되므로 PCR보다 더 안정적인 성능을 발휘한다. 알고리즘은 다음과 같다.

$$X = TP + E \quad - (4)$$

$$Y = UQ + F \quad - (5)$$

$$U = TB + H \quad - (6)$$

where Y: concentration  
 T: score matrix of spectrum  
 U: score vector of concentration  
 P, Q: Eigen vector of spectrum and concentration, respectively

나) 알고리즘 개발

통계적 방법을 이용한 신선도의 지표구명을 위한 알고리즘을 다음 그림 53과 같이 구성하였다.

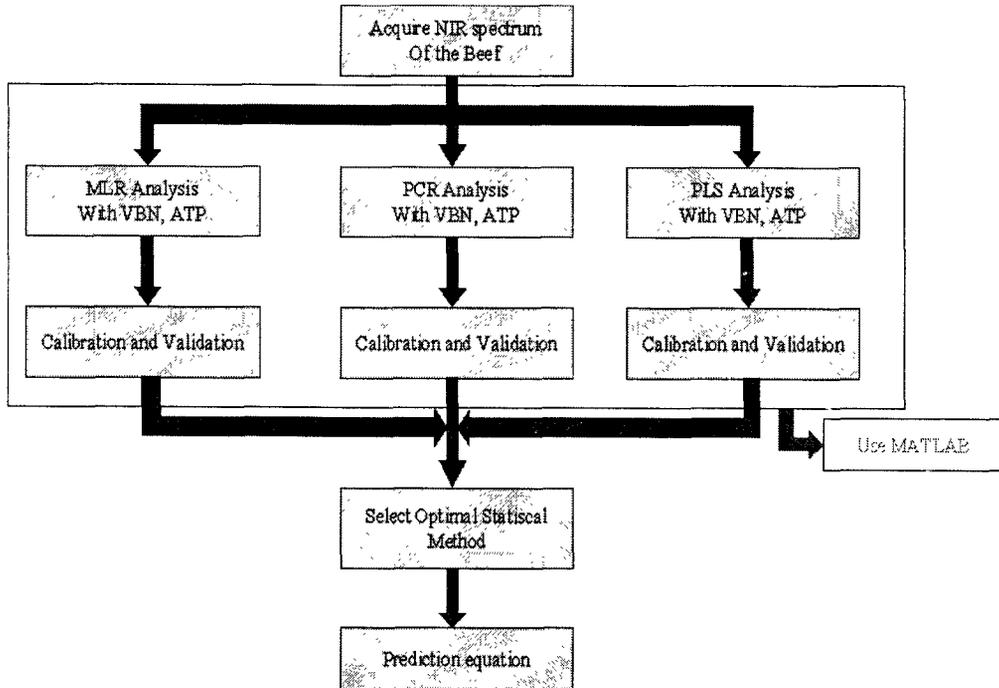


Fig 53. Algorithm of statistic analysis model

위의 결과를 토대로 최적 통계분석 모형을 구축하였다.

다) 개발된 모형 성능평가

모형의 성능평가를 위하여 예측 정밀도는 검량 표준오차 (standard error of calibration, SEC), 실제값 및 예측값 간의 상관관계를 나타내는 상관계수 (correlation coefficient,  $r$ ), 두 값 사이 관계의 적합성을 나타내는 결정계수 (determination coefficient,  $r^2$ ), bias, 미지시료를 이용한 예측값과 실제값의 검증표준오차 (standard error of prediction, SEP)를 다음과 같이 계산한다.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2}{m - k - 1}} \quad - (7), \quad r = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2}} \quad - (8)$$

$$r^2 = (r)^2 \quad - (9), \quad bias = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})}{m} \quad - (10)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m [(y_i - \bar{y}) - bias]^2}{m-1}} \quad - (11)$$

where  $m$  : No. of samples  
 $k$  : No. of factors  
 $y$  : actual value  
 $\bar{y}$  : predicted value by model

위에서 선정된 통계분석 모형과 MATLAB을 이용한 PCR, PLS 통계분석 프로그램을 개발하였다.

(1) PCR 분석결과

쇠고기 등심 시료 122개를 획득하여 실험을 수행하였다. 그 중 예측식에 80개의 샘플을 사용하였으며, 검증식에 42개의 샘플을 사용하였다. 그림 54는 PCR 분석의 예측식이며, 그림 55는 검증식이다. 예측식에서 결정계수 ( $r^2$ )는 0.944, 표준오차 (SEC)는 2.894%이었으며, 검증에서는 결정계수 ( $r^2$ )가 0.408, 표준오차 (SEP)는 2.013%이었다.

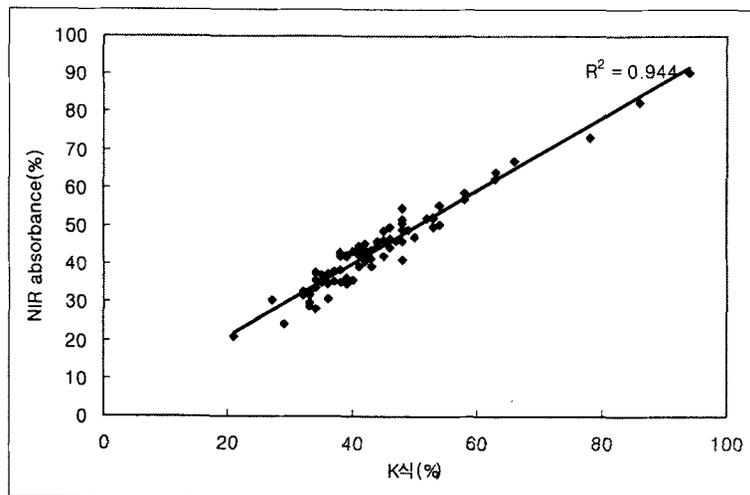


Fig 54. PCR Calibration (K value and NIR reflectance)

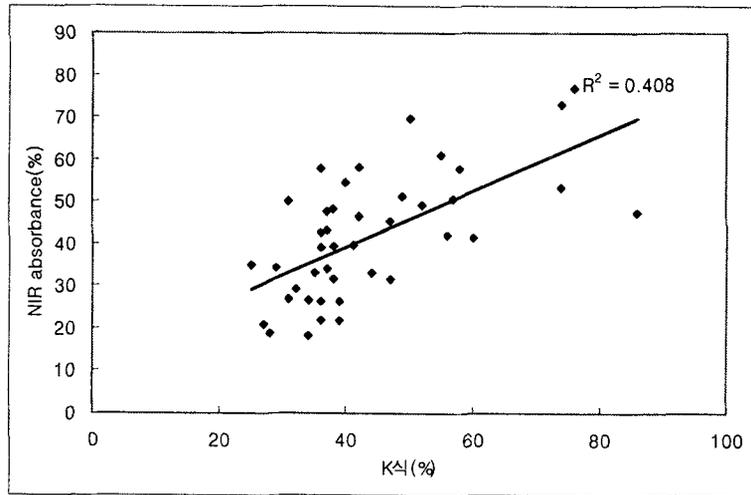


Fig 55. PCR Validation (K value and NIR reflectance)

(2) PLSR 분석 결과

본 실험에서 PLSR 기법을 적용하여 분석한 결과를 그림 56 (예측모델)과 그림 57 (검증모델)에 도시하였다. 그림 56에서 알 수 있듯이 예측식 결정계수 ( $r^2$ )는 0.901, SEC는 3.754%이었다. 또한 검증을 실시한 결과 결정계수( $r^2$ )는 0.297, SEP는 2.518%이었다. 따라서, 본 실험에서는 PLSR보다 PCR의 결과가 다소 우수한 성능을 보여주었다.

