

Micro-HPLC/IS/MS에 의한 수 중의 Microcystins (LR, YR 및 RR)의 분석

朴寬洙¹ · 裴竣鉉² · 姜俊吉 · 金演斗*

충남대학교 자연과학대학 화학과

²한국수자원공사

¹안양대학교 환경공학과

(2001. 10. 8 접수)

Analysis of Microcystins(LR, YR and RR) in Water by Micro-HPLC/IS/MS

Kwan-Su Park¹, Jun-Hyun Bae², Jun-Gill Kang and Youn-Doo Kim*

Department of Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Korea Water Resources Corporation, Daejeon 306-711, Korea

²Department of Environmental Engineering, Anyang University, Kyungki-Do 430-714, Korea

(Received October 8, 2001)

요 약. Microcystin-LR, -YR 및 -RR과 같은 독성 microcystin의 분석에 있어서 정확성을 높이기 위해 고상 추출을 통한 Micro-HPLC/IS/MS를 사용하였다. 이러한 microcystin-LR, -YR, -RR를 확인하는데 HPLC/UV로는 238 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 질량스펙트럼에서는 135 m/z 및 [M+H]⁺ m/z의 특징 피크만을 검출하여 왔다. 본 연구에서는 이중 전하에 해당하는 새로운 선들이 LR에서는 507 m/z, RR에서는 520 m/z, YR에서는 532 m/z에서 추가로 검출되었다. 이 방법을 사용하여 대청호에서 독성 microcystin의 존재성을 조사하였다.

ABSTRACT. Micro-HPLC/IS/MS after solid phase extraction has been employed to enhance the accuracy in the determination of toxic microcystins, such as microcystin-LR, -YR and -RR. The absorbance at 238 nm in HPLC/UV and characteristic spectra of 135 m/z and [M+H]⁺ m/z in MS have been widely monitored to identify those microcystin-LR, -YR and -RR. In this study, new lines at 507 m/z for LR, 520 m/z for RR and 532 m/z for YR have been additionally detected in the micro-HPLC/IS/MS spectrum, corresponding to double charge. The micro-HPLC/IS/MS methodology has been applied to investigate the presence of the toxic microcystins in Taechong lake.

서 론

상수원으로 이용되고 있는 호수나 저수지의 수질은 하, 폐수의 유입이 늘어나면서 갈수록 악화되고 있다. 특히, 인 및 질소계 유기질들의 유입으로 인한 부영양화는 정수공정을 어렵게 하고, 여름철에는 조류번성을 초래할 수 있어 더욱 심각한 문제가 되고있다. 조류가 서식하고 있는 물을 마시면 불쾌한 맛과 냄새가 있고

특히, 남조류 중 microcystins aeruginosa는 불고기와 가축을 죽게 하고, 사람의 신경과 간에 유해한 독성물질을 발생하는 것으로 알려져 있다.^{1,2}

신경에 독성을 주는 물질로는 aphanizomenon flos-aquae로부터 발생하는 antoxins와 anabaena flos-aquae로부터 발생하는 anatoxin-a 및 anatoxin-a(s) 등 세 가지가 보고되어 있다. Anatoxin-a는 alkaloid와 같은 화학적 구조를 갖고, 또 anatoxin-a(s)는 cyclic N-hydroxy

guanidine의 phosphate ester 구조를 가진 것으로 밝혀져 있다.⁵ 지금까지 알려진 50 여종의 microcystins는 공통적으로 7개의 peptide가 고리를 형성하고, 그 기본이 되는 구조는 γ -linked D-glutamic acid, N-methyldehydroalanine, β -aminoacid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyl-4,6-dienoic acid 및 두 개의 L-aminoacid로 구성되어 있다.⁶⁻⁸ 이렇듯 독성물질들의 구조와 영향이 속속 밝혀지자 아직까지 직접적 피해가 나타난 바 없는 우리나라에서도 90년도 중반부터 HPLC/UV에 의한 microcystins의 확인 및 분석방법이 연구되어 왔다. 1995년, 소양호, 충주호, 대청호, 장성호, 합천호 및 영랑호 등의 건조조체 중에서 microcystin-LR 및 microcystin-RR의 생성 확인 실험을 하였고,⁹ 1996년, 국내의 호소에서 분리한 16종의 microcystins 중에서 14종이 microcystin-LR, microcystin-YR 및 microcystin-RR을 생성한 것으로 발표하였다.¹⁰ 1998년, 낙동강 하류 녹산 지점의 건조조체 중에서 microcystin-LR 및 microcystin-RR을 확인, 보고한 바 있다.¹¹ 또한 행정적으로는 97 및 98년에 걸쳐, 금강환경관리청이 조류 주의보 및 경보를 통해 잠재적으로 위험 요소임을 지적한 바 있었다.

