

하천수중 잔류 베타-락탐계 항생제의 동시분석법

허민정 · 명승운*

경기대학교 자연과학대학 화학과
(2010. 2. 17. 접수, 2010. 3. 31. 승인)

Simultaneous analysis of β -lactam antibiotics in surface water

Min Jeong Huh and Seung-Woon Myung*

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, 443-760, South Korea
(Received February 17, 2010; Accepted March 31, 2010)

요 약: 환경 시료중에 잔류하는 베타-락탐계 항생제를 동시에 추출하는 방법을 확립하였다. pH 2에서 HLB 고체상을 사용하여 추출 및 정제한 후, 7종의 베타-락탐계 항생제(amoxicillin, ampicillin, penicillin G, cefaclor, cefadroxil, cefatrizine 및 cephradine)를 LC/ESI-MS/MS를 사용하여 동시에 분석하였다. 새롭게 확립된 분석법은 하천수중에서 베타-락탐계 항생제의 농도가 0.01~1.0 ng/mL일 때 정량을 위한 검정곡선의 상관계수(r^2)가 0.9911~0.9995 범위로서 우수한 직선성을 나타내었다. 바탕 하천수로부터 구한 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.0003~0.0234 ng/mL 와 0.0046~0.0778 ng/mL이었다. 이 분석방법은 물 환경중에 잔류하는 베타-락탐계 항생제를 정성·정량하는데 빠르고 신뢰할 만한 방법이 될 것이다.

Abstract: An effective method for the simultaneous analysis of β -lactams from surface water was established. After solid-phase extraction with HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) cartridge at pH 2, seven β -lactams (amoxicillin, ampicillin, penicillin G, cefaclor, cefadroxil, cefatrizine and cephradine) were determined using LC/ESI-MS/MS. In this newly established method, correlation coefficients (r^2) of calibration curves for seven β -lactams in blank surface water appeared to be 0.9911~0.9995 in the concentration range of 0.01~1.0 ng/mL. The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) in spiked surface water were shown to be 0.0003~0.0234 ng/mL and 0.0046~0.0778 ng/mL, respectively. The developed method is believed to serve as a rapid and reliable method for the qualitative and quantitative analysis of residual β -lactam antibiotics from aquatic environment.

Key words: β -lactam, surface water, LC/MS/MS, residual analysis

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-241-9639 Fax : +82-(0)31-249-9639

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

1. 서 론

항생제는 세균의 세포벽 합성을 억제하여 항균효과를 나타내는 항생제로 사용에 따른 부작용이 적어 병원과 가정뿐만 아니라 축산업 및 농업 등의 여러 분야에서 널리 사용되고 있다^{1,2}. 그러나 베타락탐계 항생제가 사용되고 처리되는 과정에서 일부만이 제거되고 일부는 그대로 환경 중으로 배출되어 환경오염 문제를 야기시킬 수 있다.³ 항생제는 인류의 수명연장에 막대한 공로를 세웠지만 이와 같이 순환과정에서의 처리미비로 새로운 환경오염물질로 부각되고 있다.

환경 중에 존재하는 의약품 잔류물에 관심을 갖는 이유는 의약품질이 갖고 있는 부작용으로 인해 생태계가 파괴될 수 있으며 환경과 밀접한 관계를 맺고 있는 인류에게 그 악영향이 되돌아 올 수 있기 때문이다. 환경 중에 노출된 의약품질은 초기에는 매우 적은 양이 존재하기 때문에 의약품질이 존재하고 있는 환경이나 그 환경에 서식하고 있는 동·식물, 그리고 더 나아가서 그 동·식물을 소비하는 사람들에게 별다른 영향을 주지 않는 것처럼 보인다. 그러나 수십 년 동안 방치되었다가 결국 중독현상을 보이며 생태계를 교란시켰던 중금속과 마찬가지로 의약품질 또한 장시간 환경에 노출되어 그 잔류량이 축적된다면 생태계에 큰 영향을 주게 되며 결국엔 생태 피라미드의 질서가 흐트러지게 될 것이다. 베타락탐계 항생제는 베타락탐 고리라는 독특한 구조를 갖고 있는 화합물로, 이 고리는 안정성이 낮아 화학적으로 반응하기 유리하다. 따라서 환경 중에 배출될 경우 환경 중에 존재하는 다른 효소들과 반응하여 베타락탐 고리가 분해되어 원래의 구조대로 존재하는 경우가 드물다.⁴ 이에 환경 중에 존재하는 베타락탐계 항생제의 잔류량을 파악하기 위해서는 신속하면서도 정확한 분석방법이 요구되고 있다. 현재까지, amoxicillin, cefadroxil, penicillin G procaine, cefatrizine, cefaclor, ampicillin, cephradine 등 7종의 베타-락탐계 항생제를 개별 또는 2~3종을 LC/MS^{5,6} 또는 LC/MS/MS⁷⁻¹⁰를 사용하여 동시분석한 예는 있지만 7종을 동시분석한 예는 거의 없다.

