

Sulfadimethoxine의 경구 투여에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus* 혈액 및 간에서의 잔류량 변화

정승희* · 김진우* · 서정수 · 지보영* · 박명애

국립수산과학원 전략양식연구소 병리연구과, 국립수산과학원 *수산생물방역과

Residues of sulfadimethoxine in blood and liver of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* by oral administration

Sung Hee Jung[†], Jin Woo Kim*, Jung Soo Seo, Bo-Young Jee*, and Myoung Ae Park

Pathology Division, Aquaculture Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705, Korea

*Aquatic Life Disease Control Division, NFRDI, Busan, Korea

The residue levels of sulfadimethoxine (SDM) was studied after oral administration to cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at 20±1.0°C. The concentrations of SDM in the plasma and liver were determined by HPLC-UV detector after a single dosage of 400 mg/kg body weight. The average recoveries of SDM in spiked samples between 2~50 ppm were 92.24~93.62% for plasma and 88.34~91.90% for liver. Limit of detection for SDM was 0.05 ppm by using this method. Samples were taken at 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h, 240 h, 336 h and 480 h post-dose. The peak plasma and liver concentrations of SDM, which attained at 1 h post-dose, was 402.64±59.66 µg/ml and 238.18±54 µg/g, respectively. Thereafter, it's elimination from both tissues was considerably faster following process of time. Their concentrations of SDM were not measurable at 480 h post-dose. Based on this results, dosage and withdrawal times for SDM could be used when it is prescribed with SDM in olive flounder.

Key words : Oral, Residue, HPLC, Sulfadimethoxine, Olive flounder

1955년에 개발된 설파디메톡신(sulfadimethoxine, SDM)은 설파제의 대표적인 항균제이다. SDM은 그람 음성균과 양성균 모두에 대하여 광범위한 항균 스펙트럼을 가지고 있어서 어류의 세균성 질병의 치료에 유용하게 사용되었다(Uno *et al.*, 1993). 우리나라에서 SDM은 1970년에 무지개송어의 비브리오병을 치료하

는 수산용 약제로 처음 품목허가를 받았으며, 현재 약 13개의 제품이 허가된 것으로 파악되었다(국립수산과학원, 2011). 허가된 SDM의 제품은 대부분 뱀장어, 송어류, 잉어류 및 은어 등 담수어류의 세균성 질병으로 잘 알려진 아가미부식병, 지느러미부식병, 에드워드병 등을 예방 또는 치료하는데 효과가 있으며, 일부는 방어의 비브리오병, 유결절증 및 궤양병에도 사용할 수 있다. 미국(FDA)에서는 SDM과 ormetoprim이 5:1의 비율로 조합된 복합제가 무지개송어의

[†]Corresponding author: Sung Hee Jung

Tel: +82-51-720-2490, Fax: +82-51-720-2498

E-mail: inmu@nfrdi.go.kr

Aeromonas salmonicida 감염증과 channel 메기의 *Edwardsiella ictaluri*를 치료하는데 경구 투여하도록 되어 있다(American fisheries society, 2011). 일본에서는 SDM이 2006년 1월까지의 무지개송어의 비브리오 병의 치료에 사용하였으나, 2006년 11월부터 수산용 의약품으로서 제조가 중지됨으로써 사용가능한 약품에서 제외된 것으로 나타났다(農林水産省, 2006).

도 등(2010)은 여수관내 가두리 양식장의 조피볼락에서 SDM을 투여한 후 발생한 폐사 사고와 관련하여 체내 잔류량에 대한 임상사례를 보고하였다. 즉 겨울철(2월)과 여름철(8월)에 SDM을 MP사료(습식)에 섞어서 투여한 다음 폐사가 발생하였다고 한다. 조피볼락은 SDM을 투여할 수 있는 어종으로 품목허가된 것은 아니지만, 현재의 제도적인 여건(약사법 제85조 제3항)에서 수산질병관리사(수의사)의 처방을 받으면 사용할 수 있다. 정확한 질병 진단과 약제감수성 시험을 통해 처방받은 SDM을 조피볼락에 투여하였는지 그 여부는 확인할 수 없었으나, 양식현장에서는 전문가의 처방에 의하지 않고 관습적으로 투약하는 사례가 여전히 있는 것 같다. 투여된 약제의 효과와 밀접한 관계가 있는 SDM의 어류 체내 약물동태 연구로는 channel 메기(Squibb *et al.*, 1988; Gehring *et al.*, 2006), 무지개송어(Kleinow and Lech, 1988; Kleinow *et al.*, 1992; Uno *et al.*, 1993), 대서양 연어(Gehring *et al.*, 2006), 새우(Gehring *et al.*, 2006)에서 조사되었다. SDM이 조피볼락에 사용된 보고를 통해 넙치에도 사용할 개연성이 있을 것으로 생각되었으나, 넙치에 대한 SDM의 약물동태 연구는 거의 찾아 볼 수가 없었다. 이번 연구의 목적은 SDM을 넙치에 경구 투여하였을 때 나타나는 혈액과 간에서의 경시적 잔류량을 HPLC로 분석함으로써 처방에 필요한 기초자료를 제공하는 것이다.

