한국어병학회지 제28권 제1호 (2015)
J. Fish Pathol., 28(1) : 37~42

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2015.28.1.037

Oxytetracycline과 neomycin 복합제의 약욕에 따른 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 근육내 잔류량 변화

김승민 · 전려진* · 정준범†

제주대학교 해양의생명과학부
*제주대학교 수산백신연구센터

Muscle distribution level after dipping administration of a combination of oxytetracycline and neomycin in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Seung Min Kim, Lyu Jin Jun* and Joon Bum Jeong†

Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea
**Fish Vaccine Resarch Center, Jeju National University, Jeju 695-814, Korea*

In the present study, we performed a dipping of olive flounder (average length and weight: 20±2.0 cm, 70±5.0 g) for a period of three hours a day, over two days, in a melted complex of oxytetracycline (OTC) and neomycin (N), by dissolving 25-10 ppm or 50-20 ppm in water. Subsequently, the remaining antibiotic density in muscle tissue collected from olive flounder was investigated, 1, 5, 14 and 40 days after discontinuation of the medication. 5 fish were used from each group. The standard graph drawn from the results of diluting two standard solutions of OTC and N based on various density levels, showed a relatively straight line with an R^2 of 0.9999 and 0.9952, respectively. The recovery rate of OTC was shown to be 90-93% and N, 88-95%. Upon measurement of the remaining antibiotic density in the test group that had been exposed to 25-10 ppm of the complex of OTC and N, 0.97±0.084 μg/ml of OTC and 0.118±0.079 μg/ml N were detected on 1 day of the test. No antibiotic density was detected after day 5 of the test. Regarding the test group that were exposed to 50-20 ppm of the complex of OTC and N, 1.324±0.062 μg/ml of OTC and 0.788±0.05 μg/ml N were detected on day 1 of the test, and no antibiotic density was detected after day 5 of the test.

Key words: Oxytetracycline, Neomycin, Concentration, Olive flounder

제주 양식산업의 대표적 품종인 넙치는 연간 전체 양식어류 생산량인 4만 톤 중 약 50% 이상을 차지하여 주요 양식어종으로 자리 잡고 있다. 그러나 어류에 대한 소비량이 증가하면서 양식 어류의 공급이 증가되고 그에 따라 고밀도 사육방법이 성해하면서 양식어류에서 질병 발생률이 증가되고 있다. 일반적으로 어류 질병에 대한 대처 방법으로 항생제를 사용하고 있으며, 주로 질병 발생을 예방하거나 치료를 목적으로 사용되었으나, 최근에는 사료와 혼합하여 어류의 성장 촉진을 위한 목적으

†Corresponding author: Joon Bum Jeong
Tel: +82-64-754-3426 , Fax: +82-64-756-3493
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

로도 사용되어지고 있다(Jo *et al*., 2010; Son *et al*., 2011). 이러한 어류양식장에서의 항생제 사용 증가는 질병 원인균의 항생제 내성을 증가시켜 질병에 대한 약품의 효율성이 떨어뜨릴 뿐만 아니라, 잔류허용기준치를 초과한 수산물을 지속적으로 섭취할 경우 인체에 내성이 생겨 질병 치료가 제대로 되지 않는 등의 직·간접적인 영향을 미칠 수 있다. 그러나 이러한 의약품은 사용방법과 용량 및 출하 전 휴약기간 등을 준수하면 어체 내에서 소실되기 때문에 안전성을 확보할 수 있다 (KFDA, 2009). 또한, 미국, EU, 일본 등 선진 각국에서는 동물용의약품의 사용을 수의사의 처방을 받도록 하는 등 엄격하게 규제하고 있으며, 잔류허용기준(MRL, maximum resodue level)을 설정하여 과다한 사용을 억제토록 정책을 유지하고 있다(Cohen *et al*., 1998; MHLW, 2005; USDA FSIS, 2009).

옥시테트라사이클린(oxytetracycline, OTC)은 테트라사이클린계 항생물질에 속하며, 세균의 리보솜에서 단백질 합성을 억제하여 세균의 성장을 저해하는 정균작용을 갖는 광범위한 항생제이고, 주로 *Streptococcus* sp., *Edwardsiella* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. 등에 효과를 나타내며, 예방과 치료를 하기 위해 경구투여 및 약욕의 방법으로 사용되고 있다(KAHPA, 2001).

