

GC를 이용한 어패류속의 마이크로시스틴 정량분석

表東震* · 李學株 · 朴權瑛 · 申鉉斗

강원대학교 자연과학대학 화학과

(1998. 4. 17 접수)

Quantitative Analysis of Microcystins in Shellfish Using GC

Dongjin Pyo*, Hakjoo Lee, Keunyoung Park, and Hyundu Shine

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received April 17, 1998)

요약. 어패류 속의 마이크로시스틴은 다른 단백질과 서로 결합하여 존재하기 때문에 이를 정확하게 정량 분석하기는 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 마이크로시스틴의 가장 특징적인 Adda부분을 화학적으로 잘라내면 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid(MMPB)라는 물질이 생성된다. 이 물질을 에스테르화시켜서 GC로 분석하는 방법을 이용하여 어패류 속의 마이크로시스틴을 정확하게 정량분석할 수 있었다.

ABSTRACT. It is very difficult to analyze microcystins quantitatively in shellfish, since microcystins in shellfish easily combine with other proteins. Therefore, in this study, we produced 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) by separating Adda, the most characteristic part of microcystins, from the complexes of proteins and microcystins. MMPB was esterified and used for the quantitative analysis of microcystins in shellfish using GC.

서 론

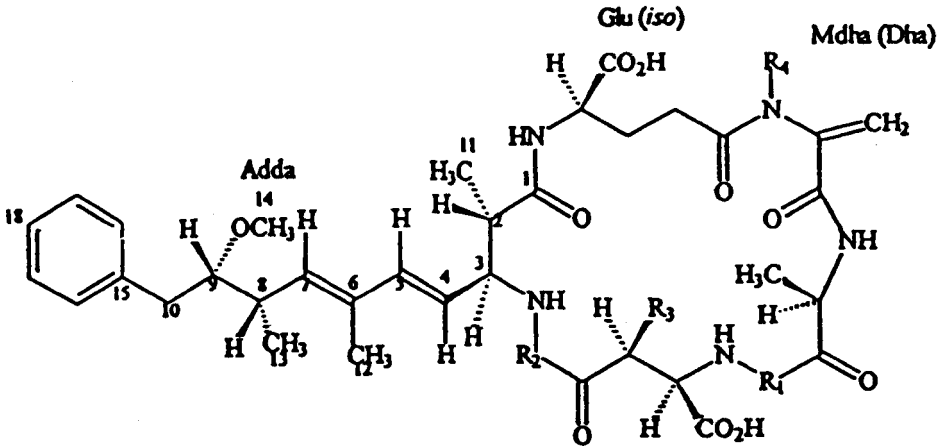
호수에 부영양화가 일어나고 수온, 햇빛 등의 환경요인이 조류 성장에 최적조건으로 작용하면 "물꽃(water bloom)"이라고 불리는 조류의 대발생이 진행되는데 특히 담수에서는 주로 Microcystis, Anabaena, Oscillatoria 등의 남조류가 우점하게 된다. 담수생태계에서 이러한 물꽃현상은 악취를 유발하게 되고, 남조류가 분비하는 독성물질로 인하여 동물에 대한 피해가 보고되어 왔다.^{1,2}

독성물질을 발생시키는 남조류 중에서 세계적으로 가장 먼저 알려지고 대표적인 종이 Microcystis aeruginosa로 국내 대부분의 부영양호에서 하계에 우점종으로 나타나고 있다. 이 종에 의한 가축의 피해는 이미 1940년대에 보고되었고, 이것을 발생시키는 독성물질은 Microcystin이라고 불리는 간장독성물질임이 밝혀졌다.

지금까지 알려진 20여 가지의 Microcystins는 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 이러한 특

징들로는 모두가 7개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이룬 형태를 취하고 있으며 그 기본적인 구조는 γ -linked D-glutamic acid(Glu), N-methyldehydroalanine(Mdha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyl-deca-4,6-dienoic acid(Adda) 그리고 두 개의 L-amino acids로 구성되어 있다. Nodularin은 Microcystins과 구조가 비슷하나 5개의 펩타이드 고리를 이루고 있는 것이 다르다고 할 수 있다. Fig. 1은 대표적인 남조류 독성물질인 Microcystins의 구조를 보여주고 있다.