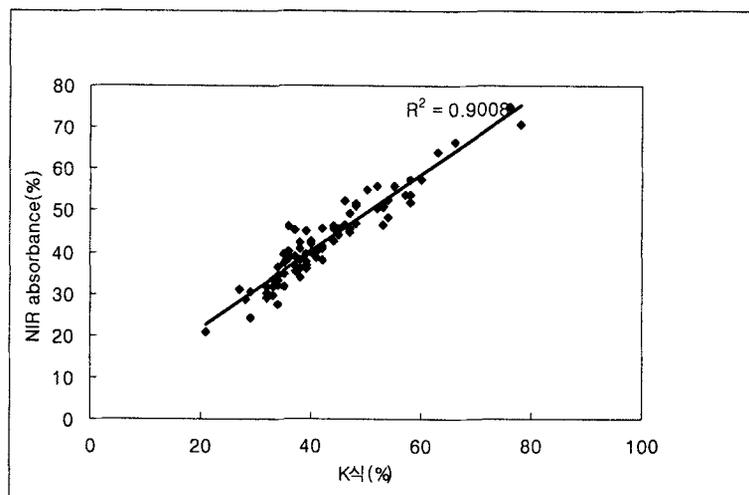


Fig 56. PLSR Calibration (K value and NIR reflectance)

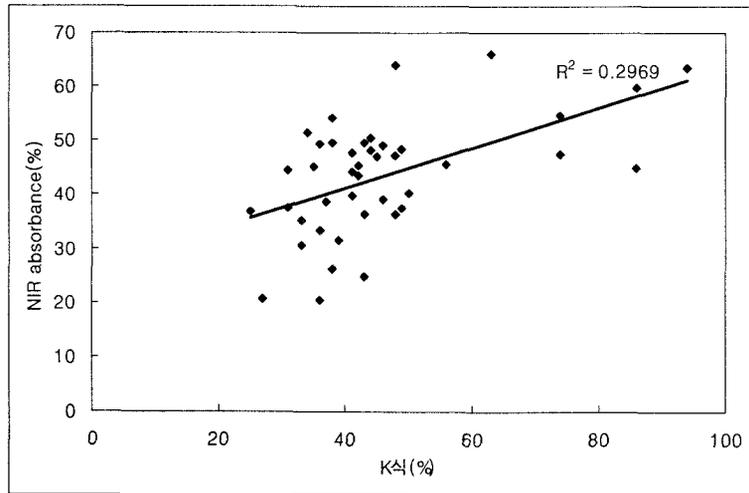


Fig 57. PLSR Validation (K value and NIR reflectance)

## 2) 신경회로망을 이용한 신선도 및 저장상태 지표 계측모형 개발

Neural network model은 매우 복잡한 비선형 상호작용을 다룰수 있기 때문에 통계학이나 프로그래밍 논리와 같은 전통적 접근방법으로 모델을 세울 수 없는 난해한 데이터의 모델을 쉽게 구축할 수 있고, 특히 변화하는 환경에서 더욱 유연하게 적용될 수 있다. Neural network은 경험으로부터 학습해 가는 인간 두뇌의 신경망 활동을 흉내내어 자신이 가진 데이터로부터 반복적인 학습과정을 거쳐 패턴을 찾아내고 이를 일반화함으로써, 향후를 예측 (prediction)하고자 할 때 사용되는 모형화 기법이다.

신경망에는 두 가지 주요 학습방법이 사용되는데, 주로 결과변수 (target variable)에 대한 예측 (prediction)에 사용하는 통제된 (supervised) 학습과 데이터의 분류-집단화 (clustering)와 기술 (description)에 이용하는 비통제된 (unsupervised) 학습이 그것이다. 비통제적 학습방법은 예측보다는 기술에 적합하다. 따라서 본 연구에서는 기존의 통계적 방법에 비교하여 신경망 모델을 구성하며 신선도와 저장상태 예측을 위해 통제적 학습방법인 MLP (multi-layer perceptron)와 RBF (radial basis function)를 사용하였다.

가) 신경망 기법

(1) MLP (multi-layer perceptron)

MLP는 복잡한 구조를 가진 데이터들 사이의 관계나 패턴을 찾아내는 유연한 비선형적 모형 (flexible nonlinear model)으로 다른 통계적 예측모형에 비해 높은 예측력을 보여준다. MLP 모형의 정보처리체계는 대량의 처리 단위들 (노드)로 구성되어 있으며 각 단위들 간에는 연결이 있다. 단위들과 이들간의 연결들이 망의 구조를 결정하며 마디간의 연결은 흥분적 (excitatory)이거나 억제적 (inhibitory) 성격을 가진다. 각 상호연결에는 가중치가 주어져 있으며, 가중치는 고정적 또는 가변적이며 (+) 혹은 (-)의 값을 지닌다. 기본 처리요소인 단위 (노드)는 층으로 배열되는데, 하나의 층에 있는 노드는 다음 층의 노드와 연결된다. 그림 58은 전형적인 MLP의 구조이다.

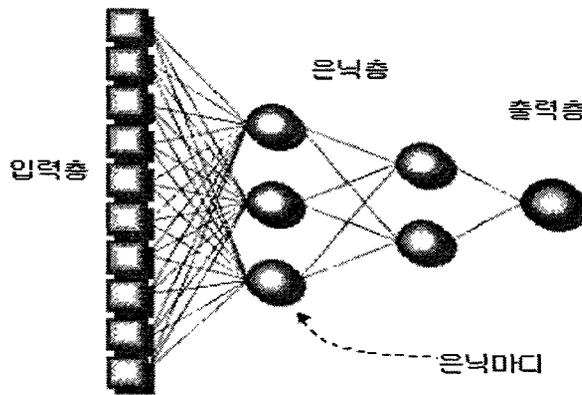


Fig 58. Structure of MLP

(2) RBF (radial basis function)

RBF 신경망은 세 개의 층을 갖는 네트워크인데, 특징벡터의 성분 ( $V_i$ )에 대응하는 각 입력 노드가 두 번째 층 (은닉층)의 모든 노드에 연결되고, 은닉층 (hidden layer)의 각 노드가 카테고리화 일치하는 하나의 출력 노드에 연결된다. 그림 59는 RBF 신경망 형태의 모습이다.

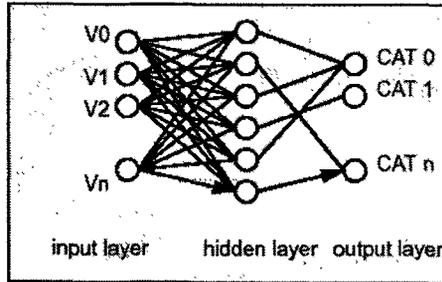


Fig 59. RBF Networks

첫 번째 및 두 번째 층들 사이의 연결은 정적 (static)이며, 학습과정에 의해서 성립되는 대응하는 가중치들이 두 번째 층에 저장된다. 두 번째 및 세 번째 층들 사이의 연결은 학습과정에 의해서 동적 (dynamic)으로 성립된다. RBF 신경망은 은닉층은 한 개가 있으며 결합함수로 다음의 원형기준함수를 사용한다.

$$H_i = \exp \left( \frac{-(x_1 - c_{1i})^2 + (x_2 - c_{2i})^2 + \dots + (x_k - c_{ki})^2}{r_i^2} \right) \quad (12)$$

RBF는 함수의 간소화로 인한 계산량의 감소로 실시간적인 측정이 가능하다. 그러나 중점을 잘못 잡거나 은닉마디의 수가 충분하지 않을 경우 수렴하지 않을 가능성이 높고 중복된 입력자료에 대해 민감하다.

