

## LC-MS/MS에 의한 하천수중 스트렙토마이신 분석

이종혁 · 김병주 · 명승운<sup>†</sup>  
경기대학교 자연과학대학 화학과

### The Analysis of Residual Streptomycin in Surface Water by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Jong-Hyuk Lee, Byung-Ju Kim, and Seung-Woon Myung<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Received September 9, 2010/Accepted December 6, 2010

The method for the determination of streptomycin in environmental aqueous water samples by LC/ESI-MS/MS was developed. After ion pairing reagent was added into surface water sample, aqueous samples were extracted and concentrated through a Hydrophilic-Lipophilic Balanced (HLB) cartridge. In reverse phase liquid chromatographic (RPLC) system, chromatographic separation was achieved on a Eclipse Plus C18 column (2.1×100 mm, 5 μm), using gradient elution with 20 mM HFBA in water and acetonitrile as mobile phase. After HPLC separation, quantification and qualification were performed by electrospray ionization(ESI) and tandem mass spectrometry. As a result, calibration curve showed good linearities (above  $r^2=0.99$ ) in the concentration range of 0.25~1.0 μg/L. From the spiked blank surface water, the limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.07 μg/L and 0.23 μg/L, respectively and recovery was the range of 48.7~76%. The established method can be used to determine μg/L levels of streptomycin from the environmental aqueous sample, and also can be applied to the other environmental samples.

**Key words:** streptomycin, aqueous sample, LC/ESI-MS/MS

## 1. 서 론

스트렙토마이신(streptomycin)은 아미노글리코사이드계 항생제로 인체 의료용 및 동물용의약품으로 그람-음성(Gram-negative) 생물체 감염의 치료에 널리 이용되고 있다.<sup>1)</sup> 인체 치료용으로는 결핵 및 세균성 감염에 쓰이고 있고, 동물용 의약품으로는 꿀벌의 질병 치료에 사용되는 것으로 알려져 있다.<sup>2-4)</sup> 또한 감귤, 복숭아 같은 과실류와 유실수, 고추 배추 등의 채소 등의 채소류의 세균성 병해를 방지하기 위하여 살충제로 이용되는 등 세균성 질병 치료에 이용하고 있다. 이와 같이 치료 목적으로 사용되고 있는 스트렙토마이신은 인체 부작용은 경미한 편이지만 현기증, 이명, 난청 등의 부작용이 경고되어있고 내성균이 생길 우려가 있기 때문에 다

른 화학적요법과 병행하여 치료하고 있다.

최근 항생제인 스트렙토마이신을 비롯한 의약품의 광범위한 사용으로 인한 배설 및 폐기되는 의약품질(Pharmaceutical and Personal Care Products, PPCPs)과 동물성 의약품이 환경에 유입되면서 이에 대한 관심과 관리가 요구되고 있으며, 특히 수질 환경 중에 잔류하는 항생제는 인체에 알려지 반응이나 의약품에 대한 내성균 형성으로 인체에 악영향을 미칠 수 있기 때문에 이를 모니터링하기 위해서 환경 중 잔류하는 의약품질의 분석 방법의 확립이 필요한 실정이다.

스트렙토마이신은 자외선(UV) 검출기를 이용하여 확인하는 방법이 있으나 흡수 발색단이 강하지 않기 때문에 미량분석에서는 대부분 HPLC에서 컬럼을 통과후(post-column) 유도체화 후 형광검출기(FLD)로 검출하

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

Tel: 82-31-249-9647, Fax: 82-31-249-9647, E-mail: swmyung@kgu.ac.kr

는 방법이 일반적이며, ELSD 같은 검출기를 사용한 예도 있다.<sup>2,5-8)</sup> 하지만 이 방법은 절차가 복잡하여 반복적인 실험에 적용하기는 다소 어렵기 때문에 최근에는 액체 크로마토그래프/텐덤 질량분석법(LC-MS/MS)이 HPLC/UV 나 HPLC/FLD 방법보다 많이 이용되고 있다.<sup>1,3-4,9)</sup>

