ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2016 Vol. 26. No. 3. 309~317 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.3.309

Effect of Oxytetracycline Injection an the Body of *Paralichthys Olivaceus*

Chang-Sik Ko[1], Dong-Hwi Kim[2], So-Hyun Park[2], Kyung-Mi Moon[2] and Moon-Soo Heo[2]*

[1]*Jeju Biodiversity research institute, Jeju Technopark, Jeju 63608, Korea*
[2]*Department of Aquatic Biomedical Sciences and Marine and Environment Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea*

Received November 27, 2015 / Revised January 14, 2016 / Accepted March 9, 2016

Industrial advancements have resulted in food culture development, followed by increased seafood consumption and large-scale seafood farming, which has been accompanied by an increased prevalence of fish disease. The antibiotic oxytetracycline (OTC) is commonly used to prevent and treat bacterial diseases in fish. However, overuse of OTC had led to negative aspects. In view of this, we conducted a research with regard to aspects of remnants on olive flounder skin, liver, and muscle through dipping treatment and oral feeding of OTC and analyzed the results with bioassay and HPLC quantitative analyses. The dipping treatment was carried out once with 25 g/ton/hr of OTC, and the oral treatment with 62.5 mg/kg body weight/7 days. The results underwent a bioassay analysis. The dipping group reacted only on the skin right after dipping, while the oral feeding group responded on the skin for 77 days after feeding and on the muscle for 14 days. In the dipping group, the HPLC quantitative analysis revealed remnants in the skin on the 37th day and on the 13th day in the liver group. No remnants were found in the muscle, even immediately after dipping. In the oral feeding group, there was a high concentration (1.07 mg/kg) of remnant in the skin, even on the 77th day. 0.56 mg/kg in the liver, even a small amount, and no remnant in the muscle on the 42nd day. To sum up, the results suggest that it will not be harmful to our body to observe the OTC withdrawal period of 40 days with the muscle because OTC will hardly remain on it. When using olive flounder for sashimi, the skin and liver should not be used for broth, as the quantity of OTC residue is several times higher than that found in muscle. As previous studies reported that the concentration of remnants gradually decreased with heating, so it was likely to lessen, depending on the cooking temperature.

Key words : Antibiotic, Fish disease, HPLC, Oxytetracycline, *Paralichthys olivaceus*

서 론

수산식품 및 활어의 소비가 증가하면서 1990년대 후반부터 국내 양식어업은 급속히 발전하여 생산규모가 대형화 되면서 양식현장에서의 어병 발생도 매년 급증하여 그로 인한 경제적 피해가 상당한 비중을 차지하고 있으며, 그 중에서도 에드워드병, 비브리오병, 연쇄구균병, 활주세균병등과 같은 다양한 세균성 질병이 많은 비중을 차지하는데 대처방법으로 주로 많은 항생제에 의존하고 있다[4]. 우리나라에서는 성분 별로 약 30여종의 항균물질이 수산양식용으로 시판되고 있는데[11], 이 중에서 Tetracycline계열인 OTC (Oxytetracycline)이 가장 많이 판매되고 있다[3, 8]. 모든 Tetracycline계 항생제는 인체에 오심, 구토, 상복부 통증 및 설사를 유발할 수 있으며 식도궤양이 생길 수 있고 췌장염이 생겼다는 보고도 있다. OIE (Office international des épizooties, 국제무역사무국)에서는 Tetracycline계 항생제를 동물 및 사람의 건강상 중요하거나 또는 항생제 내성으로 인해 중요한 경제적 결과를 초래할 가능성이 있어 관리가 필요한 항생제로 규정하고 VCIA (Veterinary Critically Important Antimicrobials)로 분류하고 있다. 수산용의약품 사용안내[12]에 의하면 넙치인 경우 OTC는 1일 용량으로 체중 kg 당 62.5 mg 이하의 양을 사료에 혼합하여 경구 투여한다. 약욕 처리는 물 1톤당 5~25 g (30~60분) 또는 2.5~5 g (24~48시간)을 녹여서 liquid chromatography를 이용한 정량분석법은 정확한 항생제 종류 및 정밀한 분석결과를 알 수 있다. 하지만 전처리과정에 많은 시간이 필요하고 고가의 시약 및 장비를 필요로 하는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthysolivaceus*)를 대상으로 OTC의 약욕과 경구투여에 따른 피부, 근육, 간의 잔류특성을 미생물학적 간이검사법과 HPLC 정량분석법으로 조사함으로써, 올바른 수산용 항생제 사용지도에 기초자료로 활용될 것이며 나아가 안전한 양식 수산물 생산에 기여하고자 본 연구를 실시하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493
E-mail : msheo@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

공시어

넙치(*Paralichthlys olivaceus*)는 항생제 투여치료를 받은 경력이 없는 건강한 어체를 고르게 선별하여 약욕처리구, 경구투여구 각각 45마리, 51마리를 두 개의 유수식 수조에서 3주간 순치시켰으며, 평균 체중은 112±17 g이었고 실험 기간 동안의 수온은 21±0.5℃이었으며, 매일 1회 평균 체중의 1%씩 사료를 급이 하였다.

