

## 잉어의 생체 내 대사체 변화에 미치는 플록세틴 영향규명 연구

정인영<sup>1,†</sup> · 박유미<sup>1</sup> · 김상민<sup>1</sup> · 김일규<sup>1</sup> · 도영선<sup>1</sup> · 김석만<sup>2</sup> · 한상범<sup>3</sup> · 조현덕<sup>3</sup> · 석광설<sup>1</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원 화학물질연구과, <sup>2</sup>부산대학교 화학과, <sup>3</sup>중앙대학교 약학대학

### A Study of the Adverse Effects of Fluoxetine on *Cyprinus carpio* Metabolomics

In-Young Chung<sup>1,†</sup>, Yu-Mi Park<sup>1</sup>, Sang-Min Kim<sup>1</sup>, Il-Gyu Kim<sup>1</sup>, Young-Sun Do<sup>1</sup>,  
Suhkmann Kim<sup>2</sup>, Sang Beom Han<sup>3</sup>, Hyun-Deok Cho<sup>3</sup>, and Kwang-Seol Seok<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemical Research Division Environmental Health Research Department,  
National Institute of Environmental Research, Incheon, 22689, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Pusan National University, Busan, 46241, Korea

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 06974, Korea

Received December 28, 2016/Revised February 23, 2017/Accepted March 7, 2017

The purpose of this study was to clarify the effect of fluoxetine, one of the most frequently prescribed anti-depressant drugs, on *Cyprinus carpio* by comparing the variations in its metabolite concentrations after exposure to the drug, using NMR and LC/Orbitrap MS. Three experimental reactors were employed, and the total experimental period was 14 days. *Cyprinus carpio* were acclimatized for 3 months in the laboratory and then subjected to the study. One reactor was used as a 14-day control, and the others were exposed to fluoxetine at 10 ng/L and 10 µg/L for 7 days and deplete for 7 days. The variations in metabolite concentration after exposure were analyzed by NMR and LC/Orbitrap MS. Before exposure, the concentration trends of fluoxetine and its main metabolite, norfluoxetine were almost the same in blood and liver samples of *Cyprinus carpio*. However, after the depuration period, the concentrations of norfluoxetine in the liver and blood samples were higher than those of fluoxetine. The concentration of the remaining norfluoxetine in the liver sample was higher than that in the blood sample. This means that the liver mainly metabolized pharmaceuticals. The main change in the concentrations of metabolites of *Cyprinus carpio* was shown in amino acids such as leucine, isoleucine, glutamate, tyrosine, and valine; organic acids such as acetate and formate; creatine; and glucose. Although after the depuration period, the control, and 10 ng/L and 10 µg/L exposure groups had overlapping results, the exposure and control groups could be classified clearly after 14 days. These results are expected to contribute to identifying the effects of environmental pollutants by tracing metabolite changes and building a chemical metabolite database.

**Key words:** Fluoxetine, Norfluoxetine, *Cyprinus Carpio*, Metabolite, Metabolomics

### 1. 서 론

중금속이나 내분비계장애물질과 같이 널리 알려져 있는 환경 중 독성물질 외에도 의약품에 대한 환경오염 및 위해성이 새로이 대두되고 있다. 의약품 소비량의 증가와 더불어 환경 중으로 배출되는 의약품의 양도

증가하고 있는데, 본 연구에서의 대상물질인 항우울제로 사용되는 플록세틴(fluoxetine) 역시 널리 사용되는 의약품 중 하나이다. 플록세틴을 포함한 의약품들과 그 대사체들은 주로 폐수처리장을 통해 수생태계로 지속적으로 유입된다는 보고가 있다.<sup>1)</sup> 또한 플록세틴은 무척추동물의 성장과 생식에 상호 작용을 하며, 시험

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

생물종에 따라 약 10 µg/L의 농도에 노출되어도 유의한 영향을 받을 수 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>2)</sup> 플록세틴의 대사체인 노르플록세틴(norfluoxetine)은 수생생물에 잠재적인 위해성을 나타내고 있으며, 플록세틴보다 수생생물에 대해 더 높은 위해성을 보일 수 있기 때문에 대사체로서의 노르플록세틴에 대한 모니터링 연구도 필요하다.<sup>3)</sup> 한편, 송사리를 이용한 플록세틴의 독성시험에서 반수치사농도(96-h LC<sub>50</sub>)는 pH 7, 8, 9에서 각각 5.5, 1.3, 0.2 mg/L로 보고되었다.<sup>4)</sup> 유기물질의 생물축적은 pH가 중성일 때 증가하게 되고 독성시험 반수치사 농도가 중성에서 염기(pH 7→9)로 변할수록 낮아진다는 보고가 있다.<sup>5)</sup> 플록세틴은 미국의 경우 하천에서 약 12 ng/L 수준으로 검출된 바 있으며, 스페인의 하천에서는 0.6~66.1 ng/L의 범위를 보여 하천수 중 수 ng/L 수준으로 존재하는 것으로 추정되는 물질이다.<sup>6)</sup> 플록세틴은 pH 2.0, 7.0, 11.0일 때 Log K<sub>ow</sub>가 1.25, 1.57, 4.30이고, 노르플록세틴은 pH 2.0, 7.0, 11.0일 때 Log K<sub>ow</sub>가 0.97, 2.05, 4.06으로 노출실험에 사용될 수 있는 수용성의 특성을 가지며,<sup>7)</sup> 내분비계장애물질처럼 생물농축성이 크고, 노르플록세틴은 주요한 대사체로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 이와 같은 특성을 고려할 때 환경으로 유입된 플록세틴으로 인한 건강 및 환경영향을 규명하고 생체 대사체 변화를 추적하여 플록세틴의 장기간 노출에 의해 야기 될 수 있는 잠재적인 영향을 사전에 파악할 필요가 있다. 특히, 국제적으로 생물종의 대사체 변화를 토대로 환경오염물질에 의한 생체영향 추적의 필요성이 증폭되고 있음에도 불구하고 국내에서의 관련 연구는 극히 미미한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 대사과정의 산물로 발생하는 대사체를 핵자기공명분광기, 질량분석기 등으로 추적함으로써 환경독성학적 측면에서 의약물질의 대사체 연구 기반을 구축하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 어류에 대한 시험물질 노출

