pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 1, pp. 1~8 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.1.1

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

Review

유기인계 및 카바메이트계 농약 신속 검출을 위한 역 Y자 스트립의 개발

이정은[1] · 김솔아[1] · 박현진[1] · 문효영[2] · 심원보[3,4,5]*

[1]경상대학교 응용생명과학부, [2]압티지엠제이㈜, [3]경상대학교 농업생명과학연구원,
[4]경상대학교 스마트팜연구소, [5]경상대학교 농화학식품공학과

Development of an Inverted Y-Shaped Strip for the Detection of Organophosphorus and Carbamate Residual Pesticides

Jeong-Eun Lee[1], Sol-A Kim[1], Hyun-Jin Park[1], Hyoyoung Mun[2], Won-Bo Shim[3,4,5]*

[1]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[2]*Apteasy MJ inc., BI center, 123 Cheomdangwagi-ro, Buk-gu, Gwangju, Korea*
[3]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[4]*Institute of Smart Farm, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*
[5]*Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea*

(Received December 04, 2020/Revised December 22, 2020/Accepted January 7, 2021)

ABSTRACT - The inverted Y-shaped strip detection method based on acetylcholinesterase (AChE) was developed for the rapid detection of organophosphorus and carbamate pesticides. The inactivation of AChE by organophosphorus and carbamate pesticides has been well known. The AChE catalyzes acetylthiocholine into thiocholine having (-) and (+) charges, and the (+) charge results in aggregation of gold nanoparticle (GNP). Malaoxon and carbofuran were used as standard organophosphorus and carbamate for the development of the inverted Y-shaped strip, respectively. In order to optimize the method, various angles of the Y-shaped strip, different types of nitrocellulose membrane, and concentration of AChE were tested as key parameters. The detection limit of the method was 10 ng/mL for both malaoxon and carbofuran pesticides. No cross-reaction was observed to other pesticides such as atrazine, cyanazine, simazine, bifenthrin, boscalid, metalaxyl, and chlorobenzilate. Recoveries from lettuce spiked when known concentrations of malaoxon and carbofuran were found ranging from 96.4 to 100.7% and 81 to 112.7%, respectively. This study suggests that the inverted Y-shaped strip method based on AChE may be a useful tool for the sensitive, specific, rapid detection of organophosphorus and carbamate pesticides in agricultural products.

Key words : Y-shaped strip, Acetylcholinesterase, Organophosphorus, Carbamate pesticides, Gold nanoparticle aggregation

농약의 개발은 인구 증가와 식량난 등의 문제를 해결하기 위해 많은 발전을 해 왔으며, 특히 농약은 농작업의 편의성을 높이고 농작물의 생산량 증가를 위하여 많이 개발되고 있다[1-3]. 하지만 농약의 오남용으로 인하여 환경 오염, 해충의 내성 증가, 새로운 해충의 출현 등의 문제를 야기시키고 있으며 현재 알려진 내분비계 교란물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)의 많은 부분이 농약이 차지하고 있다[4-6]. 이에 세계 각국에서는 농산물의 안전성을 높이고 환경오염문제를 예방하기 위하여 농약잔류허용기준과 농약의 안전사용 기준을 설정하고 있다[7].

또한 국내에서는 2019년 1월부터 농약허용물질목록관리제도 (Positive List System, PLS)를 시행하고 있다. PLS제도는 농산물 재배과정에서는 사용이 허가된 농약을 잔류허용기준 내에서 사용하도록 규정하고, 허가되지 않은 농약의 경우 잔류허용기준인 0.01 mg/kg 이하로 사용하도록 관리하는 제도이며 일부 농산물(밤, 들깨, 참깨, 바나나, 파인애플, 참다래)과 열대과일류는 2016년 12월부터 우선적으로 적용되었고, 2019년 1월 1일부터 모든 농산물에 적용되고 있다[8]. 따라서 PLS 제도에 대응하고 소비자들에게 안전한 농산물을 공급하기 위해서는 농산물 중 잔류하고

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

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

있는 저농도의 농약을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 분석법의 개발이 요구된다.

일반적으로 식품 또는 농산물 중 잔류농약의 검출은 액체크로마토그래피(liquid chromatography, LC), 기체크로마토그래피(gas chromatography, GC), 질량분석기(mass spectrometry, MS) 등 분석장비를 통해 잔류농약의 허용 농도를 측정한다. LC와 GC의 경우 검출 감도가 매우 높고 정확하며 많은 성분을 동시에 분석할 수 있는 장점이 있지만 분석 시료의 전처리에 오랜 시간이 소요되며, 전문적인 인력, 고가의 장비가 수반되어 많은 비용이 드는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고 발전시키기 위하여 새로운 잔류농약 분석법들이 개발되고 있다[9-11].

