

기술자료

## 액체크로마토그래피-탠덤질량분석법에 의한 하천수 및 정수 중 남세균 기원 독소 실린드로스퍼몌신(Cylindrospermopsin)의 정량분석

최재원<sup>†</sup> · 장제헌 · 이선홍 · 윤미애

한국수자원공사 물환경안전처

## Determination of Cylindrospermopsin in Surface and Treated Water using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Jae-won Choi<sup>†</sup>, Jae-heon Jang, Sun-hong Lee, and Mi-ae Yoon

Department of Water Environmental Safety Management, K-water, Shintanjinro 200 Daeduck, Daejeon, 34350, Republic of Korea

Received June 15, 2022 / Revised June 29, 2022 / Accepted June 30, 2022

Cylindrospermopsin (CYN) is an emerging freshwater cyanobacterial toxin, and its reports on toxicity toward the human liver and kidney tissues has drawn a lot of attention. An appropriate analytical method is necessary to determine the presence of this emerging cyanobacterial toxin in water resources including drinking water; therefore, it is necessary to develop a sensitive analytical method for CYN detection. In this study, we developed a simple and sensitive analytical method for CYN detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using direct injection. The method was validated for linearity of calibration, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, and precision. The limit of detection and quantitation were in the range of 0.029 µg/L and 0.091 µg/L, respectively. Accuracy and precision were also obtained within an acceptable range. The optimized method was used to measure the concentrations of CYN in the surface water from each weir areas of the Geum River, Nakdong River. Additionally, this method was applied to samples of drinking water obtained from the treatment plants of the Geum River, Nakdong River for each process.

**Key words:** Cyanobacterial toxins, Cylindrospermopsin, LC-MS/MS, Surface water, Drinking water

### 1. 서 론

2013년부터 환경부는 남세균(cyanobacteria)에서 생성되는 간 독소물질인 마이크로시스틴 LR을 먹는 물 감시 항목으로 지정하여, WHO 수준의 권고기준인 1 µg/L로 설정한 이후, K-water에서는 물환경에서 주로 검출되는 마이크로시스틴 RR, YR 및 노들라린, 아나톡신 등 다양한 남세균 기원 독소에 대해 자체적인 분석법 확립과 모니터링을 통한 수질관리를 확대 실시중이다. 최근에도 남세균 기원 독소는 기후변화로 인한 이상 고온, 부영양화 및 수계의 복잡한 물관리 여건 속에서 언론보도와 학계의 보고를 통해 녹조 발생과 관련한 신종 독소에 출현에

대한 우려가 지속되고 있다.<sup>1-6)</sup>

신종 독소 중 anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin 등의 신경독소 외에 최근에 지하수에서 검출된 것으로 보도된 실린드로스퍼몌신(cylindrospermopsin, CYN)은 Raphidiopsis (기존의 Cylindrospermopsis), Umezakia natans, Aphanizomenon ovalisporum, Anabaena bergii 등의 담수 남세균에서 생성되는 간독성물질로 알려져 있다.<sup>7-9)</sup> 이 물질의 분자 구성은 질소가 다수 포함된 알칼로이드계 화합물이며 우라실 구조를 기반으로 구아니디노(guanidino)와 설페이트를 포함한 다환 형태의 구조를 가지고 있다.<sup>10)</sup> CYN의 화학구조 및 물리화학적 특성을 Fig. 1, Table 1에 요약하였다. 원소 조성 및 분자량은 각각 C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-42-629-4760, Fax: 42-629-4739, E-mail: choijw@kwater.or.kr

**Table 1.** Physical and chemical properties of common cylindrospermopsins

Property	Cylindrospermopsin
CAS Number	143545-90-8
Chemical Formula	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S
Average Molecular Weight (g/mole)	415.43
Monoisotopic MW (g/mole)	415.12
Log P(Octanol-Water)	-1.1
pKa	-1.6
Solubility in Water	High

및 415.43 g/mol이며, 분배계수 Log P(Octanol-Water)는 -1.1, 산해리상수 pKa는 -1.6이다. 이러한 물질 특성을 고려하면 CYN은 물에서 높은 극성을 가진 자유분자(free molecule)로서 용존성 결합(soluble bound) 형태로 존재할 가능성이 높다.

