

배양조류 및 댐 저수지 조체중 신경독소 Anatoxin-a, Saxitoxin류의 분석 및 수처리방안

김학철* · 최일환

한국수자원공사 수자원연구원

Analysis of Neurotoxins, Anatoxin-a, Saxitoxin in Algae Cultured and Algae in Dam Reservoir and its Water Treatment

Hak-Chul Kim · Il-Whan Choi

Korea Water Resources Research Institutes, Kwater, Taejon, Korea, 305-390

Abstract

In this study we developed the analytical methods for the determination of three neurotoxin; anatoxin-a, saxitoxin and neosaxitoxin using HPLC/FLD system and this analytical methods were applied to real sample; algae culture and algae extracts. For the HPLC/FLD analysis of anatoxin-a samples were concentrated on WCX(Weak Cation Exchanger) SPE and then anatoxin-a in concentrate was derivatized with NBD-F solution. Supernatant was injected on HPLC system. For the HPLC/FLD analysis of saxitoxin and neosaxitoxin samples were separated on the column and then derivatized by post column reactor for fluorescen detection. For post column reaction of saxitoxin we feed two kinds of reaction solution; Oxidizing Reagent of which composition was periodic acid(7mM) in 50mM potassium phosphate buffer, pH 9 and acidifying reagent of which Composition was 0.5M acetic acid. The LOD value for anatoxin-a, saxitoxin and neosaxitoxin in HPLC/FLD method was 24.3 ng, 35 $\mu\text{g/L}$, 27 $\mu\text{g/L}$ respectively. We determined the anatoxin-a content of lyophilized *anabaena flos-aquae* and 20 $\mu\text{g/g}$ d.w. of anatoxin-a was detected. We analyzed saxitoxin and neosaxitoxin in algae culture media and extracts of lyopolyllized algal cell cultured and that of Deachung reservoir. Saxitoxin and neosaxitoxin in real sample were below the limit of detection.

Although there are various water treatment processes for removing neurotoxins were suggested no process give simultaneous and complete removal of neurotoxins. It was concluded that nanofiltration which reject material by size can be a process for removal of neurotoxins.

Key words : Neurotoxins, Anatoxin-a, Saxitoxin, Neosaxitoxin, HPLC-FLD, Algae Culture.

* Corresponding author E-mail : peacedove@kwater.or.kr

I. 서론

남조류 신경독소는 anatoxin-a와 saxitoxin 류를 포함한다. Saxitoxin과 neosaxitoxin은 *Aphanizomenon flos-aquae*에서 발견되는데 이 종만이 이 독소를 내는 것으로 알려져 있다. 그러나 saxitoxin과 그와 관련된 신경독소들이 호주의 강과 호수의 *Anabaena circinalis*의 수화에서도 발견되었다. 1990년 Darling강의 *Anabaena* 수화 때 1,600마리의 양이 죽은 것은 saxitoxin과 관련된 것으로 추측되어진다. anatoxin-a는 그 구조가 밝혀진 첫 번째 남조류 독소이고 alkaloid (2-acetyl-9-azabicyclo[4,2,1]non-2-ene)이다. James1)등에 의하면 Anatoxin-a는 그 독성이 매우 강하다(LD50 I.p. mouse 200 µg/kg). Anatoxin-a는 *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aqua*, *Cylindrospermum spp.*에서 만들어 진다. Anatoxin-a는 일광과 높은 pH에서 독성이 없는 분해산물로 쉽게 분해한다. 남조류 조체의 anatoxin-a를 크로마토그래피로 분석하는 방법은 HPLC/UVD와 Thin-Layer Chromatography(TLC), electrospray ionization을 이용하는 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry(LC-MS)이 있다. 자연적인 물속에 존재하는 anatoxin-a의 농도는 매우 낮아서 분석 상에 어려움이 있지만 Gas Chromatography (GC)로 분리 후 유도체화하여 electron capture detector(ECD)로 검출하는 하는 방법이나 질량분석기로 검출하는 방법이 적용되어 왔다. 본 연구에서는 James1)등에 의한 유도체화 시약인 NBD-F를 이용하는 HPLC 방법을 적용하였다

