

LC/MS/MS 분석을 위한 microcystins 전처리 단계별 효율성 연구

김화빈 · 박혜경[†] · 문정숙

국립환경과학원 한강물환경연구소

Evaluation of Pre-treatment Stages for Microcystins Analysis using LC/MS/MS

Hwa-Bin Kim · Hae-Kyung Park[†] · Jeong-Suk Moon

Han River Water Environment Research Center, National Institute of Environmental Research

(Received 1 June 2009, Revised 22 July 2009, Accepted 28 July 2009)

Abstract

We investigated the most effective pre-treatment processes and LC/MS/MS condition for microcystins analysis. With a step-by-step pre-treatment, efficiencies of several established methods were compared. At the level of cell burst, sonication method was found to be the most efficient. As a microcystins first extraction solvent, 5% acetic acid showed the highest efficiency. An isolation and recovery rate of microcystins of ODS Sep-Pak C₁₈ cartridge was higher than HLB SPE cartridge. As a final elution solvent from cartridge, 100% MeOH had a better efficiency than others. Using a LC/MS/MS, effective analytical methods were established. C₁₈ reverse column was used and gradient elution was performed with using acetonitrile, 0.1% formic acid as a mobile phase. We analysed to 0.8 mL/min flow rate fit to the 5 μ m particle size column and 55°C housing temperature. The validity of established analytical method was evaluated that MDL as average $0.050 \pm 0.014 \mu\text{g/L}$ and LOQ as average $0.160 \pm 0.045 \mu\text{g/L}$ had a good sensitivity over 40 magnification rather than 2 $\mu\text{g/L}$ detection limit of HPLC.

keywords : Cyanobacteria, LC/MS/MS, Microcystins, Pre-treatment

1. 서론

상수원 호수에서 남조류의 대량 발생은 이취미 발생과 독소 생산으로 인해 최근 큰 환경문제로 부각되고 있다. 남조류가 생산하는 독소는 크게 간장독과 신경독으로 분류되고 있으며 이중 가장 흔하게 나타나는 독소는 *Microcystis* spp, *Anabaena* spp, *Oscillatoria* spp 등에서 생산되는 간장독의 일종인 microcystins으로 알려져 있고 이는 간세포 내에서 탈인산화 효소의 활성을 저해하여 간세포의 변형, 종양 유발 등 인체 및 동물에 위해성을 나타낸다(Dai et al., 2008; Hilborn et al., 2005). 현재까지 남조류 독소에 대한 수질기준은 정해져 있지 않으나 그 중에서 가장 대표적인 독소인 microcystins에 대해 1997년 WHO에서 먹는물 가이드라인을 1 μg microcystin-LR/L로 정하였다(Chorus and Bartram, 1999).

Microcystins은 7개의 아미노산으로 구성된 환상 펩타이드 구조를 지니고 있고 열에 대해 매우 높은 안정성을 지니는 극성이 낮은 물질로서 두 개의 치환 아미노산에 따라 70 여종의 변이체가 있으며 이 중 가장 독성이 높은 물질은 microcystin-LR로 알려져 있다(Ruangyutikarn et al., 2004). 1982년에 처음 연구되기 시작한 microcystins은 낮

은 농도의 가이드라인으로 인해 이미 분석법에 대해 많은 연구들이 진행되고 있으며 기기분석법으로 HPLC/UV법, LC/MS법, GC/MS법이 있고 microcystins를 항원으로 인지해 항원과 특이적으로 결합하는 성질을 가지는 항체를 이용하는 ELISA, PCR, FISH와 같은 분자생물학적 방법이 있다. ELISA 분석의 경우 최근 연구에서 95 ng/L까지 검출가능하다고 조사되어 2 $\mu\text{g/L}$ 의 검출한계를 지니는 HPLC에 비해 감도가 매우 뛰어나지만 구입에 드는 비용이 크고 독성을 가진 microcystins의 변종에 대한 개별 분석이 어렵다는 단점을 지닌다(이진욱 등, 2007; McDermott et al., 1995). HPLC/UV법, HPLC/PDA법은 현재까지 주로 사용되었던 분석법이지만 분석 값의 오차와 검출한계를 낮추는데 한계가 있다. 이러한 단점을 보완한 것이 액체크로마토그래피에 질량분석기를 더하여 정성뿐만 아니라 정량 분석까지 정확하게 해 내는 LC/MS 및 LC/MS/MS를 이용한 분석법이다(Dell'Aversano et al., 2004; Hummert et al., 2001).