### (3) EBF (elliptical basis function)

EBF 신경망은 2개의 은닉층이 있고 RBF 신경망의 문제점을 어느정도 보완한 알고리즘이다. 첫번째 은닉층은 단순선형결합 (항등활성함수), 입력층의 차원 감소, 입력공간 회전 기능을, 두번째 은닉층은 RBF의 기능을 한다. 그림 60은 EBF의 모습이다.

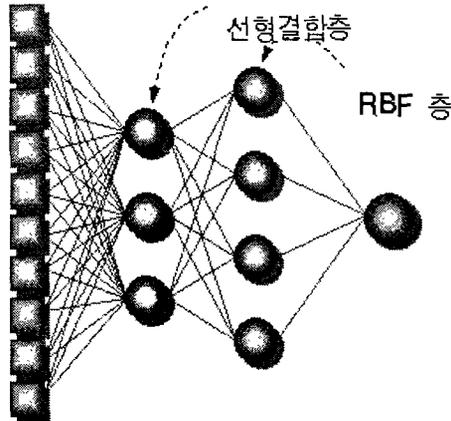


Fig 60. EBF Networks

#### 나) 신경망을 이용한 예측모형 개발

선형적으로 근사된 통계적 data를 이용하여 신경망을 이용한 예측모형을 개발하고자 하였다. 신경망은 통계적 분석모형의 비선형적이고 노이즈가 있는 부분을 실시간적으로 병렬화 시킬 수 있다. 구성단계는 다음과 같다.

- ① 통계적 분석을 통해 입력변수의 수를 감소시키고 변수사이의 관계를 제거한다.
- ② 최적 선형 평가자를 유도한다.
- ③ 다층의 신경망을 이용하여 함수의 비선형적 부분을 추출한다.

그림 61, 62는 구성단계의 도식도이다.

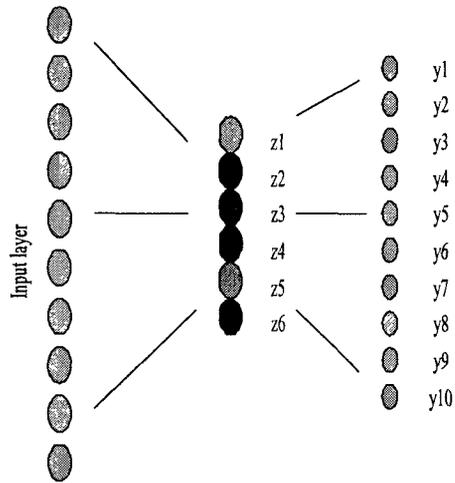


Fig 61. Statistical method for linear analysis

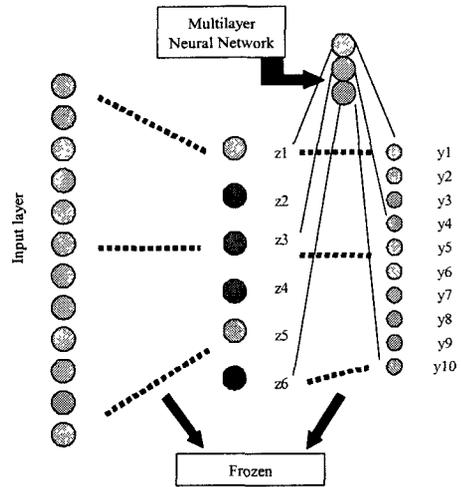


Fig 62. Neural network algorithm for non-linear analysis

Back propagation을 적용하여 분석한 결과를 다음 그림 63, 64에 나타내었다. 신경망에서는 상관계수  $r$ 을 사용하였다. 예측에서 상관계수 ( $r$ )는 0.9833이었으며, 검증에서 상관계수는 0.6673이었다.

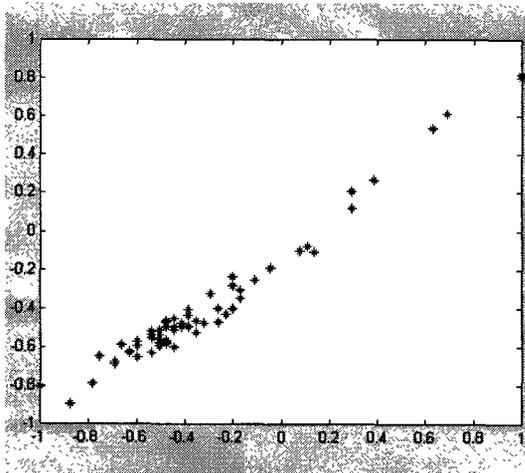


Fig 63. Calibration(back propagation)

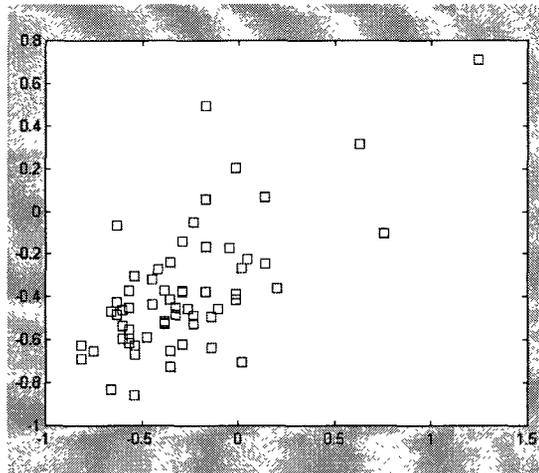


Fig 64. Validation(back propagation)

Radial basis network를 사용하여 분석한 결과를 다음 그림 65, 66에 나타내었다. 예측식의 상관계수 ( $r$ )는 0.9992이었으며, 검증에서의 상관계수는 0.5735로 나타났다.

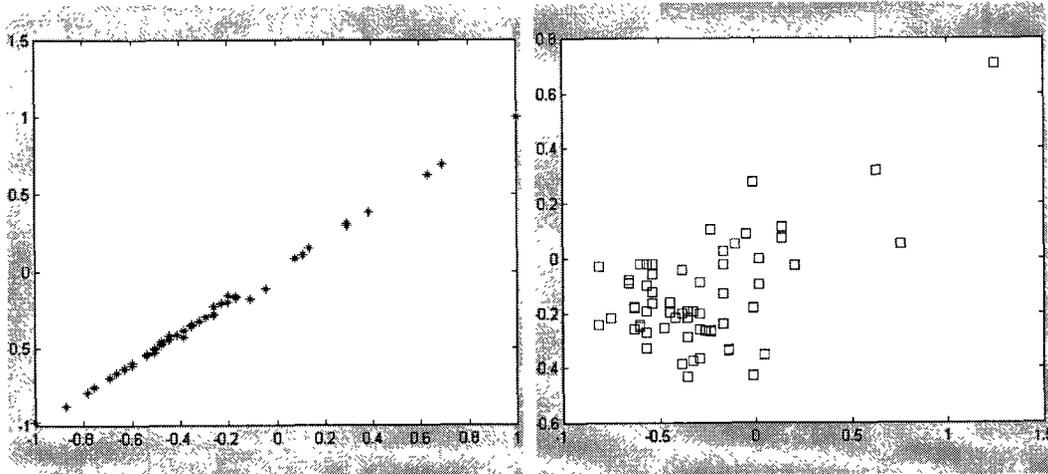


Fig 65. Calibration(radial basis network) Fig 66. Validation(radial basis network)

다) 통계적 기법과 신경회로망 기법을 적용한 분석결과

본 실험에서는 통계적 기법 (PCR, PLSR)과 신경회로망을 이용하여 신선도를 예측하였다. 그 결과를 표 6에 정리하였다.

