

형광유도체화법을 이용한 Moxidectin 정량 및 피하주사 후 돼지에서의 잔류 연구

장범수 · 임중환 · 박병권 · 김민규¹ · 윤효인*

충남대학교 수의과대학

¹서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2004년 2월 23일)

Study on the quantitation of moxidectin by fluorescence derivatization and it's residual after subcutaneously injection in pigs

Beom-su Jang, Jong-hwan Lim, Byung-kwon Park, Min-Kyu Kim¹, and Hyo-in Yun*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: February 23, 2004)

Abstract : We established a new method to analyze moxidectin using high performance liquid chromatography(HPLC) with fluorescence derivatization in order to obtain its residual profiles in biological samples. Recovery of moxidectin in tissue was 62% at 10 ppb. Average detection reproducibility in terms of coefficient variation was 4.47% at 0.32 to 10 ppb. Residual of moxidectin was studied in 44 Yorkshire-Landrace mixed bred male pigs administered subcutaneously 0, 200, or 800 µg/kg body weight (BW). Residual profiles of moxidectin in blood, muscle, liver, kidney and fat of pigs were described. The concentration of the moxidectin in liver after administration of moxidectin was the highest among the tissues examined. Moxidectin in liver after administration of moxidectin as 200 µg/kg BW was declined from 10.0±3.7 ng/g at 10 day post administration to 0.5±0.3 ng/g level at 40 day post administration. Residual levels of moxidectin in all samples were estimated to fall below the limit of quantitation (0.32 ng/ml) after 50 day after treatment of 200 µg/kg. Moxidectin showed no abnormal observations in all the clinical findings at any concentrations under these experimental conditions. In conclusion, this analysis method by HPLC after fluorescence derivatization was very effective for the detection of moxidectin in biological samples. We suggest that 50-day is safe enough for the withdrawal time of moxidectin in pigs, following the recommendation dose by the manufacturer.

Key words : fluorescence derivatization, HPLC, moxidectin, residual concentration

서 론

산업동물에 있어 내·외부 기생충 감염은 직접적으로 빈혈, 영양장애, 기능장애, 면역반응을 야기시킬 뿐 아니라 증체·산란·유생산 저하 등 이차적 손실을 일으키기 때문에 경제동물의 생산성 향상을 위하여 구충요법은 매우 중요하다. 산업동물은 특성상 과밀사육되고 있어 이에 연계된 기생충 감염 확산이 상존하고 있기 때

문에 대부분의 농장에서는 구충프로그램을 실시하고 있다.

Avermectin류는 Burg 등 [3]에 의해 1979년대 말에 개발되어 넓은 구충범위와 안전성으로 세계적으로 널리 사용되고 있는 구충제이다. Avermectin류는 방선균인 *Streptomyces avermitilis*가 산생하는 것으로서 화학적으로 거대 환상의 lactone 환을 가지고 있는데 구조내 이중 결합의 유무 및 주요 관능기의 차이에 따라 abamectin

*Corresponding author: Hyo-in Yun

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[Tel: +82-42-821-6759, Fax: +82-42-822-5780, E-mail: hiyun@cnu.ac.kr]

