

<원 저>

고속액체크로마토그래피를 이용한 항원충제 분석법 개발: 톨트라주릴 및 디클라주릴

정경훈 · 정미영 · 박해철 · 아킬후세인 · 김대균 · 이광직 · 강정우*
농림축산검역본부 동물약품평가과

(접수: 2017년 7월 28일, 수정: 2017년 9월 20일, 게재승인: 2017년 10월 10일)

Development of high-performance liquid chromatography methods for the anticoccidials: toltrazuril and diclazuril

Kyung Hun Jeong, Miyoung Jeong, Hae-Chul Park, Md Akil Hossain, Daegyun Kim,
Kwang-Jick Lee, Jeong Woo Kang*

Veterinary Drugs & Biologics Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

(Received: July 28, 2017; Revised: September 20, 2017; Accepted: October 10, 2017)

Abstract: This study was undertaken to develop new analytical methods for assessment of anticoccidials. High-performance liquid chromatography (HPLC) was found to be a fast, reliable, and practical method. The anticoccidials used in this experiment were toltrazuril and diclazuril, and the analysis factors were specificity, linearity, accuracy, repeatability, and intermediate precision. The linearity of each anticoccidial was better than 0.99, and the accuracies were 99.5% and 99.1% with relative SD of 0.5 and 0.4, respectively. To assess whether the developed HPLC method could be effectively applied, toltrazuril and diclazuril post-market veterinary products (five products) that are currently sold were tested. The results revealed no non-compliant items and the method was applied successfully. Therefore, the newly developed HPLC method for anticoccidial assessment described in this study may be useful as a reference method in the Korean Standards of Veterinary Pharmaceuticals for the analysis of toltrazuril and diclazuril.

Keywords: coccidiostats, diclazuril, high performance liquid chromatography, toltrazuril

서 론

톨트라주릴(toltrazuril)과 디클라주릴(diclazuril)은 기생충의 예방 및 치료에 사용되는 광범위한 구충제로서 축산업계 및 제약업계에서 수십 년간 이용되었으며 최근 판매량이 높은 동물용의약품 중 하나이다 [6, 13]. 국민소득의 증가와 더불어 서구식 생활패턴의 변화는 축산식품 소비를 증가시켰으며 이는 축산업에서 더욱 많은 동물용의약품의 사용을 불러 일으켰다. 과도한 동물용의약품이 사용된 환경에 인간이 만성적으로 노출되면 기형을 일으키거나 돌연변이를 유발할 수 있고 또한 내성 문제를 일으켜 면역체계에 이상을 일으킨다 [1, 5]. 그렇기 때문에 동물용의약품의 안전한 사용과 품질보증을 위해 국가차원에서 동물용의약품 성분의 안전성 검사

와 연구가 필요한 상황이다 [9].

현재 우리나라에서는 정부의 주도적인 지침 아래 인체용 의약품 품질관리기준 안내 규정에 따라 표준화된 방법을 사용하여 동물용의약품을 관리하고 있으며, 자체 분석을 위한 기준을 마련하여 품질을 관리하도록 권장하고 있다 [2]. 그러나 국내 동물용의약품 공정서에는 아직 톨트라주릴과 디클라주릴에 대한 분석 자료가 없어서 외국의 분석 자료를 참고하여 동물용의약품을 분석하고 있다. 하지만 기존의 구충제 분석법은 다소 복잡하고 분석시간이 길어지는 단점 때문에 유기용매 사용량이 많아져 경제적으로 비효율적이며 환경에도 유해하다. 그러므로 상대적으로 분석시간을 단축할 수 있고 유기용매 사용량을 줄일 수 있는 표준화된 시험법의 제정이 확립되어야 한다.