Microcystin에 의한 소, 양 등의 가축피해는 1940년대에 이미 보고되었고, Ashworth와 Mason(1946)은 Microcystin을 쥐에 투여했을 때, 간장에 피가 맺히는 현상을 최초로 발견하였다. 실험적으로 쥐 몸모트등에 Microcystin을 투여하면 주로 간장에 출혈을 일으켜서 죽게된다.^{3,4} Microcystin에 의한 어패류의 피해는 많이 보고되지 않았지만 무지개 송어와 금어의 복강 내에 투여하면 포유류와 마찬가지로 간장에 출혈



Adda : 3-amino-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyl-deca-4,6-dienoic acid

β -Me-Asp (iso)
(Asp (iso))

Mdha : N-methyldehydroalanine

	R1	R2	R3	R4	MW
microcystin LA	Leu	Ala	CH ₃	CH ₃	909
microcystin LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	994
microcystin YR	Tyr	Arg	CH ₃	CH ₃	1044
microcystin RR	Arg	Arg	CH ₃	CH ₃	1037
microcystin YM	Tyr	Met	CH ₃	CH ₃	1019
microcystin YA	Tyr	Ala	CH ₃	CH ₃	956
microcystin LY	Leu	Tyr	CH ₃	CH ₃	1001
microcystin FR	Phe	Arg	CH ₃	CH ₃	1028
microcystin LABa	Leu	Aba*	CH ₃	CH ₃	923
3-desmethylnmicrocystin LR	Leu	Arg	H	CH ₃	980
7-desmethylnmicrocystin LR	Leu	Arg	CH ₃	H	980
3,7-desmethylnmicrocystin LR	Leu	Arg	H	H	966
3-desmethylnmicrocystin RR	Arg	Arg	H	CH ₃	1023

*L-aminoisobutyric acid

Fig. 1. Structure of Microcystins.

을 일으켜서 죽게 된다.^{5,6} 이 독소의 동물성 플랑크톤에 대한 영향은 생존율과 동화속도의 저하, 치사영양 유발을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁷

최근 상수원으로 이용되고 있는 국내 대부분의 호수에도 가축이나 어류 등의 동물 배설물, 가정하수, 농경지의 비료 등에 의한 인의 대량유입으로 여름철에 남조류 bloom이 흔하게 발생되고 있다. 앞으로 남조류로 오염된 어패류를 먹고 질병이 유발될 위험성을 방지하기 위해서라도 어패류 속에 잔류하는 마이크로시스틴의 정확한 측정법이 시급히 확립되어야 한다. 여름철 남조류가 대량 번식할 때 호수에서

잔류하는 어패류는 체내에 남조류 독성물질을 축적하고 있을 가능성이 높으며 그것을 우리가 섭취하였을 때 건강상의 문제를 일으킬 여지가 있다. 따라서 어패류에 잔류하는 마이크로시스틴의 양을 정확히 측정할 수 있는 방법을 개발하는 것이 매우 중요하다고 생각된다. 그런데 어패류 속에 잔류하는 cyanobacteria 독소는 다른 단백질과 결합할 가능성이 많기 때문에 마이크로시스틴 자체를 분석하는 것보다 마이크로시스틴을 강산화제로 처리하여 가장 특징적인 부분만 잘라내면 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid(MMPB)라는 물질이 생성된다. 이 물질

을 에스테르화시켜서 GC로 분석하는 방법이 가장 합리적인 표준 분석법이 될 수 있으리라 생각된다.^{8,9}

본 연구에서는 이를 위해 마이크로시스틴을 MMPB로 만드는 자세한 공정의 개발과 어패류 시료의 효과적인 전처리법을 개발하였으며, GC 실험을 통하여 실제로 어패류 속에 축적된 마이크로시스틴을 분석, 정량할 수 있었다.

