

표면플라즈몬공명을 이용한 살충제 카보후란 잔류물 검출 Sensing of the Insecticide Carbofuran Residues by Surface Plasmon Resonance

양길모* 최규홍* 조남홍*
정희원 정희원 정희원
G. M. Yang K. H. Choi N. H. Cho

1. 서론

농약은 그 이점에도 불구하고 농산물과 생태계에 잔류하여 환경오염과 사람의 건강을 위협하기 때문에 세계적으로 잔류농약에 대한 관심이 고조되어 있는 실정이다. 특히, 농산물에 존재하는 잔류농약은 국내·외적인 큰 관심사항으로 각 국가마다 농산물 중 농약의 잔류량을 규제함으로써 농약의 안전사용기준 준수를 유도하여 농약 사용량을 억제함으로써 농산물의 안전성을 사전에 확보하고 있다.

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고성능액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC), GC/MS(gas chromatography/mass spectrometry)에 의존하고 있는데, 분석을 위해 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추출하고 정제한다. 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 갖는 반면 많은 경비와 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능을 필요로 한다(송 등, 2003)

농산물의 안전성 확보를 위한 검사는 유통특성상 신속한 검사기술이 요구된다. 따라서 잔류농약 성분을 정확하고, 신속하게 측정할 수 있으며, 조작이 간단하여 누구나 손쉽게 측정할 수 있는 소형, 경량의 경제성 있는 장비 혹은 바이오센서 개발 기술의 습득이 절실히 요구된다(최 등, 2002)

카보후란은 카바메이트계 살충제, 살선충제로서 토양 서식충 및 잎가식 곤충을 죽이는 신경독성 침투성 농약이다. 산중성에 안정하나 알칼리에 불안정하며 녹는점은 150~153℃이며 분자량은 221.26이다. 인체에 과다 축적될 경우 혈액, 신경계통 또는 생식계통에 이상을 일으키며 벼, 참나물, 들깨잎 등에 사용되고 있다.

바이오센서는 “측정 대상물로부터 정보를 얻을 때 생물학적 요소를 이용하거나, 측정 대상물이 생물체이거나 또는 생물학적 요소를 모방하는 것을 사용하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 유용한 신호로 변환시켜주는 시스템”으로 전처리가 간편하고 현장에서 실시간 측정이 가능하기 때문에 보건, 의료 및 국방 분야를 중심으로 선진국에서는 개발에 대한 관심이 급증하고 있다. 본 논문에서는 농산물에 잔류하는 농약의 신속한 검출을 위한 바이오센서 개발의 1차년도 결과로서 표면플라즈몬공명과 효소면역분석법을 기초로 하여 살충제 카보후란의 잔류물을 신속하게 검출할 수 있는 효소면역분석법을 개발하고 측정 감도를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 표면플라즈몬공명(SPR, Surface plasmon resonance)

(1) 표면플라즈몬공명 현상

표면플라즈몬은 그림1에서처럼 금속박막 표면에서 일어나는 전자들의 집단적 진동이며 이

* 농업공학연구소 수확후처리공학과

에 의해 발생한 표면플라즈몬파는 금속과 이에 인접한 유전물질의 경계면을 따라 진행되는 표면전자기파이다. 표면플라즈몬의 여기(Excitation)는 외부에서 서로 다른 유전함수를 갖는 두 개의 매질의 경계면 즉, 금속과 유전체의 경계면에 전기장을 인가하면 경계면에서의 전기장의 수직성분의 불연속성 때문에 표면전하가 유도되고 이 표면전하의 진동이 표면플라즈마파로 나타난다. 이 표면플라즈마파는 자유공간에서의 전자기파와는 달리 입사면에 평행하게 진동하는 파로서 p-편광(p-polarization) 성분을 가진다. 따라서 TM 편광된 전자기파에 의해서만 표면플라즈몬을 여기시킬 수 있다.

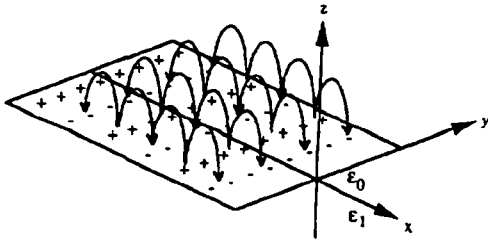


Fig. 1 A SPR phenomenon.