*Corresponding author

Tel: +82-54-912-0564, Fax: +82-54-912-0584
E-mail: hijach@korea.kr

한편, 동물용의약품 내 구성성분은 매우 다양할 뿐만 아니라 제형제의 차이나 첨가제의 유무로 인하여 원료의 구성성분 분석 결과가 상이할 수 있기 때문에 제조업체 제품에 적합한 시험방법 개발 및 검증이 필요하다. 현재 톨트라주릴 및 디클라주릴의 분석에는 전기영동이나 바이오센서, liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS), high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 분석 방법 등이 있지만, 바이오센서와 전기영동법은 실험방법이 복잡하며 결과를 해석하기 어렵고 LC-MS/MS는 고가의 장비 구축이 필요하다. 반면 HPLC는 상대적으로 값이 저렴하고 분석오차가 적으며 신뢰성이 높아 널리 이용될 수 있는 장점이 있다 [7, 8, 10, 12]. 이를 바탕으로 HPLC 장비를 이용하여 톨트라주릴 및 디클라주릴 제품들의 분석법을 표준화하고 동물약품의 품질관리를 위해 농림축산검역본부에서 고시하는 동물용의약품 공정서 상에 분석법을 신설한다면 국가검정 업무의 경쟁력 강화로 품질보증을 확립할 수 있다 [2, 3].

그러므로 본 연구에서는 HPLC를 이용하여 새로운 분석방법을 개발하고 동물용의약품 구충제 구성성분인 톨트라주릴과 디클라주릴의 새로운 시험법을 확립하였다. 또한 개발된 검사법의 검증을 위해 현재 시판되고 있는 인허가제품 5종(톨트라주릴 3품목, 디클라주릴 2품목)을 수거하여 적용검사를 하였다.

재료 및 방법

시약

톨트라주릴과 디클라주릴 표준품은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하였다. 실험에서 사용된 용매는 모두 HPLC 등급이며 아세트나이트릴(JT Baker, USA), 다이메틸폼아마이드(Merck, Germany), 인산과 구연산(Fluka Chemie, Germany)을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q Integral Millipak membrane point-of-use cartridge(0.22 µm; EMD Millipore, USA)를 사용하였다.

HPLC 조건

물질의 분석을 위해 YMC-Triart C18(3.9 mm × 150 mm, 5 µm; YMC, Japan) 칼럼을 이용하여 30°C에서 실험하였다. 톨트라주릴의 경우 1 mL/min의 유속으로 용매를 흘려주었고 이동상은 아세트나이트릴:완충용액(pH 3) [55:45 (v/v)]을 선

택하였다. 시료는 10 µL 주입하였고, 검출을 위해 Diode Array Detector 240 nm에서 검출하였다. 디클라주릴 역시 1 mL/min의 유속과 10 µL의 시료를 주입하여 280 nm에서 0.2% 인산이 포함된 아세트나이트릴:증류수[57:43 (v/v)] 용매를 이용하여 분석하였다. 장비는 Agilent 1260 Infinity Binary LC(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다(Table 1).

표준품 및 구충제 시험물질 조제

표준품 톨트라주릴과 구충제 시험물질 3종 1 mg을 50% 아세트나이트릴:증류수 용매에 녹여 Bransonic Ultrasonic Cleaner(8510E-DTH; BRANSON, USA)를 이용하여 균일하게 혼합하였다. 디클라주릴과 구충제 시험물질 2종의 경우 1 mg을 100% 다이메틸폼아마이드 용매에 녹였다. 표준품 및 시험물질의 여과를 위해 Acrodisc Syringe Filters with PVDF Membrane, 13 mm(0.45 µm; Pall, USA)를 사용하였고, 표준품 제조 후 실험에 사용하기 전까지 4°C에 보관하며 필터 여과 후 바이알에 담아 실험에 이용하였다.

분석법 검증

HPLC 시험법 검증을 위해 국제적 표준절차(WHO Technical Report Series, No. 937, 2006, Annex 4. Analytical method validation) [14]에 따라 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 반복성(repeatability), 실험실 내 정밀성(intermediated precision)을 측정하여 유효성을 판단하였다. 특이성은 International Conference on Harmonization Guideline을 따랐으며 다른 물질에 의한 간섭 없이 성분이 분리되는 것을 확인하기 위해 HPLC에 희석용매와 이동상을 주입 후 시험물질의 retention time과 동일한 위치에서 간섭 피크가 있는지 평가하였다. 직선성은 각 표준액을 5개의 농도별로 3회 측정 후 평균값의 피크 면적 비를 구하여 $y = ax + b$ ($y = \text{peak}$, 면적; x , 시료 함량)의 형태로 검량선을 작성 후 측정하였다. 정확성은 표준액을 5개의 농도별로 3회 측정하여 얻은 값을 회수율로 측정하였고 반복성은 하루 3번 반복 실험을 통해 측정하였다. 실험실 내 정밀성은 실험에 영향을 줄 수 있는 인자인 시험일과 시험자, 시험기기를 다른 시험자가 분석한 결과를 토대로 분석하였고 역시 표준액 5개의 농도별로 3회 HPLC에 주입하여 상대표준편차(relative SD, %)로 측정하였다.

