



넙치에 대한 Erythromycin thiocyanate의 단일 근육투여에 따른 약물동태학적 특성

서정수*† · 정승희** · 지보영** · 권문경**

*국립수산과학원(연구소) · **국립수산과학원(연구관)

The Pharmacokinetic Characterization of Erythromycin thiocyanate in Cultured Olive Flounder by Single Intramuscular Administration

Jung-Soo SEO*† · Sung-Hee JUNG** · Bo-Young JEE** · Mun-Gyeong KWON**

*National Institute of Fisheries Science (researcher) · **National Institute of Fisheries Science (senior researcher)

Abstract

The study was aimed at investigating the pharmacokinetics of erythromycin thiocyanate(EM) in the cultured olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) following single intramuscular administration, using LC/MS/MS following. After single administration of EM(5 and 10 mg/kg body weight) by intramuscular injection in olive flounder(332±20 g, 20±0.5°C), the EM concentration in the serum was determined at 1, 3, 6, 9, 24, 72, 120, 168, 264, 360, 504 and 720 h post-dose, respectively. The kinetic profile of EM intramuscular administration in serum were analyzed fitting to a non-compartment model by WinNonlin program. The residual pattern of EM was immediately decreased on after single administration. Concentrations of EM were not measurable at 168 hours (7 days) after intramuscular administration in all samples. The results of this study could be used for determining withdrawal time and efficacy dose of EM for the treatment of bacterial diseases in culturing olive flounder.

Key words : Erythromycin thiocyanate, Olive flounder, LC/MS/MS, Intramuscular injection

I. 서론

Erythromycin thiocyanate(EM)은 2013년부터 처
방대상 동물용의약품으로 지정되어 관리되고 있
다(Seo et al., 2014). EM은 단일제제 및 복합제제
로 품목허가 나 있으며 단일 성분은 erythromycin
및 erythromycin thiocyanate로 제조·판매되며, 복합
제제도 erythromycin 및 erythromycin thiocyanate로
구성되어져 있다. Erythromycin의 효능 및 효과는
연어과 어류(Esposito et al., 2007) 및 방어(Katae

et al., 1980)의 세균성 질병을 치료하기 위해 국
내에서 1일 용량으로 어체 중 1 kg당 역가 25~
100 mg이 되게 사료에 혼합하여 5일 혹은 21일
동안 경구 투여하며 총 45개 제품이 품목허가 나
있다(NIFS, 2016). EM은 가축에서도 자주 사용되
고, 국내 식품 잔류허용기준은 육상동물인 소, 돼
지 등에서는 0.05 mg/kg 이고, 수생동물인 어류
및 갑각류에서 0.2 mg/kg으로 설정되어져 있다
(KFDA, 2017).

양식 현장에서는 집약적 고밀도 사육방법, 사

† Corresponding author : 051-720-3022, jsseosoo@korea.kr

* 이 논문은 2018년 국립수산과학원 수산생물 방역프로그램 개발·운영 지원에 의해 수행되었음.

육 환경 변화 등에 따라 다양한 질병이 발생되고 있다. 이에 질병의 치료제로서 항생제가 가장 많이 사용되고 있으며, 그 중 마크로라이드계 항생제 중 에리스로마이신(erythromycin 및 erythromycin thiocyanate 구조 형태)의 경우 2016년 이후 사용량이 oxytetracycline, amoxicillin에 이어 12,632 kg으로 3위를 차지한다. Erythromycin은 *Streptomyces erythraeus* 균으로부터 최초로 생산되었으며, in vitro 에서 그람양성 구균, 그람양성 간균 또는 그람음성 간균 등에 대하여 활성을 가지며, 대부분 Enterobacteriaceae(*Pseudomonas*, *E. coli*)에 속하는 균종들은 내성이 있는 것으로 보고되고 있다 (Ray et al., 2004).

어류의 세균성 질병을 치료제를 개발하기 위해서는 약물의 다양한 투여방법에 따른 약물의 최고혈중농도(C_{max}), 최고혈중농도 도달시간(T_{max}), 소실반감기(CL or $T_{1/2}$) 등을 계산한 생체 내 약물동태학적 기초자료가 필수적이다. 이러한 기초 자료를 바탕으로 유효하고 안전성이 높은 의약품 개발을 수행할 수 있으며, 현재까지 Erythromycin의 어류에 대한 약물 연구는 주로 연어과 어류(Esposito et al., 2007; Moffitt et al., 1991; Salvo et al., 2013)의 경구투여에 따른 휴약기간 및 효능효과, 방어(Katae, 1980)의 경구투여에 따른 휴약기간, 감성돔(Salvo et al., 2014)의 경구투여에 따른 휴약기간 및 약물동태학적(pharmacokinetics) 특성, 넙치(Lee et al., 2008; Park et al., 2008; Seo et al., 2014)의 경구 투여에 따른 휴약기간 및 약물동태학 특성에 대해 연구가 이루어져 있다.

