

## 겔 여과 크로마토그래피에 의한 토양 풀빅산의 분자량 분획 및 형광특성 분석

정근호 · 신현상 \* · 이완로 · 조영현 · 최근식 · 이창우 \*  
한국원자력연구소 원자력환경연구부, \* 서울산업대학교 환경공학과  
(2004. 2. 16 접수, 2004. 3 11 승인)

### Molecular Size Fractionation of Soil Fulvic Acid by Gel Filtration Chromatography and Analysis of Their Fluorescence Characteristics

Kun-Ho Chung, Hyun-Sang Shin\*, Wanno Lee, Yeong-Hyun Cho, Geun-Sik Choi and Chang-Woo Lee\*  
Nuclear Environment Research Division, Korea Atomic Energy Research Institute, 150 Dukjin-Dong, Yuseong-Gu,  
Daejeon 305-353, Korea

\*Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology, Nowon-Gu, Seoul 139-743, Korea  
(Received Feb. 16, 2004, Accepted Mar. 11, 2004)

**요 약 :** 토양 풀빅산 (FA)의 분자량 크기 분포와 분자량별 형광특성을 겔 여과 크로마토그래피 (GFC)와 형광 분석시스템을 사용하여 분석하였다. 본 연구에서는 제주 지역 토양에서 추출한 풀빅산을 세 개의 분자량 영역으로 분리하였고, 분자량별 풀빅산의 excitation, emission, synchronous 형광특성을 비교·분석하였다. 토양 풀빅산의 분자량 분리를 위한 GFC 시스템은 아세톤과 텍스트란 블루 및 폴리에틸렌 글리콜 표준분자를 사용하여 교정하였다. 분자량 분리 시스템의 틸세부피는 130 mL이고, total permeation volume은 404 mL을 나타냈다. 이 시스템을 풀빅산의 분자량 분리에 적용한 결과, 토양 풀빅산은 190 ~ 8,900 Da의 분자량 분포를 나타냈으며 피크에서의 분자량은 930 Da을 나타냈다. 분자량별 구조 차이를 나타내는 synchronous 형광피크의 상대비 ( $I_{498nm}/I_{390nm}$ )는 분자량이 클수록 증가하였다. 이와 같은 결과는 고 분자량의 풀빅산이 저 분자량의 풀빅산에 비해 껍질함으로 연결된 방향족 고리와 다양한 치환기가 결합된 좀더 복잡한 분자 구조임을 제시한다.

**Abstract :** The molecular size distribution and fluorescence properties of soil fulvic acids (FA) were characterized by using gel filtration chromatography (GFC) and luminescence spectroscopy. The objectives of this work were to fractionate the FA extracted from a forest soil into different nominal molecular size using GFC system and to characterize the fluorescence properties (excitation, emission and synchronous) of these fractions using luminescence spectrometer. The GFC column was calibrated with polyethylene glycols, acetone and dextrane Blue. The total permeation volume of the GFC system was 404 mL and the void volume 130 mL. The GFC molecular weight of the soil FA was in the range of 190 ~ 8,900 Dalton and the molecular weight at the peak on the chromatogram was 930 Dalton.

★ Corresponding author.  
Tel. : +82+(0)42-868-2296 Fax : +82+(0)42-863-1289  
E-mail : cwlee@kaeri.re.kr

The fluorescence intensity ratio ( $I_{498\text{nm}}/I_{392\text{nm}}$ ) was found to be increased with an increasing molecular weight. This results may suggest that the fulvic acid fractions with high molecular weight have large amount of the condensed aromatic compound.

**Key words** : fulvic acids, GFC, molecular size fractionation, luminescence spectroscopy, fluorescence

## 1. 서 론

핵실험 및 원자력시설의 사고 등으로 인해 대기로 방출된 방사성 물질은 장기간에 걸쳐 토양에 침적된다. 침적된 방사성 물질은 식물을 통한 흡수, 토양 무기물への 흡착 및 토양 층에서의 이동과 변환과정을 통하여 지하수 및 주변 생태계로 확산된다.<sup>1</sup> 토양환경에서 방사성 핵종의 분포 및 거동은 방사성 핵종의 농도, 산화상태, 토양 구성 성분과의 상호작용 및 주변식생과 강수량 등 매우 다양한 요소에 의해 영향을 받게된다.<sup>2</sup> 특히, 토양 구성 성분 중의 하나인 토양유기물질은 방사성 핵종과의 반응성이 높고, 토양의 pH 및 다양한 산화 환원 조건에 따라 토양 내 핵종의 축적, 이동 등에 중요한 역할을 한다.<sup>3,4</sup>

동식물의 분해과정에서 생성되는 자연산 고분자 유기물질인 휴믹물질 (humic substances)은 토양 중에서 가장 일반적으로 발견되는 토양 유기물이다. 휴믹물질은 다양한 자연산 유기물질들의 불균질 혼합체로서, 수용액에서 pH에 따른 용해도에 따라서 휴믹산 (humic acid), 풀빅산 (FA: fulvic acid) 및 휴민 (humic)으로 분류된다. 휴믹물질은 카르복실기, 페놀기, 알코올기 및 아민기 등의 작용기를 가진 다전해질성 (polyelectrolyte)의 산성고분자로서 토양 내 존재하는 방사성핵종이나 중금속 이온에 대해 높은 친화력을 지니며, 이들 이온의 화학종 분포에 중요한 영향을 미친다. 휴믹물질은 산화수가 2 이상인 방사성 핵종이온과 휴믹콜로이드를 형성하여 자연수계에서 이들 핵종의 이동에 중요한 역할을 한다.<sup>5,6</sup> 특히, 풀빅산은 휴믹물질 중 모든 pH 영역에서 용해성을 띠는 부분으로서, 분자량이 작고 산도가 높아 토양 환경 중에서의 방사성 핵종의 이동에 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup> 그러나 풀빅산은 일반 토양 중에서 적은 양이 존재하며 (토양 유기물질의 10 % 이하), 휴믹산에 비교해 추출이 어려운 점 때문에 많은 연구결과가 발표되지 않고 있다.

