

3-상 속빈 섬유-액체상 미량추출법(HF-LPME)과 HPLC-UV/Vis을 이용한 Tetracycline류 항생제 동시분석

오웅교 · 명승운*

경기대학교 화학과

(접수 2014. 6. 19; 게재확정 2014. 9. 17)

Simultaneous Determination of Tetracycline Antibiotics by 3-Phase Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction (HF-LPME) and HPLC-UV/Vis

Woong Kyo Oh and Seung-Woon Myung*

Department of Chemistry, Kyonggi University, San 94-6, lui-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 443-760, Korea

*E-mail: swmyung@kgu.ac.kr

(Received June 19, 2014; Accepted September 17, 2014)

요 약. 간편하고 효율적이며 친환경적인 시료전처리 방법인 3-상 속빈 섬유 액체상 미량추출법(3-phase HF-LPME) 및 HPLC-UV/Vis를 이용하여 소변 중에 존재하는 테트라사이클린류 항생제 3종(tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline)을 동시에 분석하는 방법을 개발하였다. 분석 물질은 C₈ 컬럼(150×3.0 mm, 3 μm)을 사용하여 기울기 용리법으로 분리되었으며 높은 선택성과 감도를 나타내었다. 시료 전처리를 위한 최적의 실험조건을 확립하였는데, 추출용매로는 heptanal, 추출시간은 60분, 주개 상의 pH는 9.0, 받개 상의 pH는 1.0, 시료의 교반속도는 700 rpm, 추출 시간은 60분이었으며 농축인자는 5.6~22.3이었다. 검출한계와 정량한계는 각각 0.08~0.8 μg/mL와 0.4~1.6 μg/mL이었으며, 0.1~32 μg/mL 농도범위의 검정곡선은 좋은 직선성(R² > 0.995)과 정밀도(1.3~9.1 RSD %) 및 정확도(84~118%)를 나타냈다.

주제어: 테트라사이클린류 항생제, 시료 전처리, HF-LPME, HPLC/UV-Vis

ABSTRACT. A simple and efficient preconcentration method was developed using three-phase liquid phase microextraction prior to HPLC-UV for simultaneous extraction and determination of tetracycline antibiotics (tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline). The tetracycline antibiotics were separated simultaneously on a column (C₈, 3.0×150 mm, 3 μm) with high selectivity and sensitivity using gradient elution. Under optimized conditions (extraction solvent, heptanal; pH of donor, 9.0; pH of acceptor, 1.0; stirring speed, 700 rpm; NaCl salt, 0%; and extraction time, 60 min), enrichment factors (EF) were between 5.6 and 22.3. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) in the spiked urine matrix were in the concentration range of 0.08~0.8 μg/mL and 0.4~1.6 μg/mL, respectively. The calibration curves were linear within the range of 0.1~32 μg/mL with the square of the correlation coefficient being more than 0.995. The precision (as a relative standard deviation, RSD) and accuracy (as a relative recovery) within working range were 1.3~9.1% and 84~118%, respectively.

Key words: Tetracycline antibiotics, Sample preparation, HF-LPME, HPLC/UV-Vis

서 론

테트라사이클린(tetracyclines)류 항생제는 각종 세균에 의한 질병 치료는 물론이며 동물의 성장 촉진을 위해 광범위하게 사용되는 항생제로써,¹ 대표적인 화합물로는 테트라사이클린(tetracycline), 클로르테트라사이클린(chlortetracycline), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 디메틸 클로르테트라사이클린(dimethylchlortetracycline), 메타사이클린(metacycline), 독시사이클린(doxycycline) 등이 있다.²

세계 각국에서는 항생제 과다 사용으로 인한 슈퍼박테

리아 출현을 방지하기 위해 노력을 기울이고 있는 가운데 세계보건기구(World Health Organization, WHO)와 국제연합식량농업기구(Food and Agriculture Organization, FAO)에서는 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린에 대해서 식용 동물의 근육, 간, 신장 및 계란과 우유 등에서 0.1~1.2 mg/kg으로 최대잔류허용치(maximum residual limits, MRLs)를 정하여 규제하고 있다.^{1,3}

한편, 식품 중에 잔류하는 다량의 항생물질들은 식품을 섭취한 예민한 환자들에게는 알려지 반응의 원인이 되므로, 사람의 생체 시료로부터 테트라사이클린류 항생제를

신뢰성 있게 검출하는 방법들을 개발하고 있다.⁴

크로마토그래피 분석을 위한 최근의 시료 전처리 방법 연구의 동향은 친환경적이고 간편하고 빠른 시료 전처리 기법 개발에 중점을 두고 있다. 전통적인 시료 전처리 방법인 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)의 경우에는 간편하게 추출할 수 있다는 장점이 있지만 많은 양의 고 순도 유기 용매 사용으로 인해 환경오염을 야기할 수 있고, 추출시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)의 경우에는 액체-액체 추출법보다 유기 용매의 사용량이 적지만 시료 전처리 과정이 복잡하고 유지비용이 많이 든다는 단점이 있다. 이러한 기존 전처리 방법의 단점을 보완하기 위해서 액체상 미량 추출법(liquid phase microextraction, LPME)과 고체상 미량 추출법(solid phase microextraction, SPME)이 개발되었다.⁵