Erythromycin은 가축의 다양한 세균성 질병을 치료하고자 근육주사를 통하여 질병치료의 효능·효과를 높이고 있다. 약물의 근육투여 방법은 국내 주요 양식 어류인 넙치의 세균성질병 치료 및 예방을 위해 약물 흡수율을 높이고 소실을 최소화하여 약제의 효능·효과를 높일 수 있다는 장점이 있으나, 어류 개별 치료로 인력 및 시간이 많이 드는 단점이 있다.

최근 양식 넙치에서는 다양한 세균성 질병을 치료하고자 약물의 경구투여 방법보다는 근육투여 방법으로 질병 치료효능을 높이고 있다(NIFS, 2016). 이에 에리스로마이신이 넙치에 대한 세균성 질병 치료제로서 근육투여 방법의 가능성을 알아보기 위해 에리스로마이신 투여에 따른 약물동태학적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 시험어류

이 연구에서 사용된 표준품 Erythromycin thiocyanate는 Clearsynth 사(USA)를 사용하였고, 실험어에 투여된 약품은 erythromycin thiocyanate (순도 76%; 대성미생물)를 사용하였다.

LC/MS/MS 분석을 위한 용매류인 acetonitrile, methanol 및 증류수 등은 Merck 사(Germany)를 사용하였으며, 기타 이 실험에 사용된 모든 시약은 특급 이상을 사용하였다.

본 실험에 사용한 넙치는 항생제 투여 경력이 없는 건강한 넙치(평균체중 332 ± 20 g, 150 마리)를 사용하였고 사육수온은 아쿠아트론을 이용하여 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였다.

2. 약물 투여 및 시료 채취

건강한 넙치(평균체중 332 ± 20 g)를 실험수조에 옮겨 2주 동안 순치시킨 후, 실험구 당 36마리씩 수용하여 20°C 로 설정한 사육수온에서 증류수에 희석하여 어체 중 kg 당 5, 10 mg이 되도록 근육상부에 $100 \mu\text{l}$ 로 1회 주사하였다. 투여 후 1, 3, 6, 9, 24, 72, 120, 168, 264, 360, 504, 720시간까지 5마리씩 미부정맥으로부터 1.0~3.0 ml씩 채혈하여 혈장 분리 후 -80°C 에 보관하였다가 분석에 사용하였다.

3. LC/MS/MS 분석 및 전처리 방법

분석기기는 LC/MS/MS(Agilent, 6430)를 이용하였으며 분석조건은 <Table 1>에 나타내었다. 간단히 설명하면, 초기 이동상은 A 이동상 및 B 이동상 용매를 80:20의 비율로 주입하다가 10분 후 50:50으로 점진적으로 증가시킨 후 다시 초기 이동상으로 하여 20분간 주입하였다. 샘플은 Seo et al.(2014)의 방법에 따라 혈장 200 μl 에 동량의 acetonitril을 가하여 혼합한 후 10분 동안 방치 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min)하여 상등액을 여과 필터(0.45 μm) 후 LC/MS/MS분석하였다.

그리고 EM의 경시적 혈중농도는 WinNonlin program(Pharsight Co., Inc., USA)이용하여 약물동태학적 매개변수를 조사하였다.

<Table 1> LC/MS/MS used for analysis of erythromycin thiocyanate

MS/MS condition	
Ionization	ESI, positive
MRM transition(m/z)	734→577
	734→158
Cone voltage(V)	114V
Collision energy(eV)	22, 33V
Nebulization and collision gas	N ₂ Ar
Spray voltage	4500V
Capillary temp	350°C
HPLC condition	
Column	Shiseido UG 120V (2 mm ID×150 mm)
Mobile phase	A:0.2% acetic acid/water B:0.2% acetic acid/acetonitrile
Flow rate	0.2 ml/min
Oven temperature	40°C
Injection volume	10 μl

4. 표준곡선 작성 및 회수율 측정

EM의 표준곡선 및 회수율 측정은 이전의 논문(Seo et al., 2014)에 따라 진행하였으며 표준용액

은 다양한 농도(5~200 ng/ml)로 희석하였으며, 회수율은 EM의 표준용액을 10, 50, 100 ng/ml의 농도로 넵치 혈청에 첨가한 후, EM을 추출하여 LC/MS/MS로 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 표준검량선 및 회수율

