



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 대한
타일로신과 린코마이신의
잔류 분석 및 휴약 기간 설정 연구

오지학

제주대학교 대학원
해양생물공학과

2024년 2월



넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 대한
타일로신과 린코마이신의
잔류 분석 및 휴약 기간 설정 연구

이 논문을 해양생물공학 석사 학위논문으로 제출함

오 지 학

제주대학교 대학원

해양생물공학과

지도교수 정 준 범

오지학의 해양생물공학 석사 학위논문을 인준함

2023 년 11 월

심사위원장

허 문 수

위 원

정 준 범

위 원

전 려 진



목 차

Abstract	iv
그림 목차.....	vi
표 목차.....	x
약어 목차.....	xi
국문 초록	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 넓치에 대한 tylosin 잔류 특성 연구.....	8
1-1. 연구실 내에서의 tylosin 잔류 특성 연구.....	8
1-1-1. 실험어.....	8
1-1-2. 항생제 투여.....	9
1-1-3. 시료채취.....	9
1-2. 양식현장에서의 tylosin 잔류 특성 연구.....	13
1-2-1. 실험어.....	13
1-2-2. 항생제 투여.....	13
1-2-3. 시료채취.....	14
1-3. 근육 및 혈청에서의 tylosin 분석.....	16
1-3-1. 사용기기 및 시약.....	16

1-3-2. Tylosin 추출	16
1-3-3. UPLC 분석조건	17
1-3-4. Mass spectrometer 분석조건	17
1-3-5. 표준곡선 작성 및 회수율	18
2. 넓치에 대한 lincomycin 잔류 특성 연구	22
2-1. 연구실 내에서의 lincomycin 잔류 특성 연구	22
2-1-1. 실험어	22
2-1-2. 항생제 투여	22
2-1-3. 시료채취	23
2-2. 양식현장에서의 lincomycin 잔류 특성 연구	24
2-2-1. 실험어	24
2-2-2. 항생제 투여	24
2-2-3. 시료채취	25
2-3. 근육 및 혈청에서의 lincomycin 분석	25
2-3-1. 사용기기 및 시약	25
2-3-2. Tylosin 추출	26
2-3-3. UPLC 분석조건	26
2-3-4. Mass spectrometer 분석조건	27
2-3-5. 표준곡선 작성 및 회수율	27

Ⅲ. 결과	32
1. 넙치에 대한 tylosin 잔류 분석.....	32
1-1. 표준곡선 및 회수율.....	32
1-2. 연구실 내에서의 tylosin 잔류 분석 결과.....	36
1-3. 양식현장에서의 tylosin 잔류 분석 결과.....	38
1-4. 근육 내 tylosin 잔류량 분석에 의한 휴약기간 탐색.....	40
2. 넙치에 대한 lincomycin 잔류 분석.....	44
2-1. 표준곡선 및 회수율.....	44
2-2. 연구실 내에서의 lincomycin 잔류 분석 결과.....	48
2-3. 양식현장에서의 lincomycin 잔류 분석 결과.....	50
2-4. 근육 내 lincomycin 잔류 분석에 의한 휴약기간 탐색.....	52
Ⅳ. 고찰	56
참고문헌	61
V. 감사의 글	64

Abstract

Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) is the leading commercially farmed fish species that accounts for more than 50% of domestic aquaculture production. As the aquaculture industry developed and production increased, mortality and antibiotics use also increased. *Streptococcus* sp., which causes serious damage to olive flounder every year, is a bacterial disease that causes death by symptoms such as dark discoloration of the body, exophthalmia, hemorrhagic septicaemia, ascites and fin haemorrhage. In aquaculture fields, antibiotics are used to prevent and treat *Streptococcus* sp., but it is difficult to effectively treat the disease due to the increased frequency of antibiotic use, drug residue due to misuse of antibiotics, and increase in resistant bacteria. To solve these problems, the need to develop new antibiotics emerged, and tylosin and lincomycin were newly approved as veterinary medicines in 2021. However, the maximum residue limit (MRL) of tylosin has not been set for fish, and the withdrawal period for olive flounder has not been set. MRL of lincomycin specifies individual standards for various tissues for livestock products, but for fish is set at 0.1 mg/kg without distinction of species or tissue. Through residual analysis of tylosin and lincomycin for olive flounder, this study was conducted with the goal of securing basic data to set an appropriate level of MRL and searching for withdrawal period. In the laboratory, tylosin and lincomycin were orally administered at the 10 mg/kg B.W. for 5 consecutive days, and muscle and serum were collected at 3, 7, 14, and 20 days after the last administration. In the aquaculture sites, tylosin and lincomycin were orally administered at the 10 mg/kg B.W. and 20 mg/kg B.W. for 5 consecutive days, and muscle were collected at 3, 7, 14, and 20 days after the last administration. The residual

analysis of the collected samples was analyzed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and withdrawal period was calculated using the Withdrawal-time calculation program (Heckmen, WT1.4). Tylosin has no MRL set for fish in Korea, but the European MRL is set at 0.1 mg/kg, and the MRL set for livestock product at 0.1 mg/kg in the Korean Food Standards. This study also calculated by applying an MRL of 0.1 mg/kg for tylosin. Lincomycin was calculated by applying 0.1 mg/kg, which is the MRL for fish in the Korean Food Standards Codex. In a study on tylosin in the laboratory, the withdrawal period was calculated to be 13 days for the 10 mg/kg B.W., and in the aquaculture sites, the withdrawal period was calculated to be 5 days for the 10 mg/kg B.W. administered group and 6 days for the 20 mg/kg B.W. administered group. In a study on lincomycin in the laboratory, the withdrawal period was calculated to be 21 days for the 10 mg/kg B.W., and in an aquaculture sites, the withdrawal period was calculated to be 11 days for the 10 mg/kg B.W. administered group and 12 days for the 20 mg/kg B.W. administered group. The residual results of tylosin and lincomycin are expected to be used as basic data to present standards for usage, dosage, and safety for olive flounder.

그림 목차

Figure 1. Olive Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) acclimating to laboratory conditions in fish water tank maintained at $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$	10
Figure 2. After collecting blood using a 1 mL syringe, separate serum from the supernatant by centrifugation.....	11
Figure 3. Muscle isolation of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) for tylosin analysis in the laboratory.	12
Figure 4. Muscle isolation of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) for tylosin analysis in the aquaculture sites.....	15
Figure 5. Extraction procedure of tylosin from the olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).....	19
Figure 6. Extraction procedure of lincomycin from the olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).....	29
Figure 7. Chromatogram of 0.01 mg/kg tylosin standard analyzed by LC-MS/MS.....	33

Figure 8. Matrix matched calibration standard curve of tylosin extracted from (A) muscle and (B) serum.....34

Figure 9. (A) Muscle and (B) serum concentration-time profile of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of tylosin 10 mg/kg B.W. in the laboratory. 37

Figure 10. Concentration-time profile of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of tylosin (A) 10 mg/kg B.W. and (B) 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites.39

Figure 11. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the laboratory using the WT 1.4 software.....41

Figure 12. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in aquaculture sites using the WT 1.4 software.....42

Figure 13. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.43

Figure 14. Chromatogram of 0.01 mg/kg lincomycin standard analyzed by LC-MS/MS.	45
Figure 15. Matrix matched calibration standard curve of lincomycin extracted from (A) muscle and (B) serum.	46
Figure 16. (A) Muscle and (B) serum concentration-time profile of lincomycin from olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) after oral administration of lincomycin 10 mg/kg B.W. in the laboratory.	49
Figure 17. Concentration-time profile of lincomycin from olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) after oral administration of lincomycin (A) 10 mg/kg B.W. and (B) 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites.....	51
Figure 18. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the laboratory using the WT 1.4 software.....	53
Figure 19. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.	54

Figure 20. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.55

표 목차

Table 1. UPLC instrument and analysis condition for tylosin.....	20
Table 2. Mass spectrometer instrument and analysis condition for tylosin.....	21
Table 3. UPLC instrument and analysis condition for lincomycin.....	30
Table 4. Mass spectrometer instrument and analysis condition for lincomycin.....	31
Table 5. Validation parameters for the analysis of tylosin in muscle and serum of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).....	35
Table 6. Validation parameters for the analysis of lincomycin in muscle and serum of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).....	47

약어 목차

MRL	Maximum Residue Limit
WOAH	World Organization for Animal Health
VCIA	Veterinary Critically Important Antimicrobials
MRM	Multiple Reaction Monitoring
RSD	Relative Standard Deviation
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitrile
LC-MS/MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
PLS	Positive List System
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance

국문 초록

넙치는 국내 양식 수산물 생산량의 50% 이상을 차지하고 있는 중요한 어종이다. 넙치 양식산업이 발전하고 생산량이 증가함에 따라 폐사량과 항생제 사용량도 증가하였다. 넙치에 매년 심각한 피해를 입히는 연쇄구균증(*Streptococcus* sp.)은 넙치의 채색흑화, 안구돌출, 출혈성 패혈증, 복수, 지느러미출혈 등의 증상을 야기하여 폐사를 일으키는 세균성 질병이다. 양식현장에서는 연쇄구균증을 예방하고 치료하기 위해 항생제를 사용하지만 항생제 사용 빈도 증가, 항생제 오용으로 인한 약물의 잔류, 내성균의 증가 등으로 효과적인 질병치료에 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 새로운 항생제 개발의 필요성이 대두되었고 2021 년에 수산용 동물용의약품으로 tylosin 과 lincomycin 이 신규 허가되었다. 하지만 어류에 대해서 tylosin 의 잔류허용기준 (MRL, Maximum Residue Limit)이 설정되어 있지 않고 넙치에 대한 휴약기간 또한 설정되어 있지 않은 상황이다. Lincomycin 의 MRL 은 축산물에 대해서는 다양한 조직의 개별 기준을 명시하고 있지만 어류에 대해서는 어종, 조직의 구분이 없이 0.1 mg/kg 으로 설정되어 있다. 넙치에 대한 tylosin 과 lincomycin 의 잔류 분석을 통해 적정 수준의 MRL 을 설정할 수 있는 기초자료

확보와 적정 휴약기간을 탐색을 목표로 본 연구를 수행하였다. 실험실 내에서의 잔류 특성 연구에서는 5 일 연속으로 tylosin 과 lincomycin 을 경구투여 하였고 마지막 투여 후 3 일, 7 일, 14 일, 20 일에 근육 및 혈청을 채취하여 분석하였다. 양식현장에서의 잔류 특성 연구에서는 5 일 연속으로 tylosin 과 lincomycin 을 임상용량(10 mg/kg B.W.)과 임상 2 배용량(20 mg/kg B.W.)으로 경구투여 하였고 마지막 투여 후 3 일, 7 일, 14 일, 20 일에 근육을 채취하여 분석에 사용하였다. 채취된 시료의 잔류 분석은 LC-MS/MS 를 사용하여 분석하였고 휴약기간은 Withdrawal-time calculation program (Hekmen, WT1.4)을 사용하여 계산하였다. Tylosin 은 현재 국내에서 어류에 대한 MRL 이 설정되어 있지 않으며 유럽 MRL 의 경우 0.1 mg/kg 으로 설정 되어있고 국내 식품공전에서의 MRL 은 축산물에 대해서 0.1 mg/kg 의 기준이 설정 되어있기 때문에 본 연구에서도 0.1 mg/kg 의 MRL 을 적용하여 계산하였다. Lincomycin 의 경우 국내 식품공전에서 어류에 대한 기준인 0.1 mg/kg 을 적용하여 계산하였다. Tylosin 에 대한 연구실 내 잔류 특성 연구에서 휴약기간은 13 일로 계산되었고 양식현장에서의 잔류 특성 연구에서는 임상용량을 투여한 그룹이 5 일, 임상 2 배용량을 투여한 그룹의 경우 6 일로 계산되었다. Lincomycin 의 연구실 내 잔류 특성 연구에서 휴약기간은 21 일로 계산되었고 양식현장에서의 잔류 특성 연구는 임상용량 및 임상 2 배용량

각각 11 일, 12 일로 계산되었다. 본 연구에서 확인한 tylosin 과 lincomycin 의 잔류경향은 어류에 대한 용법, 용량 및 안전성에 관하여 기준을 제시할 수 있는 기초자료로 활용 될 것으로 기대된다.

I. 서론

넙치는 한국 양식산업의 대표적인 어종으로 국가통계포털(KOSIS)에 따르면 2022년 넙치의 생산량은 45,801 M/T로 국내 양식 수산물 생산량의 50.6 %를 차지하고 있다. 우리나라 수산업의 선진화와 고급 수산물에 대한 수요 증가로 국민들은 더욱 안전한 수산물의 소비를 원하고 있다. 국내 양식어업은 꾸준히 발전하여 온 만큼 생산규모 또한 대형화 되면서 어병발생 또한 매년 급증하고 있는 실정이고 연쇄구균병, 에드워드병, 비브리오패혈증 등 다양한 세균성 질병에 기인한 피해가 증가하고 있고 그에 따른 대처방안으로 많은 항생제에 의존한다. 하지만 항생제 사용 빈도 증가, 항생제 오용으로 인한 약물의 잔류, 내성균의 증가 등으로 효과적인 질병치료에 어려움을 겪고 있다(Jung et al., 2004). 이러한 문제들로 인해 현장에서는 새로운 항생제와 그에 따른 효과적인 치료법 개발이 가장 필요할 것이다.

2015년부터 2017년까지 전남과 제주에서의 넙치 폐사 원인을 분석하였는데 연쇄구균병으로 인한 폐사는 2015년 9.8 %, 2016년 7 %, 2017년 2 %로 나타났다(Shim et al., 2019). 연쇄구균병은 채색흑화, 안구돌출, 출혈성패혈증, 복수, 지느러미출혈 등의 증상을 야기하고 (Harvie et al., 2013; Mishra et al., 2018) 이러한 증상을 치료하기 위해 다양한 항생제가 사용되고 있다(Kim et al., 2014). 그 중 tylosin과 lincomycin은 연쇄구균병에 광범위한 활성을 가지고있는 항생제이다.

방선균 *Streptomyces fradiae*에 의해 생성되는 이차대사 산물로서 마크로라이드계 항생제인 tylosin은 수의학에서 널리 사용된다(Prescott et al., 2000). WOAH(World Organization for Animal Health, 국제동물보건기구)에서 조사한 동물용 항생제 중요도 목록에서 가장 중요한 그룹인 VCIA(Veterinary Critically Important Antimicrobials)로 분류되어 있고 연쇄상구균(*Streptococcus*), 포도상구균(*Staphylococcus*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 에리시펠로트릭스(*Erysipelothrix*)를 포함한 그람 양성 박테리아에 대해 광범위한 활성을 가지고 있다. *Campylobacter coli* 및 특정 스피로헤타류(*Spirochaetes*)와 같은 제한된 범위의 Gram 음성균에 대해 상대적으로 낮은 감수성을 가지고 있기 때문에 감수성이 확인되지 않은 세균 치료에 선택하기보단 정확한 원인균을 동정하고 선택하여 사용해야 한다. 이러한 tylosin은 사료 첨가제, 일부 종의 성장 촉진제 및 반려 동물의 대장염 치료제로 사용되기도 한다.

