pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 3, pp. 269~276 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.3.269

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

금 나노 입자 응집 원리를 이용한 유기인계와 카바메이트계 비색-신속 농약검출법 개발

김효인[1] · 이정은[1] · 김솔아[1] · 문효영[2] · 조성래[3] · 심원보[4,5]*
[1]경상대학교 응용생명과학부, [2]압티지엠제이㈜, [3]대한제과협회 진해지부,
[4]경상대학교 농화학식품공학과, [5]경상대학교 농업생명과학원

Development of a Colorimetric Rapid Detection Method for Organophosphorus and Carbamate Pesticides using Gold Nanoparticle Aggregation Principle

Hyo-In Kim[1], Jeong-Eun Lee[1], Sol-A Kim[1], Hyo-Yeong Moon[2], Sung-Rae Cho[3] and Won-Bo Shim[4,5]*
[1]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[2]*Apteasy MJ inc., BI center, Gwangju, Korea*
[3]*Jinhae Branch, Korea Confectionery association, Jinhae, Korea*
[4]*Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[5]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
(Received April 4, 2019/Revised May 9, 2019/Accepted June 10, 2019)

ABSTRACT - A colorimetric rapid detection method based on acetylcholinesterase (AChE) was developed for the analysis of organophosphorus (OP) and carbamate (CB) pesticides. The AChE catalyzes acetylthiocholine into thiocholine having (-) and (+) charges, and the (+) charge results in gold nanoparticle (GNP) aggregation. The in-activation of AChE by OP and CB has been well known. In order to optimize the colorimetric method, optimal dilution times of commercial serum containing AChE, diameter of GNP, and concentration of acetylthiocholine were tested as a key parameter. The colorimetric detection limits of the method were 7.5 ng/mL for both dimethyl amine and carbofuran pesticides in 60% ethanol. No cross-reaction to other chemicals, such as aflatoxin B1 and ochratoxin A, which can be contaminated with pesticides in agricultural products, was observed. Recoveries from lettuce, sesame leaf, and cabbage lettuce spiked with known concentrations of dimethyl amine and carbofuran were found to be ranged from 83.85 to 133.16%. These results indicated that the colorimetric rapid method based on AChE can be a useful tool for the sensitive, specific, rapid, and accurate detection of OP and CB pesticides in fresh vegetables.

Key words : Gold nanoparticle aggregation, Acetylcholinesterase, Organophosphorus, Carbamate pesticides detection

농약은 곤충, 설치류, 균류, 잡초 등 농작물에 피해를 주는 해충을 방제하기 위해 사용되는 화학물질로 화학적 성질에 따라 크게 유기인계, 카바메이트계, 유기염소계, 피레드린 등 4개의 주요 그룹으로 분류된다[1]. 그중 유기인계 농약은 인산염 그룹을 가지고 있으며 척추동물과 무척추동물의 acetylcholinesterase (AChE) 억제작용을 유발하여 시냅스에서 신경전달물질의 작용을 막아 신체를 마비시켜 사망에 이르게 하며, 인체에 대하여 독성이 높은 것으로 알려져 있다[2]. 유기인계 농약은 현재 사용하고 있는 농약 중 가장 많은 종류를 차지하고 있으며 대표적인 농약으로parathion, malathion, diazinon 등이 있다[3,4]. 카바메이트계 농약은 carbamic acid으로 부터 유도된 유기 농약으로 곤충 및 포유동물에 대해 독성이 매우 높고 cholinesterase 억제작용을 유발하나 유기인계농약과는 다르게 특정 종에게 가역적으로 작용한다. 카바메이트계 농약의 예로는 carbaryl, carbofuran, aminocarb 등이 있다[5].

인구가 증가함에 따라 농산물의 소비는 급증하고 있는

*Correspondence to: Won-Bo Shim, Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
Tel: +82-55-772-1902; Fax: +82-55-772-1901
E-mail: wbshim@gnu.ac.kr

추세이며 이에 따라 농작물 생산량 증대의 필요성이 커지고 있으며 병충해를 방지하여 농작물의 수율을 높이기 위해서는 농약의 사용은 필수불가결하다[6]. World health organization (WHO)산하 잔류농약규격부회(codex committee on pesticide residures)에서는 1966년부터 국제식품규격계획(join-FAO/WHO food standard programme)의 일환으로 식품 중 잔류농약의 국제적 허용량을 설정하는 작업이 추진된 바 있다[7]. 우리나라에서도 1968년부터 잔류농약 모니터링을 실시하여 현재까지 국내의 유통 농산물들을 대상으로 모니터링을 실시하고 있으며 특히 2004년부터는 '국가 잔류농약 안전관리망 구축'사업으로 장기적인 계획 하에 유통농산물에 대한 잔류농약 모니터링을 실시하고 있다[8,9]. 그 결과로 잔류허용 기준치를 초과한 부적합 농산물의 비율은 2001년 1.4%에서 2014년 0.6%, 2015년 0.5%, 2016년 0%[10,11]로 잔류농약 부적합 농산물은 점차 줄어들고 있어 국가의 농약관리 시스템이 안정화 단계로 들어선 것으로 보인다.

