

수계환경독성물질의 탐색 및 예방

김 용 화

한국화학연구원 환경독성연구팀

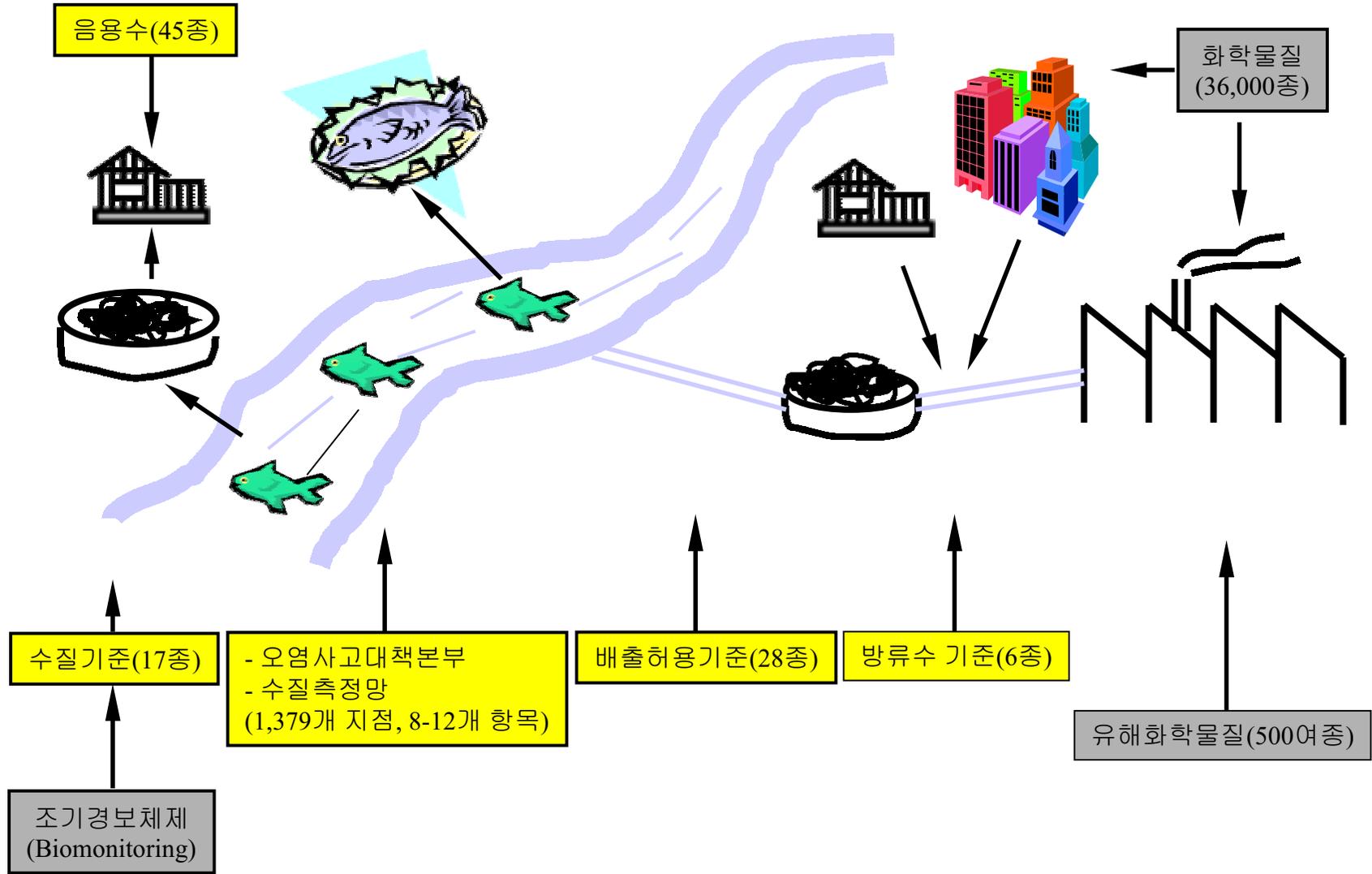
수질오염에 대한 근원적 질문들

행정부 : “페놀, 벤젠, THM 다음에는 어떤 화학물질이 수질오염을 일으킬 것인가?”

산업체 : “소비자나 정부가 어떤 물질을 규제하게 될까?”
“어떻게 대응하나?”

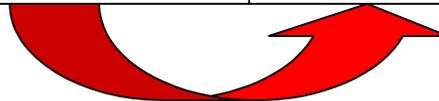
소비자 : “산업체나 정부가 유해 화학물질을 제대로 관리하고 있는가?”
“또 무슨 사고가 나지 않나?”

국내 수질오염물질 관리현황



법적·행정적 측면에서의 화학물질 관리

사전관리 (예방차원)	사후대응
<ul style="list-style-type: none"> □ 화학물질등록 사전심사 (년 200종) □ 화학물질 관리감독 (약 500종) <ul style="list-style-type: none"> -지도점검 -유해화학물질 사용실적보고 -유통실태조사 (36,000종) -유해물질 배출량조사 	<ul style="list-style-type: none"> □ 수질환경기준 (17종) □ 폐수배출허용기준 (28종) □ 방류수 수질기준 (6종) □ 중앙환경오염사고대책본부 □ 생물조기경보체제



Gap

Toxic potential of effluents based on the aquatic toxicity and Ames' test

Type of Industry	Source	Aquatic Toxicity ^{*1}			Ames ^{*2}
		<i>O. latipes</i>	<i>D. magna</i>	<i>S. capricornutum</i>	
Industrial Chemicals	(1)	+++	+++	+++	-
	(2)	+	+++	+++	-
	(3)	++	++	+++	-
	(4)	+	+++	+++	-
	(5)	-	+	-	-
	(6)	-	-	+	-
	(7)	+	+	+	-
	(8)	-	+	-	-
	(9)	+	+++	+++	-
	(10)	-	+	-	-
Detergent and Film	(11)	-	-	+	-
	(12)	-	-	-	-
Rubber and Plastic	(13)	-	+	++	-

***1 - 0 : Practically harmless, +1~5 : Slightly toxic, ++6~10 : Toxic, +++11~15 : Highly toxic**

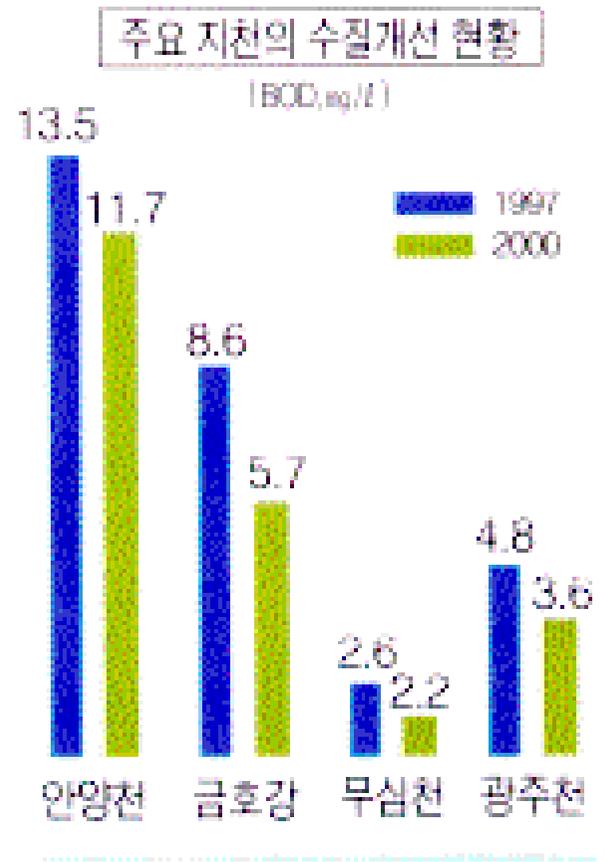
***2 - : negative, + : positive**

Type of Industry	Source	Aquatic Toxicity ^{*1}			Ames ^{*2}
		<i>O. latipes</i>	<i>D. magna</i>	<i>S. capricornutum</i>	
Non-Ferrous Metal	(14)	-	+++	+++	-
Petroleum Refinery	(15)	-	-	-	-
Leather Processing	(16)	++	+++	+++	-
	(17)	+++	+++	+++	-
Textile Mill	(18)	+	+	++	-
	(19)	-	+	+++	+
	(20)	+	+	+++	-
	(21)	+	+	+++	+
Paper and Pulp	(22)	-	-	+	-
	(23)	-	+	++	-
	(24)	-	-	+	-
	(25)	+	+++	+++	-
Public Wastewater	(26)	-	+	-	-
Treatment Plant	(27)	-	+	-	-
	(28)	-	+	-	-
	(29)	-	+	-	-
Total		12	23	20	2

***1 - 0 : Practically harmless, +1~5 : Slightly toxic, ++6~10 : Toxic, +++11~15 : Highly toxic**

***2 - : negative, + : positive**

주요지천의 수질개선현황

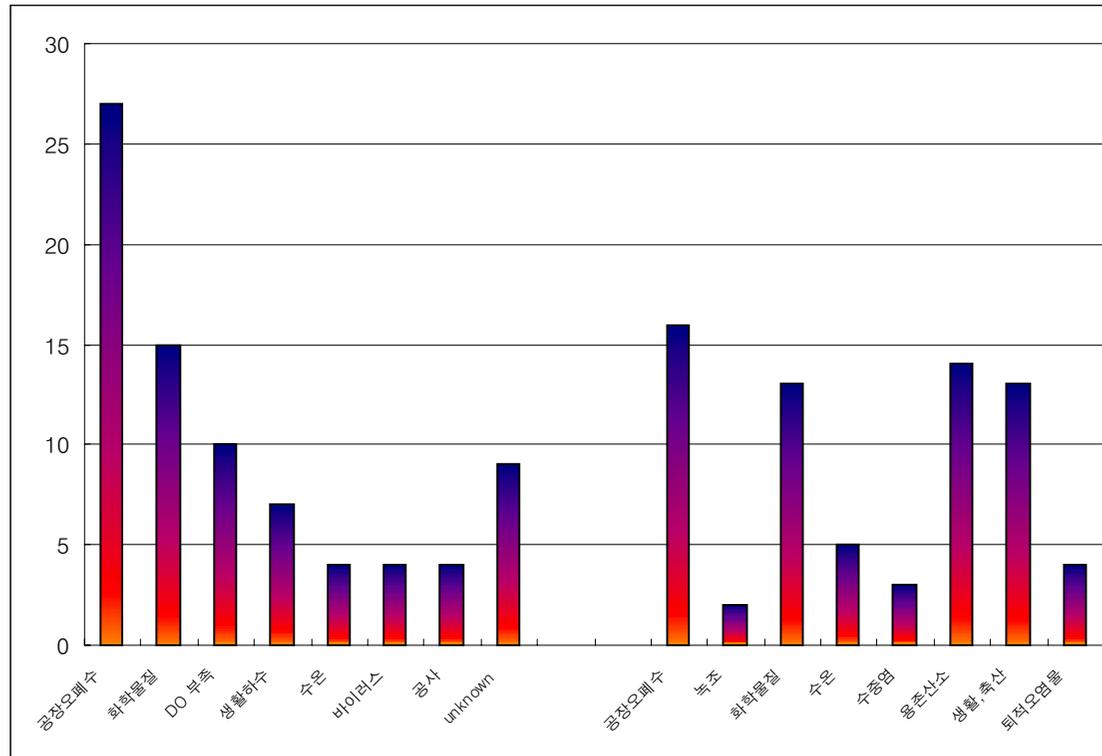


국내 하천 환경오염 사고

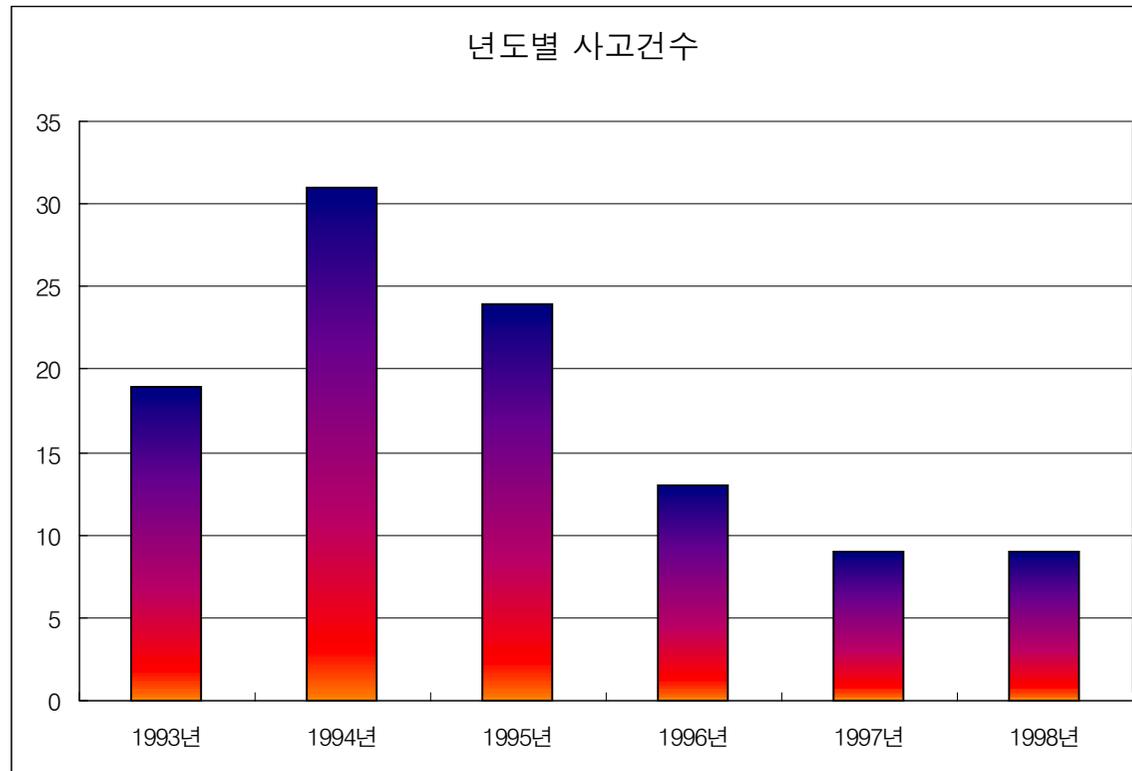
- 원인별 오염사고 건수

원인	건수	원인	건수	원인	건수
공장오폐수	34	축산폐수	6	수생균	3
화학물질	29	갈수기	4	수중염	3
용존산소	23	Unknown	4	악취	2
생활하수	11	공사	4	침출수	2
수온	10	퇴적오염물	3		

