

LC-HRMS를 이용한 *Daphnia magna* 및 *Gammarus pulex* 생체내 의약품 대사체 정성분석

전준호^{1,2,†}

¹국립창원대학교 환경공학과, ²국립창원대학교 친환경해양플랜트 FEED 공학과

Qualitative Analysis for Metabolites of Pharmaceuticals Formed in *Daphnia magna* and *Gammarus pulex* Using Liquid Chromatogram-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)

Junho Jeon^{1,2,†}

¹Department of Environmental Engineering, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

²Graduate School of FEED of Eco-friendly Offshore Structure, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received November 5, 2018/Revised November 22, 2018/Accepted November 27, 2018

Pharmaceuticals in wastewater effluents have been recognized as emerging pollutants threatening freshwater organisms. To extend understanding for bioaccumulation and toxicity in those organisms, information on biotransformation products (or metabolites) and their metabolic pathway are crucial. The aim of the present study is to identify and elucidate metabolites of pharmaceuticals formed in exposed organisms using suspect and nontarget screening approach using LC-HRMS. As the target pharmaceuticals, carbamazepine, ketoprofen, metoprolol, propranolol, and verapamil were selected whereas *Daphnia magna* and *Gammarus pulex* were used as test organisms. After 24h exposure, metabolites formed in the organisms were identified using LC-HRMS. The structures of metabolites were elucidated via analysis of MS/MS fragment pattern and the comparison with fragment database. As the results, a total of 10 metabolites were identified for 5 parent compounds (C253/C356 for carbamazepine, K211 for ketoprofen, M256 for metoprolol, P218/P276/P306 for propranolol, V196/V291/V441 for verapamil). Among them, the presence of C253 and V291 was confirmed using standard materials. Most of the identified metabolites were formed through oxidative reactions such as hydroxylation, N-demethylation, and dealkylation. Cysteine conjugation (phase II reaction) metabolite (C356) for carbamazepine was found in daphnia. The metabolic pathway of verapamil showed similar metabolic pathways and metabolic pathways for both species. Although the toxicological information on the identified metabolites could not be confirmed, the molecular structure information of the proposed metabolites can be used for future evaluation and prediction of toxicity.

Key words: Pharmaceuticals, Metabolite, Structure elucidation, LC-HRMS, Suspect and nontarget screening

1. 서 론

하폐수의 배출을 통해 수환경으로 유입되는 수많은 환경오염물질들은 수계에 존재하는 다양한 수서생물들의 안전을 위협하고 있다^{1,2)}. 그 중 하수에 포함되어 있는 각종 의약품들은 새로운 위협요소로 인지되고 있다. 의

약품은 생체활성물질(biologically active agents)로 생물에 노출·농축되었을 시 잠재적으로 생물의 기능 교란을 야기시킬 수 있다. 의약품에 대한 생태위해성을 정확히 이해하기 위해서는 이들의 독성기작과 생물의 반응정도 등에 대한 정보가 필요한데, 그 중 화학물질의 대사체(metabolites) 연구는 생물이 화학물질의 노출 및 농축에

[†]To whom correspondence should be addressed.

어떻게 대응하는지에 대한 유용한 정보를 제공한다. 생물농축(bioaccumulation)은 화학물질의 위해성 평가시 주요 지표 중 하나로, 독성저감작용 중 하나인 생물변환(biotransformation) 등에 의해 조절 및 변화된다^{3,4)}. 일부 연구에서 담수 절지 동물의 생물변환에 의해 유기 화학물질의 생체내 농도가 크게 변화되었으며⁵⁾, 방향족 탄화수소 및 살충제와 같은 유기 오염 물질에 대한 대사 물질이 확인된 바가 있다³⁾. 의약품의 상당부분을 차지하는 극성 화합물은 비극성 화합물보다 생물농축 가능성이 낮지만, 생물 이용 가능성이 높은 표층수에서 상대적으로 높은 농도로 존재하기 때문에 수중 생물에 잠재적인 위협요소가 되고 있다. 그러나, 의약품과 같은 신종 오염물질(emerging pollutants)에 대한 수생생물내에서의 생물변환 정보는 매우 제한적이며, 물벼룩 및 민물새우 등 1차 소비자로서 중요한 생태적 지위를 가지는 생물종에 대한 정보는 더더욱 찾아보기 힘들다. 대사체는 일반적으로 모체 화합물보다 친수성이 높고 독성이 적기 때문에 대사체의 형성은 독성저감으로 인식되어왔다. 그러나 일부 대사체는 모화합물에 비해 독성이 비슷하거나 더 높은 것으로 보고되었다. 예를 들어, acetylcholine esterase inhibitor인 유기인계 살충제의 경우 대사과정에서 생성된 oxon-analogs 대사체의 독성이 모화합물에 비해 수 배 가량 높은 것으로 알려져 있다⁶⁾. 이렇듯, 대사체 확인 및 구조분석 연구는 노출생물의 독성기작에 중요한 정보 및 단서를 제공할 수 있다. 이러한 독성 및 위해성평가에서의 중요성에도 불구하고, 생물변환의 결과물인 대사체의 존재유무를 확인하는 분석연구는 분석기기의 검출한계 및 분해능의 부족 등으로 인해 많은 한계를 지니고 있었다. NMR 장비는 대사체 등 분자의 구조확인에 활용될 수 있으나, 이를 위해서는 충분한 양 및 순도의 대사체 획득이 필요한데, 이는 소규모 노출실험을 통해 얻어내기가 사실상 어려워 대사체 식별이 제한적이었다. 한편, 일반적인 질량분석기를 활용한 대사체의 확인을 위해서는 대사체 표준물질의 구비가 반드시 필요한데, 대다수의 대사체 표준물질은 소매시장에서

확보가 어려운 현실이다. 최근, 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography, LC)와 결합된 고분해능질량분석기(High resolution mass spectrometry, HRMS) 기반 분석기술은 표준물질 없이도 대사체의 존재유무 및 잠정 확인이 가능하다는 것을 성공적으로 보여주었다⁴⁾. 다만, 대사체의 구조확인을 위해서는 isotopic 패턴 분석, MS/MS fragment 정보 등 분자구조에 대한 구체적인 증거가 필요하다⁷⁾.