한편, 지금까지 하천수에서 스트렙토마이신을 LC-MS/MS를 사용하여 분석하는 방법을 발표한 논문은 없다. 따라서 본 논문에서는 염기성이며 매우 친수성이 강해서 수용액 시료로부터 추출이 까다롭고, 또한 역상 크로마토그래피(RPLC) 시스템에서 분석이 어려운 스트렙토마이신을 본 연구실에서 확립하여 발표한 논문<sup>10)</sup>에 기초하여 하천수에 대한 시료전처리 방법이 간편하고 감도가 좋고 신뢰성있는 정성 및 정량확인이 가능한 방법을 확립하였으며, 방법에 대한 유효성 확인시험도 실시하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 기구

고체상 추출(SPE)을 위한 진공감압장치로는 Supelco 사(Bellefonte, PA, USA)의 SPE vacuum manifold 제품을 이용하였고, 고체상 카트리지는 Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 60 mg, 3 cc) 카트리는 Waters사(Milford, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Caliper Lifescience사(Seattle, WA, USA)의 TurboVap LV evaporator가 시료 농축기로 사용되었다. 실험에 사용한 시험관 등 모든 유리 기구는 세척액과 3차 증류수로 세척 후 건조하여 사용하였다.

### 2.2. 시약

스트렙토마이신(Streptomycin)은 Riedel-deHaen 사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였다. 메탄올, 아세트나이트릴, 아세톤 등의 용매는 J. T. Baker사(NJ, USA)의 HPLC 등급 용매를 사용하였고, HFBA (Perfluorbutyric acid)와 1-heptanesulfonic acid는 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)를 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다.

스트렙토마이신 표준물질을 메탄올과 증류수를 이용하여 100 µg/mL의 표준용액으로 만든 후 -20°C 냉동고에 보관하였으며, 필요시 보관용 표준용액을 메탄올로 혼합·희석하여 사용하였다.

### 2.3. 분석기기

분석장비인 LC/MS/MS는 시료자동주입기(Agilent 1200 Series G1313A Autosampler)가 장착된 Agilent Technologies사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 Series HPLC와 결합된 Agilent 6410 Triple-Quadrupole 텐덤 질량분석기를 사용하였다. 사용된 HPLC 칼럼은 Waters사의 Eclipse Plus C18(2.1×100 mm (length), 3.5 µm particle size)이었으며, 이동상의 유량은 0.3 mL/min, 시료 주입량은 10 µL이었다. HPLC의 이동상으로써 20 mM HFBA와 아세트나이트릴을 Table 1의 기율기 용리조건으로 사용하였다.

3중 사중극자형(triple quadrupole) 질량분석기를 사용하였으며 이온화방식은 전기분무 방식(electrospray ionization, ESI)의 양이온(+) 모드를 사용하였고 MRM(multiple reaction monitoring)방식으로 검출하였으며, nebulizing gas (N<sub>2</sub>)의 온도는 350°C, 유량은 10 L/min, collision voltage는 35V 이었다(Table 1).

### 2.4. 시료 전처리

먼저, 하천수 시료에 1 M 1-heptanesulfonic acid를 첨가한 후(이는 극성이 큰 streptomycin이 streptomycin-sulfonate 이온쌍을 생성함으로써 스트렙토마이신의 극성을 감소시켜 고체상(HLB 카트리지)에서의 머무름을 증가시켜 줌으로써 추출효율을 높이기 위한 이온쌍 시약이다) 이 시료용액을 미리 메탄올 5 mL와 물 5 mL로 활성화 시킨 HLB(hydrophilic lipophilic balance) 카트리지(60 mg, 3 cc)에 적재시켜 흡착시키고 5 mL

**Table 1.** LC/ESI-MS/MS parameters for the analysis of streptomycin

Parameters	Conditions
Column	Eclipse Plus C <sub>18</sub> column, 2.1 mm i.d., 100 mm length, 3.5 µm particle size
Mobile phase	A: 20 mM HFBA B: Acetonitrile
Gradient	Time(min) 0 2 8 8.1 10 Solvent B(%) 15 25 80 15 15
Column flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	10 µL
Column temperature	25°C
Ionization mode	Positive ion electrospray
Capillary voltage	4.00 kV
Gas temperature	350°C
Gas flow	10 L/min (N <sub>2</sub> )
Nebulizer	35 psi

증류수로 세척한 후 메탄올 5 mL로 용출하였다. 용출액은 45°C에서 질소 증발기를 사용하여 농축하고 잔류물은 30% 메탄올 1 mL로 녹인 후 실린지 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액을 만든 후 10  $\mu$ L를 LC-MS/MS에 주입하였다(Fig. 1).