본 논문에서는 환경(하천수) 중에 배출된 베타락탐계 항생제인 의약품질의 신속하고 정확한 분석을 위하여 소수성 상호작용을 이용한 hydrophilic lipophilic balance (HLB) 카트리지를 사용한 고체상 추출법을 통해 수 ng/mL 범위의 항생제를 검출할 수 있도록 하였다. 또한, 추출의 효율성을 높이기 위해 여러 가

지 실험 요인(시료의 pH, pH 조절 용매의 종류, 시료적재량, 시료적재속도)들을 변화시키면서 LC/MS/MS 분석을 위한 최적의 추출 조건들을 체계적으로 확립하였다.

2. 실험

2.1. 시약

베타락탐계 항생제인 cefadroxil, penicillin G procaine, cefaclor, ampicillin, cephradine은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다. Amoxicillin은 Fluka 사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였으며 cefatrizine은 의약품으로 판매되고 있는 시약을 사용하였다. 정제용 내부표준물질은 Cambridge Isotope Laboratories 사(Andover, MA, USA)의 ¹³C로 치환된 amoxicillin-6-¹³C를 구입하여 사용하였다.

이 외의 실험에 사용된 메탄올, 아세트나이트릴 등의 용매는 J.T. Baker 사(NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였으며, 금속이온의 제거를 위해 사용한 Na₂-EDTA은 Junsei 사(Tokyo, Japan)의 제품을, pH 조절을 위해 사용된 염산은 Waco 사(Osaka, Japan), ammonium acetate는 Merck 사(Darmstadt, Germany), formic acid는 Fluka 사(Seelze, Germany), ammonium hydroxide는 Samchun 사(Kyonggi-do, Korea)의 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다.

2.2. 표준용액의 제조

7종의 베타락탐계 항생제는 3차 증류수와 20 mM 암모늄 아세테이트를 사용하여 1000 ug/mL 농도의 표준용액이 되도록 제조하였다. 분석 시에는 이 저장용액을 각각 100 µL씩 취하여 3차 증류수와 20 mM 암모늄 아세테이트에 소량첨가(spike)시켜서 묽힌 용액을 만들어 사용하였다. 제조된 표준용액은 약 4°C로 냉장 보관하였다.

2.3. 분석기기

액체크로마토그래프/전기분무이온화-질량분석기(LC/ESI-MS/MS)는 시료 자동주입기(Agilent 1200 series Autosampler)가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 series HPLC를 사용하였으며, 분리된 각 물질의 분자량 확인을 위해 Triple Quadrupole tandem mass spectrometer (Agilent 6410

Table 1. LC/MS/MS parameters for analysis of β -lactam pharmaceuticals

Parameters	Conditions
Column	CAPCELL PAK 3 μ m C ₁₈ , 4.6 mm I.D., 100 mm length (Shiseido Fine Chemical, Japan)
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid B : Acetonitrile
Gradient	Time(min) 0 15 15.01 23 Solvent B(%) 5 40 5 5
Column flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 μ L
Column temperature	25 °C
Ionization mode	Positive ion electrospray
Gas temperature	350 °C
Gas flow	12.0 L/min
Nebulizer	45.0 psi
Capillary Current	40 nA
Chamber Current	1.32 μ A

Triple Quad., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 이때 사용된 컬럼은 Shiseido Fine Chemical 사(Japan)의 제품으로 길이는 100 mm, I.D.는 4.6 mm, 입자크기는 3 μ m의 C₁₈ 컬럼을 사용하였다.

이동상 A는 0.1% formic acid 와 이동상 B는 아세토나이트릴을 사용하였다. 시료는 10 μ L 주입하였고, 유속은 0.5 mL/min이었다. 이동상의 조건은 초기에는 이동상 B를 5%에서 15분 동안 40%까지 증가시킨 후 재평형을 위해 8분 동안 5%으로 감소시켰다. LC/ESI-MS/MS의 기기 조건은 Table 1에 나타내었다.

2.4. 시료전처리

하천수 시료 250 mL를 취하여 5% Na₂-EDTA 1 mL와 정제용 내부표준물질 amoxicillin-6-¹³C (10 μ g/mL) 25 μ L를 첨가한 후, 0.5 M 염산을 이용하여 pH를 2로 조절하였다. Oasis HLB (200 mg, 6 cc) 카트리지를 진공 추출장치에 장착한 후 메탄올 3 mL, 0.5 M 염산 3 mL, 증류수 3 mL을 흘려주어 컨디셔닝하였다. HLB 카트리지에 시료를 5 mL/min의 속도로 적재시킨 후, 시료가 통과된 카트리지를 증류수 3 mL로 씻어준 다음, 메탄올 5 mL를 2회에 나누어 용리시켰다. 수집된 용리액은 질소증발기를 사용하여 완전히 증발시킨 다음 0.1% formic acid 500 μ L로 잔사를 녹여 0.45 μ m 여과지를 이용하여 여과한 후 2 mL 갈색 바이알에 옮겨 LC/ESI-MS/MS로 분석하였다(Fig. 1).

