



## NMR-based metabolic responses of the zebrafish exposed to Benzo[a]pyrene

Sujin Lee, Seonghye Kim, and Suhkmann Kim\*

Department of Chemistry and Chemistry Institute for Functional Materials,  
Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

Received Dec 12, 2022; Revised Dec 20, 2022; Accepted Dec 20, 2022

### Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP), one of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), is an endocrine disruptor and carcinogenic. This study was conducted to investigate the metabolic changes of zebrafish short-term exposure to BaP using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In our results, the multivariate analysis showed that the metabolic responses were differed according to the exposure concentration. Also, it was observed that exposure to high concentration of BaP (162 µg/L and 1620 µg/L) increased the levels of creatine, histidine, and inosine in zebrafish, which means high concentration of BaP exposure affected the energy metabolism and immune function in zebrafish.

**Keywords** zebrafish, benzo[a]pyrene, PAHs, metabolomics, NMR

### 서문

다환방향족탄화수소류(Polycyclic aromatic hydrocarbons, 이하 PAHs)는 식품에 존재하는 탄수화물, 단백질, 지방 등이 불완전 연소되어 생성된다. 특히 식품의 제조·조리·가공과정에서 생성되어 잔류되는 유해물질은 미량일지라도 음식물을 통해

일생동안 섭취되기 때문에 안정성에 대한 문제가 대두되고 있다. 환경으로부터 노출된 PAHs는 토양의 지하수, 담수를 통해 최종적으로 해양에 유입되며, 이는 해양생물에서 산화 스트레스, DNA, 지질 등의 생체 고분자 시스템의 손상 및 신경 독성, 유전독성을 유발한다. 특히, PAHs중에서도 벤조피렌 (benzopyrene, 이하 BaP)은 황색의 결정성 고체로 300~600 °C 사이 온도에서 불완전연소로 인해 생성되기 때문에 숯불에 구운 고기 등 가열로 인해 검게 탄 식품과 그 외에도 음식 섭취, 담배 흡연, 자동차 배기가스, 쓰레기 소각장 연기 등 오염원이 매우 다양하다. BaP는 퇴적물과 입자상 물질에 강하게 흡착되어 생물학적 시스템에서 활성화되며, 결과적으로 반응성 대사산물은 조직에 결합하여 미량으로도 인간에게 발암성 돌연변이를 일으킬 수 있다. 실제로 독성시험대상 생물종인 zebrafish (*Danio rerio*)에 BaP를 노출시켜 심폐기능을 분석한 연구에서는 산소 요구량은 증가함에 불구하고 심박수가 유의하게 감소한 결과를 보였다.<sup>1</sup> 또한, BaP를 배아 상태의 zebrafish에 노출시켜 세대 간에 유전적 영향, 행동학적, 생리적 및 신경행동학적 지표를 분석한 연구<sup>2</sup>

\* Address correspondence to: **Suhkmann Kim**, Department of Chemistry and Chemistry Institute for Functional Materials, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea, Tel: 82-51-510-2240; Fax: 82-51-516-7421; E-mail: suhkmann@pusan.ac.kr

등 다양한 해양 생물을 이용한 BaP의 독성 연구가 진행되어왔다<sup>3,4</sup>. Palanikumar 등 (2012)의 연구 결과, BaP에 노출된 갯농어 *Chanos chanos*에서 지질과산화물 (Lipid peroxidation)과 카탈라아제 (Catalase)의 증가 및 아세틸콜린에스터라아제 (Acetyl choline esterase)의 활성이 감소됨을 밝혔으며, 이는 BaP의 노출이 잠재적으로 생물체에 산화적 스트레스 및 신경 독성을 유발할 수 있음을 의미한다.<sup>5</sup> 하지만 BaP의 잠재적 발암성뿐만 아니라 간 독성, 면역 독성 및 생식 독성 등에 대한 다양한 유해성 평가가 진행되어 왔음에도 불구하고 대사체학 관점에서 BaP의 노출이 생물체의 대사시스템에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다.

