

양식산 넙치에서 Enrofloxacin의 잔류

서정수 · 전은지 · 이은혜 · 정승희 · 박명애* · 지보영* · 김나영†

국립수산과학원 병리연구과, 수산생물방역과*

The Residues of Enrofloxacin in Cultured *Paralichthys olivaceus*

Jung Soo Seo, Eun Ji Jeon, Eun Hye Lee, Sung Hee Jung, Myoung Ae Park,
Bo Young Jee* and Na Young Kim†

Pathology Division, National Fisheries Research & Development Institute (NFRDI), Busan 619-705, Korea

*Aquatic Life Disease Control Division

Enrofloxacin is one of the normally used flouroquinolones in mammalian and fish but its withdrawal time and studies were remain obscure. The residual contents of enrofloxacin in fish muscle were analyzed by using HPLC-FLD. More than 0.1 mg/kg of ENR was detected in muscle tissues and the residues were found over 1 year after treatment. The concentration of ENR in *Paralichthys olivaceus* was not affected by water temperature and lasted for an extended amount of time. The spike recoveries of ENR in the muscle tissue ranged from 78% to 85%. From this results, we need the prescription by veterinarian or aquatic organism disease inspector in ENR usage to assure safety of fish.

Future research is required to determine the recommendation dose of ENR for side effects and safety.

Key words : Enrofloxacin, Flouroquinolones, HPLC-FLD, *Paralichthys olivaceus*

어류에 대한 소비량이 증가하면서 양식 어류의 공급이 증가되고 그에 따라 고밀도 사육방법이 성행하면서 양식어류에서 질병 발생률이 증가되고 있다. 질병발생 치료제로 항생제가 많이 사용되어 졌으며 이 중 퀴놀론계 항생제는 1980년도에 어류 양식 산업에 도입된 이후 사용량이 점차 증가하였다.

퀴놀론계 항생제의 작용기전은 세균 내에 존재하는 DNA gyrase와 결합함으로써 세균의 DNA gyrase 활성을 감소시키거나, 또는 세균의 DNA 합성 자체를 막아 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Vancutsem *et al.*, 1989; Brown., 1996). 이러한 퀴놀론

계열의 합성 항생제 중 ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR)은 기존의 제1세대 퀴놀론계 항생제인 nalidixic acid, oxolinic acid, piromidic acid 들보다 그람 음성균과 그람 양성균에 탁월한 효과를 가질 뿐만 아니라 항균활성 또한 높은 것으로 보고되어지고 있다 (Wolfson *et al.*, 1985; Neer *et al.*, 1988).

그러나 대부분 효과가 뛰어난 항생제라도 과다 사용하게 되면, 이것으로 인한 경제적 손실뿐만 아니라 어류에 잔류된 항생제로 인해 위험에 노출되어질 수 있다. 또한, 양식어류에 항생제를 너무 남용하게 되면 어류의 세균 내성 및 해양 생태계의 오염 등 다양한 문제를 야기할 수 있다. 특히, 플로르퀴놀론 (flouroquinolones) 계열의 항생제는 세균 내성과 축산

†Corresponding author : Na Young Kim

Tel : +82-51-720-3047, Fax : +82-51-720-3039

E-mail : kny009@nate.com

물 및 어류 등 식품 내 항생제 잔류로 인한 안전성 문제가 대두되어 미국, EU, 일본 등에서 동물용의약품에 대한 규제를 강화하는 실정이다 (Herikstad *et al*, 1997; Smith *et al*, 2003). 우리나라도 약사법 제76조 및 85조의 규정에 의해 2008년 7월부터 4종 (ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin)의 인수공통 플로르퀴놀론 항생제 (134개 품목)에 대하여 국내 제조 및 수입금지 조치가 내려졌고 제품 판매가 금지되었다.

퀴놀론계 항생제에 대한 약동력학 연구 및 식품 안전성으로서의 잔류 분석은 국내·외에서 포유류에 대한 연구가 대부분이고 어류나 갑각류 등의 수산물에 대한 연구는 미흡하다. 특히, 국내에서 사용되고 있는 ENR에 대한 연구는 대부분 포유류 위주이고 어류에 대한 연구는 미흡하다. Bowser *et al*. (1992)은 무지개 송어에서 ENR을 경구투여 했을 경우 수온의 차이에 따라서 약동학적으로 비교하였다. Lewbart *et al*. (1997)은 열대어인 red pacu에서 ENR을 경구, 약욕, 근육주사 했을 경우에 투여 방법에 따라서 약동학적으로 비교하였다.