재료 및 방법

시약, 기구 및 실험어류

이 연구에서 사용된 표준품 sulfadimethoxine (SDM)은 Sigma사(USA)를 사용하였다(Fig. 1). 초산(acetic acid)과 기타 시약은 시약특급, acetonitrile, water, methanol 등은 HPLC grade (Fisher, USA)를 사용하였다. 혼합기(vortex mixer), 호모게나이저, 마이크로원심분리기, 진공탈기장치, 마이크로 원심분리용 튜브, 여과필터(membrane filter, 직경 47 mm, 0.45 μ m), 주사기 필터(syringe filter, 직경 13 mm, 0.45 μ m)를 사용하였다. 넙치 *Paralichthys olivaceus*는 항생제 투여를 받은 경력이 없는 건강개체(100 \pm 20 g)로서 부산에 위치한 국립수산과학원 전략양식연구소 사육실에서 관리하고 있던 총 50마리를 사용하였다. 실험기간 동안의 사육수온은 평균 20 \pm 1.0 $^{\circ}$ C로서 자연수온의 상태였으며 비교적 일정하게 유지되었다.

약제 투여 및 시료 채취

우리나라에서 품목허가된 SDM의 용법은 어체중 kg당 평균 200 mg의 경구 투여를 하도록 되어 있으며, 이 용량은 어류에 있어서 하루에 투여하는 SDM의 권장투여량으로 보고되었다(日本水産資源保護協會, 1980). 양식현장에서는 오랜 관습에 따라서 투여

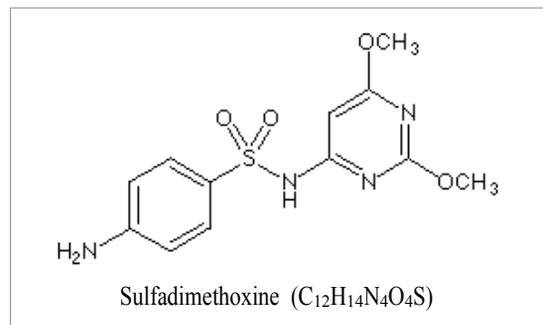


Fig. 1. Chemical structure of sulfadimethoxine.

하는 약제의 기준량의 초과해서 사용하고 있으므로 이 연구에서는 투여량을 권장량의 2배(400 mg/kg)로 결정하였다.

실험어는 약제의 투여 하루 전부터 먹이를 공급하지 않았으며, 어체중 kg당 400 mg이 되도록 SDM의 약제 사료를 만들었다. 즉 시판 뱀장어용 분말 배합사료에다 넙치의 한입에 들어갈 크기로 물을 섞어서 동그랗게 잘 반죽한 다음 그 속에다 약제를 칭량하여 환약처럼 만들어서 미리 냉동고(-80°C)에다 얼린 뒤, 실험 당일 꺼내어 핀셋을 이용하여 마취하지 않은 어체의 위장 안에까지 직접 강제로 1회 삼입하였으며, 만약 약제 사료를 뱉어 내는 개체가 있을 경우에는 새로운 개체로 교체하였다. 투여가 종료된 직후를 0시간으로 간주하여 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 168시간, 240시간, 336시간 및 480시간 마다 3~5마리씩 시료를 채취하였다. 실험어는 마취시키지 않고 미부혈관으로부터 헤파린 처리된 일회용 주사기로 한 마리당 최소한 1.5 ml가 되도록 채집하였는데, 이 때 채혈량이 부족한 경우는 2마리의 혈액을 한데 모아서 이용하였고, 같은 개체에서

해부하여 간 조직을 채취하였다. 혈액은 상법에 따라 혈장을 분리하였고, 채집된 간과 혈장 시료는 곧바로 -80°C에 보관하였다가 HPLC 분석에 이용하였다.

