



04

## 국내 환경 중 의약품물질 분석방법 연구 및 노출실태

2008 한국환경농학회 추계전문학술 Workshop

- >> 좌장 : 윤희인 교수
- >> 연사 : 명승운(경기대학교 화학과)



## 국내 환경 중 의약품질 분석방법 연구 및 노출실태

명 승 운

경기대학교 화학과

swmyung@kgu.ac.kr

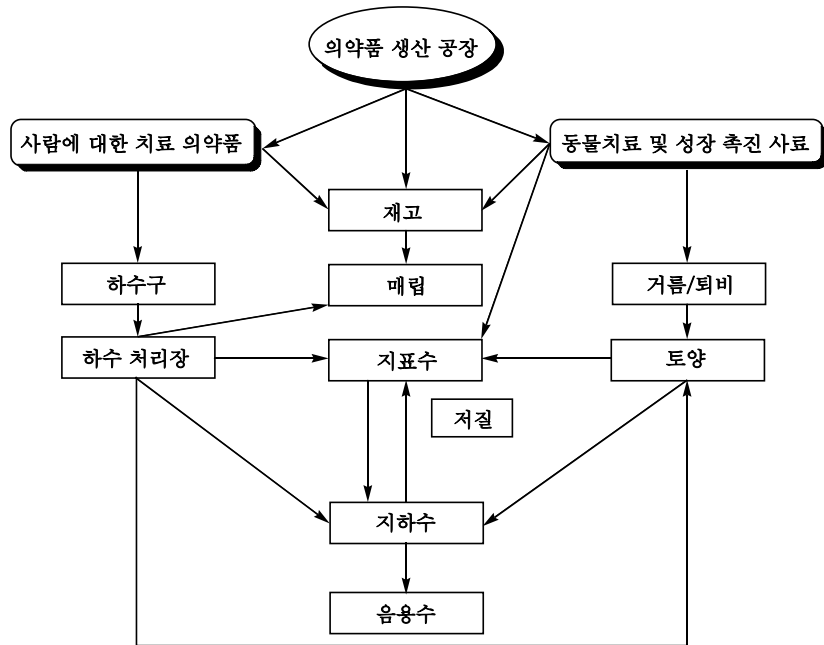
### 1. 서 론

최근, 국제적 환경 연구의 초점은 PCBs, DDT 및 살충제와 같은 고전적인 환경 오염물질들로부터 가정에서 사용되어 환경으로 유입되는 의약품(pharmaceuticals), 개인적 치료 또는 관리 물질(personal care products) 및 내분비계장애물질(EDCs) 등으로 확장되고 있는 추세이다. 현재 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 진통제, 항생제, 당뇨병 치료제, 베타-차단제, 피임약, 지방 조절제, 항울약, 발기부전 치료제 등 3,000종 이상의 물질이 의약품 원료로 사용되고 있다. 우리나라의 경우 항생제 처방비율은 약 59% 정도로서 WHO의 23%보다 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 상당수의 생리활성을 가진 화합물들은 결과적으로 폐수로 유출된 후 환경적인 영향에 대한 특정 검사나 유출량의 측정 없이 강이나 호수로 유입되고 있다.

이들 의약품들이 환경에 존재함으로써 i) 인체나 동물들에게서 비정상적인 생리학적 과정이 일어나고, ii) 생식 또는 번식기관의 손상, iii) 발암성 위험증가, iv) 내성 항생 박테리아의 발달 등 인간과 생태계에 대한 잠재적인 영향은 아직까지 명백하게 밝혀지지 않고 있다.

의약품들의 오염원으로는 i) 의약품 원료 생산 공장에서의 생산단계에서 폐기 및 부산물의 폐수로 유입, ii) 가정에서 의약품의 사용 및 폐기로 인한 배출, iii) 개인 치료를 통한 배설물들에 의한 배출, iv) 병원 및 약국 등에서 유효기간 경과 등에 의한 무단 폐기, v) 동물의 사료에 포함된 후 축산 배설물에 의한 배출, vi) 관상용 어항에 사용되는 의약품이 함유된 물의 방류, vii) 횃집 등에서 수조를 청소할 때 버리는 폐수 등 다양한 경로가 있다(Fig 1).

Fig 1. Fate of pharmaceuticals in the environment



의약품들은 하수처리시설에서의 처리효율도 좋지 않아서 소염제의 경우는 제거효율이 40-65%, 스테로이드는 65%, 항생제는 60% 정도만이 제거되고 나머지는 하천으로 배출됨으로써 수돗물의 원수까지 도달이 가능하다.

