

고성능 역상 액체 크로마토그래피를 이용한 넙치에서의 Josamycin의 약물동태에 관한 연구

오수연 · 장원철*

단국대학교 자연과학대학 화학과

The Pharmacokinetic Study of Josamycin in Flounder by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Su-Yeon Oh and Won-Choeul Jang

*Department of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University

(Received September 28, 1998)

(Accepted November 4, 1998)

ABSTRACT : This study was conducted to observe the distribution of josamycin, a macrolide antibiotic in flounder. Josamycin was administered orally to the flounder at the dose of 100 mg/kg josamycin in flounder. Josamycin in blood and various organs of flounder was analyzed using reversed phase HPLC. In blood kinetics study, C_{max} was shown 9.50 $\mu\text{g/ml}$ at 45 min. after treatment and then decreased slowly up to 8th day. Concentration of josamycin in muscle was 0.47 $\mu\text{g/g}$ tissue at 11th day of the treatment and 0.41 $\mu\text{g/g}$ tissue at 7th day for liver. The concentration of josamycin in all the tested organs except gall bladder was decreased as the time passed. On the contrary, josamycin in gall bladder was increased 3.8 times at the day of 5th compared to that of the 1st day aftreatment.

Key Words : Josamycin, HPLC, Flounder, Fish

I. 서 론

Josamycin은 macrolide 계에 속하는 항생물질의 일종으로 세균의 50 ribosomal subunit의 P 부분에 가역적으로 결합하여, RNA 의존성 단백질의 합성을 저해함으로써(Kucers & Bennet, 1987) 그람 양성균, 그람 음성구균 등에 작용하는 비교적 작용범위가 넓은 약물이다.

이와 동일한 macrolide계의 약물들이 지난 35년 동안 동일 계열 약물들이 광범위하게 사용되어져 왔으나, 여러 가지 allergy 반응과 내성균들의 출현으로 인해 새로운 약물의 필요성이 증가되는 요즘, 현재 널리 사용되고 있는 erythromycin 등에 비해 조직 내로 흡수가 빠르고(Piero Periti *et al.*, 1989), 비교적 안정하며, 부작용도 적은 것으로 알려져 있는 josamycin의 의미는 크다고 말할 수 있다.

임상에 사용되는 많은 약물들의 경우 그 효능에 따라 적용대상을 사람뿐만 아니라, 가축이나 어류 등에

까지 넓히고 있는 점을 고려해보면 josamycin도 예외는 아니어서 특히 밀집 사육으로 여러 감염증에 노출될 수밖에 없는 양식 어류에 이 약물의 사용이 증가되고 있다. 일반적으로, 어류는 서식환경의 특성상 약물의 체내 잔류가 포유동물에 비하여 긴 것으로 알려져 있기 때문에 우리 나라와 같이 양식 어류의 소비가 많은 나라의 경우 어중에 따른 약물의 체내 잔류가 문제시 될 수 있으므로, 어류에서의 약물의 대사에 관한 연구는 중요하다 하겠다.

따라서, 본 실험에서는 기본적인 HPLC 장비를 이용하여 넙치의 혈액, 근육, 장기에 잔류하는 josamycin의 농도를 분석함으로써 어체내에서의 약물의 동태에 대하여 관찰하여 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

넙치(*Paralichthys oliraceus*)는 외부 소견으로 판단하

*To whom correspondence should be addressed

여 질병이 없는 건강한 것으로 크기가 28 cm에서 37 cm, 무게가 480 g에서 610 g인 것을 충북대학교의 수 의학과 어병학실로부터 제공받았다.

2. 실험 재료

본 실험에서 사용한 josamycin은 중앙 케미칼의 양 식 어류용 약품으로, 순도가 90% 이상인 것을 사용하였으며, josamycin을 ethyl ether에 녹인 다음 filter paper로 걸러서 불순물을 제거하였으며, 24시간 동안 냉장고에 방치한 후 evaporator(Büchi Rotavapor R-114)로 ether를 증발시켜 얻은 결정을 완전히 건조하였다.

