

## 반응표면분석법을 이용한 설파메톡사졸의 액체크로마토그래피 -텐덤형 질량분석 최적화

### Optimization of LC-MS/MS for the Analysis of Sulfamethoxazole by using Response Surface Analysis

배효관 · 정진영<sup>†</sup>

Hyokwan Bae · Jin-Young Jung<sup>†</sup>

한국과학기술연구원 환경기술연구단

Center for Environmental Technology Research, KIST

(2009년 6월 29일 접수, 2009년 9월 11일 채택)

**ABSTRACT** : Pharmaceutical compounds enter the water environment through the diverse pathways. Because their concentration in the water environment was frequently detected in the level of ppt to ppb, the monitoring system should be optimized as much as possible for finding appropriate management policies and technical solutions. One Factor At a Time (OFAT) approach approximating the response with a single variable has been preferred for the optimization of LC-MS/MS operational conditions. However, it is common that variables in analytical instruments are interdependent. Therefore, the best condition could be found by using the statistical optimization method changing multiple variables at a time. In this research, response surface analysis (RSA) was applied to the LC-MS/MS analysis of emerging antibiotic compound, sulfamethoxazole, for the best sensitivity. In the screening test, fragmentation energy and collision voltage were selected as independent variables. They were changed simultaneously for the statistical optimization and a polynomial equation was fit to the data set. The correlation coefficient,  $R^2$  value represented 0.9947 and the error between the predicted and observed value showed only 3.41% at the random condition, fragmentation energy of 60 and collision voltage of 17 eV. Therefore, it was concluded that the model derived by RSA successfully predict the response. The optimal conditions identified by the model were fragmentation energy of 116.6 and collision voltage of 10.9 eV. This RSA can be extensively utilized for optimizing conditions of solid-phase extraction and liquid chromatography.

**Key words** : LC-MS/MS, Sulfamethoxazole, Statistical Optimization, Response Surface Analysis, Antibiotics

**요약** : 의약품질은 다양한 경로를 통해 수질환경으로 유입된다. 수계에 의약품질은 ppt에서 ppb 단위의 낮은 농도로 종종 검출되고 있으므로 적절한 관리방안과 기술적 대안을 찾기 위해 최적화된 미량분석기술을 개발하는 것이 필요하다. LC-MS/MS 최적화에 있어서 단변수 변화분석이 선호되어 왔다. 그러나 분석기기의 독립변수들은 서로 영향을 주고받기 때문에 여러 독립변수를 동시에 변화시키는 방법을 통해 최적조건을 탐색해야 한다. 본 연구에서는 반응표면 분석법을 최근 문제가 되고 있는 항생제 설파메톡사졸의 LC-MS/MS 분석에 활용하였다. 먼저 선별실험을 통해 최적화 대상 독립변수를 조각화에너지(Fragmentation Energy)와 충돌전압(Collision Voltage)으로 선정하였다. 조각화에너지와 충돌전압을 동시변화시키고 각 조건의 반응을 다항식으로 모사하였다. 회귀분석결과 상관계수  $R^2$ 값은 0.9947를 나타내어 높은 정확도를 보였으며, 무작위 조건에서 반응의 예측값과 관측값 사이의 오차율이 3.41%로 작은 차이를 보였다. 따라서 RSA에 의해 도출된 모델이 조각화에너지와 충돌전압의 변화에 의한 LC-MS/MS의 반응을 성공적으로 모사하는 것으로 사료되었다. 이때 모델을 통해 확인된 최적조건은 조각화에너지 116.6과 충돌전압 10.9 eV이다. 이러한 반응표면분석법은 고체상 추출조건 및 액체크로마토그래피 조건의 최적화에 확장되어 활용될 수 있다.