휴믹물질의 분자량은 수백에서 수십만에 이르며 분자

량에 따라 분자구조 및 금속이온과의 반응성 등이 다른 것으로 알려져 있다. Shin *et. al.*은 한외여과법 (ultrafiltration)을 이용하여 분리한 분자량별 휴믹산 (Aldrich Co.)과 Eu (III)과의 결합특성을 조사하였고, 분자량이 증가할수록 금속이온과 결합되는 휴믹산 분자의 산성작용기 배위수가 증가하며 결합세기 ( $\log K$ )가 증가함을 보고한 바 있다.<sup>7</sup> 이러한 휴믹물질의 분자량별 차이는 토양환경에서의 금속이온의 수직 분포 및 확산에 분자량 크기에 따라 서로 다른 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 토양 휴믹물질 중 이동성이 가장 큰 풀빅산의 분자량 분포와 물질특성에 대한 정보는 방사성 핵종의 토양 내 거동을 보다 정량적으로 해석하는 데 중요한 자료가 된다.

본 연구의 목적은 겔 여과 크로마토그래피 (GFC: Gel Filtration Chromatography)를 이용하여 토양 풀빅산의 분자량분포 특성을 분석하고, 풀빅산을 3개의 분자량 영역으로 분리하여 분자량 영역별 풀빅산의 excitation, emission, synchronous 형광특성을 분석하는 것이다. 본 연구에서 얻어진 결과는 국내 토양에 존재하는 휴믹 물질의 특성자료에 대한 데이터베이스 구축에 사용된다.<sup>8,11</sup> 또한, 여기서 사용된 분석방법은 지표수나 해수에서 추출한 휴믹물질의 분자량분포 및 형광특성을 해석하는데도 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

## 2. 실험

### 2.1. 토양 풀빅산 추출 및 정제

본 실험에 사용한 풀빅산은 한라산의 표층토 (0~10 cm)로부터 추출되었다. 시료채취 지점에 대한 정확한 정보는 문헌에 보고되어 있다.<sup>12</sup> 풀빅산은 국제 휴믹물질 학회 (International Humic Substances Society)에서 제시한 방법에 따라 산·염기 침전에 의한 휴믹산과 풀빅산의 분리과정과 XAD-8 수지 및 Dowex 50 \*8 (H<sup>+</sup>) 수지 흡착과정을 통하여 추출 및 정제되었고, 동결건조를 실시하여 고운 분말상태의 최종시료를 얻었다.<sup>13</sup> 추출

및 정제에 대한 자세한 절차는 앞선 문헌에 자세히 제시되어 있다.<sup>11</sup>

## 2.2. 겔 전처리 및 컬럼 충전

분자량 분리를 위한 겔의 전처리는 다음과 같은 과정을 거쳐 수행하였다. 건조된 겔 (Sephadex G-50 fine, Sigma Co.) 50 g을 비이커에 넣고 650 mL의 0.1 M NaClO<sub>4</sub>를 가하여 가볍게 저어준 후 상온에서 하룻밤 방치한다. 팽윤이 끝난 후 겔을 가라앉히고, 작은 입자의 겔을 포함하는 상등액은 조심스럽게 따르면서 버린다. 위 과정은 2~3회 반복하였다. 전처리 한 겔의 컬럼 충전은 컬럼을 수직 방향으로 세운 후, 컬럼 내에 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 이루어졌으며 컬럼부피가 450 mL 정도가 되도록 충분히 충전하였다.<sup>11</sup>

## 2.3. 겔 여과 크로마토그래피 구성

폴빅산의 분자량 분리에 사용된 겔 여과 크로마토그래피 시스템은 Peristaltic 펌프, 시료 주입기, 분자량 분리칼럼, UV 모니터 (Waters 486), 아날로그-디지털 변환기, 컴퓨터 등으로 구성하였다. 분자량 분리 컬럼은 Pharmacia C26 컬럼 (I.D.×L = 2.6×100 cm)을 사용하였으며 전처리 된 겔 (Sephadex G-50 fine)을 컬럼에 86 cm까지 채워 충전 부피가 457 mL가 되도록 하였다.

## 2.4. 표준 분자를 이용한 GFC 컬럼 교정

분자량과 용리부피 사이의 관계는 아세톤 (acetone: 58 Da), 덱스트란 블루 (Dextrane Blue: 2,000,000Da), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG: Polyethylene glycol) PEG 400 (400Da), PEG 1000 (1,000Da), PEG 4600 (4,600Da)을 사용하여 표준 분자들의 GFC-elution profile 을 작성하여 결정하였다. 표준 분자량 분포의 측정과정은 다음과 같다: (i) 용리액인 0.1 M NaClO<sub>4</sub> (pH=6) 용액 1,000mL로 컬럼을 통과시켜 평형을 이루게 한다 (ii) 표준 분자들을 0.1 M NaClO<sub>4</sub> (pH=6) 용액에 녹여 10 mg/mL 정도의 농도를 가지는 표준용액을 각각 만든다 (iii) 겔 표면이 흔들리지 않도록 아주 조심스럽게 Dextran blue 4.0 mL을 컬럼에 주입시킨다 (iv) 주입 직후 연동 펌프를 운전하여 1.6 mL/min의 유속으로 용리액을 흘려준다. (v) 출구 쪽 튜브를 UV 검출기에 연결한 후 254 nm (PEG의 경우 195 nm)에서 흡광도 곡선을 작성하고 피크 중앙에서의 부피를 확인하여 틱세부피 (V<sub>0</sub>)를 결정한다. (vi) 겔 표면이 흔들리지 않도록 아주 조심스럽

게 아세톤 4.0 mL을 주입한 후 피크 중앙에서의 부피를 확인하여 Total permeable volume (V<sub>i</sub>)을 결정한다. (vii) GFC 분자량 분리 컬럼의 보정을 위하여, PEG 표준물들을 4.0 mL 씩 주입한 후 피크 중앙에서의 부피를 확인하여 용리부피 (V<sub>e</sub>)를 결정한다. (viii) 여기서 얻어진 결과로부터 log(MW) 대 V<sub>e</sub>/V<sub>0</sub> 사이의 관계식을 구하여 표준 검량선을 작성한다.<sup>11</sup>