미국 등 선진국에서도 2000년에 들어서야 U.S. EPA를 중심으로 이들에 대한 본격적인 실태조사가 실시되었는데, 그 이유는 환경 중에 존재하는 농도가 수  $\mu\text{g L}^{-1}$  정도의 낮은 농도라서 이들을 검출하는 분석방법이 극히 제한되어 있기 때문이다.

## 2. 실험

### 1) 조사대상

전국의 수계별 4대강 유역(A, B, C, D)에서 하천수, 하수처리장 및 축산 폐수 처리장 유입수, 방류수를 상반기와 하반기에 연 2회에 걸쳐 조사하였다. 본 연구 조사대상물질 10종의 측정 분석을 위한 시료 수는 하수처리장에서 유입수, 방류수 10개, 하천수 12개이며, 축산폐수처리장에서 유입수, 방류수 10개, 하천수 8개로 총 40개였다.

### 2) 시료 채취 및 보존방법

#### (1) 시료 채취

유리병에 기포가 생기지 않도록 시료를 채취하고, 수온, pH, 전도도, 탁도 등의 시료 채취 표를 작성한다.

(2) 시료 보존 및 보관

시료는 분석하기 전까지 4°C 이하를 유지하며, 유기용매의 오염이 없는 냉암소에 보관하여 채취일로부터 2주 이내에 분석한다.

(3) 조사대상 의약품질

조사대상의약품질은 우리나라에서 많이 사용되고 있는 인체용, 인체/동물겸용, 동물용 의약품 27종에 대해서 실시하였으며 Table 1과 같다.

Table 1. Monitored pharmaceuticals

구 분		조사대상 의약품질
인 체	진통/ 해열/ 소염제 (5개 항목)	이부프로펜, 디클로페낙-소듐, 나프록센, 탈니플루메이트, 메페남산
인체/ 동물	항생/ 항균제 (11개 항목)	트리메소프림, 에리스로마이신-H <sub>2</sub> O, 린코마이신, 세파드록실, 아목시실린, 암피실린*, 설파메톡사졸, 페니실린 G 프로케인, 네오마이신, 옥시테트라시클린, 시프로플록사신
	진통/ 해열/ 소염제 (2개 항목)	아세트알리실산, 아세트아미노펜
동 물	항생/ 항균제 (9개 항목)	설파메타진, 설파티아졸, 클로테트라시클린, 세프라딘, 카바독스, 엔로플록사신, 세파트리진, 세파클러, 타이로신
총 계		27개 항목

(4) 시료 전처리방법

조사대상 의약품질은 다양한 물리화학적 성질을 가지고 있으므로 동시에 시료전처리하여 동시에 기기분석을 할 수 없으므로 4개의 그룹으로 나누었으며 여기에서는 Group 1에 대해서만 예시하도록 한다.

① 기구 및 시약

가) 기 구

실험에 사용한 시험관 등 모든 유기 기구는 세척액과 3차 증류수로 세척 후 건조하여 사용하였고, 시료의 농축을 위해 질소농축기로 Caliper Lifescience사(Seattle, WA, USA)의 TurboVap LV evaporator를 사용하였다. 고체상 추출법에 사용한 카트리지는 Oasis HLB(200mg, 6cc)와 Oasis MCX(150mg, 6cc) 카트리지를 Waters사(Milford, Massachusetts, USA)에서 구입하여 사용하였고 또한 vacuum manifold는 supelco사 (Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다.

나) 시 약

본 연구의 조사대상물질인 Sulfamethoxazole, Sulfamethazine, Sulfathiazole, Lincomycin, Acetaminophen, Carbadox는 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다. 그리고 Trimethoprim은 Fluka사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였고 Surrogate standard는 Cambridge isotope laboratories사(Andover, MA, USA)의 <sup>13</sup>C로 치환된 1종(sulfamethazine-6-<sup>13</sup>C)과 내부표준물질 1종(Terbutylazine)은 Fluka사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였다.