또한, 2019년 1월부터 우리나라에서 전면 시행하는 농약허용물질 목록 관리제도(Positive List System, PLS)는 농산물 재배과정에서 사용이 허가된 농약들을 목록으로 만들어 잔류허용기준 내에서 사용하도록 하고, 등록되지 않은 농약은 잔류허용기준 0.01 mg/kg 이하로 설정하여 관리하는 제도이다. 2016년 12월부터 시행되어 우선적으로 참깨, 들깨, 밤, 바나나, 파인애플, 참다래 등 견과종실류와 열대과일류에 적용되었고, 2019년 1월 1일부터 모든 농산물에 적용되고 있다[12]. 이와 같이 농약의 안전성 논란과 PLS 제도 등의 시행으로 인해 농산물 중 저농도 농약을 검출할 수 있는 신속하고 민감도 높은 분석법 개발이 요구되는 추세이다.

농약을 검출하기 위해 사용되는 방법으로는 주로 항원과 항체 반응을 이용한 효소면역분석법(ELISA)과 AChE가 농약에 의해 억제되는 성질을 이용한 효소검출법, HPLC와 GC-MS와 같은 기기분석법이 있다[13-16]. ELISA의 경우 민감도는 높으나 검출까지 최소 2시간이 소요되며 항원의 합성이 어렵고 농약의 개발속도에 비해 항체의 개발속도가 뒤쳐지는 등의 문제점으로 실제 적용하기는 어려우며, 현재 사용되는 대부분의 농약 검출 키트들은 AChE의 성질을 이용하지만 검출한계는 대부분 μg/mL 수준으로 민감도가 낮다는 단점이 있다. 기기분석법의 경우 전처리 과정이 복잡하며, 회당 분석비용이 비싸고, 숙련된 전문가만이 기기를 다룰 수 있다는 단점이 있다.

최근 금 나노 입자(gold nanoparticle; GNP)는 LFA (Lateral Flow Assay) 이외에도 다양한 바이오센서에서 표지물질로 이용되고 있다[17,18]. GNP는 일반적으로 +전하와 반응하여 응집이 일어나며 이로 인해 고유의 붉은색이 자주색으로 변하게 된다. 이러한 색 변화를 이용한 바이오센서 개발은 활발히 진행되고 있으나 spectrophotometer와 같은 실험실 장비를 이용해야만 한다는 단점이 있다. 최근 스마트폰 어플을 이용하여 RGB값을 측정하는 기술들이 소개되고 있으며, 바이오센서의 현장성을 높이기 위해서 스마트폰 어플을 활용하고 있다. 최근의 기술들을 이용하여 GNP를 이용한 비색 분석법뿐만 아니라 ABTS, TMB 등의 발색에 의한 결과를 측정하는데 주로 활용되고 있다[19].

본 연구에서는 시판되고 있는 혈청 내 AChE가 acetylthiocholine을 +전하와 -전하를 가진 양극성 thiocholine으로 분해시키고, 이때 발생한 +전하가 GNP를 응집시키는 원리를 이용하여 비색-신속 농약 검출법을 개발하고 이를 측정할 수 있는 기술로 휴대폰 어플을 이용하는 시스템을 확립하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

실험에 사용된 금나노입자용액을 제조하기 위해 tetrachloroauricacid, sodium citrate, 혈청(USA-male)과 유기인계 농약 표준품(dimethyl amine, diazinon, malathion, malaoxon, dicholorvos, paraoxon methyl)과 카바메이트계 농약 표준품(carbofuran, oxamyl)은 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 3차 증류수로 희석하여 원하는 농도로 사용하였다. potassium carbonate, anhydrous (D.S.P GR Reagent, Seoul, Korea)를 사용하였으며, pH meter (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA), 가열교반기(Lab & tools, Seoul, Korea), white plate 96well (SPL, Pocheon, Korea)을 실험에 사용하였고, GNP의 aggregation 여부를 측정은 구글 앱스토어에서 Color Meter 어플을 휴대폰에 설치한 후 RGB값의 차이로 확인하였다.

금나노입자[Gold nano particle(GNP)]합성

실험에 사용된 GNP 용액은 Frens[20]의 방법으로 제조하였다. 0.01% tetrachloroauric acid 100 mL을 교반 하면서 가열하고 끓기 시작하면 환원제 1% sodium citrate를 0.5, 1, 2, 3, 4 mL씩 각각 첨가하여 용액을 제조하였다. 합성된 GNP 용액은 Particle Size & Zeta Potential Analyzer (Malvern panalytical, Malvern, UK)로 직경을 확인 후 실험에 사용하였다.

GNP를 이용한 비색-신속 농약 검출법개발

합성된 GNP 표면은 전기적으로 –전하를 띄고 있어 콜로이드 용액의 형태를 유지하게 되는데, +전하와 반응하게 되면 응집하는 성질을 가지고 있다. 응집이 일어나지 않는 경우는 GNP 고유의 붉은색(red wine)을 유지하며, 응집이 일어나게 되면 청자색(purple)으로 변하기 때문에 색 차이에 의한 GNP의 응집 유무를 육안으로 측정이 가능하다. 비색-신속 농약 검출법에 사용되는 acetylthiocholine은시판 혈청 내 AChE에 의해+전하와 –전하를 가진 양극