HPLC 분석에 사용된 유기용매인 acetonitrile과 methanol은 Merck(독일)사와 Burdick & Jackson(미국)사의 HPLC 등급을 사용하였고, 완충용액을 만들기 위해서는 Merck사의 특급 sodium dihydrogen phosphate monohydrate($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)를 사용하였다.

시료 추출에 이용한 유기용매인 chloroform, ethyl acetate, ethyl ether들은 덕산 이화학의 1급 시약을 사용하였으며, 그 외 실험에 사용한 모든 시약은 삼전 순약 공업화학(평택), Junsei(일본)사 등의 1급 시약을 사용하였다.

실험에 사용된 모든 물은 증류 후 Millipore사의 Milli-Q system을 이용하여 3차 증류한 후, 같은 회사의 membrane filter(크기 0.45 μm)로 다시 거른 것을 사용하였다.

3. 기기장치

HPLC는 shimadzu(일본)사의 CLASS - LC10A 기종으로, LC-10A pump, Rheodyne 7125 injector, SPD-10A UV/VIS detector, CBM-10A communication bus module로 구성되어 있으며, 이동상의 기포를 제거하기 위해 X-ACT degasser(스웨덴)를 사용하였다.

분석용 컬럼으로는 Inertsil ODS-3(C18, 5 μm , 4.6 \times 250 mm and 150 mm, GL Sciences)을 사용하였고, column의 손상을 최소화하기 위해 precolumn으로 Nova-pak C8(Waters)를 사용하였다.

원심분리기는 National Labnet 사의 Centronix micro-centrifuge를, 균질기는 Nissei(일본)사의 ACE homogenizer(AM-TYPE)를 사용하였다.

4. 표준 검량선의 작성

재결정을 통해 얻은 josamycin 5 mg을 5 ml의 aceto-

nitrile에 녹인 후 1 ml씩 취하여 증류수, 완충용액 또는 LC 이동상과 같은 조성의 용매를 넣어서 각각의 전체 부피를 5 ml로 만들었다. 이렇게 준비된 표준 용액을 각각 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 4, 5, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 희석한 후, 20 μl 씩 LC에 주입하여 분석했으며, 그 결과를 농도에 대한 높이의 비율로 계산하였다.

5. 시험물질의 조제 및 투여

Josamycin은 먼저 소량의 ethanol에 녹인 후 증류수를 첨가하여 2.5% josamycin 용액을 만들어서 넙치의 당일 체중을 기준으로 100 mg/kg씩 1일 1회 2일간 zone needle을 이용하여, 경구 투여하였으며 투여 시 약물이 아가미를 통하여 빠져 나오지 않도록 주의하였다.

6. 시료채취

넙치 체내에서 약물의 잔류량을 알아보기 위해 혈액, 근육 및 뇌를 제외한 장기들을 선택하여(Fig. 1), 이들 중 혈액, 근육, 간은 2주간 매일 관찰하였으며, 그 밖의 장기들은 1일째와 5일째의 것을 분석하였다(Fig. 2).

