

## 경구투여에 의한 양식산 넙치내 Erythromycin의 약물동태학적 특성 분석

서정수 · 전은지 · 정승희 · 박명애 · 김나영<sup>†</sup>  
(국립수산과학원)

### The Pharmacokinetics of Erythromycin in Cultured *Paralichthys olivaceus* after Oral administration

Jung-Soo SEO · Eun-Ji JEON · Sung-Hee JUNG · Myung-Ae PARK · Na-Young KIM<sup>†</sup>  
(National Fisheries Research and Development Institute)

#### Abstract

The pharmacokinetics of erythromycin (EM) after oral administration was studied in the cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, using LC/MS/MS. After single- or multiple-dose administration of EM (50, 100, 200 mg/kg body weight and 50 mg/kg for 5 days) by oral route in olive flounder (350±40 g, 22±0.5°C), the concentration in the serum was determined at 1, 3, 6, 9, 24, 72, 120, 168, 264, 360, 504 and 720 h post-dose. The kinetic profile of absorption, distribution and elimination of EM in serum were analyzed fitting to a two-compartment model by WinNonlin program. The area under the concentration-time curve (AUC), maximum concentration ( $C_{max}$ ), time for maximum concentration ( $T_{max}$ ) following oral administration of 50, 100 and 200 mg/kg b.w. and 50 mg for 5 days. EM was 165.3 hr\* $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $C_{max}$ , 34.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $T_{max}$ , 1.56 hr), 212.8 hr\* $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $C_{max}$ , 60.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $T_{max}$ , 3.99 hr), and 592.37 hr\* $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $C_{max}$ , 63.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $T_{max}$ , 4 hr), respectively. The results of this study related to dosage and  $\mu$  · withdrawal times could be used for prescription of EM in field for the treatment of bacterial diseases in olive flounder.

**Key words :** Erythromycin, Olive flounder, LC/MS/MS, MIC (minimum inhibition concentration)

#### I. 서론

어류에 대한 소비량이 증가하면서 양식 어류의 공급이 증가되고 그에 따라 고밀도 사육방법이 성행하면서 양식어류에서 질병 발생률이 증가되고 있다.

질병치료를 위하여 항생제가 많이 사용되어 왔으며, 그 중 macrolide계 항생제의 경우 2004년

이후 사용량은 10,545 kg으로 oxytetracycline, amoxicillin에 이어 3위를 차지했으나 (KFDA, 2006) 최근 3년동안 감소추세이다. 그 중 Erythromycin (EM)은 macrolide계 항생제로서, *Streptomyces erythraeus*로부터 최초로 생산되어 왔으며, *in vitro*에서 gram positive cocci (Staphylococci, Streptococci), gram positive (*Bacillus anthracis*, *Corynebacterium*, *Clostridium* sp.) 또는 gram

<sup>†</sup> Corresponding Author : 051-720-3047, kny009@nate.com

\* 이 논문은 국립수산과학원 연구비 지원에 의해 운영되었음.

negative rods에 대하여 활성을 가지며, 대부분 Enterobacteriaceae (*Pseudomonas*, *E. coli*)에 속하는 균종들은 내성이 있는 것으로 보고되고 있다 (Ray et al., 2004).

Erythromycin (EM)은 1987년에 첫 품목허가를 받았으며, 2013년부터 처방대상 동물용 의약품으로 지정되었다 (NFRDI, 2011). EM은 단일 및 복합제제로 품목허가가 났으며 단일 성분으로는 연어과 어류, 방어, 넙치, 은어의 세균성 질병을 치료하기 위해 1일 용량으로 어체중 1kg당 역가 25~100 mg 이 되도록 사료에 혼합하여 약 5일간 경구투여하며, 휴약 기간은 방어 14일 및 연어 30일로 되어있다. 축산에서도 빈번히 사용되고 있으며, 국내잔류허용 기준은 소, 돼지, 토끼, 염소에서는 0.05 mg/kg이고 어류 및 갑각류에서 0.2 mg/kg으로 설정되어 있다 (KFDA, 2007).