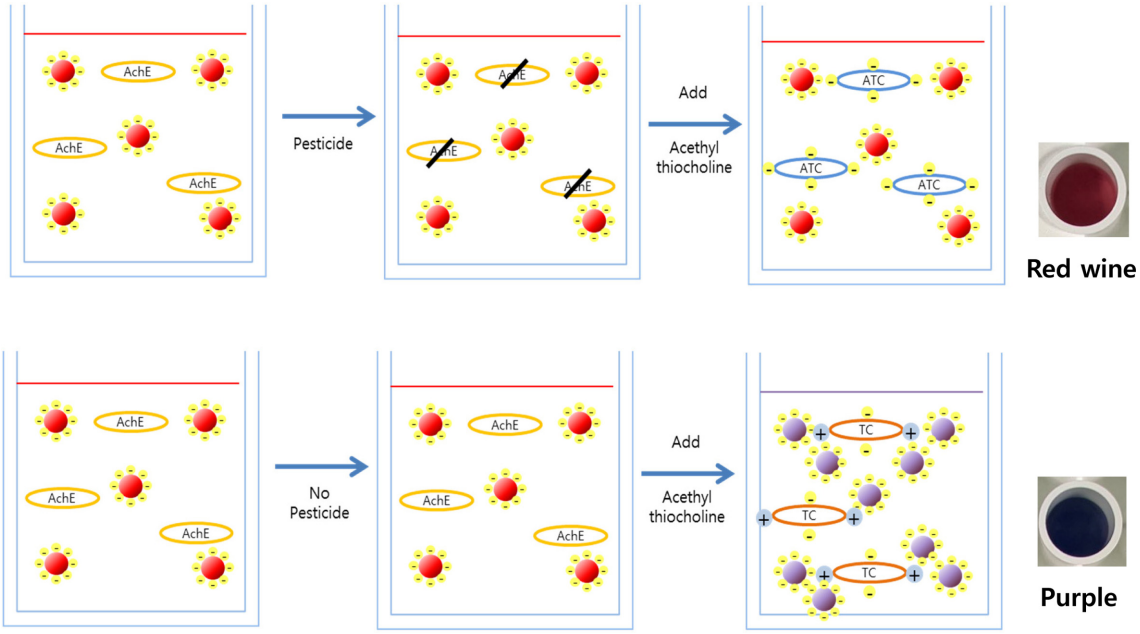

Fig. 1. The principle of the GNP aggregation through the inactivation of AChE by organophosphorus and carbamate pesticides.

성 thiocholine으로 분해된다. 이때 발생한 +전하가 표면에 -전하를 띄는 GNP와 반응하면서 응집을 일으키게 된다. 유기인계 및 카바메이트계 농약이 존재할 경우 AChE의 활성이 저해되어, acetylthiocholine을 thiocholine으로 분해하지 못하기 때문에 GNP의 aggregation이 발생하지 않는다(Fig. 1).

위의 언급한 원리를 이용한 비색-신속 농약 검출법의 실험과정은 다음과 같다. 먼저 시판 혈청 10 μL와 농약 40 μL를 섞고 1분간 반응시킨 후 acetylthiocholine용액 40 μL를 추가로 가하고, GNP 100 μL용액을 이어서 반응시킨 후 Color Meter어플을 이용하여 결과값을 수치화 하였다. 또한비색-신속 농약 검출법의 최적화를 위해 GNP입자의 크기, acetylthiocholine의 농도, 시판 혈청의 희석배수를 결정하였다. 먼저 최적화를 위해 GNP입자 크기에 따른 응집정도를 확인하였다. 직경 10~15, 15~20, 30~35, 35~40 nm의 GNP용액을 이용하여 위에 언급한 실험과정으로 유기인계 농약 dimethyl amine 양성(100 ng/mL)과 음성시료(0 ng/mL)로 처리한 후 금나노 입자의 응집차이를 확인하였고, 가장 큰 응집 차이를 나타내는 GNP 입자를 선정하였다. 두 번째로 acetylthiocholine 농도와 혈청의 희석배수에 따른 비색-신속 농약 검출법의 최적화를 위해 acetylthiocholine을 0.1, 1, 10, 100 mM농도로 준비하고 시판 혈청은 3차 증류수로 1000, 2000, 4000배로 희석한 후 각각의 조건 별로 checkboard titration을 실시하였고,그 결과 가장 큰 차이를 보이는 acetylthiocholine의 농도와 혈청의 희석배수를 선정하였다. 최적화를 위한 실험조건들은 각각 3회씩 반복 실험하였다.

비색 측정

GNP 응집 여부에 따른비색 차이를 측정하는 방법으로 구글 앱스토어[21]에서 제공하는 Color Meter어플을 설치하고 그 어플을 이용하여 RGB 값을 측정하였고 B값과 R값의 차이를 절대값으로 나타내어 GNP의 응집정도를 확인하였다(Fig. 2).

비색농약검출법의 평가

GNP입자 크기, acetylthiocholine의 농도, 그리고 시판혈청의 희석배수를 결정하여 최적화된 비색-신속 농약 검출법의 민감도와 특이성을 확인하였다. 민감도를 확인하기 위해 유기인계 농약은 dimethyl amine, 카바메이트계 농약은 carbofuran을 0, 7.5, 12.5, 25, 50, 100, 500, 그리고 1,000 ng/mL로 각각 준비한 후 비색-신속 농약 검출법으로 확인하였다. 추가로 비색-신속 농약 검출법이 다른 유기인계 및 카바메이트계 농약과 더불어 곡류 등의 농산물에 오염이 가능한 화학물질인 곰팡이독소 등에 대한 반응성을 확인하기 위해 유기인계(dimethyl amine, diazinon, malathion, malaoxon, dicholorvos, paraoxon methyl) 및 카바메이트계(carbofuran, oxamyl) 농약과 곰팡이 독소(aflatoxin B1과 ochratoxin)를 0과 100 ng/mL로 조제한 후 비색-신속 농약 검출법으로 확인하였다. 민감도 및 특이성 평가를 위해 실험은 각각의 조건을 3회씩 반복 실험하였다.