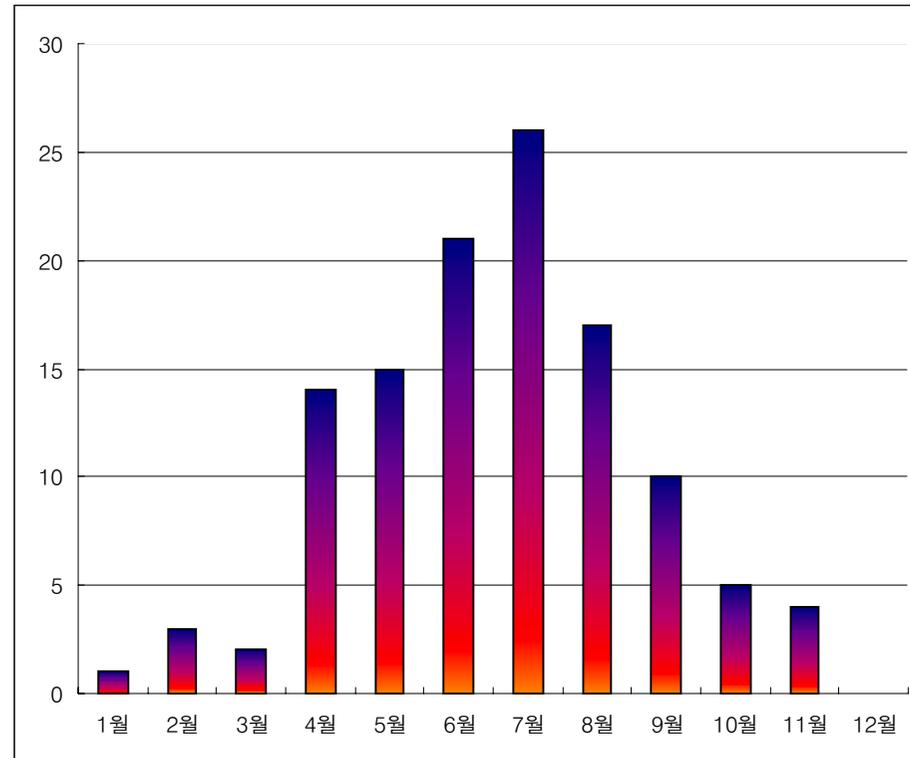
- 원인별 오염사고 건수



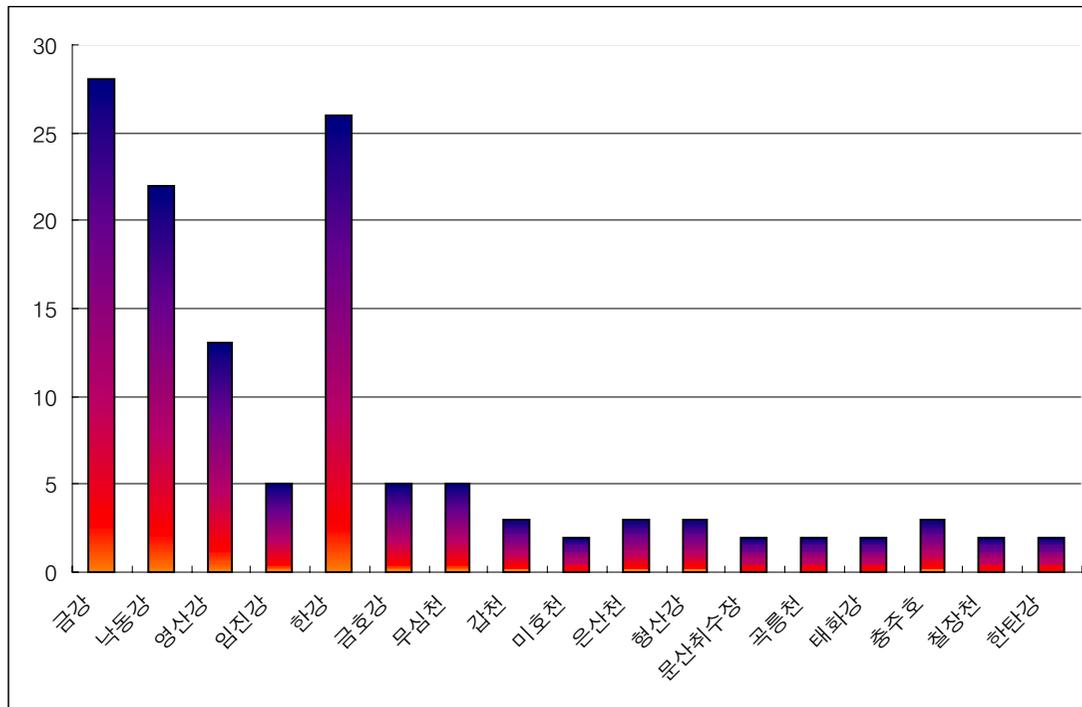
- 년도별 사고 건수



- 계절별 사고 건수



- 하천별 사고 건수



연구의 필요성

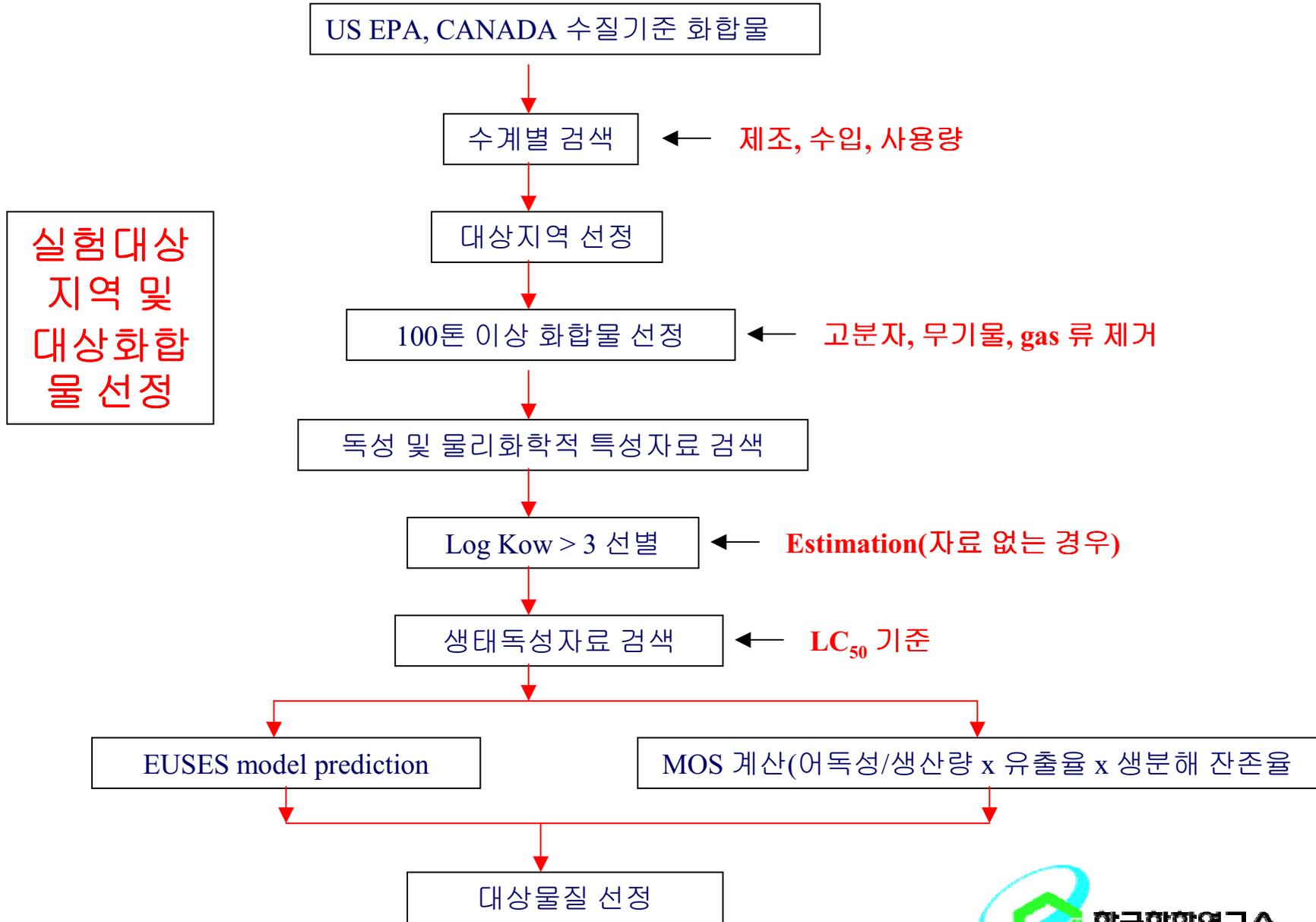
- 산업화에 따른 화학물질 사용 급증
 - 유독물 : 1986년 6백만톤 → 1996년 13백만톤
 - 화학물질수 : 1986년 10,000종 → 1996년 36,000종
- 수질오염사고 및 물고기 폐사사고의 빈발
- 생물농축성 화학물질 위해가능성 보고 및 사회문제화
- 정부의 화학물질 관리에 대한 불신 및 국민의 불안감 가중
 - 미국 : 200여종 관리
 - 한국 : 20여종 관리

예방차원의 화학물질관리와 사후대응의 간극을 좁히기 위한 연구동향

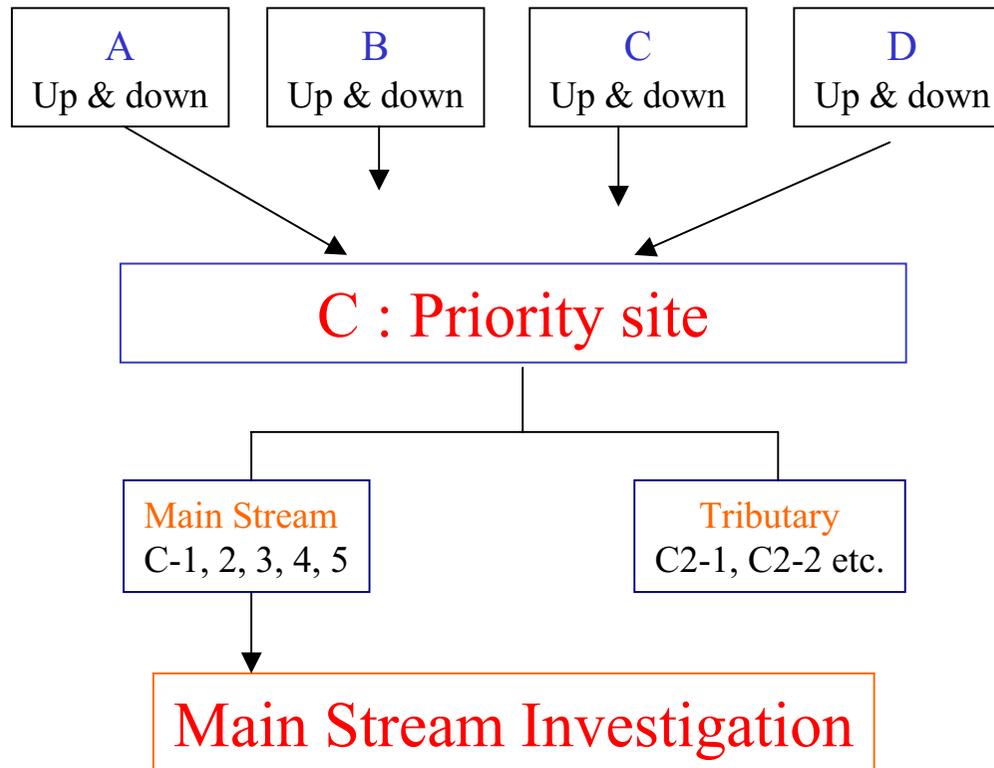
미국	일본	한국
<p><국가연구기관></p> <ul style="list-style-type: none"> - US EPA, USGS, Fish and Wildlife Service - 환경모니터링(EMAP) - 바이오모니터링(BEST) <p><학,연,연구기관></p> <ul style="list-style-type: none"> - 생태위해성 - 지표생물 	<p><국가연구기관></p> <ul style="list-style-type: none"> - 환경청 : 1979~1988 - 환경 안전성 총점검 조사(저농도-농축 가능 물질의환경잔류 분석) <p><학,연, 연구기관></p> <ul style="list-style-type: none"> - 지표생물 - 환경동태 	<p><국가연구기관></p> <p>1990년 이후</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사고대응체제 - 조기경보체제 - 사고원인분석 - 배출원 추적기법(화학적) <p><학,연, 연구기관></p> <ul style="list-style-type: none"> - 생태조사 - 환경잔류분석

연구목적

- 우선순위 선정기법에 의한 대상지역/화합물의 검색
- 생태계, 생물보호를 위한 위해성 예보체제 개발 :
 - 화학적 분석 기법과 독성시험기법의 적용
 - GC-FID profiling , GC/MS identification & Toxicity test
- 생태위해성 물질 확인



Selection of Sampling Sites



1st Preliminary study

2nd Preliminary study

1st ~ 4th Main study

Sampling, Preparation, and Analysis

- Sampling :