EM에 대한 연구는 포유류에서 약물동태학적인 연구가 많이 이루어져 있고, 어류의 경우는 연어과 어류 (Esposito et al., 2007), 감성돔 (Salvo et al., 2013a), 방어 (Katae, 1980) 그리고 주요 양식어류인 넙치에 대해서는 Lee et al. (2008)에서 휴약기간에 대한 설정 연구가 보고 되어있으나 그 이외의 연구는 이루어지지 않고 있다. 현재 넙치에 수산용의약품으로 승인된 EM에 대한 체내 잔류량에 대한 연구와 함께 투여시 어떤 영향이 있는지에 대한 선행연구가 필요하다. 그러므로 이번 연구에서는 넙치에 EM의 경구투여시 혈액에서 약물동태학적 기초 자료를 제시하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 실험어류

이 연구에서 사용된 표준품 Erythromycin은 Sigma사 (USA)를 사용하였고, 실험어에 투여된 약품은 erythromycin thiocyanate (순도 76%; 대성미생물)를 사용하였다. 기기분석을 위한 HPLC용

acetonitrile, methanol 및 증류수 등 용매류는 Merck사 (Germany)를 사용하였으며, 기타 이 실험에 사용된 모든 시약은 특급 이상을 사용하였다.

본 실험에 사용한 어류는 국립수산물과학원 연구소 내 항생제 투여를 받은 적이 없는 건강한 넙치(평균체중 350±40g)를 36마리 사용하였고 사육수온은 22±1℃로 일정하게 유지하였다.

### 2. 항균활성(MIC) 실험

넙치 및 다른 어종에서 분리된 그람 양성 및 음성균 6종 *Streptococcus iniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela subsp. damsela*을 항균활성 실험에 사용하였다.

실험균은 Kim et al. (2013)의 방법을 기초로 Mueller Hinton 배지에서 37℃의 온도조건에서 하룻밤 동안 전 배양하였으며, 항생제의 최소 억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정은 고체배지 희석법에 의하여 실시하였다. 항생제를 함유한 배지는 최고 농도를 128 µg/ml로 하여 12단계 농도로 2배씩 연속적으로 희석하여 만들었다. 106 cfu/ml 농도가 되도록 희석한 균을 항생제를 함유한 고체배지에 5 µl 접종하여 18시간 배양 후, 항생제 농도에 따른 colony의 증식양상을 관찰하였다.

### 3. 약제 투여 및 시료 채취

건강한 넙치 (평균체중 350±40g)를 실험수조에 옮겨 10일 동안 순치시킨 후, 실험구 당 36마리씩 수용하여 22℃로 설정한 사육수온에서 erythromycin thiocyanate (순도 76%; 대성미생물)의 약제첨가 사료를 각각 어체중 kg 당 50, 100, 200 mg/kg이 되도록 강제로 1회 경구투여 및 50 mg/kg이 되도록 5일 동안 강제로 5회 투여하였다. 투여 후 1, 3, 6, 9, 24, 72, 120, 168, 264, 360,

504, 720시간까지 5마리씩 마취 후 0.8~1.0 ml 씩 채혈하여 혈청 분리후 (200  $\mu$ l) -80 °C에 보관하였다가 분석에 사용하였다.

#### 4. LC/MS/MS 분석조건

분석기기는 LC/MS/MS (Agilent, 6410)를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 <Table 1>에 나타내었다. 간단히 설명하면, 초기 이동상을 A mobile phase 및 B mobile phase 용매를 80:20의 비율로 흘리다가 10분 후 50:50으로 gradient 시킨 후 다시 초기 이동상으로 하여 20분간 분석하였다.

샘플은 Salvo et al. (2013a)의 방법을 기초로, 혈장 200  $\mu$ l에 동량의 acetonitrile을 가하여 혼합한 후 10분간 방치, 10,000 rpm, 20분간 원심분리 후 그 상등액을 취하여 여과한 다음에 LC/MS/MS로 분석하였다.