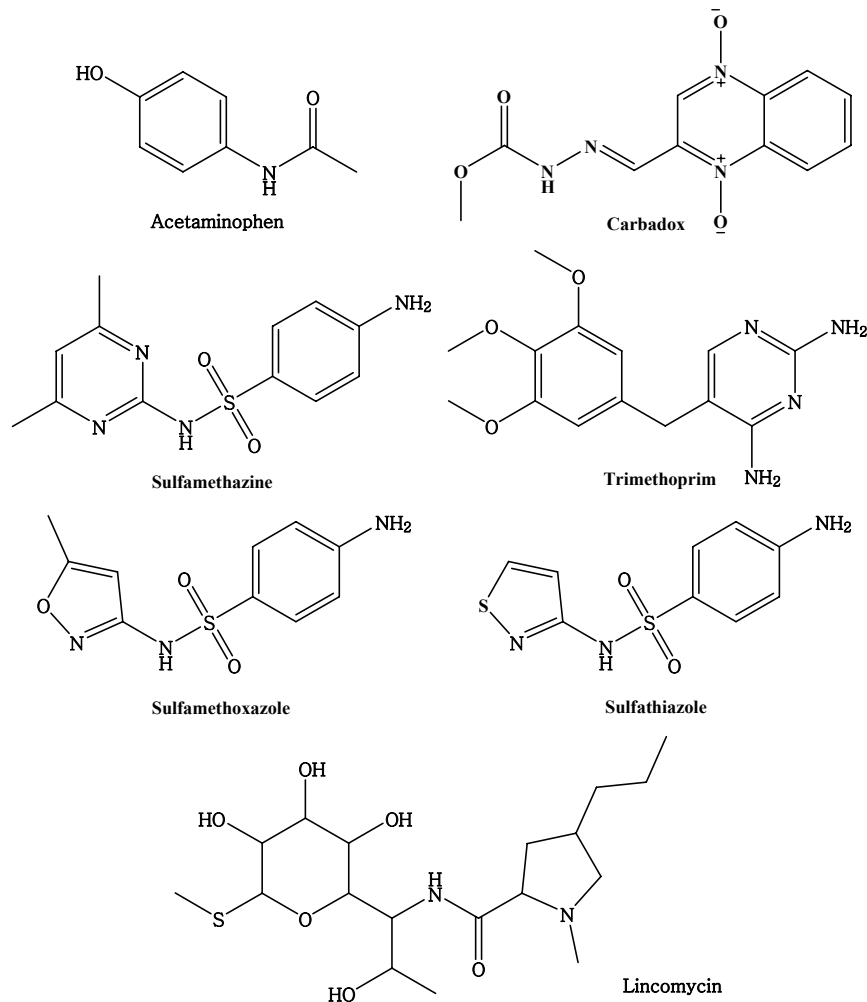
메탄올, 아세트나이트릴, 아세톤 등의 용매는 J.T.Baker사(NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하

였고, Na<sub>2</sub>-EDTA와 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>은 Junsei사(Tokyo, Japan), HCl은 Waco사(Osaka, Japan), ammonium acetate는 merck사(Darmstadt, Germany), formic acid는 Fluka사(Seelze, Germany), 암모니아수는 Samchun사(Kyungki-do, Korea)의 제품을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 이용하였다.

② 표준용액의 제조

본 실험에 사용된 7종(Fig 2)의 구입한 표준시약과 surrogate, 내부표준물질은 메탄올을 이용하여 1000 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>의 표준용액으로 만든 후 이 저장용액을 100 $\mu$ L씩 각각 취하여 섞은 다음 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다. 보관용 표준용액은 각각 농도비에 맞게 메탄올로 혼합·희석하여 10 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>이 되도록 묽혀 사용하였다. Surrogate 표준물질은 100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>의 표준혼합용액상태의 앰플로 구입하여 냉동보관 후 사용 시에 개봉하여 사용하였다.

