J. Soil Groundw. Environ. Vol. 20(7), p. 70~79, 2015
http://dx.doi.org/10.7857/JSGE.2015.20.7.070
ISSN 1598-6438 (Print), ISSN 2287-8831 (Online)

≪ **Research Paper** ≫

분자량 크기별 토양 휴믹산(HA)의 구조적 특성 및 페난트렌 흡착 반응특성 비교

이두희[1,2] · 김소희[1] · 신현상[1]*

[1]서울과학기술대학교 에너지환경공학과

[2]국립환경과학원 환경측정분석센터

Comparison in Structural Characteristics and Phenanthrene Sorption of Molecular Size-Fractionated Humic Acids

Doo-Hee Lee[1,2] · So-Hui Kim[1] · Hyun-Sang Shin[1]*

[1]Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science and Technology

[2]Environmental Measurement and Analysis Center, National Institute of Environmental Research

ABSTRACT

A sample of soil humic acid (HA) was divided by ultrafiltration (UF) into five fractions of different molecular size (UF_1: > 300, UF_2: 100~300, UF_3: 30~100, UF_4: 10~30, UF_5: 1~10 kilodaltons). Apparent average molecular weight (M_w) of the HA fractions were measured using high performance size exclusion chromatography (HPSEC), and the chemical and structural properties of the five HA fractions were characterized by elemental compositions (H/C, O/C and *w* ((2O + 3N-H)/C)) and ultraviolet-visible absorption ratios (SUVA, $A_{4/6}$). The organic carbon normalized-sorption coefficients (*K*oc) for the binding of phenanthrene to the HA fractions were determined by fluorescence quenching and relationship between the sorption coefficients and structural characteristics of the HA fractions were investigated. The elemental analysis and UV-vis spectral data indicated that the HA fractions with higher molecular weights have grater aliphatic character and lower contents of oxygen, while the HA fractions with lower molecular size have greater aromatic character and molecular polarity that correspond to greater SUVA and internal oxidation values (*w*). The log *K*oc values (L/kg C) were gradual increased from 4.45 for UF_5 to 4.87 for UF_1. The correlation study between the structural descriptors of the HA fractions and log *K*oc values of phenanthrene show that the magnitude of *K*oc values positively correlated with M_w and H/C, while negatively correlated with the independent descriptors of the O/C, *w*, SUVA and $A_{4/6}$.

Key words : Soil humic acid, Molecular size-fractionation, Chemical-structural properties, Phenanthrene, Koc

1. 서 론

PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 다환방향족 탄화수소류)는 방향족 고리가 두 개 이상 연결된 구조로서 대부분이 강한 독성과 잔류성을 지닌 대표적인 HOCs(Hydrophobic Organic Compounds, 소수성 유기화합물)이다(Edwards, 1983). 토양에 노출된 PAHs의 분포와 거동은 토양 입자와의 흡·탈착 과정에 영향을 받는다(Aiken et al., 1985). 특히, SOM(Soil Organic Matter, 토양유기물)과의 흡착(sorption) 반응은 PAHs와 같은 소수성 유기오염물질의 토양 내 분포와 거동에 영향을 미치는 주요 요인으로 알려진다(Aiken et al., 1985; Chiou, 2002).

HS(Humic Substances, 휴믹물)은 토양 및 지하수에서 가장 흔히 발견되는 대표적인 SOM으로서. 함량은 일반적으로 전체 SOM의 60~70%를 차지하는 것으로 알려진다(Aiken et al., 1985). HS는 다양한 기원의 자연유기물이 휴믹화(humification)과정을 통해 생성되는 고분자성의 불균질 유기물 혼합체로서 pH에 따른 용해도에 따라

*Corresponding author : hyuns@seoultech.ac.kr
Received : 2015. 8. 5 Reviewed : 2015. 8. 27 Accepted : 2015. 9. 22
Discussion until : 2016. 2. 29

HA(Humic Acid, 휴믹산), FA(Fulvic Acid, 풀빅산) 및 Hu(Humin, 휴민) 등으로 분류된다(IHSS, 2015). 특히, HA는 토양 환경에 존재하는 주요 DOM(Dissolved Organic Matter, 용존성 유기물)로서 -COOH, -OH 등의 산성 작용기를 가진 다전해질성(polyelectrolyte) 물질이어서 높은 산화상태($Z \geq 2+$)의 중금속이온과 강한 착화합물을 형성할 뿐 만 아니라, 분자 내 친수성과 소수성을 가진 일종의 micelle 구조를 가지고 있어 HOCs와도 강한 친화력을 가진다(Leenheer et al., 1989). 이러한 상호작용 특성은 HA의 기원이나 구조적 특성(지방족성 또는 방향족성 등)에 따라 큰 차이를 보이는 것으로 알려진다. 그러나 다양한 유기물의 혼합체인 HA가 가지는 불균질성(heterogeneity)으로 인해 여전히 HOCs와의 흡착특성에 대한 통일화된 이론이 정립되지 않은 상태이다(Chefetz and Xing, 2009; IHSS, 2015).

대표적인 불균질성의 예로서 HA는 분자량이 수백에서 수십만 daltons에 이르는 다분산성(polydispersity) 물질이며, 분자량 크기에 따라 분자구조 특성에 차이가 있는 것으로 보고된다(Leenheer et al., 1989; Shin et al., 1999). Li et al.(2004)은 8개의 분자량 크기별로 분리한 HA에 대하여 물질특성(^{13}C-NMR, Pyrolysis-GC-MS 등) 규명을 통해 HA분자는 동일한 기원에서도 분자량에 따라 화학적, 구조적 특성이 서로 다른 일련의 고분자 혼합체임을 제시하였고, Shin et al.(2003)은 토양 HA는 토양층의 깊이가 증가할수록 상대적으로 저분자량의 특성을 가지며, 구조적으로는 방향족성과 카르복실산 함량이 증가함을 밝혔다. 특히, Trubetskaya et al.(2014)는 HA의 역상 크로마토그래피 분석을 통해 고분자 HA일수록 소수성의 특성을 가짐을 보였으며, Lee et al.(2015)은 분자량 크기별 HA의 형광특성(즉, EEM-PARAFAC) 비교를 통해 고분자량의 HA가 보다 밀집된 형태의 방향족(condensed aromatic) 탄소구조를 가지며 그래핀(graphene) 산화물에 대하 보다 높은 흡착친화력을 가짐을 제안한 바 있다. 또한, Rao and Choppin(1994)는 서로 다른 분자량을 가진 HA와 Cd(II), Np(V)과의 결합특성에 대한 분광학적 연구를 통해, 분자량이 클수록 금속이온과 더 강한 결합을 형성함을 보였으며, Chen et al.(2013)은 형광소광법을 적용한 HA와 Cu(II), Hg(II)와의 반응특성 비교를 통해, pH와 함께 분자량크기가 HA의 금속이온과의 흡착친화력에 영향을 미치는 중요 인자임을 제시하였다. 이러한 HA의 분자량 크기에 따른 차이는 토양 및 지하수 환경에서의 HOCs 및 중금속이온의 반응과 거동이 HA의 분자량 크기에 크게 영향을 받음을 제시한다(Sun et al., 2013). 따라서 HA의 분자량 크기에 따른 분리와 PAHs와의 흡착특성에 대한 연구는 환경 중 소수성 유기오염물질의 거동특성에 대한 보다 상세한 정보를 제공할 수 있다. 그러나 국내・외에서의 분자량 크기별 HA와 PAHs와의 반응특성 규명에 대한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는 국내토양에서 추출한 HA를 대상으로 한외여과법(UF)을 적용하여 분자량 크기별 분리를 실시하였다. 분자량 크기별 HA은 SEC(Size Exclusion Chromatography, 크기배제크로마토그래피)분석, 원소분석, 자외선-가시광선 분석 등을 통하여 분자량 크기에 따른 분자구조 특성을 비교평가하였다. 또한 PAHs의 모델화합물로서 기존 에 널리 연구된 PHE(Phenanthrene, 페난트렌)을 선정하여 분자량 크기별 HA와의 유기탄소 표준화 분배계수(K_{OC})를 도출하였고, 각 HA의 물질특성 자료와의 상관관계를 해석함으로서 PAHs의 흡착에 기여하는 분자량 크기별 HA의 주요 물질특성 인자를 규명하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 토양 HA의 추출 및 정제

