

HPLC에 의한 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 혈장중의 acetylsalicylic acid (aspirin)과 salicylic acid의 측정

김동완 · 구재근* · 박성우†
군산대학교 수산생명의학과, *군산대학교 식품생명공학과

Determination of Acetylsalicylic acid (Aspirin) and Salicylic acid in Eel (*Anguilla japonica*) Plasma by High-performance Liquid Chromatography

Dong-Wan Kim, Jae-Geun Koo* and Sung-Woo Park†

Department of Aquatic life Medicine, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

*Department of Food Science & Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

To decrease stress in eel (*Anguilla japonica*) during its culture or transportation, aspirin (ASA) known as analgesic, antiinflammatory and antithrombic agent was administrated by dipping or oral routes. Concentrations of aspirin (ASA) and salicylic acid (SA) in eel plasma were simultaneously measured by a high performance liquid chromatography (HPLC). The plasma was acidified with 0.2 M HCl and 0.2 M orthophosphoric acid, and mixed with acetonitrile. ASA and SA extracted with acetonitrile were analyzed by the HPLC equipped with reversed phase Novapak C₁₈ column (4 μm silica, 150 × 4 mm) and UV detector(237 nm). The mobile phase consisted of 740 ml water, 900 μl orthophosphoric acid (85%) and 180 ml acetonitrile. The retention times of ASA, SA and 2-methylbenzoic acid(MBA) were 4.8 min, 8.4 min and 11.5 min, respectively. The limit of quantification was 0.01 μg/ml for SA and 0.05 μg/ml for ASA. The mean recovery from eel plasma was 70.8~99.6% for ASA and 95.2~100.3% for SA. This HPLC method was applied to analyze ASA and SA of eel plasma after either dipping in a concentration of 20 ppm or feeding the feed supplemented with 50 mg/kg BW. Only SA was detected in eel plasma after the administration of ASA by dipping or oral routes because the drug was quickly decomposed into SA in eel plasma. The amount of SA in eel plasma reached the highest value at 3hr in dipping and 7 days in oral administration. When the ASA-administrated eel were kept in ASA free aquaria, 0.02-0.03 μg/ml of SA were detected 48 hr after the administration in both routes.

Key words: Aspirin, Eel Plasma, Determination, HPLC

양식 뱀장어는 선별과정의 handling, 과밀사육, 이동 및 수온 차에 따른 스트레스로 인한 혈액 순환의 장애로 방양 후에 먹이 섭취가 불량해지는 것이 일반적이지만 이를 개선할 연구는 행해지지 않고 있다. 본 연구에서는 진통제 및 anti-thrombotic agent로 널리 사용되고 있는 aspirin

(ASA)을 뱀장어에 투여하여 사육 및 이동 중 뱀장어의 스트레스 경감 효과를 알아보려고 실시 하였다. ASA를 뱀장어에 약욕 및 경구 투여하기 위해서는 우선 뱀장어 혈장 중의 ASA의 농도 측정 방법 개발이 요구되나 아직까지 뱀장어는 물론 어류 혈장 내 ASA의 측정방법에 관

†Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884,
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

한보고는 없다. 반면에 ASA는 인체에 진통제 혹은 심장병 예방을 위해 많이 이용되고 있어 인체, 의약품 및 실험 동물의 혈장내의 ASA 및 관련물질의 분석 방법은 많이 보고되고 있어 분광광도계를 이용한 방법 (Kim and Hwang, 1982; 이 등, 1989) 및 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 인체 혈청 및 피부 (각질층) 내의 ASA를 측정하는 방법이 보고되어 있다 (Tebbett *et al.*, 1985; Kees *et al.*, 1996; Pirola *et al.*, 1998; Mikami *et al.*, 2002).

ASA는 *in vivo*에서 salicylic acid (SA)로 신속히 분해되며 특히 물, methanol, 혈액 중에서는 급격히 분해되므로 분석 전처리 조건이 매우 까다롭다. 특히 물에서는 pH에 따라 안정성이 크게 달라지는데 pH 2-3에서 가장 안정하고 pH 7.0에서는 하루 만에 약 20%의 ASA가 SA로 분해된다 (Kelly, 1970). 특히 본 실험의 경우 ASA 투여 방법이 사람이나 동물과 달리 약육 혹은 먹이에 혼합하여 구강 투여하므로 대부분의 ASA는 SA로 분해가 예상되고 또한 뱀장어의 혈장 성분은 인체의 혈장 성분과 다르고 혈액 채취를 위한 마취성분 등 다양한 방해 물질의 발생이 예상된다.