고체상 미량 추출법은 분석물질을 용융 실리카 섬유에 직접 흡착시키는 방법으로써 장치가 간단하고 유기용매의 사용량이 극히 적어서 친환경적인 시료 전처리 방법이지만, 용융 실리카 섬유의 수명이 제한적이고, 부러지기 쉽고, 섬유와 섬유 홀더 장치가 비교적 비싸다는 단점이 있다.⁵

액체상 미량 추출법은 단일 방울 미량추출법(single-drop microextraction, SDME)과 속빈 섬유형 미량 추출법(hollow fiber - liquid phase microextraction, HF-LPME) 등 여러 가지 추출 방법이 있으며,^{1,6} 이 방법들은 좁은 실험 공간에서 극소량(수백 μL 이하)의 유기용매를 사용하여 간편하게 경제적이며 친환경적인 방법으로 시료 전처리가 수행되기 때문에 기존의 액체-액체 추출법과 고체상 추출법은 물론이며 고체상 미량추출법을 대체할 수 있는 획기적인 시료 전처리 방법이다. Shariati등의¹ 논문도 HF-LPME를 이용하여 테트라사이클린류를 낮은 농도까지 분석한 결과이지만 2종만을 동시 분석한 결과이다.

현재까지의 테트라사이클린계 항생제 분석 연구는 대부분 액체-액체 추출법 또는 고체상 추출법을 이용한 방법이며,⁶⁻⁸ 고체상 미량 추출법 또는 액체상 미량 추출법을 이용한 연구들은 극히 미미한 실정이다.¹

본 연구에서는 U자형의 HF-LPME방법을 이용하여, 사용빈도가 높은 항생제인 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린을 동시에 분석하는 방법을 개발하였으며, 상대적으로 간편한 방법인 2-상 HF-LPME 방법 대신에 HPLC/UV-Vis로 분석이 용이하게 하기 위해 3-상(phase) HF-LPME 방법을 이용하였다. 소변 시료로부터 분석물질을 효과적으로 추출하기 위해 유기용매, 추출 시간, 받개 상(acceptor phase)의 pH, 주개 상(donor phase)의 pH, 교반속도, 염석효과 등의 실험 요인들을 변화시켜 가면서 최적의 추출 조건들을 확립하였다.

실 험

시약 및 장비

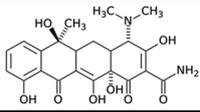
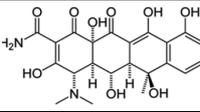
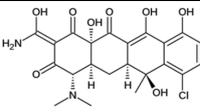
테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린 표준물질은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였으며, 추출 용매로는 1-octanol (Junsei chemicals, Tokyo, Japan), n-amyl alcohol (Shinyo pure chemicals, Osaka, Japan), heptanal (Alfa Aesar, MA, USA)이 사용되었다. 염석효과를 위해 첨가한 염화소듐과 받개 상과 주개 상의 pH 조절을 위해 사용된 염산과 수산화소듐은 대정사(Siheung, Korea) 제품이었으며 0.1 M로 묽혀서 사용하였다. HPLC의 이동상으로 사용된 물과 아세트나이트릴은 J. T. Baker 사(NJ, USA)의 HPLC급 시약이었으며, heptafluorobutyric acid와 formic acid는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 시약을 사용하였다.

분석물질들은 메탄올에 용해시켜서 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 표준 용액으로 만들어 냉장보관 하였으며, 필요에 따라 보관용액을 메탄올로 묽혀서 사용하였다.

속빈 섬유는 polypropylene 재질의 Accurel Q3/2 속빈 섬유(안지름 600 μm , 막두께 200 μm , Wuppertal, Germany)를 사용하였으며, 25 μL 의 미량주사기는 SGE 사의 HPLC용 미량주사기이었다. 분석물질의 평형 시간을 단축시키기 위해 사용되는 시료 교반 장치는 Talboys 사(NJ, USA)의 hot plate & stirrer이었으며, 미량주사기의 고정을 위해 사용되는 11 mm 격막(septum)은 Agilent 사(USA)의 제품이었다. 자석젓개(5 \times 2 mm)는 Bel-Art 사(NJ, USA)의 제품, 소변 시료의 부유물 침전을 위한 원심분리기는 한일사(Korea)의 MF80 기기를 사용하였다. HPLC/UV-Vis은 Rheodyne injector가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1050 series HPLC 시스템을 사용하였다.

분석물질들의 화학 구조 및 성질들은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Chemical structures of tetracycline antibiotics

Structure	Chemical data
	Tetracycline Formula : $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ Molecular mass : 444.435 g/mol pK_a : 3.32 / 7.78 / 9.58
	Oxytetracycline Formula : $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$ Molecular mass : 460.434 g/mol pK_a : 3.22 / 7.46 / 8.94
	Chlortetracycline Formula : $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_8$ Molecular mass : 478.88 g/mol pK_a : 3.33 / 7.55 / 9.33

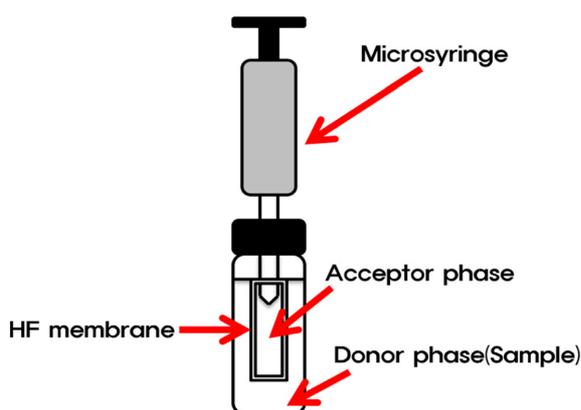


Figure 1. HF-LPME system.