(ivermectin B_{1a}), ivermectin (22,23-dihydroavermectin B_{1a}), doramectin (25-cyclohexylavermectin B₁) 등 여러 avermectin 류로 나누어지고 있다 [7]. Milbemycin은 1973년에 개발되어 초기에는 농작물에 살충제로 활용되다가 1980년대 중반에 개의 심장사상충 및 연충류 구제력이 확인되면서 수의용으로 활용되기 시작하였다 [2, 10]. Milbemycin류는 avermectin류에 비하여 구조적인 차이는 크게 C₁₃번 위치에 이당이가 결핍되어 있는 것이다. Avermectin류와 milbemycin류의 구충 기전은 기생충의 외피를 투과하여 흡수되어 GABA의 방출을 촉진하고 동시에 방출된 GABA_A의 수용체 혹은 glutamate 수용체에 연계된 Cl⁻ 막투과성을 증대시켜 과분극을 유도하여 근신경연접의 신호전달을 억제하고 나아가 마비를 일으켜 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [1]. 이들 약물은 돼지에서 크게 문제가 되고 있는 위장관 선충류 (*Ascaris suum*, *Hyostroglylus rubidus*, *Oesophagostomum spp.*, *Strongyloides ransomi*), 폐선충 (*Metastrongylus spp.*), 이 (*Haematopius suis*), 진드기 등 내외부 기생충에 구충 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다 [1, 11]. Milbemycin류의 하나인 moxidectin은 avermectin류와 마찬가지로 구충 약력(potency)이 매우 높아 체중 kg 당 200 µg이라는 현저히 낮은 용량으로 사용되기 때문에 다른 약물에 비해 잔류의 우려는 낮으나, 높은 지질친화성으로 인해 긴 반감기를 나타낼 것으로 판단된다. Avermectin류에 대한 분석은 주로 형광화 방법을 이용한 고속액체크로마토그래피법들이 보고되고 있으나, 국내에서 moxidectin에 대한 분석법 연구 및 동물체내잔류성에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 생체 시료에서 예상되는 moxidectin의 농도 분석은 통상의 HPLC 자외선 검출기에 의한 최소검출농도보다 낮아 이를 높이기 위해 생체시료 중의 moxidectin을 분리·정제한 후 이를 형광 유도체법을 통한 분석법의 확립이 요구되고 있다.

본 연구에서는 moxidectin의 형광 유도체화를 통한 형광검출기를 이용하여 분석법을 확립하고 실제로 moxidectin의 추천 용량인 200 µg/kg과 그 4배 용량인 800 µg/kg를 돼지에 피하주사한 후 계획된 시기에 각각 도살하여 수거한 조직에서 잔류량을 형광유도체화법을 이용하여 moxidectin의 잔류특성 및 잔류소실을 평가하였다.

재료 및 방법

공시약품

주식회사 한풍에서 공급하는 moxidectin 제제 (싸이벡틴, 주식회사 한풍)를 사용하였다. 이 제제는 moxidectin 1%로서 ml 당 10 mg의 유효성분이 함유되어 있다.

시험동물

청주 인근 지역의 양돈장에서 사육되고 있는 5~6주령의 Yorkshire-Landrace 교잡종 숫컷 자돈을 구입한 후 실험 돈사를 배정받아 1주일의 순화기간을 거친 후 잔류 시험에 사용하였으며 사료와 음수는 자유 급여시켰다. 사료는 구충제가 함유되어 있지 않는 사료를 그리고 음수는 상수도를 이용하였다.

시험군의 구성 및 약물투여 방법

시험군은 대조군 (x 0), 치료용량군 (x 1), 고용량군 (x 4)으로 3군으로 하고, 대조군은 무처치군으로, 치료용량군은 임상투여용량인 체중 kg 당 200 µg/kg으로, 그리고 고용량군은 임상투여용량의 4배 용량인 800 µg/kg으로 설정하였다. 약물은 돼지의 경배부위에 피하주사하였으며, 치료용량군은 돼지 체중 50 kg 당 10 mg/ml 농도의 시험약물 1 ml을, 그리고 고용량군은 4 ml로 투여하였다. 치료용량군과 고용량군은 투여 후 매 10일마다 각각 4마리의 시험동물을 희생하여 시료를 얻었다. 모든 시험방법은 동물용 의약품 등의 잔류성시험 지침(수의 과학연구소 예규 제7호, 1996년 5월 6일)에 준하여 실시하였다.

시료의 채취

도축시기별로 혈액, 근육, 간장, 신장, 지방, 주사부위의 근육을 채취하였다. 혈액은 전대동맥에서, 근육은 대퇴부, 간장은 각엽에서의 중앙부를, 신장은 좌측신장을, 지방은 목 부위의 것을 각각 충분량을 채취하여 냉동(-20°C) 보관한 후 분석을 실시하였다.

시료의 전처리 및 형광유도체화

시료의 전처리 및 형광유도체화는 최 등 [4]이 돼지에서 abamectin을 추출·형광화했던 방법을 변형하여 사용하였다. 형광화를 위하여 시료 중에 moxidectin을 제외한 불순물들을 Sep-Pak C₁₈ cartridge로 분리함으로써 moxidectin이 농축된 분획을 획득할 수 있었다(Fig. 1). 이렇게 얻어진 분획을 질소가스로서 건조시킨 후 무수 CH₃CN을 넣어 용해시키고 1-methylimidazole과 trifluoroacetic anhydride를 이용하여 moxidectin의 형광화를 시도하였다(Fig. 2).