## 2.5. 폴빅산의 분자량 분리

분자량 분리는 폴빅산 농도 5 mg/mL (I=0.1 M NaClO<sub>4</sub>, pH=6) 의 시료 용액을 앞서 보정된 컬럼에 적용하여 표준 분자량 분포 측정에서와 동일한 과정으로 수행하였다. 즉, 폴빅산 시료용액 4.0 mL을 컬럼에 주입시킨 후, 연동 펌프를 운전하여 1.6 mL/min의 유속으로 용리액을 흘려주었다. 처음 틱세부피에 해당하는 부피는 버리고 100 mL간격으로 3회에 걸쳐서 시료 용액을 분리하였다.<sup>11</sup> 폴빅산의 총유기탄소 (Total Organic Carbon Contents) 함량은 TOC 분석기 (Model 5000A, SHIMADZU)를 사용하여 측정하였다.

## 2.6. 폴빅산의 Synchronous 형광분석

겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 3개의 분자량 영역으로 분리된 폴빅산의 형광 측정은 총유기 탄소농도 (TOC) 기준으로 16 mg C/L (I=0.1 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5)로 희석한 후, 이 용액 2~3 mL를 형광측정용 석영셀에 담아 실시하였다. 용액의 pH는 NaOH와 HClO<sub>4</sub>를 사용하여 5.0 ±0.1로 조정하였다. 형광분석은 Luminescence Spectrometer (Aminco-Bowman Series 2)를 사용하여, excitation mode와 emission mode 그리고 synchronous mode에서 측정하였다. Excitation 형광 스펙트럼은 방출 단색화 장치 (emission monochromator)를 550 nm에 고정시키고, 들뜨기 단색화 장치 (excitation monochromator)의 파장을 250~500 nm로 변화시키면서 측정하였다. Emission 형광 스펙트럼은 들뜨기 단색화 장치의 파장을 357 nm로 고정시켜 폴빅산을 여기 시킨 후 방출 단색화 장치의 파장을 370~600 nm변화시키면서 측정하였다. Synchronous 형광 스펙트럼은 두 단색화 장치 사이의 파장차이 (Δλ)를 30 nm로 설정한 후 290~600nm의 파장영역에서 측정하였다. 스펙트럼 측정시 들뜨기 단색화 장치의 슬릿 폭은 2 nm, 방출 단색화 장치의 슬릿 폭은 4 nm로 조정하였다. 모든 시료에 대해서 주사속도는 4 nm/s로 설정하여 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 표준분자의 분자량 분포

Fig. 1은 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 얻어진 아세톤, 텍스트란 블루, 폴리에틸렌 글리콜 표준분자들의 크로마토그램이다. 폴리에틸렌 글리콜은 pH 및 이온 강도의 변화에 의해 분자 크기의 변화가 작기 때문에 겔 여과 크로마토그래피의 컬럼 보정용으로 많이 사용된다.<sup>14</sup> 텍스트란 블루 (Mw = 2,000,000 Dalton)는 분자 크기가 Sephadex G-50 fine 겔의 내부 구멍(pore)보다 크기 때문에 틸세부피 ( $V_0$ )을 측정하는 데 사용하였으며, 아세톤은 분자크기가 작아 겔 내부의 모든 구멍 속으로 침투할 수 있으므로 total permeation volume ( $V_e$ )을 측정하는 데 사용하였다. 아세톤과 텍스트란 블루 분자크기의 사이에 있는 폴리에틸렌 글리콜은 표준검량선을 작성하는 데 사용하였다.

텍스트란 블루와 아세톤은 비교적 반나비 (half width)가 매우 작은 크로마토그램을 보여주었으나, PEG 표준분자들은 반나비가 상대적으로 넓은 크로마토그램을 나타

냈다. 또한, PEG-1000의 경우 부가 피크가 크로마토그램에 나타났다. 이는 본 실험에 사용된 PEG 분자들의 분자량분포가 상대적으로 넓은 것에서 기인한다. 텍스트란 블루를 사용하여 측정된 분자량 분리 시스템의 틸세부피는 130 mL이고, 아세톤을 사용하여 측정된 total permeation volume은 404 mL를 나타냈다. 용리부피 ( $V_e$ )와 표준분자의 분자량 ( $\log Mw$ )과의 관계를 Fig. 2에 나타냈다. 표준분자량이 400 Da, 1000 Da, 4600 Da 인 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 사용하여 분자량 분리 시스템을 보정한 결과, 용리부피 ( $V_e$ )와 표준분자의 분자량 ( $\log Mw$ ) 사이에 식 (1)과 같은 관계식이 얻어졌다.

$$\log Mw = 4.743 - 0.006 \times V_e \quad (1)$$

#### 3.2. 폴빅산의 분자량 분포

한라산 토양에서 추출한 폴빅산의 겔 크로마토그램을 Fig. 3에 나타냈다. 폴빅산의 크로마토그램은 비교적 대칭을 보였으나, 용출 부피가 420 mL인 영역에서 아주 작은 어깨 피크를 보였다.