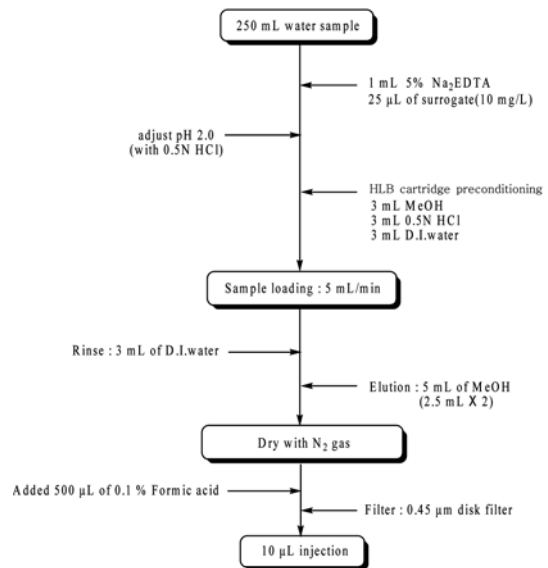


Fig. 1. Schematic diagram of sample preparation for β -lactam antibiotics from surface water for the LC/MS/MS analysis.

3. 결과 및 고찰

3.1. LC/ESI-MS/MS

7종의 베타-락탐 항생제는 6.8분(amoxicillin)에서부터 11.52분(penicillin G)의 머무름 시간을 나타내면서 크로마토그램상에서 잘 분리되었다(Fig. 2).

베타락탐계 항생제의 분석을 위해서 LC/ESI-MS/MS를 통하여 표준물질의 질량 스펙트럼을 확인하였다. 감도있는 분석을 위하여 먼저 full scan mode에서 그들의 질량 스펙트럼을 확인하였다. 그 결과, 그들의 유사분자이온(pseudo-molecular ion)인 $[M+H]^+$ 이온을 확인하였다. 그 결과, amoxicillin은 m/z 366, cefadroxil 은 m/z 368, penicillin G는 m/z 335 (procaine은 m/z 237), cefatrizine은 m/z 463, cefaclor는 m/z 364, ampicillin은 m/z 350, cephadrine은 m/z 350이 유사분자이온으로 나타났다. 전체 스캔 스펙트럼(full scan spectrum)이 얻어진 후 텐덤질량분석을 위해서 유사분자이온을 전구이온(precursor ion)으로 선택하여 생성이온(product ion) 모드에서 생성이온스펙트럼을 얻었다.

극미량을 효과적으로 검출하고 매트릭스의 방해 효과를 최소화하여 높은 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)를 얻기 위하여 각 물질의 생성이온스펙트럼으로부터 특성이온을 선택하여 MRM (Multiple Reaction Monitoring) 모드로 분석하였다. Amoxicillin은 전구이