지난 30년간 농약 검출을 위해 항체, 세포 및 효소 등을 이용한 다양한 형태의 바이오센서가 개발되어왔다. 특히 acetylcholinesterase (AChE)는 농약 검출용 바이오센서에 가장 많이 이용된 효소로 1980년대 중반에 AChE의 저해작용을 기반으로 한 농약 검출용 바이오센서 구조가 처음으로 사용된 이후 다양한 기법으로 활용되었으나[12], 대부분 AChE 반응에서 발생하는 전류를 측정하는 방식의 바이오센서가 개발되어 바이오센서의 안정성을 감소시키는 요인으로 지목되었다[13]. 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위해 항체나 세포 등을 이용한 선택성이 높은 농약 검출용 바이오센서가 다양한 형태로 개발되었으나, 실제 샘플에서의 농약 모니터링을 위해 휴대가 간편하고, 조작이 쉽고, 값이 저렴한 바이오센서의 개발이 여전히 필요한 실정이다[14].

최근에는 금 나노입자(gold nanoparticle, AuNP)를 이용한 바이오센서 시스템이 개발되고 있다[15]. 금 나노입자는 표면에 전기적으로 -전하를 띄고 있어 콜로이드 용액의 형태를 유지하게 되는데, +전하와 반응하게 되면 응집하는 성질을 가지고 있다. 응집이 일어나지 않는 경우는 금 나노입자 고유의 붉은색을 유지하며, 응집이 일어나게 되면 청자색으로 변하며 응집에 따른 입자의 크기도 증가하게 된다. 이러한 금나노입자의 성질을 이용해서 바이오센서와 측면유동스트립(lateral flow strip) 개발이 곰팡이독소, 항생제 및 미생물 분야에서 활발히 진행되고 있다. 하지만 금나노입자를 이용한 농약의 신속진단 기술의 개발은 매우 미흡한 실정이다[16-18]. 따라서, 본 연구에서는 이전 연구[19]에서 AChE가 acetylthiocholine (ATC)을 + 전하와 – 전하를 가진 양극성 thiocholine으로 분해시키고, 이때 발생한 + 전하가 금 나노입자를 응집시키는 현상을 이용한 농약 비색-신속 검출법을 별도의 측정장비 없이 현장에서 신속하게 육안으로 잔류농약의 존재 유무를 판별할 수 있는 역 Y자 형태의 스트립을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

농약 신속 검출을 위한 역 Y자 스트립 원리

역 Y자 스트립 농약 검출법에 사용되는 acetylthiocholine

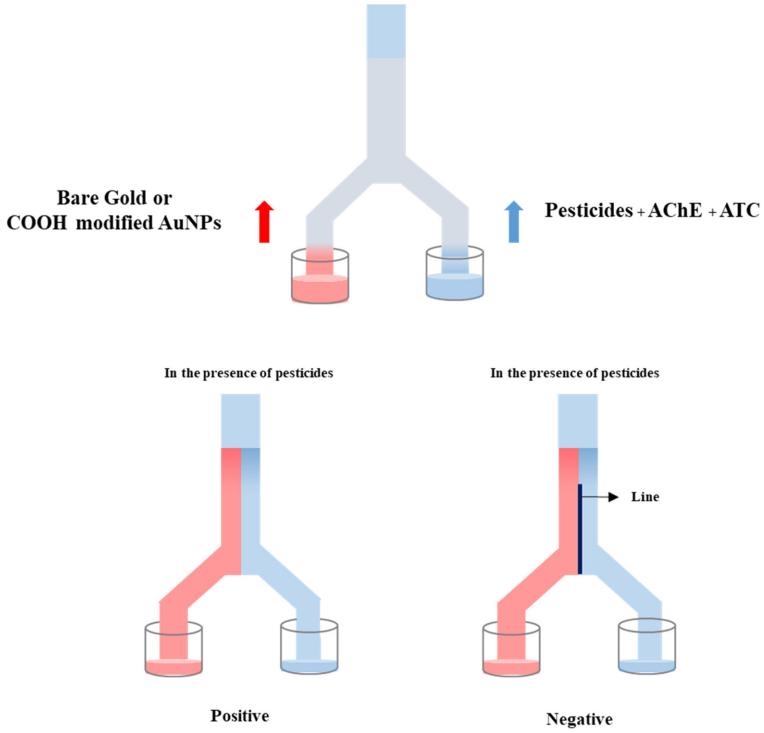

Fig. 1. The scheme of the inverted Y-shape strip using GNP aggregation through the inactivation of AChE by organophosphorus and carbamate pesticides.