본 연구에서는 국내 여러 호수에서 여름철 발생한 남조류 시료를 대상으로 국외에서 발표된 많은 문헌들에서 제시된 microcystins 추출, 정제를 위한 전처리 방법들에 대해 LC/MS/MS 분석을 위한 전처리 단계별 분석효율을 비교하였고 LC/MS/MS 기기분석 조건을 조사하였다. 또한 LC/MS/MS를 사용하여 기존 문헌들을 통해 주로 분석되어졌던 microcystin-RR, LR, YR 외에 microcystin-LA 분석을 시도하였다.

[†] To whom correspondence should be addressed.
parkhk@me.go.kr

2. 연구방법

2.1. 분석대상시료

국내 주요 대형 호수에서 발생한 남조류 시료를 대상으로 하였다(Table 1). 모든 시료는 남조류의 우점도가 90% 이상의 시료를 사용하였으며 남조류 현존량이 매우 많은 스킴시료의 경우 동결건조 한 후 추출에 사용하였고 남조류 현존량이 적은 경우는 액상시료를 바로 세포파쇄하여 추출에 사용하였다. 세포파쇄방법 효율성 실험을 위해 팔당호에서 대량발생된 남조류 스킴 시료에서 분리한 *Microcystis aeruginosa* 분리주의 배양시료를 사용하였다.

Table 1. Sampling sites

| Sample name | Site | Sampling date | Dominant genus |
|-------------|------------------------|---------------|--------------------|
| A | Lake Paldang, Yangsuri | 2008.07.18 | <i>Microcystis</i> |
| B | Lake Sangsa | 2006.08.31 | - |
| C | Jecheon River | 2008.09.10 | <i>Microcystis</i> |
| D | Lake Daechung, chusori | 2008.08.13 | <i>Microcystis</i> |
| E | Lake Daechung, jangge | 2008.10.13 | <i>Microcystis</i> |
| F | Lake Paldang, Ori | 2008.09.29 | <i>Microcystis</i> |
| G | Lake Paldang, Yangsuri | 2008.07.07 | <i>Anabaena</i> |
| H | Lake Uiam | 2008.07.15 | <i>Microcystis</i> |
| I | Lake Paldang, dam site | 2008.07.06 | <i>Anabaena</i> |

2.2. 분석방법

2.2.1. 전처리

Microcystins 전처리의 큰 틀은 1988년 발표된 Harada의 방법을 준하여 수행하였다.

동결 건조된 세포를 일정량 취해 50 mL의 용매 ①에 넣고 세포 파쇄 단계를 거친 후 원심분리하여 상등액만 취하였다. 세포파쇄 시, freeze-thaw 방법은 액체질소 또는 냉동기를 사용하여 -20°C 이하에서 급속냉동한 후 바로 40°C water bath에서 해동하였으며 7회 반복하였고 초음파파쇄는 19880 Hz를 60% 사용하여 40분간 파쇄하였다.

Fig. 1의 순서에 따라 카트리지를 100% methanol 10 mL와 증류수 10 mL를 차례로 흘려주어 활성화 시킨 후 원심분리한 상등액을 천천히 통과시켜 상등액 중의 microcystins를 카트리지에 흡착시켰다. 20% methanol 10 mL로 카트리지의 불순물을 제거한 후 용매 ②로 카트리지에 흡착된 microcystins를 용출시키고 공기펌프를 사용하여 10 mL methanol을 모두 증발시키고 남은 분말에 100% methanol 1~2 mL를 넣어 microcystins를 녹인 후 0.45 μm cellulose syringe filter로 불순물을 제거하고 기기분석에 사용하였다(Fig. 1).

2.2.2. 기기분석

Microcystins 정량을 위해 표준품 microcystin-LR 500 μg, -RR 200 μg, -YR, -LA 100 μg(Alexis, USA)을 100% methanol에 용해한 후 -20°C에 보관하였고 수단계의 농도로 희석하여 사용하였다.