기존의 HPLC/UV에 의한 측정값은¹²⁻¹⁷ UV에 의한 흡광 정도이므로 시료액 중에 microcystins와 유사한 물질이 있으면 구별·확인이 어렵다. 따라서 매트릭스 효과를 최소화할 수 있는 전처리 방법이 선결되어야 한다. 본 실험에서는 microcystin-LR, -YR 및 -RR 등 독성물질을 확인·분석하는데 있어 종전의 HPLC/UV 방법 대신, micro-high performance liquid chromatography/ion spray/mass spectrometry(micro-HPLC/IS/MS)를 적용함으로써 정확성을 부여하고자 하였다.¹⁸⁻²⁶ 따라서, micro-HPLC/IS/MS를 이용하여 microcystin-LR, -YR 및 -RR의 구조적인 특성과 검량선의 직선성을 확인하고, 검토된 조건에서 본 방법을 대청호의 시료 중에 적용하는 일련의 실험을 수행하였다.

실 험

기기 및 작동 조건

HPLC/UV 방법에 사용된 기기는 Perkin-Elmer사의 Series 200/785A 및 Shimadzu사의 LC-10AT/SPD-10A이다. 칼럼은 Waters사의 μ BondapakTM C18(3.9×300 mm)과 Shimadzu shim-pack CLC-ODS(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)를 사용하였다. UV 측정에 사용된 파장은 238 nm

이며, 오븐의 온도는 40 °C(LC-10AT), 용리액의 유속은 전자의 기기에서는 2 mL/min, 후자의 기기에서는 1 mL/min로 유지시켰다. Micro-HPLC/IS/MS 방법에 사용된 기기는 Applied Biosystems사의 HPLC(140C Microgradient system) 및 Perkin-Elmer사의 MS(Sciex API 300)로 구성되었다. 사용한 칼럼은 Perkin-Elmer사의 마이크로 칼럼(Spheri-5, RP-18, 5micron, 250×1.0 mm, Brownlee columns)이었다. MS에서는 polypropylene glycol로 저질량 56에서부터 고질량 2245까지 최적화하여 사용하였다.

시약 및 용매조제

시약, Microcystin-LR(MCST-LR), Microcystin-YR(MCST-YR), Microcystin -RR(MCST-RR)은 Calbiochem, WAKO사의 제품으로 더 이상 정제하지 않고 사용하였다. Fig. 1은 이들 microcystin의 구조를 보여주고 있다.

Ammonium acetate(GR, Merck), trifluoroacetic acid(Aldrich), methyl alcohol(99.93%, HPLC grade, Aldrich) 및 acetonitrile(99.8%, HPLC grade, Merck) 등은 그대로 사용하였고, H₃PO₄, KH₂PO₄ 등은 시약급을, Air

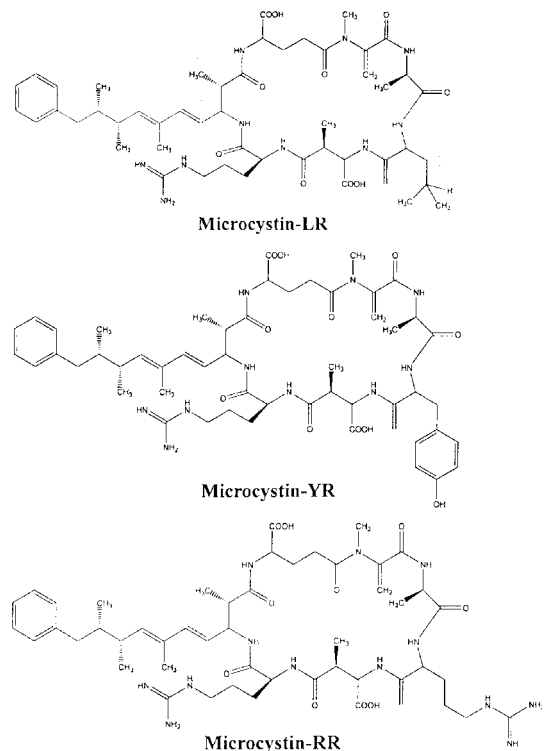


Fig. 1. Structures of microcystins.