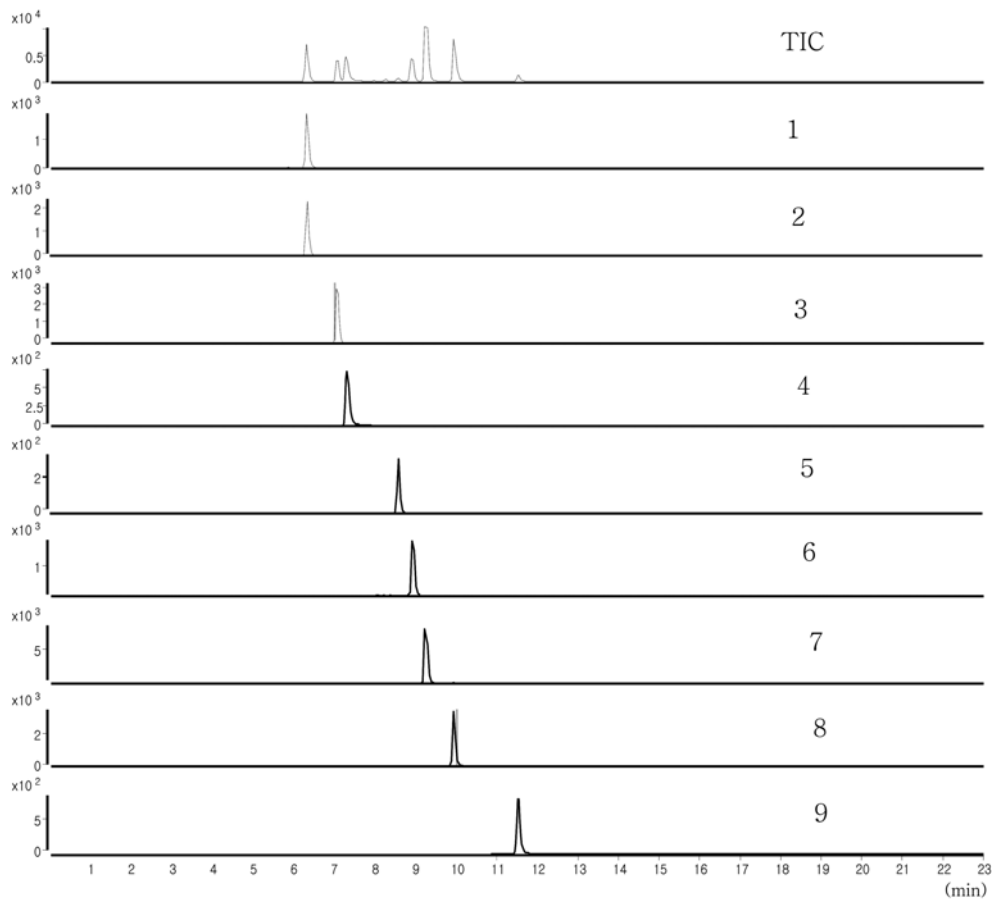


Fig. 2. LC/MS/MS chromatograms of seven β -lactam antibiotics (peak identification : 1=amoxicillin; 2=amoxicillin- 6 - ^{13}C ; 3=cefadroxil; 4=procaine; 5=cefatrizine; 6=cefactor; 7=ampicillin; 8=cephradine; 9=penicillin G).

은인 m/z 366으로부터 m/z 114, 208, 349를 특성이온으로 선택하였고, m/z 114를 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Cefadroxil은 전구이온인 m/z 364로부터 m/z 114, 158, 208을 특성이온으로 선택하였고, m/z 114를 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Penicillin G procaine의 경우, penicillin G와 procaine이 염의 형태로 1:1로 결합한 화합물로 각각의 최적 분석조건을 찾아 분석하였다. Penicillin G는 전구이온인 m/z 335로부터 m/z 87, 91, 114를 특성이온으로 선택하였고, m/z 91을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Procaine은 전구이온인 m/z 237로부터 m/z 72, 100, 120를 특성이온으로 선택하였고, m/z 72를 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Cefatrizine은 전구이온인 m/z 463으로부터 m/z 114, 138, 156을 특성이온으로 선택하였고, m/z 138을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Cefactor

는 전구이온인 m/z 368로부터 m/z 79, 106, 118을 특성이온으로 선택하였고, m/z 106을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Ampicillin은 전구이온인 m/z 350으로부터 m/z 106, 160, 174를 특성이온으로 선택하였고, m/z 106을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Cephradine은 전구이온인 m/z 350으로부터 m/z 108, 140, 176을 특성이온으로 선택하였고, m/z 108을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. 각 분석물질의 머무름 시간과 전구이온, 특성이온을 Table 2에 나타내었다.

3.2. SPE 추출인자들의 최적화

베타락탐계 항생제의 효과적인 추출을 위해 시료의 pH, pH 조절 용매의 종류, 카트리지에 적재되는 시료의 양, 시료의 적재 속도를 변화시켜 가면서 최적의 추출조건을 확립하는 실험을 실시하였다.

Table 2. Retention time, precursor ion, product ion for analysis of β -lactam antibiotics by LC/ESI-MS/MS

Compounds	R.T. (min)	Precursor ion(m/z)	Confirm ion(m/z)	Quantitation ion(m/z)	Collision Energy(eV)
Amoxicillin	6.80	366	349	208	114
Amoxicillin-6- ¹³ C	6.80	372	214	160	114
Cefadroxil	7.34	364	208	158	114
Penicillin G	11.52	335	114	87	91
Procaine	7.25	237	120	100	72
Cafatrizine	8.80	463	239	114	138
Cefaclor	9.16	368	118	79	106
Ampicillin	9.89	350	174	160	106
Cephadrine	10.64	350	176	140	108

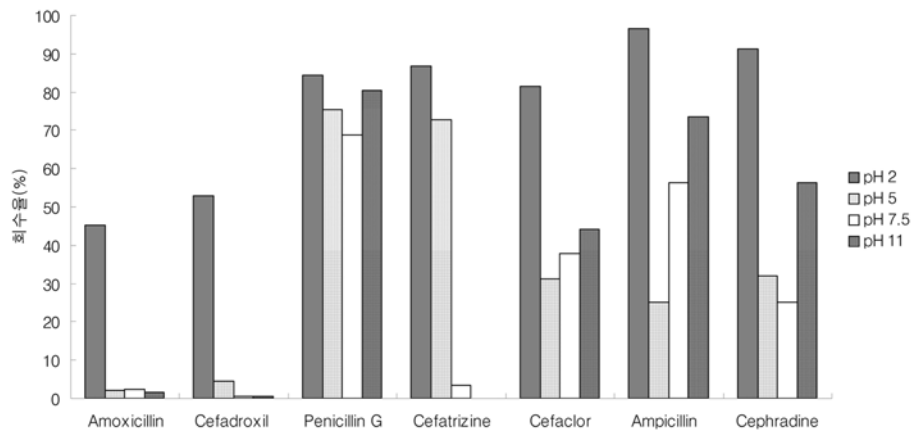


Fig. 3. Comparison of recoveries according to pH of the loading sample.