**주제어** : 액체크로마토그래피-텐덤형 질량분석기, 설파메톡사졸, 통계학적 최적화, 반응표면분석법, 항생제

## 1. 서론

항생제는 다양한 경로를 통해 수질환경으로 유입된다. 우리가 복용한 항생제는 인체 대사과정에서 완전히 흡수 혹은

분해되지 않은 상태로 정화조로 배출된다. 사용되지 않고 폐기된 항생제는 폐기물의 침출수에 포함되어 배출된다. 또한 항생제는 축산농가 등에서 감염성 질병 방지 및 성장 촉진의 목적으로 사용되고 있고, 분해되지 않은 항생제 및 대사체가

<sup>†</sup> Corresponding author : E-mail : jjjung@kist.re.kr Tel : 02-958-5837 Fax : 02-958-5839

축산폐수에 포함되어 배출된다. 이러한 오·폐수는 일반적인 생물학적 처리과정을 거쳐 환경으로 배출되지만 미량 의약품질의 처리율은 높지 않은 것으로 조사되었다.<sup>1,2)</sup>

최근 연구에 의하면 여러 수질환경매체에서 항생제가 검출되고 있는데 하수처리장 유출수 및 표면수에서 ppt에서 ppb 단위로 검출되었다.<sup>1~4)</sup> 이러한 항생물질은 낮은 농도일지라도 생물농축, 카테일효과 및 장기영향으로 인체 및 생태계에 악영향을 줄 수 있다. 이에 따라 미국 식품의약품안전청(US FDA)은 의약산업에 대한 가이드라인을 통해 신약승인시에 예상유입농도(Expected Introductory Concentration, EIC)가 1 ppb보다 크면 대상 의약품의 환경 중 거동과 생태독성에 해당되는 환경위해성 평가를 수행하도록 규정하고 있다.<sup>5,6)</sup> 이와 같이 의약품물질의 환경노출에 대한 사회적 관심도가 높아지고 있으며 적절한 관리방안과 기술적 대안을 찾기 위해 의약품물질의 미량분석기술을 개발하는 것이 시급하다.

미량오염물질의 분석을 최적화할 때 일반적으로 한 번에 하나의 독립변수를 변화시켜 최적조건을 찾는 단변수 변화분석(One Factor At a Time, OFAT)이 선호되어 왔다. 그러나 분석기기를 포함한 많은 시스템은 여러 독립변수의 변화에 상호 영향을 주고받기 때문에 동시에 여러 독립변수를 변화시키는 방법을 통해 최적조건을 더욱 효율적으로 찾을 수 있다.<sup>7)</sup> 대표적인 방법론이 통계학적 최적화 기법인 반응표면분석법인데 중심합성계획법을 통해 설계된 실험을 수행하고 각 조건에서 얻은 반응수치를 바탕으로 비선형 회귀분석 모델링 및 최적점 탐색을 수행하는 것이다.

본 연구에서는 반응표면분석을 이용하여, 수계에 검출되는 대표적인 항생제 중의 하나인 설파메톡사졸의 LC-MS/MS 분석을 최적화하였다. 여기서 최적화란 설파메톡사졸의 특성 분자조각의 피크 면적을 최대화하는 것이다. 먼저 LC-MS/MS에 영향을 주는 다양한 독립변수의 영향도를 파악하고 주요인자로 선택된 독립변수를 동시변화시켜 최적조건을 탐색하였다. 이후 도출된 반응식을 통해 예상된 설파메톡사졸의 피크 면적과 관측값을 비교하여 모델의 예측도를 평가하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 분석기기

설파메톡사졸 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 시판품을 이용하였다. 설파메톡사졸은 253.28의 분자량을 가지고 있으며 구조는 Fig. 1과 같다. 메탄올에 설파메톡사졸을

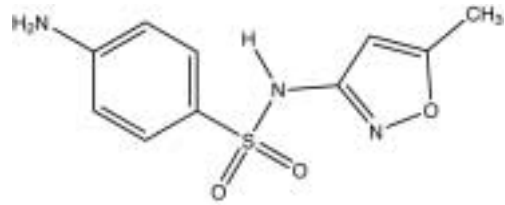


Fig. 1. The structure of sulfamethoxazole(CAS number : 723-46-6).

600 ppm으로 녹여 최적화 실험에 사용하였다.