시험물질은 플록세틴 염산염(fluxetine hydrochloride, UPS Reference Materials, U.S. Pharmacopeia)을 이용하였다. 시험물질을 정제수에 용해시켜 10 mg/L 농도의 표준원액을 조제하였으며, 유수식 노출시스템에 적합하도록 사육수로 희석하여 시험농도를 설정하였다. 노출시험 전에 잉어는 인공부화장에서 부화되어

자연채광 사육실에서 3개월 동안 관리되었으며, 노출시험을 위해 잉어 가운데 전장이 7~8 cm인 개체를 사용하였다. 사육수(희석수)는 활성탄 여과, 한의 여과 후 자외선 살균 처리한 수돗물을 사용하였으며, 수온 23±0.5°C, pH 7~8 조건으로 하고 산소농도는 폭기를 통해 일정 수준을 유지하였다. 시험기간 동안 광주기는 16h(명): 8h(암)으로 유지하였으며, 먹이는 타비아(Tabia, 천하제일, 한국)를 매일 2회(오전, 오후) 체중의 1%씩 공급하였다.

노출농도는 잉어에 대한 예비시험으로서 수행한 급성독성시험에서 도출된 값과 환경 중 농도 등을 참고하여 설정하였다. 노출농도는 대조군 및 2개의 시험군을 각각 10 ng/L과 10 µg/L로 설정하였다. 노출방식은 자동연속노출시스템(Shibata, 일본)을 이용한 유수식 노출시험을 통해 실시였다. 50 L 용량의 사각 유리수조를 이용하여 대조군 및 시험군별로 각각 잉어 15마리를 2개의 반복군으로 나누어 노출하였다. 우선적으로 5 L 시험물질 농축액을 제조한 후 매 400초마다 10 mL의 플록세틴이 들어있는 시약수와 90 mL의 사육수가 혼합조에서 자동으로 희석되도록 하여 시험 수조에 40 L 용량이 채워지도록 조정하였다. 시험 기간은 7일 동안 노출하였으며, 8일째부터 정상적인 사육수가 담긴 수조로 옮긴 후 14일째 시험을 종료하였다.

시험 종료 후 모든 개체는 혈장 내 물질 분석을 위해 바로 미부정맥(잉어의 꼬리부분)에서 채혈을 실시하였다. 채혈 시료를 1.5 mL 원심분리관에 옮겨 담은 직후, 10,000 G(중력가속도), 4°C에서 2분 동안 원심분리하였으며, 상층액은 분석을 위해 초저온 냉동고에 보관하였다. 한편, 생체 조직에 축적된 물질을 분석하고자 간을 절취하여 무게를 측정 후, 분석 전까지 초저온 냉동고에 보관하였으며, 시험용액의 농도 분석을 위해 매일 시험 수조에서 1 L씩 채수하여 냉장보관하였다.

### 2.2. 생체시료의 분해산물 및 대사체 변화분석

#### 2.2.1. 대상물질의 특성

플록세틴과 노르플록세틴의 화학구조를 Fig. 1에 각각 나타내었다. 플록세틴이 체내에서 대사되어 생성된 대사체(노르플록세틴) 또한 항우울 작용을 나타내는 활성성분으로 알려져 있다.<sup>6,8-11)</sup>

노출기간별(0, 1, 3, 5, 7, 7.5, 8, 10, 14일), 농도별(0, 10 ng/L, 10 µg/L)로 잉어(7~8 cm)를 사육한 물 시료 및 잉어에서 분리한 혈장, 간 시료에 대하여 플록

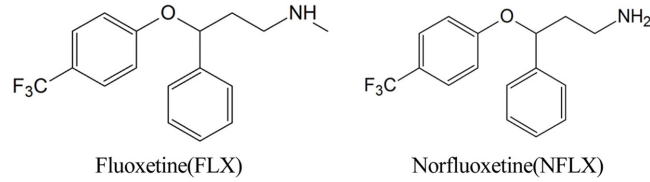


Fig. 1. Chemical structure of fluoxetine and norfluoxetine.

Table 1. Chemical profiles of analytical materials

Compounds	Elemental composition	Theoretical mass	Mass error
Fluoxetine	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO [M+H] <sup>+</sup>	310.1413	모든 시료에서 5 ppm 이내로 검출
Norfluoxetine	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO [M+H] <sup>+</sup>	296.1257	
Fluoxetine-d <sub>5</sub> (Internal standard)	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> D <sub>5</sub> F <sub>3</sub> NO [M+H] <sup>+</sup>	315.1727	

세틴, 노르플록세틴 및 플록세틴-d<sub>5</sub>를 분석하였다. 분석 대상성분 및 내부표준물질의 이온화 후 화학구조식 (Elemental composition)과 이온화 후 이론적인 m/z값 (Theoretical mass)을 Table 1에 나타내었다.

### 2.2.2. 생체 및 물시료 전처리 및 분석

잉어혈장은 시료 20 µL를 1.5 mL 마이크로원심분리관 (effendorf tube)에 취한 후, 메탄올 200 µL를 가하고 15분간 혼합하였다. 동 혼합액을 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 상층액을 새로운 1.5 mL 마이크로원심분리관에 취하였다. 동 용액에 5% 포름산 300 µL를 가하고 1분간 혼합한 후 혼합모드 양이온교환 고체상추출 카트리지 (Oasis MCX, Waters, Milford, MA, USA)를 메탄올 2 mL, 5% 포름산 (water) 2 mL로 활성화 시킨 후 추출하였다. 플록세틴과 노르플록세틴은 염기성 작용기를 가지고 있고, MCX (mixed mode cation exchange) 흡착제는 염기성 화합물 흡착에 대한 우수성을 가지고 있기 때문에 고체상 추출 카트리지는 MCX 카트리지를 사용하였다.<sup>11,12)</sup> 5% 포름산 (water) 2 mL과 메탄올 2 mL로 세척한 뒤 10분간 감압을 걸어 건조하고, 5% 수산화암모늄 (methanol) 용액 1 mL로 3회 (총 3 mL) 용리하였다. 이를 45°C 질소 기류 하에서 건조한 뒤 내부표준물질 용액 (10 ng/mL의 플록세틴-d<sub>5</sub>, methanol) 200 µL를 가하여 재분산하였다. 이를 실린지필터 (0.2 µm)로 여과한 뒤 5 µL를 액체크로마토그래피/오비트랩질량분석기에 주입하였다. 잉어의 간 조직은 약 10 mg을 정밀히 달아 1.5 mL 마이크로원심분리관에 취하였다. 트리스 완충용액 (Tris buffer solution) 100 µL로 재현탁시킨 후, 얼음에 넣