농산물 시료 분석

개발된 비색-신속 농약 검출법의 농산물에 적용 가능성을 확인하기 위해서 상추, 깻잎, 양상추에 대한 시료 전처

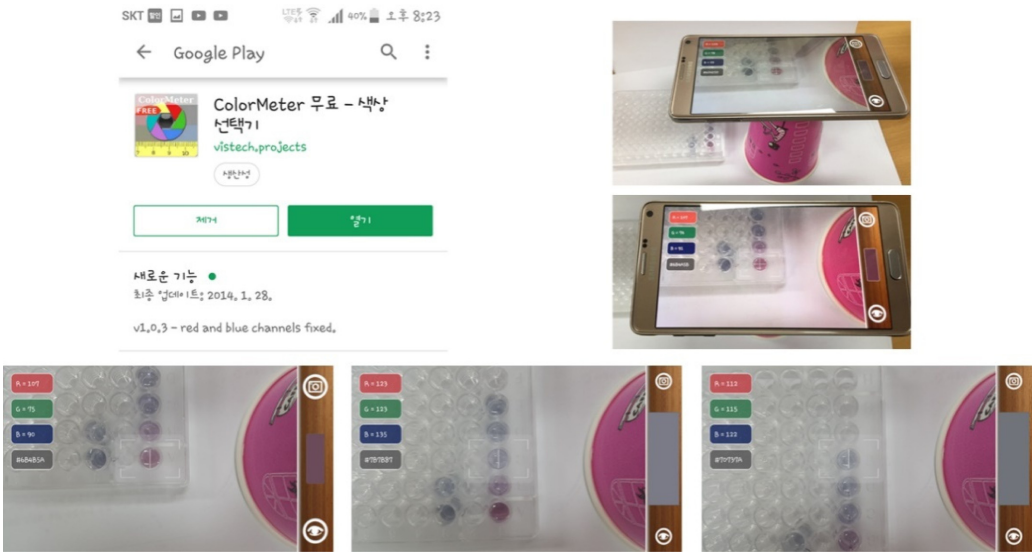

Fig. 2. Processes of color measurement using mobile phone application program, color meter.

리법을 확립하고 임의로 오염시킨 3종의 농산물에 대해서 회수율을 구하였다. 현장용 시료 전처리법으로 시료 1 g에 유기용매 4 mL를 혼합한 후 15분간 추출하고 여과지(Whatman no. 4)를 이용하여 여과하였으며 여과액 40 μL를 비색-신속 농약 검출법의 시료로 사용하였다.전처리법에서 사용되는 추출용매로 에탄올과 메탄올을 비교평가하였다.

추가로농산물에 유기인계(dimethylamine)와 카바메이트계(carbofuran) 농약을 임의로오염을 시킨후 회수율을 확인하였다. 자세히 말하면 시료 1 g의 농산물에 유기인계 농약(dimethyl amine)과 카바메이트계 농약(carbofuran)을 0, 12.5, 25, 50, 100, 500, 1000 ng/g으로 임의로 오염시킨 후 실온에서 1시간 동안 방치시키고 임의로 오염시킨 시료를 앞서 설명한 시료 전처리 방법대로 유기용매 4 mL을 가하고 추출한 후 비색-신속 농약 검출법으로 분석하고 회수율을 확인하였다.

결과 및 고찰

GNP합성 및 직경 확인

비색-신속 농약 검출법에 사용될 GNP를 합성하기 위해 100 mL 0.01% tetrachloroauric acid에 1% sodium citrate를 0.5, 1, 2, 3, 4 mL을 첨가하여 합성하였고 직경을 측정하였다. 그 결과 0.5 mL의 환원제를 첨가한 것은 무색에서 보라색으로만 변하였고, 오랜 시간 반응하여도 더 이상 붉은색으로 변하지 않았다. 직경확인 결과 100 nm 이상의 직경을 가지는 것으로 확인하였고, 일반적으로 직경이 100 nm인 경우에 보라색을 띄며 금나노입자는 이미 응집현상이 야기되었기 때문에 실험에 사용이 부적합하였다.

Table 1. Determination of GNP diameter by adding different volume of reductant

Added reductant volume (mL)	Color of GNP[1)] solution	Diameter GNP (nm)
0.5	purple	>100±2.3
1	red wine	35~40±9.1
2	red wine	30~35±8.5
3	red wine	15-20±4.4
4	red wine	10-15±4.8

[1)]GNP: gold nano particle

그 외 1% sodium citrate를 1, 2, 3, 4 mL씩 넣은 결과에서는 모든 용액이 전형적인 red wine색(붉은색)을 나타내었다. Particle Size & Zeta Potential Analyzer로 직경을 확인 한 결과 1, 2, 3, 4 mL 환원제를 넣어 제조한 GNP의 직경은 각각 35~40, 30~35, 15~20, 10~15 nm로 측정되었다(Table 1). 합성된 GNP용액은 4°C에 보관하면서 GNP 직경에 따른 비색농약측정법의 영향을 확인하였다. 1000배 희석한 시판 혈청 10 μL와 1 mM acetylthiocholine 40 μL를 이용하여 GNP 각각의 직경에 따른 비색-신속 농약 검출법을 적용한 결과 15~20 nm의 GNP 용액에서 aggregation 차이가 가장 크게 나타났으므로 이후의 실험에서는 직경 15~20 nm의 GNP 용액을 사용하였다(Fig. 3).

