

HPLC-UV를 이용한 수질 중의 항생제류 동시분석

조성희 · 이정애 · 정병화 · 이원용* · 정봉철[†]
한국과학기술연구원 생체대사연구센터, *연세대학교 화학과

Multiresidue Analysis of Antibiotics in Water by High Performance Liquid Chromatography-ultraviolet Detection

Sung-Hee Cho, Jeongae Lee, Byung Hwa Jung, Won-Yong Lee*, and Bong Chul Chung[†]

*Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology,
39-1 Haweolgok-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 136-791, Korea*

**Department of Chemistry, Yonsei University, 134 Sinchon-Dong, Seodaemun-Gu, Seoul 120-749, Korea*

In the last decades, antibiotics have been widely used against diseases for human and animal as well as industrial farming. After a fraction of the drugs are metabolized to inactive compounds, but a significant amount is excreted as active metabolites. Accumulation of antibiotics in lakes and streams has raised concern regarding the toxicity to aquatic organisms and the emergence of strains of antibiotics resistant bacteria. We developed an analytical method for antibiotics in water based with solid-phase extraction (SPE) in high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to ultraviolet detection (UV). We sample loading and elution tested various pH conditions to get maximum recovery in solid phase extraction. Under pH 4 condition (adjusted with 1 N HCl), water samples of 1 L was loaded onto Sep-Pak C₁₈ cartridge. Antibiotics were separated within 25 min using C₁₈ column (4.5 mm × 150 mm, 5 μm) and a mobile phase consisted of water (pH 2.5 adjusted with formic acid) and acetonitrile using a gradient program at a flow rate of 0.5 ml/min. The analysis of antibiotics separated was performed using UV detector with wavelengths of 265 and 285 nm. The calibration range was 0.01~5 ng/ml and the linearity of the method was over 0.992. The detection limits, defined as a 3 times of maximum S/N ratio, were in the range of 10-50 pg/mL. The recovery was over 90%. This method considered very sensitive with a pg/mL low detection limit level compare to its simple extraction step. We suggest that this method would be useful to evaluate the antibiotics concentration in environmental water.

Key words : antibiotics, high performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolet detection (UV), solid-phase extraction (SPE)

1. 서 론

항생제는 미생물이 생산하는 대사산물로서 소량으로 다른 미생물의 발육을 억제하거나 사멸시키는 물질로 제약물질 중 한 부분을 차지한다. 지난 수십 년 동안 항생제는 사람과 가축의 치료와 농작물의 경작 등 널리 사용되었다.¹⁻⁸⁾ 항생제는 약물로 사용된 후 일부는 비활성물질로 대사되지만, 대부분이 활성을 가진 대사체로 배출된다.⁹⁻¹¹⁾ 최근 항생제의 오용과 남

용, 병원과 공장에서의 항생제의 무단 방류, 양식장에서의 항생제 과량사용 등으로 인한 환경오염 문제가 대두 되고 있다. 강이나 하천에서의 항생제의 축적은 내성을 가진 세균을 증가시키고 수중 생물에 독성을 주는 등 많은 위험을 가지므로 물에서 항생제를 검출하고 모니터링 하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾

수질 중 항생제의 분석방법은 주로 고체상 추출법으로 추출한 후 HPLC로 분리시켜 분석하는 방법이 많이

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: bcc0319@kist.re.kr

연구되었다. 이는 항생제를 HPLC로 분리할 경우 별도의 유도체화 방법이 필요 없기 때문에 간단히 항생제류를 분석할 수 있기 때문이다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 본 연구에서는 물 중의 항생제를 고체상 추출방법을 이용하여 전처리 한 후 HPLC-UV를 사용하여 9종의 항생제를 동시에 검출하는 분석방법을 발전시켰다. 본 연구에서는 최적의 시료전처리 방법을 확립하기 위해 시료를 loading 하고 용출하는 pH 조건에 대한 연구를 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

