

## 해수로부터 용존 유기물의 Solid Phase Extraction을 위한 다수 시료 처리 장치

조기웅<sup>(1)</sup>, 정경화<sup>(2)</sup>, 신종현<sup>(2)</sup>, 김석현<sup>(2)</sup>, 홍기훈<sup>(2)</sup>

### Multisample Extraction system for Solid Phase Extraction of Dissolved Organic Compounds from Sea Water

by

Ki Woong Cho<sup>(1)</sup>, Kyungwha Jung<sup>(2)</sup>, Jongheon Shin<sup>(2)</sup>, Suk Hyun Kim<sup>(2)</sup>  
and Gi-Hoon Hong<sup>(2)</sup>

#### 요 약

지용성 용존 유기물을 해수로부터 효율적으로 추출할 수 있는 고체상 추출 (solid phase extraction) 장치를 새로이 고안하였다. 본 장치는 octadecyl silane (ODS) cartridge와 압력 평형 막, 96 multifold, 아스피레타 형 진공 펌프로 구성하였다. 본 장치는 기존의 액체-액체 추출법보다 회수 효율은 1.4 배 이상 증대시켰으며, 최소 시료량을 8 배 이상 감소시켰다. 따라서 용매의 사용을 5 배 이상 감소시킬 수가 있으므로 나중에 사용된 용매를 제거하는 노력도 크게 감소시켰다. 뿐만 아니라 96 개의 시료(각 1 ℓ)를 동시에 처리할 수 있으므로 지용성 용존 유기물의 추출 과정을 반자동화시킨 획기적인 장치이다. 본 장치를 통하여 황해 해수 시료에서 추출된 용존 탄화수소의 정성 및 정량 분석 결과 본 장치가 효율성과 신뢰성에서 기존의 액체-액체 추출법을 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

#### Abstract

A multisample extraction device was newly designed for efficient extraction of dissolved lipophilic organic compounds from sea water sample. This device allowed extraction of organic compounds from up to 96 sample at a time using 96 multifold on the principle of solid phase extraction with commercially available octadecyl silane (ODS) cartridges. The recovery yield of the new device was higher than 90 % while that of conventional liquid-liquid extraction process are only 60 - 70 %. The amount of solvent required for the new device could be reduced to less than 20 ml per 1 ℓ of sample while 1 - 2 ℓ of solvent were used in the conventional liquid-liquid extraction process. The usefulness of this novel method was demonstrated with sea water samples collected from Yellow sea, and the qualitative and quantitative analyses results of the dissolved hydrocarbon showed this method was superior to that of conventional liquid-liquid extraction process in efficiency and reliability.

Keywords: solid phase extraction (SPE), 96-multifold, dissolved organic carbon, lipid

(1) 해양화학연구원, 한국해양연구소, kwcho@kordi.re.kr

(2) 경기도 안산시 사동 1270, 425-600

## I. 서 론

해양에서의 유기물질의 정성 및 정량은 해양학적 과정의 이해나 유기 오염물질의 거동 및 분포 조사에 매우 중요한 부분이다. 입자 상태로 존재하는 유기물의 경우 GF/F 등 glass fiber filter를 이용하여 입자 물질을 분리한 후 이를 추출하는 방법을 사용하고 있으나 (Sicre et al., [1993]) 용존 상태의 유기물의 추출은 대개의 경우 매우 낮은 농도로 존재하므로 추출에 많은 어려움이 있다 (Douabul and Al-Shiwafi [1998]). 용존 유기물질은 해양에 존재하는 입자성 물질들에 흡착되어 여과 식자 (filter feeder)인 패류 등의 영양물질로 이용되기도 하며 특히 해양 세균에게는 직접 이용되는 물질군이다 (Law and Anrdulewicz [1983]), 또 일차 생산성이 높은 연근해에서 주로 생성되는 용존 유기물질은 생성지 근처에 절반 이상 침강하는 입자성 유기물질과는 달리 원거리 이동이 가능하므로 원양의 심해에 유기물질의 공급원이 되기도 한다 (Snedaker et al., [1995]).

