

열분해 질량분석법을 이용한 생물학 물질의 특성 연구

Characteristics study of biological materials using pyrolysis-mass spectrometry

최선경*

Choi, Sun-Kyung

ABSTRACT

Pyrolysis-mass spectrometry, incorporating an in situ thermal hydrolysis and methylation (THM) step, has been used to study biological materials for bacteria, toxin and virus. Newly developed pyrolyzer was used to decompose biological materials, and tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was used as a methylation reagent. Chemical ionization (CI) using ethanol and ion trap mass spectrometer (ITMS) were used to ionize and analyze of pyrolysis components, respectively. Analytical characteristics of bacteria (including spore), virus and toxin were analyzed. Also acquisition and interpretation of mass spectra as biomarkers for classification/identification of biological materials were explained.

주요기술용어(주제어) : pyrolysis-mass spectrometry(열분해 질량분석법), biological materials(생물학 물질), methylation(메틸화), pyrolysis-mass spectrum(열분해 질량스펙트럼), biomarker(생물학 표식 물질)

1. 머리말

대량 살상무기로서 생물학작용제 사용 위협에 대비하고자 하는 최근의 관심사에 의하여 보다 빠르고 정확하게 박테리아 등의 생물학 물질을 탐지할 수 있는 야전운용 가능한 장비의 개발이 대두되고 있다. 이러한 장비들 중에서 질량분석법을 이용한 경우 하나의 장비로써 화학작용제 및 생물학작용제를 동시에 실시간으로 탐지할 수 있다는 장점에 의하여 미국 및 독일을 중심으로 많은 연구와 개발이 이루어지고 있다^[1~2].

생물학 질량분석법(biological mass spectrometry)은 생물학 물질을 대상으로 질량분석법을 이용하여 지질(lipid), 탄수화물(carbohydrate), 펩티드(peptide), 단백질(protein) 등에 대하여 연구를 수행하는 분야이다^[3]. 여기서 사용되는 질량분석기로는 사중극자형, 자기장부채꼴형, 이온트랩형 및 비행시간형 등이 있다.

일반적으로 질량분석법과 결합된 열분해 방법은 박테리아를 포함한 생물학 물질의 빠른 탐지에 이용되고 있다^[4~5]. 열분해 과정은 박테리아 등과 같은 분자량이 큰 생물체들을 보다 작은 분자량을 갖으면서 생물학 표식물질(biomarker)로 사용될 수 있는 휘발성 물질로 변환시키는 전처리 과정으로 이용되고 있다. 이러한 전처리 과정을 통하여 변환된 물질은 질량분석기나 기체크로마토그래피로 분석할 수 있다.

† 2004년 7월 13일 접수~2004년 9월 17일 심사완료

* 국방과학연구소(Agency for Defense Development)
주저자 이메일 : choisk01@netian.com

좀더 변형된 열분해 과정으로는 생물학 물질을 열분해기 내로 도입하기전 tetramethylammonium hydroxide(TMAH)를 함께 넣어주는 방법이 있다. 이 과정은 일반적으로 in situ thermal-hydrolysis methylation(THM, 열분해/메틸레이션법)으로 명명되어 있다.

생물학 물질을 열분해 질량분석 하는 경우 시료 이온화 방법으로 화학이온화(CI) 방법을 많이 이용하고 있다. 화학이온화 방법은 시료도입 장치로부터 도입된 시료를 전자충격에 의하여 먼저 이온화되어 있는 반응기체 이온과 반응시켜 이온화하는 방법으로 전자충격 이온화(EI) 방법과 비교하여 시료의 조각나기가 적게 일어나는 특징이 있다. 그러므로, CI 방법을 이용할 경우 분자이온 측정은 EI 방법보다 훨씬 유리하다.

본 연구에서는 실험실에서 자체 제조한 열분해기를 장착한 열분해 질량분석법을 이용하여 박테리아, 바이러스, 독소 등의 생물학 유사작용제인 BG(포자포함), E. coli, EH(이상 박테리아), ovalbumin, bovine albumin(이상 독소) 그리고 MS2(바이러스)를 분석하고 그 특성에 관하여 기술하였다.

2. 실험

가. 시약 및 생물학 시료

Tetramethylammonium hydroxide(Adrich)는 메탄올(Merck, HPLC 급) 용매를 이용하여 묽혀서 0.1 M 용액으로 제조하여 메틸레이션 시약으로 준비하였다. Dipicolinic acid(Adrich, 99%)와 stearic acid(Sigma, 99%)는 역시 메탄올을 이용하여 10 μ g/ μ L의 농도로 제조하였다.

BG(*Bacillus globigi*) 영양세포는 실험실에서 보관 중이던 BG 포자(ATCC 9372)를 사용하여 배양하였는데, LB(Luria-Bertani) 배지 5mL에 BG 포자(1/50의 양)를 넣은 후 원심분리기를 사용하여 200 rpm으로 흔들며 주면서 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양액 4mL를 1.5mL 마이크로튜브를 사용하여 고속 원심분리(13,000rpm)하면서 세포만을 농축하여 수확한 후 탈이온수를 사용하여 3번 세척하였으며 최종

적으로 pellet 형태로 만들어 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다. BG 포자의 경우는 실험실에서 보관 중이던 것을 탈이온수로 3번 세척하여 그 순도를 높였으며 최종적으로 pellet 형태로 만들어 역시 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다.

E. coli는 5mL LB 배지에 전날 16 시간동안 liquid 배양해둔 E. coli(MC1061)를 1/50 양만큼 넣은 후 역시 원심분리기를 사용하여 200rpm으로 흔들며 주면서 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양하였다. 이후의 과정은 BG의 경우와 동일한 방법으로 배양 및 농축과정을 거쳤다. EH(*Erwinia herbicola*, ATCC 33243)는 영양 배지에서 24시간, 25 $^{\circ}$ C로 배양하였으며, 이것을 농축 및 세척 과정을 거쳐 수확한 후 최종적으로 동결·건조하여 보관하였다.

시료는 위에서 준비한 BG 영양세포와 포자, E. coli 그리고 EH의 경우 탈이온수를 이용하여 약 25 μ g/ μ L의 현탁액으로 실험 직전에 제조하여 사용하였다. 한편, ovalbumin(Sigma, 96%), bovine albumin(Sigma, 96%), MS2 파아지(ATCC 15597-B1, 별도의 배양없이 구매한 것을 그대로 사용)는 탈이온수를 사용하여 10 μ g/ μ L의 농도로 제조하였다.

