

액체크로마토그래피-형광검출법에 의한 호소시료의 아나톡신-a 분석

이인정★ · 이철구 · 허성남 · 이재관

국립환경과학원 낙동강물환경연구소
(2011. 5. 4. 접수, 2011. 5. 18. 승인)

Analysis of anatoxin-a in aqueous and cyanobacterial samples from korean lakes by liquid chromatography with fluorescence detection

Injung Lee★, Chulgu Lee, Seongnam Heo and Jaegwan Lee

*Nakdong River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research
Pyeong-Ri, Dasan-Myun, Goryoung-Gun, Gyeonbuk 717-873, Korea*

(Received May 4, 2011; Accepted May 18, 2011)

요약: 아나톡신-a는 *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등의 남조류에서 생성되는 신경독소로 강한 독성을 나타낸다. 국내에서는 영천호 등의 호소에서 최근 *Anabaena*에 의한 수화현상이 늘어나고 안전할 상수원수의 확보를 위하여 아나톡신-a의 미량분석이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 아나톡신-a를 고상추출한 뒤 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)로 형광 유도체화시켜 고성능액체크로마토그래피-형광검출기(HPLC-FLD)로 분석하였다. 시험방법 validation 결과 직선성, 회수율, 재현성에서 모두 좋은 값을 나타내었으며, 방법검출한계(MDL)은 조체 시료의 경우 0.034 µg/g, 물 시료의 경우 0.022 µg/L로 비교적 좋은 감도를 얻을 수 있었다. 국내 안동호, 영천호 및 대청호에서 채취한 조체와 물 시료에서 아나톡신-a의 농도를 분석한 결과 조체 시료에서는 0.135~10.979 µg/g의 농도로 검출되었으며, 물 시료에서는 검출되지 않았다.

Abstract: Anatoxin-a is a cyanobacterial neurotoxin with a high toxicity produced by *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Oscillatoria*. Water bloom, formed by *Anabaena* has been occurring frequently in Lake Yeongchun. It is need to develop a sensitive method for determination of anatoxin-a to control potential hazard in raw water resources. In this study, we developed a highly sensitive analytical method of anatoxin-a using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Anatoxin-a was converted into a highly fluorescent derivative using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBF-F). The method was evaluated in terms of linearity of calibration curve, recovery and repeatability, and the adequate values were obtained. The method detection limit was 0.034 µg/g and 0.022 µg/L for algal and water samples, respectively. The concentrations of anatoxin-a were measured in algal and water samples from Lake Andong, Yeongchun and Daechung and ranged from 0.135 µg/g to 10.979 µg/g in algal samples and not detected in water samples.

Key words: anatoxin-a, SPE, HPLC, fluorescence detection

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)54-950-9721 Fax : +82-(0)54-950-9725

E-mail : ijlee@me.go.kr

www.kci.go.kr

1. 서 론

국내 대형 인공호를 비롯한 여러 호소에서 부영양화가 진행되면서 남조류에 의한 수화현상(water blooming)이 빈번하게 발생하고 있다. 상수원으로 사용되고 있는 호소에서 남조류의 대량발생은 수돗물에 불쾌한 냄새와 맛을 내는 원인이 되기도 하며, 일부 남조류는 독성물질을 생성하는 것으로 알려져 있어 가축 및 인간의 건강에 심각한 위협이 될 수 있다. 1870년대 호주에서 *Nodularia*에 의한 가축 피해가 최초로 보고된 이래로 미국, 캐나다, 영국, 일본 등 여러 나라에서 유독 남조류에 의한 동물의 피해가 보고되고 있다. 독소를 생성하는 주요 남조류로는 *Anabaena*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* 등이 있으며, 이들에 의해 생산되는 독소는 크게 간장독소(hepatotoxin)와 신경독소(neurotoxin)로 나눌 수 있다. 독소를 생산하는 남조류 중에서 가장 널리 알려진 종인 *Microcystis aeruginosa*는 국내의 대부분 호소에서도 하계에 우점종으로 나타나고 있으며, microcystin이라는 대표적인 간장독소(hepatotoxin)를 생산한다. 신경독소(neurotoxin)로는 anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin 등이 있으며 *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다.^{1,2}