HPLC 분석

추출과정을 통하여 얻은 시료를 형광화 반응을 실시한 후 HPLC 형광검출기 (RT-10A XL, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 본 시험에 사용한 펌프는 HPLC 322 system (Kontron, Italy), 이동상은 10% acetic acid/MeOH/acetonitril (8/30/60) 이었으며, 고정상은 C₁₈

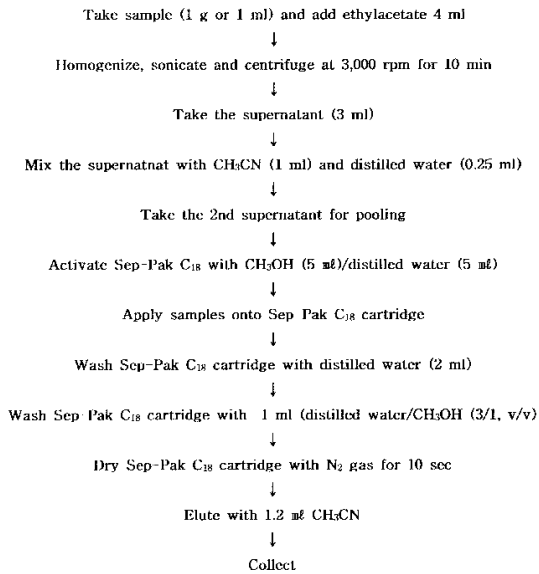


Fig. 1. Flow chart for the clean-up of moxidectin from samples.

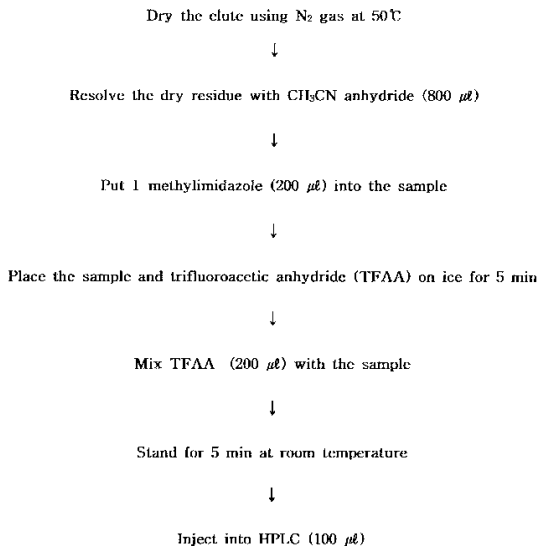


Fig. 2. Fluorescence derivatization for the elute containing moxidectin purified from samples.

(Microsorb-MV™, particle size 5 µm, 150×4.6 mm, Rainin, U.S.A.), 주입은 autosampler (Model As-100 HPLC Automatic Sampling System, Bio-Rad, U.S.A.)을 이용하였으며 주입량은 100 µl, 유속은 1 ml/min, 형광 검출 조건은 여기 파장(excitation) 365 nm, 형광 파장(emission) 475 nm 이었으며 data processing은 software

(ValueChrom, Bio-Rad, U.S.A.)를 이용하여 컴퓨터로 처리하였다. 표준검량곡선을 작성하기 위한 표준물질로 moxidectin (American Cyanamid Co., New Jersey, U.S.A.)를 이용하였다. 검출한계(limit of detection) 및 검량한계(limit of quantitation)는 신호대 잡음비(signal-to-noise ratio)를 기준으로 하였으며, 각각 3 및 10을 적용하였다.

결 과

형광검출법에 의한 moxidectin의 표준곡선의 작성

표준물질로 사용한 moxidectin을 형광유도체화하여 얻어진 각 농도에서의 HPLC area 값을 Table 1에 나타내었다. 잔류예상농도를 포함하는 0.32~10 ng/ml에서 농도에 비례하여 반응은 증대되어 나타났으며, 표준곡선을 작성하였을 때, 이 농도 범위에서의 우수한 직선성을 보였다($R^2, 0.99$). 직선의 회귀방정식은 $Y=775,225.1 \times X - 149,557$ 이었다(여기에서 Y는 area 값을 그리고 X는 농도를 가르키고 있다). 전 농도에서의 측정 재현성(coefficient of variation(CV)%)의 평균은 4.47% 이었다.

