

## 원유중 Ivermectin 구충제의 잔류실태 조사

박준조\*, 육지혜, 김휴경, 박혜원, 김인경, 이우성<sup>1</sup>

경기도 축산위생연구소, <sup>1</sup>서울우유  
(접수 2007. 8. 20, 게재승인 2007. 9. 23.)

### Examination of ivermectin residues in raw milk after skin administration

Jun-Jo Bark\*, Ji-Hea Youk, Hu-Kyoung Kim, Hye-Won Park,  
In-Kyung Kim, Woo-Seong Lee<sup>1</sup>

*Gyeonggi Veterinary Service, Suwon, 441-460, Korea; <sup>1</sup>Seoul Milk, Seoul, 131-704, Korea*  
(Received 20 August 2007, accepted in revised form 23 September, 2007)

#### Abstract

This study was conducted two kinds of aims: 1) to modify the analytical methods (conditions) by high performance liquid chromatography-fluorescence detector for the detection of residual ivermectin in raw milk, 2) to provide basic information for the evaluation of standard of the residual ivermectin in raw milk.

It could be considerable that negative ion spectra can be better method in the LC/MS analysis for the detection of residues. Characteristic daughter ions were observed in negative ion spectra, however, linear line was not formed in positive ion one.

Three Holstein cows (500±10kg) were applied to commercial ointment of ivermectin just one time at the first day of test, and residues in raw milk were examined for 20day after administration. The limit of detection (LOD) was 0.65ng (n=5) by HPLC/FLD, and recovery rates were 87.85%~99.47%. The peak was observed at the 4th day, and residues lasted to the end. Thus ivermectin was prohibited when lactating.

---

Key words : Ivermectin, Liquid chromatography-fluorescence detector, Negative ion spectra, Daughter ion, LC/MS

---

\* Corresponding author

Phone : +82-31-299-5470, Fax : +82-31-249-5304

E-mail : junjo99@gg.go.kr

## 서 론

Ivermectin은 streptomyces avermectins에서 생성된 avermectin B<sub>1</sub> 유도체로서 선충류와 절족류에 대한 구충효과가 탁월한 광범위 구충제로 많이 사용되고 특히 장의 내부 기생충인 선충류의 구충효과에 탁월한 것으로 알려져 있으며 사람, 개, 고양이, 말, 소, 양 및 돼지에 기생하는 내·외부 기생충에 대하여 효과적이다. 특히 반추류와 돼지에서 선충류와 폐충 등의 내부기생충과 진드기 등의 외부 기생충 구제제로 이용되고 있다. Ivermectin은 처음 발견한 이후 많은 연구에 의해 구충 효과가 신경세포에서 근육세포로의 신경전달을 억제하는 gamma-aminobutyric acid (GABA)의 방출을 방해함으로써 충체를 마비시켜 구충하는 작용기전이 확인되었고, 작용방법도 비가역적이어서 약효가 오래 유지되는데 이는 GABA 분비가 지속적으로 증가되기 때문인 것으로 보고되고 있다<sup>1-3)</sup>.

또 투여방법도 다양하여 경구, 피하, 근육으로 투여하는 방법이 사용되고 있으며, 최근에는 피부에 도포하는 방법을 이용함으로써 축산 농가 및 낙농가에서 사용하기 쉽게 개발되어 그 사용이 날로 증가되고 있는 추세이다.

Ivermectin 대사는 대부분 간장에서 대사되어 분변을 통하여 체외로 배출되며 배출반감기는 투약방법과 동물의 종류에 따라 다르나 보통 0.5~7일로 비교적 체외 배출이 느리게 일어나 조직에 잔류가능성이 높아 도축 전 안전휴약기간을 35일로 권장하고 있으며 비유중인 소에서는 사용이 금지되어 있을 뿐만 아니라<sup>1)</sup> 잔류허용기준도 Codex에서 소의 간 100, 지방 40, 우유 10, 돼지 간 15, 지방 20, 양의 간 15, 지방 20ppb<sup>4)</sup> 설정되어 있다. 우리나라도 소의 간 0.1, 지방 0.04, 돼지의 간 0.015, 지방 0.02ppm으로<sup>5)</sup> 설정하고 있으나 우유에는 우리나라의 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 실정이다.

