

LC/ESI-MS/MS를 이용한 환경 시료중 의약품질 분석

구소현 · 조현우 · 명승운[†]
경기대학교 이과대학 화학과

Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) from the Environmental Samples by LC/ESI-MS/MS

So-Hyun Koo, Hyun-Woo Cho, and Seung-Woon Myung[†]

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

Pharmaceuticals and personal care products(PPCPs) are emerging contaminants in an aqueous environment. For the effective monitoring of seven PPCPs from the wastewater treatment plants and surface water by LC/ESI-MS/MS, the analytical methods were developed. The investigations of analysis methods were included the rate of sample loading, volume of elution solvent, type of SPE cartridge, and volume of SPE cartridge. LODs and LOQs for the spiked sample in fresh water were in the range of 0.03~0.22 pg/mL and 0.08~0.37 pg/mL, respectively. The recovery in the concentration of 0.1 ng/mL were between 70.8% and 86.3%. The target pharmaceuticals were detected in concentrations of pg/mL~ng/mL in influent to and effluent from wastewater treatment plant and surface water in river.

Key words : PPCPs, aqueous environment, pharmaceuticals, LC/ESI-MS/MS

1. 서 론

일반 가정의 수납 공간이나 비상약 서랍을 열어보면 언제인지는 모르지만 복용하고 남은 약봉지 1~2개 정도는 발견하게 되고 이를 무심코 쓰레기통에 넣게 되며, 사람들은 당뇨병, 고혈압, 감기 등으로 인하여 약을 복용하고서 용변을 보게 된다. 또한, 가정주부들은 냉장고를 정리하다가 시간이 경과되어 탄산가스가 빠져나간 소다 음료를 싱크대 배수구를 통해서 버린다. 그리고 축산 농가에서는 소나 돼지 등을 키우면서 이들의 질병 치료나 예방 등을 위해서 사료에 각종 의약품들을 섞어서 먹이고 있으며 축산 농가에서 배출된 배설물들은 축산폐수 처리장으로 이동되어 처리된다.

이와 같이 의약품은 일반 가정에서 뿐만 아니라 병원 하수, 제약공장, 살균소독제의 사용 등 다양한 경로를 거쳐 환경으로 유입된다. 이렇게 환경에 유입된 의약품들은 대개 대사를 거치면서 활성이 감소하게 된다.

생활하수나 축산폐수와 같이 일반적인 오염물질의 정화작업을 주목적으로 만들어진 하수처리시설(Sewage Treatment Plant, STP)에서는 의약품질에 대해서는 정화하는 능력이 효율적이지 않을 수 있다.

하수처리 시설이나 축산폐수 처리장에서 여과되지 않은 상태로 수계로 흘러 들어간 의약품질은 퇴적물이나 토양에 축적됨으로써 토양 오염의 원인이 될 수 있다. 오염된 토양으로 인해 의약품이 식물의 조직으로 흡수되고 음식물 섭취 등을 통하여 인간의 체내로 되돌아 오게 된다. 궁극적으로 반감기가 매우 길거나 축적성이 매우 높은 의약품의 경우에는 철저하게 하수처리 시설을 통하여 제거해야만 하는 것이 중요하지만, 불행하게도 의약품의 하수처리 문제는 아직까지는 하수처리의 우선 순위가 되지 못하고 있는 실정이다.

의약품은 여러 가지 질병의 치료 목적으로 개발되는 것으로 인간 뿐만 아니라 동물과 농산물 생산, 수산물 양식에도 광범위하게 사용되고 있다. 현재 세계적으로

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: swmyung@kgu.ac.kr

3,000여 이상의 화학종이 의약품으로서 승인을 받았고¹⁾ 각 나라별로 이들의 연간 소비량이 수 킬로그램(kg)에서 수천 톤(ton)에 이르고 있다.^{2,4)}

현재 환경 중 의약품의 오염 실태와 관리에 관하여 체계적인 연구와 제도적인 관리를 시행하고 있는 곳은 유럽연합 국가들과 미국이다. 환경 중 의약품의 오염이 생태계에 미치는 영향 연구가 유럽에서 1980년대 이후 시작되었고, 1990년대 후반부터 미국에서도 관심을 기울이기 시작하였으며, 미국 환경청 산하 연구 개발국(Office of Research and Development, ORD) 실험실 중 한 부서가 전적으로 환경 중 의약품과 생필품의 의약품질 문제를 전담하고 있다. 1999년부터 2000년까지 미국 30개 주 139개 강에서 의약품, 내분비계 장

애물질, 기타 유기물질 등의 오염정도를 실측 평가한 보고서가 미국 지질조사소(US Geological Survey, USGS)에서 출판되기도 하였다. EU의 의약품 평가기구(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA)에서는 인체용 의약품 및 동물용 의약품의 환경 위해성 평가를 위한 지침을 제시하고 있다.⁵⁾

국내에서도 의약품질을 환경 중 오염물질로 인식하고 이에 대한 연구가 이루어지고 있는데 최근에 국내 연구기관에서는 의약품에 의한 환경오염 문제와 대응 방안과 의약품질의 환경 위해성 평가 연구를 통하여 물 환경 중 환경 위해성 평가가 필요한 의약품질의 우선 순위를 정하고 이를 보고한바 있다.⁶⁾ 또한 국내 하천수