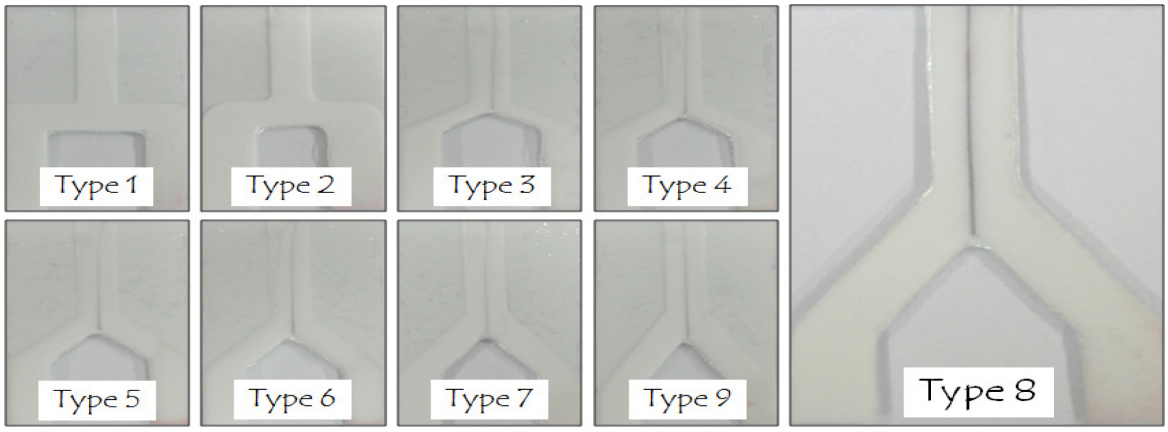

Fig. 2. The results of the aggregation of gold nanoparticles depeding on the channel angle of the reverse Y-shape strip (Channel angle; Type 1=180°, Type 2=180°, Type 3=120°, Type 4=104°, Type 5=90°, Type 6=80°, Type 7=72°, Type 8=64°, Type 9=60°).

(ATC)은 acetylchlolinesterase (AChE)에 의해 +전하와 -전하를 가진 양극성 thiocholine으로 분해되는데, 이때 발생한 +전하가 표면에 -전하를 띄는 금 나노입자와 반응하면서 응집을 일으키게 된다. 반면, 유기인계 및 카바메이트계 농약이 존재할 경우 AChE의 활성을 저해하여, ATC를 thiocholine으로 분해하지 못하기 때문에 금 나노입자의 응집현상이 발생하지 않는다[19]. 이를 2개의 채널을 가진 역 Y자 형태의 스트립에 적용하면 금 나노입자 채널과 시료와 ATC를 반응시킨 채널 간의 이동을 통해 역 Y자 형태의 스트립 중앙에서 만나 유체반응을 일으키며 금 나노입자 응집 시 멤브레인 중앙에서 검은색의 띠 모양을 형성하게 된다(Fig. 1). 본 연구에서 사용된 역 Y자 스트립은 자체적으로 제작한 스트립 절단기를 이용해 제작하였으며, Fig. 1과 같이 2개의 반응 용기 중 하나의 반응용기에는 금 나노입자를, 나머지 하나의 반응용기에는 농약, AChE, ATC을 순차적으로 반응시킨 용액을 반응시킨다. 반응이 끝난 두 용기에 역Y자 스트립의 두개의 채널을 Fig. 1과 같이 담그고 각 용액이 이동시킨 후 두 채널이 만나는 부분에 금 나노입자의 엉김 유무를 확인하였다.

잔류농약 검출을 위한 스트립의 최적화

잔류농약 검출용 스트립을 최적화하기 위해 역 Y자 스트립의 채널각도, 멤브레인 재질 그리고 효소 사용량을 최적화하였다. 먼저, 스트립의 채널각도의 최적화를 위해 Fig. 2과 같이 두 채널이 연결되는 부분의 각도를 각각 180, 120, 104, 90, 80, 72, 64 및 60도로 하여 스트립을 제작하였으며, 특히 180각도를 가진 스트립의 경우는 type 1과 2와 같이 두 가지 형태로 제작하였다.

또한, 채널 각도 결정 후 nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.)의 종류에 따른 영향을 확인하기 위해 HF075, HF090, HF120, HF180 및 HF240 membrane을 이용하여 스트립을 제작한 후 금 나노입자의 엉김 현상이 가장 잘 나타나며 농약 양성과 음성 시료에서 시그널 대비가 가장 큰 membrane을 선정하였다.

추가로 금 나노입자를 엉기게 하는 효소 반응을 유도하는 효소의 농도에 대한 최적화 실험을 실시하였다. 실험은 금 나노입자 전개 부분에 20 mm의 금 나노입자(BBI, Cardiff, U.K.) 10^{12}개를 포함하는 50 μL의 용액을 전개하였고, 효소 반응이 일어나는 부분에서는 기질인 ATC (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 100 μM 농도로 고정하였으며, AChE (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 0, 1.25, 2.5 및 5 mU의 다양한 농도로 하여 유기인계 농약인 말라옥손(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 0과 100 ng/mL로 처리한 후, 두 채널이 만나는 부분에서 금 나노입자의 응집으로 인해서 생성되는 선의 강도를 분석하였고, 양성과 음성 시료에서 시그널 대비가 가장 큰 AChE 농도를 선정하였다.

Membrane 상의 금 나노입자 엉김 확인

최적화된 역 Y자 형태의 잔류농약 검출 스트립 센서에 말라옥손 0과 100 ng/mL를 이용하여 분석 후 양성과 음성시료를 적용한 역 Y자 스트립의 nitrocellulose membrane을 광학현미경(Olympus BX43, Olympus, U.S.A)으로 측정하여 금 나노입자의 엉김 여부를 확인하였다.