CYN의 독성 영향은 마우스에서 단백질 합성을 저해하며, 배양 간세포에 대한 글루타치온(glutathione)의 합성 및 콜레스테롤 대사 저해 등 간에 대한 영향 및 흉선, 신장, 심장, 고환 등 다양한 장기에 대한 영향이 보고되었다. 또한 DNA 손상 및 세포 스트레스 반응 유도 등의 대사과정에서 시토크롬 P450(CYP450) 의존적인 독성학적 기작이 알려져 있다.<sup>6,7)</sup>

WHO<sup>11)</sup>에 의하면, CYN의 인체 노출 경로로서 이 물질은 휘발성은 없으나, 농업활동, 보트이용, 폭풍 시기 등에 의한 분사 효과로 인한 대기 경로, 어패류 등 오염된 음식섭취 경로, 충분한 수처리를 거치지 않은 음용수 섭취 또는 친수활동을 통한 일시적 노출 경로 등이며, 음식 섭취 경우 노출을 포함한 충분한 자료는 확보되어 있지 않다.

현재까지 가이드라인 도출을 위한 CYN의 독성 데이터는 제한적이고 불충분하나, 지금까지 확인된 단백질 합성 저해와 독성영향 확인을 통해 WHO에서 악영향최소 관찰량/농도(LOAEL)는 75 µg/kg bw/day가 적정할 것으로 판단하고 있으며,<sup>11)</sup> Humpage와 Falconer<sup>12)</sup>가 제안한 악영향무관찰량/농도(NOAEL) 30 µg/kg bw/day를 이용하여 일반인 기준의 일생 기간 음용수 및 친수활동 가이드라인 값을 각각 0.7 µg/L과 6 µg/L로 도출하였다. EPA는 CYN의 음용수(10일간 노출기준)는 3 µg/L, 친수활동 기준을 15 µg/L로 관리하고 있다.<sup>13,14)</sup> 한편, 호주, 뉴질랜드 및 미국 오하이오주, 오레곤주에서는 음용수 가이드라인으로 1 µg/L를 설정하여 운영중이다.

국내에는 아직 실린드로스퍼몹신에 대한 수질기준은 설정되어 있지 않지만, 최근에 지하수 및 하천수에서 ELISA

에 의한 CYN 검출이 보도되었으며,<sup>15)</sup> 국내 수계에서 보고된 측정 자료가 많지 않아 이 물질에 대한 LC-MS/MS 분석절차 확립과 물환경, 정수장 등의 조사가 필요할 것으로 판단된다. 특히 실린드로스퍼몹신은 마이크로시스틴보다 극성이 높은 성질을 가지므로 극성 물질의 머무를 특성이 고려된 크로마토그래피가 요구된다. USEPA 본 연구에서는 별도의 전처리 및 농축과정을 거치지 않은 직접 주입법(direct injection)에 의한 LC-MS/MS 정량 방법을 확립하고, 수계 하천수와 유역 정수장에 시료 조사에 적용하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 표준물질 및 시약

Cylindrospermopsin 표준물질은 Enzo Life Sciences (NY, USA)에서 구입하였으며, 아세트산 및 메탄올은 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 시스템은 UHPLC 1290 Infinity II 및 6495C QQQ tandem mass spectrometer(Agilent, CA, USA)를 이용하였으며, 분석 column은 Acquity HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 µm; Waters, USA)을 사용하였다. 컬럼분리 후 electrospray ionization (ESI)법의 positive mode (+ESI)로 이온화하였으며, multiple reaction monitoring (MRM) mode에서 Cylindrospermopsin을 분석하였다. MRM 조건을 포함한 LC-MS/MS 운전 조건은 Table 2, Table 3에 요약하였다.