본 연구에서 사용한 norfloxacin (NOR), lomefloxacin (LOM), Enrofloxacin (ENR), tetracycline (TET), sulfathiazole (STI), sulfamethoxazole (SMO)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, Pipemidic acid (PIP), sulfamethazine (SMA), trimethoprim (TRI)은 ICN Biochemicals사 (Irvine, CA, USA)로부터 구입하였다. 내부표준물질로 사용한 2-methyl-5-nitroimidazole은 Acros Organics사 (Geel, Belgium)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용한 모든 표준물질과 내부표준물질의 표준원액은 1 mg/mL의 농도로 5%의 암모니아수를 포함하는 아세트니트릴을 사용하여 제조하였다. 본 표준물질의 표준원액은 빛을 차단하여 -20°C에 보관하였으며 3개월마다 새로 제조하였다. HPLC 용매로 사용한 아세트니트릴은 Berdick & Jackson사 (Muskegon, MI, USA), formic acid는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. 고체상추출법에 사용한 Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters사 (Mildford, MA, USA)로부터 구입하였고, 본 실험에서 사용한 모든 물은 Milli-Q 시스템 (Millipore, Milford, MA, USA)을 통과한 증류수를 사용하였다.

2.2. 분석기기 및 장치

본 연구에서 사용한 HPLC-UV는 Agilent사의 Hewlett-Packard series 1100 (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA) HPLC-UV system으로 quat pumps (G1311A), degasser (G1322A), auto sampler (G1313A), column oven (G1316A) 그리고, UV detector (G1315A)가 장착되어 있다. Column oven 온도는 40°C로 유지시켰고, UV 265, 285 nm에서 실험하였다. 이때 분석용 컬럼은 Shiseido Capcell Pak MG C₁₈ (4.6 mm i.d., 150 mm length, 5 µm

particle size; Tokyo, Japan)이며, 이동상 용매는 pH 2.5로 적정된 formic acid (용매 A)와 아세트니트릴 용매 (용매 B)를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 흘려주었다. 용매 B는 처음 4%를 시작으로 8분에 30%까지 증가시키고, 다시 20분에 50%까지 증가시킨 후 5분간 유지시켜준 후 처음의 4%로 감소시켜 5분 동안 처음 상태를 유지시켜 주었다.

2.3. 시료전처리

시료를 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 loading 시키는 최적의 pH 조건을 선택하기 위하여 시료의 pH를 달리하여 실험하였다. 시료 1 L를 취한 후 1N HCl을 이용하여 시료의 pH가 3, 4, 5, 6이 되도록 조정 한 후 내부표준물질인 2-methyl-5-nitroimidazole (10 ppm×25 µl)을 첨가하였다. 고체상 추출법을 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 메탄올과 물 (1N HCl을 이용해 적정한 시료의 pH)을 이용해 각각 3 ml씩 2번 컨디션닝 한 후 준비된 시료를 2~3 psi의 압력 하에서 서서히 흘려주어 흡착시킨다. 흡착된 Sep-Pak C₁₈ cartridge는 용출하기 전 물을 제거하기 위해 진공펌프를 이용하여 10분간 진공 상태를 유지하여 Sep-Pak C₁₈ cartridge 안의 수분을 제거시킨다.

수분 제거 후 cartridge 안의 분석물질들을 용출시키기 위한 최적의 용매를 선택하기 위하여 0, 3, 5 및 7% 암모니아수가 포함된 메탄올을 이용하여 2 ml씩 3번 흘려주었다. 용출된 용액은 증발건조기를 이용하여 건조시킨 후 물 100 µl에 녹여 이 중 30 µl를 HPLC-UV에 주입하여 분석하였다.