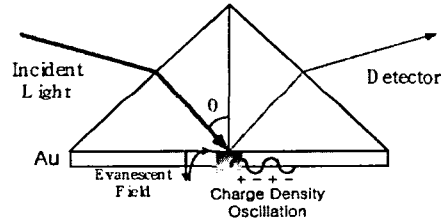


Fig. 2 Principal of SPR sensor.

만일 그림 2에서처럼 두 매질 사이가 매우 얇은 금속으로 코팅이 되어 있고, 입사광이 편광이며 단색광일 경우, 특정한 입사각도에서의 반사되는 광은 그 광 밀도가 현저히 줄어드는 SPR 현상이 발생한다. 이때 입사각을 SPR각 이라 부른다. SPR각은 전자기파가 파고드는 용액의 굴절률에 따라 달라진다. 굴절률은 버퍼가 바뀔 때 따라 변하지만, 센서칩 표면의 질량 변화에 따라서도 달라진다. 따라서 센서칩 표면에 고정화된 물질(Ligand)과 분석물질 (Analyte)이 결합하면 질량의 변화를 가져오고 따라서 SPR각이 처음과 달라지게 된다. 이러한 SPR각의 변화를 연속적으로 기록한 데이터를 센소그램(sensorgram)이라 부른다. 실제로 센소그램에서는 SPR각을 RU(resonance unit)로 전환하여 표시하여 준다. 이때 1,000RU는 $1\text{ng}/\text{mm}^2$, SPR각 변화는 0.1° 에 해당된다.

(2) SPR 센서시스템의 구조

SPR 센서시스템은 크게 SPR을 여기시키는 광학부, 측정시료의 전처리부, 신호처리부로 나눌 수 있다. 광학부는 다시 SPR을 여기시키는 데 필요한 광원부, SPR변환부, 광검지부로 나뉘며 측정시료의 전처리부는 금속막이 증착된 유리기판을 중심으로 시료 챔버, Flow Unit, 프리즘 등으로 구성되어 있고 신호처리부는 측정된 반사도를 컴퓨터에 연결해서 실시간으로 측정할 수 있는 회로 및 소프트웨어를 말한다. 특히 SPR변환부는 각도변환형, 파장가변형과 같은 여러 가지 측정방식이나 소자의 형태에 따라 달라질 수 있는데 그것은 각기 그 사용목적이나 감지대상에 따라 달라질 수 있다.

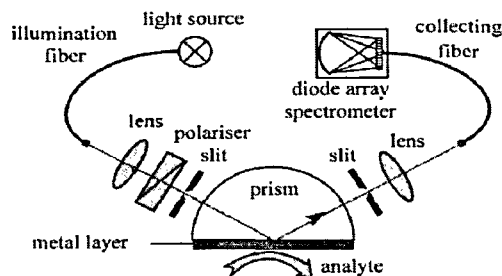


그림 4. A structure of SPR sensor system.

나. 효소면역분석법(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)

효소면역분석법은 특정 화학물질이나 미생물 항원에 대해 특이성이 있는 항체를 경합시키는 원리를 이용하여 유해물질의 정성, 정량분석을 하는 면역분석법으로 농약과 같이 분자량이 작고 농도가 낮은 분석물의 측정을 위해 유용한 분석법이다. 카바메이트계 잔류농약 분석을 위한 프로토콜이 발표되어(Abad 등, 1998; Pogaćnik 등, 2003), 부분적인 수정을 통해 바이오센서용으로 사용이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 SPR 원리를 이용해 개발된 BIACORE 3000 장비를 살충제 카보후란 잔류물 분석에 이용하였다. 항체는 GST(Glutathione-S-transferase), 항원은 카보후란, 버퍼는 PBS(Phosphate Buffered saline)를 사용하였다. 사용한 센서칩은 덱스트란(dextran)이 도포되어있는 CM5칩을 사용하였고 이때 SPR 현상을 일으키는 파장은 760nm이다. 분석을 위한 프로토콜은 다음과 같다.

(1) Preconcentration test

고정화 할 GST가 센서칩 표면(negative charged)에 쉽게 접근할 수 있도록 최적 pH 버퍼 선택을 위한 preconcentration test를 하였다. 이를 위해 10mM sodium acetate를 pH7.0~3.5의 범위 안에서 각각 1,000 μ l씩을 준비하였다. 각 pH별로 50 μ g/ml GST와 희석하여 최적의 pH 값 측정실험을 실시하였다. preconcentration test 후 50mM NaOH를 1분간 흘려주어 항체 고정화 준비를 하였다.