본 연구에서 사용한 HPLC-질량분석기는 Agilent Technologies사의 1200 series HPLC (Palo Alto, CA, USA)와 6410 텐덤형 질량분석기(Palo Alto, CA, USA)의 조합으로 구성되어 있으며, 이를 이용하여 설파메톡사졸을 분석하였다. HPLC에는 Zorbax SB-C18 칼럼(2.1×50 mm, 1.8 μm, Palo Alto, CA, USA)을 탑재하였고, 전자분무이온화(Electro Spray Ionization, ESI) 양이온 모드를 이용하여 설파메톡사졸을 양이온으로 전환하였다. 이동상 A는 20 mM의 포름산 암모늄(Ammonium Formate)과 0.3% 포름산(Formic Acid)이 함유된 HPLC급 용액(JT Backer, Phillipsburg, NJ, USA)을 이용하였고, 이동상 B는 HPLC급 아세토니트릴(JT Backer, Phillipsburg, NJ, USA)을 이용하였다. 이동상은 아세토니트릴 40%를 유지하였다. MRM (Multiple Reaction Monitoring) 모드를 이용하여 254 m/z의 설파메톡사졸 분자가 충돌전압(Collision Voltage)에 의해 쪼개어져 형성되는 156 m/z 특성분자의 피크 면적을 적분해서 측정하였다. 이와 관련된 실험조건을 Table 1에 정리하였다.

설파메톡사졸의 분석과정을 쉽게 이해하기 위하여 HPLC 및 MS/MS에서의 분석 메커니즘을 Fig. 2에 나타내었다.

Table 1. The operational condition of HPLC-MS/MS

	Description	Condition
HPLC	Flow Rate	0.6 mL/min
	Injection Volume	3 μL
	Column Temperature	25°C
	Solvent(ACN)	40%
MS/MS	Ionization Mode	ESI
	Detection Mode	MRM (254-156)
	Capillary Voltage	4 kV
	Drying Gas Temperature	300°C
	Drying Gas Flow Rate	8 L/min
	Nebulizer Pressure	40 psi
	Fragmentation Energy	90
Collision Voltage	15 eV	

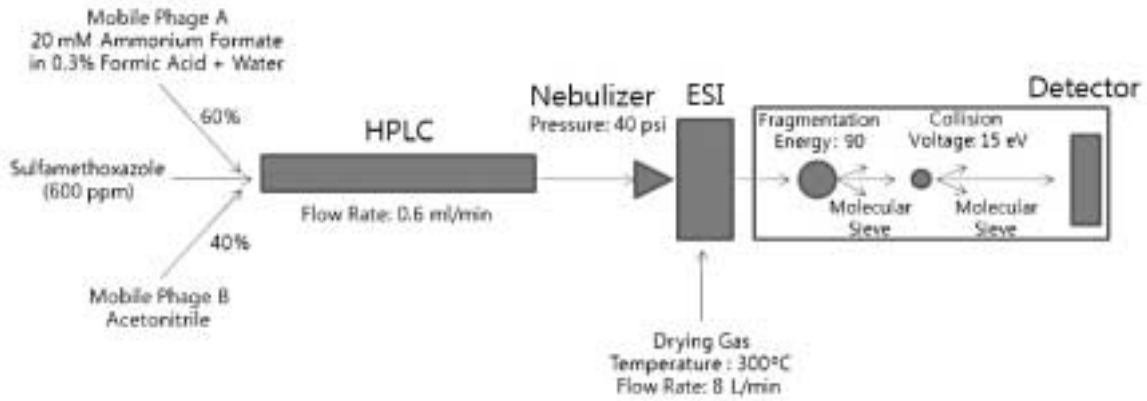


Fig. 2. The mechanism of detection of sulfamethoxazole in HPLC and tandem-mass spectrometry.

### 2.2. 실험계획 및 반응표면분석

최적화 대상 독립변수를 선별하기 위해 Table 1에 설명된 조건에서 (a)조각화에너지(Fragmentation Energy), (b)충돌전압, (c)분사기(Nebulizer) 압력, (d)건조가스 온도, (e)건조가스 공급속도, (f)모세관 전압, (g)아세토니트릴 용매, (h) 이동상 이동속도, 이상의 8개의 독립변수를 변화시키면서 민감도의 변화를 관찰하였다.