네오마이신 (neomycin, N)은 아미노글리코사이드계의 항생제로 세균의 리보솜 30S subunit에 결합하여 단백질 합성을 억제하는 기전으로 항생제 효과를 나타내며, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vilgaris*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* 등의 그람양성균과 그람음성균에 모두 효과적으로 작용한다.

본 연구에서는 넙치 양식장에서 세균성 질병의 예방이나 치료를 위하여 사용되고 있는 OTC와 N 복합제에 대한 식품위생학적 안전 확보를 위하여 HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용하여 OTC와 N의 잔류량 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용된 실험어는 제주도내 양식장에서 어류질병에 대한 이력이 없는 넙치를 구입하여, 제주대학교 해양과환경연구소로 운송시켜 1주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치하였다. 넙치(평균체장 및 무게: 20±2.0 cm, 70±5.0 g)는 총 2개의 110 L 원형플라스틱 수조에 각 수조당 40마리씩 나누어 주었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 실험기간 동안의 사육 수온은 20～23℃ 이었다.

시험의약품의 투여 및 시료 채취

실험에 사용된 OTC-N 복합제는 Komipharm사(본 제재 1 kg 중 OTC 250 g, N 100 g)에서 구입하여 25-10 ppm, 50-20 ppm으로 용해 한 후, 2일 동안, 3시간씩 약욕을 실시하였고(Table 1), 약물투여 중지 후 1일, 5일, 14일, 40일째에 시험군 별로 5마리씩 모은 넙치 근육을 사용하여 실험을 실시하였다.

OTC와 N의 추출 및 HPLC 분석

수산물의 OTC의 분석은 식품공전에 준하여 실시하였다 (KFDA, 2009). 채취된 어류의 근육을 잘게 마쇄한 후, 근육 10 g을 취해 0.5% EDTA가 함유된 5% trichloroacetic acid 40 ml를 가하여 균질기로 2분간 균질화한다. 이 액을 6,000 × *g*에서 20분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 분액깔때기로 옮기고 hexane : chloroform (9 : 1) 혼합액 40 ml를 가해 혼합한 후 액층이 분리될 때까지 정치한다. 분리된 액층 중 아래층은 다른 분액깔때기에 옮겨 hexane : chloroform (9 : 1) 혼합액을 다시 40 ml 가하여 액층을 분리한다. 분리된 아래 액층은 농축플라스크에 받아 3 ml 정도가 되도록 40℃에서 감압농축한다. 농축액은 활성화시킨 Sep-pak C_{18} 카트

Table 1. The administration of mixtures of oxytetracycline-neomycin in olive flounder.

Group	Way of dealing	Numbers of fish
control	−	40
OTC-N (25-10 ppm)	Immersion for 3 hours, 2 days	40
OTC-N (50-20 ppm)	Immersion for 3 hours, 2 days	40

리지에 흘린 후, 증류수 40 ml를 흘려 세척한다. 카트리지에 흡착된 성분은 methanol 40 ml를 흘려 용출시키고, 용출액은 다시 감압 하에서 농축기로 건조시킨다. 시험액이 건조된 플라스크에 이동상 2 ml를 가하여 녹이고 0.45 μm syringe filter (Nalgene)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1). 수산물에서 OTC를 분석하기 위한 HPLC chromatography system (Shimadzu, Japan)은 다음과 같다. Column (Shimadzu, Japan)은 C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)를 사용하여, 이동상으로 methanol : acetonitrile : 0.01 M oxalic acid (10:12:78, v/v/v)를 1 ml/min의 유속으로 흘려주었으며, injection volume은 100 μl, column 온도는 30℃의 조건으로 UV 360nm에서 분석하였다.