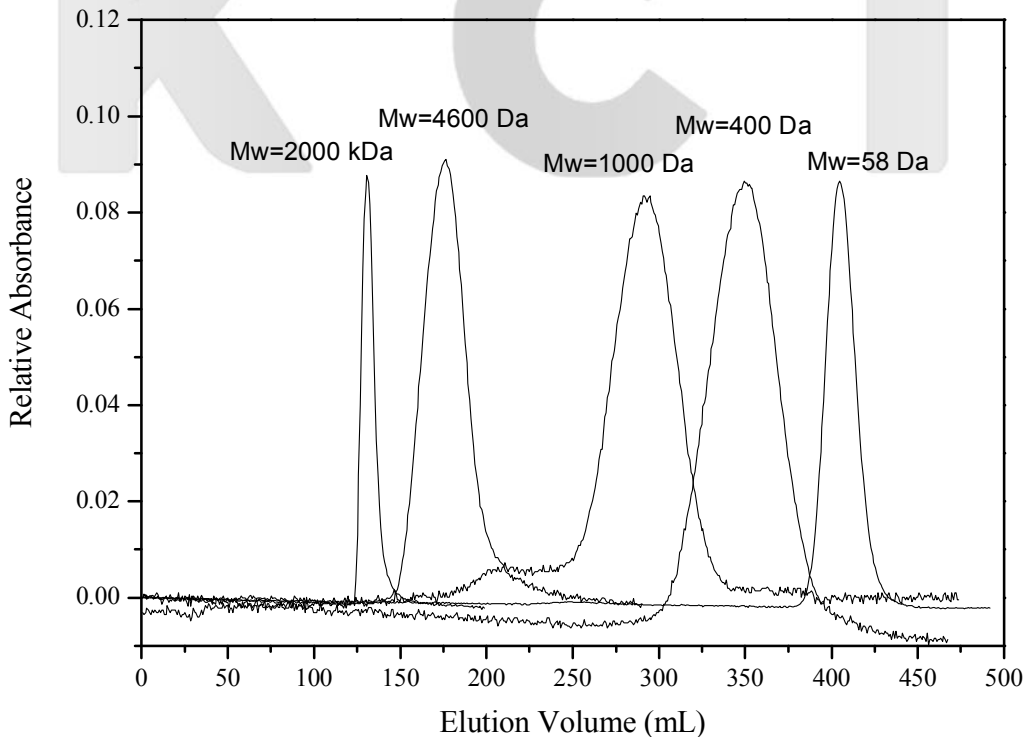


Fig. 1. GFC-elution profiles of calibration standard molecules: Dextran Blue, PEG-4,600, PEG-1000, PEG-400, Acetone (starting from the left).

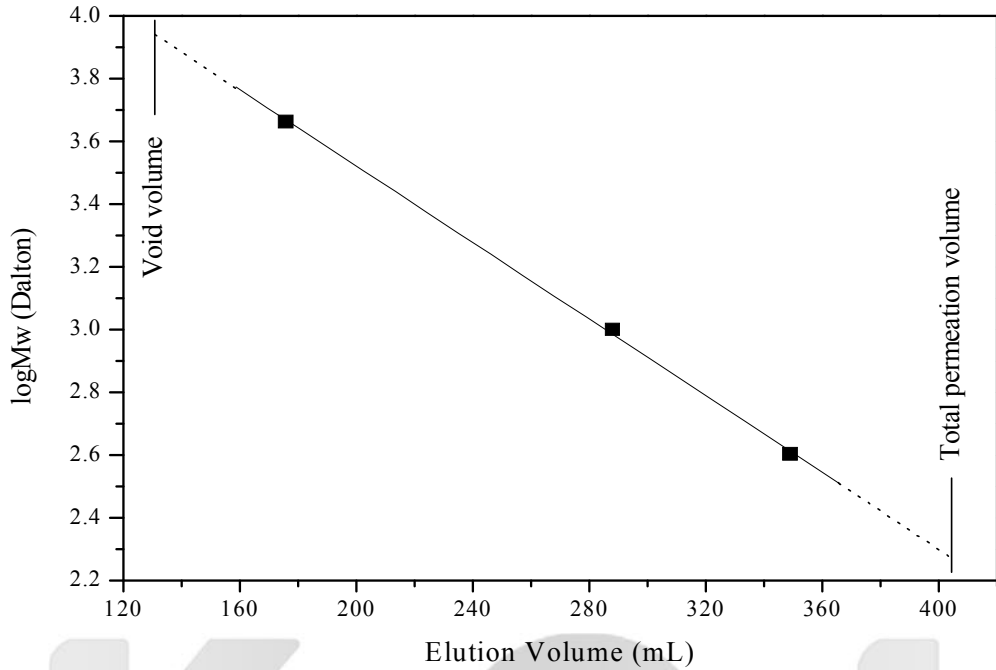


Fig. 2. Molecular weight calibration in Dalton as a function of the GFC-elution volume.

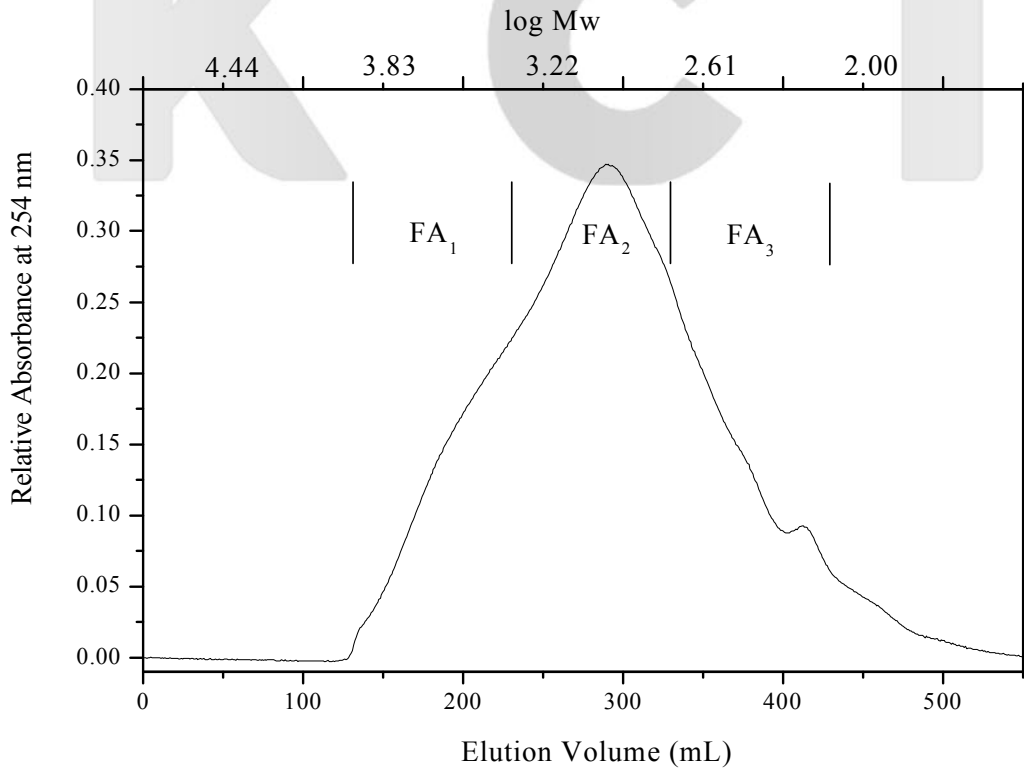


Fig. 3. Gel filtration chromatogram of soil fulvic acid (5 mg/ml) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at pH=5.0.