### 2.5. 검정곡선 작성

스트렙토마이신이 검출되지 않은 하천수 바탕 시료(blank sample)에 스트렙토마이신의 농도가 0.05, 0.12, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0  $\mu$ g/L이 되도록 소량첨가(spike)한 후 2.4의 시료전처리법과 동일한 방법으로 처리한 후 LC-MS/MS에 주입하여 크로마토그램을 얻은 후 검정곡선을 작성하였다.

### 2.6. 방법의 유효성 확인

분석과정에서 검출한계를 추정한 후 바탕 하천수에

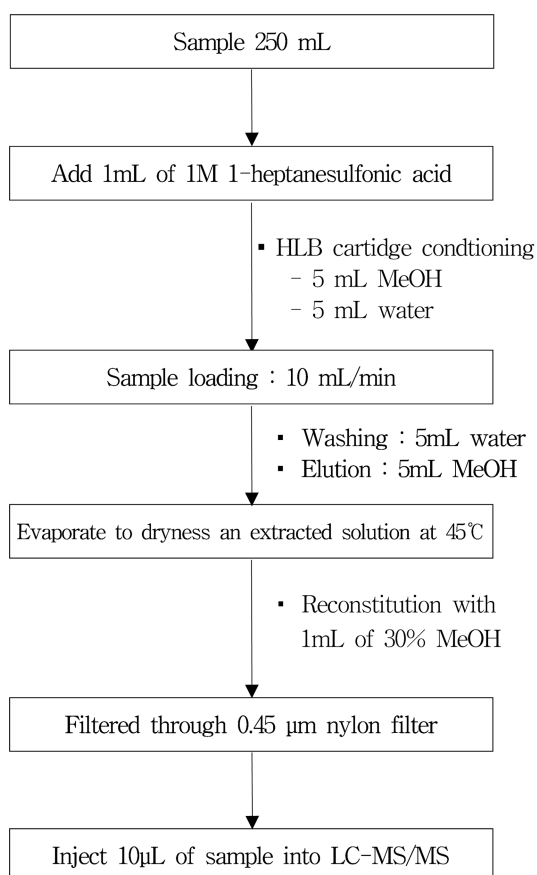


Fig. 1. Schematic diagram of sample preparation for the analysis streptomycin in the water sample by LC-MS/MS.

스트렙토마이신을 소량 첨가시킨 시료(n=7)를 준비하여 측정된 결과로부터 표준편차(s)를 구하고, 선형 검정곡선을 작성하여 기울기(m) 값을 구한 후, 검출한계(LOD)는 3s/m, 정량한계(LOQ)는 10s/m으로 정하였다<sup>11-12</sup>.

LC/MS/MS를 이용한 스트렙토마이신 분석법의 정밀성, 정확성, 회수율을 평가하기 위하여, 시료 중 스트렙토마이신의 농도가 0.5, 2.5, 5.0  $\mu$ g/L이 되도록 spike한 하천수 시료를 각 농도에 대해서 3회 반복 실험하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 스트렙토마이신의 LC/MS/MS 분석

스트렙토마이신의 구조는 Fig. 2와 같으며 분자량이 581.57이며 극성이 큰 -OH와 -NH<sub>2</sub> 기능기가 많이 존재하므로 물질 자체가 극성이 매우 크며 친수성인 물질이므로 수용액으로부터의 추출과 크로마토그래피 분석이 쉽지 않은 물질로 알려져 있으며 논문도 많지 않다.