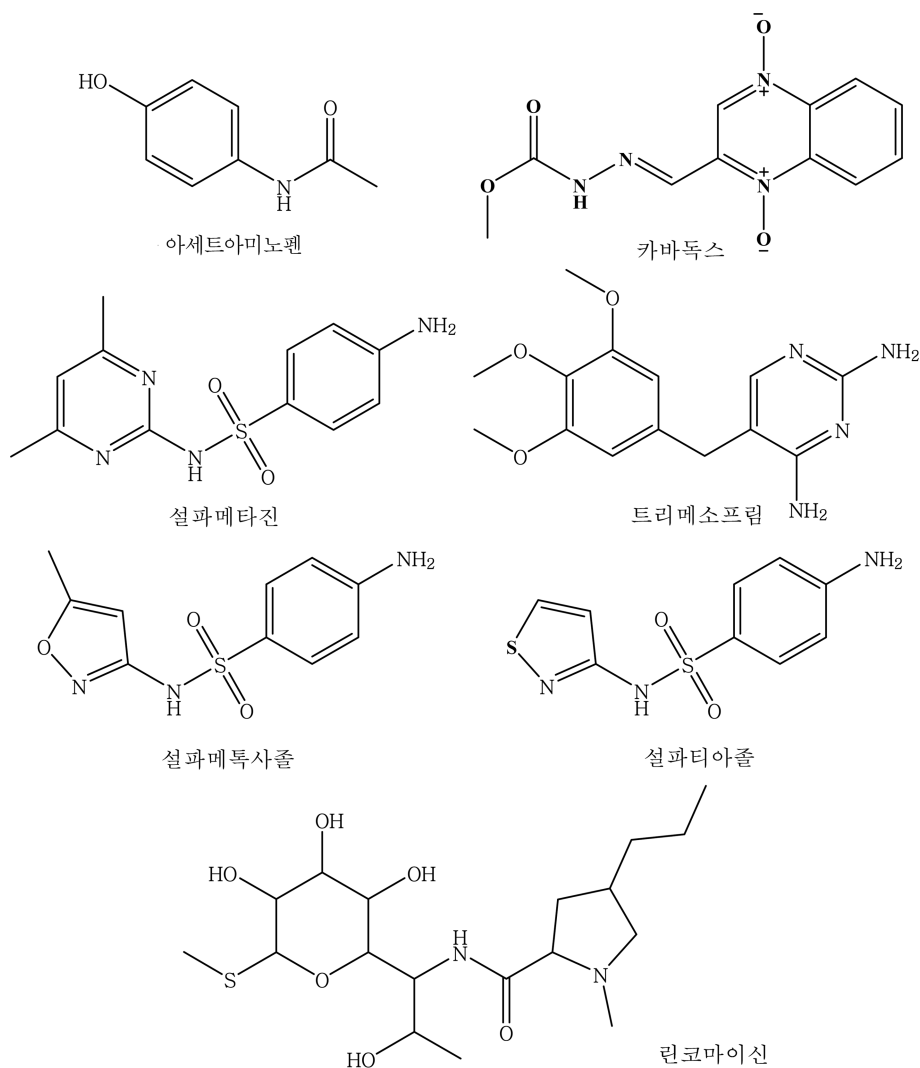


Fig. 1. The chemical structures of the pharmaceuticals.

에서 이오프로마이드, 카페인, 아세트아미노펜 등 14종의 의약품질이 검출이 되었고, 경안천, 한강 본류 및 팔당호에서 설파메타진 등 7종의 의약품질이 검출되었다고 보고된 바 있다.⁷⁻⁸⁾

물 환경 시료중의 의약품질 분석은 HLB와 MCX 카트리지를 이용하여 시료 전처리를 한 후 GC/MS나 LC/MS를 이용하여 수 pg/mL에서 ng/mL 농도 수준으로 분석하는 것이 일반적이다.⁹⁻¹⁵⁾

본 연구에서는 카바독스(carbadox), 설파메타진(sulfamethazin), 설파티아졸(sulfathiazol), 설파메톡사졸(sulfamethoxazol), 트리메소프림(trimetoprim), 아세트아미노펜(acetaminophen), 린코마이신(lincomycin) 등 7종(Fig. 1, Table 1)에 의약품질에 대한 최적의 분석조건 확립 및 유효성 검증을 실시하고, 실제 시료에서의 검출을 실시하였다.

2. 실험방법

2.1. 기구

용매의 농축을 위해 사용된 농축기는 Caliper Lifescience사(Seattle, WA, USA)의 TurboVap LV 질소농축기를 사용하였다. 추출에 사용한 고체상 카트리지에는 Oasis HLB(200 mg, 6 cc)와 Oasis MCX(150 mg, 6 cc)를 Waters사(Milford, Massachusetts, USA)에서 구입하여 사용하였고, vacuum manifold는 Supelco사(Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다.

2.2. 시약

의약품질인 설파메톡사졸, 설파메타진, 설파티아졸, 린코마이신, 아세트아미노펜, 카바독스는 Sigma-Aldrich 사(St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 트리메소프림은 Fluka사(Seelze, Germany)의 제품을 사용하였고 정제용 내부 표준물질(surrogate)는 Cambridge Isotope Laboratories사(Andover, MA, USA)의

¹³C로 치환된 설파메타진-6-¹³C과 내부 표준물질인 terbutylazine은 Fluka사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였다.

메탄올, 아세트나이트릴, 아세톤 등은 J.T.Baker사(NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였고, Na₂-EDTA와 황산은 Junsei사(Tokyo, Japan), 염산은 Waco사(Osaka, Japan), 암모늄아세테이트는 Merck사(Darmstadt, Germany), 암모니아수는 Samchun사(Kyungki-do, Korea)의 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다.

표준물질과 정제용 내부 표준물질, 내부표준물질은 메탄올을 이용하여 1000 µg/mL의 표준용액으로 만든 후 -20°C 냉동고에 보관하였고, 용도에 따라서 메탄올로 묽혀서 사용하였다.

2.3. 분석기기

LC/MS/MS는 시료 자동주입기(Agilent 1100 series G1313A Autosampler)가 장착된 Agilent사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1100 series HPLC와 결합된 Triple-quadrupole 텐덤 질량분석기(Quattro micromass, UK Ltd, Manchester, UK)를 사용하였다.

7종의 의약품질과 내부 표준물질, 정제용 내부 표준물질은 스캔 모드(scan mode)에서 각 물질의 질량스펙트럼(full spectrum)을 확인한 다음 각 물질별 선구 이온(precursor ion)을 선택하여 최적의 생성이온(product ion) 조건을 잡은 후 MRM(multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 분석하였다.

HPLC 컬럼은 Phenomenex사(Phenomenex, Torrance)의 Phenyl-Hexyl 컬럼(3 mm I.D. 150 mm, 3µm)을 사용하였으며, 이동상으로는 20 mM 암모늄아세테이트(pH 6.5)와 아세트나이트릴을 300 µL/min 유량으로 기울기 용리(gradient) 방법을 사용하였으며 자세한 조건은 Table 1에 나타내었다.