 - Term ; *ca* 1.5 month interval, May ~ Oct., 1999, 2000

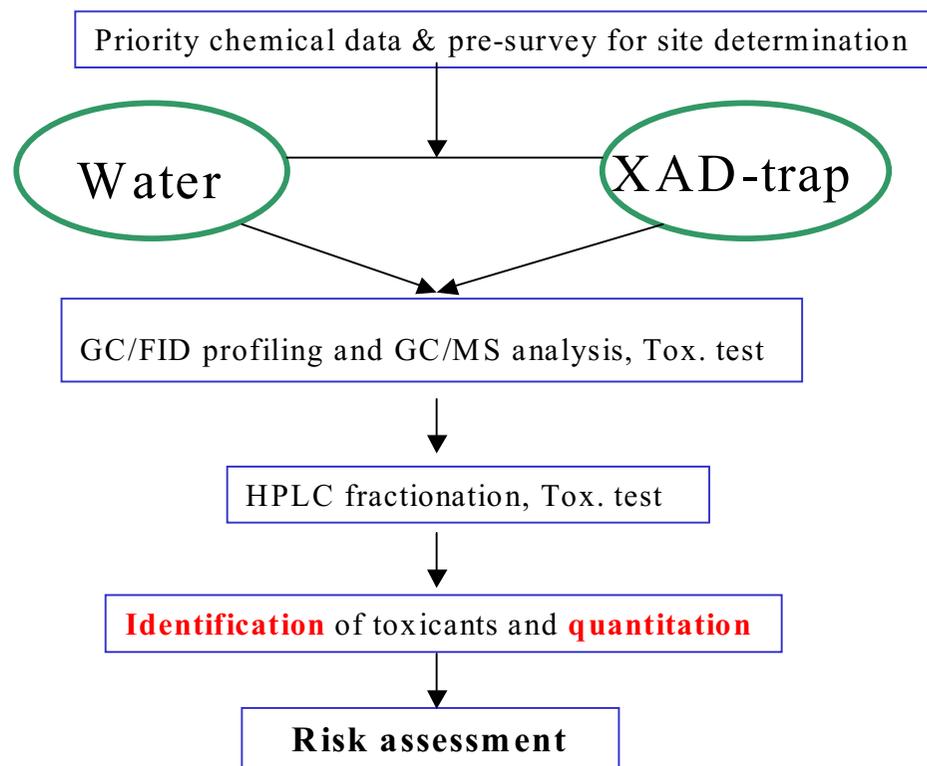
 - Water collection ; watershed, US EPA SW-846

- Preparation :

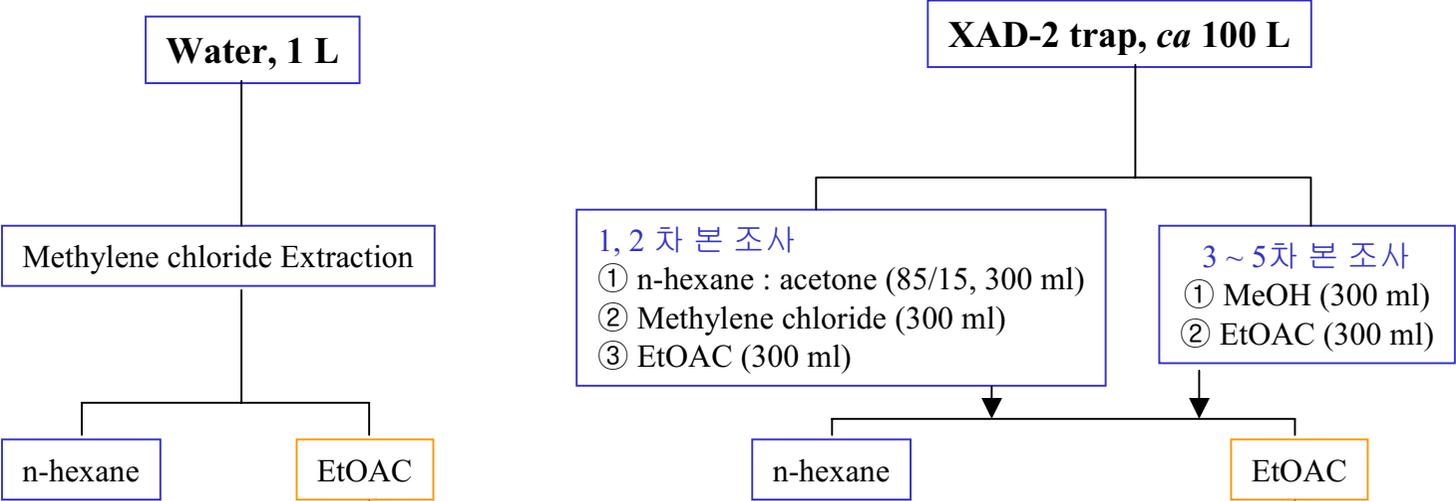
 - Filtration : GF/C filter (0.45 μ m), USGS

 - Extraction : Methylene chloride, US EPA 3500, 3510

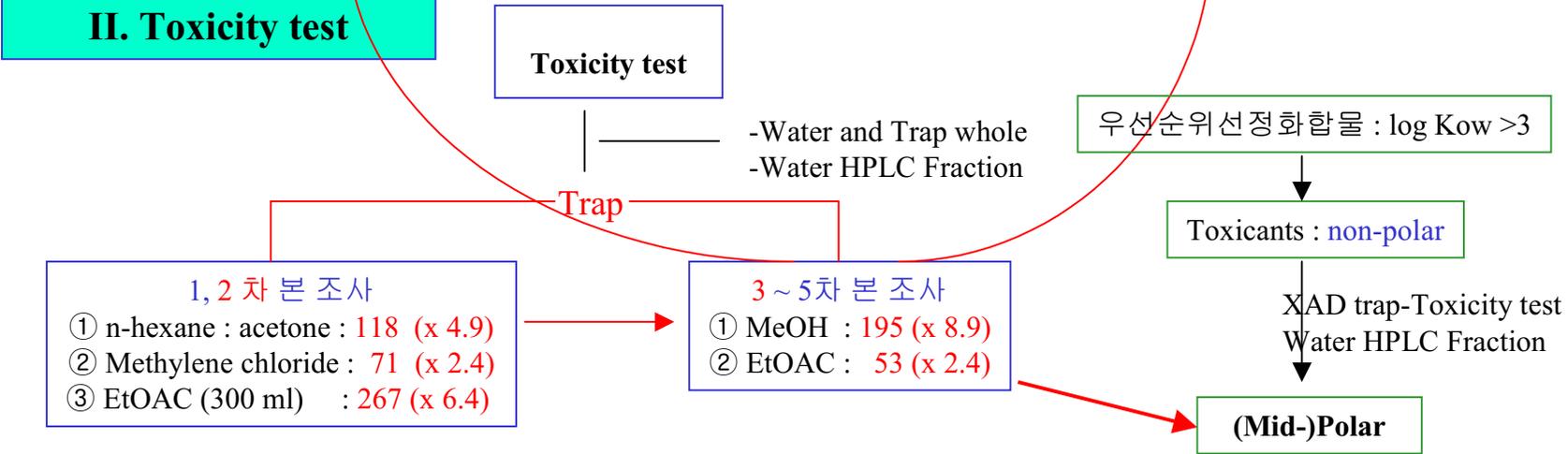
General Scheme



I. GC-FID profiling & MS identification



II. Toxicity test



Results and Discussion

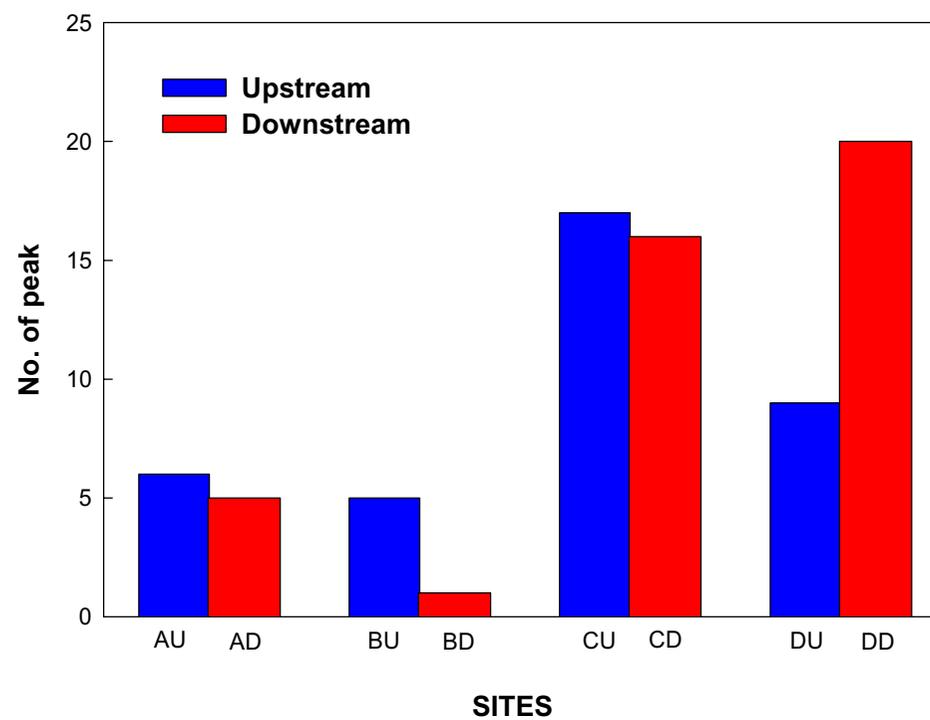


Fig. No. of peak in GC chromatograms from 4 rivers for selection of priority site

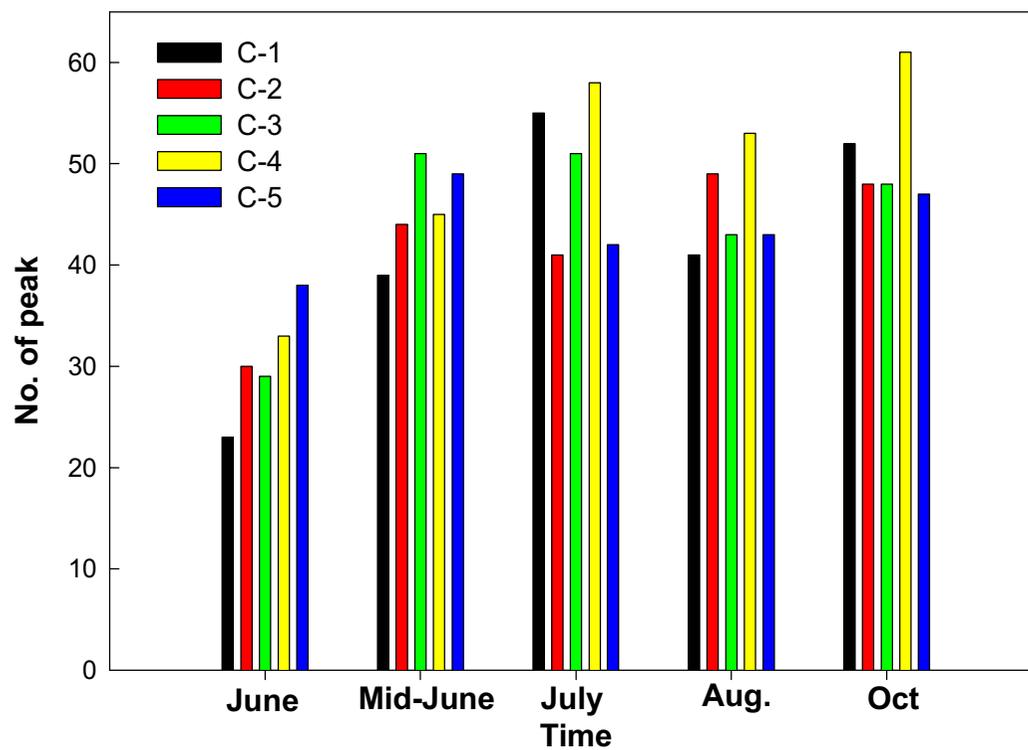


Fig. Seasonal change of peaks from GC-FID profiling.
 C-1 ~ C-3 : upstream, C-4 ~ C-5 : downstream

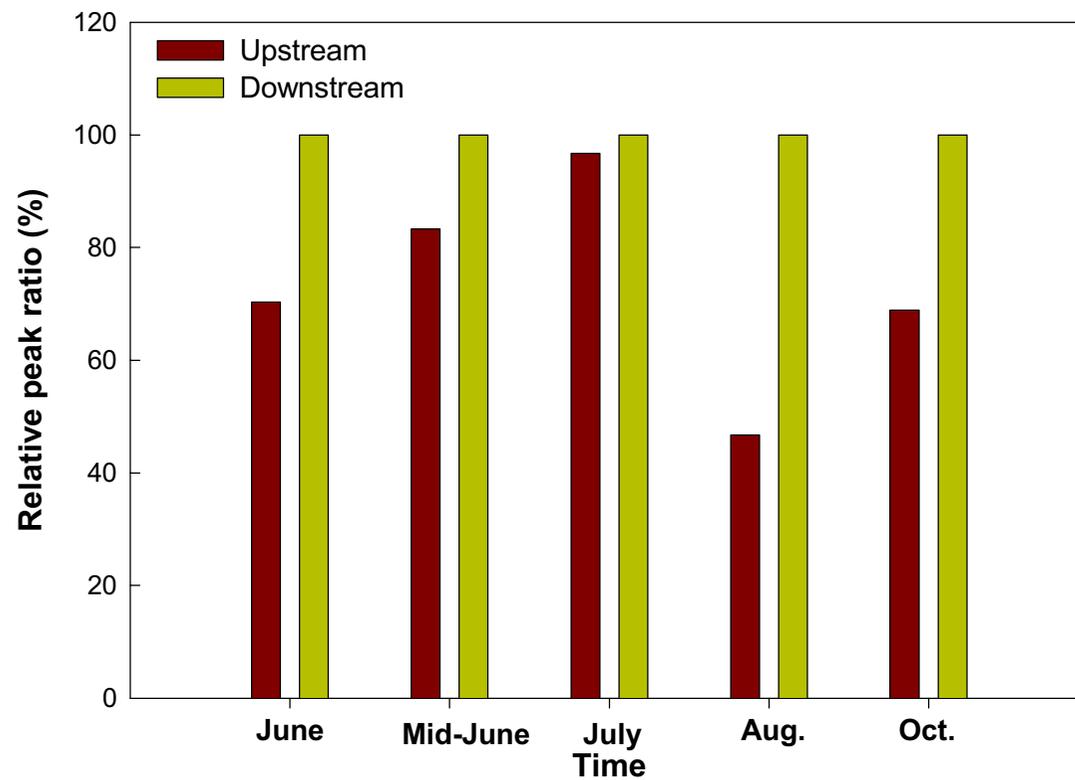


Fig. Seasonal variation of relative peak ratio between upstream and downstream.

