

한강 및 서울시 하수처리장내 타미플루 대사체(OC)의 농도 및 특성

환경연구개발팀

김현수 · 김진아 · 어수미 · 박찬구 · 김민영

Characteristics and Concentration of Oseltamivir Carboxylate(OC) in the Han River and Sewage Treatment Plants in Seoul

Environmental Research & Development Team

**Hyun-soo Kim, Jin-a Kim, Soo-mi Eo,
Chan-koo Park and Min-young Kim**

Abstract

Oseltamivir is widely used as treatment for seasonal flu. OC(oseltamivir carboxylate), a metabolites of OP(oseltamivir phosphate) is excreted from patient into the environment. In this study, the Han river and sewage treatment plant(STP) influent and effluent samples were collected between February and July, 2010. An analytical method for the detection of OC in samples was established. Samples were treated using the SPE pretreatment method, and then, analyzed via LC-MS/MS. OC was present in both the Han river and STP. In a February, OC was highest concentrations. However, in a June, not detected. The mean concentrations on each of the samples were 16.67 ng/L in influent, 13.80 ng/L in effluent, and 2.99 ng/L in surface water. In addition, based on the OC analyses in the water environments, the concentration distribution and characteristics were investigated.

Key words : influenza A virus(H1N1), oseltamivir phosphate, oseltamivir carboxylate, Han river, STPs, LC-MS/MS

서 론

신종인플루엔자A(H1N1) 바이러스는 동물원성 감염증으로 야생오리에 다량 서식하며, 돼지, 말, 바다표범, 개 등의 포유동물도 감염시킨다(1). 이 바이러스는 지난 몇세기 동안 인간을 감염시켜 범유행성 플루(flu pandemic)와 계절성 유행 인플루엔자를 발생시켰으며, 이와 관련된 사망자가 꾸준히 증가하였다(2, 3). 타미플루는 뉴라미니다제(neuraminidase) 억제제로써, 바이러스의 뉴라미니다제를 억제하여 바이러스가 체내의 다른 세포에 퍼지거나 감염을 억제하는 역할을 하며, 범유행성 인플루엔자의 치료 및 예방에 쓰이는 항바이러스제 중에 가장 중요한 역할을 하는 항바이러스제로써, 계절성 인플루엔자의 치료제로 광범위하게 사용되고 있다. 타미플루(OP : oseltamivir phosphate)는 전구약물(prodrug : 생체내에서의 대사과정에 의해 변환되어서 비로소 약리작용을 나타내는 약물군)로 인간의 간에서 광범위하게 대사되어 OC(oseltamivir carboxylate)라는 활성물질로 변환되고 더 이상 대사되지 않는다. 결국 OP의 80%이상은 OC로 환자의 소변을 통하여 배설된다(1, 3). 배설된 OC는 하수처리장을 거쳐 완전히 제거되지 않기 때문에 다른 약리활성물질과 함께 환경 내에 유입될 수 있으며, 환경에 노출된 OC는 타미플루에 내성을 가진 새로운 바이러스 출현의 가능성을 야기한다(4). 2010년 2월에서 7월까지 한강 본류 및 서울시 하수처리장 유입수와 방류수를 대상으로 SPE(solid phase extraction) 방법으로 전처리한 후에 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였으며, 분석결과를 바탕으로 수환경내 OC의 농도분포와 특성을 조사하였다.

실험방법

1. 시료채취

본 연구를 위해 2010년 2월에서 7월까지 하천수, 하수처리장 유입수와 방류수를 1개월에 한번(2L) 채취하였다. 서울시 하수처리장 4지점(난지하수처리장, 서남하수처리장, 중랑하수처리장, 탄

천하수처리장)과 하수처리장 방류수의 유입지점인 행주, 한남, 성수, 잠실의 한강 4지점을 선정하여 수행하였다.

