

Amoxicillin의 근육투여에 따른 수온별 넙치 체내 약동학적 특성

김지수·이지훈·이수진·박관하[†]

군산대학교 수산생명의학과

Pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular injection at different temperatures to cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Ji-Soo Kim, Ji-Hoon Lee, Soo-Jin Lee and Kwan-Ha Park[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University

The pharmacokinetic properties and residue levels of amoxicillin (AMOX) were studied after intramuscular injection to cultured olive flounders (100±50 g), *Paralichthys olivaceus*. For pharmacokinetic studies, AMOX of 20 to 80 mg/kg body weight was administered at 17±2°C or 22±2°C and AMOX concentrations were determined in plasma, the liver, and the kidney by HPLC-UV. Plasma samples were assessed at 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168 hours post-dose, whereas liver and kidney concentrations were measured at 0.25 to 48 hours post-dose. The kinetic profiles of AMOX were analyzed by fitting to a 2-compartmental model with PKSolver program. The following parameters were obtained for a single dosage of 20, 40 and 80 mg/kg of body weight at 22°C and 20 and 40 mg/kg of body weight at 17°C in plasma, liver and kidney, respectively: C_{max} (the peak concentration)= 27.23-257.36 μg/ml, 5.49-41.65 μg/g, 16.75-129.31 μg/g; t_{max} (the time for peak concentration)= 0.05-0.91, 1.36-3.28, 1.95-4.49 h. For residue studies, AMOX of 40 and 400mg/kg was administered, and muscle samples were taken at 2, 5, 7, 14 and 21 days post-dose. The residue of AMOX in the muscle were found under the MRLs (maximum residue levels) within 7 days for the two doses.

Key words: Amoxicillin, Pharmacokinetics, Olive flounder, Temperature, Intramuscular

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 국내에서는 흔히 광어라는 이름으로 알려져 있으며, 주로 횡감으로 많이 소비하고 있다. 통계청 조사에 따르면, 2010년부터 2013년까지 4년 간 넙치의 연간생산량은 약 3.7만~4.1만 톤에 다다르며, 이는 천해양식산업 어류생산량에서 절반 이상 차지하고 있는 등 우리

나라의 대표적인 양식 산업으로 자리매김하고 있다(Statistics Korea, 2014).

넙치 양식 산업에서 넙치의 생존율은 경제성을 결정짓는 가장 큰 요인으로 작용한다. 2012년 5월에서 10월까지 약 6개월 간 양식 넙치의 폐사 피해 동향에 따르면 총 폐사 피해에서 연쇄구균증의 폐사율이 12.77%로 보고되었다고 보고하였다(Jee et al., 2014). 생존율을 높이는 방법은 다양한 원인에 의한 폐사피해를 줄이는 것이며, 그 중 연쇄구균증

[†]Corresponding author: Kwan-Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-469-1885
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

등의 세균성 질병을 치료하기 위해 amoxicillin (AMOX)을 사용하고 있다.

AMOX은 그람양성균 및 그람음성균에 광범위하게 작용하는 페니실린계열의 반합성 항생물질(β -lactam계)로(Kaur *et al.*, 2011), 국내에서는 수산용으로 품목이 허가된 AMOX은 세부적으로 base, 나트륨염, 삼수화물 또는 florfenicol 등의 다른 항생제와 병용제제로, 투여방법으로 현재는 경구투여방법이나 근육주사로 허가되어 있으며, 양식어류의 그람양성균 및 음성균의 예방 및 치료에 사용되고 있다(NFRDI, 2014).

AMOX에 관해 국내에서 연구된 보고에 따르면 정 등(Jung *et al.*, 2006), 김 등(Kim *et al.*, 2009), 전 등(Seo *et al.*, 2010), 송 등(Song *et al.*, 2012)은 AMOX의 경구투여에 따른 단일온도의 약동학적 특성이나 잔류량에 관한 연구 등 일 뿐이며, AMOX의 약물동태에 수온이 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 연구는 거의 없다. 특히, 손 등(Son *et al.*, 2011)은 수온 상승기 및 수온 하강기로 기간을 나누어 경구투여로 진행하였지만 투여농도도 달리 하여 진행하였기 때문에 비교하기 힘들다. 병어의 경우 식욕이 감퇴하여 실제 양식장에서 경구투여방법으로는 제대로 투여하기 힘들며, 주사투여방법에 비해 약물의 흡수율이 떨어진다.