1) 혈액

시간과 날짜에 따른 josamycin의 농도를 관찰하기 위하여, 약물 투여 후 4시간 동안 정해진 시간(5, 10,

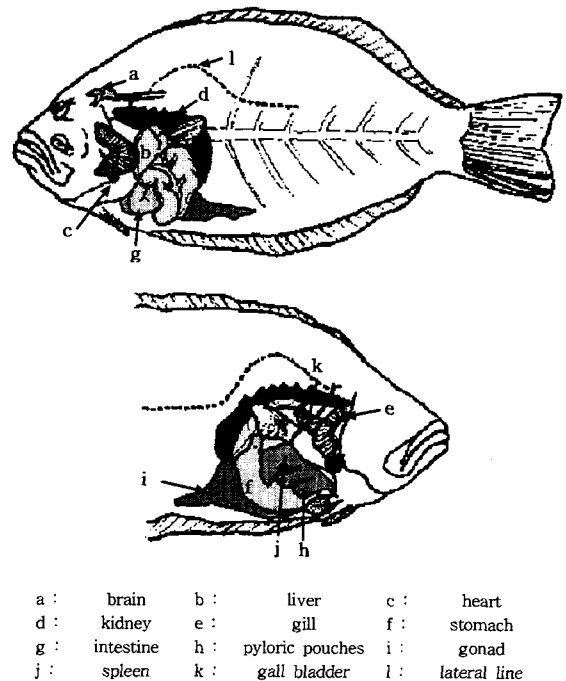


Fig. 1. Anatomy of the flounder.

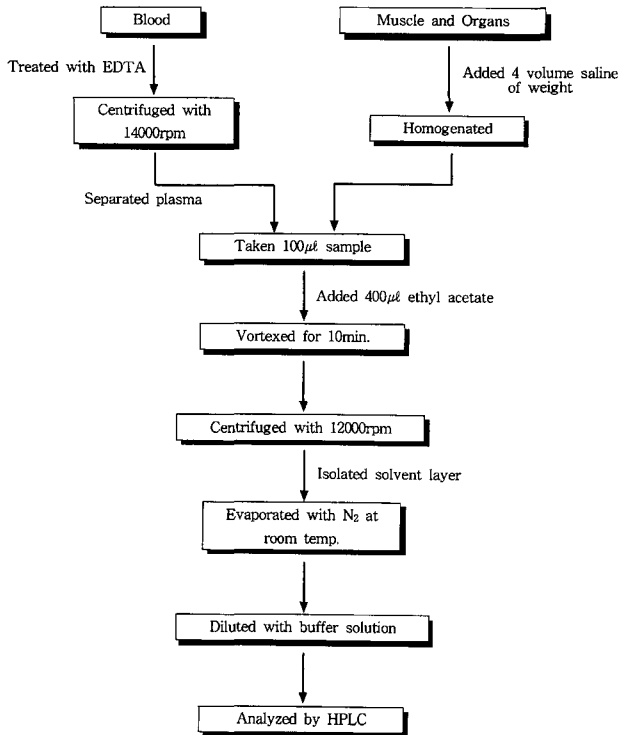


Fig. 2. Flow chart for josamycin analysis of blood, muscle, and organs in flounder.

15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분)에 따라 넙치의 척추부위에 있는 혈관으로부터 약 500 µl의 혈액을 채취하였으며, 또한 약물 투여 후 1일에서 14일까지 매일 한 차례씩 같은 방법으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 항응고제인 EDTA로 처리하여 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 혈장을 분리하였다.

2) 근육 및 장기

근육 조직은 넙치의 몸 전체를 12등분하여 각 부위에서 고르게 잘라내었으며, 그 중 10 g을 취하여 40 ml의 생리 식염수를 넣고 분쇄하여 균질액을 만들었다. 그리고 간과 그 밖의 장기들은 원래상태로 적출하여 각각의 무게를 잰 후, 무게의 3배에 해당하는 식염수를 넣고 분쇄하여 균질액을 만들었다.

모든 시료는 분쇄 후 -20°C에서 보관하였으며, 분석 직전에 추출하였다.

7. 추출

모든 시료는 액체-액체상 추출법을 이용하여 josamycin을 추출하였다.

준비된 시료를 분석 3~4시간 전에 해동하여 적당량을 취한 후, 각각 chloroform, ethyl acetate, ethyl ether

Table 1. HPLC conditions for analysis of josamycin

column	: Inertsil ODS-3 (C18, 5 µm, 4.6×250 mm)
detector	: UV/VIS detector
wavelength	: 232 nm
mobile phase ratio	: Acetonitrile : 0.05 M NaH ₂ PO ₄ (pH 6.0) = 60 : 40
flow rate	: 1.5 ml/min.
temperature	: 25°C
run time	: 15 min.
injection volume	: 20 µl

를 넣고, 15분간 vortex하였다. 14,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, 유기 용매 층을 분리하여 N₂ 가스로 증발시켰으며, 그 잔여물에 증류수, 완충 용액 또는 이동상과 동일한 조성의 액체를 가하여 HPLC로 분석하였다.