현재 식품의약품안전처 동물용의약품 정보에 따르면 tylosin에 대한 적용 대상 동물은 소, 돼지, 닭으로 축산분야로 한정되어있다. Tylosin에 대한 약동학 및 잔류특성에 대한 연구는 닭(Abu-Basha et al., 2012; Kowalski et al., 2002; Muñoz et al., 2014), 칠면조(Radi, 2016), 오리(Elazab et al., 2020) 등 가금류에 대한 연구는 활발히 이루어졌지만 넓치를 대상으로하는 연구는 드문 상황이다. 하지만 최근 국내 수산분야에서도 tylosin을 사용하기 위하여 어류에 대한 적정농도, 방법 및 안전성에 관한 연구가 진행되었다(Lee et al., 2022). *Streptococcus parauberis*에 감염된 넓치에 대한 tylosin의 치료 효과를 확인하였을 때 근육 주사와 경구투여 모두 10 mg/kg에서 가장 낮은 폐사율과 감염률을 확인하여 가장 적절한 치료농도로 제시하였다(Joo et al., 2020). 하지만 현재 식품공전(식품의약품안전처)에서 설정

한 동물용의약품 잔류허용기준(MRL)은 소, 돼지, 가금류, 양, 염소에 대해서만 설정되어 있고 수산물에 대해서는 명시되어있지 않다. 국제식품규격위원회(CODEX)에서 제시한 tylosin의 MRL(Maximum Residue Limit)에서도 마찬가지로 수산물에 대해서는 명시되어 있지 않다.

Lincomycin은 1962년 *Streptomyces lincolnensis*의 발효액에서 분리된 항생물질로서 연쇄상구균(*Streptococcus*), 포도상구균(*Staphylococcus*) 및 대부분의 혐기성 세균과 Gram 양성균에 효과적이다(Skoufos et al., 2006). 그러나 Gram 음성균은 세포 외막의 낮은 투과성 때문에 lincosamide계열에 자연내성을 나타낸다.

Lincomycin은 리보솜의 50S subunit과 결합하여 단백질 합성의 translocation 단계를 억제한다(Lin et al., 1997). 이는 macrolide계열의 항생물질과 비슷하여 macroride계열의 항생물질과 어느정도 교차내성을 갖고있다. 그러나 약물의 작용기전이 다른 penicillin계, cephalosporin계, tetracycline계열의 항생제와는 교차내성을 보이지 않는다.

린코마이신은 인체에 주로 사용될 뿐 아니라 소, 돼지, 닭 등 축산분야에서 각종 세균성 호흡기 질병의 치료를 위하여 많이 사용되고있다. 수산용 약품으로 방어의 연쇄구균증(*Lactococcus garvieae*)의 치료에 효과가 있고 국립수산과학원에서의 권장 용량으로는 어체중 kg당 20-40 mg/kg으로 6-7일 동안 경구투여하는 것으로 명시되어 있다. 하지만 아직 넙치에 대해서는 용법, 용량이 제시되어 있지 않은 실정이다.

현재 식품공전에서 lincomycin의 MRL은 축산물에 대해서는 다양한 조직의 개별 기준을 명시하고 있지만 어류에 대해서는 어종, 조직의 구분이 없이 0.1 mg/kg으로 설정되

어 있다. 또한 CODEX에서 제시한 lincomycin의 MRL은 소, 돼지, 가금류에 대해서만 설정되어있고 수산물에 대해서는 명시되어 있지 않으므로 현재 설정되어있는 lincomycin의 수산물에 대한 국내 MRL이 적정수준인지 확인 할 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 넙치에서의 tylosin 제제와 lincomycin 제제의 잔류분석을 하고 휴약기간을 탐색하여 안전성을 확보할 수 있는 기준과 자료확보를 하기 위하여 본 연구를 수행하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 넙치에 대한 tylosin 잔류 특성 연구

1-1. 연구실 내에서의 tylosin 잔류 특성 연구

1-1-1. 실험어

Tylosin을 투여한 이력이 없는 100 g 전후의 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*) 105마리를 구입하여 제주대학교 해양과학대학교로 운송시켜 3일간 순치 후 사용하였다. 80 L 플라스틱 수조에 해수 60 L를 유지하며 공기를 주입해 주었으며 수온은 $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다(Figure. 1). 실험군은 tylosin을 경구 투여하는 실험군과 대조군으로 나누었다. 4개의 수조에 각 20마리씩 넣어 총 80마리에 tylosin을 경구투여하였고, 그 중 60마리를 잔류분석에 사용하였다. 대조군으로서 tylosin을 투여하지 않은 25마리의 넙치를 한 개의 수조에 유지하였다.

1-1-2. 항생제 투여

어체중은 개별측정하고 oral zonde needle (0.9 x 50 mm)을 사용하여 위강에 직접 투여하는 방법으로 tylosin tartrate (수산용 타일로신 100산, 역가 10%)을 투약하였다. Tylosin 경구 투여 농도는 임상용량(10 mg/kg B.W.)으로 현탁 후 5일간(1회/일) 연속 경구 투여 하였다.

1-1-3. 시료채취

경구 투여 종료 후 3일, 7일, 14일, 20일 째 각 그룹의 수조에서 무작위로 15마리씩 채취하였고 시료를 MS-222로 마취한 상태에서 근육 및 혈청을 채취하였다. 근육은 껍질을 제외한 가식부위를 채취하여 균질화 하였고 혈액의 경우 각 어류의 미부정맥을 통하여 1 ml 주사기를 사용하여 채취하였다. 채취한 혈액을 원심분리(4°C, 8,000 rpm, 10 min)하여 상층액에서 혈청을 분리하였고 분석 시 까지 근육과 혈청 시료는 냉동보관(-80°C) 후 분석 실시하였다(Figure. 2 - 3).



Figure 1. Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) acclimating to laboratory conditions in fish water tank maintained at $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figure 2. Blood sample from the caudal vein of the fish collected by 1 mL syringe, separate serum from the supernatant by centrifugation.



Figure 3. Muscle isolation of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) for tylosin analysis in the laboratory.

1-2. 양식현장에서의 tylosin 잔류 특성 연구

1-2-1. 실험어

Tylosin을 사용한 이력이 없는 넙치양식장 2개소를 선정하였고 2개소 모두 약 7,000 마리씩 수용되어 있는 육상식 수조(12 m x 12 m)에 사육중인 200 g 전후의 넙치를 사용하였다. 수온은 2개소 모두 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 각 양식장 별로 3개의 수조를 사용하여 2개수조는 실험군(임상 용량 및 임상 2배 용량)으로 하였고 1개수조는 대조군으로 하였다.

1-2-2. 항생제 투여

Tylosin의 경구투여는 배합사료에 tylosin tartrate (수산용 타일로신 100산, 역가 10%)을 혼합하여 투약하였다. 투약농도는 임상용량인 어체중 kg 당 10 mg과 양식현장의 여건을 고려하여 임상용량의 2배인 어체중 kg 당 20 mg으로 혼합하여 5일간 연속 경구투여 하였다.

1-2-3. 시료채취

경구 투여 종료 후 3일, 7일, 14일, 20일 째에 임상용량을 투여한 수조와 임상 2배 용량을 투여한 수조에서 무작위로 15마리씩 채취하였고 껍질을 제외한 가식부위인 근육을 채취하여 분석에 사용하였다(Figure. 4). 분석 시 까지 시료는 냉동보관(-80°C) 후 분석 실시하였다.

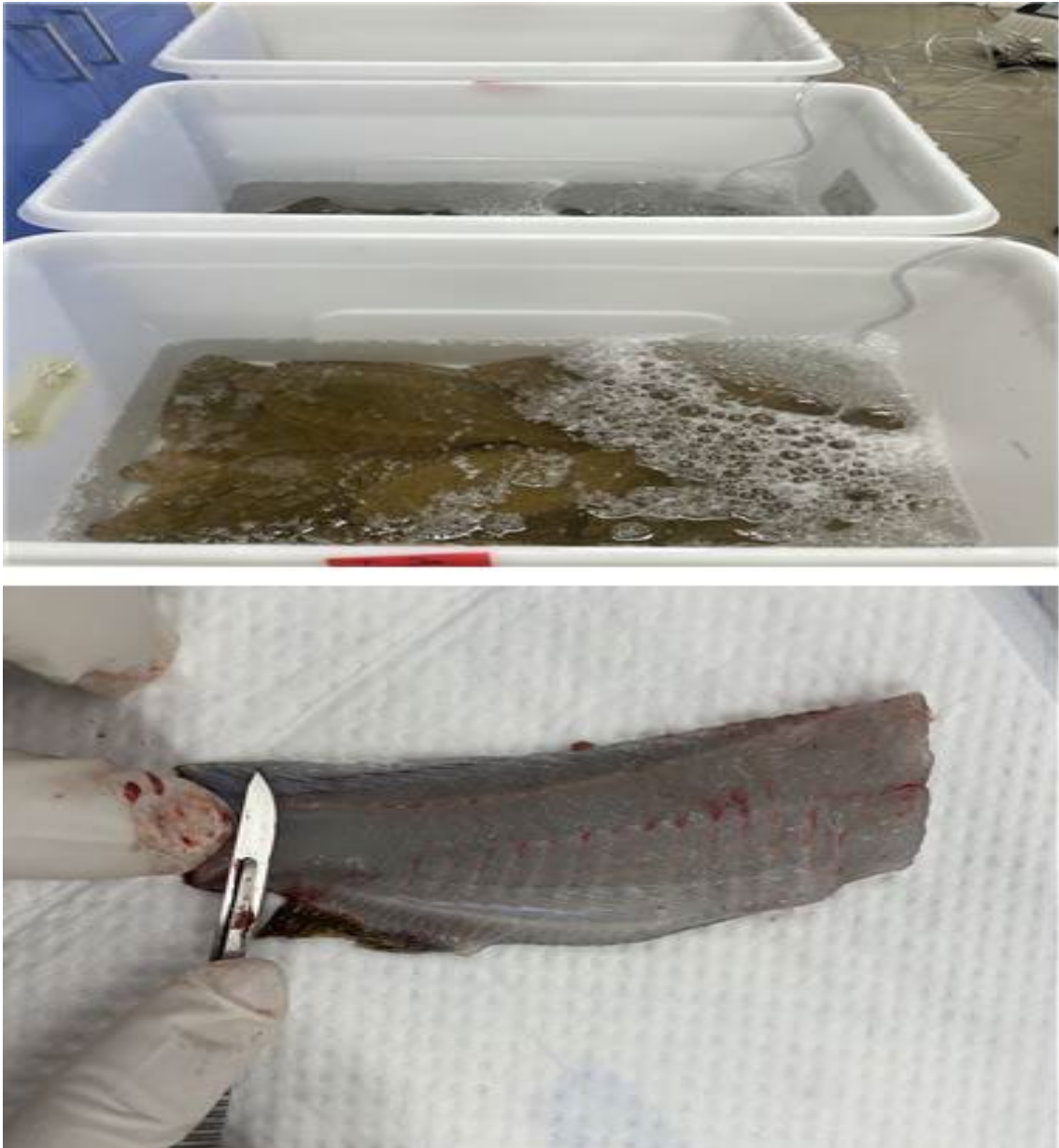


Figure 4. Muscle isolation of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) for tylosin analysis in the aquaculture sites.

1-3. 근육 및 혈청에서의 Tylosin 분석

1-3-1. 사용기기 및 시약

Tylosin의 잔류량 분석은 액체크로마토그래프(OSAKA SODA – NANOSPACE series, Japan)와 질량분석기(Sciex QTRAP 5500, Electrospray Ionization-Triple Quadrupole MS, UK)를 사용하였으며 LC-MS/MS 분석에 사용된 항생제 표준물질은 Tylosin (U.S.Pharmacopeia, USA)제품을 사용하였고 이동상 제조를 위한 아세토니트릴과 증류수는 LC-MS grade (Merck, Germany)로 사용하였다. 시료중의 항생제 추출에 사용한 아세토니트릴, 메탄올, 헥산은 HPLC grade (Fisher, USA)를 사용하였고 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다.

1-3-2. Tylosin 추출

균질화한 시료 2 g을 50 mL 원심분리관에 취하고 메탄올 / 아세토니트릴(25 : 75, v / v) 용액 10 mL을 가하여 다용도진탕기(VM-M1, Anylab)로 진탕 후 10분간 Sonicator에서 초음파 처리 후 4,700 G, 20°C에서 10분간 원심분리한다. 원심분리 후 상층액을 취하여 여분의 원심분리관으로 옮기고 아세토니트릴 포화헥산 10 mL을 가하여 10분간 혼합진탕기(SR-1,

TAITEC)를 이용하여 10분간 진탕한다. 추출액을 4,700 G, 20°C에서 10분간 원심분리하고 하층액을 취하여 40°C 수욕상에서 5 ml가 될 때까지 질소농축기(Evatros-C, Goojung)로 농축한다. 농축액을 1분간 진탕한 후 0.2 μ m 멤브레인 필터(PVDF membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다. 시료의 전처리 과정에 대한 요약은 Figure. 5와 같다.

1-3-3. UPLC 분석조건

UPLC의 기기분석조건은 Table. 1에서 나타낸 바와 같다. Column은 Cadenza CD-C18 HT(2mm x 150 mm, 3 μ m)을 사용하였고 이동상은 0.1 % 개미산을 함유한 수용액, 0.1 % 개미산을 함유한 아세토니트릴 용액을 사용하였다. 이동상의 flow rate는 0.3 ml/min, column 온도는 40°C, injection volume은 2.0 μ l, run time은 10 min으로 하였다.

1-3-4. Mass spectrometer 분석조건

Mass spectrometer의 기기분석조건은 Table. 2에서 나타낸 바와 같다. 질량분석기의 양이온(positive) 모드에서 tylosin의 선구 이온(precursor ion)을 검출하고 최적화된 충돌에너지(collision energy)로 생성 이온(product ion)을 탐색하여 정성 및 정량 이온을 결정하는 multiple reaction monitoring (MRM)으로 분석조건을 확인하였다.