약제 투여방법 및 시료채취

약제 투여방법에 따른 넙치 피부, 근육, 간의 잔류 분석을 위하여 약욕처리구와 경구처리구로 구분하였다. 약욕처리구는 Oxytetracycline-HCl 표준품(Sigma)으로 1톤당 25 g의 농도로 1시간 1회실시 하였고, 시료채취는 약욕 직후부터 약욕 후 6일까지는 매일 하였다. 그 이후는 6일간격으로 총 54일까지 3마리씩 시료를 채취하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 경구투여구는 Oxytetracyclin-HCl 표준품(Sigma)으로 OTC의 투여농도를 어체중 kg 당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여 하였다. 시료채취는 경구투여 후 1일부터 7일까지는 매일 하였으며, 그 이후는 7일간격으로 총 77일까지 3마리씩 시료를 채취하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 실험기간 동안 폐사한 실험어는 출현되지 않았다.

잔류분석방법

미생물학적 간이시험법(Bioassay)

사용시약 및 시험 균주

항생제 표준품 OTC-HCl을 사용하였으며, Trimethoprim (TMP)은 Fluka 제품을 사용하였고, 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다. 배지는 계대 및 증균용으로 nutrient agar, 아포제조용으로 A-K #2 sporulating, 시험용 배지로는 Mueller-Hinton agar, Antibiotic medium #2, Antibiotic medium #5, Antibiotic medium #8를 사용하였다. 시험용 균주는 *Bacillus megaterium* KCTC 2178, *Bacillus subtillis* KCTC 1022, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Bacillus sterarothermophilus* KCTC 3067을 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양 받았다.

아포부유액 조제

B. megaterium 아포부유액 조제는 Nutrient agar에 계대 보관한 시험균을 37℃에서 1일간 배양한 후 멸균생리식염수 2~3 ml에 현탁시킨 후, 아포조제용 배지 300 ml를 넣어 굳힌 배양병(Roux bottle)에 접종하여 37℃에서 1일간 배양 후 실온에서 6일간 아포를 형성시켰다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균한 후 65℃에서 30분간 가열한 후 분당 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척을 3회 이상 반복하고 잔사를 멸균증류수에 부유시켜 65℃에서 30분간 재 가열한다. 이를 멸균증류수로 10단계 희석하여 표준한천배지로 균수를 측정한 후 아포농도를 2×10^6 CFU/ml가 되도록 희석하여 사용하였다.

B. subtilis 및 *B. cereus*의 아포부유액 조제는 Nutrient agar에 계대 보관한 시험균을 멸균생리식염수 5 ml에 현탁시킨 후, Nutrient agar 300 ml를 넣어 굳힌 배양병에 접종하여 37℃에서 1일간 배양한 후, 멸균생리식염수 2~3 ml에 현탁시킨 후 아포조제용 배지 300 ml를 넣어 굳힌 배양병에 접종하여 37℃에서 1일간 배양한 후 실온에서 6일간 아포를 형성시켰다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균하여 65℃에서 30분간 가열한 후 분당 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균수에 부유시켜 세척을 반복하고 잔사를 멸균수에 부유시켜 65℃에서 30분간 재가열한다. 아포액은 MacFaland No. 1 정도 되게 멸균수로 희석하여 냉장 보관하여 사용하였다.

*B. stearothermophilus*의 아포부유액 조제는 Nutrient agar에 계대 보관한 균주를 멸균생리식염수 5 ml에 현탁시킨 후, Nutrient agar 300 ml를 넣어 굳힌 배양병에 접종하여 시험균을 55℃에서 1일간 배양하였다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균한 후 85℃에서 15분간 가열한 후 분당 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척을 3회이상 반복하고 잔사를 멸균증류수에 부유시켜 85℃에서 15분간 재가열한다. 아포액은 McFaland No.2 정도 되도록 희석하여 냉장 보관하였다.

시험용액의 조제

TMP (Trimethoprim) 용액은 TMP 10 mg을 용량플라스크에 달아 메탄올 10 ml에 녹이고 멸균증류수를 넣어 100 ml로 한 후 15 μg/ml 용액이 되도록 희석하여 *B. megaterium* 평판 조제 시 사용하였다.

시험용 평판의 조제

B. megaterium 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존된 MH 배지 100 ml당 조제된 시험균액 1 ml와 TMP용액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 페트리접시에 8 ml씩 분주하여 수평으로 유지하여 응고시켰다.

B. subtilis 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존 된 AM #5 배지에 100 ml 당 조제된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작하였다.

B. cereus 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존 된 AM #8 배지에 100 ml 당 조제 된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작하였다.

B. stearothermophilus 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존 된 AM #2 배지에 100 ml 당 조제 된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작하였다.

Table 1. Systematic assumption antibacterial material by microbiological method

B. cereus (AM #8)	*B. subtilis* (AM #5)	*B. megaterium* (MH)	*B. stearothermophi*lus (AM #2)	Estimated substance
++	+	±	±	Tetracycline
-	+	++	±	Macroide
-	±	+	++	Penicillin
-	+	±	-	Aminoglycoside
-	-	-	±	Polyether
-	-	+	±	Peptide
-	-	±	-	Chloramphenicol
±	-	±	±	Novobiocin
-	-	+	-	Sulfanilamides

시험용 평판의 검사

시험할 때마다 스트렙토마이신 감수성 디스크(10 μg)를 이용하여 각 시험용 평판의 감도를 확인하였다. 즉, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *B. stearothermophilus* 평판에서 스트렙토마이신 감수성 디스크의 저지환의 직경이 각 20 mm 이상 되는 평판을 사용하였다.