약제의 추출 및 HPLC 분석조건

SDM의 추출방법은 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 넙치의 간 시료 1 g (또는 혈장 1 ml)에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 1 ml로써 균질화한 후 methanol 1 ml를 넣고 vortex로 혼합하여 10분간 방치하였다. 단, 혈장은 균질화의 과정 없이 간 시료와 동일하게 실시하였다. 이것을 3,000 rpm, 15분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 주사기필터로 여과하여 HPLC에 주입해서 분석하였다. HPLC는 HITACHI 6200LC를 사용하였으며 기기분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

표준곡선 작성 및 회수율

SDM 1 mg을 칭량하여 5 ml의 methanol 용액으로 용해(200 ppm)시켜 갈색 시약병에 넣어 보관(4°C)하여 stock solution으로 사용하였다. Stock solution 500 μ l를 시험관에 취해 methanol 500 μ l를 넣고 1 ml

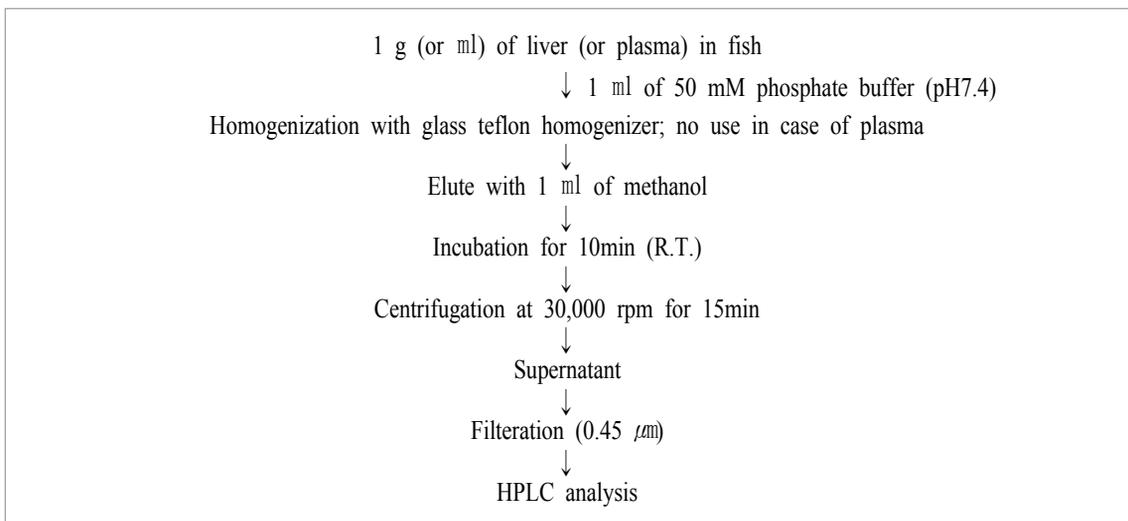


Fig. 2. Extraction procedure of sulfadimethoxine from the blood and liver of olive flounder.

Table 1. HPLC instruments and analysis conditions for sulfadimethoxine

Instrument	HITACHI D-6200
Column	4.6×150 mm (C ₁₈ , 5 μm, COSMOSIL)
Mobile phase	Acetonitrile-Water-Acetic acid (30:70:0.3, v/v/v)
Column temperature	Room temperature
Flow rate	1 ml/min
Detector	Ultraviolet λ=254 nm (LKB BROMMA 2141)
Injection volume	10 μl
Run time	10 min

(100 ppm)로 맞춘 다음, 이 용액을 methanol로 희석(50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 ppm)해서 working solution으로 사용하였다. 각 농도의 working solution 10 μl를 HPLC에 주입한 다음 SDM 농도에 대한 피크 면적에 의하여 표준곡선을 작성하였다.

건강한 넙치의 간(또는 혈장) 시료 1 g (또는 ml)에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 1 ml를 넣고 균질화하여 얻은 간 균질액 50 μl (또는 혈장)와 SDM stock solution 50 μl를 혼합하여 100 μl의 methanol을 넣고 10분간 방치하였다. 이것을 3,000 rpm, 15분간 원심분리한 다음 그 상등액을 취하여 주사기필터로 여과한 후 HPLC로 측정하여 회수율을 구하였다. 대조군은 간 균질액 및 혈장 대신에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 사용하였다.