- B, C 하천 GC-FID 분석 결과

조사지점	Fraction	Peak 수		
		1차 조사	2차 조사	3차 조사
B-1	MeOH	15	3	0
	EtOAc	32	4	0
B-2	MeOH	54	21	16
	EtOAc	67	33	16
C-1	MeOH	2	2	0
	EtOAc	13	17	0
C-2	MeOH	24	6	2
	EtOAc	21	40	0
C-3	MeOH	-	-	3
	EtOAc	-	-	1

- B, C 하천 GC-NPD 분석 결과

조사지점	Fraction	Peak 수		
		1차 조사	2차 조사	3차 조사
B-1	MeOH	3	4	12
	EtOAc	3	0	3
B-2	MeOH	20	26	36
	EtOAc	9	2	9
C-1	MeOH	0	6	7
	EtOAc	0	1	0
C-2	MeOH	12	12	10
	EtOAc	0	1	2
C-3	MeOH	-	-	11
	EtOAc	-	-	3

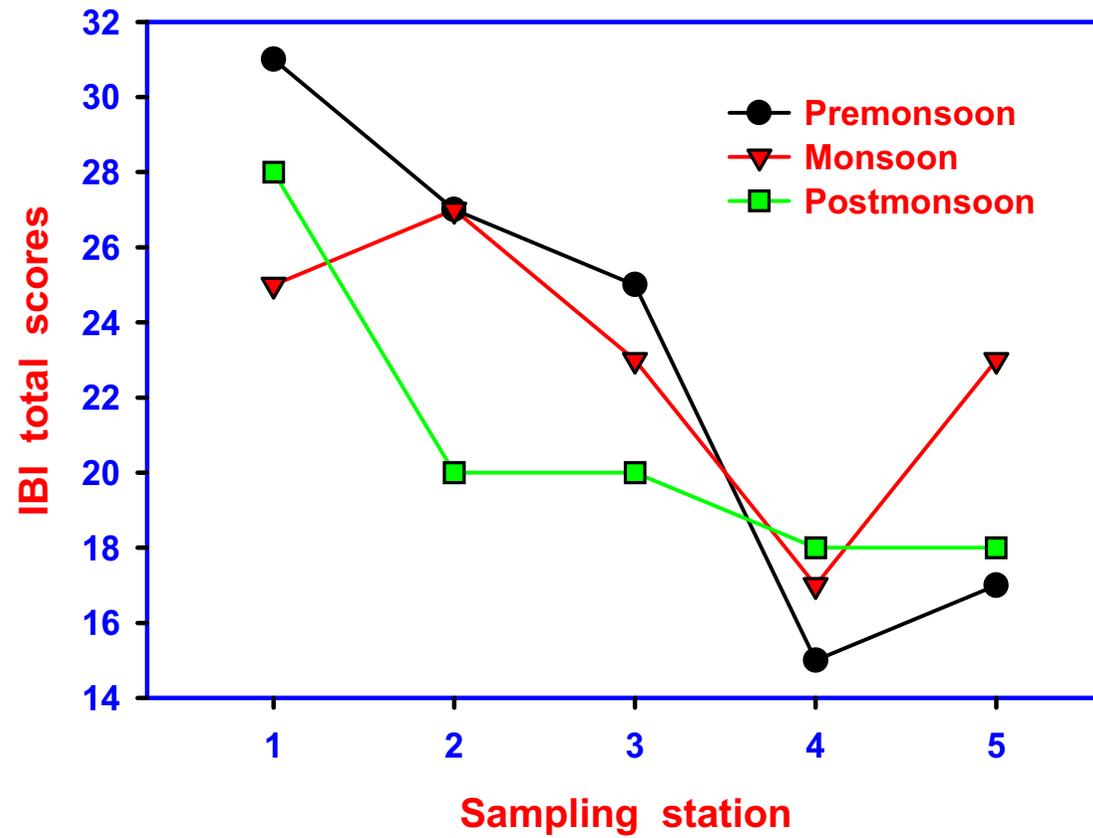
- 생태독성시험 결과 (A 하천)

Test Items	Fish		Daphnid		Lemna		Chironomid	
Sample	Water		Water		Water		Sediment	
Endpoint	Mortality(%)		Immobilization(%)		Growth rate		Mortality(%)	
Duration(day)	4		2		7		10	
Sampling month	7	8	7	8	7	8	7	8
Control	0	0	0	0	0.20	0.30	20.0	16.7
KH1	0	0	100	0	0.16	0.18*	56.7	30.0
KH2	0	14	100	0	0.20	0.19*	66.7	60.0*
KH3	0	0	20	55.3~73.5	0.20	0.21*	83.3	43.3
KH4	0	0	100	26.4~27.7	0.28*	0.25*	53.3	40.0
KH5	0	0	0	36.8~45.2	0.23	0.22*	53.3	46.6

* t-test(P<0.05) 결과 대조군에 비하여 유의하게 다른 값을 나타내는 시료

- 어류군집조사 결과(A 하천)

Sampling site	Mean/Cumulative No. of species	Index of Biotic Integrity		
		June	July	August
A1	9/14	33(Fair~Poor)	37(Fair)	25(Poor)
A2	10/12	31(Fair~Poor)	31(Fair~Poor)	27(Poor)
A3	9/11	25(Poor)	21(Poor~Very Poor)	23(Poor)
A4	7/13	13(Very Poor)	23(Poor)	19(Poor~Very Poor)
A5	6/8	15(Poor)	17(Poor)	23(Poor)



Conclusions

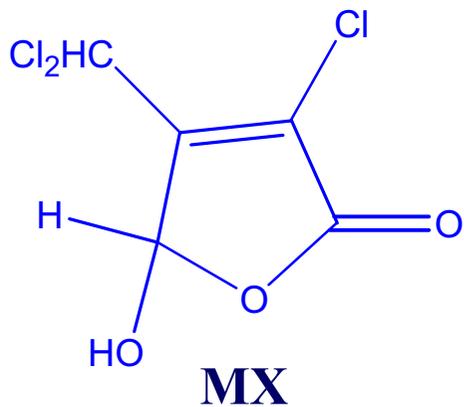


- ❑ **Applicability ; GC-FID profiling, GC/MS**
- Prediction of pollution and pollutants
- ❑ **Necessity of bioassay combined with**
instrumental analysis

STRUCTURE IDENTIFICATION

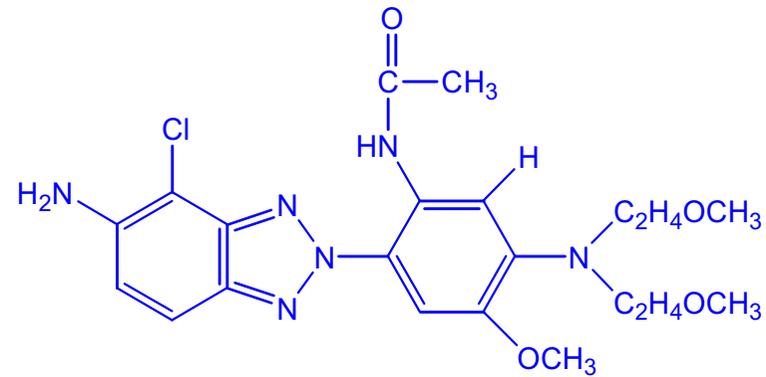
- 생태위해성 예보체제의 개발과제의 일환으로 **A**강을 대상으로 **Case Study** 수행.
- 다양한 **bioassay** 기법과 화학분석을 결합하여, 생태계에 위해성을 미칠 수 있는 원인을 탐색.
- 대상 물시료에서 미생물을 이용한 복귀돌연변이 실험에서 변이원성 물질이 존재하는 것으로 확인.

Searching Potent Mutagens in Water



3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone

**1986. Kronberg group, Finland,
Wood pulp chlorination liquor**



PBTA-1

**1997, Wakabayashi group,
Japan, River water**

복귀돌연변이원성 확인

- 만성 위해성의 감지/평가에 널리 이용되는 간편한 방법인 **Ames test**이용.
- ***Samonella typhimurium* TA98**균주를 사용.
- **S9**혼합물을 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료로 실험.
- 하수처리장(**site 3**과 **site4**사이에 위치) 이후의 지점에서 지속적인 **Ames test** 양성반응을 얻음.

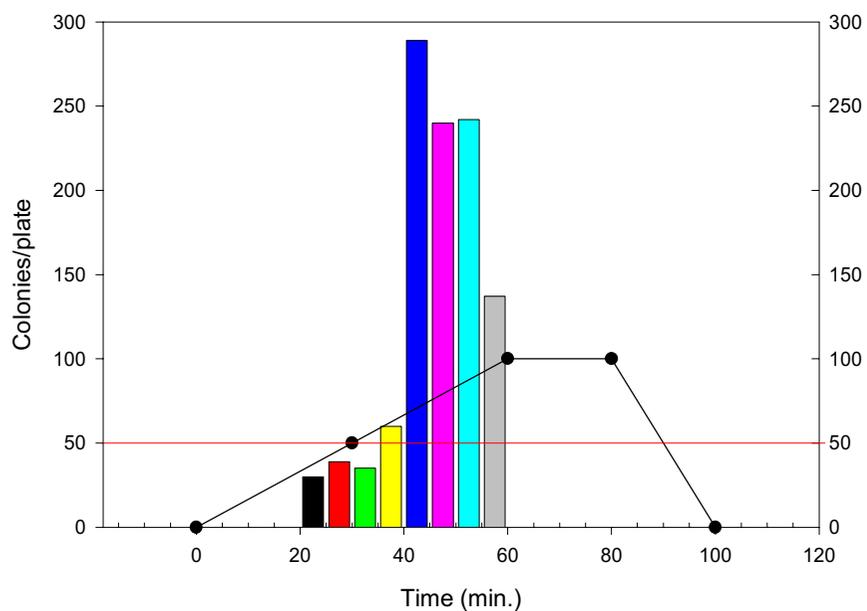


Fig. Reverse mutation assay of HPLC fraction from river water. (2nd main study)

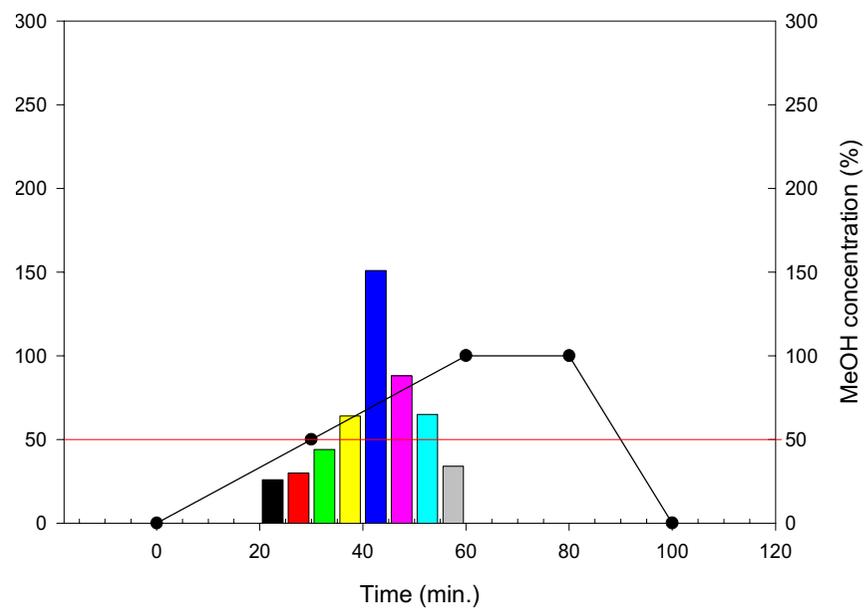


Fig. Reverse mutation assay of HPLC fraction from river water (2nd main study). Sample collection was done using XAD-resin trap and 145 ml equivalent volume of water was fractionated.

원인물질 동정을 위한 화학적 분획

- 원인물질의 동정을 위해서 **HPLC**를 이용한 화학적 분획 기법을 사용.
- 각 분획에 대해서 **Ames test** 실시 후 양성을 나타낸 분획을 대상으로 단일물질로 분리될 때까지 계속된 분획 실시.