Anatoxins은 남조류에 있어서 유일하지만 saxitoxin은 박테리아, 남조류, marine dinoflagellates에 의해서 생성되는 paralytic shellfish poisons(PSPs)로 일반적으로 알려져 있다. kass2)등에 의하면 Saxitoxin은 carbamate alkaloid이고 20종 이상의 유사 화학물질이 알려져있고 담수 조류중에 16종의 구조가 밝혀져 있다. 일반적으로 북반구 지역에 잘 알려져있는 anatoxin-a에 비하면 남조류독소에 의해 생성되는 saxitoxin에 대한 기록의 거의 없다. *Aphanizomenon flos-aquae*의 실험실내 배양과 수화현상에서 비롯한 미국의 뉴햄프셔 지역에 대한 보고에서 neosaxitoxin과 saxitoxin이 동정되었다. 1990년에서 1991년 사이에 집중적으로 호주의 Darling 강에서 발생한 신경독소 유발조류를 분석한 결과 조체에서 그리고 저수지의 물을 먹고 죽은 양의 소장에서 saxitoxin이 검출된 예가 있다.

Anatoxin-a는 HPLC-UVD법으로 분석하는 경우가 있으나 본 연구에서는 이 보다 감도가 뛰어난 HPLC/FLD법을 적용하였다. HPLC/FLD는 형광을 이용하는 분석으로 NBD-F라는 시약으로 anatoxin-a을 유도체화하는 과정을 거친다. UVD는 특정파장(227 nm)에 감응하는 모든 물질이 크로마토그램상에 나타나지만 FLD에서는 NBD-F라는 시약과 반응하는 물질 들 만이 검출되기 때문에 선택성을 갖게 되며, UVD보다 불순물의 영향을 덜 받아 형광으로 인하여 감도가 좋아지는 장점이 있다. 유도체화 반응은 HPLC에 주입되기 전에 이루어지며 암소에서 반응시킨다. 본 연구에서는 anatoxin-a를 HPLC-UVD로 검출하는 방법과 LC/MS/MS로 검출하는 방법을 적용하였다.

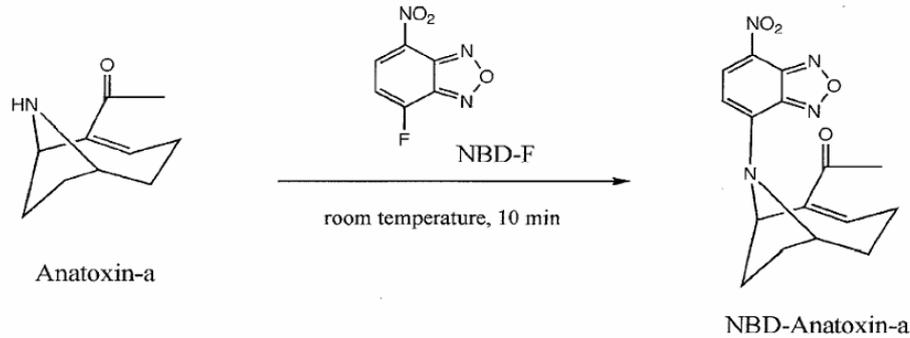


Fig. 1. Anatoxin-a 유도체와를 통한 NBD-anatoxin-a 생성 메카니즘.

Saxitoxin과 neosaxitoxin은 HPLC-Post Column Reaction 방법으로 검출한다. 이 두물질은 온도에 민감하기 때문에 -20°C 이하에서 표준물질을 보관하여 한다. Saxitoxin과 neosaxitoxin의 시료전처리는 Weak Cation Exchanger라는 SPE(Solid Phase Extraction)방법을 사용하여 신경독소인 saxitoxin을 추출하게 되고, 이것을 농축하여 HPLC/FLD로 검출하며, 이 때 post column reaction 방법을 사용하게 된다. HPLC-Post column Reaction-FLD방법에서 Saxitoxin과 neosaxitoxin은 컬럼분리 후 7.0 mM periodic acid in 50 mM sodium phosphate buffer(pH 9.0)로 reaction coil(0.5 mm, 10 m)에서 산화시키고, 이때 온도는 85°C 이다. 반응 종결은 0.5 M acetic acid로 하며 산화된 독소는 FLD로 검출한다. Saxitoxin과 neosaxitoxin의 표준물질에 대하여 HPLC-Post Column Reaction-FLD 방법 조건만을 정립하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. anatoxin-a