비색-신속 농약 검출법의 최적화

앞서 선정된 15~20 nm의 GNP용액을 사용하여 acetylthiocholine을 0.1, 1, 10, 100 mM농도와 3차 증류수로 희석한 시판 혈청을 1000, 2000, 4000배로 희석한 후

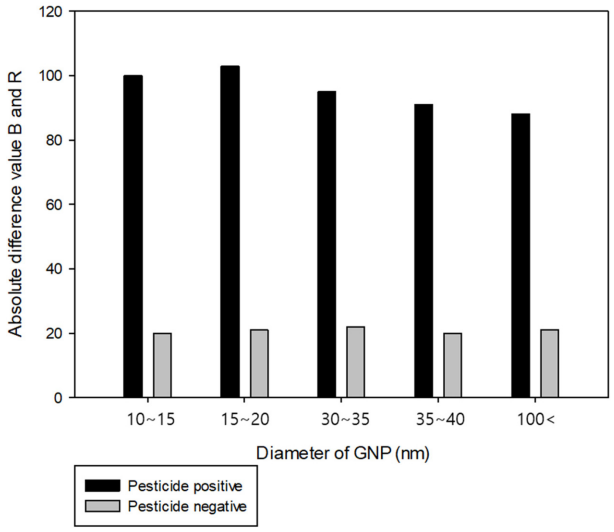

Fig. 3. Differenceof GNP aggregation between negative and positive samples by various GNP diameter.

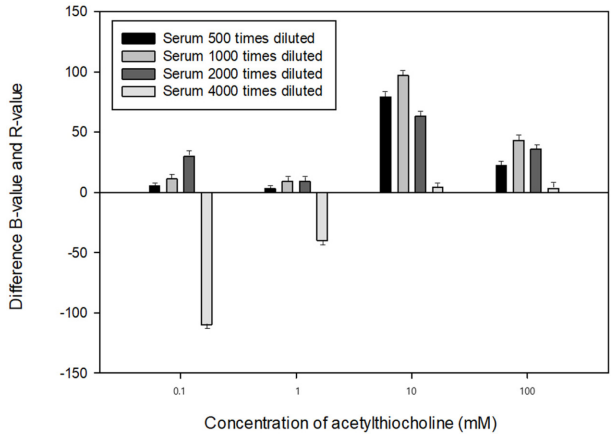

Fig. 4. Determination of optical concentration of acetylthiocholine and optical dilution rates for commercial serum.

최적화를 위해 각각의 조건별로 checkboard titration을 실시하였다. 유기인계 농약인 dimethyl amine을 표준농약으로 선정하여 100 ng/mL 농도로 실험에 사용하였으며 시판 혈청 10 μL와 농약 40 μL, acetylthiocholine 40 μL, GNP 용액 100 μL를 순서대로 반응시켜 1분간 방치 후 Color Meter어플을 사용하여결과를 측정하였다. 수치화 된 결과는 B값과 R값의 차이로 GNP의 응집정도를 확인하였고 checkboard titration 결과 acetylthiocholine의 농도 1 mM과 1000배 희석한 혈청을 사용하였을 때 GNP 응집의 차이가 가장 크게 나타났으므로 위의 조건으로 비색-신속 농약 검출법을 최적화하였으며 이 후의 민감도와 특이성을 확인하는 실험에 적용하였다(Fig. 4).

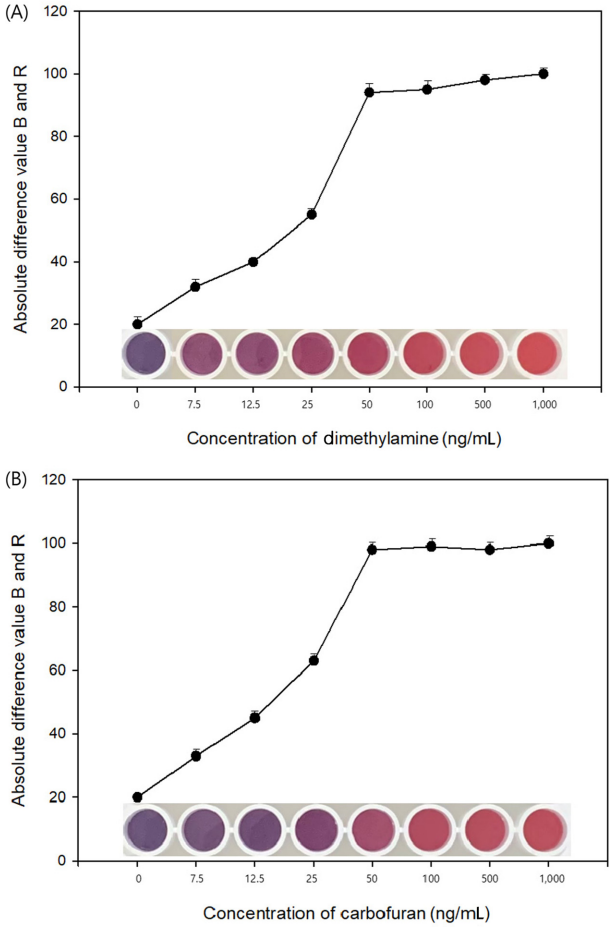

Fig. 5. Standard curves of the colorimetric detection method for organophosphorus (A) and carbamate (B) pesticides.