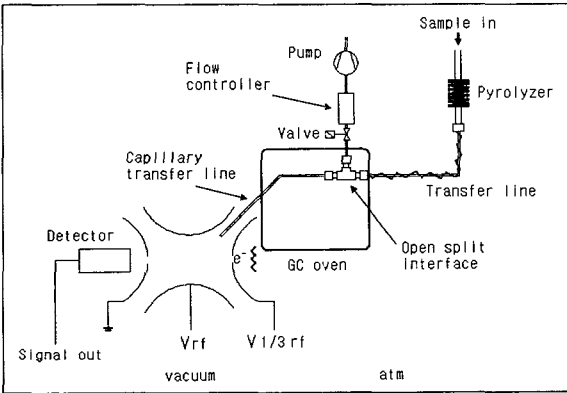
나. 기기

자체 제조한 열분해 모듈을 이용한 질량분석기의 구성에 관한 개략도를 그림 1에 보여주고 있다. 내경 2mm, 길이 5.5cm의 석영관이 열분해기 튜브로 사용되었는데, 관의 중간에 볼록한 형태로 부피 0.6cm³ 정도의 반응공간을 두었다. 반응공간 아래쪽에는 석영섬유로 막아놓아 시료가 포집될 수 있도록 하였다. 열분해기 튜브의 반응공간은 열 저항 코일을 사용하여 10초 이내에 약 480 $^{\circ}$ C로 가열되게 하였다. 튜브 내로는 펌프를 사용하여 유량 10mL/min으로 실내공기가 직접 흐르도록 하였다.

시료의 전송은 공기를 운반기체로 하여 이루어졌으며, 250 μ m(내경) \times 27cm(길이)의 silcosteel 튜브(Restec Corp. 제조)와 50 μ m(내경) \times 40cm(길이)의 석영모세관(deactivated silica capillary tubing)이 시료 전송관으로 사용되었다. Silcosteel 튜브로 전송된 시료 중의 일부만이 T형태의 open split interface에서 질량분석기의 진공에 의하여 모세관으로 빨려들

어 가도록 하였다. 질량분석기로 도입되는 유량은 0.5mL/min 이하가 되도록 하였다. 시료 전송관은 가열 코일(silcosteel 튜브 부분)과 GC 오븐(모세관 부분)을 이용하여 200°C로 유지하였다.

모든 시료의 열분해 질량스펙트럼은 Saturn® 2000 GC/MS(Varian사 제조)에서 얻었다. 이 장비는 질량



[그림 1] 자체 제조한 열분해 모듈을 이용한 질량분석기의 구성 개략도

[표 1] 주요 분석 기기조건

Operating Parameters	
Pyrolyzer	
Pyrolysis temperature	480°C(in 10s)
Carrier gas flow late	10 mL/min(using air)
Transfer line	
Silcosteel tubing	250 μm(ID)×27 cm(length)
Capillary tubing	50 μm(ID)×40 cm(length)
Line Temperature	200°C
MS inlet flow late	< 0.5 mL/min
ITMS	
Trap temperature	200°C
Ionization mode	ethanol CI
Multiplier voltage	1500 V
Emission current	10 μA
Mass detection range	100~450 amu
Scan time	0.9 s
High vacuum pressure	> 2.7×10 ⁻⁶ Torr(without CI gas)

분석 방식으로 이온트랩 질량분석기(ITMS)를 사용하고 있으며, 시료의 이온화는 이온트랩 내에서 직접 일어나는 내부 이온화 방식을 채택하고 있다. 또한, 이 장비에서는 에탄올을 이용한 화학이온화(CI) 과정이 장비 뒤쪽에 시약 용기를 연결하여 진공에 의하여 반응기체가 도입되도록 하여 이루어졌다. 질량분석기의 질량분석 범위는 반응기체인 에탄올에 의한 주요 피크들(m/z 47, 75, 93)의 영향을 최소화하기 위하여 100~450amu로 하였다. 질량분석기 내의 진공도는 반응기체 밸브를 열어주기 전에 약 2.7×10⁻⁶ Torr로 측정되었는데, 이렇게 상대적으로 고진공을 유지해 준 이유는 질량분석기로 도입되는 운반기체가 헬륨과 같은 비활성 기체가 아닌 대기 중의 공기를 사용한다. 분석에 이용한 기기의 주요 분석조건을 표 1에 나타내었다.

다. 실험 방법

실험에서는 열분해/메틸레이션 방법을 시료의 전처리 과정으로 이용하였으며, 칼럼에 의한 분리 없이 도입된 시료를 에탄올 CI를 사용하여 이온화시킨 후 이온트랩 질량분석기(ion trap mass spectrometer, ITMS)로 분석하였다.

기기와 열분해기의 상태가 설정 파라미터에 도달한 것을 확인한 후 냉장 보관된 생물학 시료 2μL를 마이크로주사기를 사용하여 열분해기 튜브내로 주입하였으며, 이렇게 도입된 시료는 튜브내의 석영섬유에 걸려 포집되도록 하였다. 실제 도입된 시료의 양은 BG, E. coli 및 EH의 경우 건조 중량으로 약 50μg, albumin 계열과 MS2의 경우 약 20μg이 되도록 하였다. 이어서 0.1 M TMAH 메탄올 용액 5μL를 역시 마이크로주사기를 사용하여 생물학 시료 위로 주입하였다.

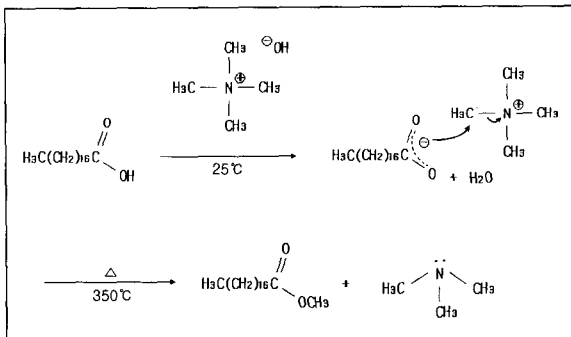
TMAH 주입 후 약 1초의 시간 간격을 둔 후 열분해기의 온도를 10초 이내에 480°C까지 승온시켰다. 열분해/메틸레이션된 시료는 유량 10mL/min의 공기에 의해 시료전송관으로 전송되었으며, open split interface에서 약 0.5mL/min의 시료유량만을 석영모세관을 통해 ITMS로 보내주었다. 시료는 ITMS의 이온트랩 내로 직접 도입되었으며, 여기서 먼저 이온화되어 있던 에탄올 반응이온들(m/z 47, 75, 93)과의

화학이온화 과정을 거쳐 시료의 이온화가 이루어졌다. 이온화된 시료는 이온트랩셀에 일정 기간동안 저장되어져 있으면서 RF 전위의 변화에 의해 질량대 전하비(m/z)에 따라 차례대로 방출되어 열분해 질량 스펙트럼으로 측정되었다.

3. 결과 및 고찰

가. 열분해/메틸레이션법과 에탄올 CI

열분해/메틸레이션의 대표적인 방법인 TMAH를 이용하여 산성의 지방산을 휘발성 있는 메틸에스테르 유도체로 만들어 주는 화학반응은 다음의 stearic acid의 반응 예에서 2 단계로 설명할 수 있다.