Table 1. HPLC analytical method parameters for toltrazuril and diclazuril

| Analytical conditions | Toltrazuril | Diclazuril |
|------------------------------|---|---|
| Column | C18 (3.9 mm × 150 mm, 5 µm) | C18 (3.9 mm × 150 mm, 5 µm) |
| Mobile phase | Acetonitrile:buffer solution*(pH 3.0) = 55:45 (v/v) | 0.2% Phosphoric acid in acetonitrile:DW = 57:43 (v/v) |
| Flow rate | 1 mL/min | 1 mL/min |
| Absorbance | 240 nm | 280 nm |
| Standard and sample solution | 50% Acetonitrile in DW | 100% N, N-dimethylformamide |

*Citric acid anhydrous (5.5 g) + sodium hydrogenphosphate (3.65 g)/distilled water (DW) 500 mL

분석법 적용

동물약품취급규칙 품질관리 하에서 구충제의 행정처분 함량 기준은 90~120%(농림축산검역본부령 제2015-165) [9]로 개발된 검사법이 이를 충족시키는지 평가하기 위해 시중에서 판매되는 구충제 제품 5종(톨트라주릴 3품목, 디클라주릴 2품목)을 구입하여 실험에 이용하였다.

결 과

항원충제 HPLC 분석 조건 확립

용매의 구성종류 및 함량비율, 검출과장 등의 조건을 고려한 뒤 다양한 조건으로 표준물질의 분석법을 확립하고자 하였다. Table 1과 같이 톨트라주릴과 디클라주릴 모두 YMC-Triart C18(3.9 mm × 150 mm, 5 μm; YMC) 칼럼을 이용하였고 각각 240 nm, 280 nm의 검출과장을 확립하였다. 톨트라주릴의 경우 6.361분에 검정성분 피크가 관찰되었고 디클라주릴의 경우 분리능력을 높이기 위해 0.2%의 인산이 함유된 아세트나이트릴 용액을 사용하여 4.227분에 검정성분 피크가 관찰되었다(Fig. 1).

특이성, 직선성 및 반복성

특이성은 표준품과 다양한 성분이 혼합된 구충제 성분 중 톨트라주릴과 디클라주릴을 정확하게 측정할 수 있는지 확인하기 위해 실험하였다. 확립된 HPLC 조건으로 실험한 결과 표준품에서의 피크 머무름 시간과 구충제로부터 얻은 크로마토그램의 피크 머무름 시간이 똑같았고 농도별로도 같은 머무름 시간에 분석이 되었다. 이를 통해 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다. 직선성의 경우 톨트라주릴은 10, 20, 80, 100 ng/mL의 농도별로 제조하여 3회 측정하였고, 디클라주릴의 경우 1.25, 2.5, 5, 10 ng/mL의 농도별로 제조하여 역시 3회 측정 후 확립된 HPLC 조건으로 분석하였다. 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 이용하여 신뢰수준 99%에서 검증하였다. X축은 농도 그리고 Y축은 피크 면적으로 하여 검량선을 작성하였고 상관계수(R^2)가 모두 0.9999로 나타나 직선성을 확인하였다. 반복성은 피크 면적과 머무름 시간을 통해 측정하였으며 피크 면적 비의 표준편차를 피크 면적 비의 평균값으로 나누어 백분율 값을 구하였다. 톨트라주릴의 경우 0.5%를 나타내었고 디클라주릴은 0.4%를 나타내 국제규격 2% 이하의 수준을 만족시켰다(Table 2).