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 뱀장어 혈장 중 ASA와 SA를 동시에 측정할 수 있는 방법을 설정한 후 약육 및 경구 투여한 뱀장어 혈장 내의 ASA와 SA 함량 변화를 경시적으로 측정하였다.

재료 및 방법

뱀장어와 ASA의 투여 방법

평균체중 200 g의 뱀장어 (*Anguilla japonica*)를 민간 양식장에서 구입하여 28°C에서 3주간 순치시킨 다음 실험에 사용하였다. 혈장은 뱀장어를 1.5% urethan으로 마취한 다음 멸균 플라스크 주사기로 동맥구에서 채혈한 후 3,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 회수하였다. 모든 혈장을 모아 혼합한 다음 에펜돌프시험관에 1 ml씩

분주하여 사용 시까지 -80°C에 보존하였다.

ASA의 약육을 위해 뱀장어는 2일전에 먹이 투여를 금지한 다음 28°C의 사각 수조에 충분히 폭기하면서 20 ppm의 ASA에 약육시켰다. 약육용 ASA는 시판의 인체용 ASA (Bayer, Korea)를 온수에 용해시킨 다음 최종 농도가 20 ppm이 되도록 약육수조에 첨가하였다. 약육 후 0, 3, 6, 12, 24시간 후 채혈하여 혈장을 분리하였다. 경구투여는 순치에 사용한 크기의 순환여과 방식의 수조를 사용하였다. 경구 투여용 사료는 어체중의 2%에 해당하는 시판의 분말사료와 사료량의 110%에 해당하는 수도수에 어체중 kg당 50 mg이 되도록 용해시킨 ASA를 혼합하여 제조하였다. 사료의 투여는 14일 동안 매일 오전 10시에 투여하였고, 투여 후 0, 3, 5, 7, 14일 후 사료 투여 후 4시간이 경과한 다음 채혈하여 혈장을 분리하였다.

또한 투여 후 혈장내의 농도 변화를 알아보기 위하여 20 ppm의 ASA에 24시간 약육과 어체중 kg당 50 mg이 되도록 14일간 경구 투여한 뱀장어를 28°C의 수조에 옮긴 다음, 약육군은 0, 6, 9, 12, 24 및 48시간 후 그리고 경구투여군은 0, 6, 9, 12, 24, 48, 72 및 120시간 후에 채혈하여 혈장내의 ASA와 SA의 농도를 분석하였다.

시약

실험에 사용한 표준품인 aspirin (acetylsalicylic acid, ASA), salicylic acid (SA)와 내부표준물질인 2-methylbenzoic acid (MBA)는 Sigma사 (USA) 특급시약을 사용하였고, 어류에 약육 및 경구 투여한 ASA는 인체용 ASA (Bayer, Korea)를 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC 등급용 (Fisher, Korea)을 사용하였고, 기타 시약은 특급용 시약을 사용하였다.

ASA 및 SA의 정량

뱀장어 혈장 내 ASA와 SA함량의 정량은 Kees 등 (1996)의 방법에 따라 HPLC를 이용하

여 실시하였다. 시료 전처리를 위해 저온에서 해당 혈장 200 μ l에 내부 표준물질 용액 (5 μ g/ml MBA in a 50 : 50 mixture of 0.2 M HCl and 0.2 M orthophosphoric acid) 200 μ l을 넣고 1~2초간 voltex 혼합하였다. 혼합액에 다시 400 μ l의 acetonitrile을 첨가하여 voltex로 혼합한 후 4°C에서 15분 방치한 다음 원심분리 (10,000 g, 2분)하여 상층액을 회수하였다. 상층액을 110 mg의 식염을 함유한 튜브에 옮긴 후 voltex 혼합한 다음 4°C에 10분간 방치하였다. 다시 voltex 혼합한 후 10,000 g에서 1분간 원심 분리하여 분리한 상층액을 membrane filter (0.45 μ m)로 여과하여 HPLC에 주입하였다. 실험에 사용한 HPLC는 UV detector가 부착된 HPLC (Waters, USA)를 사용하였으며, 칼럼은 Novapak C₁₈ column (4 μ m silica, 150×4 mm)를 사용하였다. 이동상은 혼합용매 (740 ml water, 900 μ l orthophosphoric acid, 180 ml acetonitrile)를 사용하였으며, 유속은 1 ml/min, 칼럼 온도 30°C, 검출 파장은 237 nm에서 측정하였다. 검량선 작성을 위해 ASA와 SA의 표준용액을 acetonitrile로 단계별로 희석한 후 일정량의 내부표준물질을 첨가한 후 측정하였다.