2. 시약 및 기구

표준시약 Oseltamivir carboxylate(OC)와 내부표준물질 Deuterated oseltamivir carboxylate(OC-D3)는 스위스 로슈사 제품을 사용하였으며, 표준원액은 개미산 0.1%가 포함된 증류수를 사용하여 1,000 µg/mL의 농도로 만들어 보관하였으며, 분석시에 표준원액을 단계 희석하여 표준용액으로 제조하여 사용하였다. 타미플루 대사체(OC) 분석을 위하여 TSQ Quantum ultra 질량분석기와 Accela HPLC가 장착된 Thermo사의 LC-MS/MS를 사용하였다.

3. 분석방법 비교

현재 OC 분석에 대한 공정시험법이 없어 Gopal의 실험방법(4)을 변형하여 실험하였다.

Gopal의 실험방법과 본 실험의 가장 큰 차이점은 최종 추출액과 스탠다드 희석용액이다. 참고문헌의 경우 최종 추출액을 0.1% 개미산이 첨가된 20% acetonitril을 사용하였고, 스탠다드 희석용액은 메탄올을 사용하였으며, 동일한 방법으로 분석한 결과 90%이상의 높은 회수율을 보였다. 하지만 스탠다드 제조 용액별로 분석한 결과 기기감도의 차이를 보였으며(표 1), 최종 추출액과 스탠다드 제조 용액이 다를 경우 정확한 회수율을 얻기가 어려웠다. 따라서 본 실험은 최종추출액과 스탠다드 제조 용액을 0.1% 개미산이 첨가된 증류수로 동일하게 조정하여 증류수 및 시료에 외부

Table 1. Comparison of standard solution

	120.0m/z(Area)	137.9m/z(Area)
A	254471	746360
B	135502	422854
C	162267	485349

A : 0.1% formic acid in DW.

B : 0.1% formic acid in 20% acetonitrile.

C : DW.

표준물질과 내부표준물질을 주입하여 예비실험을 하였으며(n=7), 평균 약 80% 이상의 높은 회수율을 확인하여 본 실험방법으로 채택하였다. Gopal 실험방법과 본 실험의 차이점은 표 2에 나타내었다.

Table 2. Comparison of SPE methods

	Gopal(4)	This study
Cartridge	HLB(200 mg)	HLB(1g)
Eluent solution	Methanol (2% NH ₃)	Methanol (0.1% NH ₃)
Mass up	20% ACN (0.1% Formic acid)	DW (0.1% Formic acid)
N ₂ Dry	0.5 mL	Perfect
Standard solution	Methanol	DW (0.1% Formic acid)

4. 전처리 준비

채취한 시료는 하천수와 방류수 500 mL, 유입수 300 mL를 여과(5C, 110 mm)하여 부유물질을 제거하였고, 여과한 시료는 황산을 첨가하여 pH를 4로 조정 한 후에 ascorbic acid(1g/L)와 NaCl(1 g/L), 내부표준물질(OC-D3)을 첨가하여 전처리를 준비하였다.

5. 추 출

타미플루 대사체(OC) 추출을 위해 HLB 카트리 지(Waters, 1g)와 Sep-pak Amino Propyl 카트리지(Waters, NH₂)를 사용하였다. 시료를 통과 시키기 전에 methanol 6 mL와 증류수 6 mL를 순서대로 흘려주어 카트리지를 활성화시킨 후에 시료를 유속 5 mL/min으로 HLB 카트리지에 통과 시켰다. 분리 후에 증류수 10 mL를 통과 시키고 1~2시간 공기 중에 건조하여 수분을 제거한 후, NH₂ 카트리지를 결합하여 암모니아 0.1%가 포함된 methanol 6 mL를 사용하여 추출하였다. 추출액은 질소농축기를 사용하여 완전건조 시킨 후 개미산 0.1%가 포함된 증류수로 최종부피를 1 mL

로 맞추어 2 mL 바이알에 옮겨 담았다.