3.2.1. 시료의 pH

분석하고자 하는 물질들의 최적의 pH 조건을 찾기 위해 pH 조절 용매의 종류, 시료의 양, 시료 적재 속도를 고정시킨 후, 산성, 약산성, 중성, 염기성의 조건(2, 5, 7.5, 11)으로 변화시키면서 각각의 회수율을 비교하였다. pH의 변화에 따라 분석물질들이 시료 중에서 존재하고 있는 형태가 다르기 때문에, 전처리 과정에서 사용하는 HLB 카트리지에 충분히 머무를 수 있도록 최적의 pH를 찾고자 하였다. 이 때 pH는 0.5 M 염산으로 조절하였고, 카트리지에 적재되는 시료의 양은 200 mL, 추출 용매는 메탄올, 시료의 적재 속도는 5 mL/min로 고정한 후 pH만을 변화시켜 회수율을 비교하였다.

시료의 pH에 따른 각 화합물의 추출을 결과를 살펴보면, pH가 2인 경우, 41.1 (amoxicillin)~96.5% (ampicillin)의 회수율을 나타냈다. pH가 5인 경우는 2.2~75.4%의 회수율을 나타냈으며, pH가 7.5인 경우도 2.5~68.9%의 낮은 회수율을 나타냈으며, pH가 11

인 경우는 1.6~80.4%의 회수율을 나타냈으며, cefatrizine은 회수되지 않았다. 따라서, 화합물의 pK_a 와 비슷한 pH 2일 때 모든 약물들에 대해서 전반적으로 가장 좋은 회수율을 보여주었으므로 동시 분석하기에 적합한 조건을 pH 2로 선정하였다(Fig. 3).

3.2.2. pH 조절 시약의 세기

시료의 pH를 조절해 주는 시약이 분석에 미치는 영향을 비교하기 위하여 0.5 M 염산과 6 M 염산을 사용했을 경우의 회수율을 비교하였다. 이 때, pH 2, 카트리지에 적재되는 시료의 양은 200 mL, 시료의 적재 속도는 5 mL/min로 고정한 후, 용매의 조건만 바꾸어 실험하였다. 베타락탐계 항생물질은 불안정한 락탐 고리를 갖고 있어 급격한 pH 변화에 따라 화합물이 본래의 구조를 갖지 못하고 분해될 수 있기 때문에 pH를 서서히 변화시킬 수 있는 적합한 용매를 찾고자 하였다.

각 화합물의 결과를 살펴보면, 0.5 M 염산으로 pH를

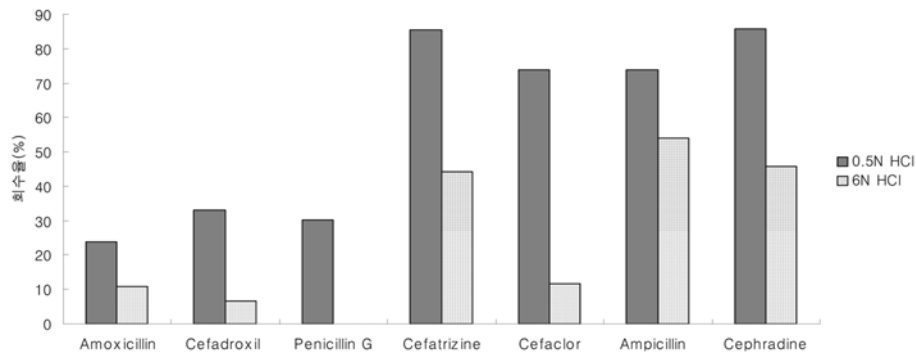


Fig. 4. Comparison of recoveries according to the concentration of pH adjusting HCl.

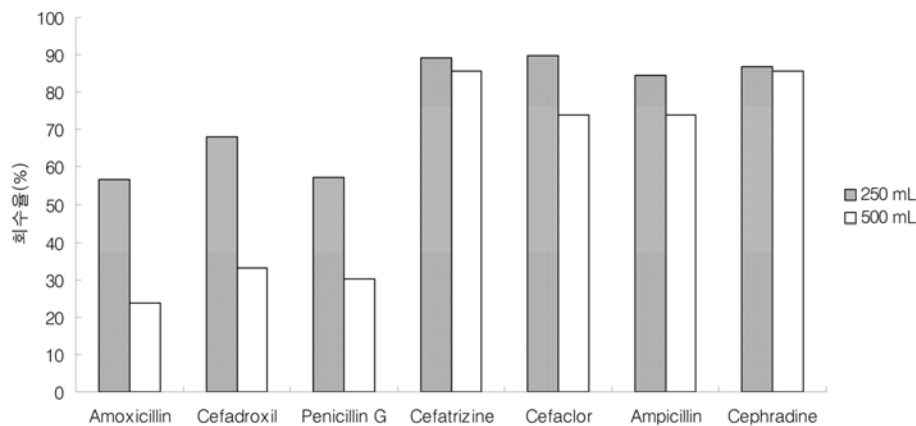


Fig. 5. Comparison of recoveries according to the loading volume of sample.