Fig 2. Chemical structures for Group I

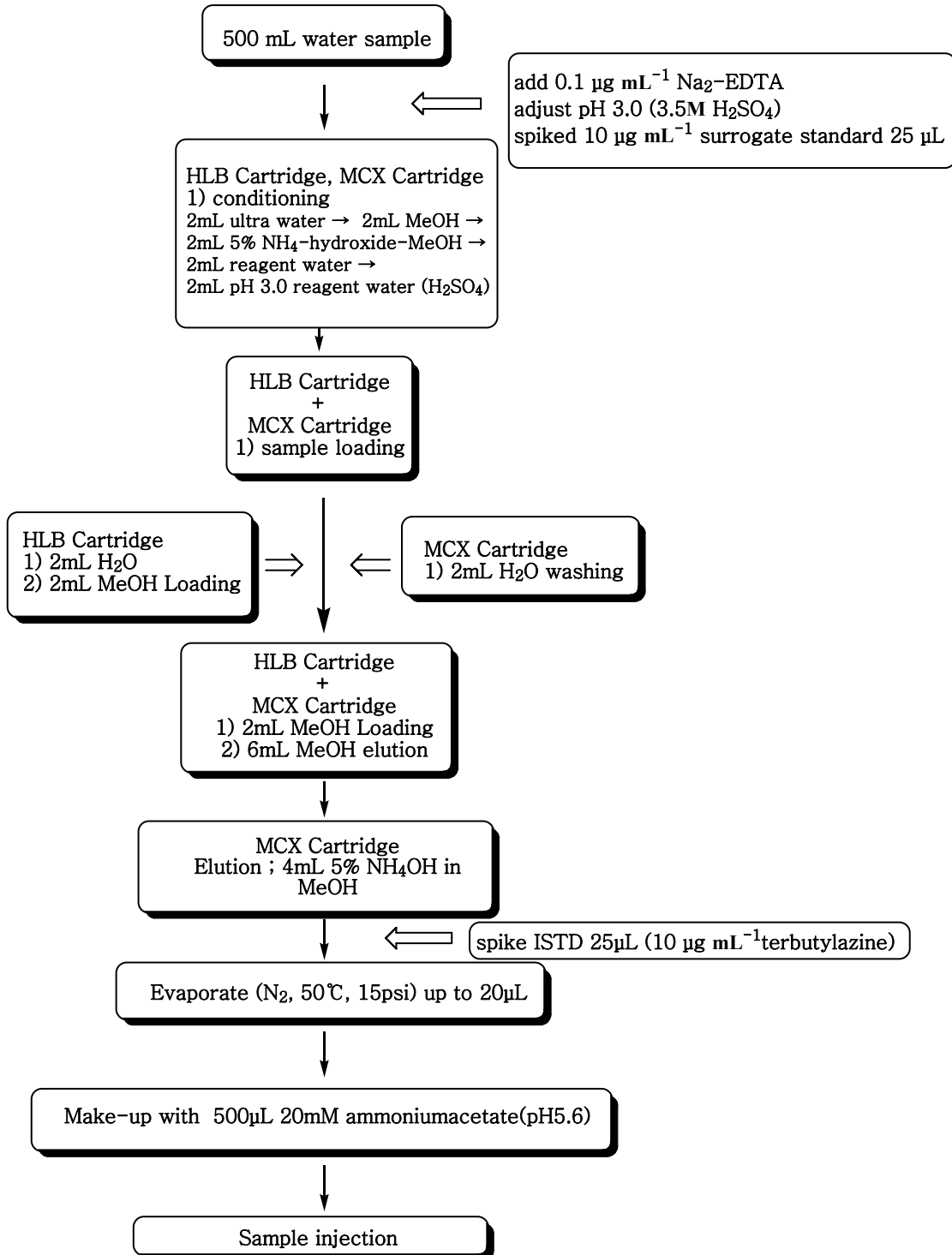


③ 분석기기

사용한 LC/MS/MS는 시료 자동주입기(Agilent 1200 series G1313A Autosampler)가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200series HPLC와 결합된 Agilent 6410 Triple-quadrupole

pole 텐덤 질량분석기(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다.

Fig 3. Sample preparation procedure of Group I



④ 실험방법

가) Group I 시료 전처리

시료 500mL를 취하여 0.1 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>-EDTA 0.5mL와 10 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> surrogate STD (sulfamethazine-6-<sup>13</sup>C) 25 $\mu$ L를 첨가한 후, 3.5M 황산을 사용해 pH를 3으로 조절한다. Oasis HLB (200mg, 6cc)와 Oasis MCX (150mg, 6cc) 카트리지를 vacuum manifold에 장착한 후 증류수 2mL와 메탄올 2mL를 흘려주고 다시 5% ammonium hydroxy-MeOH 2mL, 증류수 2mL, pH 3.0인 증류수 2mL를 차례로 통과시켜 컨디셔닝 하였다. 그리고 HLB와 MCX 카트리지를 HLB가 위에 위치하도록 연결한 다음 시료를 10mL min<sup>-1</sup>의 속도로 적재시켰다. 시료가 통과된 카트리지를 분리하여 HLB는 증류수 2mL로 씻어준 다음 메탄올 2mL를 적재하고 MCX는 증류수 2mL로 씻어준 후에 두 카트리지를 다시 연결하여 메탄올 2mL를 적재한 다음 계속해서 메탄올 6mL로 용리시킨다. 위층의 HLB 카트리는 제거하고 MCX는 5% ammonium hydroxy-MeOH 4mL로 다시 용리시킨다. 이 용리액에 내부표준물질인 10 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> terbutylazine 25  $\mu$ L를 넣고 질소증발기를 사용하여 완전히 증발시킨 다음 20mM ammonium acetate 500 $\mu$ L로 잔사를 녹여 0.45 $\mu$ m membrane filter를 가지고 여과시킨 후 2mL 호박색 vial에 옮겨 LC/ESI-MS/MS로 분석하였다.