6. LC-MS/MS

타미플루 대사체 분석을 위해 ESI 양이온 모드에서 precursor ion(285.2 m/z)과 production (137.9, 120.0 m/z)을 선택하고 분석조건을 설정하여 Hypersil Gold C₁₈(1.9 μm, 50×2.1 mm) 컬럼과 이동상을 사용하여 분석하였다. 이동상 조건은 표 1과 같으며, 시료당 분석시간은 10분이 고, 머무름 시간은 3.47분에 나타났다. OC 분석을 위한 분석 조건은 표 3에 나타내었다.

7. 정도관리

타미플루 대사체의 정성확인을 위해 표준물질과 시료의 머무름 시간과 생성이온을 비교하였다. 표준물질의 농도와 피크면적 비를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 내부표준법을 사용하여 정량하였다. 검량선은 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 ng/mL의 농도로 제조된 표준용액을 분석하여 작성하였으며, R²값은 0.999이상의 높은 상관관계를 나타내었다(그림 1). 표준용액과 시료별 크로마토그램은 그림 2에 나타내었다.

검출한계는 기기검출한계(IDL)의 5배에 해당하는 농도를 선정한 후 해당 농도의 표준물질을 정제수에 주입하여 전처리한 후 7번 반복분석 하여 반복 분석한 농도의 표준편차 값을 구해 이 표준편차 값의 3.14배에 해당하는 농도를 검출한계(MDL) 값으로 정하였다. 정확도는 현장시료의 농도

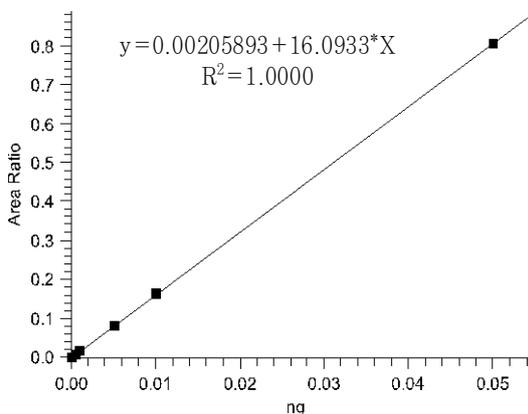


Fig. 1. Calibration curve of OC standard.

Table 3. LC-MS/MS condition for the determination of OC

Parameters	Condition								
Mobile Phase	A : 0.1% formic acid in D.W. B : Acetonitrile								
Gradient(min)	2	4	4.3	5.3	5.8	8	8.5	10	
	A (%)	90	25	10	10	90	90	100	100
	B (%)	10	75	90	90	10	10	0	0
Injection volume	10 μ L								
Ion mode	ESI ⁺								
Run time	10 min								
Collision energy	17, 25 eV								
Spray voltage	4,000 V								
Vaporizer temperature	300 $^{\circ}$ C								

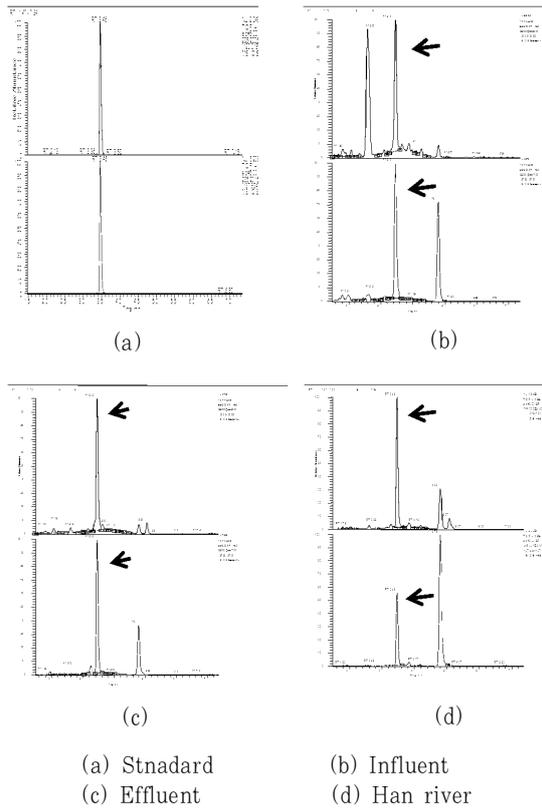


Fig. 2. Representative ion chromatograms of standard and sample. Arrows mean OC peak.