시료 전처리

속빈 섬유를 이용한 시료 전처리 과정은 다음과 같다. 먼저, 4 cm 길이로 절단시킨 속빈 섬유를 고순도 아세톤으로 5분 동안 초음파 세척 후 오븐에 건조시킨다. 25 μ L 미량 주사기에 pH가 조절된 받개 상(정제수)을 채우고, 미량 주사기와 격막을 결합시킨다. 주사기 바늘 끝에 속빈 섬유를 결합시키고, 속빈 섬유를 추출 용매에 20초 동안 담귀서 속빈섬유 멤브레인에 유기용매를 고정시킨다. 보푸라기가 일어나지 않는 종이 티슈로 속빈 섬유에 묻어있는 과량의 유기 용매를 닦아내고, 속빈 섬유의 속빈 공간(lumen)에 받개 상으로 채운다(Fig. 1). 속빈 섬유를 U자형으로 만들어서 시료(주개 상)가 채워진 1.5 mL 바이알에 잠기게 한 후 자석 막대를 사용하여 시료를 700 rpm으로 교반시킨다. 추출 시간이 지난 뒤 조심스럽게 속빈 섬유를 꺼내고 주사기의 플런저를 잡아 당겨서 속빈 섬유의 내부 공간에 있는 받개 상 5 μ L를 취하여 HPLC의 주입구에 주입하여 분석하였다.

기기분석 조건

테트라사이클린류 항생제 3종을 동시분석하기 위해 HPLC에서 사용된 컬럼은 Phenomenex 사(USA)의 C₈ 컬럼으로서 길이는 150 mm, 내경은 3.0 mm, 입자크기는 3 μ m이었다.

이동상은 0.1% formic acid를 첨가한 물과 아세트나이트릴을 사용하였고, 유속은 0.25 mL/min, 주입량은 5 μ L, 컬럼 온도는 25 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 효과적인 분리분석을 위하여 기울기 용리법을 사용하였으며, 초기에 아세트나이트릴을 15%에서 40%로 15분간 올려주었다가 5분간 40%로 유지시킨 뒤, 10분동안 아세트나이트릴을 40%에서 15%으로 낮추었다. 분석물질들은 270 nm의 흡수파장에서 분석하였으며, 기기분석 조건을 Table 2에 요약하였다.

Table 2. HPLC/UV-Vis conditions for analysis of tetracycline antibiotics

Parameters	Conditions				
Column	C ₈ , 150 \times 3 mm, 3 μ m				
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid B : Acetonitrile				
Gradient	Time (min)	0	15	20	30
	B (%)	15	40	40	15
Flow rate	0.25 mL/min				
Injection volume	5 μ L				
Wavelength	270 nm				

결과 및 고찰

실험 인자들의 최적화

3-상 HF-LPME 추출법에서 시료 추출을 위해서는 받개 상을 속빈 섬유의 내부 공간(lumen)에 채운 후 분석물질이 주개 상(시료 용액)으로부터 받개 상으로 추출되기 위해서 받개 상과 주개 상 사이에서 가교 역할을 하는 유기 용매를 속빈 섬유 멤브레인에 고정시켜 주어야 하며, 유기 용매가 속빈 섬유의 멤브레인에 침투하려면 적절한 시간이 필요하다. 이를 위해서 속빈 섬유를 유기 용매에 담귀주어야 하는데, 유기 용매의 담금 시간이 너무 짧은 경우 유기 용매가 속빈 섬유의 멤브레인에 적절히 채워지지 않아서 수용액 상에서 유기 용매 상으로 분석물질의 추출이 감소될 수 있고, 반대로 담금 시간이 길면 과량의 유기 용매가 받개 상이 있는 내부 공간에도 침투하게 되어 추출 후 HPLC에 주입할 때 유기 용매로 인해 컬럼의 정지상에 영향을 주게 되어 컬럼의 수명을 단축시킬 수 있다.

담금 시간을 1~20초까지 변화시켜가면서 유기 용매(heptanal)를 멤브레인에 고정시킨 후에 추출을 수행하였는데 담금 시간 20초에서 가장 높은 추출율을 나타내었다(Fig. 2).

한편, 3상 HF-LPME에서 추출율에 영향을 미치는 요소 들로는 추출용매의 종류, 추출시간, 교반속도, 받개 상의 pH, 주개 상의 pH, 염석효과 등이 있으며 이들 인자들을 변화시켜 줌으로써 실험 조건을 최적화하였다. 추출을 위한 분석물질의 농도는 수용액 시료 내에서 5 μ g/mL이 되도록 소량 첨가하였으며 시료의 부피는 1.5 mL이었다.