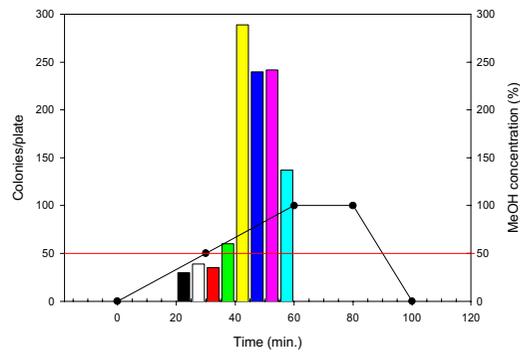
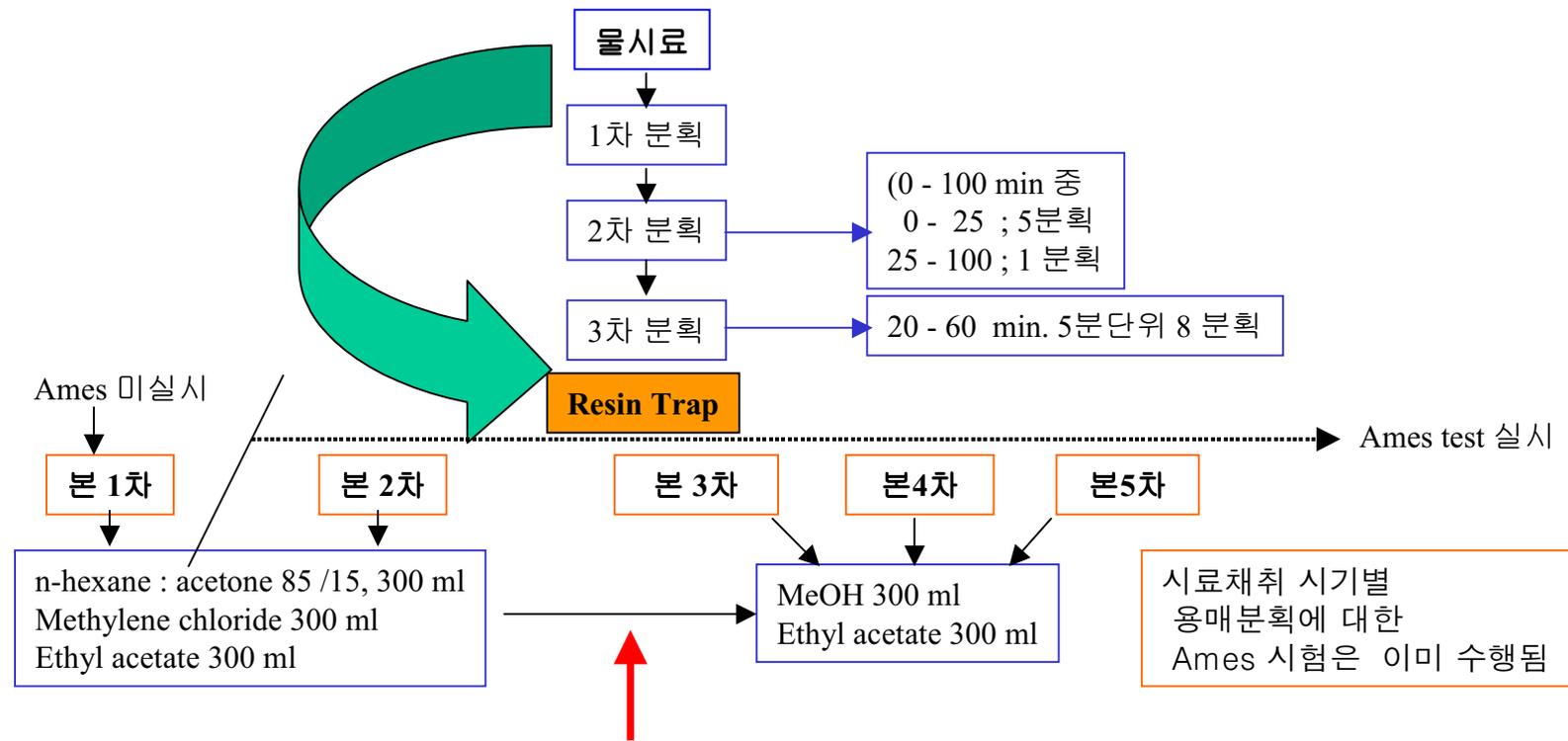


Fig. . Reverse mutation assay of HPLC fraction from KH river water (2nd main study)

→ Trap 시료는?

Chemical isolation and identification scheme

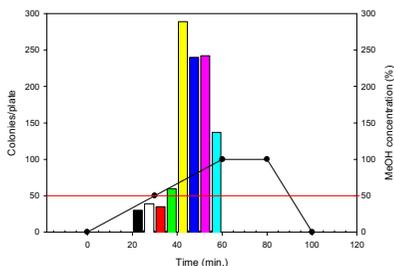
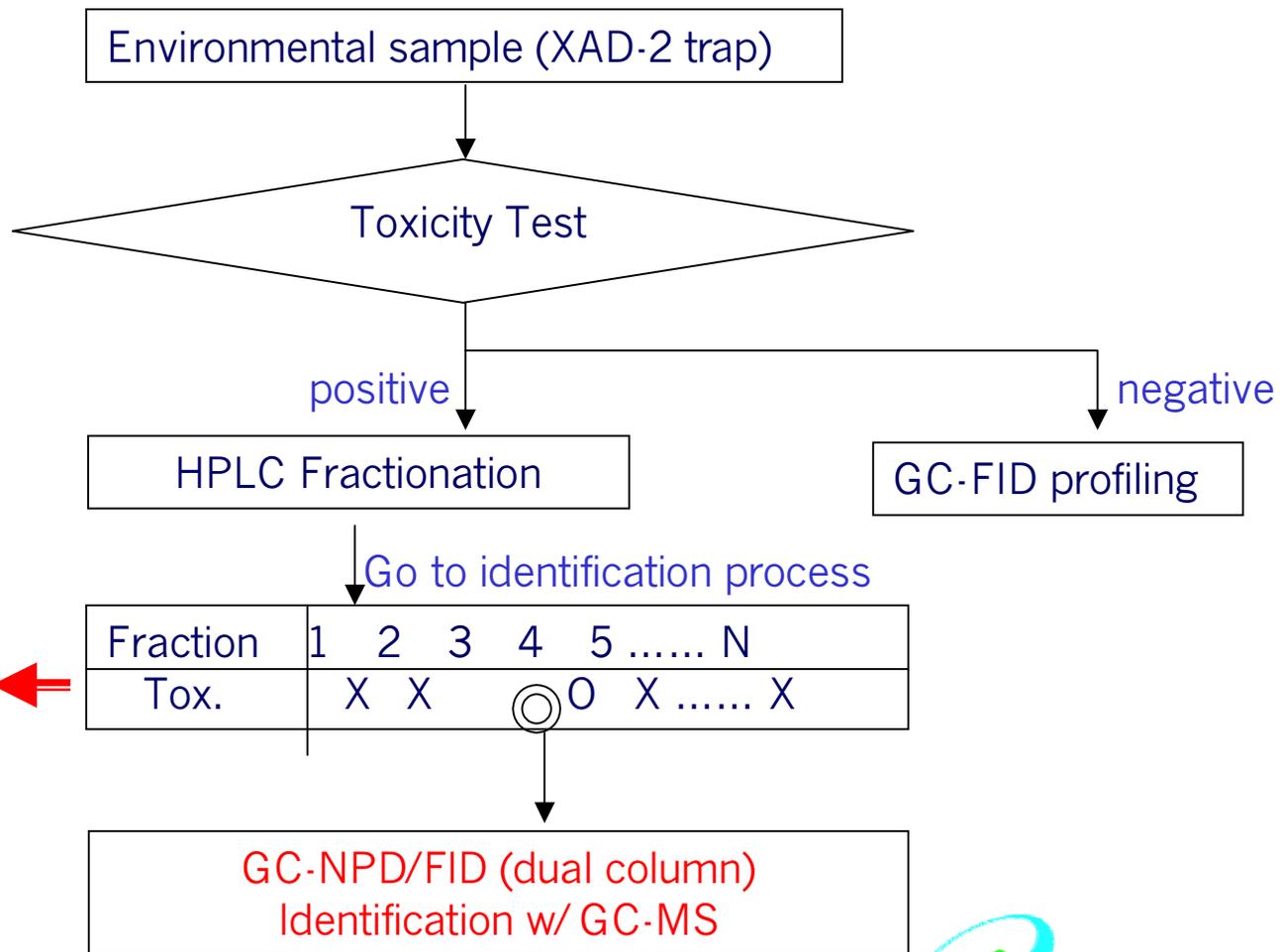
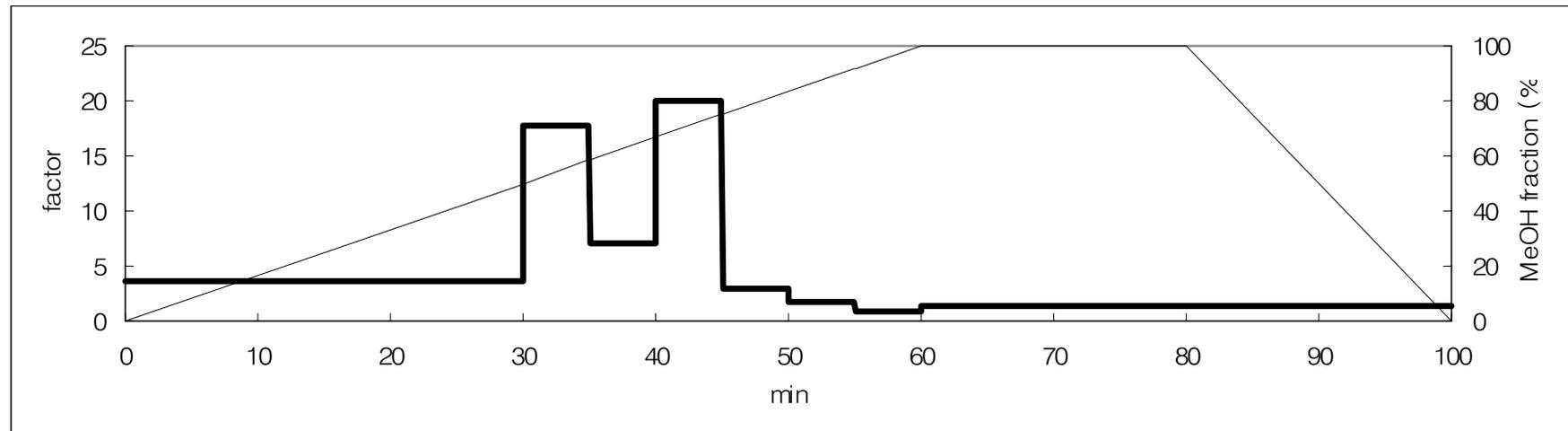
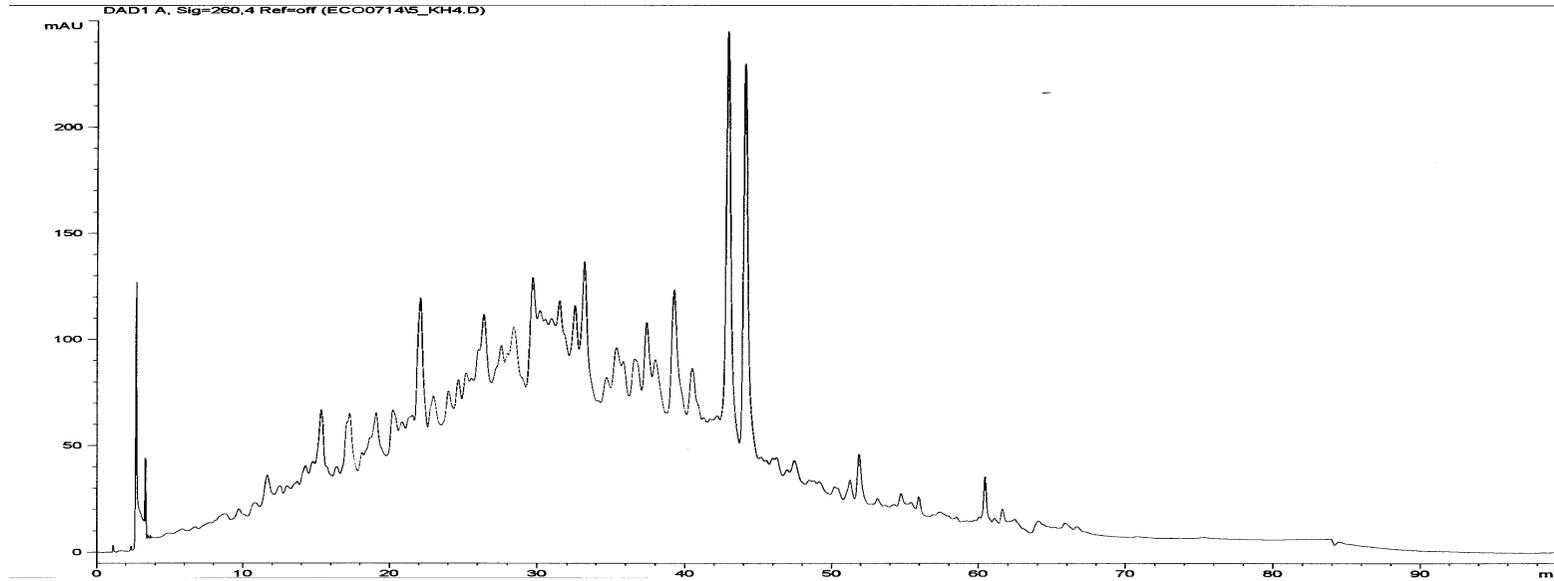


Fig. - Reverse mutation assay of HPLC fraction from KH river water (2nd main study)