본 연구에서 사용한 토양 HA은 강원도 고성지역의 토양으로부터 추출 및 정제하여 사용하였다. 토양시료는 국내 토양에서 일반적인 10YR 계열의 황갈색 토색을 띠었으며, 실트질(< 63 μm) 함량이 18%인 모래질의 토성(soil texture)과 1.16%의 유기탄소 함량(w/w)을 보였다(Cha et al., 2004). 토양 HA의 추출과 정제는 Soxhlet 용매추출을 통해 Lipid 성분을 제거한 후, 국제휴믹학회(IHSS)의 표준절차서에 따른 산・염기 침전법을 이용하였고(IHSS, 2015), 동결건조를 통해 고운 분말상태의 최종시료를 얻었다. 토양 HA의 추출과 정제과정은 이전 문헌에 상세히 기술한 바와 같다(Lee et al., 2004)

2.2. 한외여과법에 의한 HA의 분자량 크기별 분리

HA 시료의 분자량 크기별 분리는 한외여과법(UF)을 적용하였다(Shin et al., 1999). 분자량 분리를 위한 HA 모액(stock solution)은 고운분말 상태의 휴믹산 시료 200 mg을 1.0 M NaOH 5.0 mL에 완전히 녹인 후 증류수를 이용하여 1 L로 희석하여 200 mg/L 농도로 제조하였다. 이 과정에서 0.1 M HCl 사용하여 모액의 pH는 7.0 (± 0.2)로 맞추었다. HA 모액(1 L)은 PTFE(0.45 μm, PALL. Co. Ltd) 재질의 멤브레인 필터로 거른 후, 한외여과장치와 연결된 저장용기에 넣어 일정크기의 cut-off 막 필터가 장착된 200 mL 용량의 UF(Ultrafiltration, 한외여과) 장치

(Amicon 8010)를 통과시켰다. 실험은 일정크기를 가진 일련의 한외여과 cut-off 막 필터를 교환해 가면서 수행하였다. 실험에 사용된 UF 막은 직경 63.5 mm의 셀룰로스 재질(Millipore, USA)로서 MWCO(Molecular Weight Cutoff. 분획분자량)에 따라 YM1(1 kDa), YM10(10 kDa), YM30 (30, kDa), YM100(100 kDa) 및 PM300(300 kDa)이었으며, 분자량 크기 순서대로 > 300 kDa(F_1), 100~300 kDa(F_2), 30~100 kDa(F_3) 10~30 kDa(F_4), 1~10 kDa(F_5)의 HA 용액을 얻었다. 분리된 각 용액은 1 M HCl를 사용하여 pH 2.0 이하로 조정한 후 하루 밤 정치 시켜 침전시켰다. 침전된 HA는 증류수를 사용하여 2~3회 세척과 원심분리(3,000 rpm, 10 min.)를 통해 분리한 후, 냉동 동결 건조(freeze-dry)하여 고운 분말상태의 최종 분자량 크기별 HA 시료를 얻었다.

2.3. 분자량 크기 및 분광학적 특성 분석

HA 분자의 분자량 크기는 Waters사의 Protein Pak 125A(7.8 × 4,300 mm) 컬럼을 사용한 SEC를 사용하여 분석하였다. HA 시료의 농도는 SEC 분석 측정값에 영향을 미치기 때문에 일정한 농도(10 mg-C/L, pH 7.0)에서 수행하였다. 여기서 HA 농도는 TOC 분석기(TOC-5000A, Shimazu)를 통해 결정하였다. 이동상은 2 mM phosphate buffer(in pH 6.8, 0.1 M NaCl)를 사용하였으며, 흐름속도(flow rate)는 1 mL/min을 유지하였다. 시료 주입량은 20 μl이었으며, 254 nm의 UV 검출기를 사용하여 분석하였다. 분자량 결정을 위한 검정곡선의 작성은 PSS(polystyrene sulfonates sodium) 18, 8, 4.6(kDa) (Polysciences Inc., Warrington, PA) 및 저분자영역인 Salicylic acid(138 Da, Aldrich), Acetone(58 Da, HPLC grade, Aldrich) 표준시료를 제조하여 사용하였다(Zhou et al., 2000). 다음의 식 (1)은 상기 표준시료 5종을 이용하여 얻은 검량선의 직선식을 나타낸 것으로서, 결정계수(R^2) 0.99의 양호한 상관성을 보였다. 여기서 M_w는 겉보기 중량평균분자량(apparent weight-averaged molecular weights), R_t는 머무름 시간(retention time)을 나타낸다.

$$LogM_w = -0.28R_t + 6.08 \quad (r^2 = 0.99) \tag{1}$$

각 HA분자에 대한 M_w의 계산은 SEC 크로마토그램과 다음 식 (2)를 이용하여 도출하였다(Conte and Piccolo, 1999; Zhou et al., 2000). 여기서, M_i는 작성된 검량선에 의한 i시간대에서의 분자량크기이며 h_i는 i시간대서의 SEC 크로마토그래프의 높이를 나타낸다.

$$M_w = \Sigma_i h_i M_i / \Sigma_i h_i \tag{2}$$

HA 분자의 C, H, N, O 원소분석은 CHNS-932, VTF 900(LECO Co.)를 사용하여 수행하였다. C,H,N,S의 분석은 1.0 ± 0.5 mg의 분말 시료를 주석(Sn) 캡슐에 담아 1,000°C로 가열함으로서 연소 시에 발생하는 CO_2, H_2O 및 N_2 가스의 양을 IR(infrared detector)과 TCD(thermo conductivity detector)로 3회 반복하여 측정하였다. 산소(O)의 분석은 시료를 은(Ag) 캡슐에 담아 1100°C에서 열분해시켜 유기산소로부터 전환된 CO 발생량을 정량하여 측정하였다. 각 HA의 원소성분비(H/C, O/C, w (= (2O + 3N-H)/C) 등) 값은 이들 원소분석 자료로부터 계산을 통해 얻었다(Lee et al., 2004; Ciesleqixs and Gonet, 2004).