본 연구에서는 LC-HRMS를 사용하여 담수 무척추 동물, 즉 물벼룩(*Daphnia magna*)와 민물새우(*Gammarus pulex*)에서 형성된 의약품의 대사체를 정성분석(identification)하고, 이와 함께 생물변환 경로(metabolic pathway)를 제안하고자 한다. 한편, 두 종의 다른 실험생물내에서 생물변환의 과정 및 대사체가 어떠한 상이성을 지니는지에 대한 비교분석을 실시하였다. 실험대상물질로는 담수 및 하천 방류수에서의 발생 빈도 및 농도, 그리고 생물축적성 등을 고려하여 5가지의 의약품(carbamazepine, ketoprofen, metoprolol, propranolol, verapamil, log K_{ow} 범위 1.69-4.80)을 선정하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험물질 및 시약

연구대상물질로 선정된 5개 의약품(carbamazepine, ketoprofen, metoprolol, propranolol, verapamil)에 대한 정보는 Table 1에 표기하였다. 해당물질의 표준물질과 내부표준물질(Carbamazepin- C^{13} ,D2)은 98% 이상의 초고순도를 구매(TRC Inc. Toronto)하였으며, 구매된 각각의 표준물질은 메탄올에 희석 및 용해시켜 1,000 mg/L의 표준용액을 준비하였다. 노출 시험 및 질량 분석을 위해 표준용액을 다시 메탄올로 희석하여 100, 10, 및 1.0 mg/L 등으로 농도를 낮추어 사용하였다. 시료 전처리 및 LC-MS 분석을 위해 사용된 메탄올, 아세트나이트릴, 및 증류수는 HPLC grade(Acros Organics, Switzerland)을 사용하였다.

Table 1. Information on molecular formula and measurement parameters for selected pharmaceuticals

No.	Compound	Cas No.	Molecular Formula	Class	Adduct	Exact mass	K_{ow} *
1	Carbamazepine	298-46-4	C15H12N2O	Anesthetic/anti-convulsant	M+H	236.0944	2.25
2	Ketoprofen	22071-15-4	C16H14O3	Analgesics/anti-inflammatories	M+H	254.0937	3.00
3	Metoprolol	37350-58-6	C15H25NO3	Anti-hypertensive agent	M+H	267.1828	1.69
4	Propranolol	525-66-6	C16H21NO2	Anti-hypertensive agent	M+H	259.1566	2.60
5	Verapamil	52-53-9	C27H38N2O4	Anti-hypertensive agent	M+H	454.2826	4.80

2.2. 수서생물배양 및 채집

Daphnia magna (STRAUS 1820 clone 5)는 인공담수(M4 배지)에 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 16시간/8시간의 명도/암흑조건에서 OECD 가이드라인⁸⁾에 따라 배양되었다. 스무 마리의 성체 *D. magna*는 약 1.5 L의 배지에서 배양되며 일주일에 한번 배지를 교환하였다. 이들의 먹이로 *Scenedesmus obliquus*이 제공되었다. 노출실험에는 어미와 같은 조건으로 배양된 생후 5일차 물벼룩을 사용하였다.

*Gammarus pulex*는 스위스 취리히 인근 Itziker의 개울(좌표: E 702150, N 2360850)에서 채집되었고 폭기된 인공연못배지(Artificial Pond Water, APW)로 채워진 수족관에 3~5일간의 순치기간을 거쳐 노출실험에 사용되었다. 순치기간동안 *Cladosporium herbarum*으로 접종·발효된 밤나무잎을 먹이원 및 은신처로 제공하였다. 배양실은 $13 \pm 2^\circ\text{C}$ 및 12/12시간의 명암조건으로 유지하였다.

2.3. 노출실험

각 생물에 대한 노출실험조건은 아래 괄호(*D. magna*의 조건: *G. pulex*의 조건) 안에 구별하여 나타내었다. *D. magna*은 5종의 대상물질 모두에 대한 노출실험을 진행하였고, *G. pulex*는 수집된 생물수의 제약으로 인해 carbamazepine, propranolol, verapamil 3종에 대한 노출실험을 수행하였다. 노출시료는 각각의 배지(M4 배지: APW)를 이용하여 대상물질의 농도가 $100 \mu\text{g/L}$ 가 되도록 준비하였다. 복수(triplicate : duplicate)의 노출비커(50 mL : 600 mL)에 노출 용액(30 mL : 500 mL)을 담고, *G. pulex* 실험에만 접종 밤나무잎을 제공하였다. 그후, 생물(약 30마리: 5~6마리)을 노출비커에 넣고 온도 조절 챔버(20°C : 13°C)에서 24시간 노출배양하였다. 노출후 생물을 체(sieve)를 이용하여 걸러내고 생물표면에 묻어 있는 노출용액을 티슈로 닦아낸 후 2 mL microcentrifuge 튜브에 수집하였다. 수집된 생물은 무게를 잰 후 액체질소를 이용하여 급속냉각시킨 후 추출실험이 준비될 때까지 -80°C 초전냉동고에 보관하였다.