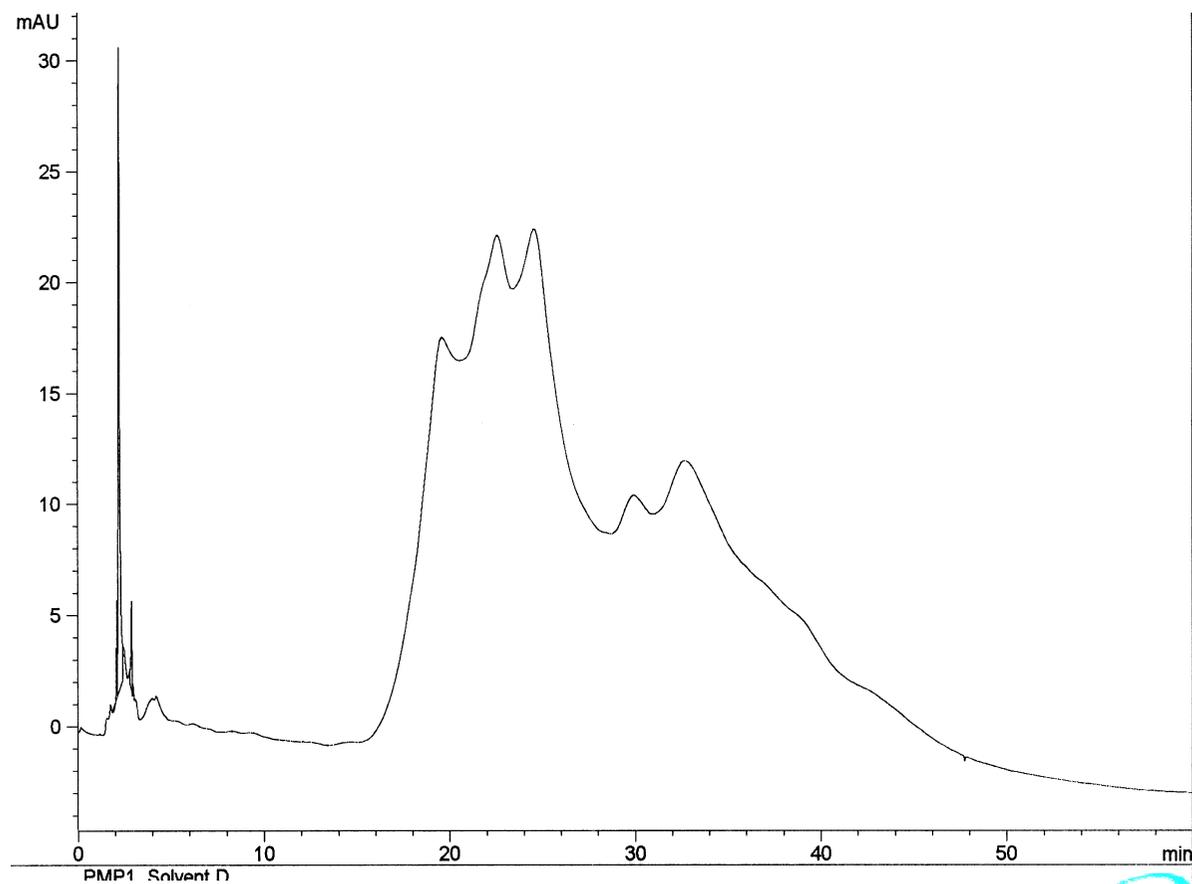
- 1차 화학분획에서 머무름 시간 **30-35분, 40-45분**의 시료에서 **Ames test**에 강한 양성반응을 보임.
- 소수성이 강하고, 높은 옥탄올-물 분배계수를 가질 것으로 예상되는 **40-45분**의 시료에 대해서 추가적인 분획을 실시.
- 2차 화학분획에서 단일 **peak**를 보이는 머무름 시간 **52-60분**의 시료에서 가장 강한 **Ames test** 양성반응을 보임.

LC Chromatogram and Tox. Test Result

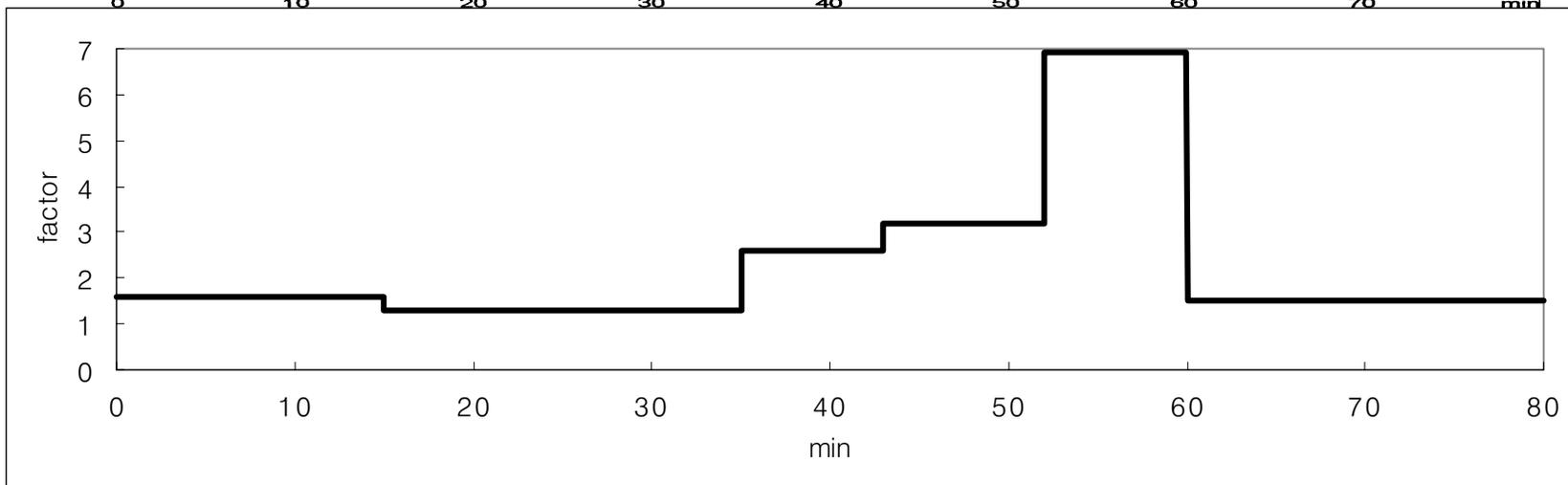
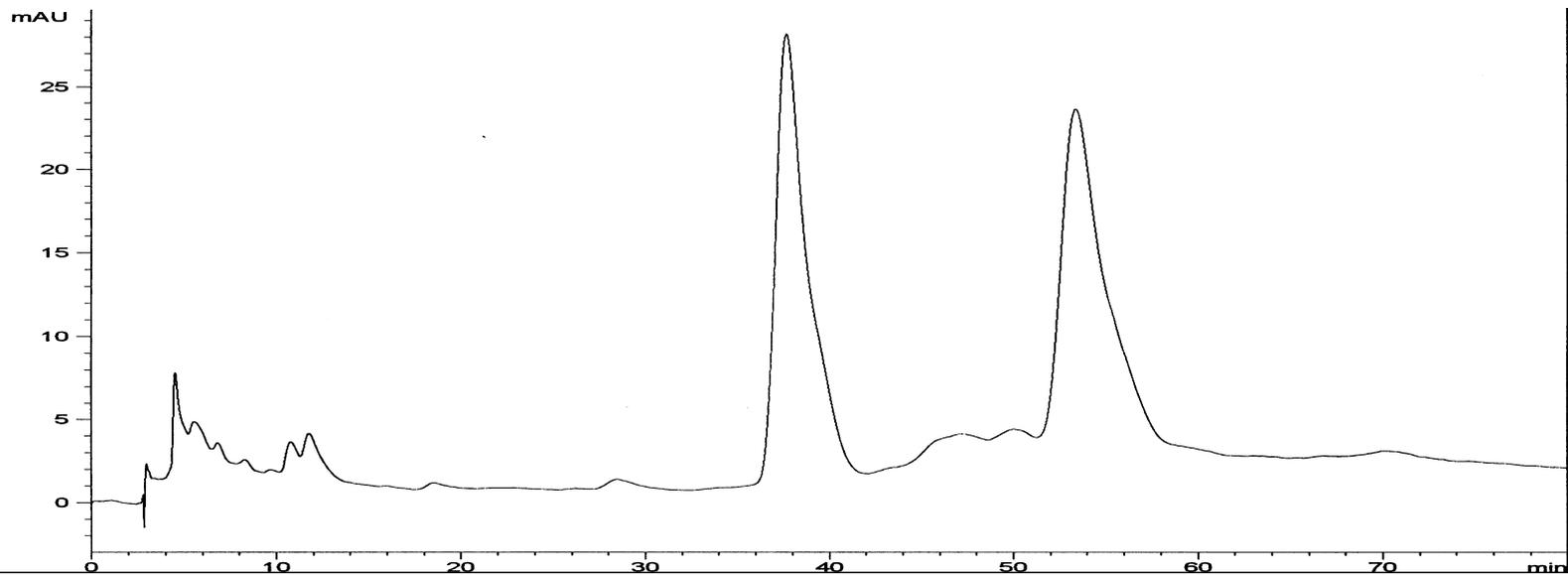


Second Fractionation and Tox. Test Result

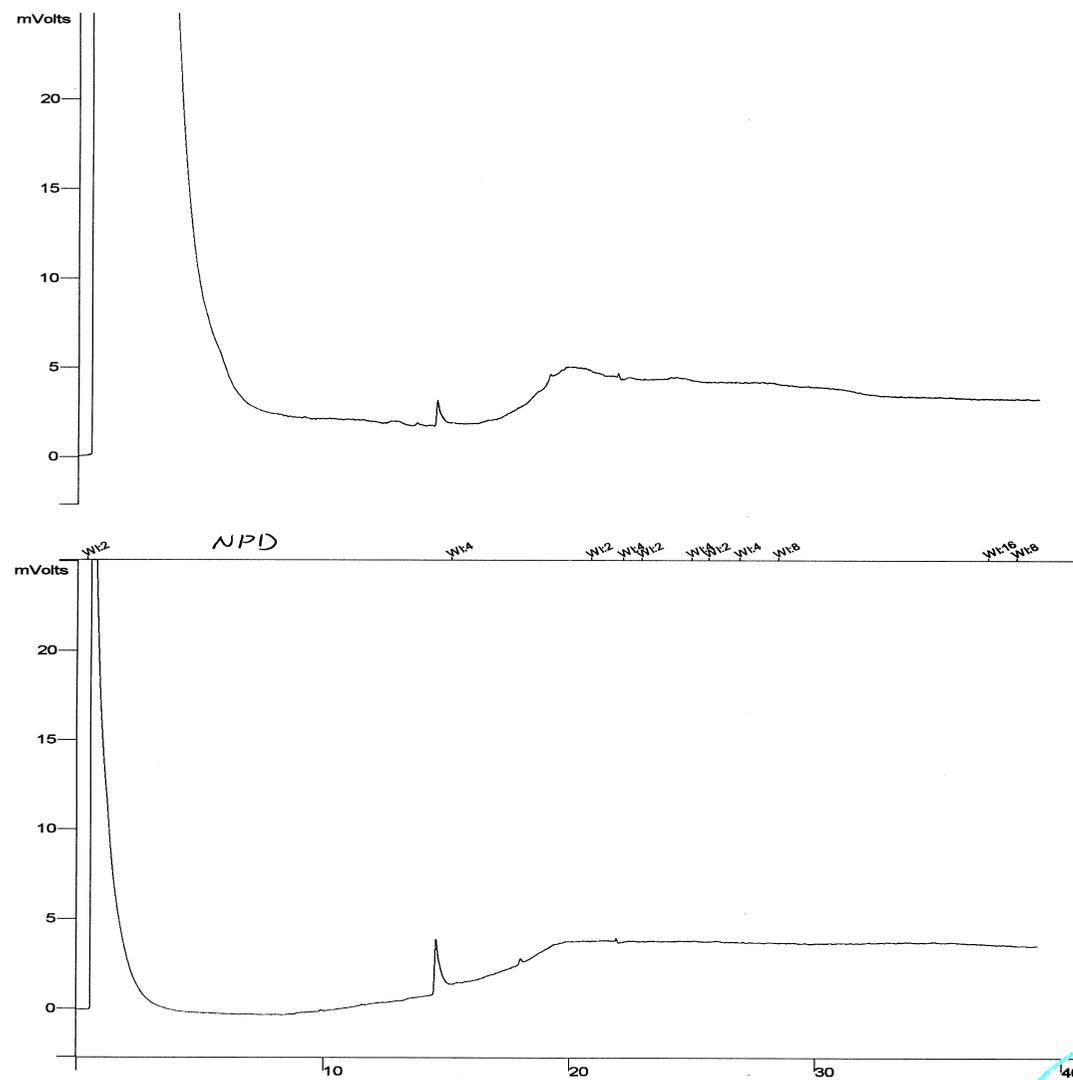
30-35min fraction (MeOH 35%)



40-45min fraction



GC-FID/NPD check of the isolated compound



원인물질 동정을 위한 화학적 분석

- **GC/MS**를 이용한 구조확인 시도.
 - GC/MS library의 낮은 matching quality
- **UV/Vis spectrum**
- **High resolution mass spectrum**
 - $C_7H_4N_2SCl_2$ 의 분자식을 가지는 물질로 확인
- 분자식에 대한 **Confirm**
 - 질량수 **218:220:222**의 비가 **9:6:1** → 두 개의 염소원자가 존재
 - **GC-FPD sulfur mode** 분석 → 황원자의 존재
 - **GC-NPD** 분석 → 질소원자의 존재

