

산란계에서 퀴놀론계 약물투여 후 혈장 및 계란내의 잔류함량 변화추이 조사

심애란¹, 김미희, 유은아, 이윤정, 천순용, 문수평, 함유식

울산광역시보건환경연구원
(접수 2005. 8. 5. 게재승인 2005. 9. 10)

A study on trend of residual changes in blood and eggs of laying hens after oral administration of quinolones

Ea-Ran Sim¹, Mi-Hee Kim, Eun-Ah Yoo, Yun-Jung Lee, Soon-Yong Chun,
Soo-Pyeong Moon, Yoo-Sik Hahm

*Ulsan Metropolitan Health & Environment Research Institute, Ulsan, 689-813, Korea
(Received 5 August 2005, accepted in revised from 10 September 2005)*

Abstract

The purposes of this study were to evaluate the distribution of quinolone and to investigate the effects of quinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin) in blood(plasma) and eggs of laying hens.

Animals were fed quinolones which supplemented with 20, 50, 80 mg/kg of body weight. Blood and egg samples were collected after oral administration and analyzed for quinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin) by HPLC.

In laying hens, the residue period of enrofloxacin were longer than that of ciprofloxacin and the levels of residues were elevated by drug dosage.

Key words : Laying hens, Quinolones, Residues

¹Corresponding author

Phone : +82-52-229-5242, Fax : +82-52-229-5249

E-mail : bada8083@hanmail.net

서 론

생활수준 및 소득수준의 향상 등 식생활 문화 변화로 고급식품에 대한 요구가 급증함에 따라

가축 사육 시 질병치료, 예방 및 성장촉진 등을 위해 합성항균제, 항생제 및 사료첨가제의 사용이 꾸준히 증가되어 축산식품 내 그 잔류가 문제시 되고 있으며, 사료첨가제 및 치료제의 과다사용, 휴약 기간 미이행, 출하 시까지 육성사료급여 등으로 잔류가능성이 높아지고 있다.

종전의 항생제는 세파로스포린계, 페니실린계, 아미노글리코사이드계, 마크로라이드계 등이 있으나, 세파로스포린계와 페니실린계가 주류를 형성하고 있었다. 그러나 세파로스포린계와 페니실린계 및 마크로라이드계 항생제에 대한 내성균주가 증가함에 따라 유효성이 떨어지면서 퀴놀론계 항균제의 사용이 급증하고 있다.

이 퀴놀론계 항균제는 세균의 DNA 전사에 관여하는 DNA-gyrase 활성을 억제함으로써 균의 분열증식을 불가능하게 하여 살균 작용을 나타내는 광범위 항균제¹⁾로서 그람음성균, 그람양성균 뿐 만 아니라 마이코플라즈마균에 의한 호흡기, 소화기, 비뇨기질병의 치료 및 예방목적으로 사용되고 있다.

그러나, enrofloxacin (EF)과 ciprofloxacin (CF)의 사용 시 항균 효능은 높으나, 변이 내성균의 출현, 연골 마모 촉진 등 부작용의 발생에 따라 축산물내 잔류방지가 더욱 크게 대두되고 있으며, 최근 미국에서 가끔에 fluoroquinolone 저항성을 보이는 *Campylobacter* spp가 검출됨에 따라 이들의 공중보건학적인 중요성을 고려하여 EF의 승인 취소 등 안전성 재평가가 진행 중인 것으로 알려져 있다²⁾.

닭에 이들 약물을 경구 투여 시 신속한 체내 흡수로 혈액 및 조직에 분포되고 간에서 EF는 CF로 대사되고 CF는 desethylene-

ciprofloxacin-oxociprofloxacin으로 대사되어 뇨 중으로 배설되는 것으로 보고되고 있으며, 산란계의 경우 난황 및 난백에 모두 이행되는 것으로 알려져 있다³⁾. 그러나 닭의 근육을 비롯한 체조직에서는 EF의 주요 대사물질인 CF가 원물질에 비해 1/10~1/100 정도의 낮은 농도로 존재하는 것으로 연구보고가 있는 반면 계란에서의 이들 대사산물 및 잔류 소실에 대한 자료는 미흡한 실정이다⁴⁾.

