

기술자료

액체크로마토그래피-탠덤질량분석법에 의한 하천수 및 정수 중 남조류 기원 신종 독소 BMAA(β -N-Methylamino-L-Alanine)의 정량분석

최재원[†] · 장제헌 · 김애경 · 이선홍

한국수자원공사 수질안전처

Determination of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) Levels in Surface Water and Treated Water by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Jae-Won Choi[†], Jae-Heon Jang, Ae-Kyung Kim, and Sun-Hong Lee

Department of Water Quality Safety and Research, K-water, Shintanjinro 200 Daeduck, Daejeon, 34350, Korea

Received November 26, 2021 / Revised January 4, 2022 / Accepted January 4, 2022

β -Methylamino-L-alanine (BMAA) is an emerging algal toxin that has drawn attention because it can cause neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease and Alzheimer's disease (AD). Therefore, it is necessary to develop a sensitive analytical method for BMAA, an emerging cyanobacterial toxin, to determine whether a trace amount is detected in the water resources and treated water. In this study, we developed a simple and sensitive analytical method for BMAA using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with direct injection. The method was validated for linearity of calibration, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, and precision. The limits of detection and quantitation were in the range of 0.030 μ /L and 0.096 μ /L, respectively. The optimized method was used to measure the concentrations of BMAA in surface water from each weir point of the Geum River, Nakdong River. Sampling and analysis of drinking water treatment plants of the Geum River, Nakdong River were applied to samples for each process.

Key words: Cyanobacterial toxins, BMAA, LC-MS/MS, Direct injection, Surface water, Drinking water

1. 서 론

2013년부터 환경부는 남조류 등에서 발생 가능성 있는 간 독소물질인 마이크로시스틴 LR을 먹는물 감시항목으로 지정하며, WHO 수준의 권고기준(1 μ g/L이하)으로 설정한 이후, 관련 연구과제 및 K-water는 LR외에도 물 환경에서 주로 검출되는 마이크로시스틴류인 RR 및 YR을 포함한 노듈라린, 아나톡신 등 다양한 조류 독소에 대해 자체적인 분석법 확립과 모니터링을 통한 조류 독소의 수질관리를 확대 실시중이다. 최근에도 조류 독소는 기후변화로 인한 이상 고온, 집중 강우 등과 수계의 복잡한 물관리 여건 속에서 언론보도를 통해 신종 독소에

대한 지속적인 관심이 요구되고 있다.^{1,2)}

신종 독소 중 기존에 알려진 anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin 등의 신경독소 외에 β -N-methylamino-L-alanine (BMAA, Fig. 1)는 비단백질성 아미노산으로서, 루게릭 병(ALS), 파킨슨증, 알츠하이머병(AD), 근위축성 측색 경화증/파킨슨증-치매 복합체(ALS/PDC)를 포함한 4종의 신경퇴행성 질환에 대한 인과관계가 제기된 물질로 주목을 받았으며, 소철 등의 식물외에 *Nostoc*, *Microcystis*, *Anabena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* 등의 해양 및 육상 남조류에서 생성되는 신경독성물질로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 한편, BMAA의 영향 정도는 10 μ M 이하의 낮은 양에서 잠재적인 신경 손상 보고 사례도 있으나, 체내(*in vivo*)

[†]To whom correspondence should be addressed.

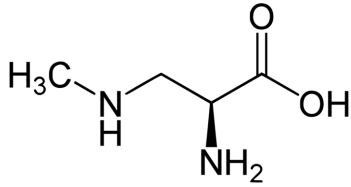


Fig. 1. Chemical structure of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA).

및 체외(*in vitro*) 실험에서 보고된 데이터는 BMAA의 낮은 독성 잠재성을 시사하여 여전히 논란이 상존하며, 현재는 독성 데이터가 불충분하여 반수치사량 (LD_{50}) 또는 무영향관찰농도(NOAE) 값이 제시되지 않아, 음용수 가이드라인 도출 사례가 없다.⁶⁾ 물환경에서 BMAA가 생성되어 인체에 영향을 줄 수 있는 경로는 남조류가 번성한 환경에서 BMAA가 생성된 후, 식물 또는 어패류 등과 접촉 및 인간의 섭취를 통하거나, 친수 활동 시 피부 접촉과 수영 등에서 일시적 소량 섭취 등이 있으며 이를 통해 직접적인 독성을 일으키는 주요 메커니즘으로 예상된다.⁷⁾