는 zero grade로, 질소가스는 99.99% 이상의 고순도급을 사용하였다.

HPLC/MS용 용매. 예비실험에 의해 확인된 조건 즉, MeOH와 물을 63:37로 혼합하고 trifluoroacetic acid가 0.05% 되게 만든 용매 A와 MeOH에 ammonium acetate가 5 mM, trifluoroacetic acid가 0.1% 되게 만든 용매 B를 초음파기로 30분 이상 탈기시켜 사용하였다.

HPLC/UV용 용매. MeOH와 0.05 M 인산염 완충용액(pH=3)을 60:40으로 배합한 용매와 35% Acetonitrile과 0.05 M 인산염 완충용액(pH=2.5)을 혼합한 후 탈기시켜 사용하였다.

구조특성의 확인 및 검량선

Micro-HPLC/IS/MS를 이용하여 MCST-LR, MCST-YR, MCST-RR를 각각 확인할 수 있는 구조특성을 찾고자, 이들의 혼합 표준용액(3 mg/L)을 20 μ L씩 주입하고, 잡혀진 조건에서 TIC 크로마토그램을 얻었다. 또한 정량에 필요한 검량선을 얻고자, 각 표준용액 1, 3, 5 mg/L에 대한 TIC 크로마토그램의 면적을 적분하였다.

시료분석

시료채취 및 전처리. 98년 7월부터 10월까지 5회(7/14, 8/13, 9/12, 9/22, 10/12)에 걸쳐 대청호의 대전 취수탑 앞, 댐측, 청주 취수탑 앞 및 회남 등 4지점에서 수체와 조체시료를 일정량씩 채취하여 다음과 같이 전처리 하였다. 500 mL의 수체시료를 GF/C로서 여과한 후, 그 여액을 MeOH 10 mL와 불 10 mL로써 전처리한 Waters사의 C_{18} -카트리지(Oasis)에 10 mL/min 속도로서 흘러 보내면서 흡착시켰다. 10, 20 및 30% MeOH 용액을 각각 10 mL씩 차례로 통과시켜 카트리지 중에 포함된 불순물을 세척한 후, 공기로써 건조시킨 다음, 6 mL의 MeOH로 용리 시켰다. 용리액을 turbovap에서 질소로 건조시키고, 잔류분은 100 μ L의 MeOH에 녹여 시료로 하였다. 망목 $\phi=5 \mu$ m의 그늘로서 채취한 300~450 mL의 조체시료를 고 진공 및 -78°C 에서 48 시간 이상 동결 · 건조시킨 다음, 일정량의 MeOH를 가하여 냉동보관 하였다. 실험할 때는 30°C 이하의 건조기에서 N_2 로써 MeOH를 증발시킨 후, 일정량을 취하여 MeOH에 녹이고, 수체시료에서와 같이 고체상 추출법으로 농축시켰다.

기본항목 분석. 대청호의 4개 지점에서 채취한 시료들의 온도, Total Nitrogen(T-N), Total Phosphorus(T-P) 및 Chlorophyll a(Chl-a)를 수질오염 공정시험방법에 따라 측정하였다. 즉, 수온은 현장에서, T-N은 자외선 흡

광 광도법으로, T-P은 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 로서 산화시켜 얻은 정인산을 phosphomolybdenum blue법으로 또, Chl-a는 아세톤용액으로 클로로필 색소를 추출 · 농축하여 UV-Vis Spectrophotometer로 측정하였다.

MCST-LR, MCST-YR 및 MCST-RR의 분석. 대청호의 4개 지점에서 채취한 시료들에 대한 기본항목을 분석한 결과 수환경이 대동소이 하였다. 따라서 대전 취수탑 앞에서 채취하여 전처리한 조체시료를 박하여, 기존의 HPLC/UV법을 적용하였고 또, 이 시료에 일정량의 MCST-LR, -YR 및 -RR를 가한 후 Micro-HPLC/IS/MS로서 확인 · 분석하였다.