N은 채취된 어류의 근육을 잘게 마쇄한 후, 근육 4 g을 취해 polypropylene 재질의 원심분리관에 취하고 10 mM 인산완충용액 10 ml를 더하여 1분 동안 균질화한 다음 초음파로 10분간 추출하였다. 진탕기를 이용하여 10분간 진탕한 후, 1,200 × *g*에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 원심분리관에 옮긴 다음 남은 잔여물에 10 mM 인산완충용액 10 ㎖를 더하여 교반기로 섞고, 위와 동일하게 진탕하고 원심분리하여 상층액을 합하였다. 30% 수산화나트륨을 0.2 ml를 가하여 pH 7.5～8.0으로 맞추어 추출액으로 하였다. Methanol 5 ml과 물 5 ml로 각각 HLB cartridge와 weak cation exchange cartridge를 활성화시킨 후, HLB cartridge와 weak cation exchange cartridge를 연속으로 연결하여 추출액을 1～3 ml/min의 속도로 흡착시키고 물 5 ml를 넣어 같은 유속으로 세척하였다. 용출용액 2 ml를 1～3 ml/min의 속도로 용출시켜 0.45 μm syringe filter (Nalgene)로 여과하여 시험액을 polypropylene vial에 담아 시험용액으로 하였다(Fig. 2). 수산물에서 N을 분석하기 위한 HPLC chromatography system (Shimadzu, Japan)으로 column (Shimadzu, Japan)은 C18 (2.1 mm × 150 mm, 3 μm)을 사용하여, 이동상

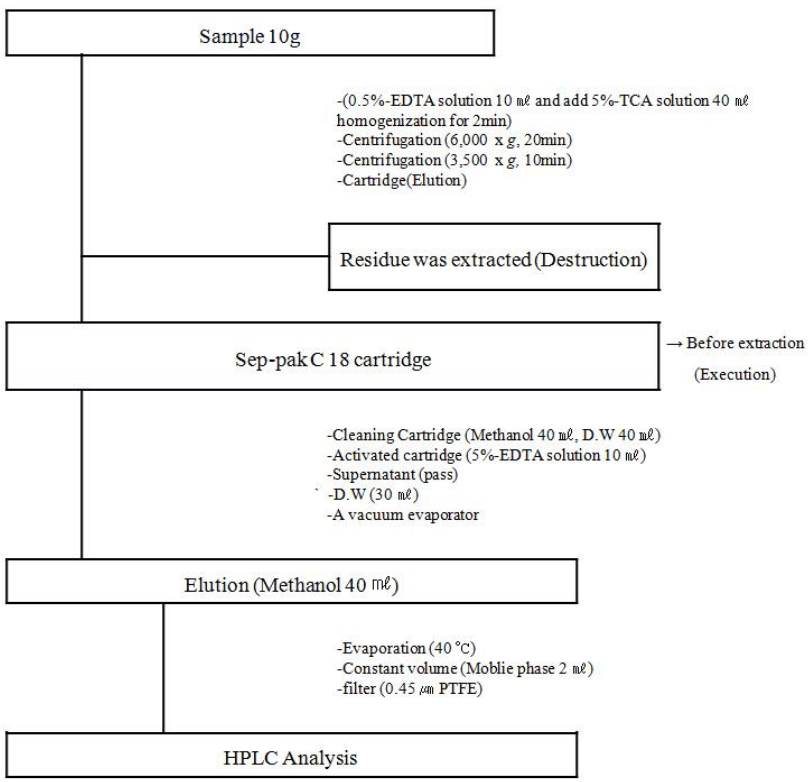

Fig. 1. The schematic diagram of sample pretreatment process for oxytetracycline residue analysis in fish.

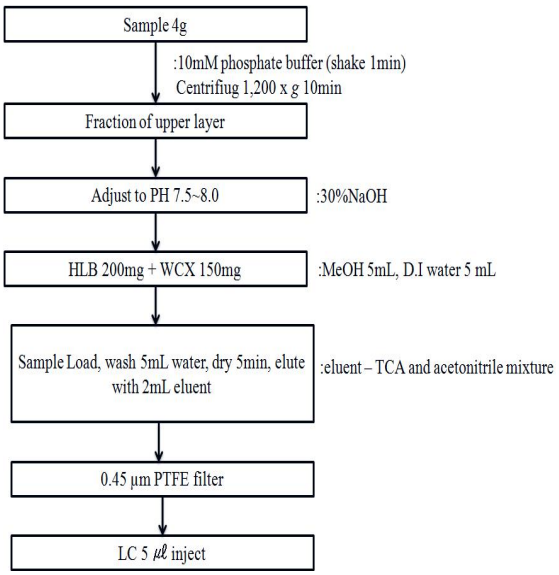

Fig. 2. The schematic diagram of sample pretreatment process for neomycin residue analysis in fish.