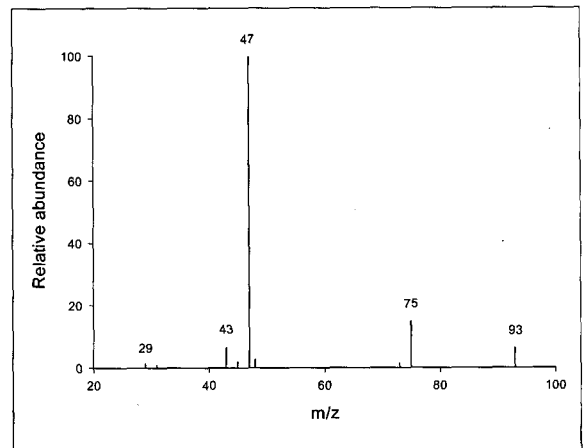
탈 양성자화 된 카르복시산 음이온이 TMAH 사차 염에 대하여 친핵성 치환반응을 일으켜 에스테르화가 일어난다. 사차의 N-methylammonium hydroxide가 과량으로 존재하는 환경에서 지방산의 탈 양성자화는 보통 실온에서 수용액이나 메탄올 용액 내에서 쉽게 일어난다. 이러한 조건 하에서 산성도가 더 강한 지방산일 경우(pKa < 12) 반응이 빠르고 정량적으로 탈 양성자 과정이 일어난다. 주어진 지방산의 염에 의한 열분해가 빠르고 효과적으로 일어나기 위해서는 최소한의 온도가 요구되는데, tetramethyl-ammonium 염인 경우 290~375°C의 온도가 필요하다. 많은 경우 열분해 과정이 효과적으로 일어나기 위해서 석영섬유로 느슨하게 채워진 석영튜브를 필요로 한다. 이것은 석영튜브 내의 기체 흐름을 원활하게 해 주고 열전도를 좋게 해 주어 열분해가 더욱 효과적으로 일어나게

한다^[6].

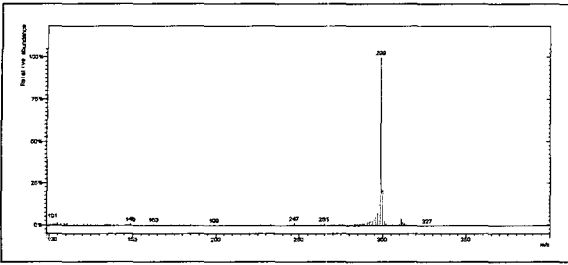
에탄올을 반응기체로 이용하는 경우 에탄올의 양성자 친화도가 열분해 산물로 생성되는 시료분자의 것과 비슷하여 메탄을 반응기체로 한 CI의 경우보다 시료의 조각나기는 더욱 작게 일어나는 장점이 있다. 많이 사용되는 반응기체 중 메탄은 127, 이소부탄은 195 그리고 에탄올은 188 kcal/mol의 양성자 친화도를 갖으며, 이와 비교되는 lipid functionality를 갖는 물질 중 알켄(alkene)류는 163~197, 에스테르(ester)류 190~202, 알코올류 185~195, 그리고 카르복시산류 176~194 kcal/mol의 양성자 친화도를 갖는다^[7]. 한편, 열분해 산물로부터 생성될 수 있는 포화 및 불포화 탄화수소 화합물들이 에탄올 CI 과정에서 효과적으로 이온화가 되지 않아 분석과정의 화학 방해물질의 작용을 줄여 줄 수 있다^[8].

에탄올에 의한 화학이온화의 조정(tune) 스펙트럼을 그림 2에 보여 주고 있다. 이 장비에서는 CI 교정 과정이 없으므로 에탄올 증기를 마이크로주사기를 이용하여 질량분석기에 직접 도입하여 측정하였으며, 이렇게 생성된 반응이온들 중 m/z 47 피크의 C₂H₅OH₂⁺가 시료를 이온화시키는 주요한 반응이온의 역할을 한다. 반응이온들로부터 시료기체는 proton 전이 받아 분자이온 [M]⁺보다 질량이 하나 큰 양성자화된 분자이온 [M+1]⁺ 피크를 생성한다.

열분해/메틸레이션과 에탄올 CI 방법으로 측정된 지방산인 stearic acid의 질량스펙트럼을 그림 3에 보



[그림 2] 에탄올을 이용한 CI 조정(tune) 스펙트럼



[그림 3] Stearic acid의 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량스펙트럼

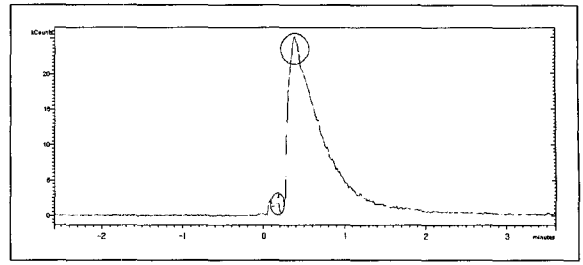
여주고 있다. Stearic acid가 메틸레이션된 stearic acid methyl ester(C18:0 ME)의 분자량은 298amu로 에탄올 CI에 의하여 m/z 299에서 양성자화된 분자이온 $[M+1]^+$ 피크가 기준피크(basepeak)로 크게 나타남을 알 수 있었으며, 이 과정에서 stearic acid methyl ester 분자의 조각나기는 거의 일어나지 않는 것을 알 수 있었다.

나. 박테리아의 열분해 질량스펙트럼

1) 전체 TIC 프로파일

박테리아(BG)를 열분해/메틸레이션시킬 때 그림 4와 같이 TIC(total ion current) 변화에 따른 두 개의 봉우리가 나타남을 볼 수가 있었다. 이것은 열분해 과정에서 두 단계 분해로 박테리아의 세포벽이 먼저 분해가 되어 그 구성물질이 메틸레이션된 후 앞의 작은 봉우리로 나타나고, 이어서 세포내 주요 물질들이 열분해/메틸레이션되어 뒤쪽의 큰 봉우리로 나타나기 때문이다. 박테리아의 경우 이러한 두 개의 봉우리에 의한 각각의 질량스펙트럼을 열분해 질량분석의 특성 연구에 이용할 수 있을 것이다.

