

# Application News

No. SSK-LCMS-1902

## LC-MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

### Analysis of Pharmaceutical and Personal Care Products(PPCPs) Using Online-SPE-LC-MS/MS

#### ■ 연구 배경

Pharmaceuticals and Personal Care Products(이하 PPCPs)는 일반적으로 개인의 건강이나 외관상의 이유로 사용하거나 가족의 성장이나 건강을 증진시키기 위해 농업에 사용되는 제품으로 정의된다. 의약품 중 PPCPs의 종류에는 치료목적에 따라 항생제, 비스테로이드성 해열제, 지질저해제 등이 있으며, 이와 관련된 3,000여종 이상의 화학종들이 의약품질로 승인받아 수많은 제품이 양산되고 있다.<sup>3)</sup> 사용량 또한 계속해서 증가하고 있는 추세이며, 이로 인해 환경에 잔류하는 의약품질이 새로운 오염물질로 거론됨과 동시에 하천 및 토양오염을 가중시킨다는 연구 결과도 국내외에 보고되고 있다. 전세계적으로 환경에서의 의약품질 오염 정도를 지속적으로 모니터링하고 있으며, 최근에는 분석기술의 발전으로 미량 분석이 가능해짐에 따라 기준도 점점 강화되고 있는 실정이다. 그러나 극미량으로 존재하는 PPCPs를 측정하기 위해 기존 분석시스템에서는 많은 양의 시료를 필요로 하고 전처리과정 또한 복잡하기 때문에 분석에 많은 어려움을 가지고 있다. 이에 본 뉴스레터에서는 물 중에 존재하는 극미량의 PPCPs 분석을 위해 기존의 복잡한 전처리 과정을 거치지 않고, Online-SPE System을 이용한 LC-MS/MS 분석방법을 적용하였다.

#### ■ 장비 구성 및 분석 조건

본 실험은 Online-SPE LC-MS/MS를 이용하여 PPCPs 52 성분을 동시 분석하였으며, Online-SPE의 구성은 아래 <그림 1>, 분석조건 및 MRM 조건은 <표 1>, <표 2>와 같다.

##### 1. 시료 전처리

물 시료 10 mL을 0.2 m polyvinyl fluoride로 필터한 후, 메탄올(10 %, v/v), Formic acid (0.1 %, v/v) 및 4 mg Na<sub>2</sub>EDTA를 첨가하여 분석하였으며, 표준품 또한 위와 같은 방법으로 준비하였다.

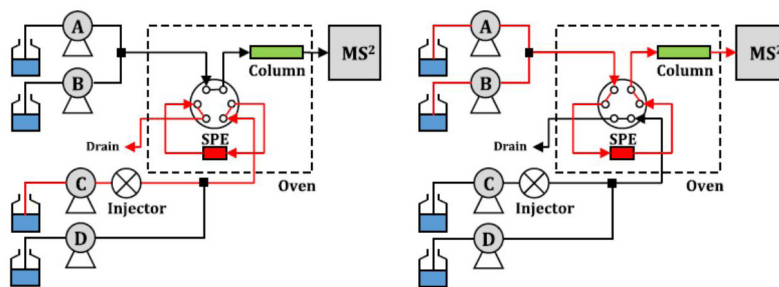


그림 1. Online-SPE-LC-MS/MS 모식도

표 1. 분석조건

HPLC (Nexera UHPLC)	
Column	: ACE 5 C18-PFP (150 mm x 2.1 mm, 5.0 µm)
SPE Column	: Shim-pack MAYI-ODS (10 mm x 2.0 mm, 50 µm)
Mobile phase A	: 0.1 % Formic acid in Water
Mobile phase B	: Acetonitrile
Mobile phase C	: 0.1 % Formic acid in Water
Mobile phase D	: Acetonitrile : Methanol : Isopropanol (1 : 1 : 1, v/v/v)
Gradient program	: 10 % (2.5 min) – 100 % (10.5 - 14.5 min) – 10 % (14.6 - 17.0 min)
Flow rate A, B	: 0.2 mL/min
Flow rate C	: 0.4 mL/min
Oven temp.	: 40 °C
Injection volume	: 300 µL
MS (LCMS-8050)	
Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Drying Gas Flow	: 10 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min
DL Temp.	: 250 °C
IF Temp.	: 300 °C
Heating Block Temp.	: 400 °C
Ionization Mode	: ESI
Data Acquisition Mode	: MRM