Table 5. Analysis results using statistical and neural network methods

		예측 ( $r^2$ )	검증 ( $r^2$ )
통계적 기법	PCR	0.944	0.408
	PLSR	0.901	0.297
신경회로망	back propagation	0.967	0.445
	radial basis network	0.998	0.329

분석결과 신경회로망 back propagation을 적용한 결과와 통계적 기법 중 PCR 분석이 가장 유효하다고 판단된다.

### 3) NIR Probe 설계 및 제작

근적외선 (NIR) 스펙트럼을 측정하기 위하여 사용된 spectroscope와 광원장치는 그림 34, 35와 같고 probe holder는 반사되는 광의 산란, 누설 없이 획득하기 위해 무광재료를 사용하여 제작하였다. 또한 시료에서 스펙트럼을 획득할 때, 압력에 따른 스펙트럼의 변화에 대한 영향을 줄이기 위하여 시료와 닿는 면적을 크게 하였다. 그림 67, 68은 실제 probe의 모습이고, 그림 69는 설계 도면이다.



Fig 67. Separated probe holder

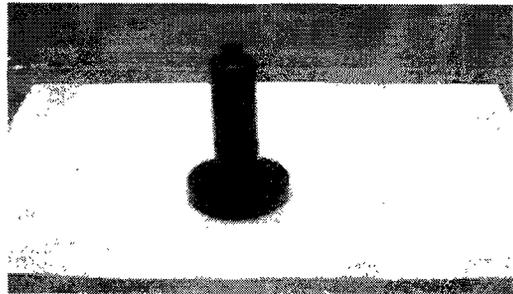


Fig 68. Probe holder

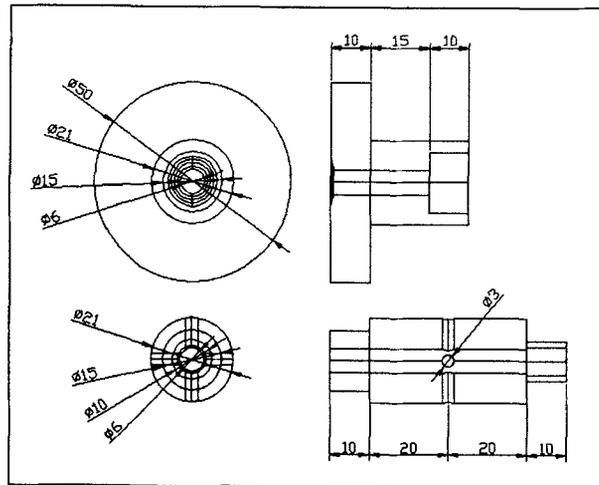


Fig 69. Design of probe holder

다. NIR을 이용한 신선도 및 저장상태 평가시스템 개발

1) 시스템 구성

NIR을 이용한 신선도 및 저장상태 평가시스템은 그림 70에 나타난 바와 같이 광원으로 35W의 할로젠 램프를 사용하는 Control Development 사의 NIR Optical Spectrograph, PC와 인터페이스를 위한 DIO (digital input output) 보드, probe, probe holder, 그리고 데이터를 저장 처리하는 PC로 구성되었다. 사용된 NIR spectrograph의 사양은 표 5 와 같다.

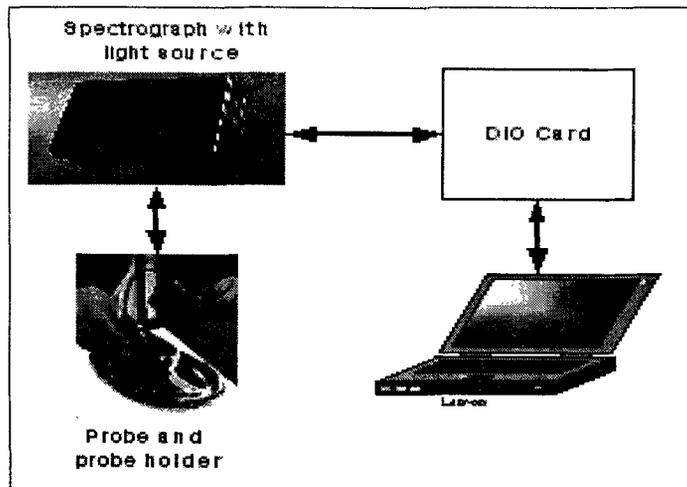


Fig 70. Schematic of freshness measurement sensor using NIR spectrograph

DAQ-DIO-24 PCMCIA card를 사용하여 NIR Optical Spectrograph Card로부터 파장별 반사도 값을 PC의 Visual C++ 6.0으로 작성된 프로그램을 이용하여 획득하였다.

2) 시스템 개발

총 120개의 쇠고기 시료는 4℃ 미만의 온도로 냉장보관 하였다. 시료의 신선도 값을 획득하기 위해 신선도 측정 kit를 이용하여 각 시료의 K값을 획득하였으며 각 시료에 대해 NIR 분광분석기를 이용하여 반사 스펙트럼을 획득하였다. 획득된 스펙트럼 중 기초실험을 토대로 신선도와 유의한 파장영역인 1100~1600 nm의 반사 스펙트럼 만이 사용되었다. 획득된 반사 스펙트럼은 각각 Beer-Lambert 법칙에 의해 흡광 스펙트럼으로 전환되었다.

모델을 개발하기 위해 시료의 K값과 흡광 스펙트럼의 관계에 대하여 Matlab 6.1의 PCR-Toolbox (ver 2.0 Eigenvector research)를 이용하여 PLS (partial least square)와 PCR (principle component regression) 분석을 수행하였다. 120개의 데이터 중 60개는 모델 개발에 사용되었으며, 60개는 검증에 사용되었다. 사용된 파장 (1100~1600 nm)에 대한 흡광도와 신선도 값 (K값)과의 상관관계 분석결과, 1200~1299 nm의 분석결과가 가장 유의하였다.

선택 파장대역 (1200~1299 nm)에서 PLS 분석을 수행한 결과는 그림 71과 같으며, 예측 데이터의  $r^2=0.988$ ,  $SEC=1.88$ 이며, 검증 데이터의  $r^2=0.958$ ,  $SEP=2.345$ 이었다. Bias는 0.49758로 나타났다.

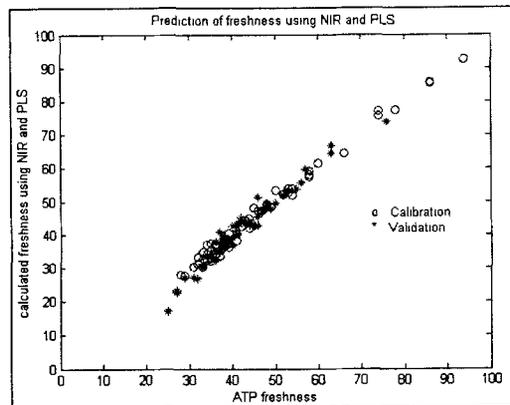


Fig 71. Prediction of freshness using NIR and PLS

PCR 분석을 수행한 결과는 그림 72와 같으며, 예측 데이터의  $r^2=0.989$ ,  $SEC=1.78$ 이며 검증 데이터의  $r^2=0.963$ ,  $SEP=2.285$  이었고 bias는 0.313723이었다.