질량분석기는 전자분무방법(electrospray, ESI)의 양

Table 1. Physical properties of the pharmaceuticals

Compounds	MW	CAS #	pKa	Water solubility	Use
Acetaminophen	151.2	103-90-2	9.5	0.1~0.5 g/100 mL at 22°C	analgesics/anti-inflammatory
Carbadox	262.2	6804-07-05	1.98	insoluble in water	antibiotics
Lincomycin	406.5	154-21-2	7.79	slightly soluble in water	antibiotics
Sulfamethazine	277.3	57-68-1	7.4	50 mg/100mL at 29°C (pH 7.0)	antibiotics
Sulfamethoxazole	253.3	723-46-6	5.8	1 mg/mL at 20°C	antibiotics
Sulfathiazole	255.3	72-14-0	7.2	0.4 g/mL	antibiotics
Trimethoprim	290.3	738-70-5	6.6	4 mg/mL	antibiotics

이온 모드를 사용하였으며 각종 파라미터는 Table 1에 나타내었다.

2.4. 시료 전처리

이물질이 걸러진 시료 500 mL를 취하여 0.1 µg/mL Na₂-EDTA 0.5 mL와 10 µg/mL 정제용 내부 표준물질 25 µL를 첨가한 후, 3.5 M 황산을 사용해 pH를 3.0으로 조절하고, HLB와 MCX 카트리지를 vacuum manifold에 장착한 후 증류수 2 mL와 메탄올 2 mL를 흘려주고 다시 5% 암모니아수-메탄올 용액 2 mL, 증류수 2 mL, pH 3.0인 증류수 2 mL를 차례로 통과시켜 컨디셔닝 하였다. 추출 고체상인 HLB와 MCX 카트리지를 HLB가 위에 위치하도

록 연결한 다음 시료를 적재시켰다. 시료가 통과된 카트리지를 분리하여 HLB는 증류수 2 mL로 씻어준 후 메탄올 8 mL을 적재하고 MCX는 증류수 2 mL로 씻어준 후에 두 카트리지를 다시 연결하여 메탄올 2 mL을 적재한 다음 계속해서 메탄올 6 mL로 용리시킨다. 위층의 HLB 카트리지는 제거하고 MCX는 5% 암모니아수-메탄올 용액 4 mL로 다시 용리시킨다. 이 용리액에 내부표준물질인 10 µg/mL 터부틸라진 25 µL를 넣고 질소증발기를 사용하여 용매를 20 µL까지 증발시킨 다음 20 mM 암모늄아세테이트 500 µL로 잔사를 녹여 0.45 여과지를 사용하여 여과시킨 후 2 mL 갈색 바이알에 옮겨 LC/ESI-MS/MS에 주입하여 분석하였다 (Fig. 2).

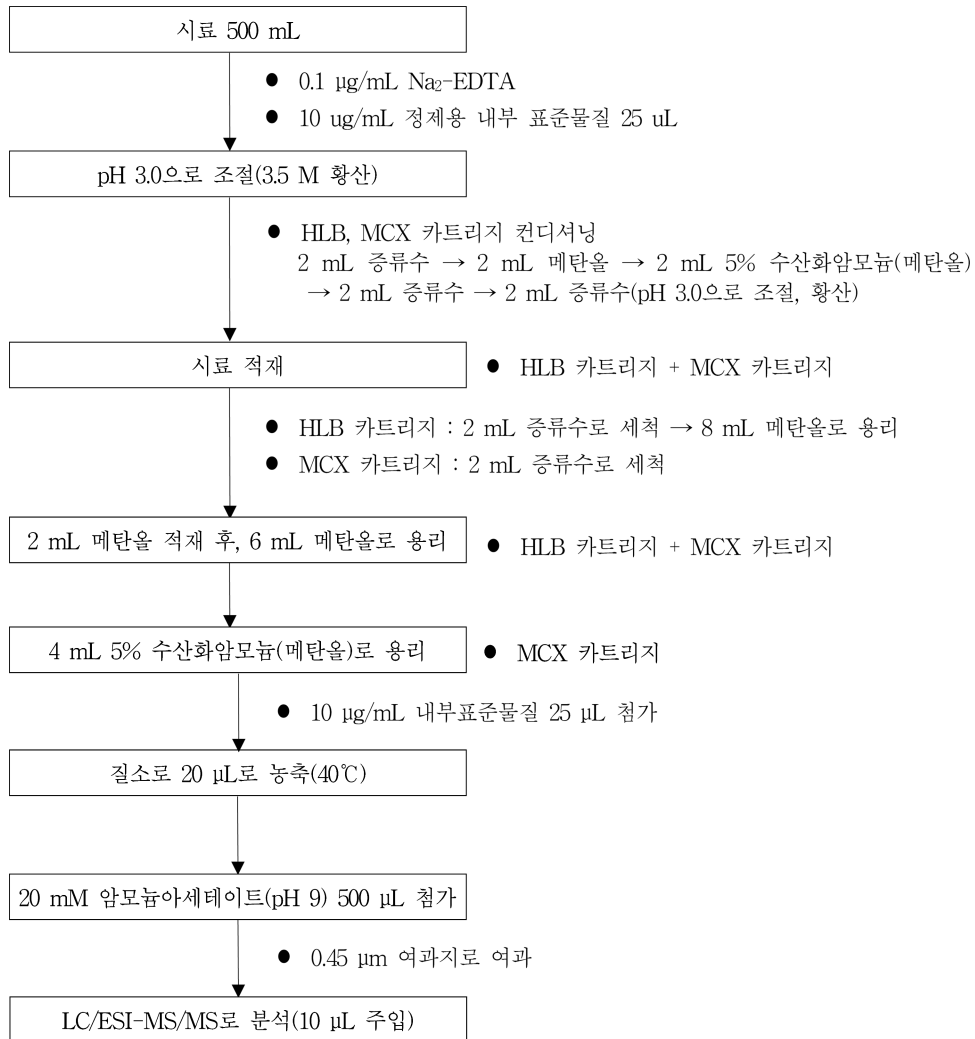


Fig. 2. Flow diagram of the sample preparation for the pharmaceuticals.

3. 결과 및 고찰

3.1. 카트리지 선택

환경 시료 중 의약품물질은 매우 낮은 농도인 수 ng/L~ μ g/L로 존재하고 있으며, 시료 중 방해 물질이 많기 때문에 분석 물질을 추출하여 분석하기에는 많은 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 많은 양의 시료를 사용하여 적은 양으로 농축이 용이하고, 방해 물질을 효과적으로 제거하는 고체상 추출법을 전처리 방법으로 선택하였으며, 최적의 추출 인자 조건들을 확립하였다.