수준을 고려하여 농도를 선택한 후 7개의 시료에 첨가, 조제하여 절대회수율로 평가하였으며, 정밀도는 한 개의 시료를 7회 반복분석 하여 반복분석의 변이로서 평가하였다(8, 9). 시료의 검출한계는 하수처리장 유입수 0.70 ng/L, 하수처리장 방류수와 하천수는 0.25 ng/L의 값(S/N=10 이상)을 보였으며, 정확도는 하천수 91.2%, 하수처리장 방류수 84.1%, 하수처리장 유입수 60.4%이며, 정밀도는 4.8%를 나타내었다. 본 실험은 시료의 특성에 따라 차이를 보이긴 하지만 전반적으로 만족할 만한 수준으로 나타났다.

결과 및 고찰

1. 잔류농도

각 시료별 OC의 최대농도는 하수처리장(STP : sewage treatment plant) 유입수(2월 : 서남하수처리장)에서 42.36 ng/L의 농도로 검출되었고 방류수(3월 : 중랑하수처리장)에서 36.09 ng/L의 수준으로 나타났으며, 한강(2월 : 행주)에서 14.11 ng/L의 농도로 검출되었다. 수환경내 OC 잔류농도는 표 4~6에 나타내었다.

한강 및 하수처리장에서 검출된 OC 농도는 기간

Table 4. Concentration of OC in STP influent (Unit : ng/L)

	Nanji	Jungnang	Tancheon	Seonam	Average
February	32.54	33.13	37.51	42.36	36.39
March	25.00	30.10	42.22	23.07	30.10
April	17.37	40.23	28.49	23.87	27.49
May	3.22	4.92	13.09	3.02	6.06
June	ND	ND	ND	ND	-
July	ND	ND	ND	ND	-

Table 5. Concentration of OC in STP effluent (Unit : ng/L)

	Nanji	Jungnang		Tancheon	Seonam	Average
		site 1	site 2			
February	26.77	31.21	27.31	31.90	33.60	30.16
March	26.97	36.09	35.17	21.34	23.14	28.54
April	17.30	17.41	19.11	23.60	21.01	19.69
May	4.60	3.65	4.51	5.36	3.81	4.39
June	ND	ND	ND	ND	ND	-
July	ND	ND	ND	ND	ND	-

Table 6. Concentration of OC in the Han river (Unit : ng/L)

	Haengju	Hannam	Sungsu	Jamsil	Average
February	14.11	8.43	9.18	3.76	8.87
March	12.54	5.19	1.49	1.00	5.06
April	6.94	4.90	2.39	1.88	4.03
May	ND	ND	ND	ND	-
June	ND	ND	ND	ND	-
July	ND	ND	ND	ND	-

의 차이는 있지만 일본 최대 잔류농도(하수처리장 방류수 : 293.3 ng/L, 하천수 : 18 ng/L)보다 낮은 수치로 나타났다(4, 5).

2. 월별 농도특성

2월에서 7월까지 월별 평균 잔류농도는 표 2~4에 나타내었다. 하수처리장의 경우 2월에서 5월까

지 유입수 83.4%, 방류수 85.4% 감소하였으며, 한강은 4월까지 54% 감소하였다. 특히 그림 3과 같이 5월에는 하수처리장 유입수와 방류수에는 잔류하였지만 한강에서는 검출되지 않았으며, 6월부터는 하수처리장과 한강에서 모두 검출되지 않았다.