으로 heptafluorobutyric acid (HFBA) : acetonitrile을 gradient (10% B용매를 15분 동안 40%까지 증가시키고 5분간 유지하였으며 1분간 다시 10%로 감소시킨 후 4분간 유지)로 이용하였으며 유속은 0.4 ml/min로 하였다.

표준곡선 작성 및 회수율

OTC (0.1, 0.2, 0.5 ppm) 및 N (0.25, 0.5, 1.0 ppm)을 이동상에 녹인 표준용액을 HPLC에 20 μl 주입하여 도출된 peak면적에 의하여 표준곡선을 작성하였다. 시료에 대한 회수율은 OTC 0.2, 0.5 ppm 농도와 N 0.5, 1.0 ppm 농도로 넙치의 근육에 첨가한 후, 시료의 전처리 방법에 따라 추출 후, HPLC에 주입하여 표준용액과 머무름 시간을 비교하여, 해당 피크의 면적 값을 표준용액의 직선 희귀방정식에 대입하여 계산하였다.

결과 및 고찰

표준곡선 및 회수율

OTC (0.1, 0.2, 0.5 ppm) 및 N (0.25, 0.5, 1.0 ppm) 표준용액을 농도별로 희석하여 HPLC로 분석한 다음 농도별에 따른 peak 면적 비를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과, 각각 R^2= 0.9999, R^2= 0.9952로 넓이가 비례하여 양호한 직선성(r^2>0.995)을 나타내었다(Fig. 3). Hah *et al*. (1997)은 넙치 근육에 OTC를 0.1, 0.3 ppm으로 spiking하여, 회수율을 조사한 결과 각각 66%, 51%나타내었으며, Lee *et al*. (2005)은 넙치 근육 조직에서 0.1, 0.5, 1.0 ppm으로 spiking한 경우 회수율은 각각 100%, 98%, 97%로 보고하였다. 본 실험의 회수율 결과, 근육에 0.2, 0.5 ppm으로 첨가한 각각의 농도의 평균 회수율은 90.12%, 93.65%를 나타내었다(Table 2). 이러한 결과는 Hah *et al*. (1997)의 연구결과보다는 높은 회수율을 보였으나, Lee *et al*. (2005)의 연구결과와는 다소 낮은 회수율을 보였지만, 결과적 차이를 보이는 것은 어류의 근육 추출 방법에 따라 회수율이 편차를 보이는 것으로 사료된다.

Hong *et al*. (2010)은 넙치 근육에 N을 농도별 (0.25～1.0 mg/kg)로 spiking하여, 회수율을 조사한

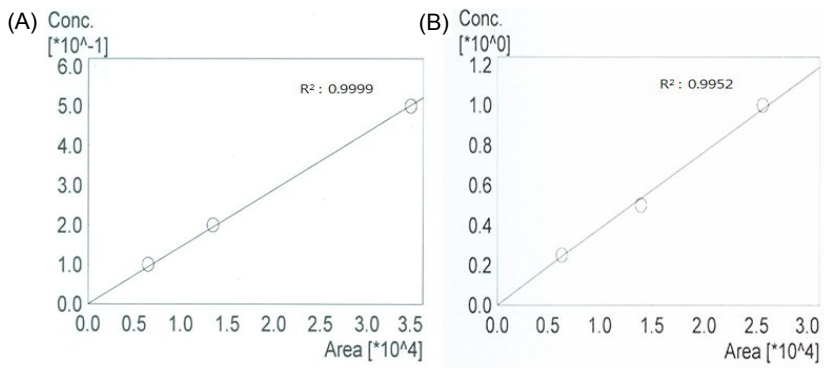

Fig. 3. Calibration curves for the determination of (A) oxytetracycline and (B) neomycin by HPLC.