<Table 1> Operation condition of LC/MS/MS for detection of erythromycin

MS/MS condition	
Ionization	ESI, positive
MRM transition (m/z)	734→577
	734→158
Cone voltage (V)	114V
Collision energy (eV)	22, 33V
Nebulization and collision gas	N <sub>2</sub> Ar
Spray voltage	4500V
Capillary temp	350 °C
UPLC condition	
column	Shiseido UG 120V (2 mm ID×150 mm)
mobile phase	A:0.2% acetic acid/water B:0.2% acetic acid/acetonitrile
flow rate	0.2 ml/min
oven temperature	40 °C
injection volume	10 $\mu$ l

그리고 EM의 경시적 혈중농도는 WinNonlin program (Pharsight Co., Inc., USA)을 이용하여 약물동태학적 매개변수 조사를 하였다.

#### 5. 표준곡선 작성 및 회수율 측정

EM을 표준품 10 mg씩을 100 ml 용량플라스크에 취하고 methanol에 녹여 100 ppm농도의 stock solution을 조제하였다. Working solution은 stock solution 10 ml을 정확히 취하여 100 ml 용량플라스크에 옮기고 이동상으로 표시선까지 채운 표준용액을 5, 10, 20, 100, 200 ng/ml로 희석하여 사용하였다. 항생제 표준원액 (stock solution)은 4 °C에 보관하였다. 회수율은 EM의 표준용액을 10, 50, 100 ng/ml의 농도로 넵치의 혈청에 첨가한 후, EM을 추출하여 LC/MS/MS로 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 항균활성(MIC) 측정

여러 어종에서 분리한 6종의 균주로 EM의 항균활성을 조사한 결과는 <Table 2>에 나타내었다. Gram positive bacteria인 *S. iniae*가 가장 sensitive 했고, gram negative bacteria들은 낮은 민감도인 16~64  $\mu$ g/ml로 나타났다.

<Table 2> Antimicrobial activity of erythromycin against fish pathogenic bacteria

Pathogenic bacteria	MIC ( $\mu$ g/ml)	Origin of bacteria
<i>Streptococcus iniae</i>	≤0.5	Spleen of olive flounder, Wando, Korea, 2005
<i>S. epidermidis</i>	≤2	Abalone, Jeju, Korea, 2013
<i>Edwardsiella tarda</i>	≤64	Kidney of olive flounder, Jeju, Korea, 2005
<i>Vibrio anguillarum</i>	≤64	Spleen of eel, Tongyeong, Korea, 2012
<i>V. harveyi</i>	≤64	Spleen of olive flounder, Korea, 2012
<i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	≤16	Spleen of black rockfish, Seosan, Korea, 2007

이 결과는 EM이 마크로라이드계 항생제로써 양식장에서 bacterial kidney diseases (BDK)와 streptococcosis (Treves-Brown, 2000)에 사용해왔고, 그중 *S. iniae*가 EM에 민감하다고 알려져 있으며 (Creep and Buller, 2006; Park et al., 2009), gram

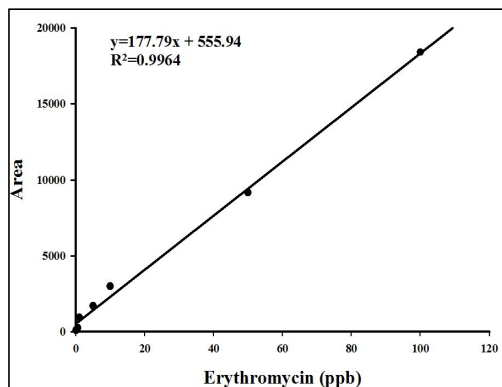
positive bacteria와 다른 전신성 세균감염에 효과적이고, gram negative bacteria에 내성이 있다는 결과와 일치한다 (Ray et al., 2004).

이러한 항생제 사용은 어종 및 세균에 따라서 독성과 약동학적 특성이 틀리기 때문에 사용전에 각 세균에 대한 MIC 측정 및 약물동태학적인 특성을 고려 후에 사용 할 필요가 있다.

