

= 단 신 =

다량 시료중 마이크로시스틴의 농축 및 분석

김명희\* · 김태승 · 김태근\*\* · 박선구\*

\*한국석유품질검사소 시험연구부, \*\*청주대학교 환경공학과, 국립환경연구원  
(2000. 1. 21 접수)

Application of Reversed-Phase Solid Phase Extraction for the HPLC  
Analysis of Microcystins in Water

Myeong-Hee Kim\*, Tae-Seung Kim, Tae-Keun Kim\*\* and Sun Ku Park\*

\*R & D Dept., Test & Research Division, Petroleum Quality Inspection Institute;  
466-5 Back-Hyun dong, Bundang gu, Seongnam, Kyungki do 463-420, Korea

\*\*Dept. of Environmental Engineering, Chongju University

36 Naedo dong, Sangdang gu, Chongju Si 360-764, Korea

National Institute of Environmental Research 613-2 Bulkwang dong,

Enpyung gu, Seoul, 122-706, Korea

(Received January 21, 2000)

**Abstract:** To determine the concentrations of microcystins present in lake water or in tap water using high performance liquid chromatography, it is necessary to concentrate a large volume of water samples (about 20 L) into very small volume (0.1-0.3 mL). Concentration can be conveniently done when disc type solid phase extraction (SPE) apparatus is used. Using this apparatus we have investigated the recovery rates of three kinds of microcystins, RR, YR, LR. The recovery rates were relatively low and the reproducibilities were not good either. It is expected, however, that the appropriate selection of the disc conditioning and eluting solvents and reproducible reconcentration process after SPE will improve both the recovery rates and the reproducibilities.

**Key words:** microcystin, microcystis, hepato-toxin, solid phase extraction, recovery rate, high performance liquid chromatography, octadecyl reversed phase disc

1. 서 론

최근 팔당호, 대청호 등과 같은 대형 인공댐과 유속이 느리고 정체 구간이 많은 낙동강과 같은 수체에서 발생하는 남조류의 수화 현상은 이취미나 독성 물질을 발생시킬 수 있으며, *Anabaena* 및 *Microcystis* 등을 이러한 지역에서 자주 출현하고 있는 조류종이다. 특

히 *Microcystis*는 독성물질을 분비하는 대표적인 남조류로서 조체의 세포 안에 포함된 독성 물질이 세포의 파괴나 분비를 통하여 수체로 이동할 수 있다. 남조류 수화에 의한 동물 피해가 호주 *Nodularia*에서 보고된 이래로 미국, 캐나다, 영국, 일본 등 많은 나라에서 유독 남조류에 의한 동물의 피해가 보고되고 있다.<sup>2</sup>

조류 독성 물질인 microcystin은 *Microcystis*속의 많은 종에 의해 생산되며, 그 외 *Oscillatoria*속과 *Anabaena*속에서도 microcystin 생산종이 보고되고 있다.<sup>3,4</sup> *Microcystis*에 대한 독성물질의 분리, 정제 및

\* Corresponding author  
Phone : +82-(0)2-389-6711 Fax : +82-(0)2-357-2961  
E-mail : nierpsk@hanmail.net

측정기술 등의 개발이 이루어져 있는데, 분리·확인 방법으로 고성능 액체크로마토그래피법(HPLC) 또는 HPLC/MS 등이 가장 널리 사용되고 있다.<sup>5</sup> 또한 NMR, FAB mass spectrometry 등을 사용하여 그 구조가 밝혀지게 되었는데 microcystin은 일곱개의 아미노산으로 이루어진 환상의 펩타이드이다. 세계의 D-amino acids와 두개의 L-amino acid, 그리고 두개의 특수 아미노산으로 구성되어 있으며 그 중 D-amino acid와 특수 아미노산은 대부분의 microcystin에서 공통이며 두개의 L-amino acid의 종류에 의해 microcystin의 종류가 달라진다. 또한 몇 가지 변형된 구조로서 9-O-acetyl adda 또는 9-O-desmethyl adda 등이 보고된 바 있어,<sup>6</sup> 현재까지 약 50여 변종의 Microcystins가 알려져 있다.<sup>7</sup>

Microcystin의 독성은 동물실험에서 주로 간장에 급성독성을 나타내는 간장독(hepatotoxin)으로 밝혀졌으며 protein phosphatase를 저해하는 발암작용이 있는 것으로도 밝혀졌다.<sup>8,9</sup> 또한 물고기의 근육에서 소량의 microcystin이 검출되어 물고기에 대한 독성도 조사 방법을 가능하게 하였다.<sup>10</sup>