남조류의 독성물질에 대한 연구는 호주, 일본, 미국 등의 선진국에서 뿐만 아니라 국내에서도 활발히 진행되어 '98년부터 환경부에서는 독성 남조류에 의한 피해를 최소화하기 위하여 주요 상수원에 대해 조류예보제를 시행하고 있으며, microcystin을 중심으로 한 남조류 독소의 관리가 이루어지고 있다. 하지만 최근 영천호 등에서는 *Microcystis* 이외에 *Anabaena*가 우점한 수화현상이 자주 발생하면서 안전한 상수원수의 확보를 위하여 아나톡신-a의 미량분석 및 관리가 필요한 실정이다.³

아나톡신-a는 *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* 등의 남조류에서 생성되는 신경독소로 근육신경에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 수송을 방해하며 강한 독성을 나타낸다(LD₅₀ i.p. mouse 200 µg/kg). 아나톡신-a(2-acetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene)는 비교적 분자량이 작은 bicyclic secondary amine 화합물이며, pKa 값은 9.6으로 환경 중에서는 주로 양이온의 형태로 존재한다.^{1,2} 아나톡신-a는 남조류 독소 중 그 구조가 일찍부터 밝혀져, 얇은막 크로마토그래프(TLC),² 자외선/가시광선 검출기(UVD)또는 형광검출기(FLD)를 이용한 고성능액체크로마토그래프(HPLC),^{2,4-7} 기체

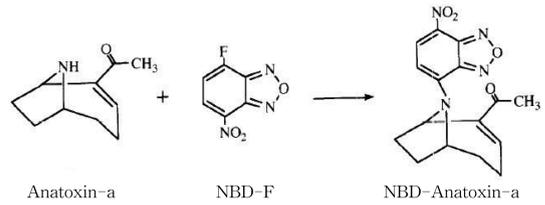


Fig. 1. Structural formula of anatoxin-a and reaction scheme for the fluorimetric derivatization of anatoxin-a with NBD-F.

크로마토그래프(GC),⁸ 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS),^{4,9} 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS)¹⁰⁻¹² 등을 이용한 다양한 분석방법들이 개발되었다. 이들 방법 중에서 아나톡신-a를 고성능액체크로마토그래프-형광검출기(HPLC-FLD)나 GC로 분석하기 위해서는 유도체화 과정이 필요하며, 그 외 분석방법에서도 감도를 높이거나 방해물질과의 분리 등을 위해서 다양한 유도체화 반응을 이용하는 것으로 알려져 있다.^{5-9,11}

아나톡신-a를 분석하는 여러 가지 방법들 중에서 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)로 형광 유도체화시켜 HPLC-FLD로 분석하는 방법은 TLC나 HPLC-UV 분석방법에 비해 감도가 좋고, MS검출기를 사용한 분석방법들에 비해 기기장치가 비교적 간단하며, 비용이 적게 들고, 시료 속에 존재하는 다른 물질들에 의한 방해효과가 적어 미량까지 분석이 가능하다. NBD-F는 아미노산이나 아민류 등을 분석하는데 있어 형광 검출을 위한 유도체 시약으로 주로 이용되는데, 아나톡신-a와 반응하여 형광을 띄는 NBD-아나톡신-a를 생성하여 HPLC-FLD로 미량분석이 가능하다(Fig. 1).

본 연구에서는 아나톡신-a를 고상추출한 뒤 NBD-F로 형광 유도체화시켜 HPLC-FLD로 분석하였으며, 낙동강 수계의 안동호, 영천호 및 금강수계의 대청호를 대상으로 2008년 남조류가 우점한 시기를 중심으로 조체 시료 및 물 시료에서 아나톡신-a의 농도를 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 기구

아나톡신-a 표준물질은 Tocris사 (Bristol, UK)의 (±)anatoxin-a fumarate 시약을 구입하여 사용하였으며, 형광유도체화 시약인 NBD-F는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 메탄올과 아세트니

트릴은 Merck사 (Darmstadt, Germany)의 잔류농약 분석용 시약 및 J. T. Baker (NJ, USA)사의 HPLC 등급 시약을 이용하였으며, 그 외 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다. 고상 추출법 (SPE)에 사용한 WCX (500 mg, 6 mL) 카트리지와 vacuum manifold는 Supelco사 (Bellefonte, PA, USA)의 제품을 이용하였다. 시료의 농축을 위해 Zymark사의 TurboVap LV 질소농축기를 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3 차 증류수를 이용하였으며, 실험에 사용하는 모든 유리기구는 사용하기 전에 3 차 증류수로 세척한 후 건조시켜 사용하였다. 조체 표준시료로는 *Anabaena flos-aquae*(영국 CCAP), *Anabaena variabilis*(영남대학교 해양연구센터) 2 종의 남조류 균주를 구매하여 실험실에서 배양하여 사용하였다.