결과 및 고찰

구조특성

Fig. 2는 Micro-HPLC/IS/MS로서 얻은 MCST-YR, -LR 및 -RR의 TIC 크로마토그램과 질량 스펙트럼이다. 첫 번째의 TIC 크로마토그램에 의하면, 7:31분에 MCST-YR, 다음에 -LR, 마지막 10:01분에 -RR이 차례대로 나타나고 있음을 확인할 수 있다. 두 번째는 기준선을 2~3회 공제한 MCST-YR의 질량 스펙트럼이다. MCST-YR의 분자량이 1044임을 고려한다면, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 인 1045 m/z 외에 532 m/z에 나타난 스펙트럼이 특이하였다. 이것은 1044+18(암모늄이온)의 이중 전하(double charge)일 것으로 예측된다. 세 번째는 기준선을 2~3회 공제한 MCST-LR의 질량 스펙트럼이다. MCST-LR의 분자량이 994임을 고려한다면, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 인 995 m/z 외에 507 m/z의 출현 또한, 994+18(암모늄이온)의 이중 전하일 것으로 예측된다. 네 번째는 기준선을 2~3회 공제한 MCST-RR의 질량 스펙트럼이다. MCST-RR의 분자량이 1037임을 고려하면, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 인 1038 m/z 외에 520 m/z의 출현은 1038의 이중 전하일 것으로 생각된다. Harada 등에 의하여 발표된 Frit-FAB-LC/MS를 이용한 microcystins의 분석 결과에 의하면, MCST-RR, YR, LR의 순서로 스펙트럼이 나타나고, 머무름 시간은 10~20 분임을 보여주고 있다. 이 결과는 본 실험결과와 약간의 차이가 있다. 그러나, 두드러진 차이점은 질량 스펙트럼에서 찾아 볼 수 있다. 이들의 결과에서는 단지 135 m/z와 1038, 1045, 995의 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 만이 나타난 반면, 본 연구에서는 이 외에 이중 전하에 해당하는 피이크들이 추가로 나타났다.

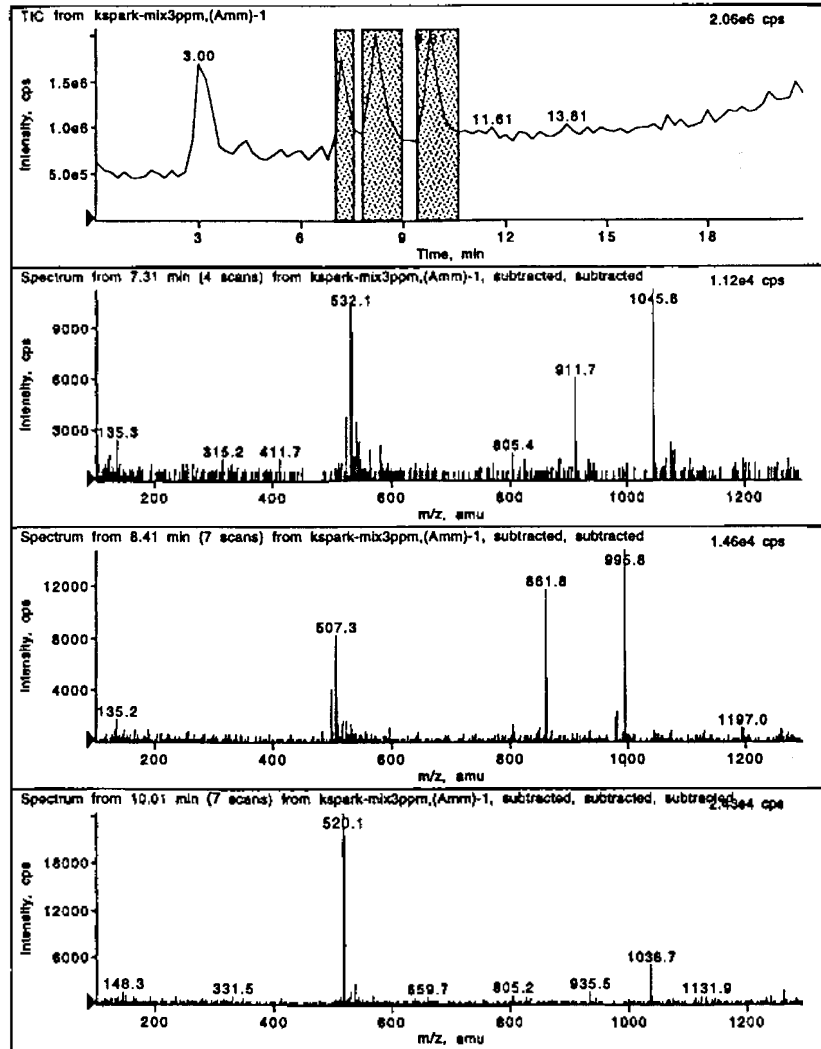


Fig. 2. TIC chromatograms of microcystin-RR, -LR and -YR.