기기분석을 위해 ZORBAX Eclipse XDB-C18(Agilent) 컬

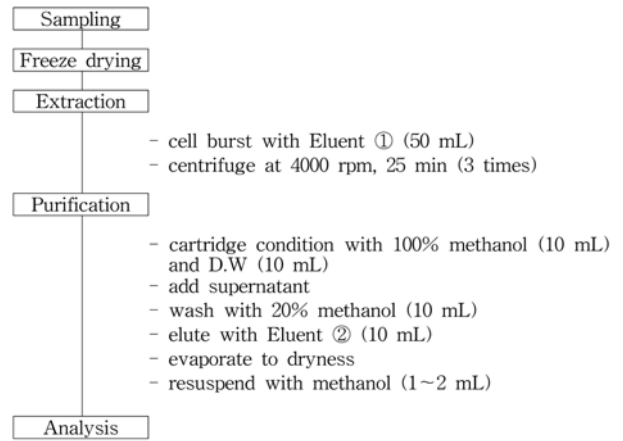


Fig. 1. Extraction and purification procedure for microcystins.

Table 2. Mobile phase composition (%)

| Time (min) | 0.1% formic acid | Acetonitrile |
|------------|------------------|--------------|
| 0 | 80 | 20 |
| 1 | 80 | 20 |
| 4 | 60 | 40 |
| 6 | 60 | 40 |
| 7 | 50 | 50 |
| 8 | 10 | 90 |
| 12 | 10 | 90 |
| 12.6 | 80 | 20 |
| 18 | 80 | 20 |

럼을 장착한 Varian사의 320 LC/MS/MS를 사용하였고 이동상 용매로는 0.1% formic acid와 acetonitrile을 사용하여 분석하였으며 이동상의 유속은 0.8 mL/min로 하였다. 기울기 용리는 Table 2의 조건일 때 가장 높은 분리능을 나타냈다. 모든 실험은 3회 분석하여 재현성을 확인하였고 Microcystin-RR, YR, LR, LA의 질량/전하(m/z)비는 각각 520, 1045.5, 995.6, 908.5로 하여 분석하였다(Table 2).

3. 결과 및 고찰

3.1. 전처리 각 단계별 방법 비교

3.1.1. 세포파쇄법

Microcystins는 남조류 세포가 사멸 또는 파괴되어야만 세포막 밖으로 누출되는 세포 내용소이다. 남조류 세포파쇄를 위해 가장 많이 사용되는 방법은 초음파 파쇄법이지만 매우 작은 양을 분석할 경우에는 온도가 높아져 시료가 증발하는 단점을 지니므로(Spoof et al., 2003) 초음파 파쇄법과 함께 많이 사용되고 있는 freeze-thaw방법과 비교하여 조류세포 파쇄정도를 현미경을 통해 살펴보고 최종 분석 결과를 통해 이에 따른 회수율을 조사하였다.

실험실에서 배양된 *Microcystis aeruginosa* 액체배양시료를 대상으로 하여 freeze-thaw 방법과 초음파 파쇄법의 결과를 비교 한 결과 freeze-thaw 방법만 사용한 경우 조체가 제대로 파쇄되지 않아 방해물질의 피크가 높고 그로 인해

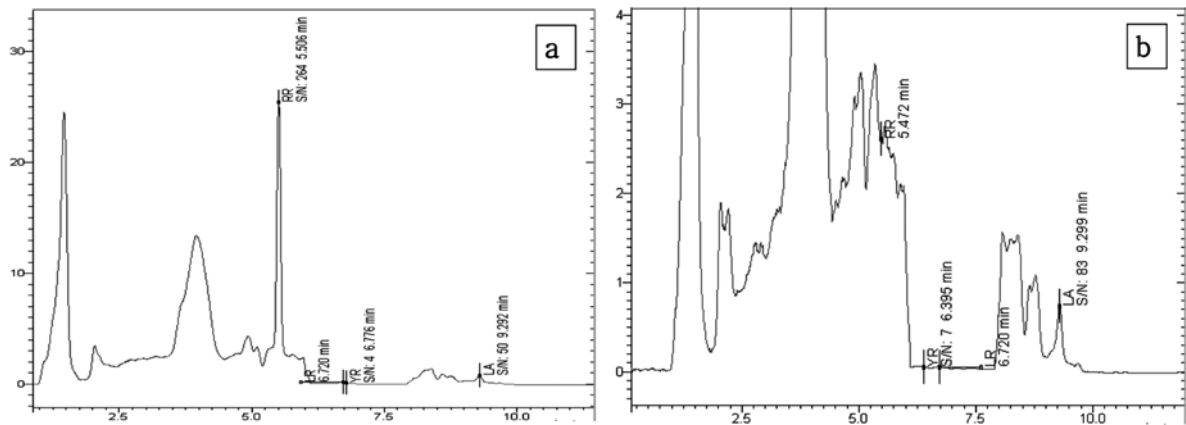


Fig. 2. Mass spectrum of: (a) sonicate method; and (b) freeze-thaw method.