실 험

호수에서 채집된 어패류 시료로부터 여러 가지 불순물을 제거하기 위해서 고체상 추출법이 이용되었으며 ODS(Octadecylsilane, C₁₈, J.T. Baker) cartridge를 사용하였다. 남조류 오염이 심한 강에서 채집된 어패류 중 분석하고자 하는 부위를 떼어낸 후 잘게 자르고 -60°C 이하에서 얼린다. 그런 다음 동결건조기를 이용하여 수분을 완전히 제거하여 분말상태로 만들고, 이 분말시료 0.5 g을 20% acetic acid 10 mL로 10시간 추출하기를 3회 반복한다. 이렇게 추출한 시료를 14,000 rpm으로 60분간 원심분리하고 어패류 속에 들어있는 지방을 제거하기 위해서 diethyl ether를 사용하여 세척하였다. 이것을 여과하여 3 mL ODS cartridge에 주입하고, 이 cartridge는 세 가지 서로 다른 용액으로 단계적으로 씻어줌으로써 가능한 한 불순물들을 많이 제거하였다. 먼저 methanol:0.05 M phosphate buffer(pH2.4)(4:6)용액 10 mL로 씻어주고, 두 번째는 isopropanol:0.01 M phosphate buffer(pH2.1)(2:8)용액 3 mL, 마지막으로 H₂O 10 mL로 씻어주고 100% methanol 15 mL로 용출시켜서 회전증발기로 농축한다. 이렇게 농축한 시료는 90% acetic acid 2 mL에 용해되어 MMPB를 생성시키기 위하여 강산화제와 화학반응을 하게 된다.

본 실험에서 사용한 GC/MS는 JEOL사 기기(Model:JMS-AM 150, JEOL, Japan)이며 Quadrupole방식이다. GC 컬럼으로는 DB-1 capillary column (0.32 mm×30 m)을 사용하였으며 이동상으로는 헬륨기체를 사용하였다. 분석을 위하여 사용한 온도프로그램은 초기온도를 80°C에서 2분 동안 유지하고 승온 속도는 8°C/min로 올리면서 최종온도 260°C까지 가열하였다. 효과적인 검출을 위하여 질량분석기와 불꽃이온화검출기(FID)를 동시에 사용하였다.

결과 및 고찰

마이크로시스틴의 화학적 분해를 통한 MMPB의 생성. 어패류 속에 잔류하는 마이크로시스틴을 정량분석 하기 위해서 본 실험실에서는 종래의 HPLC 방법^{10,11}으로 여러 차례 실험하였으나 좋은 결과를 얻을 수 없었다. 이것의 주된 원인은 마이크로시스틴이 어패류 체내의 단백질과 강하게 결합하기 때문이다. 본 연구에서는 마이크로시스틴의 가장 특징적인 Adda 부분을 화학적으로 떼어내어 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid(MMPB)라는 물질을 생성시킨 다음 이를 정량함으로써 어패류 체내에 축적된 마이크로시스틴의 양을 정확히 산출해내는 방법을 고안하였다. 마이크로시스틴으로부터 MMPB를 만드는 구체적인 방법은 아래와 같다.

(1) 동결건조된 어류(약 0.2~1.0 mg)에 90% Acetic acid 2 ml를 가하여 녹인다.

(2) 산화제(0.024 M KMnO₄+0.020 M NaIO₄)를 첨가한다.

(3) Magnetic Stirrer로 4시간 정도 stirring한다. 이때 색깔이 사라지면 산화제를 첨가한다.

(4) 20% NaHSO₃ 0.04 ml를 가한다. (탈색됨)

(5) H₂SO₄ 0.01 ml를 가한다.

(6) Separatory funnel에 혼합용액과 ethyl acetate 2 ml를 넣고 3회 추출한다.

(7) 상층액만 받아서 회전농축기로 ethyl acetate를 모두 날려보내고 나면 MMPB를 얻게된다.

(8) MMPB의 methylation을 위해 14% BF₃(in MeOH) 0.2 ml를 60°C에서 10 분간 반응시킨다.

(9) 반응을 멈추기 위하여 증류수 2 ml를 가한다.

(10) Separatory funnel에 혼합용액과 ethyl acetate 2 ml를 넣고 3회 추출한다.

(11) 상층액만 받아서 회전농축기로 ethyl acetate를 모두 날려보내면 MMPB의 Methyl Ester를 얻게 된다.

이것을 diagram으로 요약하면 Fig. 2와 같다.