1-3-5. 표준곡선 작성 및 회수율

LC-MS/MS 분석법의 정확성과 재현성 확인을 위하여 표준곡선의 직선성과 회수율을 평가하였고 방법은 다음과 같다. 표준원액은 tylosin 표준물질을 정밀히 달아 1,000 mg/L 농도가 되도록 메탄올에 용해시켜 조제하였고 이 용액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 mg/L 농도가 되도록 메탄올로 단계희석한다. 표준곡선 작성을 위해 음성시료(Blank sample)에 단계별 혼합표준용액을 첨가하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 면적으로 검량선을 작성하였다. 회수율은 tylosin 표준용액을 0.01 mg/kg의 농도로 음성시료에 spiking 한 후, 위의 전처리 방법에 따라 추출 및 정제 한 후 LC-MS/MS로 측정하였다. 측정된 시료의 정량이온 면적을 검량선에 대입하여 함량을 계산하였고 추출액은 5회 반복하여 얻어진 분석값의 상대표준편차(RSD, Relative Standard Deviation)로 재현성 및 정밀성을 계산하였다.

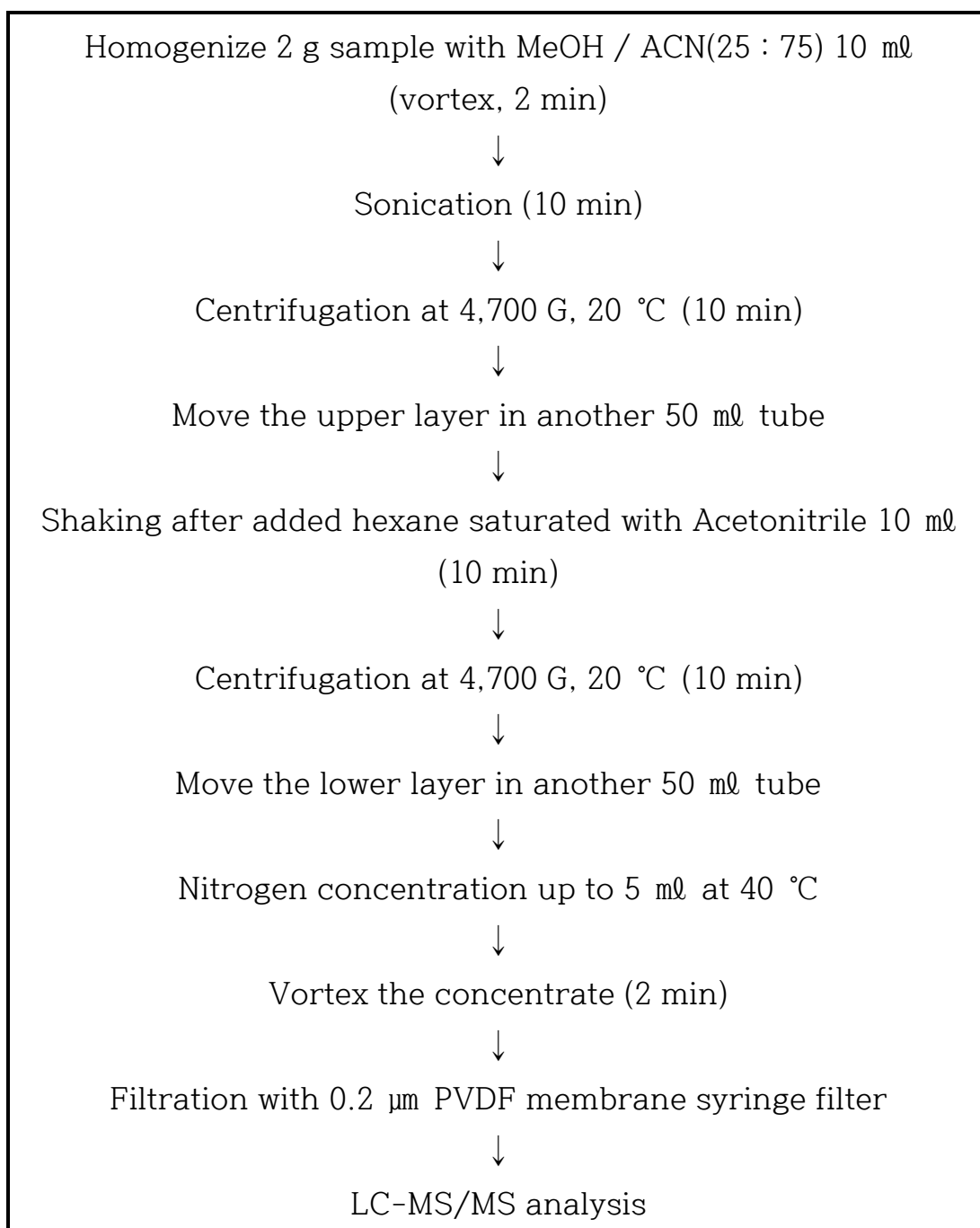


Figure 5. Extraction procedure of tylosin from the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Table 1. UPLC instrument and analysis condition for tylosin

Parameter	Conditions																					
UPLC	OSAKA SODA - NANOSPACE series																					
Column	2.1 mm x 150 mm, 3.0 μ m C ₁₈ (Cadenza CD-C18 HT)																					
Column temperature	40°C																					
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile																					
Gradient	<table border="1"><thead><tr><th>Time (min : sec)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>4.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>7.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>7.1</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>10.0</td><td>95</td><td>5</td></tr></tbody></table>	Time (min : sec)	A (%)	B (%)	0.0	95	5	0.5	95	5	4.0	0	100	7.0	0	100	7.1	95	5	10.0	95	5
	Time (min : sec)	A (%)	B (%)																			
	0.0	95	5																			
	0.5	95	5																			
	4.0	0	100																			
	7.0	0	100																			
	7.1	95	5																			
10.0	95	5																				
Flow rate	0.3 mL/min																					
Injection volume	2 μ l																					
Run time	10 min																					

Table 2. Mass spectrometer instrument and analysis condition for tylosin

Parameter	Conditions			
Mass Spectrometry	Sciex QTRAP 5500 ESI triple quadrupole MS			
Ionization mode	Positive (+) ion electrospray			
Gas temperature	600°C			
Nebulizer gas flow	10.8 ℓ /min			
Nebulizer gas pressure	100 psi			
Collision voltage	45 eV			
Scan type	RT	Multiple Reaction Monitoring (MRM mode)		
	min	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Collision energy (eV)
Tylosin	3.96	916.4	174.1 / 88.1	45 / 109

2. 넙치에 대한 lincomycin 잔류 특성 연구

2-1. 연구실 내에서의 lincomycin 잔류 특성 연구

2-1-1. 실험어

Lincomycin을 투여한 이력이 없는 100 g 전후의 넙치 105마리를 구입하여 3일간 순치 후 사용하였다. 80 L 플라스틱 수조에 해수 60 L를 유지하며 공기를 주입해 주었으며 수온은 $13 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 실험군은 lincomycin을 경구 투여하는 실험군과 대조군으로 나누었다. 4개의 수조에 각 20마리씩 넣어 총 80마리에 lincomycin을 경구 투여하였고, 그 중 60마리를 잔류분석에 사용하였다. 대조군으로서 lincomycin을 투여하지 않은 25마리의 넙치를 한 개의 수조에 유지하였다.

2-1-2. 항생제 투여

어체중은 개별측정하고 oral zonde needle (0.9 x 50 mm)을 사용하여 위강에 직접 투여하는 방법으로 lincomycin hydrochloride hydrate (수산용 링크마이신 100산, 역가 10 %)를 투

약하였다. Lincomycin 경구투여 농도는 임상용량(10 mg/kg B.W.)으로 현탁 후 5일간(1회/일) 연속 경구 투여 하였다

2-1-3. 시료채취

경구 투여 종료 후 3일, 7일, 14일, 20일 째 각 그룹의 수조에서 무작위로 15마리씩 채취하였고 시료를 MS-222로 마취한 상태에서 근육 및 혈청을 채취하였다. 근육은 껍질을 제외한 가식부위를 채취하여 균질화 하였고 혈액의 경우 각 어류의 미부정맥을 통하여 1 mL 주사기를 사용하여 채취하였고, 채취한 혈액을 원심분리(4 °C, 8,000 rpm, 10 min)하여 상층액에서 혈청을 분리하였다. 분석 시 까지 시료는 냉동보관(-80 °C) 후 분석 실시하였다.

2-2. 양식현장에서의 lincomycin 잔류 특성 연구

2-2-1. 실험어

Lincomycin을 사용한 이력이 없는 넙치양식장 2개소를 선정하였고 2개소 모두 약 7,000마리씩 수용되어 있는 육상식 수조(12m x 12m)에 사육중인 200 g 전후의 넙치를 사용하였다. 수온은 2개소 모두 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 각 양식장 별로 3개의 수조를 실험군(임상 용량 및 임상 2배 용량), 대조군으로 사용하였다.

2-2-2. 항생제 투여

배합사료에 lincomycin hydrochloride hydrate (수산용 린코마이신 100산, 역가 10 %)를 혼합하여 임상용량(10 mg/kg B.W.)과 임상 2배 용량(20 mg/kg B.W.)으로 5일간 연속 경구투여 하였다.

2-2-3. 시료채취

경구 투여 종료 후 3일, 7일, 14일, 20일 째에 각 그룹의 수조에서 무작위로 15마리씩 채취하였고 껍질을 제외한 가식부위인 근육을 채취하여 분석에 사용하였다. 분석 시 까지 시료는 냉동보관(-80°C) 후 분석 실시하였다.

2-3. 근육 및 혈청에서의 Lincomycin 분석

2-3-1. 사용기기 및 시약

Lincomycin의 잔류량 분석은 액체크로마토그래프(OSAKA SODA – NANOSPACE series, Japan)와 질량분석기(Sciex QTRAP 5500, Electrospray Ionization-Triple Quadrupole MS, UK)를 사용하였으며 LC-MS/MS 분석에 사용된 항생제 표준물질은 lincomycin (DR.Ehrenstorfer, Germany)제품을 사용하였고 이동상 제조를 위한 아세토니트릴과 증류수는 LC-MS grade (Merck, Germany)로 사용하였다. 시료중의 항생제 추출에 사용한 Formic acid는 ACS grade (Merck, Germany), Methanol은 HPLC grade (Fisher, USA)를 사용하였고 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다. 고체상 추출(SPE)에는 HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)카트리지(Strata-X, Phenomenex, USA)를 사용하였다.

2-3-2. Lincomycin 추출

균질화한 시료 2 g을 50 mL 원심분리관에 취하고 2% 초산 용액 6 mL을 가하여 다음 도진탕기(VM-M1, Anylab)로 5분 간 진탕 후 1,200 G, 4°C에서 10분간 원심분리한다. 미리 메탄올 5 mL, 물 5mL로 활성화 시킨 HLB 카트리지(Strata-X, 6 mL, 200 mg)에 상층액을 흡착시킨다. 물 5 mL로 카트리지를 세척하고 메탄올 5 mL로 용출한다. 용출액을 실온에서 3 mL가 될 때까지 질소농축기(Evatros-C, Goojung)로 농축한다. 농축액에 0.1% 개미산 용액을 넣어 총량을 4 mL로 하고 1분간 진탕한 후 0.2 µm 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다. 시료의 전처리 과정에 대한 요약은 Figure. 6과 같다.

2-3-3. UPLC 분석조건

UPLC의 기기분석조건은 Table. 3에서 나타낸 바와 같다. Column은 Cadenza CD-C18 HT(2mm x 150 mm, 3 µm)을 사용하였고 이동상은 0.1 % 개미산을 함유한 수용액, 0.1 % 개미산을 함유한 아세토니트릴 용액을 사용하였다. 이동상의 flow rate는 0.3 mL/min, column 온도는 40°C, injection volume은 2.0 µL, run time은 10 min으로 하였다.

2-3-4. Mass spectrometer 분석조건

Mass spectrometer의 기기분석조건은 Table. 4에서 나타낸 바와 같다. 질량분석기의 양이온(positive) 모드에서 lincomycin의 선구 이온(precursor ion)을 검출하고 최적화된 충돌에너지(collision energy)로 생성 이온(product ion)을 탐색하여 정성 및 정량 이온을 결정하는 multiple reaction monitoring (MRM)으로 분석조건을 확인하였다.

2-3-5. 표준곡선 작성 및 회수율

LC-MS/MS 분석법의 정확성과 재현성 확인을 위하여 표준곡선의 직선성과 회수율을 평가하였고 방법은 다음과 같다. 표준원액은 lincomycin 표준물질을 정밀히 달아 1,000 mg/L 농도가 되도록 메탄올에 용해시켜 조제하였고 이 용액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 mg/L 농도가 되도록 메탄올로 단계희석한다. 근육의 경우 표준곡선 작성을 위해 음성시료(Blank sample)에 단계별 혼합표준용액을 첨가하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 면적으로 검량선을 작성하였다. 혈청의 경우 표준원액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 mg/L 농도로 장비에 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 면적으로 검량선을 작성하였다. 회수율은 lincomycin 표준용액을 0.01 mg/kg의 농도로 음성시료에 spiking 한 후, 위의 전처리 방법에 따라 추출 및 정제 한 후 LC-MS/MS로 측정하였다. 측정된 시료의 정량이온

면적을 검량선에 대입하여 함량을 계산하였고 추출액은 5회 반복하여 얻어진 분석값의 상대표준편차(RSD, Relative Standard Deviation)로 재현성 및 정밀성을 계산하였다.