microcystins 피크가 분리되지 않아 정량이 불가능 하였다. 반면 초음파 파쇄기를 사용한 경우에는 조체의 파쇄가 충분히 이뤄져 피크가 분리되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

3.1.2. 세포파쇄 시 추출용매별 효율성 비교

조사지점 A, B, C에서 대량 발생한 남조류 시료를 동결 건조 한 후 초음파 파쇄 방법을 이용한 세포파쇄 과정 시 Yuan 등(2006)의 연구에서 사용된 5% acetic acid와 Spoof 등(2003) 연구에서 사용된 75% methanol을 추출용매로 사용하여 최종 농도를 비교하였다.

Table 3에 나타난 것처럼 추출용매를 달리 하였을 때의 최종농도는 3.5~22.6배까지 차이가 났고 5% acetic acid의 추출효율이 75% methanol에 비해 훨씬 뛰어난 것으로 나타났다.

본 연구 결과와 5% acetic acid가 세포내의 단백질을 제거 및 기타 방해물질 제거에 뛰어나다는 Yuan 등(2006)의 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 세포파쇄 후 추출용매로서 5% acetic acid를 사용하여 다음 단계의 전처리 과정별 효율성 조사를 계속 진행하였다(Table 3).

3.1.3. 카트리지에 따른 회수율 비교

기존 microcystins 관련 문헌들의 80% 이상이 전처리 과정에서 1988년 Harada에 의해 연구된 ODS Sep-Pak C₁₈ 카트리지를 사용하는 고체상 추출법을 따르고 있다. ODS 카트리는 다양한 부피의 시료에 적용 가능하며 정지상이 분석물질을 붙잡고 있는 능력이 뛰어나며 선택적 추출, 불

순물의 선택적인 제거가 가능한 장점을 지니고 있다.

그러나 2006년 발표된 Moun Yuan의 연구에 따르면 HLB SPE 카트리가 기존의 카트리지보다 높은 효율을 제공한다는 것이 발표되었고 이후 2008년 Ming Dai의 연구에서도 Oasis HLB 카트리를 사용하여 microcystins을 분석한 것을 확인할 수 있었다.

따라서 본 조사에서는 A, B, C, D, E, F 지점에서 대량 발생한 남조류 시료를 동결건조 한 후 추출에 사용하여 얻은 microcystins 최종농도결과를 바탕으로 ODS Sep-Pak C₁₈ 카트리와 Oasis HLB 카트리의 흡착능을 비교분석한 결과, ODS Sep-Pak C₁₈ 카트리의 흡착능이 Oasis HLB 카트리에 비해 약 10~30% 이상 높은 것으로 나타났다(Table 4).

3.1.4. 최종 용출 용매

카트리에 흡착된 microcystins의 최종용출에는 75%와 100% methanol, acetonitrile: water:formic acid(80:19.9:0.1), 5% acetic acid 등 다양한 용매가 사용되어 왔다. 2002년 Saito의 연구에서는 100% methanol이 94%의 회수율로 높은 효율을 보인다고 하였으나 2003년 Lisa Spoof의 연구에서는 75% methanol이 가장 효율이 좋다고 발표되었다. 그러나 최근 발표된 Järvenpää 등(2007)의 논문에 따르면 지금까지 microcystins의 전처리 방법에서 최종으로 사용된 용매들을 대상으로 효율을 비교해 본 결과 100% methanol에서의 회수율이 가장 높은 것으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 75% methanol, 100% methanol 그

Table 3. Comparison of microcystin levels depending on 5% acetic acid and 75% methanol for microcystins extraction from cyanobacterial cells

| Sample name | Extraction solvent | RR (ug/g) | YR (ug/g) | LR (ug/g) | LA (ug/g) |
|-------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A | 5% acetic acid | 90.23 | 8.36 | 39.26 | 3.22 |
| | 75% methanol | 5.26 | N.D | 1.601 | N.D |
| B | 5% acetic acid | 6.91 | N.D | 7.04 | N.D |
| | 75% methanol | 2.00 | N.D | 0.50 | N.D |
| C | 5% acetic acid | 424.14 | 61.88 | 177.53 | N.D |
| | 75% methanol | 18.77 | 0.27 | 0.49 | N.D |

