

액체크로마토그래프/질량분석기를 이용한 수중 남조독소물질 동시분석법

김정희[†] · 윤미애 · 김학철

한국수자원공사 수질분석연구센터

Method for Simultaneous Determination of Cyanotoxins in Water by LC-MS/MS

Jeong-Hee Kim[†] · Mi-Ae Yun · Hak-Chul Kim

Water Analysis & Research Center, K water

(Received 7 April 2009, Revised 26 June 2009, Accepted 1 July 2009)

Abstract

Algae bloom occurred in reservoir in summer can cause taste and odor in water and disturb the flocculation and sedimentation processes in water treatment plant and cause sand filter plugging. It was also reported that microcystins, anatoxin and saxitoxin released from cyanobacteria had acute toxic effects on liver and nervous system. For these reasons, many advanced countries inclusive of WHO set the guideline for these toxins and cyanotoxins have been managed with regular monitoring in Korea as well. However, complex sample preparation steps such as a solid phase extraction (SPE) and derivatization are required with an existing analysis method with HPLC. We needed to improve an analysis method for low extraction efficiency and long sample preparation time. In this study, we have established a new LC/MS/MS method which can simultaneously determine 6 cyanotoxins (Microcystins-LR, Microcystins-RR, Microcystins-YR, Anatoxin-a, Saxitoxin, Neosaxitoxin) with only simple filtration step. When 75 μ L filtered sample was injected onto the LC-MS/MS, the recovery ranged from 86% to 112% and the MDL was 0.025~0.581 μ g/L. We can make the MDL be lower than the guideline (1~3 μ g/L) of advanced countries with simple preparation.

keywords : Anatoxin-a, Cyanotoxin, Microcystins, Saxitoxin

1. 서론

조류(Algae)는 호소나 정체된 하천에서 영양염류인 질소, 인 등의 성분이 과량 유입되는 부영양화 단계에서 적정수온(25~30°C)이 유지될 경우 주로 발생하며, 상수원수중에 존재할 경우 원수의 pH 변화와 색도, 탁도 유발, 맛·냄새를 유발할 수 있고, 조류 세포내의 기름 성분으로 인해 정수처리 공정 중 응집·침전 방해, 여과지 폐색 등의 문제를 일으킨다. 특히 남조류의 경우 늦여름에서 초가을에 걸쳐 대량 번식하여 수면에 청록색가루를 뿌려 놓은 듯한 수화현상(Water Bloom)을 일으키고, *Anabeana*, *Phomidium*, *Oscillatoria* 등의 남조류는 geosmin, 2-MIB, β -cyclocitral 등 신진대사물질을 수중으로 배출하여 흙·곰팡이 등의 불쾌한 맛·냄새를 유발할 수 있고, 마이크로시스틴스(*Microcystis*; Henriksen and Olli, 1996), 아나베나(*Anabaena*), 오실레토리아(*Oscillatoria*; Sivone, 1996) 등은 간 독성물질인 마이크로시스틴(*Microcystin*)을 생성하고, 아나베나(*Anabaena*), 아파니조메논(*Aphazinomenon*; Repavich et al., 1990)은 신경 독성물질인 아나톡신(*Anatoxin*; 김범철 등., 1999) 및 삭시톡신(*Saxitoxin*; Toxic Cyanobacteria in Water, 1999) 등

을 배출한다고 알려져 있으며, 이들 남조독소물질에 의한 동물 피해 사례는 1940년대에 이미 보고되기 시작하였으며, 영국, 일본 등 많은 나라에서 동물 피해사례가 보고되고 있다(Carmicheal and Saffermann, 1992).

남조류 중 세계적으로 가장 잘 알려진 *Microcystis*는 국내 대부분의 부영양호에서 우점으로 나타나며, 이들 조류에서 주로 발생하는 마이크로시스틴은 분자량이 900~1,100사이의 비교적 큰 분자량을 지닌 7개의 아미노산으로 구성된 사이클펩타이드(Cyclic peptides) 물질로, 전세계적으로 약 85종 마이크로시스틴이 알려져 있으며(Sivonen, 2009), LD₅₀(Lethal dose resulting in 50 percent deaths)은 466 μ g/kg 정도이며, 수 환경 중 이들 독소 물질은 남조류 세포에 있으며, 세포가 파괴될 때 상당량의 마이크로시스틴이 수중에 방출된다고 알려져 있다. 마이크로시스틴은 화학적으로 매우 안정된 물질로, 수원에서 인간에 노출될 경우 지속적이고, 오염물질로서 지속적으로 인체에 노출될 경우 위험성을 내포하고 있다(WHO, 1999). 남조류에서 유래하는 신경 독소물질은 첫 번째 아세틸콜린(acetyl choline, 혈압강하제) 효능을 갖는 anatoxin-a 와 homoanatoxin-a과, 두 번째 항콜린에스트라제 효능을 갖는 anatoxin(s), 그리고 세 번째로 신경세포의 나트륨 통로에 결합, 통로가 차단되어 신호전달을 방해하는 saxitoxin 3가지 정도로 분류된다. anatoxin-a의 경우 비교적 작은 분자량의 알칼리성 물질(MW=165.23)로

[†] To whom correspondence should be addressed.
kjh952390@kwater.or.kr

서 1개의 2차 아민과 2-acetyl-9-azabicyclo(4-2-1)non-2-ene 로 구성된 물질로 LD₅₀ ((lethal dose resulting in 50 per cent deaths)이 200~250 µg/kg 정도로 비교적 독성이 강한 물질이다. saxitoxin은 신경 세포막의 나트륨 통로에 사시톡신이 결합할 경우 나트륨 이온이 유입되지 못해 신경섬유의 신호전달을 방해하게 된다. 사시톡신의 경우 주로 청록조(시아노박테리아) 즉 해양생물에서 생성되는데 이들 청록조를 홍합이 먹이로 이용할 경우 홍합 자체는 독에 의해 영향을 받지 않으나 이를 나중에 먹는 인간에게는 심각한 영향을 미칠 수 있는 물질로 알려져 있으며, 해양 뿐만 아니라 담수에서도 일부 조류에서 사시톡신이 검출된다는 보고가 있었다. 남조류 종류에 따라 발생이 예상되는 독소물질 및 포유동물에 대한 위해성을 Table 2에 간략하게 나타내었다.