### 2.3. 시료 채수 및 분석

**Table 2.** Liquid chromatograph (1290 Infinity II model) conditions for the cylindrospermopsin analysis

Parameter	Conditions or value
Injection volume(µL)	10
Flow rate(mL/min)	0.2
Mobile phase	A : 100mM Acetic acid in water B : Methanol
Run time(min)	14
Column	Acquity UPLC HSS T3, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm
Column Temp.(°C)	Not controlled

**Table 3.** Mass spectrometer (6495C QQQ model) conditions for the cylindrospermopsin analysis

Parameter	Conditions or value
Cylindrospermopsin	416.13 → 336, 194.1
Gas Temp.(°C)	270
Gas Flow(L/min)	11
Nebulizer(psi)	35
Sheath Gas Temp.(°C)	350
Sheath Gas Flow(mL/min)	11
Capillary(V)	4000

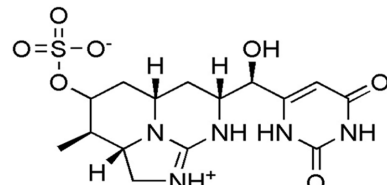
시료 채수는 21년에 5월부터 11월 동안 낙동강 및 금강수계에서 다음 지점을 대상으로 월 1회 실시하였다. 낙동강 수계는 보구간(칠곡, 강정고령, 달성, 합천창녕, 창녕함안) 하천수와 유역내 본포 취수지점, 정수장(구미, 고령, 반송)의 원,정수에 대해, 금강 수계는 원수(현도, 문의) 및 정수(청주)를 채수하였다. 5월은 남세균 번성 전시기로 판단하여 낙동강 보구간 5개 지점에서만 채수하였다. 채수 방법은 개정된 조류경보제 방법<sup>16)</sup>에 따라 통합 채수하였으며, 먹는물 수질감시항목 운영지침상의 시험법<sup>17)</sup>을 응용하여 하천 및 원수는 용존(dissolved) 및 총독소(total)로 구분하여 전처리 및 기기분석하였다. 채취한 시료는 바로 유리섬유여과지(glass microfiber filter grade C, GF/C)로 여과하여 분석한 결과는 용존상(dissolved

phase), 시료를 초음파 추출한 후, 0.2 µm GHP membrane 시린지 필터로 여과하여 분석한 결과는 총농도로 구분하며, 정수는 여과하지 않고 직접주입법으로 기기분석에 사용하였다.

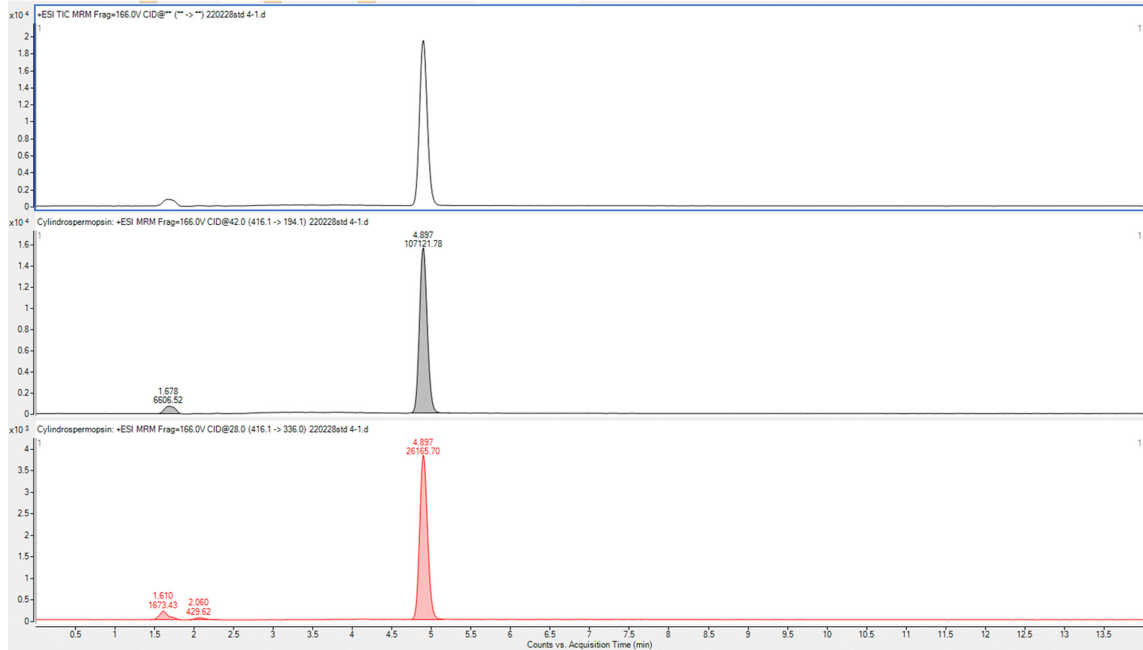
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. LC 분석방법 확립