시험 조작

시료 3마리의 각각 피부에 점액질을 완전히 제거한 후 채취하여 3 g씩 동량혼합 가능한 무균적으로 사방 1 cm 정도로 잘라 검사용 평판에 놓았다. 근육은 시료 3마리의 근육을 15 g씩 동량 채취하여 호모기나이저로 균질화한 후 사방 1 cm 정도의 모양으로 검사용 평판에 놓았다. 이것을 약 1시간 냉장으로 방치한 후 페트리접시를 도치하지 않고 *B. megaterium*는 45℃, *B. subtilis*는 37℃, *B. cereus*는 30℃, *B. sterarothermophilus*은 55℃에서 16~18시간 배양하였다.

판정

결과 판정은 시험평판의 주변 억제대 폭으로써 결과를 판정하였다. 시험평판의 주변 억제대 폭이 1.0 mm 이상인 것을 양성으로 판정하고 1.0 mm 미만의 미세한 반응은 의양성으로 판정한다. 양성으로 판정된 검체는 다음 Table 1에 따라 미생물질 또는 합성항균제의 계통을 추정할 수 있다.

정량분석

사용기기 및 시약

OTC의 잔류에 대한 정량의 분석을 위해 HPLC (SHISEIDO, Japan)를 사용하였으며 실험에서 사용된 항생제 표준품은 Oxytetracycline-HCl (Sigma)제품을 사용하였으며 시료중의 항생제 추출에는 acetonitrille, methanol (Merck), Oxalic acid, EDTA, Trichloroacetic acid (Sigma) 등을 사용하였고 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다.

OTC 추출

시료 3마리의 피부와 간은 각각 1 g씩 정확히 달아 호모기나이저로 균질화 한 후 혼합하여 총 3 g을 실험에 사용하였고, 근육은 시료 3마리 각각 15 g씩 정확히 달아 호모기나이저로 균질화 한 후 총 10 g을 사용하였다. 피부, 간, 근육의 시료들을 각각 50 ml Conical tube에 취해 1% EDTA용액 10 ml, 10% Trichlroroaceticacid (TCA)용액 10 ml를 가하여 균질기로 2분간 균질화 하였다. 이 액을 4,000 rpm으로 3분간 원심분리 후 상등액을 다른 50 ml Conical tube에 취하고 다시 1% EDTA용액 10 ml, 10% TCA용액 10 ml를 가하여 균질기로 2분간 균질화 한 후 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 전에 추출된 상등액이 들어있는 50 ml Conical tube에 합하여 다시 4,500 rpm으로 15분간 원심 분리하여 다른 50 ml Conical tube에 취하였다. 이 액을 활성화된 Sep-pakC18 카트리지(메탄올 20 ml, 증류수 10 ml, 5% EDTA 용액 10 ml를 순차적으로 흘려주어 활성화)에 흘린 후, 증류수 300 ml를 흘려 세척하였다. 카트리지에 흡착된 성분은 메탄올 40 ml를 흘려 용출시키고, 용출액은 다시 감압 하에서 농축기로 건조시켰다. 시험액이 건조된 수기에 이동상(0.01 M Oxalic acid : Acetonitrille : Methanol = 9:2:1) 2 ml를 가하여 초음파세척기로 녹이고 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. 시료의 전처리 과정에 대한 요약은 Fig. 1과 같다.

HPLC 분석조건

HPLC (SHISEIDO, Japan)의 기기분석조건은 Table 2에서 나타낸 바와 같다. 즉 column은 4.6×250 mm i.d. (C_{18}, 5 μm, SHISEIDO),이동상은 0.01 M Oxalic acid, Acetonitrille,

Table 2. HPLC instrument and analysis conditions for oxytetracycline

Instrument	SHISEIDO, NANOSPACE SI-2
Column	4.6×250mm i.d.(C_{18}, 5 μm, SHISEDO)
Mobile phase	0.01 M Oxalic acid-Acetonitrille-Methanol (100:200:900, v/v/v)
Column temperture	35℃
Flow rate	1 ml/min
UV Detector	360 nm
Injection volume	50 μl
Run time	10 min