추출 결과는 분석물질의 농축인자(enrichment factor, EF)를 구하여 비교하였으며 농축인자를 구하는 식은 다음과 같다.^{6,7}

$$EF = \frac{C_{a,f}}{C_{d,i}} = \frac{n_{a,final} \times V_d}{n_{d,initial} \times V_a} = \frac{R}{100} \times \frac{V_d}{V_a}$$

여기에서 $C_{d,i}$ 는 주개 상에서 분석물질의 처음 농도이고,

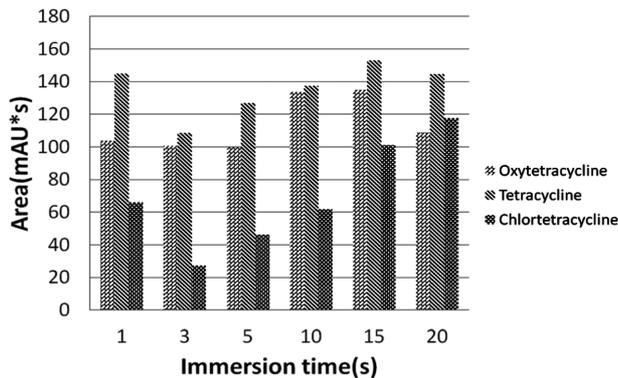


Figure 2. Effect of immersion time.

C_{af} 는 추출된 후에 분석물질의 최종 농도이다. $n_{d,initial}$ 은 주개 상 안에 처음 존재했던 분석물질의 몰 수이고, $n_{d,final}$ 은 받개 상 안에 최종적으로 존재하는 분석물질의 몰 수이다. R 은 추출 회수율이고, V_d 는 주개 상의 부피, V_a 는 받개 상의 부피이다. 높은 농축인자를 얻기 위해서는 주개 상과 받개 상의 부피비(V_d/V_a)가 커야하며, 일반적으로 주개 상은 수 mL 정도이고, 받개 상은 수 μ L 정도가 되어야 한다.

추출 용매

분배계수는 분석물질의 추출 효율에 영향을 주며, 추출 용매에 대한 분배계수가 클수록 분석물질이 수용액 상에서 유기용매 상으로 더 많이 분배되게 된다.⁹ 옥탄올-물 분배계수(K_{ow})는 다음과 같은 식으로 계산된다:

$$K_{ow} = \frac{\text{유기용매상에 용해되어 있는 분석물질의 농도}}{\text{수용액상에 용해되어 있는 분석물질의 농도}}$$

HF-LPME에서 사용되는 추출 용매들은 물에 잘 섞이지 않아야 하고, 속빈 섬유용 멤브레인에 고정성이 잘 되어 있어야 하며, 휘발성이 낮고, 분석물질들을 잘 용해시킬 수 있으며, 분석기기에 적합한 성질을 가지고 있어야 한다.¹⁰⁻¹²

주개 상의 pH는 9.0, 받개 상의 pH는 1.0, 추출 시간은 45분, 교반 속도는 100 rpm인 상태에서 추출 유기 용매로는 1-octanol, n-amyl alcohol, heptanal을 사용하여 추출율을 비교하였다.

1-Octanol의 경우 분배계수는 2.9이고, n-amyl alcohol은 1.3이고, heptanal은 2.8이다. Fig. 3에는 추출 용매에 따른 분석물질의 피크 면적을 보여주고 있는데, 1-octanol과 amyl alcohol에 비해서 heptanal은 2배 이상의 피크 면적을 나타내었으며, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 농축인자는 각각 2.9, 2.0, 3.3을 나타내었다. 따라서, 최적의 추출 용매로는 heptanal을 선정하였다.

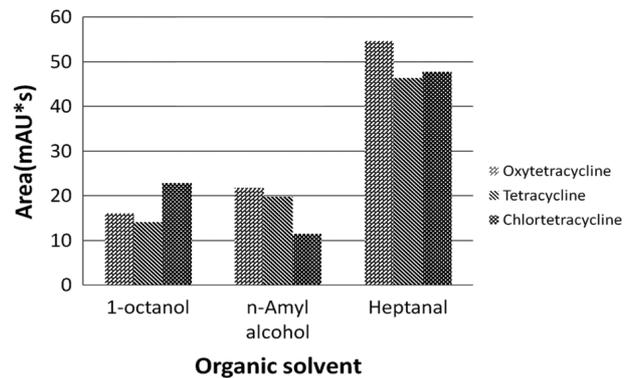


Figure 3. Effect of organic solvents.

추출 시간

주개 상에서 받개 상으로 분석물질이 이동하는 양은 시간에도 의존한다. 일반적으로는 평형에 도달할 때 까지는 시간이 증가할수록 추출량의 증가하지만 추출시간이 너무 오래되면 추출 유기 용매의 손실이 발생하여 추출율이 감소되는 경우도 있다.¹¹⁻¹³

추출시간 선정은 주개 상, 유기 용매, 받개 상 즉 3-상간의 농도 평형이 이루어져서 최대의 추출이 이루어지는 시점을 적정 추출시간으로 정하였으며, 농도 평형 시간을 단축하기 위해서 시료의 교반이 함께 진행되었다.

주개 상의 pH는 9.0, 받개 상의 pH는 1.0, 추출 시간은 45분, 교반 속도는 100 rpm, 추출 용매는 heptanal이었으며, 최적의 추출 시간을 선정하기 위해 20, 40, 60, 80, 100, 120분으로 추출 시간을 변경하면서 추출율을 비교 분석하였다.