CYN의 물리화학적 특성(Table 1)에서 알 수 있는 것처럼 이 물질은 높은 극성을 가지며, 양쪽성 이온성질(zwitterion)을 띠고 있다. 본 연구에서는 CYN 분석을 위해 극성 및 비극성 화합물에 적용 가능한 실리카 결합 기반의 ACQUITY HSS T3(2.1 × 100 mm, 1.8 µm, Waters, MA, USA)를 사용하였으며, 이 컬럼 재질은 100% 수성 이동상과 호환되므로 극성이 높은 대상물질의 머무름에 적용하는 HILIC과 유사성을 가진다. EPA method 545



**Fig. 1.** Chemical structure of cylindrospermopsin.



**Fig. 2.** MRM chromatograms of LC-MS/MS of cylindrospermopsin standard at a concentration of 2 µg/L spiked in deionized water.

(2015)에서도 본 실험과 유사한 사양의 컬럼을 적용하여 CYN 분석법을 확립하였으며, 극성이 높은 anatoxin-a와 동시분석 조건을 적용하였다.<sup>18)</sup>

본 연구에서는 이동상으로 100 mM acetic acid 및 methanol을 조합하여 최적화 시험을 통해 CYN의 적정 용출을 위한 methanol 변화 비율을 10%로 설정하여 gradient 조건에서 운영하였다. 설정한 LC 조건에서 극성이 높은 CYN 용출 및 머무름을 0.5-8.5분 범위로 설정 시 머무름 시간은 약 4.9분에서 관찰되었다(Fig. 2).

### 3.2. 분석방법의 유효성

3.1에서 확인한 바와 같이 극성 물질의 머무름 성질을 지닌 컬럼을 사용한 LC-MS/MS 분석방법을 성능을 평가하기 위해 먹는 물 및 수질오염 공정시험기준의 공통적인 정도보증/정도관리(QA/QC) 항목을 중심으로 외부표준법 적용 조건에서 검정곡선의 직선성(linearity)을 평가하고, 방법검출한계(limit of detection, LOD), 방법정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision)를 산출하였다.

정제수에 CYN가 0.3~8.0 µg/L 범위의 농도가 되도록 표준물질을 첨가한 7개의 시료를 분석하여 검정곡선을 시험한 결과,  $r^2$  값 0.998 이상의 직선성을 얻었다(Fig. 3). 정제수에 검정곡선의 최소 농도인 0.3 µg/L 시료를 7개 분석하여 얻은 값의 표준편차에 3.14(7회 반복분석에 대한 99% 신뢰구간에서의 t값)를 곱한 값을 검출한계(LOD)로, 10을 곱한 값을 정량한계(LOQ)로 계산한 결과, LOD