국내 넙치 양식현장에서는 4종의 플로르퀴놀론계 열의약품 사용금지로 인하여 수산용의약품으로 허가받지 않은 ENR이 수의사 및 수산질병관리사의 처방에 따라 양식현장에서 빈번히 사용되고 있는 실정이다. 그러나, 수의사 및 수산질병관리사의 처방을 위한 약품의 안전성 및 휴약기간, 잔류성 등에 대한 연구는 거의 없으며 매우 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구는 직접적으로 넙치 양식현장을 대상으로 하여 넙치 세균성질환을 치료하기 위하여 ENR 투여시 항생제 잔류를 high performance liquid chromatography fluorescence detector (HPLC-FLD)로 분석하고 그 문제점을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험에 사용된 실험어는 2011년 4월부터 2012년 6월까지 경북지방 양식장 두 곳(A, B 양어장)에서 양식되는 넙치를 샘플링 (양어장별 4마리)하여 실험어로 사용하였다. 양어장에서 샘플링한 어류는 근육 (5 g)부위만 떼어내어 분석에 이용하였다. 실험에 사용된 enrofloxacin (ENR)은 Sigma사에서 구입하였다. 기기분석을 위한 HPLC용 acetonitrile, methanol 및 증류수 등 용매류는 Merck사 (Germany)를 사용하였으며, 기타 이 실험에 사용된 모든 시약은 특급 이상을 사용하였다. HPLC Chromatograph system (Agilent 1200)으로는 pump (Agilent 1200 series, USA), autosampler (Agilent 1200 series, USA), FLD (fluorescence detector, Agilent 1200 series, G1321A USA), column (ZORBAX SB-C18, 4.6×250mm, Agilent, USA), column oven (Agilent 1200 series, G1316A, USA)과 data system (Agilent Chemstation software, USA)을 사용하였다.

표준용액 (stock solution)을 조제하기 위하여 10 mg의 ENR을 100 ml 용량 플라스크에 취한 후 메탄올에 용해시켜 약 100 mg/ml의 농도가 되도록 조제한 후, 이것을 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml 수준의 농도가 되도록 이동상으로 희석하여 working solution으로 사용하였다. 이동상은 조 (2003)의 방법을 변경하여 사용하였다. 0.1 M phosphoric acid를 triethylamine으로 pH 2.5로 맞춘 후, 이 용액과 ACN (acetonitrile) 및 MeOH (methanol)을 80:10:10 (v:v:v)으로 섞어서 사용하였다.

시료 전처리 및 분석조건은 식품공전 방법을 변형하여 사용하였다. 넙치 근육 5 g을 마쇄하여 이동상과 ACN을 1:1로 섞은 혼합액을 가해서 균질화시켰다. 이 액을 80℃에서 열처리 후 원심 분리하여 상등액을

분리하고 거기다 hexan을 첨가하여 액층을 분리한 후 감압 농축하여 필터 (0.22 μ m) 후 샘플로 사용하였다. 본 연구의 HPLC 분석의 회수율 측정을 위하여 ENR이 검출되지 않는 넙치의 근육에 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml 수준이 되도록 표준물질을 첨가하고 시료 전처리 방법 및 분석조건과 동일하게 수행하여 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

퀴놀론계 항균제 중 하나인 enrofloxacin (ENR)은 소수성 약품으로 장기 (신장, 비장, 근육, 피부)와 지방 조직에 많이 분포한다 (Stoffregen *et al*, 1997). 아가미와 피부를 통해 흡수된 ENR은 약육보다 복강주사, 근육주사, 경구투여 방법이 혈액에서 ENR이 높게 검출된다고 알려져 있다 (Treves-Brown, 2000). ENR의 경우 반감기는 종에 따라 다양한데 닭의 경우는 7.3시간, 개,의 경우 2.1시간, 소의 경우는 1.2 시간, 말의 경우는 3.3시간이다. 그러나 변온동물은 그보다 훨씬 길다고 보고되어 있으며, 특히 파충류의 경우 더 길다고 알려져 있다 (Vancutsem *et al*, 1990).