우리나라는 아직까지 조류 독소물질에 대한 수질기준은 아직 마련되어 있지 않으며, 브라질, 프랑스, 뉴질랜드 및 WHO에서 마이크로시틴 1 µg/L을 , 아나톡신의 경우 3 µg/L로 수질기준을 책정하고 있으며, 사시톡신의 경우 아직까지 국내·외적 수질기준이 마련되어 있지 않은 상태이다. 우리나라의 경우에도 하절기 정체된 호소 등에서 서늘·

경기지역을 중심으로 마이크로시틴 등의 조류독소 검출사례가 빈번하게 이루어지고 있어 이들 물질에 대한 먹은물원·정수중 실태조사를 통한 안정성 확보 및 오염원을 중심으로한 관리 및 대책이 필요한 실정이다(서미연 등, 2005)

현재까지 마이크로시틴은 고상추출법(SPE)을 이용하여 추출 및 농축 후 액체크로마토그래프/UV검출기(HPLC/UVD) (Sangolkar et al., 2006)를 이용하여 분석을 실시하고 있으며, 아나톡신과 사시톡신의 경우 고상추출법을 이용하여 시료 추출, 농축 후 유도체화 과정을 거쳐 액체크로마토그래프/형광검출기(HPLC/FLD)를 이용하는 분석방법이 일반적이다. 그러나 두 방법 모두 분석장비의 특성상 검출감도가 낮고, 농축 및 유도체화 과정 등의 전처리 과정 중 시료 회수를 비교적 낮아, 이에 따른 분석결과 신뢰도 저하가 예상되며, 조류 독소물질별로 전처리 방법이 상이하여 동시 분석이 불가능하였다. 그러나 최근 분석기술의 발달에 따라 전자분무이온화방식(Electrospray Ionization, ESI) 적용한 액체크로마토그래프질량분석기(LC-MS/MS)를 이용할 경우 극미량의 고감도 분석이 가능해짐에 따라 조류독소물질의 분석에 적용하는 사례가 점차 늘어나고 있으며(Chen et al., 2009; Mekebri et al., 2009; Messineo et al., 2009; Xie and Park, 2007). 이에 본 연구에서는 수체내의 조류독소물질 추출을 위해 실시하는 전처리 과정인 원심분리, 추출, 농축, 유도체화 등의 과정을 생략하고, 실린지 필터를 이용한 전처리 후 직접 기기분석을 실시하는 분석법에 대해 검토하여, 국내 수화현상 발생시 가장 빈번하게 검출이 예상되는 조류 독소물질(마이크로시틴 3종(Microcystin-LR, RR, YR), Anatoxin-a, Saxitoxin 및 Neosaxitoxin)에 대한 신속 정확한 동시 분석법 확립 및 분석결과 신뢰도 및 경제적 효율성 향상을 목적으로 실시하였다.

2. 연구방법

2.1. 표준물질 및 시약

표준물질 Microcystin-LR, Microcystin-RR, Microcystin-YR은 Wako사(Japan), Anatoxin-a은 A.G Scientific, Saxitoxin, Neosaxitoxin은 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 이들 표준물질에 대한 화학구조, 분자량 등에 관한 정보는 Table 3에 요약하였다. 전처리 및 기기분석시 사용되는 아세트니트릴 등의 용매는 J.T Baker사의 잔류 농약급을 사용하였으며, 증류수는 ELGA-RO system을 통과한 3차 증류수를 사용하였고, 기타 이동상에 사용된 Ammonium acetate 등의 분석용 시약은 특급 이상의 등급을 사용하였다.

2.2. 표준용액 제조 및 검량곡선 작성

조류독소물질 혼합 표준액은 위에서 구입한 표준품을 메탄올을 이용하여 Microcystin 100 µg/mL, 증류수를 이용하여 Anatoxin 10 µg/mL, Saxitoxin, Neosaxitoxin은 1 µg/mL 되도록 조제 후 각각 -20°C, -70°C(Saxitoxin, Neosaxitoxin)의 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. 검량곡선 작성용

Table 1. Characteristics of cyanobacteria

Cyanobacteria	Characteristics
<i>Microcystis.sp</i>	- Very small sphere, forming a dense colony on the surface of agar - <i>M. aeruginosa</i> or <i>M. viridis</i> produces microcystins which have toxicity for animal - Cause of acute toxicity(e.g. liver bleeding and liver failure)
<i>Anabaena.sp</i>	- Forms single or bundle colonies of straight line, semicircle, spiral shape - Produce taste causing material like 2-MIB in fungi - Exponential growth can cause incomplete coagulation and sand filter clogging - Produce neurotoxin like anatoxin
<i>Aphanizomenon.sp</i>	- Planktons of sea red tide produce paralytic shellfish toxin (Saxitoxin as neurotoxin)

Table 2. General features of the cyanotoxins (ref : WHO, 1999)

Toxin group	Primary target organ in mammals	Cyanobacterial genera
Cyclic peptides		
Microcystins	Liver	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktithrix (Oscillatoria)</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Anabaenopsis</i>
Alkaloids		
Anatoxin-a	Nerve synapse	<i>Anabaena</i> , <i>Planktithrix (Oscillatoria)</i> , <i>Aphanizomenon</i>
Anatoxin-a(s)	Nerve synapse	<i>Anabaena</i>
Saxitoxins	Nerve axons	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>

Table 3. Chemical formula and molecular weight of target compounds

Compound	Name (CAS No)	Chemical formula	Molecular weight
Microcystin	Microcystin_LR (101043-37-2)	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	995.1
	Microcystin_RR (111755-37-4)	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1038.2
	Microcystin_YR (101064-48-6)	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1045.1
Anatoxin	Anatoxin a (64285-06-9)	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.0
Saxitoxin	Saxitoxin (35523-89-8)	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	299.2
	Neosaxitoxin (64296-20-4)	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₅	315.2

표준용액은 분석 감도에 맞도록 Microcystin-LR(0.5~100 µg/L), Microcystin-RR, Neosaxitoxin, Anatoxin(0.05~20 µg/L), Microcystin-YR, Saxitoxin(1~400 µg/L)의 9단계의 표준용액을 조제하여 사용하였다. 표준용액의 정량은 표준액 농도와 면적의 비에 따라 외부표준법에 의해 정량하였다.