용존 유기물 중에서 탄화수소군은 해양환경 어디에나 존재하며 여러개의 기원으로부터 유래된다. 즉, 육상 유입, 석유 오염, 천연 석유 누출 (natural seepage), 해양생물에 의한 생산 (Biegger et al., [1997]) 등으로 그 기원을 구별할 수 있으며 그 기원에 따른 추적자 (Biomarker)로서의 이용도가 높아 이들의 분리 및 분석은 해양 환경의 이해에 매우 중요한 부분이다 (Volkman et al., [1997]; Fahl and Stein [1999]).

용존 탄화수소를 분석하기 위하여서는 우선 해수 시료로부터 유기물질을 추출하여야 하는데 기존의 해수로부터 용존 유기물을 추출하는 방법은 toluene이나 n-heptane 등 유기 용매를 이용한 액체-액체 추출법이 일반적이다. 그러나 이 경우 그 추출 효율이 낮으므로 추출을 위하여 다량 (10 - 40 l)의 시료가 필요하며 또 많은 양의 용매를 사용하여야 한다. 또한 이렇게 추출된 물질의 농축과정에서 다량의 유기 용매를 제거하는 데 많은 시간과 노력이 소모된다 (UNEP [1991]). 이를 대체할 수 있는 방법으로 solid phase extraction(SPE) 방법이 제시될 수 있다. 그러나 기존의 SPE 방법은 주로 고농도의 소량 시료 (예: 체액 등)에서 유기물을 추출하는 데 주로 이용되어왔다 (Chritie [1989]). SPE 방법에 사용되는 resin의 종류에는 ion exchange 방법이나 XAD-2 resin이나 ODS resin에 의한 hydrophobic interaction을 이용한 방법이 있는데 이러한 SPE 방법을 사용하면 다수의

시료의 동시 처리가 가능하고, 표준화되어 cartridge 형태로 시판되는 제품의 이용이 가능하여 결과의 재현성을 높일 수 있고, 사용되는 유기 용매의 양이 기존의 액체-액체 추출법에 비하여 1/10 - 1/100 정도로 적어 시간과 비용의 절감 효과가 크다 (Ebeler and Shibamoto [1994]). 특히 해수 중의 용존 유기물 중 비 수용성인 지방 성분은 hydrophobic interaction을 이용한 solid phase extraction 방법으로 매우 효율적으로 추출이 가능하다. 본 보고에서는 해수중의 용존 지방성분을 ODS cartridge를 사용하여 solid phase extraction 방법으로 추출, 농축, 분석하는 효율적인 방법과 이를 효율적으로 수행할 수 있도록 새로이 고안된 장치에 관하여 기술하였다.

## 2. 실험방법 및 장치

### 2.1. 사용한 시약 및 재료

추출에 사용된 유기용매 (MeOH, n-heptane)은 HPLC grade로 Merck (Germany)사에서 구입하였고 효율 비교를 위한 hexadecanol과 octadecanol은 Sigma 제품을 사용하였다. 표준 시료들인 cholesterol acetate, Behenyl myristate, docosane, docosanol, cholesterol, phosphatidyl choline도 Sigma 제품을 사용하였다. 1 l 들이 narrow mouth polypropylene 병은 Nalgene 사 (USA)에서 구입하였고 10 ml polypropylene syringe는 Aldrich (USA)에서 구입하였다. ODS-cartridge (600 mg)은 Alltech사 (USA)의 제품을 사용하였다. Polypropylene 병에 사용되는 narrow mouth cap (38 mm)에 male luer fitting과 ventilation tube (1/32" ID)를 부착하여 흡착을 위한 압력 평형 마개를 실험실에서 제조하여 사용하였다. 96 multifolder는 투명 polycarbonate 재질로 Sigma Chemical Co (Z37,080-0, USA)에서 구입하였다. ODS cartridge와 96 multifolder는 Tygon tube (1/8" ID, Nalgene)로 연결하였고 진공펌프는 aspirator (Iwaki, Japan)나 대용량 peristaltic 펌프(Masterflex Model 7529-10, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 다수 시료 흡착 장치의 구성 및 실시예

시료 채집 현장에서 취한 해수 시료 1 l를 GF/F filter (pore size : 0.45 μm)를 이용하여 1차로 여과하여 부유물질을 제거한 후 polypropylene bottle에 담아 실험실로 운반하였다. 미리 준비한 압력 평형