대사체학 (metabolomics)은 오믹스(-omics)라는 커다란 학문의 한 분야로서, 1500 Da (Dalton) 이하의 저분자 대사물질을 정성 및 정량 분석하여 생체 내에서 일어나는 대사과정을 연구하고, 대사적 특징과 관련된 중요한 생체 표지자를 동정하며, 대사적 메커니즘을 밝히는 중요한 연구 분야이다. 이는 생명현상의 변화와 원인을 규명해 나가기 위한 연구 분야로써 생체 시스템에서 다양한 유전적, 생리적, 병리적 또는 환경적인 조건에서 일어나는 저분자 대사체군의 패턴과 농도 등을 분석한다. 대표적인 대사체 분석 장비로는 질량분석기 (MS, mass spectrometry)와 핵자기공명분광기 (NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy)가 있으며, NMR의 경우 MS에 비해 감도가 낮은 단점이 있지만, 실험의 재현성 및 신뢰성이 높아 그룹 간에 대사적 차이와 대사경로의 변화를 연구하는데 적합하다. 또한, 시료가 비파괴적이라서 분석 후에 시료회수가 필요한 분석에 유용하다는 장점이 있다. 최근 대사체학을 이용한 BaP에 대한 연구에서는 Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)에 저농도의 BaP 급성 노출이 clam의 에너지 대사 및 삼투압 조절 기능 장애를 유발함이

밝혀졌으며<sup>6</sup>, BaP에 노출된 pearl oyster *Pinctada martensii*의 아가미를 분석한 연구에서는 비정상적인 에너지 대사, 삼투조절 및 면역반응의 변화가 확인되었다.<sup>7</sup>

Zebrafish는 인간의 유전자 정보와 organ system이 유사한 척추동물로써 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하고 유전자 및 단백질 간의 상동성이 매우 높으며 신경계 및 각종 기관형성 과정이 사람과 매우 유사하여 척추동물의 발생 및 유전자 기능 연구에 장점을 가지고 있다. 따라서 환경 오염 물질에 의한 대사체의 영향을 알아보는 데 매우 유용한 생물 종 모델로서 독성 물질 평가 연구에 적합하다.<sup>8</sup>

본 연구에서는 NMR 기반의 대사체학 관점에서 BaP 급성 노출에 따른 adult zebrafish의 대사시스템의 영향을 조사하였다. 본 연구의 목적은 BaP 노출 시 대사 영향을 이해하고 향후 보다 다양한 유해 물질에 대한 대사체학 기반의 독성 연구를 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 실험방법

**Reagents-** 노출 실험에 사용된 Benzo[a]pyrene (BaP; purity,  $\geq 96\%$ )과 dimethyl sulfoxide (DMSO), NMR 측정을 위해 사용된 deuterium oxide ( $D_2O$ , 99.9 atom %D) 및 3-(trimethylsilyl) propionic acid- $d_4$  sodium salt (TSP- $d_4$ )은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 추출용매로 사용된 methanol, chloroform은 Honeywell Burdick & Jackson (MI, USA)에서 구입하였다.

**시험 생물-** 본 연구에서 실험 생물로 사용한 zebrafish (*Danio rerio*)는 그린피쉬 (greenfish, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며, 부산대학교 본 연구실로 옮겨져 2주일 이상 순치하여 사용하였다. 순치 조건은 탈염소화 수돗물  $27 \pm 1^\circ C$ , 광주기 14 L : 10 D

시간을 유지하였으며 하루 3번 먹이를 공급하였다. 시험 실시 24시간 전부터는 먹이 공급을 중단하고 건강한 수컷 제브라피쉬를 선별하여 사용하였다.

**Experiment design**— BaP의 노출 실험 농도를 선정하기 위해 Courtney J. Gerger 및 Lynn P. Weber, (2015) 연구 결과를 참고하여 예비 실험을 진행하였으며, 최종적으로 농도 설정 구간은 폐사율이 나타나지 않은 16.2  $\mu\text{g/L}$ , 162  $\mu\text{g/L}$ , 그리고 1620  $\mu\text{g/L}$ 로 설정하였으며, 1% DMSO에 녹여 working solution을 제조하였다. 2L 유리수조에 Zebrafish를 5마리씩 넣은 후 예비실험을 통해 선정한 working solution (0, 16.2, 162, 1620  $\mu\text{g/L}$ )을 72시간동안 처리하였다. 대조군의 경우 노출군과의 DMSO의 영향을 배제하기 위해 1% DMSO로 설정하였다. 개체별로 섭취량의 차이 및 먹이 섭취 후의 대사 변화가 실험 결과에 영향을 끼칠 수 있으므로 실험을 진행하는 동안에는 먹이 공급을 중단하였다. 실험 종료 후  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 rinsing을 해주었으며, 대사활성을 정지시키기 위하여 액체질소에 얼려, 동결건조를 진행하였다.