증류수는 순수 제조 장치로 정제된 물을 사용한다. Anatoxin-a의 유도체화 시약은 NBD-F(4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxa-

diazole, Sigma)를 사용하였고 용매에 사용 되는. Methanol, Acetonitrile, TFA(Trifluoroacetic acid)는 HPLC grade를 사용하였다. 고상추출(SPE)는 WCX(Weak Cation Exchange) 3 ml cartridge(Supelco)를 사용하였고. 표준물질은 A.G. Scientific 사의 (+/-)anatoxin-a fumarate (CAS No 64285-06-9, M.W. 281.31) 사용하였다. Concentration Workstation은 TurboVap II(Zymark), SPE Cartridge Station : Varian VAC ELUT SPS 24을 사용하였다. 분석장비로 HPLC는 Agilent Technologies 1200 series(G1312B Binary pump, G1367C Hip-ALS SL, G1315C DAD SL, G1312A FLD)를 사용하였다.

1.2. Saxitoxin, Neosaxitoxin

Saxitoxin류를 분석하기위한 용매는 (100 mM sodium heptane sulfonate 10 ml + 500 mM phosphoric acid 30 ml + DIW 450 ml + 30 ml acetonitrile \Rightarrow pH 7.1 with 1N ammonium hydroxide)를 사용하였고 산화제(Oxidation reagent)는 (350 mM periodic acid 5 ml + 250 mM disodium phosphate 50 ml + DIW 150 ml \Rightarrow pH 9.0 with 1N sodium hydroxide)를 사용하였다. 반응종결시약(Stopping reagent)은 0.5N acetic acid를 사용하였고 표준물질은 Saxitoxin의 표준물질은 Sigma 사의 Saxitoxin diacetate salt(CAS No 35523-89-8,

M.W. 419.4) 사용하였다. neosaxitoxin의 표준물질은 Sigma 사의 Saxitoxin diacetate salt(CAS No 64296-20-4, M.W. 315.3) 사용하였다. Concentration Workstation은 TurvoVap II(Zymark), SPE Cartridge Station : Varian VAC ELUT SPS 24을 사용하였다. 분석장비로 HPLC는 Agilent Technologies 1200 series(G1312B Binary pump, G1367C Hip-ALS SL, G1315C DAD SL, G1312A FLD를 사용하였고 post column reactor는 Pickering Laboratories 사의 Pinnacle PCX를 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. Anatoxin-a

여과한 수체시료(10 ml)나 남조류 조체에서 추출한 액 5ml 준비한다. 0.1M NaOH로 시료의 pH를 7.0으로 조절한다. 6 ml의 메탄올과 6 ml의 증류수로 차례로 WCX카트리지를 conditioning한다. 시료를 카트리지에 loading한다. 3ml의 methanol-water (1:1)과 3 ml의 methanol로 유기물제거를 목적으로 세척한다. 30분간 카트리지를 건조한다. 카트리지에 10 ml 0.2 % TFA의 methanol 5ml로 elution한다. Turvo Vap을 이용하여 eluate를 건조한다. 건조된 시료를 methanol로 다시 녹인다. 이것을 amber vial에 넣어 -22℃에서 분석 전까지 보관한다. 분석을 위해서 amber vial에서 보관한 표준용액이나 추출농축액을 Turvo Vap을 이용하여 건조한다. 건조한 바이알

에 100 μ l 의 0.1 M sodium borate(pH 10)를 가한다. acetonitrile에 녹아 있는 50 μ l의 NBD-F (1 mg/ml)를 가한다. 암소에서 10분간 반응시키고 50 μ l의 1 M HCl로 반응을 정지시킨 후 이 액을 HPLC에 주입한다.