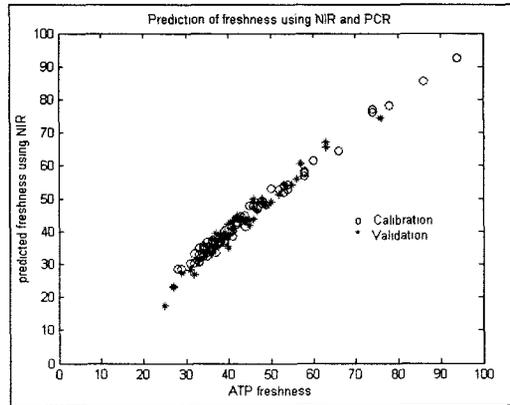


Fig 72. Prediction of freshness using NIR and PCR

PCR 분석에 의한 모델이 PLS 분석에 의한 모델보다 예측과 검증에서  $r^2$  값이 높고 오차율도 낮기 때문에 PCR 분석모델을 시스템에 적용하였다. 산출된 신선도 값은 획득된 검체의 흡광 스펙트럼 (1200~1299 nm)과 PCR 분석을 통해 획득된 각 파장 (1200~1299 nm)의 factor와의 곱에 bias를 더하여 신선도 값을 획득하는 시스템을 개발하였다. 그림 73은 각 파장의 factor 값을, 그림 74는 신선도 센서의 측정모델 개발과정을 나타낸다.

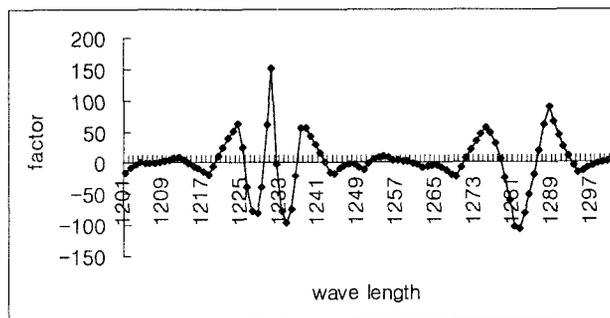


Fig 73. Factor values on each wavelength acquired from PCR analysis

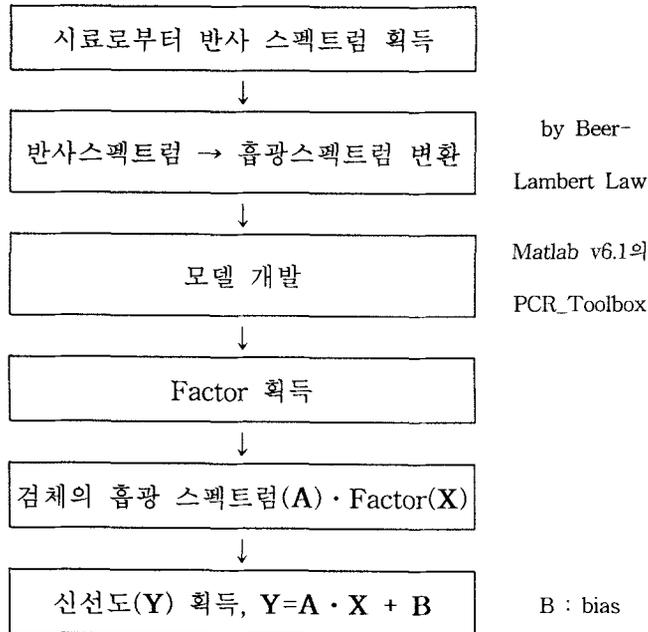


Fig 74. Development process of freshness sensor

위의 시스템을 Visual C++ 6.0을 이용하여 검체의 분광스펙트럼을 획득하고 신선도 값을 K값으로 표현하는 프로그램을 개발하였다. 그림 75는 프로그램의 실행화면으로서 반사 스펙트럼을 나타내며 이 스펙트럼을 흡광 스펙트럼으로 변환하여 PCR 통계법을 통해 획득한 factor와 bias를 계산하여 신선도 값을 K값 기준으로 표현하도록 개발하였다.

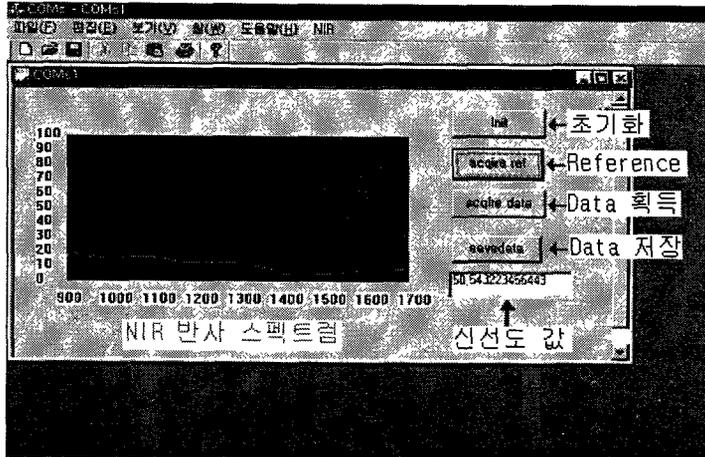


Fig 75. Executed appearance of program for measuring and calculating freshness

### 3. 결 론

본 연구에서는 육류의 신선도 및 저장상태 평가를 위한 지표를 규명하고, NIR을 이용한 육류의 신선도·저장상태 예측 가능성에 대한 평가를 하였다. 통계적 방법 및 신경회로망을 이용한 예측모형을 개발하였으며 실제로 육류를 대상으로 신선도를 측정할 수 있는 시스템을 개발하였다.

가. 세균학적, 물리적, 화학적 판정법으로 신선도 지표를 삼을 수 있지만 오랜 시간이 걸리고 파괴적이며 전문기술이 필요하다는 점이 있다. 전기전도도, biogenic amines, D-glucose와 L-lactate, VBN, K값을 이용하여 육류의 저장상태를 파악할 수 있음을 알았다. 본 연구는 VBN 및 K값을 이용하여 육류의 신선도 값을 찾고 NIR을 이용하여 신선도 및 저장상태의 예측 가능성에 대한 분석을 하였다.

나. 최소자승회귀모델 (partial least square regression, PLSR)과 주성분회귀모델 (principal component regression, PCR)의 통계적 방법, back propagation과 radial basis network의 신경회로망을 이용한 방법 중에서 높은 신뢰성을 보인 PCR 통계법을 이용하여 예측모형을 개발하였다.

다. 검체의 분광스펙트럼 획득시 외란, 산란, 검체의 압력에 대한 영향을 줄이기 위해 특별히 고안된 NIR probe를 설계하여 제작하였다.

라. 육류의 신선도를 예측하여 K값 기준의 수치로 나타내는 신선도 평가시스템을 개발하였다. 사용된 NIR 파장영역은 육류의 신선도와 관계에서 가장 유의한 영역으로 나타난 1200~1299 nm를 사용하였다. 개발된 모델을 통한 검증에서 예측 데이터는  $r^2=0.989$ , SEC=1.78, 검증 데이터는  $r^2=0.963$ , SEP=2.285이었으며 bias는 0.313723이었다.