었다. 20초간 초음파 추출하고 메탄올 400 µL를 가한 후 10분간 혼합하였다. 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 1.5 mL 마이크로원심분리관에 취하였다. 5% 포름산 600 µL를 가하고 1분간 혼합하였다. 이를 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 취해 추출액으로 하였다. MCX 카트리지를 메탄올 2 mL, 5% 포름산 (water) 2 mL로 활성화 시킨 후 여기에 추출액을 적재하였다. 5% 포름산 (water) 2 mL, 메탄올 2 mL로 세척한 뒤, 10분간 감압을 걸어 건조하고, 5% 수산화암모늄 (methanol) 용액 1 mL로 3회 (총 3 mL) 전개하였다. 이를 45°C 질소 기류 하에서 건조한 뒤 내부표준물질 용액 (10 ng/mL의 플록세틴-d<sub>5</sub>, methanol) 200 µL를 가하여 재분산하였다. 이후 실린지필터 (0.2 µm)로 여과한 뒤 5 µL를 액체크로마토그래피/오비트랩질량분석기에 주입하였다. 분석방법의 정확도를 확인하기 위해 별도로 blank matrix를 동일한 방법으로 전처리한 후 표준물질을 가한 대조시료를 비교하여 회수율을 평가하였다. 회수율은 blank matrix에 표준물질을 가한 후 확립된 전처리 과정으로 추출한 검체시료와, 분석을 위해 아센티스 익스프레스 (Ascentis Express) C<sub>18</sub> 컬럼 (직경 2.1 mm × 길이 100 mm, 입자크기 2.7 µm)을 사용하였고, 이동상은 0.1% 포름산 (water), 메탄올 (methanol)을 사용하였다. 메탄올 용액 비율을 10%를 시작으로 4분 동안 100%로 올린 후, 7분까지 100%를 유지시킨다. 그 후 7.1분까지 초기조건인 10%로 내려서 12분까지 안정화를 시키는 기울기 용리 (gradient) 방법으로 분석하였다. 이동상 유속은 0.3 mL/min, 컬럼온도는 30°C 하에서 주입량은 5 µL로 하였다. 물 (사육수) 시료는 여과지 (0.45

**Table 2.** Analytical conditions for Orbitrap MS

Orbitrap MS	Condition
Ionization method	Electrospray Ionization(ESI)
Detect method	Positive ion mode, full scan mode (resolution 70,000, scan range 250-750 m/z), MS/MS at normalized collision energy(NCE) 35.0
Total run time	12 min
Spray voltage(kV)	4.0
Sheath gas flow rate	40
Aux gas flow rate	10
Heater temperature	220°C
Capillary temperature	350°C
Data processor	Xcalibur (Ver. 2.2)

μm)로 여과한 후, 200 mL 볼륨플라스크에 취하였다. 이 용액에 포름산 4 mL를 가하고 5분간 혼합하였다. MCX 카트리지를 메탄올 2 mL, 5% 포름산(water) 2 mL로 활성화시킨 후, 여기에 물 시료 200 mL를 적재하였다. 5% 포름산(water) 2 mL, 메탄올 2 mL로 세척한 뒤, 10분간 감압을 걸어 건조하고, 5% 수산화암모늄(methanol) 1 mL로 4회(총 4 mL) 용리하였다. 이를 45°C 질소 기류 하에서 건조한 뒤 내부표준물질 용액(플록세틴-d<sub>5</sub>, methanol) 500 μL를 가하여 재분산하였다. 이를 실린지필터(0.2 μm)로 여과한 뒤 주입량은 5 μL로 하였다. 오비트랩 질량분석기의 조건은 Table 2와 같다.

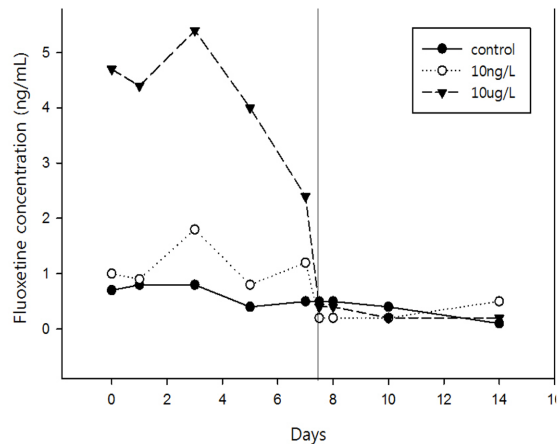
2.2.3. 잉어의 대사체 분석 및 데이터 통계 처리

노출기간별(0, 1, 3, 5, 7, 7.5, 8, 10, 14일) 및 농도별(0, 10 ng/L, 10 μg/L)로 잉어(7~8 cm)에서 분리한 혈장 및 간 시료에 대하여 핵자기공명분광기를 이용하여 대사체를 분석하였다. 동결건조시킨 5 mg의 간 시료에 중수(D<sub>2</sub>O) 20 μL를 첨가한 후, 10분간 4°C에서 팽윤시킨 다음 남은 중수를 모두 핵자기공명분광기 나노관(nano tube)으로 옮겼다. 중수 20 μL와 기준물질로 사용되는 3-트리메틸실릴-2,2,3,3-4 중수소 프로피온산 나트륨(TSP, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt) 20 mM이 포함된 중수 5 μL를 핵자기공명분광기 나노관 속 시료에 첨가하였다. 한편, 혈장시료는 동결건조된 혈장 시료 전체에 중수 40 μL를 첨가한 후, 10분간 4°C에서 혈장시료를 녹인 다음 기준물질 TSP 20 mM이 포함된 중수 5 μL를 첨가하였다. 준비된 시료 전체는 핵자기공명분광기 나노관으로 옮겨 분석하였다. 분석결과는 SIMCA P<sup>+</sup> 12.0 (Umetrics, Sweden) 소프트웨어를 이용하여 통계 처리하였다.