결과 및 고찰

SDM의 표준곡선을 작성한 결과, 농도에 따라 peak 면적의 넓이가 비례하여 직선성이 양호한 검량선이 구해졌다. 표준곡선의 식은 $Y=1884.0X+557.7$ ($R^2=0.999$)로 계산되었다. SDM을 넙치의 간 및 혈장에

2, 10 및 50 μg/ml (μg/g)가 되게 첨가하고 각 농도에서 분석한 평균 회수율의 결과, 혈장은 92.24%, 92.33%, 93.62% 그리고 간은 88.34%, 90.60%, 91.90%를 나타내었다. 혈액이 간에 비하여 다소 높은 회수율을 보였다.

하 등(1997)은 잉어와 넙치 근육에 SDM을 0.1~1 ppm 농도로 첨가하였을 때 회수율이 각각 80.86~96.52%, 길 등(2009)은 넙치 근육에 SDM을 1~5 ppm 농도로 첨가하였을 때 회수율이 각각 85.18~86.24%로 나타났다. Gehring *et al.* (2006)은 channel 메기와 새우의 근육에 SDM을 0.005~0.02 ppm 농도로 첨가한 후 조사한 회수율 결과, 메기에서는 86.2%~91.5%, 새우에서는 86.6%~87.1%를 나타내었다. 野口 등(2008)은 연어의 근육에 SDM을 0.002 ppm 농도로 첨가함으로써 79.8%의 회수율을 얻었다. 앞선 연구자들의 회수율 조사에서 HPLC 분석조건, 분석법, 이용한 시료와 첨가한 농도가 서로 달라서 직접 비교하기는 어려웠다. 한편, 이 실험에서 개발한 분석법의 검출한계는 0.05 ppm이었다.

SDM을 400 mg/kg 농도로 넙치에 경구 투여한 후 혈장 및 간에서의 경시적 농도변화는 Fig. 3에 나타내었다. 혈장의 경우, 1시간째 최고농도(402.64±59.66

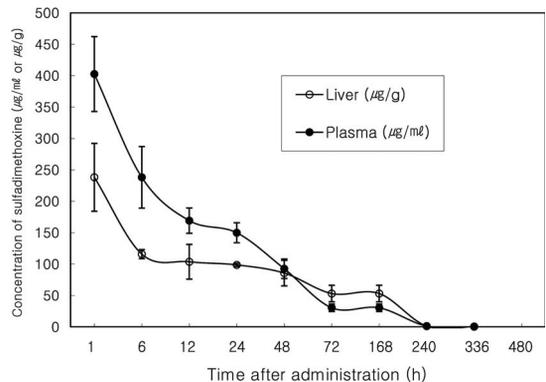


Fig. 3. Plasma and liver concentrations of sulfadimethoxine in olive flounder after oral feeding with single dose of 400 mg/kg body weight at 20±1.5°C (N=3~5). All points are means±SD.

$\mu\text{g/ml}$)에 도달하였는데, 최고농도는 최초 투여량(400 mg/kg)에 거의 근접하였다. 이후 72시간($30.38 \pm 5.95 \mu\text{g/ml}$)까지 빠르게 감소하였으며, 336시간($0.24 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$)은 미량으로 검출되었으나 480시간째(20일) 검출되지 않았다. 간에서는 1시간째 최고농도($238.18 \pm 54 \mu\text{g/g}$)에 도달하였으나, 그 양은 최초 투여량의 절반 정도였다. 이후 168시간($53.04 \pm 13.16 \mu\text{g/g}$)까지 완만하게 감소하였고, 336시간($0.62 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$)은 미량으로 검출되었으나 480시간째 검출되지 않았다. SDM은 경구 투여된 후 24시간까지는 혈장이 간보다 높게 잔류하였으며, 48시간째를 기점으로 이후부터는 간에서의 잔류농도가 혈장을 초과하였다.