마개(Screw cap with male luer fitting and ventilation tube, Fig. 1)로 이 PP 시료병의 마개를 바꾸어 막은 뒤 male luer fitting에 미리 MeOH (5 ml)와 3차 증류수(5 ml)로 세척한 ODS-cartridge를 끼우고 96 multifolder에 연결된 Tube (1/8" ID)에 부착한 다음 이 PP 시료병을 적당한 고리에 거꾸로 매단다. 96 multifolder의 outlet을 aspirator (IWAKI, Japan)에 연결하고 시료병 안의 모든 해수 시료를 ODS cartridge에 통과시킨다. 이 과정은 대략 2-3 일간의 시간을 필요로 하며 동시에 96 개의 시료의 추출이 가능하다. 1 l의 해수가 모두 ODS cartridge를 통과하여 흡착이 끝나면 ODS cartridge의 female luer fitting에 빈 시료병 대신 증류수 5 ml가 채워진 10 ml 들이 polypropylene syringe를 연결하여 ODS cartridge를 세척한다. 이 과정은 ODS cartridge내에 남아 있는 염분을 제거하기 위하여 필요하며 세척이 종료되면 syringe에 의하여 ODS cartridge의 입구가 막히므로 진공의 손실이 없다.

세척이 완료된 ODS cartridge는 공기를 채운 10 ml polypropylene syringe로 purge하여 공극에 남아 있는 증류수를 완전히 제거하고 다시 10 ml polypropylene syringe에 5 ml의 50 % MeOH을 채워 cartridge를 세척하여 약하게 부착된 유기물을 제거한다. 이들은 sugar나 amino acid의 분석에 이용할 수 있다. 탄화수소나 지방 등 강하게 흡착된 성분은 다시 5 ml의 100 % MeOH로 추출한 후 Speed-Vac (Vision, Korea)으로 용매를 제거하고 일정 부피(50  $\mu$ l)의 용매에 녹여 다음 단계의 분석을 수행한다. 흡착이 끝난 ODS-cartridge의 세척과 추출은 24 hole vacuum manifold (Altech, USA)를 이용하여 수행하면 더욱 효과적이다.

## 2.3. Chromatography 분석

### 2.3.1. Thin Layer chromatography-Flame Ionization Detector 분석

본 방법을 통하여 추출된 지방성분의 조성을 TLC-FID(Thin Layer chromatography with Flame Ionization Detector, Iatroscanner, Iatron Co., Japan)를 이용하여 분석하였다. 추출된 시료를 용매에 10 mg/ml의 농도로 녹인 후 각 10  $\mu$ g의 시료를 silica Chromarod III (Iatron Co., Japan)에 점적하고 용매를 날린 후 각 Chromarods를 인지질 분석용 용매 (Chloroform:MeOH:DW = 65:35:5)에서 전체 길이의 50 %까지 전개한 후 다시 용매를

완전히 제거한 후 중성지방 분석용 용매 (Hexane:Diethylether:Formic acid = 80:20:0.2)로 전체 길이 만큼 전개하였다 (Christie, 1989). FID를 이용하여 분석된 결과는 HP3396 integrator (Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 적분하였고 각 봉우리의 정량은 cholesterol acetate (sterol ester), Behenyl myristate (wax ester), docosane (hydrocarbon), docosanol (alkyl alcohol), cholesterol (sterol), phosphatidyl choline (phospholipids) 등 표준 시료를 이용하여 수행하였다.

### 2.3.2. Gas chromatography 분석

가스크로마토그래피(GC)는 Hewlett-Packard HP 5890II plus를 사용했으며 detector는 FID(Flame Ionization Detector)를 사용하였으며 EC-1 capillary column (Allech Co., USA, 30 m X 0.25 mm inner diameter)을 사용하였다. Column의 온도는 180부터 300°C로 분당 6°C씩 증가하도록 지정하였고 최종 온도에서 5분간 체류하도록 하였으며 Injector와 detector의 온도는 각각 300°C로 지정하였다. 시료주입은 Split-splitless injector를 사용하였으며 injection은 hexane에 녹인 시료 1  $\mu$ l를 주입하였다. 탄화수소의 동정은 표준 시료와의 retention time의 비교와 ECL (equivalent chain length)값을 계산하여 결정하였다. 분해된 성분의 정량은 internal standard로 포함된 *n*-C<sub>23</sub>과 비교하여 수행되었고 Data 획득소프트웨어 Chromate (Interface Co., Korea)를 이용하였다.