2.3. 시료의 전처리(실험방법)

본 연구에 사용된 시료는 팔당댐 원수를 사용하였으며, 정수는 청주정수장 정수를 사용하였다. 시료는 채수 후 독소물질 변화를 최소화하기 위해 -20°C 이하의 초저온 냉동고에 보관한다. 또한 본 연구에서는 수중 극미량 존재 가능한 조류 독소물질의 추출, 정제, 농축 등을 통해 발생할 수 있는 시료 유실을 최소화하고, 분석효율을 높이기 위해 실

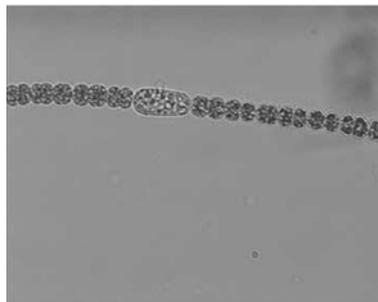
린지 필터중 멤브레인 필터인 Millipore MILLEX GP(0.22 µm)와 유리섬유필터인 GF/F(0.7 µm)를 이용하여 여과 후 여액을 기기 주입하였다. 시료 전처리시 수중에 용해되어 있는 조류독소물질만의 검출을 위해서 조체에 대한 인위적인 과과 등의 과정은 생략하였고, 기존 분석법의 경우 일정량의 시료를 고상추출장치를 이용하여 추출 후 타 방해물질 제거를 위해 고상카트리지 세척과정을 실시하였으나, 본 분석법에서는 질량분석법 중 MRM 기법을 사용함으로써 타 방해물질에 대한 영향을 받지 않고 분석을 실시할 수 있었다. 또한 기기주입 가능한 최적용량 산정을 위해 50, 75, 100 µl의 시료를 각각 주입하여 비교 검토하였다.

2.4. 기기분석

분석장비로 액체크로마토그래프는 Agilent Technology 사 (Santa Clara, CA, USA)의 HP-1200(SL) series liquid chromatography와 질량분석장치는 Applied Biosystem사(Foster City, CA, USA)의 API4000(Triple-quadrupole mass spectrometer)를 사용하여 대상물질을 분석하였다. 대상물질 피크 분리를 위하여 사용한 컬럼은 Phenomenex사의 Luna C₁₈(2.1 mm × 150 mm, 5 µm)이었으며, 이동상은 아세트니트릴과 2 mM 암모니아아세이트/0.1% 개미산 두종류를 사용하였다. 질량분석장치 이온화 방식은 ESI(Electro Spray Ionization) Positive Mode를 이용하여 분석하였으며, 자세한 LC-MS/MS 분석조건은 Table 4와 같다. 앞선 분석조건을 이용한 조류독소물질 6종의 Mass Chromatogram을 확인한 결과 검출피크는 모두 5~7분 사이에 모두 검출되었으며, 전체 크로마토그램(TIC)과 각 물질의 피크를 볼 수 있는(Extract Ion) 분석 결과는 아래 Fig. 3과 같다.

Table 4. Summary of LC-MS/MS analytical conditions used

Description	HPLC condition	Description	MS/MS analysis condition
Instrument	HP 1200SL	Instrument	API 4000
Column	Phenomenex Luna C ₁₈	Source temp	500°C
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 2 mM Ammoniumacetate/ 0.1% Formic water	Curtain gas	25
Gradient program	5 min, A : B = 0:100(Equi)	GS1	60
	0.1 min, A : B = 50:50	GS2	50
	3 min, A : B = 75:25	IS	5500 Voltage
	7.5 min, A : B = 75:25	CAD	6
Run time	7.5 min	EP	10

(a) *Microcystis aeruginosa*(b) *Anabaena macrospora*(c) *Aphazinomenon flos aqua***Fig. 1.** Picture of cyanobacteria (Hwang et al., 2005).