Moxidectin 측정의 최소검출량 및 조직에서의 검출한계, 회수율 및 재현성

Table 1에서 살펴본 바와 같이 표준물질 희석액에서 0.32 ng/ml이 측정되었다. 혈장, 근육 및 간장 1 ml (또는 g) 중 0.32 ng에 해당되는 농도로 첨가하였을 때, 모두 측정이 되었기 때문에 본 시험에서의 조직 중 moxidectin의 검출한계는 0.32 ng/g (또는 ml)로 사료되었다. 한편 근육에서 moxidectin으로서 5 ng/g을 첨가하여 위에서 구한 표준곡선과 비교하여 측정회수율을 계산하여 보았는 바, 평균 62.43% 이었다. 동물의약품 등의 잔류성 시험지침의 이 농도에서 허용되는 회수율이

Table 1. Reproducibility on the calibration of moxidectin between 0.32 and 10 ng/ml

Unit	Nominal concentration	^a Observed concentration	Reproducibility
	ng/ml	ng/ml	CV%
	0.31	0.38±0.005	1.3
	0.63	0.59±0.038	6.5
	1.25	1.23±0.136	11.0
	2.50	2.47±0.053	2.2
	5.00	5.01±0.087	1.7
	10.00	10.00±0.424	4.2

^aAll values are expressed as mean±S.D. CV, coefficient of variation; CV mean value is 4.47%.

60~120%을 참고할 때 이 기준을 만족시킴을 알 수 있었다. 회수율이 낮은 것은 농축 및 형광화 과정이 다단계이고 복잡한 것에 기인하는 것으로 사료되었다. 같은 조직을 대상으로 하여 3회 측정하였을 때의 재현성(CV%)은 3.97% 이었다.

조직에서의 경시적 moxidectin 잔류농도

Fig. 3에 moxidectin 200 µg/kg 투여군 및 800 µg/kg 투여군에서 각 시기별로 순차적으로 도살하여 수거한 조직에서의 측정된 moxidectin의 잔류농도를 나타내었다. 대조군으로 이용한 돼지에서는 4마리 모두에서 어떤 조직에서도 moxidectin은 검출되지 않았다. Moxidectin 200 µg/kg을 피하주사한 경우는 그 4배 용량인 800 µg/kg를 투여한 경우보다 모든 조직에서의 농도가 낮게 나타남으로써, moxidectin 용량과 조직 잔류 농도는 밀접한 상호관련성이 있음이 확인되었다. 두 용량 모두에서 주사부위에서 가장 높은 농도를 나타내었다. 권장용량인 moxidectin 200 µg/kg를 피하주사하였을 때 가장 높은 잔류농도를 나타낸 주사부위의 경우 투여 후 20일에 61.8±20.3 ng/g 이었으며, 투여 후 35일째에는 9.1 ng/g 이었다. 주사부위를 제외한 조직에서의 잔류농도가 큰 순서는 800 µg/kg 투여군의 10일째를 제외하고 두 용량

모두에서 대체로 간장 > 근육 > 신장 > 지방 > 혈장 순이었다. 권장용량인 moxidectin 200 µg/kg를 피하주사하였을 때, 주사부위를 제외하고 가장 높은 잔류농도를 나타낸 간장의 경우, 투여 후 40일에 0.5±0.3 ng/g 이었고 투여 후 50일에 검출되지 않았으므로 이 용량에서의 휴약기간은 50일로 간주되었다. 간장을 제외한 다른 조직에서의 농도는 모두 간장보다 낮았으며 투여 후 50일에는 검출이 되지 않았기 때문에 간장을 기준으로 휴약기간을 산정하여도 무방할 것으로 생각되었다. 한편, 권장용량의 4배인 800 µg/kg에서는 투여 후 50일째에도 전 조직에서 검출되었으며, 그 범위는 0.9~2.7 ng/g 이었다.