3. 연구결과 및 고찰

3.1. 플록세틴 및 대사체 분석

플록세틴과 노르플록세틴을 정성, 정량 분석하기 위해 바탕시료(사육수)와 사육수에 표준물질을 첨가한 시료를 액체크로마토그래피 오비트랩질량분석기로 분석하였다. 내부표준물질은 플록세틴-d<sub>5</sub>를 사용하였다. 물시료 중 플록세틴과 노르플록세틴의 정량한계는 모두 0.5 ng/L로 분석되었으며 저농도 고농도 범위에서의 물시료 중 플록세틴의 정확도는 92.6~113.7%, 노르플록세틴의 정확도는 84.2~112.9%로 나타났다. 대조군에서의 사육수 및 플록세틴을 각각 10 ng/L, 10 μg/L로 7일간 잉어에 노출시킨 후 8~14일까지 정화된 사육수를 공급한 시험군에서의 플록세틴 농도를 Fig. 2에 나타내었다. 또한 플록세틴에 노출시킨 잉어에 의해 생성된 대사체인 노르플록세틴의 농도 변화를 Fig. 3에 나타내었다.



**Fig. 2.** Variations in fluoxetine concentration in water.

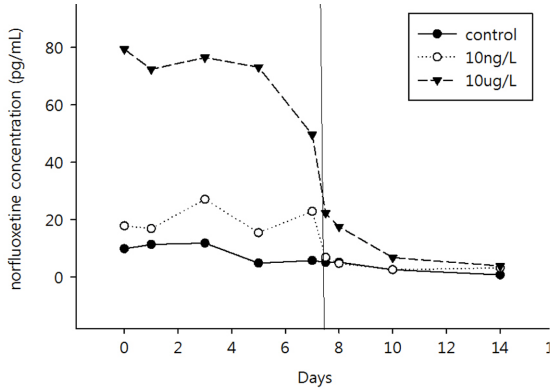


Fig. 3. Variations in norfluoxetine concentration in water.

대조군 사육수에서 14일간 플록세틴 농도는 평균 0.5 ng/L, 0.1~0.8 ng/mL의 범위를 나타내었다. 사육수 시료와 동일한 전처리 과정을 적용하여 정제수를 분석하였지만 플록세틴과 노르플록세틴이 검출되지 않았고, 이를 통해 전처리 및 분석과정에서의 오염 가능성은 매우 희박함을 알 수 있었다. 물고기 사료로 인한 플록세틴의 혼입여부를 확인하고자 사료도 분석하였으나, 플록세틴 및 노르플록세틴은 검출되지 않았다. 플록세틴의 96-h LC<sub>50</sub>은 pH 7에서 5,500 ng/mL로<sup>4)</sup> 노출실험에 미치는 농도의 영향은 미미한 것으로 사료되었다. 10 ng/L, 10 µg/L의 플록세틴이 노출된 시험군 용액에서는 7일까지 각각 평균 1.1 ng/mL, 4.2 ng/mL를 보이다가 노출이 완료된 후인 8일부터 14일까지는 두 시험군에서의 농도가 모두 평균 0.3 ng/mL로 대조군과 같은 농도 범위를 나타내었다. 플록세틴의 대사체인 노르플록세틴은 대조군에서 평균 6.3 pg/mL, 0.7~11.8 pg/mL의 범위를 나타내었다. 한편, 10 ng/L, 10 µg/L의 플록세틴이 노출된 시험용액에서는 7일까지 각각 평균 20 pg/mL, 70 pg/mL를 나타내었다가 노출이 완료된 후인 8일부터 14일까지는 두 시험군에서 각각 평균 3.4 pg/mL, 9.3 pg/mL를 나타내었다. 플록세틴의 노출 농도가 높을수록 주요 대사체인 노르플록세틴이 많이 생성되었으며 이미 생성된 노르플록세틴은 노출이 끝난 후에 점차로 감소되었다.

### 3.2. 잉어의 혈장 및 간 중 플록세틴 및 대사체 변화

잉어 바탕 혈장 시료(fish plasma) 양에 대한 적정성을 검토하고자, 사람의 혈장시료(human plasma)와의 유의성을 확인한 결과 플록세틴의 경우 잉어 혈장에서

79.2~84.9%, 사람의 혈장에서 80.1~84.5%의 회수율을 나타냈다. 노르플록세틴의 경우는 잉어 혈장에서 78.1~84.6%, 사람 혈장에서 77.0~97.3%의 양호한 회수율을 나타냈다. 물질에 의한 이온화 억제효과(ion suppression) 또는 이온화 증강효과(enhancement) 정도는 회수율 시험 결과를 이용하여 평가하였다. 이를 위해 3개의 농도(20, 50, 200 ng/mL)에서 수행하였으며, 바탕물질을 전처리한 후 표준용액으로 재분산한 시료와 표준용액 간의 백분율로서 물질효과를 산출하였다. 3개 농도의 평균값으로 비교한 결과 플록세틴은 잉어 혈장에서 85.8~95.5%, 사람 혈장에서 83.6~96.8%로 각각 9.2%, 9.0% 수준의 이온화 억제효과가 있었고, 노르플록세틴의 경우 잉어 혈장에서 80.1~96.1%, 사람 혈장에서 79.9~106.1%로 각각 13.1, 8.5% 수준의 이온화 억제효과가 있었다. 즉, 두 종류의 물질에서 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 대조군 잉어의 혈장 시료에서 측정된 플록세틴 농도와 시험군 잉어(10 ng/L, 10 µg/L 노출) 혈장 시료에서 측정된 플록세틴과 노르플록세틴 농도변화를 Fig. 4에 나타내었다. 또한 플록세틴에 노출시킨 잉어 혈장에서의 대조군인 사육수에서 14일간 노출한 잉어 혈장에서의 플록세틴 농도는 평균 19.0 ng/mL, 6.7~35.9 ng/mL의 범위를 나타냈다. 반면 10 ng/L, 10 µg/L의 플록세틴에 7일간 노출된 잉어 혈장에서의 플록세틴 농도는 각각 평균 79.5 ng/mL, 306.4 ng/mL를 나타내었으며, 이후 노출이 완료된 후(8일째)부터 14일까지는 각각 평균 24.1 ng/mL, 94.5 ng/mL로 농도가 감소하였다. 이때 10 ng/L에 노출된 잉어 혈장에서의 플록세틴 농도는 대조군과 비교해 유사하였으나, 10 µg/L에 노출된 잉어 혈장에서의 플록세틴 농도는 대조군보다 높게 나타났다(Fig. 4). 노르플록세틴은 대조군에서 평균 9.9 pg/mL, 3.5~16.2 pg/mL의 범위를 나타내었으며, 시험군인 10 ng/L, 10 µg/L의 플록세틴에 7일간 노출된 잉어의 혈장 중 노르플록세틴 농도는 각각 평균 33.4 pg/mL, 77.7 pg/mL를 나타내었다. 한편, 노출이 완료된 후인 8일부터 14일까지는 두 시험군에서 각각 평균 25.5 pg/mL, 98.0 pg/mL를 나타내었다.