각 추출법의 효율을 비교하기 위하여 1 mg의 hexadecanol을 5 ml의 MeOH에 녹인 뒤 이를 95 ml의 3 % NaCl 용액에 가하고 초음파로 처리하여 완전히 분산시킨 후 이를 다시 3 % NaCl 용액 10 l에 가하고 상온에서 1 시간 동안 교반하여 시료를 제조하였다. 이 시료중 1 l는 ODS-cartridge 흡착에 이용하고 나머지 9 l에 1 l의 *n*-heptane을 가하여 18 l 들이 Pyrex 병 안에서 12 시간 동안 동력교반기로 교반하여 추출하였다. 추출 후 ODS-cartridge에서 추출된 20 ml의 MeOH에 0.1 mg의 octadecanol을 가하고 액체-액체 추출에서 얻어진 1 l의 *n*-heptane에 0.9 mg의 octadecanol을 각각 첨가한 후 농축하여 GC로 분석하여 회수율을 결정하였다.

## 3. 실험 결과 및 토론

용존 유기물의 동시 추출을 위한 장치의 모식도는 Fig. 1과 같다. 여기서 중요한 점은 male luer

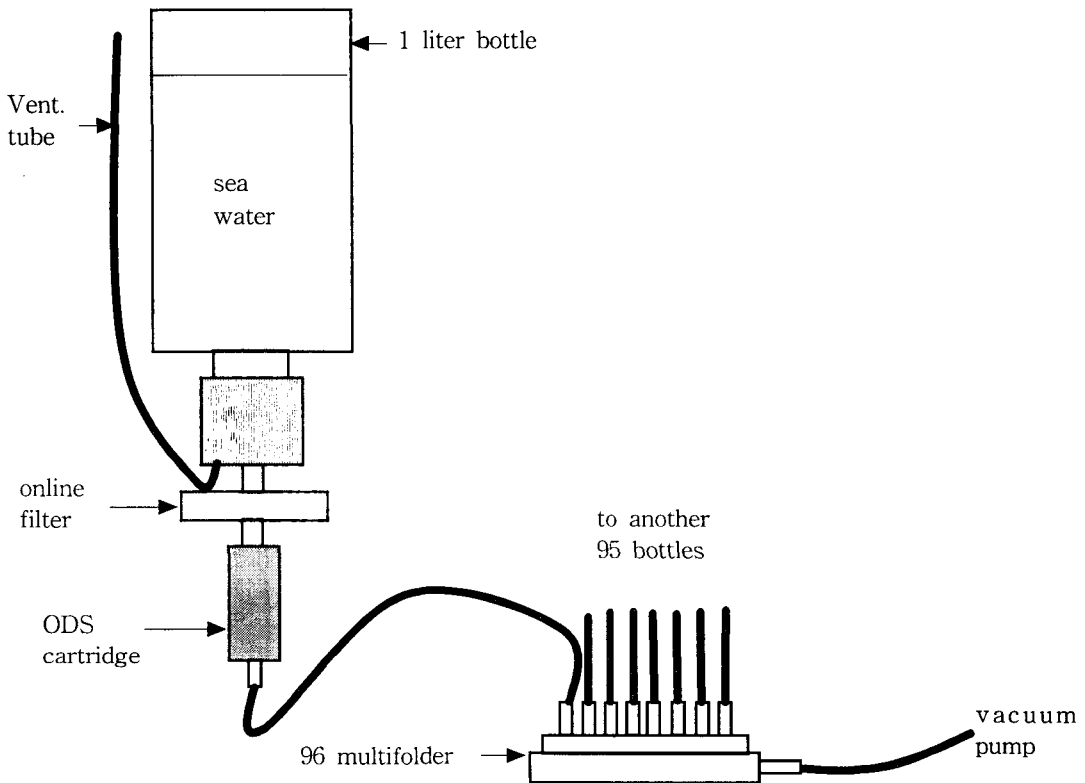


Fig. 1 Schematic diagram of multisample SPE(solid phase extraction) system.