고 찰

마크로라이드 락톤계 화합물은 내·외부 기생충을 억제할 목적으로 수의학분야에서 널리 사용되고 있는 구충제들이다. Milbemycin 류의 하나인 moxidectin은 *Streptomyces cyaneogriseus*를 제한된 조건에서 배양하여 생산된 발효산물 중 하나인 nemadectin으로 부터 반합성하여 만들어 졌으며, C₂₃번에 methoxime 치환체가 존재하는 차이가 있다 [7, 12]. Moxidectin은 avermectin류와 구조, 구충범위, 구충기전, 약력 등이 매우 유사한 것으로 알려져 있으며, avermectin류보다 지방조직에서 반감기가 길다고 한다. Vercruysee 등의 보고 [13]에 의하면 소에서 35일 이상의 오스테그타르위충(*O. ostertagi*)에 대한 지속적인 구충효과가 있는 것으로 나타났고, Demeulenaere 등 [6]은 자연적으로 말에서 strongyle 충란이 재발견 되는 시점을 기준으로 본 구충기간은 ivermectin의 투약 후 10~13주인 것에 비해 훨씬 긴 22~24주인 것으로 보고하였다. 본 실험에서 조직에 존재하는 moxidectin을 형광화하여 HPLC로 분석하는 방법은 0.32 ng/ml 까지 측정할 수 있어 잔류분석이 가능하였으며, 검출한계는 0.32 ng/g or ml, 조직에 moxidectin을 5 ng/g 첨가하여 얻어진 회수율은 62.43%, 이 때의 재현성(CV%)은 3.97% 이었다. 동물약품 등의 잔류성 시험 지침의 이 농도에서 허용되는 회수율이 60~120%을 참고할 때 이 기준을 만족시킴을 알 수 있었다. 회수율이 낮은 것은 농축 및 형광화 과정이 다단계이고 복잡한 것에 기인하는 것으로 사료되었다. 또한 동 농도에서의 재현성은 허용기준인 30(CV)% 보다 훨씬 낮기 때문에 조직중의 moxidectin의 분석법으로 충분한 가치가 있다고 판단하였다. 돼지에 moxidectin을 200 µg/kg과 800 µg/kg를 피하주사 실험결과, 측정된 모든 조직에서 잔류농도가 용량상관성이 있음을 확인하였다.

800 µg/kg 투여군의 10일째를 제외하고는 200 µg/kg

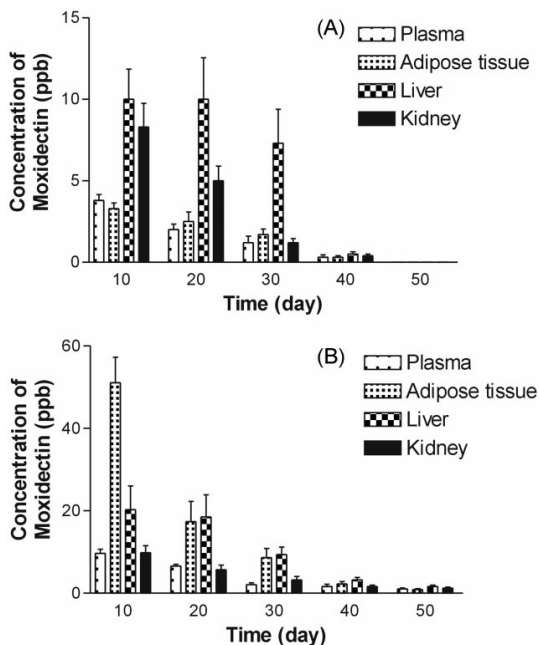


Fig. 3. Concentration of moxidectin in various tissues obtained at different time points after subcutaneous administration of moxidectin to four pigs at dose levels of 200 µg/kg and 800 µg/kg.

및 800 µg/kg 투여군 모두에서 간장, 신장, 지방, 혈장 순으로 높은 농도를 나타내었다. 가장 높은 잔류농도를 나타낸 장기는 간장으로 200 µg/kg를 피하주사 하였을 때 투여 후 40일에도 0.5±0.3 ng/g로 잔류가 검출되었으나 투여 후 50일에 검출되지 않았다. 그 밖의 다른 조직의 투여 후 40일의 농도는 간장의 그것보다 낮았으며 투여 후 50일에는 모든 조직에서 검출되지 않았다. Craven 등 [5]은 돼지에 moxidectin을 300 µg/kg으로 피하주사시 돼지의 비만도에 따라 차이는 있으나, 28일까지 혈액 및 지방 중에서 잔류가 관찰되었다고 보고하고 있어 본 연구자들은 실험결과와 위 보고를 참조하여 moxidectin을 200 µg/kg으로 돼지에 피하주사할 경우, 휴약기간을 50일로 간주한다.