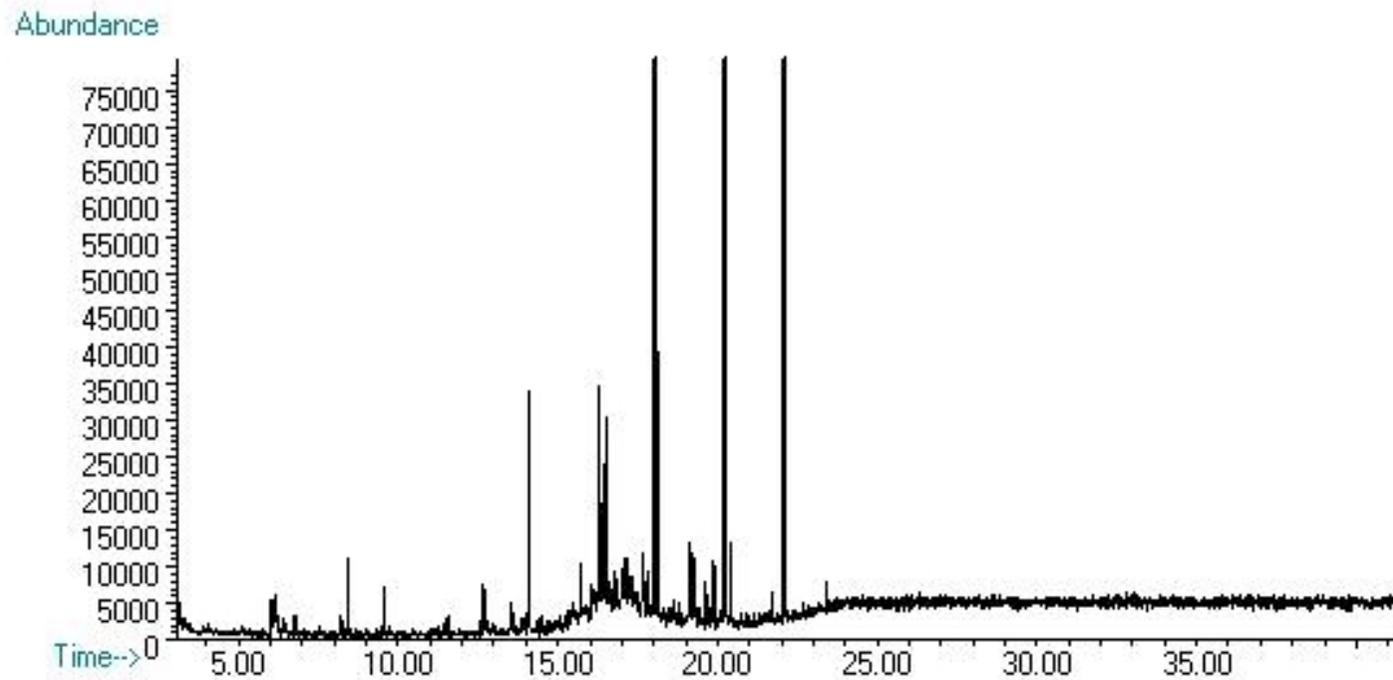
Limitation and Solution

<Limitation>

- (1) Low matching quality in GC/MS spectrum
- (2) Difficulty in the isolation of a mutagenic chemical
- (3) Difficulty in the synthesis of the tentatively identified structures