조절할 경우 23.9~85.6%의 회수율을 나타냈으며, 6 M 염산을 사용하여 pH를 조절했을 경우 6.7~53.9%의 회수율을 나타냈으며 penicillin G는 회수되지 않았다.

전체적으로 0.5 M 염산을 이용하여 pH를 조절했을 경우에 더 좋은 회수율을 보였으며 이는 분석하고자 하는 대상물질들이 pH가 높은 시약이 첨가되는 순간 높은 이온세기에 의해 수용액 중에서 화합물들이 분해가 되었을 가능성이 크다. 따라서 실제 시료에 적용했을 때, 이러한 점을 고려하여 0.5 M 염산을 사용하여 pH를 조절하였다(Fig. 4).

3.2.3. 고체상 카트리지에 적재되는 시료의 양

카트리지에 적재되는 시료의 양이 분석에 미치는 영향을 비교하기 위하여 시료의 pH, pH 조절 용매의 종류, 적재 속도를 고정시킨 후, 시료의 양이 500 mL일 때와 250 mL일 때 각각의 회수율을 비교하였다. 적재되는 시료의 양이 분석조건에 적합하지 않을 경우에는 분석물질이 카트리지에 흡착되지 못하고 오히려 시

료에 의해 씻겨져 나갈 수 있기 때문에 효과적으로 추출할 수 있도록 시료의 양을 조절하고자 하였다.

이 때 pH는 0.5 M 염산을 사용하여 2로 조절하였고, 시료의 적재 속도는 5 mL/min로 고정된 후 시료의 양만을 변화시켜 회수율을 비교하였다(Fig. 5).

각 화합물의 결과를 살펴보면, 적재되는 시료의 양이 250 mL인 경우 amoxicillin은 56.7%, cefadroxil은 68.1%, penicillin G는 57.1%, cefatrizine은 88.2%, cefaclor는 89.8%, ampicillin은 84.6%, cephradine은 86.9%의 회수율을 나타냈다. 적재되는 시료의 양이 500 mL인 경우 amoxicillin은 23.9%, cefadroxil은 33.1%, penicillin G는 30.3%, cefatrizine은 85.6%, cefaclor는 73.9%, ampicillin은 73.8%, cephradine은 85.7%의 회수율을 나타냈다. cephradine의 경우에는 적재되는 시료의 양에 따른 회수율의 변화가 거의 없었으나 효율적인 동시 분석을 위하여 고체상 카트리지에 적재되는 시료의 양을 250 mL로 선택하였다.

시료의 양이 많을 경우, 카트리지에 흡착되어 있던

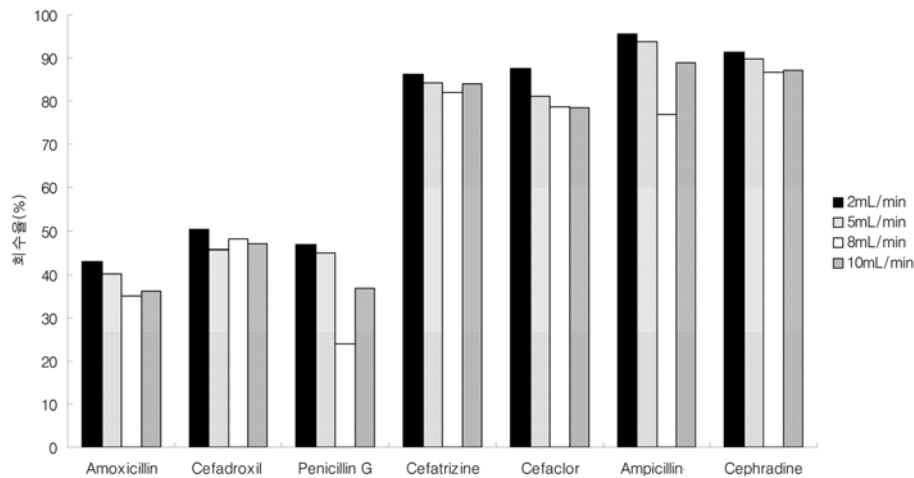


Fig. 6. Comparison of recoveries according to the flow rate of sample loading.

분석물질들이 반대로 시료에 의해 씻겨나가는 현상이 일어나서 회수율이 오히려 감소하는 경향을 보였다.

3.2.4. 시료의 적재속도

시료가 SPE 카트리지에 적재될 때의 속도가 추출에 미치는 영향을 비교하기 위하여 적재속도를 변화시켜 실험하였다. 이 때 pH는 0.5 M 염산을 이용하여 2로 조절하였고, SPE 카트리지에 적재되는 시료의 양은 250 mL로 고정한 후, 시료의 적재 속도를 2, 5, 8, 10 mL/min로 변화시키면서 회수율을 비교하였다.