검량선

Fig. 3은 Micro-HPLC/IS/MS로서 짙은 MCST-LR 표준용액 1, 3 및 5 mg/L에 대한 TIC 크로마토그램을 적분한 그림이고, Fig. 4(a)는 그 결과로부터 얻은 MCST-LR의 표준검량선이다. Fig. 4(b) 및 (c)는 같은 방법으로 작성한 MCST-YR 및 -RR에 대한 표준검량선을 보여주고 있다. Fig. 4에서 보여 주는 바와 같이, Micro-HPLC/IS/MS에 의한 MCST -LR, -YR 및 -RR의 검량선은 직선을 이루고 있다.

시료분석

수질 기본항목에 대한 분석. 호수에서 생물학적으로

수질환경의 기본이 되는 인자들은 여러 가지가 있지만, 수온, T-N, T-P 및 Chl-a 등은 특히 조류의 생육에 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 대청호의 조사지점 4곳은 실험기간 동안, 수온은 19~22 °C로 거의 동일하였고, T-N은 8월 11일과 10월 26일 2회에 걸쳐 4 mg/L 이상이었으나 평균농도는 1.5~3.5 mg/L이었다. 또한 T-P는 평균농도가 0.05 mg/L 이하 이었고, 클로로필-a는 4지점 모두 변화가 심하였으며 특히, 8~9월에는 25 mg/m³으로, 우리 나라의 조류 경보의 발령기준인 5~20 mg/m³을 상회하였다. 이렇듯 대청호의 수질은 대체로 남조류(blue-green-algae)의 성장에 적합한 환경으

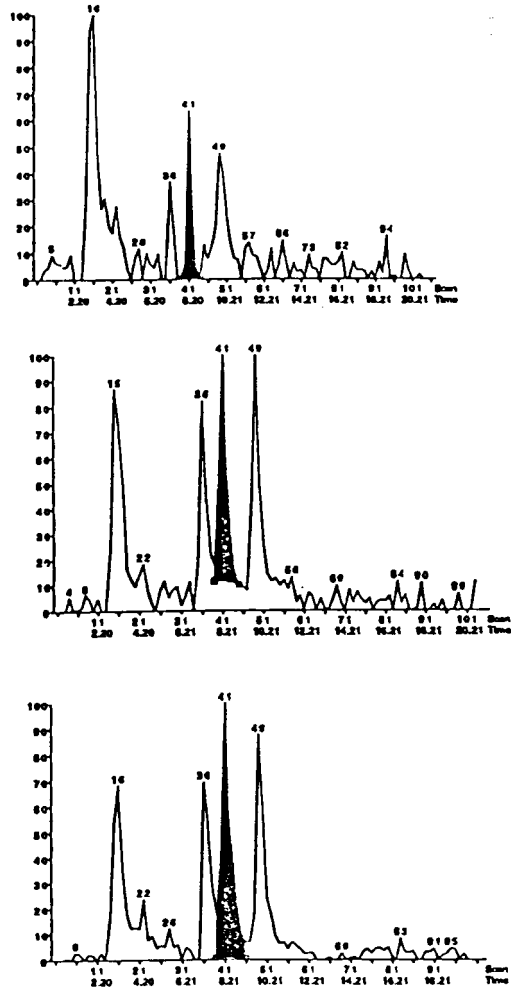


Fig. 3. Area integration of TIC chromatograms of microcystin-LR. The concentrations of microcystin-LR are 1, 3 and 5 mg/L from upper.

