

전복에 Oxytetracycline의 처리에 따른 잔류성 분석

김나영 · 조희성 · 한지도 · 박민우 · 김진우 · 김현정 · 지보영 · 원경미*
(국립수산과학원)

Analysis of Residual Oxytetracycline in Abalone, *Haliotis discus hannai* (Following OTC Treatment)

Na-Young KIM · Hee-Sung JO · Ji-Do HAN · Min-Woo PARK · Jin-Woo KIM ·
Hyun-Jeong KIM · Bo-Young JEE · Kyoung-Mi WON†
(National Fisheries Research and Development Institute)

Abstract

Oxytetracycline (OTC) has been widely used in aquaculture field as a therapeutic and prophylactic agent because of its broad-spectrum activity against gram-positive and negative bacteria. Residual oxytetracycline (OTC) was studied after spray treatment of cultured abalone, *Haliotis discus hannai*. Muscle concentration of OTC was determined after spray treatment (4,000, 7,000, 10,000 ppm) in the abalone. Muscle samples were taken at 0, 1, 3, 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 and 360 day post-dose. OTC analyses were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). In 4000, 7000 and 1000 ppm treatment for small size abalones, OTC levels at 1 day post-dose, have been dramatically decreased by 8.34, 3.35 and 4.47 ug/g, respectively. For medium size abalones, concentration were measured as 7.58, 15.62 and 7.8 ug/g, respectively. Those of large size abalones also were observed as 11.31, 12.38 and 15.28 ug/g, respectively, at 1 day post-dose. No significant differences in residual OTC depletion in muscles were observed between the size of abalones. More than 0.2 mg/kg of OTC was detected in muscle tissues and the residues were found over 60 days after treatment. It is expected that these results would contribute to improve recommended withdrawl periods of OTC for a safer seafood supply.

Key words : Abalone, *Haliotis discus hannai*, Oxytetracycline, HPLC, Oxytetracycline

I. 서론

양식산업이 발전함에 따라 고부가가치 양식품종의 생산기술 개발에 대한 양식현장의 요구가 증대되면서 전복양식 관심이 높아져 가고 있다. 전복은 2001년 전복가두리양식기술이 개발됨에 따라 양식생산량이 급격히 증가해 오고 있다

(Shin et al, 2008). 전복양식에 있어 전복생활사 특성 때문에 부착기질 (셸타)로부터 박리작업이 필요한데 전복의 수가 많으면 박리할 때 물리적 손상을 받을 수 있어 안전한 박리를 위해 여러 방법들이 개발되었고 (No, 1988; White et al., 1996; Han et al, 2003), 최근 전복 양식현장에서는 수산용의약품인 Oxytetracycline (OTC)를 전복

† Corresponding author : 055-640-4772 , kyoungmiwon@korea.kr
* 이 논문은 국립수산과학원 연구비 지원에 의해 운영되었음.

박리작업에 사용하고 있다 (Kim et al., 2012).

수산용의약품으로 허가된 OTC는 광범위 항생제로 Gram positive와 Gram negative 세균에 효과적이고, 양식어류에서는 비브리오병, 유클절증, 에로모나스병 슈도모나스증 등 세균성 질병 치료 및 질병 예방을 위해 사용되는데, 전복에서는 비브리오병 (Handlering et al., 2006), *Candidatus Xenohaliotis* 감염시 사용되고 있다(Friedman et al., 2007). 1일 사용량은 넙치의 경우 어체 중 1 kg당 역가 50 mg 이하로 사료에 혼합하여 경구 투여하고 휴약기간은 40일로 규정하고 있으며 (동물용의약품 안전사용기준, 국립수의과학검역원 고시 제 2007-25호), 식품위생법에 따른 OTC의 잔류허용기준은 어류, 갑각류, 전복에서 0.2 mg/kg 이하로 규정되어 있다.