표 2. PPCPs 52성분의 MRM 조건

NO	Compounds	Quantitation Ion						
		R.T. min	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	CE (V)	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	CE (V)
1	Acetaminophen	6.1	152	65	-30	152	110	-20
2	Amoxicillin	5.6	366	114	-25	366	349	-10
3	Aripiprazole	9.5	448	285	-28	448	176	-33
4	Atenolol	5.7	267	145	-28	267	190	-20
5	Caffeine	6.6	195	138	-20	195	42	-40
6	Carbamazepine	9.0	237	194	-18	237	193	-35
7	Cefradine	6.6	350	176	-15	350	158	-10
8	Cephalexin	6.5	348	158	-10	348	174	-20
9	Chlorpheniramine	8.1	275	230	-15	275	167	-38
10	Chlortetracycline	7.9	479	444	-20	479	462	-25
11	Cimetidine	5.7	253	95	-25	253	117	-15
12	Ciprofloxacin	7.0	332	231	-40	332	314	-20
13	Clarithromycin	9.7	748	158	-32	748	590	-20
14	Cloxacillin	10.0	434	293	10	434	390	10
15	Demeclocycline	7.5	465	448	-15	465	430	-20
16	Diclofenac	11.2	294	250	10	294	214	20
17	Diphenhydramine	9.0	256	167	-20	256	165	-40
18	Enrofloxacin	7.3	360	316	-20	360	342	-25
19	Erythromycin	8.6	734	158	-35	734	83	-50
20	Florfenicol	8.3	356	336	10	356	185	20

21	Flumequine	9.7	262	202	-30	262	244	-20
22	Fluoxetine	10.2	310	44	-13	310	148	-9
23	Gemfibrozil	12.1	249	121	16	249	127	10
24	Ibuprofen	11.2	205	161	9	-	-	-
25	Iopromide	5.6	792	573	-26	792	300	-55
26	Ketoprofen	10.2	255	209	-15	255	105	-25
27	Lincomycin	6.2	407	126	-25	407	359	-20
28	Metoprolol	7.5	268	116	-19	268	74	-22
29	Naproxen	10.4	231	185	-15	231	170	-26
30	Ofloxacin	7.0	362	318	-20	362	261	-25
31	Oseltamivir	7.9	313	120	-30	313	166	-21
32	Oseltamivir acid	6.8	285	138	-21	285	197	-12
33	Oxolinic acid	8.6	262	244	-15	262	216	-30
34	Oxytetracycline	6.9	461	426	-20	461	443	-15
35	Pefloxacin	7.0	334	290	-20	334	316	-25
36	Penicillin G	8.8	335	176	-15	335	160	-15
37	Penicillin V	9.3	349	208	10	349	93	30
38	Propranolol	8.7	260	183	-18	260	56	-30
39	Quetiapine	8.5	384	253	-24	384	221	-38
40	Roxithromycin	9.6	838	679	-25	838	158	-40
41	Sulfachlorpyridazine	8.1	285	108	-25	285	156	-15
42	Sulfadimethoxine	8.9	311	156	-20	311	92	-35
43	Sulfamethazine	7.4	279	186	-20	279	124	-25
44	Sulfamethoxazole	8.3	254	156	-15	254	92	-30
45	Sulfathiazole	6.8	256	156	-15	256	92	-25
46	Testosterone	10.1	289	109	-30	289	97	-25
47	Tetracycline	7.2	445	410	-25	445	427	-15
48	Triclosan	12.6	287	35	9	287	142	35
49	Trimethoprim	6.8	291	230	-25	291	261	-25
50	Tylosin	8.7	917	174	-40	917	101	-50
51	Vancomycin	5.6	725	100	-40	725	144	-20
52	Warfarin	10.6	307	161	19	307	250	22