**Sample preparation**— 건조된 샘플은 균질화하여 대사체 추출에 사용되었다. 대사체 추출은 methanol, chloroform, and distilled water을 이용하여 변형된 bligh and dyer 방법을 사용하였으며, 이는 다양한 조직 추출에 사용된다.<sup>9</sup> 추출을 통해 얻어진 수용성 상등액은 액체질소에 얼려 동결건조를 진행하였으며, 건조된 샘플은 이후 NMR 스펙트럼 상의 내부기준물질로 사용되는 2mM TSP-d<sub>4</sub>를 포함한 600  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O에 녹여 NMR 측정에 사용되었다.

**NMR spectrum measurement**— 모든 샘플의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 600 MHz Agilent NMR spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 얻어졌으며, 대사체 피크의 정확한 동정 및 정량을 위해 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 펄스 시퀀스를 사용하였다. 대사체 연구에서 CPMG

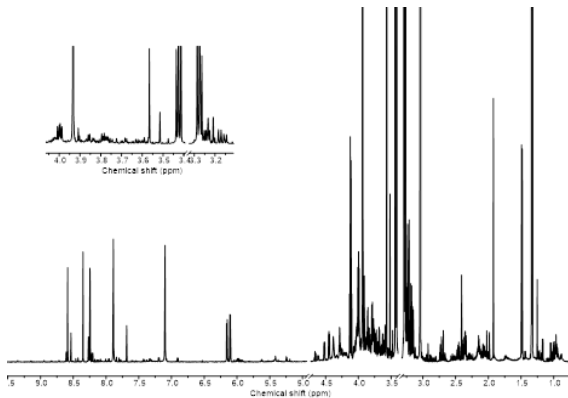
펄스 시퀀스는 T<sub>2</sub> relaxation delay를 조정함으로써 저분자인 대사체 피크를 가릴 수 있는 고분자의 크고 넓은 (broad) peak를 제거하기 위해 사용된다.<sup>10</sup> 모든 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 다음의 조건으로 측정이 이루어졌다; 128 scan, 13.188  $\mu\text{s}$  90° pulse, 3 s relaxation delay 및 3 s acquisition time. 전체 측정 시간은 13분 9초가 소요되었다. 얻어진 스펙트럼은 VnmrJ 4.2 software를 사용하여 phase and baseline correction을 하였다.

**NMR spectrum analysis**— <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 내 대사체의 동정 및 정량분석은 Chenomx NMR Suite 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada)을 사용하였다. 대사체의 정량은 내부 기준물질인 TSP의 농도를 기준으로 절대정량한 후 샘플 내 전체 대사체 농도 (mM) 대비 대사물질 (mM)의 농도, 즉 [대사물질, mM]/[샘플 내 확인된 전체 대사체 농도 합, mM]의 상대농도를 사용하였다.

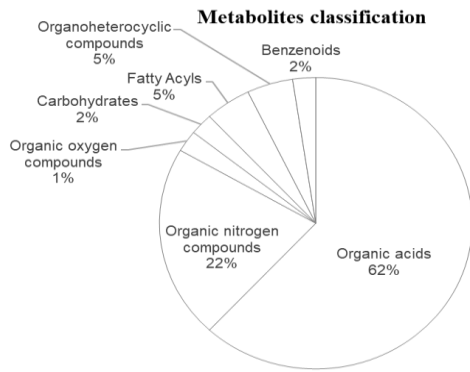
**Statistical analysis**— 그룹 간의 대사체 패턴 차이 확인을 위한 다변량 통계분석을 위해 모든 NMR 스펙트럼은 0.001 ppm 단위로 비닝 (binning)한 후 peak의 chemical shift 보정을 위해 spectrum alignment를 하였다. 비지도 분석에는 주성분 분석 (PCA, Principal Component Analysis)과 지도 분석에는 (O)PLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis)를 사용하였다. 다변량 통계분석에는 Chenomx NMR Suite 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada), MATLAB 8.0 (MathWorks Inc., Massachusetts, USA) 및 SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics, Umeå, Sweden)를 사용하였다. IBM SPSS Statistics 25를 사용하여 Komig-rov -Smirnov test를 통해 대사체 상대농도의 정규성을 검정하였으며, 대조군 대비 각 그룹과의 대사체 농도 변화를 비교하기 위해 student's t-test를 진행하였다 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