(2) 고정화(Immobilization)

리간드로 사용될 생체 물질을 센서칩 CM5에 고정화하는 방법은 매우 다양하다. 이 중 가장 널리 사용되는 아민커플링법으로, 이는 EDC와 NHS로 센서칩을 활성화시킨 다음 분자 구조 내 일차 아민기를 가지고 있는 물질을 흘려줌으로써 간단히 고정화시키는 방법이다. 센서칩 표면에 NHS와 EDC를 각각 50 μ l씩 섞어 유속 5 μ l/min로 흘려주어 약 30~40%의 카르복실 그룹(carboxyl group)을 활성화 하여 단백질의 아민(amine)기가 공유결합 될 수 있도록 하였다. preconcentration test에서 채택된 pH 4.5의 버퍼에 리간드인 GST를 희석하여 고정화시켰다. 실험에 사용된 GST의 농도는 50 μ g/ml였으며 200 μ l를 준비하였다. 끝으로 고정화된 GST를 안정화시키기 위해 1M의 에탄올아민(ethanolamine) 35 μ l를 흘려주었다.

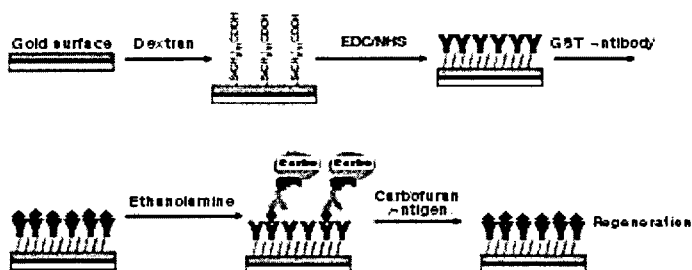


Fig. 4 Protocol about antigen-antibody immobilization.

(3) 효소면역반응 실험

효소면역반응 실험을 위해 카보후란을 4.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.03, 0.01, 0.001 ppm, 13 농도의 샘플을 준비하였다. 이때 농도별 희석에 사용된 버퍼는 러닝버퍼(running buffer)를 이용하였다. 재현성을 확인하기 위해 3반복 실험을 하였으며 Kinetic assay를 구하기 위해 유속은 30 μ l/min, 유량은 90 μ l(180sec)를 적용하였다. 재생단계

(regeneration step)에서는 10mM NaOH를 사용하였다. 이 과정은 면역반응이 끝난 후 결합된 리간드와 효소를 인위적으로 분리함으로써 초기화하는 작업이다.

3. 결과 및 고찰

가. Preconcentration test

GST가 센서칩 표면(negative charged)에 쉽게 접근할 수 있도록 pH 별로 실험한 결과 그림5에서 처럼 pH 4.5에서 가장 좋은 RU값을 보였다. 이는 센서칩 표면이 네거티브 차지를 가지기 때문에 산성에 가까운 버퍼를 사용해야 하며 그중 GST의 활성을 가장 좋게 하는 값이 pH 4.5인 것으로 나타났다.

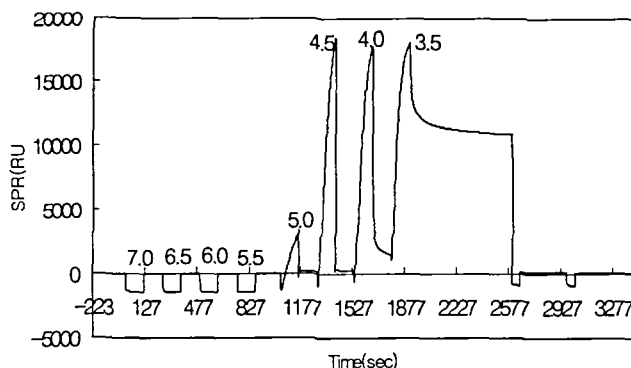


Fig. 5 Preconcentration test.

나. 카보후란의 농도별 실험

그림 6은 카보후란을 고농도에서 저농도까지 희석을 하여 검출실험을 한 결과이다. 식약청의 잔류농약 허용기준에 의하면 카보후란은 최저 0.1ppm 이하로 관리되어 지고 있다. 그러나 본 실험에서는 카보후란 허용기준치의 100배 이하인 0.001ppm까지 검출 실험을 실시하여 표면플라즈몬공명의 유용성을 증명해 보았다. GST가 카보후란과 충분히 반응하는데 걸린시간(association)은 176초였으며 완전히 해리되는데 걸리는 시간(dissociation)은 215초가 소요되었다. 그리고 준비단계에서 초기화를 위한 실험(regeneration)을 포함해 결과값을 구하는데 까지 13분이 소요되었다.