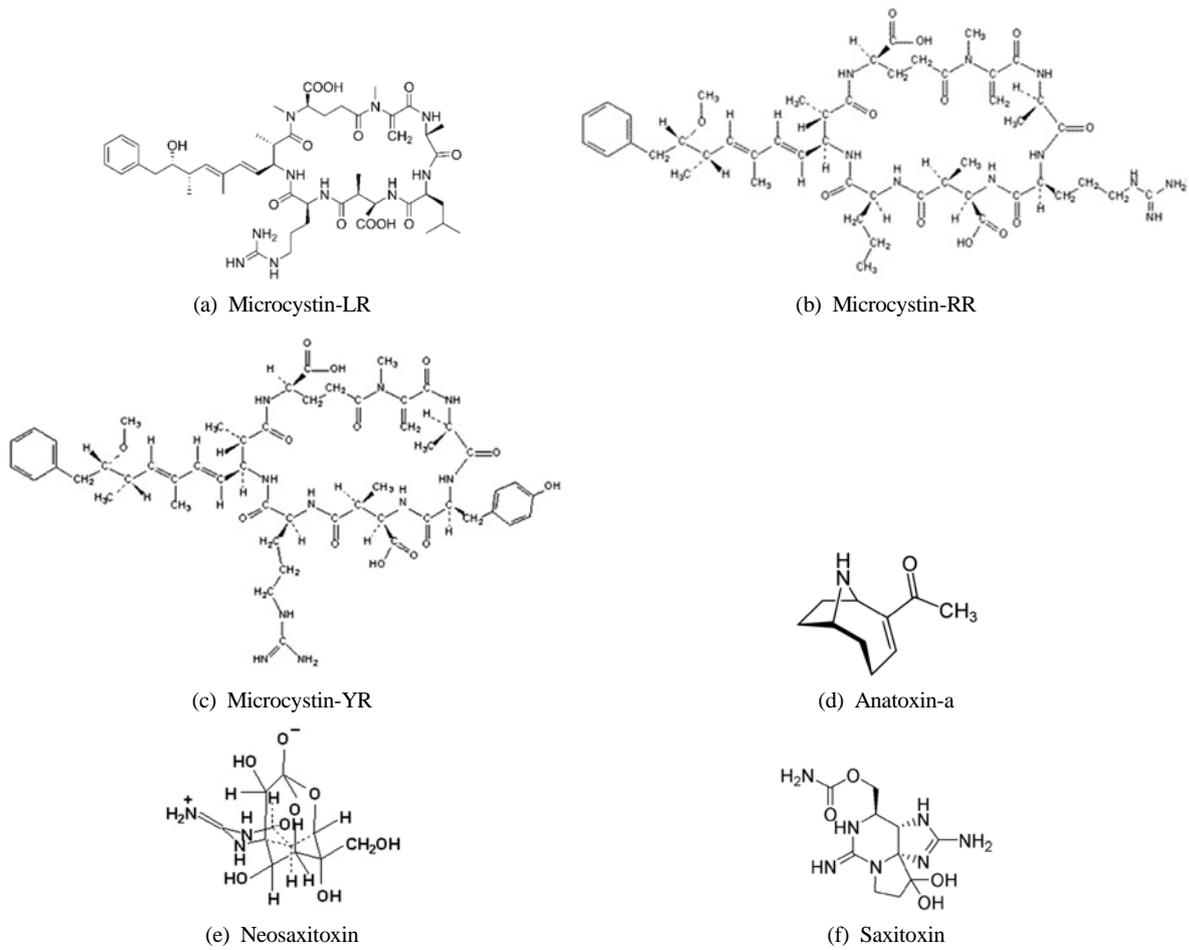


Fig. 2. Chemical structure of cyanotoxins.

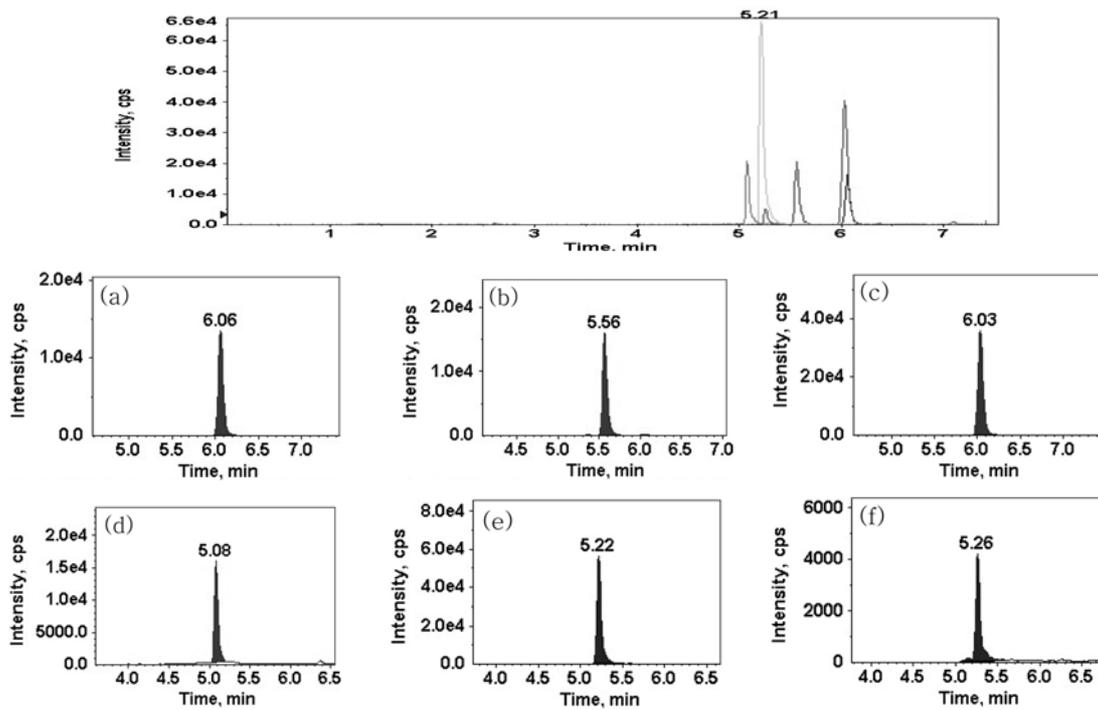


Fig. 3. TIC & MRM Chromatograms of Cyanotoxins. (a) Microcystin-LR, (b) Microcystin-RR, (c) Microcystin-YR, (d) Anatoxin-a, (e) Neosaxitoxin, (f) Saxitoxin

2.5. LC-MS/MS 분석조건 최적화

대상화합물들은 Triple Quadrupole MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring) 기법을 적용하여 분석하였으며, ESI 조건하 실린지펌프(Syringe Pump)에 Microcystin 10 µg/L 범위의 표준액을 이용하여 최적의 전구이온(precursor ion)과 생성이온(product ion)을 선정하였다. Microcystin-RR을 제외하고는 모두 single charge를 띠는 [M+H]⁺ 형태를 띠며 Microcystin-RR은 double charge인 [M+2H]²⁺ 전구이온(Precursor ion)을 가지게 되는데 Microcystin LR, m/z=995.6 [M+H]⁺; Microcystin RR, m/z=520.0 [M+2H]²⁺; Microcystin YR, m/z=1045.6 [M+H]⁺; Anatoxin a, m/z=166.1 [M+H]⁺; Saxitoxin, m/z=300.2 [M+H]⁺; Neosaxitoxin, m/z=316.4 [M+H]⁺와 같다. 선택된 전구이온은 Fragmentation Spectra 즉 각 물질에