Table 1에 나타낸 바와 같은 역상 크로마토그래피(RPLC) 조건에서 극성이 큰 친수성물질을 효과적으로 분석하기 위해서 20 mM HFBA 수용액(A)과 아세트나이트릴(B)을 사용하여 기울기 용리방법을 사용함으로써 피이크의 꼬리클림이 없고 바탕선이 안정된 정성 및 정량에 적합한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. LOD(Fig. 3(a)) 및 LOQ(Fig. 3(b)) 농도로 바탕하천수에 스트렙토마이신 표준용액을 소량첨가(spike)한 시료와 시험방법의 선택성 확인을 위해서 바탕 하천수(Fig. 3(c))에 대하여 확립된 분석방법에 따라 전처리한 후 확립된 크로마토그래피 조건에서 HPLC를 통과시킨 후 ESI-MS/MS의 MRM 방식으로 분석한 결과 스트렙토마이신의 머무름 시간은 약 5.8분이었으며, 바탕시료에

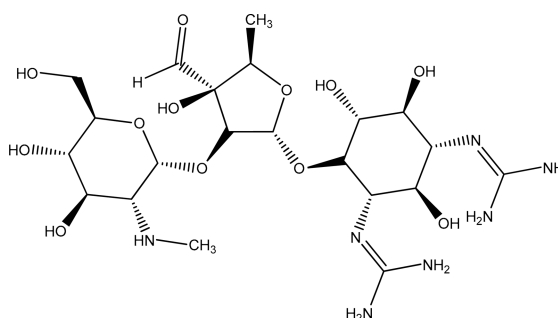
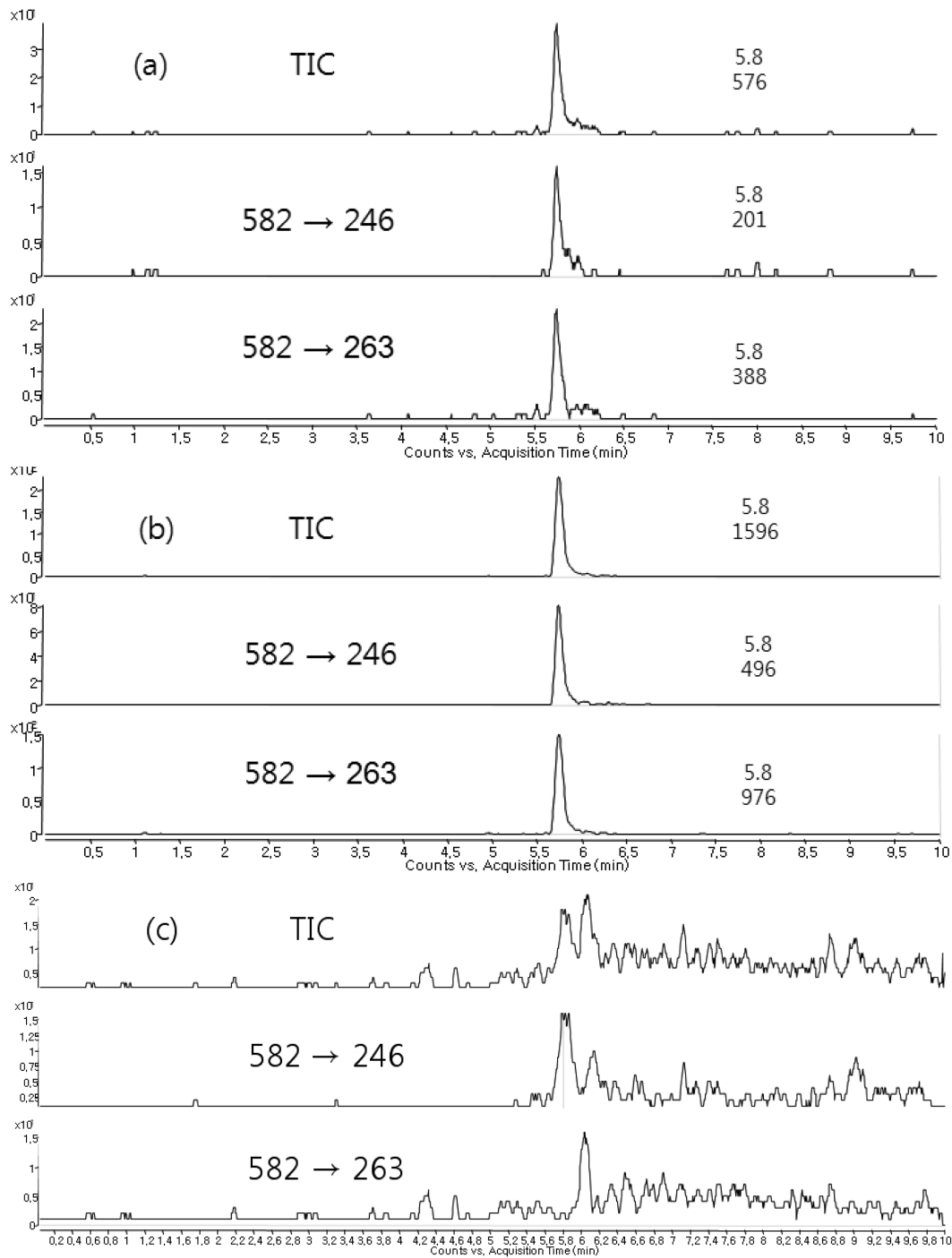