노출물질 및 대사체 추출을 위해 1mm 지르코니아/실리카 비드(BioSpec Products, Inc., USA)와 FastPrep-24 bead beater (MP Biomedicals, Switzerland)를 사용하였다. 노출생물이 수집된 microcentrifuge 튜브에 300 mg의 beads를 넣고, 200 mL의 내부표준물질(Carbamazepin-C13,D2, 표적농도 100 ng/mL)와 800 mL의 메탄올을 주입한 후 FastPrep에 넣고 6 m/s의 속도로 15초 동안 두 번 균질화시켰다. 균질추출물은 원심분리

후 상층액을 $0.2 \mu\text{m}$ 셀룰로오스 필터(BGB Analytic AG, Switzerland)에 걸러 LC-HRMS 분석에 사용하였다. 정성분석결과와 확인 및 보정을 위해 두 개의 다른 바탕시료, 즉 표적 화학 물질(chemical negative) 및 시험 생물이 없는 것(organism negative)을 상기의 방법과 동일하게 취급하여 준비하였다. 또한 접종 밤나무잎에 의한 대사체 확인을 위해 추가적인 바탕시료 (화학 - 접종 밤나무만 있고 *G. pulex*는 부재)도 수행되었다.

2.4. 대사체 예측

생물 대사체의 예측을 위해 두 개의 다른 in silico 기법, 즉, University of Minnesota Pathway Prediction System (UM-PPS) 및 Meteor Environmental Pathway Prediction System (Lhasa Limited, 영국)를 사용하였다. UM-PPS는 University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database 기반으로 미생물 대사 반응을 예측하고, Meteor는 포유동물의 생체대사정보를 바탕으로 대사체를 예측한다. 두 프로그램의 예측 결과 생성된 대사체의 정확한 질량 및 구조정보를 목록화하여 구조분석을 위한 data-dependent fragmentation (DDF)에 활용하였다.

2.5. 노출실험 LC-HRMS 정성분석

노출생물의 추출물 및 노출용액에 대한 분석을 위해 LC-ESI-HRMS/MS를 이용하였다. 질량분석기의 오염 및 매트릭효과(matrix effect)의 최소화를 위해 자동 온라인 고체상추출기법(automated online solid-phase extraction (SPE))을 이용하여 시료를 농축 및 정제하였다. SPE 카트리지는 4개의 흡착물질을 혼합(10 mg 오아시스 HLB (Waters, USA)를 ENV + (International Sorbent Technology, UK), Strata X-AW 및 X-CW (Phenomenex, UK))한 다층구조의 카트리지를 사용하였으며, 이는 광범위한 유기화합물뿐만 아니라 이온성물질 및 다양한 대사산물(metabolite 또는 transformation products)의 추출에도 적합한 것으로 알려져 있다. 생물시료에 대한 online-SPE과정은 아래에 서술된 바와 같다. 필터를 거친 메탄올 추출물 $100 \mu\text{L}$ 를 20 mL 헤드 스페이스 유리 vial에 주입하고, 3차 증류수로 채웠다. Binary 펌프(Rheos 2000, Flux Instruments, Switzerland)를 이용하여 이동상(0.1% (vol.) formic acid 처리된 H_2O 및 메탄올)를 $300 \mu\text{L/min}$ 의 유속으로 Atlantis T3 3 mm 크로마토그램 컬럼($3.0 \times 150 \text{ mm}$)으로 이송하였다. Vial에 담겨진 시료는 isocratic pump를 이용하여 $2000 \mu\text{L}$

min 유속으로 20mL 용량의 루프로 이송되며, 이후 online SPE로 loading 및 정제된다. 시료를 보관·이송하는 루프 및 연결 tube는 시료 loading 전후로 acetonitrile로 세척된다. Online-SPE에 흡착된 분석물질들은 메탄올에 의해 용출되며, 용출 즉시 ESI로 이온화되어 질량분석기로 보내진다. 분석물질의 검출은 Linear Trap Quadrupole Orbitrap 질량 분석기(Thermo Scientific, Switzerland)의 positive 및 negative mode 수행되었으며 150~2000 m/z의 질량 범위를 분석하였다. 질량분석기의 교정을 위해 external mass calibration 방법을 사용하였으며, 5 ppm 미만의 질량 정확도를 나타내었다.

분석물질의 구조분석을 위해 data-dependent fragmentation (DDF)를 수행하였다. DDF는 inclusion list에 수록된 예측 대사산물이 full scan 모드에서 감지되었을 때 해당 이온을 fragmentation시켜 이온의 파편(fragment) 정보를 획득하는 것이다. Full scan에서의 질량분석 해상도는 60,000, DDF 스캔의 해상도는 7,500로 설정되었다. 분석데이터는 Xcalibur (Thermo Scientific, Switzerland)의 Qual Browser를 통해 질량정보 및 분자구조를 확인하였다. 크로마토그램, ESI, 질량분석조건 및 DDF에 대한 보다 상세한 정보는 Jeon et al.³⁾에서 확인할 수 있다.

2.6. 분자구조 해석을 통한 신뢰도 등급

대사체의 분자구조해석 및 신뢰도 등급화를 위해 체계적 절차가 확립되었다⁷⁾. 대사체로 의심되는 피크가 확인되면, 이에 대한 분자식이 할당되고 isotopic pattern 분석을 수행한다. 이를 통해 분자식이 확인된 피크는 다음의 신뢰도 등급으로 나뉘어진다. 첫번째로, 표준물질의 크로마토그램 RT 및 fragmentation 패턴 비교분석으로 해당 피크가 확인된 물질은 가장 높은 신뢰 수준을 나타내는 Level 1 등급이 주어진다. 만일, 표준물질이 없는 경우, fragment 패턴분석 등을 통해 하위 등급이 산정되는데, 특정 하부 구조를 갖는 분자의 특정 fragment (i.e. diagnostic fragment)가 확인된 경우는 Level 2, 측정된 MS/MS 스펙트럼이 문헌에서 보고된 것과 유사한 경우는 Level 3, 예측프로그램에서 예측된 대사체로 의심되는 피크가 확인되었을 때 Level 4가 주어진다. 신뢰도 등급에 대한 상세한 설명은 Schymanski 등 (2014)⁷⁾에서 찾을 수 있다.