Table 2. Spiked recovery in blood and muscle

Fish	Sample	Group	Spiked concentration (mg/kg)	Recovery (%)
P. olivaceus	Muscle	OTC	0.2	90.12±0.52
			0.5	93.65±1.47
		N	0.5	88.42±2.31
			1.0	95.13±4.45

결과 각각 92～114%의 회수율이 관찰되었고, 본 실험의 네오마이신 회수율 결과, 근육에 0.5, 1.0 ppm으로 첨가한 각각의 농도의 평균 회수율은 88.42%, 95.13%로 Hong *et al*. (2010)의 연구결과보다 낮은 회수율을 보였다(Table 2). 이러한 결과는 국내의 식품안전과 관련하여 동물용의약품의 식품 내 검출분석법은 계속 수정·보완되고 있다. 현재 본 연구에 사용된 HPLC 분석기와 다른 액체크로마토그래프/질량분석기를 이용한 방법으로 회수율의 편차를 보이는 것으로 여겨진다.

양식 넙치에 대한 OTC 및 N 잔류량 분석

옥시테트라사이클린 및 네오마이신은 에드워드병, 비브리오병, 연쇄구균병 등의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 넙치의 대한 옥시테트라사이클린 휴약기간은 40일로 권고하고 있으며, 네오마이신의 넙치에 대한 휴약기간은 정해지지 않았으나, 잉어에서 5일째로 규정되어 있다 (NFRDI, 2010). 본 시험에서는 OTC-N 복합제를 25-10 ppm, 50-20 ppm 농도로 2일 동안, 3시간씩 약욕을 실시하고 두 항생제의 잔류량의 변화를 분석하고자 하였다. 시험군에 약욕을 실시한 후, 1일째에 OTC는 25-10 ppm 투여군에서 0.97±0.084 μg/ml, 50-20 ppm 투여군에서 1.324±0.062 μg/ml이 검출되었고, 5일째 이후부터 검출이 되지 않았다 (Table 3). 25-10 ppm 및 50-20 ppm 투여군에서 1일째에 검출된 결과는 최대잔류허용기준인 0.2 ppm을 넘었으나, 5일째 이후부터 최대잔류허용 기준치 이하로 검출되었다. 이러한 결과는 Kim *et al*. (2006)에서 보고된 OTC를 넙치에 약욕하여 근육조직 내 잔류량을 조사한 결과와 일치하였다.

본 실험의 N 결과, 1일째에 25-10 ppm 투여군에서 0.118±0.079 μg/ml, 50-20 ppm 투여군에서 0.788±0.05 μg/ml이 검출되었고, 5일째 이후부터 검출이 되지 않았다(Table 4). 검출된 그룹 모두 1일째에 0.5 ppm을 넘지 않아 식품의약품안전청에 명시한 잔류허용 기준치 이하로 검출되었으며, 잔류량 분석기간 5일부터 40일까지 검출이 되지 않았다. 그러므로, 넙치에 대한 N의 안정적인 휴약기간 설정이 가능하다고 여겨지나 양식 현장에서 발생하는 다양한 문제점의 해결과 항생제의 올바른 처방을 위하여 더 많은 데이터의 축적을 위한 연구가 필요

Table 3. Concentration of oxytetracycline in muscle of fishes after dipping of 25 ppm and 50 ppm water.

Fish	Group	No. of samples	Residue concentration after treatment (mg/kg)			
			1day	5day	14day	40day
P. olivaceus	Control	5	ND	ND	ND	ND
	25 ppm	5	0.97	ND	ND	ND
	50 ppm	5	1.324	ND	ND	ND

ND: Not detected.

Table 4. Concentration of neomycin in muscle of fishes after dipping of 10 ppm and 20 ppm water

Fish	Group	No. of samples	Residue concentration after treatment (mg/kg)			
			1day	5day	14day	40day
P.olivaceus	Control	5	ND	ND	ND	ND
	10 ppm	5	0.118	ND	ND	ND
	20 ppm	5	0.788	ND	ND	ND

ND: Not detected.

할 것이다.