및 LOQ는 각각 0.029, 0.091 µg/L이었다(Table 4). 참고로 마이크로시스틴 LR의 목표 정량한계는 먹는물 감시 항목 권고기준인 1.0 µg/L의 1/10 수준인 0.1 µg/L이며, EPA method 545의 CYN 최소보고수준(LCMRLs)은 0.063 µg/L 수준으로 제시되어 있다.<sup>18)</sup> 또한 CYN에 대한 WHO 음용수 가이드라인 및 EPA 음용수 기준이 각각 0.7 µg/L, 3 µg/L임을 고려하면 본 실험으로 산출된 CYN 정량한계는 시료분석을 위한 적정 수준일 것으로 사료되었다. 정확도 및 정밀도는 4.0 µg/L로 조제한 시료 4개를 측정하여 산출한 결과, 정확도는 99.4%, 정밀도는 3.9%로 확인되어, 확립한 방법의 QA/QC는 감시항목인 마이크로시스틴 LR의 정도관리 범위 이내이며 양호한 결과가 도출된 것으로 판단하였다. SPE 농축단계를 결합한 LC-MS/MS 방법에서 정량한계를 0.9 µg/L로 보고한 사례<sup>19)</sup>에 비해 본 연구에서 정립한 CYN 정량분석방법은 SPE등 시료 농축 과정을 수반하지 않고도 WHO, EPA의 음용수 가이드라인에 적용 가능한 감도가 확보되었으며, 분석시간 단축, 농축 카트리지가 및 유기용매 절감 등 실험실 생산성과 환경적, 경제적 효과도 기대된다.

### 3.3. 하천수 및 정수장 시료의 CYN 분석

2021년 5월부터 11월 사이에 월 1회 채수한 낙동강 수계 보구간 하천수(칠곡보, 강정고령보, 달성보, 함천창녕보, 창녕함안보)와 금강 및 낙동강 유역의 정수장(청주, 구미, 고령, 반송)의 원수 및 정수에 대해 본 연구에서 확립한 분석방법을 적용한 결과, 모든 시료에서 실린드로스프

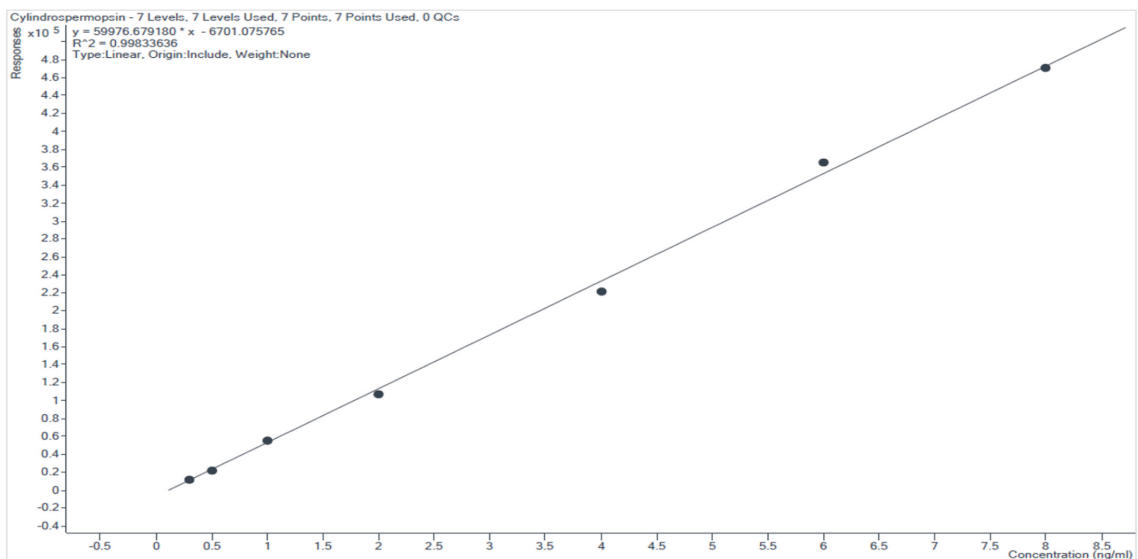


Fig. 3. External calibration curve with concentration ranges in 0.3-8 ng/mL.