따라서, 본 연구에서는 AMOX의 사육수온 및 투여농도를 달리 하여 넙치에 근육투여를 하였을 때 HPLC-UVD 및 LC-MS/MS를 이용하여 체내 AMOX의 잔류량과 약동학적으로 어떠한 변화가 있는 지 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

시험어 및 시약

전남 완도지역에서 100±50 g의 건강한 넙치를 두 차례 구입하여 차광된 실험실 내에서 순환여과 수조에 수용하여 시험하였다. 시험 전 사육수온은 (17±2)°C와 (22±2)°C로, 분석에 사용한 항생제의 표준품 amoxicillin(AMOX)은 Sigma사(≥900 µg/mg, USA)를 사용하였으며, 그 외 시약으로는 Samchun(Korea)과 Sigma(USA)를 사용하였다. LC-MS/MS 시료의 전처리를 위해 사용한 SPE cartridge는

Oasis® HLB cartridge (Waters, USA, 6 cc, 200 mg)를 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 용매는 Samchun(Korea)을 사용하였다.

항생제 투여 및 시료 채취

시험구는 크게 사육수온, 22°C를 우선적으로 진행한 후에 17°C로 온도를 낮춰 진행하였으며, 세부적으로는 농도로 나누었다. 22°C는 어체중 kg 당 20, 40 및 80 mg, 17°C는 어체중 kg 당 20 및 40 mg 되도록 조제하여 넙치의 등쪽 근육에 1회 투여하였다. 투여가 종료된 직후를 0시간으로 간주하여 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168시간마다 각 시험구에서 3마리씩 채취하여 시료를 채취하여 냉동보관(-70°C)하였다.

근육 내 잔류량을 분석하기 위해 각 온도 별로 두 농도로 시험하였다. 권고하는 최대용량 및 최대용량의 10배 즉, 어체중 kg 당 40 및 400 mg이 되도록 조제하여 넙치의 등쪽 근육에 1회 투여하였다. 투여가 종료된 직후를 0일로 간주하여 2, 5, 7, 14, 21일마다 각 시험구에서 3마리씩 채취하여 근육을 취하여 냉동보관(-70°C)하였다.

시료전처리

혈액, 간 및 신장 내 AMOX을 추출하는 방법은 다음과 같다. 혈장 200 µl에 동일한 양의 70% TCA 용액과 물 1.1 ml을 넣고 균질화한 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상층액을 튜브에 취하였다. 유도체화를 위해 7% formaldehyde 용액 500 µl을 넣어 뚜껑을 닫고 진탕하여 끓는 물에 30분간 반응시킨 후 상온에 10분간 방냉하였으며, 이를 0.45 µm syringe filter로 여과하여 HPLC-UVD 분석에 사용하였다. 간 및 신장은 혈장 200 µl 대신 0.2 g을 각각 정량하였으며, 이후의 방법은 위와 동일하게 수행하였다.

근육의 전처리 방법은 송 등(Song *et al.*, 2012)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 넙치 근육 2 g을 정량하여 80% acetonitrile (ACN) 10 ml를 넣어 균질화한 후 10 ml를 넣어 잔사를 씻어 내려 상기액과 합하였다. 8,000 rpm으로 10분 간 원심분리를 하여 상층액을 감압농축플라스크에 취하여 50°C 이하의 수욕상에서 감압농축하여 ACN을 모두 날

렸다. 여기에 0.1M Na_2HPO_4 용액 2.5 ml를 넣어 용해하였다. SPE cartridge는 메탄올 5 ml, 물 5 ml, 0.05M Na_2HPO_4 용액 5 ml로 활성화를 시킨 다음 시료추출액을 cartridge에 넣어 흡착시켰다. 5 ml 0.05M Na_2HPO_4 용액으로 세척하고 건조시킨 후 0.05M $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{ACN}$ 혼합용액(50:50, v/v) 5 ml로 용출시켰다. 이 용출액을 다시 50°C 이하의 수욕상에서 감압농축하여 ACN을 모두 날려 남은 잔류물을 물로 용해하여 최종부피를 5 ml가 되도록 한 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 이를 LC-MS/MS로 분석하였다.

기기분석조건

혈액, 간 및 신장 내 AMOX의 분석을 위해 Waters 2690 (Alliance) 및 detector로는 UV-detector인 Waters 2487을 사용하였다. Column은 C_{18} (Inno column, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, flow rate를 1 ml/minute, injection volume을 50 μl , run time은 10 minutes로 하였다. Mobile phase는 0.05M KH_2PO_4 (pH 6.5) : Acetonitrile 혼합용액(4:1, v/v)을 사용하였다.

근육 내 AMOX 잔류량 분석을 위한 LC-MS/MS의 기기분석조건은 다음과 같다. LC 및 mass spectrometry는 Agilent사(1260 series, 6420 triple quadrupole MS), C_{18} column (Agilent, 4.6 mm \times 50 mm, 2.7 μm , 30 °C)을 사용하였다. Mobile phase는 0.1% formic acid가 첨가된 물 및 메탄올을 15분동안 gradient로 분석하였다. Flow rate는 0.5 ml/minute, injection volume은 10 μl 로 하였다. MS의 조건으로 scan type는 ESI mode, gas temperature는 300°C, gas flow는 10 L/minute, nebulizer pressure는 30 psi, collision voltage는 8 eV로 하였다. Precursor ion은 366 m/z, product ion은 113.9, 208, 349 m/z로 하여 AMOX의 정성 및 정량에 이용하였다.