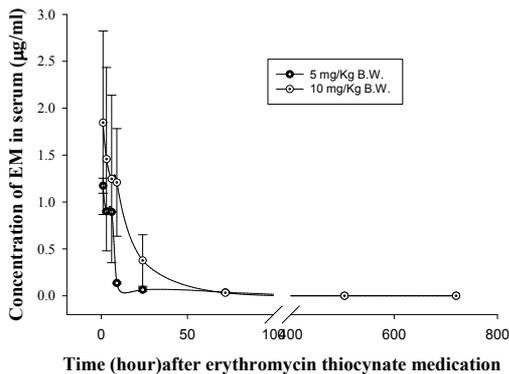
EM 표준 검량선은 표준용액을 acetonitrile로 5, 10, 20, 100, 200 ppb로 희석하여 LC/MS/MS로 분석한 결과 농도에 따라 직선성(r^2 값)은 0.9997을 나타내었다(data not shown). 이 결과는 이전의 Seo et al.(2014)와 동일하게 나타났으며, 또한 검출한계, 정량한계 및 회수율도 유사하게 나타났다. 본 실험방법은 여러 어종의 근육 및 혈청을 대상으로 한 결과(Park et al., 2008; Salvo et al., 2014)와 유사하며, 실험 방법의 유의성을 조사하였을시에 분석 방법이 안정적임을 알 수 있었다.

2. 근육투여에 따른 약동학적 변화

EM은 국내에서 연어과어류의 세균성신장병, 연쇄구균병 및 방어의 연쇄구균병 치료(Treves-Brown, 2000)에 사용되도록 품목 허가가 승인되어져 있으나, 실제 양식 넵치 및 조피볼락의 세균성 질병 치료에 많이 쓰이고 있다(NIFS, 2016). EM은 현재 경구 투여로만 승인되어져 있으나 국내에서는 수산질병관리사 등의 처방 하에서 투여 방법을 변경을 할 수 있다. 따라서 EM을 근육투여 방법으로 투약 시 어체 내 약물대사 작용을 분석하기 위해 혈청으로 경시적 농도변화를 관찰하였다([Fig. 1]).

EM을 넵치 근육에 투여 시 최대 혈중 농도는 투여 후 빠르게 감소하였다. EM의 무지개송어, 방어, 감성돔에 대한 경구투여 시 혈중 최고 농도가 다양한 시간대인 3~9시간으로 나타나며 24시간 이후에 급격한 감소를 나타낸다고 알려져 있다(Katae et al., 1980; Salvo et al., 2013, 2014).

본 연구에서 EM을 넙치 근육투여 시에는 이전 논문들보다 빠르게 소실됨을 알 수 있으며, 이는 투여방법의 차이로 보아지며 이전 논문에서 EM을 넙치에 경구투여(50 mg/kg b.w로 5일 동안 연속투여) 시 혈중에서 0.2 ppm이상의 혈중 농도가 11일 유지된다고 보고되었다(Seo et al., 2014). 이는 넙치의 EM 경구 투여는 넙치의 혈중 배출속도가 어종의 낮은 활동성으로 인해 체내물질대사속도가 느린 것으로 추정하나, 근육 투여는 빠르게 소실됨을 알 수 있었다(Seo et al., 2014). 국내에서 양식 어류의 세균성 질병 치료·예방을 위하여 에리스로마이신의 경구투여는 에리스로마이신(Erythromycin thiocyanate), 설파디아진(Sulfadiazine sodium) 및 트리메토프림(Trimethoprim)의 복합제가 주로 판매되며, 이는 복합제가 단일제보다 경구투여에 따른 치료효능이 좋아 제품수가 많은 것으로 추정된다(NIFS 2016).



[Fig. 1] Concentration (µg/ml) of EM in serum of olive flounder after intramuscular injection of 5 and 10 mg/kg b.w., respectively.

국내 양식 넙치의 주요 세균성질병인 연쇄구균병 치료제로서의 EM 근육투여는 혈중 내 0.5 µg/ml 이상으로 유지하여야만 효능효과를 나타낸다고 알려져 있다(Lee et al., 2008; Seo et al., 2014). 약동력학 분석을 통하여 EM은 Non-compartment analysis로 빠르게 소실되는 경향을 나타내었다. 최고혈중농도(C_{max}) 및 최고혈중농도 도달시간