직선성 검증 및 정확성 측정

직선성 검정을 위해 ASA와 SA 표준품으로 저장 표준 용액을 제조한 후, acetonitrile로 단계별로 희석한 5개 농도의 표준 용액을 제조하여 각각 3번씩 측정한 다음 모두 표준용액의 농도

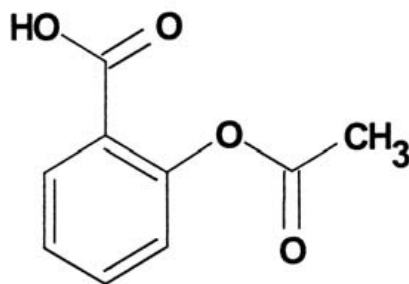


Fig. 1. Chemical structure of aspirin (synonyms : 2-(acetyloxy) benzoic acid, salicylic acid acetate).

와 피크 면적의 비 (표준 용액 피크면적/MBA 표준물질 피크면적)와의 상관계수를 구하였다. 정확성 검정을 위해서 ASA 무투여 뱀장어 혈장에 ASA와 SA의 5개 농도의 표준 용액을 첨가 후 3회 반복하여 측정하였다. 정확성은 첨가한 표준용액 농도에 대한 회수된 농도 백분율 (%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

ASA를 구강 투여한 뱀장어 혈장과 ASA 무투여 뱀장어 혈장에 ASA, SA와 MBA를 첨가한 혈장의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. ASA, SA 및 MBA 간 분리도가 우수하였으며, 뱀장어 혈장 성분과도 양호하게 분리가 되어, 뱀장어 혈장 중 ASA와 SA 분석에 방해 물질이 존재하지 않았다. 또한 3물질의 retention time은 ASA

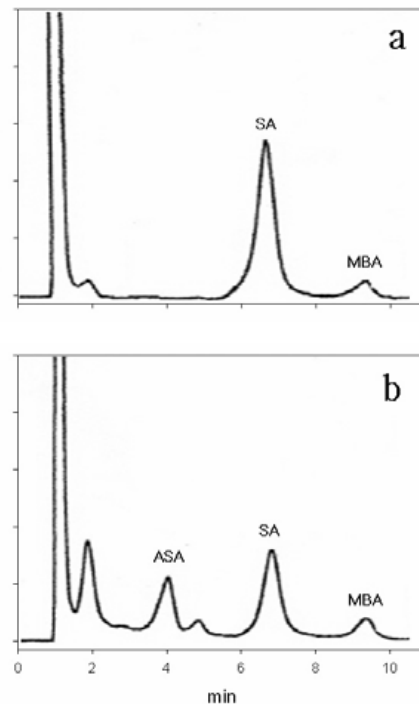


Fig. 2. HPLC chromatogram of eel plasma prepared 3 hours after oral administration of aspirin (a) and by spiking drug-free plasma with standard mixture (b). ASA, SA and MBA stand for aspirin, salicylic acid and 2-methylbenzoic acid, respectively.

4.25분, SA 7.18분, MBA 9.84분으로 모두 10분 이내 신속하게 분석이 가능하였다. 이는 인간의 혈장에서의 용출시간인 15분 (Gandihimanthi *et al.*, 2003)과 쥐의 혈장과 오줌에서의 용출시간인 14분 (Abu-Quare & Abou-Donia, 2001)에 비해

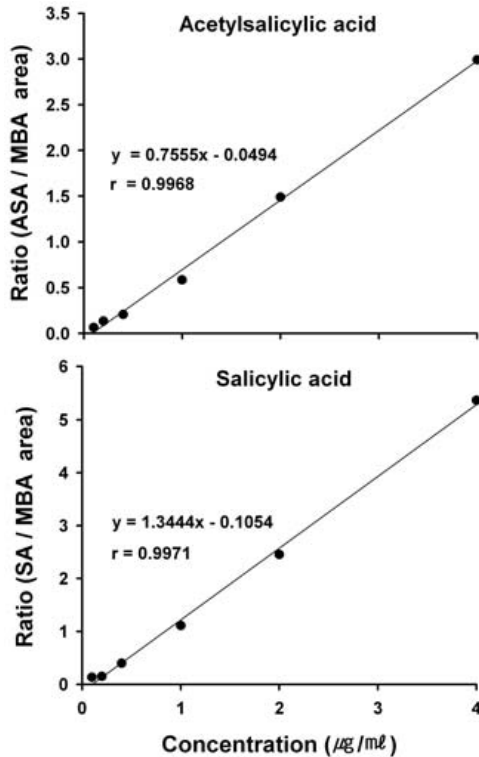


Fig. 3. Calibration curves of acetylsalicylic acid and salicylic acid.