민감도 및 특이성

민감도를 확인하기 위해 최적화된비색-신속 농약 검출법의 조건으로 유기인계 농약 dimethyl amine과 카바메이트계 농약 carbofuran을 이용하여 위와 같은 실험방법으로 민감도를 분석하였다. 각 농약은 0, 7.5, 12.5, 25, 50, 100, 500, 그리고 1,000 ng/mL로 준비하여 실험에 사용하였으며, 어플을 이용하여 RGB 값을 측정하였고 B값과 R값의 차이를 절대값으로 나타내었다. GNP 용액이 최대로 응집된 값을 20으로 확인하고, 절대값 20 초과를 농약 양성으로, 20 이하는 농약 음성으로 판단하였다. 비색-신속 농약 검출법에 적용한 결과 모두 7.5 ng/mL까지 검출이 가능한 것으로 확인하였다(Fig. 5).

한국작물보호협회의 '농약 성분량 및 종류별 순위'에 따르면 2011년까지 살충제 부분 상위 순위에 유기인계와 카바메이트계 농약이 사용되고 있으며 이 들 농약은 AChE를 억제하는 것으로 잘 알려져 있다[22]. 따라서 유기인계 농약(dimethyl amine, diazinon, malathion, malaoxon, dicholorvos, paraoxon methyl) 6종과 카바메이트계 농약

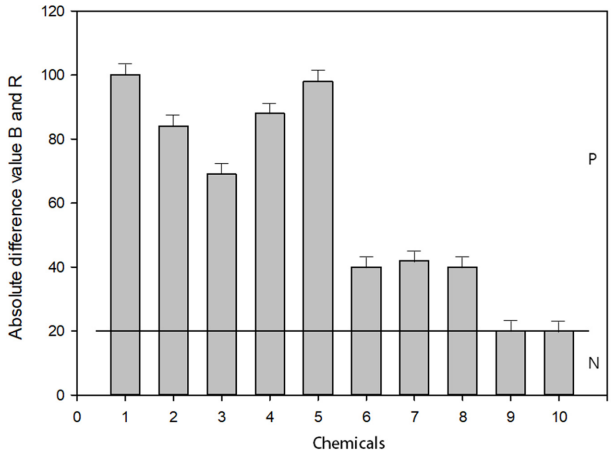

Fig. 6. Specificity of the colorimetric detection method for organophosphorus and carbamate pesticides and mycotoxin.
1:Dimethylamine, 2: Diazinon, 3: Malathion, 4:Malaoxon, 5:Dicholorvo, 6:Paraoxonmethyl, 7:Oxamyl 8:Carbofuran, 9:Aflatoxin B1, 10:Ochratoxin A

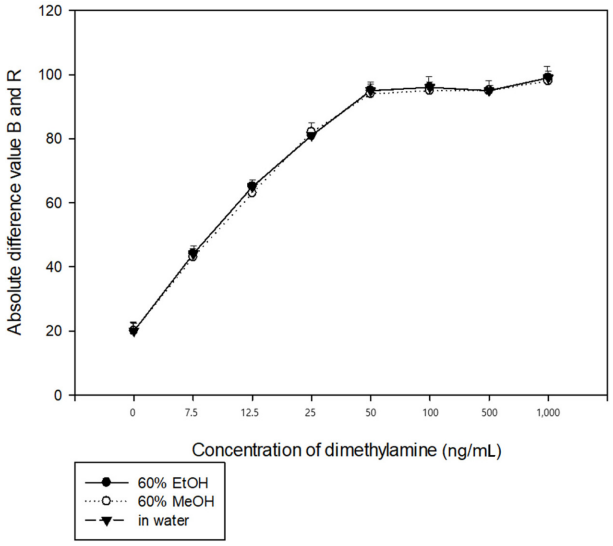

Fig. 7. Comparison of ethanol and methanol as a solvent for the colorimetric detection method.

(carbofuran, oxamyl) 2종을 계열 별 대표농약으로 선정하였고 그 농도를 0 ng/mL과 100 ng/mL로 준비하여 실험에 적용하였다. 그 외 농산물에 농약과 같이 오염될 수 있는 곰팡이 독소에 대한 반응성을 확인하고자 aflatoxin B1과 ochratoxin A를 0 ng/mL과 100 ng/mL 농도로 준비하여 최적화된 비색-신속 농약 검출법을 적용하였다. 그 결과 총 유기인계 5종(dimethyl amine, diazinon, malathion, malaoxon, dicholorvos, paraoxon methyl)과 카바메이트계 2종(carbofuran, oxamyl)에 대해모두 양성 반응성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러나 농약이외에 곰팡이 독소 2종(aflatoxin B1, ochratoxin A)에 대해서는음성결과를 나타내었다(Fig. 6). 이상의 결과로 볼 때, 개발된 비색-신속 농약 검출법은 유기인계와 카바메이트계 농약을 특이적으로 측정할 수 있는 것으로 판단되고, 다른 화학물질에 대해서는 위 양성 결과를 나타내지 않는 것으로 확인되어 농산물 중 농약의 선택적인 측정이 가능한 것으로 판단하였다. 그러므로 본 연구에서 개발된 비색-신속농약 측정법은 기존 AChE를 이용한 농약의 비색분석법(검출한계: 50~2000 ng/mL)보다 민감도(7.5 ng/mL)와 분석시간(5분 이내) 측면에서 매우 개선된 분석법으로 판단된다