Fig. 2. Chemical structure of streptomycin (MW : 581.57).



**Fig. 3.** LC-MS/MS chromatograms for streptomycin at concentration of (a) LOD ( $0.07 \mu\text{g/L}$ ), (b) LOQ ( $0.23 \mu\text{g/L}$ ) and (c) blank sample in spiked surface water.

서는 스트렙토마이신이 검출된 위치에서는 피크가 검출되지 않았다.

스트렙토마이신 표준용액을 HPLC 칼럼을 통과시키

지 않고 직접 질량분석기에 주입하여 ESI의 양이온(+) 모드와 음이온(-) 모드를 비교한 결과 양이온 모드에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.

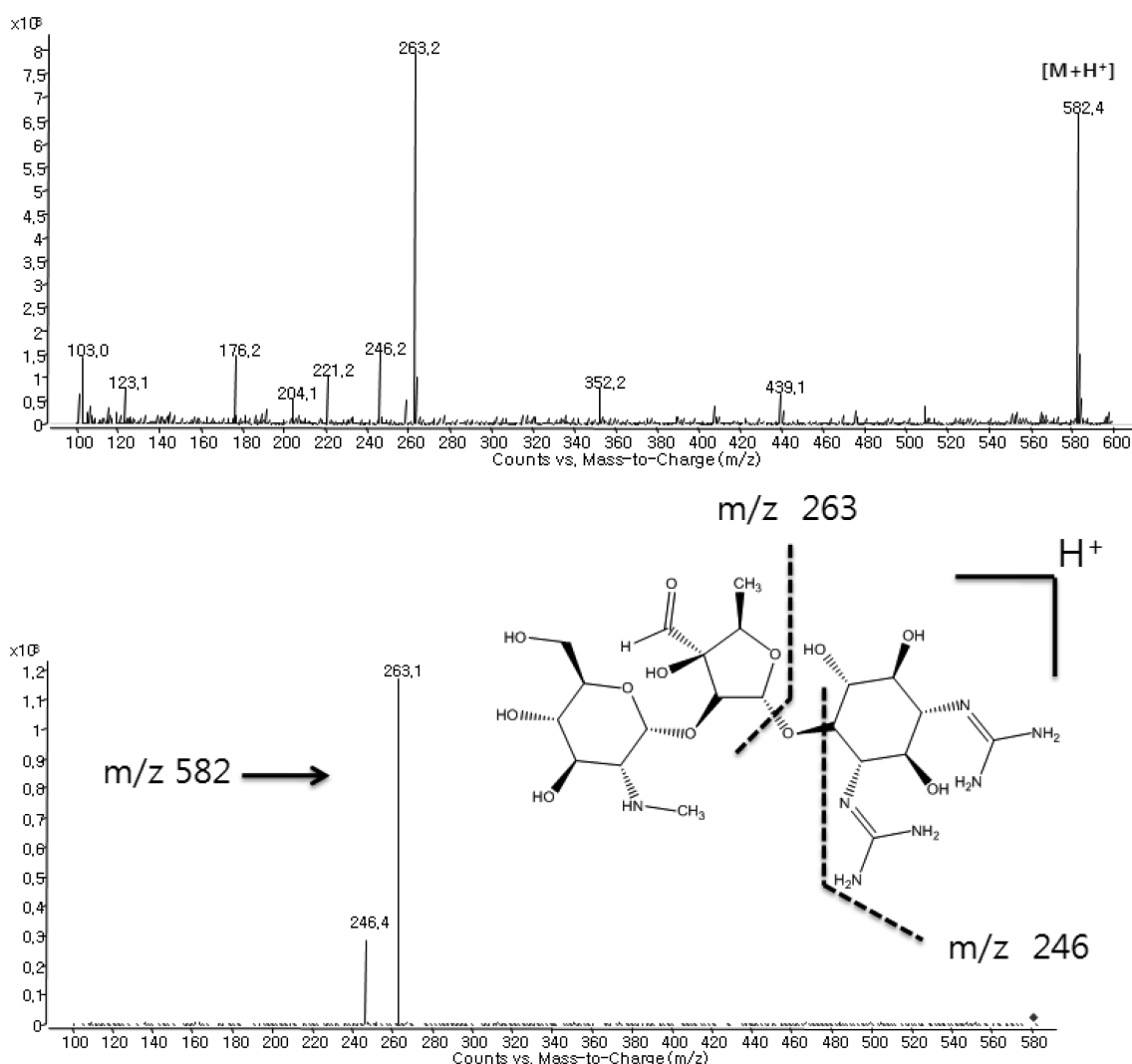


Fig. 4. Eletspray positive ion Q1 mass spectrum (upper) and product ion mass spectrum (lower) used in MRM for streptomycin.

분석의 선택성과 검출감도 향상을 위해 MS/MS 분석시 MRM(multiple reaction monitoring) 모드를 이용하였고, collision energy 강도를 조절하여 생성이온(product ion)의 감응도가 크도록 조정하였다.