GC를 통한 MMPB의 검출. 앞에서 기술한 바와 같이 마이크로시스틴을 강산화제(KMnO₄와 NaIO₄)로 산화시키면 MMPB(2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid)라는 물질이 형성되며(Fig. 3참조) 이 물질을 Methyl Ester화시키면 GC/MS를 이용해서 확인할 수 있다. 이때 MMPB의 Methyl Ester화합물

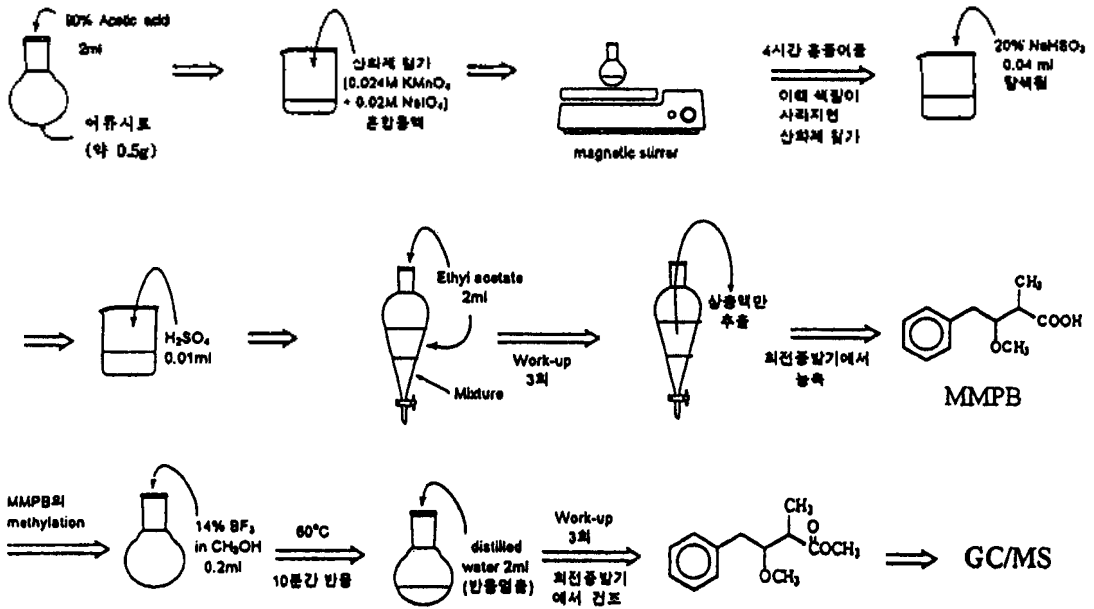


Fig. 2. Preparation of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) and methyl ester of MMPB.

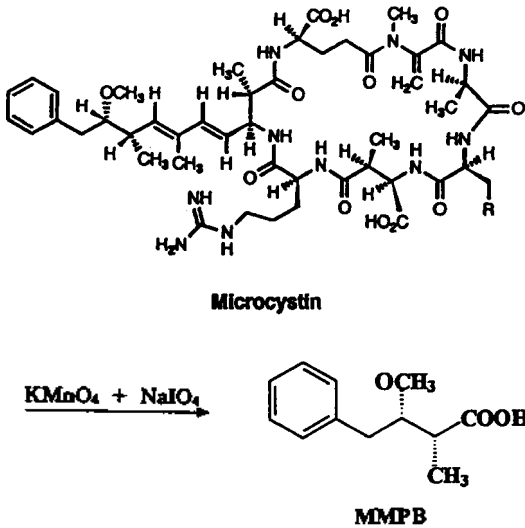


Fig. 3. Formation of MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid) from Adda (3-amino-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) residues present in microcystins.

은 질량 스펙트럼상에서 매우 특징적인 몇 가지 피크들을 보여준다. Fig. 4는 MMPB의 Methyl Ester 표준시료물질에 대해 GC/MS 실험을 한 결과이다. 실험부분에서 기술한 조건으로 실험한 결과 MMPB의 Methyl Ester는 약 12분 36초 영역에서 TIC(Total Ion

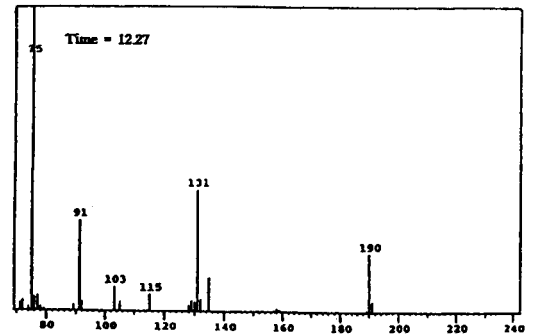
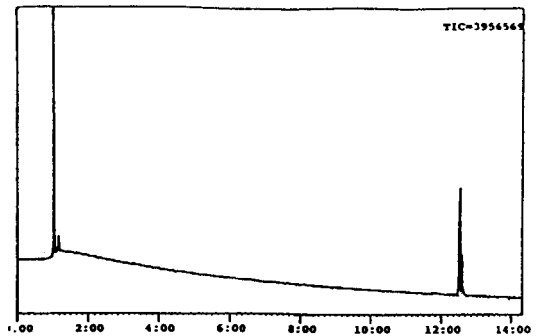


Fig. 4. GC/MS data of the standard methyl ester of MMPB.