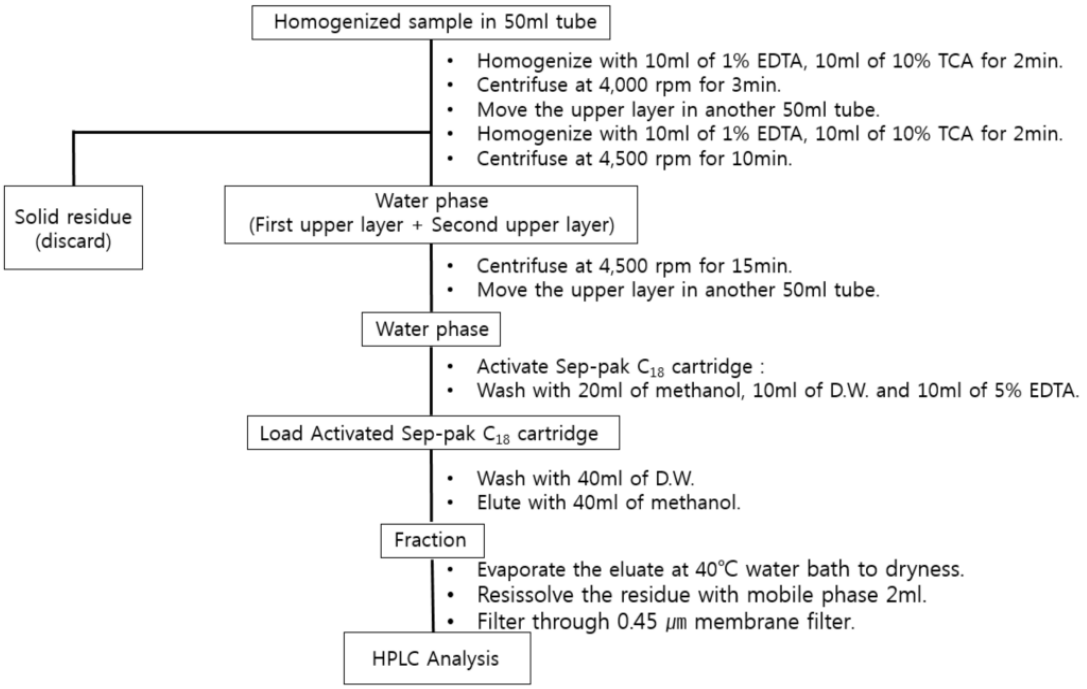

Fig. 1. Extraction procedure of oxytetracycline from the skin, the muscle, the liver of olive flounder.

Methanol을 9:2:1의 비율로 혼합, column온도는 35℃, Flow rate는 1 ml/min, UV detector파장은 360 nm, Injection volume은 50 µl, Run time은 10 min으로 하였다.

검량선 작성 및 회수율 분석

표준용액은 OTC-HCl (Sigma)를 정확히 달아 메탄올로 용해시켜 100 ppm의 표준 원액을 조제하였고 이 용액을 이동상으로 희석하여 0.1, 1.0 ppm의 농도로 하여 농도 대 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 시료에 대한 회수율은 근육에 1.0 ppm 농도로 spiking하여 시료의 OTC 추출방법에 따라 추출 및 정제한 후, HPLC에 주입하여 표준곡선과 Retention time을 비교하여 정성 확인한 후, 해당 peak의 면적값을 표준용액의 직선회귀방정식에 대입하여 농도를 구한 후,

Table. 3. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline dipping administration (25 mg/ton/1 hr) in skin, muscle of olive flounder

Day after administration	*B. stearothemophillus*		*B. megaterium*		*B. subtilis*		*B. cereus*	
	Screening test		Screening test		Screening test		Screening test	
	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct
0	±	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-

시료에 첨가 된 OTC의 농도와 회수 된 OTC의 농도로 나누고 100을 곱하여 회수율을 구하였다. 또한 시료에서의 잔류농도 계산은 시료를 정제하고 HPLC에 주입하여 표준용액과 동일한 Retention time에 있는 peak의 면적 값을 표준물질의 회귀방정식에 대입하여 농도를 구한 다음 시료량으로 나눠주고 회수율을 보정하여 잔류농도를 구하였다.

결 과

약욕처리구 분석결과

미생물학적 간이검사 결과 Fig. 2와 같은 방법으로 결과를 판정하였다. 그리고 Table 3에는 OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 1시간 약욕한 후 시간경과에 따라 넙치 3마리씩 채취하여 피부와 근육을 동량 혼합하여 미생물학적 간이시험법으로 잔존 유무 분석결과를 나타내었다. *B. sterarothermophillus* 평판에서는 약욕직후 피부에서만 의양성을 보이고 약욕후 1일째부터는 반응이 일어나지 않았다. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* 평판에서는 어떤 시료에서도 반응이 일어나지 않았다.

경구투여구 분석결과

Table 4에는 OTC를 어체중 kg 당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여한 후 시간경과에 따라 넙치 3마리씩 채취하여 채취하여 피부는 각각하고 근육은 동량 혼합하여 미생물학적 간이시험법으로 잔존 유무 분석결과를 나타내었다. *B. stearothermophillus* 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였다. 근육에서는 경구투여후 5일째부터 의양성을 보인후, 7일째부터 반응이 보이지 않았다. 피부에서는 경구투여후 28일째까지 양성을 보이다가 35일째부터 의양성을 보인후 실험종료 즉 경구투여후 77일째까지 의양성을 보였다. *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였다. 근육에서는 경구투여후 2일째부터 의양성을 보인후 4일째부터 반