각 화합물의 결과를 살펴보면, 적재속도가 2 mL/min인 경우 42.9~95.6%, 적재속도가 5 mL/min인 경우 40.2~93.8%, 적재속도가 8 mL/min인 경우 23.9~86.7%, 적재속도가 10 mL/min인 경우 36.1~88.9%의 회수율을 나타냈다.

전체적으로 적재속도가 2 mL/min일 때가 가장 좋은 회수율을 보였다. 그러나, 적재속도가 너무 느릴 경우, 실제 시료에 적용했을 때에 카트리가 막히는 경우가 발생할 수 있고 적재하는 데 시간이 너무 오래 걸려 오히려 분석의 효율성을 저하시킬 수 있기 때문에 차선택으로 그 다음으로 좋은 회수율을 보인 5 mL/min의 속도를 적재속도로 선택하였다(Fig. 6).

3.3. 검정곡선

시료 중에 함유된 베타락탐계 항생제의 양을 측정하기 위해서 표준용액을 증류수 250 mL에 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ng/mL가 되도록 소량 첨가시킨 후, 확립된 추출조건으로 추출하여 LC/ESI-

MS/MS에 주입하여 7종의 베타락탐계 항생제 표준물에 대한 검정곡선을 작성하였다. 그 결과 amoxicillin은 $y=1.8879x-0.0168$ ($r^2=0.9971$)의 검정곡선을 얻었고, cefadroxil은 $y=2.8224x-0.1731$ ($r^2=0.9960$), penicillin G는 $y=1.1844x-0.0768$ ($r^2=0.9965$), procaine은 $y=2.0321x-0.0850$ ($r^2=0.9938$), cefatrizine은 $y=0.3859x-0.0449$ ($r^2=0.9911$), cefaclor는 $y=2.5772x-0.0766$ ($r^2=0.9951$), ampicillin은 $y=3.6731x+0.1129$ ($r^2=0.9995$), cephadrine은 $y=5.8515x-0.2696$ ($r^2=0.9932$)의 검정곡선을 얻었다.

3.4. 유효성 검증

검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantification, LOQ)는 최적의 추출조건으로 시료를 추출한 후 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 분석한 후 설정하였다. 검출한계는 신호 대 잡음비가(S/N ratio)가 3 이상 되는 농도로 설정하였고, 신호 대 잡음비가 10 이상이고 정밀도(RSD)가 20% 이내인 농도를 정량한계로 정하였다. 또한 매트릭스가 분석에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 실제 시료와 비슷한 매트릭스 효과를 갖는 하천수를 채취하여 바탕실험을 한 후, 검출한계와 정량한계를 구하였다. 증류수와 하천수에 대한 검출한계와 정량한계를 Table 3에 나타내었다.

정제수에 대해서는 LOD가 0.32~23.35 pg/mL, LOQ는 1.05~77.82 pg/mL이었으며, 상대적으로 매트릭스가 복잡한 하천수에 대해서는 ampicillin의 정량한계가 4.26 pg/mL로써 가장 낮았고, procaine의 경우 349.65 pg/mL로써 가장 높은 정량한계(LOQ)를 나

Table 3. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for seven β -lactam from distilled water and surface water

Pharmaceuticals	Distilled water		Surface water	
	LOD*	LOQ**	LOD*	LOQ**
	(pg/mL)		(pg/mL)	
Amoxicillin	1.83	6.10	4.42	14.75
Cefadroxil	1.38	4.60	2.72	9.05
Penicillin G	2.22	7.40	3.96	13.19
Procaine	5.46	18.21	104.89	349.65
Cefatrizine	23.35	77.82	23.81	79.36
Cefaclor	3.73	12.44	3.45	11.49
Ampicillin	0.32	1.05	1.28	4.26
Cephadrine	1.48	4.95	2.43	8.10

*LOD : S/N ratio > 3

**LOQ : S/N ratio > 10 and RSD > 20%

Table 4. Absolute recovery, precision and accuracy for the analysis of β -lactam antibiotics

Pharmaceuticals	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Bias* (%)
Amoxicillin	0.08	36.2	9.7	-10.1
	0.25	33.4	7.7	2.6
	1	37.9	13.7	-0.8
Cefadroxil	0.08	85.6	9.4	-8.4
	0.25	89.6	2.5	0.1
	1	89.5	3.2	-1.4
Penicillin G	0.08	104.5	3.8	-1.6
	0.25	105.6	7.4	1.8
	1	93.5	1.7	-0.8
Procaine	0.08	68.4	9.8	-3.1
	0.25	59.3	13.8	0.4
	1	78.5	8.7	-0.3
Cefatrizine	0.08	77.8	14.3	8.5
	0.25	72.2	7.7	5.7
	1	72.6	1.4	1.3
Cefaclor	0.08	85.4	2.1	2.5
	0.25	78.4	2.5	2.3
	1	84.5	5.2	0.1
Ampicillin	0.08	60.6	15.6	-7.0
	0.25	77.5	2.2	2.8
	1	61.3	0.5	-2.1
Cephadrine	0.08	100.3	7.0	-7.8
	0.25	109.9	5.5	11.6
	1	102.0	4.7	-0.5

* Bias = $\frac{(\text{Calculated value} - \text{Measured value})}{\text{Calculated value}} \times 100$

타내었다.