SDM을 무지개송어에게 42 및 126 mg/kg ($13 \pm 1.0^\circ\text{C}$)의 농도로 1회 경구 투여하였을 때, 혈장은 10~24시간의 범위에서 최고농도($20\sim 80 \mu\text{g/ml}$)에 도달하였고, 이 가운데 42 mg/kg 의 실험군은 간에서 12시간째 최고농도($61.4 \mu\text{g/ml}$)를 나타내었으며, 조직 내 SDM의 분포는 담즙>장관>간>혈액>신장>근육의 순서였다 (Kleinow *et al.*, 1992). SDM을 channel 메기에게 40 mg/kg (24°C)의 농도로 1회 경구 투여하였을 때, 혈액 (whole blood)은 3~6시간째 최고농도를 보였다 (Squibb *et al.*, 1988). SDM을 무지개송어에게 200 mg/kg (15°C)의 농도로 1회 경구 투여하였을 때, 혈청은 20~40시간째 최고농도($36.1 \mu\text{g/ml}$), 간은 48시간째 최고농도($38.6 \mu\text{g/g}$)에 도달하였으며 28일째 완전히 소실하였다 (Uno *et al.*, 1993). SDM의 경구 투여에 따른 무지개송어, 뱀장어, 방어 조직 내 분포를 조사한 보고 (日本水産資源保護協會, 1980)에 의하면, 무지개송어와 방어의 간>신장>혈액>근육 그리고 뱀장어는 혈액>간>신장>근육의 순서였다. 한편, swine과 lamb에서 분석한 설파제의 일반적인 조직별 분포는 뇨>혈청>장간>신장>근육의 순서라고 보고되었다 (박 등, 1994). 앞선 연구자들의 보고와 이번 연구를 동일

선상에서 비교하기는 어려웠으나, SDM은 어종에 따라서 체내 흡수 기작이 뚜렷하게 차이가 있었으며, 넙치는 무지개송어와 channel 메기에 비하여 혈액으로 흡수되는 속도가 상당히 빠르다는 것을 알 수 있었다. 또한, 넙치에서 SDM의 조직별 분포는 뱀장어와 비슷하였으며, 전형적인 설파제의 분포패턴과도 매우 유사하다고 보인다. 이번 연구에서 SDM을 경구 투여한 후, 혈액과 간에서 모두 투여 후 1시간째 이미 최고농도로 도달하였는데, 1시간 이내에서 분석시간을 좀 더 세분화하여 조사하지 못하였다. 앞으로 후속 연구를 통해 SDM이 1시간보다 훨씬 빨리 체내로 흡수되어 최고농도에 도달하는지 그 여부를 중점적으로 밝혀야 하겠다.

어체 내에서 약제의 농도가 어느 정도를 유지하면 치료효과를 높일 수 있는지는 매우 어려운 문제이다. 감염된 병원균의 종류, 그에 따른 MIC, 어종, 수온 등 많은 요인이 관여하겠으나, 일반적으로 MIC가 높은 내성균에는 치료효과가 없어지기 때문에 MIC도 중요한 요인이라는 것은 분명하다. 항생제의 사용에 있어서 병원균의 감수성을 조사할 필요가 있는 것이기 때문이다. 어체 내에서 약제농도는 MIC보다 높을 필요가 있다. 고농도의 편이 효과적일 것이나 농도가 너무 높으며 부작용을 일으키게 된다. 어종에 따라서 차이는 있겠지만 SDM의 경구 투여에 따른 주요 부작용으로는 섭취량의 저하와 이에 따른 성장 억제가 보고되었는데 (日本水産資源保護協會, 1980), 이번 연구에서 투여 20일까지 생존한 넙치를 대상으로 SDM의 부작용에 대한 실험은 실시하지 못하였으므로 더욱 심도 있게 연구되어야 하겠다. SDM은 넙치에서 경시적 혈중 농도가 매우 높게 분석되었으므로, 저자는 2004~2005년에 양식 넙치와 조피볼락에서 분리한 세균(7종류)을 이용해서 상법에 따라 항균활성(MIC)을 조사해 보았다. 이용한 세균은 넙치에서

분리한 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio ichthyenteri*, *Streptococcus iniae*, *S. paruberius*, 조피볼락에서 분리한 *Photobacterium damsela*, *Lactococcus garvieae*이었다. 그 결과, 이들 모두에서 SDM의 MIC는 5,000 µg/ml 이상을 나타내었다(자료 미발표). 물론 가장 최근에 분리한 더 많은 세균을 대상으로 항균활성을 조사할 필요가 있기 때문에 성급하게 결론을 내릴 수는 없겠으나, SDM을 이용해서 넙치와 조피볼락을 치료하기 위해서는 사전에 약제감수성 시험을 반드시 거쳐야 할 것으로 생각되었다. 이번 연구에서 얻어진 결과는 넙치에 SDM을 처방할 때 투여농도 및 휴약기간 등을 설정할 수 있는 기초 자료로서 유용하게 활용될 것이다.