2.4. 검량선 작성 및 회수율 측정

증류수에 항생제 표준물질용액을 농도 별로 0.01~5 ng/ml가 되도록 첨가하여 시료분석을 위해 선택된 최적의 방법으로 전처리 한 후 HPLC-UV에 각각 30 µl씩 주입하여 분석한 후 일정농도의 내부표준물질의 봉우리면적에 대한 용액 중의 각 성분의 농도에 따른 봉우리 면적 비에 따라 검량선을 작성하고 S/N 비가 3이상 되는 최저농도를 검출한계로 정하였다.

2.5. 실제시료 분석

탄천 지역의 수계, 우물 및 하수처리 방출구에서 받은 물을 시료분석을 위해 선택된 최적의 전처리 방법을 이용해 추출 및 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료전처리 방법 선정

본 연구의 분석물질인 9가지 항생제류 (Fig. 1)는 각각 다른 pKa 값을 가지므로 이온화되는 pH가 다르다. 본 연구에서는 고체상추출법에 의한 최적의 시료전처리 방법을 선택하기 위하여 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 loading 시키는 시료의 pH를 3~6 까지 변화를 주어 실험한 후 각각의 pH에서 9가지 항생제류의 회수율을 Fig. 2에 나타내었다. 본 연구에서 사용한 고체상추출법은 비록 무극성 cartridge인 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 사용하였지만 추출 메커니즘을 음이온 교환 메커니즘을 이용하였다. 시료의 pH를 6에서 4까지 산성인 조건에서 추출할 경우 항생제들의 회수율이 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 시료의 pH가 분석물질의 pKa보다 낮아지면 항생제류가 양이온 형태를 띠어 C₁₈ cartridge에 흡착된 후, 염기성 용매를 사용하면 음이온 교환 메커니즘에 의해 회수율이 된다. 이러한 산성의 조건에서

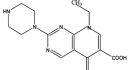
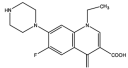
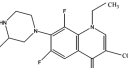
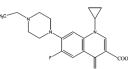
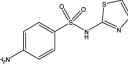
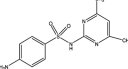
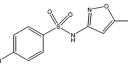
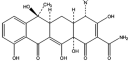
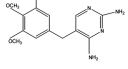
Classification	Name	Structures	pKa	
			1	2
Quinolones	Pipemidic acid		4.2	8.1
	Norfloxacin		6.3	8.8
	Lomefloxacin		5.1	8.1
	Enrofloxacin		6.0	6.9
	Sulfathiazole		7.2	
Sulfonamides	Sulfamethazine		7.4	
	Sulfamethoxazole		5.8	
Tetracyclines	Tetracyclines		8.3	
Trimethoprim	Trimethoprim		6.6	

Fig. 1. Chemical structures of antibiotics and its pKa values.

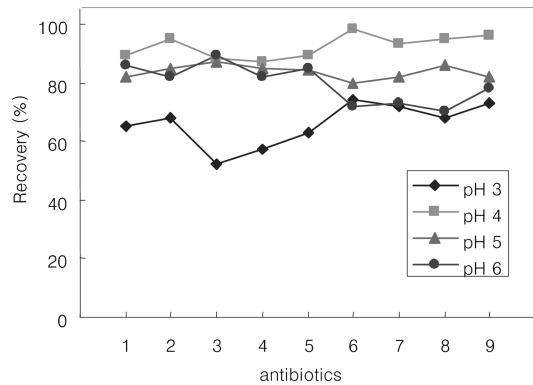


Fig. 2. Effect of variable pH condition for sample loading. (1-pipemidic acid, 2-trimethoprim, 3-norfloxacin, 4-lomefloxacin, 5-enrofloxacin, 6-sulfathiazole, 7-sulfamethazine, 8-tetracycline, 9-sulfamethoxazole).