## 2. 표준검량선 및 회수율

EM의 표준은 검량선의 작성은 표준용액을 acetonitrile로 5, 10, 20, 100, 200 ppb로 희석하여 분석한 결과 농도에 따라 직선성 ( $r^2$  값)은 0.9997을 나타내어 아주 양호한 검량선이 구해졌다 [Fig. 1]. 이 실험의 EM의 검출한계 (LOD, Limit of Detection)와 정량한계 (LOQ, Limit of Quantitation)은 2.5 ng/ml이고, 8.3 ng/ml로 측정되었으며 (KFDA, 2006), 회수율은 85~99%로 나타났다.

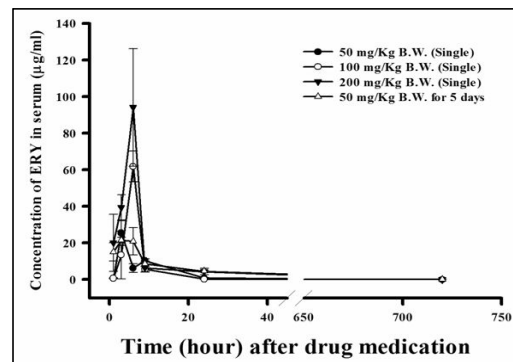
여러 어종의 근육에 대한 EM의 회수율은 넙치에서는 87.6%, 돌돔은 87.2%, 무지개 송어에서는 86%, 뱀장어에서는 85%로 나타났다 (Park et al., 2008). 혈액에서의 무지개송어의 경우는 95%로 (Salvo et al., 2013b), 이 실험방법은 여러 실험들과 비교하여 이 분석 방법이 안정적인 방법임을 나타내었다.



[Fig. 1] Calibration curve for the assay of erythromycin

## 3. 경구투여에 따른 약동학적 변화

EM은 넙치 및 조피볼락의 세균성 질병 치료에 많이 쓰이고 있으며 (Treves-Brown, 2000), 어체내 MRL은 200 ng/ml이며 휴약기간은 30일로 권고하고 있다 (KFDA, 2006). EM을 50, 100, 200 mg/kg으로 경구투여한 후 어체내 혈중 약물농도의 경시적 농도변화를 관찰하였다 [Fig. 2]. 투여후 50 mg/kg 투여시 최대 혈중농도 도달시간의 3시간이었으나 100 mg/kg 및 200 mg/kg으로 증가시 6시간으로 늘어남을 알 수 있었다. 다른 어종인 무지개 송어에 75 mg/kg을 매일 10일 동안 투여한 실험에서도 혈중 약물의 농도가 6시간 쯤에 가장 높게 나타났고, 24시간째에 급격한 감소를 하였다. (Salvo et al., 2013b). Katae (1980) 등에 따르면 방어에서도 EM을 10일 동안 50 mg/kg으로 경구투여시 비슷한 결과를 나타내었고, 감성돔의 경우 75 mg/kg을 10일 동안 경구투여시 1시간째 혈중 약물농도가 최대였고 (Salvo et al., 2013a), 혈류에서는 EM의 축적이 일어나지 않았다. 반면, 넙치에서는 약물이 혈중에서 0.2 ppm이하로 배출되는데 50 mg/kg 1회 경구투여는 3일이 소요되었고, 100 및 200 mg/kg 1회 경구투여는 5일이었으며, 50 mg/kg 5일 동안 경구투여는 11일 가량이 소요되었고, 0.05 ppm이하로 배출되는데



[Fig. 2] Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of EM in serum of olive flounder after oral administration of 50, 100 and 200 mg/kg b.w. and 50 mg/kg for 5 days, respectively.