2.2. 시료채취

낙동강 수계의 다목적댐인 안동호, 용수 전용댐인 영천호 및 금강 수계의 대청호를 대상으로 2008년 남조류가 우점한 시기를 중심으로 시료를 채취하여 아나톡신-a의 분석을 실시하였다. 세포내 독소함량을 조사하기 위하여 플랑크톤 네트로 조체 시료를 채취한 뒤 동결 건조하여 사용하였고, 물속에 녹아있는 독소

함량은 표층수를 채취하여 조사하였다.

2.3. 시료 전처리

2.3.1. 물 시료

물 시료는 먼저 유리섬유여지(grade C, GF/C)로 여과한 뒤 WCX 6 mL 카트리지를 이용한 SPE로 전처리하였다. 여과한 시료는 SPE로 전처리하기 전에 pH 7로 맞추고, WCX 카트리지는 메탄올 6 mL 와 증류수 6 mL로 컨디셔닝하였다. 컨디셔닝된 카트리지에 시료 10 mL를 통과시켜 아나톡신-a를 흡착시킨 뒤 메탄올-증류수(1:1) 3 mL로 카트리지를 씻어 주었다. 공기를 불어 넣어 카트리지를 말린 다음 0.2% trifluoroacetic acid(TFA)-메탄올 용액 10 mL로 아나톡신-a를 용출시켜, 40 °C에서 TurboVap LV 질소농축기로 용매를 완전히 날린 뒤 형광유도 체화 반응을 시켰다(Fig. 2).

2.3.2. 조체 시료

조체 표준시료로 *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena variabilis* 2 종의 남조류 균주를 구매하여 실험실에서 배양하였다. BG11 배지를 사용하여 25 °C에서 광배양한 뒤 동결 건조하여 분석에 이용하였다. 열

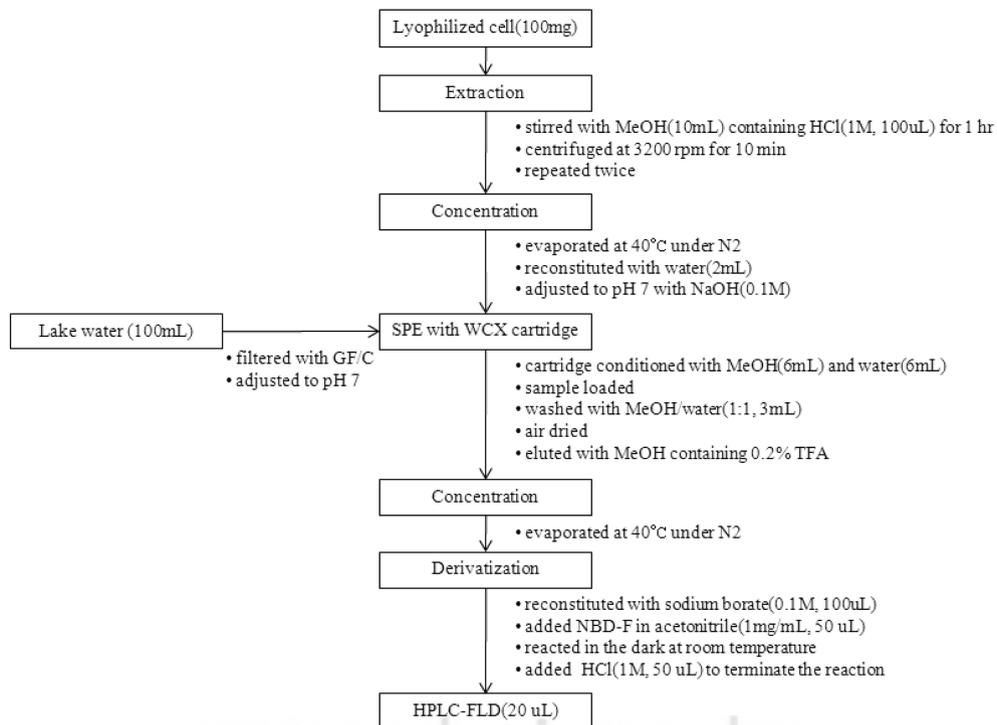


Fig. 2. Procedure used for extraction of anatoxin-a from algal and water samples.