정확성과 실험실 내 정밀성

정확성은 표준액 3가지 농도를 3번 반복 실험하여 평가하였고 검량선을 이용하여 원래의 농도로 환산하여 나타내었다. 톨트라주릴은 99.5%, 디클라주릴의 경우 99.1%로 양호한 수치를 보였다. 실험실 내 정밀성은 3가지 농도의 표준용액을 만들어 일내와 일간 시험을 통해 5회 측정하였다. 측정 결과는 피크 면적 비의 상대표준편차를 이용해 구하였고 이로부터 톨트라주릴은 2.4%, 디클라주릴은 3.2%의 값을 나타

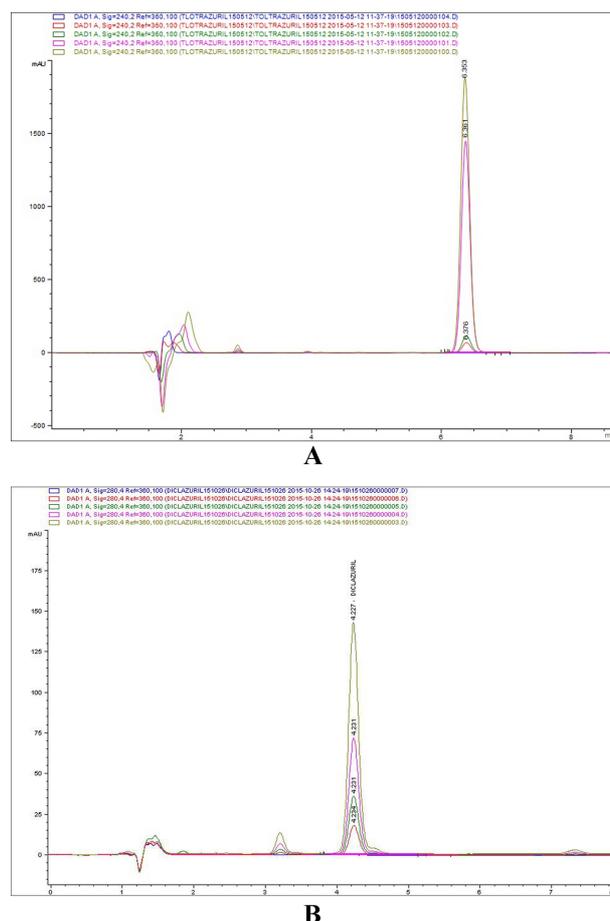


Fig. 1. Chromatograms of toltrazuril (A) and diclazuril (B) at 5 different doses.

Table 2. Validation result parameters of toltrazuril and diclazuril

| Analyte | Toltrazuril | Diclazuril |
|--|-------------|------------|
| Retention time (min) | 6.361 | 4.227 |
| Calibration curve (r^2) (5 points) | 0.99 | 0.99 |
| Average accuracy (%) (n = 5) | 99.5 | 99.1 |
| Relative SD (%) (n = 5) | 0.5 | 0.4 |
| Intermediated precision (%) (3 d) | 2.4 | 3.2 |

내어 일반기준인 10% 이하를 만족하여 분석법의 정밀성을 확보하였다(Table 2).

구충제 내 분석법 적용검사 결과

조사대상은 국내 인허가 동물용의약품 중 구충제 5가지 제품으로 톨트라주릴 3품목(주사제, 액제, 주입제), 디클라주릴 2품목(산제, 액제)을 확립된 분석 방법으로 시험하였다. 그 결과 톨트라주릴 성분이 들어간 제품에서 검사함량이 92~109%로 구충제의 행정처분 함량 기준인 90~120%를 만족하였다. 디클라주릴 성분이 들어간 제품은 검사함량이 98~105%로 측정되어 새로운 개발 분석법으로서 적합함을 나타냈다(Table 3).

Table 3. Development analytical method inspections of collected product

| Licensing product | Toltrazuril 1 | Toltrazuril 2 | Toltrazuril 3 | Diclazuril 1 | Diclazuril 2 |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| Reference content (unit) | 100 g/L | 100 g/L | 100 g/L | 2 g/kg | 5 g/L |
| Test content (unit) | 101~117 g/L | 92~111 g/L | 103 g/L | 2.39 g/kg | 4.76 g/L |
| Result | Compliant | Compliant | Compliant | Compliant | Compliant |