**Table 1.** Relative concentration (%) of metabolites identified in zebrafish.

<b>Metabolites</b>	<b>Con</b>	<b>16.2 µg/L</b>	<b>162 µg/L</b>	<b>1620 µg/L</b>
Acetate	0.252 ± 0.137	0.265 ± 0.051	0.234 ± 0.034	0.254 ± 0.033
Alanine	2.645 ± 0.153	1.994 ± 0.268	2.725 ± 0.439	2.683 ± 0.271
Arginine	0.365 ± 0.055	0.409 ± 0.104	0.433 ± 0.065	0.394 ± 0.053
Asparagine	0.392 ± 0.083	0.397 ± 0.085	0.46 ± 0.078	0.472 ± 0.081
Aspartate	0.29 ± 0.016	0.244 ± 0.094	0.29 ± 0.05	0.323 ± 0.026
Betaine	0.303 ± 0.064	0.28 ± 0.042	0.054 ± 0.027	0.062 ± 0.024
Choline	0.395 ± 0.121	0.432 ± 0.026	0.416 ± 0.061	0.485 ± 0.101
Creatine	16.115 ± 1.456	13.404 ± 0.76	19.308 ± 1.234	20.845 ± 1.358
Dimethylamine	25.839 ± 1.725	34.584 ± 1.594	19.862 ± 2.962	17.112 ± 3.035
Ethanol	0.724 ± 0.202	0.764 ± 0.176	0.419 ± 0.229	0.337 ± 0.116
Formate	0.034 ± 0.003	0.046 ± 0.02	0.06 ± 0.008	0.072 ± 0.01
Fumarate	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.005	0.019 ± 0.003	0.023 ± 0.003
Glucose	1.795 ± 0.633	1.955 ± 0.219	1.14 ± 0.32	1.284 ± 0.362
Glutamate	2.14 ± 0.23	2.185 ± 0.307	2.52 ± 0.323	2.311 ± 0.311
Glutamine	0.842 ± 0.141	0.982 ± 0.101	1.101 ± 0.08	1.142 ± 0.071
Glutathione	0.313 ± 0.031	0.271 ± 0.037	0.126 ± 0.023	0.136 ± 0.065
Glycine	1.389 ± 0.356	1.291 ± 0.248	1.595 ± 0.336	1.798 ± 0.314
Guanosine	0.053 ± 0.014	0.054 ± 0.005	0.064 ± 0.009	0.053 ± 0.007
Histidine	4.321 ± 1.364	3.314 ± 0.126	5.684 ± 1.738	5.047 ± 0.811
Hypoxanthine	0.211 ± 0.06	0.196 ± 0.011	0.179 ± 0.044	0.216 ± 0.046
IMP	1.189 ± 0.546	1.207 ± 0.276	1.502 ± 0.68	1.491 ± 0.649
Inosine	2.029 ± 0.535	1.477 ± 0.135	2.139 ± 0.854	2.289 ± 0.605
Isoleucine	0.165 ± 0.036	0.158 ± 0.015	0.155 ± 0.032	0.171 ± 0.016
Lactate	11.278 ± 0.883	10.041 ± 1.186	12.919 ± 1.801	11.084 ± 1.113
Leucine	0.385 ± 0.055	0.301 ± 0.061	0.366 ± 0.099	0.391 ± 0.094
Methionine	0.106 ± 0.041	0.061 ± 0.017	0.103 ± 0.038	0.117 ± 0.022
Methylamine	0.239 ± 0.017	0.321 ± 0.017	0.19 ± 0.036	0.162 ± 0.03
N-Acetylaspartate	0.15 ± 0.018	0.114 ± 0.025	0.156 ± 0.038	0.165 ± 0.014
Niacinamide	0.121 ± 0.012	0.103 ± 0.017	0.105 ± 0.009	0.099 ± 0.012
O-Acetylcarnitine	0.062 ± 0.002	0.055 ± 0.014	0.076 ± 0.01	0.084 ± 0.02
O-Phosphocholine	0.266 ± 0.067	0.537 ± 0.075	0.292 ± 0.12	0.455 ± 0.249
Phenylalanine	0.088 ± 0.012	0.082 ± 0.004	0.083 ± 0.014	0.104 ± 0.028
Pyruvate	0.029 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.031 ± 0.002	0.034 ± 0.002
Succinate	0.347 ± 0.048	0.293 ± 0.041	0.37 ± 0.042	0.368 ± 0.05
Taurine	22.686 ± 1.228	20.067 ± 1.06	22.433 ± 1.661	25.183 ± 1.91
Threonine	0.792 ± 0.146	0.576 ± 0.064	0.992 ± 0.406	1.106 ± 0.266
Trimethylamine	0.038 ± 0.003	0.033 ± 0.002	0.041 ± 0.002	0.043 ± 0.002
Trimethylamine N-oxide	0.141 ± 0.042	0.144 ± 0.035	0.324 ± 0.083	0.269 ± 0.069
Tyrosine	0.088 ± 0.016	0.084 ± 0.015	0.086 ± 0.021	0.104 ± 0.04
Valine	0.306 ± 0.06	0.305 ± 0.03	0.288 ± 0.044	0.323 ± 0.045
myo-Inositol	0.339 ± 0.14	0.197 ± 0.098	0.24 ± 0.032	0.331 ± 0.128
sn-Glycero-3-phosphocholine	0.701 ± 0.424	0.706 ± 0.22	0.399 ± 0.134	0.559 ± 0.139