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분	과제명	달성도	달성율 (%)
1 세부과제	○ NIR 및 CE를 이용한 농산물의 원산지 판정방법 개발	- 울무, 당귀, 홍화씨, 백삼(가루) 등 11종의 CE에 의한 원산지 식별법 개발과 적용실험 완료 - 울무, 당귀, 홍화씨 등 9종의 NIR에 의한 원산지 식별법 개발 완료	100
2 세부과제	○ PCR을 이용한 축산물 및 축산가공식품으로부터 <i>Listeria</i> , <i>Escherichia</i> 및 <i>Salmonella</i> 신속검출법 개발	- <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i> 에 대한 특이적 primer를 이용한 PCR 기법 개발 - 식품별로 최적의 PCR 조건 확립 - 다양한 PCR 방법 개발과 field test 실시	100
3 세부과제	○ 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 신속계측 바이오센서 시스템 개발	- Batch/flow형 중금속 계측 효소센서 개발 - Batch/flow형 항생제 계측 광학적 면역센서 개발 - 항생제 계측 potentiometric 효소센서 개발 - 바이오센서 시스템의 실제적용, PC 접속 및 제어	100
1 협동과제	○ 농산물 중의 잔류농약 신속·다성분 분석기술 개발	- SPME 분석조건 확립 및 최적화 완료 - GC에 의한 공시농약, 공시 농산물별 분석법 정립 - HPLC에 의한 공시농약, 공시 농산물별 분석법 정립 - 2,4-D에 대한 ELISA법 확립과 간이검사 kit 개발	100
2 협동과제	○ 전자코를 이용한 농산물의 판별기술과 NIR을 이용한 육류의 신선도 및 저장성 평가	- 검정현미, 대추, 영지버섯 등 6종의 전자코에 의한 원산지 판별법 개발과 적용실험 완료 - NIR에 의한 육류의 신선도 및 저장상태 지표 구명과 평가모형 및 평가시스템 개발 완료	100
총괄과제	○ 국산 및 수입농산물(가공식품)의 판별기술과 안전성 평가기술 개발	- NIR, CE, 전자코에 의한 농산물의 과학적인 원산지 식별법 개발 - NIR에 의한 육류 신선도와 저장성 평가기술 개발 - SPME 방법에 의한 잔류농약 신속 다성분 분석법 및 2,4-D에 대한 효소면역분석법 개발 - <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. enterica</i> 검출을 위한 시료전처리 조건 및 신속검출법 개발 - 농산물의 안전성 평가를 위한 중금속 및 항생제 계측 효소센서와 면역센서 개발	100

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

본 연구개발을 통하여 농산물(가공식품)의 원산지 판별 및 안정성 평가를 위한 다양한 측정원리의 분석기법이 개발되었으며 이들은 식품산업에서의 품질관리기술 발전에 필요한 기초 연구자료로서 뿐만 아니라 실제적용을 위하여도 중요한 가치를 지니므로 본 연구결과가 관련분야의 기술발전에 기여하는 정도는 다음과 같으리라 사료된다.

- 산지나 재배조건에 따라 발생하는 농산물의 품질차이를 효율적으로 구분가능하고 증가추세인 부정유통 수입산 농산물의 원산지 식별에 활용가능
- 국내에서 유통되는 농산물에 대한 NIR, CE 및 전자코를 이용한 신속하고 과학적인 원산지 식별방법 확립에의 기여 및 기타의 신속 원산지 식별방법 개발의 동력 제공
- 과학적인 원산지 식별방법 개발로 농산물의 원산지 관리업무에 활용함으로써 행정의 과학화 도모 및 유통단속업무에 직접 활용
- 농산물 및 가공식품의 품질향상에 크게 기여함에 따라 국내 식품산업의 고급화 선도 및 신속품질평가로 공정·저장·유통 중 유용성분의 양적·질적 손실 방지
- 인공지능망에 접목한 휴대용 전자코 개발 시 중소기업의 생산원가 감소에 기여가능
- 신선도의 신속평가법 개발로 육류의 등급화 등을 통한 유통과정의 투명관리에 기여
- 농산물(가공식품)의 신속 안전성 평가관련 검사기법 제시와 관련기술 발전에 기여
- SPME 분석법에서 처럼 세계적 추세인 친환경적 안전성 검사기법 확립기반 조성
- 특정 농약성분의 현장측정을 위한 면역분석법 개발과 관련된 hybridoma cell line 개발 등 platform 기술 확립에 기여
- 식품 중 유해미생물에 대한 PCR 기법 개발을 통하여 정립된 기술을 *Campylobacter* 등 국내에서 새롭게 발견되는 병원성미생물 신속분석법 개발에 적용가능
- 농산물 안전성 평가시스템의 센서화를 통한 시료채취와 분석간 시차발생 최소화와 바이오센서 개발을 통한 생물신호 변환의 know-how 축적 및 타 분야 적용
- 농산물의 엄격한 원산지관리로 국내 농산물의 대외 경쟁력 강화에 기여 및 수입 농산물의 부정유통 방지 및 차별화를 통한 국내생산자와 소비자의 보호
- 다양한 간이분석법 개발로 분석에 소요되는 시간의 획기적 단축, 경제적 손실 및 무역마찰의 최소화와 숙련된 기술인력의 소용감소를 통한 예산절감
- 개발기술 적용에 의한 원료손실 최소화, 수입대체효과 및 타 관련산업에의 파급효과

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 기존 활용실적

	학술지 게재 (예정포함)		학회발표		산업재산권		세미나	워크샵	합계
	국외	국내	국외	국내	등록	출원			
총괄과제	1	11	4	13	0	1	3	3	36

#### 1. 학술논문

- Rapid detection of *Salmonella* sp. in foods by PCR. *한국농화학회지* 투고 중.
- Improvement of detection sensitivity of *L. monocytogenes* using cell membrane disruptor by PCR. *Food Science & Biotechnology* 투고 중.
- Optimization of rapid detection of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by PCR and its application to field test. *Journal of Food Protection* 투고 중.
- Characterization and food application of a potentiometric biosensor measuring  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 투고 중.
- Urease 저해활성 측정 cuvette assay에 의한 중금속 이온 검출. 2003. *한국농화학회지* 46(2): 74-78.
- Capillary electrophoresis를 이용한 울무의 원산지 판별. 2002. *한국식품과학회지* 34(5): 787-791.
- Capillary electrophoresis 및 근적외선분광분석기를 이용한 황기의 원산지 판별. *한국식품과학회지* 게재승인.
- Capillary electrophoresis를 이용한 천궁의 원산지 판별. *한국농화학회지* 투고 중.
- SAW 센서를 바탕으로한 GC를 이용한 국내산 및 수입산 당귀의 향기 패턴분석. 2003. *한국식품과학회지* 33(1): 144-148.
- 전자코를 이용한 대추의 산지판별. 2001. *서울여자대학교 자연과학연구소 논문집*

13: 47-52.

- 전자코에 의한 검정 현미의 산지판별. 2002. *한국식품과학회지* 34(1): 136-139.
- NIR을 이용한 쇠고기의 신선도 측정센서 개발. 2003. *한국농업기계학술대회지* 8(1) 185-191.

## 2. 학회발표

- Anaysis of pesticide multi-residue in friuts using solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography. 2002. *4th European Pesticide Residues Workshop*, p. 193.
- SPME/HPLC를 이용한 과일·채소류 중의 잔류농약분석. 2003. *한국분석과학회 춘계학술대회 초록집*, p. 188.
- 고체상미세추출법을 이용한 인삼에서의 잔류농약분석. 2001. *한국분석과학회 추계학술대회*.
- 고체상미세추출법과 염석효과를 이용한 농산물에서의 농약분석방법. 2001. *한국환경농학회 춘계학술대회*.
- 신선채소에서 고체상미세추출법을 이용한 잔류농약 다성분 분석. 2001. *한국농약과학회 춘계학술대회*.
- Residue analysis of plant growth regulator 6-benzyl adenine in bean sprouts using in tube solid phase microextraction by high performance liquid chromatography. 2001. *제26회 한국분석과학회 춘계학술대회 초록집*, p. 47.
- Rapid detection of *Salmonella* sp. in foods by PCR. 2003. *한국농화학회 춘계학술대회*.
- Comparison of sensitivities of prepared template types for the detection of *E. coli* O157:H7 from food samples by PCR. 2003. *IFT Annual Meeting*.
- Optimization of PCR detection of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in food samples and its application to field test. 2003. *한국식품과학회 춘계학술대회*.
- Rapid detection of food-borne *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in food by PCR. 2002. *GIM*.
- Chloramphenicol 검출을 위한 광학적 면역센서 개발. 2002. *한국식품과학회 추계학술대회*.