HA 분자의 흡광분석은 자외선-가시광선 분광분석기(UV-1601, Shimadzu)를 사용하여 측정하였다. 흡광분석은 제조된 분석시료(10 mg-C/L, pH 6.0)를 10 mm 석영 셀에 담아 200~700 nm 영역에서의 흡광스펙트럼을 얻은 후, 254 nm에서의 SUVA(specific UV absorbance)(즉, UV_{254}/DOC, L/mgC) 및 465 nm와 665 nm의 흡광도 비인 $A_{4/6}$를 결정하였다.

2.4. HA와 PHE과의 흡착실험

HA와 PHE과의 흡착실험은 형광소광법(fluorescence quenching)을 이용하였다(Peuravuori, 2001). PHE($C_{14}H_{10}$, purity > 97%)는 Aldrich 사에서 구입하였으며 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 실험에 사용한 PHE 표준용액(1.0 mg/L, pH 6.0)은 과량을 녹여 포화용액을 만든 후, 0.45 μm 막 여과지(MFS, JPO50)로 여과하여 조제하였다. 이때 미생물 방지를 위해 5 mM $CaCl_2$ 및 0.01 mM $HgCl_2$를 첨가하였으며 0.1 M NaOH 또는 0.1 M HCl을 사용하여 pH 6으로 조절하였다. 흡착실험은 회분식으로 수행하였으며 20 mL 용량의 serum bottle을 사용하였다. 반응용액은 일정 PHE 표준용액(1.0 mg/L, pH 6.0)에 HA 모용액(10 mg-C/L, pH 6.0)을 첨가하여 최종 농도가 1~5 mg-OC/L가 되도록 변화시켰다. 반응용액은 휘발에 의한 영향을 줄이기 위해서 반응용기 상층 공간(head space)을 최소화 하였으며, 사용된 유리관의 마개는 표면흡착에 의한 영향을 방지하기 위하여 별도로 제작하여 밀봉하였다. 각 시료용기는 알루미늄박을 이용하여 빛에 유입을 차단한 후 20분 동안의 평형시간 경과 후 곧바로 형광분석을 실시하였다(Lee et al., 2008). 형광분석은 Perkin-Elmer의 LS-50B 형광분광기를 사용하였고, SyF (synchronous fluorescence, 동시형광) 모드에서 측정하였다. SyF 스펙트럼은 5.0 nm 들뜸과 방출 슬릿너비, 500 nm/min.의 주사속도 조건에서 350~600 nm의 파장 범위에

서 얻었다. 들뜸과 방출의 파장 차이(Δλ)는 30 nm로 일정하게 유지하였고, 모든 실험은 상온(25ºC)에서 수행하였다.

HA와 PHE와의 흡착자료 해석은 HA 자체의 형광바탕신호와 식 (3)의 내부-필터효과(inner-filter effect, IFE)에 기인한 보정과정을 거친 후, 식 (4)의 Stern-volmer 식에 적용하여 해석함으로서 유기탄소표준화 분배계수(K_{oc})값을 도출하였다(Peuravuori, 2001). 보정을 위한 HA 시료는 PHE가 첨가되지 않은 HA를 대상으로 1~5 mg-C/L(pH 6.0)를 따로 조제하여 사용하였고, 내부필터 효과(IFE)는 형광 들뜸파장(λ_{ex}, 250 nm)와 방출파장(λ_{em}, 347 nm)에서의 HA시료의 UV흡광도를 측정하여 결정하였다. 문헌에 따르면, HA의 자체흡수에 의한 IFE 보정인자가 3 이상일 경우 PAHs의 형광소광 보정 값의 신뢰성이 낮아지는 것으로 보고된다(Pan et al., 2007). 이에 본 실험에서는 HA 자체에 의한 내부필터효과의 영향을 최소화하기 위해 HA 농도를 최대 < 5 mg-C/L로 설정함으로서 IFE 보정인자를 1.0~1.5 범위 내로 유지하였다.

$$\frac{F_{cor}}{F_{obs}} = \frac{2.3A_{\mathrm{ex}}\Delta x 10^{A_{\mathrm{ex}}x_1}}{1-10^{-A_{\mathrm{ex}}\Delta x}} \frac{2.3A_{\mathrm{em}}\Delta y 10^{A_{\mathrm{em}}y_1}}{1-10^{-A_{\mathrm{em}}\Delta y}} \quad (3)$$

$$\frac{F_o}{F} = 1 + Koc[OC_{HA}] \quad (4)$$

식 (3)에서의 F_{cor}은 보정된 형광강도이고, F_{obs}는 관찰된 형광강도이며, A_{ex}와 A_{em}은 형광분석 시 사용한 들뜸(excitation)과 방출(emission) 파장에서의 흡광도이다. ΔY는 들뜸 슬릿 너비이고 ΔX는 방출 슬릿 너비를 나타내며 X_1과 Y_1은 각각 들뜸과 방출 빛(beam)의 끝과 큐벳(cuvette) 끝까지의 거리이다. 형광바탕신호를 보정하기 위한 시료는 PHE가 첨가되지 않은 분자량 크기별 HA 시료를 대상으로 1~5 mg-C/L(pH 6.0 ± 0.1)를 따로 조제한 후 PHE가 첨가된 시료와의 차로서 계산하였다. 식 (4)에서의 F_0는 초기 PHE의 형광강도, F는 HA을 포함하고 있는 시료에서 HA영향을 보정한 형광강도이며, [OC_{HA}]는 사용된 HA의 농도(mg-C/L)를 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 토양 HA의 분자량 크기 분포 및 SEC 분석결과