BMAA는 결사슬에 메틸아미노기가 있는 아미노산 알라닌의 유도체로서 극성 염기로 분류되고 원소 조성 및 분자량은 각각 $C_4H_{10}N_2O_2$ 및 118.136 g/mol이며, 분배계수 $\log P(\text{Octanol-Water})$ 는 -0.1, 산해리상수 pK_a 는 1.883이다.⁸⁾ 이러한 물질 특성을 고려하면 BMAA는 물에서 자유분자(free molecule)로 존재하거나 용존성/침전성 결합(soluble/precipitated bound) 형태로 존재할 수 있다.⁹⁾ 즉, 마이크로시스턴 분석에서 가장 보편적으로 사용되는 역상(reversed phase) LC방법과 대별되는 흡착-분리 기작이 요구된다. 즉, RPLC를 기반으로 한 LC-MS방법으로 BMAA 분석은 머무름(retention) 및 감도가 저하될 가능성이 높고, 기존 연구사례에서도 이러한 방법을 적용한 경우, BMAA의 수질 데이터는 높은 검출한계, 부정확한 전처리 및 LC-MS 등의 기술적 제약으로 인해 객관적 판단에 대한 논란이 상존하였다.¹⁰⁾ 이러한 대상물질의 특성을 고려하여 normal phase(순상) 기반의 컬럼에 역상의 이동상을 적용하는 개념인 HILIC은 역상 크로마토그래피의 변형된 형태로서 극성 고정상(polar stationary phase)을 기반으로 제조되며, 친수성 화합물의 유지를 가능하게 한다. 최근 BMAA 분석은 HILIC을 기반으로 한 LC-MS 응용 사례가 다수 보고되고 있다.^{4,5,10-15)}

본 연구에서는 BMAA를 HILIC 컬럼 기반의 직접 주입법(direct injection)을 적용한 LC-MS/MS 정량방법을 확립하였으며, 2021년 8월 및 10월에 금강 및 낙동강

수계 보구간 하천수와 관련 유역의 정수장에 대해 농도를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 표준물질 및 시약

BMAA 및 중수소치환체 (BMAA-d₃) 표준물질은 Enzo Life Sciences(NY, USA)에서 구입하였으며, formic acid 및 아세트니트릴은 각각 Sigma-Aldrich(MO, USA), Merck(Darmstadt, Germany), 정제수는 Thermo Fisher Scientific(MA, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였다.

2.2. 기기분석

LC-MS/MS 시스템으로는 UHPLC 1290 Infinity II 및 6495C QQQ tandem mass spectrometer(Agilent, CA, USA)를 이용하였으며, 분석 column은 Poroshell 120 HILIC-Z (3.0 × 150 mm, 2.7 μ m; Agilent, CA, USA)를 사용하였다. Electrospray ionization (ESI)법의 positive mode(+ESI)로 이온화하였으며, multiple reaction monitoring (MRM) mode에서 BMAA 및 BMAA-d₃를 동시분석하였다. LC-MS/MS 분석조건 및 MRM 조건을 Table 1, 2에 요약하였다.

Table 1. Liquid chromatograph (1290 Infinity II model) conditions used for BMAA analysis

Parameter	Conditions or value
Injection volume(μ L)	5
Flow rate(mL/min)	0.25
Mobile phase	A: 0.1% FA water B: 0.1% FA acetonitrile
Run time(min)	7
Column	Poroshell 120 HILIC-Z, 3.0×150 mm, 2.7 μ m
Column Temp.(°C)	40

Table 2. Mass spectrometer (6495C QQQ model) conditions used for BMAA analysis

Parameter	Conditions or value
BMAA	119.1 → 76.1, 44.1
BMAA-d ₃	122 → 76.1, 47.1
Gas Temp.(°C)	225
Gas Flow(L/min)	11
Nebulizer(psi)	50
Sheath Gas Temp.(°C)	380
Sheath Gas Flow(mL/min)	11
Capillary(V)	3000

2.3. 시료 채수 및 전처리

금강 및 낙동강 수계 보구간 하천수와 관련 유역의 정수장(청주, 구미, 고령, 반송)의 원수 및 정수에 대해 2021년 8월 및 10월에 시료를 채취하였다. 시료채취는 개정된 조류경보제 방법¹⁶⁾에 따라 통합채수를 하였으며, 먹는물 수질감시항목 운영지침상의 시험법¹⁷⁾을 응용하여 하천수는 용존(dissolved, intercellular) 및 총독소(total)로 구분하여 전처리 및 기기 분석하였다. 채취한 시료는 실험실로 운반하여 유리섬유여과지(glass microfiber filter grade C, GF/C)로 여과하였으며, 여과액(용존 독소)은, 0.2 μ m GHP membrane 시린지 필터로 추가로 여과한 뒤 직접주입법으로 기기분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LC-MS 분석방법 확립