표준곡선 및 회수율

HPLC-UVD의 분석을 위해 stock solution을 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ppm의 농도로 단계희석하였다. 유도체화를 위해 희석한 각 표준용액 200 μl 에 증류수 1.1 ml, 70% trichloroacetic acid solution 200 μl , 7% formaldehyde solution 500 μl 를 가하고 뚜껑

을 닫아 진탕하여 끓는 물에 30분 동안 반응시킨 후 상온에 10분간 방냉하여 이를 0.45 μm syringe filter로 여과하여 분석표준용액으로 사용하였다. 회수율은 최종농도가 각각 1, 5 ppm이 되도록 표준용액을 넙치의 혈장, 간 및 신장에 각각 첨가한 후, 위의 전처리 과정을 거쳐 HPLC-UVD로 측정하였다.

LC-MS/MS 분석을 위해 stock solution을 0.005, 0.025, 0.05, 0.1 ppb ($\mu\text{g/L}$)의 농도로 증류수에 녹인 표준용액을 0.45 μm syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 회수율은 AMOX의 최종 농도가 최대잔류허용량인 0.05 mg/kg이 되도록 넙치의 근육에 첨가한 후, 위의 전처리 과정을 거친 후에 LC-MS/MS로 측정하였다.

약동학적 해석

AMOX을 투여한 넙치 체내, 그 중 혈장, 간, 신장 내 약물 농도 측정결과를 바탕으로 2-compartmental model에 따라 Microsoft Office Excel의 add-in인 PKSolver를 이용하여 C_{max} , T_{max} , AUC 등의 AMOX의 pharmacokinetic parameter를 구하였다 (Zhang *et al.*, 2006).

결 과

표준곡선 및 회수율

AMOX의 표준용액을 단계희석한 후 HPLC-UVD 및 LC-MS/MS로 각각 분석하여 농도에 대한 peak area 비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. AMOX의 회귀계수(R^2)는 각각 1.0000 및 0.9994로 직선성이 매우 양호한 것으로 확인되었다.

회수율은 혈장, 간 및 신장은 최종농도가 각각 1, 5 ppm, 근육은 최대잔류허용량(Maximum residue levels, MRLs)인 0.05 mg/kg(KFDA, 2014)이 되도록 AMOX을 첨가한 후 전처리 과정을 거쳐 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다.

수온 및 투여농도에 따른 AMOX의 경시적 농도 변화

AMOX을 각 농도로 넙치에 근육 투여한 후 시간경과에 따른 혈장, 간, 신장 내 농도변화를 각각

Table 1. Recovery of AMOX from blood, liver, kidney and muscle samples of olive flounder

Sample	Fortified concentration	Recovery (%) (Mean±SD, n=3)
Blood	1 ppm	101.23±4.30
	5 ppm	110.09±2.41
Liver	1 ppm	79.38±0.49
	5 ppm	83.36±1.50
Kidney	1 ppm	91.24±5.21
	5 ppm	100.33±4.43
Muscle	0.05 mg/kg	83.83±9.28

Fig. 1, 2, 3에 나타내었다.

혈액 내 AMOX의 경시적 농도 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 먼저 22°C 시험구에서 20, 40 mg/kg는 투여 1시간 후에 35.33±2.21, 97.51±18.08 µg/ml, 80 mg/kg은 15분 후에 212.15±5.37 µg/ml로 혈중 최고값을 나타내었다. 20 mg/kg은 투여 48시간 후, 40 mg/kg은 투여 96시간 후 AMOX의 농도가 1 µg/ml 이하로 나타났으며 168시간에는 검출되지 않았다. 80 mg/kg의 경우 투여 96시간 후에도 1.32±0.62 µg/ml로 1 µg/ml 이상 검출되었으나 168시간에는 검출되지 않았다. 17°C 시험구에서는 20 mg/kg은 투여 1시간 후 26.64±6.47 µg/ml, 40 mg/kg은 51.60±2.04 µg/ml로 혈중 최댓값을 나타내었다. 투여 168시간 후에는 검출되지 않았다.

시간에 따른 간의 AMOX 농도변화는 Fig. 2에

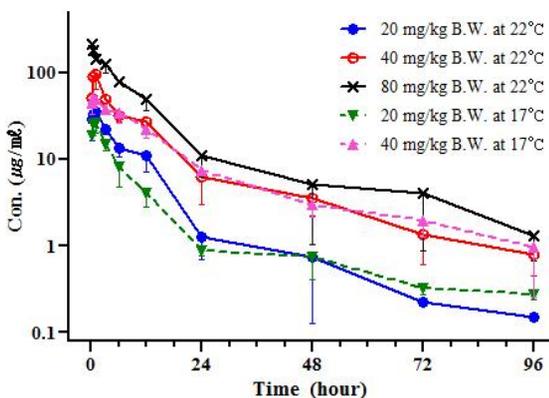


Fig. 1. Plasma concentration of AMOX in olive flounder after intramuscular injection with different doses (mg/kg of body weight) at (22±2)°C and (17±2)°C.