대조군에서 14일 동안 노출시킨 잉어 간 시료에서의 플록세틴 농도와 플록세틴을 각각 10 ng/L, 10 µg/L로 7일간 잉어에 노출시킨 후 8~14일까지 정화된 사육수를 공급한 시험군 잉어의 간 시료 중 플록세틴 농도는 Fig. 5에 나타내었다. 또한 플록세틴에 노출시킨 잉어의 간 중 생성된 대사체 노르플록세틴의 농도변화를 Fig.

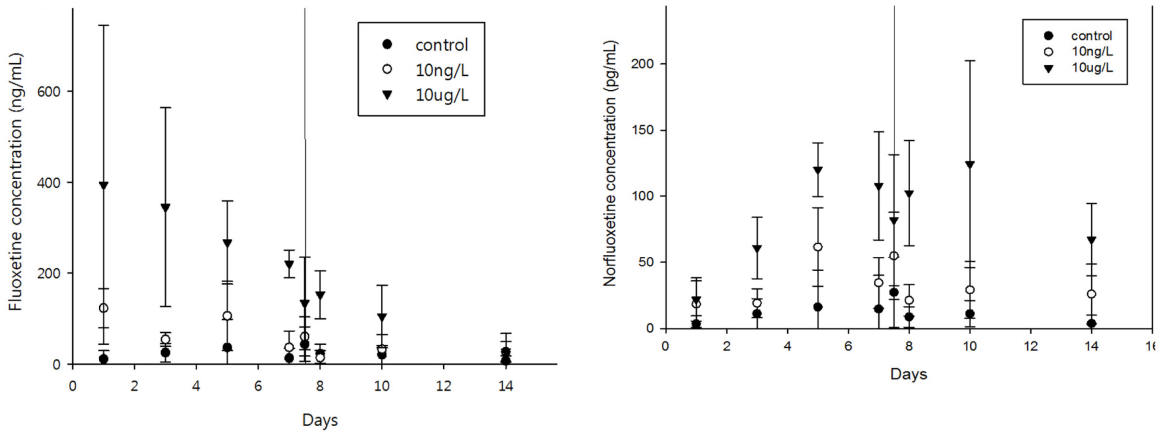


Fig. 4. Variations in fluoxetine and norfluoxetine concentration in *Cyprinus carpio* blood.

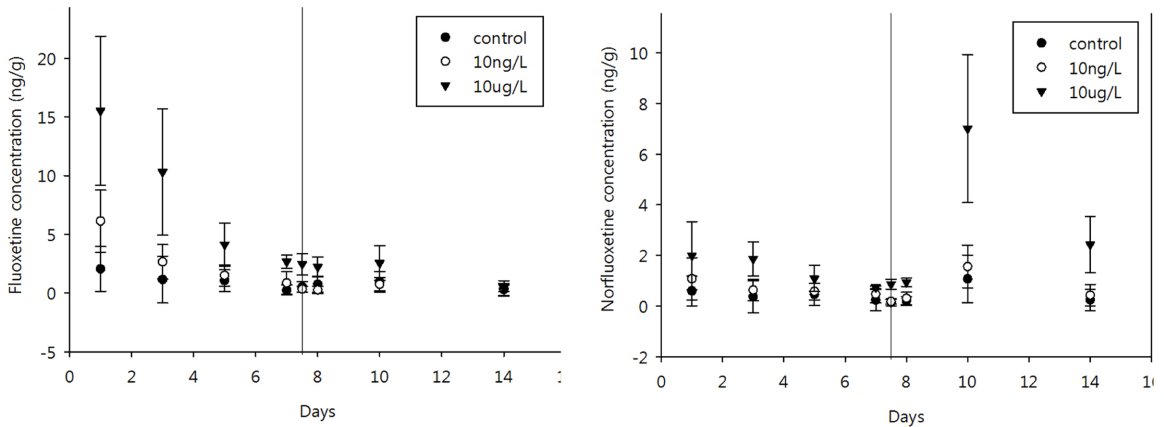


Fig. 5. Variations in fluoxetine and norfluoxetine concentration in *Cyprinus carpio* liver.