시료를 loading할 경우 극성의 분석방해물질을 또한 제거시킬 수 있으므로 더 좋은 회수율을 보여준다. 하지만 매우 산성인 pH 3에서는 분석방해물질 뿐만 아니라 항생제들까지도 일부 cartridge에 흡착되지 못하고 빠져나와 회수율이 감소하게 된다. 특히, pKa₁ 5~6, pKa₂ 8~9 값을 갖는 norfloxacin과 lomefloxacin의 경우 pH 3에서 이중전하를 띠어 다른 항생제들보다 더욱 극성이 증가되어 회수율이 좋지 않다. 따라서 본 연구에서 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 loading 시키는 시료의 pH는 4로 고정하여 실험하였다.

다음으로 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 흡착된 항생제들을 용출시키는 용매의 조건에 대한 연구를 위하여 0,

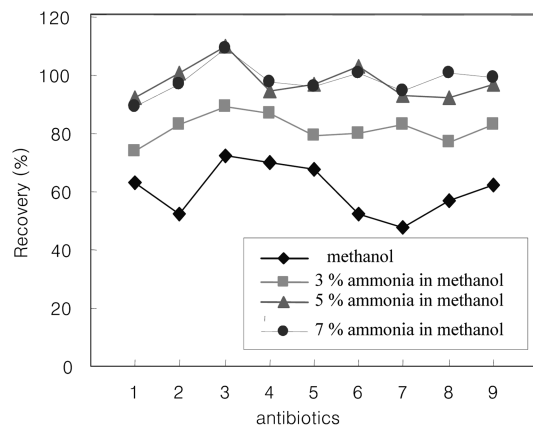


Fig. 3. Effect of ammonia contents in methanol for optimum recovery. (1-pipemidic acid, 2-trimethoprim, 3-norfloxacin, 4-lomefloxacin, 5-enrofloxacin, 6-sulfathiazole, 7-sulfamethazine, 8-tetracycline, 9-sulfamethoxazole).

3, 5 및 7% 암모니아수가 포함된 메탄올을 사용하여 실험한 후 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 높은 pH, 즉 염기의 조건에서 용출할 경우 암모니아수가 포함된 메탄올은 양이온 형태로 흡착되어 있던 분석물질들의 C₁₈ cartridge 밖으로의 용출을 돕는다. 이러한 경우, 메탄올에 포함된 암모니아수의 함량이 증가하면 할수록 더 큰 이온강도 (염기세기)를 가지므로 분석물질과 더 큰 상호작용을 통한 회수율의 증가를 보여주게 된다. 하지만 7%의 암모니아수를 포함한 메탄올의 경우 5%의 암모니아수를 포함한 메탄올과 거의 같거나 약간 줄어든 회수율의 결과를 보여준다. 이것은 5%의 암모니아수가 포함된 메탄올의 염기세기로 충분히 C₁₈ cartridge에 흡착되어 있던 항생제들이 용출될 수 있으며 오히려 더 큰 염기세기를 가질 경우 C₁₈ cartridge에 흡착되어 있던 다른 분석방해물질이 용출되어 회수율이 낮아진 것으로 보여진다. 따라서 본 연구에서는 pH 4로 적정한 시료를 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 loading 시킨 후 5% 암모니아수를 포함한 메탄올을 사용하여 분석물질을 용출하였다.

3.2. 검정곡선 및 회수율 측정

항생제들의 정량분석을 위하여 검정곡선 및 회수율을 측정하였다. 항생제들은 농도범위가 0.01~5 ng/ml 내에서 내부표준물질의 봉우리면적에 대한 각 성분의 농도에 따른 봉우리 면적 비로부터 검정곡선을 얻었다. 얻어진 검정곡선은 $r=0.992$ 이상의 좋은 상관계수와 10~50 pg/ml의 낮은 검출한계를 가졌다. 이를 Table 1에 나타내었다.

본 분석방법으로 얻어진 항생제는 83.41% 이상의 좋은 회수율을 가지며 이에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Accuracy and precision tests in distilled water spiked with known amounts of antibiotics.