반응표면분석의 실험설계를 위해 중심합성계획법(Central Composite Design)에 따라 선별된 두 인자의 조건을 동시변화시켰다. 반응표면분석을 위해 Design-Expert 6.0.6(Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA)을 이용하였다. 두 변수에 대한 피크 면적의 반응을 3차 다항식으로 모사하였으며 2차원 및 3차원으로 시각화하였다. 도출된 모델의 예측도 및 정확도는 R<sup>2</sup>값과 무작위 조건에서의 예측값 대 관측값의 차이로 판별하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 최적화 대상 독립변수 선별

최적화 대상 독립변수 선별을 위해 하나의 인자를 변화시켜 설파메톡사졸의 피크 면적이 반응하는 차이를 Fig. 3과 같이 판별하였다.

피크 면적이 민감하게 반응하는 독립변수는 조각화에너지, 충돌전압, 건조가스 온도, 건조가스 공급속도, 그리고 이동상 이동속도였다. 그 외의 변수인 분사기 압력, 모세관 전압, 아세토니트릴 용매에 대해서는 큰 반응을 보이지 않았다.

조각화에너지와 충돌전압은 민감도에 큰 영향을 준다. 질량분석기 MRM 모드 상 설파메톡사졸 254 m/z 분자는 조각화에너지에 의해 일부 쪼개어지거나 하전이 강화된다. 이

후 텐덤형 질량분석기가 제공하고 있는 분자 체거름 기능(Molecular Sieve)에 의해 254 m/z의 분자만 선별되어 충돌유발분해(Collision-induced Dissociation) 구간으로 옮겨진다. 충돌전압에 의해 254 m/z 분자는 여러 분자들로 쪼개어지고, 두 번째 체거름 현상에 의해 여러 분자조각들 중 156 m/z 분자만이 검출기에서 측정된다. 2차 함수 곡선을 나타내는 조각화에너지와 충돌전압의 영향은 실험범위 안에서 최대화되는 최적점을 가지고 있다. 조각화에너지가 너무 강하면 254 m/z가 첫 번째 체거름을 지나기 전에 모두 쪼개어져 민감도가 낮아지므로 최적화가 필요하다. 마찬가지로 충돌전압이 너무 강하면 분자들이 모두 작은 조각으로 나뉘어져 156 m/z의 분자가 줄고, 반대로 너무 약하면 156 m/z가 생성되지 않으므로 최적화가 필요하다. 따라서 위의 두 독립변수는 본 실험의 최적화 대상으로 선별되었다.

분자의 조각화 현상 뿐만 아니라 질량분석기의 민감도는 시료의 이온화 효율에 의해 크게 좌우된다. 그러므로 효율적인 이온화를 위해 이온화 장치를 최적화하는 것이 중요하다. 본 연구에서 조사된 건조가스 온도, 건조가스 공급속도, 이동상 이동속도는 모두 이온화 효율과 관계있는 독립변수들이다. 건조가스 온도가 높을수록, 건조가스 공급속도가 빠를수록 이온화 효율은 향상될 것이다.

반면에 시료를 이온화하는 효율이 일정할 때 단위시간 당 이온화 장치에 유입되는 시료의 양이 적을수록 전체적인 민감도는 높아진다. 즉, 이동상의 속도는 느릴수록 피크 면적이 늘어난다. 그러나 이동상의 속도를 늦추는 것은 피크의 예리도(Sharpness)에 악영향을 주고 체류시간도 늦추므로 여러 물질을 동시에 분석할 시에는 주의해야 한다. 1차 함수 곡선을 나타내는 위의 세 가지 변수는 모두 실험범위 내에 최적점이 없으므로 최적화 대상에서 제외한다.