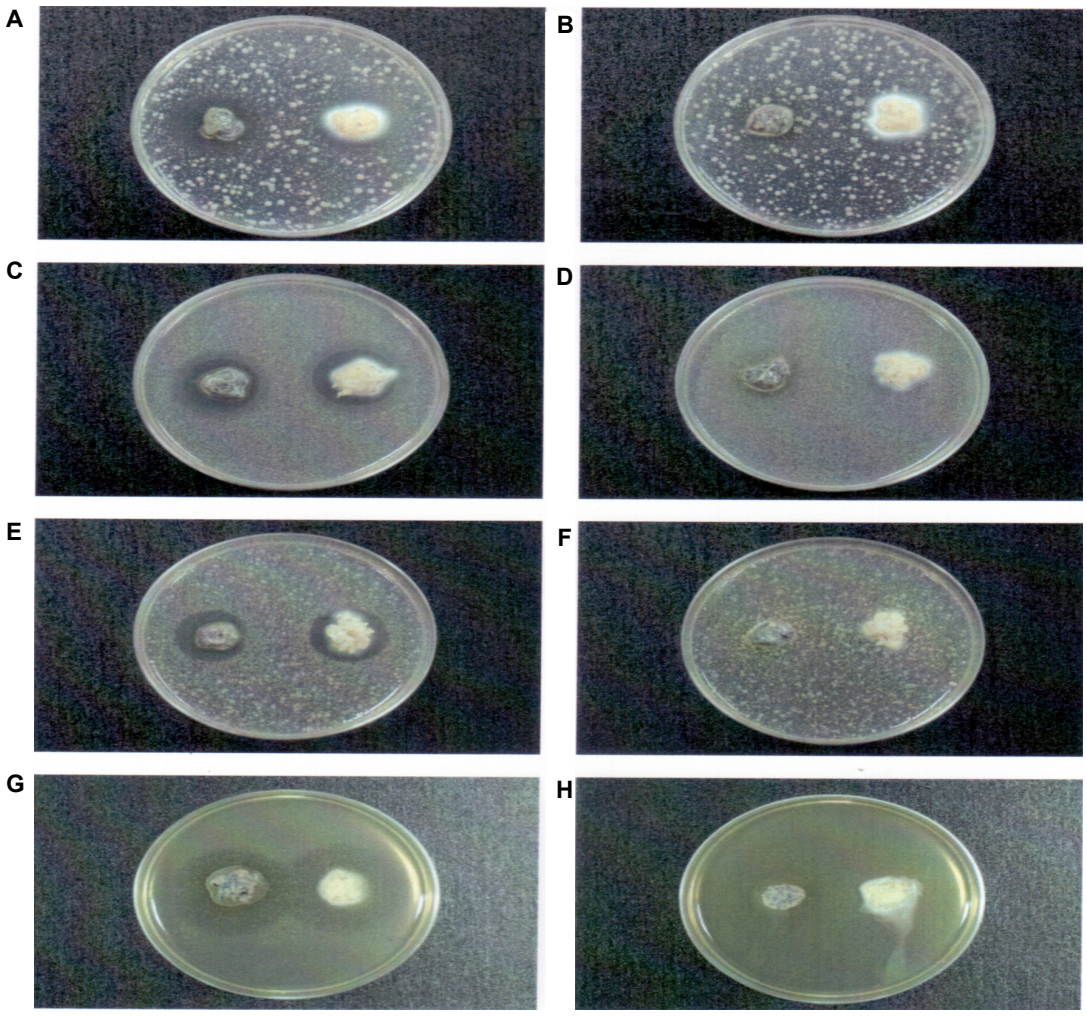

Fig. 2. Decision of bioassay method in each strain inoculated medium. A, Positive reaction in *B. megaterium* ; B, Negative reaction in *B. megaterium* ; C, Positve reaction in *B. subtilis* ; D, Negative reaction in *B. subtilis* ; E, Positive reaction in *B. cereus* ; F, Negative reaction in *B. cereus* ; G, Positive reaction in *B. stearothermophillus* ; H, Negative reaction in *B. stearothermophillus*.

Table 4. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline oral feeding administration (62.5 mg/kg body weight/7 days) in skin, muscle of olive flounder

Day after administration	*B. stearothemophillus*		*B. megaterium*		*B. subtilis*		*B. cereus*	
	Screening test		Screening test		Screening test		Screening test	
	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct
0	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	±	+	±	+	+
2	+	+	+	±	+	±	+	+
3	+	+	+	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	+	-	+	+
5	+	±	+	-	+	-	+	+
6	+	±	±	-	+	-	+	+
7	+	-	±	-	±	-	+	+
14	+	-	-	-	-	-	+	±
21	+	-	-	-	-	-	±	±
28	+	-	-	-	-	-	±	±
35	±	-	-	-	-	-	±	-
42	±	-	-	-	-	-	-	-
49	±	-	-	-	-	-	-	-
56	±	-	-	-	-	-	-	-
63	±	-	-	-	-	-	-	-
70	±	-	-	-	-	-	-	-
77	±	-	-	-	-	-	-	-

응이 보이지 않았다. 피부에서는 경구투여후 5일째까지 양성을 보이다가 6일째부터 의양성을 보인후, 경구투여후 7일째까지 의양성을 보이다가 14일째부터 반응이 보이지 않았다. *B. cereus* 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였다. 근육에서는 경구투여후 7일째부터 의양성을 보인 후, 21일째부터 반응이 보이지 않았다. 피부에서는 경구투여후 14일째까지 양성을 보이다가 14일째부터 의양성을 보인후, 경구투여후 21일째까지 의양성을 보이다가 28일째부터 반응이 보이지 않았다.

정량분석 결과

표준곡선

OTC 표준용액을 0.1, 1.0 mg/l의 농도로 희석하여 HPLC로 분석하였는데 Retention time은 5.08 분으로 조사되었고 농도에 따른 peak 면적 비를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과 OTC의 r^2은 0.999으로 양호한 직선성(r^2>0.995)을 나타내었다.