텐템 질량분석을 위해 먼저 full scan 모드에서 스트렙토마이신의 스펙트럼을 얻었다(Fig. 4의 상단 스펙트럼). 양이온 모드에서 [M+H]<sup>+</sup>인 m/z 582가 기준이온(base ion)으로 검출되어 이를 선구이온(precursor ion)으로 선택 하였으며, product ion scan을 통하여 m/z 246, 263 이온이 특성 이온으로 나타나 이들을 정성이온으로 선정하였다(Fig. 4의 하단 스펙트럼).

### 3.2. 정량분석을 위한 유효성 검증

실제시료 측정을 위해서 스트렙토마이신이 검출되지 않은 하천수 시료에 0.05, 0.12, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 µg/L의 농도로 스트렙토마이신을 spike한 후 확립된 시료 전처리 방법에 따라 전처리하여 LC/MS/MS로 분석한 피크 면적으로부터 검정곡선을 작성한 결과, 상관계수(coefficient of correlation, r<sup>2</sup>)는 0.9925로 정량 분석에 양호한 직선성(직선식:  $y = 58,686x - 2,677$ )을 나타내었다. 정밀도 및 정확도는 좋지 않지만 흔적량일 지라도 검출하여 정량을 하기 위하여 검출한계(LOD) 이하의 농도에 대해서도 검정곡선에 포함시켰다.

검출한계(LOD)는 0.07 µg/L이었으며, 정량한계(LOQ)

는 0.23 µg/L이었는데, 이는 2.6항에서 제시한 방법으로 LOD와 LOQ의 이론적인 값을 계산한 후 실제 농도를 바탕 하천수에 spike한 후 크로마토그램을 확인한 후 얻은 값이다(Fig. 4).