역 Y자 스트립의 평가

최적화된 조건으로 제작된 잔류농약 검출 스트립을 다양한 종류의 농약으로 테스트하여 검출 민감도 및 특이성을 확인하였다. 특이성 실험을 위해 사용된 농약은 말라옥손과 카보퓨란 각각의 농약을 0, 10, 50, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/mL의 농도로 제조한 후 역 Y자 스트립에 적용하였다. 추가적으로 각 5종의 유기인계[EPN, dichlorvos,

diazinon, malathion, fenthion (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)] 및 카마메이트계[Carbaryl, carbosulfan, fenobucarb, methomyl, oxamyl (Kemidas, Suwon, Republic of Korea)] 농약과 3종의 트리아진 계열의 농약[simazine, cyanazine, atrazine (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)] 그리고 Kemidas사로부터 추가 구입한 각 1종의 피레스로이드계(bifenthrin), 카복사마이드계(boscalid), 페닐아마이드계(metalaxyl) 및 유기염소계(chlorobenzilate) 농약(Kemidas, Suwon, Republic of Korea)]에 대해서도 검출 적용가능성과 특이성을 확인하였다.

농산물 시료에서의 잔류농약 검출 분석

보다 실제적인 검증을 위하여 신선농산물 상추에 농약을 임의로 오염시켜 개발한 역 Y자 스트립과 HPLC를 이용해 농약 검출 유무를 테스트하였다. 먼저, 역 Y자 스트립을 이용한 검증을 위해 각 1 g씩 절편한 상추에 임의로 말라옥손과 카보퓨란을 0, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/g로 오염시키고 빛이 차단된 곳에서 2시간 동안 방치한 후 60% 에틸알코올 5 mL을 이용해 강하게 추출하고 상층액 25 μL를 AChE와 ATC와 순차적으로 반응시킨 용액을 역Y자 두개의 채널 중 하나의 채널에 반응시켰고, 다른 채널에는 금나노입자 50 μL를 적용시켜 분석하였다. 이때, 개발한 역 Y자 스트립을 이용한 농약의 검출량 및 회수율 측정을 위해 image J 프로그램을 활용하여 역 Y자 스트립의 멤브레인 상에서 형성되는 검은 띠의 색도 차이를 수치화하고, 이를 이용해 정량분석을 실시하였다. 즉, 0, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/g의 말라옥손 및 카보퓨란을 이용해 역 Y자 스트립을 실시하고 image J 프로그램을 활용하여 표준곡선을 그은 뒤, 임의의 농도로 오염시킨 농산물 분석을 통해 도출된 값을 표준곡선에 대입시킴으로써 농산물 중 오염된 농약의 농도를 확인하였다. 이후 농약에 대한 국내 공인분석법인 HPLC를 이용한 잔류농약 검출 유무를 확인하기 위해 식품공전상에 제시된 다종 농약 다성분 분석법 제 2법으로 0, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/g의 말라옥손 및 카보퓨란이 오염된 농산물 시료를 추출 및 분석하였으며, 역 Y자 스트립 및 HPLC 모두 [(검출된 농약의 농도/임의로 오염시킨 농약의 농도) × 100]과 같은 방식으로 회수율을 측정하였다[20].

결과 및 고찰

잔류농약 신속 검출을 위한 역 Y자 스트립 개발

역 Y자 형태의 스트립에서 금 나노입자와 효소-기질-시료 반응물이 각 채널을 따라 이동 후 두 용액이 만나는 지점의 각도는 스트립 상에 금나노입자가 ATC가 AChE에 의해 +전하와 -전하를 가진 양극성 thiocholine으로 분해되고 발생한 +전하와 반응하면서 응집되어 반응선이 생성되는데 있어 중요한 인자로 작용할 수 있다. 따라서, 두 채널이 만나는 각도를 각각 180, 120, 104, 90, 80, 72, 64 및 60도로 스트립을 제조한 뒤 실험한 결과, Fig. 2에서와 같이 60-104 도에서 선명한 금 나노입자의 엉김 현상을 확인할 수 있었으며, 특히 64의 각도에서 금 나노입자의 엉김 현상이 가장 크게 발생하였기 때문에 역 Y자 형태의 스트립 센서의 최적화된 채널 각도는 64도로 결정하였다.

또한, 역Y자 스트립의 주재료인 membrane도 그 종류에 따라 유체의 속도 등이 변수로 작용할 수 있다. 일반적으로 Millipore사에서 판매하고 있는 membrane의 경우 4 cm 길이, 0.5 cm 폭을 기준으로 유체가 흘러가는 속도에 따라 스트립의 구성을 구분하고 있다. 본 연구에서는 4 cm의 스트립을 75, 90, 120, 180 및 240초에 이동할 수 있는 Millipore사의 HF075, HF090, HF120, HF180 및 HF240 멤브레인을 이용해 스트립을 제작하고 그 영향을 실험하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 HF075, HF090와 HF120 membrane을 이용하여 제작한 스트립에서 농약 음성 시료 테스트에서는 반응선(금 나노입자의 엉김 현상)이 확인되었다. HF075 membrane를 이용한 스트립에서 농약 양성과 음성시료 모두 반응성이 확인되었고, HF120 membrane

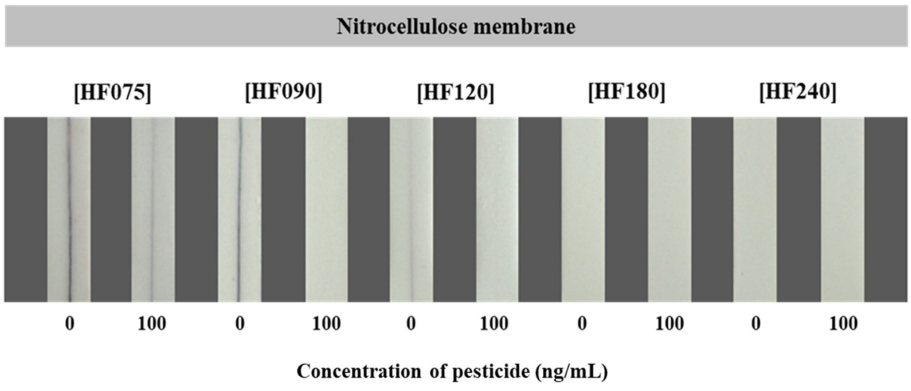

Fig. 3. Selection of optimal nitrocellulose membrane for the inverted Y-shape strip.