Table 1. Characteristics of the soil fulvic acid fractionated by the gel permeation chromatography and their luminescence properties

Fulvic acid fraction	Elution volume ( ml )	Molecular weight (Dalton)	TOC mg C/ l	Rel. excitation intensity <sup>a</sup>	Rel. emission intensity <sup>b</sup>	Synchronous I <sub>498nm</sub> /I <sub>390nm</sub> <sup>c</sup>
FA0	-	190 ~ 8,900	34	1.00	1.00	1.27
FA1	130 ~ 230	2,200 ~ 8,900	16	0.25	0.14	2.46
FA2	230 ~ 330	540 ~ 2,200	31	0.91	0.90	0.90
FA3	330 ~ 430	190 ~ 540	20	1.24	1.47	0.67

<sup>a</sup>The excitation fluorescence intensity at 357 nm of the fractionated fulvic acids relative to that of the unfractionated fulvic acid(FA<sub>0</sub>). The concentration of each sample is 16 mg C/ l.

<sup>b</sup>The emission fluorescence intensity at 450 nm of the fractionated fulvic acids relative to that of the unfractionated fulvic acid(FA<sub>0</sub>). The concentration of each sample is 16 mg C/ l.

<sup>c</sup>The synchronous fluorescence intensity ratios, I<sub>498nm</sub>/I<sub>390nm</sub>, for the unfractionated and fractionated fulvic acids. The concentration of each sample is 16 mg C/ l.

폴빅산 4.0 mL을 컬럼에 주입한 후 틴새부피에 해당하는 130 mL을 버리고, 그룹 I (130 ~ 230 mL), 그룹 II (230 ~ 330 mL), 그룹 III (330 ~ 430 mL)의 세 그룹으로 폴빅산을 분리하였다. 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 얻어진 폴빅산의 분자량 분리 결과를 Table 1에 정리하였다. 폴빅산을 세 그룹의 분자량별로 분리한 결과, 그룹 I (FA<sub>1</sub>)은 2200 Da ~ 8900 Da의 분자량 분포를, 그룹 II (FA<sub>2</sub>)는 540 Da ~ 2200 Da, 그룹 III (FA<sub>3</sub>)은 190 Da ~ 540 Da의 분자량 분포 나타났다. 제주 한라산에서 추출한 폴빅산의 겔 여과 크로마토그래피 분석결과 190 ~ 8900 Da의 분자량 분포를 보였으며, 피크점에서의 분자량(M<sub>wp</sub>)은 930 Da 이었다. 분리된 폴빅산의 TOC 분석을 실시한 결과 FA<sub>1</sub>은 16 mg C/L, FA<sub>2</sub>는 31 mg C/L, FA<sub>3</sub>은 20 mg C/L의 총유기탄소 함량을 나타냈다.

### 3.3. 폴빅산의 형광 특성

Fig. 4는 그룹 I~III의 폴빅산에 대한 들뜸 스펙트럼을 보여준다. 분자량 분포별 폴빅산 (16 mg C/ l)의 excitation 형광스펙트럼은 345 ~ 365 nm와 380 ~ 395 nm에서 다소 넓은 특성 피크를 보였으며, 450 nm, 463 nm, 468 nm에서 특징적인 피크를 나타냈다. 분자량 분포별 폴빅산의 들뜸 형광스펙트럼 분석결과는 Table 1에 정리하였다. 상대적인 excitation 형광피크세기는 I<sub>345-365 nm</sub> > I<sub>380-395 nm</sub> > I<sub>450-468 nm</sub> 순서를 나타냈다. Senesi 가 보고한 토양 폴빅산의 들뜸 형광스펙트럼은 분해능이 좋지 않았으며, 상대적인 피크세기 380 ~ 395 nm에서 가장 강한 형광세기를 보였다.<sup>15</sup> 그러나 Ghosh 등이 보고한 토양 폴빅

산의 가장 강한 들뜸 형광피크 (360 nm)는 본 연구에서 보고한 파장영역과 잘 일치하였다.<sup>16</sup> 들뜸 형광 스펙트럼은 357 nm에서 가장 강한 형광세기를 나타냈다. 그러므로 방출 스펙트럼 측정 시 폴빅산의 여기파장으로 357 nm를 사용하였다. Table 1에 정리된 357 nm에서 excitation 형광세기는 FA<sub>3</sub> > FA<sub>0</sub> > FA<sub>2</sub> > FA<sub>1</sub> 순이었으나, 468 nm (π-결합으로 연결된 방향족 화합물의 fluorescent)에서는 FA<sub>0</sub> > FA<sub>3</sub> > FA<sub>2</sub> > FA<sub>1</sub> 순으로 FA<sub>3</sub>의 형광세기가 비 분리 폴빅산인 FA<sub>0</sub> (폴빅산 원액 5 mg/mL의 50배 희석액)보다 낮았다. 이는 저 분자량 영역인 FA<sub>3</sub> 분자가 π-결합으로 연결된 방향족 화합물을 상대적으로 적게 함유하고 있음을 의미한다. 폴빅산을 구성하고 있는 분자성분 중 357 nm에서 최대 형광세기를 나타내는 단량체 유기분자로는 protocatechuic acid, caffeic acid, ferulic acid, β-naphthols, coumarin 유도체, quinoline 유도체 등이 보고되고 있다.<sup>15</sup>