Microcystin의 분석 결과들은 이 독소가 일반적인 정수처리과정(응집-여과-염소소독)에 의해서 효과적으로 제거되지 않는다고 보고하고 있다.<sup>11,12</sup> 따라서 정수과정에서 남조류와 남조류의 독소를 제거하는 것은 매우 중요한 문제가 되었다. 정수과정에서 남조류의 독소를 효과적으로 제거하기 위하여 염소소독,<sup>13</sup> 활성탄 여과 및 오존처리<sup>11,12,14</sup> 그리고 생물막 산화조<sup>15</sup> 등의 몇 가지 고도처리기술이 개발되어 독소제거에 이용되고 있다.

Wicks와 Thiel<sup>16</sup>은 자연적으로 발생한 남조류 수화에서 독소의 농도는 환경적인 요인에 의하여 영향을 받는다고 보고하고 있어 남조류의 발생량만으로 그 독성의 정도를 직접 예측할 수 없고 생물학적 실험이나 분석을 통한 독성물질의 농도 확인을 통하여 위해성 여부를 결정해야 할 것이다. Microcystin의 분석은 주로 C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge를 사용하여 HPLC로 분석하고 있으며, CN cartridge를 이용한 방법도 국내에서 연구된 바 있다.<sup>17</sup> 조류체 내부에 함유된 microcystin의 정량은 냉동 건조된 남조류를 전처리하여 C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge에 흡착시킨 후 용리시켜 HPLC로 분석하기도 하였으나,<sup>18,19</sup> 상수원이나 정수 등에 함유된 microcystin은 20l 가량의 물을 농축하여야 하므로, 카

트리지형보다는 디스크형의 solid phase extraction (SPE) 장치가 편리하다. 단일항체반응을 이용한 ELISA방법은 검출한계가 HPLC보다 약 1000배 정도 낮아 농축과정이 필요하지 않으나, 단일항체가 microcystin 종류를 구분하여 검출할 수 없다. 따라서 전체 독성을 가늠하기 위한 정량방법으로는 불완전한 방법이라 하겠다. 본 논문에서는 호소수나 수돗물 속에 intact한 상태로 존재하는 microcystin의 종류를 HPLC로 각각 분리정량하기 위하여, SPE Octadecyl (C<sub>18</sub>) reversed phase disc를 이용한 시료농축방법의 회수율을 조사해 보았다.

## 2. 실험

본 실험에 사용된 microcystin 표준물질은 microcystin YR (Calbiochem사), microcystin RR (Calbiochem사), microcystin LR (Sigma사)이며, 표준물질 각각을 100% methanol에 녹여 500 ppm으로 만든 후 -20°C에 보관·사용하였다. 500 ppm 농도의 표준물질 1.7-8.1 µl (0.85-4.05 µg)을 0.5% 또는 5% methanol 500 ml에 넣고 octadecyl (C<sub>18</sub>) extraction disc (3 M Empore, USA)를 장착한 autotrace solid phase extraction workstation (Tekmar, Cincinnati, Ohio, USA)에 통과시켰다. Adsorbent particle의 질량은 solid phase extraction (SPE) disc 질량(0.553 g)의 90±2%이고 adsorbent particle의 흡착용량은 흡착제 질량의 1-3%이므로 disc 한 장의 흡착용량은 5.0-14.9 mg으로 계

Table 1. Operation condition of solid phase extraction apparatus

Sample solvent	0.5% or 5% methanol
Disc conditioning	① 100% methanol ② reagent grade water
Disc rinsing	10% methanol
Eluting solvent	100% methanol

Table 2. HPLC operation condition

Column	Waters Puresil 5 µ C <sub>18</sub> , 4.6 × 150 mm
Mobile phase	MeOH-0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.0) in H <sub>2</sub> O
Flow rate	1 ml/min
Detector	Waters 996, photodiode array (PDA) detector (wavelength : 239 nm)

산되었다. 본 실험에서 사용한 표준물질의 절대량은 disc한 장의 흡착능력의 1/1000에도 미치지 않는 양이었다.

SPE의 시험 조건은 Table 1과 같으며, 용리된 추출액은 다시 회전증발농축기로 재농축시켜 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석조건은 Table 2와 같다.