DP(Declust potential), FP(Formation potential), CE(Collision energy) 등의 에너지 값을 조정하여 선정된 최적의 생성이온(product ion, daughter ion) 및 에너지 값들에 대한 사항은 Fig. 4 및 Table 5에 나타내었다. 선정된 정량이온(Quantitation Ion)으로 HPLC 및 ESI를 장착한 Triple Quadrupole MS를 이용하여 ppb level로 정성 및 정량 분석이 가능하였다. 분석용 컬럼은 Phenomenex Luna C₁₈(2.0 mm × 150 mm, 5.0 µm)을 사용하였으며, 이동상은 Acetonitrile과 10 mM Ammoniumacetate/0.1% Formic water을 사용하였으며, 조류 독소물질의 안정적인 분리를 위하여 5분간 10mM Ammonium-acetate/0.1% Formic water을 이용하여 안정화 시킨 후 7.5분간 이동상을 Gradient 조건하에서 컬럼 분리하였다. 컬럼은 통과한 시료의 이온화는 ESI를 사용하여 positive mode로 분

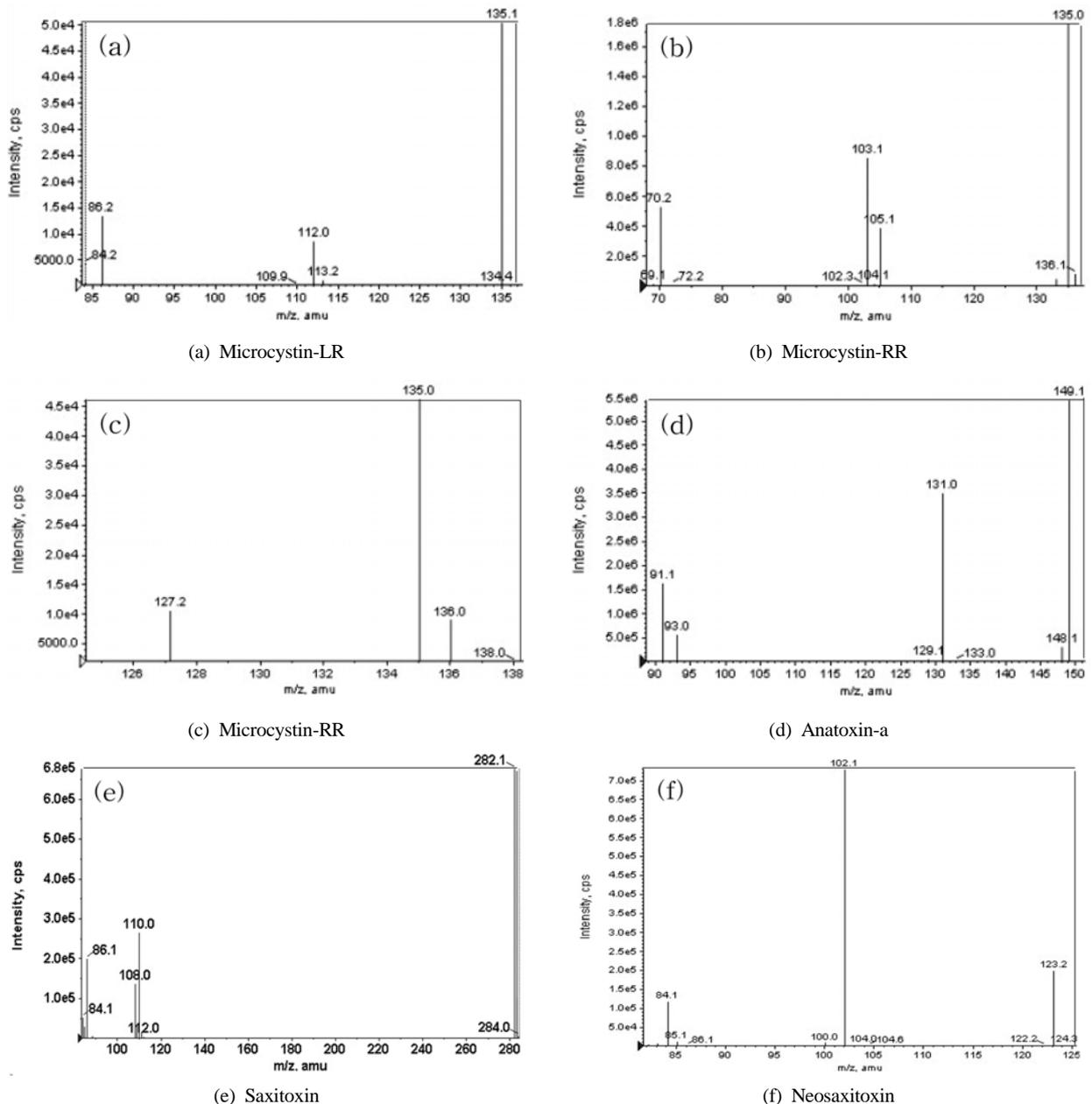


Fig. 4. Product ion scan of each compounds

Table 5. MRM parameters for analysis cyanotoxins

Compound name	Precursor (m/z)	Product (m/z)		Declust potential	Collision energy
		Quantitation ion	Confirm ion		
Microcystin-LR	995.6	135.1	96.2	146	89
Microcystin-RR	520.0[M+2H] ²⁺	135.0	103.1	86	45
Microcystin-YR	1045.6	135.1	127.2	146	95
Anatoxin-a	166.1	149	131	61	19
Saxitoxin	300.2	86.3	110.0	46	37
Neosaxitoxin	316.4	102.1	123.2	61	29

석하였으며, nebulizing gas와 collision gas는 모두 질소가스를 사용하였고, ion spray 온도는 500°C로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료 최적 주입량 결정

본 분석법은 기존 분석법과 달리 고상추출장치를 이용한 추출, 농축등의 전처리 과정을 생략하고 단순 여과만을 실시하여 분석하므로써, 기존 액체크로마토그래프/질량분석기를 이용한 분석법 사용시 시료 주입량인 5~10 μL 에 반해서 상대적으로 시료 주입량이 많을 수 밖에 없다.