의 경우는 스트립에서 농약 양성 시료에서는 반응선이 확인되지 않았으나 농약 음성의 시료에서도 반응선이 HF075와 HF090 membrane을 이용한 스트립에 비해 약하게 생성되는 것을 확인할 수 있어 검출법 개발에 적합하지 않은 것으로 확인되었다. 그러나 HF090 membrane을 스트립에 적용한 결과에서는 금 나노입자의 엉김 현상이 양성과 음성에서 가장 큰 차이를 확인할 수 있었고, 최적화를 위한 membrane으로 HF090을 선정하였다.

마지막으로 역Y자 스트립 상의 금 나노입자 엉김반응에 있어서 AChE의 사용양에 대한 최적화 실험을 실시하였다. 먼저, 역Y자 스트립 두개의 채널 중 하나의 채널에는 10^{12}개 수준의 금 나노입자 용액 50 μL를 전개를 시키고, 다른 하나의 채널에 AChE (25 μL)를 0, 1.25, 2.5와 5 mU의 다양한 농도로 하여 유기인계 농약인 말라옥손(25 μL)을 0과 100 ng/mL와 먼저 섞어주고 바로 2 μL의 ATC (100 μM)을 바로 섞은 용액을 전개시켰다. 그 결과, 말라옥손 100 ng/mL가 적용된 경우, AChE가 2.5 mU 이하일 때 농약에 의해 효소가 비활성화되어 기질을 분해하지 못하고 어떠한 농도에서도 금 나노입자가 엉기지 않는 것을 확인할 수 있었고, 농약을 적용하지 않은 경우에는 효소가 활성화되어 어떠한 농도에서도 금 나노입자가 엉김을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러므로 본 연구에서는 잔류농약 검출용 스트립에 적용하는 최적 효소의 농도로 2.5 mU을 선정하였다.

광학현미경을 통한 membrane 상 금나노입자 엉김 확인

앞서 최적화된 조건(채널각도 64도, HF090 membrane, AChE 농도 2.5 mU)으로 제작된 역Y자 스트립을 이용하여, 유기인계 농약 말라옥손 양성(100 ng/mL)와 음성(0 ng/mL)를 분석한 후 membrane 상의 반응선을 광학현미경으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 역Y자 스트립의 원리와 같이 말라옥손 100 ng/mL 처리한 스트립의 membrane 상에서는 반응선이 확인되지 않았고, 말라옥손 0 ng/mL의 경우는 membrane 상에서는 반응선이 확인되었다. 이러한 결과는 앞서 설명한 역Y자의 원리에서 설명한 바와 같이 AChE가 농약에 의해 활성이 저해되었고 ATC를 +전하와 -전하를 가진 양극성 thiocholine로 분해하지 못하여 금나노입자의 엉김현상이 발생하지 않았고, 농약 음성의 경우는 반대로 AChE에 의해 ATC가 +전하와 -전하를 가진 양극성 thiocholine로 분해되어 금나노입자 엉김이 유도되어 membrane 상에 반응선을 나타낸 것으로 확인되었다.

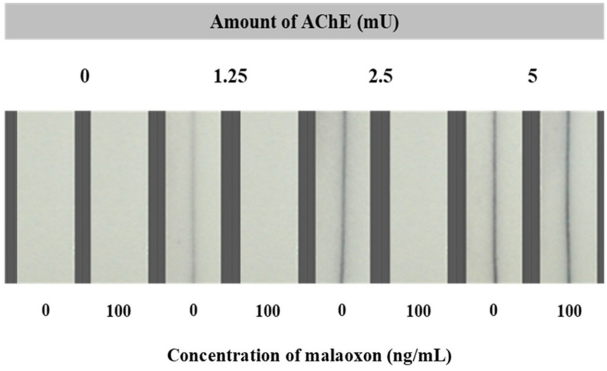

Fig. 4. Determination of optimal concentration of acetylcholinesterase (AChE).