시간 경과에 따라서 추출율은 증가하였으며 테트라사이클린을 제외하고는 80분에서 최대 추출율을 보였으며, 그 이후에는 추출율이 감소하였는데 이는 저어주기에 의한 시료의 온도 상승 등에 의한 추출 용매의 손실 때문으로 해석된다. 따라서, 테트라사이클린의 추출율을 고려하여 추출시간을 60분으로 선정하였으며, 옥시테트라사이클린,

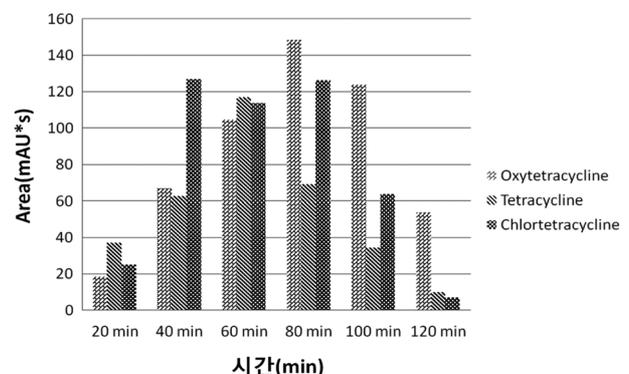


Figure 4. Effect of extraction time.

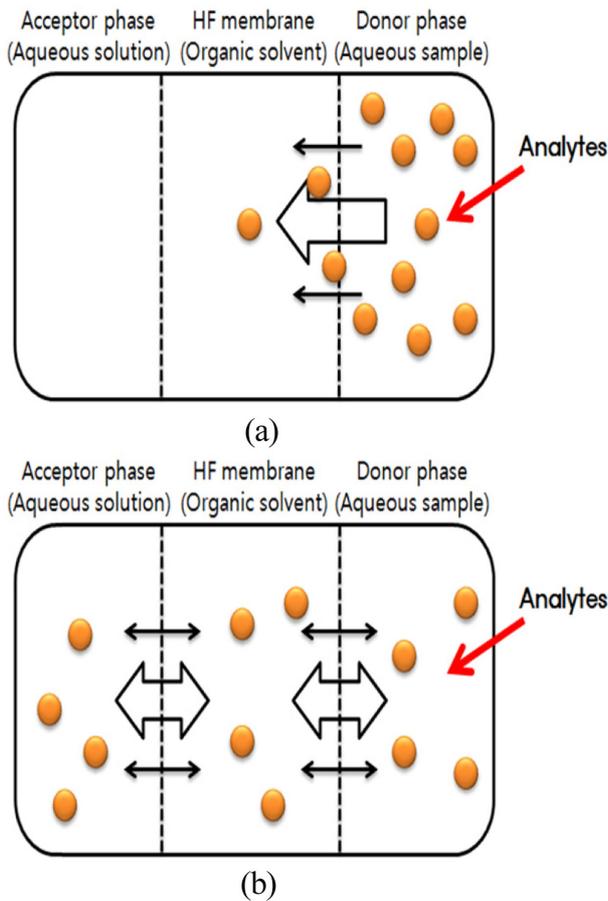


Figure 5. Three phase HF-LPME; (a) Before equilibration, (b) After equilibration.

테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 농축인자는 각각 5.5, 5.2, 7.9를 나타내었다(Fig. 4).

받개 상의 pH

3-상 HF-LPME는 주개 상(수용액)에 녹아있는 분석물질이 속빈 섬유막의 소수성 멤브레인에 고정되어 있는 유기용매를 통과하여 속빈 공간에 있는 받개 상(수용액)으로 추출되는 방법이다(Fig. 5). 이 추출방법은 분석물질이 이온을 띠는 산성 물질 또는 염기성 물질에 유리한 추출방법으로써, 이온성 분석물질이 유기 용매로 고정되어 있는 속빈 섬유막의 막을 통과하기 위해서 주개 상의 pH를 조절하여 분석물질을 비이온화 형태의 화학종으로 만들어 막을 통과하게 한 후에 비이온화 형태로 존재하는 분석물질이 계속해서 받개 상으로 추출되기에 적합하도록 pH가 조절된 받개 상으로 추출되게 하는 방법이다.¹⁴

받개 상(HPLC에 직접 주입이 가능하도록 정제수를 사용)의 최적 pH를 선정하기 위해서 pH를 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14로 변화시켜 가면서 추출하였는데, 이 때 주개 상의 pH는 9.0,

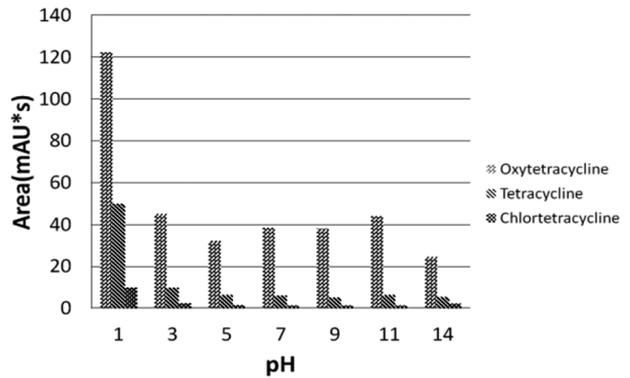


Figure 6. Effect of acceptor phase pH.

추출 시간은 60분, 교반 속도는 100 rpm, 추출 용매는 heptanal 이었다.

받개 상의 적절한 pH 선정은 매우 중요한데, pH를 적절하게 선정하지 못한 경우 받개 상에 용해되어 있던 분석물질이 다시 추출용매를 거쳐 주개 상으로 역추출이 일어나게 되어 추출효율이 감소할 수도 있기 때문이다.¹⁰⁻¹⁵

실험결과 pH 1.0일 때 추출율이 최대임을 알 수 있었으며, 다른 pH에서는 추출율이 현저하게 낮았으며, pH 1.0에서 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 농축인자는 각각 6.0, 1.9, 3.4를 나타내었다(Fig. 6).