따라서 바탕선의 떨림 등 기타 분석에 지장을 주지 않는 범위안에서 최대 시료 주입량을 결정하는 것은 분석결과

신뢰도 및 검출한계 향상에 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 최적의 기기 주입량 산정을 위하여 50, 75, 100 μL 의 시료를 각각 주입 후 분석한 결과를 각각 비교하였다. 검토결과 Fig. 5와 같이 시료 주입량이 각각 50, 75 μL 까지는 안정된 결과값을 나타내었으나, 100 μL 에서도 다른 독소물질은 안정된 값을 나타내었으나, 아나톡신 피크 앞단에 시료 과잉 주입으로 인한 바탕선 떨림현상(baseline drift)이 발생됨에 따라 안정된 분석이 가능한 최대 주입량은 75 μL 로 선정하였다.

3.2. 회수율

문헌조사 결과 조류독소물질 전처리 방법으로 널리 알려진 고상추출법을 이용한 전처리의 경우 마이크로시스틴 3종

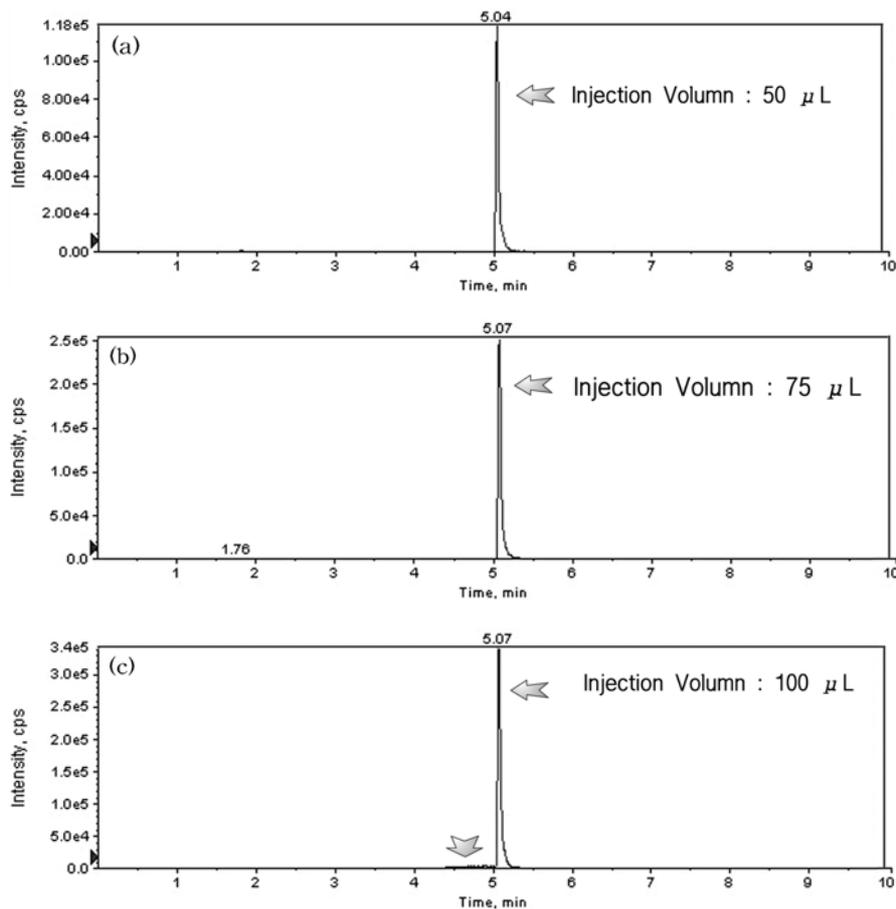


Fig. 5. Optimization of cyanotoxin (Anatoxin-a) injection volume.

및 사시톡신의 회수율은 약 80~115% 정도로 우수하였으나, 아나톡신과 네오사시톡신의 회수율이 40~60%로 비교적 낮아 전처리방법의 보완이 필요했다(한국수자원공사 수돗물분석연구센터, 2008). 금번 조사에서는 고감도분석장비를 이용하여 분석을 실시하므로써, 기존의 고상추출법을 이용한 복잡한 전처리과정을 대신하여, 실린지 필터 여과 후 시료 직접주입법을 이용하고자 여과과정 중 시료의 회수율을 검토하였다. 실시료에 대한 회수율 평가를 위하여 팔당댐원수 (TOC ≒ 1~2 mg/L) 100 mL에 기기분석 감도에 적합하도록 Microcystin-LR(10 µg/L), Microcystin-YR, Saxitoxin(40 µg/L), Microcystin-RR, Anatoxin-a, Neosaxitoxin(2 µg/L) spiking 후

멤브레인 필터와 GFF 실린지 필터로 여과한 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석을 실시하여 각 물질에 대한 회수율을 측정하였다. 회수율 측정된 결과 멤브레인 필터 회수율은 57~117%, GFF 필터의 회수율은 86~112%로 멤브레인에 비해 GFF 필터가 우수하였다. 특히 멤브레인으로 여과를 할 경우 Microcystin-LR의 회수율이 57%로 GFF 90%에 비해 상대적으로 많이 떨어지는 경향을 보임으로서, 금번 연구에서는 GFF 필터를 이용하여 전처리를 실시하였다. 선정된 GFF 필터를 이용하여 증류수와 팔당댐 원수에 동일 농도를 spiking 후 회수율을 측정된 결과 증류수에서 91~127%, 원수에서 86~112%로 매우 우수한 결과 값을 나타내었다(Table 6).