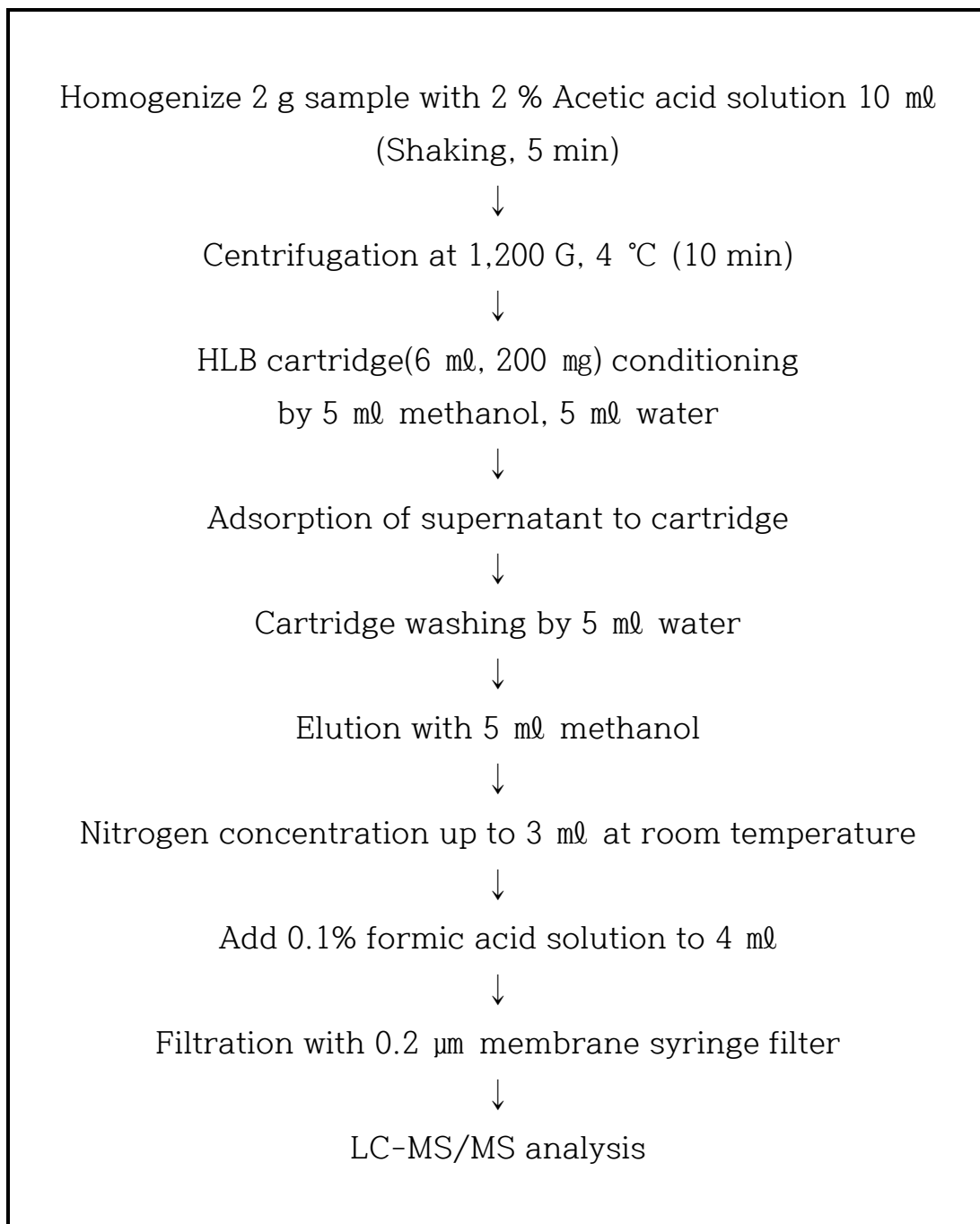


Figure 6. Extraction procedure of lincomycin from the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Table 3. UPLC instrument and analysis condition for lincomycin

Parameter	Conditions																					
UPLC	OSAKA SODA - NANOSPACE series																					
Column	2.1 mm x 150 mm, 3.0 μ m C ₁₈ (Cadenza CD-C18 HT)																					
Column temperature	40°C																					
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile																					
Gradient	<table border="1"><thead><tr><th>Time (min : sec)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>4.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>7.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>7.1</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>10.0</td><td>95</td><td>5</td></tr></tbody></table>	Time (min : sec)	A (%)	B (%)	0.0	95	5	0.5	95	5	4.0	0	100	7.0	0	100	7.1	95	5	10.0	95	5
	Time (min : sec)	A (%)	B (%)																			
	0.0	95	5																			
	0.5	95	5																			
	4.0	0	100																			
	7.0	0	100																			
	7.1	95	5																			
10.0	95	5																				
Flow rate	0.3 mL/min																					
Injection volume	2 μ l																					
Run time	10 min																					

Table 4. Mass spectrometer instrument and analysis condition for lincomycin

Parameter	Conditions			
Mass Spectrometry	Sciex QTRAP 5500 ESI triple quadrupole MS			
Ionization mode	Positive (+) ion electrospray			
Gas temperature	600°C			
Nebulizer gas flow	10.8 ℓ /min			
Nebulizer gas pressure	100 psi			
Collision voltage	45 eV			
Scan type	RT	Multiple Reaction Monitoring (MRM mode)		
	min	Precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Collision energy (eV)
Lincomycin	3.89	407.2	126.0 / 359.0	33 / 29

III. 결과

1. 넙치에 대한 tylosin 잔류 분석

1-1. 표준곡선 및 회수율

Tylosin의 표준용액을 음성시료에 첨가하여 전처리 한 후 LC-MS/MS로 분석하였는데 Retention time 은 3.95 분(Figure. 7)으로 조사되었고 정량이온의 피크 면적 값의 비를 이용해 표준곡선을 작성한 결과, 각 농도에 따라 피크 면적의 넓이가 비례하였으며 그에 따른 상관계수(r^2)는 혈청과 근육 모두 0.99 이상의 직선성을 나타내었다(Figure. 8).

회수율 확인을 위해 tylosin 투여 이력이 없는 근육 및 혈청에 tylosin 표준용액을 0.01 mg/kg 농도로 첨가하여 위 전처리방법으로 추출한 결과 평균 102%, 100% 수준으로 회수되었고 CODEX 가이드라인(CCRVDF CAC/GL 71-2009)에 충족하는 결과를 나타내었다(Table. 5).

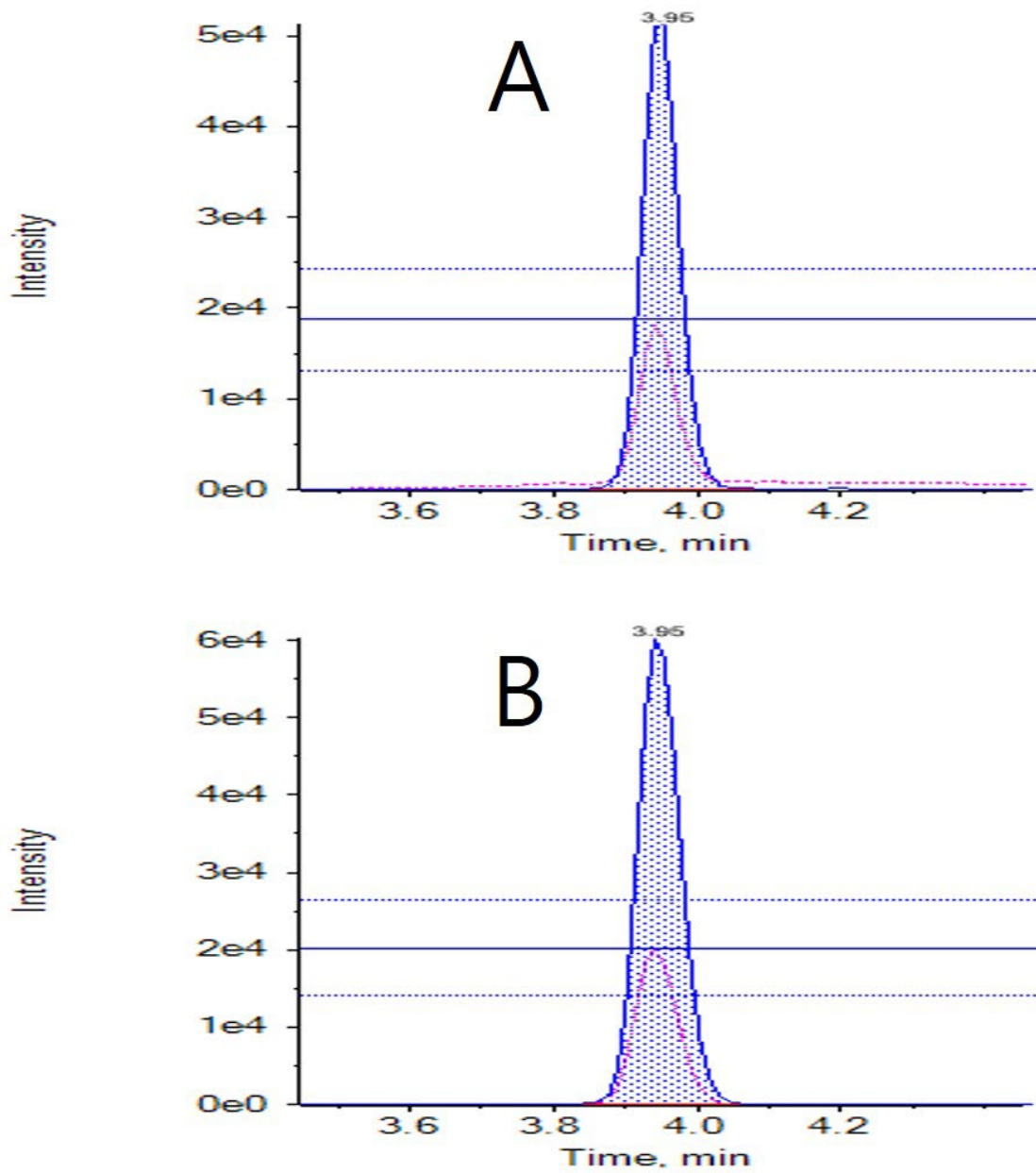


Figure 7. Chromatogram of 0.01 mg/kg tylosin standard analyzed by LC-MS/MS.

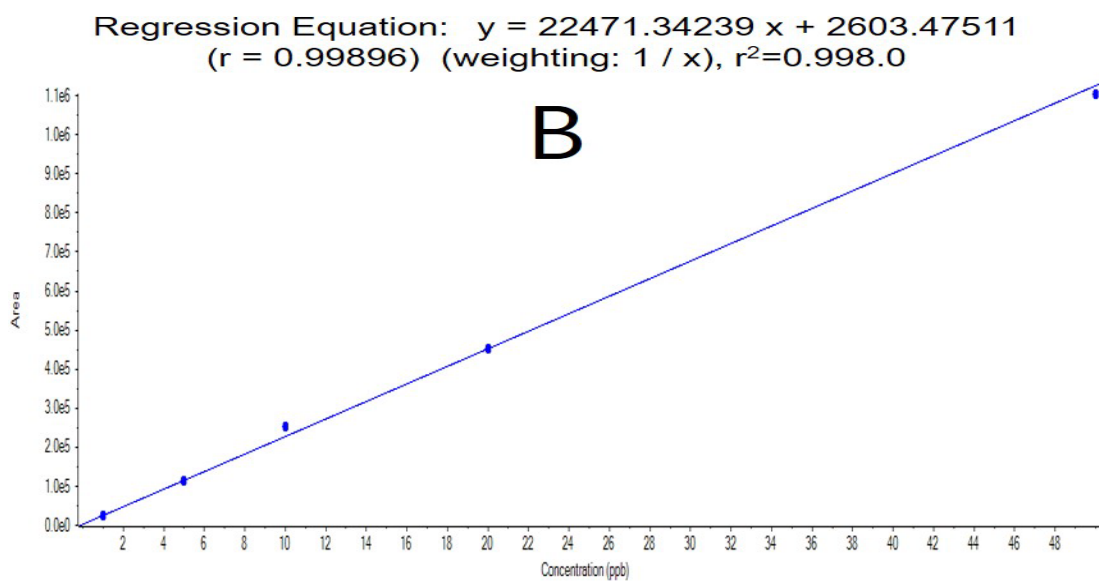
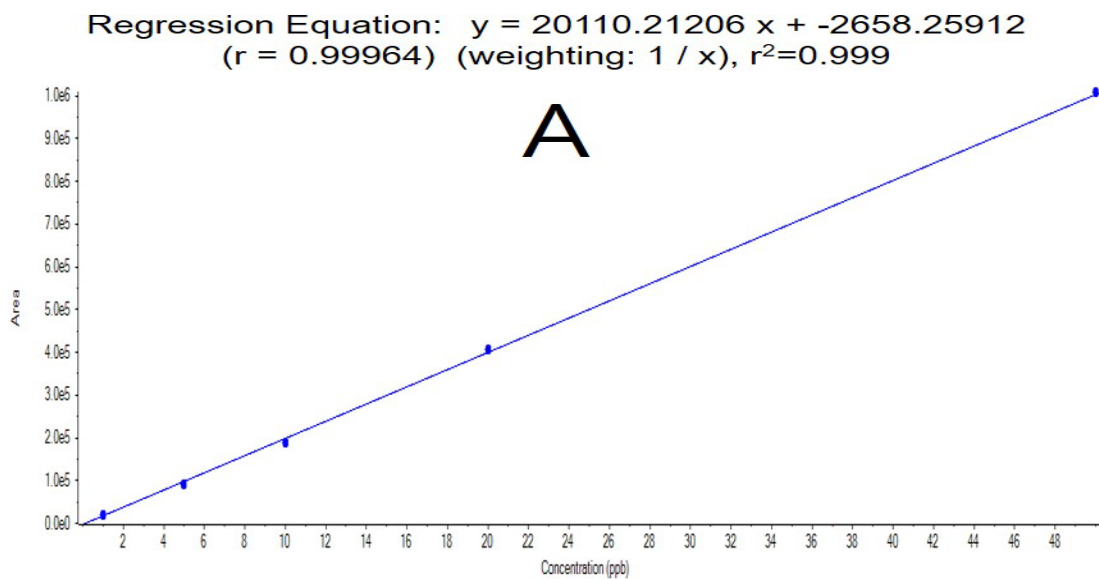


Figure 8. Matrix matched calibration standard curve of tylosin extracted from (A) muscle and (B) serum.

Table 5. Validation parameters for the analysis of tylosin in muscle and serum of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Compound	Sample	Fortified Concentration (mg/kg, ppm)	Recovery(%) (Mean±SD,n=3)	CV(%)	LOQ (mg/kg)
Tylosin	Muscle	0.01	101.9 ± 8.6	8.5	0.001
	Serum	0.01	99.9 ± 0.5	0.5	0.001

1-2. 연구실 내에서의 tylosin 잔류 분석 결과

Tylosin 을 98 ± 14.5 g 의 넙치에 oral zoned needle 을 이용하여 임상용량(10 mg/kg B.W.)으로 5 일간 경구투여 후 근육 및 혈청에서의 잔류 농도변화를 Figure. 9 에 나타내었다. 시간경과에 따른 넙치 근육 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.15 ± 0.07 mg/kg 농도를 보인 후 지속적으로 감소 경향을 보였다. 넙치의 혈청 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.06 ± 0.04 mg/kg 의 농도를 보인 후 점차 감소하였다. 근육과 혈청의 잔류량을 비교해 보았을 때 혈청의 잔류량이 근육보다 다소 낮은 잔류량을 보이는 것을 확인하였다.