잔류물질은 여러 가지 방법의 추출 및 정제과정이 있으며 분석장비도 매우 다양하여 측정하고자 하는 물질의 특성을 미리 파악하여 가장 적합한 분석방법을 선택하여야 한다. ivermectin 분석은 Fig 1과 같이 화학구조가 hexahydrobenzofuran환을 가지고 있어 UV 흡광도가 낮아 재료를 액-액 추출하여 solid phase extraction 방법으로 정제한 다음 hexahydrobenzofuran환의 유도체화 과정을 거쳐 형광검출기로 검사하는 방법<sup>6, 7)</sup>이 일반적이거나 정성실험에 어려움이 있어 LC/MS 분석기술이 이용되고 있다.

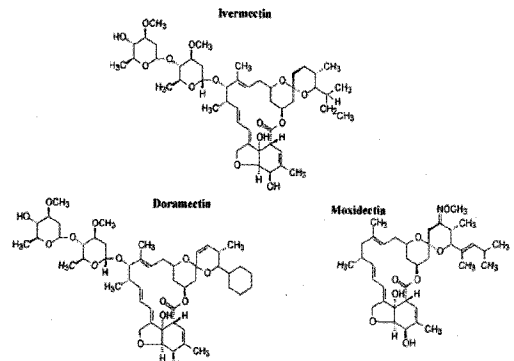


Fig. 1 Structures of avermectins

LC/MS를 이용한 ivermectin의 확인방법으로 positive 이온화는  $[M+H]^+$  생성되지 않고  $[M+Na]^+$  생성되며 직선상의 검량곡선을 작성할 수 없으며<sup>8,9)</sup> 실험실에서 Na를 제거하기는 어려운 현실을 감안하여 APCI negative 이온화 방법을 많이 활용하고 있는 실정이다. negative 이온화는 직선상의 검량선 뿐만 아니라  $[M-H]^-$  생성되며 특징적인 조각이온이 형성되어 정성분석에 용이하다고 보고되어 있다<sup>10,11)</sup>.

이에 본 조사는 ivermectin 구충제의 잔류량을 정성정량 분석하기 위하여 복잡한 추출 및 정제과정을 단순화시켜 HPLC 형광검출기와 LC/MS로 쉽게 분석할 수 있도록 분석조

건을 확립하고 피부투과도를 증진시켜 차별화된 약효 운반체를 개발하여 생산된 ivermectin 도포제를 함유하는 소의 등위에 도포하는 방법으로 투여하여 매일 잔류량을 측정하여 안전휴약기간 설정에 근거를 마련하고 원유위생관리의 지표자료로 제시하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시 약

Ivermectin의 표준품과 trifluoroacetic acid, N-methylimidazole, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>는 sigma(USA)사 제품의 시약특급을 사용하였으며 acetonitrile, methanol, water는 B&J ACS(SK chemical, Korea)의 HPLC용 제품을 사용하였다.

표준용액은 ivermectin 10.0mg을 methanol에 용해하여 100ml 플라스크에 표선까지 채우고 냉장보관하면서 사용하였으며, 이 용액 5ml를 취하여 이동상으로 용해하여 50ml (10 µg/ml)되게 하고 이를 다시 100ng, 200ng, 300ng이 함유되도록 희석하여(사용 직전에 제조) 검량곡선을 작성하였다.

HPLC 형광검출기로 분석하기 위하여 trifluoroacetic acid:acetonitrile (1:2) (TFA sol)과 N-methylimidazole:acetonitrile (1:1) (MIZ sol)을 쓸 때마다 제조하여 사용하였다.

### HPLC 및 LC/MS 분석조건

Ivermectin을 정성정량분석하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)는 펌프, 시료자동주입기, 형광검출기(FLD), 질량분석기(LC/MS)는 1100 series (Agilent, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Hypersil BDS C<sub>18</sub> (5.0µm, 250×3.0mm id)를 사용하였다. data system은 Chemstation (Hewlett Packard USA)을 사용하였으며 이동상은 초기에 물100%, 35분에 70% methanol을 0.5ml/min으로 gradient

를 작성하였다.

Mass spectrophotometer의 분석조건은 mass range : 100-1,000 amu, fragment voltage : 110V, polarity : negative, ionization mode : API-ES, nebulizer pressure : 30 psi, dry gas flow 12 l/min, capillary voltage : 4,000V로 측정하였다.