분석물질의 pK_a 값과 화학적 구조를 고려한 카트리지의 선택이 분석 물질의 회수를 크게 좌우하게 되는데 다양한 pK_a 를 가지는 의약품물질을 동시에 분석하기 위한 카트리지의 선택을 위해 비극성 상호작용으로 중성형태의 분석 물질을 흡착시키는 HLB(Hydrophilic-Lipophilic Balance) 카트리지와 양이온 교환 메커니즘으로 양이온 형태의 분석물질을 흡착시키는 MCX(Mixed mode Cation eXchange) 카트리지를 사용하였고, 시료를 pH 3으로 조절하여 분석 물질을 양이온 또는 중성형태를 갖도록 하였으며, 산성 조건에서 시료를 고체상에 적재할 경우 극성의 분석 방해 물질을 제거할 수 있으므로 더 좋은 회수율을 나타내도록 하였다. MCX에 시료를 적재할 때에는 분석 물질을 흡착시키는데 방해되는 금속 양이온을 제거하기 위하여 Na_2 -EDTA를 첨가하였다.

3.2. 카트리지 용량 및 세척

고체상 추출과정 중 카트리지의 용량에 따라 소요되는 시간과 비용, 유기용매의 사용량이 많이 차이가 나게 되므로 효과적인 카트리지 용량이 선택되어야 한다. 적은 용량의 카트리지를 사용할 경우 비용이 저렴하고, 분석 물질을 용리시키는데 필요한 유기용매의 사용량이 줄어들 뿐만 아니라 시간이 단축되어진다. 반면에 시료의 매트릭스가 지나치게 많을 경우에 고체상 카트리지의 용량이 작으면 원하는 분석 물질의 흡착이 제대로 이루어지지 않을 수가 있다.

따라서, 본 실험에서는 물 환경 중 의약품물질 분석에 일반적으로 많이 사용되고 있는 HLB와 MCX 카트리지 60 mg, 3 cc 카트리지와 150 mg, 6 cc 카트리지를 비교 실험하였으며, 시료 적재 후에 카트리지를 2 mL 증류수로 세척한 경우와 세척하지 않은 경우를 비교 실험 하였다.

그 결과 6 cc 카트리지를 사용하고 시료 적재 후 세척을 하였을 경우는 71.2%~94.8%의 회수율을 나타내었고, 세척을 하지 않았을 경우에는 71.0%~94.6%의 회수율을 나타내었다. 그리고 3 cc 카트리지에 시료를 적재한 후 2 mL 증류수로 세척하였을 경우에는 32.5%~92.2%, 세척을 하지 않았을 경우에는 27.7%~50.5%의 회수율을 나타내었다.

따라서, 본 실험에서는 HLB와 MCX 150 6 cc 카트리지에 시료를 적재한 후 2 mL 증류수로 세척하여 사용하는 것으로 결정하였다(Fig. 3).

카트리지의 세척 과정은 시료가 고체상에 적재될 때 분석 물질 뿐만 아니라 필요하지 않은 시료의 매트릭스가 동시에 흡착이 일어나기 때문에 이를 제거해주는

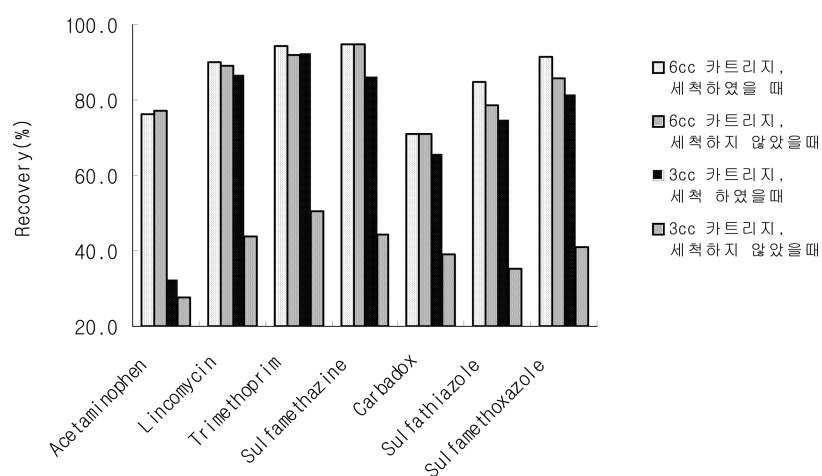


Fig. 3. Comparison of the volume of SPE cartridge and with/without washing.

과정이지만 이 과정에서 분석 물질이 용출되기도 하므로 신중하게 고려되어야 한다. 증류수를 이용해서 카트리지를 세척하였을 경우에 고체상에 흡착되어 있던 방해 물질이 효과적으로 제거되어 바탕선이 안정화 되어 더 좋은 회수율이 나타났다.

3.3. 시료 적재 속도

고체상 추출법에서는 재현성 있는 결과를 나타내기 위해서 적절한 적재 속도를 선택하는 것이 중요하다. 적재 속도가 빠르면 전처리하는데 걸리는 시간은 줄어들지만 분석 물질의 흡착이 제대로 일어나지 않아 낮은 회수율 및 재현성이 좋지 않은 결과를 얻게 되고, 속도를 너무 느리게 하면 전처리하는데 많은 시간 소요되며, 실제 시료에 적용했을 경우 카트리지가 막히는 경우가 발생할 수 있고 분석의 효율성을 저하시킬 수 있다.

따라서 적절한 적재 속도를 얻기 위해 시료 적재 속도를 5, 10, 20 mL/min로 조절하여 회수율과 재현성을 비교하였다. 그 결과 5 mL/min에서 카바독스는 검출되지 않았으며, 나머지 의약품들의 경우 7.3%~96.1%의 회수율을 나타냈는데 아세트아미노펜의 경우 매우 낮은 회수율을 나타내었다. 10 mL/min의 속도에서는 설파메타진 90.2%, 설파티아졸 82.2%, 트리메소프림 83.2%, 아세트아미노펜 87.1%, 카바독스 84.9%로서 동시 분석 대상 의약품질들에 대해서 가장 좋은 회수율을 나타내었다(Fig. 4). 20 mL/min의 적재 속도에서는 70.3%~89.2%의 회수율을 나타내었다. 따라서 전체적으로 높은 회수율을 보여준 10 mL/min 속도를 500 mL의 시료의 적재속도로 선정하였다.