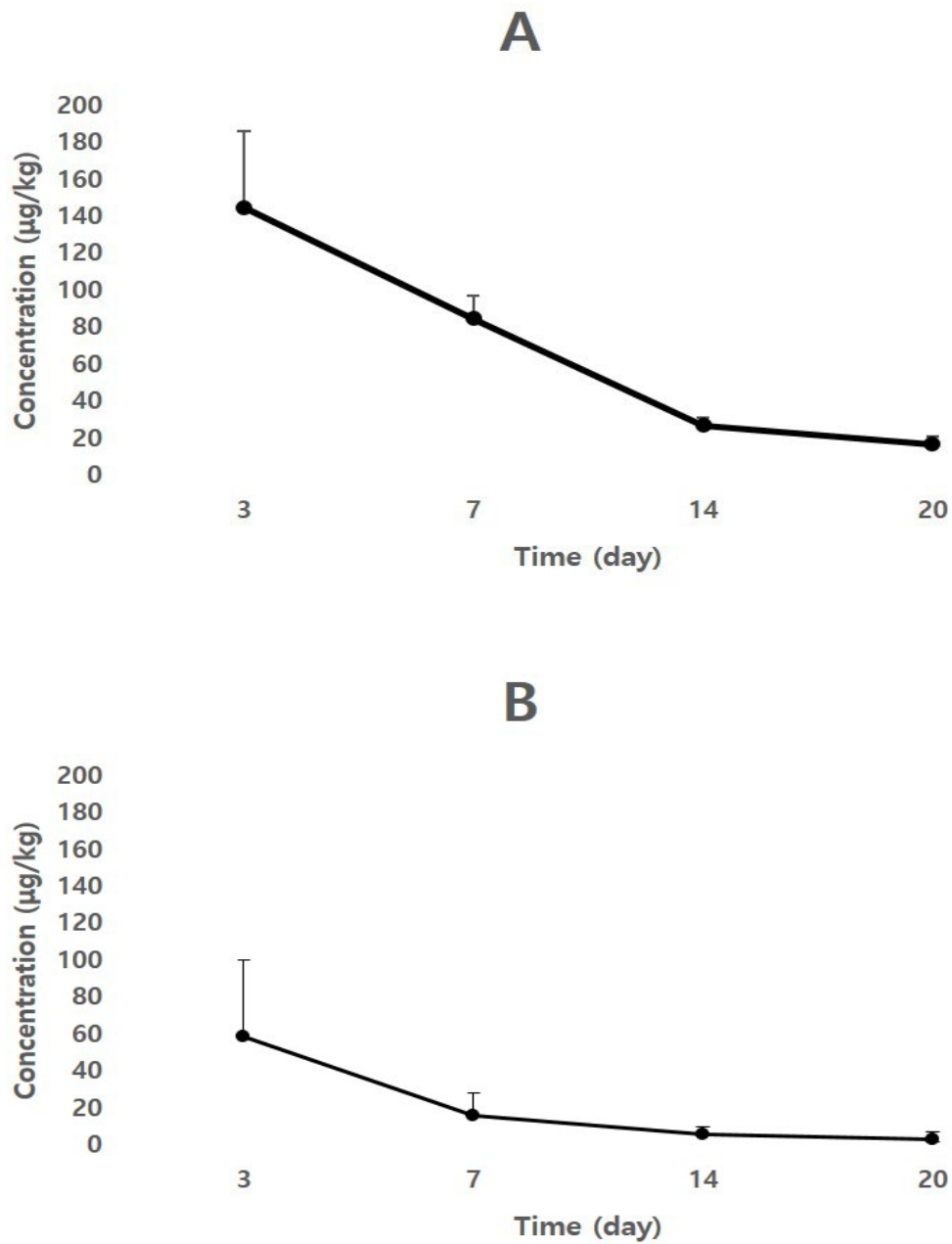


Figure 9. (A) Muscle and (B) serum concentration-time profile of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of tylosin 10 mg/kg B.W. in the laboratory.

1-3. 양식현장에서의 tylosin 잔류 분석 결과

임상용량(10 mg/kg B.W.) 및 임상 2 배농도(20 mg/kg B.W.)로 2 그룹으로 진행하였으며 배합사료에 tylosin 을 혼합하여 5 일간 경구투여 후 근육에서의 잔류 농도변화를 Figure. 10 에 나타내었다. 시간경과에 따른 넙치 근육 내 tylosin 잔류 농도는 임상용량을 투여한 그룹에서 경구투여 3 일 후 0.03 ± 0.01 mg/kg 농도를 보인 후 경구투여 7 일 째에 오히려 증가하였다가 이후 점차 감소하였다. 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 근육 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.05 ± 0.03 mg/kg 의 농도를 보인 후 지속적으로 감소 경향을 보였다.

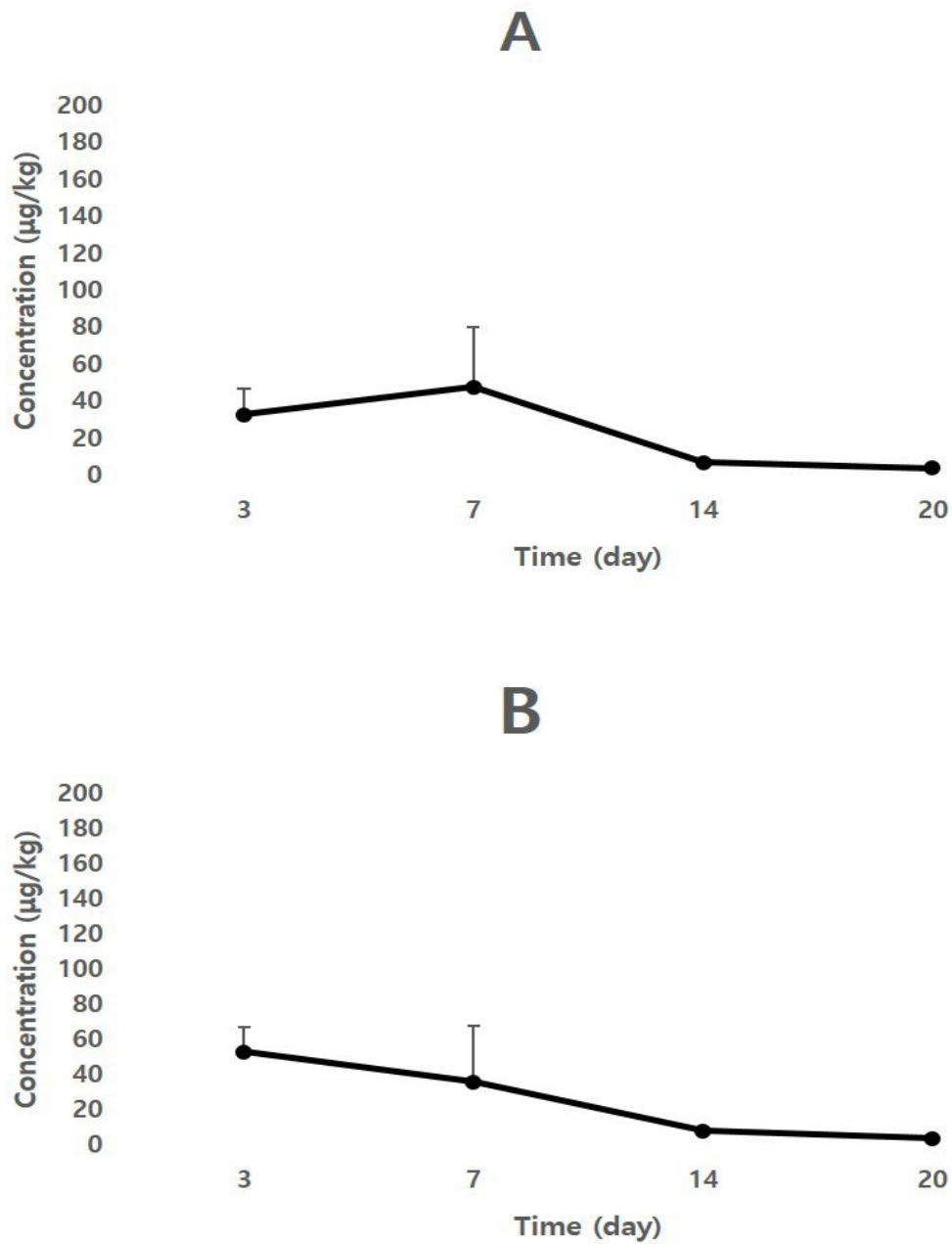


Figure 10. Concentration-time profile of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of tylosin (A) 10 mg/kg B.W. and (B) 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites.

1-4. 근육 내 Tylosin 잔류 분석에 의한 휴약기간 탐색

Tylosin 경구투여에 따른 적정 휴약기간 탐색을 위해 Withdrawal-time calculation program(Hekmen, WT1.4)를 활용하여 근육의 평균 잔류량을 바탕으로 계산한 결과 실험실 내에서의 연구의 경우 13 일, 양식현장에서의 연구에서 임상용량을 투여한 그룹은 5 일, 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 경우 6 일로 나타났다(Figure. 11 - 13).

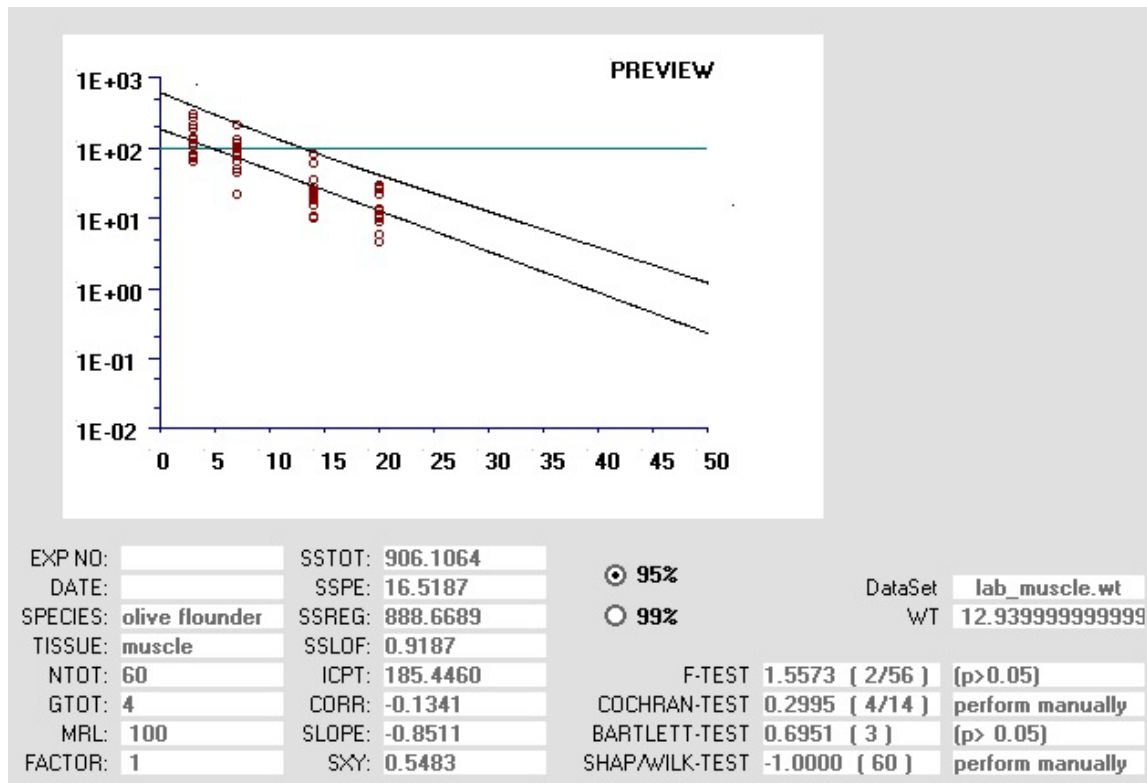


Figure 11. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the laboratory using the WT 1.4 software.

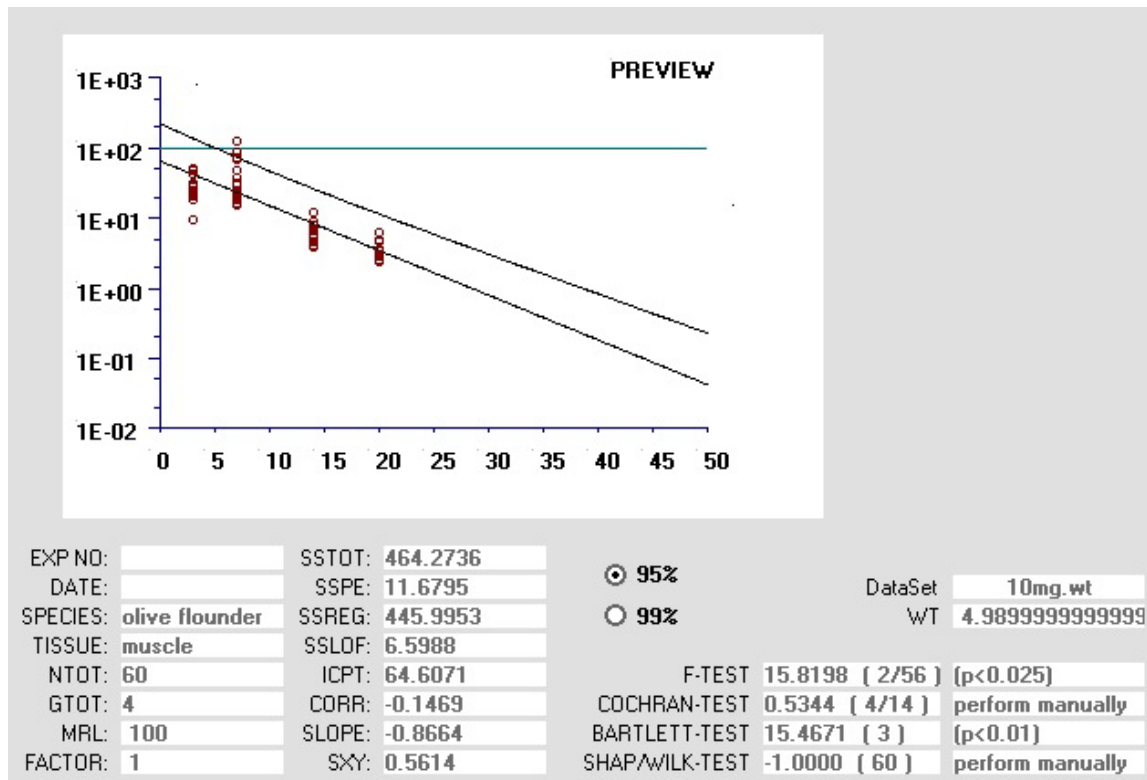


Figure 12. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in aquaculture sites using the WT 1.4 software.