Table 6. Recovery result of cyanotoxins

Compounds	True conc (µg/L)	GF/F filter				Membrane filter	
		DI water		Paldangdam		Paldangdam	
		Conc (µg/L)	Recovery (%)	Conc (µg/L)	Recovery (%)	Conc (µg/L)	Recovery (%)
Microcystin-LR	10	9.12	91.2	8.29	90.9	5.70	57.0
Microcystin-RR	2	2.04	102.0	1.83	89.7	1.64	82.0
Microcystin-YR	40	40.4	101.0	40	99.0	27.2	68.0
Anatoxin A	2	2.11	105.5	2.37	112.3	2.26	113.0
Saxitoxin	40	40.7	101.7	35.1	86.2	33.2	83.0
Neosaxitoxin	2	2.55	127.5	2.22	87.0	2.35	117.5

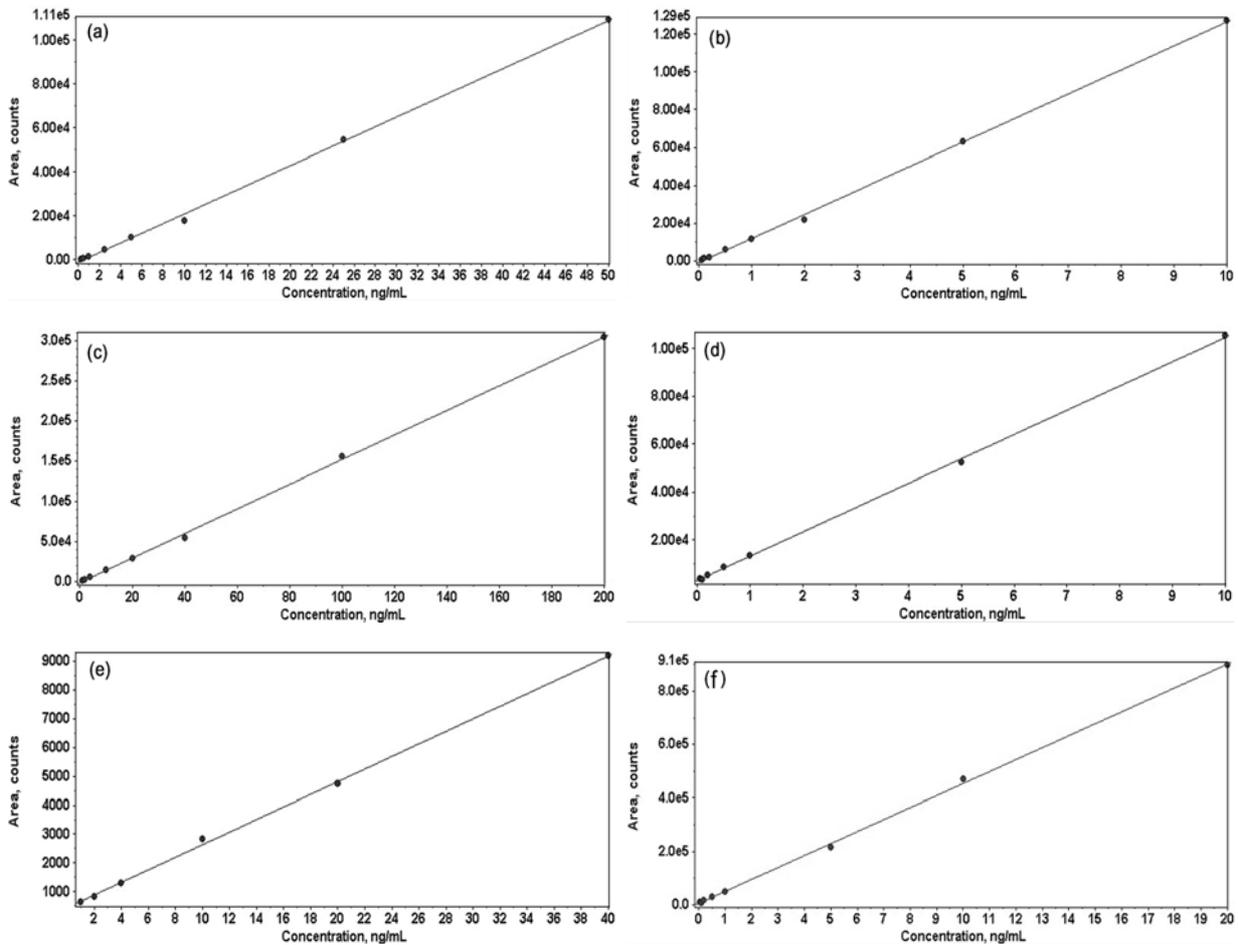


Fig. 6. Calibration curve of cyanotoxins (a: Microcystin-LR, b: Microcystin-RR, c: Microcystin-YR, d: Anatoxin-a, e: Neosaxitoxin, f: Saxitoxin).

3.3. 직선성 검토

조류독소물질 6종에 대해 각각 6개로 작성된 표준용액을 측정된 결과 표준용액 검량선의 직선성이 모두 $r^2=0.999$ 이상의 양호한 직선성을 보였다(Fig. 6, Table 7).

3.4. 정밀도, 정확도 및 검출한계 검토

분석법의 정밀도, 정확도 및 검출한계 측정을 위해서 증류수 100 mL에 분석가능한 저농도인 Microcystin-LR(0.25 $\mu\text{g/L}$), Microcystin-YR, Saxitoxin(1 $\mu\text{g/L}$), Microcystin-RR, Anatoxin, Neosaxitoxin(0.05 $\mu\text{g/L}$)가 되도록 표준액을 첨가한 후 전처리 후 LC-MS/MS로 분석 정량하여 실제값(True Conc)과 비교하여 정밀도 및 정확도를 측정하였으며, 동시료를 7회 반복 분석하여 각 결과를 이용하여 검출한계 및 정량한계를 산정하였다. 참값 대비 검출값 범위인 정확도는 87~110%이었으며, 정밀도(상대표준편차(RSD, relative standard deviation)) 역시 3~9%로 매우 우수한 값을 나타내었는데, 이는 전처리방법의 단순화에 따른 오차 감소로 보여진다. 저농도 표준물질의 7회 반복 측정된 결과값을 이용한 방법검출한계(MDL) 및 정량한계(PQL)는 0.025(Neosaxitoxin)~0.581(Saxitoxin) $\mu\text{g/L}$ 로 산출되었으며, 이 값을 적용한 정량한계(PQL)는 0.125~2.903 $\mu\text{g/L}$ 범위로 극미량 저농도까지 분석이 가능하였으며, 이와 관련된 결과는 Table 8과 같다.