본 연구는 넙치 양식현장에서 세균성질병 치료용으로 사용된 ENR의 근육내 잔류량을 HPLC-FLD를 사용하여 조사하였다. 수산질병관리사의 처방을 받아 구입한 ENR은 투여 후 1개월 경과 후부터 넙치 근육내 잔류량을 2011년 4월부터 2012년 6월까지 경북지방 A와 B 양식장 두 곳을 모니터링 하였다. 초기 1개월 내에서는 HPLC-FLD 분석법으로 0.2 ppm 정도로 검출이 되나 3개월 이후 부터는 식품의약품안전청에 명시한 잔류허용 기준치 (식품위생법에 따른 잔류허용 기준치: 어류와 갑각류에서 ENR과 CIP의 합으로서 0.1 ppm이하, ofloxacin, norfloxacin, pefloxacin은 불검출) 이하로 대부분 검출되었다. 그러나, 근육

내 ENR의 잔류량 분석기간 (14개월) 동안 ENR의 검출량이 줄어들기는 하나 미량적으로나마 계속적으로 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

국내에 동물용의약품으로 품목허가 된 ENR은 닭의 세균성질병을 치료목적으로 휴약 기간은 12일로 이루어져 있으나, 수산용으로는 품목허가가 나 있지 않다. 넙치 양식현장에서의 세균성 질병을 치료하기 위하여 2009년 이전에는 ciprofloxacin 과 norfloxacin 이 품목허가로 판매가 되었으나, 품목취소 후 수의사 및 수산질병관리사의 처방에 의하여 동물용의약품인 ENR이 수산용으로 판매되고 있는 실정이다. 그러나, ENR의 안전성 및 휴약기간에 대한 연구 없이 사용되다 보니 양식 현장에서 다양한 문제점들이 노출되었다. 본 연구에서 14개월 가량 ENR의 잔류량을 모니터링 한 결과 계속적으로 미량이 검출되며 이는 같은 계열의 ciprofloxacin도 넙치에서 25일의 휴약기간보다도 더 오래 유지됨을 알 수 있었다.

양식 넙치내 ENR의 장기간 검출은 수온의 변화에도 불구하고 변온동물인 넙치가 수온 영향없이 잔류가 오래됨을 나타내는 것으로 추정되었다. 다른 연구 결과들에서도 넙치에서 식품위생안전을 고려할 때 ENR의 휴약 기간을 60일로 추천하였고, 100일이 지나도 어체 내에서 완전히 배출되지 않고 잔류되는 것을 확인하였다 (김 등, 2006). 본 실험법의 회수율에 있어서도 ENR이 검출되지 않는 넙치에 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/ml 수준이 되도록 표준물질을 첨가하여 전처리 후 HPLC-FLD로 분석한 결과 회수율이 78-85%인 것으로 보아 본 실험방법이 유효한 결과임을 확인할 수 있었다 (data not shown).

국내의 식품안전과 관련하여 동물용의약품의 식품 내 검출 분석법은 계속 발전하고 있다. 식품위생법에 따른 동물용의약품의 잔류허용기준치를 측정하기 위한 식품공전 방법은 현재 본 연구에 사용된

Table 1. The residual monitoring of enrofloxacin (ENR) from muscle of *Paralichthys olivaceus* by HPLC-FLD.

Date	water temperature (°C)	A farm		B farm	
		weight ^a (g)	residue of ENR ^b (ppm)	weight(g)	residue of ENR(ppm)
Apr, 2011	12	647	0.1785±0.0112	620	0.2151±0.0076
Jun, 2011	17.1	640	0.0701±0.0014	778	0.0561±0.0005
Jul, 2011	18.3	1080	0.0606±0.0045	660	0.0476±0.007
Aug, 2011	24	1100	0.0507±0.0015	800	0.0421±0.002
Sep, 2011	25	890	0.0358±0.0015	704	0.0309±0.005
Oct, 2011	18	600	0.0315±0.0097	1367	0.0315±0.0037
Jun, 2012	19.8	440	0.033±0.0013	1040	0.033±0.0015