2.2. Saxitoxin, Neosaxitoxin

본 연구에서의 시료전처리는 등에 의하여 동결건조한 시료 10 mg에 0.03N acetic acid 2 ml을 가하여 추출한다. 추출이 잘 되게 하기 위하여 추출액을 -20℃에서 얼리고, 녹이는 과정을 3회 실시한 후 2분 동안 sonication 하고 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 원심분리한 상등액을 MFS-13 microfilter로 거른 후 -20℃에서 보관하고 분석 시 30 μ l를 주입한다.

2.3. 배양조건

Anabaena flos-aquae AG 30010은 한국생명공학연구원에서 분양받았고, *Anabaena circinalis* NIES-1645, *Aphanizomenon flos-aquae* NIES-1258은 일본 NIES의 culture Collection of Algae로부터 분양받았다. 분양 받은 조류 균주는 각각 일부 변형된 BG11 배지(Stanier et al., 1971)와 NaCB 배지, CT 배지로 28℃에서 배양하였다. 광은 형광등을 이용하여 30 μ E/m²/sec 로 Light : Dark cycle을 12시간으로 하였다. 조류 배양체가 정상상태에 도달하였을 때 배양을 종결시키고 anatoxin-a, saxitoxin의 함량을 분석하였다.

Table 1. 남조류 배양배지 조건.

	<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Anabaena circinalis</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
Strain number	AG30010	NIES-1645	NIES-1258
Media	modified BG11	NaCB	CT
Temperature	25℃	25℃	25℃
Light intensity	30 μ E/m ² /sec	30 μ E/m ² /sec	30 μ E/m ² /sec
L:D cycle	12L:12D	12L:12D	12L:12D

III. 결과 및 고찰

1. Anatoxin-a

Anatoxin-a을 HPLC/FLD법을 적용하여 분석할 때의 재현성과 검출한계를 보기 위하여 절대량으로 500 ng에 해당하는 표준용액을 7회 주입하였다. 재현성을 나타내는 RSD값이 0.32%로 매우 양호한 값을 보였다. 표준편차의 3배에 해당하는 농도인 검출한계는 주입되는 anatoxin-a의 농도로 81 µg/L이었다. 1 L의 수체에 적용하는 경우 수체 중 anatoxin-a의 농도 0.02 µg/L

까지 검출할 수가 있다. 회수율은 수체에 기지농도를 spike하여 SPE를 통한 추출과 농축과정을 거친 후 외삽법(extrapolation)으로 그 농도를 정량하여 넣어준 표준물질의 양과 비교하여 얻었는데 1 L의 수체시료에 적용한 결과 97%의 회수율 값을 얻었다. anatoxin-a의 HPLC/FLD방법에서의 검량선은 200 ng, 500 ng, 1,000 ng에 해당하는 anatoxin-a를 유도체화한 후 HPLC/FLD로 측정하여 검량선 작성한 결과 r^2 값이 0.99 이상으로 반응의 재현성과 직선성이 우수하게 나타났다.

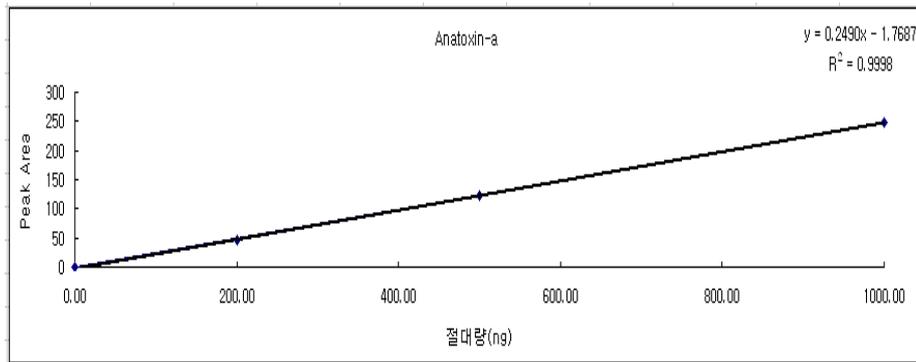


Fig. 2. Anatoxin-a 검량선(HPLC/FLD).