회수율 측정을 위해 7종의 의약품질 표준용액을 정제수에 첨가시켜 농도가 0.08, 0.25, 1 ng/mL 이 되도록 하여 전처리를 거친 값과 거치지 않은 표준물질 농도의 절대치를 비교함으로써 측정하였다. 세 가지 농도에서 측정한 회수율은 amoxicillin (33.4~37.9%)을 제외한 6종의 의약품질에 대하여 59.3~109.9%의 값을 나타내었으며 상대표준편차(RSD)가 15.6% 이하로 대체로 정밀한 값을 나타내었다. 측정값이 참값에 얼마나 가까운지를 나타내는 정확도는 bias로써 -10.10~11.62% 이었다(Table 4).

4. 결 론

본 논문에서는 하천수중에 잔류하는 베타락탐계 항생제를 분석하기 위하여 SPE 카트리지를 이용하여 추출함으로써 신속하고 정확한 결과를 얻을 수 있도록 하는 데에 초점을 두었다. 따라서, 시료전처리에 대한 간결성과 친 환경성에 맞게 추출절차를 단순화시키고 인체에 유해한 유기용매의 사용을 최소화하고자 하였다.

분석물질이 SPE 카트리지에 효율적으로 흡착되기 위해서 시료의 pH를 산성, 약산성, 중성, 염기성으로 조절하여 실험한 결과, 분석물질들의 pK_a 값과 비슷한 산성조건(pH=2)에서 좋은 회수율을 나타내었다. 시료의 pH를 조절하는 과정에서 0.5 M 염산을 사용하여 pH를 조절하였을 때 양호한 추출율을 나타내었다. 카트리지에 적재되는 시료의 양을 변화시켜 실험한 결과, 250 mL를 적재하였을 때가 500 mL를 적재하였을 때보다 훨씬 좋은 회수율을 보였다. 카트리지에 적재될 때 시료의 유속을 변화시켜 회수율을 비교하였을 때, 유속이 5 mL/min일 때 비교적 좋은 회수율과 분석 시료 전처리의 속도면에서도 유리하였다.

각 분석물질(베타-락탐계 항생제)에 대해서 0.01~1.0 ng/mL의 농도 범위에서 검정곡선을 작성하였을 때, 상관계수(r^2)는 0.9911~0.9995의 비교적 좋은 직선성을 나타내었다. 최적의 추출조건으로 시료를 추출한 후 LC/ESI-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, 각 분석물질들의 LOD는 0.0003~0.0234 ng/mL였고, LOQ는 0.0046~0.0778 ng/mL이었다.

세 가지 농도에서 측정한 회수율은 amoxicillin (33.4~37.9%)을 제외한 6종의 의약품질에 대하여 59.3~109.9%의 값을 나타내었으며 상대표준편차(RSD)가

15.6% 이하로 대체로 정밀한 값을 나타내었다. 측정값이 참값에 얼마나 가까운지를 나타내는 정확도는 bias로써 -10.10~11.62% 이었다.

그동안의 베타락탐 계열의 관한 연구가 주로 amoxicilin이나 ampicillin에 관한 연구가 주를 이루었으며, 특히 환경 시료를 대상으로 한 연구가 최근에 들어서야 활발해진 점을 감안했을 때, 본 논문에서 확립된 최적의 추출 조건은 하천수를 포함한 다양한 매트릭스의 환경 시료 중에 존재하고 있는 7종의 베타락탐계 항생제의 신속하고 정확한 동시분석을 가능하게 할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. W. M. A. Niessen, *J. Chromatogr. A*, **812**, 53-75(1998)
2. W. G. Huber, *Adv. Environ. Sci. Technol.* **2**, 289-320(1971).
3. J. M. Cha, S. Yang and K. H. Carlson, *J. Chromatogr. A*, **1115**, 46-57(2006).
4. J. P. Hou and J. W. Poole, *J. Pharm. Sci.* **60**, 503-532(1971).
5. F. Bruno, R. Curini, A. D. Corcia, M. Nazzari and R. Samperi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1391-1400(2001).
6. K. L. Tyczkowska, R. D. Voyksner and A. L. Aronson, *J. Chromatogr. A*, **594**, 195-201(1992).
7. T. Christian, R. J. Schneider, H. A. Faber, D. Skutlarek, M. T. Meyer, H. E. Goldbach, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **31**, 36-44(2003).
8. R. Hirsch, T. A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz and K. Kratz, *J. Chromatogr. A*, **815**, 213-223(1998).
9. R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, and K. L. Kratz, *Sci. Total Environ.* **225**, 109-118(1999).
10. F. Sacher, F.T. Lange, H. Brauch and I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A*, **938**, 199-210(2001).