또한, 항생제 (특히, 옥시테트라사이클린)의 경우 해양 무척추동물인 전복에 사용시 먹이섭취가 느리고 항생제의 활성이 감소된다 (reviewed by Treves-Brown, 2000). 전복은 다른 동물에 비해 대사작용 배출이 느리며 특히, OTC의 경우 일주일동안 잔류가 중요하므로 출하시에 잔류 테스트가 필요하다 (Handlering, 2006).

현재 전복 종묘배양장에서는 선별을 위해 파판으로부터 전복을 박리시킬 때, 핸들링에 의한 상처 및 스트레스로 인해 세균성 질병에 노출되기 쉬운 것으로 인식하고 있으므로 박리와 세균성 질병 치료를 한번에 해결하기 위해 OTC를 사용하고 있다.

따라서 본 연구에서는 OTC의 빈번한 사용으로 OTC 잔류의 위험성이 있을 것으로 판단되어 산업현장과 동일하게 스프레이법으로 실험하여 전복의 느린 먹이섭취와 느린 약물 배출 그리고 전복의 생활사로 인한 부착기질에서 효과적인 박리를 위해서 약물 사용시 영향 및 잔류 정도를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 실험동물

본 연구에서 실험에 사용된 Oxytetracycline은 Sigma (USA) 제품을 이용하였다. 기기분석을 위한 HPLC용 acetonitrile, methanol 및 증류수 등 용매류는 Merck사 (Germany)를 사용하였으며, 기타 실험에 사용된 모든 시약은 특급 이상을 사용하였다.

양식전복에 대한 잔류성 시험은 2013년 1월 ~ 2013년 12월까지 1년 동안 진행하였으며, 본 실험에 사용한 전복은 항생제 투여와 질병 이력이 없는 건강한 참전복, *Haliotis discus hannai*을 크기 (치패, 중패, 성패)별로 구분하여 실험을 진행하였다. 치패는 각장 26.7±2.67 mm, 중패는 각장 66.7±3.69 mm, 성패는 각장 80.9±3.53 mm 개체를 각 10미씩 SW연구소 육상종묘장 내에서 실시하였다.

2. 약물처리

Kim et al. (2012) 에 따라 박리에 효과적인 농도를 기준으로 전복박리에 실제 잔류량을 측정하기 위해 OTC 미처리구, 4,000, 7,000, 10,000 ppm으로 나누어서 스프레이로 10초간 분사하여 실험하였다.

3. 시료채취

매일 일정한 시간 (오전 10시 전후)에 각 처리구 수조 (치패, 중패, 성패) 와 미처리구 수조에서 전복 3미씩 채취하였고, 채취한 전복은 -20℃에 바로 저장하여 HPLC를 이용하여 분석하였다.

4. HPLC 분석조건

전복에서 OTC의 분석은 Oxalic acid와 Acetonitrile로 추출하여 HPLC로 분석하는 Jung et al. (2008)의 분석 방법을 사용하였다 <Table 1>. 즉, 전복 근육 1 g에 0.01 M Oxalic acid (1ml)를 넣고 homogenizer로 충분히 분쇄하여 균질화한 뒤

acetonitrile을 첨가하여 OTC를 추출하였으며, OTC 검출에는 HPLC Chromatograph system (Agilent 1200)을 이용하여 분석하였다

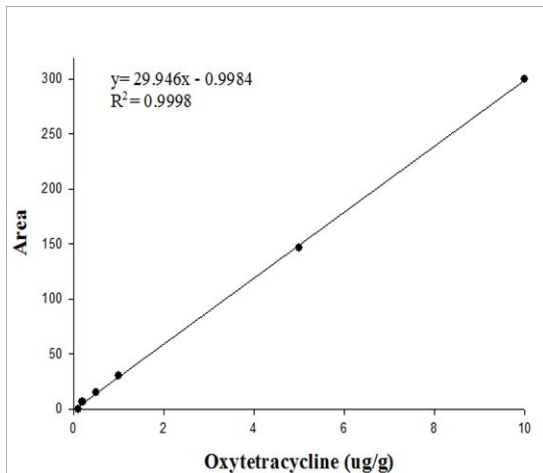
<Table 1> HPLC instruments and analysis conditions for oxytetracycline