월별 하수처리장 및 하천수의 처리량 및 유출량

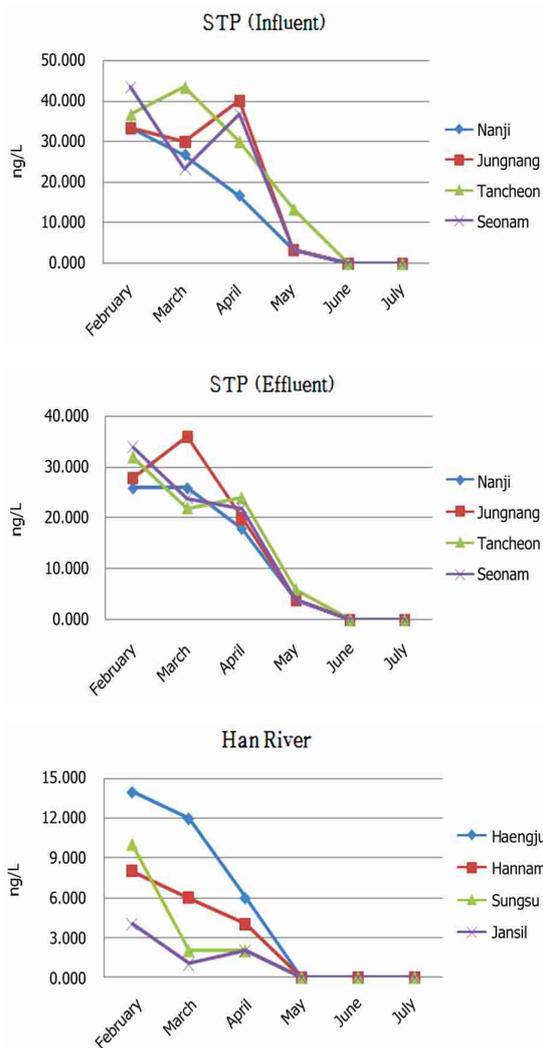


Fig. 3. Monthly variation of OC concentration in water environment.

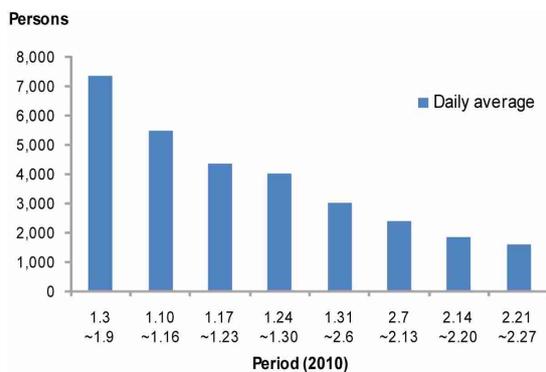


Fig. 4. Medication status of antiviral(7).

등의 정확한 자료확보에 어려움이 있어 희석배수 등의 고찰은 이루어지지 않았지만, 2009년 말에 대유행 하였던 신종인플루엔자는 유행계절이 지남에 따라 신종인플루엔자 발병률이 낮아졌고, 항바이러스제 투약률 또한 감소하였으며(그림 4)(7), 이와 관련되어 월별 OC농도의 감소 현상이 나타나는 것으로 판단한다.

3. OC농도 비교

각 시료별 평균농도를 비교한 결과 하수처리장에 유입되어 하수처리공정을 거치면서 20%정도 감소된 후에 방류되어 한강에 유입되는 과정에서 OC는 하수처리장 방류수 잔류농도의 78.5% 정도 감소되지만 분해되지 않고 하천에 잔류하는 것으로 나타났다(그림 5). 또한 한강으로 유입되는 지점별 하수처리장의 방류수 내 OC의 평균잔류농도(그림 6)를 고려하여 한강 지점별 OC 잔류농도를 비교해본 결과 하류지점인 행주가 상류지점인 잠실보다 78.1% 높은 농도로 나타났다(그림 7).