Fig. 5는 그룹 I~III의 폴빅산에 대한 방출 스펙트럼을 보여준다. 방출 스펙트럼은 특성피크를 나타내지 않았으며, 450 nm에서 피크점을 보이며 전체적으로 넓은 스펙트럼을 나타냈다. 이는 전형적인 토양 폴빅산의 방출 형광 스펙트럼의 피크영역인 435 ~ 465 nm에 해당한다.<sup>16</sup> 분자량 분리된 폴빅산 (FA<sub>1-3</sub>) 16 mg Carbon/L의 방출 스펙트럼 (들뜨기 파장 = 357 nm, 측정파장 = 370 ~ 450 nm)을 분석한 결과는 Table 1에 나타났다. 비 분리 폴빅산 (FA<sub>0</sub>)의 형광세기를 1.00로 보았을 때 FA<sub>1</sub>은 0.14, FA<sub>2</sub>는 0.90, FA<sub>3</sub>은 1.47로서 분자량이 작을수록 방출 형광세기가 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 형광세기 변화는 다른 지역의 휴믹물질에 대하여 관측된 경향과도 일치한다.<sup>14</sup>

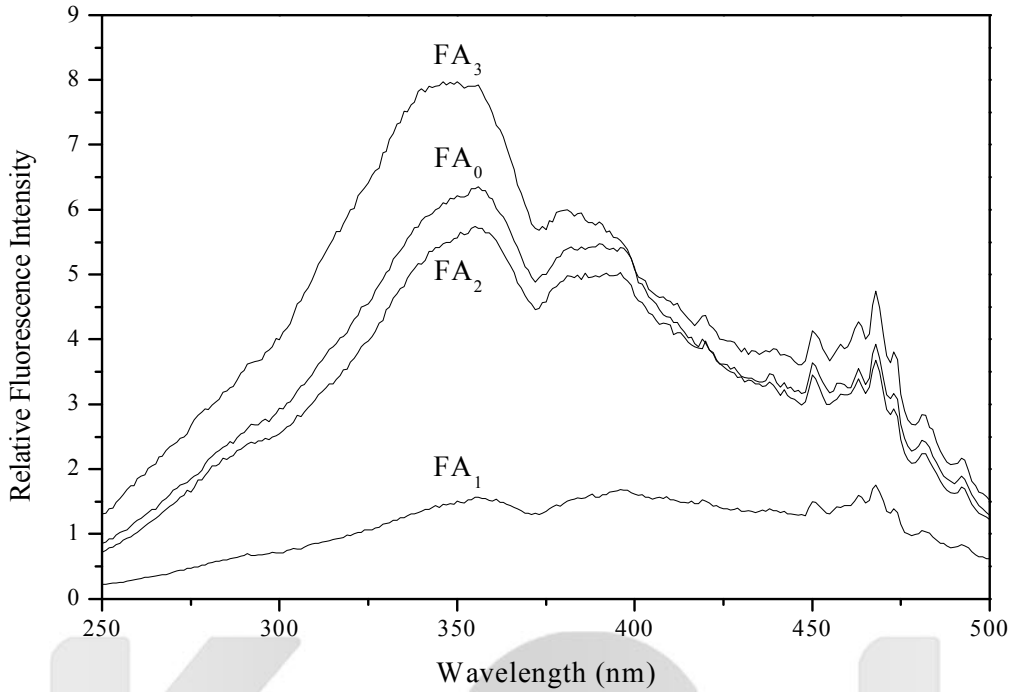


Fig. 4. Excitation mode fluorescence spectra of the fractionated fulvic acids (16 mg C/L) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at pH=5.0: FA<sub>0</sub> (unfractionated fulvic acid), FA<sub>1</sub> (2,200~8,900Da), FA<sub>2</sub> (540~2,200Da), FA<sub>3</sub> (190~540Da).

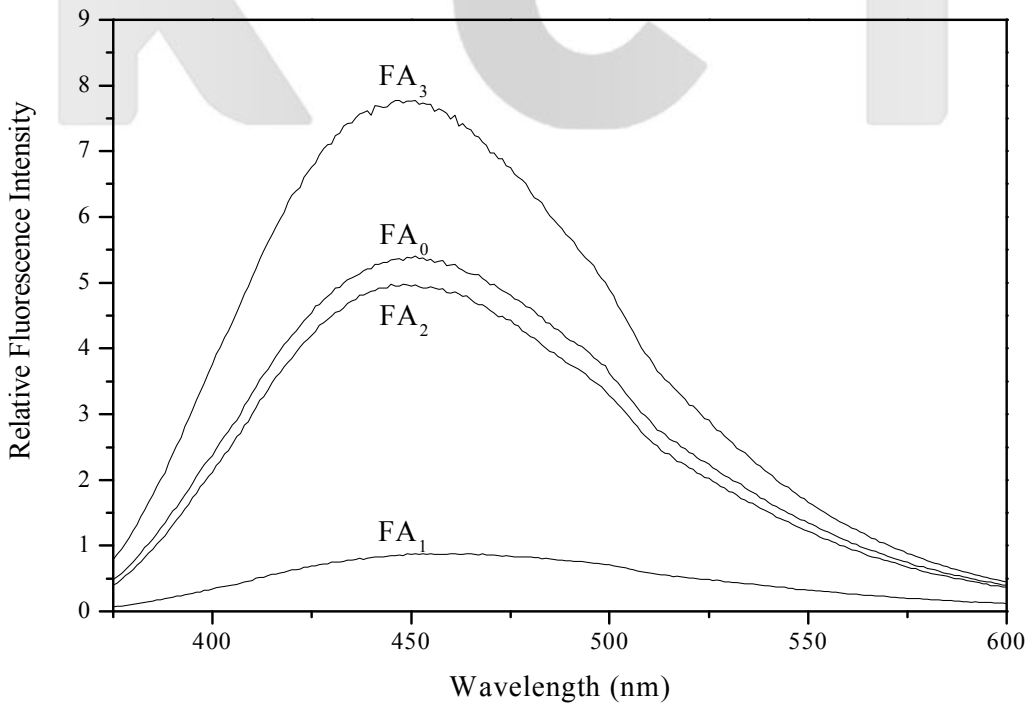


Fig. 5. Emission mode fluorescence spectra of the fractionated fulvic acids (16 mg C/L) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at pH=5.0: FA<sub>0</sub> (unfractionated fulvic acid), FA<sub>1</sub> (2,200~8,900Da), FA<sub>2</sub> (540~2,200Da), FA<sub>3</sub> (190~540Da).