주개 상의 pH

본 연구의 분석대상 테트라사이클린류 화합물들은 친수성 물질이며, 수용액 상의 pH에 따라 이온성 혹은 중성 형태를 갖는다. Table 1에서 볼 수 있듯이 분석물질들의 pKa는 3.22~3.33, 7.46~7.78, 8.94~9.58이다. 따라서, 분석물질들은 pH 3 이하에서는 양이온 형태를 갖게 되고 pH가 증가하면 중성상태인 쯤비터 이온(zwitter ion) 형태를 가지다가 pH 8.5 이상에서는 음이온 형태를 갖게 된다.¹ 그러므로, 분석대상의 테트라사이클린류들을 수용액 상으로부터 유기 용매상으로 이동시키기 위해서는 수용액 상(주개 상)의 pH를 증가시켜야 효과적이는데, 이는 주개 상의 pH를 증가시켜 줌으로써 이온성 분석물질들이 유기 용매에 잘 용해되는 중성형으로 변하기 때문이다.

주개 상의 최적 pH를 선정하기 위하여 0.1 M 염산과 0.1 M 수산화 소듐 용액을 사용하여 1~14 까지 pH를 변화시켜서 비교 분석하였다. 옥시테트라사이클린과 테트라사이클린은 pH 5.0에서 추출이 잘되었고 클로르테트라사이클린은 pH 9.0에서 추출율이 양호하였다. 하지만, 다른 화합물들에 비해서 검출 감도가 상대적으로 낮은 클로르테트라사이클린을 효과적으로 분석하기 위해서 주개 상의 최적 pH를 9.0으로 설정하였는데 이 조건에서 옥시테

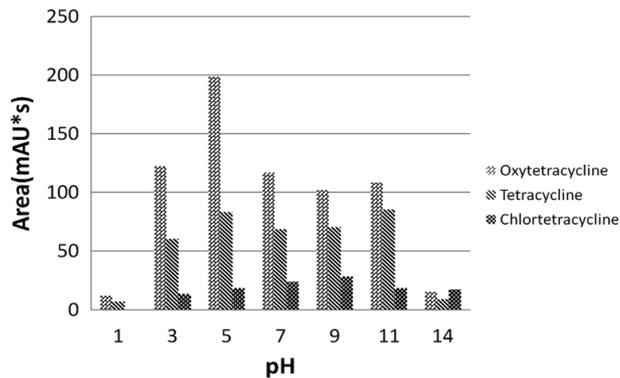


Figure 7. Effect of donor phase pH.

트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 농축인자는 각각 5.2, 3.0, 5.4를 나타내었다(Fig. 7).

교반 속도

교반 속도가 증가할수록 분석물질의 농도 평형에 도달하는 시간이 빨라진다. 하지만 교반 속도가 너무 크면 속빈 섬유 매트릭스에 고정되어 있는 유기 용매가 주계 상으로 흘러나올 수 있어 추출이 제대로 이루어지지 않을 수 있으므로 적절한 교반 속도의 선정이 필요하다.

주계 상의 pH는 9.0, 반계 상의 pH는 1.0, 추출 시간은 60분, 추출 용매는 heptanal이었으며, 최적의 교반속도를 설정하기 위하여 100~1000 rpm까지 교반속도를 변화시켜 분석하였다. 옥시테트라사이클린은 550 rpm에서 가장 높은 추출율을 보였고, 테트라사이클린은 400 rpm, 클로르테트라사이클린은 250 rpm에서 가장 높은 추출율을 나타내었다. 하지만, 700 rpm에서 분석물질들이 고르게 높은 추출율을 나타내었으므로 최적의 교반속도는 700 rpm으로 선정하였으며, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 농축인자는 각각 6.2, 6.7, 28.3이었다(Fig. 8).

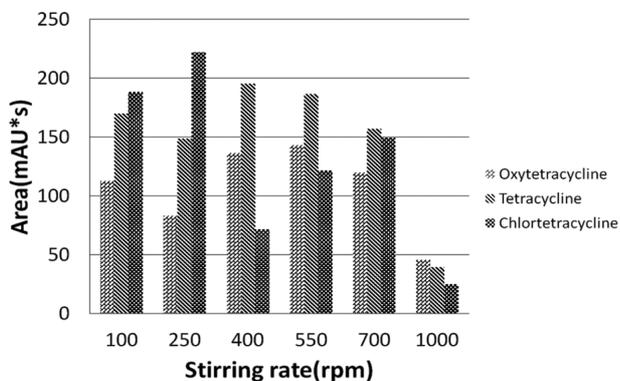


Figure 8. Effect of stirring rate.

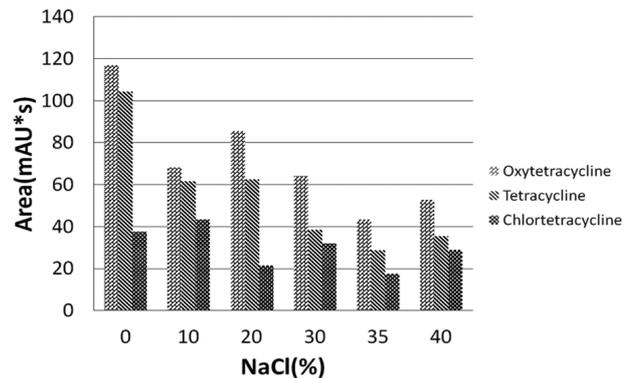


Figure 9. Effect of salting-out with NaCl.