회수율 조사

시료에 대한 회수율은 OTC의 표준용액을 넙치의 근육에 1.0 mg/kg의 농도로 spiking하여 앞서 기술한 방법에 따라 전처리한 후, HPLC로 측정한 결과이며 Table 5에서와 같이 약욕처리구는 평균 80.43%, 경구투여구는 평균 76.71%의 회수율을 보였다.

Table 5. Spiked recovery in muscle

Sample	Spiked concentration (mg/kg)	Recovery (%) OTC (Mean ± SD, n=5)
Dippiing group	1	80.73±13.34
Oral feeding group	1	76.71±5.33

약욕처리구 분석결과

OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 넙치에 1시간 약욕한 후 시간경과에 따른 피부, 근육, 간의 농도변화를 Fig. 3에 나타내었다. 피부에서는 약욕직후 0.51 mg/kg의 농도를 보인 후 지속적으로 감소경향을 보이며 약욕후 24일째부터는 0.16 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준(0.2 mg/kg) 이하로 측정되었으며 약욕후 48일째부터는 농도가 검출한계농도이하(0.05 mg/kg)로 관찰되었다. 근육에서는 약욕 직후부터 검출한계농도이하로 관찰되었다. 간에서는 약욕직후 0.09 mg/kg의 농도를 보인 후 지속적으로 증가경향을 보이다가 4일째에 최고농도인 0.25 mg/kg까지 보이다가 점차 감소하여 5일째부터는 0.18 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준 이하로 측정되었으며, 약욕 후 19일째부터는 농도가 검출한계농도이하로 관찰되었다.

경구투여구 분석결과

OTC를 어체중 kg당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일

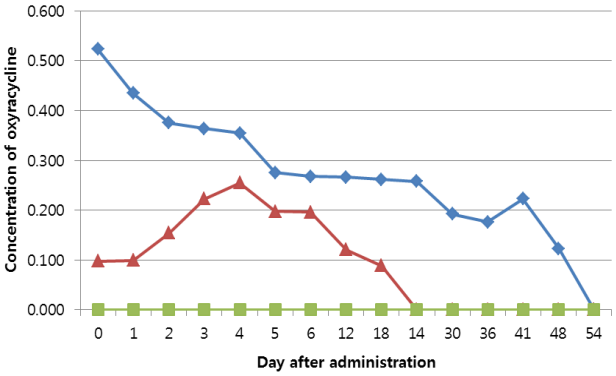

Fig. 3. Plasma concentration of oxytetracycline in olive flounder after dipping with concentration of 25 ppm for 1 hr. Skin, —◆—; Muscle, —■—; Liver, —▲—.

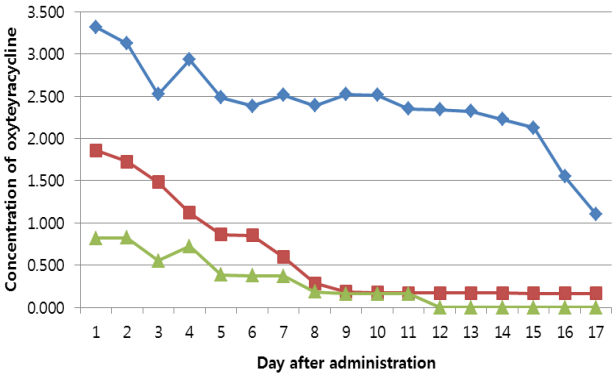

Fig. 4. Plasma concentration of oxytetracycline in olive flounder after oral feeding with concentration of 62.5 mg/kg body weight/7 days. Skin, —◆—; Muscle, —■—; Liver, —▲—.

간 경구투여한 후 시간 경과에 따른 피부, 근육, 간의 농도 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 피부에서는 경구 투여 후 1일째 3.28 mg/kg 농도를 보인 후 점차 감소경향을 보이면서 경구투여 후 14일째부터는 0.13 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준이하로 측정되었으며, 경구투여 후 42일째부터는 농도가 검출한계농도이하로 관찰되었다. 간에서는 경구투여 후 1일째에 1.91 mg/kg의 농도를 보인 후 지속적으로 감소경향을 보이면서 경구투여 후 21일째부터는 0.17 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준이하로 측정되었으며, 측정종료일인 경구투여 후 77일째까지 0.06 mg/kg의 농도를 보였다.