8. HPLC 분석

모든 시료는 Simadzu사의 CLASS-LC10 HPLC를 사용하여 분석하였고, josamycin을 분석하기 위한 LC 조건은 Table 1에 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. Josamycin의 표준 검량선

Josamycin의 표준용액을 UV과장 232 nm에서 분석하여 chromatogram을 얻었다. 검량선은 josamycin 표준 용액의 농도(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 4, 5, 6, 8, 10 µg/ml)와 chromatogram상의 peak 높이의 비로 구하여 최소 자승법을 이용한 회귀 방정식 $y = 1.016x - 0.3272$ 을 Sigma plot(4.0 version)을 사용하여 얻을 수 있었고, 이는 0.9954의 높은 상관관계를 나타내었다. 또한 josamycin의 농도 0.1~10 µg/ml 사이에서 직선 관계가 성립함으로써 약물의 농도를 계산하기에 적합함을 알 수 있었다.

2. Josamycin의 회수율

Chloroform, ethyl acetate, ethyl ether의 3가지 유기 용매로 회수율을 측정한 결과는 각각 76.3%, 64.1%, 79.7%로 나타나서 ethyl ether가 가장 좋은 결과를 보였다. 그러나, 실제 시료의 추출에서는 LC chromatogram상의 peak의 모양과 감도 및 방해물질 peak 등을 고려할 때 ethyl acetate가 더 나은 결과를 나타내어 이를 추출 용매로 선택하였다.

3. 잔류량 분석

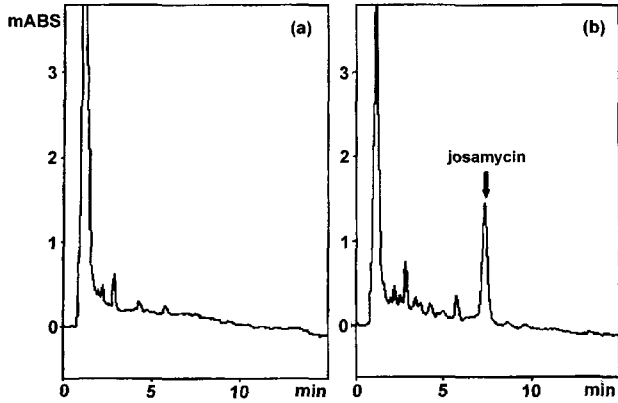


Fig. 3. Chromatograms of blank plasma (a) and after administration (b) in flounder.

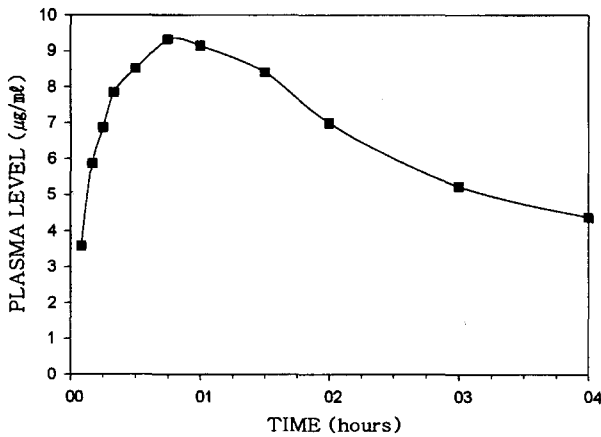


Fig. 4. Plasma concentrations after oral dosing of 100 mg/kg of josamycin in flounder. (n = 5) (Error bars were not shown; SD<0.1).