^a. weight: average of fish body weight^b. ENR: enrofloxacin

HPLC-FLD 보다 검출률이 매우 높은 액체크로마토그래프/질량분석기 (HPLC-Mass spectrometer)의 방법으로 더 강화되었다 (식품의약품안전청). 따라서, 본 논문에서 양식넙치에 투여된 ENR을 HPLC-FLD로 검사한 근육내 ENR 수치보다 더 높게 나올 수 있다. 그러므로 넙치 양식현장에서 세균성 질병치료를 위하여 수의사 및 수산질병관리사의 처방에 따른 동물용의약품인 ENR의 사용은 근육내 잔류성 및 안전성으로 인하여 사용시에 매우 많은 주의가 요구된다. 현재 수산용 의약품 사용에 대한 사용 및 처방이 정확하게 이루어지지 않고 그 근거에 대한 데이터도 많이 부족한 실정이다. 따라서, ENR에 대한 오남용을 방지하기 위해서 지속적인 모니터링 및 기초데이터 연구를 통한 수산물 안전성에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Bowser, P. R., Wooster, G. A., Stleger, J. and Babish, J. G.: Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*), J. Vet. Pharmacol. Therap., 15:62-71, 1992.
- Brown, S. A.: Fluoroquinolones in animal health, J. Vet. Pharmacol. Therap., 19:1-14, 1996.
- Herikstad, H., Hayers, P., Mokhtar, M., Fracaro, M. L., Threlfall, E. J. and Angulo, F. J.: Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the USA. Emerg. Infect. Dis., 3:371-372, 1997.
- Horie, M., Saito, K., Nose, N. and Nakazawa, H.: Determination of enrofloxacin in meat and fish by high performance liquid chromatography. J. Food. Hyg. Soc. Japan., 34:289-293, 1993.
- Lewbart, G., Vaden, S., Deen, J., Manaugh, C., Whitt, D., Doi, A., Smith, T. and Flammer, K.: Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. J. Vet. Pharmacol. Ther., 20: 124-128, 1997.
- Lucchetti, D., Fabrizi, L., Guandalini, E., Podesta, E., Marvasi, L., Zaghini, A. and Coni, E.: Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Antimicrob. Agent Chemother., 48:

- 3912-3917, 2004.
- Mark, A. M.: Enrofloxacin. J. Exct. Pet. Med., 15:66-90, 2006.
- Neer, T. M.: Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobial drugs. J. American Vet. Med. Assoc., 193:577-580, 1988.
- Rocca, D. G., Salvo, A. D., Malvisi, J. and Sello, M.: The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sprus aurata* L.) after single intravenous injection of from medicated feed administration. Aquaculture, 232:53-62, 2004.
- Smith, K. E., Besser, J. M., Hedberg, C. W., Leano, F. T., Bender, J. B., Wicklund, J. H., Johnson, B. P., Moore, K. A. and Osterholm, M. T.: Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota. New Engl. J. Med., 340:1525-1532, 2003.
- Stoffregen, D. A., Wooster, G. A., Bustos, P. S., Bowser, P. R. and Babish, J. G.: Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. J. Vet. Pharmacol. Therap., 20:111-123, 1997.
- Treves-Brown K. M.: Applied fish pharmacology, pp.1-117, Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000.
- Vancutsem, P. M., Babish, J. G. and Schwark, W. S.: The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity, Cornell. Vet., 80:173-186, 1990.
- Wolfson, J. S. and Hooper, D. C.: The fluoroquinolones: Structure, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity invitro. Antimicrob Agents Chemother., 28:581-586, 1985.
- 김풍호, 이희정, 조미라, 이태식, 하진환: 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 enrofloxacin 휴약기간. 한국수산과학회지, 39:72-77, 2006.
- 박명애, 육동현, 김수연, 김진아, 박애숙, 김연천, 김무상: 어류 중 fluoroquinolone계 항균제의 분석 및 잔류량 조사. 한국식품과학회지, 44:293-299, 2012.
- 조미라: 양식어류에 투여된 퀴놀론계 항균물질의 분석 및 약물동태학적 연구, 경성대학교 식품공학과 박사학위 논문, 1-112, 2003.
- 식품공전, 10-5-89, 식품의약품안전청, 2011.

Manuscript Received : December 21, 2012

Revised : April 5, 2013

Accepted : April 8, 2013