고 찰

OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 넙치에 1시간 약욕한 약욕처리구와 OTC를 어체 중 kg당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구 투여한 경구투여구로 구분하여 실험하였다. 그리고 미생물학적 간이검사법을 이용하여 넙치 피부, 근육에 대한 잔류특성을 분석하였고 HPLC 정량분석법을 이용하여 넙치 피부, 근육, 간의 잔류특성을 분석하였다. 미생물학적 간이검사에 의한 분석결과는 약욕처리구의 피부에서는 약욕 직후에서만 *B. stearothermophillus* 평판에서 양성을 보였고 근육에서는 모든 균주의 평판에서 음성으로 조사되었다. 경구투여구 피부에서는 *B. stearothermophillus* 평판에서 경구 투여 후 77일째, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서 경구 투여 후 7일째, *B.cereus* 평판에서 경구 투여 후 28일째까지 양성을 보였다. 근육에서는 *B. stearothermophillus* 평판에서 경구 투여 후 6일째, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서 경구 투여 후 4일째, *B. cereus* 평판에서 경구 투여 후 14일째까지 양성을 보였다. Jung (2008)은 넙치에 OTC를 체중 kg 당 100 mg으로 1회 강제 투여하여 시간경과에 따른 *B. cereus* 평판에서의 반응을 조사하였는데 경구 투여 후 20일째에 의양성 반응이 조사되어 비록 OTC의 투여량과 경구 투여하는 방법과 기간이 다르지만 본 실험에서는 6일 정도 잔류기간의 차이가 있었다. HPLC에 의한 정량분석 결과를 보면 회수율은 근육에 1.0 ppm의 농도로 Spiking하여 평균 77%~81%의 회수율을 보였는데 이는 Kim (2006)의 연구에서 근육에 OTC를 본 실험과 같은 농도로 Spiking한 회수율(약 80%)과 거의 같은 값으로 조사되었다. 약욕처리구에서는 피부에서 약욕 직후의 농도가 0.51 mg/kg이었고 점차 감소하여 약욕 후 24일에 OTC의 잔류허용기준치(0.2 mg/kg) 이하로 조사 되었고 약욕 후 48일이 지나서야 검출한계농도(0.05 mg/kg)이하로 측정되었다. 근육에서는 약욕 직후부터 검출한계농도이하로 측정되었으며 간에서는 약욕 직후 농도가 0.09 mg/kg으로 측정된 후 점차 증가하다가 약욕 후 4일째에 최고농도 0.25 mg/kg으로 측정된 후 점차 감소하기 시작하여 약욕 후 5일째에 OTC의 잔류허용기준치이하도 측정되었으며 약욕 후 13일째가 되어서 검출한계농도이하로 측정되었다. 경구투여구에서 피부에서의 OTC의 잔류경향은 경구 투여 후 1일째부터 3.28 mg/kg의 높은 농도로 측정되었으며 점차 감소하기 시작하여 미생물학적 간이검사에서는 양성반응이 나타났던 시험종료일인 경구 투여 후 77일째도 1.07 mg/kg의 농도로 측정되었다. 근육에서는 경구 투여 후 1일째에 0.83 mg/kg의 농도를 보인 후 점차 감소하기 시작하여 경구 투여 후 14일째에 OTC의 잔류허용기준치 이하인 0.13 mg/kg의 농도가 측정되었으며 경구 투여 후 42일째에 검출한계농도 이하로 측정되었고, 간에서는 경구 투여 후 1일째의 농도가 1.91 mg/kg로 측정된 후 점차 감소하기 시작하여 경구 투여 후 21일째에 OTC의 잔류허용기준치 이하인 0.17 mg/kg의 농도가 측정되었으며 시험종료일인 경구 투여 후 77일째에도 0.06 mg/kg의 농도가 측정되었다. 미생물학적 간이검사법과 HPLC를 이용한 정량분석법간의 결과를 비교해 볼 때 약욕처리구의 피부시료인 경우 약욕직후 *B. stearothermophillus* 평판에서만 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.51 mg/kg이었고, 경구투여구 피부시료인 경우 *B. stearothermophillus* 평판에서 경구투여 후 77일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 1.07 mg/kg, *B. megaterium*

평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여 후 7일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 2.54 mg/kg, B. cereus 평판에서는 경구투여 후 28일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 2.42 mg/kg이었다. 경구투여구 근육시료에서는 *B. stearothermophillus* 평판에서 경구투여 후 6일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.304 mg/ kg, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여 후 4일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.73 mg/kg, B. cereus 평판에서는 경구투여 후 14일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.13 mg/kg이었다. 피부보다 근육에서 낮은 농도에서 양성을 보였는데 이는 피부와 근육을 같은 크기로 평판에 올려 놓았지만 피부와 근육의 조직량이 다르기 때문에 이러한 결과를 나았다고 생각되나 피부에서의 잔류농도가 높기 때문에 미생물학적 간이 시험법으로 항생제 잔류검사를 해야 할 때는 피부와 근육을 같이 병행실험을 해야 될 것이라고 사료된다. 그리고 시판 중인 육류중의 항생물질 잔류량과 가열에 의한 분해[1]에 관한 연구와 시판 중인 뱀장어중의 oxolinic acid 잔류량과 가열에 의한 변화[6]에 보고 된바, 활넙치 근육 및 부산물에 잔류하는 OTC의 잔류량도 조리 온도에 따라 감소할 것으로 추측 된다.

본 연구에서 다소 미흡한 점은 경구투여구에서 OTC의 휴약기간이 40일이라 거기에 준하여 실험어를 준비하였더니 근육 부위를 제외한 피부와 간에서 OTC가 77일 이상 오래도록 잔류함으로써 실험어가 부족하여 OTC의 소멸시점을 알아내지 못하였는데 차후 추가실험을 하여 알아 내고자 하고 피부인 경우 다른 부위 보다 월등히 높은 OTC 농도를 보였는데 이 것에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 본 연구를 통하여 OTC의 투여경로별 어체의 조직별 잔류특성을 조사함으로써 향후, 양식어류에 사용 되고 있는 다양한 항생제들에 대해 조직 내 잔류분포 연구를 촉진하고 항생제의 효율적인 사용을 통한 잔류 및 내성균의 출현을 방지하는데 기초 자료로 활용될 것을 기대한다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성과 지역대학우수과학자지원사업으로 수행된 연구결과로 깊은 감사를 드립니다(NRF-2013H1B8A2032163 & 2013R1A1A4A03011090).