이러한 봉우리 경향은 열분해/메틸레이션의 과정에서 TMAH의 주입 시점에 많은 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 실험에서와 같이 TMAH를 주입한 후 약 1초의 시간적인 여유를 갖고 열분해기의 온도를 상승시켰을 경우 그림과 같은 봉우리의 분리를 관찰할 수 있었다. 그러나, 열분해기의 온도 상승이 이루어지는 시점에서 TMAH를 주입할 경우는 앞 봉우리가 뒤쪽 봉우리에 묻혀 버리는 것을 알 수 있었다. 이 경우 앞 봉우리의 전체적인 TIC 크기가 뒤쪽 봉우리에 비하여 1/10 정도 밖에 되지 않아 앞 봉우리에서 관찰



[그림 4] 박테리아의 열분해/메틸레이션 후 시간변화에 따른 TIC 프로파일

되는 질량스펙트럼의 주요 특정 피크들이 거의 관찰되지 않았다. 한편, TMAH를 주입한 후 열분해기의 온도 상승까지 너무 많은 시간 여유를 두면 TMAH의 입자가 작은 관계로 이들이 열분해기의 석영섬유를 통과하는 경향이 증가하여 메틸레이션의 효율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

2) 박테리아의 지방산 분포

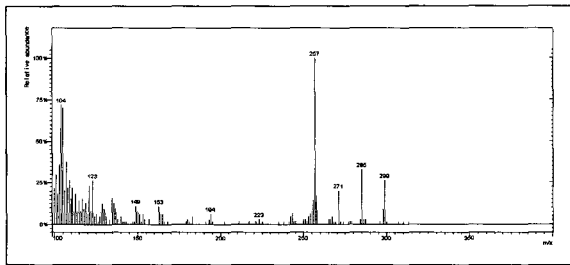
박테리아 세포는 열분해시 복잡한 화합물들로 분해가 이루어지며 이들 물질들 중에서 특징적인 표식물질을 찾기란 매우 힘든 작업이다. 박테리아는 E. coli의 경우 약 70%의 물, 15%의 단백질, 6%의 RNA, 3%의 탄수화물, 2%의 지질, 그리고 기타 DNA, 피막물질, 무기물 등으로 구성되어 있다. 이중 열분해/메틸레이션 질량분석법에서 관심을 갖는 물질은 지질 성분이다.

지질의 경우도 여러 가지 종류의 대상물질이 있으나, 특히 세포벽의 구성 물질인 인지질(phospholipid)이 열분해 구성 성분의 화학적 조성으로부터 대상 박테리아 물질을 확인하는데 많이 이용되고 있다. 인지질은 일반적으로 1개의 인산기와 1개의 알코올(글리세롤) 및 2개의 지방산으로 구성되어 있다. 열분해 과정에서 세포벽을 이루는 인지질은 깨어지면서 다양한 종류의 지방산이 튀어나오게 되는데, 세포마다 그들이 갖는 지방산의 종류와 분포는 고유한 특성을 갖는다.

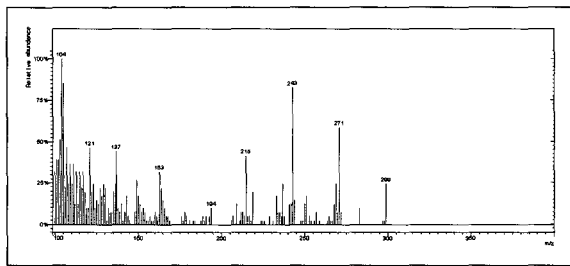
박테리아 3종(BG 영양세포, E. coli, EH)의 열분해/메틸레이션과 에탄올 CI에 의한 질량스펙트럼 중 세포벽내 지방산의 분포에 의한 질량스펙트럼을 그림 5에 보여주고 있다. 지방산에 의한 질량스펙트럼은 열

분해 과정에서 세포벽이 세포내 물질보다 먼저 깨어져 메틸레이션되는 관계로 그림 4와 같은 TIC 프로파일의 앞쪽 봉우리에서 나타났다. 표 2에는 박테리아내의 지방산이 메틸레이션되어 측정될 수 있는 FAME(fatty acid methyl ester)에 의한 주요 피크 성분들을 정리하여 보여주고 있다.

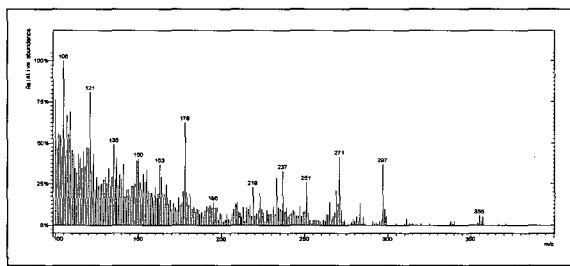
그림 5 (a) BG의 열분해 질량스펙트럼 상에서 m/z 243 (C14:0 MeH⁺), 257 (C15:0 MeH⁺), 271 (C16:0 MeH⁺), 285 (C17:0 MeH⁺), 299 (C18:0 MeH⁺) 등이 FAME류의 양성자화된 분자이온에 해



(a)



(b)



(c)

[그림 5] 박테리아 세포벽내 지방산의 분포에 의한 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량스펙트럼; (a) BG 영양세포, (b) E. coli, (c) EH

[표 2] 박테리아에서 측정되는 FAME의 주요 성분들

FAME isomer ions	m/z	FAME isomer ions	m/z
C12:0MeH ⁺	215	C18:0Me H ⁺	299
C13:0Me H ⁺	229	C18:1Me H ⁺	297
C14:0Me H ⁺	243	C18:1Me H ⁺ -32	265
3-OH C14:0Me H ⁺ -18	241	C18:1Me H ⁺ -50	247
C15:0Me H ⁺	257	C19:0Me H ⁺	313
C16:0Me H ⁺	271	C19:1(C19:cy)Me H ⁺	311
C16:1Me H ⁺	269	C19:1(C19:cy)Me H ⁺ -32	279
C16:1Me H ⁺ -32	237	C19:1(C19:cy)Me H ⁺ -50	261
C16:1Me H ⁺ -50	219	C20:0Me H ⁺	327
C17:0Me H ⁺	285	C20:1Me H ⁺	325
C17:1(C17:cy)Me H ⁺	283	C20:1Me H ⁺ -32	293
C17:1(C17:cy)Me H ⁺ -32	251	C20:1Me H ⁺ -50	275
C17:1(C17:cy)MeH ⁺ -50	233		

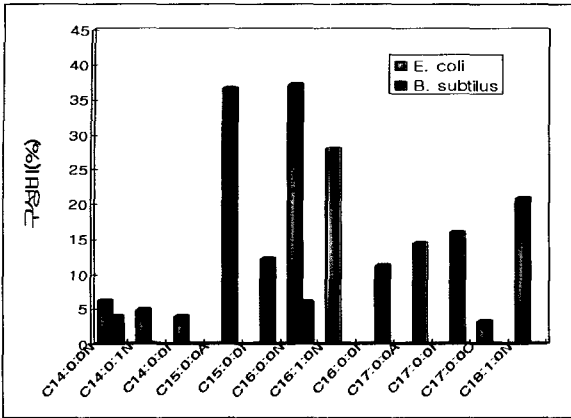
당하는 피크들이었다.