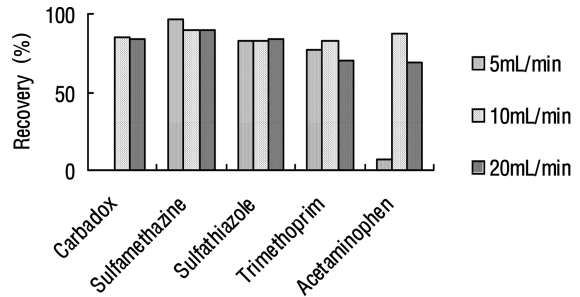


Fig. 4. Comparison of recoveries according to rate of the sample load.

3.4. 카트리지 용리액 부피

고체상에 원하는 분석 물질을 흡착시킨 후 분석 물질을 용리시키는 과정에서 용리액의 종류와 부피는 분석 물질의 추출과 방해 물질의 제거에 중요한 역할을 한다. 본 실험에서는 HLB 카트리지에 소수성 상호작용으로 흡착된 중성 분석 물질을 용리하기 위해서 메탄올을 사용하였다. HLB 카트리지와 MCX 카트리지를 분리한 후 HLB 카트리지만 따로 메탄올을 이용하여 분석물질을 용리하는데, 이때 메탄올의 양이 적게 되면 분석 물질이 충분히 용리되지 않아 회수율이 떨어지게 되고 메탄올의 용리량이 많아지게 되면 방해 물질까지 용리되어 분석에 효과적이지 않다.

추출용매인 메탄올의 양이 4 mL일 때는 60.7%~82.9%, 6 mL에서는 68.3%~84.6%의 회수율을 나타내었는데, 8 mL에서는 80.2%~94.8%의 높은 회수율을 나타내었다. 따라서, 본 연구에서는 용리량이 늘어날수록 회수율이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 그러나 메탄올의 양을 더 늘릴 경우 회수율이 증가하더라도 시료의 방해 물질까지 용리되고, MCX와 연결하여 다시

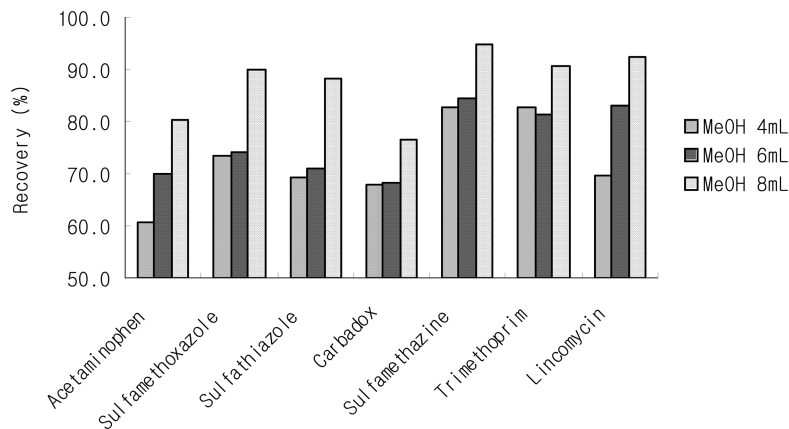


Fig. 5. Recoveries according to volume of methanol for HLB cartridge.

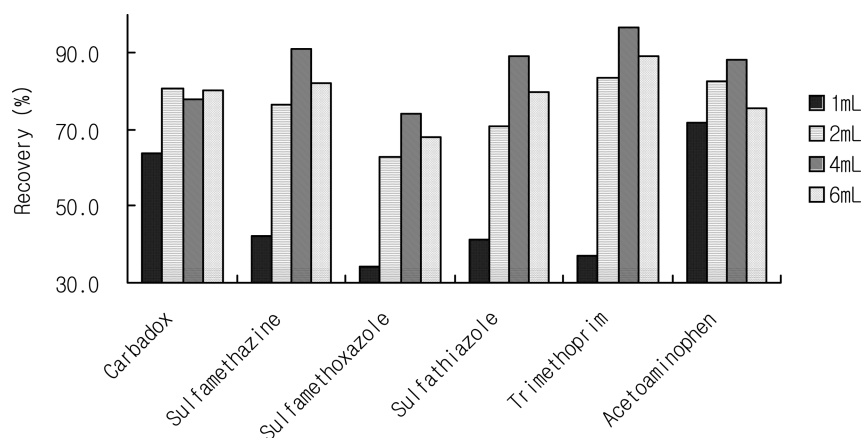


Fig. 6. Comparison of recoveries according to volume of 5% NH_4OH -methanol solvent.

메탄올로 용리하는 과정이 포함되어 있기 때문에 8 mL만 사용하였다.

HLB와 MCX를 다시 직렬 연결하여 메탄올 2 mL를 적재한 후 6 mL를 더 용리하고, HLB를 제거한 다음 MCX만 다시 5% NH_4OH -메탄올 용액을 이용하여 분석 물질을 용리하였다. 이때 염기성 용리액에 의해서 양이온 형태로 흡착되어 있던 분석 물질이 중성 형태로 바뀌면서 정전기적 상호작용이 끊어지고 메탄올이 비극성 상호작용을 방해하여 분석 물질이 용리된다. 본 실험에서는 5% NH_4OH -메탄올 용액의 양을 1, 2, 4, 6 mL로 조절하여 실험한 결과 1 mL에서는 34.3%~71.9%의 낮은 회수율을 나타내었으며, 4 mL일 때 설파메타진 91.1%, 설파티아졸 89.3%, 설파메톡사졸 74.1%, 트리메소프림 96.5%, 아세트아미노펜 88.1%

로서 가장 좋은 회수율을 나타내었다. 5% NH_4OH -메탄올 용액의 양이 충분하지 않으면 분석 물질의 용리가 전부 일어나지 않아 회수율이 낮아지고, 6 mL로 용리할 경우 시간의 소모와 방해 물질까지 용리되어 바탕선이 올라가기 때문에 회수율이 낮게 나타났다(Fig. 6).