<Solution>

- (1) High resolution GC/MS
- (2) Use of HPLC
- (3) Proton NMR

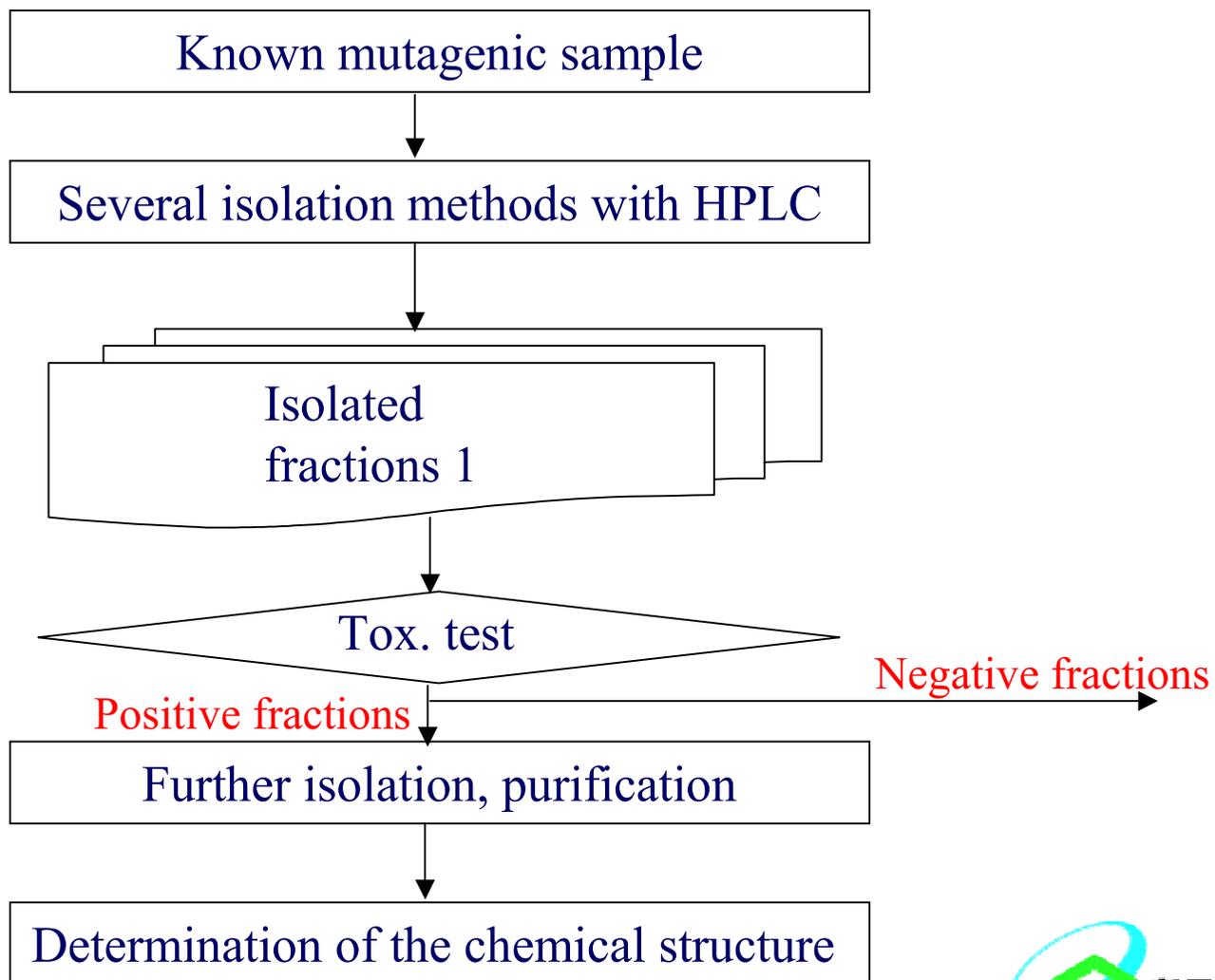


1. NIST 및 Willey library 의 matching quality 우선순위 화합물의 spectrum 검토 :

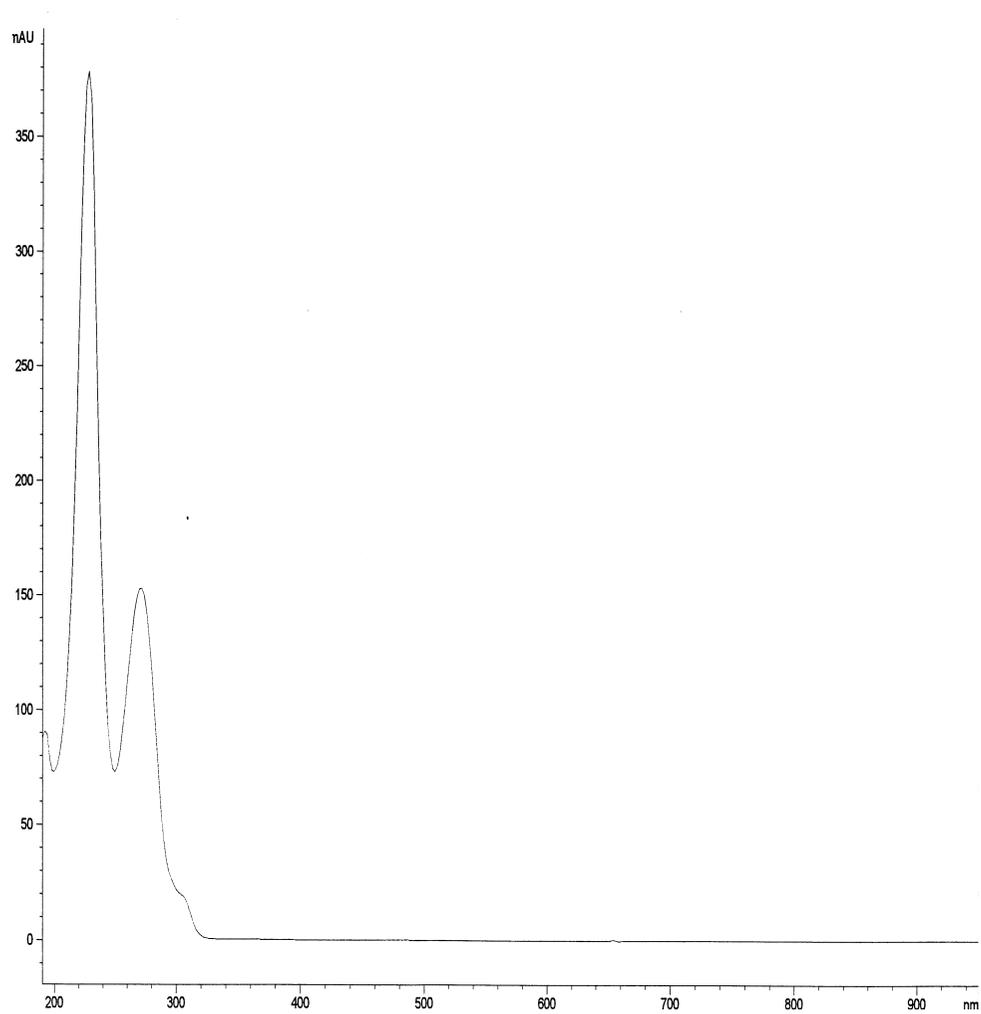
Matching quality 의 낮은 신뢰성

2. 개별 peak의 spectrum 분석 → 구조 예측 → library 재확인

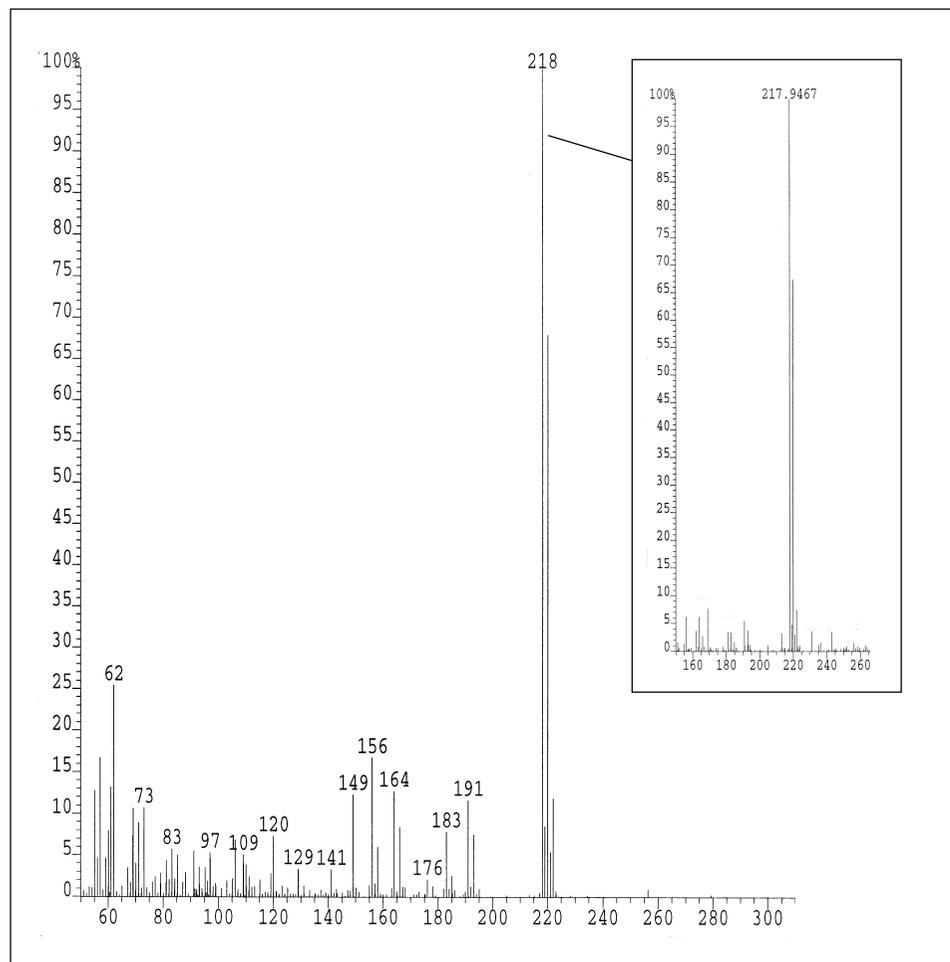
Modified scheme



UV absorbance spectrum

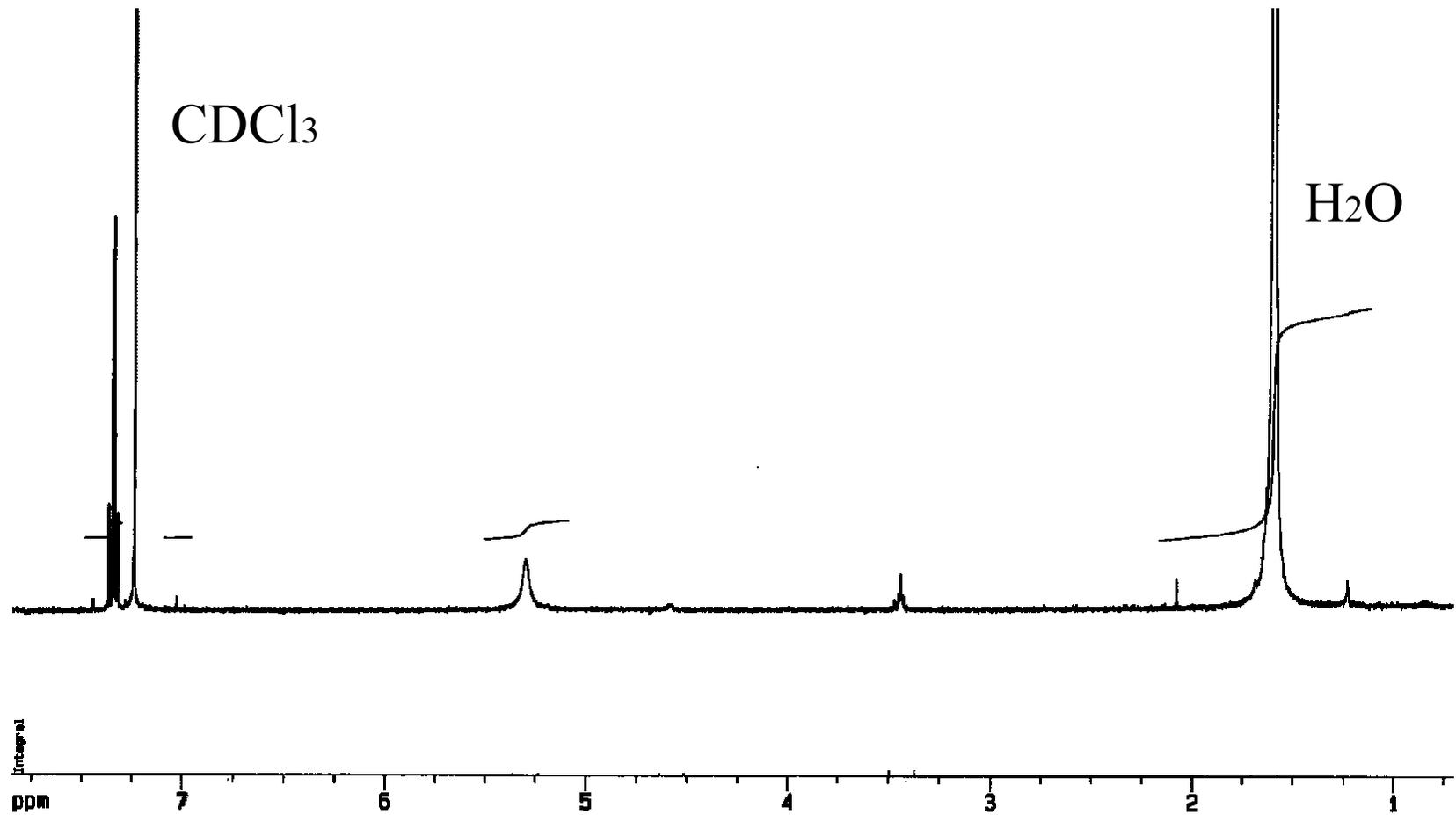


High-Resolution GC/MS



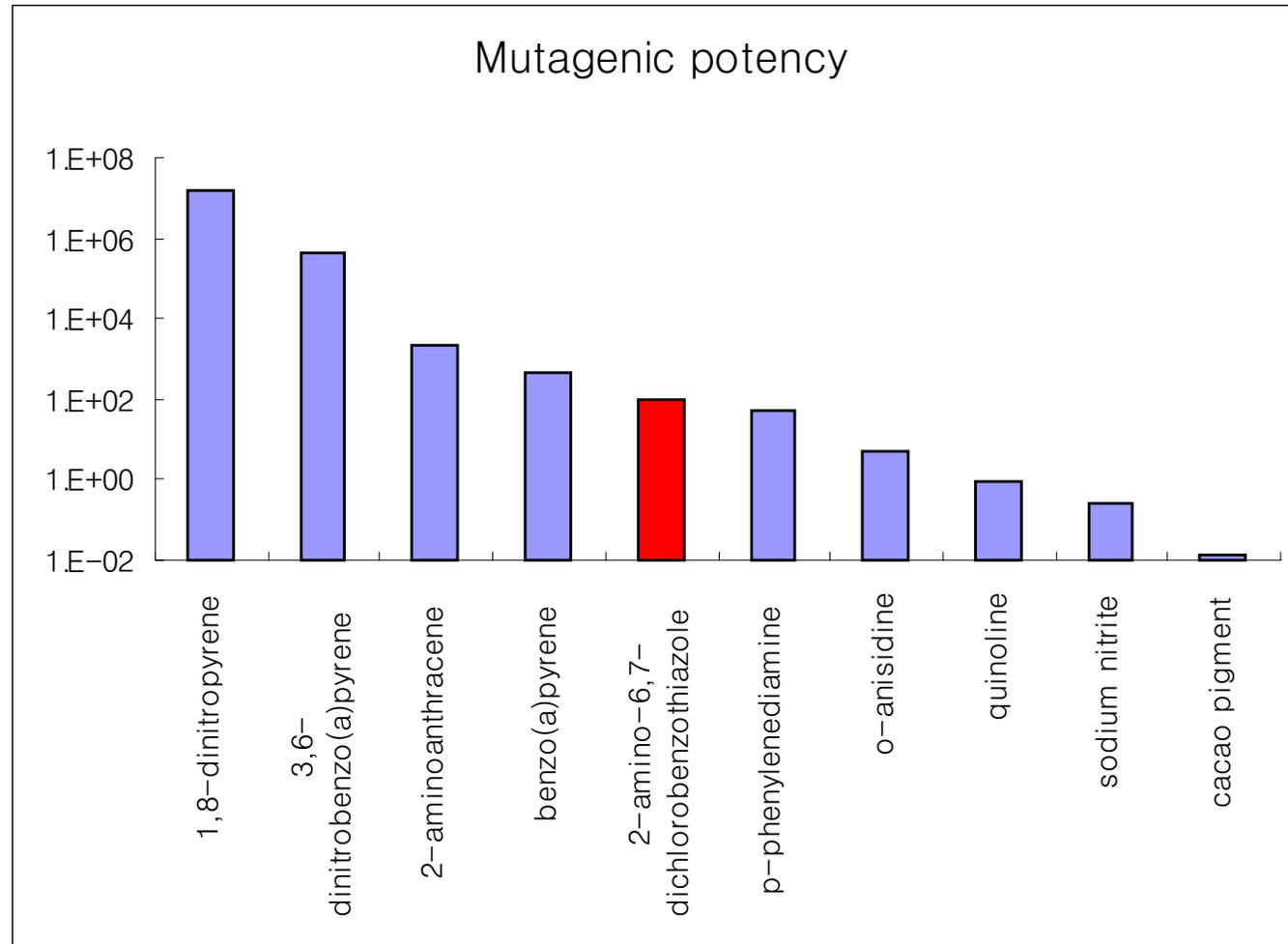
Proton NMR 분석

- **Proton NMR**분석을 위해서 다량의 환경시료 확보.
 - **Proton NMR**에는 대략 **1mg**정도의 순수한 물질이 필요.
- 앞서의 기술과 동일한 방법으로 변이원성 화학물질을 분리, 정제
- **500MHz proton NMR**분석
 - 2-amino-4,5-dichlorobenzothiazol
 - 2-amino-4,7-dichlorobenzothiazol
 - 2-amino-6,7-dichlorobenzothiazol의 세 구조 가운데 하나인 것으로 판명.



클로로포름-*d*에 용해한 변이원성 화학물질의 H-NMR spectrum

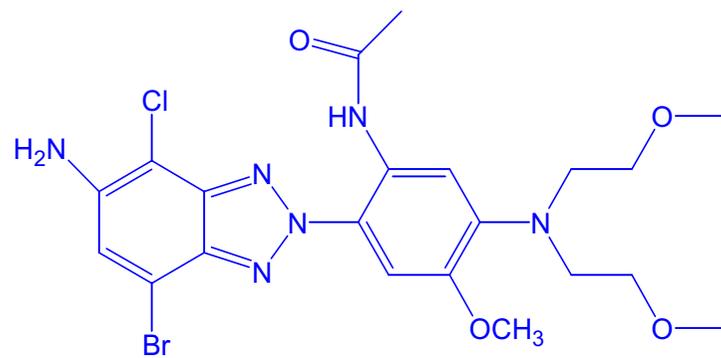
향후(연구) 계획



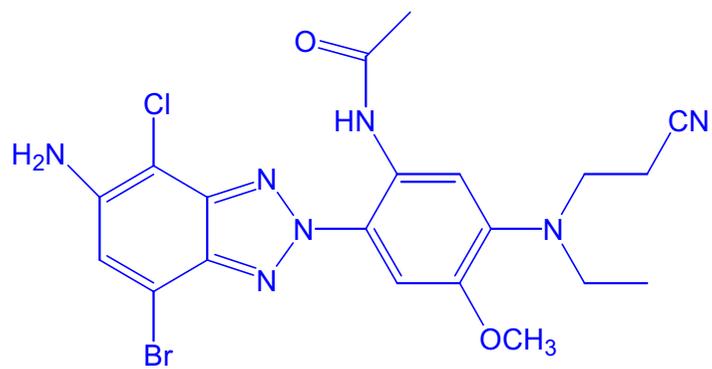
외국과의 비교 - 일본

□ 일본 국립암연구센터(NCCRI)에서도 비슷한 연구수행(1980-현재)

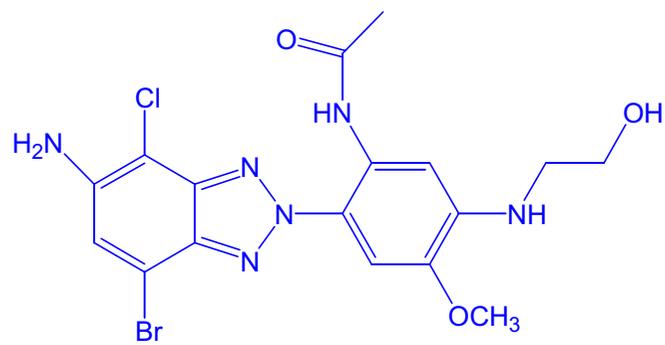
- 환경 중에서 염료로부터 만들어진 여러 종류의 강력한 변이원성 물질 발견
- 발견된 변이원성 물질의 유전독성 정량화
- 발암성 실험에 대한 결과는 아직 없고, 행정적 규제에 대한 발표도 아직은 없음
- 인체위해성 중심의 연구방향 - 본 연구의 생태위해성 연구방향과 차이가 있음



PBTA-1

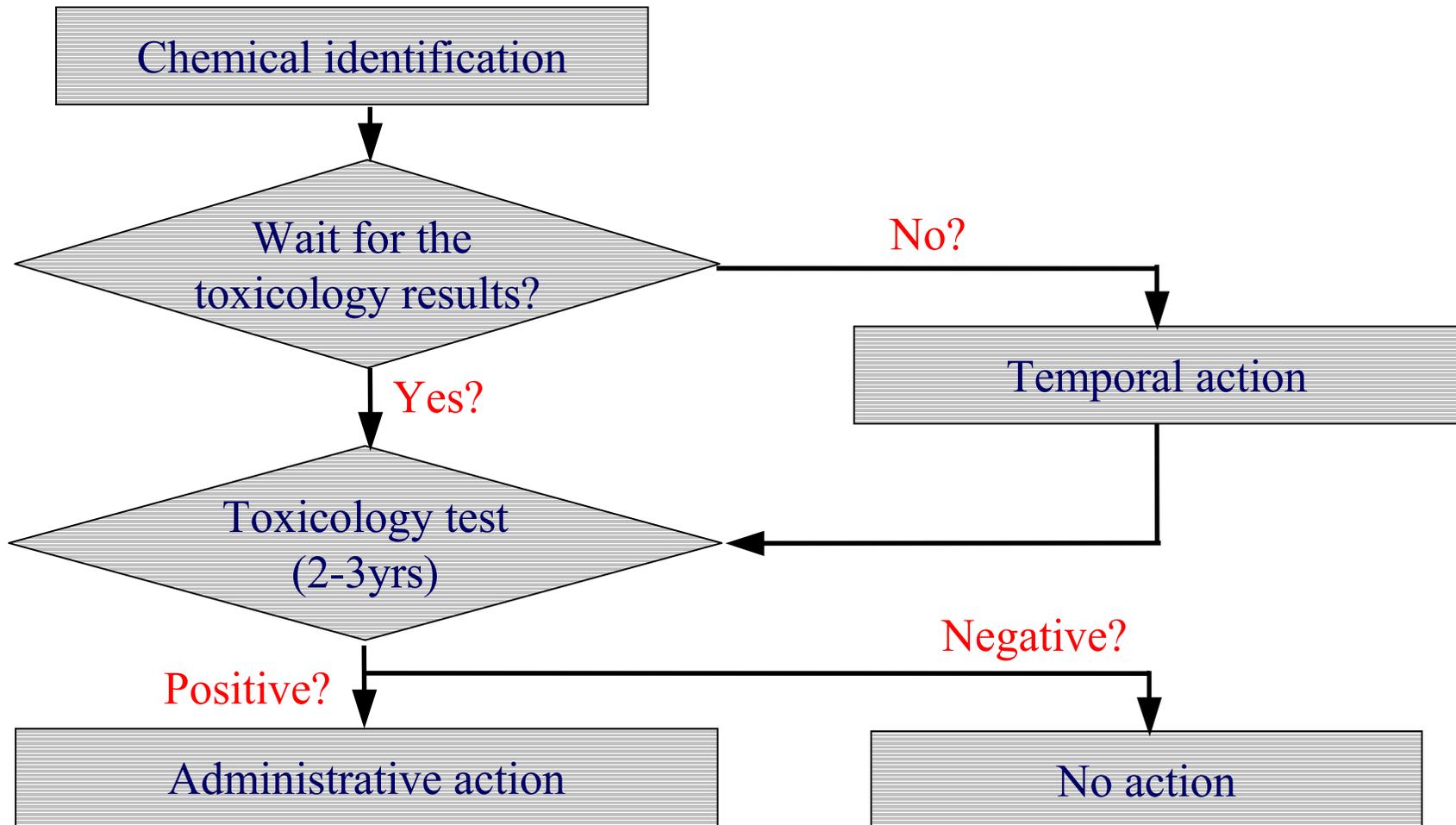


PBTA-2



PBTA-

향후대책 순서도(장기적)



본 연구결과의 활용방향

- 배출원 규명 - 유통량 조사와 결부
 - 염료의 분해산물 or 염료중간체?
- 위해도 평가
 - *in vitro* and *in vivo* test
 - 필요한 경우 발암성 시험
- 행정적, 법적 조치 - 현장조사와 원인규명
 - 유해물질, 관찰물질 지정여부 검토
- 관련 연구
 - 다른 변이원성물질 탐색

Trends in Environmental Policy in U.S.A.

Before 1980's	After 1980's
Technology-Based	Quality-Based Receptor-Based Risk-based
Reactive	Proactive <ul style="list-style-type: none">- Commercial product- Technology

위해성 평가 및 관리