ND : Not-detected

Table 4. Comparison of microcystin levels between cartridges

| Sample name | Cartridge | RR (ug/g) | YR (ug/g) | LR (ug/g) | LA (ug/g) |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A | ODS | 85.69 | 8.63 | 36.21 | 3.24 |
| | HLB | 73.59 | 7.17 | 31.93 | 1.21 |
| B | ODS | 4.95 | 1.39 | 5.08 | 0.10 |
| | HLB | 4.42 | 1.10 | 4.69 | 0.07 |
| C | ODS | 428.88 | 66.41 | 168.11 | 0.02 |
| | HLB | 374.10 | 56.77 | 148.74 | N.D |
| D | ODS | 109.83 | 11.56 | 102.41 | 3.28 |
| | HLB | 100.45 | 7.72 | 73.54 | 3.58 |
| E | ODS | 126.48 | 8.60 | 223.52 | 5.31 |
| | HLB | 113.37 | 7.83 | 124.08 | 3.40 |
| F | ODS | 56.34 | 12.21 | 54.89 | 0.19 |
| | HLB | 49.19 | 8.12 | 51.63 | 0.07 |

ND : Not-detected

리고 acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) 이렇게 3가지 용매를 대상으로 하여 다른 조건을 똑같이 하여 분석한 결과, A 지점 시료를 제외한 모든 시료에서는 100% methanol을 사용하였을 때 효율이 가장 높게 나타났다. A 지점 시료의 경우 acetonitrile:water:formic acid 혼합 용매 사용 시 microcystins-RR, LA 농도가 75%와 100% methanol을 사용한 경우보다 조금 더 높게 나타나긴 하였으나 오차범위 안에 드는 값으로 100% methanol과 거의 차이가 없었다(Table 5).

지금까지의 결과를 종합하면 LC/MS/MS를 이용한 microcystins 분석을 위한 전처리(추출, 정제) 단계별로 효율을 비교한 결과 세포 파쇄방법은 초음파파쇄법이 freeze-thaw 방법에 비해 높은 추출율을 보였으며 추출용액은 5% acetic acid가 효율이 좋았고 ODS Sep-Pak C₁₈를 사용하여 용출 용액으로 100% methanol을 사용했을 때 가장 높은 회수율을 보였다(Table 6).

3.2. LC/MS/MS 분석방법

3.2.1. 컬럼 직경에 따른 효율성 비교

일반적으로 분석물이 단백질 계열인 경우에는 C₄, C₈ 컬럼을 많이 사용하지만 microcystins과 같이 펩타이드 구조의 경우에는 아미노산의 서열이 단백질에 비해서 짧고 분자량도 2000이하이므로 C₁₈ 역상컬럼을 사용한다. 따라서 microcystins 분석에 사용되는 C₁₈ 컬럼 중에서 충전물은 같지만 직경이 다른 두 컬럼을 사용해 microcystins 최종 농도를 비교하여 결과를 비교하였다. Fig. 3에서 보이는 것처럼 microcystin-RR은 피크자체의 Area값이 크기 때문에 큰 차이를 보이지 않고 있으나 microcystin-YR, -LR의 경우 5 μm 직경 컬럼 사용시 농도가 2~3배 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있다. 특히 현재까지 국내에서 분석결과가 보고된 사례가 없는 microcystin-LA의 경우 2.6 μm 직경 컬럼에서는 피크가 나오지 않아 정량이 불가능하였으나 5