따라서, 본 연구는 EF 및 CF를 산란계에 각각 농도별로 투여하고 투여용량에 따른 체내 잔류량 및 계란 내 이행기간 및 농도를 파악하여 합리적인 휴약 기간 및 계란 출하 시기 등을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

22주령 2.7~3kg 내외의 산란계를 구입 사용하였으며, 실험하기 1개월 전에 구입하여 케이지에 넣어 제일제당 산란계용 사료를 먹여 적응시켜 실험에 공여하였다.

표준품 및 시약

Enrofloxacin (EF)과 ciprofloxacin (CF)은 Fluka사의 HPLC용 시약을 사용하였으며, 추출과 분석에 사용된 n-hexane, acetonitrile, ethylacetate, methanol 등은 HPLC grade로 J.T.Baker 및 Sigma로부터 구입하였으며, oxalic acid, phosphoric acid, triethylamine 등 실험에 사용되는 모든 시약은 특급 및 그 이상의 수준을 사용하였다.

공시약물의 투여

1개월간 케이지에 넣어 적응 사육시킨 산란계 그룹(각 10수)에 EF와 CF를 농도별(20, 50, 80mg/kg)로 경구투여하고, 대조군에

는 약물회석에 사용한 생리식염수를 투여하였다.

시료채취

혈중의 잔류약물을 검사하기 위해서는 경구투여 후 1, 5, 8, 24, 48, 72 및 168 시간에 채혈하여 heparin을 첨가하여 혈장을 분리하였다. 계란은 24, 48 및 168 시간 후에 채취한 것을 homogenizer로 난황과 난백을 혼합, 균질 화하여 사용하였다.

시료전처리

계란 1.0 g을 50 ml 원심튜브에 취한 후 10 % oxalic acid 1 ml를 가하고 약 2분간 균질화한 후 추출액 (ACN : ethylacetate = 2 : 1) 5 ml를 넣고 2분간 혼합하여 4,500 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취한 후 추출과정을 반복하여 이 상층액을 질소 농축시켜 50 % acetonitrile 0.5 ml와 이동상 0.5 ml를 가한 뒤 초음파 (40℃)에서 10분간 방치하여 상층액을 0.2 μm nylon syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 혈장은 Intorre 등⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 혈액에 대한 간편하면서 신속하게 추출하는 방법으로 700 μl의 혈액에 동량의 이동상을 가한 다음 균질화하여 80℃에서 5분간 가열한 후 냉각시켜 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μm nylon syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용 하였다.

분석방법

분석 시 형광검출기가 장착된 액체크로마토그래피 Agilent 1100 Series를 이용하였으며, HPLC 분석 조건은 컬럼으로 ZORBAC Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 3.6 μm)을 사용하였으며 이동상은 0.4% triethylamine, phosphoric acid (1 l D. W. + 4 ml triethylamine, phosphoric acid) / ACN = 85 : 15 (v/v) 혼

합용액을 Whatman 0.2 μm 필터로 여과하여 사용하였으며, 검출과장은 형광검출기의 여기파장 278 nm 측정과장 455 nm에서 분당 1.0 ml의 유속으로 1회 주입량은 농도에 따라 저농도 최고 100 μl에서 고농도 최저 10 μl로 다양하게 자동 주입기로 주입 측정하였다.

표준곡선의 작성

검출농도에 따라 표준용액을 단계 회석한 농도별 (0.005~6.400 ppm) 표준물질로 3회 반복분석을 통하여 표준곡선을 검량하고, 각 농도별 면적비를 구한 후 회귀 분석하여 표준곡선 (correlation coefficient 0.999~1)을 작성하였다.

결과 및 고찰

Enrofloxacin (EF) 의 농도 (ppm) 변동

EF를 경구투여 1시간 후 채취한 혈액에서 EF의 대사산물인 CF를 검출하는 것으로 투여 즉시 체내 작용함을 확인할 수 있었으며, 원물질이 대사물질보다 농도가 높게 관찰되었다.