2.7. 데이터 분석을 위한 소프트웨어 도구

MetWorks 1.3 및 SIEVE V1.2 (Thermo Scientific, Switzerland)를 사용하여 대사체로 의심되는 피크 및 이온들을 추출하였다. 의심되는 대사체의 MS/MS fragmentation 예측은 Mass Frontier 6.0 (HighChem, Ltd., 슬로바키아) 및 MetFrag (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>)를 이용하여 수행하였다.

3. 실험결과

3.1. 크로마토그램 및 질량분석결과

노출에 사용된 생물들의 치사율은 0%였으며, 육안상으로 관찰되는 비정상적 행동은 찾아볼 수 없었다. 노출에 사용된 노출용액과 노출생물에서 얻어진 추출액에 대한 분석결과, 모든 노출용액 및 추출액에서 노출물질, 즉 모화합물의 크로마토그래픽 피크를 확인하였다. 모화합물의 피크 강도는 모두 1×10^7 이상의 높은 강도를 나타내었고, exact mass¹⁾에 대한 accurate mass²⁾의 mass error는 5 ppm 이내로 나타났다. 모화합물 carbamazepine, ketoprofen, metoprolol, propranolol, verapamil의 머무름 시간(retention time, RT)은 각각 15.3, 16.0, 11.5, 12.7, 12.9 min으로 관찰되었다.

고분해능질량분석으로 얻어진 full scan 크로마토그래픽 결과는 추정 및 비표적 분석기법을 활용하여 대사체의 확인에 사용되었다. Full scan에서 인지된 피크 정보 중 신호강도가 1×10^5 이하, 비정상적 피크 모양, 또는 RT가 3 min 이하 또는 25 min 이상인 경우는 결과해석에서 제외시켰다. 이상의 조건들을 만족하는 피크 중 바탕시료에서 확인된 피크들은 시료오염에 의한 것으로 간주하여 결과에서 배제하였다. 위의 과정에서 선별된 피크들은 Kind와 Fiehn⁹⁾이 제시하는 7가지의 golden rule에 따라 해당 이온의 accurate mass에 대한 분자식 지정을 수행하였다. 이와 함께, 효율적인 분자식 지정을 위하여 인공화학물질의 주요구성원소인 C, H, N, S, O, P, F, Cl, Br 및 Si만을 이용하였다. 확인된 대사체 피크에 대해서는 isotopic pattern분석 및 MS/MS fragment 비교분석을 수행하였으며, 이를 통해 대사체의 분자식 및 분자구조를 확인하였다. 이러한 과정을 거쳐 확인된 대사체의 피크와 분자식 및 분자구조는 아래에 서술하였다.

¹분자식에 대한 정확한 질량. 일반적으로 소수점 넷째자리 이상 표현.

²질량분석기에서 측정된 이온의 질량.

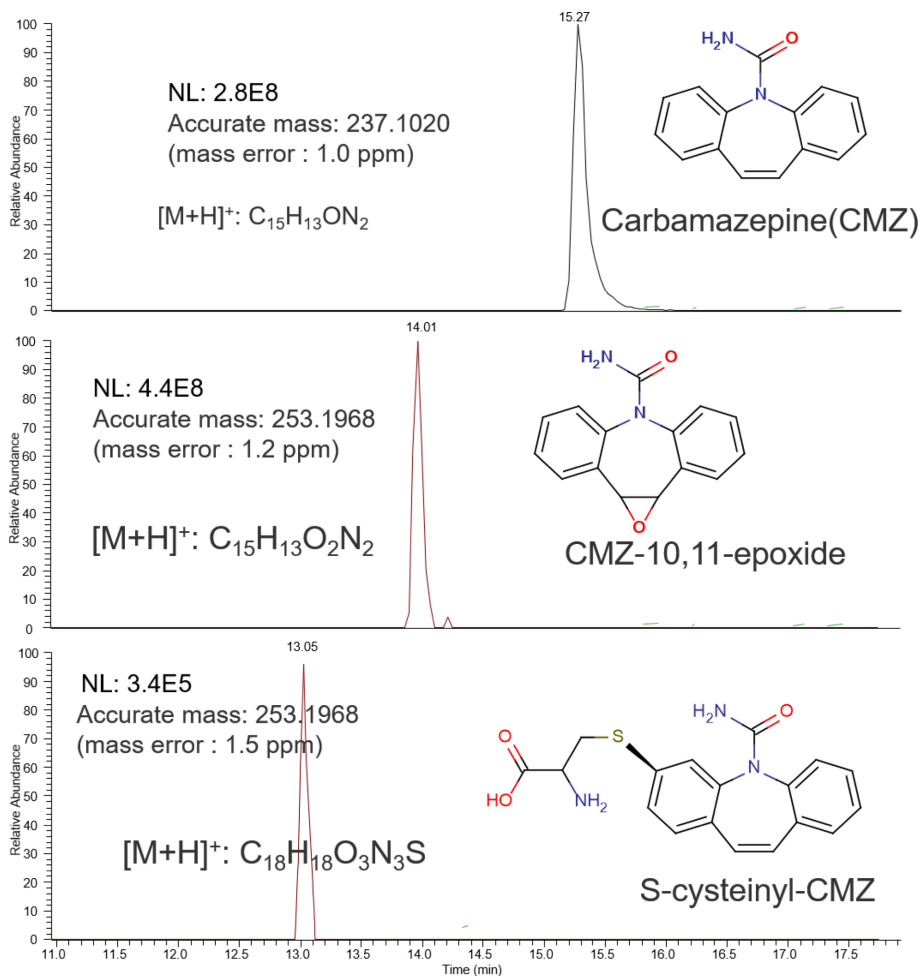


Fig. 1. Chromatographic peaks and molecular structures for metabolites of carbamazepine.