Antibiotics	Added amounts (ng/mL)	Amounts founds (ng/mL) mean \pm SD	CV (%)	Recovery (%)
Pipemidic acid	0.20	0.20 \pm 0.01	5.61	98.35
	1.00	0.99 \pm 0.14	14.24	99.03
	5.00	4.57 \pm 0.13	2.76	91.46
Trimethoprim	0.20	0.21 \pm 0.01	3.37	104.78
	1.00	0.93 \pm 0.10	10.27	92.51
	5.00	4.87 \pm 0.27	5.44	97.46
Norfloxacin	0.20	0.21 \pm 0.02	9.14	104.22
	1.00	0.94 \pm 0.06	6.82	93.92
	5.00	4.35 \pm 0.16	3.66	86.90
Lomefloxacin	0.20	0.22 \pm 0.04	16.52	111.99
	1.00	1.00 \pm 0.06	5.51	99.77
	5.00	4.52 \pm 0.35	7.70	90.34
Enrofloxacin	0.20	0.18 \pm 0.02	9.09	88.36
	1.00	0.99 \pm 0.06	5.64	99.43
	5.00	4.46 \pm 0.37	8.20	89.27
Sulfathiazole	0.20	0.20 \pm 0.01	2.97	100.93
	1.00	0.96 \pm 0.03	3.14	95.66
	5.00	4.45 \pm 0.67	15.02	89.06
Sulfamethazine	0.20	0.23 \pm 0.03	14.35	114.94
	1.00	0.92 \pm 0.08	8.24	92.19
	5.00	4.50 \pm 0.19	4.16	89.94
Tetracycline	0.20	0.23 \pm 0.03	11.89	113.46
	1.00	0.89 \pm 0.16	18.34	88.87
	5.00	4.44 \pm 0.01	2.16	88.76
Sulfamethoxazole	0.20	0.21 \pm 0.02	9.52	105.10
	1.00	0.96 \pm 0.04	3.94	96.38
	5.00	4.17 \pm 0.41	9.83	83.41

3.3. 실제시료 분석

고체상추출방법을 이용한 물 시료에서의 항생제류의

Table 1. Calibration dates for antibiotics (linear regression equation : $y = ax + b$)

Antibiotics	Conc. range (ng/mL)	$Y = aX + b$			LOD (pg/mL)
		a	b	r	
Pipemidic acid	0.01~5.00	3.069	0.252	0.993	50
Trimethoprim	0.01~5.00	0.282	0.031	0.998	10
Norfloxacin	0.01~5.00	1.624	0.077	0.992	10
Lomefloxacin	0.01~5.00	2.643	-0.075	0.994	10
Enrofloxacin	0.01~5.00	0.793	0.013	0.995	10
Sulfathiazole	0.01~5.00	0.425	0.052	0.992	10
Sulfamethazine	0.01~5.00	1.113	0.191	0.992	10
Tetracycline	0.01~5.00	0.972	0.207	0.992	10
Sulfamethoxazole	0.01~5.00	5.269	0.733	0.994	10

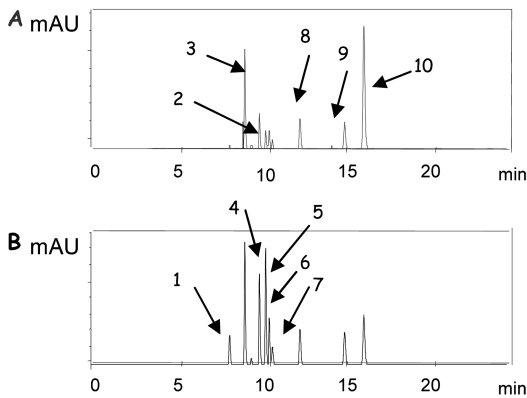


Fig. 4. Chromatograms of added antibiotics in distilled water at 265 nm (A) and 285 nm (B). (1-ISTD; 2-methyl-5-nitroimidazole, 2-pipemidic acid, 3-trimethoprim, 4-norfloxacin, 5-lomefloxacin, 6-enrofloxacin, 7-sulfathiazole, 8-sulfamethazine, 9-tetracycline, 10-sulfamethoxazole).