나) Group I 기기분석 조건

시료 전처리를 통해 얻은 용액을 Table 2에 나타난 Group I 기기조건에 따라 7종의 의약품질을 분석하였다. 7종의 의약품질과 내부표준물질, Surrogate는 scan mode에서 각 물질의 질량스펙트럼을 확인한 다음 각 물질별 선구 이온(precursor ion)을 선택하여 MRM(multiple reaction monitoring) 방법을 사용하여 분석하였다.

Table 2. LC / ESI-MS / MS parameters for Group 1 analysis

Parameters	Conditions
Column	Luna 3 $\mu$ Phenyl-Hexyl column, 3 mm I.D. 150 mm (Phenomenex, Torrance)
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 $\mu$ L min <sup>-1</sup>
Injection volume	10 $\mu$ L
Column temperature	25 $^{\circ}$ C
Ionization mode	Positive ion electrospray
Capillary voltage	3.20 kV
Cone voltage	30 V
Source temperature	120 $^{\circ}$ C
Desolvation temperature	300 $^{\circ}$ C
Cone gas flow	50 L / hr
Desolvation gas flow	550 L / hr



### 3. 결 과

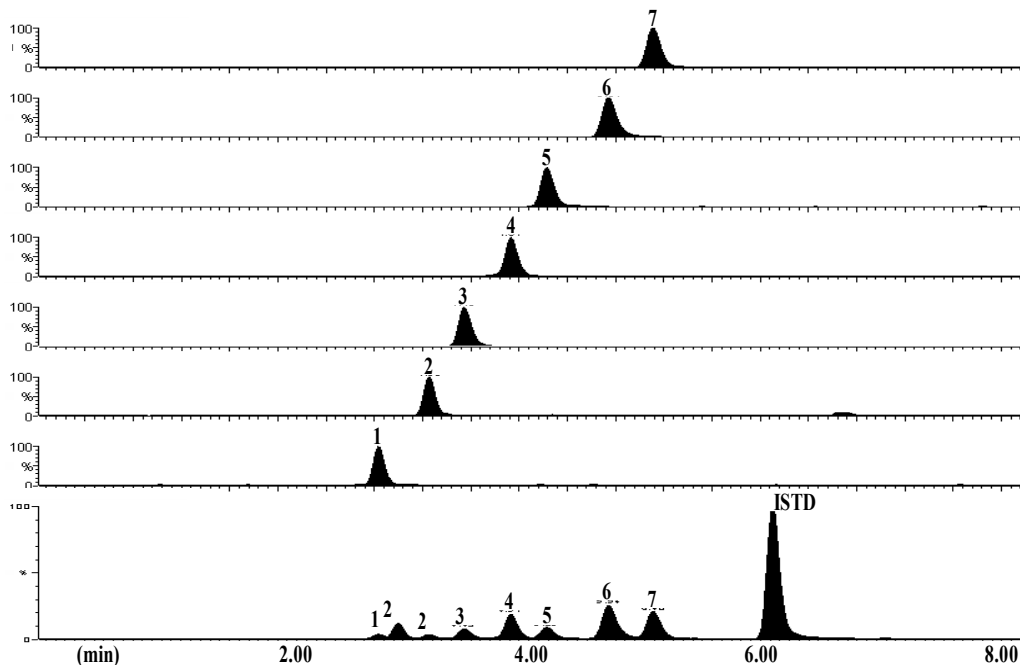
#### 1) LC-MS 분석

Group I에서 분석되는 의약품질은 이동상의 조성예 비해 강한 염기성 물질이기 때문에 분자 구조예 양성자 1개예 붙은 [M+H]<sup>+</sup>가 PPCPs 이온화예 일반적예 경로예 된다. PPCPs 분석예 위한 positive-ion mode 예서 방법 1예 선구 이온예 생성 이온, 그리고 정량 이온예 Table 3예 나타내었고 7종 PPCPs예 extracted ion chromatogram, EIC와 total ion chromatogram, TIC는 Fig 4예 나타내었다.