Table 5. Comparison of microcystin levels depending on the elution solvent

| Sample name | Elution solvent | RR (ug/g) | YR (ug/g) | LR (ug/g) | LA (ug/g) |
|-------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A | 75% Methanol | 84.71 | 8.08 | 36.46 | 3.51 |
| | 100% Methanol | 90.23 | 8.36 | 39.26 | 3.22 |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 94.63 | 8.35 | 37.08 | 3.96 |
| B | 75% Methanol | 6.77 | 0.78 | 7.59 | N.D |
| | 100% Methanol | 6.95 | N.D | 7.04 | N.D |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 6.91 | N.D | 4.93 | N.D |
| C | 75% Methanol | 375.32 | 52.22 | 166.31 | N.D |
| | 100% Methanol | 424.14 | 61.88 | 177.53 | N.D |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 400.29 | 50.20 | 150.27 | N.D |
| D | 75% Methanol | 92.99 | 6.17 | 73.04 | 3.01 |
| | 100% Methanol | 109.83 | 11.56 | 102.41 | 3.28 |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 100.48 | 6.36 | 73.67 | 2.45 |
| E | 75% Methanol | 110.38 | 5.82 | 100.51 | 3.41 |
| | 100% Methanol | 126.48 | 8.60 | 223.52 | 5.31 |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 113.08 | 6.08 | 105.41 | 3.01 |
| F | 75% Methanol | 47.47 | 6.75 | 45.36 | 0.00 |
| | 100% Methanol | 56.34 | 12.21 | 54.89 | 0.19 |
| | Acetonitrile:water:formic acid (80:19.9:0.1) | 37.21 | 4.85 | 33.22 | 0.03 |

ND : Not-detected

Table 6. Comparison of efficiency of microcystin pre-treatment methods

| Parameter | Methods | Result |
|--------------------|--|---------------------------------------|
| Cell burst | Sonication | High |
| | Freeze-thaw (7 times) | Low |
| Extraction solvent | 5% Acetic acid | High |
| | 75% Methanol | Low |
| Cartridge | ODS Sep-Pak C ₁₈ cartridges | High |
| | HLB SPE cartridge | Low |
| | 75% Methanol | Low |
| Elution solvent | Acetonitrile:water:formic acid | Efficiency varies according to sample |
| | 100% Methanol | High |

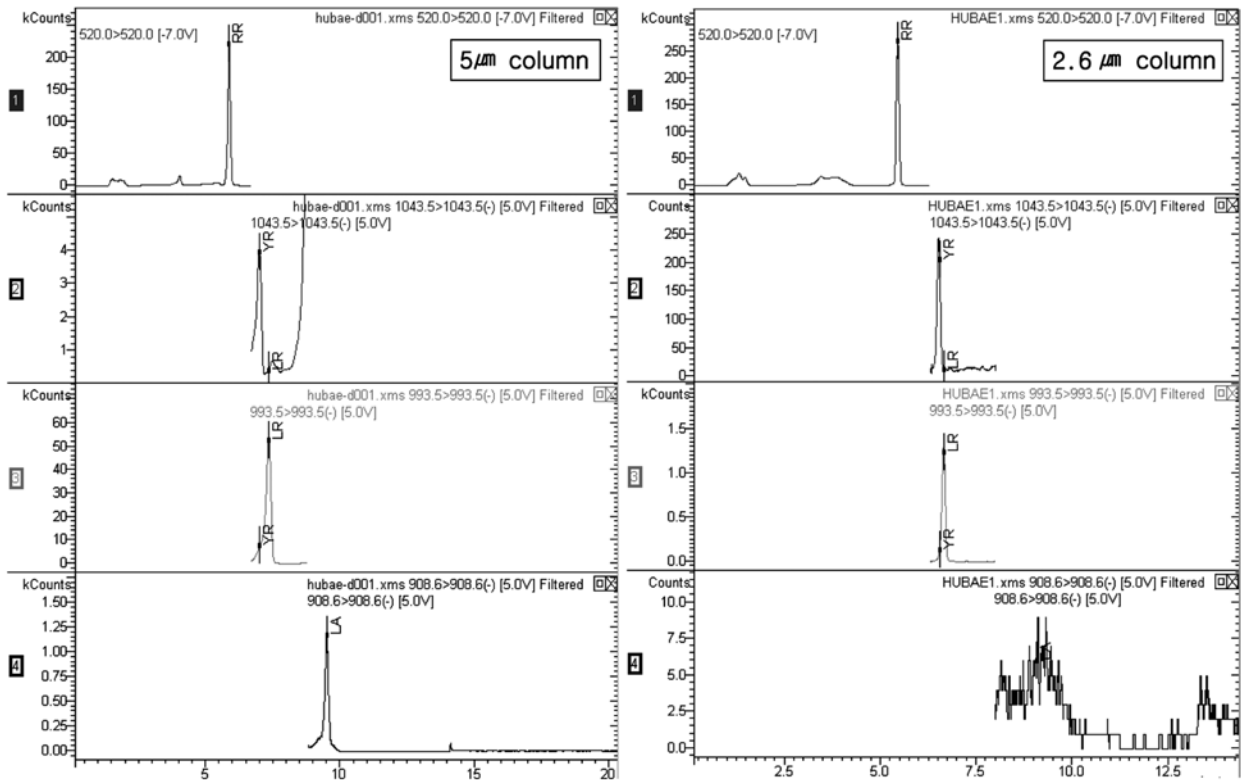


Fig. 3. Comparison of microcystin peaks between (a) 5 μm and (b) 2.6 μm column in water sample.