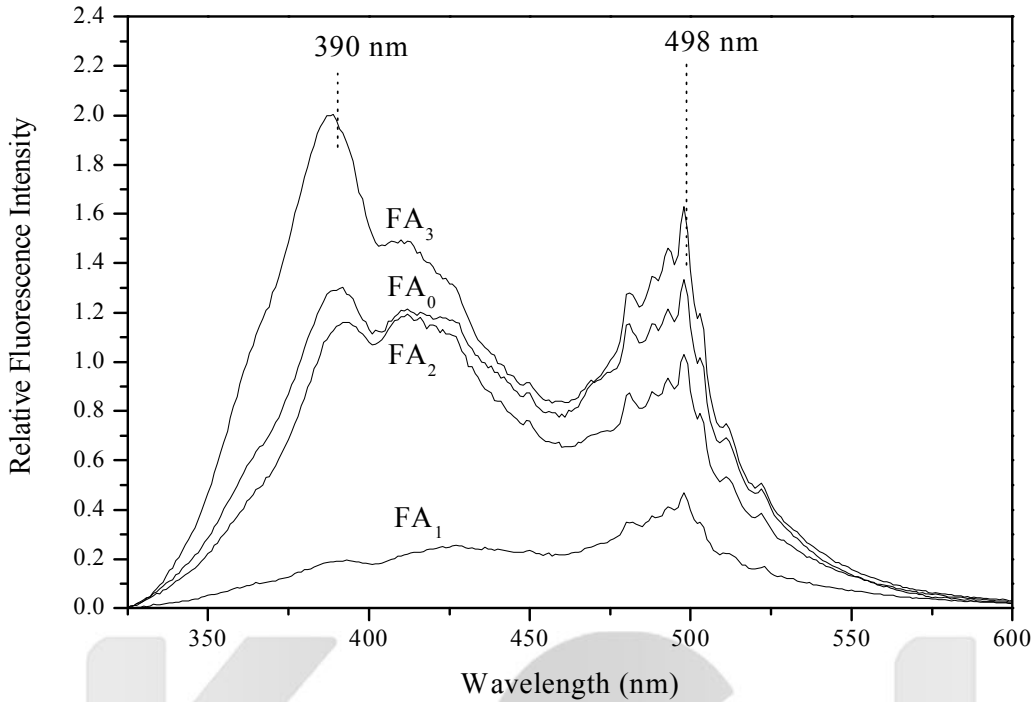


Fig. 6. Synchronous mode fluorescence spectra of the fractionated fulvic acids (16 mg C/L) in 0.1 M NaClO<sub>4</sub> at pH=5.0: FA<sub>0</sub> (unfractionated fulvic acid), FA<sub>1</sub> (2,200~8,900Da), FA<sub>2</sub> (540~2,200Da), FA<sub>3</sub> (190~540Da).

폴빅산의 발색단에 대한 정보는 synchronous 형광분석에 의해서 보다 명확히 확인할 수 있다.<sup>15,17</sup> Synchronous 형광스펙트럼은 들뜸 형광스펙트럼과 방출 형광스펙트럼의 특징을 동시에 포함하면서 높은 분해능을 제공하기 때문에 유용하게 이용될 수 있다. 겔 여과 크로마토그래피로 분리된 분자량 분포별 폴빅산의 synchronous 형광스펙트럼 (Fig. 6)은 390 nm와 400~460 nm 및 498 nm에서 특이적인 세 개의 피크를 나타냈으며, 분자량별로 각 피크들의 상대비가 다른 특징적인 스펙트럼을 나타냈다.

고 분자량의 폴빅산 (FA<sub>1</sub>)에서는  $\pi$  결합으로 연결된 방향족 화합물의 형광의 피크 세기가 커지며 저 분자량의 폴빅산 (FA<sub>3</sub>)에서는 390 nm (-OH기나 -COOH기를 가진 단순 방향족 화합물의 형광)에서의 피크가 상대적으로 커졌다. 분자량 분포별 폴빅산의 synchronous 형광스펙트럼 분석결과는 Table 1에 제시하였다. 분자량별 구조 차이를 나타내는 형광피크의 상대비 ( $I_{498nm} / I_{390nm}$ )는 FA<sub>1</sub> > FA<sub>2</sub> > FA<sub>3</sub> 순으로 분자량이 클수록 증가하였다. 이와 같은 결과는 고 분자량의 폴빅산이 저 분자량의 폴빅산에 비해  $\pi$  결합으로 연결된 방향족 고리의 축합도 증가 또는 방향족 고리와 컨주게이션을 형성하는 다양한 치

환기가 결합된 좀더 복잡한 구조임을 제시한다. 따라서, 고 분자량의 폴빅산 일수록 소수성을 띠어 토양수내에서의 용해성이 감소하고 토양 층을 따른 이동성이 낮을 것으로 예측된다. 이러한 결과는 앞서 발표한 깊이별 토양 시료에서 추출한 폴빅산 분자의 분자량 분포 분석결과와도 일치하는 것으로서 표층에 비하여 심층에 존재하는 토양 폴빅산 일수록 저 분자량 영역의 분포 함량이 높은 이유를 설명한다.<sup>8</sup>

#### 4. 결 론

본 연구에서는 국내 토양에 존재하는 휴믹물질의 특성자료에 대한 데이터베이스 구축을 위한 연구의 일환으로서 제주 지역의 토양에서 추출한 폴빅산의 분자량 분포특성 및 형광특성을 분석하였다. 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 폴빅산의 분자량 분포를 확인할 수 있었고, 형광분석을 통하여 분자량 영역별 폴빅산의 excitation, emission, synchronous 형광특성을 밝힐 수 있었다. 이상에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) GFC 분자량 분리시스템 교정 결과, 분자량 분리시



스텝의 void volume은 130 mL이고, total permeation volume은 404 mL을 나타냈다. 용리부피 ( $V_e$ )와 표준분자의 분자량( $\log M_w$ ) 사이에는  $\log M_w = 4.743 - 0.006 \times V_e$ 의 관계식을 나타냈다.