렸다 녹이기를 반복하면서 동결 건조된 남조류 시료 약 100 mg에 1 M 염산 100 μ L를 포함한 메탄올 용액 10 mL를 가하여 1 시간 동안 교반시킨 후 3200 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 과정을 2 회 더 반복하여 추출액을 합하고, 40 °C에서 TurboVap LV 질소농축기로 용매를 완전히 날린 뒤 물 2 mL에 다시 녹여 이후는 물 시료와 동일하게 전처리하였다. 실제 호소에서 채취한 조체 시료도 위와 같은 과정으로 동결 건조하여 전처리하였다(Fig. 2).

2.4. HPLC-FLD

2.4.1. 형광 유도체화 반응

표준액 또는 전처리한 시료를 질소 기류 하에 용매를 완전히 날린 뒤 0.1 M sodium borate 용액 100 μ L를 가하였다. 여기에 아세토니트릴에 녹인 NBD-F 용액(1 mg/mL) 50 μ L를 가한 뒤 빛을 차단한 채 상온에서 10분간 반응시켰다. 1 M 염산 50 μ L를 가하여 반응을 종결시킨 후 20 μ L를 HPLC에 주입하여 분석하였다(Fig. 2).

2.4.2. 기기 분석조건

HPLC 시스템은 Waters 600 Controller, pump, Waters 474 형광검출기로 구성되었으며, 칼럼은 Agilent XDB-C18 (4.6 \times 150 mm \times 5)을 이용하였다. 이동상으로 아세토니트릴-물(40:60, v/v)을, 0.8 mL/min의 유속으로 사용하였다. 형광검출기는 excitation 470 nm, emission 530 nm의 파장에서 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Method validation

3.1.1. 검정곡선

10~200 ng 범위에 해당하는 아나톡신-a 표준액을 형광 유도체화시키고 HPLC에 주입하여 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선 각 단계마다 3회씩 분석하였으며, r^2 값은 0.9993으로 좋은 직선성을 얻었다(Fig. 3).

3.1.2. 방법검출한계 및 정량한계

방법검출한계(MDL)와 정량한계(LOQ)는 물 시료의 경우 1 μ g/L의 농도가 되도록 아나톡신-a 표준액을 증류수에 첨가하고, 조체 시료의 경우 아나톡신-a가 포함되어 있지 않은 동결 건조된 조체 시료에 0.1 μ g/g의 농도가 되도록 아나톡신-a 표준액을 첨가하여 각

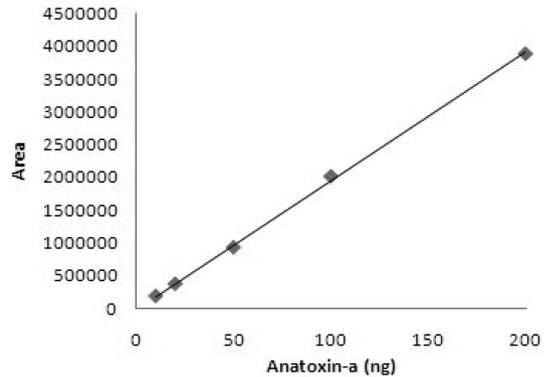


Fig. 3. Calibration curve of anatoxin-a by HPLC.

Table 1. Method detection limit (MDL) and limit of quantitation (LOQ) of the method

Type of matrix	Spiked conc.	n	MDL	LOQ
Water (μ g/L)	1.0	7	0.022	0.070
Algae (μ g/g)	0.1	7	0.034	0.110

시료를 실험절차와 동일하게 분석하였다. MDL은 각 7 회 측정된 값의 표준편차에 3.14를 곱한 값으로 구하고, LOQ는 10을 곱한 값으로 구한 결과, MDL은 물 시료의 경우 0.022 μ g/L, 조체 시료의 경우 0.034 μ g/g으로 비교적 좋은 감도를 얻을 수 있었다. LOQ는 물 시료의 경우 0.070 μ g/L이며, 조체 시료의 경우의 0.110 μ g/g으로 나타났다(Table 1).