나타내었다. 22°C 시험구에서 20, 40 mg/kg에서는 투여 1시간 후에 8.27±0.40, 12.35±1.40 µg/g, 80 mg/kg은 투여 3시간 후에 40.77±12.16 µg/g로 최댓값을 나타내었다. 17°C 시험구는 20 mg/kg에서는 투여 1시간 후에 5.60±0.85 µg/g, 40 mg/kg에서는 투여 6시간 후 6.11±0.46 µg/g으로 최댓값을 나타내었으며, 두 온도 모두 고농도일수록 간 내 농도의 최댓값이 나타나는 시간이 뒤로 미뤄지는 경향을 보였다.

AMOX의 근육투여 후 시간에 따른 신장 내 농도 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 수온 22°C에서 20, 40, 80 mg/kg 투여했을 때 각각 6시간, 6시간, 3시간 후에 33.33±5.10, 64.65±25.94, 135.56±24.26 µg/g로 최댓값을 나타내었으며 40 mg/kg의 경우 3시간 후 64.23±25.47 µg/g로 측정된 것을 보아 최고농도도 달시간이 앞당겨진 것을 확인할 수 있었다. 17°C에서는 20 mg/kg은 투여 3시간 후에 15.55±7.85 µg/g로 농도 최댓값을 보였으며, 40 mg/kg은 투여 6시간 후 33.64±3.80 µg/g로 나타났다.

AMOX의 투여 후 시간경과에 따른 근육 내 잔류량을 Table 2에 나타내었다. 수온 17°C에서 40 mg/kg으로 투여했을 때 2일 후에는 MRLs인 0.05 mg/kg보다 낮은 값을 나타내었지만, 22°C에서는 투여 2일 후에 94.23±13.60 µg/kg으로 MRLs를 초과하는 값이 검출되었다. 또한 17°C에서 400 mg/kg으로 투여한 후 7일째 잔류량이 17.48±5.48 µg/kg

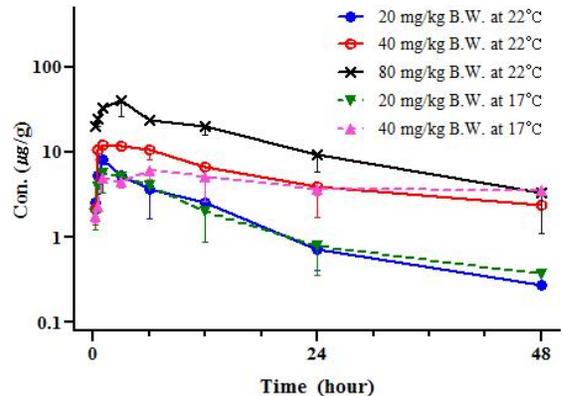


Fig. 2. Liver concentration of AMOX in olive flounder after intramuscular injection with different doses (mg/kg of body weight) at (22±2)°C and (17±2)°C.

Table 2. Mean concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of AMOX in muscles of olive flounder with different doses of 40 and 400 mg/kg B.W. after intramuscular injection

Day	40 mg/kg				400 mg/kg			
	17 °C		22 °C		17 °C		22 °C	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
2	47.66	3.84	94.23	13.60	1450.24	618.59	2328.69	505.32
5	6.67	1.43	24.43	6.97	69.65	24.98	182.15	12.59
7	4.17	0.08	3.33	0.43	17.48	5.48	44.00	8.84
14	1.95	0.44	2.37	0.13	4.71	0.68	5.20	1.26
21					0.84	0.49	2.51	1.93

S.D.: Standard deviation; Bold: above the MRLs(Maximum residue levels) 0.05 mg/kg B.W.

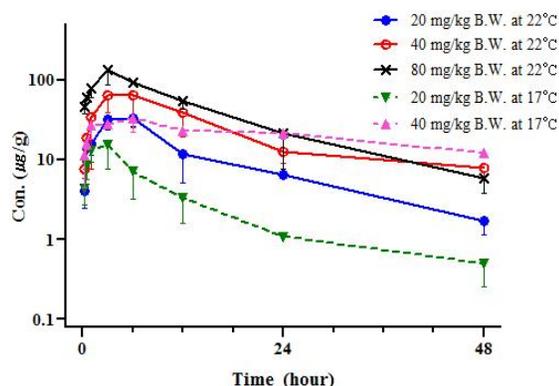


Fig. 3. Kidney concentration of AMOX in olive flounder after intramuscular injection with different doses (mg/kg of body weight) at $(22\pm 2)^\circ\text{C}$ and $(17\pm 2)^\circ\text{C}$.