μm 직경 컬럼 사용시 피크가 뚜렷히 분리되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

직경 5 μm 컬럼 사용시 microcystins 각각의 피크 분리가 직경 2.6 μm 컬럼보다 뚜렷하게 이뤄졌고 microcystin-YR, -LR 피크의 경우 직경 2.6 μm 컬럼에서는 검출시간대가 같아 피크가 겹쳐서 나타났으나 5 μm 컬럼의 경우는 유속이 2.6 μm 컬럼보다 3배가량 더 컸으므로 피크가 깨끗이 분리되었다. 팔당호(H, I) 및 의암호(H)에서 대량 발생한 남조

류 시료를 대상으로 컬럼 직경 별 농도를 비교한 표를 Table 7에 나타내었다.

3.2.2. LC/MS/MS 조건 및 분석한계

LC/MS/MS 분석조건은 다음과 같다. 5 μm 직경의 컬럼을 사용하였으므로 Järvenpää 등(2007)의 연구에서의 유속조건보다 좀 더 높여 0.8 mL/min로 조건을 정해 분석하였고 유속을 높임에 따라 Nebulizer의 부하를 낮춰주기 위해 Hou-

Table 7. Comparison of microcystin levels between 5 μm and 2.6 μm column

| Sample name | 5 μm | | | | 2.6 μm | | | |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | RR ($\mu\text{g/L}$) | YR ($\mu\text{g/L}$) | LR ($\mu\text{g/L}$) | LA ($\mu\text{g/L}$) | RR ($\mu\text{g/L}$) | YR ($\mu\text{g/L}$) | LR ($\mu\text{g/L}$) | LA ($\mu\text{g/L}$) |
| G | 0.08 | 0.02 | 0.02 | N.D | 0.04 | N.D | N.D | N.D |
| H | 2.97 | 0.60 | 1.96 | 0.08 | 1.73 | 0.14 | 0.43 | N.D |
| I | 0.14 | 0.03 | 0.06 | N.D | 0.13 | N.D | 0.05 | N.D |

ND : Not-detected

Table 8. LC/MS/MS condition for microcystins analysis

| Mass | Conditions |
|------------------------|------------------------------------|
| MS | Varian 320-MS TQ Mass spectrometer |
| Column | ZORBAX Eclipse XDB-C18 |
| Flow | 0.8 mL/min |
| Drying gas pressure °C | 350°C |
| SIM width | 0.700 amu total |
| Column °C | 35°C |
| Inject volume | 20 µL |
| Nebulizer gas pressure | 55 psi |
| Drying gas pressure | 35 psi |
| Housing °C | 55°C |
| Ionization voltage | 5.2 kV. |
| CID gas pressure | 1.5 torr |

ing 온도를 높여 55°C로 설정하여 분석하였다(Table 8).

확립된 LC/MS/MS 기기조건을 바탕으로 분석한계를 도출하였다. 기기분석한계(Instrument Detection Limit, IDL)는 microcystin 5 µg/L 표준용액을 분석해 S/N 3:1을 계산하여 나타내었고 방법검출한계(method detection limit, MDL)는 남조류 스크립시료 A를 사용하여 7회 반복 측정하여 식 (1)을 이용해 산정하였다. 정량한계는 표준편차에 10을 곱한 결과를 사용하여 산정하였다.

$$MDL = t(0.01, n-1) \times s = 3.14s \quad (1)$$

여기서, t는 자유도 (n-1)과 유의수준 0.01에 대한 Student t분포에 적용한 값이고, n은 공시험 값의 개수이며, s는 공시험 값의 표준편차이며 일반적으로, t(0.01, n-1)은 3.14를 이용하였다. 5, 10, 25, 50 µg/L의 microcystin mix 표준용액을 주입하여 검량선을 작성한 결과 R² 값 0.9993로 나타났고 식 (1)에 의거해 계산된 Microcystin-RR, YR, LR, LA의 MDL 값은 각각 0.031, 0.065, 0.042, 0.064 µg/L, 정량한계인 LOQ 값은 각각 0.100, 0.206, 0.134, 0.202 µg/L로 좋은 감도를 나타내었다.