3.5. LC/ESI-MS/MS

Table 2에 나타낸 바와 같은 기울기 용리 조건에서 7종의 분석 대상 물질인 아세트아미노펜은 3.56분, 카바독스는 4.08분, 설파티아졸은 4.43분, 링크마이신은 4.91분, 설파메톡사졸은 5.26분, 트리메소프림은 5.94분, 설파메타진은 6.37분에서 검출되었고, 정제용 내부표준물질인 설파메타진- $6\text{-}^{13}\text{C}$ 은 6.37분, 내부표준물질인 터부털라진은 7.61분에서 검출되었다(Fig. 7).

Table 2. LC/ESI-MS/MS conditions for the determination of the pharmaceuticals

Parameters	Conditions
Column	Luna Phenyl-Hexyl column, 3 mm I.D. 150 mm, 3 μm
Mobile phase	A: 20 mM Ammonium acetate(pH 6.5) B: Acetonitrile
Gradient	Time(min) 0 10 11 15 15.1 17 Solvent B(%) 30 65 100 100 30 30
Column flow rate	300 $\mu\text{L}/\text{min}$
Injection volume	10 μL
Column temperature	25°C
Ionization mode	Positive ion electrospray
Capillary voltage	3.20 kV
Cone voltage	30 V
Source temperature	120°C
Desolvation temperature	300°C
Cone gas flow	50 L/hr
Desolvation gas flow	550 L/hr

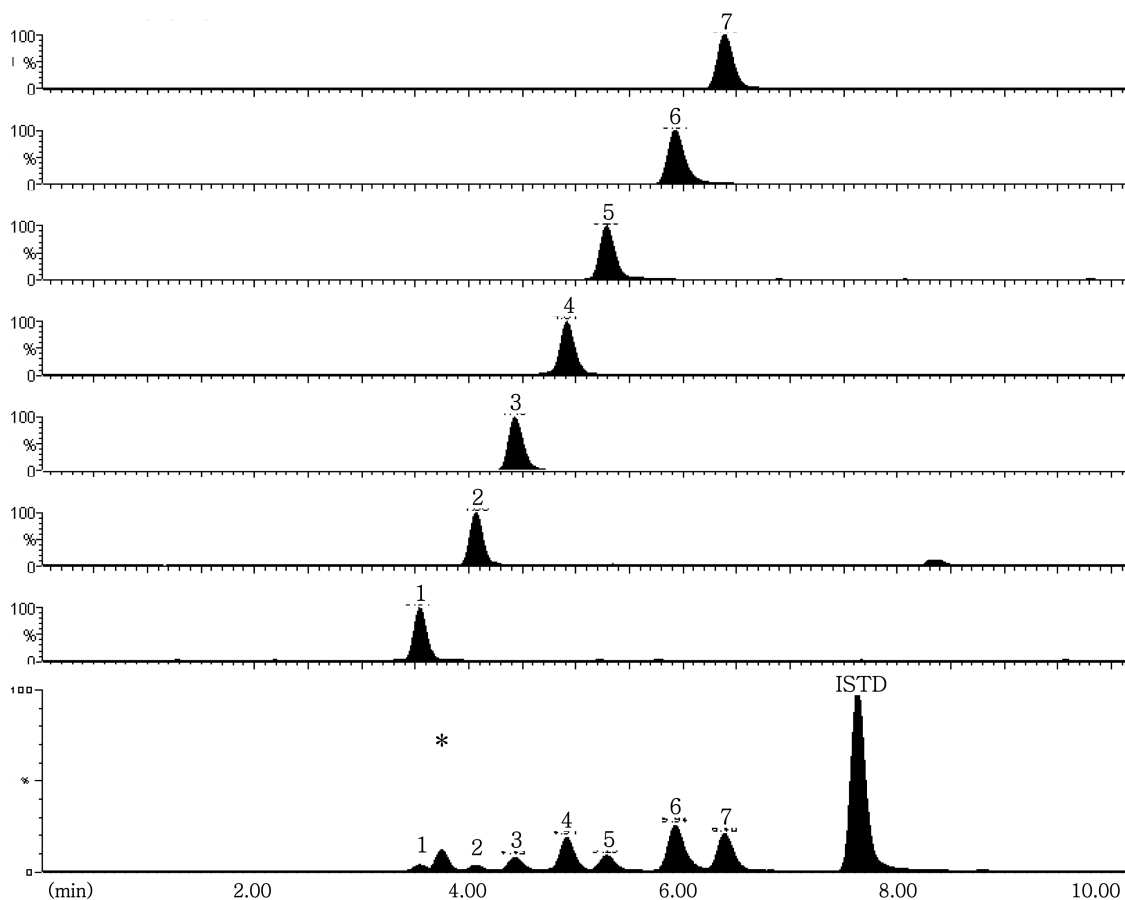


Fig. 7. Extraced ion chromatogram and total ion chromatogram (bottom layer) of LC/ESI-MS(peak identification : 1=acetaminophen; 2=carbadox; 3=sulfathiazole; 4=lincomycin; 5=sulfamethoxazole; 6=trimethoprim; 7=sulfamethazine; ISTD=terbutylazine; *=caffein).

한편, 분석대상 의약품질은 이동상의 조성에 비해 염기성 물질이기 때문에 양이온 ESI 모드의 전체 스캔 스펙트럼(full scan spectrum)에서는 분자 구조에 양성자 1개가 붙은 $[M+H]^+$ 가 유사분자이온(pseudo-molecular ion)으로 생성되면서 기준 이온(base ion)을 나타내는 것이 일반적인 이온화 경향이였다.

텐텐 질량분석을 위해서 선구이온(precursor ion)을 선택한 후 최적의 충돌 에너지(collision energy)로 생성이온(product ion)을 생성한 다음, 분석의 감도를 높이고 매트릭스에 의한 방해효과를 최소화하기 위하여 MRM(multiple reaction monitoring)방법을 사용하였다. 또한, 정량과 정확한 정성을 위해서 MRM을 위한 특성이온(characteristic ion)을 3개씩 선택하였다(Table 3). 선구이온으로서 아세트아미노펜은 m/z 152.2, 카바독스는 m/z 262.9, 설파티아졸은 m/z 256.2, 린코마이

신은 m/z 407.6, 설파메톡사졸은 m/z 254.3, 트리메소프림은 m/z 291.3, 설파메타진은 m/z 279.3이었다.