EF를 경구 투여한 후 1, 5, 8, 24, 48, 72 및 168 시간 경과별 EF의 혈장 내 농도를 조사한 결과 Table 1과 같이 각각의 주입농도에서는 주입 5시간 후의 혈중 농도가 대사성 CF는 각각 0.361 ppm, 0.136 ppm, 0.390ppm, EF는 2.223 ppm, 4.187 ppm, 5.055 ppm로 가장 높았으며, EF의 주입농도에 따라 혈중농도가 비례양상을 나타내었다 (Fig.1). 80 mg/kg에서 대사산물인 CF는 8시간 후가 가장 고농도로 0.469 ppm로 5시간 후인 0.390 ppm과 큰 차이를 나타내지는 않았으나, 고농도의 주입 시 잔류량이 높은 경향을 보였으며, 잔류소실기간도 다소 길어지는 양상을 나타내었다.

Table 1. Enrofloxacin and metabolic ciprofloxacin residues in blood after oral administration of enrofloxacin (20, 50 and 80 mg/kg of body weight)

Residues Time (hrs)	Blood (µg/g)							
	Saline		20mg/kg		50mg/kg		80mg/kg	
	CF	EF	CF	EF	CF	EF	CF	EF
1	ND	ND	0.052±0.007	1.456±0.075	0.013±0.008	1.811±0.150	0.164±0.043	3.380±0.465
5	ND	ND	0.361±0.138	2.223±0.179	0.136±0.036	4.187±0.495	0.390±0.064	5.055±0.285
8	ND	ND	0.040±0.004	1.500±0.102	0.114±0.029	3.950±0.387	0.469±0.080	4.987±0.336
24	ND	ND	0.020±0.001	0.475±0.042	0.069±0.020	2.736±0.325	0.323±0.027	4.297±0.181
48	ND	ND	ND	0.056±0.008	0.022±0.005	0.329±0.083	0.048±0.004	0.810±0.187
72	ND	ND	ND	0.013±0.001	0.012±0.005	0.160±0.061	0.020±0.004	0.286±0.061
168	ND	ND	ND	0.005±0.001	0.009±0.003	ND	0.001±0.001	0.001±0.001

ND : Not detected

계란에서의 잔류 농도검출은 EF 투여 24, 48, 168 시간 후에 채란한 것을 대상으로 하였다 (Table 2). 혈액에서와 유사하게 대사 산물인 CF가 잔류하였으며, 투입농도별 잔류량은 비례양상을 보였다. 또한 계란의 경

우 약물 주입 후 24~48시간에서 가장 고농도로 잔류하였으며, 168시간 이후까지도 혈액의 잔류량 보다 많은 양의 잔류가 확인되었다 (Fig.2).

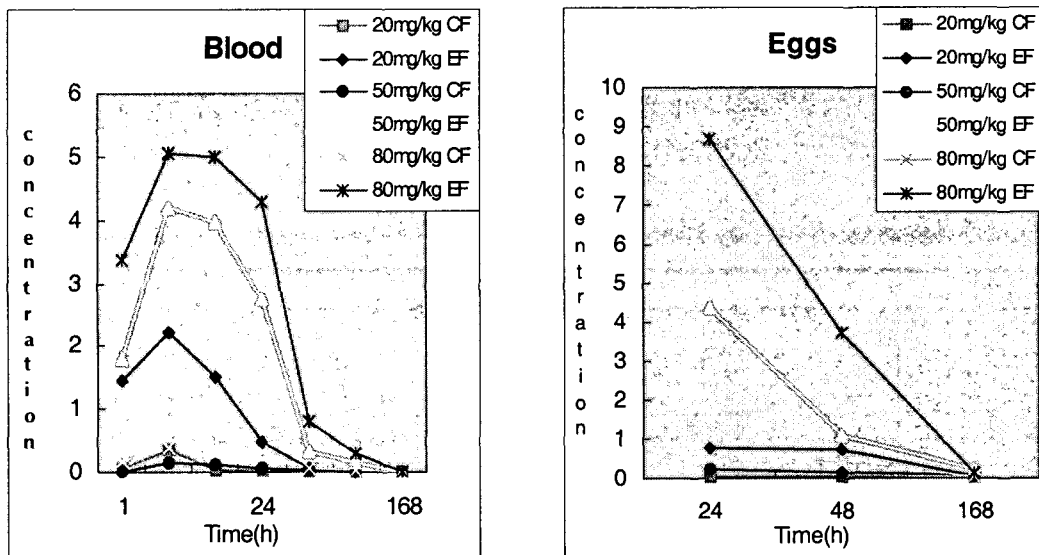


Fig 1. Diagram of enrofloxacin and metabolic ciprofloxacin residues in eggs and blood after oral administration of enrofloxacin