염석효과

염석효과(salting-out effect)는 수용액 상에 염(salt)을 포화시켜줌으로 수용성 시료에 대한 분석물질의 용해도가 감소되고, 대신에 추출 유기 용매에 대한 분석물질의 용해도가 증가하게 되어 추출 효율을 향상 시킬 수 있다.¹⁰⁻¹³

주계 상의 pH는 9.0, 반계 상의 pH는 1.0, 추출 시간은 60분, 추출 용매는 heptanal, 교반 속도는 700 rpm 이었으며, 시료 중에서 염화소듐의 농도가 0~40%가 되도록 첨가하여 추출을 비교 실험을 수행하였다.

옥시테트라사이클린과 테트라사이클린은 염화소듐을 첨가하지 않았을 때 가장 추출이 잘 되었고, 클로르테트라사이클린의 경우는 염화소듐의 농도가 10%일 때 추출율이 가장 높았다(Fig. 9). 따라서, 염화소듐을 첨가하지 않았을 경우를 최적의 추출 조건으로 설정하였다.

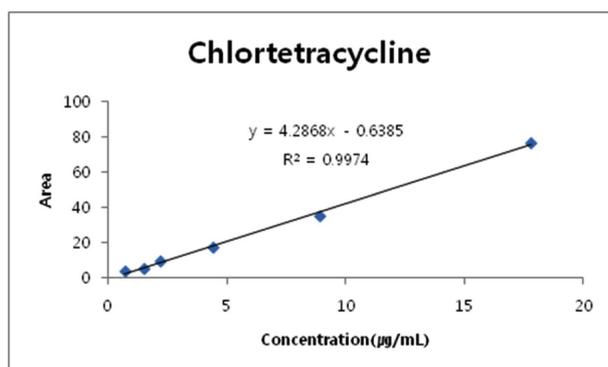
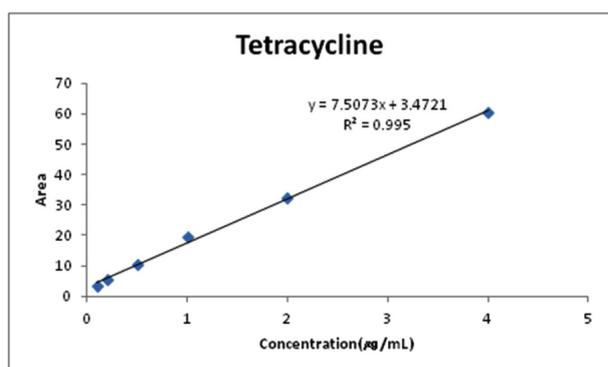
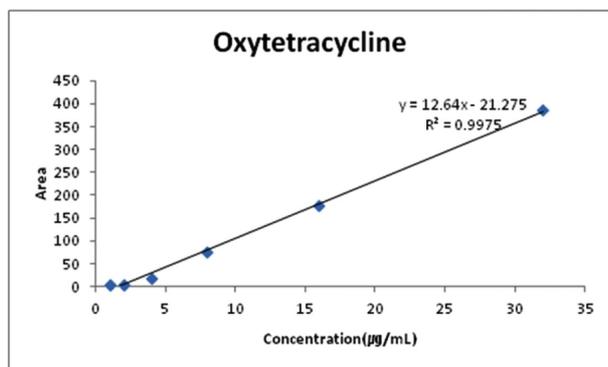
유효성 검증

소변 시료 중에서 테트라사이클린들의 농도가 2.5 µg/mL가 되도록 소량 첨가 해주어 동일한 조건으로 7번 반복 측정하여 표준편차(σ)를 구하였다. 동일한 방법으로 소변 시료에 테트라사이클린 표준물질의 농도가 12.5 µg/mL가 되도록 소량 첨가하여 5번 반복 측정하였다. 이를 바탕으로 검정곡선을 작성하였고 검정곡선의 기울기(m)를 이용하여 검출한계(LOD)는 $3\sigma/m$, 정량한계(LOQ)는 $10\sigma/m$ 으로 이론적인 검출한계와 정량한계를 구하였다. 계산치를 바탕으로 검출한계는 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)가 3 이상이 되는 농도로 정하였고, 정량한계는 신호 대 잡음비가 10 이상이며 상대 표준편차(R.S.D)가 20% 이내인 농도를 정하였다. 실험결과 검출한계와 정량한계는 각각 0.08~0.8 µg/mL와 0.4~1.6 µg/mL 이었다(Table 3).

기존의 LLE 방법으로 소변에서 테트라사이클린 항생제 분석한 논문에서는¹ 검출한계가 1~1.5 µg/mL을 나타내었는데 본 연구에서 확립한 HF-LPME 방법은 더 낮은

Table 3. LOD and LOQ for determination of tetracyclines from urine

Compounds	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Oxytetracycline	0.8	1.4
Tetracycline	0.08	0.4
Chlortetracycline	0.7	1.6

**Figure 10.** Calibration curves for the determination of tetracyclines by HF-LPME.**Table 4.** Working range, linear equation and correlation coefficient for tetracyclines from urine

Compounds	Working range ($\mu\text{g/mL}$)	Linear equation	R^2
Oxytetracycline	1 ~ 32	$y = 12.64x - 21.275$	0.997
Tetracycline	0.1 ~ 4	$y = 7.5073x + 3.4721$	0.995
Chlortetracycline	0.7 ~ 17.8	$y = 4.2868x - 0.6385$	0.997