빠르게 용출되었다. 본 실험에서 사용한 측정 방법은 인체 혈장내의 ASA와 SA를 동시에 신속하게 분석하기 위해 연구 보고한 방법 (Kees *et al.*, 1996)에 준하여 실시하였는데, 뱀장어 혈장 분석에도 적용이 가능함을 알 수 있었다.

검량선 작성을 위해 ASA와 SA의 표준용액을 acetonitrile로 각각 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석한 액을 3회 반복 측정하여 표준 용액의 농도 대 피크 면적의 비를 회귀선식으로 나타내었다 (Fig. 3). ASA와 SA 모두 0.1~4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위에서 희석한 표준 용액의 농도와 피크 면적비의 상관계수가 0.996이상의 우수한 직선으로 나타났다.

ASA 무투여 뱀장어 혈장에 ASA와 SA를 5가지 농도 (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 첨가하였을 때의 평균 회수율은 Table 1에 표시한 것처럼 SA가 95.2~100.3%, ASA가 70.8~99.6%로 SA의 회수율이 ASA에 비하여 높았다. 이러한 결과는 인체 혈액 중의 ASA의 회수율이 SA보다 낮다는 결과와 일치하였다 (Kees *et al.*, 1996). 이는 acetonitrile의 일부가 염 용액에 일부 녹고 또한 전처리 과정 중 ASA의 일부가 분해되었기 때문이라 판단된다. 한편 쥐의 혈장과 오줌에서의 회수율이 각각 88.6%와 85.9%로 본 실험의 결과와 유사한 수준이었다 (Abu-Quare & Abou-Donia, 2001).

20 ppm ASA액에 침지한 후의 약육 시간에 따

Table 1. Recovery of aspirin (ASA) and salicylic acid (SA) in spiked eel plasma*

SA				ASA			
Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R.S.D. (%)	% Recovery	Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R.S.D. (%)	% Recovery
0.10	0.095	10.1	95.2	0.10	0.071	18.2	70.8
0.20	0.192	3.1	95.8	0.20	0.161	3.9	80.4
0.50	0.477	1.8	95.5	0.50	0.423	9.1	84.7
1.00	0.940	15.9	94.0	1.00	0.908	6.2	90.8
2.00	2.006	4.1	100.3	2.00	1.992	18.7	99.6

*: n=3

큰 뱀장어 혈장의 SA의 농도 변화는 Fig. 4와 같다. 약욕 후 뱀장어의 혈장 내에서는 ASA는 검출되지 않고 SA만 검출되었다. SA 농도는 3시간 후 $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 증가 후 6시간에 $0.09 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 최대값을 나타내었고, 이 후는 완만히 감소하는 경향을 나타내어 24시간 후에는 $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이는 ASA가 pH 중성에서 급격히 분해되고, *in vivo* 상에서 더욱 급격히 분해된다는 보고를 미루어 볼 때 약욕 시간이 6시간 이상에서는 혈장 내 ASA의 흡수 속도와 분해 속도가 평형을 유지하기 때문으로 사료된다.

ASA의 경구 투여 일수에 따른 뱀장어 혈장

내 SA 농도의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 경구 투여하였을 때도 약욕의 경우와 마찬가지로 뱀장어의 혈장내에서는 ASA는 검출되지 않고, SA만 검출되었다. SA는 약욕 3일 후에 $14.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 최대값을 나타낸 후 그 후 완만히 감소하는 경향을 나타내었으며, 7일 후에는 $3.13 \mu\text{g}/\text{mL}$, 그 이후는 거의 변화가 없었다. ASA에 24시간 약욕시켰을 때의 혈장내 SA농도가 $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었던 것에 비하면 경구 투여군은 7일 이후 $3.31 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 현저히 높은 농도로 검출되었다. 그럼으로 ASA를 뱀장어에 투여할 경우 약욕에 비하여 경구 투여가 효과적일 것으로 생각된다.