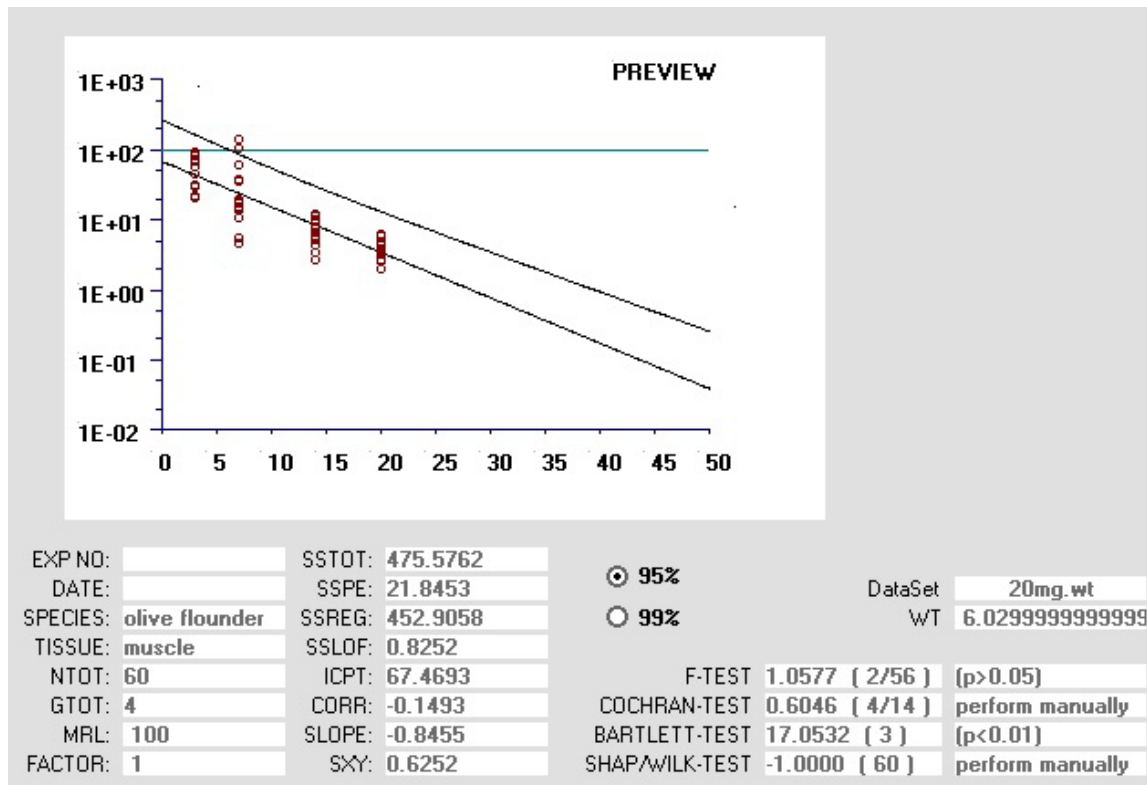


Figure 13. Calculated withdrawal time of tylosin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.

2. 넙치에 대한 lincomycin 잔류 분석

2-1. 표준곡선 및 회수율

Lincomycin 의 표준용액을 음성시료에 첨가하여 전처리 한 후 LC-MS/MS 로 분석하였는데 Retention time 은 근육의 경우 3.89 분, 혈청의 경우 3.91 분(Figure. 14)으로 조사되었고 정량이온의 피크 면적 값의 비를 이용해 표준곡선을 작성한 결과, 각 농도에 따라 피크 면적의 넓이가 비례하였으며 그에 따른 상관계수(r^2)는 혈청과 근육 모두 0.99 이상의 직선성을 나타내었다(Figure. 15).

회수율 확인을 위해 lincomycin 투여 이력이 없는 근육 및 혈청에 lincomycin 표준용액을 0.01 mg/kg 농도로 첨가하여 위 전처리방법으로 추출한 결과 평균 98%, 91% 수준으로 회수되었고 CODEX 가이드라인(CCRVDF CAC/GL 71-2009)에 충족하는 결과를 나타내었다(Table. 6).

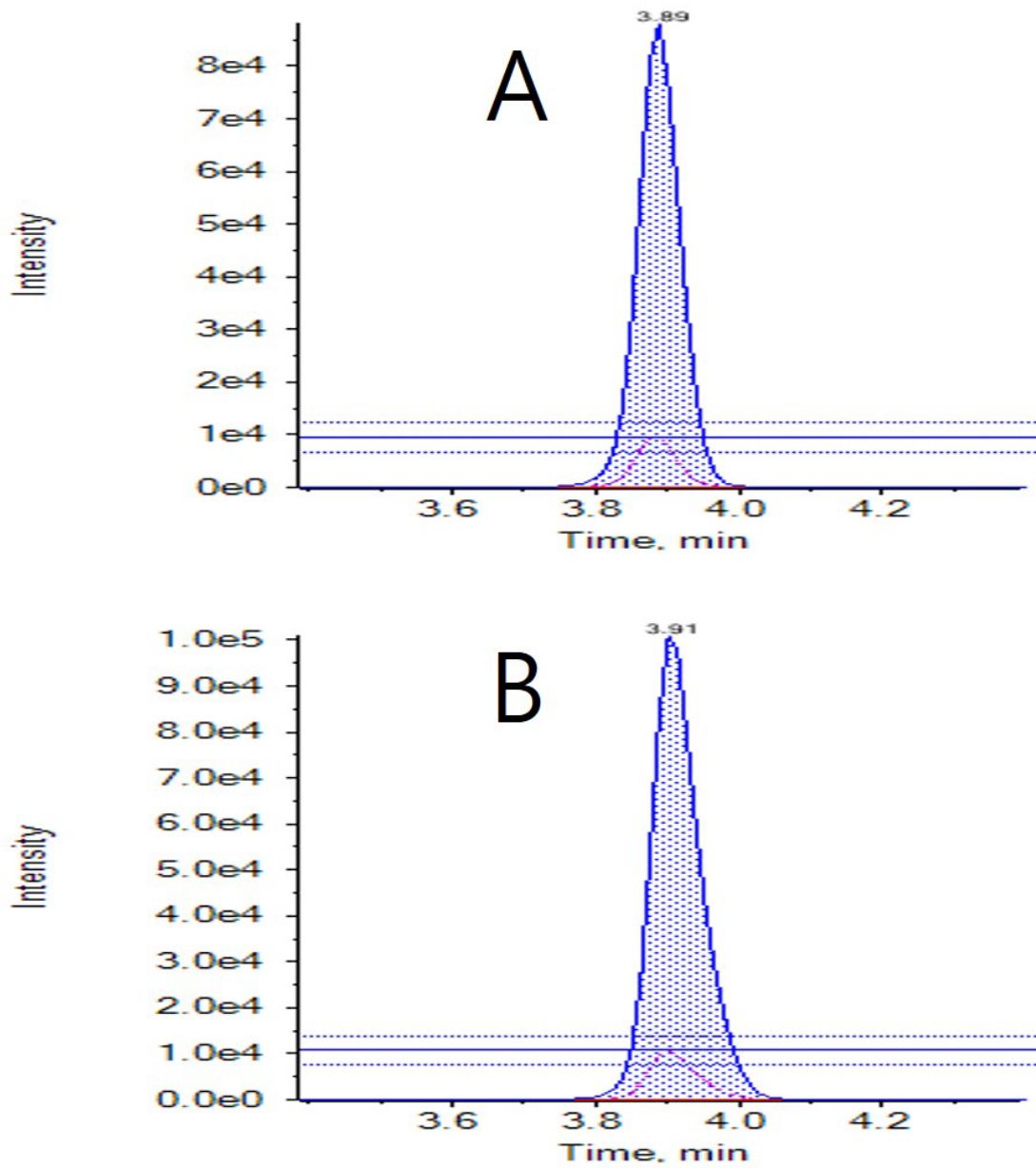
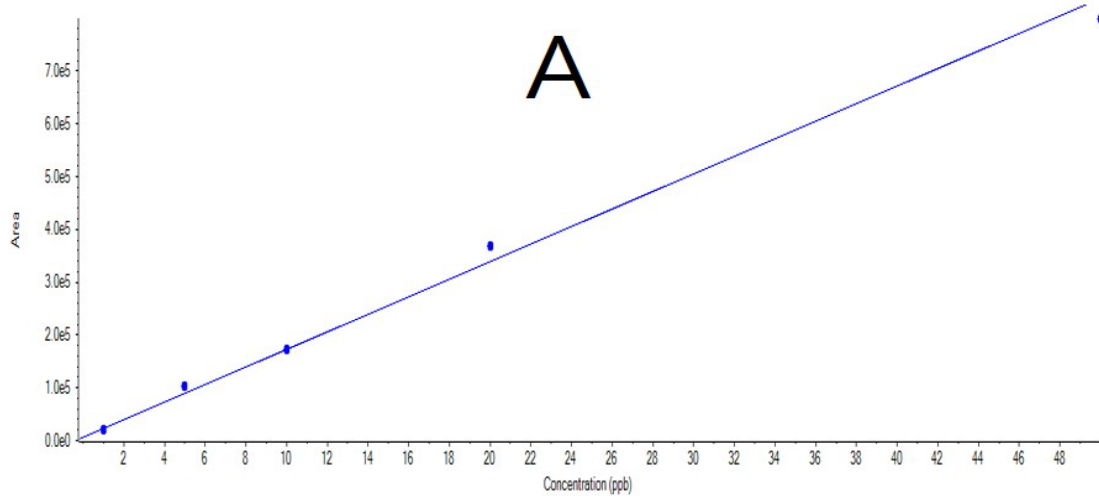


Figure 14. Chromatogram of 0.01 mg/kg lincomycin standard analyzed by LC-MS/MS.

Regression Equation: $y = 16631.35369 x + 6302.20373$
($r = 0.99671$) (weighting: $1 / x$), $r^2=0.993$



Regression Equation: $y = 4.68529e4 x + 3429.07780$
($r = 0.99969$) (weighting: $1 / x$), $r^2=0.999$

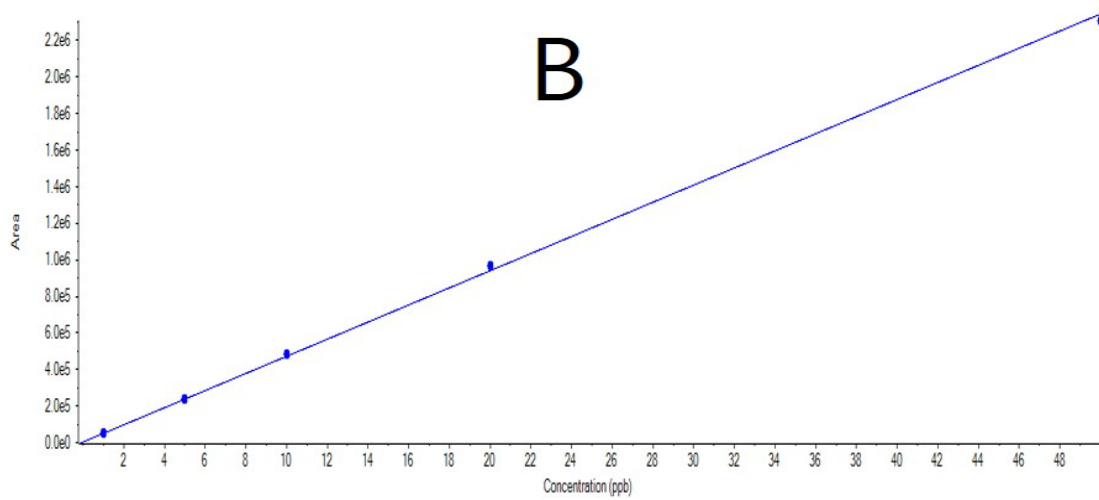


Figure 15. Matrix matched calibration standard curve of lincomycin extracted from (A) muscle and (B) serum.

Table 6. Validation parameters for the analysis of lincomycin in muscle and serum of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Compound	Sample	Fortified Concentration (mg/kg, ppm)	Recovery(%) (Mean±SD,n=3)	CV(%)	LOQ (mg/kg)
Lincomycin	Muscle	0.01	98.1 ± 5.1	5.3	0.001
	Serum	0.01	91.6 ± 0.1	0.2	0.001

2-2. 연구실 내에서의 lincomycin 잔류 분석 결과

Lincomycin 을 96 ± 13.8 g 의 넙치에 oral zoned needle 을 이용하여 임상용량(10 mg/kg B.W.)으로 5 일간 경구투여 후 근육 및 혈청에서의 잔류 농도변화를 Figure. 16 에 나타내었다. 시간경과에 따른 넙치 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.22 ± 0.15 mg/kg 농도를 보인 후 지속적으로 감소 경향을 보였다. 넙치의 혈청 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.3 ± 0.15 mg/kg 의 농도를 보인 후 점차 감소하였다.