Table 5. Accuracy and precision for analysis of tetracyclines from urine

Compounds	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy* (n=3)	R.S.D (%) (n=3)
Oxytetracycline	1	114	4.6
	2	105	6.1
	4	95	3.9
	8	97	6.8
	16	98	2.3
	32	100	9.1
Tetracycline	0.1	86	1.5
	0.2	118	4.0
	0.5	84	6.8
	1	116	7.0
	2	92	3.3
	4	89	1.3
Chlortetracycline	0.7	115	3.1
	1.5	93	3.2
	2.2	107	4.1
	4.4	97	2.8
	8.9	93	1.8
	17.8	101	2.4

*Accuracy: (measured value / calculated value) \times 100

농도도 검출이 가능하였다.

검정곡선의 농도범위는 분석물질들의 정량한계에 따라 다르게 작성되었는데, 배양 소변에서 농도 범위가 0.1~32 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 표준물질들을 소량 첨가하여 검정곡선을 작성하였으며, 상관계수(R^2)는 0.995 이상의 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 10, Table 4).

정밀도 실험은 작업구간내의 6개 농도에서 동일 농도에 대해서 3회씩 실시하였으며, 상대표준편차가 1.3~9.1%로써 양호한 정밀도를 나타내었다(Table 5). 정확도는 상대회수율(relative recovery)로 나타내었는데, 직선식을 통해서 구한 실험값의 평균을 소변 시료에 소량첨가한 이론값으로 나눈 후 100을 곱하여 나타내었고, 84~118%의 상대회수율을 보여 주었다(Table 5).

결론

소변 시료 중에 함유된 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린의 동시분석을 위한 3-상

HF-LPME 시료 전처리 방법을 확립하였으며, HPLC/UV-Vis를 이용하여 효과적으로 분리 분석하였다.

테트라사이클린류 항생제 분석을 위한 3-상 HF-LPME 최적의 조건으로서 추출 용매는 heptanal, 추출 시간은 60 분, 주개 상의 pH는 9.0, 받개 상의 pH는 1.0, 교반 속도는 700 rpm, 추출 용매 담금시간은 20초가 선정되었다.

소변 속에서 잔류하는 테트라사이클린류 항생제의 검출한계와 정량한계는 각각 0.08~0.8 µg/mL와 0.4~1.6 µg/mL 이었다. 상대회수율은 84~118%로써 좋은 정확도를 가졌으며, 1.3~9.1%의 양호한 정밀도를 나타내었다. 검정곡선은 0.1~32 µg/mL 범위에서 작성되었으며, 상관계수(R²)는 0.995 이상으로서 양호한 직선성을 나타내었다.

본 연구를 통하여 확립된 3-상 HF-LPME에 의한 테트라사이클린류 항생제 분석법은 기존의 LLE 방법이나 SPE 방법에 비하여 간편하고, 경제적이며, 유기 용매 사용량을 획기적으로 줄여 친환경적인 분석 방법으로써 수용액 환경시료나 생체 시료 중에 잔류하는 유기화합물들을 분석하는데도 이용될 수 있을 것이다. 또한, 최소한의 추출 도구만을 필요하므로 장소의 제약 없이 환경, 화학 무기 등 현장(on-site)에서도 복잡한 시료 전처리 과정을 거치지 않고 쉽게 크로마토그래피 분석을 위한 시료 전처리 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Shariati, S.; Yamini, Y.; Esrafil, A. *J. Chromatogr., B.* **2009**, *877*, 393.
- Chopra, I.; Roberts, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 232.
- Cooper, A. D.; Stubbings, G. W. F.; Kelly, M.; Tarbin, J. A.; Farrington, W. H. H.; Shearer, G. *J. Chromatogr., A.* **1998**, *812*, 321.
- Jin, H.; Kumar, A.; Paik, D.; Ha, K.; Yoo, Y.; Lee, Y. *Microchem. J.* **2010**, *94*, 139.
- Bello-López, M. A.; Ramos-Payána, M.; Ocaña-González, J. A.; Fernández-Torres, R.; Callejón-Mochón, M. *Anal. Lett.* **2012**, *45*, 804.
- Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. *TrAC- Trend. Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1.
- Wang, C.; Li, C.; Zang, X.; Han, D.; Liu, Z.; Wang, Z. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1143*, 270.
- Rasmussen, K. E.; Padersen-Bjergaard, S. *TrAC- Trend. Anal. Chem.* **2004**, *23*, 1.
- Jonsson, J. A.; Mathiasson, L. *J. Chromatogr., A.* **2000**, *902*, 205.
- Psillakis, E.; Kalogerakis, N. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2003**, *22*, 565.
- Yang, Y.; Chen, J.; Shi, Y. P. *J. Chromatogr., B.* **2010**, *878*, 2813.
- Villar-Navarro, M.; Ramos-Payan, M.; Perez-Bernal, J. J.; Fennandez-Torres, R.; Callejon-Mochon, M.; Bello-Lopez, M. A. *Talanta* **2012**, *99*, 56.
- Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. *J. Biochem. Bioph. Meth.* **2007**, *70*, 200.
- Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1184*, 135.
- Desoubries, C.; Hugon, F. C.; Bossee, A.; Pichon, V. *J. Chromatogr., B.* **2012**, *900*, 50.