5에 나타내었다. 대조군 잉어 간에서의 플록세틴 농도는 평균 0.9  $\mu\text{g/g}$ , 0.2~2.1  $\mu\text{g/g}$ 의 범위를 나타내었다. 반면 10 ng/L, 10  $\mu\text{g/L}$ 의 플록세틴에 7일간 노출된 시험군 잉어 간에서의 플록세틴 농도는 각각 평균 2.8  $\mu\text{g/g}$ , 8.2  $\mu\text{g/g}$ 를 보이다가 노출이 완료된 후인 8일부터 14일까지는 각각 평균 0.5  $\mu\text{g/g}$ , 1.7  $\mu\text{g/g}$ 으로 나타냄으로써 시험군 잉어 간에서의 플록세틴 농도는 대조군과 유사하였다. 한편, 노르플록세틴은 대조군에서 평균 0.5  $\mu\text{g/g}$ , 0.2~1.1  $\mu\text{g/g}$ 의 범위를 나타내었으며, 10 ng/L, 10  $\mu\text{g/L}$ 의 플록세틴에 7일간 노출된 잉어 간에서 생성된 노르플록세틴은 각각 평균 0.7  $\mu\text{g/g}$ , 1.4  $\mu\text{g/g}$ 을 보이다가 노출이 완료된 후인 8일부터 14일까지는 두 노출구에서 각각 평균 0.8  $\mu\text{g/g}$ , 3.5  $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었다.

플록세틴의 노출 농도가 높을수록 대사체인 노르플록세틴이 잉어의 간에서 많이 생성되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 한편, 10 ng/L에 노출된 잉어의 간은 대조군 수준의 노르플록세틴 농도를 유지하고 있었으나 10  $\mu\text{g/L}$ 에 노출된 경우는 노출 전보다 높은 평균 농도수준을 나타내어 잉어의 혈장 시료에서와 같이 간에서도 지속적으로 일정 농도 수준을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.3. 생체시료내의 대사체 변화 및 통계 처리

잉어시료의 혈장과 간에서 노출 후 및 순화시킨 후의 대사체 변화에 대한 스펙트럼의 유사성을 통계학적으로 분석한 결과를 Fig. 6과 7에 나타내었다. 잉어 시

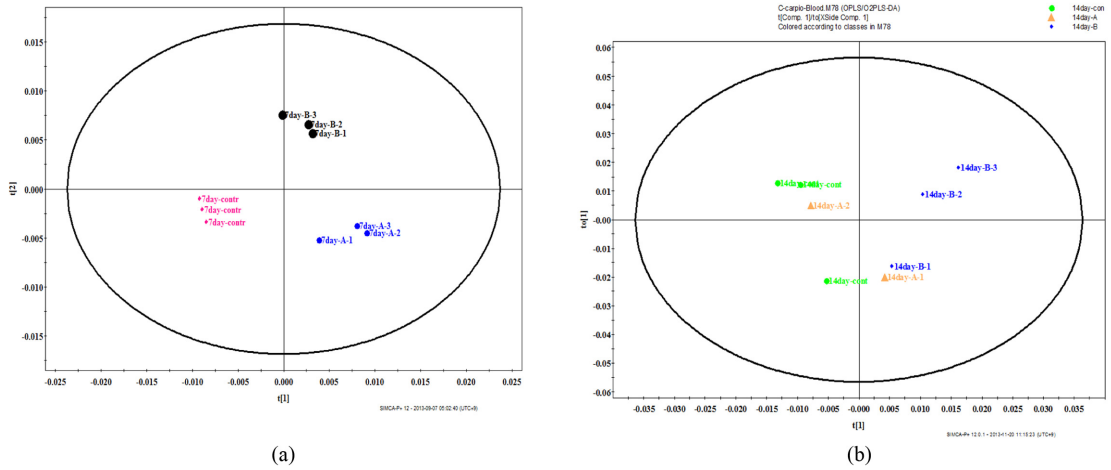


Fig. 6. Statistical analysis of blood sample at day 7 (a) and 14 (b).

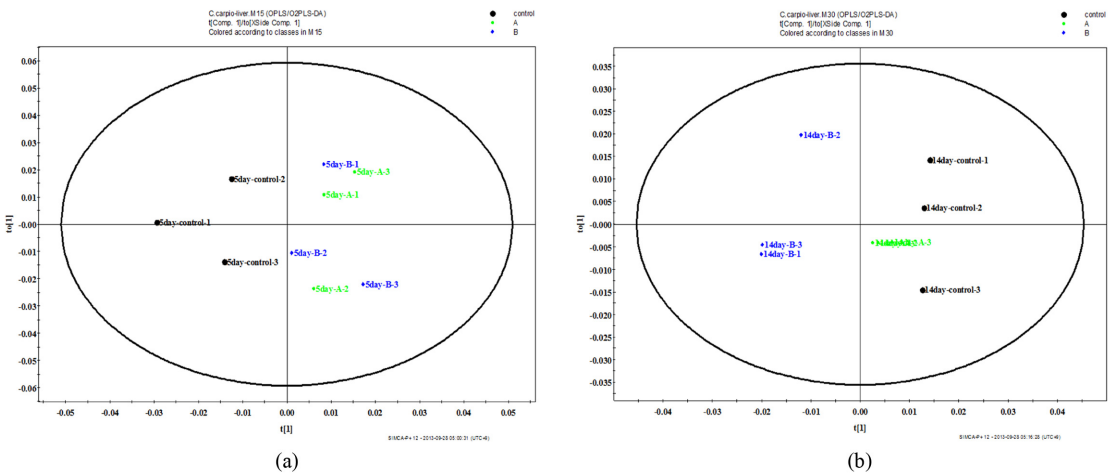


Fig. 7. Statistical analysis of liver sample at day 5 (a) and 14 (b).

료의 간과 혈장 중 대사체 스펙트럼의 유사성을 통계적으로 분석한 결과 각각 시료의 핵자기공명분광기 스펙트럼 패턴으로부터 노출 후 5일째는 시험군 A, B와 대조구가 t[1]축을 기준으로 완전히 구분됨에 따라, 플록세틴에 의한 대사체 변화가 생겼음을 알 수 있었다. 또한 시험물질 노출이 종료되고, 사육수로 옮겨진 후 추가적으로 노출한 경우에는 각 그룹이 섞이는 현상이 나타났으나 14일째 대조군과 시험군 B는 완전히 다른 그룹으로 나타나 일단 플록세틴에 노출된 뒤 체내 대사체의 변화가 이루어지면 다시 회복하는데 많은 시간이 소요됨을 알 수 있었다.