- (2) 풀빅산의 분자량 분리 결과, 풀빅산은 190~8,900 Da의 분자량 분포를 보였으며 피크점에서의 분자량( $MW_p$ )은 930 Da이었다. 틸새부피 용리후 100 mL씩 수집하여 3개 영역으로 분자량을 분리한 결과, FA<sub>1</sub>은 2,200 Da~8,900 Da, FA<sub>2</sub>는 540 Da~2,200 Da, FA<sub>3</sub>은 190 Da~540 Da의 분자량 분포 나타냈다. 각 분자량 영역의 총 유기탄소함량 (TOC)은 FA<sub>1</sub>이 16 mg C/L, FA<sub>2</sub>는 31 mg C/L, FA<sub>3</sub>은 20 mg C/L을 나타냈다.
- (3) 방출 형광분석 결과, 풀빅산의 방출 형광스펙트럼은 345~365 nm와 380~395 nm에서 다소 넓은 특성 피크를 보였으며, 450 nm, 463 nm, 468 nm에서 특이적인 형광 피크를 나타냈다. 상대적인 excitation 형광피크세기는  $I_{345-365nm} > I_{380-395nm} > I_{450-468nm}$  순서를 나타냈다. 분자량별 풀빅산의 방출 형광세기는 FA<sub>3</sub> > FA<sub>2</sub> > FA<sub>1</sub> 순서를 나타냈다.
- (4) 방출 형광분석 결과, 방출 스펙트럼은 특성피크를 나타내지 않았으며 450 nm에서 피크점을 보이며 전체적으로 넓은 스펙트럼을 나타냈다. 분자량 분리를 하지 않은 풀빅산 (FA<sub>0</sub>)의 상대 형광세기가 1.00 일 때 FA<sub>1</sub>은 0.14, FA<sub>2</sub>는 0.90, FA<sub>3</sub>은 1.47로서, 분자량이 작을수록 방출 형광세기는 증가하는 경향을 보였다.
- (5) Synchronous 형광분석 결과, 분자량 분포별 풀빅산의 synchronous 형광스펙트럼은 390 nm와 400~460 nm 및 498 nm에서 특이적인 세 개의 피크를 나타냈다. 분자량별 구조 차이를 나타내는 형광피크의 상대비 ( $I_{498nm}/I_{390nm}$ )는 분자량이 클수록 증가하였다. 이상에서 얻어진 토양 풀빅산의 분자량 분포 특성 및 형광특성 자료는 앞서 발표된 결과와 함께 국내 토양 휴믹물질의 특성 자료에 대한 데이터베이스 구축 및 토양 오염물질의 거동 평가를 위한 토양 유기물의 물리화학적 역할을 이해하는데 중요한 기초자료로 활용될 수 있다.

### 감사의 말씀

이 연구는 과학기술부가 주관하는 원자력 중장기 연구의 일환으로 수행되었습니다.

### 참고 문헌

- P. J. Couhrtrey, M. C. Throne and D. Jackson, "Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems", Vol. 1., edited by A.A. Balkema, Rotterdam, 1986.
- M. Yamato, S. Yamamori, K. Komura and M. Sakanoue, *J. Radiat. Res.*, **21**, 204-210(1980).
- G. I. Agapkina, F. A. Tikhomirov and L. V. Berketova, *J. Environ. Radioactivity*, **29**, 257-269 (1995).
- Y. Fujikawa and M. Fukui, *Water, Air, and Soil Pollution*, **131**, 305-328(2001).
- F. J. Stevenson, "Geochemistry of Soil Humic Substances, in Humic Substances in Soil, Sediment and Water" pp 13-52, edited by G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw and Patrick MacCarthy, John Wiley & Sons, U.S.A., 1985.
- F. J. Stevenson, "Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions", pp 453-471, Wiley, New York, U.S.A., 1994.
- H. S. Shin and G. R. Choppin, *Radiochimica Acta*, **86**, pp. 167~174(1999)
- H. S. Shin, D. S. Rhee, K. H. Chung and C. W. Lee, *Anal. Sci. Technol.*, **15**(4), 373-380(2002)
- H. S. Shin, C. H. Lee, D. S. Rhee, K. H. Chung and C. W. Lee, *Anal. Sci. Technol.*, **16**(4), 283-291(2003).
- C. H. Lee, H. S. Shin, K. H. Chung, Y. H. Cho and C. W. Lee, *J. Korea Asso. Radiat. Prot.*, **28**(3), 165-172(2003)
- C. W. Lee, Y. H. Cho, M. H. Lee, G. S. Choi, K. H. Chung, W. Lee, G. M. Lim, H. K. Park, D. W. Park, G. H. Hong, M. K. Kim and H. P. Lee, "Development of Monitoring Technology for Environmental Radioactivity", KAERI/RR-2344/2002, 2002.
- M. H. Lee and C. W. Lee, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**(3), 471-476(1999).
- IHSS. Isolation of IHSS soil fulvic and humic acids. *International Humic Substances Society*, <http://www.ihss.gatech.edu/>.

14. C. F. Lin, D. Y. Lee, W. T. Chen, and K. S. Lo, *Environ. Pollut.*, **87**, 181-187(1995).
15. N. Senesi, *Anal. Chim. Acta*, **232**, 77-106(1990).
16. K. Ghosh and M. Schnitzer, *Can. J. Soil Sci.*, **60**, 373(1980).
17. T.M. Miano and N. Senesi, *Sci. Total Environ.*, **117/118**, 41-51(1992).

K C I