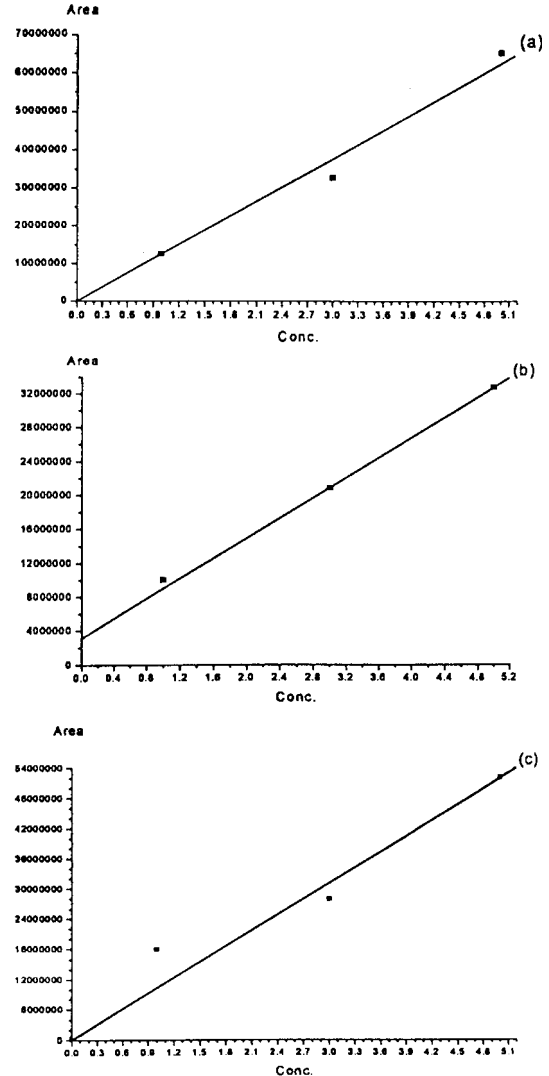


Fig. 4. Calibration curves for microcystins: (a) LR, (b) YR and (c) RR.

로 조사되었다.

MCST-LR, MCST-YR 및 MCST-RR의 분석. 98년 9월에 채취한 대청댐 시료에서 추출한 조류세포에, Micro-HPLC/IS/MS법을 적용하여 TIC 크로마토그램을 측정하였다. Fig. 5에서 보여 주듯이, 크로마토그램에 조류의 독성물질이 검출되지 않았다.

Fig. 6은 MCST-RR, MCST-YR 및 MCST-LR의 표준용액을 각각 3mg/L 되게 혼합한 용액에 대한 HPLC/UV의 크로마토그램을 보여 주고 있다. Fig. 7은 댐측에서 채취하여, 전처리한 조체시료에 대한 HPLC/UV의

크로마토그램을 보여 주고 있다. Fig. 6에서, 6.5분대에 나타난 피이크는 MCST-RR이고 7.9분대에 나타난 피이크는 MCST-YR이며 마지막으로 9.6분대에 나타난 피이크는 MCST-LR로서 용매의 조성과 사용하는 칼럼에 따라 순서가 바뀌었다. Fig. 7을 보면 대청호 댐측 수질은 바탕선이 불균일하고 여러 개의 피이크가 복잡하게 나타나 있다. 또한 6.5 및 9.6 분대에 피이크가 나타난 것으로 미루어 MCST-RR 및 MCST-LR이 존재할 것으로 예측할 수 있다. 그러나, Fig. 5에서와 같이 Micro-