본 연구에서는 BMAA 및 BMAA-d3에 대해 HILIC 컬럼(Poroshell 120 HILIC-Z, 3.0 \times 150 mm, 2.7 μ m)을 적용하여, 대상물질의 머무름, 감도 저하 등 기존 RPLC-MS 방법의 한계를 개선하고자 하였다. 이동상은 0.1% FA water 및 0.1% FA acetonitrile을 조합하여 최적화 시험을 통해 각각 30%, 70% 비율로 isocratic 조건에서 운영하였으며, LC-MS의 세부 조건은 Table 1, Table 2에 제시하였다. 이 조건에서 BMAA 및 BMAA-d3의 머무름 시간은 약 3.6분 범위였으며 극성이 높은 물리화학적 특성에서 HILIC의 머무름이 관찰되었다(Fig. 2).

3.2. 분석방법의 유효성

본 연구는 3.1에서 확인한 직접주입법 및 HILIC 컬럼 기반의 LC-MS/MS 분석방법의 성능을 평가하기 위해 먹는물 및 수질오염 공정시험기준의 공통적인 정도보증/정도관리(QA/QC) 항목을 중심으로 검정곡선의 직선성(linearity)을 평가하고, 방법검출한계(limit of detection, LOD), 방법정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision)를 산출하였다.

정제수에 BMAA가 0.3~10.0 μ g/L 범위의 농도가 되도록 표준물질을 첨가한 8개의 농도 구간 시료를 분석하여 검정곡선을 작성하였으며, r^2 값이 0.9985 이상의 직선성을 얻었다(Fig. 3). 정제수에 검정곡선의 최소 농도인 0.3 μ g/L 시료를 7개 분석하여 얻은 값의 표준편차에 3.14(7회 반복분석에 대한 99% 신뢰구간에서의 t 값)를 곱한 값을 LOD로, 10을 곱한 값을 LOQ로 계산한 결과, LOD 및 LOQ는 각각 0.030, 0.096 μ g/L이었다(Table 3). 참고로 마이크로시스틴 LR의 정량한계는 먹는물 감시항목 권고기준인 1.0 μ g/L의 1/10 수준인 0.1 μ g/L이며, 본 연구에서 산출된 BMAA의 정량한계도 유사한 LOQ 범위에서 측정 가능한 것으로 판단하였다. 정확도 및 정밀도는 4.0 μ g/L로 조제한 시료 4개를 측정하여 산출한 결과, 정확도는 98.6%, 정밀도는 1.3%로 확인되어, 확립한 방법의 QA/QC는 마이크로시스틴의 정도관리 범위와 유사하며 양호한 결과가 도출된 것으로 판단하였다. 확립한 BMAA 분석방법은 SPE¹⁷⁾등 별도의 시료 농축 절차 없이도 낮은 μ g/L의 감도가 제시되었으며, 분석시간 단

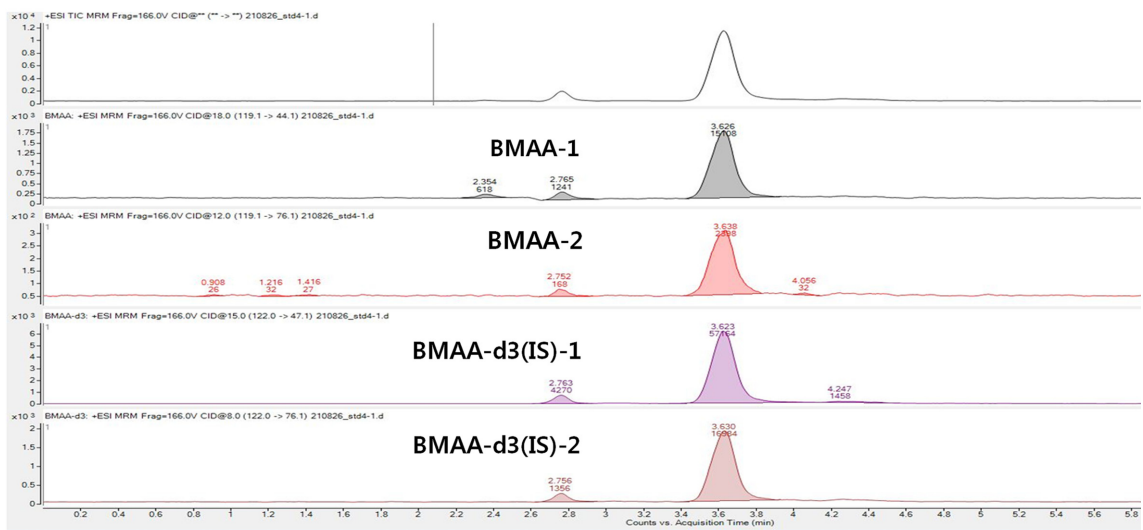


Fig. 2. MRM chromatograms of LC-MS/MS of BMAA and BMAA-d3 (as an internal standard) at a concentration of 1 μ g/L spiked in DI water.