### 실험동물 약물투여 및 재료의 채취

실험동물로 사용된 젖소는 약 24개월 이상 사육된 착유하고 있는 홀스타인으로 체중은 500±10kg인 3두를 사용하였다. 하이백틴 도포용(ivermectin 5.0mg/ml, 삼양애니팜, 한국) 구충제를 체중 1ml/10kg을 등 위에 도포하여 투약하였으며 투약을 실시하면서 두당 약 50ml씩 원유를 채취하여 공실험재료로 사용하였고 투약후 20일까지 매일 같은 시간에 1회 착유하여 50ml를 냉장보관하면서 재료의 추출방법에 따라 추출하여 3회 반복 실험하였다.

### 재료의 추출

재료의 추출은 Sheridan등<sup>12)</sup>의 방법을 응용하여 Fig 2와 같이 원유 10ml을 50ml 원심튜브에 취한 후 acetonitrile 10ml을 가하고 약 10분간 균질화한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 NaCl 1.5g 가하여 혼합한 다음 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다.

상층액에 물 4ml과 NaCl 1.5g을 넣고 혼합하여 다시 원심분리한 다음 상층액에 MgSO<sub>4</sub> 4.0g을 가하여 혼합한 다음 원심분리 후 5ml를 취하여 농축한 다음 메탄올:물(1:9) 1ml에 용해한 후 0.2µm nylon syringe filter로 여과하여 LC/MS용 실험용액으로 하였고 원심분리 용액중 5ml는 농축하여 실험할 때 마다 제조한 trifluoroacetic acid:acetonitrile (1:2) 300µl에 용해한 다음 N-methylimida-

zole : acetonitrile (1 : 1) 200 $\mu$ l를 혼합하여 유도체화 시켜 0.2 $\mu$ m filter로 여과하여 갈색 바이알에 넣어 6시간 이내에 형광검출기로 정량 분석하였다.

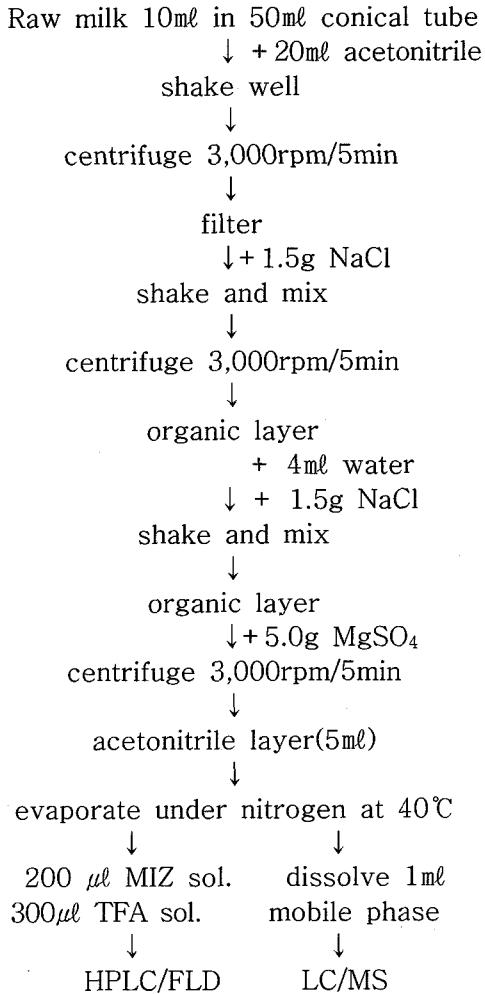


Fig 2. The sample preparation scheme of ivermectin in raw milk

### 결과 및 고찰

#### 검량곡선 작성 및 회수율

표준용액을 100ng, 200ng, 300ng이 함유 되도록 이동상으로 제조하여 HPLC/FLD로

측정하였을때 Fig 3과 같이 직선상의 검량곡선( $r=0.99991$ )을 나타내었다.