- Potentiometric penicillinase sensor system을 이용한 모델시료 중의 베타-락탐계 화합물 계측. 2003. 한국식품과학회 연차학술대회.
- 중금속 계측 urease 저해센서 시스템 개발. 2002. 한국농화학회 춘계학술대회.
- Optimum reaction conditions and heavy metal sensitivity of an urease-based inhibition sensor. 2003. *IFT Annual Meeting*.
- Urease 저해활성을 이용한 중금속 이온 측정. 2002. 한국식품과학회 춘계학술대회.
- Capillary electrophoresis를 이용한 곡류의 특성분석. 2001. 제67차 한국식품과학회 특별강연.
- Capillary electrophoresis를 이용한 황기의 원산지 판별. 2002. 제69차 한국식품과학회 poster 발표.

### 3. 산업재산권

- 쇠고기의 신선도 측정방법 및 장치. 특허출원 10-2003-49384 (2003년 7월 18일).

### 4. 세미나

- 향기분석을 위한 전자코 응용. 2002. 한국향료연구회 초청세미나, 한국과학기술회관
- 전자코를 이용한 식품의 품질분석과 제품의 품질 수명 예측. 2002. 강릉대 동해안 해양생물자원연구센터 초청세미나, 강릉대학교.
- 전자관능검사 및 식품의 품질예측. 2002. 한양대학교 생활과학연구소 초청세미나, 한양대학교.

### 5. 워크샵

- 제 1차 식품독성 미생물검출 워크샵 (ABAX를 이용한 *Salmonella* 및 *Listeria monocytogenes* 검출 및 식중독유발 *E. coli* O157:H7 의 PCR신속검출법). 2002.
- 향의 특성과 분석법의 특징, 전자코를 이용한 최신 향분석. 2002. 서울여자대학교.
- 전자코의 원리와 개념, 전자코/전자혀 workshop. 2002. 서울여자대학교.

## 제 2 절 활용계획

본 연구개발의 내용 중 NIR, 전자코에 의한 원산지 식별기술은 국립농산물품질관리원에서 원산지 식별을 위한 장치 및 기술로서 활용 중이고 SPME 기술도 활용예정이며 기타 연구결과도 농산물 품질평가의 일선기관에서 활용가능하리라 여겨지므로 관련기술의 보급과 활용을 위하여 다음과 같이 노력하고자 한다.

- 계량적인 추가 활용계획으로서, 향후 2년내 SCI 논문게재 1편 및 논문게재 4편, 특허 등록 및 출원 각 1편, 세미나 1건을 계획 중임
- 울무, 당귀 등 공시한 시료에 대하여 작성한 NIR에 의한 원산지 식별 검량식에 대한 재검증 실시 및 이를 토대로 유통현지의 원산지 관리업무에 활용 예정
- 원산지 식별의 현장에서 CE를 다른 분석법들과 함께 적용하여 판별율을 높이는데 활용 기대
- 전자코를 이용한 원산지 판별에 대한 세미나 및 workshop을 통하여 그 동안 습득된 기술에 대한 know-how를 전수하고 이에 관련된 업무를 주로 수행하는 국립농산물 품질관리원의 자문을 통하여 실용화 될 수 있도록 수행함
- 다양한 육류의 스펙트럼에 대한 factor 분석과 적합한 모델개발을 통하여 여러 육류를 대상으로 신선도 및 저장상태를 계측할 수 있는 시스템 개발에 활용 예정
- 식품시료의 전처리기술과 PCR 증폭법을 이용하여 신선농축산물의 유통과정 중의 위해성 검사 및 각종 식품성분에 대한 광범위한 적용실험에 활용 기대
- 중금속과 항생제 계측 효소센서 및 면역센서 기술과 장치를 식품 중의 위해잔류물질 및 위해세균 나노분석기술 개발에 향후 활용하고자 하며 개발된 기술은 식품전시회 등에 출품하여 홍보할 예정임
- 생력적이고 환경친화적인 신속 잔류농약 분석법인 SPME를 직불제 농산물이나 대규모 단일작물 경작지에서의 품목별 안전성 분석에 활용 예정
- 분석분야의 선도적 입지를 구축하고 신속하고 간편한 SPME-Instrument에 의한 분석법의 전파로 국내 분석능력의 향상을 유도한다. 아울러, 현재 농림부에서 시행하고 있는 “간이 속성분석법”의 대안으로써 검색법 활용을 계획하고 있음
- 현장에서 잔류농약인 2,4-D를 신속 정확히 분석할 수 있는 indirect ELISA kit 개발을 통해 식품원료나 가공식품에서 2,4-D의 오염정도를 신속히 파악하는데 활용가능

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

문헌분석 및 Internet 조사 등을 통하여 본 연구과정에 활용되었거나 향후의 계승발전 연구에 적용될 수 있는 다양한 해외과학기술정보가 수집되었다. 특히 IFT Annual Meeting 등에는 본 연구의 원산지 판별 및 안전성 평가에 활용가능한 다양한 기기 및 검출 kit가 전시되었고, 이를 통하여 본 연구개발의 연구방향과 내용들이 적절한 것이었고, 그들이 현재 혹은 가까운 미래에 활용될 기술임을 재확인하게 되었다. 본 연구개발을 통하여 수집한 해외과학기술정보는 일일이 열거하기 어려우나, 그 중 하나로서 IFT 기기전시회에 소개된 Electronic Sensor Technology사 (CA, USA, [www.estcal.com](http://www.estcal.com))의 z-Nose 시스템을 망라하는 전자코 시스템과 관련된 해외기술정보를 소개하고자 한다.

미국 캘리포니아의 Cyranose사는 휴대용 전자코를 개발하여 쌀 품질을 분석하고 등급화하는 작업에 적용하는 문제를 검토하기 시작하였으며 영국의 Cranfield 연구소는 건조한 양파의 품질상의 변화를 전자코를 이용하여 추적하는 연구를 발표한 바 있다. 미국에서는 우유제품에 오염된 미생물의 맛의 차이와 관능검사 요원으로부터 확보한 검사결과와 전자코 결과간의 상관관계를 통하여 오염을 판단할 수 있는 검출기로 사용할 수 있는지를 검토한 바 있다. 터키에서는 붉은 고추의 캡사이신의 함량과 매운 맛 그리고 전자코 분석결과간의 높은 상관관계를 발견하였다. 이러한 연구는 고추 품질관리 및 등급조정 등의 업무에 활용될 수 있을 것이다. 한편, 원산지 판별을 위한 농산물 저장 시 어떤 종류의 포장지를 사용하였느냐에 따라 원료 농산물의 품질, 특히 향에 있어서 영향을 줄 수 있다. 핀란드의 Ahvenainen 등은 종이로 구성된 포장지의 사용된 잉크 등이 얼마큼 영향을 미치는지 여부를 전자코로 분석한 결과를 발표한 바 있다. 핀란드의 Hyvoenen 그룹은 아이스크림의 지방 함량에 따른 차이를 전자코로 분석하거나 유화 정도에 따른 차이를 전자코로 분석한 결과를 발표하기도 하였다. 미국 아이오와에서는 돼지우리의 청결 문제를 해결하기 위한 방법으로 여러 가지 방법을 도입한 후 우리에서 발생된 냄새가 실내로 얼마큼 유입되는지를 비교검토한 바 있다. 미국 노스켈로라이나 대학의 Singleton 교수 등은 땅콩 제품의 품질을 구별하거나 땅콩에서 발생될 수 있는 이취 등의 정도를 전자코를 이용하여 판별하는 결과를 제시한 바 있다. 한편, 미국 조지아 주에서는 육류를 다양한 상태의 저장조건에서 처리한 후 신선한 육류와 냉동 보관한 고기로부터 발생하는 휘발성분을 토대로 육류의 품질평가에 적용하였다.