Parameters	Analytical conditions
Instrument	Agilent 1200
Detector	UV(360nm)
Column	ZORBAX SB-C18, 4.6×150mm
Mobile phase	0.01M Oxalic acid: MeOH:ACN = 7:1:1
Flow rate	1.0ml/min
Column temperature	40℃
Injection volume	20 ul

III. 결과 및 고찰

1. 표준검량선 및 회수율

OTC의 표준 검량선의 작성은 OTC 표준용액을 acetonitrile로 0.1, 0.2, 1, 5, 10 ppm으로 희석하여 분석한 결과, 농도에 따라 회귀직선 기여율 ($R^2=0.9997$)이 높게 나타나 양호한 검량모형을 도출하였다 [Fig.1].



[Fig. 1] Calibration curve for the assay of Oxytetracycline

이 실험의 OTC의 검출한계 (LOD, Limit of Detection)은 0.05 ppm이고, 정량한계 (LOQ, Limit of Quantitation)은 0.17 ppm로 측정되었으며, 회수율은 78~84%로 나타났다.

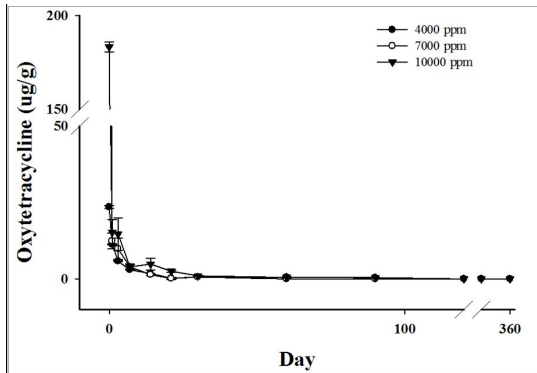
여러 종의 근육에 대한 OTC의 회수율은 담치에서는 73±9% (Coyne et al., 1997), 성게의 경우 72.9±7.6% (Campbell et al., 2001), 굴에서는 79.8% (Pouliquen et al., 1992)로 이 실험방법은 여러 실험들과 비교하여 이 분석 방법이 안정적인 방법임을 나타내었다.

2. 양식산 전복의 oxytetracycline의 잔류성

Oxytetracycline은 넙치, 우럭, 방어, 돔, 뱀장어, 송어의 비브리오병에 사용되고, 전복에서도 비브리오에 효과적이어서 많이 사용하고 있다. 또한, 물에 잘 녹고 낮은 bioavailability를 가지므로 약용방법으로 많이 사용하고 있다. 하지만 해수에서 사용시 chelating 때문에 bioavailability의 감소로 농도의 증가를 야기시켜 (Treves-Brown, 2000), 항생제 사용시 제약이 따른다. 따라서 전복의 생활사 특성으로 인해서 OTC 사용시 스프레이로 분사하여 사용함으로써 휴약기간에 대한 기초연구를 실시하였다.

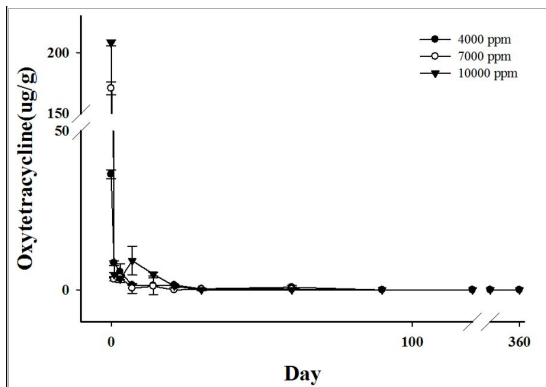
사용된 전복은 각 크기별 (치패, 중패, 성패)로 나누어서 미처리구, 4,000, 7,000, 10,000 ppm으로 스프레이로 분사하여 약물을 처리하였고, 실험기간 동안 평균수온은 15±12℃를 유지하였다.