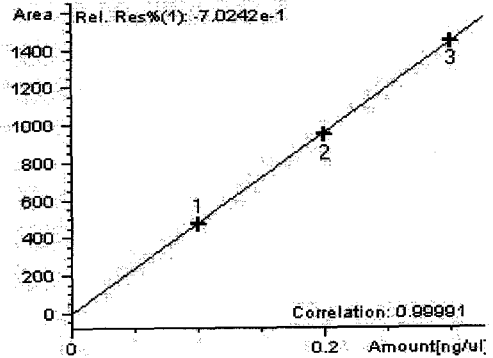


Fig 3. Calibration curve of standard

#### 검출한계 및 회수율

Ivermectin의 검출한계치를 측정하기 위하여 신호대 잡음(signal to noise) 비가 3:1이 되는 농도를 HPLC/FLD로 측정한 결과 0.65ng( $n=5$ )이었으며 Durden<sup>11)</sup>은 2가지 방법으로 7종의 abamectin계에 대한 검출한계치를 SPE로 정제하여 LC/MS/MS로 측정한 결과 0.2-0.5ng/ml이라고 보고하여 본 실험과 비슷한 결과를 나타냈다.

실험동물로 사용한 젖소에 약물을 투여하기 전에 미리 착유한 원유에 ivermectin을 50, 100, 200ng/ml씩 첨가하여 재료의 추출방법에 따라 추출하여 회수율을 측정한 결과 Table 1과 같이 87.85~99.47%로 매우 우수한 결과를 나타냈다. 또 Fig 4와 같이 공실험 결과 표준용액과 회수율 검사에 영향을 미치는 방해피크가 나타나지 않아 추출방법과 HPLC의 분석조건이 우수한 것으로 나타났다. Sheridan과 Desjardins는 6종의 abamectin계 구충제를 동시분석하였을 때 ivermectin 1.0ng/ml를 원유에 첨가하여 회수율을 측정한 결과 99.6%라고 보고하였고<sup>12)</sup>, Durden은 0.5~50ppb 농도에서 회수율이 96.4~101.4%로 보고하여<sup>11)</sup> 본 조사와 거의 비슷한 결과를 나타내고 있다.

Table 1. Recovery results of fortification in raw milk

Compound	Spiked amount (ng/ml)	Amount calculated(ng/ml)			Mean recovery (%)	RSD
Ivermectin	50	43.82	45.03	42.92	87.85	2.4
	100	92.21	95.08	94.27	93.85	1.6
	200	196.57	198.06	202.18	99.47	1.5

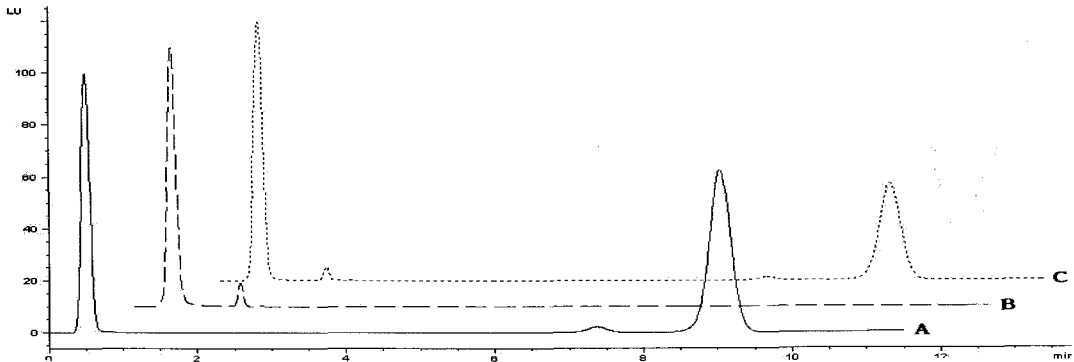


Fig 4. Chromatograms of ivermectin in (A)standard(50ng/ml), (B)Blank, (C)Recovery(50ng/ml)

Ivermectin 투약 후 잔류기간

피부도포용(ivermectin 5.0mg/ml) 구충제를 젖소 등에 뿌리고 매일 동일한 시간에 착유하여 분석한 결과 Fig 5와 같이 투약 3~4일에 가장 높은 34.6~42.1ng/ml로 나타났고 6일째부터 급격히 하락하였으며 투약후 20일 이후에도 잔류되는 것으로 나타났다. Fernanda 등은 면양의 경구와 피하에 ivermectin과 moxidectin을 투여한 후 면양 유에 잔류결과보고에서 경구투여하였을 때 유즙에 ivermectin의 농도가 0.5일에 가장 높게 나타났으며 11일에 미량이 잔류되었으며 피하에 투여하였을 때 2일째에 28.1ng/ml로 가장 높게 잔류되었으며 25일째에도 미량이 잔류되는 것으로 보고되어<sup>13)</sup> 투약방법과 최고잔류농도 및 잔류기간이 상당한 차이를 보이고 있으며 본 실험에서는 투약방법이 피부에 도포하는 방법으로 흡수시간 및 유즙으