(T_{max})은 투여 후 바로 소실되어 매우 낮은 시간대로 나타났으며, 이는 이전의 경구투여 결과와는 확연히 다르다(<Table 2>). 이전 논문(Seo et al., 2014)에서 넙치를 대상으로 EM을 1회 경구투여(50 mg/kg b.w)한 결과에 따르면 약물동태학적 특성은 two-compartment model로 나타나며, 최고혈중농도(C_{max})는 34 µg/ml, 혈장농도-시간곡선하면적(AUC)이 165.3 hr·µg/ml로 나타나 EM 근육투여는 경구투여보다 빠르게 소실되는 경향이 있다. 일부 연구에서 EM의 근육투여의 흡수율을 올리기 위하여 erythromycin base 형태로 만들어 투여 방법을 연구하거나 혹은 복강투여 방법을 연구하기도 하였다(Brown et al., 1990; Creeper and Buller, 2006; Treves-Brown, 2000). 그러나, 어류에 대한 EM 근육 투여 방법에 대한 연구는 거의 수행되지 않았으며, 일부 연구도 약물동태학적 특성은 조사되지 않았으며, 투여방법에 따른 치료 효능 연구에 중점을 두고 있다(Brown et al., 1990; Moffitt 1992).

<Table 2> Pharmacokinetic parameters following a intramuscular injection of EM in olive flounder (n=5)

Parameter	(unit)	Intramuscular injection	
		5 mg/kg	10 mg/kg
AUC	hour*µg/ml	8.931829	18.879556
K01_HL	hour	0.409165	0.643776
K10_HL	hour	3.946575	10.636979
CL_F	{µg/ml}/(hour*µg/ml)	0.559796	0.529673
Tmax	hour	1.492835	2.772786
Cmax	µg/ml	1.206955	1.026900

Abbreviations: AUC, Area under a concentration of analyte vs. time curve; K01_HL and K10_HL, half-life of distribution rate constants of central and peripheral compartments; CL_F, an estimate of the total body clearance; Tmax, The time of peak concentration; Cmax, The peak or maximum concentration.

EM은 어병치료제로 경구투여 방법이 주로 사

용되어 왔으나, 이 항생제는 어류의 위산에 의하여 파괴가 잘되고, 반감기(1~1.5)가 매우 짧은 약물이므로 향후 주사와 같은 다른 투여방법에 의한 유효성 및 안전성 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Brown LL, Albright LJ and Evelyb TPT(1990). Control of vertical transmission of *Renibacterium salmoninarum* by injection of antibiotics into maturing female coho salmon, *Diseases of Aquatic Organisms* 9, 127~131.
<https://doi.org/10.3354/dao009127>
- Creep JH and Buller NB(2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal* 84(11), 408~411.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.00058.x>
- Esposito A, Fabrizi L, Lucchetti D, Marvasi L, Coni E and Guandalini E(2007). Orally Administered Erythromycin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Residues in Edible Tissues and Withdrawal Time, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(3), 1043~1047.
- Katae H, Kouno K, Shimizu M, Kusuda R Taniguchi M, Shiomitsu K and Hasegawa H(1980). Studies on Chemotherapy of Fish Disease with Erythromycin-I, *Fish Pathology* 15(1), 7~16.
- KFDA(Korea Food & Drug Administration)(2017). MRLs for veterinary drugs in foods. pp. 1~729.
- Lee TS, Park MJ, Choi HS, Shin KB, Park MS and Shin IS(2008). Erythromycin Withdrawal Time in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) after Oral Administration, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42(3), 204~208.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.3.204>
- Moffitt CM(1991). Oral and injectable applications of erythromycin in salmonid fish culture, *Vet Hum Toxicol* 33, 49-53.
- NIFS(National Institute of Fisheries Science)(2016). Explanation of the manual about products of fish drug, pp. 27~40, Aquatic Disease control Division.
- Park MJ, Park MS, Lee TS and Shin IS(2008). A New Analytical Method for Erythromycin in Fish by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry, *Food Science and Biotechnology* 17(3), 508 ~ 513.
- Ray WA, Murray KT, Meredith S, Narasimhulu SS, Hall K and Stein CM(2004). Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. *The New England Journal of Medicine* 351(11), 1089~1096.
<https://doi.org/10.1097/01.aog.0000148215.04456.64>
- Salvo AD, Rocca GD, Pellegrino RM and Cagnard P(2013). Pharmacokinetics and residue depletion of erythromycin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases* 36, 1021~1029.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12074>
- Salvo AD, Pellegrino RM and Cagnard P(2014). Pharmacokinetics and residue depletion of erythromycin in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. after oral administration, *Journal of Fish Diseases* 37, 797-803.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12170>
- Seo JS, Jeon EJ, Jung SH, Park MA and Kim NY(2014). The Pharmacokinetics of erythromycin in cultured *Paralichthys olivaceus* after oral administration. *JFMSE* 26(2), 302~307.
- Treves-Brown KM(2000). Macrolides. In *Applied Fish Pharmacology*, pp. 87~94. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

-
- Received : 28 August, 2018
 - Revised : 18 October, 2018
 - Accepted : 25 October, 2018