### 3. 결과 및 고찰

Microcystin RR, YR, LR의 HPLC chromatogram과 각각의 봉우리에 대한 UV spectra가 Fig. 1에 나타나 있다. 각 microcystin의 머무름 시간은 극성이 클수록 짧아 RR, YR, LR의 순서로 컬럼으로부터 용출되었다. Microcystin의 UV spectrum은 Fig. 1에서와 같이 239 nm 부근에서 최대흡수를 보이며, 머무름 시간과 함께 microcystin 피크임을 재확인하는 방법으로 유용하다.

Table 3에 요약된 회수율 실험결과에 의하면, 현재의 SPE 조건으로는 회수율이 대체적으로 낮았는데 이것은 소량의 조체로부터 냉동건조 및 증발농축을 통하여 얻어진 농축액에 의한 microcystin 분석방법과는 달리 조체가 제거된 20l 이상 대량의 수체 또는 수돗

물에서 신속하게 microcystin을 디스크타입의 SPE 장비를 사용하여 농축하는 국내에서 최초로 시도되는 분석방법이며, 회수율을 높이기 위한 연구를 보다 더 수행하고 있다. SPE disc의 활성화 상태를 유지하기 위해 시료용액에 첨가한 methanol의 농도가 0.5%일 때는 극성이 높은 microcystin RR의 회수율이 대체적으로 높았다. 그러나 메탄올의 농도가 높아지면(5%) 비교적 극성이 작은 LR과 YR의 회수율이 상대적으로 높아지는 것을 알 수 있었다. 극성이 큰 용매는 비극성인 용질과 흡착제(adsorbent)의 상호작용을 방해하여 용질이 머무르지 않고 그대로 통과되므로 극성이 작은 용매일 경우 회수율이 전반적으로 더 높았으나, 독성이 높은 microcystin LR을 중점적으로 분석하고자 할 경우에는 메탄올의 농도를 0.5% 이상으로 유지하는 것이 회수율을 높이는 방법이 될 것으로 판단되었다.

메탄올의 농도가 5%일 때에는, 세 microcystin 가운데 가장 극성이 작아 C<sub>18</sub> 컬럼에서의 머무름 시간이 가장 긴 microcystin LR의 회수율이 가장 높았다. 그러나 methanol의 농도가 0.5%(약한 용매)일 때에는 셋 가운데 극성이 가장 높은 microcystin RR의 회수

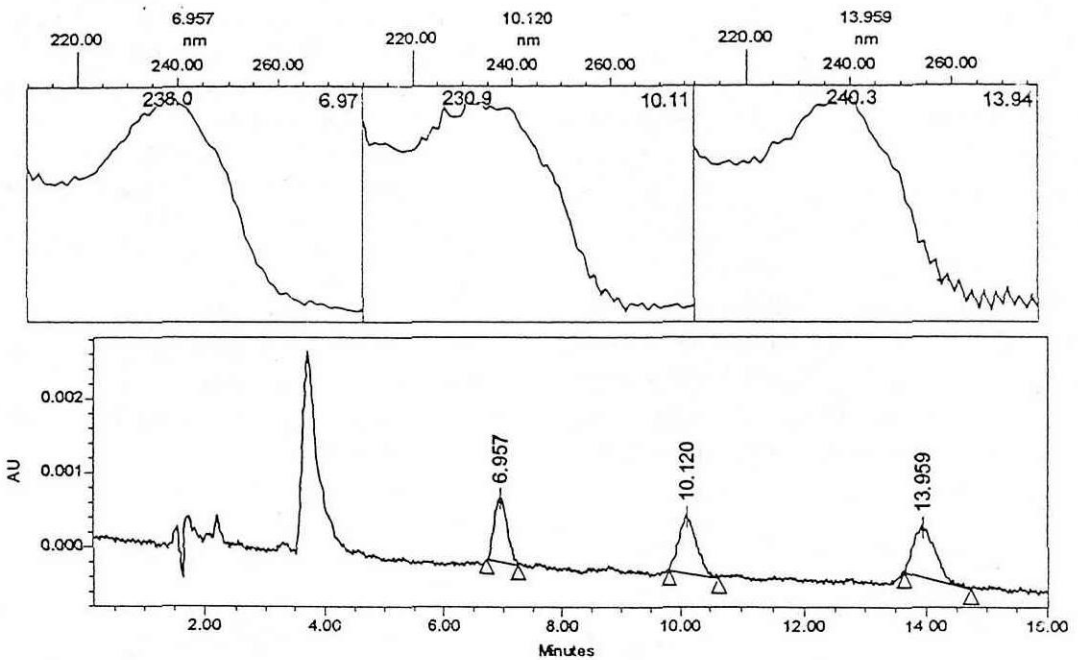


Fig. 1. HPLC chromatogram of microcystin RR, YR, LR and their UV spectra.