Table 3. Retention time, precursor and product ion for analysis of pharmaceuticals

Compounds	RT	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
Sulfathiazole	4.43	256.2	92.3 108.5	156.1	15
Lincomycin	4.91	407.6	127.0 173.1	126.3	25
Sulfamethoxazole	5.26	254.3	107.8 254.1	156.1	15
Trimethoprim	5.94	291.3	230.7 261.8	123.0	25
Sulfamethazine	6.37	279.3	204.1 279.2	186.1	15
Sulfamethazine-6- <sup>13</sup> C (Surrogate standard)	6.37	285.0	— —	186.2	20
Terbutylazine (ISTD)	7.61	212.2	— —	156.1	15

Fig 4. LC-MS with positive ESI ionization of 7 PPCPs. The bottom trace is the TIC obtained by summing all of the ions above. Peaks: 1=Acetaminophen; 2=Carbadox; 3=Sulfathiazole; 4=Lincomycin; 5=Sulfamethoxazole; 6=Trimetoprim; 7=Sulfamethazine; ISTD=Terbutylazine; \*=Caffeine.



## 2) 검량식 및 상관계수

7종 PPCPs의 경우 시료 중 농도가 0.01~5ng mL<sup>-1</sup>의 범위가 되도록 표준물질을 첨가하여 확립된 전처리 과정을 거쳐 분석 자료를 얻었다. 얻어진 자료는 내부표준물질을 사용하여 검량선을 작성하였고 검량식의 상관 계수를 구하였다. 직선의 범위는 낮은 농도에서 약 5×10<sup>2</sup>배로 정하였을 때 0.99 이상의 양호한 상관계수를 나타내었으며, 구해진 검량식은 정량에 사용하였다.

## 3) 회수율 및 LODs, LOQs 조사

회수율 측정을 위해 7종의 PPCPs 표준용액을 정제수에 spike시켜 농도가 0.1, 0.5, 1.0ng mL<sup>-1</sup> 되도록 하였다. 그런 다음 전처리를 거친 값과 거치지않은 표준물질 make-up 농도의 절대치로써 측정하였다. 세 가지 농도에서 측정한 회수율은 대체적으로 57.6~86.3%의 값을 나타내었으며 상대표준편차(RSD)가 12.1% 이하인 정밀한 값을 나타내었다.

시료 중 표준물질의 농도를 점차적으로 낮춰 기기분석 후 정량한계(limits of quantification, LOQs)와 검출한계(limits of detection, LODs)를 구하였고 이때 정량한계는 신호 대 잡음비가 10이면서 상대표준편차가 20% 이하의 값을 만족했으며, 검출한계는 신호 대 잡음비가 3인 값을 만족하였다.

Table 4에 PPCPs에 대한 회수율과 LODs, LOQs를 나타내었다.

Table 4. The absolute recovery, LODs and LOQs of group I in distilled water spiked with known amounts of antibiotics

No	Compounds	Concentration (pg mL <sup>-1</sup> )			Recovery(%) (%RSD)
		LODs*	LOQs**	Conc.(ng mL <sup>-1</sup> )	
1	Acetaminophen	0.11	0.37	0.1	79.4 (12.1)
				0.5	66.2 (6.6)
				1.0	58.7 (6.7)
2	Carbadox	0.03	0.10	0.1	79.9 (4.7)
				0.5	64.0 (7.7)
				1.0	60.0 (11.3)
3	Sulfathiazole	0.03	0.08	0.1	82.2 (5.6)
				0.5	64.8 (10.1)
				1.0	57.6 (5.2)
4	Lincomycin	0.06	0.18	0.1	84.1 (7.2)
				0.5	69.6 (1.9)
				1.0	67.4 (8.5)
5	Sulfamethoxazole	0.07	0.22	0.1	86.3 (5.5)
				0.5	66.4 (9.6)
				1.0	63.7 (7.9)
6	Trimethoprim	0.04	0.15	0.1	70.8 (17.1)
				0.5	57.6 (18.9)
				1.0	60.4 (10.5)
7	Sulfamethazine	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), \*\*LOQ : Limit of Quantification (at 20% < RSD and S/N >10)