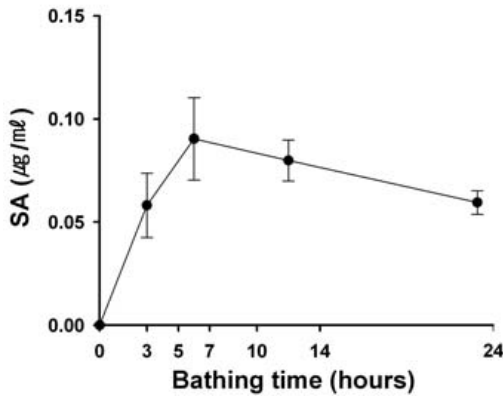


Fig. 4. Changes in salicylic acid (SA) of peripheral blood from eels bathed in a concentration of 20 ppm aspirin.

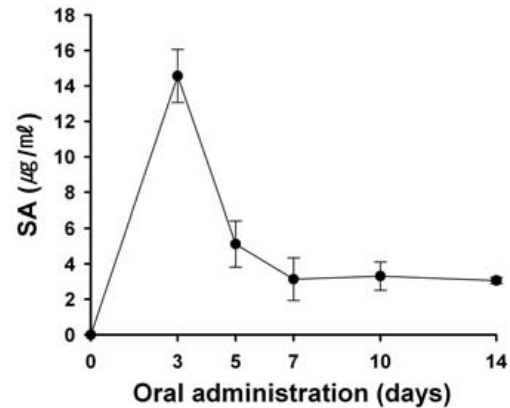


Fig. 5. Changes of salicylic acid (SA) in the plasma from eel fed the aspirin-supplemented diet (50 mg/kg of body weight).

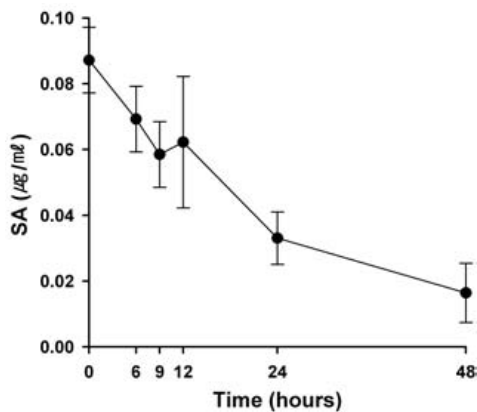


Fig. 6. Changes in salicylic acid residues in the eel plasma after aspirin bathing for 24 hours.

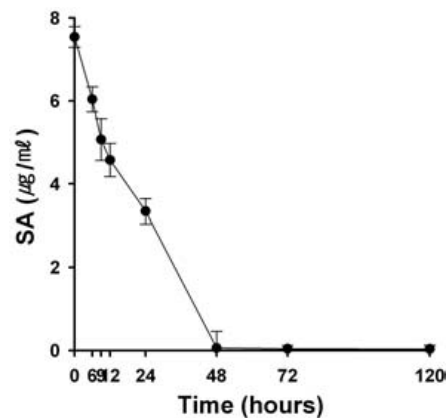


Fig. 7. Changes in salicylic acid residues in eel plasma after feeding the aspirin-supplemented diet for 7 days.

Fig. 6은 24시간 20 ppm ASA액에 약육 후 ASA를 첨가하지 않은 수조에 수용하여 50시간 사육하면서 혈장내 ASA관련 물질 함량을 측정 한 것이다. 약육 동안의 혈장과 마찬가지로 ASA는 검출이 되지 않고, SA만 검출되어 ASA는 모두 SA로 분해되었음을 알 수 있었다. SA는 약육 종료 시점에 $0.09 \mu\text{g/ml}$ 으로 최대값을 나타내었지만 그 후 점차 감소하여 24시간 이후는 $0.03 \mu\text{g/ml}$ 이하로, 48시간 이후에는 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 이하로 미량만 검출되었다. 그러므로 약육의 경우 ASA 약육 후 2일 정도 경과하면 ASA의 잔류 문제는 없을 것으로 판단되었다.

14일간 경구 투여 후 ASA가 없는 수조에서 120시간 사육하면서 혈장내의 ASA와 SA의 양을 측정 한 결과는 Fig. 7에 표시한 것처럼 약육의 경우와 동일하게 ASA는 검출되지 않았다. 혈장내의 SA는 경구투여 종료시점에 $7.54 \mu\text{g/ml}$ 로 최대치를 도달한 후 급격히 감소하여, 투여 후 48시간이 경과하였을 때는 $0.06 \mu\text{g/ml}$ 이 검출되었고, 120시간 이후에는 $0.03 \mu\text{g/ml}$ 이 검출되었다. 따라서 약육과 경구 투여 후 ASA는 혈장내에서 SA로 분해되며, 혈장내의 SA도 48시간 이내에 분해되어 거의 잔류하지 않는 것으로 나타났다.