Chromatogram)상에 피크를 보였다. 자세히 보면 피크가 두 개로 나뉘어져 있는 것을 볼 수 있는데 이는

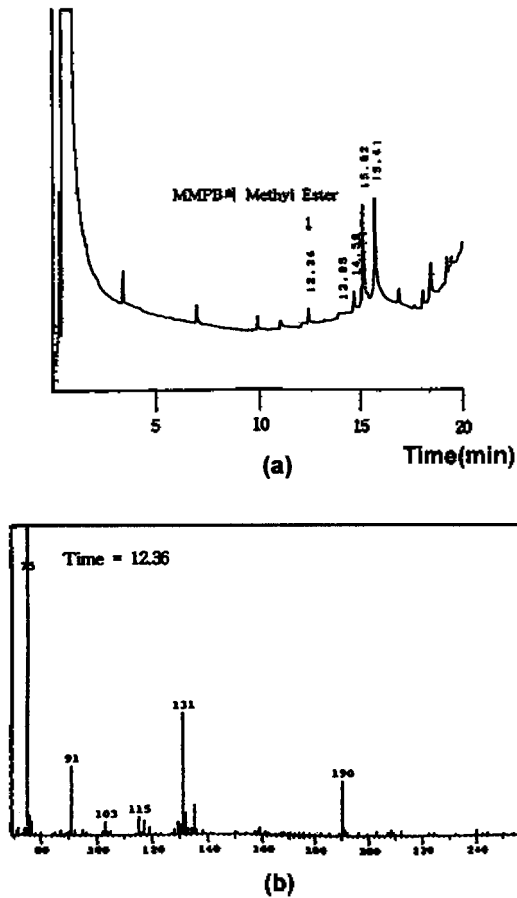


Fig. 5. (a) GC/FID chromatogram of microcystins (0.1 mg added) in fish sample. (b) Mass spectrum of MMPB methyl ester at the peak of 12.36 min.

MMPB의 Methyl Ester가 두 개의 키랄원자를 가지고 있어서 두 개의 서로 다른 부분입체 이성질체를 갖기 때문이다. 질량스펙트럼을 보면 분자량 피크인 $M/z=190$ 피크, 그리고 $-OCH_3$ 의 산소원자를 중심으로 α cleavage로 기인한 $M/z=131$ 피크, 벤젠링 구조의 특징적인 $M/z=91$ 피크가 선명하게 나타나는 것을 볼 수 있다.

어패류 시료중의 마이크로시스틴 정량. 마이크로시스틴으로부터 MMPB의 Methyl Ester를 생성시키는 분석방법을 실제 몇 가지 어패류 시료에 적용해 보았다. 먼저 96년 9월 대청호에서 채취한 어류 시료에 마이크로시스틴 0.1 mg을 spike하여 지방을 제거하고 MMPB를 생성시켜 GC로 분석한 결과 Fig. 5와 같은 크로마토그램과 질량 스펙트럼을 얻었다.