## 제 7 장 참고문헌

- Ai, J. 1997. *Anal. Chem.* **69**: 1230.
- Alpha MOS. 1997a. *Application Note N° 4*.
- Alpha MOS. 1997b. *Application Note N° 22*.
- Basha, S.M. 1997. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 400.
- Bean, S.R., Lookhart, G.L. and Bietz, J.A. 2000. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 318.
- Beltran, J., Lopez, F.J., Cepria, O. and Hernandez, F. 1998. *J. of Chromatogr. A* **808**: 257.
- Bietz, J.A. and Schmalzried, E. 1992. *Cereal Foods World* **37**: 555.
- Bietz, J.A. and Schmalzried, E. 1993. *Cereal Foods World* **38**: 615.
- Bradford, M.M. 1989. *Anal. Biochem.* **72**: 248.
- Campos, C.C. and Simpson, C.F. 1992. *J. Chromatogr. Sci.* **30**: 53.
- Cancalon, P.F. 1995. *J. AOAC Intl.* **78**: 12.
- Chen, F-T.A. 1991. *J. Chromatogr.* **559**: 445.
- Dean, P.D.Q., Exley, D. and Johnson, M.W. 1971. *Steroids* **18**: 593.
- Dong, Y. 1999. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 87.
- Fernandez, M., Padron, C., Marconi, L., Ghini, S., Colombo, R. Sabatini, A.G. and Giriti, S. 2001. *J. Chromatogr. A* **922**: 257.
- Huebner, F.R., Bietz, J.A., Webb, B.D. and Juliano, B.O. 1990. *Cereal Chem.* **67**: 129.
- Jia, L., Zhang, H.X., Kou, X.L. and Hu, Z.D. 1995. *Chromatographia* **41**: 605.
- Jimenez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.T., Martin, M.T. and Magoya, A.L. 1998. *J. Chromatogr. A* **829**: 269.
- Keay, R.W. and McNeil, C.J. 1998. *Biosens. Bioelectron.* **13**: 963.
- Kim, H.S., Bae, H.R., Seong, K.Y., Jung, T.G. and Kim, J.H. 2002. Analysis of pesticide multi-residue in fruits using solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography. *4th European Pesticide Residues Workshop*.
- Kim, N., Haginoya, R. and Karube, I. 1996. *J. Food Sci.* **61**: 286.
- Kohler, G. and Milstein, C. 1975. *Nature* **256**: 495.

- Lookhart, G.L. and Bean, S.R. 1995. *Cereal Chem.* **72**: 312.
- Lookhart, G.L. and Bean, S.R. 1996. *Cereal Chem.* **73**: 81.
- Lookhart, G.L., Bean, S.R. and Jones, B.L. 1999. *Electrophoresis* **20**: 1605.
- Lucy, C.A., Yeung, K.K.-C., Peng, X. and Chen, D.D.Y. 1998. *LC-GC* **16**: 26.
- Meier, H., Lantreibecq, H. and Trinh Minh, C. 1992. *J. Autom. Chem.* **14**: 137.
- Mulchandani, A., Male, K.B. and Luong, J.H.T. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 739.
- Osipov, A.P., Zaitseva, N.V. and Egorov, A.M. 1996. *Biosens. Bioelectron.* **11**: 881.
- Park, I.-S., Kim, N., Noh, B.-S. and Choi, B.-D. 2002. *Food Sci. Biotechnol.* **11**: 122
- Preininger, C. and Wolfbeis, O. 1996. *Biosens. Bioelectron.* **11**: 981.
- Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Ahn, M.O. and Kim, S.S. 1998. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 1252.
- Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Kim, S.S. and Chang, Y.S. 2001. *Food Sci. Biotechnol.* **10**: 299.
- Righetti, P.G., Oliviere, E. and Viotti, A. 1998. *Electrophoresis* **19**: 1738.
- Rusling, J.F., Luttrell, G.H., Cullen, L.F. and Papariello, G.J. 1976. *Anal. Chem.* **48**: 1211.
- Rubtsova, M.Y., Kovba, G.V. and Egorov, A.M.. 1998. *Biosens. Bioelectron.* **13**: 75.
- Schaller, E., Bosset, J.O. and Escher, F. 1998. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **31**: 305.
- Schwer, C. and Kenndler, E. 1990. *Chromatographia* **30**: 546.
- Scotter, C.N.G and Day, L.Z. 1992. VCH, New York, USA. p. 394.
- Simplicio, A.L. 1999. *J. Chromatogr. A* **833**: 35.
- Staples, E.J. 1999. *ONDCP Inter. Technol. Sympo.*, March 8-10, Washington, DC.
- Volante, M., Cattano, M., Biachin, M. and Zoccola, G. 1998. *J. Environ. Sci. Health* **B33**(3): 279.
- Volante, M., Pontello, M., Valoti, L., Cattaneo, M., Bianchi, M. and Colzani, L. 2000. *Pest. Manag. Sci.* **56**: 618.
- Wittekindt, E., Werner, M., Reinicki, A., Herbert, A. and Hansen, P.D. 1996. *Environ. Technol.* **17**: 597.
- Zeece, M. 1992. *Trends Food Sci. Technol.* **3**: 6.

- 권영길, 조래광. 1998. *한국농화학회지* 41.
- 권혜순, 이남윤, 김수정, 정승성, 김중환. 1999. *한국유화학회지* 16.
- 김상숙, 이상효, 이세은, 류미라, 남백희. 1997. *쌀의 원산지 및 품종 판별에 관한 보고서* (한국식품개발연구원).
- 김성란. 1997. *식품과학과 산업* 30: 126.
- 김영수. 1997. *한국식품과학회지* 10: 94.
- 김영수. 1996. *한국식품과학회지* 9: 87.
- 김용욱, Barton, F.E. 1994. *근적외선분광법을 이용한 제품담배 판별연구* (담배학회).
- 노봉수, 고재원. 1997a. *산업식품공학* 1: 103.
- 노봉수, 김상용, 김수정. 1997b. *서울여대 자연과학연구논문집* 9: 69.
- 노봉수, 양영민, 이택수, 홍형기, 권철한, 성영권. 1998. *한국식품과학회지* 30: 356.
- 배혜리, 정승성, 성기용, 이부영. 2001. Residue analysis of plant growth regulator 6-benzyl adenine in bean sprouts using in tube solid phase micro extraction by high performance liquid chromatography. *제26회 한국분석과학회 춘계학술대회 초록집*.
- 손현주, 김수정, 이남윤. 2002. *몇가지 기기분석을 통한 인삼의 원산지 식별방법 연구. 국제인삼심포지움 발표*.
- 우영아, 조창희, 김효진, 조정환, 조경규, 정승성, 김수정, 김중환. 1998. *대한약학회지* 42.