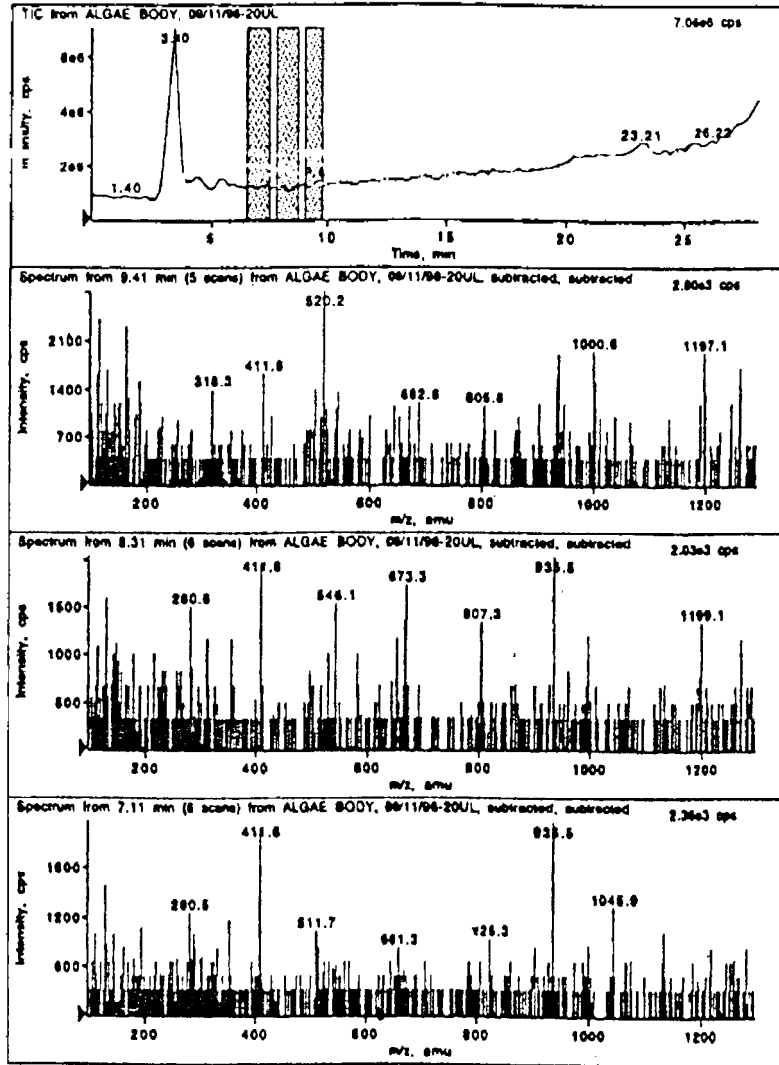


Fig. 5. TIC Chromatograms of sample extracted from Taechong laker on September, 1998.

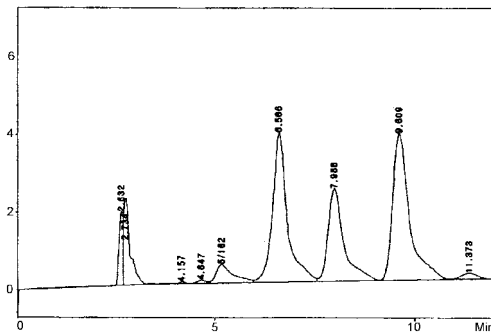


Fig. 6. Chromatogram of standard solution of microcystins detected by HPLC/UV.

HPLC/IS/MS에 의해서는 확인되지 않았다. 이러한 현상은 UV에 감지된 매트릭스의 영향으로 생각된다. 이를 확인하기 위하여 MCST-LR, -YR 및 -RR를 각각 10 mg/L 씩 취하고, 대전 취수탑 앞에서 채취하여 전처리한 조체시료로서 총 1L씩 회석시켜 만든 합성시료를, 본 Micro-HPLC/IS/MS 법으로 5회 분석하여 구한 평균값과 상대표준편차를 보면, MCST-LR는 $X=10.24$ ppm, $RSD=\pm 5.8\%$ 이고, MCST-YR는 $X=9.99$ ppm, $RSD=\pm 4.0\%$ 이며 또 MCST-RR는 $X=9.77$ ppm, $RSD=\pm 5.3\%$ 이었다. 본 분석값을 참고하면, 댐축 앞 조체시료 중에는 MCST-LR, -YR 및 -RR 등이 함유되지 않았음을 알 수 있다.

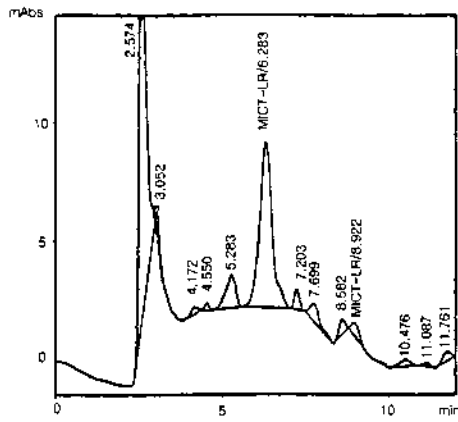


Fig. 7. Chromatogram of algal cell extracted from Taecheong lake on September, 1998, detected by HPLC/UV.