**Table 4.** Linearity in calibration, LOD, LOQ, accuracy and precision of cylindrospermopsin

Validation category	Parameter	Range, value
Linearity	Calibration. range ( $\mu\text{g/L}$ )	0.3~8.0
	Calibration curve ( $Y = aX + b$ )	a: 59976.67, b: -6701.07
	Linearity coefficients	0.9983
LOD, LOQ	Spiked conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	0.3
	No of sample	7
	LOD* ( $\mu\text{g/L}$ )	0.029
	LOQ** ( $\mu\text{g/L}$ )	0.091
Accuracy, Precision	Spiked conc. ( $\mu\text{g/L}$ )	4.0
	No of test sample	4
	Accuracy (%)	99.4
	Precision (RSD, %)	3.9

\* LOD : limit of detection ( $SD*3.14$ )\*\* LOQ : limit of quantitation ( $SD*10$ )

모핀은 검출되지 않았다. 한편, 독일에서 Aphanizomenon 이 우점한 호소에서 CYN 분포가 입자상 및 용존상으로 각각 0.002~0.484  $\mu\text{g/L}$ , 0.08~11.75  $\mu\text{g/L}$  검출된 사례<sup>20)</sup>가 있으며, CYN의 각종 논문 검출 자료를 평가한 연구에 의하면, 실린드로스퍼모핀이 입자상 또는 용존상으로 검출된 데이터를 취합하면 median 및 95th percentile 농도는 각각 0.898  $\mu\text{g/L}$ , 24.8  $\mu\text{g/L}$  수준이었다.<sup>21)</sup> 국내에서는 LC-MS/MS에 의한 CYN 검출자료는 아직 발견되지 않았으며, 최근 낙동강 수계에서 ELISA방법에 의한 하천수 조사에서 불검출<sup>22)</sup> 또는 보도에 따르면 ELISA방법을 적용한 지하수 시료에서 2.6  $\mu\text{g/L}$ 이 검출된 사례가 있다.<sup>15)</sup>

#### 4. 결 론

기후변화 및 물관리 환경 등 남세균 수화(blooming) 현상 및 신종 조류 독소에 대한 우려가 제기됨에 따라 본 연구에서는 남세균에서 생성하는 독소인 실린드로스퍼모핀(CYN)의 신속, 고감도 분석방법을 확립하고 시료에 적용한 결과 다음과 같이 요약하였다.

1. 직접 시료주입 및 이동상 조건에 물 100%를 적용할 수 있는 분석컬럼 기반의 LC-MS/MS 방법 최적화를 통해 실린드로스퍼모핀의 적정 머무름이 확보되었고 5분 이내의 검출 및 유지관리를 고려한 총 15분 이내의 운영조건을 확인하였다.
2. 분석방법의 성능은 양호한 직선성, 정밀도, 정확도 및 직접 주입조건에서 0.1  $\mu\text{g/L}$  이하의 정량한계가 얻어졌으며, 시료 농축 절차 없이도 적정 LOQ의 확보, 짧은 분석시간, 농축 카트리지가 및 유기용매 사

용 저감 등 실험실 생산성과 환경적, 경제적 효과도 달성되었다.

3. 2021년에 채수한 물환경 및 정수장(원수, 정수) 시료에서 실린드로스퍼모핀이 검출되지 않았으며, 중장기적인 기후변화 여건과 국외에서 수질기준이 설정되어 운영중이고, 국외 조사 결과 및 국내에서 최근 보도된 물환경 검출 수준을 고려할 때 향후에도 지속적인 조사, 관찰이 필요할 것이다.

#### 감사의 글

분석법의 시료 적용을 위한 조사 대상 보 및 정수장의 시료 채수에 도움을 주신 한국수자원공사 금강유역본부 및 낙동강유역본부산하 보관리단 및 정수장에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. 연합뉴스, <https://www.yna.co.kr/view/AKR20210824091900004>, 2021년 8월.
2. 뉴스타파, <https://newstapa.org/article/cf0mm>, 2022년 2월.
3. Q. T. Dinh, G. Munoz, D. F. Simon, S. V. Duy, B. Husk, and S. Sauvé, "Stability issues of microcystins, anabaenopeptins, anatoxins, and cylindrospermopsin during short-term and long-term storage of surface water and drinking water samples", *Harmful Algae*, **2021**, 101, 101955.
4. M. Llana-Ruiz-Cabello, A. Jos, A. Cameán, F. Oliveira, A. Barreiro, J. Machado, J. Azevedo, E. Pinto, A. Almeida, A. Campos, V. Vasconcelos, and M. Freitas, "Analysis