References

1. Bae, K. C. and Lee, Y. G. 1991. Studied on the content and heat decomposition of residual tetracyclines in meats on the market. *Kor. J. Food Hygiene* **6**, 83-87.
2. Chung, H. S., Kim S., Lee, W. and Lee, H. J. 2006. Muscle tissue distribution level of amoxicillin in olive flounder (*Paralichthys olvaceus*), rockfish (*Sebastes schlegeli*), and red sea bream (*Pagrus major*) following oral administration. *J. Fd. Hyg. Safety* **21**, 244-249.
3. Coyne, R., Bergh, Ø. and Samuelsen, O. B. 2004. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *J. Chromatography B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **810**, 325-328.
4. Jung, S. H., Choi, D. L., Kim, J. W., Seo, J. S. and Jee, B. Y. 2008. Pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder (*Paralichthys olvaceus*) by dipping and oral administration. *J. Fish Pathol.* **21**, 107-117.
5. Kim, J. D., Seo J. S., Kim, J. W., Lee, J. S., Jung, S. H., Jee, B. Y., Kim, J. W. and Kim, E. O. 2008. Pharmacokinetics of oral administration of oxytetracycline in eel. *Anguilla japonica. J. Fish Pathol.* **21**, 119-127.
6. Kim, K. H., Song, M. R., Choe, S. N., Choe, M. S. and Park, K. H. 1989. Oxolinic acid residue in the cultured eel tissues and its change to heating process. *J. Fd Hyg. Safety* **13**, 14-19.
7. Kim, S., Chung, H. S., Kang, S. J., Ha, J. Y., Jung, W. C., Heo, S. H., Shin, Y. W., Kim, K. W., Kim, D. G. and Lee, H. J. 2006. Tissue distribution after dipping administration of oxytetracycline and tetracycline in olive flounder (*Paralichthys olvaceus*), rockfish (*Sebastes schlegeli*), and red sea bream (*Pagrus major*). *J. Fish Pathol.* **19**, 155-164.
8. Lee, H. J., Lee, T. S., Son, K. T., Kim, P. H., Jo, M. R., Park, M. J. and Yi, Y. H. 2005. Analysis of tetracyclines using high-performance liquid chromatography for fishery products. *J. Kor. Fish. Soc.* **38**, 372-378.
9. Lu, H. T., Jiang, Y., Li, H. B., Chen, F. and Wong, M. H. 2004. Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chromatographia* **60**, 259-264.
10. National Fisheries Research and Development Institute. Information on the use of fisheries medicine. 10-11., 2005.
11. National Veterinary Research and Quarantine Sevice. Sales of antibiotics (2001~2004). 125-149, 2005.
12. Park, M. H., Kim, T. W., Jo, N. U., Jeong, J. Y., Lee, S. H., Lee, J. O. and Kim, H. Y. 2008. Evaluation and improvement of bioassay for residual antibiotics in foods. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 360-365.

초록 : Oxytetracycline의 투여방법에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 체내의 잔류 특성

고창식[1] · 김동휘[2] · 박소현[2] · 문경미[2] · 허문수[2]*
([1]제주테크노파크 생물종다양성연구소, [2]제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과)

어류 질병은 매년 대규모 해산물 양식 및 소비량에 따라 증가하고 있으며, 이를 예방 및 치료하기 위해 항생제인 OTC (Oxytetracycline)를 사용하고 있다. 하지만 이는 부적절한 사용 및 오남용을 하게 되면 인체 내 통증을 유발시킬 수 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 간이시험법 및 HPLC 분석과 함께 OTC의 약욕 처리 및 경구 투여에 따른 넙치의 피부, 간, 근육에 관해 연구하였다. 약욕처리구는 물 1톤당 25 g의 농도로 1시간 1회 실시 하였고, OTC의 투여 농도를 어체중 kg 당 62.5 mg을 사료에 혼합시켜 7일간 경구 투여하였다. 미생물학적 간이 검사법에서 약욕 처리구는 피부 직후에서만 양성을 보였고 경구 투여구에서는 77일째 양성으로 조사되었다. 그리고 근육은 14일째까지 양성을 보였다. HPLC 분석에서는 약욕 처리구인 간에서는 13일째, 피부는 37일째 잔해가 남은 것을 확인할 수 있었고 근육에서는 발견하지 못했다. 경구 투여구인 피부에서는 높은 농도(1.07 mg/kg)로 나타났으며, 간에서는 소량(0.56 mg/kg)을 나타냈으며 42일째의 근육에서는 남아 있지 않았다. 종합적으로 어류 양식장에서 사용 되는 OTC의 휴약 기간을 40일로 준수하면 OTC는 거의 잔류하지 않고 우리 몸에 무해하나 영양물질의 중간대사 또는 저장, 해독 등의 중요한 역할을 하는 간과 어체의 몸의 표면을 보호하고 감각작용을 하는 역할을 하는 피부는 근육에 남아 있는 OTC의 잔류량보다 몇 배의 높은 수치를 나타냈다. 하지만 이는 이전 연구에 따르면 OTC의 잔류량은 조리 온도에 따라 감소될 것으로 추측 된다.