결론

Micro-high performance liquid chromatography/ion spray/mass spectrometry(Micro-HPLC/IS/MS)를 이용하여 microcystin 계열의 MCST-LR, MCST-YR 및 MCST-RR 등의 독성물질들을 확인·분석하는 일련의 실험을 수행하였다. 지금까지 발표된 일련의 연구결과에 의하면 MCST-LR, -YR 및 -RR를 확인하는데 특성 스펙트럼인 135 m/z와 [M+H]⁺ 즉, MCST-YR는 1045 m/z, MCST-LR는 995 m/z, 그리고 MCST-RR는 1038 m/z 만이 측정되어 분석에 이용하여 왔으나, 본 연구에서는 이것 외에 MCST-YR는 1044+18(암모늄 이온)의 이중 전하인 532 m/z, -LR는 994+18(암모늄 이온)의 이중 전하인 507 m/z 그리고 -RR는 1038의 이중 전하인 520 m/z를 찾아내었다. Micro-HPLC/IS/MS를 이용한 실험에서 얻은 MCST-LR, MCST-YR 및 MCST-RR 등의 표준검량선은 이들의 정량이 가능하도록 직선성을 잘 유지하고 있었다. 기존의 HPLC/UV법은 매트릭스 영향을 받게되므로 이를 최소화할 수 있는 전처리 방법이 선결되어야 했다. 따라서 본 Micro-HPLC/IS/MS법은 앞으로 microcystins 연구에 도움이 되는 새로운 방법이라 사료된다.

인용문헌

1. Kenefick, S. L.; Hruddy, S. E.; Prepas, E. E.; Motkowsky, N.; Peterson, H. G. *Wat. Sci. Tech.* **1992**, *25*, 147.
2. Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Carmichael, W. W.; Hirota, F. *Toxic microcystins*: CRC press: 1996.
3. Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M. *J. Appl. Phycol.* **1994**, *6*, 261.
4. Jones, G. J.; Orr, P. T. *Wat. Res.* **1994**, *28*, 871.
5. Sivonen, K.; Himberg, K.; Luukkainen, R.; Poon, G. K.; Codd, G. A. *Toxicity Assessment. An International Journal* **1989**, *4*, 339.
6. Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Sakai, R. *J. Org. Chemistry* **1992**, *57*, 866.
7. Kotak, B. G.; Kenefick, S. L.; Fritz, D. L.; Rousseaux, C. G.; Prepas, E. E.; Hruddy, S. E. *Wat. Res.* **1993**, *27*, 495.
8. Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Luukkainen, R.; Fardig, M.; Rouhiainen, L.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Rinehart, K. L.; Niemela, S. I. *The Contaminants in the Nordic Ecosystem: Dynamics, Processes & Fate*, ed. Munawar, M.; Luotola, M.; Finland SPB Academic Publishing: Amsterdam, The Netherlands, 1995; p. 163.
9. 김범철; 김은경; 표동진; 박호동; 허우명 *한국수질보전학회지* **1995**, *11*, 231.
10. 박혜경; 진익렬; 류홍일; 류재근 *한국수질보전학회지* **1996**, *12*, 29.
11. 정종문; 최은재; 박흥기; 박은주; 정철원; 김주현 *부산광역시 상수도 연구보* **1998**, *4*, 108.
12. 조석주; 이수원; 조은주; 김재돈; 최종갑 *서울상수도기술 세미나* 1999, 189.
13. Meriluoto, J. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *352*, 277.
14. Moollan, R. W.; Rae, B.; Verbeek, A. *Analyst* **1996**, *121*, 233.
15. Lawton, L. A.; Edwards, C.; Codd, G. A. *Analyst* **1994**, *119*, 1525.
16. Coyle, S. M.; Lawton, L. A. *Phycologia* **1996**, *35*, 57.
17. Luukkainen, R.; Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Fardig, M.; Rinehart, L.; Niemela, S. I. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 2204.
18. Ohtake, A.; Shirai, M.; Aida, T.; Mori, N.; Harada, K. I.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Nakano, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 3202.
19. Yoshizawa, S.; Matsushima, R.; Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Ichihara, A.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 867.
20. Namikoshi, M.; Rinehart, K. L.; Sakai, R.; Sivonen, K.; Carmichael, W. W. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6135.
21. Sivonen, K.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M.; Rinehart, M. L.; Dahlem, A. M.; Niemela, S. I. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2650.
22. Harada, K. I.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W. *Toxicon* **1990**, *28*, 55.
23. Lawton, L. A.; Edwards, C.; Beattie, K. A.; Pleasance,

- S.; Dear, G. J.; Codd, G. A. *Nat. Toxins* **1996**, *4*, 50.
24. Lawton, L. A.; Setsuda, S.; Watanuki, T.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Harada, K.-I. *Nat. Toxins* **1996**, *4*, 189.
25. Kondo, F.; Harada, K. I. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **1996**, *44*, 78.
26. Kondo, F.; Matsumoto, H.; Yamada, S.; Ishikawa, N.; Ito, E.; Nagata, S.; Ueno, Y.; Suzuki, M.; Harada, K.-I. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1355.
-