3.1.3. 회수율 및 재현성

증류수 및 아나톡신-a가 포함되어 있지 않은 동결 건조된 조체 시료에 농도가 각각 10 μ g/L, 1 μ g/g가 되도록 아나톡신-a의 표준액을 가한 뒤 전처리 과정을 모두 거쳐 분석한 결과와 전처리 과정을 거치지 않고 바로 형광유도체화 반응을 시킨 동일한 농도의 표준액의 분석결과를 비교하여 회수율을 측정하였다. 각 시료마다 5 회 반복하여 측정하였으며, 측정된 회수율

Table 2. Recovery and repeatability of anatoxin-a from spiked samples

Type of matrix	Spiked conc.	n	Recovery (Mean, %)	RSD (%)
Water	10 (μ g/L)	5	89.2~91.0 (90.1)	4.0
Algae	1 (μ g/g)	5	85.8~92.8 (88.7)	4.1

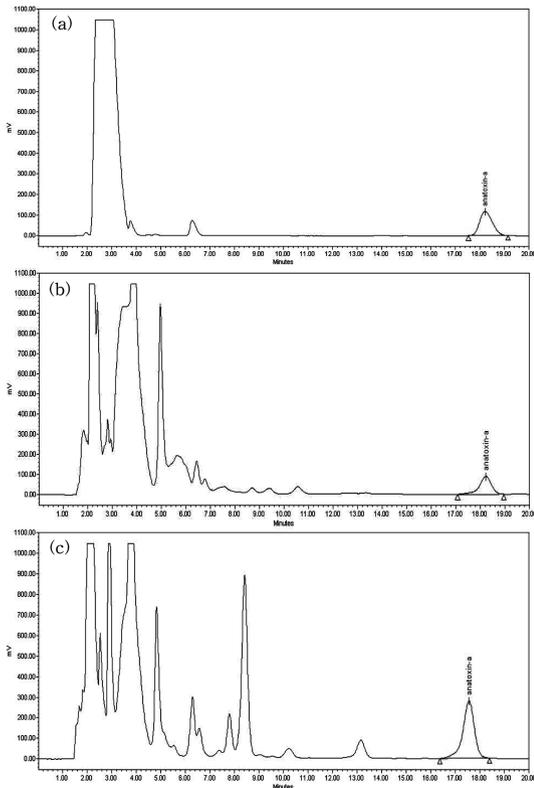


Fig. 4. HPLC Chromatograms of anatoxin-a derivative from (a) standard (20 ng), (b) *Anabaena flos-aquae* from pure laboratory batch cultures and (c) algal sample from Lake Youngchun. HPLC conditions: Agilent XDB-C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm); mobile phase, acetonitrile-water (40:60, v/v); flow rate, 0.8 mL/min; fluorescence detection, λ_{ex} =470 nm, λ_{em} =530 nm.

과 상대표준편차(RSD)를 Table 2에 나타내었다. 평균 회수율은 물 시료의 경우 90.1%, 조체 시료의 경우 88.7%로 비교적 좋은 회수율을 얻을 수 있었으며, 재현성을 나타내는 RSD 값은 물 시료의 경우 4.0, 조체 시료의 경우 4.1%로, 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

3.2. 실제 호소시료의 아나톡신-a 분석

낙동강 수계의 다목적댐 안동호, 용수 전용댐 인 영천호 및 금강수계의 대청호를 대상으로 2008년 남조류가 우점한 시기를 중심으로 시료를 채취하여 아나톡신-a의 분석을 실시하였으며, 분석 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. 물 시료에서는 anatoxin-a가 검출되지 않았으나 조체 시료에서는 0.135~10.979 μg/g의 농도로 검출되었으며, 8~9월의 영천호 시료에서 비교적 높은 농도로 검출되었다(Table 3).