플록세틴에 노출된 잉어의 혈장과 간에서 나타나는 대사체 변화를 600 MHz 핵자기공명분광기 나노관으로 측정하고 Chenomx 600 MHz 대사체 라이브러리를 통해 정량적으로 분석한 결과를 Table 3과 4에 나타내었다. 혈장의 경우 28종의 대사체를 확인하였다. 대조군 그룹에 대한 A농도, B농도 대사체 양의 변화량은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{변화량} = \{(A \text{ 농도 또는 } B \text{ 농도} - \text{대조군 농도}) / \text{대조군 농도}\} \times 100$$

간 시료에서는 유기산, 아미노산, 당 및 그 외 콜린,

**Table 3.** Time series table of blood sample metabolites variation

Metabolites	Time					
	5 day	7 day	8 day	10 day	14 day	
Acetate	-	-	NA	-	NA	
Alanine	-	NA	-	NA	+	
Arginine	+	--	-	+	+	
Asparagine	++	+	NA	-	-	
Betaine	+	+	NA	-	NA	
Choline	-	-	--	+	-	
Creatine	-	+	-	NA	NA	
Formate	-	+	+	NA	+	
Glucose	+	++	+	NA	-	
Glutamate	NA	+	--	NA	NA	
Glutamine	NA	NA	NA	NA	++	
Glycerol	-	-	-	--	++	
Glycine	+	NA	-	NA	+	
Histidine	-	+	+	-	+	
Inosine	--	-	NA	-	-	
Isoleucine	+	+	++	+	++	
Lactate	-	-	+	NA	NA	
Leucine	-	+	+	+	++	
Lysine	-	-	+	NA	NA	
Methionine	NA	+	++	++	++	
Phenylalanine	+	+	+	++	++	
Proline	+	-	-	NA	-	
Serine	+	NA	-	NA	+	
Succinate	-	+	-	NA	++	
Threonine	NA	NA	-	-	+	
Tyrosine	+	+	+	++	++	
Valine	NA	NA	+	+	+	
myo-Inositol	++	--	NA	-	-	

크레아티닌 등 35종의 대사체를 확인할 수 있었다 (Table 4).

본 연구 결과, 간과 혈장에서의 대사체 변화는 동일한 경향을 나타내지 않았는데, 이는 간에서는 외인성 물질 뿐만 아니라 생체 내 다양한 물질들의 합성과 분해가 일어나는 반면, 혈장은 주로 물질을 운반하는 역할을 하기 때문에 대사체의 변화가 상이한 것으로 해석될 수 있다. 대표적으로 여러 종류의 아미노산의 변화가 간과 혈장에서 서로 다르게 나타났다. 이소루신(*isoleucine*), 루신(*leucine*), 발린(*valine*) 등은 신경독성 자극이 있을 때 뇌에서 필요로 하는 글루타메이트(*glutamate*)의 합성에 아미노 그룹을 제공하는 것으로 알려진 아미노산들이다.<sup>13)</sup> 간에서는 이들 아미노산의 농도가 감소하였으며 혈장에서는 그 농도가 증가한 것으로 나타남에 따라, 상기 아미노산들이 간에서부터 혈장을 통해 뇌로 전달된 것으로 추정된다. 이와 관련하여 해당 아미노산인 글루

타메이트는 간과 혈장 모두에서 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 글루타메이트가 뇌로 많은 양이 전달되었기 때문인 것으로 예측된다. 티로신(*tyrosine*)은 신경 전달 물질과 호르몬의 전구체로 알려진 아미노산으로서,<sup>14,15)</sup> 본 연구의 분석 결과에서 간에서는 그 농도가 감소하였으며 혈장에서는 그 농도가 증가하였는데 이는 발린, 이소루신, 루우신과 마찬가지로 간에서 혈장을 통해 뇌와 같은 다른 장기로 이동할 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 티로신의 전구체인 페닐알라닌(*phenylalanine*) 또한 간에서는 그 농도가 감소하였고, 혈장에서는 농도가 증가함에 따라, 상기 아미노산들과 동일한 원인에 의하여 변화한 것으로 보인다. 또한 과거 연구에 따르면 플록세틴의 독성으로는 과혈당증이 유발된다고 알려진 바 있다.<sup>16,17)</sup> 본 실험 결과에서도 이와 마찬가지로 혈장에서 글루코스 농도가 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 과거의 관련 연구에 따르면, 세로토닌 증후군

Table 4. Time series table of liver sample metabolites variation

Metabolites	Time					
	5 day	7 day	7.5 day	8 day	10 day	14 day
Acetate	+	NA	NA	+	++	NA
Alanine	-	--	-	--	-	-
Arginine	-	+	++	NA	-	NA
Asparagine	++	-	+	NA	--	+++
Aspartate	-	--	-	-	--	++
Betaine	++	NA	-	+	++	NA
Choline	+	-	-	NA	-	++++
Creatine	NA	NA	-	-	++	NA
Formate	--	--	NA	+	++	NA
Fumarate	+	NA	-	-	-	-
Glucose	-	NA	NA	+	NA	-
Glutamate	-	-	NA	-	-	NA
Glutamine	-	-	+	-	-	NA
Glutathione	+	-	++	+	-	++
Glycerol	++	++	NA	+	+	++
Glycine	+	+	NA	+	+	-
Inosine	-	NA	+	+	NA	NA
Isoleucine	-	--	NA	-	-	+
Lactate	+	NA	++	NA	NA	-
Leucine	-	--	NA	-	-	NA
Lysine	-	-	-	-	--	NA
Methionine	-	--	NA	-	--	++
Niacinamide	+	+	NA	+	-	-
O-Phosphocholine	NA	-	NA	+	+	+++
Phenylalanine	-	--	NA	-	-	+
Proline	-	-	-	-	-	+
Serine	+	+	NA	-	+	NA
Succinate	-	-	-	-	NA	-
Threonine	NA	-	-	++	NA	-
Tryptophan	+	-	-	NA	--	--
Tyrosine	-	--	-	-	NA	++
Uracil	-	-	--	NA	NA	-
Uridine	NA	-	NA	NA	NA	-
Valine	-	--	NA	-	-	+
$\beta$ -Alanine	+	-	NA	++	NA	-