로 이행기간 등 농도에 다소 차이가 있었으나 잔류기간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타나 ivermectin을 투약후 휴약기간은 35일 이상을 지켜야하고 가능하면 착유소에서는 구충제 사용을 금지하고 건유기간 동안에 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

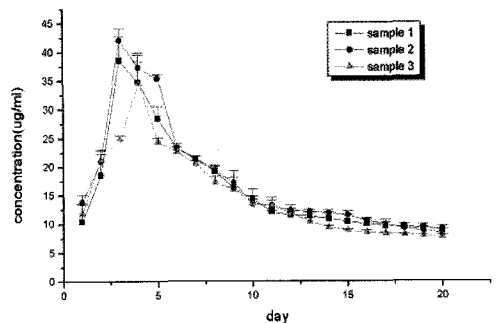


Fig 5. Ivermectin concentration in raw milk obtained after its skin administration on three dairy cattles

LC/MS에 의한 정성분석

Avermectin계의 구충제에 대하여 LC/MS 분석조건을 확립하기 위하여 이온화 방법은 API-ES로 하였고 검출기를 positive와 negative mode에서 spectrum을 비교실험한 결과 Fig 6과 같이 positive에서 이온화하였을 때  $[M+H]^+$  은 형성되지 않고  $[M+Na]^+$ 만 있어 정성실험에 어려워 negative에서 이온화하여  $[M-H]^-$  이온과 특징적인 조각이온을 형성하였다.

Durden는 우유에서 LC-MS-MS로 avermectin 등 7종에 대하여 positive와 negative 이온화 방법으로 분석하였는데 negative 이온화 방법이 직선상의 검량선과  $[M-H]^-$  이온이 형성되었으며 검출한계치도 0.6~60 ppb로 보고하여<sup>11)</sup> 본 실험과 일치한 결과를 나타내 avermectin계 구충제의 정성확인 실험을 위하여 LC/MS 이온화 조건은 negative 이온화 방법이 정성정량 검사방법으로 보다 정확한 것으로 사료된다.