fitting과 ventilation tube가 부착된 시료병 뚜껑과 96 multifolder의 사용이다. 시료병 뚜껑의 male luer fitting은 ODS cartridge의 female luer fitting과 쉽게 연결되어 부착이 용이할 뿐만 아니라 병 마개와 ODS-cartridge 사이에 male-female luer fitting을 가진 on-line filter cartridge (25 mm GF/F filter 용)를 부착할 수 있어 필요할 경우 부유물질과 용존물질의 분리를 동시에 수행할 수 있다. 또 다른 주요 부품인 96 multifolder는 암세포 배양에서 주로 사용되는 96 well microplate에 시료를 채우거나 제거하는 pipet head로서 8 X 12의 배열을 가진 multifolder이다. 따라서 이 96 multifolder는 고압 별균이 가능한 polycarbonate 재질로 제작되어 투명하며 진공을 견딜 수 있을 만큼 견고하여 본 용도에 매우 적합하다. 일반 diaphragm 방식의 진공 pump로는 추출이 끝난 해수가 pump 안으로 유입될 경우 땅가지기 쉬우므로 본 실험에서는 해수가 유입되어도 무방한 aspirator type의 진공 pump를 사용하였으며 유기물질이 제거된 청정 해수가 필요할 경우 이 진공 pump는 대

용량의 peristaltic pump로 대체하여 추출이 끝난 청정해수를 회수할 수도 있다. 본 실험실에서는 이렇게 회수된 청정 해수를 해양 세균의 배양에 사용하고 있다. 또 시료병 마개의 ventilation tube는 시료병 안의 압력을 대기압과 동일하게 유지시켜주는 역할을 하여 추출을 위한 흐름을 용이하게 해 준다.

본 실험에 사용된 ODS-cartridge는 particle 지름이 약 10  $\mu\text{m}$  수준이므로 이는 particle 사이의 공극의 크기가 10  $\mu\text{m}$  보다 작다는 의미가 된다. 해수는 이 공극을 통하여 흐르게 되므로 본 cartridge를 통과하는 해수의 흐름의 단면적은 공극의 단면적 만큼 작아진다. 따라서 공극 사이를 흐르는 해수중의 용존 유기물질들이 cartridge 내의 particle 표면에 붙어있는 octadecyl group과 접촉, 흡착될 기회가 높아지므로 효율적인 추출이 가능하다. 반면에 액체-액체 추출법은 일반적으로 분액깔대기를 이용하여 손으로 흔들어주거나 보다 효과적인 추출을 위하여 혼합을 더욱 강화할 경우 유리병에 해수와 유기 용매를 넣고 motor를 이용

한 교반기로 혼합해 주게 된다. 그러나 이러한 경우에도 유기 용매와 해수 중의 용존 유기물이 충분히 접촉할 만큼 해수나 용매의 크기를 작게 부수는 힘이 약하므로 추출 효율은 ODS-cartridge에 비하여 떨어진다. 본 ODS-cartridge를 사용한 solid phase extraction 방법과 액체-액체 추출법의 효율을 Table 1 에 비교하였다. 우선 필요로 하는 해수 시료의 양이 본 방법에서는 1ℓ로 기존의 액체-액체 추출법의 8 - 20ℓ에 비하여 매우 적어 시료의 취급이 간편하며 사용되는 유기 용매의 양도 액체-액체 추출법이 최소 1ℓ 임에 반하여 20 ml 수준이다. 본 분석과 같이 미량분석의 경우 용매의 순도가 매우 높아야하므로 고가의 용매를 적게 사용할 수 있다는 것은 매우 큰 장점이다. 또

추출 후 용매의 제거에서도 최소 1ℓ의 용매를 제거하기 위하여 rotary evaporator 등의 장비가 필요한데 이러한 장비는 1회에 1 개의 시료만을 농축할 수 있다. 반면에 20ml 수준의 용매는 Speedvac과 같은 회전형 농축기를 사용할 수 있어 동시에 많은 수의 시료의 농축이 가능하며 시간 또한 절약된다. 뿐만 아니라 질소 가스를 이용한 농축도 가능하다. 가장 중요한 요인인 용존 유기 물질의 회수율에서도 hexadecanol을 대상으로 수행된 실험에서 ODS-cartridge를 이용한 solid phase extraction 방법은 92 ± 2 % 수준의 회수율을 보여 액체-액체 추출법의 65 ± 5 % 정도의 회수율에 비하여 월등 뛰어난 추출 효율을 보이고 있다.