3.2. 대사체 확인 및 분자구조분석

노출된 물벼룩 시료에서 확인된 대사체에 대한 결과로, carbamazepine에서 2종, ketoprofen에서 1종, metoprolol에서 1종, propranolol에서 2종, verapamil에서 3종으로, 5종의 모화합물에 대해 총 9종의 대사체가 확인되었다. 한편, 민물새우에서 확인된 대사체는, carbamazepine에서 1종, propranolol에서 3종, verapamil에서 3종으로, 3종의 모화합물에 대해 총 7종의 대사체가 확인되었다. 확인된 대사체에 대한 분자식, 분석정보, 그리고 신뢰도 level에 대한 정보 등은 Table 2에 표기하였다. 이 중 carbamazepine (CMZ)과 2종의 대사체에 대한 크로마토그램 및 분자구조를 Fig. 1에 나타내었다.

2종의 대사체 중 하나인 C253은 CMZ-10,11-epoxide로 표준물질의 구매 후 정성 확인하였다(신뢰도 level

1). 특히, C253의 피크강도가 모화합물보다 약 1.2~1.6배 가량 높게 측정되어, 물벼룩 및 민물새우 체내에서 활발한 변환이 진행되었음을 암시하였다. Epoxide 대사체는 CMZ의 대표적인 변환산물로 하수처리장 방류수에서도 상대적으로 높은 빈도와 농도로 검출되고 있다¹⁰⁾. 반면, 또다른 대사체인 C356은 isotopic pattern 및 MS/MS fragment 분석결과 S-cysteinyl-CMZ로 잠정확인(신뢰도 level 2)되었다. 기존의 물벼룩에 대한 irgarol 노출연구에서 cysteine conjugation 형태의 대사체가 보고된 바가 있으나³⁾, CMZ에 대한 대사체로는 처음 확인되었다. 해당 대사체에 대한 MS/MS fragment 구조 분석에서 diagnostic fragment가 확인되어 신뢰도 level2가 부여되었다. Fig. 2은 S-cysteinyl-CMZ의 MS/MS fragment 패턴과 주요 fragment의 예측된 구조를 설명하고

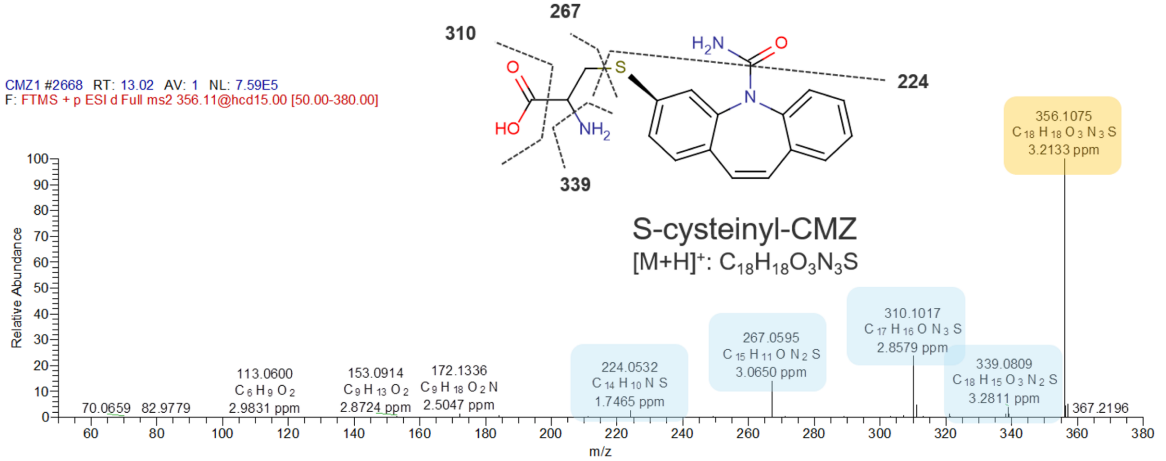


Fig. 2. Structure elucidation with MS/MS fragment interpretation for a metabolite of carbamazepine (C356).

있다. Cysteine은 아민기(-NH₂)와 카르복실기(-COOH)로 구성된 구조체로 정의되는데, fragment 310.1017 m/z (C₁₇H₁₆ON₃S)와 339.0809 m/z (C₁₈H₁₅O₃N₂S)의 확인을 통해 각 작용기가 해당 분자에 존재하고 있음을 추정할 수 있다. 또한, 267.0595 m/z는 cysteine의 주요부

분이 S분자에서 유리되었음을 나타내고 있다. 이러한 fragment의 패턴은 해당 피크의 구조가 S-cysteine을 가지고 있음을 증명하고 있다.