고 찰

항원충제 내 톨트라주릴과 디클라주릴을 분석하는 방법은 다양하다 [4, 11]. 그러나 이러한 방법들은 분석시간이 많이 소요되거나 별도의 정제과정이 요구되는 등 분석법이 복잡하고, 특히 톨트라주릴과 디클라주릴의 경우 2014년 감사원의 감사 결과 판매량이 가장 높은 구충제 성분이었지만 동물용의약품 공정서(농림축산검역본부 고시 제2016-16호) [2]에 분석법이 등재되어 있지 않아 공인된 검사법을 이용한 분석이 요구되어 왔다. 따라서 본 연구를 통해 항원충제의 대표 성분인 톨트라주릴과 디클라주릴에 대하여 HPLC를 이용한 최적의 분석방법을 개발하고자 하였다. 특이성, 직선성, 정확성, 반복성 그리고 실험실 내 정밀성 시험을 통해 톨트라주릴과 디클라주릴에 대한 본 분석법의 효율성을 검증하였고, 확립된 분석법을 직접 인허가 제품 5품목에 적용한 결과 유효성분 함량이 92~109%로 행정처분 기준인 90~120% 조건을 만족해 효과적으로 분석할 수 있었다. 따라서 구충제 중 톨트라주릴과 디클라주릴의 새로운 HPLC 분석 방법으로 기존 방법보다 정확하고 효율적인 품질관리가 가능하게 되었고 향후 동물용의약품 공정서에 톨트라주릴 및 디클라주릴 검사법 개정을 고시할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 농림축산검역검사기술개발 연구과제(F-1542058-2016-17-01)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. **Abbas RZ, Iqbal Z, Blake D, Khan MN, Saleemi MK.** Anticoccidial drug resistance in fowl coccidian: the state of play revisited. *Worlds Poult Sci J* 2011, **67**, 337-350.
2. Animal and Plant Quarantine Agency (KR). Korean pharmacopoeia of veterinary medicinal products. Public Notice 2016-16 (Feb. 24, 2016).
3. Animal and Plant Quarantine Agency (KR). Standards of national certification assay of the veterinary biological products. Public Notice 2016-99 (Nov. 8, 2016).
4. **Dirikolu L, Lehner F, Natrass C, Bentz BG, Woods WE, Carter WG, Karpiesiuk W, Jacobs J, Boyles J, Harkins JD, Granstrom DE, Tobin T.** Diclazuril in the horse: its identification and detection and preliminary pharmacokinetics. *J Vet Pharmacol Ther* 1999, **22**, 374-379.
5. **González-Díaz H, Gruz-Monteagudo M, Molina R, Tenorio E, Uriarte E.** Predicting multiple drugs side effects with a general drug-target interaction thermodynamic Markov model. *Bioorg Med Chem* 2005, **13**, 1119-1129.
6. **Greif G.** Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitol Res* 2000, **86**, 787-790.
7. **Huet AC, Bienenmann-Ploum M, Vincent U, Delahaut P.** Screening methods and recent developments in the detection of anticoccidials. *Anal Bioanal Chem* 2013, **405**, 7733-7751.
8. **Kanda M, Ushiyama K, Igusa K, Murayama M, Horie M, Hirokado M, Miyazaki T.** [Simple determination of residual anticoccidial drugs (diclazuril and nicarbazin) in chicken tissues by HPLC]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2003, **44**, 110-113. Japanese.
9. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (KR). Enforcement Rule of Handling of veterinary medicinal products. No. 165 (Oct. 5, 2015).
10. **Matabudul DK, Lumley ID, Points JS.** The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 2002, **127**, 760-768.
11. **Stanker LH, Elissalde MH, Rowe LD, Beier RC, El-Aziz Nasr MIA.** Detection of coccidiostats by immunoassay. *Food Agric Immunol* 1994, **6**, 45-54.
12. **Su H, Tan H, Shen H, Tian C.** [Simultaneous separation and determination of four anticoccidial drugs in soil by high performance capillary electrophoresis]. *J Instrum Anal* 2013, **2**, 005-010. Chinese.
13. **Vanparijs O, Marsboom R, Desplenter L.** Diclazuril, a new broad spectrum anticoccidial drug in chickens. 1. Dose titration studies and pilot floor pen trials. *Poult Sci* 1989, **68**, 489-495.
14. **World Health Organization (WHO).** WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. WHO Technical Report Series 937. WHO, Geneva, 2006.