실험 전복에 대한 항생제 처리 후 전복의 근육내 OTC의 잔류량은 스프레이 처리 후 급속도로 감소하기 시작하여 최대농도를 기준으로 치패의 경우 4,000, 7,000, 10,000 ppm 처리구에서 1일째 8.34±0.73 ug/g, 3.35±0.52 ug/g, 4.79±0.62 ug/g으로 급격한 약물 감소가 나타났고, 7일째부터는 완만하게 감소하여, 최대잔류허용량 (Maximum Residue Limit, MRL) (0.2ppm)까지는 60일 전후로 나타났다 [Fig 2].



[Fig. 2] Concentration(ug/g) of OTC in muscle of small size of abalone by spray of 4,000ppm, 7,000ppm and 10,000 ppm, respectively

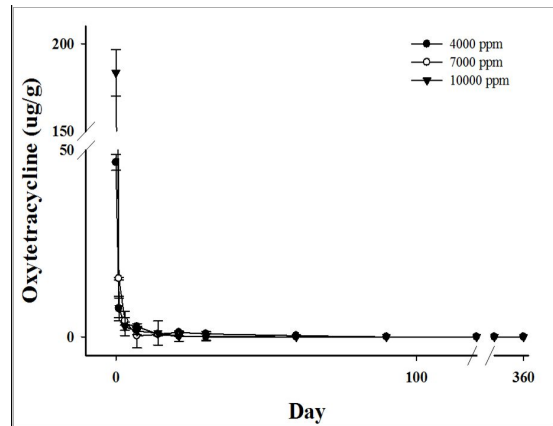
중패의 경우 4,000, 7,000, 10,000 ppm 처리구에서 1일째 7.58 ± 3.25 ug/g, 15.62 ± 0.34 ug/g, 7.80 ± 2.65 ug/g 농도로 크기에 관계없이 급속히 감소하는 경향을 보이다가, 7일째부터는 서서히 감소하여 0.2 ppm이하 검출까지는 60일 이상이 소요되었다 [Fig 3].



[Fig. 3] Concentration(ug/ g) of OTC in muscle of medium size of abalone by spray of 4,000ppm, 7,000ppm and 10,000 ppm, respectively

성패의 경우 4,000, 7,000, 10,000 ppm 처리구에서 1일째 11.31 ± 0.12 ug/g, 12.38 ± 2.6 ug/g, 28 ± 4.2 ug/g 농도로 크기에 관계없이 급속히 감소하는 경향을 보이다가, 7일째부터는 서서히 감소

를 하면서 0.2 ppm이하 검출까지는 60일 이상이 소요되었다 [Fig 4]. 처리구의 농도들 사이에서 OTC 농도 감소가 발생하나 유의적이지 못하였다.



[Fig. 4] Concentration(ug/ g) of OTC in muscle of large size of abalone by spray of 4,000ppm, 7,000ppm and 10,000 ppm, respectively

많은 수생동물 연구중에서 OTC 배출에 관한 연구는 one-compartment model (Chen et al. 2004; Wang et al. 2004)에서 보고되고 있으며, 소화선또는 간에서 OTC의 농도는 같은 기간의 근육에서 보다 훨씬 높다고 알려져 있다 (Rigos et al. 2002; Chen et al. 2004; Wang et al. 2004; Friedman et al. unpubl, data; Rosenblum 2006). OTC의 경우 지방에 빠르게 축적되기 때문에 (Jobling, 1994), 전복은 식품으로 섭취시 내부장기 보다는 근육을 섭취하므로 근육을 채취하여 실험을 하였다. 현장에서 약물 처리방법시에 동일한 방법으로 처리시 약물의 잔류가 어느 정도에서 얼마나 잔류가 일어나는지 확인하였다. 그 결과 전복의 크기가 OTC의 잔류 상관관계는 나타나지 않았으며, 전반적으로 60일 전후에서 0.2 ppm이하로 검출되는 것을 확인할 수 있었다.