그림 5 (b)에는 실험에서 얻은 E. coli의 열분해 질량스펙트럼을 보여주고 있다. m/z 215 (C12:0 MeH⁺), 219 (C16:1MeH⁺-50), 233 (C17:1MeH⁺-50), 237 (C16:1MeH⁺-32), 243 (C14:0 MeH⁺), 251 (C17:1MeH⁺-32), 269 (C16:1 MeH⁺), 271 (C16:0 MeH⁺), 283 (C17:1 MeH⁺), 299 (C18:0 MeH⁺) 등이 주요한 피크로 관찰되고 있다.

그림 5 (c)에는 EH의 열분해 질량스펙트럼을 보여주고 있다. m/z 219 (C16:1MeH⁺-50), 233 (C17:1 MeH⁺-50), 237 (C16:1MeH⁺-32), 247 (C18:1MeH⁺-50), 251 (C17:1MeH⁺-32), 265 (C18:1MeH⁺-32), 269 (C16:1 MeH⁺), 271 (C16:0 MeH⁺), 283 (C17:1 MeH⁺), 297 (C18:1 MeH⁺) 그리고 311 (C19:1 MeH⁺) 등이 주요한 피크로 관찰되고 있다.

그림 5의 각 질량스펙트럼의 비교에서 중요하게 발견되고 있는 것이 불포화 지방산의 존재이다. BG의 경우 분포하고 있는 지방산이 대부분 포화 지방산(예: C15:0, m/z 157)인데 비하여 E. coli나 EH의 경우 불포화 지방산(예: C16:1, m/z 269)의 분포가 많이 발견되고 있다. 또한, 불포화 지방산을 내포하고 있는 경우 불포화 지방산 메틸유도체의 조각나기에 의한 피크(예: C16:1MeH⁺-32, m/z 237)도 많이 발견되었다. 이러한 경향은 박테리아를 분류하는 주요한 방법인 그람 양성(gram-positive) 박테리아와 그람 음성(gram-negative) 박테리아의 차이점에서 기인한 것으로 생각된다.

실험에 사용한 박테리아 중 BG는 대표적인 그람 양성 박테리아이며, E. coli와 EH는 대표적인 그람 음성 박테리아이다. 그람 양성 박테리아에서는 C15:0 (pentadecanoic acid)과 C17:0(margaric acid)의 홀



[그림 6] E. coli와 B. subtilus의 지방산 분포 비교

수의 탄소수를 갖는 포화 지방산의 분포가 우세한 것으로 알려져 있다. 반면, 그람 음성 박테리아에서는 C16:0(palmitic acid)의 짝수의 탄소수를 갖는 포화 지방산과 C16:1, C18:1 등 불포화 지방산의 분포가 큰 것으로 알려져 있다^[4].

박테리아 열분해 질량스펙트럼 비교에서 알 수 있듯이 박테리아 세포내에 함유된 지방산의 분포는 박테리아의 종류에 따라 다르다. 그림 6에는 E. coli와 bacillus subtilus 영양세포의 지방산 분포의 차이를 인용하여 나타내었다. 이러한 세포내 지방산의 분포 차이에 의해서 각 박테리아 종을 식별할 수 있을 것이다.

3) 박테리아 포자와 영양세포 구별

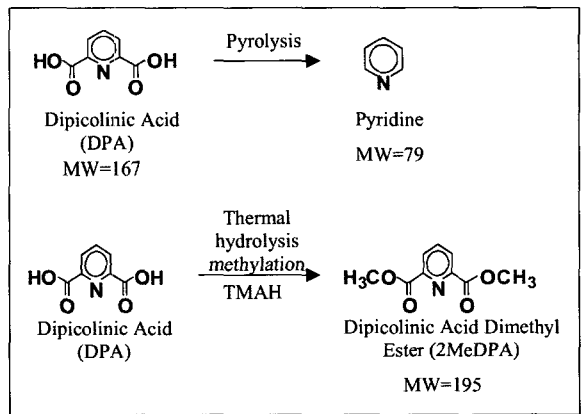
박테리아의 열분해 질량스펙트럼에서 세포내 주요 물질에 의한 질량스펙트럼(뒤쪽 봉우리에서 나타남)은 지방산의 분포에서 확인하지 못한 특징적인 정보를 제공하였다. 그림 7에는 BG 영양세포, E. coli 및 BG 포자의 뒤쪽 봉우리에서 얻어진 세포내 주요 물질에 의한 열분해 질량스펙트럼을 보여 주고 있다. 그림의 (a)와 (b)의 비교에서 BG 영양세포와 E. coli의 경우 m/z 141, 150, 164, 178, 194, 208의 피크들이 피크세기에는 차이가 있지만 거의 동일한 분포로 나타나고 있음을 알 수 있었다.

이것은 세포벽으로 둘러싸여 있는 세포내 물질의 주요한 성분들이 종은 달라도 상호간 유사한 경향이 있는 것으로 판단된다. 그러나, 각각의 피크들이 어떤

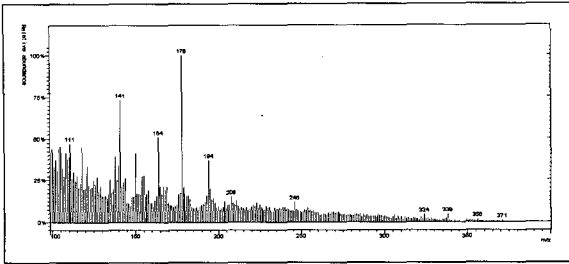
물질에서 기인하는지를 규명하는 일은 매우 어려운 일이며, 여기서는 다만 이러한 경향만을 확인하고자 하였다.

한편, 그림 7 (c), BG 포자의 경우에는 (a), (b)와는 전혀 다른 질량스펙트럼 경향을 보여주고 있다. 여기에서는 m/z 138과 196의 피크가 특징적으로 크게 나타나고 있으며, (a)와 (b)에서 나타나던 주요 피크들은 거의 관찰되지 않고 있다. (c)의 열분해 질량스펙트럼에 나타나는 m/z 138과 196의 피크는 박테리아 포자의 특징적인 피크들로 판단된다. 박테리아가 영양세포에서 포자로 변환될 때 이러한 피크를 유발하게 만든 물질이 우세하게 생성된 것으로 판단되며, 실제 이 물질은 포자에서만 존재하는 DPA (dipicolinic acid)로 알려져 있다^[9].

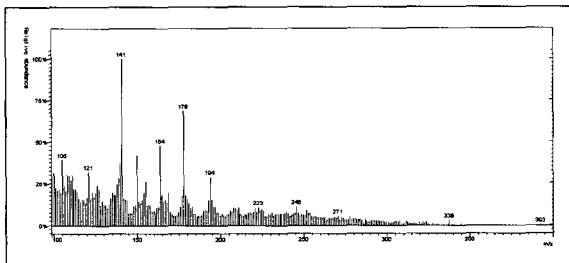
박테리아 포자의 경우도 세포벽 내에 함유된 지방산의 분포는 영양세포일 때와 거의 유사하리라 생각되며, 실제 그림 5 (a)와 유사한 경향을 나타내었다. 영양세포와 구별되는 포자만의 고유한 표식물질을 찾는 것이 포자의 존재를 확인하는데 중요한 과정일 것으로 판단된다. Bacillus anthracis 포자의 연구결과로 DPA가 표식물질로 밝혀졌으며 대부분의 포자류에 DPA가 존재하는 것으로 확인되었다^[10]. 다음의 반응 과정은 DPA의 열분해 및 열분해/메틸레이션 과정의 반응 경로를 보여주고 있다.