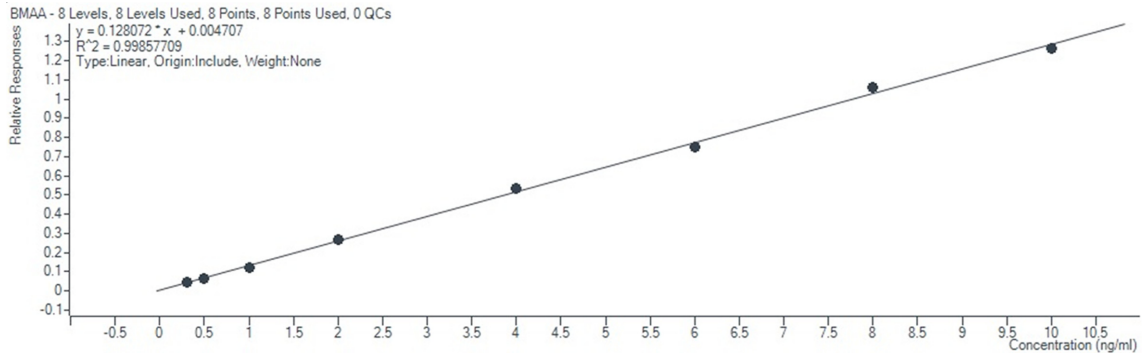


Fig. 3. Calibration curve with BMAA concentrations ranging from 0.3-10 ng/mL.

Table 3. Linearity in the calibration curves, LOD, LOQ, accuracy, and precision of BMAA analysis

Validation category	Parameter	Range, value
Linearity	Conc. range ($\mu\text{g/L}$)	0.3~10.0
	Calibration curve ($Y = aX + b$)	a: 0.128072, b: 0.004707
	Linearity coefficients	0.9985
LOD, LOQ	Spiked conc. ($\mu\text{g/L}$)	0.3
	No of sample	7
	LOD* ($\mu\text{g/L}$)	0.030
	LOQ** ($\mu\text{g/L}$)	0.096
Accuracy, Precision	Spiked conc. ($\mu\text{g/L}$)	4.0
	No of sample	4
	Accuracy (%)	98.6
	Precision (RSD, %)	1.3

*LOD: limit of detection ($SD \times 3.14$)

**LOQ: limit of quantitation ($SD \times 10$)

축 및 농축 카트리지가 및 용매저감 등의 실험실 생산성과 환경적, 경제적 효과도 기대된다.

3.3. 하천수 및 정수장 시료의 독소 분석

2021년 8월 및 10월에 채수한 낙동강 수계 보구간 하천수(칠곡보, 강정고령보, 달성보, 합천창녕보, 장녕함안보)와 금강 및 낙동강 유역의 정수장(청주, 구미, 고령, 반송)의 원수 및 정수에 본 연구에서 확립한 분석방법을 적용한 결과, 전시료에서 BMAA는 검출되지 않았다. HILIC-LC-MS/MS를 적용한 비교적 최근 국외 연구사례¹⁰⁾에서도 BMAA가 물환경에서 검출가능성에 제기되어 왔으나, 하천수 및 정수장에서 검출된 사례는 발견되지 않았다.

4. 결 론

기후변화 및 물환경 관리 여건 등에서 남조류 수화

(blooming) 빈도 증가 및 신종 조류 독소에 대한 우려가 제기됨에 따라 본 연구에서는 신경독소 BMAA의 신속, 고감도 분석방법을 확립하고 시료에 적용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 직접 주입법 및 HILIC 컬럼 기반의 LC-MS/MS 방법 최적화를 통해 BMAA의 적정 머무름이 확보되었고 7분 이내의 분석시간을 확인하였다.

2. 본 방법의 성능은 양호한 직선성($r^2=0.9985$), 정밀도, 정확도 및 $0.1 \mu\text{g/L}$ 이하의 정량한계가 얻어졌으며, 시료 농축 절차 없이도 낮은 LOQ를 확보하였고, 현장 수질관리에서 가장 중요한 분석 신속화 및 농축 카트리지가, 용매 등의 저감을 통해 실험실 생산성과 환경적, 경제적 효과성도 달성되었다.