**Figure 1.** A representative 1-dimensional 600 MHz <sup>1</sup>H NMR spectrum of zebrafish extract of from the control group.

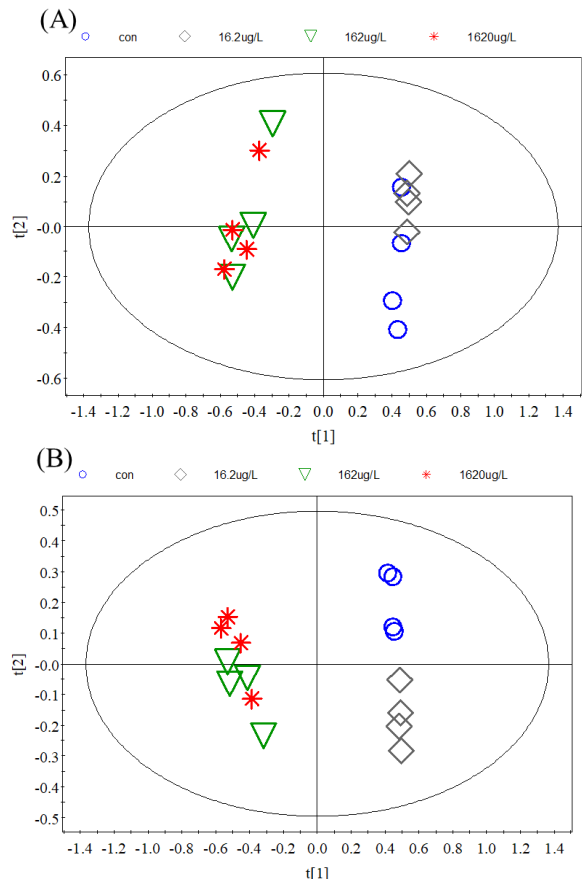


**Figure 2.** Pie chart of the classes of metabolites identified in zebrafish extracts.

**실험결과**

추출한 제브라피쉬의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum 내 대사체는 총 42 개가 검출되었다 (Fig. 1 및 Table 1). 이 중 60 %의 대사체가 organic acid 에 분류되었으며 (Betaine; Creatine; Glycine; Fumaric acid; Formic acid; L-Glutamic acid, 등), 다음으로 organic nitrogen compounds (Dimethylamine; Choline; Methylamine; Trimethylamine; Trimethylamine N-oxide; Inosine; Guanosine; Phosphorylcholine; sn-GPC), Organic oxygen compounds (Ethanol), Carbohydrates (Glucose), Fatty Acyls (Acetate; L-Acetylcarnitine), Organoheterocyclic compounds (Niacinamide; Hypoxanthine) 및 Benzenoids (myo-Inositol)로 분류되었다 (Fig. 2). NMR 스펙트럼을 기반으로 다변량 통계분석을