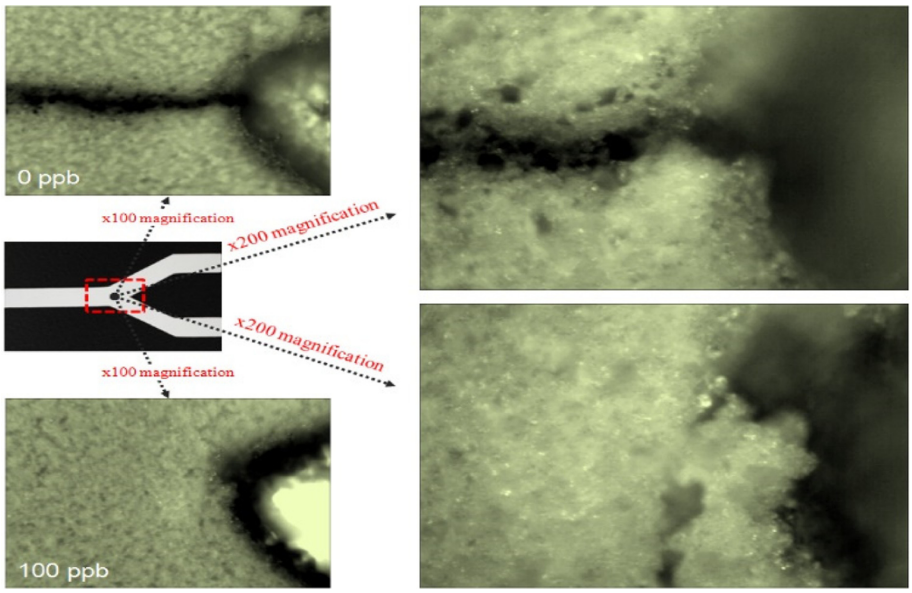

Fig. 5. The optical microscope images of GNP aggregation on the membrane.

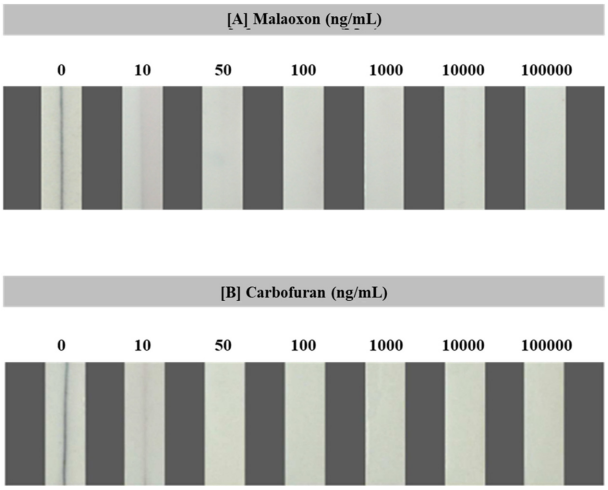

Fig. 6. Detection limits of the inverted Y-shape strip test for the detection of organophosphorus(A) and carbamate(B) pesticide.

잔류농약 검출 스트립을 이용한 농약 검출한계 및 특이성 확인

2019년에 시행된 PLS 제도에 의해 농약 잔류 허용기준이 설정되지 않은 농산물에 대해 잔류농약의 최대 허용기준치가 10 ng/mL로 규제됨에 따라, 본 연구에서는 말라옥손과 카보퓨란 2종의 농약을 각각 0, 10, 50, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/mL의 농도로 제조 후 개발한 역 Y자 스트립에 적용한 결과 Fig. 6에서와 같이 50-100,000 ng/mL 농도의 농약을 적용한 조건에서는 스트립상에서 반응선(금 나노입자의 엉김 현상)이 확연하게 나타나지 않았으나, 10 ng/mL 농도의 농약을 적용한 스트립에서는 희미하게 반응선이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 농약을 처리하지 않은 조건과 비교하였을 때 반응선의 형성 정도가 아주 희미하게 관찰되었기 때문에 육안으로도 10 ng/mL 수준의 농약을 충분히 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

추가적으로, 각 5종의 유기인계(EPN, dichlorvos, diazinon, malathion, fenthion) 및 카바메이트계(carbaryl, carbosulfan, fenobucarb, methomyl, oxamyl) 농약과 3종의 트리아진(triazine) 계열의 농약(simazine, cyanazine, atrazine) 그리고 각 1종의 피레스로이드(bifenthrin), 카복사마이드(boscalid), 페닐아마이드(metalaxyl) 및 유기염소(chlorobenzilate) 계열의 농약을 10 ng/mL 농도로 제조하여 역 Y자 스트립에 적용한 실험 결과에서도 각 5종의 유기인계 및 카바메이트계 농약을 제외한 나머지 계열의 농약을 처리한 스트립 상에서만 금 나노입자의 엉김 현상이 특이적으로 발생하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

신선농산물 중 농약 검출에 적용

개발한 역Y자 스트립을 이용한 농산물 중 농약의 검출 여부를 확인하기 위해 시중에서 판매하는 상추를 구매하여 농약을 임의로 오염시키고, 개발한 역 Y자 스트립으로