Table 3. Recovery rates of microcystins

Run No.	Kind	Content of microcystin (ng)/sample 500 ml	Recovery (%)	Mean recovery (%)	Sample pretreatment
1	RR	850	22.4	RR : 11.6 YR : 19.0 LR : 58.6	5% methanol
	YR	500	ND		
	LR	1000	107.6		
2	RR	2550	5.22		
	YR	2525	9.41		
	LR	1950	72.4		
3	RR	3400	10.82		
	YR	4000	27.49		
	LR	2500	30.8		
4	RR	4050	7.97		
	YR	3250	19.97		
	LR	2900	23.79		
5	RR	2300	105	RR : 61.0 YR : 34.2 LR : 26.1	0.5% methanol
	YR	2650	50.6		
	LR	2700	36.3		
6	RR	2700	16.9		
	YR	2625	17.8		
	LR	2655	15.8		

ND : Not Detected

율이 가장 높았다. 강한 용매는 비극성인 분석제 (analyte)와 흡착제 (adsorbent)의 상호작용을 방해하여 분석제가 머무르지 않고 그대로 통과되므로 (break-through 현상) 약한 용매일 경우 회수율이 전반적으로 더 높았으나, 독성이 가장 높은 microcystin LR에 중점을 두어 분석하고자 할 경우에는 methanol의 농도를 0.5% 이상으로 높이는 것이 유리할 것으로 본다.

본 실험의 회수율은 disc conditioning solvent와 eluting solvent의 적절한 선택, 고체상 추출후 재농축시 미량시료의 농축에 적합하고 재현성있는 방법의 도입을 통해 향상되어질 수 있으리라 판단되었다. 또

한 실제 시료를 농축할 경우 약 20%의 시료량이 필요하므로 disc를 통과하는 시료량에 따른 회수율의 차이도 현재 조사연구중에 있다.

### 참고문헌

1. G. Francis, *Nature* (London), **18**, 11-12 (1992).
2. W. W. Carmichael and R. S. Saffermann. A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins, EPA/600/R 92/079, 1992.
3. K. Sivonen, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2495-2500 (1992).
4. R. Luukkainen, *Appl Environ. Microbiol.*, **59**, 2204-2209 (1993).
5. K-I Harada, *J. Chromat.*, **448**, 275-283 (1988).
6. M. Namikoshi, *J. Org. Chem.*, **57**, 661-666 (1992).
7. Mariyo F. Watanabe, Ken-ichi Harada and Hirota Fujiki, *Waterbloom of Blue-green algae and their toxins*, Univ. of Tokyo Press, p. 65, 1994.
8. I. R. Falconer, *Aust. J. Biol. Sci.*, **34**, 179-187 (1981).
9. D. K. MacKintosh, A. Beattie, S. Klumpp, S. Cohen, and G.A. Codd. *FEBS Let.*, **264**, 187-192 (1990).
10. M. F. Watanabe et al., *Natural Toxins*, **5**, 31-35 (1997).
11. A. M. Keijola, K. Himberg, A.L. Esala, K. Sivonen and L. Hiisvirta. *Toxic. Assess.*, **3**, 643-656 (1988).
12. K. Himberg, A. M. Keijola, L. Hisvirta, H. Pysalo and K. Sivonen. *Wat. Res.*, **23**(8), 979-984 (1989).
13. B. C. Nicholson, J. Rositano and M. D. Burch, *Wat. Res.*, **28**(6), 1297-1303 (1994).
14. I. R. Falconer, *J. AWWA.*, Feb (1989).
15. Y. Inamori, R. Sudo, K. Kaya, Y. Ohno and K. Oyama, *Proceeding of IAWPRC.*, 311-314, 1990.
16. R. J. Wicks and P. G. Thiel. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1413-1418 (1990).
17. 표동진 외, *대한화학회*, **38**(10), (1994).
18. 박혜경, 진익렬, 류홍일, 류재근, 稻森悠平, *한국수질보전학회지*, **12**(1), 29-34 (1996).
19. 김범철, 김은경, 표동진, 박호동, 허우명, *한국수질보전학회지*, **11**(3), 231-237 (1995).