대략 20일 가량이 소요됨을 알 수 있었다. 50 mg/kg을 5일 동안 투여시 약물의 체내 대사 기간이 27일 이상 소요됨을 알 수 있었다. EM은 약물 농도 의존적으로 혈액에서 검출되며, 50 mg/kg 1회 경구투여와 50 mg/kg 5회 투여방법에 따른 약물 검출 차이 및 어종의 적정수온에 따라서 EM의 배출속도가 다를것이라 생각되며, 무지개 송어와 (Salvo et al., 2013b), 방어 (Katae,

1980)와 넙치의 약물대사작용을 비교해보면, 넙치의 혈중 배출속도가 느린 것은 어종의 높은 사육 수온과 낮은 활동성으로 인해 체내물질대사 속도가 느린 것으로 사료된다. 경구투여에 의한 실험 결과 수치는 어체내 대사작용에 있어 조직으로 분포되는 분포상과 간이나 신장을 통하여 소실되는 분포후상의 two-compartment 모델로 나타났다 [Table 3].

<Table 3> Pharmacokinetic parameters following a oral administration of EM in olive flounder (n=5)

Parameter	(unit)	For single			For 5 days
		50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	50 mg/kg
AUC	hr* $\mu\text{g}/\text{ml}$	165.300079	212.836855	592.373813	202.137348
K01_HL	hr	0.121054	0.523089	2.356091	0.539632
K10_HL	hr	2.835722	1.269979	2.378559	4.752453
Alpha	1/hr	0.289200	0.599970	0.298888	0.178159
Beta	1/hr	0.061372	0.016736	0.003915	0.007495
Alpha_HL	hr	2.396778	1.155304	2.319089	3.890613
Beta_HL	hr	11.294220	41.415395	177.050968	92.478557
CL_F	ml/hr	0.302480	0.469843	0.337625	0.247357
V2_F	ml	0.571361	2.457185	2.127238	5.677219
T <sub>max</sub>	hr	1.553235	3.998914	4.045350	2.178643
C <sub>max</sub>	$\mu\text{g}/\text{ml}$	34.633570	60.383592	63.019005	21.495531

Abbreviations: AUC, Area under a concentration of analyte vs. time curve; K01\_HL and K10\_HL, half-life of distribution rate constants of central and peripheral compartments;  $\alpha_{HL}$ , The half-life associated with the macro constant alpha (distribution phase);  $\beta_{HL}$ , The half-life associated with the macro constant Beta (elimination phase), V2\_F, Volume of distribution of the peripheral compartment, CL\_F, an estimate of the total body clearance; CL, Total body clearance. CL=Dose/AUC; T<sub>max</sub>, The time of peak concentration; C<sub>max</sub>, The peak or maximum concentration.

넙치 EM 경구투여 그룹 (50, 100, 200 mg/kg)에 대해 EM 투여 후 시료로부터 혈청을 분리하여 2-compartment model을 통한 LC/MS/MS로 분석한 결과, 혈장농도-시간곡선하면적 (AUC)은 50 mg/kg 투여시 165.3 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 mg/kg 투여시 212.83 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 mg/kg 투여시 592.37 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었고, 5일 동안 50 mg/kg 투여시 202.13 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 농도들 사이에서 증가가 발생하나 유의적이지 못하였다.

넙치 EM 경구투여 그룹 (50, 100, 200 mg/kg)에 대해 EM 투여 후 시료로부터 혈청을 분리하여 2-compartment model을 통한 LC/MS/MS로 분석한

결과, 혈장농도-시간곡선하면적 (AUC)은 50 mg/kg 투여시 165.3 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 mg/kg 투여시 212.83 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 mg/kg 투여시 592.37 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$  이었고, 5일 동안 50 mg/kg 투여시 202.13 hr\* $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 농도들 사이에서 증가가 발생하나 유의적이지 못하였다.

최고혈중농도 도달시간 (T<sub>max</sub>) 및 최고혈중농도 (C<sub>max</sub>)도 50 mg/kg 투여시 T<sub>max</sub>는 1.55 h, C<sub>max</sub>는 34.63  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 mg/kg 투여시 T<sub>max</sub> 3.99 h, C<sub>max</sub> 60.38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 mg/kg 투여시 T<sub>max</sub>는 4 h, C<sub>max</sub>는 63.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 농도간 증가는 있으나 100 mg/kg 투여시와 200 mg/kg 투여시에는 농도 증가

시 최고혈중농도 도달시간과 혈중농도의 증가가 있으나 유의적이지 못하였다. 50 mg/kg을 5일동안 투여시  $T_{max}$ 가 약간 증가하나  $C_{max}$ 는 감소함을 알 수 있었다.