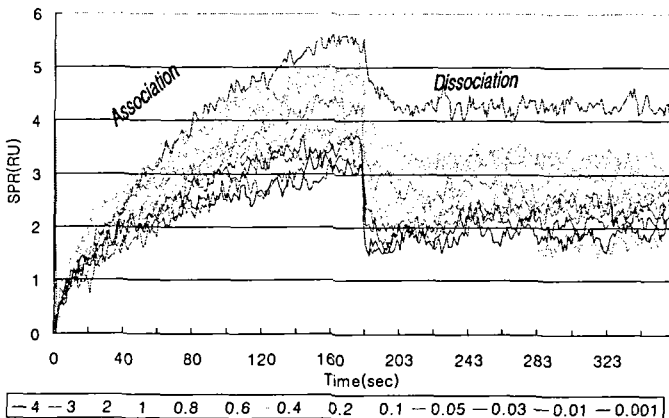


Fig. 6 A reaction experiments between GST and carbofuran by concentrations.

다. 농도변화에 따른 측정 감도

카보후란 농도변화에 따른 실험을 실시한 결과 그림 7에 처럼 0.001ppm까지 검출할 수 있는 충분한 감도를 갖는 것으로 나타났다. 이때 R^2 값은 0.94의 실험결과를 보였다.

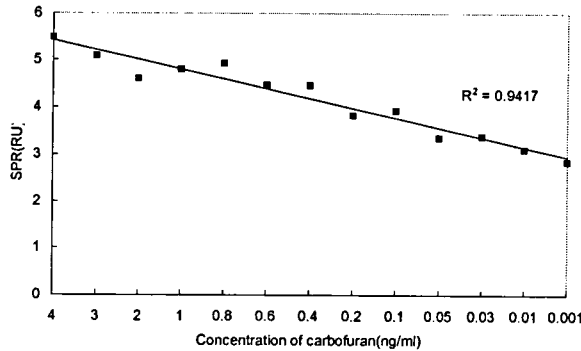


Fig. 7 A performance by concentrations of carbofuran.

4. 요약 및 결론

본 연구는 표면플라즈몬공명을 이용하여 살충제 카보후란 잔류물의 실시간 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서 바이오센서용 효소면역분석법을 개발하기 위해 실행되었다. 실험에 사용된 항체는 GST를 사용하였으며 GST를 칩표면에 고정화하기 위해 아민커플링법을 사용하였다. 적절한 pH값은 preconcentration test를 통해 pH 4.5가 가장 좋은 것으로 판명되었다. 실험결과 HPLC나 GC가 분석하는데 보통 2시간이 소요되는데 반해 표면플라즈몬공명을 이용한 분석결과에서는 13분으로 실시간에 가깝게 노력과 분석시간을 절약할 수 있음을 증명하였다. 국내 카보후란의 허용 잔류량의 최소 검출한계인 0.1ppm 보다 낮은 값을 가지므로 현장적용에 문제가 없다고 판단된다.

5. 참고문헌

1. Abad J. M., F. Pariente, L. Hernandez, H. D. Abruna, and E. Lorenzo, 1998, Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor, *Anal. Chem.* 70, 2848-2855.
2. Ashani, Y., Rothschild, N., Segall, Y., Levanon, D. and Raveh, L., 1991. Prophylaxis against organophosphates poisoning by an enzyme hydrolyzing organophosphorus compounds in mice. *Life Sci.* 49, pp. 367374. Abstract.
3. Durand, R., Nicaud, J.M. and Mallevalle, J., 1984. Detection of organophosphorus pesticides with an immobilized acetylcholinesterase electrode. *J. Anal. Toxicol.* 8, pp. 112117.
4. Lea Pogacnik *, Mladen Franko, 2003, Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 18 1-9.
5. 송석진, 조한근, 2003, 살충제 이미다크로프리트 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법, *한국농업기계학회지* 28(6), 505-510.
6. 최정우, 이원홍, 2002, 농산물의 잔류농약성분을 검출하는 이성분 동시 측정용 광바이오센서 개발, *농림부 농림기술과제 연구보고서*.