그림 3 은 HPLC/FLD 방법으로 측정된 표준물질과 수체시료를 전처리한 것, 그리고 조체시료를 전처리하여 분석한 크로마토그램들이다. 본 연구에서 대청담축, 대청담 추소리, 그리고 영천담의 수체시료들과 조체시료들을 분석하였는데 대부분이 불검출

로 나타났다. *Anabaena flos-aquae* 배양조류의 계대배양 후 60일 째 되는 조체시료를 전처리하고 HPLC/FLD로 측정하였을 때 anatoxin-a가 조체 건시료 중에 20 µg /g d.w.의 농도로 검출되었다.

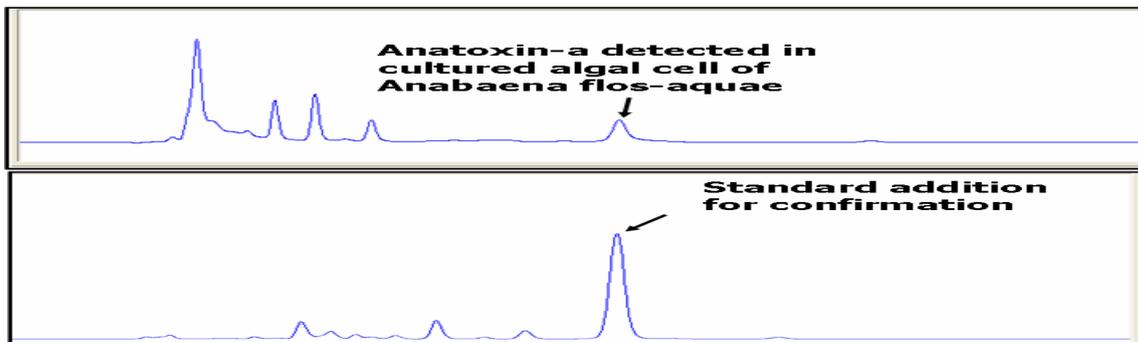


Fig. 3. *Anabaena flos-aquae* 배양 조체 중의 anatoxin-a 분석.

HPLC/FLD방법은 HPLC/UVD방법보다 약 1,000배 이상의 높은 감도로 anatoxin-a를 정량할 수 있는 방법이다, 감도가 높은 장점 이외에 자외선을 흡수하는 모든 물질이 검출되는 HPLC/UVD방법보다 NBD-F라는 유도체화시약과 반응하는 물질들만이 검출되기 때문에 시료중의 타성분에 의한 방해 효과가 적다.

2. Saxitoxin, Neosaxitoxin

2.1. Saxitoxin

Saxitoxin을 HPLC/FLD법을 적용하여 분석할 때의 재현성과 검출한계를 보기 위하여 절대량으로 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 해당하는 표준용액을 7회 주입하였다. 재현성을 나타내는 RSD값이 2.30 %로 양호한 값을 보였다. 표준편차의 3배에 해당하는 농도인 검출한계는 주입되는 Saxitoxin의 농도로 34.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 이었다. 20mg의 조체를 분석하는 경우 조체에 대한 방법검출한계는 20 mg의 조체 시료를 취하는 경우 3.46 ppm($\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.)으로 계산 되었다. 조체시료에 대한 회수율을 계산할 때는 추출이외에 다른 정제과정이 없으므로 이론적으로 조체 중의 saxitoxin이 100% 추출용매로 추출되어지는 것을 가정한다. Saxitoxin의 HPLC/FLD방법에서의

검량선은 25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 에 해당하는 Saxitoxin를 유도체화한 후 HPLC/FLD로 측정하여 검량선 작성한 결과 r^2 값이 0.99 이상으로 반응의 재현성과 직선성이 우수하게 나타났다.

2.2. Neosaxitoxin

neosaxitoxin을 HPLC/FLD법을 적용하여 분석할 때의 재현성과 검출한계를 보기 위하여 절대량으로 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 해당하는 표준용액을 7회 주입하였다. 재현성을 나타내는 RSD값이 1.80 %로 양호한 값을 보였다. 표준편차의 3배에 해당하는 농도인 검출한계는 주입되는 neosaxitoxin의 농도로 27.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 이었다. 20mg의 조체를 분석하는 경우 조체에 대한 방법검출한계는 2.70 ppm($\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.)으로 계산 되었다. 조체시료에 대한 회수율을 계산할 때는 추출이외에 다른 정제과정이 없으므로 이론적으로 조체 중의 saxitoxin이 100% 추출용매로 추출되어지는 것을 가정한다. neosaxitoxin의 HPLC/FLD방법에서의 검량선은 25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$, 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 에 해당하는 neosaxitoxin를 유도체화한 후 HPLC/FLD로 측정하여 검량선 작성한 결과 r^2 값이 0.99 이상으로 반응의 재현성과 직선성이 우수하게 나타났다.