4. 결론

- 1) Microcystins의 LC/MS/MS 분석을 위해 전처리(추출, 정제) 단계별로 기존 방법들의 효율성을 비교한 결과, 세포파쇄 단계에서는 초음파파쇄를 이용한 방법의 조체파쇄 효율이 가장 좋았고 조류세포에서 microcystins을 1차 추출하는 용매로는 5% acetic acid가 가장 높은 효율을 나타내었다. HLB SPE 카트리지에 비해 ODS Sep-Pak C₁₈ 카트리지가 microcystins 분리, 회수 효율이 높았고 최종용출 용매로는 100% methanol의 효율이 다른 용매에 비해 뛰어난 것을 알 수 있었다.
- 2) LC/MS/MS를 이용한 microcystins 분석을 용이하게 하기 위해 C18 역상 컬럼을 정지상으로 하였고 이동상으로는 극성 매질인 acetonitrile과 0.1% formic acid 용리액을 함께 사용하였다. 5 µm 직경의 컬럼에 맞게 0.8

ml/min 유속으로 분석하였고 Housing 55 °C 조건으로 하여 분석하였다. 구축된 기기분석조건으로 분석검출한계를 조사한 결과 MDL 평균 0.050 ± 0.014 µg/L, LOQ 평균 0.160 ± 0.045 µg/L로 나타나 기존 microcystins 분석에 주로 사용되었던 HPLC의 검출한계인 2 µg/L에 비해 40 배 이상 낮은 검출한계를 나타내었으며 이로 인해 국내에서의 연구가 한번도 시도되지 않았던 microcystin-LA 까지 모니터링 할 수 있었다.

사 사

본 연구는 2008년도 국립환경과학원의 환경현안지원연구인 「조류예보제 발령기준 적정화 방안연구(I)」의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- 국립환경과학원(2008). 조류예보제 발령기준 적정화 방안연구(I). NIER No.2008-49-999.
- 이진옥, 유혜원, 김인수(2007). 나노크리스탈 Quantum-dot을 적용한 남조류 독소 Microcystin 탐지 연구. 수질보전 한 국물환경학회지, 23(5), pp. 705-711.
- Chorus, I. and Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria In Water*, Spon Press.
- Dai, M., Xie, P., Liang, G., Chen, J., and Lei, H. (2008). Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), pp. 43-50.
- Dell'Aversano, C., Hess, P., and Quilliam, M. A. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081(2), pp. 155-164.
- Harada, K., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M. F., Oishi, S., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., and Carmichael, W. W. (1988). Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 448, pp. 275-283.
- Hilborn, E. D., Carmichael, W. W., Yuan, M., and Azevedo, S. M. (2005). A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicol.*, 46(2), pp. 218-221.
- Hummert, C., Dahlmann, J., Reichelt, M., and Luckas, B. (2001). Analytical techniques for monitoring harmful cyanobacteria in lakes. *Research and Management*, 44(7), pp. 159-168.
- Järvenpää, S., Lundberg-Niinistö, C., Spoof, L., Sjövall, O., Tyystjärvi, E., and Meriluoto, J. (2007). Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography mass spectrometry. *Toxicol.*, 49(6), pp. 865-874.
- McDermott, C. M., Feola, R., and Plude, J. (1995). Detection of cyanobacterial toxins (Microcystins) in waters of north-eastern Wisconsin by a new immunoassay technique.

- Toxicon*, **33**(11), pp. 1433-1442.
- Ruangyuttikarn, W., Miksik, I., Pekkoh, J., Peerapornpisal, Y., and Deyl, P. (2004). Reversed-phase liquid chromatographic - mass spectrometric determination of microcystin-LR in cyanobacteria blooms under alkaline conditions. *Journal of Chromatography B*, **800**(1-2), pp. 315-319.
- Saito, K., Ishii, H., Nishida, F., Saito, H., Abe, T., and Toyota, Y. (2002). Purification of microcystins by DEAE and C18 cartridge chromatography. *Toxicon*, **40**(1), pp. 97-101.
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., and Meriluoto, J. (2003). Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography - electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1020**(1), pp. 105-119.
- Yuan, M., Carmichael, W. W., and Hilborn, E. D. (2006). Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil, 1996. *Toxicon*, **48**(6), pp. 627-640.