Table 2. Changes of concentration of josamycin in plasma, liver and muscle of flounder after twice exposures of 100 mg/kg josamycin (n = 5)

Days after treatment	Concentration of josamycin (µg/g tissue)		
	plasma	liver	muscle
1	3.17±0.09	20.29±0.69	2.65±0.03
2	2.35±0.11	9.09±0.24	2.06±0.19
3	1.51±0.10	5.31±0.06	1.52±0.01
4	1.18±0.02	2.58±0.24	1.27±0.14
5	0.89±0.12	1.18±0.10	1.03±0.06
6	0.58±0.04	0.62±0.06	0.90
7	0.48±0.01	0.41±0.04	0.81
8	-	-	0.68±0.04
9	-	-	0.59±0.03
10	-	-	0.50±0.02
11	-	-	0.47
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
$t_{1/2}(h)$	69.60	35.52	199.20
$k_e(day^{-1})$	0.24	0.47	0.08

- : not detected or below 0.1 ppm.

$t_{1/2}$: Time for concentration of josamycin in tissue to decrease by one-half; terminal half-life.

k_e : Elimination rate constant.

Table 3. Changes of concentration of josamycin in other organs of flounder after twice exposures of 100 mg/kg josamycin (n = 5)

Organs	Concentration of josamycin (µg/g tissue)	
	1 day	5 day
heart	3.70±1.06	1.11±0.61
stomach	36.07±1.92	4.21±2.45
intestine	25.20±0.16	2.08±0.07
bile	33.26±0.76	126.31±4.70
kidney	7.40±0.13	4.39±0.21
gonad	9.04±0.62	-
liver	20.29±0.69	1.18±0.1
muscle	2.65±0.03	1.03±0.06

- : not detected or below 0.1 ppm.

넙치에 100 mg/kg의 josamycin을 2일 연속 경구 투여한 후, 혈액, 근육, 간 그리고 그 밖의 장기들의 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 이 때 말단 반감기($t_{1/2}$)는 약물이 검출된 마지막 날과 그 전날에서 시간과 약물농도에 대한 선형 방정식을 구하여 농도가 절반이 되는데 걸리는 시간으로 구하였고, 제거 상수(k_e)는 $t_{1/2} = 0.693/k_e$ 의 공식을 사용하여 계산하였다.

1) 혈액

약물 투여 후 혈장 내에서 josamycin의 농도를 시간에 따라 관찰한 결과, 45분에 혈장최대농도(Cmax)가 9.5 µg/ml로 나타났고(Figs. 3, 4), 날짜별 관찰에서는 1일째는 3.17 µg/ml이었으며, 점차 감소하여 7일째는 0.48 µg/ml가 검출되었다(Table 2).

2) 근육 및 장기

근육의 경우 1일째에 2.65 µg/g tissue가 검출되었고, 11일째에 0.47 µg/g tissue가 되는 비교적 서서히 감소하는 모습을 보였다. 반면, 간에서는 첫째 날 20.29 µg/g tissue가 검출되었으나 빠른 대사 경향을 보이며 7일째에는 0.41 µg/g tissue까지 감소하였다.

그 밖의 장기들에서 나타난 결과는 Table 3에서 보는 바와 같으며, 이 중 위는 첫째 날 가장 높은 결과를 나타내었다. 5일째 분석한 결과들을 보면, 대부분의 장기들에서의 농도는 점차 감소하는 경향을 보인 반면, 담즙에서는 첫째 날의 약 4배가 검출되어 많은 양의 약물이 축적됨을 알 수 있었다.

IV. 결 론

본 실험은 목적의 macrolide계 항생제의 일종인 josamycin을 넙치에 투여한 후 기본적인 HPLC 장비를 이용하여, 혈액, 근육, 장기들을 분석함으로써 약물의 동태를 관찰하기 위해 체내에서의 잔류량을 알아보고

자 하는 것이었다.

넙치에의 혈장에서 시간에 따른 농도 변화를 살펴보면, 최대 혈장 농도는 9.5 µg/ml로 45분에 나타났고 서서히 감소하여 8일째부터는 약물이 검출되지 않았다. 근육에서는 약물 투여 1일 후 2.65 µg/g tissue가 검출되었으며, 12일째부터는 약물이 검출되지 않았다. 간에서는 1일 후에 비교적 높은 농도를 나타내었으나, 빠른 감소를 보여 8일째부터는 약물이 검출되지 않았다. 근육과 간의 말단 반감기는 각각 199.2와 35.52 h로 나타났다.