절대 회수율(absolute recovery) 조사를 위해서 바탕 시료에 0.5, 2.0, 5.0 µg/L 농도가 되도록 분석물질은 소량첨가하여 분석한 결과 각 농도에서 76.0, 48.7, 56.0%의 회수율을 나타내었다. 위와 동일한 농도에서 정밀도(RSD%, n=3)는 2.2, 4.2, 2.3 %를 나타내었고, 정확도(bias)(Bias = [(계산값 - 측정값)/계산값 × 100])는 5.8, 13.8, 0.6%를 나타내어 비교적 만족할만한 정밀도와 정확도를 보여주었다<sup>12)</sup>.

### 3.3. 실제 시료 분석

4대강 (한강, 금강, 낙동강, 영산강) 유역의 하천수를 40지점을 대상으로 본 논문에 제시된 전처리 방법을 이용하여 분석을 실시하였으나 정량한계(LOQ)이상으로 나타난 하천수는 없었다. 외국의 경우에도 하천수 중 streptomycin의 검출 결과는 보고된바 없었다. 하지만, 우리나라의 경우 항생제인 streptomycin의 사용량이 다른 나라에 비해서 많다는 사실에 근거하여 streptomycin의 검출방법을 확립하였으며 하천수에서의 모니터링도 실시하였다.

## 4. 결 론

하천수 중에 잔류하는 스트렙토마이신을 LC/MS/MS로 분석하기 위해 HLB 카트리지를 사용한 고체상 추출법은 크로마토그래피 분리에 방해되는 매트릭스를 효과적으로 제거함으로써 스트렙토마이신을 선택적으로 추출이 가능하였다. 적절한 이온쌍 시약(1-heptanesulfonic acid)을 사용함으로써 친수성이 강한 스트렙토마이신을 하천수 시료로부터 효과적으로 추출(추출율: 48.7~76%)할 수 있었으며, 역상크로마토그래피(RPLC) 시스템에서도 이온쌍시약인 20 mM HFBA를 사용함으로써 감도 좋게(검출한계: 0.07 µg/L, 정량한계: 0.23 µg/L) 분석할 수 있는 방법을 확립하였다.

본 연구를 통해 확립된 분석조건을 이용하여 먹는 물

(정수)에 적용 시킬 수 있고 지속적인 모니터링을 실시하여 수질관리에 이용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 국립환경과학원의 2009년도 잔류의약품질 분석방법 연구 및 실태조사(II) 사업과 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국장학재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(No. S2-2009-000-00686-1), 경기대학교 특성화사업단의 LC/ESI-MS/MS를 사용하였음.

## 참고문헌

1. R. H. M. M Granja, A.M. Montes Niño, R. A. M. Zucchetti, R. E. Montes Niño, R. patel and A. G. Salerno, *Anal. Chim. Acta.* **2009**, 637, 64-67.
2. J. M. Serrano and M. Silva, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1117, 176-183.
3. A. Kaufmann, P. Butcher and P. Kölbener, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 22, 2575-2577.
4. M. van Bruijnsvoort, S. J. M. Ottink, K. M. Jonker and E. de Boer, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1058, 137-142.
5. P. Viñas, N. Balsalobrea and M. H-Córdoba, *Talanta*, **2007**, 72, 808-812.
6. C. W. Pyun, A. M. Abd El-Aty, M. M. M. Hashim, J. H. Shim, S. K. Lee, K. D. Choi, K. H. Park, H. C. Shin and C. H. Lee, *Biomed. Chromatogr.*, **2008**, 22, 254-259.
7. P. Edder, A. Cominoli and C. Corvi, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 830, 345-351.
8. A. K. Sarri, N. C. Megoulas and M. A. Koupparis, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1122, 275-278.
9. S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, M. Mele and M. Nazzari, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1067, 93-100.
10. Y. E. Shim and S. W. Myung, *Anal. Sci. Tech.*, **2008**, 21, 535-431.
11. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, **2007**, 7th Ed, Ch 5.
12. US FDA/Center for Veterinary Medicine, **1999**, Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: methodology.