증상으로 간수치가 증가된다고 보고된 바 있다.<sup>18)</sup> 따라서, 간수치 증가는 간 손상을 대표할 수 있으며, 세로토닌 증후군은 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI)인 플록세틴에 의해서 발생할 수 있고, 이는 플록세틴에 의해 간 손상이 일어날 수 있음을 예측할 수 있다. 이와 관련된 대사체로는 아스파테이트(aspartate), 알라닌(alanine), 글루타메이트(glutamate)가 있으며 이는 간 손상에 따른 아미노산 형성의 영향과 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>19)</sup> 그 외에도 알라닌은 신경전달물질로서 에너지대사 회로에서도 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있으

며,<sup>20)</sup> 알라닌의 농도 변화는 플록세틴에 의해 신경전달 이상과 세포 에너지대사에 이상 발생을 나타낼 가능성이 있는 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 생활 속에서 널리 사용되는 의약품들이 수계 등 환경 중에서 비의도적인 노출에 따라 발생할 수 있는 생태계 건강피해 영향과 그 원인을 규명하기 위한 기반 연구로서 의약품 중 플록세틴을 노출시킨 어류

에서의 축적도 및 대사체 변화 등을 분석하였다.

잉어의 혈장과 간 조직 분석 결과 간 조직에서 플록세틴의 주요 대사가 일어났으며 이는 간 조직의 특성이 반영된 결과이다.

플록세틴의 노출에 의한 생체 내 영향을 확인하기 위하여 잉어를 이용한 노출 실험 및 대사체 변화를 추적한 결과 주요 대사체는 아미노산류, 유기산류, 당류, 아미이드류 등이 있었으며, 대조군과 노출군의 농도별 대사체 증감을 토대로 그 차이를 확인할 수 있었다.

본 연구의 결과는 의약물질을 비롯한 다양한 환경 중화합물질의 노출에 따른 인체 및 생태계 건강 영향을 과학적으로 평가하고 규명하기 위한 대사체 변화 추적 연구 등에 대한 중요한 기초연구 자료로 활용될 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. C. Fernández, M. González-Doncel, J. Pro, G. Carbonell, and J. V. Tarazona, "Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system(madrid, spain) and a potential risk characterization", *Science of the Total Environment*, **2010**, 408, 543-551.
2. A. R. R. Péry, M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes, and J. Garric, "Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates", *Chemosphere*, **2008**, 73, 300-304.
3. Lúcia H. M. L. M. Santos, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, C. Delerue-Matos, A. Pena, D. Barceló, and M. C. B. S. M. Montenegro, "Contributions of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals", *Science of the Total Environment*, **2013**, 461-462, 302-316.
4. Y. Nakamura, H. Yamamoto, J. Sekizawa, T. Kondo, N. Hirai, and N. Tatarazako, "The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka(*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish", *Chemosphere*, **2008**, 70, 865-873.
5. 국립환경과학원, "잔류 의약품물질 환경위해성 평가(I)", **2008**. 137-139.
6. V. K. H. Barclay, N. L. Tyrefors, I. M. Johansson, and C. E. Pettersson, "Trace analysis of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Part II: Enantioselective quantification and studies of matrix effects in raw and treated wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1227, 105-114.
7. B. W. Brooks, C. M. Foran, S. M. Richards, J. Weston, P. K. Turner, J. K. Stanley, K. R. Solomon, M. Slattery, and T. W. La Point, "Aquatic ecotoxicology of fluoxetine", *Toxicology Letters*, **2003**, 142, 169-183.
8. R. Lazzara, M. Blázquez, C. Porte, and C. Barata, "Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*", *Aquatic Toxicology*, **2012**, 106-107, 123-130.
9. V. K. H. Barclay, N. L. Tyrefors, I. M. Johansson, and C. E. Pettersson, "Trace analysis of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Part I: Development of a chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for wastewater samples", *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 5587-5596.
10. M. M. Schultz and E. T. Furlong, "Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS", *Analytical Chemistry*, **2008**, 80, 1756-1762.
11. S. Chu and C. D. Metcalfe, "Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1163, 112-118.
12. B. Son, J. Kim, C. An, S. Lee, B. Kim, and D. Chung, "Simultaneous analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -blockers by LC-MS/MS", *Analytical Science and Technology*, **2016**, 29, 179-185.
13. V. Contrusciere, S. Paradisi, A. Matteucci, and F. Malchiodi-Albedi, "Branched-chain amino acids induce neurotoxicity in rat cortical cultures", *Neurotoxicity Research*, **2010**, 17, 392-398.
14. L. E. Banderet and H. R. Lieberman, "Treatment with tyrosine, a neurotransmitter precursor, reduces environmental stress in humans", *Brain Research Bulletin*, **1989**, 22, 759-762.
15. J. Zeng, H. Kuang, C. Hu, X. Shi, M. Yan, L. Xu, L. Wang, C. Xu, and G. Xu, "Effect of bisphenol A on rat metabolic profiling studied by using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry", *Environmental Science & Technology*, **2013**, 47, 7457-7465.
16. F. Carvalho, D. Barros, J. Silva, E. Rezende, M. Soares, J. Fregoneze, and E. De C. e Silva, "Hyperglycemia induced by acute central fluoxetine administration: role of the central CRH system and 5-HT<sub>3</sub> receptors", *Neuropeptide*, **2004**, 38, 98-105.
17. K. Nonogaki and A. Iguchi, "Role of central neural mechanism in the regulation of hepatic glucose meta-

- bolism”, *Life Science*, **1997**, 60, 797-807.
18. E. W. Boyer and M. Shannon, “The serotonin syndrome”, *The New England Journal of Medicine*, **2005**, 352, 1112-1120.
  19. P. Thulin, I. Rafter, K. Stockling, C. Tomkiewicz, E. Norjavaara, M. Aggerbeck, H. Hellmold, E. Ehrenborg, U. Andersson, I. Cotgreave, and B. Glinghammar, “PPAR $\alpha$  regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2008**, 231, 1-9.
  20. M. Erecin’ska, D. Nelson, D. F. Wilson, and I. A. Silver, “Neurotransmitter amino acids in the CNS. I. regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion”, *Brain Research*, **1984**, 304, 9-22.