검출은 HPLC-UV 방법으로 분석하였다. Fig. 4는 삼차증류수에 9가지 항생제류를 첨가하여 얻은 크로마토그램이다. 이때의 UV 흡광파장은 미리 얻은 항생제들의 UV fullscan 스펙트럼을 바탕으로, 항생제들이 각각 가장 좋은 흡광 세기를 갖는 265와 285 nm 2가지를 선택하여 실험하였다. Pipemidic acid, trimethoprim, sulfamethazine, tetracycline, 그리고 sulfamethoxazole은 265 nm에서 더 좋은 흡광세기를 나타내며, 내부표준물질인 2-methyl-5-nitroimidazole, norfloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin, 그리고 sulfaathiazole은 285 nm에서 더 좋은 흡광세기를 나타내므로 각각의 과정에서 분석하였다. 탄천 지역의 수계, 우물 및 하수처리 방출구에서 받은 물을 시료분석을 위해 선택된 최적의 전처리 방법을 이용해 추출 및 분석한 결과 실제 물 시료에서는 항생제가 검출되지 않았다.

4. 결 론

본 연구는 실제 물 시료에서 고체상추출방법을 통해 시료전처리 후 HPLC-UV를 이용하여 항생제류를 검출하기 위한 분석방법을 발전시켰다. 본 연구에서는 pH 4인 물을 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 loading 시켜 시료 안에 존재하는 분석방해물질을 효과적으로 제거하였으며 5% ammonia가 포함된 메탄올을 용출용매로 사용함으로써 C₁₈ cartridge로부터 항생제의 용출을 최적화

하여 83.41% 이상의 좋은 회수율을 얻을 수 있었다. 본 분석방법은 0.01~5 ng/ml 내에서 $r=0.992$ 이상의 좋은 선형성을 보여주었으며, 10~50 pg/ml의 낮은 검출한계를 얻을 수 있었다. 실제 탄천 인근의 물 시료에서 본 분석방법을 이용하여 항생제류를 검출한 결과 모두 검출되지 않았다. 이러한 실제 물 시료에서의 항생제의 모니터링은 계속 되어 질 것이며 향후 더 많은 항생제들을 더 낮은 검출한계에서 분석하기 위한 지속적인 연구가 수행될 것이다.

참고문헌

- Suh, B., Lorber, B., *Med. Clin. North Am.*, **1995**, 79, 869-894.
- Kanfer, I., Skinner, M.F., Walker, R.B., *J. Chromatogr. A* **1998**, 812, 255-286.
- Niessen, W.M.A., *J. Chromatogr. A* **1998**, 812, 53-75.
- Huber, W.G., *Adv. Environ. Sci. Technol.* **1971**, 2, 289-291.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Schuppert, B., Haberer, K., *Water* **1998**, 90, 295-311.
- Ternes, T.A., Hirsch, R., Mueller, J., Haberer, K., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 362, 329-340.
- Moeder, M., Schrader, S., Winkler, M., Popp, P., *J. Chromatogr. A* **2000**, 873, 95-106.
- Haberer, T., *Toxicol. Lett.* **2002**, 131, 5-17.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodrigues, S.V., Baumann, W., *Sci. Total Environ.* **1999**, 225, 135-141.
- Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., *J. Chromatogr. A* **2001**, 938, 175-185.
- Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A., Giger, W., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3632-3638.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K., *Sci. Total Environ.* **1999**, 815, 213-223.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202-1211.
- Yang, S., Carlson, K.H., *Water Res.* **2003**, 37, 4645.
- Alder, A., *Chimia* **2000**, 54, 14-15.
- Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Miao, X.S., *J. Chromatogr. A* **2002**, 952, 139-147.
- Volmer, D.A., Mansoori, B., Locke, S.J., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4143-4155.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1509-1518.