요 약

설파디메톡신(sulfadimethoxine, SDM)을 넙치(평균 체중 100±20 g, 20±1.0°C)에 대하여 400 mg/kg의 농도로 1회 경구 투여한 다음, 혈장과 간에서 시간 경과에 따른 잔류량을 HPLC로써 분석하였다. SDM을 넙치의 조직에 2-50 ppm의 농도가 되도록 첨가한 결과, 평균 회수율은 혈장에서 92.24-93.62%, 간에서 88.34-91.90%의 범위로 나타났으며, 이 분석법의 검출한계는 0.05 ppm이었다. SDM은 투여한 후, 1시간째에 혈액(402.64±59.66 µg/ml)과 간(238.18±54.00 µg/ml)에서 모두 최고농도로 분포하였다. 이후 SDM은 빠른 속도로 배설되었으며, 480시간째는 혈장과 간에서 검출되지 않았다.

감사의 글

이 연구는 국립수산과학원(생태 안전형 천연 소득제 개발, RP-2012-AQ-029)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- American fisheries society: Guide to using drugs, biologics, and other chemical in aquaculture. FCS working group on aquaculture drugs, chemicals, and biologics, pp.36-37, 2011.
- Gehring, T.A., Griffin, B., Williams, R., Geiseker, C., Rushing, L. G. and Siitonen, P.H.: Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp, and salmon tissue by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogra. B.*, 840: 132-138, 2006.
- Kleinow, K.M., Beilfuss, W.L., Jarboe, H.H., Droy, B.F. and Lech, J.J.: Pharmacokinetics, bioavailability, distribution and metabolism of sulfadimethoxine in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 1070-1077, 1992.
- Kleinow, K.M. and Lech, J.J.: A review of the pharmacokinetics and metabolism of sulfadimethoxine in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Hum. Toxicol.*, 30: 26-30, 1988.
- Squibb, K.S., Michel, C.M.F., Zelikoff, J.T. and O'Connor, J.M.: Sulfadimethoxine pharmacokinetics and metabolism in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Vet. Hum. Toxicol.*, 30: 31-35, 1988.
- Uno, K., Aoki, T. and R. Ueno: Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 115: 209-219, 1993.
- 農林水産省: 養殖業者の皆様へ, 水産用醫藥品の使用について. 第20報 pp. 1, 農林水産省消費安全 國 畜水産安全管理課, 2006.

- 野口昭一郎, 寺田久屋, 田村征男. LC/MS/MSを用いた
畜水産物中の残留動物用医薬品の一斉分析.
日本食品衛生學會誌, 49: 177-177, 2008.
- 日本水産資源保護協會. 水産用医薬品使用指針 1, pp.
23-37, 1980.
- 국립수산과학원 병리연구과. 2011 수산용의약품 제품
요약 해설집, pp. 57-59, 보성인쇄, 부산, 2011.
- 길근환, 고광용, 이용재, 박혜진, 이규승. MSPD와HPLC
를 이용한 돼지고기 및 광어 중의 테트라사이클
린계 항생제와 sulfonamide의 다성분 잔류분석
법 개발. 한국환경농학회지, 28: 266-273, 2009.
- 도정완, 서정수, 이남실, 백하림, 박민우, 황형규, 오봉세.
겨울철과 여름철의 양식 조피볼락(*Sebastes sch-
legeli*)에서 설파디메톡신나트륨(sulfadimethox-
ine sodium)과 관련된 임상사례. 2010년도 한국
수산과학총연합회 공동학술발표대회 발표요
지집, PB-21, 2010.
- 박종태, 정은주, 김영국, 송병준, 오금순, 임현철, 김순찬.
HPLC법에 의한 식육중의 설파제 잔류량 조사.
한국식품과학회지, 26: 221-225, 1994.
- 하대식, 김종수, 김근섭. MSPD와HPLC를 이용한 어류
의 잔류 설파제와 테트라사이클린계 항생물질
의 동시분석. J. of Food Hygiene Safety, 12: 117-
124, 1997.

Manuscript Received : April 30, 2012

Revised : July 19, 2012

Accepted : August 09, 2012