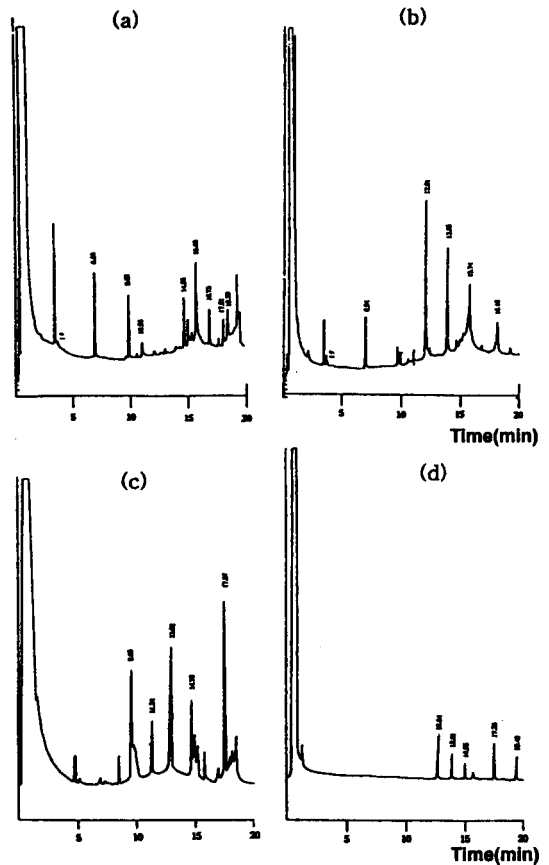


Fig. 6. Chromatograms of each sample. (a) Fish sample in Daechong Lake (96.8), (b) Fish sample in Daechong Lake (96.9), (c) Fish sample in Nakdong River (96.9), (d) Shellfish sample in Soyang Lake (97.9)

그런 다음 4개의 실제 어패류 시료에 위의 방법을 적용하여 Fig. 6과 같은 분석결과를 얻었다. 그러나 이들 4개의 시료 중 어느 것도 12.36분대의 피크는 나타나지 않았다. 실제 어패류 시료에는 12.36분대 피크가 발견되지 않았으므로 현재까지는 이 분석방법으로 마이크로시스틴을 검출할 수 없었다.

이번 실험에서는 실제 어류 시료에서 MMPB피크가 나타나지 않았다. 물고기의 몸통, 살 부분에서만 시료를 채취해서 실험하고 있는데 앞으로 물고기의 내장 부분, 아가미 부분도 실험을 해야 정확한 오염 정도를 확인할 수 있을 것이다.

어패류 시료들은 (a) 1996년 8월 대청호에서 채집한 어류 (b) 1996년 9월 대청호에서 채집한 어류 (c) 1995년 8월 낙동강에서 채집한 어류 (d) 1997년 9월

소양강에서 채집한 패류 등이다.

결 론

어패류 속에 잔류하는 마이크로시스틴을 효과적으로 정량 분석할 수 있는 분석법을 개발하였다. 구체적으로 강산화제(KMnO_4 와 NaIO_4)로 산화시켜 마이크로시스틴의 가장 특징적인 부위를 잘라내어 MMPB라는 물질을 만들었으며 이 물질을 메틸에스테르화하여 GC로 정량 분석할 수 있었다. 앞으로 이 방법을 이용하여 우리 나라 주요 수계의 어패류 속에 잔존하는 마이크로시스틴을 검출할 계획이다.

이 연구를 수행할 수 있도록 재정적인 도움을 준 학술진흥재단(BRSI-98-3425), 과학재단(98-0501-07-01-3) 그리고 보건복지부에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Schwimmer, M.; Schwimmer, D., In *Medical Aspects of Phycology*; Jackson, D. F., Ed.; Algae, Man and Environment, Syracuse Univ. Press: 1968; Vol. 358, p 279.
2. Carmichael, W. W.; Saffermann, R. S. *EPA/600/R 92/079*, 1992.
3. Konst, J. P. D. Mckercher; Gorham, P. R.; Robertson, A.; Jowell, J. *Can. j. Comp. Me4d. Vet. Sci.* **1965**, 28, 221.
4. Oishi, S.; Watanabe, M. F. *Environ. Res.* **1986**, 40, 518.
5. Phillips, M. J.; Roberts, R. J.; Steward, J. A.; Codd, G. A. *J. Fish. Dis.* **1985**, 8, 339.
6. Sugaya, Y.; Yasuno, M.; Yanai, T. *Jpn. J. Limnol.* **1990**, 50, 149.
7. Demott, W. R.; Zhang, Q.-X.; Carmichael, W. W. *Limnol. Oceanogr.* **1991**, 36, 1346.
8. Sano, T.; Nohara, K.; Shiraishi, F.; Kaya, K. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1992**, 49, 163.
9. Shigeyuki, T.; Yoshito, T. *Chemosphere.* **1995**, 31, 3635.
10. Pyo, D.; Lee, M. J. *Chromatogra.* **1994**, 39, 427.
11. Pyo, D.; Song, K.; Yoon, S.; Kim, B.; Lee, D. J. *of the Korean Chemical Society* **1994**, 38, 741.