한외여과에 의해 분리한 분자량 크기별 HA 소부분의 상대적인 분포(wt, %)는 Table 1에 제시하였다. 토양 HA의 주요 분자량 크기(MWCO) 분포 영역은 > 300 kDa와 30~100 kDa으로서 각각 33.3%와 26.3%의 분포 비를 나타냈다. 특히 > 30 kDa 영역의 고분자 HA(UF_1~UF_3)가 약 72%로 대부분을 차지한 반면, 저분자 HA(1~10 kDa, UF_5)는 약 10.6%를 차지하였다. 이는 문헌에 보고된 한외여과법에 의한 다양한 기원의 토양 HA에서의 분자량 분포 경향과도 유사하다. 예로서, Lee et al.(2003) 국내 화강암 기원의 토양 HA에 대한 분자량 분포 측정

Table 1. Molecular size distribution (%), averaged molecular weight (Mw), elemental composition (%), atomic ratios and UV/vis index of Whole HA and its UF fractions

Size fractions	Mass (wt, %)	M_w (kDa)	Elemental composition (%)[a]				Atomic ratios[b]			UV/vis index	
			C	H	O	N	H/C	O/C	w	SUVA (L/mgC)	$A_{4/6}$[c]
Whole HA	–	10.27	53.47	4.37	37.94	4.22	0.98	0.53	0.721	4.37	5.57
UF_1 (> 300 kDa)	33.3	16.95	56.19	4.77	34.54	4.49	1.02	0.46	0.665	3.50	4.67
UF_2 (100~300 kDa)	12.2	11.06	54.87	4.51	36.89	3.72	0.99	0.50	0.679	3.60	4.90
UF_3 (30~100 kDa)	26.3	6.65	54.62	4.21	37.65	3.52	0.93	0.52	0.683	4.17	5.23
UF_4 (10~30 kDa)	17.6	4.54	54.34	3.95	37.56	4.15	0.87	0.52	0.715	4.44	6.34
UF_5 (1~10 kDa)	10.6	3.31	53.90	3.68	38.44	3.98	0.82	0.53	0.725	4.63	8.66

[a]Normalized to 100% of organic compounds. [b]degree of internal oxidation ($w = (2O + 3N - H) / C$).
[c]absorbance ratio at 465 nm and 665 nm

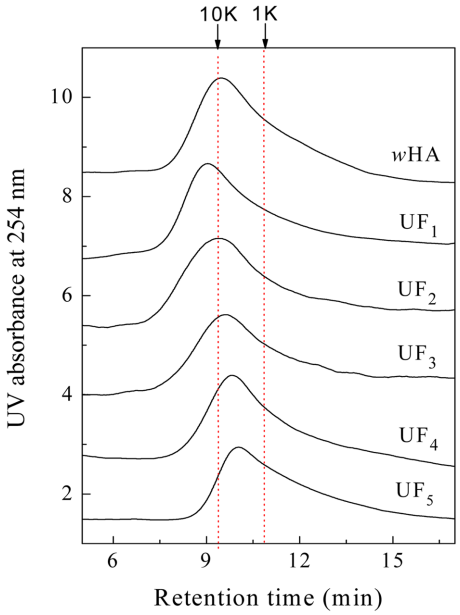

Fig. 1. SEC spectra of the five UF fractions and *W*HA.

을 통해 MWCO > 30 kDa이 60~75% 범위에 해당함을 보고한 바 있으며, Christ et al.(2000)은 휴믹화도가 높은 토양(Humic Gleysol) 표층에서 얻은 HA에서 MWCO > 300 kDa와 30~100 kDa 부분이 각각 52%와 34%로 주요 분포 영역임을 보고한 바 있다. 이러한 토양 HA의 분자량분포 특성은 일반적으로 수질기원 HA에서 < 10 kDa의 저분자가 70~97%로서 대부분을 차지함을 고려할 때, 토양 HA가 수질기원 HA에 비교해 매우 높은 분자량 크기를 가짐을 보여준다(Thurman et al., 1982).

한외여과법으로 분리한 각 분자량 크기별 HA의 보다 정확한 분자량을 측정하기 위하여 각 HA 시료의 크기배제크로마토그래피(SEC) 분석을 실시하였다. Fig. 1은 한외여과 분리 전의 *Whole* HA(*W*HA) 시료와 각 분자량 크기별 HA($UF_{1\text{-}5}$)의 크로마토그램을 나타낸 것이며, Table 1은 크로마토그램에서의 머무름 시간(R_t)를 식 (1)-(2)에 적용하여 얻은 각 HA 시료의 겉보기 중량평균 분자량(M_w, kDa)을 타나낸 것이다. 분석결과 *Whole* HA의 M_w는 10.27이었으며, 각 분자량 크기별 HA의 M_w는 3.31(UF_5)~16.95(UF_1)의 범위에서 한외여과막의 분획분자량(MWCO)이 증가할수록 일정하게 증가하였다. 본 연구에서의 각 분자량 크기별 HA의 M_w 값은 Li et al.(2004)이 유사한 한외여과 실험조건에서 분리한 이탄(*peat*) 기원 HA의 M_w 값(kDa)인 1.18(1~3 kDa)~18.56(> 300 kDa)과 유사하였으며, Chung et al.(2004)이 보고한 국내 화산재 토양에서 얻은 펄빅산(FA)의 분자량 분포(M_w) 값인 0.2~8.9 kDa에 비교해서는 높은 분자량 크기를 보였다. 한편, SEC에 의해 측정된 M_w 값(kDa)이 한외여과방법에서의 MWCO 값(kDa)에 비교해 낮은 것은 기존 문헌결과와도 일치하는 것으로서, 분석방법의 차이에 기인한다. 즉, 실제 HA 분자는 한외여과법에서 MWCO의 기준으로 사용하는 표준물질(즉, 구형 단백질)과 달리 다전해질성으로 인해 UF 막에 쉽게 걸러지기 때문에 상대적으로 더 큰 겉보기 분자크기를 나타내기 때문으로 알려진다(Christ et al., 2000; Li et al., 2004).