회수율

비색-신속 농약 검출법이 농산물에 적용이 가능한지를 확인하기 위해서 상추, 깻잎, 양상추에 대한 시료 전처리법을 확립하고 회수율을 확인하였다. 먼저 농산물 시료에 남아있는 잔류농약을 제거하기 위해 60% 에탄올로 시료를 3번 헹구어 세척한 후 3차 증류수로 남아있는 불순물을 제거하여 실험에 사용하였다. 세척된 농산물 잎의 윗부분을 칼과 핀셋을 이용하여 잘게 자른 후 전자저울을 이용해 시료 1 g을 취하고 conical tube에 담아 60% 에탄올과 메탄올을 각각 4 mL를 혼합하여 15분간 추출하였다. 추출된 용액을 여과지를 이용해 여과한 후 여과액을 이용하여 dimethyl amine 표준용액을 0, 7.5, 12.5, 25, 50, 100, 500, 그리고 1,000 ng/mL로 조제한 후 40 μL를 비색농약 분석법의 시료로 분석하여 유기용매를 선정하였다. 그 결과 본 비색-신속 농약 검출법은 에탄올과 메탄올의 농도에 영향을 나타내지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 7). 그러나 최근 메탄올에 대한 유해성 논란이 커짐에 따라 앞으로의 시료 전처리에 사용되는 유기용매로 에탄올을 선정하여 사용하였다[23].

추가로 상추, 깻잎, 양상추를 농약에 임의로 오염시킨 후회수율을 구하여, 확립된 비색-신속 농약 검출법의 농산물 적용 가능성 여부를 확인하였다. 시료인 3종의 농산물에 유기인계 농약(dimethyl amine)과 카바메이트계 농약(carbofuran)을 0, 12.5, 25, 50, 100, 500, 1000 ng/g으로 임의로 오염시킨 후 실온에서 1시간 동안 방치시켰다. 임의로 오염시킨 시료에 앞서 설명한 시료 전처리 방법대로 60% 에탄올 4 mL을 가하고 추출한 후 여과지를 이용하여 여과하였으며 여과액 40 μL를 최적화된 비색-신속 농약 검출법에 적용하였다. 그 결과 83.85~133.16% 정도의 회수율이 확인되었으며, WHO (world health organization) 산하 codex alimentarius의 기준에 농약의 회수율의 검출기준을 70-120%, RSD ≤ 20%인 것으로 규정하였으므로 본 분석법을 이용한 농약의 회수율은 기준 내에서 적합한 것으로 판단되었고 양성시료에 대해서는 위 음성(false negative)결과를 나타내지 않는 것으로 확인하였다(Table

Table 2. Recovery ratio for artificially contaminated lettuce, sesame, cabbage lettuce by the colorimetric detection method

	Samples	Spiked	Detection	Recoveries (%)
Carbofuran concentration(ng/mL)	Lettuce	0	-	-
		12.5	11.38±0.87	91.1±0.93
		25	24.59±0.55	98.3±0.01
		50	48.07±0.11	96.15±0.86
		100	98.68±0.98	98.15±0.49
		500	506.66±0.37	101.33±0.57
		1000	1088.61±0.76	108.86±0.97
	Sesame leaf	0	-	-
		12.5	11.38±0.99	91.11±0.06
		25	24.18±0.80	96.72±0.15
		50	47.43±0.39	94.87±0.65
		100	97.36±0.56	97.36±0.47
		500	500±0.62	100±0.37
		1000	1063.29±0.66	106.32±0.17
	Cabbage lettuce	0	-	-
		12.5	12.22±0.05	97.77±0.11
		25	23.77±0.24	95.08±0.37
		50	48.71±0.39	97.43±0.46
		100	96.05±0.49	96.05±0.14
		500	433.33±0.57	86.66±0.32
		1000	1063.29±0.30	106.32±0.82
Dimethylamine concentration(ng/mL)	Lettuce	0	-	-
		12.5	13.41±0.87	107.30±0.55
		25	26.28±0.28	105.10±0.51
		50	52.51±0.48	105.02±0.44
		100	99.10±0.30	99.10±0.86
		500	497.70±0.80	99.54±0.73
		1000	1062.08±0.38	106.21±0.99
	Sesame leaf	0	-	-
		12.5	13.99±0.37	89.35±0.23
		25	29.81±0.47	83.85±0.52
		50	54.64±0.78	91.51±0.95
		100	103.02±0.11	97.07±0.63
		500	530.28±0.32	94.29±0.22
		1000	1138.93±0.78	87.80±0.89
	Cabbage lettuce	0	-	-
		12.5	13.99±0.43	111.91±0.49
		25	27.36±0.94	109.43±0.28
		50	56.95±0.44	113.89±0.21
		100	111.84±0.82	111.84±0.70
		500	659.88±0.30	131.98±0.53
		1000	1331.64±0.22	133.16±0.49

2)[24]. 그러므로 최근 PLS법의 제정에 따라 농산물 중 잔류 농약을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법의 필요성이 부각되고 있으며 농약이 검출되지 않아야 하는 친환경 농산물 시료 분석에 본 연구에서 개발한 비색-신속 농약 검출법을 이용한다면 시판 농산물의 유기인계와 카바메이트계 잔류농약을 신속하고 민감도 높게 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