결 론

본 연구에서 형광유도체화를 통한 액체크로마토그래피법을 이용하여 생체시료에서 효과적으로 잔류농도를 검출하는 방법을 확립하였다. 각 장기에서 moxidectin의 회수율은 10 ppb 농도일 때 62%로 나타났다. 평균검출재현율(CV)은 0.32~10 ppb 농도에서 4.47%로 나타났다. Moxidectin의 잔류연구는 44마리의 요크셔-랜드레이스 교잡종 돼지에 0, 200 및 800 µg/kg 체중으로 피하주사한 후 혈액, 근육, 간장, 신장 및 지방에서의 잔류농도변화를 측정하였다. 간장에서 가장 높은 잔류농도를 나타내었으며, 200 µg/kg 주사 후 간장에서의 moxidectin의 잔류농도는 주사 후 10일의 10.5±3.7 ng/g에서 주사 후 40일에 0.5±0.3 ng/g로 낮아졌다. 투여 후 50일째에는 전 장기에서 moxidectin이 정량한계 이하로 낮아졌음을 확인하였다. Moxidectin은 본 실험에서 사용한 전 농도에서 비정상적인 임상증상을 나타내지 않았다.

결론적으로, 형광유도체화를 이용한 액체크로마토그래피법을 이용한 분석방법은 생체시료에서 moxidectin을 검출하는데 매우 효과적이었다. 권장용량을 사용할 경우, moxidectin의 휴약기간으로 50일은 충분히 안전할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S., Frazier, E. G., Cully, D. F., Mrozik, H. and Schaeffer, J. M. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity. *J. Parasitol.* 1995, **81**, 286-294.
2. Bowman, D. D., Parsons, J. C., Grieve, R. B. and Hepler, D. I. Effects of milbemycin on adult *Toxocara canis* in dogs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.* 1988, **49**, 1186-1189.
3. Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y. L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R. and Omura, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, **15**, 361-367.
4. Choi, K. S., Yun, H. I., Park, S. C., Park, J. M. and Cho, J. H. Pharmacokinetics of abamectin after subcutaneous injection in pigs. *Kor. J. Vet. Publ. Health.* 1998, **22**, 1-8.
5. Craven, J., Bjorn, H., Hennessy, D. R. and Friis, C. The effects of body composition on the pharmacokinetics of subcutaneously injected ivermectin and moxidectin in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2002, **25**, 227-232.
6. Demeulenaere, D., Vercruyse, J., Dorny, P. and Claerebout, E. Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *Vet. Rec.* 1997, **141**, 383-386.
7. McKellar, Q. A. and Benchaoui, H. A. Avermectins and milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1996, **19**, 331-351.
8. de Montigny, P., Shim, J. S. and Pivnichny, J. V. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methyl-imidazole as the derivatization reagent. *J. Pharm. Biomer. Anal.* 1990, **8**, 507-511.
9. Rabel, S. R., Stobaugh, J. F., Heinig, R. and Bostick, J. M. Improvements in detection sensitivity for the determination of ivermectin in plasma using chromatographic techniques and laser-induced fluorescence detection with automated derivatization. *J. Chromatogr.* 1993, **617**, 79-86.
10. Sasaki, Y., Kitagawa, H., Okachi, H., Kajita, Y. and Ishihara, K. Clinical application of mibemycin D as a prophylactic agent against *Dirofilaria immitis* infection in dogs: reaction in uninfected and infected dogs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1986, **48**, 579-586.
11. Shoop, W. L., Mrozik, H. and Fisher, M. H. Structure and activity of avermectins and mibemycins in animal health. *Vet. Parasitol.* 1995, **59**, 139-156.
12. Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., Terao, M.,

- Aoki, A. and Fukuda, R.** Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* 1980, **33**, 1120-1127.
13. **Vercruyse, J., Claerebout, E., Dorny, P., Demeulenaere, D. and Deroover, E.** Persistence of the efficacy of pour-on and injectable moxidectin against *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 1997, **140**, 64-66.