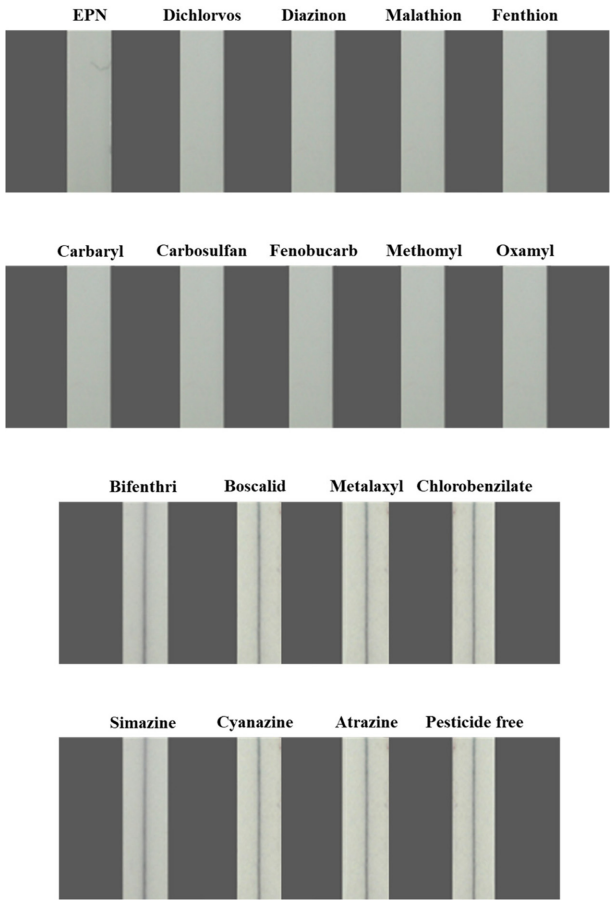

Fig. 7. Determination of cross-reactivity of the inverted Y-shape strip for organophosphorus (EPN, dichlorvos, diazinon, malathion, fenthion), carbamate (carbaryl, carbosulfan, fenobucarb, methomyl, oxamyl), pyrethroids (bifenthrin), carboxamide (boscalid), phenylamide (metalaxyl), organochloride (chlorobenzilate), and triazin (simazine, cyanazine, and atrazine) classes pesticides.

분석함으로써 농산물 시료적용 가능성을 확인하고, 국내 농산물 잔류농약 공인분석법인 HPLC와의 검출률을 비교·분석하였다. 먼저 역 Y자 스트립의 적용을 위해 절편한 상추 1 g에 말라옥손과 카포퓨란을 각각 0, 100, 1,000, 10,000, 100,000 ng/mL 농도로 오염시킨 후 앞서 설명한 방법으로 추출과정을 수행하였고, 추출액을 역Y자 스트립으로 분석한 뒤 image J 프로그램을 이용하여 수치화하였다. 추가로 본 연구에서 개발한 역 Y자 스트립으로 분석한 결과를 HPLC로 분석한 결과와 비교하였을 때, Table 1과 같이 HPLC와 역Y자 스트립 분석결과가 유사하게 확인되었고, 말라옥손은 96.4에서100.7%, 카보퓨란은 81에서112.7%의 회수율이 확인되었다. WHO (World Health Organization) 산하 codex alimentarius의 기준에 의하면 농약 회수율 기준을 70-12%, RSD ≤20% 인 것으로 규정하였기 때문에 본 연구에서 개발된 역Y자 스트립을 이용한 농약의 회수

Table 1. Recovery ratio for artificially contaminated lettuce by the inverted Y-shape strip

Pesticides	Spiked pesticides (ng/g)	HPLC		Inverted Y-shaped strip	
		Detected (ng/g)	Recovery (%)	Detected (ng/g)	Recovery (%)
Malaoxon	0	ND	-	ND	-
	100	103.9±0.05	103.9±0.03	96.4±0.02	96.4±2.41
	1000	926.3±0.03	92.6±0.04	997.7±0.41	99.8±0.44
	10000	9,927.3±0.05	99.2±0.05	9,970.8±0.04	99.7±0.48
	100000	97,327.3±0.32	97.3±0.31	100,674.4±1.81	100.7±1.82
Carbofuran	0	ND	-	ND	-
	100	91.8±0.08	91±8	81.2±0.09	81±0.9
	1000	812.9±0.68	81±7	894.3±1.42	89±14
	10000	10,832±0.02	108±8	8,462±0.18	84±6
	100000	84,244±0.39	84±13	112,036±0.36	112±3.6

ND: not detected

율이 기준 내에서 적합하여 실제 시료 적용에 이용될 수 있는 것으로 판단되었다[21].

국문요약

본 연구에서는 농약의 음성시료에서는 acetylcholinesterase와 acetylthiocholine을 반응시켜 +전하와 -전하를 가지는 thiocholine으로 분해되어 금 나노입자를 응집시켜 역 Y자 스트립상에서 청자색의 반응선(띠)을 형성하고 양성 시료에서는 생성시키지 않는 원리를 이용한 신속 농약 검출법을 개발하였다. 개발한 분석법은 유기인계 농약 말라옥손과 카바메이트계 농약 카보퓨란을 각각 10 ng/mL 수준까지 검출이 가능한 것으로 확인되었으며, 2종의 유기인계와 카바메이트계 농약(EPN, dichlorvos)에 대해 추가적으로 검출 한계를 확인한 결과에서도 10 ng/mL 수준까지 모두 검출 가능함을 확인할 수 있었다. 그러나 3종의 트리아진 계열의 농약과 각 1종의 피레스로이드, 카복사마이드, 페닐아마이드 및 유기염소계열의 농약에 대해서는 반응성이 없는 것으로 확인되어 유기인계와 카바메이트계 농약 분석에 적용이 가능한 것으로 확인되었다. 마지막으로, 임의로 오염시킨 농산물 시료를 대상으로 분석법의 회수율을 확인한 결과, 말라옥손에 대해서 96.4에서100.7%, 카보퓨란은 81에서112.7%의 회수율이 확인되어 본 연구에서 개발한 역 Y자 스트립을 농약 검출법으로 이용한다면 농산물과 농업환경 중 존재하는 유기인계 및 카바메이트계 잔류농약을 신속하게 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jeong-Eun Lee https://orcid.org/0000-0002-0790-8578
Sol-A Kim https://orcid.org/0000-0002-4055-7511
Hyun-Jin Park https://orcid.org/0000-0001-6240-0833
Hyoyoung Mun https://orcid.org/0000-0003-4456-496x
Won-Bo Shim https://orcid.org/0000-0003-1800-6091