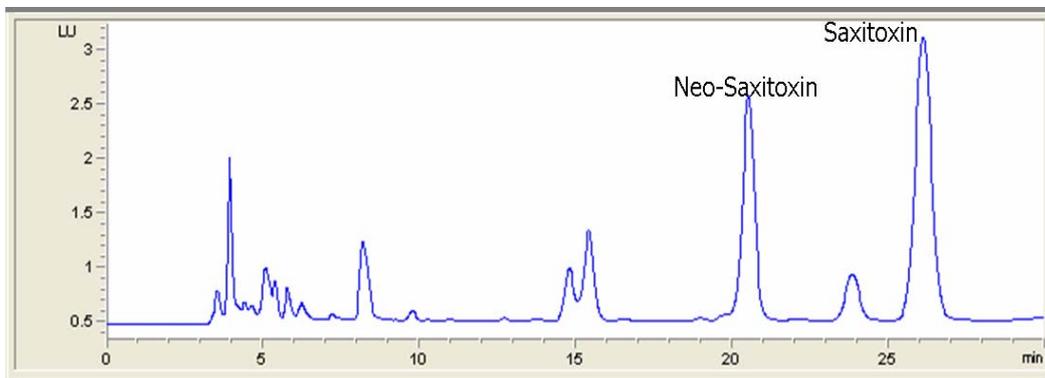


Fig. 4. HPLC/FLD 크로마토그램(Saxitoxin, neosaxitoxin).

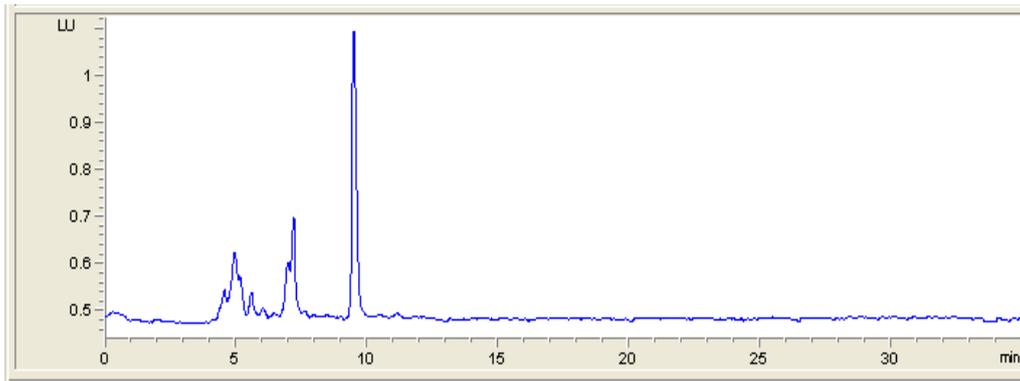


Fig. 5. HPLC/FLD 크로마토그램(조체시료).

3. 신경독소의 수처리 방안

본 연구에서는 신경독소의 수처리 방안에 대하여 문헌을 통한 조사를 수행하였다. Rodriguez³⁾등과 Hoeger⁴⁾등에 의하면 재래의 응집-여과-염소처리의 정수공정에서는 남조류 독소가 쉽게 제거되지 않으며 그 제거율도 일정치가 않다. 예를 들어 3 mg/L의 염소로 처리하게 되는 경우에 Anatoxin-a의 제거율은 8%에 불과하다. 반면 오존산화와 활성탄 처리는 기존 정수처리와는 반대로 마이크로시스틴의 처리에 가장 적합하다. 지금까지 보고된 많은 산화처리는 주로 microcystin-LR에 대한 것이었고 CYN과 Anatoxin-a에 대한 보고는 거의 없고 수용액에 녹아 있는 Anatoxin-a의 산화는