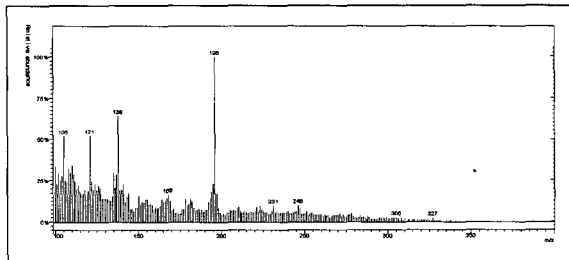
DPA는 분자량 167amu를 갖는 물질로 TGA (thermal gravimetric analysis)에 의하여 약 250℃에서 완전히 분해되는 것을 알 수 있었다(그림 8 참



(a)



(b)

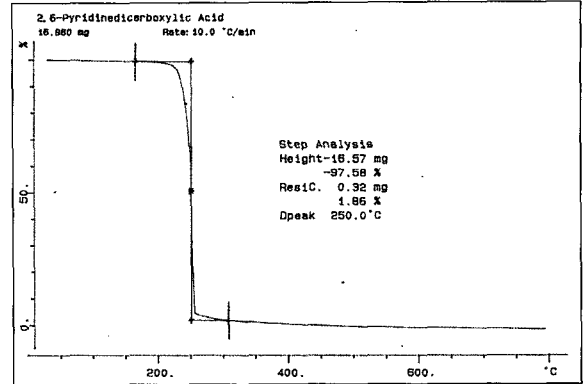


(c)

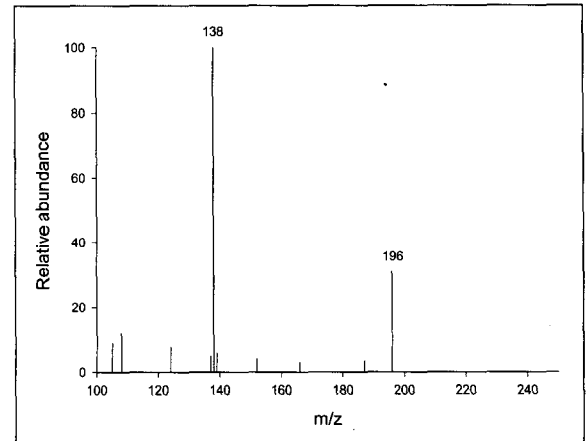
[그림 7] TIC 프로파일의 두 번째 봉우리에서 얻은 박테리아의 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량스펙트럼; (a) BG 영양세포, (b) E. coli, (c) BG 포자

조). 이렇게 DPA는 열분해되어 반응식에서와 같이 분자량 79amu의 pyridine을 주로 생성한다. 열분해/메틸레이션 과정에서 DPA는 열분해보다 메틸레이션 반응이 우세하여 분자량 195amu의 dipicolinic acid dimethyl ester(2MeDPA)를 형성하였다.

DPA의 열분해/메틸레이션 과정에서 생성된 2MeDPA는 DPA와는 달리 가해진 열에 매우 안정함을 실험을 통하여 알 수 있었으며 실제 560°C 이상의 온도에서도 거의 분해되지 않았다. 이것은 메틸레



[그림 8] DPA의 TGA 결과



[그림 9] DPA의 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량 스펙트럼(측정: GCQ™ 시스템)

이션의 과정이 시료의 휘발성을 높게 해 줄 뿐만 아니라 시료의 열적 안정성도 높게 해 줄을 의미한다.

DPA를 열분해/메틸레이션 후 에탄올 CI 및 이온 트랩 질량분석기(ITMS)로 분석한 질량스펙트럼을 그림 9에 보여주고 있다. 질량스펙트럼 상에서는 m/z 137에 양성자가 하나 붙은 m/z 138 이온이 기준피크로 나타났으며, 2MeDPA의 양성자화된 분자이온인 m/z 196 이온이 기준피크의 약 30%의 크기로 측정되었다(피크의 상대적인 세기는 사용한 질량분석기에 의해 달라질 수 있다). 한편, 2MeDPA는 EI 질량분석 과정에서 m/z 137, 105(basepeak), 77 등이 주요 피크로 나타난다는 것이 알려져 있다^[11].

따라서, 박테리아 포자류를 열분해/메틸레이션시킨

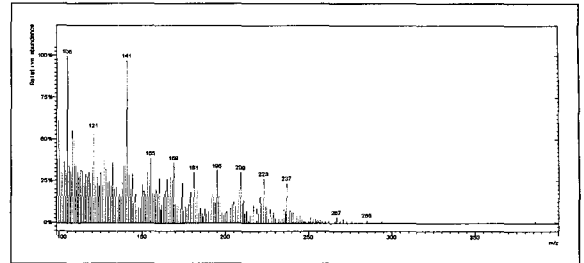
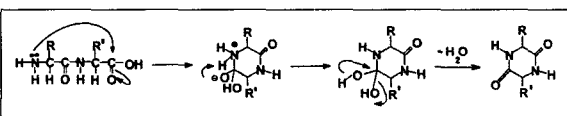
후 에탄올 CI/TMS를 이용하여 분석할 경우 이러한 DPA에 의한 m/z 138 및 196 이온피크를 표식인자로 하여 포자류의 존재를 확인할 수 있을 것이다. 실제 이러한 경향은 그림 7 (c)의 BG 포자 질량스펙트럼에서도 잘 나타나고 있다.

다. 독소 유사작용제의 열분해 질량스펙트럼

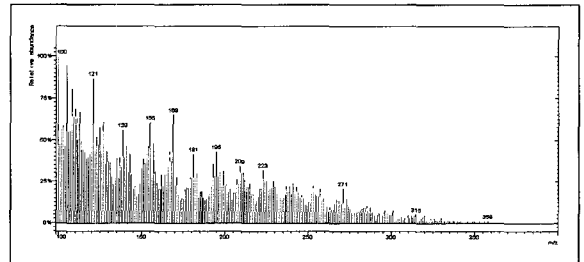
대표적인 독소의 유사작용제인 ovalbumin과 bovine albumin의 열분해/메틸레이션과 에탄올 CI에 의한 질량스펙트럼을 그림 10에 보여주고 있다. 실험에서 사용한 ovalbumin의 경우도 386개의 아미노산이 펩티드 결합으로 이루어진 단백질 고분자에 해당한다. 그러므로, 열분해/메틸레이션에 의한 질량스펙트럼은 그림 10 (a)와 같이 아주 복잡한 경향을 나타내었다. (b)의 bovine albumin의 경우는 질량스펙트럼은 아주 복잡하지만 전체적인 패턴이 ovalbumin과 매우 유사함을 알 수 있었다. 두 질량스펙트럼 모두에서 m/z 139, 141, 153, 155, 157, 167, 169, 181, 195, 209, 223, 237 등이 주요한 피크로 관찰되고 있다. 이것은 ovalbumin과 bovine albumin이 같은 알부민 계열로 그 단백질 조성이 유사함을 의미한다.