4. 결 론

아나톡신-a를 WCX 카트리지로 고상추출한 뒤 NBD-F로 형광 유도체화시켜 HPLC-FLD로 분석하였다. 직선성, 회수율, 재현성을 구한 결과 모두 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 방법검출한계(MDL)은 물 시료의 경우 0.022 μg/L, 조체 시료의 경우 0.034 μg/g으로 비교적 좋은 감도를 얻을 수 있었다. 국내 3개 호소를 대상으로 2008년 남조류가 우점한 시기를 중심으로 시료를 채취하여 아나톡신-a를 분석한 결과 물 시료에서는 전부 검출되지 않았고, 동결건조한 남조류

Table 3. Concentrations of anatoxin-a in cyanobacterial samples

Sampling sites	Date	Concentrations of anatoxin-a		Dominant genus
		Algae (μg/g)	Water (μg/L)	
Lake Andong	06 10 2008	0.135	-	<i>Microcystis</i>
	07 07 2008	0.324	ND	<i>Anabaena</i>
	07 14 2008	0.239	ND	<i>Microcystis, Anabaena</i>
	07 21 2008	0.675	ND	<i>Anabaena, Microcystis</i>
	08 04 2008	4.362	ND	<i>Microcystis</i>
	08 11 2008	6.098	ND	<i>Microcystis</i>
Lake Youngchun	08 18 2008	5.168	ND	<i>Microcystis</i>
	08 25 2008	3.586	ND	<i>Microcystis, Anabaena, Oscillatoria</i>
	09 03 2008	0.535	ND	<i>Microcystis, Anabaena, Oscillatoria</i>
	09 09 2008	0.244	ND	<i>Microcystis, Oscillatoria, Anabaena</i>
	09 17 2008	10.979	ND	<i>Microcystis, Anabaena, Oscillatoria</i>
	09 22 2008	3.100	ND	<i>Microcystis, Oscillatoria, Anabaena</i>

*ND : not detected

*- : not determined

Table 3. Continued

Sampling sites	Date	Concentrations of anatoxin-a		Dominant genus
		Algae ($\mu\text{g/g}$)	Water ($\mu\text{g/L}$)	
Lake Daechung (Chuso)	06 24 2008	0.787	-	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>
	08 13 2008	1.717	ND	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>
	10 15 2008	2.240	ND	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i>
(Hoenam)	08 28 2008	ND	ND	<i>Oscillatoria</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>
(Jangge)	10 13 2008	1.836	-	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>

시료에서는 0.135~10.979 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 검출되었다. 형광검출기를 이용한 고성능액체크로마토그래피법은 비교적 기기장치가 간단하면서 또한 감도가 좋아 저비용으로 미량까지 분석이 가능하여 상수원의 안전성을 확보하기 위한 남조류 독소의 관리 등에 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. J. Osswald, S. Rellan, A. Gago and V. Vasconcelos, *Environ. Int.*, **33**, 1070-1089 (2007).
2. K. Harada, Y. Kimura, K. Ogawa, M. Suzuki, A. M. Dahlem, V. R. Beasley and W. W. Carmichael, *Toxicol.*, **27**, 1289-1296 (1989).
3. NIER, "Study on the Alert Criteria of Harmful Algal Bloom Alert System(I)", 2008.
4. C. Edwards, K. A. Beattie, C. M. Scrimgeour and G. A. Codd, *Toxicol.*, **30**, 1165-1175 (1992).
5. K. J. James, A. Furey, I. R. Sherlock, M. A. Stack, M. Twohig, F. B. Caudwell and O. M. Skulberg, *J. Chromatogr. A*, **798**, 147-157 (1998).
6. S. Rellan, J. Osswald, V. Vasconcelos and A. G. Martinez, *J. Chromatogr. A*, **1156**, 134-140 (2007).
7. K. J. James, I. R. Sherlock and M. A. Stack, *Toxicol.*, **35**, 963-971 (1997).
8. D. K. Stevens and R. I. Krieger, *J. Anal. Toxicol.*, **12**, 126-131 (1988).
9. K. Himberg, *J. Chromatogr.*, **481**, 358-362 (1989).
10. S. Bogialli, M. Bruno, R. Curini, A. D. Corcia and A. Lagana, *J. Chromatogr. A*, **1122**, 180-185 (2006).
11. A. Furey, J. Crowley, B. Hamilton, M. Lehane and K. J. James, *J. Chromatogr. A*, **1082**, 91-97 (2005).
12. J. M. Jung, Y. J. Lee, H. K. Park, E. Y. Jung and G. J. Joo, *Algae*, **18**, 233-238 (2003).