3.2. 분자량 크기별 HA의 원소성분비 및 흡광특성 분석

Table 1은 *W*HA와 각 분자량 크기별 HA($UF_{1\text{-}5}$)의 원소분석 결과 및 UV-Vis 흡광분석 결과를 나타낸 것이다. 원소성분비와 흡광분석은 미량(< ~2 mg)의 시료로 신속한 분석이 가능하며, HA의 구조적 특성에 대한 유용한 정보를 제공한다. Table 1에서 볼 수 있듯이 $UF_{1\text{-}5}$의 C와 H의 함량(%)은 53.90~56.19 및 3.68~4.77의 범위에서, 분자량 크기가 증가할수록($UF_5 \rightarrow UF_1$) 증가한 반면, O의 함량(%)은 34.54~38.44의 범위에서 일정하게 감소하였다. 원소성분비에 대한 보다 정확한 정보를 얻기 위해 수소에 대한 탄소 비(H/C) 및 산소에 대한 탄소 비(O/C) 및 분자산화도(degree of internal oxidation, $w = (2O + 3N\text{-}H)/C$) 등을 조사하였다. 그 결과, HA의 분자량 크기가 증가할수록 H/C가 0.82에서 1.02로 일정하게 증가한 반면, O/C는 0.46에서 0.53로 일정하게 감소하였다. 또한, HA의 분자산화도(w) 값도 0.725(UF_5) → 0.665(UF_1)로 분자량이 증가하면서 일정하게 감소하였다. 분자산화도는 토양 휴믹산의 특성과 기원을 추적하는 지표로 활용되며, 호기성 조건에서의 분해과정을 거칠수록 w 값이 높아지는 경향이 있는 것으로 알려진다(Cieslewicz and gonet, 2004).

일반적으로 H/C비가 높을수록 $-CH_2$, $-CH_3$ 등을 포함하는 지방족(aliphatic) 알킬기의 성분이 더 높고, O/C비가 높을수록 산소-포함 작용기의 함량이 높은 것으로 알려진다(Leenheer et al., 1989). 따라서 이러한 결과는 고분자량의 HA 분자일수록 지방족성 탄화수소 성분을 높게 포함하며, 저 분자량의 HA 분자일수록 카르복실산(-COOH)과 phenolic-OH 등의 극성작용기 성분이 높음을 제시한다. 이는 기존 문헌에서의 결과와도 일치하는 것으로서, Li et al.(2004)은 탄소구조에 대한 보다 직접적인 정보를 제공하는 ^{13}C NMR을 분석을 통해 고분자량의 HA 분자일수록 높은 지방족 탄소(aliphatic carbons) 함량을 가짐을 밝혔으며, Shin et al.(1999)은 작용기 함량 분석(즉, pH 적정)을 통해 고분자량의 HA가 저분자 HA 보다 단

위 질량 당 카르복실기 함량(mmol/g)이 낮음을 밝혔다. 한편, 분자산화도(*w*)가 고분자량의 HA로 갈수록 증가한 것은 고분자 HA일수록 산소, 질소-포함 작용기의 함량이 낮아 분자가 보다 비극성을 띰을 의미하며, 소수성 유기물과의 흡착능이 높을 수 있음을 제시한다(Aiken et al., 1985; Lee et al., 2008).

UV/vis 흡광분석을 통하여 HA의 특성분석에 널리 이용되는 254 nm에서의 UV 흡광도 값(SUVA, L/cm · mg-C) 및 665 nm에 대한 465 nm에서의 흡광도 비($A_{4/6}$) 등을 도출하였고, 그 결과는 Table 1에 제시하였다. SUVA 값은 분자량 크기가 증가할수록 4.63(UF_5)에서 3.50(UF_1)로 일정하게 감소하였으며, $A_{4/6}$ 값도 8.66(UF_5)에서 4.67(UF_1)로 일정하게 감소하였다. 일반적으로 SUVA 값이 높을수록 자연유기물은 유기탄소 당 불포화탄소결합이 많으며, 높은 방향족 탄소함량을 가지는 것으로 알려지며, $A_{4/6}$ 값은 휴믹물질의 휴믹화 정도를 판단하는 지표(humification index)로서 분자량과 분자 구조의 밀집성(condensed)에는 반비례하고, 산도(acidity)에는 비례하는 것으로 알려진다(Weishaar et al., 2003). 따라서 이상의 결과는 저분자량의 HA 분자일수록 방향족성과 산도가 높은 반면, 고 분자량의 HA일수록 지방족성과 분자구조의 밀집성(condensed)이 높은 분자 구조 특성을 가짐을 의미한다. 이는 앞선 원소 분석(H/C, O/C, *w* 등) 및 기존 문헌에서의 결과와도 일치한다. 예로서, Li et al.(2004)은 분자량별로 분리한 이탄(peat) HA를 대상으로 한 pyrolysis-GC-MS 분석을 통해 저분자 HA는 리그닌 유래의 산소-포함 벤젠구조 pyrolysates 함량이 높은 반면, 고분자 HA는 지질 성분이 풍부한 생체고분자(biopolymer)에서 유래하는 다양한 지방족 pyrolysates 함량이 높음을 밝혔다. 이상의 결과로부터 토양 HA은 분자량 크기별로 분자구조와 극성도가 서로 다른 고분자 혼합물임을 알 수 있었으며, 이러한 분자량 크기별 HA의 분자구조 특성에 대한 정보는 환경 중 SOM과 오염물질(PAHs, 중금속 등)의 반응특성 해석 및 이들의 환경 중 거동과 영향 평가에 유용한 지표인자로 활용가능하다.

3.3. 분자량 크기별 HA과 PHE의 흡착상수(Koc) 비교

Fig. 2는 분자량 크기별 HA와 PHE의 흡착반응에 대한 형광소광결과를 보정과정을 거친 후 식 (3)에 적용하여 얻은 Stern-Volmer plot을 나타낸 것이다. 분석 결과, 모든 HA 시료에서 선형회귀식의 결정계수(r^2)는 0.994~0.999였으며, 기울기 값으로부터 얻은 각 HA의 PHE에 대한 유기탄소표준화분배계수(*K*oc)는 Table 2에 제시하였다.

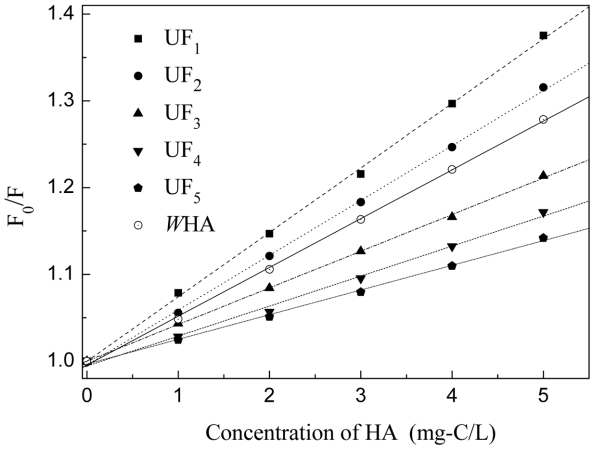

Fig. 2. Fitting results of Stern-volmer plots obtained for the binding of phenanthrene to the *Whole* HA and its UF fractions.