요 약

인체에 널리 사용되고 있는 Aspirin (ASA)을 양식 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 약육 또는 경구 투여한 다음 혈장 중의 ASA와 salicylic acid (SA)의 양을 HPLC로 측정하였다. 뱀장어 혈장은 0.2 M HCl과 0.2 M orthophosphoric acid로 산성화시킨 다음 acetonitrile과 혼합하여 ASA와 SA를 추출하였다. 2약제의 정량은 Novapak C18과 UV detector (237 nm)가 장착된 HPLC로 측정하였다. 이 때 이동상은 740 ml의 증류수, 900 μl 의 orthophosphoric acid와 180 ml의 acetonitrile을 사용하였다. ASA, SA 및 내부 표준물질로 사용한 2-methylbenzoic acid (MBA)의 retention

time은 각각 4.8분, 8.4분 및 11.4분이었으며, 측정한 농도는 ASA가 $0.05 \mu\text{g/ml}$, SA는 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 였다. 혈장으로 부터의 평균회수율은 ASA가 70.8-99.6%, SA는 95.2-100.3%였다.

뱀장어에 ASA를 약육 (20 ppm) 또는 경구투여 (50 mg/kg BW) 한 다음 채취한 혈장을 시료로 이 방법으로 ASA와 SA의 양을 측정 한 결과 단지 SA만 검출되어졌고, ASA는 검출되지 않았다. 이는 ASA가 혈장내에서 신속히 SA로 분해되기 때문으로 판명되었다. 또 ASA에 약육시킨 경우에는 약육 후 3시간후에 혈장내의 SA양이 최고치에 도달하였으며, 경구투여 한 경우에는 7일후에 최고치에 도달하였다. 한편 ASA를 투여한 다음 ASA 무첨가 수조에 수용한 결과 2투여 경로 모두 48시간 이후에는 SA가 $0.02-0.03 \mu\text{g/ml}$ 이 검출되어 잔류의 문제도 거의 없었다. HPLC를 이용한 혈장내의 ASA와 SA의 검출법은 신속하며 정확한 방법으로 뱀장어 이외의 어류에도 활용 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 해양수산부에서 실시한 해양한국발전프로그램 (KSGP) 연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Abu-Qare, A.W. and Abou-Donia, M.B.: A validated HPLC method for determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26: 939-947, 2001.
- Gandhimathi, M., Ravi, T.K., Abraham, A. and Thomas, R.: Simultaneous determination of aspirin and isosorbic 5-mononitrate in formulation by reversed phase high pressure

- liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32: 1145-1148, 2003.
- Gilpin, R.K., Kasturi, P. and Gilpin, C.S.: Acidic drugs. *Encyclopedia of analytical science*. Vol. 6. Ed. by Townshend, A. Academic press. pp 3814-3815, 1995.
- Gliman, A.G., Goodman, L.S. and Gliman, A.: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 6th ed., Macmillan, pp 682, 1980.
- Kees, F., Jehnich, D. and Grobecker, H.: Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 677: 172-177, 1996.
- Kim, C.-K. and Hwang, S.-J.: Simultaneous determination of salicylic acid and aspirin in commercial aspirin tablets. *J. Kor. Pharm. Sci.*, 12: 126-131, 1982.
- Klimes, J., Sochor, J. and Zahradnicek, M.: Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of salicylates in whole blood, plasma and isolated erythrocytes. *J. Chromatogr.*, 584: 221-228. 1992.
- Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H. and Nishida, M.: Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28: 261-267, 2002.
- Pirola, R., Bareggi, S.R. and Benedittis, G.D.: Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 705: 309-315, 1998.
- Tebbett, I.R., Omile, C.I. and Danesh, B.: Determination of paracetamol, salicylic acid and acetyl salicylic acid in serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 329: 196-198, 1985.
- 이진환, 최준식, 백채선, 범진필: 시판 아스피린 정제의 생체내 이용율. *약제학회지*, 19: 131-136, 1989.

Manuscript Received : July 5, 2007

Revision Accepted : August 20, 2007

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)