Oxytetracycline의 경우 수산용의약품으로 허가

된 약품으로 현재 MRL은 0.2 ppm이며 휴약기간은 송어·메기·뱀장어는 30일, 넙치는 40일, 참돔·방어는 20일로 지정되어 있으나 현재 전복은 휴약기간은 없다. FDA에서도 현재 전복에 사용 중인 OTC의 경우 35일로 권장하고 있고, 이 실험결과를 토대로 전복에 OTC 사용후 휴약기간을 60일로 한다면 안전한 수산물 공급에 도움이 될 것이라 사료 된다.

References

- Campbell, D. A. · Pantazis, P. and Kelly, M. S.(2001). Impact and residence time of oxytetracycline in the sea urchin, a potential aquaculture species, *Aquaculture* 202, 73~87.
- Chen, C. Y. · Getchell, R. G. · Wooster, G. A. · Craigmill, A. L. and Bowser, P. R.(2004). Oxytetracycline residues in four species of fish after 10-day oral dosing in feed. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 208~219.
- Coyne, R. · Hiney, M. and Smith, P.(1997). Transient presence of oxytetracycline in blue mussels *Mytilus edulis* following its therapeutic use at a marine Atlantic salmon farm, *Aquaculture* 149, 175~181.
- Friedman, C. S. · Trevelyan, G. · Robbins, T. T. · Mulder, E. P. and Fields, R.(2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*, *Aquaculture* 224,1~23.
- Han, S. H. · Kim, B. R. · Won, S. H. and Kim, J. W.(2003). Effect of urea on the exfoliation of juvenile abalone, *Haliotis discus Reeve*, *Journal of Aquaculture* 16(4), 223~228.
- Handler, J. · Harris, J. · Carson, J. and Taylor D.(2006). Abalone aquaculture subprogram: The potential for antibiotic use in abalone for disease control. Final Report January FRDC Project No. 2000/205.
- Jobling, M.,(1994). *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London.
- Jung, S. H. · Choi, D. L. · Kim, J. W. · Jo, M. R. · Seo, J. S. and Jee, B. Y.(2008). Pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by intramuscular injection, *Journal of Fish Pathology* 21(2), 107~117.
- Kim, W. S. · Lee, S. W. · Kim, J. · Choi, D. I. · Oh, M. J. and Hwang, D. J.(2013). Exfoliation of abalone, *Haliotis discus hannai* using organic acid. *Journal of Fish Pathology*, 26(1), 51~56.
- No, S. (1988). Studies on the seed production of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, Pukyung National university. 87~101.
- Pouliquen, H. · Keita, D. and Pinault, L.(1992). Determination of oxytetracycline in marine shellfish (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Scrobicularia plana*) by high-performance liquid chromatography using solid-phase extract, *Journal of Chromatography* 627(1-2),287~293.
- Rigos, G. · Alexis, M. · Andriopoulou, A. and Nengas, I.(2002). Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures, *Aquaculture* 210, 59~67.
- Rosenblum, E. S.(2006). Pharmacokinetics and efficacy of oxytetracycline in WS-RLP-infected abalone, University of California, Davis, California, 127.
- Shin, Y. T. · Jang, H. S. and Kim, B. T.(2008). Production control and distribution reform as a way to develop the abalone aquaculture industry, *Korea Maritime Institute* 12, 1~137.
- Treves-Brown, K. M.(2000). Tetracyclines. In *Applied Fish Pharmacology*, pp. 64~82. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Wang, Q. Liu, Q., and Li, J.(2004). Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in perch (*Lateolabrus janopicus*) and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration, *Aquaculture* 237, 31~40.
- White, H. I., Hecht, T. and Potgieter, B. (1996). The effect of four anaesthetics on *Haliotis midue* and their suitability for application in commercial abalone culture. *Aquaculture* 140, 145~151.

-
- 논문접수일 : 2014년 07월 14일
 - 심사완료일 : 1차 - 2014년 08월 13일
2차 - 2014년 11월 17일
 - 게재확정일 : 2014년 11월 26일