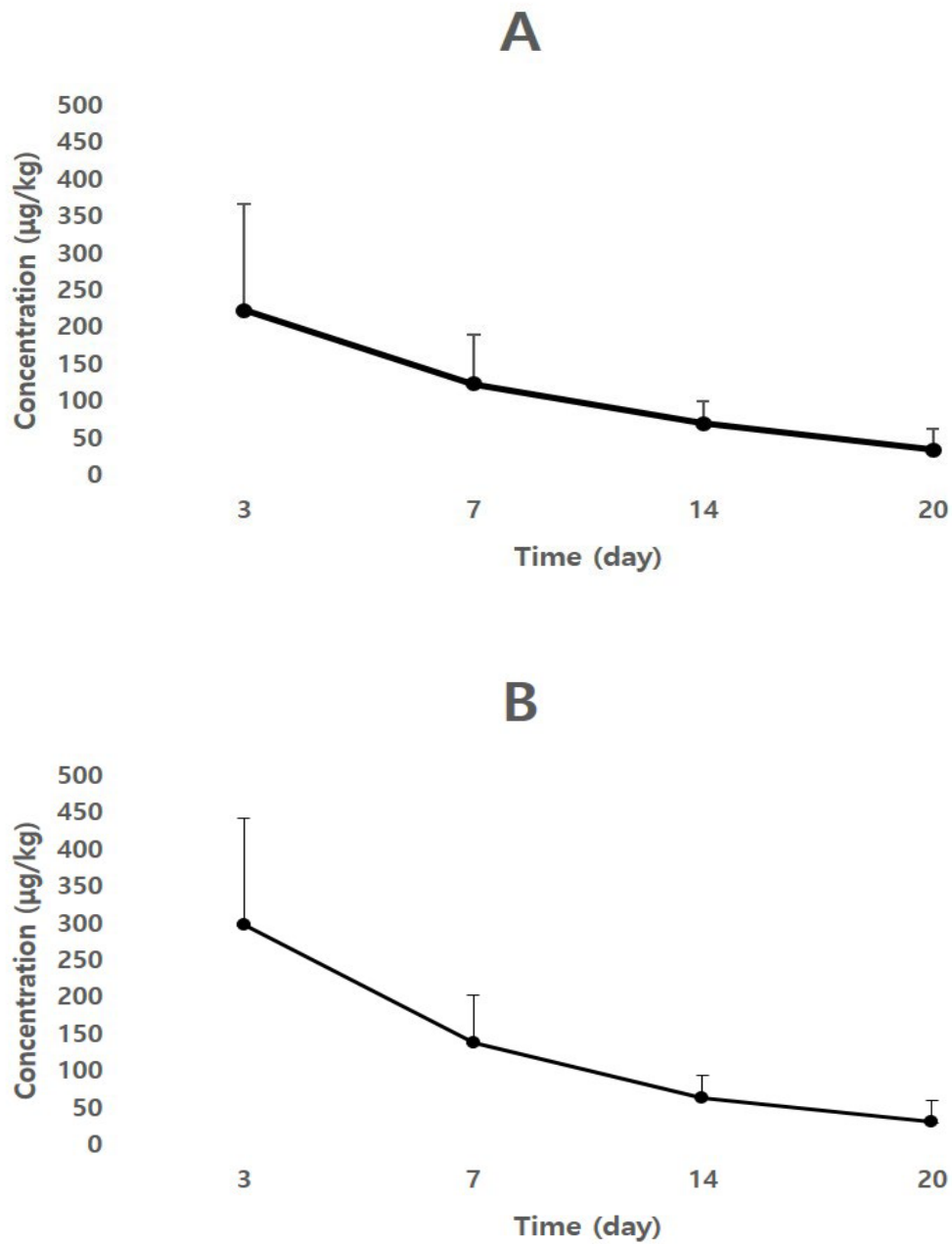


Figure 16. (A) Muscle and (B) serum concentration-time profile of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of lincomycin 10 mg/kg B.W. in the laboratory.

2-3. 양식현장에서의 lincomycin 잔류 분석 결과

임상용량(10 mg/kg B.W.) 및 임상 2 배농도(20 mg/kg B.W.)로 2 그룹으로 진행하였으며 배합사료에 lincimycin 을 혼합하여 5 일간 경구투여 후 근육에서의 잔류 농도변화를 Figure. 17 에 나타내었다. 시간경과에 따른 넙치 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 임상용량을 투여한 그룹에서 경구투여 3 일 후 0.36 ± 0.27 mg/kg 농도를 보인 후 빠르게 감소하였다. 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.2 ± 0.19 mg/kg 의 농도를 보인 후 급격한 감소 경향을 보였다.

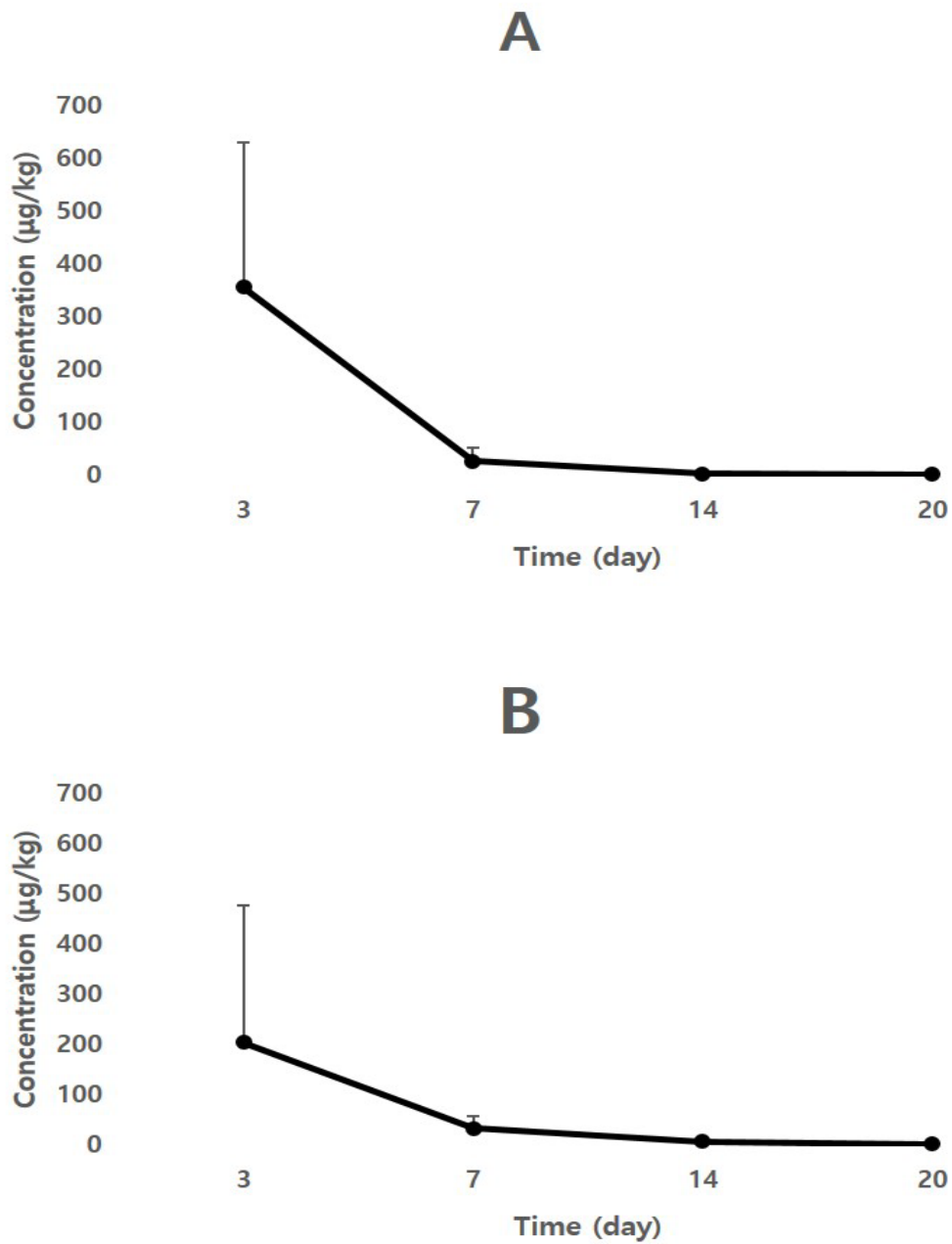


Figure 17. Concentration-time profile of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration of lincomycin (A) 10 mg/kg B.W. and (B) 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites.

2-4. 근육 내 lincomycin 잔류 분석에 의한 휴약기간 탐색

Lincomycin 경구투여에 따른 적정 휴약기간 탐색을 위해 Withdrawal-time calculation program (Hekmen, WT1.4)를 활용하여 근육의 평균 잔류량을 바탕으로 계산한 결과 실험실 내에서의 연구의 경우 21 일, 양식현장에서의 연구에서 임상용량을 투여한 그룹은 11 일, 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 경우 12 일로 나타났다(Figure. 18 - 20).

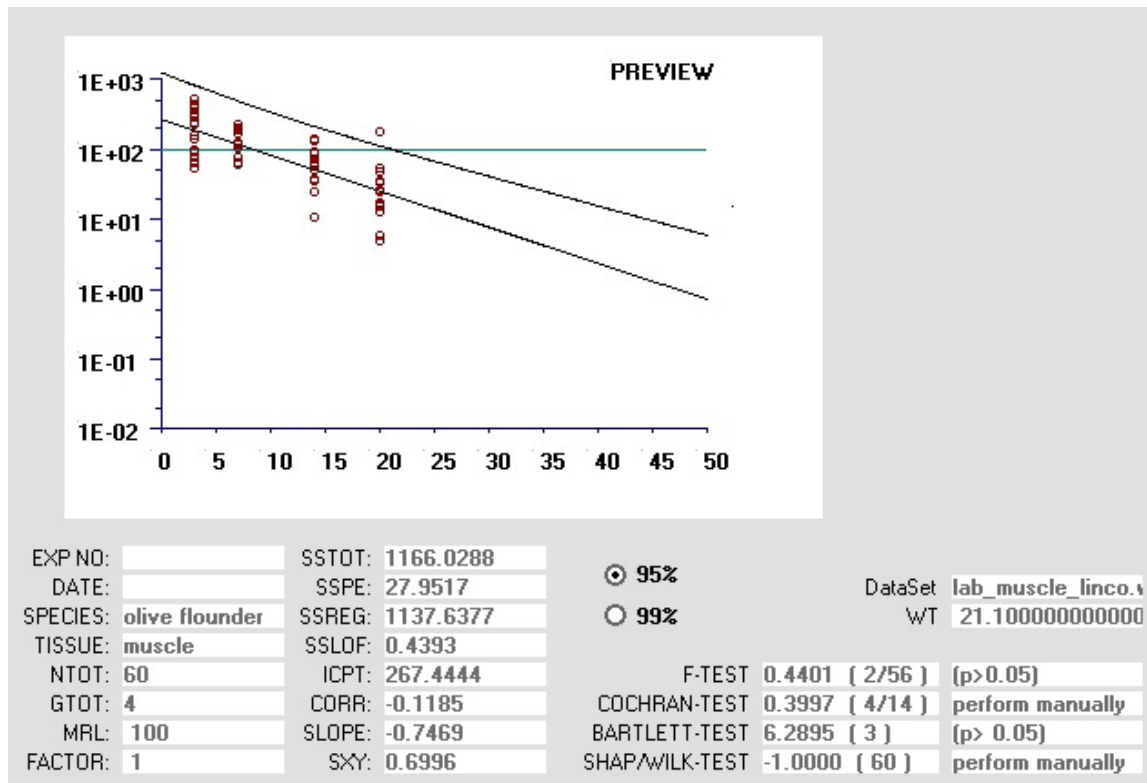


Figure 18. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the laboratory using the WT 1.4 software.

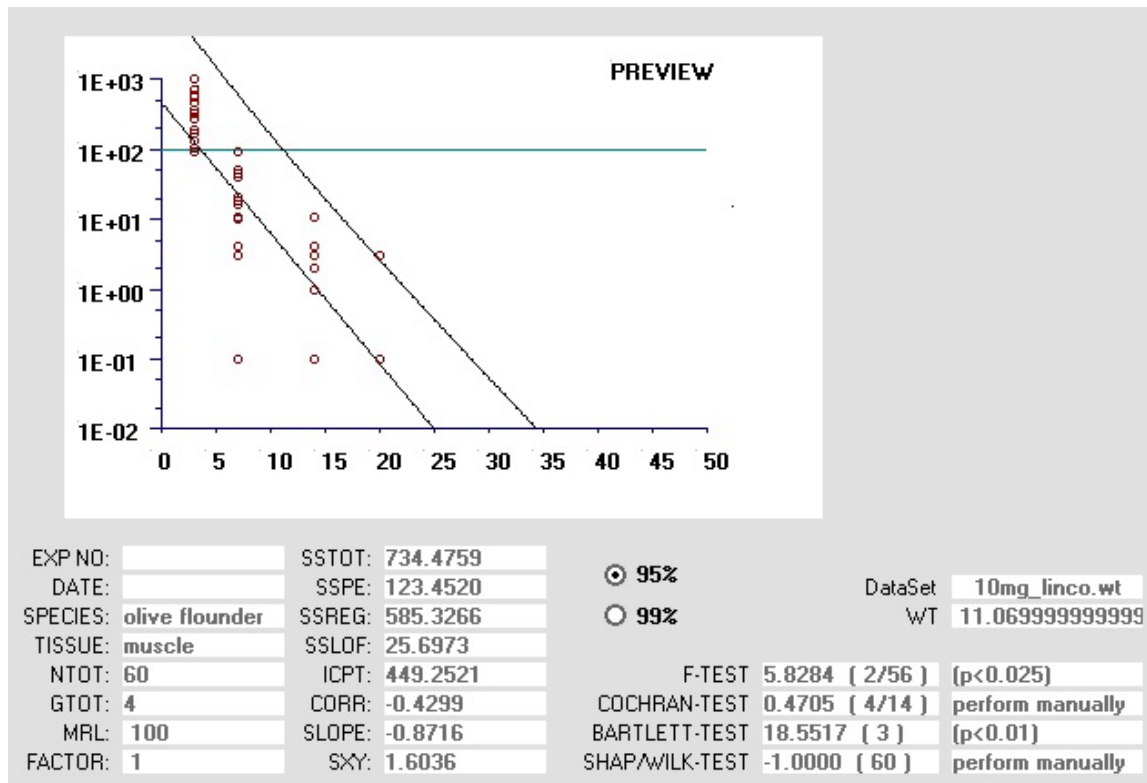


Figure 19. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 10 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.

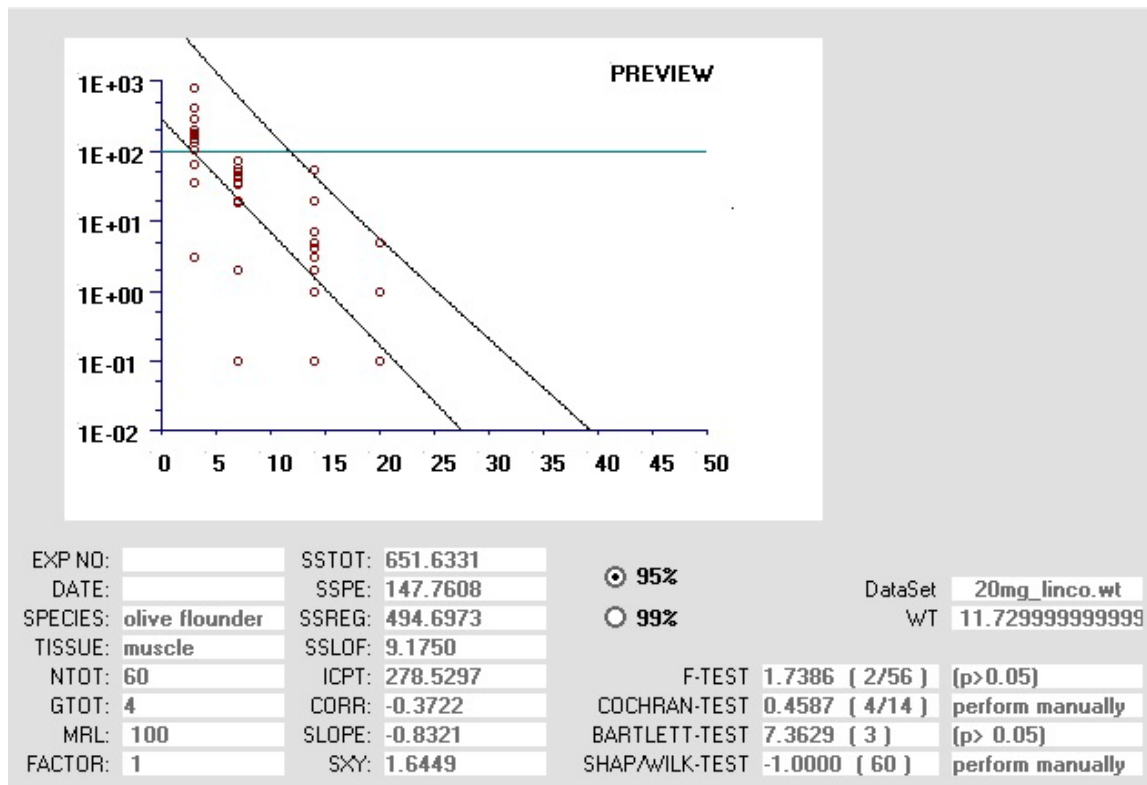


Figure 20. Calculated withdrawal time of lincomycin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle after oral administration of 20 mg/kg B.W. in the aquaculture sites using the WT 1.4 software.