통해 각 노출 농도군에 따른 대사 패턴을 비교하였다 (score plot). 주성분 t[1]을 따라 저농도와 대조군 및 중·고농도의 뚜렷한 대사 차이를 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 특히 PLS-DA score plot 의 경우 노출군 내에서도 농도에 따른 큰 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 그룹간 차이를 나타내는 대사체 확인을 위해 loading line plot 분석을 진행하였다. Y 축을 기준으로 윗방향에 나타나는 피크는 저농도 노출군과 대조군에 높은 농도로 존재하며, 반면 아랫방향에 나타나는 피크는 중·고농도 노출군에 높은 농도로 존재하는 대사체임을 의미한다. 분석 결과, 노출농도가 높아질수록 dimethylamine 은 감소하였으며, threonine, creatine, histidine, inosine 은 증가함을 확인하였다 (Fig. 4).



**Figure 3.** Multivariate score plot-based NMR spectra. (A) PCA score plot ( $R^2X=0.708$ ,  $Q^2=0.609$ ) and (B) PLS-DA score plot ( $R^2Y=0.978$ ,  $Q^2=0.718$ ).

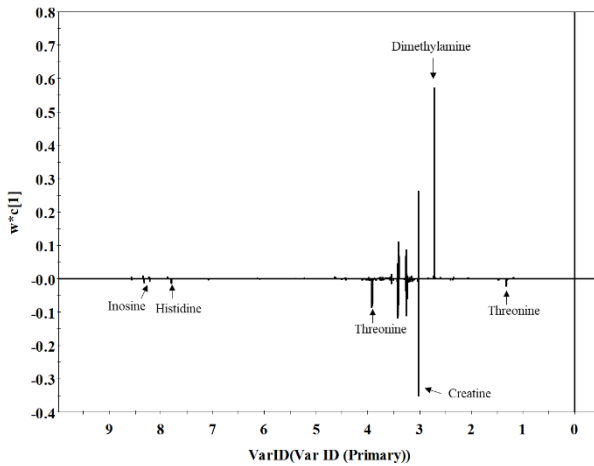


Figure 4. Loading line plot of PLS-DA score plot

## 고찰

본 연구는 핵자기공명분광기를 이용하여 대표적인 발암성 유해물질인 BaP 노출로 인한 제브라피쉬의 대사변화를 알아보려고 하였다. 연구결과, 노출농도에 따른 뚜렷한 차이가 확인되었으며, 특히 중·고농도의 노출군에서 creatine, histidine, threonine, inosine 의 농도가 크게 증가함이 확인되었다.

Creatine 은 인체에서는 글라이신(glycine)으로부터 글라이신 아미노기전이효소(glycine transaminase)의 촉매작용에 의해서 구아니디초산(guanidinoacetic acid)로 전환되고, 다시 GAMT(guanidinoacetate ethyltransferase)에 의해서 합성되게 되는데 주로 간과 신장을 통해 합성되어진다. 이렇게 합성된 Creatine 은 혈관을 통해 골격근과 심근 등의 세포로 전달되며, 전달된 Creatine 은 세포질과 미토콘드리아에서 Creatine 의 극성을 띤 creatine-phosphate (CP)의 형태로 저장되게 되고, 이는 근육 중에 저장되어 에너지원으로써 중요한 역할을 한다. 즉, 골격근의 에너지 대사에 있어서 항상성 조절을 하며 근육의 지속적인 생성에 필요한 대사체로 볼 수 있다.