Table 7. Calibration table of cyanotoxins

Compounds	Conc range ($\mu\text{g/L}$)	$y=ax+b$	r^2
Microcystin-LR	0.25~50	$y=2.2e^3x-1.07e^3$	0.9994
Microcystin-RR	0.05~10	$y=1.27e^4x-811$	0.9997
Microcystin-YR	1.0~200	$y=1.53e^3x-1.24e^3$	0.9997
Anatoxin A	0.05~10	$y=1.02e^4x+3.01e^3$	0.9998
Saxitoxin	1~40	$y=218x+447$	0.9996
Neosaxitoxin	0.05~20	$y=4.48e^4x+5.73e^3$	0.9996

4. 결론

하절기 호소의 남조류 과다번식시에 배출이 예상되는 남조독소물질 총 6종(마이크로시스틴 3종과 아나톡신, 삭시톡신, 네오삭시톡신)을 고상추출법을 이용한 전처리 없이 단순 여과 후 과량을 LC-MS/MS에 주입하여 극미량의 남조

독소물질 동시분석법을 정립한 결과는 아래와 같다.

첫째, 과량의 시료를 고감도 장비에 주입하는 방식인 본 분석법에서 최적 시료 주입량을 검토한 결과 75 μL 이하에서는 시료 과량주입으로 인한 피크 꼬리끌림이나 baseline drift 등이 발생하지 않아, 최적 시료 주입량으로 75 μL 를 선정하였다.

둘째, 증류수와 팔당담 원수를 대상으로 한 회수율 검토 결과 유리첨유여지(GF/F)를 이용할 경우 6종 모두의 회수율이 86~112%로 이내의 매우 안정적인 결과값을 나타내었으며, 독소물질에 따른 감도를 고려하여 0.05~200 $\mu\text{g/L}$ 범위의 표준물질 검량곡선의 직선성을 검토한 결과 6종 모두 0.999 이상의 매우 양호한 결과값을 나타내었다.

셋째, 분석대상물질에 대한 기기검출한계 및 정량한계는 각각 0.025(Neosaxitoxin)~0.581(Saxitoxin) $\mu\text{g/L}$ 로 추출, 농축 등의 전처리 과정 없이도 남조독소물질 수질기준이 1~3 $\mu\text{g/L}$ 보다 낮은 범위로 남조독소물질 6종의 정성 및 정량 동시분석이 가능하였다.

향후 분석법의 추가적인 신뢰도 검증을 이용하여 내부표준물질을 이용한 분석법 검증 및 조체에 대한 분석법 개선을 통해, 조류 수화현상 발생시 신속 정확한 분석법의 지속적인 연구 개발이 필요할 거라 사료된다.

참고문헌

- 김범철, 김호섭, 박호동, 최광순, 박종근(1999). 국내호수에서 발생한 남조류의 microcystin 함량과 독성평가. *한국유수학회지*, **32**, pp. 288-294.
- 서미연, 김백호, 한명수(2005). 서울 경기지역의 공원 연못 및 한강 수계내 조류독소 Microcystin-LR의 분포. *Korea J. Limnol.*, **38**(2), pp. 237-248.
- 한국수자원공사 수돗물분석연구센터(2008). 수돗물 신규 유해물질 수질분석 확장을 위한 2007년 분석법 정립결과 보고서.
- 황수옥, 고춘주, 이경식, 이정민, 김백호(2005). 한국 호수의 플라크톤, 정행사.
- Carmichael, W. W. and Saffermann, R. S. (1992). *A status report on planktonic cyanobacteria(blue-green algae) and their toxin*. EPA/600/R/92/079.
- Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., and Ma, Z. (2009). Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic Microcystis blooms. *Science of The Total Environment*,
- (Ref : Standard methods 20th edition, 1030C Method detection level)
MDL : Method detection limit, PQL : Pratical quantitaion limit

Table 8. Accuracy, Precision, MDL and PQL result of cyanotoxins (n=7).

Compounds	True Conc ($\mu\text{g/L}$)	Meas Conc ($\mu\text{g/L}$)	SD	MDL ($\mu\text{g/L}$)	PQL ($\mu\text{g/L}$)	Accuracy (%)	RSD (%)
Microcystin_LR	0.500	0.559	0.034	0.107	0.537	89.47	6.12
Microcystin_RR	0.100	0.100	0.005	0.015	0.076	100.11	4.87
Microcystin_YR	1.000	1.005	0.069	0.216	1.078	99.49	6.83
Anatoxin A	0.200	0.228	0.023	0.071	0.354	87.83	9.90
Saxitoxin	4.000	4.216	0.185	0.581	2.903	94.88	4.39
Neosaxitoxin	0.200	0.209	0.008	0.025	0.125	95.82	3.83

MDL : $SD \times t = SD \times 3.14$, (n=7, $1-\alpha=0.99$), PQL : $MDL \times 5$
SD : Standard deviation

- 407, pp. 3317-3322.
- Henriksen, A. S. and Olli, K. (1996). Sedimentation and buoyancy of *Aphanizomenon cf. flos-aquae* (Nostocales, Cyanophyta) in a nutrient-replete and nutrient-depleted coastal area of the Baltic Sea. *Hycologia*, **35**, pp. 94-101.
- Mekebri, A., Blondina, G. J., and Crane, D. B. (2009). Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A*, **1216**, pp. 3147-3155.
- Messineo, V., Bogianni, S., Melchiorre, S., Sechi, N., Lugliè, A., Casiddu, P., Mariani, M. A., Padedda, B. M., Corcia, A. D., Mazza, R., Carloni, E., and Bruno, M. (2009). Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, **39**, pp. 95-106.
- Repavich, W. M., Sonzogni, W. C., Standridge, J. H., Wedepohl, R. E., and Meisner, L. F. (1990). Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Research*, **24**, pp. 225-231.
- Sangolkar, L. N., Maske, S. S., and Chakrabarti, T. (2006). Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, **40**, pp. 3485-3496.
- Sivonen, K. (2009). Cyanobacterial Toxins. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), pp. 290-307.
- Sivone, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxiproduction. *Phycol.*, **35**, pp. 12-24.
- WHO (1999). Toxic Cyanobacteria in Water, A guide to their public health consequences, monitoring and management.
- Xie, L. and Park, H. D. (2007). Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction. *Aquaculture*, **271**, pp. 530-536.