permanganate가 오존보다 더 효과적이라는 것을 확인하였다. Membrane을 이용한 막여과 공법에서는 cell의 제거가 98%이상 이루어지기 때문에 Single spiral wound nanofiltration을 이용한 microcystin과 Anatoxin-a의 제거는 96% 이상의 값을 나타내었다. 이와 같이 남조류 독소는 기존의 수처리 공정을 이용하여 제거하는 것이 어렵고 남류 독소를 제거하는 산화공정이나 물리적공정은 여러 가지로 조사되지만 동시에 간독소와 신경독소를 제거해내는 산화공정이나 물리적 공정은 아직 조사되지 않았다. Teixeira⁵⁾등에 의하면 여러 가지 공정중 남조류 독소를 동시에 제거하는 공정으로 가장 유력한 것은 막여과 공정으로 판단된다.

Table 2. 분석항목에 대한 정수처리 요약.

Analyte Applicable Method	Microcystin	Anatoxin-a	Saxitoxin	neo-Saxitoxin
Ozonation	Effective but concern of DBPs	Powerful but concern of DBPs	NR	NR
Chlorination	Effective	8% removal at 3ppm chlorine	NR	NR
Permanganate	Effective	Effective	NR	NR
Chlorin dioxide	Intermediate	NR	NR	NR
Membrane (Nano-filtration)	98% removal (Microcystis cell)	96% removal	NR	NR
PAC or GAC	Effective but high dose required	Effective but high dose required	NR	NR

NR : No Report

IV. 결 론

본 연구에서는 Anatoxin-a과 saxitoxin 그리고 neosaxitoxin에 대하여 HPLC/FLD 분석법을 정립하였다. 신경독소의 경우 독소자체에 자외선을 흡광하는 부분이 있어도 그 몰흡광계수가 매우 작아 미량분석에 적합하지 않기 때문에 HPLC/FLD법은 유도체화 방법을 사용하는데 anatoxin-a는 주입 전에 saxitoxin과 neosaxitoxin은 컬럼 후에 유도체화하여 측정하였다. 실제 우리나라에서 신경독소의 검출이 흔하지 않지만 HPLC를 보유하는 일반적인 실험실에서 수행할 수 있는 분석법을 정립하였다. Anatoxin-a가 배양조류에서 20 μ g/g d.w.로 검출된 것 이외에는 신경독소가 실제시료에서 검출되지는 않았다. 본 연구에서는 신경독소를 물체의 성질에 따라 두가지로 나누어 실험을 수행하였지만 근래에 활용되기 시작한 LC/MS/MS방법은 추출이외의 유도체화 같은 과정이 따로 필요하지 않기 때문에 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 장점이 있으나 기기를 구매하고 유지하는 비용이 많이 든다. 그러나 향후 독소들의 다성분 동시분석 면에서는 LC/MS/MS가 더 유리한 것으로 생각된다(Roistano⁶등) .

Reference

1. Kevin J. James, Ambrose Furey, Ian R. Sherlock, Mary A. Stack, Marian Twohig, F. Barry Caudwell, Olav M. Skulberg : Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorometric detection, *Journal of Chromatography A*, 798, 147-157, 1998.
2. Hanne Kaas, Peter Henrisken : Saxitoxins(PSP) Toxin in Danish Lakes, *Wat. Res.*, 34, 2089-2097, 2000.
3. Eva Rodriguez, Gretchen D. Onstad, Tomas P.J. Kull, James S. Metcalf, Juan L. Acero, Urs von Gunten : Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate, *Water Reserach*, 41, 3381-3393, 2007.
4. Stefan J. Hoeger, Bettina C. Hitzfeld, Daniel R. Dietrich : Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plant, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 231-242, 2005.
5. Margarida Ribau Teixeira, Maria Joao Rosa : Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration, *Water Research*, 40, 2837-2846, 2006.
6. J. Roistano, G Newcombe, B. Nicholson, P. Sztajnbok : Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters, *Wat. Res.*, 35, 22-32, 2001.