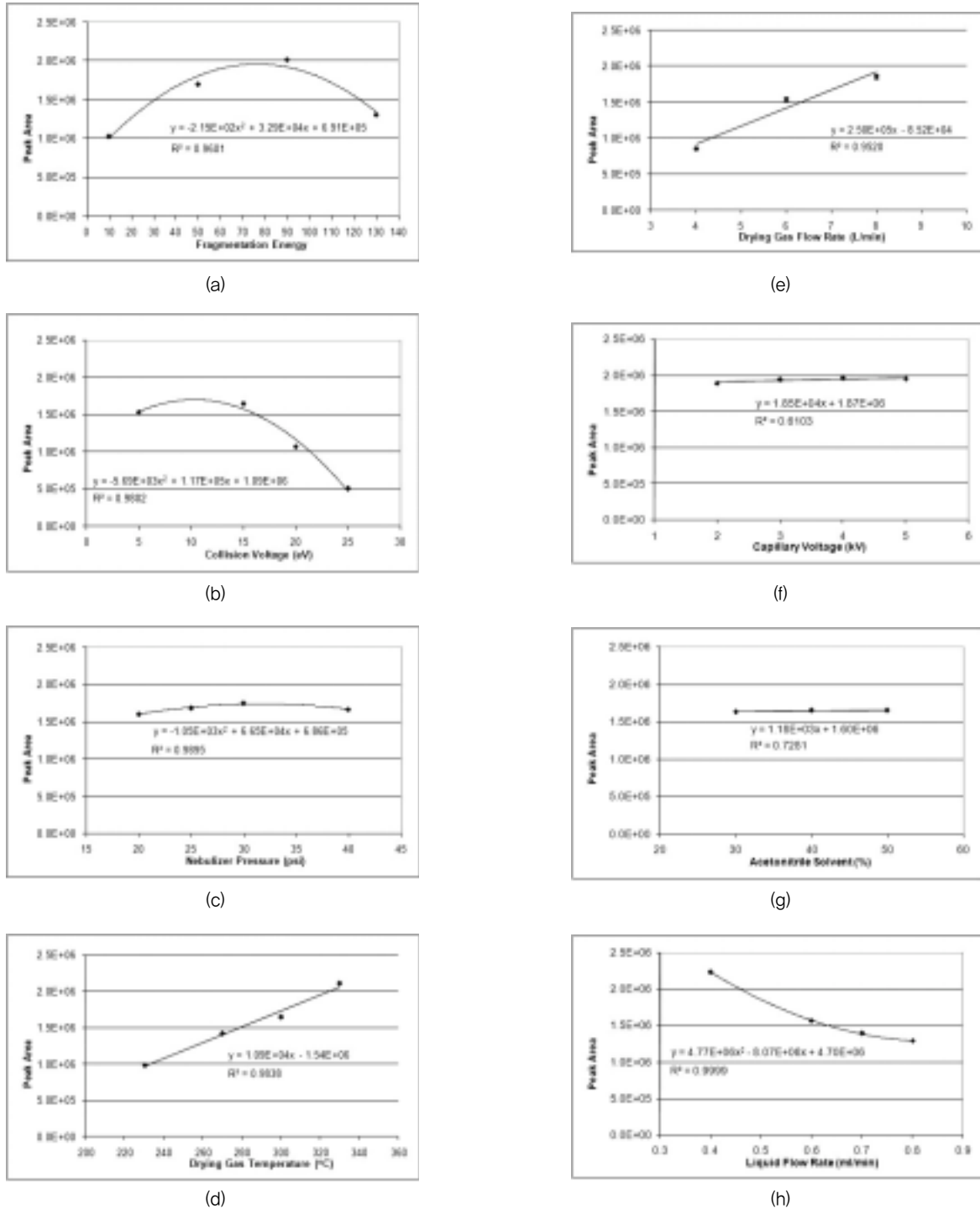


Fig. 3. The effect of (a) fragmentation energy, (b) collision voltage, (c) nebulizer pressure, (d) drying gas temperature, (e) drying gas flow rate, (f) capillary voltage, (g) acetonitrile solvent, and (h) liquid flow rate on the peak area of sulfamethoxazole.