여러 장기에서 약물의 분포를 살펴본 결과, 1일째에 위와 장에서 높은 농도가 검출됨에 따라 josamycin이 주로 위장관을 통해서 흡수됨을 관찰했고 특히 담즙에서의 농도는 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내는 것으로 보아, josamycin이 담즙으로 축적됨을 알 수 있었다. 일반적으로 약물의 체내 잔류농도는 각 기관에 따라 서로 다르므로 어떤 특정 기관의 것을 기준으로 하기에 많은 무리가 따르나 가식 부위가 주로 근육 부분인 것을 감안할 때, 양식 어류에 있어서 josamycin의 휴약 기간은 12일 이상이 되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 단국대학교 대학연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사를 드립니다. 아울러 많은 조언을 해주신 충북대학교 수의학과 허강준 교수님과 대학원생 여러분께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Ducci, M. and Scalori, V. (1984): A rapid and sensitive high-pressure liquid chromatographic method for monitoring josamycin levels in plasma, *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, **4(3)**, 195-199.
- Fourtillan, J.B., Lefebvre, M.A. and Gobin, P. (1982): Josamycin chemical determination in biological fluid, *G. Ital. Chemioter.*, **29**, suppl. 1, 103-108.
- Horie, M., Satto, K. and Nakazawa, H. (1996): Determination of kitasamycin and josamycin in meat by HPLC, *Bunseki Kagaku*, **45(12)**, 1089-1094.
- Leory, P., Decolin, D. and Nicolas, A. (1994): Determination of josamycin residues in porcine tissues using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and spectrofluorimetric detection, *Analyst*, **119**, 2743-2747, Dec.
- Mitsuhashi, S. (1971): Drug action and drug resistance in bacteria, University park press, Tokyo.
- Omura, S., Hironaka, Y. and Hata T. (1970): Chemistry of leucomycin. IX. Identification of leucomycin A3 with josamycin., *J. Antibiot (Tokyo)*, **23(10)**, 511-513.
- Osono, T. et al. (1967) A new antibiotic, Josamycin. I. Isolation and physico-chemical characteristics., *J. Antibiot.*, 174-180, May.
- Rader, K., Wildfeuer, A., Schwedass, A. and Laufen, H. (1985): Determination of josamycin in plasma, erythrocytes via high-performance liquid chromatography by direct injection of plasma or homogenized blood cells, using altering sample clean-up columns, *J. Chromatography*, **8**, 344: 416-421.
- Reriti, P., Mazzei, T., Mini, E. and Novelli, A. (1989): Clinical pharmacokinetic properties of the macrolide antibiotics., Effects of age and various pathophysiological states (Part I). [Review], *Clinical Pharmacokinetics*, **16(4)**, 193-214, Apr.
- Skinner, M. and Kanfer, I. (1988): High-performance liquid chromatographic analysis of josamycin in serum and urine, *J. Chromatography*, **459**, 261-267.
- Straubaugh, L.J., Bolton, W.K., Dilworth, J.A., Guerrant, R.L. and Sande, M.A. (1976): Comparative pharmacology of josamycin and erythromycin stearate., *Antimicrobial Agent & Chemotherapy*, **10(3)**, 450-6, Sep.
- Tachibana, A., Sasaki, H., Watanabe, T., Yano, K. and Sado, T. (1975): [Absorption, distribution and excretion of ¹⁴C-josamycin and ¹⁴C-josamycin propionate in rats (author's transl)] [Japanese], *Japanese Journal of Antibiotics*, **28(4)**, 558-66, Aug.
- 윤효인, (1995): 양식어류(이스라엘 잉어, 넙치, 뱀장어, 무지개 송어)에 있어서 ciprofloxacin의 HPLC에 의한 어체내 잔류분석에 관한 연구보고서, 충남대학교 수의과 대학.