References

1. Nam, S.M., Lee, H.R., Lee, J.M., Removal efficiency of residual pesticides during processing of Perilla Jangachi preparation. *J. Korean Soc. Food Cult.,* **18**, 562-568 (2003).
2. Hwang, I.S., Oh, Y.J., Kwon, H.Y., Ro, J.H., Kim, D.B., Moon, B.C., Oh, M.S., Noh, H.H., Park, S.W., Choi, G.H., Ryu, S.H., Kim, B.S., Oh, K.S., Lim, C.H., Lee, H.S., Monitoring of pesticide residues concerned in stream water. *Korean J. Environ. Agric*., **38**, 173-184 (2019).
3. Cho, T.S., Moon, Y.H., Recognition of fanner and urban resident on pesticide toxicity. *Korean J. Pestic. Sci.,* **4**, 48-55 (2000).
4. Lee, S.H., Hong, Y.P., Seo, S.Y., Kim, Y.G., Choi, J.H., Identification, synthesis, and biological activities of cyclic L-prolyl-L-tyrosine. *J. Korean Chem. Soc.,* **56**, 661-664 (2012).
5. Turgut, C., The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Küçük Menderes River in Turkey, 2000–2002. *Environ. Int.,* **29**, 29-32 (2003).
6. Kim, H.Y., Park, G.H., Park, J.H., Jin, H., Kim, J.S., Eu, G.J., Cho, H.S., Kang, G., Lee, M.S., Song, B.H., Shin, J.S., Cho, M.H., Effects on EDC-like farming chemicals in aquatic organism. *Korean J. Pestic. Sci.*, **7**, 188-197 (2003).
7. Kang, G.W., Lee, G.G., Food safety and instrumental analysis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **16**, 39-41 (2011).
8. Lee Y. D., Status of Residual Positive list System(PLS) Sub-

stances in Foods. *Korean J. Environ. Agric*., 29-50 (2020).
9. Kim, M.O., Hwang, H.S., Lim, M.S., Hong, J.E., Kim, S.S., Do, J., Choi, D.M., Cho, D.H., Monitoring of residual pesticides in agricultural products by LC/MS/MS. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **42**, 664-675 (2010).
10. Kim, W.S., Son, Y.W., Jeong, J.Y., An, K.A, Hong, M.K., Im, M.H., Lee, H.J., Lee, B.H., Park, H.J., Kim, B.G., Kim, Y.S., Kim, S.M., Development of simultaneous analytical method for various residual pesticides using GC-ECD. *J. Environ. Health Sci.*, **27**, 88-92 (2001).
11. Chio, Y.H., Nam, H.S., Hong, H.M., Lee, J.H., Chae, K.R., Lee, J.O., Kim, H.Y., Yoon, S.H., Development of rapid analysis method for pesticide residues by GC-MS/MS. *Korean J. Pestic. Sci.,* **9**, 292-302 (2005).
12. Pundir, C.S., Chauhan, N., Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem*., **429**, 19-31 (2012).
13. Du, D., Huang, X., Cai, J., Zhang, A., Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. *Biosens. Bioeletron*., **23**, 285-289 (2007).
14. Verma, N., Bhardwaj, A., Biosensor technology for pesticides- a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **175**, 3093-3119 (2015).
15. Dykman, L., Khlebtsov, N., Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2256-2282 (2012).
16. Wu, S.W., Yu, Y.A., Liu, B.H., Yu, F.Y., Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting citrinin in monascus fermented food. *Toxins*, **10**, 354 (2018).
17. Jia, M., Liu, J., Zhang, J., Zhang, H. A., An immunofiltration strip method based on the photothermal effect of gold nanoparticles for the detection of Escherichia coli O157: H7. *Analyst*, **144**, 573-578 (2019).
18. Peng, J., Wang, Y., Liu, L., Kuang, H., Li, A., Xu, C., Multiplex lateral flow immunoassay for five antibiotics detection based on gold nanoparticle aggregations. *RSC Adv.*, **6**, 7798-7805 (2016).
19. Kim, H.I., Lee, J.E., Kim, S.A., Moon, H.Y., Cho, S.R., Shim, W.B., Development of a colorimetric rapid detection method. *J. Food Hyg. Saf.,* **34**, 269-276 (2019).
20. Ministry of Food and Drug Safety, Analytical manual for pesticide residues in foods, 5th Ed., Korea (2017).
21. Codex alimentarius international food standard: Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed, adopted in 2017.