### 3.2. 반응표면분석을 이용한 최적화 실험

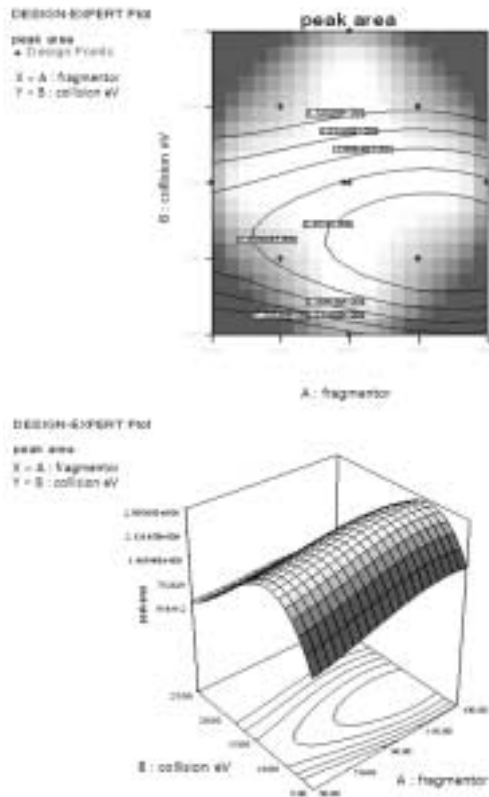
설파메톡사졸 분석용 LC-MS/MS 최적화 실험을 중심합성계획법에 따라 Table 2와 같이 설계하고 각 조건에 따른 피크 면적을 측정하였다. 그리고 실험의 검증을 위하여 무작위 조건을 선정하여 피크 면적을 산출하였다(No. 14 in

Table 2). 실험의 중심점은 Fig. 3a와 3b에서 피크 면적이 최고로 측정된 조건을 기준으로 하여 조각화에너지와 충돌전압을 각각 90과 15 eV로 설정하고 5회에 걸쳐 실험을 반복하였다(No. 9~13 in Table 2). 실험 조건의 변화 단위를 조각화에너지는 20, 충돌전압은 5 eV로 설정하고 1단위 변

**Table 2.** Experimental conditions and observed peak area of sulfamethoxazole analyzed by LC-MS/MS

No.	Coded Value		Actual Value		Peak Area
	Fragmentation Energy	Collision Voltage (eV)	Fragmentation Energy	Collision Voltage (eV)	
1	-1	-1	70	10	2.20E+06
2	1	-1	110	10	2.71E+06
3	-1	1	70	20	9.72E+05
4	1	1	110	20	1.21E+06
5	-2	0	50	15	1.86E+06
6	2	0	130	15	2.29E+06
7	0	-2	90	5	1.25E+06
8	0	2	90	25	3.55E+05
9	0	0	90	15	2.21E+06
10	0	0	90	15	2.23E+06
11	0	0	90	15	2.26E+06
12	0	0	90	15	2.26E+06
13	0	0	90	15	2.36E+06
14*	-1.5	0.4	60	17	1.51E+06

\* No. 14 was the random condition for verifying the prediction ability of the model derived by RSA in this study



**Fig. 4.** Two- and three-dimensional contour plot of the quadratic model for the peak area of sulfamethoxazole analyzed by LC-MS/MS.

화영역에서 1~4번 실험을 수행하였다. 5~8번은 2단위 변화 영역에서의 실험조건과 결과이다. 실험을 통해 얻어진 피크 면적을 기반으로 통계학적 처리를 통해 도출하였다. 식 (1)은 조각화에너지와 충돌전압의 변화에 따른 피크 면적 반응표면을 묘사하는 3차 다항식을 나타낸다. 다항식에 의한 피크

면적모사는 R<sup>2</sup>값 0.9947의 높은 정확도를 보였다.

$$\eta_{\text{Peak Area}} = -26,343A^3 + 152,879B^3 - 48,534A^2 - 366,992B^2 - 67,160AB + 213,319A - 835,327B + 2,243,894 \quad (1)$$

$\eta_{\text{Peak Area}}$  : 피크 면적의 반응

A : 조각화에너지 강도 (coded value)

B : 충돌전압(eV) (coded value)

본 다항식을 이용하여 피크 면적의 반응표면을 Fig. 4와 같이 2차원 및 3차원으로 시각화 하였다. 통계학적 최적화에 의해 추산된 최적조건은 조각화에너지 116.6과 충돌전압 10.9 eV이고 예상되는 피크 면적은 2.81E+06이다.