Table 2. Sorption fitting results of Whole HA and its UF fractions

Sample	Fitting results by *Stern-Vomler* plot		
	Koc (L · kg C^{-1})	log *Koc* (L · kg C^{-1})	r^2
*W*HA	56,234 ± 768	4.75	0.999
UF_1 (> 300 kDa)	74,308 ± 1,120	4.87	0.994
UF_2 (100~300 kDa)	58,393 ± 1,640	4.77	0.997
UF_3 (30~100 kDa)	42,218 ± 448	4.63	0.999
UF_4 (10~30 kDa)	34,572 ± 1,230	4.54	0.995
UF_5 (1~10 kDa)	28,410 ± 690	4.45	0.999

Whole HA의 *K*oc(L/kg C^{-1})는 56,234 ± 768로서, 기존 문헌에 보고된 토양 HA-PHE 흡착상수 값인 41,000~58,800(Laor and Rebhun, 1997) 및 Lee et al.(2008)이 보고한 국내산 토양 HA에서의 31,400~83,400와 유사한 범위에 있었다. 분자량 크기에 따른 *Koc*(L/kg C^{-1})는 표에서 볼 수 있듯이 UF_1(56,234 ± 768)에서 UF_5(28,410 ± 690)로 일정하게 감소하였다. 보다 명확한 비교를 위하여 SEC 분석을 통해 얻은 HA(즉, UFs)의 겉보기 분자량(M_w)과 log *Koc*와의 상관성을 조사한 결과, 상관계수는 (+)0.96 ($p < 0.011$)로서 높은 양(positive)의 상관성을 보였다(Fig. 3.). 이는 높은 분자량의 HA 분자가 저분자 HA에 비교해 PHE와 같은 소수성유기화합물에 대해 더 높은 흡착친화력을 가짐을 의미한다. 유사한 예로서, Chin et al.(1994) 및 Hur와 Schlautman(2004) 등은 토양 및 수질기원의 다양한 *Whole* HA와 FA를 대상으로 겉보기 분자량(M_w)과 Pyrene 흡착상수(*Koc*)와의 상관성 분석을 통해 분자량이 증가할수록 Pyrene과의 흡착친화력이 증가함을 보고한 바 있다.

Table 3. Correlation coefficients between the log *K*oc values and structural parameters of the UF fractions

	Mw (kDa)	H/C	O/C	*w*	SUVA	$A_{4/6}$
R value	0.96	0.99	(–)0.89	(–)0.95	(–)0.99	(–)0.89
p value	0.010	< 0.001	0.040	0.013	< 0.001	0.043

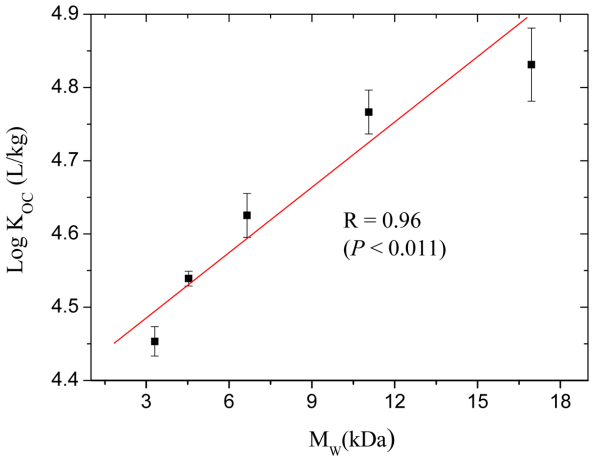

Fig. 3. A correlation between apparent molecular weight (kDa) and the log *Koc* values of the UF fractions.

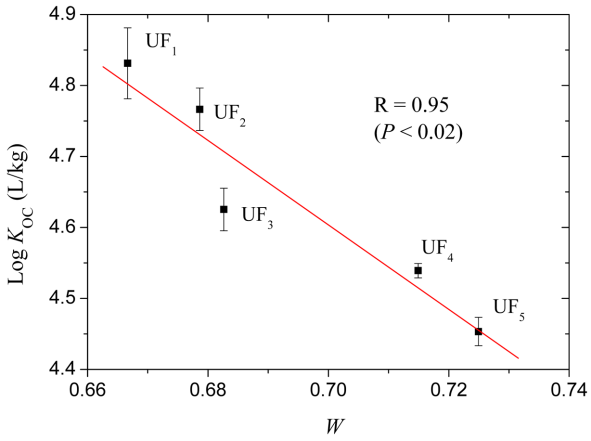

Fig. 4. A correlation between *w*(= (2O + 3N – H) / C) ratios and the log *Koc* values of the UF fractions.

3.4. 분자량 크기별 HA의 분자구조특성과 *Koc*와의 상관성 해석

Table 3은 앞서 얻은 결과를 토대로 분자량 크기별 토양 HA의 물질특성(원소성분비, UV-vis 흡광도 등)과 PHE 흡착상수(log *Koc*)와의 상관관계를 분석하여 정리한 것이다. 원소성분비(H/C, O/C, *w*)와 흡착상수와의 상관성 해석결과, PHE 흡착상수는 H/C와는 높은 양(+)의 상관성을 보인반면, O/C 및 분자산화도(*w*)와는 각각 상관계수(*r*) (–)0.89(p = 0.04)와 (–)0.95(p = 0.013)로서 음(–)의 상관성을 보였다(Fig. 4). O/C와 *w* 값의 증가는 분자 내 산소, 질소-포함 작용기의 함량이 높아 HA 분자가 보다 극성을 띰을 의미함(Cieslewicz, 2004)을 고려할 때, 이러한 결과는 분자량 크기별 HA 분자의 극성이 낮아질수록 PHE에 대한 흡착친화력이 높아짐을 제시한다. 이는 일반 토양 HA 시료(즉, *Whole* HA)를 대상으로 얻은 기존 문헌에서의 결과와도 일치한다. 예로서, Kang and Xing(2005)은 알칼리 연속추축을 통해 얻은 토양 HA를 대상으로 물질특성-PHE 흡착상수 상관성 해석연구를 통해 분자극성도가 높을수록 흡착 친화력이 감소함을 보고한 바 있으며, Chen et al.(2005)도 식물표피에서 추출한 자연유기물을 대상으로 한 분자극성도와 PHE 흡착상수와의 상관성 해석을 통해 동일한 결론을 도출한 바 있다. 따라서 토양 HA의 분자극성도가 분자량 크기의 차이에도 불구하고 HOCs의 흡착친화력 예측에 유용한 물질 특성인자(즉, molecular descriptors) 임을 알 수 있다. 한편, H/C는 log *Koc*와 상관계수(*r*) 0.996(p < 0.001)로서 H/C의 값이 클수록 log *Koc* 값이 감소하였다(Table 3). 이는 분자량별로 분리한 HA에서의 비교 시 방향족 대비 지방족 성분의 비율이 높은(즉, H/C 증가) 고분자 HA일수록 HOCs와의 흡착친화력이 증가함을 제시한다. 일반적으로 HOCs와의 흡착은 SOM의 생성기원과 구조적 특성에 따라 큰 차이를 보이며, 주요 흡착영역이 지방족 또는 방향족 성분인지에 대하여는 아직까지 통일화된 이론이 정립되어 있지 않은 상태임을 고려할 때(Chefetz and Xing, 2009; Lee et al., 2013), 본 연구결과는 분자극성도가 낮은 고분자 HA에서는 지방족 성분이 HOCs의 흡착에 보다 직접적인 영향을 미치는 인자임을 제시한다. 이러한 결과는 지방족 성분 함량이 높은 SOM인 케로겐(kerogen)과 휴믹산(Salloum et al., 2002) 및 식물기원의 유기물(cuticles) (Chen et al., 2005), 휴민(Lee et al., 2013) 등을 대상으로 보고된 HOCs와의 흡착특성 규명 관련 최근의 연구결과와도 일치한다.