IV. 고찰

국내 양식 수산물의 항생제 잔류물질은 수산물을 섭취하는 인간의 건강과 안전에 지대한 영향을 끼칠 수 있다. 항생물질의 잔류분석을 통해 항생물질의 부정적 효과를 최소화하고 양식산업의 전반적인 안전성 확대에 도움을 줄 수 있다.

이번 연구에서는 tylosin 과 lincomycin 의 잔류분석을 위해 LC-MS/MS 법을 이용했으며 이 분석법은 시료의 matrix 가 복잡한 수산식품의 경우 미량의 잔류의약품을 내인성 생체 성분들로부터 선택적으로 분석할 수 있는 가장 신뢰성 있는 분석방법이다(Oh et al., 2009). 분석결과 tylosin, lincomycin 표준용액을 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 mg/L 5 개 이상 지점으로 검량선을 작성했을 때 상관계수(R^2)는 0.99 이상의 직선성을 보였고 tylosin 과 lincomycin 의 표준용액을 0.01 mg/kg 농도로 음성시료(Blank sample)에 spiking 하여 회수율을 확인한 결과 tylosin 의 경우 102%, 100%, lincomycin 에서는 98%, 91%로 양호한 값을 나타냈다. 이는 CODEX 에서 제시한 가이드라인(CCRVDF CAC/GL 71-2009)를 충족하였으므로 분석에 대한 신뢰성은 확보한 것으로 사료된다.

Tylosin 의 MRL 의 경우 현재 국내에서 어류에 대한 MRL 이 설정되어 있지 않다. 유럽의 경우 0.1 mg/kg 의 MRL (EMEA, 2002)이 설정되어 있고 국내 식품공전에서의 MRL 역시 유, 알을 제외한 소, 돼지, 양, 염소, 가금류에 대해 0.1 mg/kg 의 기준이 설정되어 있어 본 연구에서도 0.1 mg/kg 의 잔류허용기준을 적용하였다.

Tylosin 의 실험실 내에서의 잔류특성연구에서 시간경과에 따른 넙치 근육 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.15 ± 0.07 mg/kg 농도를 보인 후 경구투여 7 일 후 잔류허용기준 이하로 검출되었다. 넙치의 혈청 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.06 ± 0.04 mg/kg 의 농도를 보인 후 점차 감소하였는데 경구투여 3 일 후부터 잔류허용기준인 0.1 mg/kg 을 초과하지 못하는 결과를 보였다. 근육과 혈청의 잔류량을 비교해 보았을 때 혈청의 잔류량이 근육보다 다소 낮은 잔류량을 보이는 것을 확인하였다. 이는 아마 약물의 지질투과성이 높아 조직 특이적 분포가 가능했기 때문일 수 있는데 이러한 데이터는 강도다리의 혈청, 근육+껍질, 간, 신장 샘플 중 혈청의 tylosin 농도가 가장 낮다고 보고한 연구결과와 일치한다(Lee et al., 2022). 또한 닭에서 근육, 간, 신장, 폐, 혈액 샘플 중 혈액 샘플에서 tylosin 농도가 가장 낮다고 보고한 연구와도 일치한다(Soliman and Sedek, 2016).

Tylosin 양식현장에서의 잔류특성연구에서 시간경과에 따른 넙치 근육 내 tylosin 잔류 농도는 임상용량을 투여한 그룹에서 경구투여 3 일 후 0.03 ± 0.01 mg/kg 농도를 보인 후 경구투여 7 일 때에 오히려 증가하였다가 이후 점차 감소하였다. 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 근육 내 tylosin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.05 ± 0.03 mg/kg 의 농도를 보인 후 지속적으로 감소 경향을 보였다. 임상용량을 투여한 그룹에서 경구투여 3 일 후보다 7 일 때에 잔류량이 증가하는 경향을 보였고 임상용량을 투여한 그룹 및 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 잔류량이 유의미한 차이를 보일 것으로 예상했지만 미미한

차이를 보였다. 이는 현장실험의 특성상 배합사료에 tylosin 을 혼합하여 경구투여하는 방식에서 기인한 개체별 섭취차이가 있었을 것으로 사료된다. 또한 수온이 다양한 어류에서 항생물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 상당한 영향을 미치는 요인이라는 많은 연구(Rairat et al., 2019; Yang et al., 2020; Lee et al., 2022)에 기인해 실험실 내에서의 연구보다 양식현장에서의 연구의 결과가 다소 낮은 잔류량을 보인 것이 두 실험에서의 수온 차이에 의한 것이라고 추측할 수 있다.

Tylosin 은 현재 국내에서 어류에 대한 MRL 이 설정되어 있지 않으므로 2024 년부터 적용되는 PLS (Positive List System)제도의 적용을 받게 된다. PLS 제도란 동물용의약품의 오남용을 방지하기 위해 국내 잔류허용기준이 설정된 동물용의약품 외에는 일률기준(0.01 mg/kg)을 적용하여 관리하는 제도이다. PLS 제도의 0.01 mg/kg 기준을 WT1.4 에 적용하여 휴약기간을 계산한 결과 실험실 내에서의 연구의 경우 32 일, 양식현장에서의 연구에서는 임상용량 및 임상 2 배용량의 그룹에서 각각 21 일, 22 일로 계산되었다. 이는 현재 국내에서 수산용으로 허가된 tylosin 의 잠정적 휴약기간인 20 일에 부합하는 결과이다. 하지만 본 연구에서 설정한 0.1 mg/kg 의 MRL 을 적용하여 계산한 결과는 실험실 내에서의 연구의 경우 13 일, 양식현장에서의 연구에서 임상용량을 투여한 그룹은 5 일, 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 경우 6 일로 나타났다. 본 연구에서 나타난 잔류 경향과 계산된 휴약기간이 tylosin 의 휴약기간을 설정하는데 필요한 기초자료로 활용할 가치가 있다고 판단된다.

Lincomycin 의 실험실 내에서의 잔류특성연구에서 시간경과에 따른 넙치 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.22 ± 0.15 mg/kg 농도를 보인 후 지속적으로 감소 경향을 보였고 경구투여 14 일 후 잔류허용기준인 0.1 mg/kg 이하로 검출되었다. 넙치의 혈청 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.3 ± 0.15 mg/kg 의 농도를 보인 후 점차 감소하였고 근육과 마찬가지로 경구투여 14 일 후 잔류허용기준 이하로 검출되었다. Lincomycin 의 경우 tylosin 과 달리 혈청의 잔류량이 근육의 잔류량보다 높은 경향을 보였다.

Lincomycin 양식현장에서의 잔류특성연구에서 시간경과에 따른 넙치 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 임상용량을 투여한 그룹에서 경구투여 3 일 후 0.36 ± 0.27 mg/kg 농도를 보인 후 급격한 감소경향을 보이며 경구투여 7 일 후 잔류허용기준 이하로 검출되었다. 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 근육 내 lincomycin 잔류 농도는 경구투여 3 일 후 0.2 ± 0.19 mg/kg 의 농도를 보인 후 마찬가지로 급격히 감소되어 경구투여 7 일 후 잔류허용기준 이하로 검출되었다.

Lincomycin 잔류량 데이터를 기반으로 적정 휴약기간 탐색을 위해 WT1.4 를 활용하여 근육의 평균 잔류량을 바탕으로 계산한 결과 실험실 내에서의 연구의 경우 21 일, 양식현장에서의 연구에서 임상용량을 투여한 그룹은 11 일, 임상 2 배농도를 투여한 그룹의 경우 12 일로 나타났다. 현재 국내에 승인된 lincomycin 의 휴약기간은 경구투여제의 경우 25 일, 주사제는 30 일이다. 하지만 lincomycin 주사제에 대한 다른

연구에서도 30 일의 휴약기간이 아닌 20 일의 휴약기간을 제시하였다(Lee et al., 2022). 본 연구에서는 휴약기간이 25 일로 되어있는 lincomycin 경구투여제에 대해서 잔류분석을 하였고 주사제에 대한 잔류경향은 추가 연구가 필요할 것으로 보인다. Lincomycin 의 잔류분석 결과 현재 25 일로 허가되어 있는 lincomycin 경구투여제의 휴약기간보다 짧은 휴약기간을 제시할 수 있는 기초자료로 활용될 것을 기대한다.

본 연구를 통하여 tylosin, lincomycin 의 잔류 분석을 통하여 수산용 동물용의약품의 어류에 대한 효능과 용법, 용량, 적절한 농도, 방법 및 안전성에 관하여 기준을 제시할 수 있을 것이고 보다 안전한 약제사용 및 넙치 생산과 유통에 기여할 것으로 사료된다.

참고문헌

Abu-Basha E. A., et al (2012) "Comparative pharmacokinetics and bioavailability of two tylosin formulations in chickens after oral administration." Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 63(2): 159-166

Elazab S. T., et al. (2020). "Pharmacokinetics, tissue residues, and ex vivo pharmacodynamics of tylosin against *Mycoplasma anatis* in ducks." Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 43: 57-66.

EMA (2002). European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK

Harvie E. A., et al. (2013). "Innate immune response to streptococcus iniae infection in zebrafish larvae." Infection and Immunity 81(1): 110-121

Joo M.-S., et al. (2020). "Application of tylosin antibiotics to olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Streptococcus parauberis*." Fisheries and Aquatic Sciences 23(3): 1-18

Jung S. J., et al. (2004). "Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* orally administered chloramphenicol." Journal of fish pathology 17(2): 113-121

Kim J. W., et al (2014). "Administration and use of aquaculture drugs in Korea." Journal of fish pathology 27(1): 67-75

Kowalski C., et al (2002) "Pharmacokinetics of tylosin in broiler chickens." Polish journal of veterinary sciences 5(3): 127-130

Shim J.-D., et al. (2019). "Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea." Journal of fish pathology 32(1): 29-35

Lee J.-H., et al. (2022). "Oral pharmacokinetic profile and withdrawal time

estimation for tylosin tartrate in the cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*." **Aquaculture Reports** 26

Lee J.-H., et al (2022). "Temperature-dependent tissue residue depletion and withdrawal time of orally administered tylosin tartrate in starry flounder, *Platichthys stellatus*." **Aquaculture** 561

Lin A. H., et al (1997). "The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin." **Antimicrobial agent and chemotherapy** 41(10): 2127-2131

Mishra A., et al. (2018). "Current challenges of streptococcus infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture." **Molecules and Cells** 41(6): 495-505

Muñoz R., et al (2014) "Withdrawal times of oxytetracycline and tylosin in eggs of laying hens after oral administration." **Journal of Food Protection** 77(6): 1017-1021

Oh J.-H., et al. (2009). "Management of veterinary drug residues in food." **Korean Journal of Environmental Agriculture** 28(3): 310-325

Prescott J. F., et al (2000). "Antimicrobial therapy in veterinary medicine." Iowa State University Press, No. Ed. 3: 796

Radi A. M. (2016) "Pharmacokinetic and bioavailability of tylvalosin after oral, intramuscular and intravenous administration in turkeys." **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 8(2): 140-144

Rairat T., et al (2019). "Temperature-dependent pharmacokinetics of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following single oral and intravenous administration." **Aquaculture** 503: 483-488

Scoufos J., et al. (2022). "Use of lincomycin to control respiratory infections in lambs: Effects on health and production." **Small Ruminant Research** 66: 214-221

Soliman A. M. and Sedeik M. (2016) "Pharmacokinetics and tissue residues of tylosin in broiler chickens." Pharmacology & Pharmacy 7: 36-42

Yang F., et al (2020). "Effects of water temperature on tissue depletion of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) following multiple oral doses." Aquaculture 515

V. 감사의 글

저는 법학과 학사를 졸업하여 우연한 기회에 해양수산연구원에서 업무를 하게 되면서 하나부터 열까지 일을 배우며 생소한 분야였던 해양수산분야에 관심을 가지게 되었습니다. 일을 배우기 시작하면서 조금 더 이 분야에 대한 공부를 하고싶다는 생각을 가지게 되었고 2021 년 해양생물공학과 석사과정에 입학을 하였습니다. 전혀 관련없는 학사 학위를 가진 저에게 흔쾌히 실험실 생활을 허락해주시고 심도깊은 학문을 공부할 수 있게 지도해주신 정준범 교수님께 진심으로 감사드립니다. 부족한 제가 실험을 진행하고 논문을 쓸 수 있게 옆에서 많은 격려와 도움을 준 전려진 박사님, 예지, 영준, 예진, 영은, 지은, 응준에게 감사드립니다.

제가 석사 과정을 결심 할 수 있게 가장 큰 도움을 주시고 격려해주신 강봉조 과장님, 원승환 과장님, 양혜영 연구사님, 유은호 연구사님께도 감사의 말씀 드립니다. 또한 제가 직장과 석사 과정을 병행하느라 힘들어하고 업무에 집중하지 못하는 순간이 있었지만 마은실, 부민진, 배서영, 이지혜, 강순영, 한석규, 이성희, 강문수, 백민정 주무관님들께서 배려해주시고 많이 도와주셔서 항상 감사했습니다.

마지막으로 항상 응원과 격려, 사랑을 주는 우리 가족 아버지, 어머니, 형, 동생 모두 너무 감사드리고 항상 사랑합니다.