모델의 예측도를 평가하기 위해 무작위로 선정된 조건(No. 14 in Table 2)에서 실험을 진행하여 모델에 의해 예측되는 값과의 차이를 계산하였다. 모델에 의해 예측된 값은 1.56E+06, 측정된 값은 1.51E+06으로 3.41%의 작은 오차를 보였다. 높은 R<sup>2</sup>값과 낮은 오차율을 볼 때에 RSA에 의해 도출된 다항식은 조각화에너지와 충돌전압에 따른 설파메톡사졸 156 m/z의 피크 면적 변화를 훌륭하게 묘사하는 것으로 판단된다.

#### 4. 결론

LC-MS/MS를 이용한 설파메톡사졸의 분석을 최적화하기 위하여 각 독립변수에 대한 영향을 조사하고, 통계학적 최적화 기법을 적용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 설파메톡사졸 분자의 이온화와 조깅현상에 영향을 주는 조각화에너지와 충돌전압은 156 m/z 피크 면적에 큰 영향을 주며, 실험범위인 조각화에너지 10~130, 충돌전압 5~25 eV 사이에서 최고점을 나타내는 2차 함수의 경향을 보였다. 위의 두 인자는 최적화 대상 독립변수로 선정되었다.
- 2) 건조가스 온도 및 건조가스 공급속도는 설파메톡사졸의 이온화에 관여하며 온도가 높고 공급속도가 빠를수록 피크 면적이 증가하는 1차 함수의 경향을 나타내었다. 이동상의 유속은 전체적으로 이온화되는 설파메톡사졸 분자수에 영향을 주며 유속이 낮을수록 피크 면적이 증가하였다. 위의 세 인자는 해당 실험구간에서 최적점을 보이지 않아 최적화 대상에서 제외되었다.
- 3) 조각화에너지와 충돌전압의 조건이 통계학적 최적화를 통하여 최적화되었다. 반응표면분석법을 통해 도출된 다항식은 높은  $R^2$ 값과 무작위점에서 작은 오차를 보였으므로 조건에 따른 피크 면적의 반응을 성공적으로 모사하는 것으로 판단되었다. 통계학적 최적화에 의해 추산된 최적조건은 조각화에너지 116.6과 충돌전압 10.9 eV이고 예상되는 피크 면적은 2.81E+06이다.

반응표면분석법은 HPLC-MS/MS를 활용한 항생제의 분석에 있어서 고체상 추출조건 및 액체크로마토그래피 조건의 최적화에 확장되어 활용될 수 있다. 예를 들면, 고체상 추출 조건은 카트리지 용량, pH, 시료 적제양, 시료 적제속도, 세척용 시료양, 세척속도, 세척횟수, 건조시간, 추출 유기용매량 등이 있으며 액체크로마토그래피의 운영조건은 시료양, 물 이동상 조성, pH, 유기용매 조성, 유기용매 기울기 용리 조건(Gradient Elution), 유속 등이 있다.

**KSEE**

## 사 사

본 연구는 KIST의 지원을 받아 수행된 연구이며, 이에 감사드립니다. 아울러 본 연구와 관련하여 조언을 해주신 신병희님께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., and Snyder, S. A., "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters," *Water Res.*, **41**, 1013~1021(2007).
2. Ternes, T. A., "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers," *Water Res.*, **32**, 3245~3260(1998).
3. Batt, A. L., Kim, S., and Aga, D. S., "Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations," *Chemosphere*, **68**, 428~435(2007).
4. Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., and Kratz, K-L., "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment," *Sci. Total Environ.*, **255**, 109~118(1999).
5. 신선경, 황승률, 송기봉, 강영렬, "국내 환경 중 의약품물질 현황 및 향후 관리방안," 2008년도 한국환경농학회 추계워크샵 자료집, pp. 3~15(2008).
6. US FDA, "Guidance for Industry; Environmental Assessment for Human Drug and Biologics Applications"(2008).
7. Riter, L. S., Vitek, O., Gooding, K. M., Hodge, B. D., and Julian, R. K. Jr., "Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, **40**, 565~579(2005).