위와 동일한 MS/MS 패턴분석을 통해 기타 대사체에 대한 구조분석을 수행하였으며 이들의 구조에 대한 신

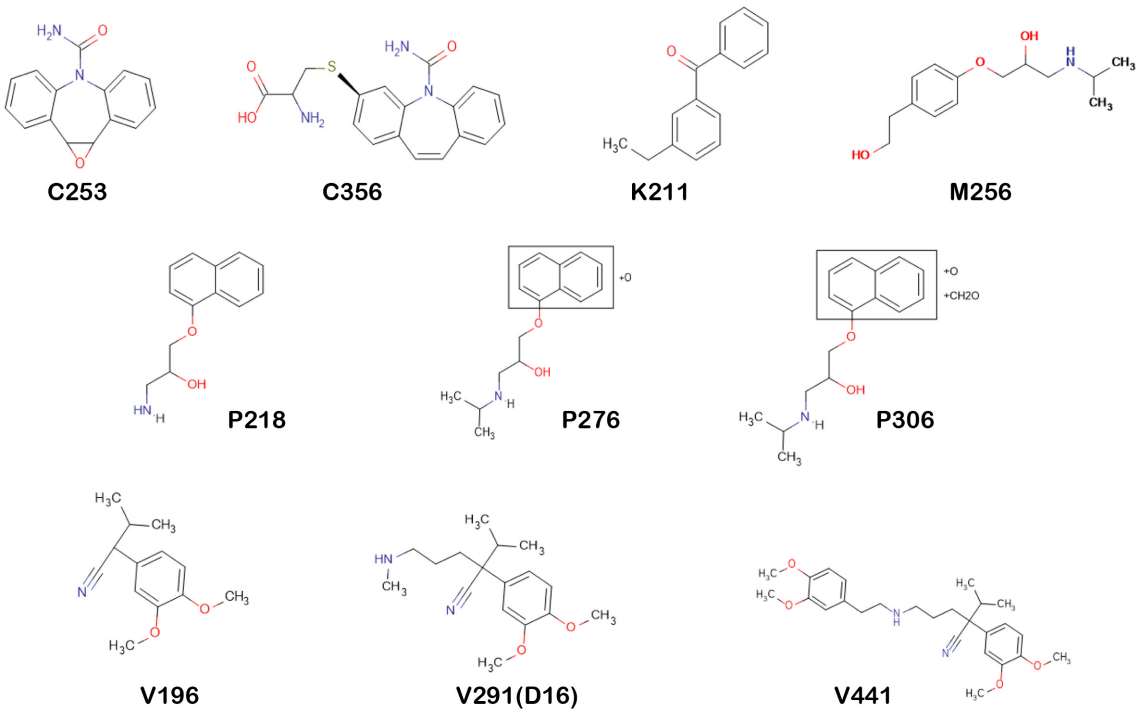


Fig. 3. Molecular structures of metabolites formed in *D. magna* and/or *G. pulex*.

Table 2. Analytical results for identified metabolites formed in test organisms

Parent compound	Metabolite ID	Measured [M+H] ⁺ of metabolites	Assigned formula for [M+H] ⁺	Formula change	RT (min)	Organism sample ^a	Confidence level
Carbamazepine [M+H] ⁺ : C ₁₅ H ₁₃ ON ₂ RT: 15.3 min	C253	253.1968	C ₁₅ H ₁₃ O ₂ N ₂	+O	14.0	D, G	1
	C356	356.1075	C ₁₈ H ₁₈ O ₃ N ₃ S	+C ₃ H ₅ O ₂ NS	13.1	D	2
Ketoprofen [M+H] ⁺ : C ₁₆ H ₁₅ O ₃ RT: 16.0 min	K211	211.11	C ₁₅ H ₁₅ O	-COO	14.4	D	2
Metoprolol [M+H] ⁺ : C ₁₅ H ₂₆ O ₃ N RT: 11.5 min	M256	256.1760	C ₁₄ H ₂₄ O ₃ N	-CH ₂	10.0	D	2
Propranolol [M+H] ⁺ : C ₁₆ H ₂₂ O ₂ N RT: 12.7 min	P218	218.1188	C ₁₃ H ₁₆ O ₂ N	-C ₃ H ₆	12.4	D, G	2
	P276	276.1610	C ₁₆ H ₂₂ O ₃ N	+O	11.5	G	2
	P306	306.1704	C ₁₇ H ₂₄ O ₄ N	+CH ₂ O ₂	11.3	G	2
Verapamil [M+H] ⁺ : C ₂₇ H ₃₉ O ₄ N ₂ RT: 12.9 min	V196	196.1333	C ₁₃ H ₁₈ O ₂ N	-C ₁₅ H ₂₁ O ₂ N	9.4	D, G	2
	V291	291.2069	C ₁₇ H ₂₇ O ₂ N ₂	-C ₁₀ H ₁₈ O ₂	12.3	D, G	1
	V441	441.2744	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ N ₂	-CH ₂	12.9	G	2

^aD: *Daphnia magna*, G: *Gammarus pulex*

피도 level은 1 또는 2로 높은 신뢰수준을 나타내었다. 특히, verapamil의 대사체인 V291은 기존 연구에서도 잘 알려진 D16 대사체로¹¹⁾, 표준물질들을 통해 확정되어 C253과 함께 신뢰도 level 1을 획득하였다. 이들 대사체의 분자구조는 Fig. 3에 나타내었다.

한편, 모든 대사체의 RT는 해당 모화합물의 RT보다 빨랐는데(Table 2), 이는 모화합물에 비해 대사체가 보다 친수성이 높음을 의미한다. 친수성이 높은 대사체의 형성은 생물의 모화합물 배출을 증가시키는 효과가 있으며, 이는 곧 체내농도의 감소로 연결될 수 있다. 즉, 해당 대사체의 형성은 모화합물의 독성 저감에 직간접적으로 관여를 하고 있음을 나타내는 결과로 풀이된다.