국문 요약

본 연구에서는 시판되고 있는 혈청 내 AChE가 acetylthiocholine과 반응하여 GNP에 aggregation 일으키는

원리를 이용하여 신선채소 농산물 중에 저농도 농약을 신속하고 간편하게 분석할 수 있는 비색-신속 농약 검출법을 개발하는 연구를 수행하였다. 먼저 비색-신속 농약 검출법의 최적화를 위해 GNP 입자의 크기에 따른 응집정도를 확인하여 15~20 nm 직경의 GNP를 선정하였고, 혈청의 희석배수와 acetylthiocholine의 농도를 확인하여 GNP 응집 차이가 가장 큰 혈청 1000배 희석과 acetylthiocholine 1 mM을 최적화 조건으로 선정하였다. 비색-신속 농약 검출법의 평가를 위해 최적화된 비색농약분석법을 이용하여 유기인계 농약은 dimethyl amine으로 카바메이트계 농약은 carbofuran으로 민감도를 분석한 결과 모두 7.5 ng/mL까지 검출이 가능한 것으로 확인되었으며 이는 기존의 비색-신속 농약 검출법과 비교했을 때 높은 민감도와 특이성을 나타내었다. 농약 이외에 화학물질인 곰팡이독소 등에 대한 반응성은 확인되지 않아 높은 특이성을 나타내었다. 또한 상추, 깻잎, 양상추에 대한 시료 전처리법을 확립하고 임의로 오염시킨 3종(상추, 깻잎, 양상추)의 농산물에 대해서 회수율을 확인한 결과유기인계와 카바메이트계 농약을 83.85~133.16% 정도의 회수율이 확인되었다. 이상의 결과 볼 때 본 연구에서 개발한 비색-신속 농약 검출법을 이용한다면 시판 농산물의 잔류농약을 신속하고 민감도 높게 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

Reference

1. WHO(World Health Organization). Definition of Pesticide. Available from: https://www.who.int/topics/pesticides/en/. Accessed February 12 (2019).
2. Chung, S.P., Roh, H.K.:Antidote for organophosphate insecticide poisoning:atropine and pralidoxime, *J. Korean. Med. Assoc.*, **56(12)**, 1057-1066 (2013).
3. Martin, H.: Pesticides Manual, British Crop Protection Council, London, UK pp. 30-100 (1968).
4. Stoytcheva, M.: Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis, Intech Open, London, pp. 3-10, (2011)
5. Ware, G.W.: The pesticide book, 5th Ed. CAB International, Fresno, pp. 212-260 (2000).
6. Choi, S.Y.: food contamination, 1st Ed. Ulsan university press.Ulsan, pp. 158-250 (1994).
7. Lee, Y.D.: The problem is ‘recognition / prejudice’ rather than actual safety, *Agro. news mag*., **27**, 22-25 (2006).
8. Monitoring of Pesticide Residues inEnvironmental-friendly Agricultural Products and TheirSafety Assessment: National Institute of Agricultural Sciences (2012).
9. Kim, H.Y., Lee, K.B.: Content of pesticide contaminants content in organic vegetable, *J. Food Process Pres.*, **11**, 57-62 (2004).
10. Monitoring of Pesticide Residues inAgro-Livestock Products: Ministry of Food and Drug Safety, (2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016).
11. Kim, J.G.: Analysis of pesticide contaminants in food, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, **19**, 90-93 (1993).
12. Available from http://www.nongsaro.go.kr/portal/portalMain, Accessed Feb. 06 (2019).
13. Alvarez, M., Calle, A., Tamayo, J., Lechuga, L.M, Abad, A., Montoya, A.: Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 649-653 (2003).
14. Firdoz, S., Ma, F., Yue, X., Dai, Z., Kumar, A., Jiang, B.: A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water, *Talanta*, **83**, 269-273 (2010).
15. Clara, F.C., Zhi., W., Louise, U., Pommier, J.J., Montury, M.: Focused Microwave Assistance for Extracting Some PesticideResidues from Strawberries into Water before Their Determinationby SPME/HPLC/DAD, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5092-5097 (2001).
16. Bravo, R., Driskell, W.J., Whitehead Jr., R.D., Needham, L.L., Barr, D.B.: Quantitation of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphate Pesticides in Human Urine UsingGC-MS-MS with Isotopic Internal Standards, *J. Anal. Toxicol.*, **26**, 245-252 (2002).
17. Chan, P.Y., Sum, K.W, Cheung, K.Y., Glatz, F.C., Sanderson, J.E., Hempel, A., Lehmann, M., Renneberg, I., Renneberga, R.: Development of a quantitative lateral-flow assay for rapid detection of fatty acid-binding protein, *J. Immune. Meth.*, **279**, 91-100 (2003).
18. Li, Y., Schluesener, H.J., Xu, S.: Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bulletin*, **43**, 29-41 (2010).
19. Hong, S.W., Choi, L.: Automatic flower recognition using smartphones, *JCSE.,* **38**, 462-465 (2011).
20. Frens, G.: Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature*, **241**, 20-22 (1973).
21. Availablefrom https://play.google.com/store/apps/details?id=com.vistechprojects.colormeterfree,Accessed Feb. 21 (2019).
22. Availablefrom https://www.koreacpa.org/bbs/board.php?bo_table=2_5, Accessed May. 21 (2019).
23. Thomas, T.: The toxicity of methanol, *Life Sciences*, **48**, 1031-1041 (1991).
24. Codex alimentarius international food standard: Guidelines on performace criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed, adopted in 2017.