Table 2. Enrofloxacin and metabolic ciprofloxacin residues in eggs after oral dministration of enrofloxacin

Time (hrs)	Residues		Eggs					
	Saline		20mg/kg		50mg/kg		80mg/kg	
	CF	EF	CF	EF	CF	EF	CF	EF
24	ND*	ND	0.033±0.009	0.792±0.523	0.219±0.112	4.341±0.048	0.525±0.027	8.692±0.349
48	ND	ND	0.049±0.017	0.746±0.720	0.117±0.022	1.100±0.230	0.381±0.255	3.724±0.260
168	ND	ND	ND	0.059±0.040	0.022±0.026	0.228±0.088	0.126±0.030	0.418±0.101

ND* : Not detected

이 결과는 Anadon⁶⁾, Son⁷⁾ 및 Suhren등⁸⁾이 젖소와 육계에 EF를 단독투여 후 우유와 조직내 CF가 높은 농도로 오랜 기간동안 잔류한다고 보고한 것과 달리 Donoghue와 Schneider⁹⁾, Gorla¹⁰⁾ 등이 산란계에서 음수 투여 시 그 대사산물인 CF가 투여기간과 휴약 후에도 낮은 농도로 잔류하는 것으로 보고한 것과 유사한 결과로서 알의 형성과정 중 생리화학적 차이에 따른 차이라는 가설을 뒷받침할 수 있을 것으로 사료된다.

Ciprofloxacin (CF)의 농도 (ppm) 변동

CF를 경구 투여한 후 1, 5, 8, 24, 48, 72 및 168 시간 경과별 혈장 내 농도를 조사한 결과 CF는 대사 속도가 매우 빨라 투여 72 시간 이후는 거의 잔류하지 않음을 알 수 있었으며 (Table 3), 고농도로 투여 시 잔류농도 또한 높게 나타났다 (Fig 2).

Table 3. Residues in blood after oral administration of ciprofloxacin (20, 50 and 80mg/kg of body weight)

Time (hrs)	Residues		Blood					
	Saline		20mg/kg		50mg/kg		80mg/kg	
	CF	EF	CF	EF	CF	EF	CF	EF
1	ND	ND	0.243±0.025	ND	0.710±0.063	ND	0.975±0.107	ND
5	ND	ND	0.300±0.041	ND	0.674±0.049	ND	1.869±0.182	ND
8	ND	ND	0.089±0.021	ND	0.451±0.047	ND	1.134±0.059	ND
24	ND	ND	0.025±0.004	ND	0.102±0.015	ND	0.205±0.059	ND
48	ND	ND	ND	ND	0.008±0.003	ND	0.009±0.002	ND
72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
168	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND* : Not detected

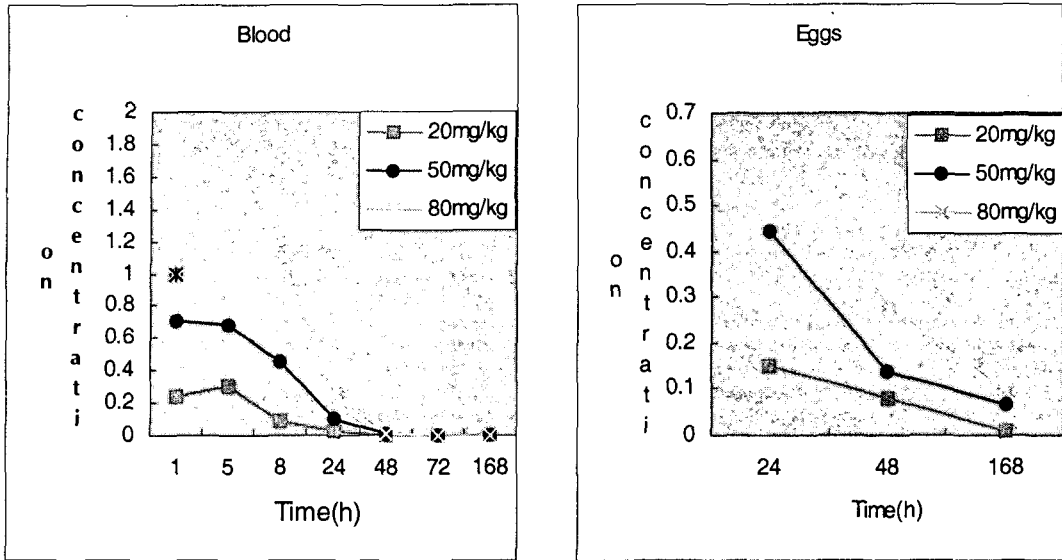


Fig 2. Diagram of residues in the eggs and blood after oral administration of ciprofloxacin