## ■ 분석 결과

### 1. 검량선 및 방법검출한계 (이하 MDL)

PPCPs 표준물질 52 성분을 메탄올에 녹여 100 g/mL로 조제하고, 이를 0.1 % formic acid와 4 mg Na<sub>2</sub>EDTA가 포함된 10 % 메탄올로 희석하여 농도 범위 0.01 pg/mL ~ 10 pg/mL 수준으로 검량선을 작성하였다. MDL의 경우, 성분에 따라 표준물질 농도 0.005 ng/mL 또는 0.05 ng/mL 수준에서 7 회 반복 측정하여 산출하였다. 결과는 아래 <표 3>과 같으며, 직선성에 있어서는 모든 성분에 대해서 R<sup>2</sup>=0.99 이상으로 양호한 것으로 나타났다. 또, MDL 결과는 32 개 성분이 1 pg/mL - 80 pg/mL 범위에서 분포하는 것으로 나타났으며, 나머지 20 개 성분은 1 pg/mL 이하인 것으로 나타났다.

### 2. 재현성 및 회수율

회수율 및 재현성 테스트는 샘플에 저, 중, 고 3가지 농도로 표준품을 spike하여 테스트를 진행하였으며, 결과는 <표 3>에 정리하였다.

표 3. PPCPs 52성분의 밸리데이션 결과

NO	Compounds	Linearity range (pg/mL)	R2	MDL (pg/mL)	Spiked level (pg/mL)			Recovery, n=7 (%)					
					Low	Middle	High	Low	% RSD	Middle	% RSD	High	% RSD
1	Acetaminophen	0.1-10	0.99	0.01	0.5	4	8	89	6	99	6	95	6
2	Amoxicillin	0.1-10	0.99	0.05	0.5	4	8	90	6	100	5	94	7
3	Aripiprazole	0.01-1	0.99	0.005	0.05	0.4	0.8	89	10	86	3	92	6
4	Atenolol	0.01-1	0.99	0.005	0.05	0.4	0.8	88	4	100	10	94	7
5	Caffeine	0.01-1	0.99	0.004	0.05	0.4	0.8	86	12	98	3	103	7
6	Carbamazepine	0.01-1	1.00	<0.001	0.05	0.4	0.8	98	2	101	2	100	2
7	Cefradine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	96	10	104	4	104	4
8	Cephalexin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	93	9	101	4	99	3
9	Chlorpheniramine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	95	5	92	6	92	3
10	Chlortetracycline	0.1-10	0.99	0.06	0.5	4	8	89	9	87	6	95	7
11	Cimetidine	0.01-1	0.99	<0.001	0.5	4	8	87	8	100	5	100	3
12	Ciprofloxacin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	92	9	90	8	94	6
13	Clarithromycin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	89	3	90	3	91	2
14	Cloxacillin	0.01-1	0.99	0.008	0.05	0.4	0.8	91	7	102	3	101	4
15	Demeclocycline	0.1-10	0.99	0.08	0.5	4	8	87	11	90	9	93	7
16	Diclofenac	0.01-1	0.99	0.003	0.05	0.4	0.8	88	3	97	2	101	1
17	Diphenhydramine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	98	3	104	3	97	3
18	Enrofloxacin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	92	5	65	5	74	8
19	Erythromycin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	88	4	94	3	94	2
20	Flufenicol	0.01-1	0.99	0.007	0.05	0.4	0.8	105	4	99	9	88	2
21	Flumequine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	93	3	101	2	100	2
22	Fluoxetine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	95	3	96	2	96	5
23	Gemfibrozil	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	94	3	99	2	102	2
24	Ibuprofen	0.1-10	0.99	0.08	0.5	4	8	91	4	94	5	89	6
25	Iopromide	0.1-10	0.99	0.02	0.5	4	8	90	9	102	6	97	4
26	Ketoprofen	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	93	5	99	2	101	2
27	Lincomycin	0.01-1	0.99	0.001	0.05	0.4	0.8	91	7	99	4	95	6
28	Metoprolol	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	88	13	100	5	100	7
29	Naproxen	0.01-1	0.99	0.002	0.05	0.4	0.8	105	6	96	2	99	2
30	Ofloxacin	0.01-1	0.99	0.001	0.05	0.4	0.8	92	6	94	5	96	3
31	Oseltamivir	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	89	8	99	4	94	5
32	Oseltamivir acid	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	92	6	99	3	101	2
33	Oxolinic acid	0.01-1	0.99	0.002	0.05	0.4	0.8	112	14	97	2	102	4
34	Oxytetracycline	0.1-10	0.99	0.006	0.5	4	8	89	8	90	6	91	5
35	Pefloxacin	0.01-0.5	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	91	5	91	7	93	7
36	Penicillin G	0.01-1	0.99	0.007	0.05	0.4	0.8	95	8	102	4	100	5
37	Penicillin V	0.01-1	0.99	0.01	0.05	0.4	0.8	97	19	100	5	100	4
38	Propranolol	0.01-1	0.99	0.001	0.05	0.4	0.8	91	5	101	4	101	5
39	Quetiapine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	88	5	95	3	98	2
40	Roxithromycin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	89	6	86	3	83	3
41	Sulfachlorpyridazine	0.01-1	0.99	0.004	0.05	0.4	0.8	99	9	99	4	94	3
42	Sulfadimethoxine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	93	3	99	1	100	2
43	Sulfamethazine	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	90	7	98	2	99	3
44	Sulfamethoxazole	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	97	6	97	2	95	2
45	Sulfathiazole	0.01-1	0.99	0.005	0.05	0.4	0.8	88	9	104	8	104	4
46	Testosterone	0.01-1	0.99	0.002	0.05	0.4	0.8	92	4	101	3	100	2
47	Tetracycline	0.1-10	0.99	0.01	0.5	4	8	87	9	88	10	91	6
48	Triclosan	0.1-10	0.99	0.07	0.5	4	8	91	7	98	2	100	3
49	Trimethoprim	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	97	12	99	4	96	4
50	Tylosin	0.01-1	0.99	0.005	0.05	0.4	0.8	87	8	89	3	89	3
51	Vancomycin	0.01-1	1.00	<0.001	0.05	0.4	0.8	93	11	106	4	98	7
52	Warfarin	0.01-1	0.99	<0.001	0.05	0.4	0.8	113	2	94	2	93	3