- of the Use of Cyndrospermopsin and/or Microcystin-Contaminated Water in the Growth, Mineral Content, and Contamination of Spinacia oleracea and Lactuca sativa”, *Toxins*, **2019**, 11(11), 624.
5. A. Roy-Lachapelle, S. V. Duy, G. Munoz, Q. T. Dinh, E. Bahl, D. F. Simon, and S. Sauvé, “Analysis of multiclass cyanotoxins (microcystins, anabaenopeptins, cyndrospermopsin and anatoxins) in lake waters using on-line SPE liquid chromatography high-resolution Orbitrap mass spectrometry”, *Analytical Methods*, **2019**, 11, 5289-5300.
  6. 이인정, 김진아, 안정민, 양득석, “액체크로마토그래피-탠덤질량분석법에 의한 하천수 중 남조류 독소 7종의 동시분석”, *한국환경분석학회지*, **2018**, 21(2), 78~86.
  7. K. Preußel, A. Stüken, C. Wiedner, I. Chorus, and J. Fastner, “First report on cyndrospermopsin producing *Aphanizomenon flosaquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes”, *Toxicon*, **2006**, 47, 156-162.
  8. L. Pearson, T. Mihali, M. Moffitt, R. Kellmann, and B. Neilan, “On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and Cyndrospermopsin”, *Marine Drugs*, **2010**, 8(5), 1650-1680.
  9. K.-I. Harada, I. Ohtani, K. Iwamoto, M. Suzuki, M. F. Watanabe, and K. Terao, “Isolation of Cyndrospermopsin from a Cyanobacterium *Umezakia Natans* and Its Screening Method”, *Toxicon*, **1994**, 32(1), 73-84.
  10. WIKIPEDIA, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyndrospermopsin>
  11. World Health Organization “Cyanobacterial toxins: cyndrospermopsins, Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environment”, World Health Organization, Geneva, **2020**, 15-22.
  12. A. R. Humpage, and I. R. Falconer, “Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cyndrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value”, *Environmental Toxicology*, **2003**, 18(2), 94-103.
  13. US Environmental Protection Agency, <https://www.epa.gov/cyanoabs/epa-drinking-water-health-advisories-cyanotoxins>, November 2021.
  14. US Environmental Protection Agency, <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-human-health-criteria-table>, June 2022.
  15. 오마이뉴스, [http://www.ohmynews.com/NWS\\_Web/View/at\\_pg.aspx?CNTN\\_CD=A0002808493](http://www.ohmynews.com/NWS_Web/View/at_pg.aspx?CNTN_CD=A0002808493), 2022년 2월.
  16. 환경부, “조류경보제 운영 매뉴얼”, **2016**.
  17. 환경부, “먹는물 수질감시항목 운영 등에 관한 고시”, **2018**, 108-137.
  18. US Environmental Protection Agency “Method 545: Determination of Cyndrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS)”, **2015**, US.
  19. R. Guzmán-Guillén, A. I. Prieto, A. G. González, M. E. Soria-Díaz, and A. M. Cameán, “Cyndrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: Optimization and validation of the method and application to real samples”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2012**, 31, 2233-2238.
  20. J. Rücker, A. Stüken, B. Nixdorf, J. Fastner, I. Chorus, and C. Wiedner, “Concentrations of particulate and dissolved cyndrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes”, *Toxicon*, **2007**, 50(6), 800-809.
  21. K. R. Scarlett, S. Kim, L. M. Lovin, S. Chatterjee, J. T. Scott, and B.W. Brooks, “Global scanning of cyndrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards”, *Science of The Total Environment*, **2020**, 738, 139807.
  22. Y.-J. Kim, H.-K. Park, and I.-S. Kim, “Assessment of the Appearance and Toxin Production Potential of Invasive Nostoclean Cyanobacteria Using Quantitative Gene Analysis in Nakdong River, Korea”, *Toxins*, **2022**, 14(5), 294.