이러한 경향성은 UV 흡광특성 인자 중 SUVA와 log *Koc* 상관성 분석 결과에서도 동일하게 관찰되었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 SUVA와 log *Koc*의 상관계수(*r*)는 (–) 0.992(p < 0.001)로서 고분자에서 저분자 HA로 갈수록 방향족 탄소 비율이 높아지면서(즉, SUVA 증가) PHE와의 흡착친화력이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 앞선

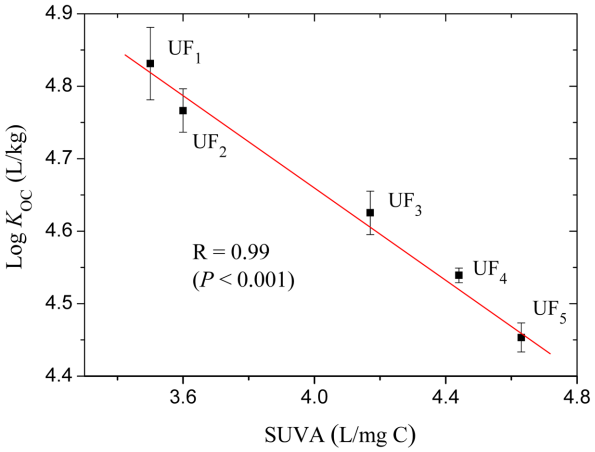

Fig. 5. A correlation between SUVA values and the log *K*oc values of the UF fractions.

H/C와 log *Koc*의 상관성 분석과 동일한 결과로서, 분자량 크기별로 분리하여 비교한 HA에서는 지방족과 비교시 방향족 성분 함량이 높은 저분자량의 HA일수록 PHE와의 흡착친화력이 낮음을 제시한다. 유사한 예로서, Khalaf et al.(2003)는 한외여과 분획 HA시료를 대상으로 ^{13}C-NMR 및 ^{19}F-NMR 분석을 통해 hexafluoro-benzene와의 흡착특성 규명연구에서 고분자 HA(0.2 μm~50 kDa)의 주요 흡착영역(sorption domain)은 HOCs와의 강한 흡착능을 가진 “rigid, condensed type”의 지방족 탄소영역에 해당함을 밝혔으며, 저분자 HA(0.5~50 kda)에서의 상대적으로 낮은 HOCs 흡착능은 대부분의 방향족 탄소가 극성 작용기로 치환된 형태를 가지기 때문임을 제시하였다. 한편, $A_{4/6}$ 분석결과와 PHE에 대한 log *Koc* 상관성 분석 결과, 상관계수(*r*)는 (–)0.894로 음의 상관관계를 보였다(Table 3). $A_{4/6}$가 휴믹물질의 분자량과 분자 구조의 밀집성(condensed)에는 반비례하고, 산도(acidity)에는 비례하는 인자임을 고려할 때, 본 결과는 산도가 낮은 고분자량의 HA일수록 높은 휴믹화도 특성을 가지며 HOCs와의 흡착친화력이 증가하는 경향이 있음을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 한외여과법을 이용 분획한 분자량 크기별 토양 휴믹산(HA)의 겉보기평균분자량, 원소성분비, UV/vis 흡광특성을 규명하였고, 분자량 크기별 HA와 페난트렌(PHE) 유기탄소표준화 분배계수(*Koc*)와의 상관성 해석을 통하여 소수성유기화합물과의 흡착반응에 영향을 미치는 HA의 분자량 크기별 주요 물질 특성인자를 도출하였다. 토양 HA는 분자량 크기에 따라 서로 다른 화학적 조성과 구조적 특성 및 PHE과의 흡착특성을 지닌 고분자 유기물 혼합체로서, 분자량이 높은 HA분자일수록 방향족(aromatic) 대비 지방족(aliphatic) 성분의 비율이 높고(즉, H/C), 단위 탄소 당 UV 흡광도는(SUVA)가 낮으며, 분자극성도(O/C, *w*)가 더 낮은 특징을 보였다. PHE 유기탄소표준화분배계수(*Koc*)는 고분자량의 HA에서 더 높았다.

HA의 물질특성과 *Koc*와의 상관성 해석결과로부터 분자극성도(O/C, *w*)가 분자량 크기에 관계없이 소수성유기화합물의 흡착친화력 예측에 유용한 물질 특성인자(즉, molecular descriptors) 임을 확인하였다. 또한, 분자량 크기별로 분획한 HA를 대상으로 도출한 H/C, SUVA 등과 log *Koc*와의 상관성 해석결과로부터 방향족 대비 지방족 성분의 비율이 높은 고분자량의 HA에서는 분자 내 지방족 성분이 HOCs의 흡착에 주로 기여함을 알 수 있었다.

일반적으로 소수성유기화합물과의 흡착은 토양유기물의 생성기원과 구조적 특성에 따라 큰 차이를 보이며, 주요 흡착영역(지방족 또는 방향족 성분)에 대한 통일화된 이론이 정립되어 있지 않은 상태임을 고려할 때, 본 연구결과는 분자량 크기별 HA에서는 지방족 성분이 소수성 유기화합물의 흡착에 중요 흡착영역임을 제시했다는 점에서 의미가 있다. 또한, 본 연구를 통해 확보된 분자량 크기별 HA의 물질특성 규명 자료와 상관성 해석 자료는 소수성 유기오염물질의 토양 및 지하수 내에서의 흡착과 분포에 토양유기물이 미치는 영향과 거동 특성 평가에 유용한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원(2015)으로 수행되었음.

References

Aiken, G.R., Mcknight, D.M., Wershaw, R.L., and MacCharthy, P., 1985, An Introduction to Humic Substances in Soil, Sediment, and Water, In *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation, and Characterization* (G. R. Aiken, D. M., MaKnight and R. L. Wershaw, eds.), John Wiley and Sons, USA.