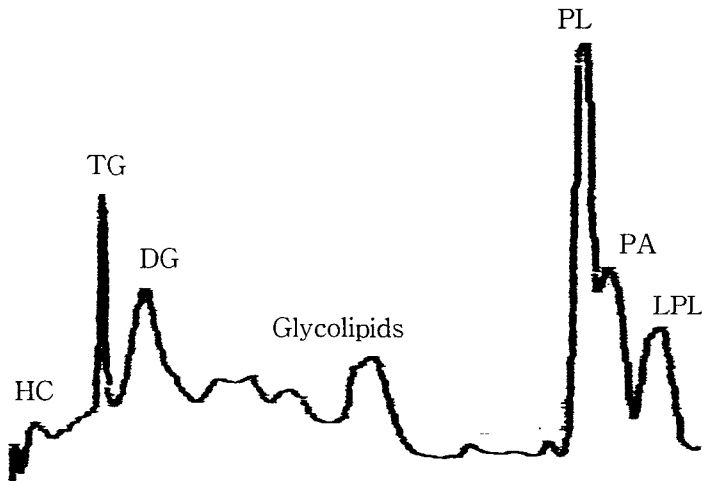


Fig. 2 Typical TLC-FID chromatogram of dissolved lipid compounds in sea water collected from the Yellow Sea (YS9908, Site A-3 surface water) at Aug 1999. TG: Triacyl glycerol, DG: Diacyl glycerol, MG: Monoacyl glycerol, FA: free Fatty acid, PL: Phospholipids, LPL: lysophospholipid, PA: phosphatidic acid.

Table 1 Comparison of solid phase extraction method using ODS-cartridge and liquid-liquid extraction method.

Method*	Amount of Sample (ℓ)	Amount of Solvent (ml)	Removal of solvent	Extraction at a time	Recovery yield (%)	Process
SPE (ODS)	1	20	Speed-vac	up to 96 simultaneously	92 ± 2	semi automatic
Liquid extraction	8 - 20	1,000	Rotary evaporator	one by one	65 ± 5	manual

\* 각 방법은 3 회의 실험을 수행하였음.

본 방법을 사용하여 실제 해수로부터 추출된 지방성 유기물질의 조성을 TLC-FID로 분석하였다 (Fig. 2). 용존 유기물은 주로 살아있는 생체에서 발견되는 전형적인 형태인 저장성 triacyl glycerol 이나 세포막의 주성분인 인지질 이외에 이들의 분해 산물로 추정되는 diacyl glycerol, monoacyl glycerol 등의 함량이 높음을 보여준다.

용존 유기물중의 탄화수소의 조성을 gas chromatograph를 이용하여 분석한 예를 Fig. 3에 보였다. Fig. 3에서는 원유 오염의 징후인 unresolved complex material (UCM)이 nonadecane ( $n-C_{19}$ ) 부근에서 관찰되며 각 길이별의 탄화수소가 매우 분명하게 분포하고 있음을 보여준다. 이는 충분히 각 탄화수소 성분의 정량이나 함량 분석을 수행할 수 있는 수준의 결과가 얻어짐을 의미한다.

#### 4. 결론

본 방법과 장치의 장점은 다수의 시료를 동시에 처리할 수 있어 각 시료별로 동일한 조건에서 추출 및 용출되므로 재현성이 매우 높고 처음 시료

를 채취한 용기를 그대로 사용할 수 있으므로 액체-액체 추출법에서 추출을 위하여 유리 용기로 시료를 다른 용기로 옮기는 과정에서 생길 수 있는 오염의 염려가 없다. 또 액체-액체 추출법에 비하여 소모되는 유기 용매의 양을 1/100 이하로 줄일 수 있어 고순도 유기용매의 비용 절감과 함께 환경 오염의 염려가 없고 액체-액체 추출법에 비하여 추출 효율이 높고 조작이 간편하고 규격화되어 있어 전체 추출 시간이 1/10 이하로 감축되므로 인력이 절감되고 자동화가 가능하다.