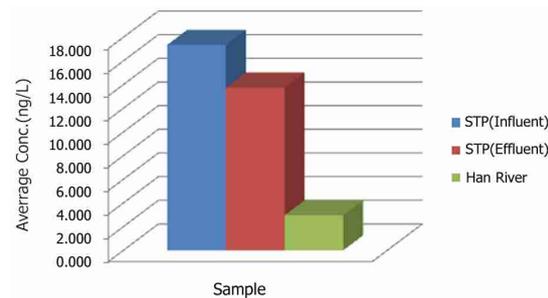


Fig. 5. Comparison of OC mean concentration between water sample.

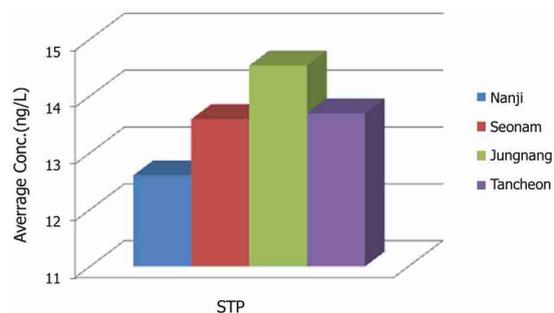


Fig. 6. Comparison of OC mean concentration between STPs effluent.

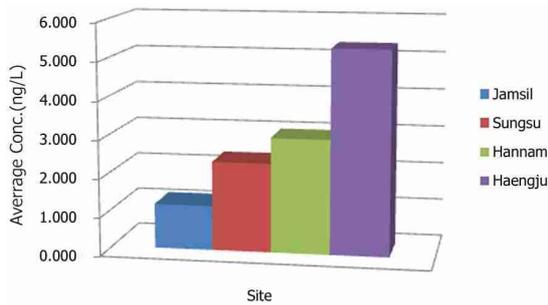


Fig. 7. Comparison of OC mean concentration between Haengju and Jamsil.

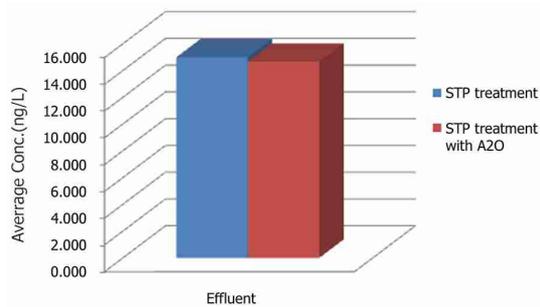


Fig. 8. Comparison of OC concentration among STP effluent.

중랑하수처리장 일반방류수와 고도처리(A2O공법)를 거친 방류수의 평균 농도를 비교한 결과 그림 8과 같이 0.33 ng/L 정도로 큰 차이를 보이지 않아 생물학적 고도처리과정에서 잔류의약품 처리 효율이 비교적 낮음을 알 수 있었다.

따라서 물에 안정하며, 수환경내 반감기가 1년 이상인 물질(2)인 OC는 하수처리장에서 완전히 제거되지 않고, 방류수를 통하여 하천으로 이동하여 잔류하며, 단기간에 분해되지 않는 것으로 나타났다. 수환경에 배출되어 잔류하는 OC는 인플루엔자 A 바이러스를 저항성 바이러스로 전환시켜 타미플루 저항성 바이러스의 출현 및 확산과 같은 문제를 일으킬 수 있다(1).

결론

2010년 한강 및 서울시 하수처리장 유입수와 방류수를 대상으로 타미플루 대사체(Oseltamivir

carboxylate, OC)를 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. OC는 모든 지점에서 ng/L 수준으로 검출되었다. OC는 신종인플루엔자A(H1N1)가 유행하여 타미플루를 많이 처방한 겨울(2월)에 가장 높은 농도로 검출되었으며, 유행시기가 지나감에 따라 수환경내 잔류농도가 감소하였다. 여름(6, 7월)에는 모든 지점에서 잔류하지 않는 것으로 나타났다.
2. 한강 및 서울시하수처리장에서 검출된 OC 농도는 EMA(European Medicines Agency)에서 제시한 타미플루 예측 무영향농도(100 µg/L)보다 매우 낮았다. 하지만 하수처리장(일반하수처리, 생물학적고도처리)에서 완전히 제거되지 않고, 방류수를 통하여 하천으로 이동하여 잔류하는 것으로 나타났다.