이와 유사하게 Histidine 도 에너지 대사에 크게 관여하는 대사체이다. Histidine 은 histidase 에 의해 Urocanate 로 전환되고, urocanase 에 의해 Imidazolone propionate 로 전환되며, 그 외에 효소들에 의해 Glutamate 로 전환된다. Glutamate 는 아미노기 전이반응

(transamination)을 통해 -케토글루타르산염(-ketoglutarate)으로 전환되어 TCA cycle 로 들어가 에너지 대사에 관여한다.

Figure 3 을 살펴보면 저농도 노출군에 비해 고농도 노출군에서 Creatine 과 Histidine 이 증가했음을 통해 BaP 투여 후 대사과정 중 에너지 수요가 늘어났음이 추정된다.

Threonine 은 장 점막 단백질 합성에 중요한 역할을 하며 성장 성능, 생화학적 지수, 항산화 기능 및 장 형태에 더 좋은 영향을 미친다. 또한 장 장벽 기능에 영향을 미치는 영양 면역조절제 역할을 한다.

그 외에 Inosine 은 자연적으로 발생하는 퓨린 뉴클레오사이드(purine nucleoside)로, 아데노신(adenosine)의 C-6 탈아미노화(deamination)에 의해 생성된다. 이 대사체는 T 세포와 관련이 있으며 손상을 입은 신경세포의 회복에 도움이 된다고 알려져 있다.

Figure 4 에서 나타나듯이 Threonine 과 Inosine 은 고농도에서 증가했다. 이렇듯 Threonine 과 Inosine 은 면역 기능에 관여를 하며, BaP 노출 후 제브라피쉬의 면역체계에 영향이 있었음이 추정된다.

## 결론

본 연구에서는  $^1\text{H}$  NMR 기반 대사체 분석을 통해 BaP 에 노출된 제브라피쉬의 대사 반응에 대해 조사하였다. OPLS-DA score plot 결과, 저농도 노출군 (16.2  $\mu\text{g/L}$ ) 및 대조군과 중·고농도(162  $\mu\text{g/L}$ , 1620  $\mu\text{g/L}$ )간의 차이가 확연히 구별됨을 발견하였으며, 이를 통해 BaP 의 함량이 높을수록 제브라피쉬의 대사에 영향을 많이 미치는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 OPLS-DA Loading plot 및 대사체 정량분석결과, 저농도에 비해 고농도 BaP 의 노출군에서 inosine, creatine, histidine 이 증가했음을 확인하였으며, 이를 통해 BaP 과량 섭취 시 에너지 수요가 늘어나며, 면역 체계에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 그러나 BaP 은 장기 노출 시 발암 위험성이 커지기 때문에 단기 노출만으로 실험 결과를

판단하기 힘들다. 따라서 대사의 변화를 판단된다.  
효과적으로 알아보기 위해 장기적으로 BaP 을  
투여한 실험이 추가적으로 필요할 것으로

## 감사의 글

이 작품은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)의 지원을 받아 연구되었다.

## References

1. C. J. Gerger and L. P. Weber, *Aquat. Toxicol.* **165**, 19 (2015)
2. A. L. Knecht, L. Truong, S. W. Marvel, D. M. Reif, A. Garcia, C. Lu, and R. L. Tanguay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **329**, 148 (2017)
3. L. Huang, Z. Zuo, Y. Zhang, M. Wu, J. J. Lin, and C. Wang, *Chemosphere* **108**, 55 (2014)
4. D. Gao, J. Lin, K. Ou, Y. Chen, H. Li, Q. Dai, and C. Wang, *Environ. Pollut.* **240**, 403 (2018)
5. L. Palanikumar, A. K. Kumaraguru, C. M. Ramakritinan, and M. Anand, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **75**, 187 (2012)
6. L. Zhang, X. Liu, L. You, D. Zhou, Q. Wang, F. Li, and H. Wu, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 2, 218 (2011)
7. H. Chen, X. Diao, H. Wang, and H. Zhou, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **156**, 330 (2018)
8. Í. F. S. Gonçalves, T. M. Souza, L. R. Vieira, F. C. Marchi, A. P. Nascimento, and D. F. Farias, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27**, 10, 10185 (2020)
9. S. Lee, S. Oh, S. Kim, W. Lee, J. Choi, H. Lee, and S. J. Kim, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **24**, 4, 104 (2020)
10. Y. S. Jung, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 3, 96 (2017)