3.6. 검정곡선

실제시료 분석을 위해서 의약품질의 시료 중 농도가 0.01~5 ng/mL의 범위가 되도록 증류수에 표준물질을 첨가하여 확립된 전처리 과정을 거쳐 검정곡선을 얻었다. 의약품질의 각 농도에서 측정된 피크의 면적과 내부 표준물질의 면적의 비로서 계산하여 검정곡선을 작성하여 검정식과 상관 계수(r^2)을 구하였다. 아세트아미노펜 $y=0.2186x-0.0236(r^2=0.9972)$, 카바독스 $y=0.0747x-0.0076(r^2=0.9961)$, 설파티아졸 $y=0.2168x-0.0251(r^2=0.9983)$, 린코마이신 $y=0.3436x-0.0497(r^2=0.9912)$, 설파메톡사졸 $y=0.2709x-0.0287(r^2=0.9982)$, 트리메소프림 $y=0.8974x+0.025(r^2=0.9984)$, 설파메타

Table 3. Retention time, precursor ion and characteristic ions for identification and quantification

Compounds	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Confirm ion (m/z) (relative abundance %)		Quantitation ion (m/z)	Collision Energy (eV)
Acetaminophen	3.56	152.2	152.1	92.3	109.8	15
Carbadox	4.08	262.9	130.3	229.7	231.0	15
Sulfathiazol	4.43	256.2	92.3	108.5	156.1	15
Lincomycin	4.91	407.6	127.0	173.1	126.3	25
Sulfamethoxazol	5.26	254.3	107.8	254.1	156.1	15
Trimethoprim	5.94	291.3	230.7	261.8	123.0	25
Sulfamethazin	6.37	279.3	204.1	279.2	186.1	15
Sulfamethazin-6- ¹³ C (surrogate standard)	6.37	285.0	-	-	186.2	20
Terbutylazine (ISTD)	7.61	212.2	-	-	156.1	15

진 $y=0.4248x+0.0085$ ($r^2=0.9946$)의 직선식과 상관계수를 나타냄으로써 대부분 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선을 나타내었다.

3.7. 회수율, 검출한계 및 정량한계

확립된 시료 전처리 방법에 대한 회수율 측정을 위해 7종의 분석 의약품질 표준용액을 정제수에 첨가시켜 농도가 0.1, 0.5, 1.0 ng/mL 되도록 하였다. 시료 전처리를 거친 값과 시료 전처리를 거치지 않은 값을 비교함으로써 절대 회수율(absolute recovery)를 구하였다. 세 가지 농도에서 측정된 회수율은 대체적으로 57.6%~86.3%의 값을 나타내었으며, 상대표준편차(RSD)가 18.9% 이하인 정밀한 값을 나타내었다(Table 4).

또한, 시료 중 표준물질의 농도를 점차적으로 낮춰줌으로써 정량한계(limits of quantification, LOQ)와 검출한계(limits of detection, LOD)를 구하였는데 정량한계는 신호 대 잡음비가 10이면서 상대표준편차가 20% 이하의 값을 만족하는 농도이며, 검출한계는 신호 대 잡음비가 3인 농도를 택하였다. 검출한계는 0.03~0.11 pg/mL(ppt) 수준이었으며, 정량한계는 0.08~0.37 pg/mL 농도 수준이었다.

3.8. 실제 시료분석

확립된 고체상 추출방법(HLB, MCX 카트리지를)을 이용한 환경 중 물 시료에서 의약품질을 효과적으로 추출한 후 LC/ESI-MS/MS 방법으로 분석하였다. 전국의 수계별 4대강 유역(한강, 금강, 낙동강, 영산강)에서 하수/축산 폐수 처리장의 유입수, 방류수 그리고 그 연장선상에 있는 하천수를 분석한 결과 의약품질이 다음과 같이 검출되었다.

Table 4. Absolute recoveries, LODs and LOQs

Compounds	Concentration (pg/mL)			Recovery (% RSD)
	LODs*	LOQs**	Conc. (ng/mL)	
Acetaminophen	0.11	0.37	0.1	79.4(12.1)
			0.5	66.2(6.6)
			1.0	58.7(6.7)
Carbadox	0.03	0.10	0.1	79.9(4.7)
			0.5	64.0(7.7)
			1.0	60.0(11.3)
Sulfathiazol	0.03	0.08	0.1	82.2(5.6)
			0.5	64.8(10.1)
			1.0	57.6(5.2)
Lincomycin	0.06	0.18	0.1	84.1(7.2)
			0.5	69.6(1.9)
			1.0	67.4(8.5)
Sulfamethoxazol	0.07	0.22	0.1	86.3(5.5)
			0.5	66.4(9.6)
			1.0	63.7(7.9)
Trimethoprim	0.04	0.15	0.1	70.8(17.1)
			0.5	57.6(18.9)
			1.0	60.4(10.5)
Sulfamethazin	0.05	0.17	0.1	78.3(7.0)
			0.5	77.5(5.6)
			1.0	66.9(6.6)

*LODs : Limits of Detection (at S/N > 3), **LOQs : Limits of Quantification (at 20% < RSD and S/N > 10)

아세트아미노펜은 대부분 유입수에서 검출되었는데 0.317~12.790 ng/mL 농도로 검출되었으며 카바독스와 설파메타진은 검출되지 않았다. 수계 A에서는 아세트아미노펜의 경우 유입수(A-1-1-a)에서 12.125 ng/mL가

Table 5. Concentration of the pharmaceuticals from wastewater treatment plants and surface water (ng/mL)

수계	지점	ACE	SMO	STI	CAR	SMA	TRI	LIN
A	A-1-1-a	12.125	1.009	0.194	N.D.	N.D.	0.067	0.983
	A-1-1-c	N.D.	0.393	N.D.	N.D.	N.D.	0.049	0.909
	A-1-2-a	12.790	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.065	1.400
	A-1-2-c	N.D.	0.380	N.D.	N.D.	N.D.	0.046	1.175
	A-1-3*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.270
	A-1-4*	N.D.	0.224	N.D.	N.D.	N.D.	0.005	N.D.
B	A-1-5*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	B-1-1-a	3.256	0.508	N.D.	N.D.	N.D.	0.025	0.537
	B-1-1-c	N.D.	0.323	N.D.	N.D.	N.D.	0.002	0.283
	B-1-2*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	B-1-3*	N.D.	0.173	N.D.	N.D.	N.D.	0.004	N.D.
C	B-1-4*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	C-1-1-a	0.317	0.234	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.577
	C-1-1-c	N.D.	0.167	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.224
	C-1-2*	N.D.	N.D.	0.138	N.D.	N.D.	N.D.	0.210
	C-1-3*	N.D.	0.121	0.201	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	C-1-4*	N.D.	N.D.	0.151	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	D-1-1-a	6.121	0.483	N.D.	N.D.	N.D.	0.050	0.698
	D-1-1-c	N.D.	0.295	N.D.	N.D.	N.D.	0.061	0.200
	D-1-2*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.378
	D-1-3*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.255
D-1-4*	N.D.	N.D.	0.283	N.D.	0.518	N.D.	2.657	

Group = 아세트아미노펜(ACE), 설파메톡사졸(SMO), 설파티아졸(STI), 카바독스(CAR), 설파메타진(SMA), 트리메소프림(TRI), 린코마이신(LIN).