으로 MRLs의 2/5로 나타났으나, 수온이 다른 22°C 에서의 잔류량이 $44.00\pm 8.84 \mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타나

MRLs에 근접했다.

AMOX의 약동학적 검토

AMOX을 근육투여한 넙치 체내 즉, 혈장, 간 및 신장의 약물 농도 측정결과를 바탕으로 2-compartmental model에 따라 PKSolver를 이용하여 pharmacokinetic parameters를 계산한 결과를 각각 Table 3, 4, 5에 나타내었다.

수온 22°C 에서 20, 40 및 80 mg/kg으로 근육투여한 넙치 혈장내 AMOX의 농도-시간곡선하 면적 ($\text{AUC}_{0-\infty}$)는 각각 310.64, 869.16, 1558.29 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ 로 나타났다. 혈중 최고 농도(C_{max}) 및 도달시간(t_{max})은 각각 0.65, 0.91, 0.05시간에서 35.56, 97.40, 257.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 그 외 흡수속도반감기 ($t_{1/2k_a}$)는 각각 0.16, 0.51, 0.01시간, 분포반감기($t_{1/2\alpha}$)는 1.16, 0.54, 0.24시간, 소실반감기($t_{1/2\beta}$)는 8.48,

Table 3. Pharmacokinetic parameters for AMOX in plasma of olive flounder following intramuscular injection with different doses and temperature

Parameter	Unit	22°C			17°C	
		20	40	80	20	40
$t_{1/2k_a}$	h	0.16	0.51	0.01	0.22	0.08
$t_{1/2\alpha}$	h	1.16	0.54	0.24	1.19	8.51
$t_{1/2\beta}$	h	8.48	11.74	6.61	6.56	166.84
t_{max}	h	0.65	0.91	0.05	0.77	0.55
C_{max}	$\mu\text{g}/\text{ml}$	35.56	97.40	257.36	27.23	50.19
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$	310.64	869.16	1558.29	167.42	1076.76
MRT	h	11.26	15.03	9.31	7.95	109.37

Abbreviation: h, hours; $t_{1/2k_a}$, half-life of the drug during absorbance; $t_{1/2\alpha}$, half-life of the drug during distribution phase; $t_{1/2\beta}$, half-life of the drug during elimination phase; t_{max} , time for maximum concentration; C_{max} , the maximum concentration; $\text{AUC}_{0-\infty}$, area under the time-concentration curve; MRT, mean residence time.

11.74, 6.61시간으로 나타났다. 평균체류시간(MRT)은 각각 11.26, 15.03, 9.31시간으로 나타났다. 17°C에서 20 및 40 mg/kg으로 근육투여한 넙치 혈장내 AMOX의 $AUC_{0-\infty}$ 는 각각 167.42, 1076.76 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ 로 나타났다. C_{max} 및 t_{max} 는 각각 0.77, 0.55시간에서 27.23, 50.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 그 외 $t_{1/2k_a}$ 는 각각 0.22, 0.08시간, $t_{1/2\alpha}$ 는 1.19, 8.51시간, $t_{1/2\beta}$ 는 6.56, 166.84시간으로 나타났다. MRT는 각각 7.95, 109.37시간으로 나타났다.

22°C에서 20, 40 및 80 mg/kg으로 근육투여한 넙치의 간 내 $AUC_{0-\infty}$ 는 각각 84.30, 426.66, 709.50 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$ 로 나타났다. C_{max} 및 t_{max} 는 각각 1.36, 1.92, 1.85시간에서 7.74, 13.36, 41.65 $\mu\text{g}/\text{g}$ 로 나타났다. 그 외 $t_{1/2k_a}$ 는 각각 0.71, 0.43, 0.73시간, $t_{1/2\alpha}$ 는 0.75, 5.81, 1.19시간, $t_{1/2\beta}$ 는 10.74, 50.70, 14.87시간으로

나타났다. MRT는 각각 14.21, 59.49, 20.48시간으로 나타났다. 17°C에서 20 및 40 mg/kg으로 근육투여한 넙치의 간 내 AMOX의 $AUC_{0-\infty}$ 는 각각 71.65, 2.78×10^6 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$ 로 나타났다. C_{max} 및 t_{max} 는 각각 1.78, 3.28시간에서 5.92, 5.49 $\mu\text{g}/\text{g}$ 로 나타났다. 그 외 $t_{1/2k_a}$ 는 각각 0.46, 0.51시간, $t_{1/2\alpha}$ 는 3.42, 20.93시간, $t_{1/2\beta}$ 는 9.77, 6.93×10^5 시간으로 나타났다. MRT는 각각 12.43, 1.00×10^6 시간으로 나타났다.