Cha, H.J., Park, D., Park, H., Kang, M.J., Lee, W., Choi, G.S., Cho, Y.H., Chung, K.H., Lee, H.P., Shin, H.S., and Lee, C.W., 2004, Vertical distribution of 137Cs and 90Sr activities in the soils of Korea, *J. Korea Asso. Radiat. Prot.*, **29**(3), 197-204.

Chefetz, B. and Xing, B., 2009, Relative role of aliphatic and

aromatic moieties as sorption domain for organic compounds: A review, *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 1680-1688.

Chen, W.B., Johson, B.J., Chefetz, B., Zhu, L., and Xing, B., 2005, Sorption of polar and nonpolar aromatic organic contaminants by plant cuticular materials: Role of polarity and accessibility, *Environ. Sci. Technol.*, **39**(16), 6138-6146.

Chen, W.B., Smith D.S., and Gueguen, D., 2013, Infleunce of water cheistry and dissolved organic matter (DOM) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching, *Chemosphere*, **92**(4), 351-359.

Chin, Y., Aiken, G., and O'Loughlin, E., 1994, Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1853-1858.

Chiou, C.T., 2002, Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems, Jhon Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Christ, L., Knicker, H., Kogel-Knabner, I., and Kretzschmar, R., 2000, Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow-fiber ultrafiltration, *European J. Soil Sci.,* **51**, 617-625.

Chung, K.H., Shin, H.S., Lee, W., Cho, Y.H., Choi, G.S., and Lee, C.W., 2004, Molecular size fractionation of soil fulvic acid by gel filtration chromatography and analysis of their fluorescence characteristics, *Anal. Sci. Technol.*, **17**(2), 163-172.

Cieslewicz, I. and Gonet, S.S., 2004, Properties of humic acids as biomakers of lake sediment management, *Aquatic Science*, **66**, 178-184.

Conte, P. and Piccolo, A., 1999, Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules, *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1682-1690.

Edwards, N., 1983, Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial - A review, *J. Environ. Qual*., **12**, 427-441.

Hur, J. and Schlautman, M., 2004, Influence of humic substance adsorptive fractionation on pyrene partitioning to dissolved and mineral-Associated humic Substances, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5871-5877.

IHSS, 2015, International Humic Substance Society Home Page, http://www.ihss.gate.edu/.

Kang, S. and Xing, B., 2005, Phenanthrene sorption to sequentially extracted soil humic acids and humins, *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 134-140.

Khalaf, M., Kohl, S.D., Klumpp, E., Rice, J.A., and Tombcz, E., 2003, Comparison of sorption domains in molecular weight fractions of a soil Humic acid using solid-state ^{19}F NMR., *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2855-2860.

Laor, Y. and Rebhun, M., 1997, Complexation-flocculation: A new method to determine binding coefficients of organic contaminants to dissolved humic substances, *Environ. Sci. Technol*., **31**, 3558-3564.

Lee, B.M., Seo, Y.S. and Hur, J., 2015, Investigation of adsorptive fractionation of humic acid on graphene oxide using fluorescence EEM-PARAFAC, *Wat. Res*., **73**, 242-251.

Lee, C.H., Shin, H.S., Chung, K.H., Cho, Y.H. and Lee, C.W., 2003, Isolation and Characterization of Humic Acids Present in Soils at the Vicinity of Domestic Atomic Power Plants (NPPs), *J. Korean Asso. Radiat. Prot.,* **28**(3), 165-172.

Lee, C.H., Shin, H.S., and Kang, K.H., 2004, Chemical and spectroscopic characterization of peat moss and its different humic fractions (Humin, Humic Acid and Fulvic Acid), *J. Soil Groundwater Environ*., **9**(4), 42-51.

Lee, D.H., Eom, W.S., and Shin, H.S., 2013, A study of the correlations between molecular structures of soil humins and sorption properties of phenanthrene, *J. Kor. SOc. Environ. Eng.*, **35**(12), 897-905.

Lee, D.H., Lee, S.S., and Shin, H.S., 2008, Chemical and spectroscopic chanracterization of soil humic and fulvic acids and sorption coefficient of phenanthrene: A correlation study, *J. Kor. SOc. Environ. Eng.*, **30**, 1067-1074.

Leenheer, J., Mcknight, D., Thurman, E., and MacCarthy, P., 1989, Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties, and Proposed Structure, US Geology Survey, Open-File Report 85-557, Denver, Colorado.

Li, L., Zhao, Z., Huang, W., Peng, P., Sheng, G., and Fu, J., 2004, Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration, *Org. Geochem.,* **35**, 1205-1037.

Pan, B., Xing, B.S., Liu, W.X., Xing, G.H., and Tao, S., 2007, Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: limitations of Stern-Volmer plot, *Chemosphere* **69**, 1555-1562.

Peuravuori, J., 2001, Partition coefficients of pyrene to lake aquatic humic matter determined by fluorescence quenching and solubility enhancement, *Analytica Chimica Acta*, **429**, 65-73.

Rao, L. and Choppin, G.R., 1994, Effect of natural organic materials on cadium and neptunium, *Radiochim Acta.*, **69**, 87-95.

Salloum, M.J., Chefetz, B., and Hatcher, P.G., 2002, Phenanthrene sorption by aliphatic-rich organic matter, *Environ. Sci. Technol,* **36**, 1953-1958.

Shin, H.S., Lee, C.H., Chung, K.H., and Lee, C.W, 2003, Characterization of humic and fulvic acid extracted fro soils in different depth: Proton exchange capacity, elemental composition and 13C NMR spectrum, *Anal. Sci. Tech*,, **16**(4), 283-291.

Shin, H.S., Monsallier, J., and Choppin, G., 1999, Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid, *Talanta,* **50**, 641-647.

Sun, K., Jin, J., Kang, M., Zhang, Z., Pan, Z., Wang, Z., Wu, F., and Xing, B., 2013, Isolation and characterization of different organic matter fractions from a same soil source and their phenanthrene sorption, *Environ, Sci. Technol.*, **47**, 5138-5145.

Thurman, E.M., Wershaw, R.L., Malcolm, P.L., and Pinckney, D.J., 1982, Molecular size of aquatic humic substances, *Org. Geochem*., **4**, 27-35.

Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., and Richard, C., 2014, Hydrophobicity of electrophretic fractions of different soil humic acids, *J. Soil Sed*., **14**, 292-297.

Weishaar, J., Aiken, G., Bergamaschi, B., Fram, M., Fujii, R., and Mopper, K., 2003, Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 4702-4708.

Zhou, Q., Cabaniss, S., and Maurice, P., 2000, Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances, *Water Research,* **34**, 3505-3514.