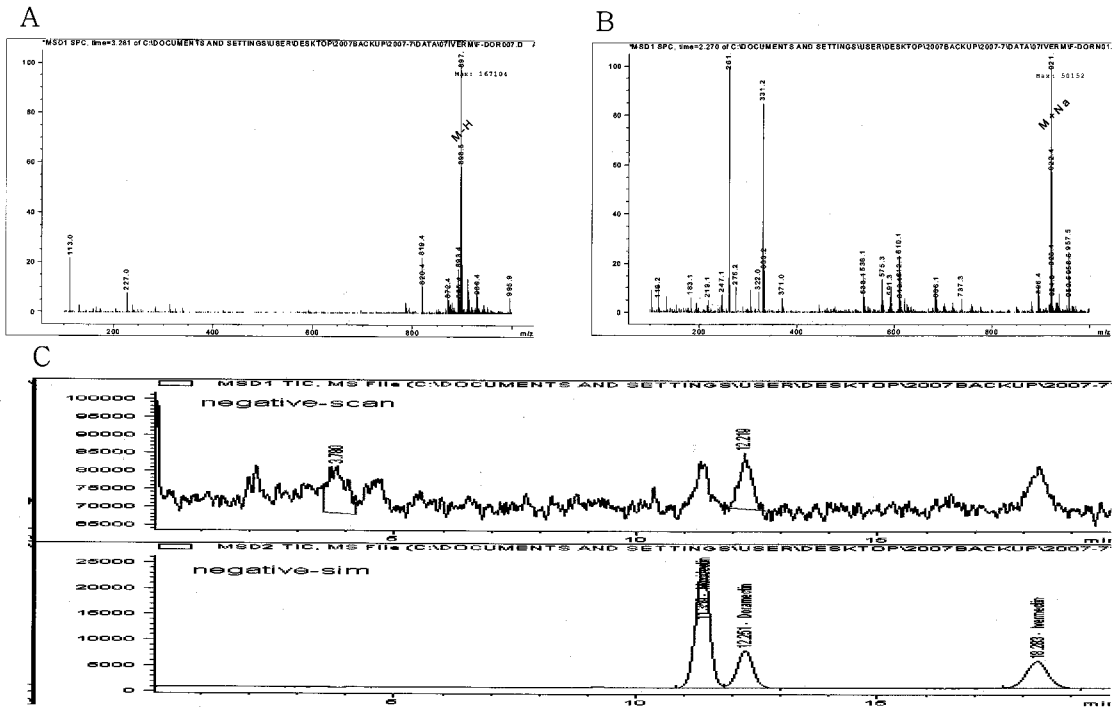


Fig 6. Negative(A) and positive(B) ion spectra of ivermectin and negative ion chromatograms (C) of the avermectins spiked into raw milk at 50ppb

결론

Ivermectin은 젖소의 내·외부 구충제로 널리 사용하고 있어 원유에 잔류될 가능성이 높아 HPLC 형광검출기와 LC/MS로 쉽게 분석할 수 있도록 분석조건을 확립하고 ivermectin 도포제를 착유하는 소의 등위에 도포

하는 방법으로 1ml/10kg씩 3두에 투여하여 20일 동안 매일 착유하여 원유중에 잔류된량을 측정된 결과 다음과 같다.

1. Ivermectin의 검출한계치는 HPLC/FLD로 측정된 결과 0.65ng (n=5)이었으며 회수율은 농도별로 87.85~99.47%로 매우 우수한 결과로 나타났다.

2. 피부도포용(ivermectin 5.0mg/ml) 구충제를 젖소 등에 뿌리 후 잔류량을 측정한 결과 투약 3~4일에 가장 높은 34.6~42.1ng/ml으로 나타났고 6일째부터 급격히 하락하였으며 투약후 20일째에도 8.3~9.1ng/ml으로 잔류되는 것으로 나타났다.

3. LC/MS 분석결과 positive 이온화에서  $[M+H]^+$  생성되지 않고  $[M+Na]^+$  생성되었으며 직선상의 검량곡선이 작성되지 않았으나 negative 이온화에서  $[M-H]^-$  생성되었으며 특징적인 조각이온(daughter ion)도 형성되어 정성정량분석에 적합하였다.

### 참고문헌

1. Paul AJ, Tranquilli W. 1989. *Current veterinary therapy*. 10 eds. WB Saunders Co, Philadelphia : 140-150.
2. Booth NH, Mcdonald LE. 1982. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 5 eds. Iowa State University Press, Ames : 842-844.
3. Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, et al. 1983. Ivermectin: apotent new antiparasitic agent. *Science* 221 : 823-828.
4. Codex Alimentarius Commission. 2005. Maximum residues limits for veterinary drug in foods, update as at the 28th session of the Codex Alimentarius Commission : 1-25.
5. 식품의약품안전처. 2002. 식품의약품안전청고시 제2002-22호. 동물용의약품의 잔류허용기준 : 1-7.
6. Pollmeier M, Maier S, Moriarty K, et al. 2002. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin analog (eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels. Method development and validation. *J Chromatogr B* 772 : 99-105.
7. Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD. 2000. Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst* 125 : 1741-1744.
8. Stout SJ, Wickremesinha E, daCunha AR, et al. 2000. Confirmation of moxidectin residues in cattle fat by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 83(6) : 1446-1450.
9. Yoshii K, Kaihara A, Tsumura Y, et al. 2000. Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 896 : 75-85.
10. Howells L, Sauer MJ. 2001. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSn. *Analyst* 126 : 155-160.
11. Durden DA. 2007. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J Chromatogr B* 850 : 134-146.
12. Sheridan R, Desjardins L. 2006. Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J AOAC* 89 : 1088-1094.
13. Imperiale F, Lifschitz A, Sallovitz J, et al. 2004. Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk resi-

박준조, 육지혜, 김휴경, 박혜원, 김인경, 이우성

dues in dairy sheep after oral and  
subcutaneous administration. *J Dairy*

*Res* 71:427-433.