신종인플루엔자A(H1N1)는 계절성 유행 질환으로 환자가 꾸준히 발생하고 있으며, 타미플루 또한 꾸준히 처방되고 있다. 타미플루 등 저항성 바이러스의 등장 및 감염이 세계적으로 문제가 되고 있는 시점에서 OC와 관련된 지속적인 연구와 조사가 필요하다.

감사의 글

본 실험 중 시료채취에 협조해주신 수질부(수질화학팀, 수환경생태팀)에 감사드립니다.

참고문헌

1. Jerker F, Richard HL, Mats T, Paul DH, Jonas W, Anders W and Bjorn O : Antiviral Oseltamivir is not removed or degraded in normal sewage water treatment : Implications for development of resistance by Influenza A virus. PLoS ONE (10) e986, 2007.

2. Oxford JS : Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918 : virology, pathology and epidemiology. *Rev. Med. Vir.*, 10:119~133, 2000.
3. Andrew CS, Miles AN, Ernest AG and Anerew CJ : Potential Risks Associated with the Proposed Widespread Use of Tamiflu. *Environmental Health Perspectives*, 115(1):102~106, 2006.
4. Gopal CG, Norihide N, Naoyuki Y, Hiroaki T : Oseltamivir carboxylate, the active metabolite of oseltamivir phosphate (Tamiflu), detected in sewage discharge and river water in Japan. *Environmental Health Perspectives*, 118(1):103~107, 2010.
5. Hanna S, Josef DJ, Bjorn O, Richard HL, Hiroaki T and Jerker F : Detection of the Antiviral Drug Oseltamivir in Aquatic Environments. *PLoS ONE* (6) e6064, 2009.
6. Peter B and Wolf von Tumpling Jr : The environmental fate of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in different waters. *Science of the total environment*, (405):215~225, 2008.
7. 질병관리본부 : <http://www.cdc.go.kr>
8. 국립환경과학원 : 잔류의약품질 분석방법 연구 및 실태조사 최종보고서. 2008.
9. US EPA : Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. 2007.
10. Maria LS, Cesare A, Jerker F, Richard L and Bjorn O : Environmental fate of the antiviral drug Tamiflu in two aquatic ecosystems. *Chemosphere*, 75: 28~33, 2009.
11. European Medicines Agency : <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=search.jsp&q=Tamiflu&btnG=Search&murl=&mid=>
12. Beate IE, Nadine B, Judit L, Judith N and Jurg OS : Mixture toxicity of the antiviral drug Tamiflu(Oseltamivir ethylester) and its active metabolite oseltamivir acid. *Aquatic Toxicology*, 96(3):194~202, 2009.
13. Thomas HH, Amanda B, Patricia E F, James WR, Jenny PS and Jurg OS : Extending the environmental risk assessment for oseltamivir(Tamiflu) under pandemic use conditions to the coastal marine compartment. *Environment International*, 35:931~936, 2009.
14. Jurg OS : An environmental risk assessment for oseltamivir(Tamiflu) for sewage works and surface water under seasonal-influenza-and pandemic-use conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72:1625~1634, 2009.
15. Aeron CH, Jessica KH and Ian GB : In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H5N1) influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10):4433~4440, 2009.
16. Menno DD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Gavin JDS, Nguyen VC, Bach VC, Phan TQ, Do QH, Yi G, J.S. Malik Peiris, Tran TH and Jeremy F : Oseltamivir resistance during treatment of Influenza A(H5N1) infection. *N. Engl. J. Med.*, 353(25):2667~2672, 2005.