이번 연구의 결과는 OTC 및 N을 복합제로 사용하였을 때 넙치의 근육내 항생제의 잔류량를 조사한 것으로서 각 항생제에 대한 휴약기간 내에 배출이 일어나 두 항생제가 검출되지 않은 것을 확인할 수 있었으며, 향후에는 이러한 복합제가 세균에 대하여 상승작용을 유발시켜 강력한 항균력을 나타내는지에 대한 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 넙치 (평균체장 및 무게: 20±2.0 cm, 70±5.0 g)에 옥시테트라사이클린(oxytetracycline, OTC)-네오마이신(neomycin, N) 복합제를 25-10 ppm 및 50-20 ppm으로 용해하여 2일 동안, 3시간씩 약욕을 실시하였고, 약물투여 중지 후 1일, 5일, 14일, 40일째에 시험군별로 각각 5마리씩 넙치의 근육을 채취하여 항생제 잔류농도를 조사하였다. OTC와 N 표준용액을 농도별로 희석하여 표준곡선을 작성한 결과 각각 R^2= 0.9999, R^2= 0.9952로 양호한 직선성을 나타내었고, OTC와 N 회수율은 각각 90～93%, 88～95%가 관찰되었다. 잔류농도에 대한 측정결과, OTC와 N 복합제를 25-10 ppm 투여한 시험군에서 1일째 OTC는 0.97±0.084 μg/ml이 검출되었고, N은 0.118±0.079 μg/ml이 검출되었으나 5일째 이후부터 검출이 되지 않았다. OTC와 N 복합제를 50-20 ppm 투여한 시험군에서 1일째 OTC는 1.324±0.062 μg/ml이 검출되었고 N은 0.788±0.05 μg/ ml이 검출되었으나 5일째 이후부터 검출이 되지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (어류백신개발 및 전문인력 양성).

References

Cohen, M., Harrison, P.F and Lederberg, J.: Antimicrobial Resistance: Issues and Options. Division of Health Sciences Policy, pp. 41, 1998.

Hah, D.S., Kim, J.S. and Kim G.S.: Simultaneous Quantification of Sulfonamide and Tetracyclines in Fish Muscle Tissue by Matrix Phase Dispersion (MSPD) Extraction and HPLC. J. Fd Hyg Safety, 12:117-124, 1997.

Hong, Y.M., Lee, S.K., Kim, H.A. and Hwang, Y.K.: Simultaneous Analytical Method for the Neomycin, Gentamicin Residues in Seafood. J. Appl Biol, 53: 25-30, 2010.

Jo, M.R., Park, K., Lee H.J., Kim, J.H., Lee, T.S., Jung, S.H., Lee, D.S., Yoon, H.D. and Kim, P.H.: Distribution of Fluoroquinolones in the Carp (Cyprinus carpio) and Eel (Anguilla japonica) following their Oral Administration. J. Fish Aquat. 43: 623-628, 2010.

Kim, S., Chung, H.S., Kang, S.J., Ha, J.Y., Jung W.C., Heo, S.H., Shin, Y.W., Kim, K.W., Kim, DG and Lee, H.J.: Tissue Distribution after Dipping Administration of Oxytetracy-cline and Tetracycline in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), Rockfish (*Sebastes schlegeli*), and Red Sea bream (*Pagrus major*). J. Fish Pathol. 19:155-164, 2006.

KAHPA (Korea Animal Health Product Association): Drugs for animal use. 2001

KFDA (Korea Food and Drug Adminstration).: Food Code, Korea Food & Drug Administration. Seoul Kor. Annex 7.8 7.13～7.14, 2009.

Lee, H.J., Lee, T.S., Son, K.T., Kim, P.H., Jo, M.R., Park, M.J., and Yi, Y.H.: Analysis of Tetracyclines Using High-Performance Liquid Chromatography for Fishery Products. J. Fish Aquat. 38:372-378, 2005.

MHLW (Ministry of Health Labour welfare).: Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural CHemicals, Feed Additivess and Veterinary Drugs in Food. The director notice no.02124001 Janpan, 2005.

NFRDI (National Fisheries Research and Development In stitute).: The guidance of aquatic drug use. pp 1-31, 2010.

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 Lee, H.J.: Residues of Ampicillin and Amoxicillin in Olive Flounder *Parlichthys oliveceus* Following Oral Administration. J. Fish Aquat. 44: 464-469, 2011.

USDA FSIS (United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service).: Chemistry Laboratory Guidebook, USA, 2009.

Manuscript Received : Mar 9, 2015
Revised : Apr 12, 2015
Accepted : Apr 13, 2015