3. 2021년 8월 및 10월에 채수한 하천 및 정수장(원수, 정수) 시료에서 BMAA는 검출되지 않았으며, 조사기간 동안 확보한 국내외 문헌에서도 하천수 및 정수장 시료의 BMAA 검출에 대한 보고는 확인되지 않았다.

감사의 글

분석방법의 시료 적용을 위한 대상 보 및 정수장의 시료 채취에 도움을 주신 한국수자원공사 금강유역본부 및 낙동강유역본부산하 보관리단 및 정수장에 감사드립니다.

참고문헌

1. <https://www.yna.co.kr/view/AKR20210824091900004>
2. <http://newstapa.org/article/wZH3t>
3. J. Hu, J. Liu, Y. Zhu, Z. Diaz-Perez, M. Sheridan, H. Royer, R. Leibensperger, D. Maizel, L. Brand, K. J. Popendo, C. J. Gaston, and R. G. Zhai, "Exposure to Aerosolized Algal Toxins in South Florida Increases Short-and Long-Term Health Risk in Drosophila Model of Aging," *Toxins*, **2020**, 12, 787.
4. J. Stanhope, J. Brody, and C. Morris, "Epidemiologic features of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in Guam, mariana islands," *Int. J. Epidemiol.*, **1972**, 1, 199-210.
5. J. F. Amanda, C. Neil, and T. A. Mark, "The analysis of underivatized β -Methylamino-L-alanine (BMAA), BMAA, AEG & 2,4-DAB in *Pteropus mariannus mariannus* specimens using HILIC-LC-MS/MS", *Toxicon*, **2018**, 152, 150-159.
6. European Commission, "Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection", JRC Technical Reports, **2017**, 8-15.
7. N. Chernoff, D. J. Hill, D. L. Diggs, B. D. Faison, B. M. Francis, J. R. Lang, M. M. Larue, T. T. Le, K. A. Loftin, J. N. Lugo, J. E. Schmid, and W. M. Winnik, "A critical review of the postulated role of the non-essential amino acid, β -N-methylamino-L-alanine, in neurodegenerative disease in humans", *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B Crit. Rev.*, **2017**, 20, 183-229.
8. <https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-Methylamino-L-alanine>
9. E. J. Faassen, M. G. Antoniou, W. Beekman-Lukassen, L. Blahova, E. Chernova, C. Christophoridis, A. C. C. Edwards, J. Fastner, J. Harmsen, A. Hiskia, L. L. Ilag, T. Kaloudis, S. Lopicic, M. Lüring, H. Mazur-Marzec, J. Meriluoto, C. Porojan, Y. Viner-Mozzini, and N. Zguna, "A collaborative evaluation of LC-MS/MS based methods for BMAA analysis: soluble bound BMAA found to be an important fraction", *Mar. Drugs*, **2016**, 14, 45.
10. E. J. Faassen, "Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know?" *Toxins (Basel)*, **2014**, 6, 1109-1138.
11. E. J. Faassen, F. Gillissen, and M. Lüring, "A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria", *PLoS One*, **2012**, 5, e36667.
12. B. Yan, Z. Liu, R. Huang, Y. Xu, D. Liu, T.F. Lin, and F. Cui, "Optimization of the determination method for dissolved cyanobacterial toxin BMAA in natural water", *Anal. Chem.*, **2017**, 89, 10991-10998.
13. A. J. Fossa, N. Chernoff, and M. T. Aubel, "The analysis of underivatized β -Methylamino-L-alanine (BMAA), BAMA, AEG and 2,4-DAB in *Pteropus mariannus mariannus* specimens using HILIC-LC-MS/MS", *Toxicon*, **2018**, 15, 150-159.
14. A. Combes, S. Abdellaoui, J. Vial, E. Lagrange, and V. Pichon, "Development of an analytical procedure for quantifying the underivatized neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in brain tissues", *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 4627-4636.
15. D. G. Beach, E. S. Kerrin, S. D. Giddings, M. A. Quilliam, and P. Pearce, "Differential mobility-mass spectrometry double spike isotope dilution study of release of β -methylaminoalanine and proteinogenic amino acids during biological sample hydrolysis", *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 117.
16. 환경부, "조류경보제 운영 매뉴얼", **2016**.
17. 환경부, "먹는물 수질감시항목 운영 등에 관한 고시", **2018**, 108-137.