22°C에서 20, 40 및 80 mg/kg으로 근육투여한 넙치의 신장 내 AMOX의 $AUC_{0-\infty}$ 는 각각 604.67, 7.73×10^6 , 1852.24 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$ 로 나타났다. C_{max} 및 t_{max} 는 각각 3.90, 4.49, 2.70시간에서 33.86, 68.13, 129.31 $\mu\text{g}/\text{g}$ 로 나타났다. 그 외 $t_{1/2k_a}$ 는 각각 2.49, 2.11, 1.34시간, $t_{1/2\alpha}$ 는 2.64, 4.39, 1.48시간, $t_{1/2\beta}$ 는 39.02, 6.93×10^5 , 10.88시간으로 나타났다. MRT는 각각

Table 4. Pharmacokinetic parameters for AMOX in liver of olive flounder following intramuscular injection with different doses and temperature

Parameter	Unit	22°C			17°C	
		20	40	80	20	40
$t_{1/2k_a}$	h	0.71	0.43	0.73	0.46	0.51
$t_{1/2\alpha}$	h	0.75	5.81	1.19	3.42	20.93
$t_{1/2\beta}$	h	10.74	50.70	14.87	9.77	6.93×10^5
t_{max}	h	1.36	1.92	1.85	1.78	3.28
C_{max}	$\mu\text{g}/\text{g}$	7.74	13.36	41.65	5.92	5.49
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$	84.30	426.66	709.50	71.65	2.78×10^6
MRT	h	14.21	59.49	20.48	12.43	1.00×10^6

Abbreviation: h, hours; $t_{1/2k_a}$, half-life of the drug during absorbance; $t_{1/2\alpha}$, half-life of the drug during distribution phase; $t_{1/2\beta}$, half-life of the drug during elimination phase; t_{max} , time for maximum concentration; C_{max} , the maximum concentration; $AUC_{0-\infty}$, area under the time-concentration curve; MRT, mean residence time.

Table 5. Pharmacokinetic parameters for AMOX in kidney of olive flounder following intramuscular injection with different doses and temperature

Parameter	Unit	22°C			17°C	
		20	40	80	20	40
$t_{1/2k_a}$	h	2.49	2.11	1.34	1.21	0.45
$t_{1/2\alpha}$	h	2.64	4.39	1.48	1.28	15.74
$t_{1/2\beta}$	h	39.02	6.93×10^5	10.88	18.37	33.96
t_{max}	h	3.90	4.49	2.70	1.95	2.84
C_{max}	$\mu\text{g}/\text{g}$	33.86	68.13	129.31	16.75	30.86
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$	604.67	7.73×10^6	1852.24	170.07	1601.84
MRT	h	33.24	1.00×10^6	14.84	18.07	49.64

Abbreviation: h, hours; $t_{1/2k_a}$, half-life of the drug during absorbance; $t_{1/2\alpha}$, half-life of the drug during distribution phase; $t_{1/2\beta}$, half-life of the drug during elimination phase; t_{max} , time for maximum concentration; C_{max} , the maximum concentration; $AUC_{0-\infty}$, area under the time-concentration curve; MRT, mean residence time.

Table 6. Mean plasma and tissue concentration in olive flounder following intramuscular injection of AMOX at 40 mg/kg B.W. (n=3)

	Mean AMOX concentration \pm standard deviation at hour:							
	0.25	0.5	1	3	6	12	24	48
Plasma	51.7 \pm 7.7	88.6 \pm 3.2	97.5 \pm 18.1	48.8 \pm 4.3	31.9 \pm 4.1	26.8 \pm 4.7	6.3 \pm 1.2	3.6 \pm 1.4
Liver	2.2 \pm 0.3	10.6 \pm 2.1	12.3 \pm 1.4	11.9 \pm 1.0	10.7 \pm 2.4	6.7 \pm 1.0	4.0 \pm 0.8	2.4 \pm 0.1
Kidney	7.6 \pm 0.6	18.6 \pm 1.5	34.6 \pm 9.3	64.2 \pm 25.5	64.6 \pm 25.9	39.0 \pm 18.3	12.6 \pm 1.5	8.0 \pm 1.2

Bold: peak concentration at hours following injection

33.24, 1.00×10^6 , 14.84시간으로 나타났다. 17°C에서 20 및 40 mg/kg으로 근육투여한 넙치의 신장내 AMOX의 $AUC_{0-\infty}$ 는 각각 71.65, 170.07, 1601.84 $\mu\text{g/g} \cdot \text{h}$ 로 나타났다. C_{max} 및 t_{max} 는 각각 1.95, 2.84시간에서 16.75, 30.86 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 그 외 $t_{1/2k_a}$ 는 각각 1.21, 0.45시간, $t_{1/2\alpha}$ 는 1.28, 15.74시간, $t_{1/2\beta}$ 는 18.37, 33.96시간으로 나타났다. MRT는 각각 18.07, 49.64시간으로 나타났다.