#### 후 기

본 연구는 황해오염 현황 과제(PN99393, 과학기술부) 및 PE00784-01 (한국해양연구소)의 지원으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

[1] Biegger, T., Abrajano, T. A. and Hellou, J., 1997. "Generation of biogenic hydrocarbons during

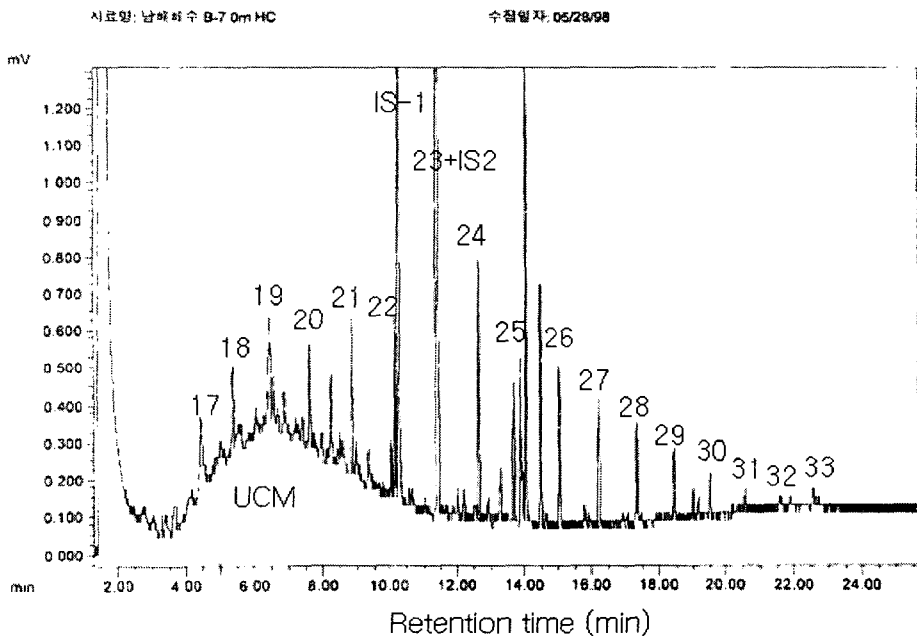


Fig. 3 Typical GC chromatogram of dissolved hydrocarbon in sea water collected from the Southern Sea of Korea (NH9804, Site B-7 surface water) at Apr. 1998, taken after the addition of internal standard (nonadecanoic acid methyl ester: IS-1 and tricosane: IS-2) showing UCM around nonadecane.

a spring bloom in Newfoundland coastal (NW Atlantic) waters", *Organic Geochemistry*, 26, 207-218.

[2] Christie, W. W., 1989, *Gas chromatography and lipid : A Practical Guide*, The Oily Press, Scotland.

[3] Douabul, A. A. -Z. and Al-Shiwafi, N. A., 1998, "Dissolved/dispersed hydrocarbons in the Arabian region", *Marine Pollution Bulletin*, 36, 844-850.

[4] Ebeler, S. E. and Shibamoto, T., 1994, "Overview and recent developments in solid-phase extraction for separation of lipid classes", in *Lipid chromatographic analysis, Chromatographic science series*, (Ed. by T. Shibamoto), Vol. 65, 1-50, Marcel Dekker, Inc. NY.

[5] Fahl, K. and Stein, R., 1999, "Biomarkers as organic-carbon-source and environmental indicators in the late Quaternary Arctic Ocean: problems and perspectives", *Marine Chemistry*, 63, 23-30.

[6] Law, R. and Anrdulewicz, E., 1983, "Hydrocarbons in water, sediment and mussels from the southern Baltic Sea", *Marine Pollution Bulletin*, 14, 289-293.

[7] Sicre M., A, Broyelle, I., Lorre, A. and Saliot. A., 1993. "Sources and transport of particulate hydrocarbons in the meso-tidal Changjiang Estuary", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 37, 557-573.

[8] Snedaker, S. C., Glynn, P. W., Rumbold, D. and Corcoran, E. F., 1995, "Distribution of n-alkanes in marine samples from Southeast Florida", *Marine Pollution Bulletin*, 30, 83-89

[9] UNEP., 1991, *Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Manual and Guides No. 20*. Prepared by K. A. Burns, International Atomic Energy Agency, Monaco.

[10] Volkman, J. K., Revill, A. T., and Murray, A. P., 1997, "Applications of biomarkers for identifying sources of natural and pollutant hydrocarbons in aquatic environments", in *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*, (Ed. by R. P. Eganhouse), ACS Symposium Series, 671, 110-132.