EM은 위산에 의해서 파괴가 잘되고, 반감기(1~1.5 h)가 짧은 약물로, 주사제, 경구 투여제, 사료첨가제로 질병의 예방 및 치료제로 식용동물과 양식어에 사용되어 왔는데, 통상적으로 넙치 양식장에서 치료에 이용하는 EM은 경구 투여법에 전적으로 의존하고 있어, 다른 투여방법에 의한 약물 치료효과와 영향에 대한 연구가 많이 필요하다.

## Reference

- Creeper J. H. and Buller N. B.(2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture, Australian Veterinary Journal 84(11), 408~411.
- Esposito, A. · Fabrizi, L. · Lucchetti, D. · Marvasi, L. · Coni, E. and Guandalini, E.(2007). Orally Administered Erythromycin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Residues in Edible Tissues and Withdrawal Time, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(3), 1043~1047.
- Katae, H. · Kouno, K. · Shimizu, M. · Kusuda, R. · Taniguchi, M. · Shiomitsu, K. and Hasegawa, H. (1980) Studies on Chemotherapy of Fish Disease with Erythromycin-I, Fish Pathology 15(1), 7~16.
- Kim, M. J. · Lee, S. W. · Lee, D. K. · Park J. E. · Kang, J. Y. · Park, I. H. · Shin, H. S. and Ha, N. J.(2013). Antibiotic Resistant Patterns and DNA Fingerprint Analysis of *Acinetobacter baumannii* from Clinical Isolates, Yakhak Hoeji 52(2), 132~138.
- Korea Food and Drug Administration.(2006). Approval of registration of the animal drug and usage status, 1~183.
- Korea Food and Drug Administration.(2007). MRLs for veterinary drugs in foods, 1~310.
- Lee, T. S. · Park, M. J. · Choi, H. S. · Shin, K. B. · Park, M. S. and Shin, I. S.(2008). Erythromycin Withdrawal Time in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) after Oral Administration, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42(3), 204~208.
- National Fisheries and Development Institute(2011). Explanation of the manual about products of fish drug, 24~28, Fish Pathology.
- Park Y. K. · Nho S. W. · Shin G. W. · Park S. B. · Jang H. B. · Cha I. S. · Ha M. A. · Kim Y. R. · Dalvi R. S. · Kang B. J. and Jung T. S.(2009) Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Veterinary Microbiology 136(1-2), 76~81.
- Park, M, J. · Park, M. S. · Lee, T. S. and Shin, I. S.(2008). A New Analytical Method for Erythromycin in Fish by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Food Science and Biotechnology 17(3), 508 ~ 513.
- Ray, W. A. · Murray, K. T. · Meredith, S. · Narasimhulu, S. S. · Hall, K. and Stein, C. M. (2004). Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. The New England Journal of Medicine 351(11), 1089~1096.
- Salvo, A. D. · Pellegrino, R. M. and Cagnard, P. (2013a). Pharmacokinetics and residue depletion of erythromycin in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. after oral administration, Journal of Fish Diseases. doi: 10.1111/jfd.12170.
- Salvo, A. D. · Rocca, G. D. · Pellegrino, R. M. and Cagnard, P.(2013b). Pharmacokinetics and residue depletion of erythromycin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Journal of Fish Diseases 36, 1021~1029.
- Treves-Brown K. M.(2000) Macrolides. In Applied Fish Pharmacology, pp. 87~94. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

- 
- 논문접수일 : 2014년 02월 11일
  - 심사완료일 : 1차 - 2014년 03월 04일  
2차 - 2014년 03월 14일
  - 게재확정일 : 2014년 03월 17일