고 찰

본 연구는 amoxicillin의 투여농도 및 사육수온을 다르게 하여 넙치에 근육투여 했을 때 혈장 및 각 조직에 머무르는 경향과 이를 통한 약동학적 변수를 확인하기 위해 HPLC-UVD를 이용하여 분석하였으며, 근육은 투여허가최대농도인 40 mg/kg과 그 용량의 10 배인 400 mg/kg을 투여하여 나타나는 amoxicillin의 잔류량을 LC-MS/MS로 측정하였다.

넙치의 근육에서 amoxicillin을 추출할 때 송 등 (Song *et al.*, 2012)의 방법을 약간 수정하여 진행하였는데, 61.2%의 회수율이 나온 이전 연구와는 다르게 넙치 근육의 회수율 결과가 83.83%로 넙치의 어체 성분 중 지질 성분이 1.7%를 차지하지만 전처리 과정에서 크게 영향을 미치지 않고 오히려 더 높은 수준이었기에 지질제거과정을 따로 거치지 않고 진행하였다.

넙치의 최적 사육수온은 22-24°C이며(Son *et al.*, 2006), 현재 근육투여로 허가된 amoxicillin의 투여농도는 어체중 kg당 40 mg이므로(NFRDI, 2014), 가장 최적 사육수온에 근접한 (22 \pm 2)°C에서 근육투여최대농도인 40 mg/kg으로 투여한 후 분석한 혈장 및 각 조직의 평균 농도를 Table 6에 수치로

나타내었다. 혈장과 간에서는 투여 후 1시간에 최고농도를 나타내었지만, 혈장과 달리 간은 3, 6시간의 농도차이가 각각 0.4 $\mu\text{g/g}$, 1.6 $\mu\text{g/g}$ 으로 약물의 제거속도가 확실하게 차이가 나는 것을 보여주었다. 신장의 경우에는 64.6 $\mu\text{g/g}$ 으로 투여 후 6시간으로 가장 늦게 최대농도에 도달하였는데 이는 신장이 조혈기관이기도 하지만 어류의 배설기관으로 질소성 대사산물과 어체에 유해하거나 불필요한 물질을 배출하는 기능을 담당한다(Park and Oh, 2008). 체내에 제대로 흡수하지 못한 채 혹은 이미 흡수하고 제거되는 amoxicillin이 배출되는 경로로 추측된다. 또한 간은 해독작용을 하는 기관이며 약물을 분해하는 능력에 비해 간으로 들어오는 amoxicillin의 분포 속도가 빠른 경우, 상대적으로 분해 속도가 더더지기 때문에 간 내 잔류시간이 증가한다(Fig. 2).

LC-MS/MS로 근육의 잔류량을 분석한 결과, 22°C에서의 잔류량이 17°C보다 더 높게 측정되었는데(Table 2), 변온동물인 어류에 있어 수온은 모든 생리적 대사과정에 직접적인 영향을 미치는 대사 조절인자이기 때문에 항생제의 잔류농도와 잔류기간이 수온에 의해 크게 영향을 받는다(Son *et al.*, 2011). 22°C에서 근육잔류량이 더 높게 나온 것은 높은 수온에서 투여부위로부터 전신 근육으로의 이동(분포)이 원활하였기 때문인 것으로 추정된다. 특히 그 차이가 투여 후 2-5일에 현저하였고 시간이 흐름에 따라 17°C와 22°C의 잔류농도가 유사해지는 것으로부터도 수온이 분포에 미치는 요인으로 인해 차이가 발생하였을 것으로 사료된다. 또한 Table 4의 서로 다른 수온에서 어체중 kg당 40 mg의 10배인 400 mg으로 투여했음에도 7일 후에는 MRLs 이하로 검출되었다. 이는 항생제 남용으로 인해 넙치 체내에 항생제가 더 많이 잔류한다

고 해도 7-14일이 지나면 체내에서 배출되었다고 보며 amoxicillin의 휴약기간을 최소 7일 이상으로 두는 것이 바람직하다고 생각된다.

생체이용률(Bioavailability)란 치료성의 동등성을 보장하기 위해 흡수속도와 양의 두 가지 측면에서 흡수의 효율성을 정량적으로 평가하고자 하는 것으로 약물의 체내 흡수성을 살펴볼 수 있는 유의한 검사항목이다(Jung *et al.*, 2008). 뱀장어(Jeon *et al.*, 2010)의 경우 40 및 80 mg/kg으로 amoxicillin trihydrate를 경구투여 했을 때 생체이용률(bioavailability)이 각각 1.6, 1.1%라고 보고하였다. 그러나 본 연구는 amoxicillin을 정맥투여하여 시험을 진행하지 않았기 때문에 생체이용률을 구할 수는 없었다.