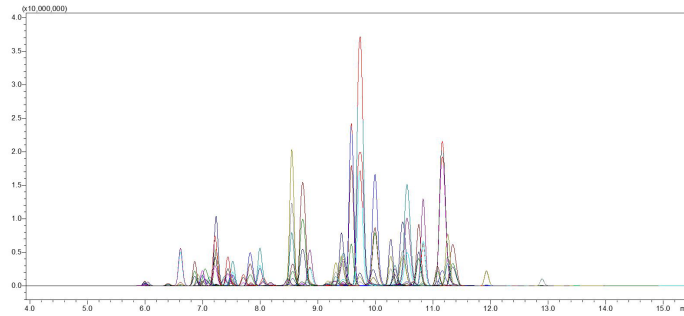


그림 2. PPCPs 52성분의 크로마토그램 (2 ng/mL)

## ■ 결론

본 실험은 별도의 전처리 과정을 거치지 않는 Online-SPE-LC-MS/MS 시스템을 이용하여 PPCPs 52성분에 대한 동시 분석법을 검토한 것으로 검량선, MDL, 재현성 및 회수율 등이 모두 우수한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 바탕으로 Online-SPE-LC-MS/MS 시스템을 물 중에 존재하는 극미량의 PPCPs 분석에 적용한다면, 우수한 데이터 확보와 더불어 전처리의 간소화를 통해 실험 시간을 단축할 수 있는 장점이 있을 것으로 판단된다.

## ■ 참고 문헌

- 1) Mass-balance-model-based evaluation of sewage treatment plant contribution to residual pharmaceuticals in environmental waters. Y.Hong et al./Chemosphere 225 (2019) 378-387
- 2) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. Nikolaou A et al./Anal Bioanal Chem (2007)
- 3) 국립환경과학원 보고서 자료, [http://www.prism.go.kr/homepage/research/Common/downloadResearchAttachFile.do?sessionId=D8C80610778F4EBCD54A38B29CA103BE.node02?work\\_key=001&file\\_type=CPR&seq\\_no=001&pdf\\_conv\\_yn=Y&research\\_id=1480000-20090](http://www.prism.go.kr/homepage/research/Common/downloadResearchAttachFile.do?sessionId=D8C80610778F4EBCD54A38B29CA103BE.node02?work_key=001&file_type=CPR&seq_no=001&pdf_conv_yn=Y&research_id=1480000-20090)