CF를 경구 투여한 후 24, 48, 168 시간 경과별 CF의 계란 내 잔류 농도를 조사한 결과 24시간 후 채취한 계란에서의 잔류농도가 가장 높았으며, 혈중 잔류농도가 소멸된 168 시간 이후 채취한 계란에서도 잔류가 됨

을 확인할 수 있어 혈중 잔류농도가 소실되는 시기에도 계란 내 잔류는 되고 있음을 알 수 있었으며 (Table 4), 투여 농도별 잔류농도는 비례양상을 보였다 (Fig 2).

Table 4. Residues in egg after oral administration of ciprofloxacin (20, 50 and 80mg/kg of body weight)

Residues Time(hr)	Eggs							
	Saline		20mg/kg		50mg/kg		80mg/kg	
	CF	EF	CF	EF	CF	EF	CF	EF
24	ND*	ND	0.151±0.091	ND	0.441±0.157	ND	0.659±0.116	ND
48	ND	ND	0.079±0.003	ND	0.138±0.011	ND	0.273±0.132	ND
168	ND	ND	0.010±0.011	ND	0.068±0.040	ND	0.091±0.032	ND

ND* : Not detected

결론

산란중인 닭에서 EF와 CF의 농도별 (20, 50, 80 mg/kg, 1회, 경구투여) 투여 후 잔류양상을 비교한 결과 EF가 CF보다 잔류 기

간이 길었으며, 투여농도별 잔류농도 비교에서도 높은 경향을 나타내었다.

EF 투여 군에서 혈중과 계란의 잔류농도는 차이가 있으나, 7일 이후에도 투여물질과 대사물질이 모두 검출되며, 혈액에서의 잔류

농도보다 계란에서의 잔류농도가 비교적 더 높은 것으로 나타났다.

CF 투여 군의 경우 혈중잔류농도는 48시간 이후에는 검출되지 않았으나, 계란에서는 7일 이후 까지도 검출되는 양상을 보였는데 이는 알의 형성과정 중 생리 화학적 차이에 의한 것으로 사료된다.

투여 물질별, 투여 농도별 잔류 양상은 모두 용량 의존적으로 투여농도가 높을수록 잔류농도 또한 높았으며, 잔류소실기간도 다소 길어지는 경향을 보였다.

참고문헌

- Gigosos PG, Revesado PR, Cadahia O, et al. 2000. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 871 : 31-36
- Herikstad H, Fracaro Ml. 1997. Emerging quinolonr-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerging Infect Dis* 3 : 253-372
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Iturbe J, et al. 2001. Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci* 71 : 101-109
- Rohwedder R, Bergan T, Caruso E, et al. 1991. Penetration of ciprofloxacin and its metabolite into lung, bronchial and pleural tissue after 250 and 500mg PO ciprofloxacin. *Chemotherapy* 37 : 229-238.
- Intorre L, Cecchini S, Bertii S, et al. 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the sea bath (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182 : 49-59
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ, et al. 1995. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in cickens. *Am J Vet Res* 56(4) : 501-506
- Son SW. 1999. Studies on the detection of quinolones in foods of animal origin. Dissertation for doctor of philosophy, Seoul National University : 66-99
- Suren G, Hammer P, Heeschem W. 1996. Detection of residues of quinolones in milk. In proceedings of the EuroResidue III conferece on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands 6-8 : 917-921
- Donoghue DJ, Schneider MJ. 2003. Comparison between a bioassay and liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry (n) for the determination of incurred enrofloxacin in whole eggs. *J AOAC Int* 86(4) : 669-674
- Gorla N, Chiostrri E, Ugnia L, et al. 1997. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *Int J Antimicrob Agents* 8 : 253-256