3.3. 대사체 형성기작

확인된 대사체는 모화합물과 분자식에서의 차이(formula change)를 보이는데(Table 2), 이러한 차이를 통해 대사체 형성기작을 확인할 수 있다. Carbamazepine의 대사체인 C253은 epoxidation을 통해 형성되었고, C356은 cysteine conjugation 반응을 통해 형성되었다. K211은 모화합물의 carboxyl group이 탈기되는 decarboxylation을 통해 형성되었으며, M256은 아민기에 결합되어 있던 메틸이 분리되는 N-demethylation을 통해 형성되었다. P218은 아민기에 연결되어 있던 isopropyl 결합이 분리되어 형성되었으며, P276은 나프탈렌 구조에 산소분자가 결합되는 hydroxylation 반응을 통해 형성되었다. 다만, 형성된 hydroxyl 그룹의 위치가 나프탈렌에

있다는 것은 fragment 패턴분석을 통해 확인할 수 있었으나, 어느 벤젠링에 존재하는지에 대한 정확한 위치는 확인할 수 없었다. 인체 혈청에서는 4-hydroxy propranolol이 확인된 바 있다¹²⁾. 한편, P306은 P276의 형성 후 CH₂O가 나프탈렌 구조에 추가로 결합하는 methoxylation 반응을 통해 형성된 것으로 판단된다. Verapamil의 대사체인 V291과 V441은 분자의 중심에 위치한 amine 기에 연결된 메틸기가 분리되어 형성(N-dealkylation, -demethylation)되었고, V196은 isobutyl기가 분리되는 demethylation을 통해 형성되었다. 상기에서 확인된 N-demethylation, methylation, oxidation 등은 모두 호기적 조건에서 형성되는 산화반응(oxidative reaction)으로, 물벼룩 및 민물새우의 대사반응은 주로 산소가 관여하는 반응이 주를 이루는 것으로 판단된다.

3.4. 물벼룩과 민물새우의 대사경로 비교

Carbamazepine, propranolol 및 verapamil에 함께 노출된 물벼룩과 민물새우의 대사경로는 Fig. 4에 나타내었다. 이들의 대사체 및 대사경로는 대체로 유사한 것으로 나타났는데, verapamil의 대사경로는 두 생물에서 동일하게 확인되었으며, carbamazepine에서는 C356이, propranolol에서는 P218이 물벼룩과 민물새우에서만 유일하게 확인되었다. C356의 cysteine 대사체는 phase II reaction에 의한 것으로, 모화합물의 독성저감에 매우 효과적인 대사경로로 알려져 있다^{3,13)}. 또한, cysteine 대사체는 glutathione conjugation reaction의 최종산물로 알

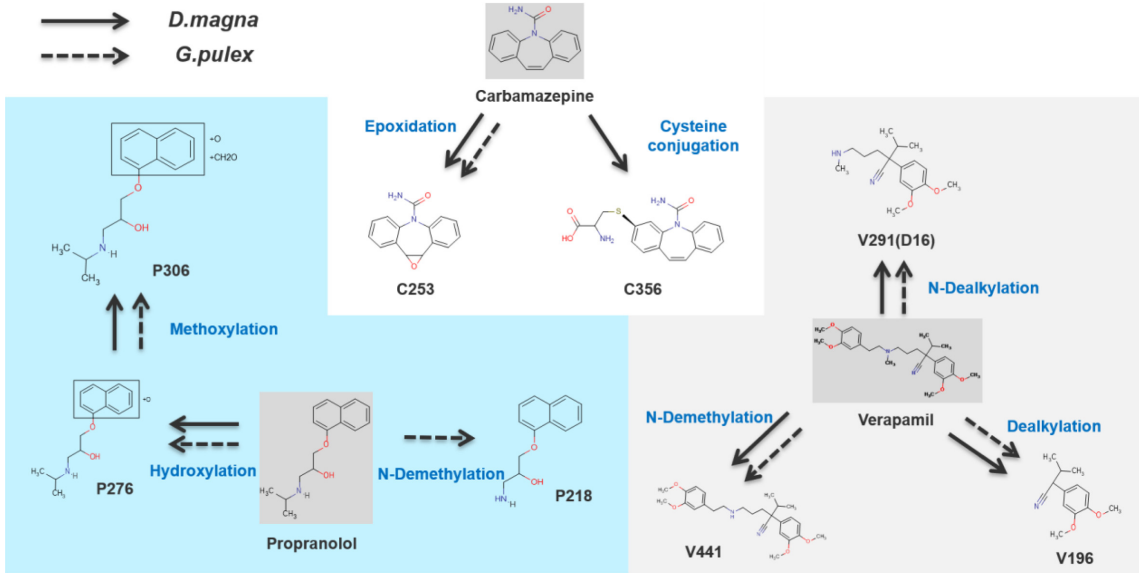


Fig. 4. Metabolites and metabolic pathways of carbamazepine, propranolol, and verapamil in *D. magna* and *G. pulex*.