독소는 진균독소(Mycotoxins: T-2)의 경우와 같이 분자량이 250~500 Da 정도로 작은 물질에서부터 좀 더 덩치가 큰 펩티드형 독소, 그리고 보툴리눔 독소(Botulinum toxin)와 같이 고 분자량을 갖는 단백질 독소에 이르기까지 다양한 화학적 조성을 갖는다. 그러므로, 질량분석의 과정을 통하여 이들의 특징적인 표식물질을 찾는 것은 아주 어려운 일이다.

단백질은 열분해/메틸레이션 질량분석 과정에서 일반적으로 독특한 표식물질을 생성하지 않는데 이것은 열분해/메틸레이션 과정에 의하여 메틸화된 DKP(diketo-piperazines)류의 고유한 작은 조각들로 단백질이 분해되기 때문이다. 다음의 반응은 디펩티드에 의한 DKP의 생성 과정을 보여주고 있다. 여기서 R 및 R' 작용기는 디펩티드의 선구물질인 아미노산 종류에 따른다.



(a)



(b)

[그림 10] 독소 유사작용제의 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량스펙트럼; (a) ovalbumin, (b) bovine albumin

이 반응에서 앞쪽 아미노산의 N-말단 아미노기가 뒤쪽 아미노산의 카르보닐 탄소를 친핵성 공격하여 중간체를 생성하며, 생성된 중간체에서 물이 이탈하면서 최종적으로DKP를 생성한다. 20여 종류의 아미노산의 배열에 의해 만들어진 단백질의 열분해에 의해서 생성되는 DKP의 종류는 매우 다양하다. 따라서, 단백질의 열분해 질량스펙트럼은 아주 다양하면서 복잡한 경향을 갖는다. 또한 DKP 내에 존재하는 산성수소(예: DKP내 질소원자에 결합된 수소)의 개수만큼 분자내에서 메틸레이션되는 것으로 알려져 있다^[12].

이들 질량스펙트럼의 또 다른 특징은 m/z 153과 167, 155와 169 그리고 181, 195, 209, 223, 237의 일련의 관계에서 나타나는 규칙성이다. 이들 모두는 질량에서 14amu의 차이를 보이고 있는데, 이것은 DKP 분자내의 산성수소의 개수와 관계해서 메틸레이션 과정이 몇 번 일어날 수 있는냐는 문제와 연관된다. 분자내 메틸레이션이 한 번씩 더 일어날 때 마다 14amu씩 증가하게 된다. 질량스펙트럼내 이러한 피

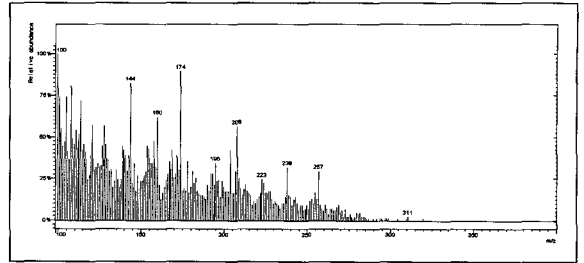
크의 순차적인 특징은 독소와 같은 단백질 열분해 질량분석 과정의 특성으로 해석할 수 있다.

이러한 각각의 피크들의 기원에 대하여 glycine과 proline의 경우를 예로써 설명하고자 한다. Glycine과 proline의 두 아미노산을 일련으로 포함하는 단백질의 열분해 반응에서 분자량 154amu를 갖는 DKP를 만들 수 있다. 이렇게 만들어진 DKP는 분자내 산성 수소를 하나만 갖고 있으므로 이것이 메틸레이션 될 경우 분자량 168amu를 갖는 메틸레이션된 DKP를 만들 수 있다. 이들 두 분자가 각각 에탄올 CI의 과정에서 양성자를 하나 받아 이온화될 경우 각각 m/z 155와 169의 이온을 생성할 수 있다. 이것은 ovalbumin 등의 질량스펙트럼에 나타난 두 피크(m/z 155, 169)와 잘 일치하고 있다.

그러나, 질량스펙트럼에서 나타난 위의 피크들이 모두 glycine과 proline의 반응에서 만들어진 DKP에 의한 것인지는 단정하기 어렵다. 이러한 피크들이 다른 DKP(또는 메틸레이션된 DKP)가 조각나서 생성된 것이거나, 이온-이온 또는 이온-분자 상호 반응에서 생성된 것 일수도 있기 때문이다.

라. 바이러스 유사작용제의 열분해 질량스펙트럼
 바이러스의 특성 연구를 위해 실험에서는 바이러스 유사작용제인 MS2(F-specific coliphage)로써 열분해 질량스펙트럼을 얻었다. MS2의 숙주는 E. coli(대장균)이며 이 물질의 특성은 유독하면서 전염성이 강한 것으로 알려져 있다. 실험에 사용한 MS2는 숙주인 E. coli를 완전히 제거한 후 정제한 것이었다. MS2의 열분해 질량스펙트럼은 그림 11에 보여주고 있다.

얻어진 질량스펙트럼에서는 m/z 144, 158, 160, 168, 174, 195, 204, 208, 223, 238, 257 등이 특징적인 피크로 관찰되었다. 이들 값에서는 ovalbumin 등의 단백질 분석에서 보여진 피크들의 규칙적인 증가는 관찰되지 않고 있다. 이것은 독소의 경우 물질 대부분이 단백질로 구성되어 있는 반면, 바이러스 경우 단백질이 다른 물질들과 혼합되어 있기 때문에 단백질의 피크만이 두드러지게 나타나지 못하기 때문으로 생각된다. 따라서, 질량스펙트럼 상에 나타난 위의 피크들은 핵산, 단백질, 아미노산, 기타 바이러스 구



[그림 11] 바이러스 유사작용제인 MS2의 열분해/메틸레이션 에탄올 CI 질량스펙트럼

성 성분들의 복합적인 발현에서 기원한 것으로 파악되며, 이들 각각을 정확히 해석하는 것은 매우 어려울 것으로 생각된다.