N.D. = 불검출.

-a : 하수/축산폐수처리장 유입수, -c : 하수/축산폐수처리장 방류수, * : 하천수

Table 6. Concentration of the pharmaceuticals from livestock wastewater treatment plants and surface water (ng/mL)

수계	지점	ACE	SMO	STI	CAR	SMA	TRI	LIN
A	A-2-1-c	N.D.	0.367	1.081	N.D.	1.199	N.D.	0.923
	A-2-2-a	9.797	N.D.	355.186	N.D.	29.393	N.D.	11.466
	A-2-2-c	0.913	N.D.	0.329	N.D.	N.D.	N.D.	1.983
	A-2-3*	0.156	0.132	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	A-2-4*	N.D.	0.197	0.318	N.D.	0.144	N.D.	0.184
B	B-2-1-a	N.D.	16.226	2293.934	N.D.	658.511	N.D.	204.452
	B-2-1-c	1.121	5.695	922.747	N.D.	268.831	N.D.	99.237
	B-2-2*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	B-2-3*	N.D.	0.272	0.944	N.D.	1.546	N.D.	2.527
C	C-2-1-a	N.D.	5.002	888.318	N.D.	260.814	N.D.	42.449
	C-2-1-c	N.D.	N.D.	0.174	N.D.	0.023	N.D.	0.214
	C-2-2*	N.D.	N.D.	0.170	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	C-2-3*	0.108	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	D-2-1-a	3.045	N.D.	600.716	N.D.	128.697	N.D.	33.768
	D-2-2-a	4.724	N.D.	0.724	N.D.	N.D.	N.D.	0.624
	D-2-1,2-c	N.D.	0.182	0.186	N.D.	0.024	N.D.	0.238
	D-2-3*	0.164	0.125	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.273
	D-2-4*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Group = 아세트아미노펜(ACE), 설파메톡사졸(SMO), 설파티아졸(STI), 카바독스(CAR), 설파메타진(SMA), 트리메소프림(TRI), 린코마이신(LIN).

N.D. = 불검출.

-a : 하수/축산폐수처리장 유입수, -c : 하수/축산폐수처리장 방류수, * : 하천수

검출되었으나 방류수에서는 검출되지 않았는데 이는 하수처리 시설에서 분해가 된 것으로 사료된다(Table 5).

또한 축산폐수 처리장에서는 대체적으로 검출빈도도 높았으며, 설파티아졸의 경우는 2 ppm 이상의 높은 농도로 검출된 사례도 있었다(Table 6).

4. 결 론

새로운 환경오염물질로 분류되어 관심이 높아지고 있는 의약품질(pharmaceutical and personal care products, PPCPs)을 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 효과적이며 감도 높은 분석방법을 확립하였다. 최적의 시료 전처리조건을 확립하기 위해서 성질이 다른 HLB와 MCX 고체상 두 개를 직렬로 연결한 텐덤 고체상 추출법을 선택하였으며, 시료의 적재 속도, 추출용매의 양 등을 비교하는 실험을 통하여 최적의 추출조건이 선정되었다. 그 결과 0.1 ng/mL 농도에서 70.8~86.3%의 회수율을 나타내었으며, 검출한계는 0.03~0.11 pg/mL, 정량한계는 0.08~0.37 pg/mL를 얻을 수 있었다.

한편, 확립된 분석방법을 이용하여 일반 하수 및 축산 폐수의 유입수와 방류수, 그리고 그 연장선상에 있는 하천수를 분석한 결과 검출된 유입수에서는 수 ng/mL의 농도에서 수 ug/mL 농도 수준까지도 검출되었다.

감사의 글

본 연구는 국립환경과학원의 2007년도 “환경 중 의약품질 분석방법 연구 및 노출실태조사(II)” 사업의 지원으로 이루어진 것이며 경기대학교 특성화사업단 기자재를 사용하였음.

참고문헌

1. K. Fent, A. A. Weston and D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* **2006**, 76, 122-159.
2. O. A. Jones, N. Voulvoulis, and J. N. Lester, *Water Res.* **2002**, 36, 5013-5022.
3. S. J. Khan and J. E. Ongerth, *Chemosphere*, **2004**, 54, 355-367.
4. C. Carlsson, A.-K. Johansson, G. Alvan, K. Berman, and T. Kuhler, *Sci. Total Environ.* **2006**, 364, 67-87.
5. EMEA, *CMPC/SWP/4447/draft*, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), London, **2005**.
5. J. Park, *KEI RE-12*, **2005**.
7. S. D. Kim, J. Cho, I. S. Kim, B. J. Vanderford, and S. A. Snyder, *Water Res.* **2007**, 41, 1013-1021.
8. G. H. Han, H. G. Hur, and S. D. Kim, *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, 25, 265-271.
9. K. G. Karthikeyan and M. T. Meyer, *Sci. Total Environ.* **2006**, 361, 196-207.
10. S. Ollers, H. P. Singer, P. Fassler, S. R. Muller, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 911, 225-234.
11. D. Löffler and T. A. Ternes, *J. Chromogr. A*, **2003**, 1021, 133-144.
12. G. R. Boyd, J. M. Palmeri, S. Zhang, and D. A. Grimm, *Sci. Total Environ.* **2004**, 333, 137-148.
13. B. J. Vanderford, R. A. Pearson, D. J. Rexing, and S. A. Snyder, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6265-6274.
14. S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, and E. Zuccato, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092, 206-215.
15. X.-S. Miao, F. Bishay, M. Chen, and C. D. Metcalfe, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 3533-3541.