려져 있는데, 이러한 대사경로는 물벼룩에 대한 이전 연구에서 확인된 바 있다^{3,14}. 이러한 결과는 glutathione conjugation에 이은 cysteine 대사체 형성이 물벼룩의 주요 대사과정이며, 이는 물벼룩의 detoxification 기작으로써 중요한 역할을 하고 있음을 암시하고 있다. Propranolol의 산화적 demethylation 대사체인 P218은 민물새우에서만 확인되었는데, 이는 민물새우의 호기성 산화 반응 기작이 물벼룩에 비해 보다 다양하게 전개되고 있음을 암시하고 있다. P218은 모화합물에 비해 분자크기가 작기 때문에 체외배출이 용이할 것으로 판단된다. 비록, P218의 독성을 확인할 수는 없지만, 체외배출의 용이성은 모화합물의 독성저감에도 기여하는 바가 있어, 이러한 대사경로 또한 화학물질의 노출에 대응하는 생물의 합리적인 생존전략으로 판단된다. Verapamil은 본 연구의 대상물질 중 가장 소수성이 높은 물질($\log K_{ow} = 4.8$)로 생물농축성이 가장 높을 것으로 예측된다. 이러한 생물농축성 물질의 노출에 대응하기 위하여 물벼룩과 민물새우는 3가지의 동일한 대사체를 형성하는 것으로 나타났다. 이들중 V291은 verapamil의 인체 대사체로 잘 알려진 D16과 동일한 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 D16의 형성에 관여하는 인체의 효소(e.g., CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 등)와 유사한 종이 해당 수서생물에서 존재할 수 있음을 의미하고 있다^{11,15}. 이렇듯, 확인된 생물대사체는 생물종에 따라 유사성 또는

상이성을 동시에 나타내는데, 이를 통해 화학물질의 노출에 대응하는 각 생물의 생존전략이 서식처의 상이성 또는 진화과정에서의 변화 등을 통해 달리 형성될 수 있음을 확인할 수 있다. 비록, 본 연구에서는 형성된 대사체의 독성을 확인하지는 못했지만, 이들의 분자구조는 추후 해당 대사체의 독성평가 및 예측에 중요한 정보를 제공할 수 있고, 이를 통해 해당 생물의 detoxification 기작에 대한 보다 심도있는 연구가 가능할 것으로 판단된다.

4. 결 론

신중 미량오염물질로 인지되고 있는 의약품 5종(Carbamazepine, ketoprofen, metoprolol, propranolol, verapamil)에 대해서 대표적 수서생물인 물벼룩과 민물새우에서 총 10종의 대사산물이 확인되었다. 대사체의 분자구조는 MS/MS fragment 패턴분석을 통해 확인하였고, 이들 중 C253과 V291은 표준물질을 이용하여 그 존재를 확정하였다. 확인된 대사체의 대부분은 hydroxylation, N-demethylation, dealkylation 등 산화적 반응을 거쳐 형성되었으며, carbamazepine의 경우 물벼룩에서 cysteine conjugation (phase II reaction) 대사체(C356)가 확인되었다. 비록, 민물새우에서는 C356이 확인되지 않았으나, verapamil의 대사경로는 물벼룩과 일치하는 등

대체적으로 유사한 대사산물 및 대사경로를 나타내었다. 확인된 대사체에 대한 독성정보는 확인할 수 없었으나, 제시된 대사체의 분자구조는 추후 독성평가 및 예측에 활용될 수 있으며, 이를 통해 수서생물의 독성저감기작 연구에 해당정보가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 성과는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NO. 2017R1C1B2010098).

참고문헌

- H. P. Singer, A. E. Wössner, C. S. McArdell, and K. Fenner, "Rapid screening for exposure to 'non-Target' pharmaceuticals from wastewater effluents by combining HRMS-Based suspect screening and exposure modeling", *Environmental Science and Technology*, **2016**, 50, 6698-6707.
- Y. Yoon, J. Ryu, J. Oh, B. G. Choi, and S. A. Snyder, "Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea)", *Science of the Total Environment*, **2010**, 408, 636-643.
- J. Jeon, D. Kurth, and J. Hollender, "Biotransformation pathways of biocides and pharmaceuticals in freshwater crustaceans based on structure elucidation of metabolites using high resolution mass spectrometry", *Chemical Research in Toxicology*, **2013**, 26, 313-324.
- A. A. Bletsou, J. Jeon, J. Hollender, E. Archontaki, and N. S. Thomaidis, "Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment", *Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 66, 32-44.
- A. Rösch, S. Anliker, and J. Hollender, "How biotransformation influences toxicokinetics of azole fungicides in the aquatic invertebrate *Gammarus pulex*", *Environmental Science and Technology*, **2016**, 50, 7175-7188.
- A. Kretschmann, R. Ashauer, K. Hitzfeld, P. Spaak, J. Hollender, and B. I. Escher, "Mechanistic toxicodynamic model for receptor-mediated toxicity of diazoxon, the active metabolite of diazinon, in *Daphnia magna*", *Environmental Science and Technology*, **2011**, 45, 4980-4987.
- E. L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. P. Singer, and J. Hollender, "Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence", *Environmental Science and Technology*, **2014**, 48, 2097-2098.
- OECD, "OECD 202 - *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test", **2004**.
- T. Kind, and O. Fiehn, "Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry", *BMC Bioinformatics*, **2007**, 8, 105.
- A. Bahlmann, W. Brack, R. J. Schneider, and M. Krauss, "Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal", *Water Research*, **2014**, 57, 104-114.
- M. Gu, Y. Wang, X. G. Zhao, and Z. M. Gu, "Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20, 764-770.
- P. Partani, Y. Modhave, S. Gurule, A. Khuroo, and T. Monif, "Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 50, 966-976.
- E. Tudela, K. Deventer, L. Geldof, and P. Van Eenoo, "Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry", *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7, 95-108.
- J. Jeon, D. Kurth, R. Ashauer, and J. Hollender, "Comparative toxicokinetics of organic micropollutants in freshwater crustaceans", *Environmental Science and Technology*, **2013**, 47.
- W. Alderton, S. Berghmans, P. Butler, H. Chassaing, A. Fleming, Z. Golder, F. Richards, and I. Gardner, "Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae", *Xenobiotica*, **2010**.