숙주와 기생체로서의 관계성 때문에 실험에서와 같이 순수하게 정제된 바이러스성 물질을 준비하는 것은 힘들며, 따라서 바이러스를 전파시키는데 사용되는 매개체(media)에 연구의 초점이 맞추어져 있다. 바이러스의 탐지는 많은 양의 매개체 속에 아주 작은 양의 바이러스가 포함되어 있다는 점을 이해해야 한다. 질량분석법으로 바이러스를 분석하는데 있어서 측정된 질량스펙트럼은 숙주의 혈청 및 플라즈마 세포의 질량스펙트럼과 동시에 나타나게 된다. 이것은 바이러스를 직접적으로 탐지하는데 어려움을 주거나 불가능하게 하며, 측정된 질량스펙트럼에 나타나는 각각의 질량피크를 정확히 판단하기에도 많은 어려움을 준다.

반면에 바이러스를 확산시키기 위해 배양한 매개체 그 자체는 탐지하기에 아주 효과적이다. 대기 환경 속에서 에어로졸화 된 배양 매개체의 탐지는 바이러스성 작용제의 존재를 강력히 암시할 것이다. 스테로이드 계열은 포유동물의 혈액 내에 가장 풍부하게 함유되어 있다. 이 중 콜레스테롤에 의한 피크의 발견은 포유류 형태의 세포 시스템의 존재를 암시하여 바이러스의 존재를 예견할 수 있다고 한다^[13-14].

만약 열분해/메틸레이션 질량분석 과정 전에 선택적인 고립 방법으로 공기 중에 있는 바이러스류를 포집할 수만 있다면 얻어진 질량스펙트럼은 바이러스에 의한 질량스펙트럼과 유사할 것이다. 그림 11의 MS2 경우와 같이 질량스펙트럼 상에는 바이러스 내의 주 성분인 핵산, 단백질, 자유 아미노산 등에 의한 열분

해 피크들이 복잡하게 나타날 것으로 예상된다.

4. 결론

본 논문에서는 자체 제조한 열분해기를 이용한 열분해 질량분석법으로 생물학 물질의 특성을 연구하였다. 박테리아의 경우 열분해 과정에서 분해된 물질들은 두 개의 TIC 봉우리로 관찰되었다. 첫 번째 봉우리는 세포벽내의 지방산 분포에 의한 것이었으며, 두 번째 봉우리는 세포내 주요 물질에 의한 것이었다.

박테리아 영양세포에서 지방산의 메틸레이션에 의한 FAME류의 분포는 박테리아 종류에 따라 다르게 측정되었으며, 이것을 이용하여 박테리아를 구별할 수 있을 것으로 판단된다.

박테리아 영양세포와 구별되는 포자의 확인은 두 번째 TIC 봉우리에서 관찰된 DPA의 메틸레이션에 의한 2MeDPA의 특정 피크(m/z 138, 196)를 이용할 수 있을 것이다.

독소의 경우 단백질의 열분해에 의해서 생성된 DKP류에 의한 특정 피크들을 그 식별에 이용할 수 있을 것이며, 이들은 메틸레이션 과정에서 규칙적인 피크 형태로 나타났다.

바이러스의 경우 배양 매개체에 의한 특정 피크를 표식물질로 이용할 수는 있지만 정제된 바이러스의 경우 단백질 등에 의한 복잡한 피크 경향을 나타내었다. 그러므로, 이들 피크 중 바이러스의 특성을 나타내는 재현성 있는 피크를 찾는 과정이 필요하였다.

참 고 문 헌

[1] W. H. Griest, M. B. Wise, K. J. Hart, S. A. Lammert and C. V. Thompson, "Biological agent detection and identification by the Block II chemical biological mass spectrometer", *Field Anal Chem Tech*, vol. 5(4), 2001, pp.177~184.
 [2] S. Luo, J. Mohr, D. Sickenberger and A. Hryniewicz, "Study of purified bacteria and

viruses by pyrolysis mass spectrometry", *Field Anal Chem Tech*, vol. 3(6), 1999, pp.357~374.
 [3] M. Xu and K. J. Voorhees, "Differentiation and classification of user-specified bacterial groups by in situ thermal hydrolysis and methylation of whole bacterial cells with *tert*-butyl bromide chemical ionization ion trap mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, vol. 418, 2000, pp.119~128.
 [4] A. J. Madonna, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Rapid detection of taxonomically important fatty acid methyl ester and steroid biomarkers using in situ thermal hydrolysis/methylation mass spectrometry (THM-MS): implications for bioaerosol detection", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 61, 2001, pp.65~89.
 [5] M. Xu, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Repeatability and pattern recognition of bacterial fatty acid profiles generated by direct mass spectrometric analysis of in situ thermal hydrolysis/methylation of whole cells", *Talanta*, vol. 59, 2003, pp.577~589.
 [6] J. D. J. van den Berg and J. J. Boon, "Unwanted alkylation during direct methylation of fatty (di)acids using tetramethyl ammonium hydroxide reagent in a Curie-point pyrolysis unit", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 61, 2001, pp.45~63.
 [7] S. A. Barshick, D. A. Wolf and A. A. Vass, "Differentiation of microorganisms based on pyrolysis-ion trap mass spectrometry using chemical ionization", *Anal Chem*, vol. 71, 1999, pp.633~641.
 [8] K. J. Hart, M. B. Wise, W. H. Griest and S. A. Lammert, "Design, development, and performance of a fieldable chemical and biological agent detector", *Field Anal Chem Tech*, vol. 4(2-3), 2000, pp.93~110.
 [9] C. D. Havey, F. Basile, C. Mowry and K. J.

- Voorhees, "Evaluation of a micro-fabricated pyrolyzer for the detection of *Bacillus anthracis* spores", J. Anal. Appl. Pyrolysis, vol. 72, 2004, pp.55~61.
- [10] M. B. Beverly, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Direct mass spectrometric analysis of *Bacillus* spores", Rapid Comm. Mass Spectrom., vol. 13, 1999, pp.2320~2326.
- [11] F. Basile, M. B. Beverly and Kent J. Voorhees, "Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling with pyrolysis mass spectrometry", trends in Analytical Chemistry, vol. 17(2), 1998, pp.95~109.
- [12] A. D. Hendricker and Kent J. Voorhees, "Amino acid and oligopeptide analysis using Curie-point pyrolysis mass spectrometry with in-situ thermal hydrolysis and methylation: mechanistic considerations", J. Anal. Appl. Pyrolysis vol. 48, 1998, pp.17~33.
- [13] A. J. Madonna, K. J. Voorhees, T. L. Hadfield and E. J. Hilyard, "Investigation of cell culture media infected with viruses by pyrolysis mass spectrometry: implications for bioaerosol detection", J Am Soc Mass Spectrom, vol. 10, 1999, pp.502~511.
- [14] F. Basile, M. B. Beverly, C. Abbas-Hawks, C. D. Mowry, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Direct mass spectrometric analysis of in situ thermally hydrolyzed and methylated lipids from whole bacterial cells", Anal Chem, vol. 70, 1998, pp.1555~1562.