요 약

아목시실린(AMOX)의 수온에 따른 약동학적 특성과 잔류량을 알아보기 위해 넙치(평균 100 g)를 (17±2)°C 및 (22±2)°C에 수용하여 1회 근육투여한 후 시간에 따른 혈장, 간, 신장의 잔류농도를 HPLC-UVD로 분석하였다. 이 측정결과를 바탕으로 2-compartmental model로 PKSolver program을 이용하여 AMOX의 반감기, AUC 등의 pharmacokinetic parameter를 조사하였다. 혈장, 간, 신장의 최고농도 및 도달시간의 범위가 각각 27.23-257.36 µg/ml (0.05-0.91 h), 5.49-41.65 µg/g (1.36-3.28 h), 16.75-129.31 µg/g (1.95-4.49 h)으로 나타났다. 수온에 따른 잔류기간을 시험하기 위해 어체중 kg 당 40 및 400 mg을 투여한 후 LC-MS/MS로 분석하였다. 40 mg/kg은 5일 후, 400 mg/kg은 7일 후에 각각 최대잔류허용량인 0.05 mg/kg 이하로 검출되었다.

References

- Dhillon, S. and Kostrzewski, A.: Clinical pharmacokinetics, pp 3-23, Pharmaceutical Press, 2006.
- Jee, B.Y., Shin, K.W., Lee, D.W., Kim, Y.J. and Lee, M.G.: Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea, *J. Fish Pathol.*, 27(1): 77-83, 2014.
- Jeon, E.J., Seo, J.S., Kim, J.D., Jung, S.H., Kim, M.S., Hwang, J.Y., Park, M.A., Jee, B.Y., Kim, J.W. and Kim, Y.C.: Pharmacokinetics of amoxicillin trihydrate in cultured eel *Anguilla japonica* by single oral and intravenous administrations, *J. Fish Pathol.*, 23(3): 357-367, 2010.
- Jung, S.H., Choi, D.L., Kim, J.W., Jo, M.R., Seo, J.S. and Jee, B.Y.: Pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by dipping and oral administration, *J. Fish Pathol.*, 21(2): 107-117, 2008.
- Jung, S.H., Seo, J.S., Jee, B.Y., Kim, J.W. and Park, M.A.: Effect of temperature on pharmacokinetics of nalidixic acid and piromidic acid in black rockfish *Sebastes schlegeli* following oral administration, *J. Fish Pathol.*, 24(1): 29-37, 2011.
- Jung, S.H., Seo, J.S. and Park, M.A.: Residues of ampicillin in blood of cultured olive flounder by oral, injection and dipping administration, *J. Fish Pathol.*, 25(3): 211-219, 2012.
- Kaur, S.P., Rao, R. and Nanda, S.: Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic, *International J Pharm Pharm Sci.*, 3(3): 30-37, 2011.
- Kim, H.Y., Choi, H.J., Kim, Y.H., Choi, S.H., Cheong, S.Y., Lee, H.J., Kim, J.I., Choi, G.S. and Choi, J.C.: Analysis of amoxicillin, ampicillin, oxolinic acid, and flumequin in foods, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 41(5): 490-497, 2009.
- Kim, M.S., Cho, J.Y., Seo, J.S., Jung, S.H., Choi, H.S. and Park, M.A.: Distribution of MIC value of antibiotics against *Edwardsiella tarda* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *J. Fish Pathol.*, 25(3): 181-188, 2012.
- Korea Food and Drug Administration(KFDA): MRLs for veterinary drugs in foods, Ministry of Food and Drug Safety, Korea, 2014.
- Kwon, J.W.: The application of definition of the limits of detection and quantification, *Korean J. Environ. Agric.*, 2009(1): 85-102, 2009.
- Park, S.W. and Oh, M.J.: The Histology of fisheries animals, Bioscience publication, 2008.
- Pathology division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI): Catalog of aquaculture drugs in 2014, pp 12-15, NFRDI, Ministry of Oceans and Fisheries, 2014.
- Son, K.T., Jo, M.R., Oh, E.G., Mok, J.S., Kwon, J.Y., Lee, T.S., Song, K.C., Kim, P.H. and Kwon, H.J.: Residues of ampicillin and amoxicillin in olive flounder *Paralichthys olivaceus* following oral ad-

- ministration, Kor J Fish Aquat Sci, 44(5): 464-469, 2011.
- Son, M.H. et al., Standard manual of olive flounder culture, pp 5-7, NFRDI, 2006.
- Song, J.Y., Hu, S.J., Joo, H.J., Kim, M.O., Hwang, J.B., Han, Y.J., Kwon, Y.J., Kang, S.J. and Cho, D.H.: Residue analysis of penicillines in livestock and marine products, Anal. Sci. Technol., 25(4): 257-264, 2012.
- Statistics Korea: Survey for the aquaculture industry, Korean Statistical Information Service, <http://kosis.kr>, 2014.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J. and Xie, S.: PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel, Computer methods and programs in biomedicine, 99(3): 306-314, 2010.

Manuscript Received : Dec 8, 2014

Revised : Apr 15, 2015

Accepted : Apr 17, 2015